

**Chemische und enzymatische Synthese modifizierter
Nukleinsäuren für die Analytik mit Hilfe der MALDI-TOF
Massenspektrometrie**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Carsten Siegert

aus Hamburg

Hamburg 1999

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

2. November 1999

Gutachter :

Prof. Dr. H. Köster

Prof. Dr. Dr. h.c. W. Francke

Die experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von November 1995 bis Januar 1999 unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Köster am Institut für organische Chemie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg und soweit nötig bei der Firma Sequenom - Gesellschaft für industrielle Genomanalytik mbH, Hamburg, durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Hubert Köster danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine inspirierenden Visionen.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Klima der Zusammenarbeit.

„Damit das Mögliche entsteht, muß immer wieder das Unmögliche versucht werden.“

Hermann Hesse

Inhalt

	Abkürzungsverzeichnis	III
I	Einleitung	1
1	Wachsende Bedeutung der DNA-Analytik	1
2	Nachteile klassischer Methoden der DNA-Analytik	3
3	MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Analyse von Biomolekülen	4
4	Massenspektrometrie von Nukleinsäuren	7
II	Problemstellung	9
III	Ergebnisse und Diskussion	11
1	Einführung	11
2	Das Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinsystem	13
	2.1 Biologische Bedeutung	13
	2.2 Nomenklatur	14
3	Synthese von 7-Deaza-2'-desoxyguanosin und 7-Deaza-2'-desoxyadenosin	15
	3.1 Darstellung der Aglykone	15
	3.2 Synthese geeigneter Akzeptoren für Glykosidierungsreaktionen	17
	3.3 Synthese von Glykosyldonoren	19
	3.4 Glykosidierungsreaktionen	23
	3.5 Abspaltung der Schutzgruppen aus den Glykosidierungsprodukten	31
4	Chemische Festphasensynthese von Oligodesoxynukleotiden	33
	4.1 Die Phosphoamiditmethode	33
	4.2 Darstellung von Monomeren für die DNA-Synthese	36
	4.3 Benzoyl- und Isobutyryl-Gruppe als exozyklische Aminoschutzgruppen .	38
	4.4 4- <i>tert</i> -Butylphenoxyessigsäure als Schutzgruppe für exozyklische Aminogruppen	42
	4.5 Phosphoamiditsynthese	47
	4.6 Festphasengebundene Synthese modifizierter Nukleinsäuren	49
5	Enzymatische Darstellung modifizierter Nukleinsäuren	55
	5.1 Die Polymerasekettenreaktion	55
	5.2 Wahl von Primer-Template-Systemen für die PCR	56
	5.3 Wahl einer geeigneten DNA-Polymerase für die PCR	57
	5.4 Erfolgreicher Einbau der modifizierten Triphosphate	58

5.5	Effektivität des Einbaus von 7-Deazanukleosidtriphosphaten	58
6	Analytik doppelsträngiger DNA mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie	63
6.1	Analyse der 103-mer PCR-Produkte aus M13mp18	65
6.2	Analyse der 99-mer PCR-Produkte aus pHis6Bap	68
6.3	Restriktionsverdau der 99-mer PCR-Produkte	74
6.4	Ribomodifizierte Primer zur Darstellung 7-deaza-modifizierter Nukleinsäuren	75
7	Massenspektrometrie einzelsträngiger DNA	77
7.1	Analytik synthetischer Homopolymere von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin .	77
7.2	Das Streptavidin-Biotin-System	78
7.3	Asymmetrische PCR mit biotinmodifizierten Primern	80
7.4	Darstellung und Massenspektrometrie komplett c ⁷ -modifizierter Nukleinsäuren	83
8	DNA-Sequenzanalyse	87
8.1	Vermessung einer modifizierten synthetischen DNA-Leiter	87
8.2	DNA-Sequenzierung mit Hilfe einer Endonuklease	90
9	Modifikation des Zuckers zur Stabilisierung der DNA	95
9.1	Enzymatische Reaktionen mit 2'-Fluoro-2'-desoxynukleosidtriphosphaten	95
9.2	2'-Fluorocytidin in einem synthetischen Oligonukleotid	96
9.3	Kombination von Basen- und Zuckermodifikation	97
10	Konzept eines massenspektrometrischen Polymerase-Inkorporations-Assays ..	100
IV	Zusammenfassung	103
V	Summary	105
VI	Diskussion und Ausblick	107
VII	Experimenteller Teil	113
VIII	Literaturverzeichnis	175

Abkürzungsverzeichnis

3-HPA	3-Hydroxypikolinsäure
A	Adenosin, 2'-Desoxyadenosin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B/W	<i>Binding and Wash</i>
Bio	Biotinyl-
Bn	Benzyl-
bp	Basenpaar(e)
Bz	Benzoyl-
C	Cytidin, 2'-Desoxycytidin
Ci	Curie
CPG	<i>Controlled Pore Glas</i>
δ	chemische Verschiebung (NMR)
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DCA	<i>Dichloracetic Acid</i> (Dichloressigsäure)
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMT	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl- (Dimethoxytrityl-)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient (UV/VIS)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
EtBr	Ethidiumbromid (5-Ethyl-3,8-diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid)
EtOH	Ethanol
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
fwhm	<i>full width at half maximum</i>
G	Guanosin, 2'-Desoxyguanosin
HMDS	Hexamethyldisilazan
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
ib	Isobutyryl-, 2-Methylpropanoyl-
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
m/z	Quotient aus Masse und Ladung
M	Molmasse
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i>
MeOH	Methanol
MPC	<i>Magnetic Particle Collector</i> TM

MS	Massenspektrometrie
N _d TP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NMWG	Nominale Molekulargewichtsausschlußgrenze
OD	Optische Dichte, Extinktion bei einer Schichtdicke von 1 cm
OPC	<i>Oligonucleotide Purification Cartridge</i> TM
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNK	Polynukleotidkinase
RF	replikative Form
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
RP	reverser Sequenzierprimer
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
T	Thymidin, 2'-Desoxythymidin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tBPA	4- <i>tert</i> -Butyl-phenoxyacetyl-
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i> (Trifluoressigsäure)
Tfl	<i>Thermococcus litoralis</i>
TMS	Tetramethylsilan
Tol	Toluoyl-, (4-Methylbenzoyl-)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UITma	aus <i>Thermotoga maritima</i> isolierte DNA-Polymerase
USP	universeller Sequenzierprimer
v/v	Volumen zu Volumen
Vent	aus <i>Tfl</i> isolierte und in <i>E.coli</i> klonierte und exprimierte DNA-Polymerase
VIS	<i>visible</i> (Bereich des sichtbaren Lichtes)

I Einleitung

1 Wachsende Bedeutung der DNA-Analytik

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist eine der wichtigsten Substanzen überhaupt: Da die genetische Information aller lebender Organismen in ihrer Struktur kodiert wird, ist sie *das* Molekül des Lebens^{1,2}. Beim Menschen besteht das komplette Genom aus etwa 300,000 Genen auf insgesamt 24 Chromosomen³. Jedes Gen kodiert dabei ein bestimmtes Protein, das nach seiner Expression via Transkription und Translation eine bestimmte biochemische Aufgabe in der lebenden Zelle ausübt. Mutationen, d. h. Veränderungen der DNA Sequenz, können in klinisch manifesten Krankheitsbildern resultieren, indem sie zur Expression von Proteinen führen, die eine veränderte biochemische Aktivität zeigen, oder in einigen Fällen diese sogar komplett verlieren. Man unterscheidet verschiedene Arten von Mutationen; diese umfassen Nukleotiddeletion, -insertion oder -austausch (d.h. Punktmutation).

Mehr als 3,000 genetisch bedingte Krankheiten sind inzwischen bekannt⁴, darunter z.B. Alzheimer⁵, Mukoviszidose (zystische Fibrose^{6,7,8}), sowie bestimmte Arten der Hämophilie oder der Muskeldystrophie⁹. Neben vererbaren Krankheiten, die auf die Mutation bestimmter Gene zurückzuführen sind, können auch bestimmte Geburtsfehler auf chromosomalen Abnormalitäten beruhen wie z.B. die recht verbreitete Trisomie 21 (eines von 700 Lebendgeborenen betroffen) oder das auf einer Aneuploidie der Geschlechtschromosomen beruhende Klinefelter-Syndrom (XXY, einer von 590 lebendgeborenen Männern). Darüber hinaus gibt es zunehmend Hinweise, daß das Vorhandensein bestimmter DNA-Sequenzen ein Individuum für eine Reihe von Krankheiten besonders prädisponieren kann. So zum Beispiel für Diabetes, Arteriosklerose, Obesitas, eine Reihe von Autoimmunkrankheiten und auch verschiedene Krebsarten wie z.B. Brust-, Gebärmutter- und Lungenkrebs.

Die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist die Basis, um die Ursachen solcher Krankheiten, die auf genetischen Defekten beruhen, zu verstehen. Dieser enormen Herausforderung für die Naturwissenschaft stellen sich zahlreiche Forschungsgruppen auf der ganzen Welt, die ihre Bemühungen im Rahmen des sogenannten humanen Genom-Forschungsprogramms (Humane Genome Project, HUGO^{10,11,12}) institutionalisiert haben. Die Teilnehmer haben sich zum Ziel gesetzt, das komplette menschliche Genom bis zum Jahre 2003 zu sequenzieren. Auch wenn der erfolgreiche Abschluß des humanen Genomprojektes oder ähnlich gelagerter Projekte in Landwirtschaft und Tierzucht einen großen Erfolg für die Wissenschaft darstellen wird, so ist aber allein durch das Vorliegen der Sequenz des menschlichen Genoms noch keinerlei Aussage über deren Bedeutung möglich.

Es wird sich daher eine zweite Phase des vergleichenden Sequenzierens und der Katalogisierung der genetischen Varianz zwischen den verschiedenen Individuen anschließen müssen¹³. Das hiermit verbundene immens hohe Probenaufkommen erfordert Verfahren, die eine schnelle und kostengünstige DNA-Analytik ermöglichen. Für diese zweite Phase rechnet man mit einem Zeitbedarf von ca. 40 Jahren bei weiterer Anwendung etablierter Verfahren.

Nimmt man an, daß lediglich ein Promille aller Nukleotide heterozygot ist, bedeutet dies, daß die Nukleotidsequenz zweier verglichener Gene bei unterschiedlichen Individuen niemals identisch sein wird, ohne das es sich hierbei um eine Mutation im eigentlichen Sinne handelte¹⁴. In den meisten Fällen wird sich daher ein Phänotyp nicht einfach aufgrund einer einzigen spezifischen Veränderung der Nukleotidsequenz zuordnen lassen. Ein Phänotyp wird viel häufiger auf einer ganzen Reihe von unterschiedlichen Veränderungen in einem oder mehreren Genen beruhen. Zu entwickelnde Methoden der DNA-diagnostischen Zuordnung von Krankheitsbildern werden also in solchen Fällen darauf angewiesen sein, das gesamte Gen, oder sogar mehrere Kombinationen von Genen, auf Mutationen hin zu untersuchen¹⁵. Diese Anforderungen können kaum mit konventionellen auf Gelchromatographie oder Hybridisierung basierenden Sequenzierverfahren in einer angemessenen Zeit und mit der notwendigen Präzision bewältigt werden.

Statistische Überlegungen zeigen, das bereits relativ kurze Nukleinsäuresequenzen verwendet werden können, um normale und defekte Gene in höheren Organismen eindeutig zu identifizieren. Viren und andere infektiöse Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Pilze, Hefen und Protisten) enthalten Nukleinsäuresequenzen, die sich von denen des Trägerorganismus unterscheiden lassen. Daher lassen sich infizierte Organismen allein auf Grundlage dieser spezifischen DNA Sequenzen entdecken und identifizieren^{16,17}. DNA Sequenzen können sogar als individueller Fingerabdruck dienen, um verschiedene Individuen derselben Spezies zu unterscheiden¹⁸. Eine Methode, die z.B. zur Aufklärung von Sexualdelikten in Form des DNA-Fingerprinting seit einiger Zeit in die moderne Forensik Einzug genommen hat^{19,20}. Durch diese vielfältigen Anwendungen ergibt sich zusätzlich ein großer Bedarf für schnelle, zuverlässige und preiswerte Verfahren zur DNA-Analytik mit möglichst hohem Probendurchsatz.

2 Nachteile klassischer Methoden der DNA-Analytik

Voraussetzung für die stetig zunehmende Rolle, die Methoden zur DNA-Analyse²¹ in Grundlagenforschung und klinischer Diagnostik spielen, war die Entwicklung effizienter Techniken zur spezifischen Vervielfältigung von DNA. Eine der wichtigsten Entwicklungen auf diesem Gebiet stellt die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dar. Diese 1985 von Mullis und Saiki vorgestellte Methode^{22,23} erlaubt die selektive Vervielfältigung des in der jeweiligen Fragestellung interessanten Analytmoleküles, eines spezifischen DNA-Fragmentes (auch als Template oder Matrize bezeichnet), aus einer heterogenen Population von DNA-Sequenzen. In der Theorie kann man ausgehend von einem einzigen DNA-Molekül in kurzer Zeit ohne großen Aufwand Kopien in jeder gewünschten Menge anfertigen. Insbesondere die Entdeckung thermostabiler DNA Polymerasen (z.B. aus *Thermus aquaticus*) hat erheblich zur Verbesserung des Prozesses beigetragen²⁴. Die zunehmende Bedeutung der Pathogendetektion auf Nukleinsäure-Basis wird durch aktuelle Änderungen im Verordnungswesen zur Blutproduktsicherheit unterstrichen. So müssen seit dem 01.04.1999 alle in Deutschland in den Verkehr gebrachten Blutprodukte mittels geeigneter Nukleinsäure Amplifikationstechniken, also z.B. der PCR, auf die Nachweisbarkeit des Genoms von Hepatitis C überprüft werden²⁵.

Ungeachtet der geschilderten Fortschritte und der Bedeutung der DNA Diagnostik ist ihr Einsatz im Routinebetrieb klinischer Laboratorien im Vergleich zu immunologischen Methoden noch immer eingeschränkt. Hauptursache hierfür sind die bisher nur schwer zu automatisierenden und arbeitsintensiven Verfahren²⁶. Zum Nachweis von DNA gibt es eine Reihe von Methoden. So können Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe der Gelelektrophorese durch Vergleich der Mobilität eines amplifizierten Nukleinsäure-Fragmentes mit einem bekannten Standard oder durch Hybridisierung^{27,28} mit einer zu der zu identifizierenden komplementären Nukleinsäuresequenz identifiziert werden.

Die Identifizierung ist jedoch bei diesen Methoden stets nur indirekt und erfordert die Anwesenheit einer wie auch immer gearteten Reporterfunktionalität, die mit hoher Nachweisempfindlichkeit detektiert werden kann. Solche Funktionalitäten sind z.B. Radioaktivität, wobei insbesondere die Isotope ³²P und ³⁵S zum Einsatz kommen, Fluoreszenz²⁹ oder Chemilumineszenz³⁰. Radioaktives Markieren ist mit Gefahren für Mensch und Umwelt verbunden, und die Intensität des erzeugten Signals nimmt im Laufe der Zeit, in Abhängigkeit von der Halbwertszeit des zur Markierung verwendeten Isotopes, ab. Andere Arten der Markierung (z.B. Fluoreszenz) haben den Nachteil geringerer Empfindlichkeit und abnehmender Signalstärke, wenn Laser hoher Intensität zur Anregung verwendet werden.

Darüber hinaus sind die Vorgänge von Labelling, Elektrophorese und anschließender Detektion zeitaufwendig, mühsam und vor allem fehlerbehaftet. Insbesondere die Elektrophorese ist äußerst anfällig für Fehler, da Größe bzw. Molekulargewicht einer Nukleinsäure nicht direkt mit der Mobilität korrelieren, welche hier aber als Messgröße verwendet wird. Man kennt eine Vielzahl sequenzspezifischer Effekte, Sekundärstrukturen und anderer Interaktionen mit der Gelmatrix, die Artefakte hervorrufen^{31,32}.

3 MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Analyse von Biomolekülen

Die Massenspektrometrie stellt ein Verfahren dar, um distinkte Moleküle zu „wägen“. Sie zählt daher wohl unbestritten zu den heute leistungsfähigsten Methoden der instrumentellen Analytik in der organischen Chemie und hat sich zum Nachweis und bei der Identifizierung unterschiedlichster Substanzen bis in den extremen Spurenbereich als Methode der Wahl etabliert. Es ist nicht verwunderlich, daß mit zunehmender Bedeutung der Biochemie und Biotechnologie in den letzten Jahren immer wieder versucht wurde, den Einsatzbereich massenspektrometrischer Verfahren durch neue Ionisierungstechniken auf biochemisch relevante Substanzklassen zu erweitern, an denen die klassische Elektronenstoßionisation (EI) oder auch die chemische Ionisation (CI) scheitern. Bei diesen und verwandten Verfahren erfolgt die Ionisation bei reduziertem Druck in der Gasphase. Die Voraussetzung dafür ist, daß sich die Probe unzersetzt verdampfen läßt, was aber bei den meisten polaren, thermisch labilen und sehr großen Biomolekülen mit ihrem fast nicht existenten Dampfdruck nur äußerst selten gegeben ist.

Seit den 70er^{33,34} Jahren werden Laser in der organischen Massenspektrometrie eingesetzt. Die Laserdesorption (LD) gelang allerdings zunächst nur bei relativ kleinen Molekülen und hatte daher wenig praktische Bedeutung. Überwunden wurde dies durch die fast zeitgleiche Einführung des matrixunterstützten Laserdesorptionsverfahrens (MALD) durch Hillenkamp und Karas^{35,36,37} bzw. Tanaka³⁸ im Jahre 1988. Da sowohl die Laserdesorption seit den 70er Jahren als auch die TOF-Technologie sogar schon seit den 50er Jahren bekannt waren, ist die enorme Zeitverzögerung kaum begreiflich, bis eine Kombination der beiden Methoden endlich Einzug in die moderne Massenspektrometrie gefunden hat.

Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe mit einem 100- bis 1000 fachen Überschuß einer sogenannten Matrix verdünnt, auf einem Probeneller kokristallisiert und im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Typische Matrixsubstanzen sind kleinere aromatische Säuren, wie etwa Nikotinsäure, Sinapinsäure oder Dihydroxybenzoesäure (DHB³⁹),

die mit ihren π -Elektronensystemen Licht im Wellenlängenbereich des jeweils verwendeten Lasers absorbieren können⁴⁰. Bei den zur Anwendung kommenden Lasern handelt es sich häufig um Impulsfestkörperlaser (Nd-YAG-Laser im Wellenlängenbereich von 355 bzw. 266 nm) oder um Stickstoff-Gaslaser (mit einer Wellenlänge von 337 nm), wie in allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometern. Die Einkopplung der für die Desorption notwendigen Energie erfolgt über die resonante elektronische Anregung der Matrixmoleküle.

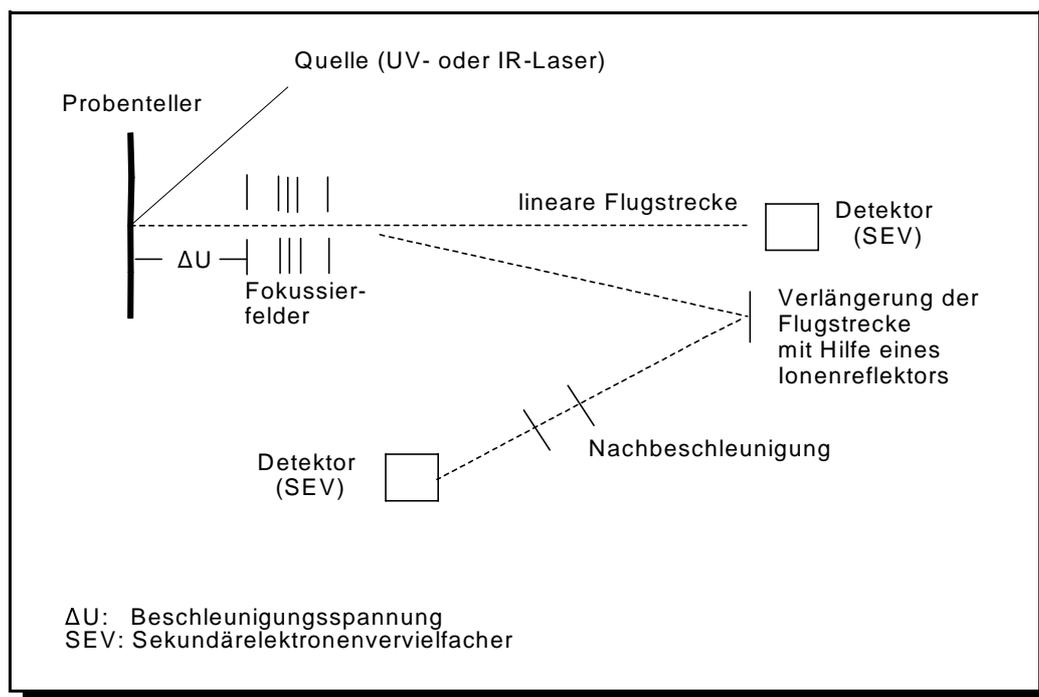


Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Elemente eines MALDI-TOF Massenspektrometers

Die zunächst von den Matrixmolekülen aufgenommene elektronische Anregungsenergie wird in extrem kurzen Zeiten in das Gitter des Festkörpers relaxiert und bewirkt dort eine starke Störung und Aufweitung. Was folgt, ist ein Phasenübergang weit außerhalb des thermischen Gleichgewichtes, der wohl am ehesten als explosive Auflösung eines Mikrobereiches des Probenfestkörpers zu beschreiben ist⁴¹, wobei neben den Matrix- auch die Probenmoleküle unzersetzt freigesetzt werden. Erst jetzt erfolgt durch Protonentransfer mit photoionisierten, d.h. radikalischen Matrixmolekülen die Bildung von elektrisch geladenen Probenmolekülen. In einem elektrostatischen Feld werden nun je nach Polarität positive oder negative Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt. Bei den in Kombination mit der matrixunterstützten Laserdesorption eingesetzten Massenanalysatoren handelt es sich in der Regel um Flugzeitmassenspektrometer (TOF = time of flight), bei denen die Massen-

bestimmung über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht, erfolgt. Eine deutliche Verbesserung der Massenauflösung erhält man dabei durch Verwendung eines Ionenreflektors^{42,43} zur Verlängerung der Flugstrecke (vgl. Abbildung 1 zum schematischen Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers)⁴⁴.

Mit Hilfe der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI), als einer „weichen“ Desorptions- und Ionisationsmethode, in Verbindung mit einem Flugzeitmassenspektrometer gelang der Massenspektrometrie endlich der Durchbruch auch in der biochemischen Analytik. Die MALDI-TOF Massenspektrometrie entwickelt sich seitdem zunehmend zu einer Alternative zu den in der Biochemie/Molekularbiologie etablierten Methoden der Molekulargewichtsbestimmung. Diese Methode bringt im Vergleich zur Molekulargewichtsbestimmung über Gelfiltration, Gelelektrophorese oder Dichtegradientenultrazentrifugation eine Reihe entscheidender Vorteile mit sich:

- Kürzere Analysendauer bei minimaler Probenvorbereitung
- Minimaler Probenbedarf (Attomol für Proteine)
- Hohe Massengenauigkeit und -auflösung
- Reproduzierbarkeit
- Die Verwendbarkeit auch für Probengemische
- Einfach zu interpretierende Massenspektren, da wenig Fragmentierung beobachtet wird
- Separation und Detektion in einem Arbeitsgang

Insbesondere in Bereichen mit hohem Probenaufkommen bietet die MALDI-TOF MS im Vergleich zu gelelektrophoretischen Verfahren einen enormen Vorteil durch das hohe Automatisierungspotential des Verfahrens. MALDI hat sich in kürzester Zeit zu einem wirkungsvollen Werkzeug in der biologischen Massenspektrometrie entwickelt⁴⁵. Insbesondere bei der Charakterisierung von Proteinen und Peptiden hat MALDI bedingt durch den hohen verfügbaren Massenbereich seine Stärken bewiesen, es wurden Proteine mit Molmassen über 200,000 g/mol detektiert⁴⁶. Ursprünglich vor allem zur Protein- und Peptidanalytik entwickelt, haben zahlreiche Modifikationen der Technik den erfolgreichen Transfer auch auf eine Vielzahl anderer organischer Biopolymere^{47,48} wie Oligosaccharide/Kohlenhydrate, Ganglioside und Oligonukleotide, ebenso wie auf synthetische organische Polymere mit Molekulargewichten von bis zu 1.5 Millionen g/mol ermöglicht^{49,50}.

4 Massenspektrometrie von Nukleinsäuren

Die Analyse von Nukleinsäuren ist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden, da es sich hierbei um äußerst polare Biopolymere handelt, die nur sehr schwer zu verdampfen sind. Daher waren Verfahren, die auf einer Desorption mittels Fast Atom Bombardement (FAB) oder Plasma Desorption (PD) beruhten, auf die Detektion synthetischer Oligonukleotide sehr geringer Masse beschränkt^{51,52}. Auch der MALDI-Prozeß erwies sich bei dieser Substanzklasse als nicht trivial und zudem äußerst abhängig von der verwendeten Matrix. Ein Matrixgemisch aus 3-Hydroxypikolinsäure (3-HPA⁵³) und Pikolinsäure⁵⁴ erlaubte es erstmals, auch längere DNA-Stränge zu detektieren⁵⁵; wobei trotz hoher Analytmenge und großem Aufwand bei der Probenvorbereitung nur eine sehr geringe Auflösung und Signalintensität erzielt werden konnte. Erste Ergebnisse mit kleineren Oligodesoxynukleotiden haben zur Erforschung der Einsatzmöglichkeiten der Massenspektrometrie für DNA-Screening und -Sequenzierung ermutigt⁵⁶.

Es ist bekannt, daß DNA in Lösung nur eine begrenzte chemische Stabilität besitzt, wobei die N-glykosidische Bindung zwischen einer Purinbase und der Zuckereinheit die höchste Hydrolyseempfindlichkeit aufweist. So findet man spontane Depurinierung mit nachfolgender Hydrolyse der Phosphodiesterbindung an den so entstandenen apurinischen Stellen unter physiologischen Bedingungen in Lösung erstaunlich häufig. Ein ähnliches Phänomen beobachtet man auch bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie von Oligodesoxyribonukleotidfragmenten als einen entscheidenden Beitrag zur Verschlechterung der detektierten Signale. Insbesondere bei Oligodesoxynukleotiden mit hohem Desoxyguanosinanteil wurde das Auftreten von Signalen niedrigerer Massen, die durch Depurinierung verursacht wurden, beobachtet⁵⁷. Als illustratives Beispiel zeigt Abbildung 2 das Massenspektrum eines 19-mer PCR-Primers. Neben dem Signal des Molekülions von $(M+H)^+ = 5822$ u ist eine Serie von Fragmentierungssignalen zu sehen.

Um die bei der DNA-Sequenzierung nach den Verfahren von Maxam/Gilbert⁵⁸ oder Sanger^{59,60,61} eingesetzte zeitaufwendige Gelelektrophorese zur Analyse der Produkte der Sequenzierreaktion durch die bedeutend schnellere, empfindlichere und aussagekräftigere Methode der Molmassenbestimmung mit Hilfe der Massenspektrometrie ersetzen zu können, müssen u.a. noch wesentliche Vorgänge bei der Desorption und Ionisation von DNA besser verstanden werden. Insbesondere im Bereich höherer Massen (Moleküle mit 200-300 Nukleotiden) liegen sowohl Massenauflösung als auch Nachweisgrenze um mindestens eine Größenordnung unter den Werten, die man für das Sequenzieren benötigt^{62,63}.

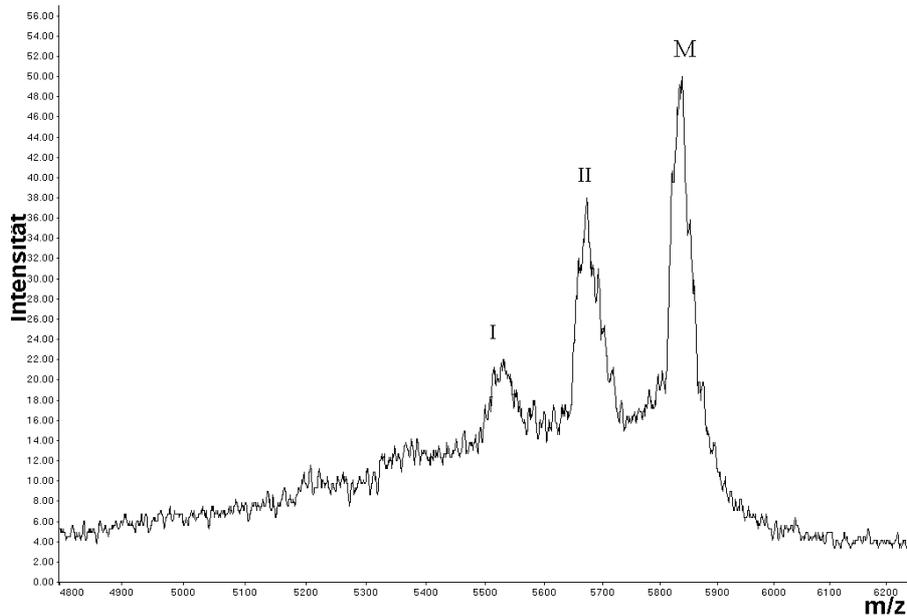


Abbildung 2: Massenspektrum eines 19-mer Oligonukleotids, das als Primer in der Polymerasekettenreaktion verwendet wird. Das Signal bei $M = 5822$ u steht für das einfach protonierte $(M+H)^+$ Molekülion. Begleitet wird das Signal von den Tochterionen I und II, welche aus Depurinierung hervorgegangene Fragmentationen darstellen $[(M-A+H)^+ \text{ und } (M-A-G+H)^+]$.

Möchte man die Massenauflösung nachhaltig verbessern, gibt es unterschiedliche Ansätze. Enormen Einfluß auf die erzielten Ergebnisse hat die Wahl der verwendeten Matrix, mit der die Analytlösung kokristallisiert wird^{64,65,66}. Ein wichtiger Ansatzpunkt ist sicherlich die Optimierung des MALDI-Prozesses selbst durch die Entwicklung neuer Geräte. Sehr große Fortschritte konnten z.B. mit der Technik der verzögerten Fokussierung (delayed ion extraction, DE) erzielt werden^{67,68}. Allerdings bietet diese Methode nur im Bereich geringerer Massen bis ca. 10,000 g/mol entscheidende Vorteile.

Neben der Optimierung dieser äußeren Parametern, bietet sich aber auch die Stabilisierung des zu untersuchenden Moleküls durch chemische Modifikation an. Diese Strategie bietet den entscheidenden Vorteil, daß so auch auf bereits vorhandenen Massenspektrometern bessere Meßergebnisse erhalten werden können. Mit diesem Aspekt soll sich nun die hier vorliegende Arbeit beschäftigen:

II Problemstellung

Bei der Depurinierung von Nucleotiden in Lösung wurde das Vorliegen eines niedrigen pH-Wertes als beschleunigender Faktor beobachtet^{69,70}. In Abbildung 3 ist das Modell eines A₁-Mechanismus vorgestellt, wie er für die säurekatalysierte Hydrolyse von Desoxypurinnucleosiden angenommen wird^{71,72,73}. Nach diesem Modell wird die hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung durch Protonierung am N⁷-Atom der Purinbase eingeleitet. Das protonierte Nucleosid dissoziiert in dem sich anschließenden, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zum freien Purin und einem Carbeniumion. Letzteres reagiert sofort mit Wasser zur freien Desoxyribose. Ersetzt man das N⁷-Stickstoffatom des Purinring-system durch eine Methineinheit, erwartet man eine erhöhte Stabilität eines solchen Nucleosides gegen saure Hydrolyse, da die initiale Protonierung an N⁷ nun nicht mehr möglich ist. Tatsächlich beobachtet man in Lösung eine drastisch erhöhte Stabilität von 7-Deazapurinnucleosiden⁷⁴ gegenüber saurer Hydrolyse.

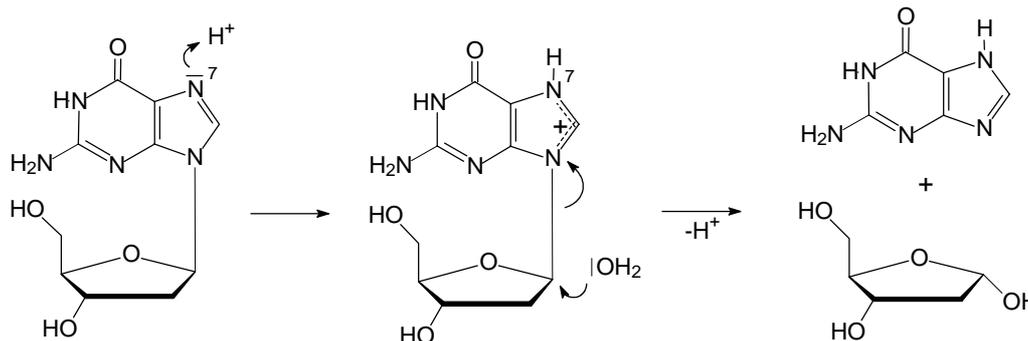


Abbildung 3: Darstellung eines möglichen Mechanismus zur säurekatalysierten Depurinierung von 2'-Desoxyguanosin in wässriger Lösung

Man kann sich leicht vorstellen, daß die auch bei der Desorption und Ionisation von Proben im MALDI-Prozeß zu beobachtende Depurinierung auf einen ähnlichen Mechanismus zurückzuführen ist und zwar infolge einer Wechselwirkung der DNA-Probe mit der sauren Matrix (z.B. 3-Hydroxypikolinsäure) oder durch intramolekularen Protonentransfer ausgehend vom Phosphatrückgrat des Oligonucleotides.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Auswirkungen ein anteiliger Austausch von 2'-Desoxyadenosin und -guanosin durch die entsprechenden C⁷-Isostere auf das Verhalten eines Oligodesoxynukleotides unter den Bedingungen der Laserdesorption hat. Das Ersetzen des N⁷-Stickstoffes durch eine Methineinheit bewirkt das Fehlen eines Akzeptors für Wasserstoffbrückenbindungen pro Purinbase. Neben schärferen Signalen durch geringere Fragmentierung, insbesondere bei längeren Oligonukleotiden, könnte dies auch ein verändertes Desorptions- und Ionisationsverhalten des Moleküls mit sich bringen.

Um zu modifizierten Nukleinsäuren zu gelangen, sollten in Rahmen dieser Arbeit zwei Wege parallel verfolgt werden (vgl. Abbildung 4):

Zum einen die enzymatische Synthese modifizierter Nukleinsäuren, z.B. unter Verwendung der Triphosphate 7-Deaza-A_dTP und 7-Deaza-G_dTP als Substrate in enzymatischen Reaktionen wie der Polymerasekettenreaktion (PCR) an Stelle von A_dTP und G_dTP. Allerdings hatten Untersuchungen von Seela⁷⁵ gezeigt, daß bei Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase 7-Deaza-A_dTP nicht als Substrat akzeptiert wird, so daß zunächst geeignete Enzyme gefunden werden mußten. Weiterhin sollten geeignete Methoden der Probenaufbereitung und -konditionierung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie weiterentwickelt werden.

Ein weitere Aufgabe bestand in der chemische Darstellung von Oligodesoxynukleotiden durch Verwendung von basenmodifizierten Synthesebausteinen. Hierzu sollten die Nucleoside 7-Deaza-2'-desoxyadenosin und 7-Deaza-2'-desoxyguanosin dargestellt und anschließend in die mit passenden Schutzgruppen versehenen, als Synthesebausteine in der chemischen Oligodesoxynukleotidsynthese verwendeten, Phosphoamidite⁷⁶ überführt werden. Die so hergestellten Oligodesoxynukleotide könnten dann direkt zur Untersuchung in MALDI-TOF Massenspektrometrie verwendet werden. Vor allem aber könnten sie als Oligonukleotidprimer zusammen mit modifizierten Triphosphaten in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden. Nur mit dem Einsatz modifizierter Primer wäre es möglich, das Ziel der Herstellung vollständig basenmodifizierte Nukleinsäuren zu erreichen.

III Ergebnisse und Diskussion

1 Einführung

Der Weg zur Bearbeitung der oben beschriebenen Problemstellung ist zusammenfassend in Abbildung 4 in Form eines Flußdiagramms festgehalten. Um zu modifizierten, synthetischen Nucleinsäuren zu gelangen, müssen zunächst die entsprechenden Synthone für die chemische DNA-Synthese dargestellt werden. Mit diesen Aspekten beschäftigt sich der folgende Abschnitt der Arbeit. Daran schließt sich ein Kapitel über die chemische DNA-Synthese an, gefolgt von der enzymatischen Darstellung modifizierter Nucleinsäuren. Die Arbeit setzt sich fort mit der ausführlichen Beschreibung und Diskussion der Auswirkungen der gewählten Modifikationen auf die Eigenschaften von Nucleinsäuren bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie in verschiedenen Anwendungen wie PCR-Analytik und DNA-Sequenzierung, wobei unterschiedliche Verfahren zur Probenkonditionierung sowie weitere chemische Modifikationen diskutiert werden.

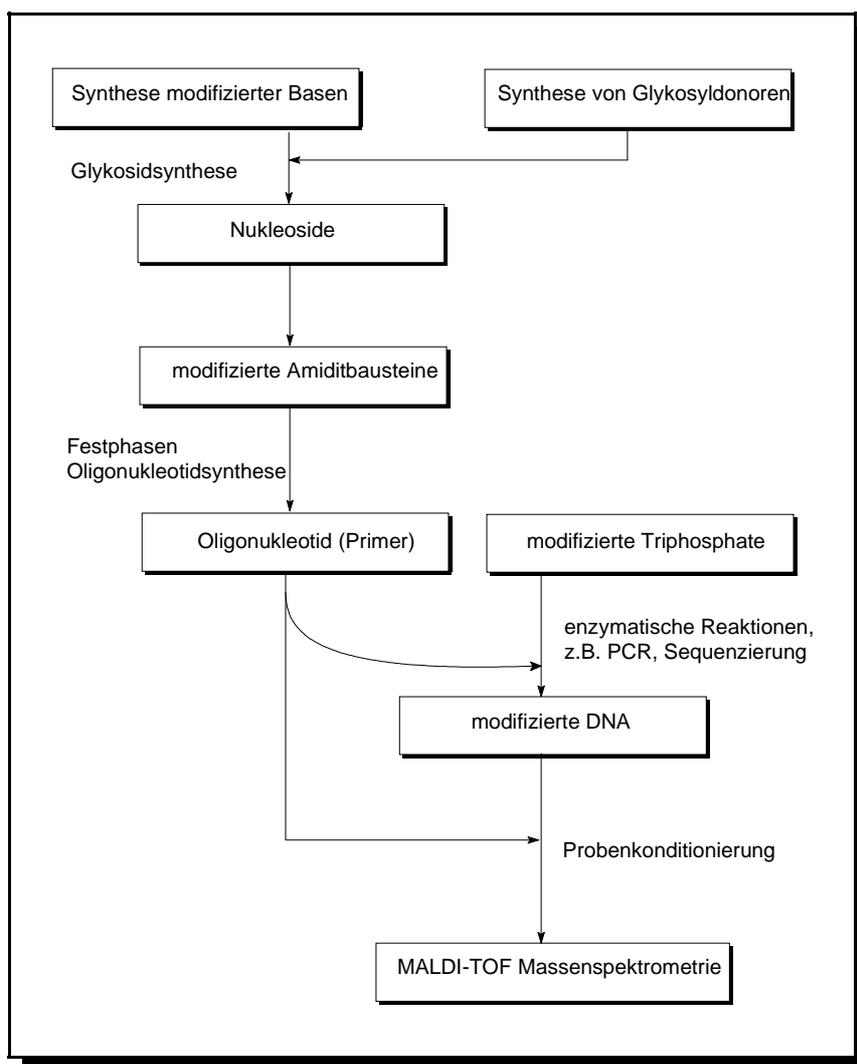


Abbildung 4

Um zu basenmodifizierten Synthesebausteinen für die chemische Synthese von Oligodesoxynukleotiden zu gelangen, benötigt man zunächst das jeweilige Nucleosid in präparativen Mengen. Im Gegensatz zum N^7 -Deazaadenosin (Tubercidin, Abbildung 5: **31**) ist sein 2'-Desoxyanalogon **35** (vgl. Abbildung 18) bisher nicht aus natürlichen Quellen isoliert worden. Nur die Triphosphate, 7-deaza- A_d TP und - G_d TP, die durch enzymatische Synthese relativ leicht aus der jeweiligen Riboform zugänglich²⁰ sind, können im μ molaren Maßstab für enzymatische Reaktionen käuflich erworben werden. Daher blieb für diese Arbeit nur der Weg der Totalsynthese der modifizierten 2'-Desoxynucleoside. Dies gelingt ganz allgemein durch Glykosidierung geeigneter 7H-Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine mit einem entsprechenden Desoxyribosyldonor, in der Regel einer Halogenose⁷⁷. Nach weiterer Umwandlung des Reaktionsproduktes in das gewünschte Nucleosid wird dieses mit für die chemische Oligodesoxynucleotidsynthese geeigneten, d.h. die exozyklischen Aminogruppe mit einer basen- und die 5'-Hydroxyl-Gruppe mit einer säurelabilen, Schutzgruppe versehen. Schließlich gelangt man durch Umsetzung der noch freien 3'-OH Gruppe mit *N,N*-Diisopropyl-cyanoethyl-phosphochloridit zum Phosphoramiditderivat als Baustein für die chemische DNA-Synthese.

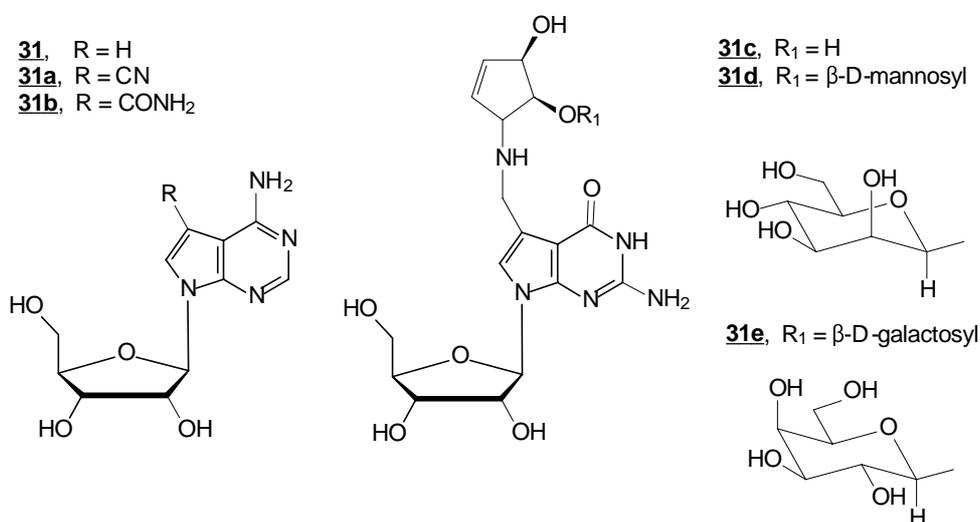


Abbildung 5: Tubercidin und von dieser Struktur abgeleitete Nucleosidantibiotika: **31** = Tubercidin, **31a** = Toyocamycin, **31b** = Sangivamycin, **31c**: Struktur des Nucleosides Q (Queuosin) bzw. Q* (**31d+e**).

2 Das Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinsystem

2.1 Biologische Bedeutung

Das Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinringsystem, das formal als das Ergebnis der Kondensation eines Pyrrolringes mit einem Pyrimidinring gesehen werden kann, wurde zuerst in der Natur gefunden. Obschon der Stammheterozyklus bereits 1911⁷⁸ synthetisiert wurde, gewinnt diese Verbindungsklasse erst ab 1955 in der Literatur an Bedeutung. Im Jahre 1955 wurde aus *Streptomyces toyocaensis* von Nishimura et al.⁷⁹ das erste Nukleosid-Antibiotikum isoliert, bei dem gezeigt werden konnte, daß es das Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinringsystem enthielt - es wurde Toyocamycin genannt. Durch Totalsynthese und Vergleich mit der aus natürlichen Quellen isolierten Substanz konnte bewiesen werden, daß es sich um 4-Amino-7-(β -D-ribofuranosyl)pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-carbonitril (Abb. 5: **31a**) handelte⁸⁰. Das zweite Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinnukleosid, das isoliert wurde, war Tubercidin (**31**). Es wurde 1957 von Anzai und Mitarbeitern^{81,82} aus *Streptomyces tubercidus* gewonnen. Auf Grund der großen Ähnlichkeit zu den Purinen, dem natürlichen Auftreten seiner Derivate und der ungewöhnlichen biologischen Eigenschaften entwickelten sich bald große Aktivitäten zur Totalsynthese und biologischen Evaluation^{83,84} dieses Ringsystems, die sich bis in die Gegenwart fortsetzen^{85,86}.

In den darauffolgenden Jahren gelang es, eine Vielzahl von derivatisierten 7-Deazapurinnukleosiden zu isolieren und zu synthetisieren, darunter auch solche die 7-Deazaguanosin als Stammverbindung besitzen. Eine besondere Bedeutung besitzen hierbei die Nukleoside Q (**31c**) und Q* (**31d+e**). Die Struktur dieser Nukleoside ist ungewöhnlich, da sie in der Seitenkette am C-7 ein Cyclopentendiol enthalten. Das hypermodifizierte Nukleosid Q nimmt die erste Position, auch Wobble-Position^{87,88}, des Anti-Codons von *E. coli* Transfer-RNA und der vieler anderer Organismen⁸⁹ inklusive des Menschen ein. In bestimmten tRNA wird das Nukleosid durch Glycosyltransferasen weiter zum Q* modifiziert⁹⁰. Die Verbindung kann nur von Eubakterien *de novo* synthetisiert werden⁹¹ und stellt somit für alle Eukarioten einen essentiellen Bestandteil der Nahrung dar. Noch nicht vollständig geklärt ist die Beobachtung, daß in vielen Tumoren keine oder nur zu geringem Anteil Q-haltige tRNA gefunden wird^{92,93}.

Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten im Laufe ihrer Forschung mit diesen Verbindungen, daß einige der 7-Deazanukleoside ein sehr hohes klinisches Potential nicht nur als Antibiotika und Virustatika⁹⁴, sondern auch als Zytostatika für den Einsatz gegen bestimmte Krebserkrankungen besitzen. So wies Tubercidin zum Beispiel eine hohe Zytotoxizität in Kulturen von Maus-L1210-Leukämiezellen⁹⁵ auf. Ebenso wird die Verwendung bestimmter 7-Deazanukleotide in der Entwicklung wirksamer Antisense⁹⁶-Oligonukleotide diskutiert^{97,98,99}.

So groß die Euphorie bei der Entdeckung neuer Wirkstoffleitstrukturen häufig ist, so wurden

doch nur wenige Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinnukleoside tatsächlich für weitergehende klinische Studien ausgewählt, darunter das in Abbildung 5 dargestellte Sangivamycin (**31b**). Das National Cancer Research Institute (USA) förderte daher Studien der zweiten klinischen Phase bezüglich seiner Wirksamkeit gegen Darmkrebs, Gallenblasenkrebs und akuter myelogener Leukämie (AML) beim Menschen¹⁰⁰. Diese Verbindung scheint darüber hinaus auch gegenüber L1210- und P388-Leukämie sowie dem Lewis-Lungenkarzinom¹⁰¹ wirksam zu sein.

Die biologische Wirkung ist in diesen Fällen darauf zurückzuführen, daß das Nukleosidantibiotikum im Polynukleotidverband die Basenpaarungseigenschaften von Nucleinsäuren verändert und bei der ribosomalen Proteinbiosynthese die Codon/Anticodon-Wechselwirkung beeinflußt¹⁰². Vor kurzem wurden auch N⁷-Deaza-2'-desoxypurinnukleotide für den Einsatz in der Krebschemotherapie als eine neue Klasse von Telomerase-Inhibitoren¹⁰³ vorgeschlagen. Bei der Telomerase handelt es sich um eine terminale Transferase, die nur in Krebszellen Aktivität zeigt und dort eine bedeutende Rolle für Chromosomenorganisation und -stabilität übernimmt.

2.2 Nomenklatur

Man bezeichnet den Heterozyklus Pyrrolo[2,3d]pyrimidin auch als 7-Deazapurin oder 7-Carbapurin, um zu verdeutlichen, daß man sich dieses Molekül als ein Purin vorstellen kann, in dem formal das N⁷-Atom des Puringerüsts durch eine Methingruppe ersetzt wurde.

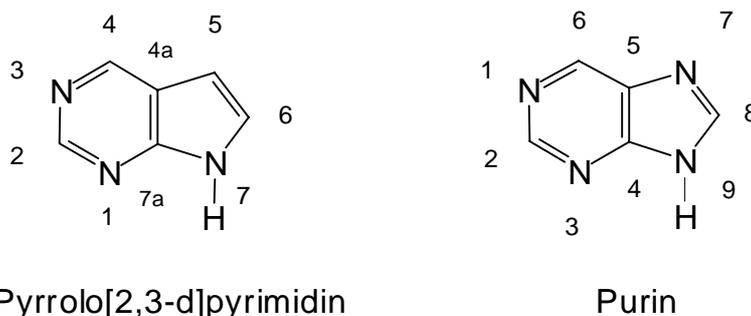


Abbildung 6

Die Numerierung des Purins unterscheidet sich wie in Abbildung 6 dargestellt von der des Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin. Bei letzterem erhalten, wie von IUPAC vorgeschlagen, C-Atome in Anellierungsposition die Bezifferung des vorhergehenden peripheren Atoms unter Zusatz eines kleinen Buchstabens zur Kennzeichnung der Brückenpositionen. Beim Purin hingegen werden alle Atome gleichwertig durchnummeriert. Aus Gründen der Konformität mit der vorhandenen Literatur wurde auch in dieser Arbeit die unterschiedliche Numerierung für Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin- und Purinderivate beibehalten.

3 Synthese von 7-Deaza-2'-desoxyguanosin und 7-Deaza-2'-desoxyadenosin

3.1 Darstellung der Aglykone

Ein einfacher Weg, der zur Verbindungsklasse der Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine führt, geht auf eine Arbeit von Davoll^{104,105,106} zurück. Durch Ringsynthese wurden 4-Aminopyrimidine dargestellt, die in der 5-Position eine als Acetal geschützte Acetaldehydgruppe trugen. Die durch saure Hydrolyse freigesetzten Aldehyde ließen sich anschließend zu den korrespondierenden Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinen zyklisieren (vgl. Abbildung 7).

Zur Synthese von 4-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidinen wurde von 2-Cyano-4,4-diethoxybuttersäureethylester (**1**) ausgegangen, der leicht durch Alkylierung von Cyanessigsäureethylester mit Bromacetaldehyddiethylacetal in Gegenwart von Kaliumcarbonat und einer katalytischen Menge Natriumiodid in 40-50 % Ausbeute erhalten werden konnte. Die Kondensation des Nitrils mit Guanidin oder Thioharnstoff in ethanolischem Natriumethylat lieferte die Pyrimidinderivate 2,6-Diamino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidin-4-ol¹⁰⁷ (**2**) in 50 %iger und 6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)-2-mercaptopyrimidin-4-ol¹⁰⁸ (**3**) in 62 %iger Ausbeute. Die Betrachtung der ¹H-NMR Daten (vgl. Tabelle 1, S.18) legt nahe, daß in Verbindung **3** die Carbonylgruppe im Gegensatz zu **2** nicht als Enol vorliegt, da nur für letztere das Signal einer Hydroxylgruppe im ¹H-NMR-Spektrum zu finden war. Somit müßte der Name in Abweichung von der Literatur korrekterweise 6-Amino-5-(2,3-diethoxyethyl)-2-mercaptopyrimidin-4-on lauten.

Eine anschließende Behandlung von **2** mit 0.2 mol/L Salzsäure bei Raumtemperatur bewirkte den Ringschluß zum 2-Amino-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (**4**) nach drei Stunden in 83 % Ausbeute. Die Synthese von **5** aus **3** gelang entsprechend nach 24 Stunden in 90 % Ausbeute. Das ¹H-NMR-Spektrum (vgl. Tabelle 1) zeigte für letztere Verbindung stets das Signal einer Hydroxylgruppe in 4-Position. Verbindung **5** sollte daher abweichend von der Literatur korrekterweise als 3,7-Dihydro-2-mercapto-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol bezeichnet werden. Reduktive Entschwefelung von **5** mit Raney-Nickel in verdünnter ammoniakalischer Lösung führte schließlich zu 2-unsubstituiertem 7-Deazahypoxanthin (**6**) als Basenprecursor für 7-Deaza-2'-desoxyadenosin in 70 %iger Ausbeute. Die dreistufige Synthese von 7-Deazaguanin (2-Amino-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on, **4**) gelang in insgesamt 15-20 %iger Ausbeute. 7-Deazahypoxanthin (3,7-Dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on, **6**) konnte ganz analog in vierstufiger Synthese mit einer Ausbeute von 10-15 % dargestellt werden.

III. Ergebnisse und Diskussion - organische Chemie

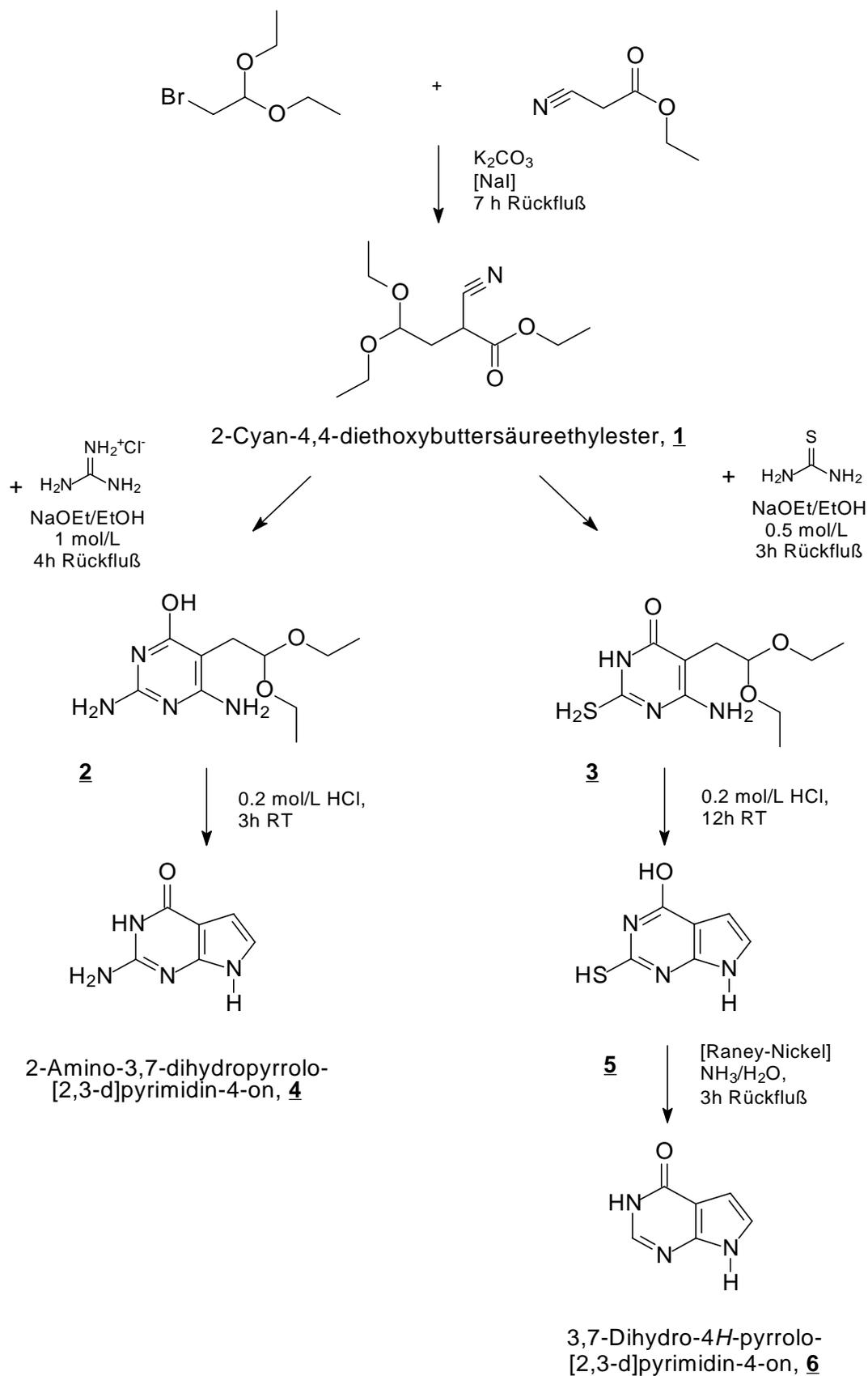


Abbildung 7: Darstellung von 2-Amino-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on und 3,7-Dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on

3.2 Synthese geeigneter Akzeptoren für Glykosidierungsreaktionen

3,7-Dihydro-4*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on-derivate werden in basischen Medien bevorzugt am N³-Atom methyliert¹⁰⁹ und scheiden somit als Vorstufe für die Synthese von Nucleosiden aus. Voraussetzung für eine selektive 7-Alkylierung ist daher der Schutz des tautomerie-fähigen Lactams. Außerdem kann man durch geeignete Substitution des Aglykons die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln erhöhen. Unter diesen Randbedingungen als besonders geeignet haben sich 4-Chlorverbindungen erwiesen, die im Anschluß an die N-Glykosidierung leicht in das gewünschte 7-Deazaguanin bzw. 7-Deazaadenin-Derivat überführt werden konnten.

Die Chlorierung von 7-Deazaguanin zu 2-Amino-4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**8**) gelingt nach Seela mit Phosphorylchlorid in Gegenwart von *N,N*-Dimethylanilin nur in mäßiger Ausbeute¹¹⁰. Daher wurde zunächst eine von Robins¹¹¹ beschriebene Methode verwendet, die mit äquimolaren Mengen Phosphorylchlorid in Acetonitril und in Gegenwart von *N,N*-Dimethylanilin und eines quartären Ammoniumsalzes (TEBA) arbeitet. Es konnten hierbei Ausbeuten von bis zu 76 % erzielt werden, wobei das eingesetzte *N,N*-Dimethylanilin zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten stets am selben Tag frisch destilliert sein mußte.

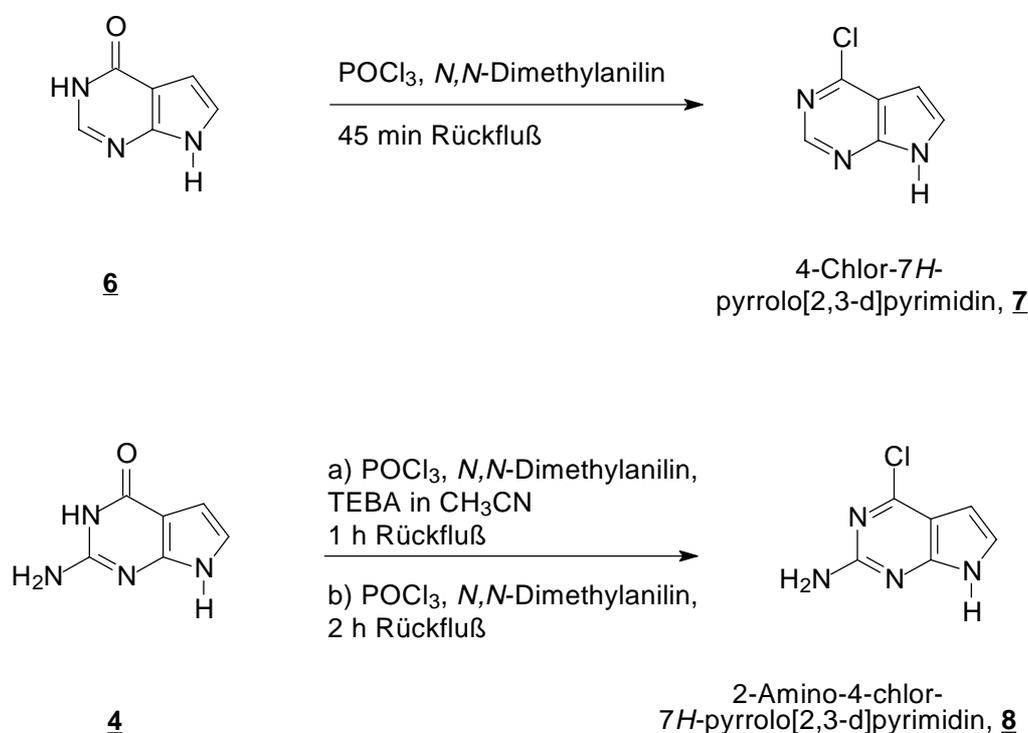


Abbildung 8: Umwandlung der Purinbasen in geeignete Akzeptoren für eine Glykosidierungsreaktion

III. Ergebnisse und Diskussion - organische Chemie

In Anlehnung an eine Vorschrift von Davoll¹¹² konnte auch in Phosphorylchlorid bei Gegenwart einer nur katalytischen Menge *N,N*-Dimethylanilin und ohne Lösungsmittel eine ebenso gute Ausbeute (70 %) an chloriertem Produkt erzielt werden. Aufgrund der recht hohen Toxizität von *N,N*-Dimethylanilin und des Lösungsmittels Acetonitril ist dieser Variante daher eindeutig der Vorzug zu geben. Ganz entsprechend konnte 4-Chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**7**) aus **6** durch Umsetzung mit Phosphorylchlorid in Gegenwart von *N,N*-Dimethylanilin in 50 - 60 % Ausbeute erhalten werden. Ein Grund für die geringere Ausbeute ist sicherlich das schlechtere Kristallisationsverhalten der Verbindung. Versuche mit anderen Lösungsmittelsystemen haben aber zu keiner weiteren Steigerung der Ausbeute geführt.

Verb.	2-H	5-H	6-H	NH	NH ₂	SH	OH
2	---	---	---		5.55/6.03	---	9.92
4	---	6.18	6.6	10.19/10.94	6.01	---	---
8	---	6.25	7.08	11.45	6.46	---	---
3	4.67	---	---	---	6.22	11.87	---
5	---	6.33	6.72	13.15	---	11.82	11.22
6	7.84	6.42	7.03	11.76/11.84	---	---	---
7	8.57	6.59	7.68	12.6	---	---	---

Tabelle 1: Chemische Verschiebungen der ¹H-NMR-Signale der Chromophore (D₆-DMSO)

Verb.	2-C	4-C	4a-C	5-CH	6-CH	7a-C
2	162.70	162.77	83.31	---	---	153.29
4	152.1	158.76	99.79	101.47	116.49	151.05
8	143.01	158.36	107.57	101.88	123.05	154.50
3	172.86	161.76	85.67	---	---	152.07
5	171.74	157.62	102.23	102.85	118.25	138.26
6	143.01	158.36	107.57	101.88	120.22	147.98
7	151.14	152.65	117.42	99.64	129.24	151.31

Tabelle 2: Chemische Verschiebungen der ¹³C-NMR-Signale der Chromophore (D₆-DMSO)

3.3 Synthese von Glykosyldonoren

3.3.1 Darstellung von 1-Chloro-2-desoxy-3,5-di-O-(*para*-toluoyl)- α -D-erythro-pentofuranose

Ein geeigneter Glykosyldonor zur Synthese von Nukleosiden sollte leicht darzustellen sein und eine Kopplungsreaktion mit hohen Ausbeuten bezüglich der Regio- und Stereospezifität ermöglichen. Hierzu muß das C-1 eine gute Abgangsgruppe tragen, und die Hydroxylgruppen an C-3 und C-5 müssen mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden. Diese Schutzgruppen sollten unter den alkalischen Bedingungen der Glykosidierungsreaktion stabil, aber anschließend hinreichend leicht wieder abspaltbar sein. Auch der Einfluß der Schutzgruppen auf die Stereokontrolle der Reaktion darf nicht vernachlässigt werden. Die Halogenose 1-Chloro-2-desoxy-3,5-di-O-(*para*-toluoyl)- α -D-erythro-pentofuranose (**12**) hat sich unter diesen Randbedingungen zur Darstellung von 2'-Desoxy- β -D-ribonukleosiden etabliert¹, auch wenn sie keineswegs alle gestellten Anforderungen erfüllt.

Die Synthese (vgl. Abb. 9, S. 20) gelang in Anlehnung an einen von Hoffer¹¹³ beschriebenen dreistufigen Reaktionsweg in 30 - 50 %iger Ausbeute. Hierzu wurde im ersten Schritt Desoxyribose in Methanol in der 1-O-Stellung methyliert und das erhaltene Glykosid (**10**) anschließend in Pyridin mit Toluoylchlorid an den noch freien 3-OH und 5-OH-Gruppen verestert. Hier ist die Stereochemie am C-1 noch offen, so daß die erhaltene 1-O-Methyl-2-desoxy-3,5-di-O-(*para*-toluoyl)-D-erythro-pentofuranose (**11**) als ein Gemisch der beiden anomeren Furanoside vorlag.

Ansätze, die über Nacht bei RT gerührt wurden, lieferten unmittelbar nach der Aufarbeitung ein kristallines Produkt. Hingegen ergaben solche, bei denen die Reaktion zwei Stunden bei 40-50°C geführt wurde, meistens **11** zunächst als Sirup, der erst im Verlauf mehrerer Wochen langsam kristallin wurde. Da für die nachfolgende Reaktion ein lösungsmittelfreies Edukt gewünscht war, um möglichst hohe Ausbeuten erzielen zu können, wurde der Weg, der unmittelbar das kristalline Produkt lieferte, bevorzugt. Durch NMR-spektrometrische Analyse wurde bestätigt, daß die Verbindung als Furanosid und nicht als ebenfalls denkbare Pyranosid vorlag. Hierfür war entscheidend, daß die Bildung des Methylethers nur in sehr schwach saurer Lösung, kurzer Reaktionszeit und ohne Zufuhr von Wärme durchgeführt wurde, andernfalls wäre die Bildung des Pyranosides bevorzugt^{114,115}.

1

Anmerkung zur Nomenklatur: Für 4-Methylbenzocarbonsäure ist der Trivialname Toluylsäure gebräuchlich. Zur Bezeichnung ihrer Derivate wird das Präfix Toluoyl- verwendet.

Bei der nachfolgenden Umsetzung mit HCl/HOAc entstand, durch den anomeren Effekt gesteuert, schließlich das Halogenid **12** ausschließlich als das thermodynamisch stabilere α -Anomere, welches unter den gewählten Reaktionsbedingungen auskristallisierte. Nicht umgesetztes Edukt konnte vom erhaltenen Produkt leicht durch Waschen mit eiskaltem Ether abgetrennt werden. Die Wahl anderer Lösungsmittel wie z.B. THF und eine Absenkung der Reaktionstemperatur führten nicht zu einer deutlichen Erhöhung der Reaktionsausbeute unter gleichzeitiger Beibehaltung der Stereokontrolle.

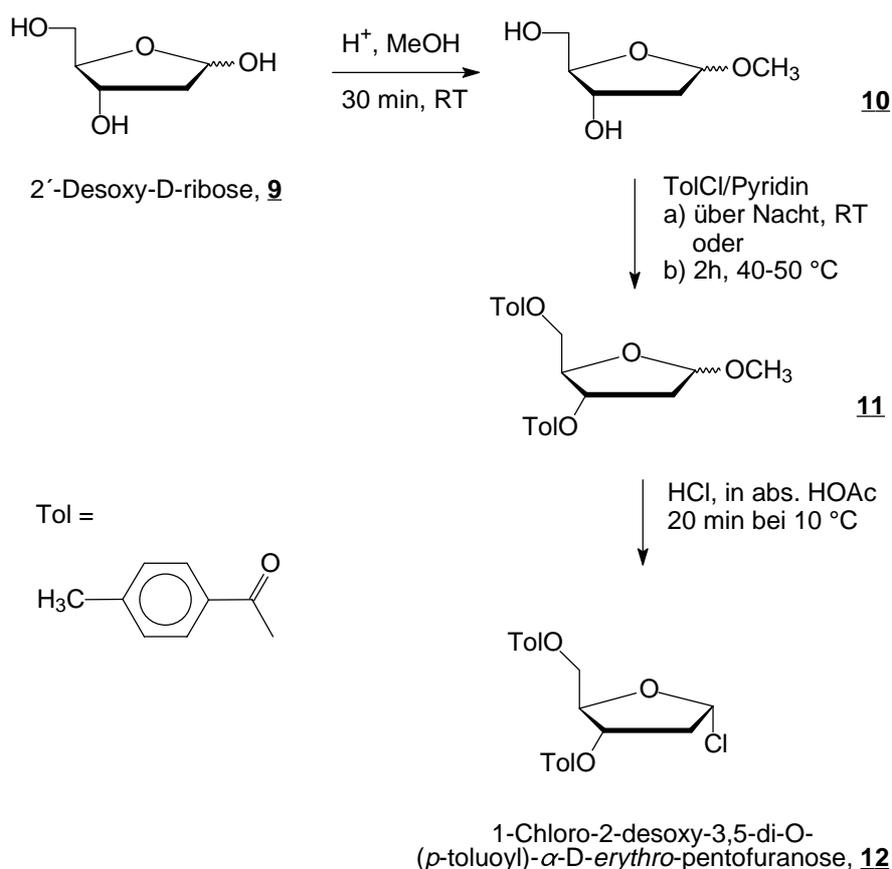


Abbildung 9: Synthese eines Desoxyribosyldonors

Analog werden auch in der Riboreihe an C_1 halogenierte Riboderivate für die Kopplungsreaktion mit Nukleobasen in der Literatur beschrieben. Durch den stabilisierenden Effekt des C_2 Substituenten bedingt ist es in dieser Substanzklasse möglich Glykosyldonoren herzustellen, die Brom als Abgangsgruppe an C_1 tragen wie z. B. die Verbindung 1-Bromo-2,3,5-tris-O-benzyl- α -D-ribofuranose (**20**). Trotzdem wurde auch für diese Reaktion später eine Chlorverbindung von Seela als geeigneterer Glykosyldonor aufgrund einer höheren Stereo- und Regioselektivität des Reaktionsverlaufen vorgeschlagen: das 5-O[(1,1-Dimethylethyl)-dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- α -D-ribofuranosylchlorid (**16**).

3.3.2 Darstellung von 5-O-[(1,1-Dimethylethyl)dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- α -D-ribofuranosylchlorid (**16**)

Zur Synthese des Ribosyldonors **16** wurde im ersten Schritt D-Ribose mit Aceton in Gegenwart von 2,2-Dimethoxypropan und einer katalytischen Säuremenge zusammen mit Molekularsieb 4 Å zu 2,3-O-(1-methylethyliden)-D-ribofuranose^{116,117} (**14**) umgesetzt. Der bei dieser Reaktionsführung entstehende Anteil an Isosteren war so gering, daß das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung mit *tert*-Butyldimethylchlorsilan¹¹⁸ und Imidazol in Dimethylformamid zur 5-O-[(1,1-Dimethylethyl)dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- β -D-ribofuranose (**15**) umgesetzt werden konnte. Die Reaktionsausbeute über beide Stufen betrug etwa 50 %.

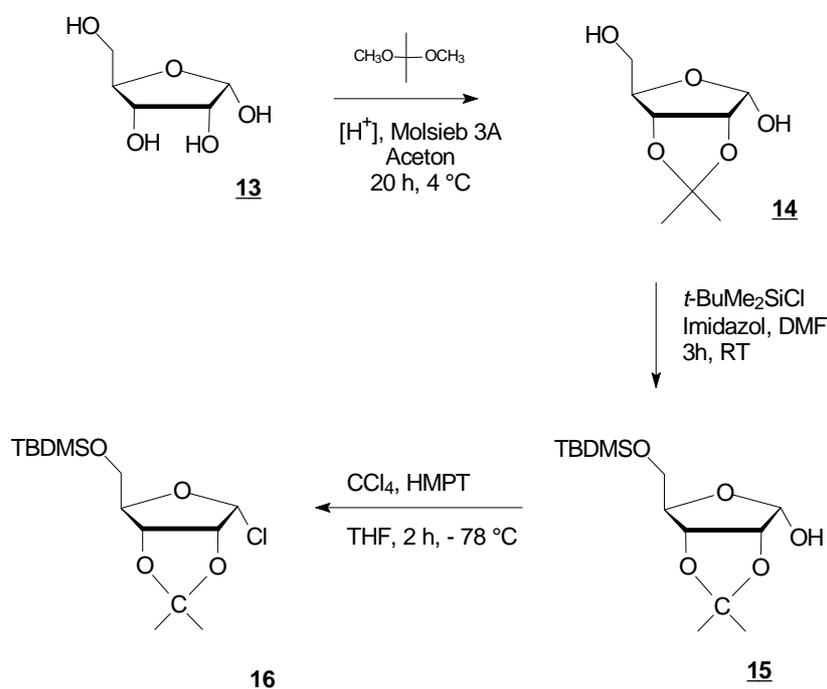


Abbildung 10: Synthese von 4-Chlor-7-{5'-O[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- β -ribofuranosyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**16**)

Durch Isolierung und erneute Umsetzung von nicht umgesetztem **14** konnte die Gesamtausbeute auf gut 80 % gesteigert werden. Eine noch höhere Ausbeute dürfte durch die Verwendung des von Johnson¹¹⁹ kürzlich beschriebenen, deutlich reaktiveren Silylierungsreagenzes *N,O*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)acetamid zu erzielen sein, das zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht käuflich zu erwerben war. Die Umsetzung zum reaktiven Chlorid **16** erfolgte schließlich in THF bei -78 °C stereoselektiv durch Umsetzung mit Tris(dimethylamino)phosphan (HMPT) und Tetrachlorkohlenstoff¹²⁰. Die Verbindung wurde ohne weitere Aufreinigung unmittelbar für nachfolgende Reaktionen eingesetzt.

3.3.3 Darstellung von 1-Bromo-2,3,5-tris-O-benzyl- α -D-ribofuranose

Auch das Bromoribofuranosylderivat **21** wurde wie auch das Chlorid **16** aufgrund seiner äußerst geringen Stabilität *in situ* dargestellt. Dies geschah durch Umsetzung von 2,3,5-Tris-O-benzyl-1-O-*para*-nitrobenzoyl- β -D-ribofuranose (**20**) mit einer Lösung von Bromwasserstoff in Dichlormethan¹²¹. Die Ausgangsverbindung **20** konnte dabei in vierstufiger Synthese in insgesamt 15 - 20 % Ausbeute aus D-Ribose (**13**) erhalten werden. Dazu wurde zunächst die 1-O-Position als Methylether durch Umsetzung von D-Ribose in Methanol in Gegenwart von Molsieb und einer katalytischen Säuremenge zu 1-O-Methyl-D-ribose (**17**) geschützt.

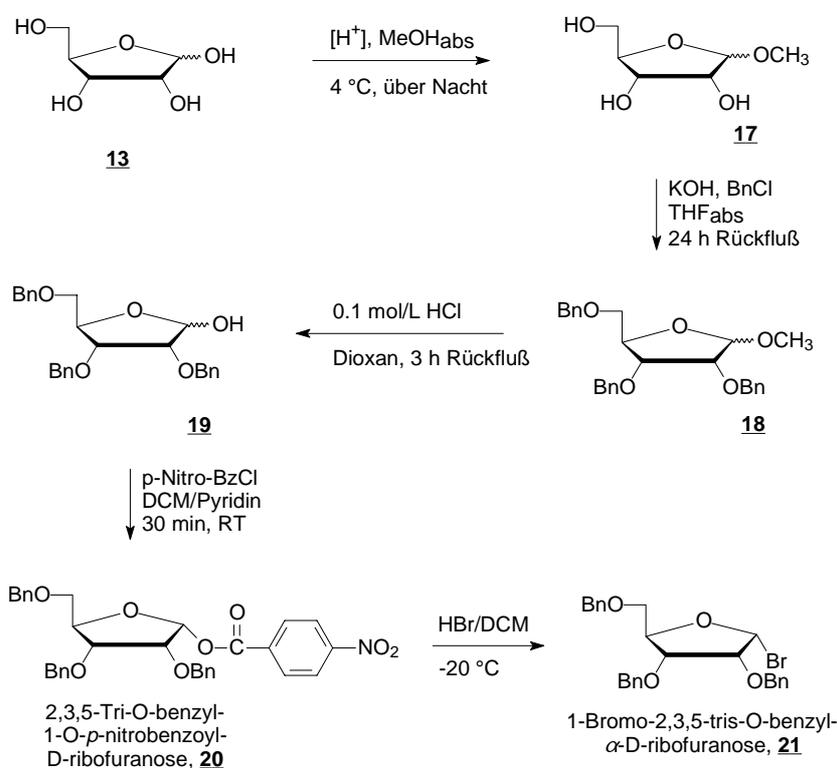


Abbildung 11: Syntheschema zur Darstellung von 1-Bromo-2,3,5-tris-O-benzyl- α -D-ribofuranose als einen weiteren Ribosyldonor

Das ^{13}C -NMR-Spektrum deutete auf ein gleichzeitiges Vorliegen von Furanosid und Pyranosid, wobei letzteres deutlich überwog. In der nächsten Stufe entstand hingegen durch das Einführen sterisch anspruchsvoller Substituenten bevorzugt die Furanoseform. Das kristalline Produkt wurde dann an den verbleibenden Hydroxylgruppen mit Benzylchlorid und KOH zum Benzylether **18** umgesetzt. In 0.1 mol/L Salzsäure wurde der Methylether wieder gespalten und die erhaltene 2,3,5-Tris-O-benzyl-D-ribofuranose (**19**) konnte schließlich in den Nitrobenzoylester **20** überführt werden. Das β -Anomere wurde als kristalliner Feststoff erhalten, so daß in der folgenden Reaktion **21** anomerenrein dargestellt werden konnte.

3.4 Glykosidierungsreaktionen

3.4.1 Darstellung von Desoxyribonukleosidderivaten

Klassische, auf Schwermetallkatalyse¹²² beruhende Verfahren zur Glykosidierung von Purinen bieten sich bei Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinen nicht an⁷⁴, da sich diese Verbindungen durch eine deutlich reduzierte Reaktivität auszeichnen. Dies ist bei einem Vergleich der beiden aromatischen Ringsysteme leicht einzusehen:

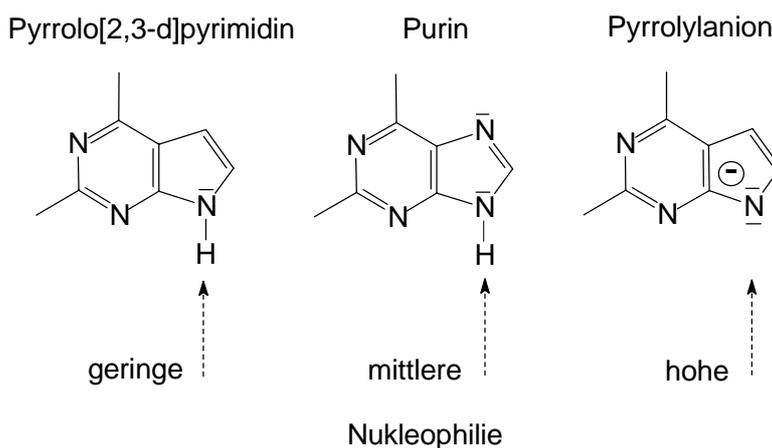


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Nucleophilie des 7-N Atomes im Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin und dem korrespondierenden Pyrrolylanion im Vergleich mit der entsprechenden Position im Purinringsystem

Da das freie Elektronenpaar des Pyrrolstickstoffes Bestandteil des aromatischen π -Systems ist, kann eine Glykosidierung in dieser Position nur erfolgreich sein, wenn das *in situ* generierte Anion der Nucleobase verwendet wird. Dieses stellt im Gegensatz zur neutralen Base ein gutes Nucleophil dar. Das Anion kann als Intermediat mit Hilfe von flüssig-flüssig¹²³ oder fest-flüssig Phasentransferkatalyse oder direkt in einem aprotischen Lösungsmittel unter Einwirkung von starken Basen erzeugt werden. Durch Umsetzung mit einer Halogenose ist auf diesem Wege eine regio- und stereoselektive Knüpfung der N-glykosidischen Bindung zu erreichen.

Der Einsatz von Nucleobaseanionen oder -ionenpaaren in der Nucleosidchemie geht auf Arbeiten von Holy¹²⁴ und Goto¹²⁵ zurück, die diese erstmals zur Synthese von Ribonucleosiden einsetzten. Die Glykosidierung von Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinen via *in situ* erzeugter Pyrrolylanionen wurde erstmals mit NaH in DMF beschrieben⁷⁴. Im Gegensatz zum Purin-system ist der Ort der Glykosidierung im Pyrrolring eindeutig, da nur noch ein Stickstoffatom vorhanden ist. Dies ändert allerdings nichts an der Tatsache, daß es im Pyrimidinring über die Atome N¹ und N³ zur Bildung von unerwünschten Verknüpfungsprodukten kommen kann. Durch spezielle Reaktionsführung stehen auch das C-7 in 7-Deazapurinen bzw. das C-9 in

9-Deazapurinen für eine Glykosidierungsreaktion zur Verfügung. Man gelangt auf diesem Wege zur Verbindungsklasse der C-Nukleoside^{126,127}.

Von Seela wurde 1983 eine Methode zur diastereoselektiven Synthese von 2'-Desoxy- β -D-ribonukleosiden mit Hilfe der Phasentransferkatalyse in einem zweiphasigen System aus 50 % Natronlauge und Dichlormethan in Gegenwart quartärer Ammoniumsalze vorgestellt¹²⁸, wobei mit Hilfe eines Vibromixers eine intensive Vermischung der Phasen erreicht wurde. 1988 wurde von Seela eine Variante der fest-flüssig Phasentransferkatalyse vorgestellt, die sich eines Kryptanden, Tris-[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]amin (TDA-1)¹²⁹ als Katalysator, Kaliumhydroxid als Base und Acetonitril als aprotischem Lösungsmittel bedient. Hierbei kam es zu deutlich besseren Ausbeuten in der Glykosidierungsreaktion. Auch Kronenether wie 18-Krone-6 eignen sich als Katalysatoren¹³⁰. Die Reaktion verdient erst jetzt wirklich die Bezeichnung „diastereoselektiv“, da nun im Gegensatz zur ursprünglichen Variante praktisch kein ungewünschter Anteil mehr an α -Anomeren beobachtet wird.

1984 stellten Kazimierczuk und Robins ein „Sodium salt glycosylation“ genanntes Verfahren vor, daß sich Natriumhydrid als Base bedient und Acetonitril als aprotisches Lösungsmittel einsetzt¹³¹. Auch für diese Methode wurde 1988 von einer im Vergleich zu früheren Veröffentlichungen deutlich gesteigerte Ausbeute bei der Synthese von **22** berichtet¹³². Erstaunlicherweise sollte dies allein durch eine deutliche kürzere Reaktionszeit (zwei statt 16 Stunden) möglich sein. Es verwundert daher nicht, daß im Rahmen dieser Arbeit Ausbeuten erzielt wurden, die mehr denen der ursprünglich für diese Methode beschriebenen entsprechen. Durch Glykosidierung der 4-Chlor-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine **7** und **8** mit 1-Chlor-3,5-di-O-(*p*-toluoyl)- α -D-*erythro*-pentofuranose **12** konnten regio- und diastereoselektiv die kristallinen Verknüpfungsprodukte 4-Chloro-7-(2'-desoxy-3,5-di-O-*para*-toluoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**22**) und 2-Amino-4-chloro-7-(2'-desoxy-3,5-di-O-*para*-toluoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**23**) erhalten werden (vgl. Abb. 13). Nicht umgesetzte Purinbase konnte aus dem Reaktionsansatz säulenchromatographisch teilweise zurückgewonnen und für weitere Reaktionen eingesetzt werden.

Es liegt die Annahme nahe, daß die Phasentransferglykosidierung einem S_N2-Mechanismus mit einer Waldenumkehr der Konfiguration am 1'-C-Atom folgt¹³³. Nach anderen in der Literatur beschriebenen Modellen ist ein S_N2-Mechanismus allerdings nicht zwingend zur Erklärung des diastereoselektiven Reaktionsverlaufes notwendig (vgl. Abb. 15). Bei einer deutlichen Erhöhung der eingesetzten Menge an Phasentransferkatalysator überschreitet die Ausbeute an α -Anomer schnell die an erwünschtem β -Anomer. Dieses kann entweder auf

III. Ergebnisse und Diskussion - organische Chemie

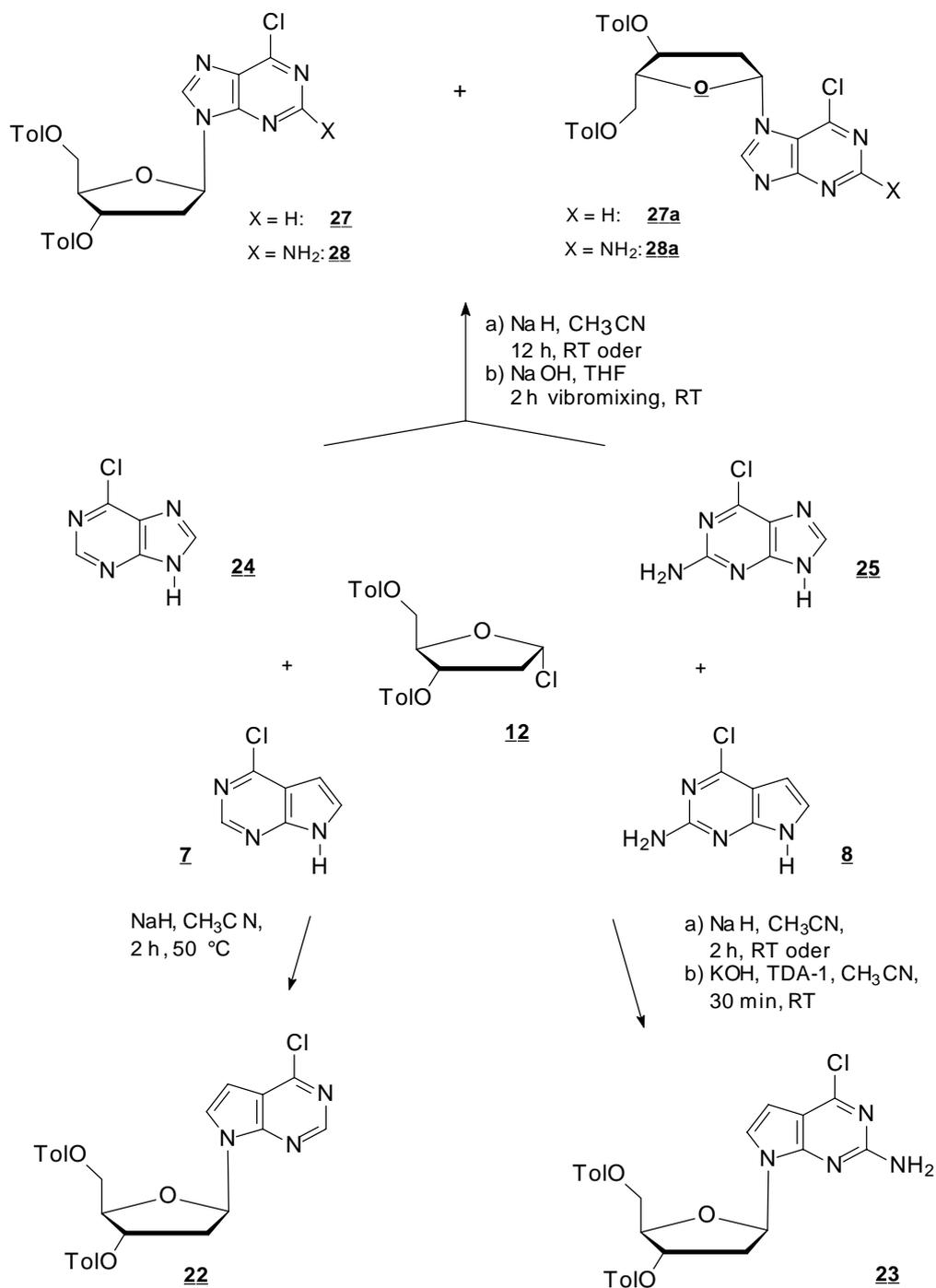


Abbildung 13: Reaktionen mit 1-Chloro-2-desoxy-3,5-di-O-(*para*-toluoyl)- α -D-erythro-pentofuranose

eine beschleunigte Equilibrierung der Anomeren der Halogenose oder aber auf einen Wechsel des Reaktionsmechanismus von S_N2 nach S_N1 zurückgeführt werden¹³⁴. Bei allen Glykosidierungsansätzen wurden stets dünnschichtchromatographisch zwei Nebenprodukte mit einer geringeren Polarität als die gebildeten Nukleoside in unterschiedlicher Ausprägung detektiert. Insbesondere bei Ansätzen, bei denen die Ausbeute an Glykosidierungsprodukt besonders niedrig war, wurden diese zum Hauptprodukt. Es wurde offensichtlich ein Teil der Halogenose oder des geschützten Nukleosids unter den basischen Reaktionsbedingungen der Glykosidierung deacyliert. Die freigesetzte Toluylsäure liegt dann als Anion vor und kann mit dem Nukleobasenanion in der nukleophilen Reaktion an der Halogenose konkurrieren. Da im Verlauf der Reaktion die Konzentration des Methylbenzoatanions stetig wächst, kann auch ein weiterer Zusatz an Halogenose den noch nicht umgesetzten Heterozyklus nicht mehr glykosidieren, da nun sofort die Nebenreaktion (vgl. Abb. 14) zu **12a** und **b** überwiegt. Unter diesem Gesichtspunkt ist auch die Tatsache zu bewerten, daß die Ausbeute mit zunehmender Größe des Glykosidierungsansatzes zurückging. Zur Darstellung größerer Mengen des Nukleosides war es somit erforderlich, daß viele kleine Reaktionsansätze (3 mmol Base) gefahren wurden.

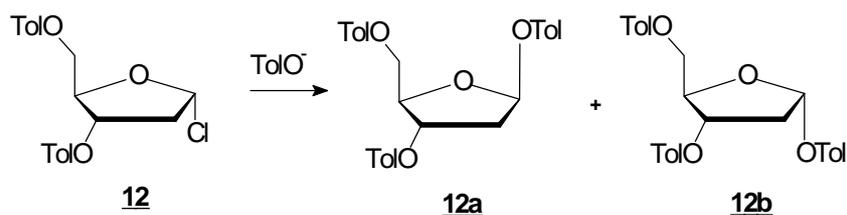


Abbildung 14

Ein möglicher Ansatz zur Optimierung der Glykosidierungsreaktion wäre der Einsatz einer Halogenose mit weniger basenlabilen Schutzgruppen. Die Wahl einer anderen Schutzgruppe ist aber nicht trivial, da die 3'- und 5'-OH- Schutzgruppen entscheidenden Einfluß auf das Anomerenverhältnis und die Reaktionsausbeute haben, wie Untersuchungen von Wierenga und Skulnick¹³⁵ bei Lewis-Säure-Katalyse zeigten. Die Verwendung der Benzylschutzgruppe würde daher den Nachteil mit sich bringen, daß nun sowohl α - als auch β -Anomere entstehen können, da diese Gruppe keinen anomer dirigierenden Effekt besitzt. Der Einfluß der Schutzgruppen ist dabei nicht allein sterischer Natur, sie üben vielmehr auch einen Nachbargruppen-effekt aus. Wie in Abbildung 15 verdeutlicht, kann das α - bzw. β -Anomere entweder über ein intermediäres Acyloxonium-Ion (**26a** bzw. **26b**), wenn dieses durch Beteiligung der Nachbargruppen gebildet werden kann, oder aber durch direktes Abfangen des primären Oxonium-Ions (**26**) entstehen. Dieses ist z.B. bei Verwendung der Benzyl-Schutzgruppe der Fall, die somit nur eine geringe Stereokontrolle ausübt.

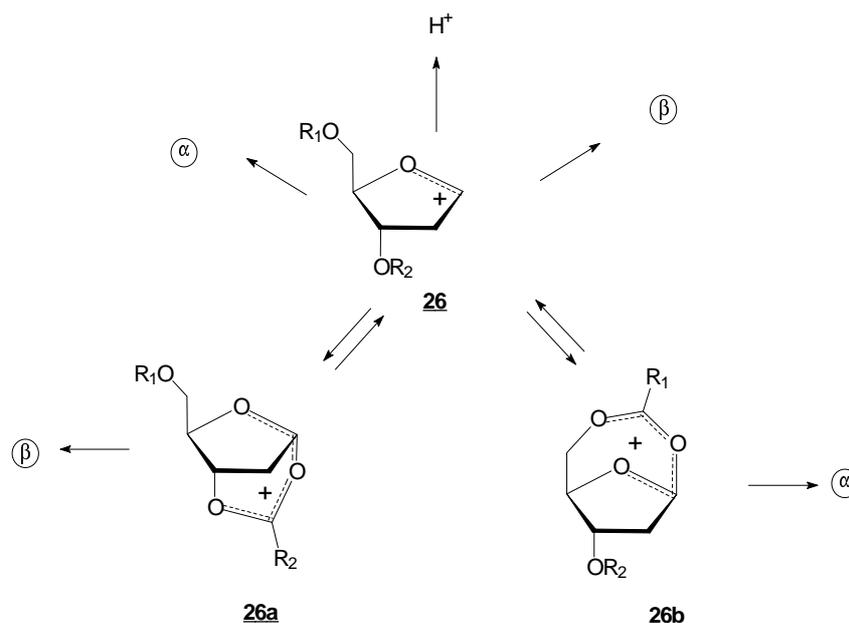


Abbildung 15: Darstellung des Einflusses der OH-Schutzgruppen auf die Anomerenausbeute bei der Glykosidierungsreaktion

Vergleicht man die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Purinnukleoside (**27**, **28**, Abbildung 13) mit denen ihrer 7-Deazahomologen (**22**, **23**), findet man die oben beschriebenen unterschiedlichen Elektronendichten der Heteroaromaten in unterschiedlichen chemischen Verschiebungen bestätigt. Sehr leicht konnte bei den Reaktionen mit Purinbasen mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektrometrie (vgl. Tabelle 3) zugeordnet werden, welches Isostere entstand war. Das über das N^7 -Atom verknüpfte Nukleosid **27a** zeigt eine im Vergleich zum entsprechenden N^9 -Verknüpfungsprodukt deutlich höhere chemische Verschiebung an $1'$ -H und $2'$ -H. Insbesondere unterscheidet sich diese Verbindung von den übrigen Nukleosiden durch eine geringere Differenz der chemischen Verschiebung von H_{2a} und H_{2b} aus. Charakteristisch für die erfolgreiche Bildung des β -Anomeren ist darüber hinaus die pseudo-Triplett-Formation des $1'$ -H-Signales und die besonders deutliche Tieffeldverschiebung des Signales des $2'$ -H_a-Protons.

Bei der Glykosidierung von Purinen (Darstellung von **27** und **28**) lieferte die Natriumhydridmethode erheblich bessere Ausbeuten als die Umsetzung im Zweiphasensystem mit NaOH als Base in der wässrigen Phase. Es wurde daher zunächst die Natriumhydridmethode zur Darstellung von **22** und **23** angewendet. Wirklich zufriedenstellende Ausbeuten wurden damit jedoch nur bei der Darstellung von **22** erzielt (bis zu 75%). Hingegen gelang die Synthese von **23** nach der Methode der fest-flüssig Phasentransferkatalyse unter Verwendung von KOH als Base und eines Kryptanden als Phasentransferkatalysator deutlich besser, wenn auch nur mit

III. Ergebnisse und Diskussion - organische Chemie

einer Ausbeuten von etwa 55 %. Dieser Wert lag aber immerhin 15 % höher als der, der für diese Verbindung nach der Natriumhydridmethode erzielt werden konnte. Die niedrigeren Reaktionsausbeuten bei der Glykosidierung von 7-Deazaguanin überraschen nicht, weist dieses doch im Gegensatz zum 7-Deazaadenin eine exozyklische Aminogruppe auf. Gerade bei Verwendung einer sehr starken Base wie Natriumhydrid entsteht somit sicherlich nicht mehr ausschließlich das gewünschte Pyrrolylanion.

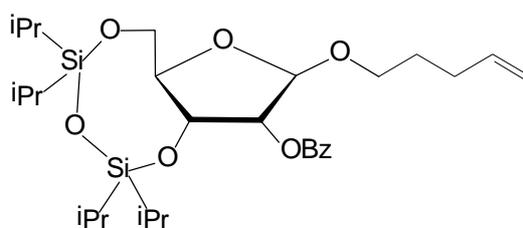
Verb.	1'-H	2'-H _b	2'-H _a	3'-H	4'-H	5'-H	2-H	5-H	6-H	NH ₂
12(α)	6.4	2.7	2.7	5.47	4.78	4.55		---	---	---
7	---	---	---	---	---	---	8.57	6.59	7.68	---
8	---	---	---	---	---	---	---	6.25	7.08	6.46
22	6.99	2.99	3.38	5.98	4.84	4.78	8.86	6.96	8.17	---
28	6.55	2.85	3.15	5.95	4.73	4.73	---	---	8.86	
23	6.55	2.65	2.99	5.68	4.59	4.50	---	6.38	7.34	6.76
27	6.75	2.95	3.50	5.95	4.72	4.72	8.84	---	8.86	---
27a	6.99	3.11	3.27	5.86	4.79	4.69	8.97	---	9.26	---

Tabelle 3: ¹H-NMR-Spektren der Glykosidierungsprodukte und deren Vorstufen, D₆-DMSO

Abschließend betrachtet stellte sich die Umsetzung mit der Halogenose **12** als noch sehr verbesserungsfähig dar. Die Verbindung ist sehr instabil, da sie aufgrund der fehlenden 2'-OH Funktion leicht HCl eliminiert, und muß deshalb in kleinen Mengen stets frisch dargestellt werden und der Umgang mit gasförmigen HCl entspricht auch unter dem Gesichtspunkt des Arbeitsschutzes nicht mehr unbedingt den heute angestrebten "sauberen" Synthesemethoden.

In einer jüngeren Veröffentlichung wurde die Verwendung von Pentenylribosiden, insbesondere Pent-4-enyl-2'-O-benzoyl-3',5'-O-(tetraisopropylsiloxan-1,3-diyl)-D-erythro-pentofuranose (Abbildung 16, **66**) als Glykosidierungsreagenz vorgeschlagen¹³⁶. Diese Verbindung ist sehr leicht darzustellen und ist auch bei längerer Lagerung stabil. Der Weg zu Desoxynukleosiden würde nach Abspaltung der 2'-O-Benzoyl-Gruppe (die Verwendung von 2'-Desoxyderivaten führt, wie weiter oben diskutiert, zum Verlust der stereochemischen Kontrolle in der Glykosidierungsreaktion) durch Barton-Desoxygenierung eröffnet. Allerdings entsprechen die Ausbeuten der mit N-Iodsuccinimid/Trifluormethansulfonsäure katalysierten Reaktion noch nicht den mit der Halogenose **12** erzielten (s.u.), so daß zunächst geeignetere Katalysatoren für die Glykosidierungsreaktion gefunden werden müßten.

Es ist außerdem bekannt, daß die in der Riboreihe beschriebene Glykosidierung von 1-O-Acytriboverbindungen mit silylierten Purinen in Gegenwart von Trimethylsilyltrifluoressigsäure in der 2'-Desoxyreihe immer zu unterschiedlich großem Anteil an α - neben dem gewünschten β -Anomeren¹³⁷ führt.



66

Abbildung 16: Mögliche Struktur eines effektiveren Glykosyldonors für die Nukleosidsynthese

3.4.2 Glykosidierungsreaktionen in der Riboreihe

Die in der Literatur dargestellten Wege zu Ribonukleosiden der 7-Deazapurinreihe bedienen sich der Halogenose 1-Bromo-2,3,5-tris-O-benzyl- α -D-ribofuranose, die frisch aus dem in vierstufiger Synthese wie in Abbildung 11 beschrieben zugänglichen Precursor 2,3,5-Tris-O-benzyl-1-*para*-nitrobenzoyl- α -D-ribofuranose (**20**) hergestellt wurde. Liefert diese Verbindung bei elektronenreicheren Purinen und Purinderivaten hohe Ausbeuten, so sind diese in der Reihe der 7-Deazapurine nur recht mäßig. Als Alternative wurde in späteren Veröffentlichungen die Halogenose 4-Chlor-5-O[(1,1-dimethylethyl)-dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- α -ribofuranose (**16**) als Glykosyldonor beschrieben. In Gegenwart von Tetra-chlorkohlenstoff und HMPT^{138,139} wird bei -78 °C selektiv das α -Anomere der Halogenose **16** gebildet, welches ohne weitere Aufarbeitung für die Glykosidierungsreaktion eingesetzt wird.

Da HMPT zu den wenigen Substanzen zählt, bei denen die kanzerogene Wirkung beim Menschen als erwiesen gilt, ist diese Reaktion zwar vom Verlauf sehr elegant, aber nur bedingt empfehlenswert. Die beiden Methoden zur Darstellung von Ribonukleosiden (vgl. Abbildung 17) bergen den Nachteil, daß die reaktiven Glykosyldonoren jeweils unmittelbar vor einer Reaktion dargestellt werden müssen, da sie nicht oder nicht lange gelagert werden können.

III. Ergebnisse und Diskussion - organische Chemie

Als Alternative bot sich daher eine von Wirsching¹⁴⁰ zur Synthese von thiomodifizierten Nukleosidderivaten vorgestellte Methode an, von der gezeigt werden konnte, daß sie auch auf die Synthese von 7-Deazapurindukleosiden anwendbar ist. So konnte mit der Verbindung 2,3,5-Tris-O-benzyl-1-*para*-nitrobenzoyl- α -D-ribofuranose (**20**) in Gegenwart von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat eine Umsetzung beobachtet werden. Allerdings lagen die Ausbeuten noch unter 20 %. Gelingt es aber einen geeigneten Katalysator für die Reaktion zu entwickeln, könnte diese Art der Reaktionsführung eine äußerst elegante Alternative zu den bisher in der Literatur verwendeten Methoden darstellen. Bei Verwendung der Benzoyl- an Stelle der Benzylschutzgruppe in 2'-Position wäre, wie oben ausgeführt, sehr leicht der Weg auch in die 2'-Desoxyreihe möglich, so daß auf die Verwendung der labilen Halogenose **12** verzichtet werden könnte.

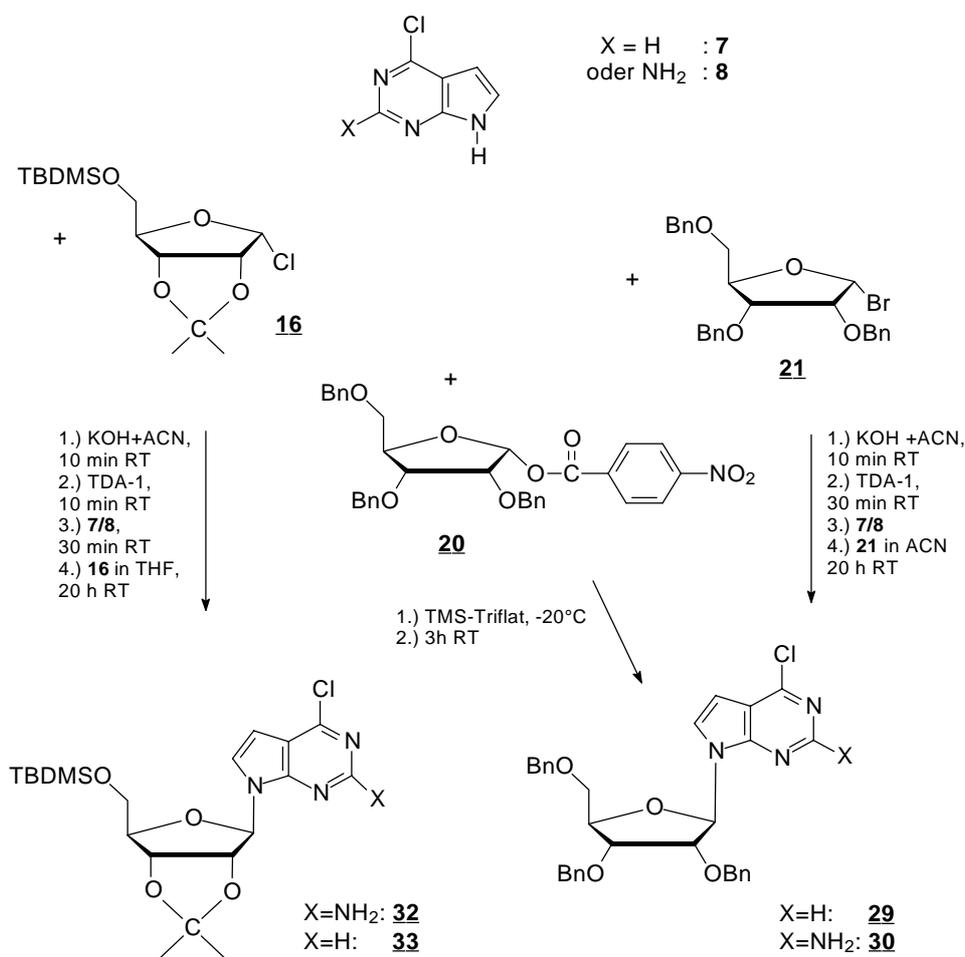


Abbildung 17: Glykosidierungsreaktionen in der Riboreihe mit unterschiedlichen Glykosyldonoren

3.5 Abspaltung der Schutzgruppen aus den Glykosidierungsprodukten

3.5.1 Synthese von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin

Während die Entschützung der Hydroxylgruppen von **22** mit verdünntem Natriummethoxid in Methanol bereits unter milden Bedingungen möglich ist, erfordert die gleichzeitige Substitution des 4-Chloratoms durch Ammoniak recht drastische Bedingungen. Nach Umsetzung von **22** in einem Tischautoklaven bei einer Temperatur von 130 °C und einer Reaktionsdauer von 60 h in einer bei 0 °C gesättigten Lösung von Ammoniak in Methanol und in Gegenwart von Molsieb (0,3 nm) konnte 7-Deaza-2'-desoxyadenosin (**35**) nach säulenchromatographischer Reinigung und erneuter Umsetzung nicht reagierten Eduktes in bis zu 80 %iger Ausbeute isoliert werden. Hierbei mußte auf wasserfreie Reaktionsbedingungen geachtet werden, um eine mögliche Konkurrenzreaktion zum 7-Deaza-2'-desoxyinosin zu verhindern.

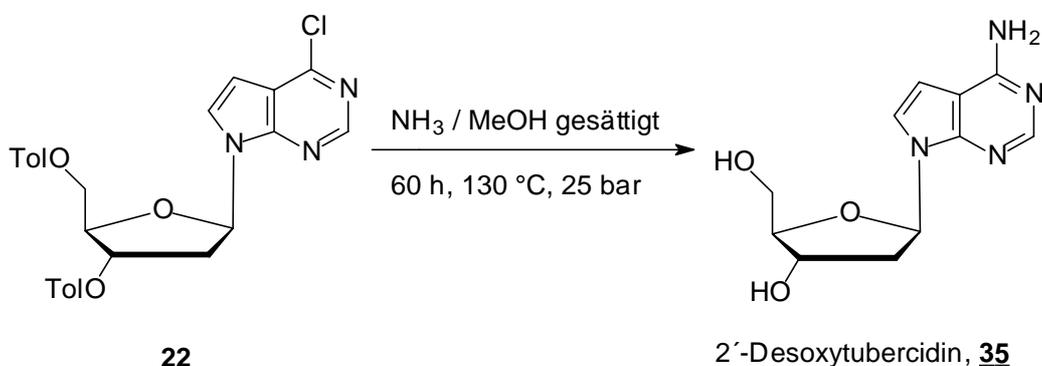


Abbildung 18: Synthese von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin

3.5.2 Synthese von 7-Deaza-2'-desoxyguanosin (**38**)

Die 4-Chlor-Position von Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinnukleosiden ist für eine nukleophile Substitution weniger gut zugänglich als der korrespondierende Substituent in einem Purinderivat. Dies führt dazu, daß die benötigten Reaktionsbedingungen um **23** in **38** zu überführen etwas weniger sanft sind. Die direkte Umwandlung durch Natronlauge führte zu schlechten Ergebnissen. Schonender ist die Entschützung mit verdünnter Natriummethanolatlösung. Die selektive Abspaltung der Toluoylgruppen erfolgte in 0.1 mol/L Natriummethoxid bei Raumtemperatur und man erhielt die noch an C-4 chloresubstituierte Verbindung **36**. Eine Entschützung der Hydroxylgruppen war als ungewollte Nebenreaktion auch zu beobachten, als ein Glykosidierungsansatz nach Filtration über Nacht stehengelassen wurde, ohne das Lösungsmittel abzudestillieren. Vor diesem Hintergrund erscheinen in der Literatur vorgeschlagene Reaktionszeiten von 12 bis 24 h für die Glykosidierungsreaktionen als weniger sinnvoll und die Beobachtung höherer Ausbeuten an **23** bei einer Verkürzung der Reaktionszeit als verständlich.

III. Ergebnisse und Diskussion - organische Chemie

Erhitzte man **23** mit 0.5 mol/L Natriummethoxid in Methanol unter Rückfluß oder ließ mit einer 1 molaren Lösung bei Raumtemperatur über Nacht stehen, so erfolgte nukleophile Substitution des Chloratoms in 4-Position. Auf diese Weise wurde **37** in 68 % Ausbeute erhalten. Im Falle des Purinnukleosides **27** gelang diese Reaktion bereits innerhalb von 2 h bei RT. **36** und **37** lieferten dann in einer anschließenden Reaktion nach Erhitzen unter Rückfluß mit 2 mol/L Natronlauge 7-Deaza-2'-desoxyguanosin (**38**) in jeweils etwa 80 %iger Ausbeute. Aufgrund etwas günstigerer chromatographischer Eigenschaften der Zwischenverbindung ist allerdings der Weg über **37** vorzuziehen.

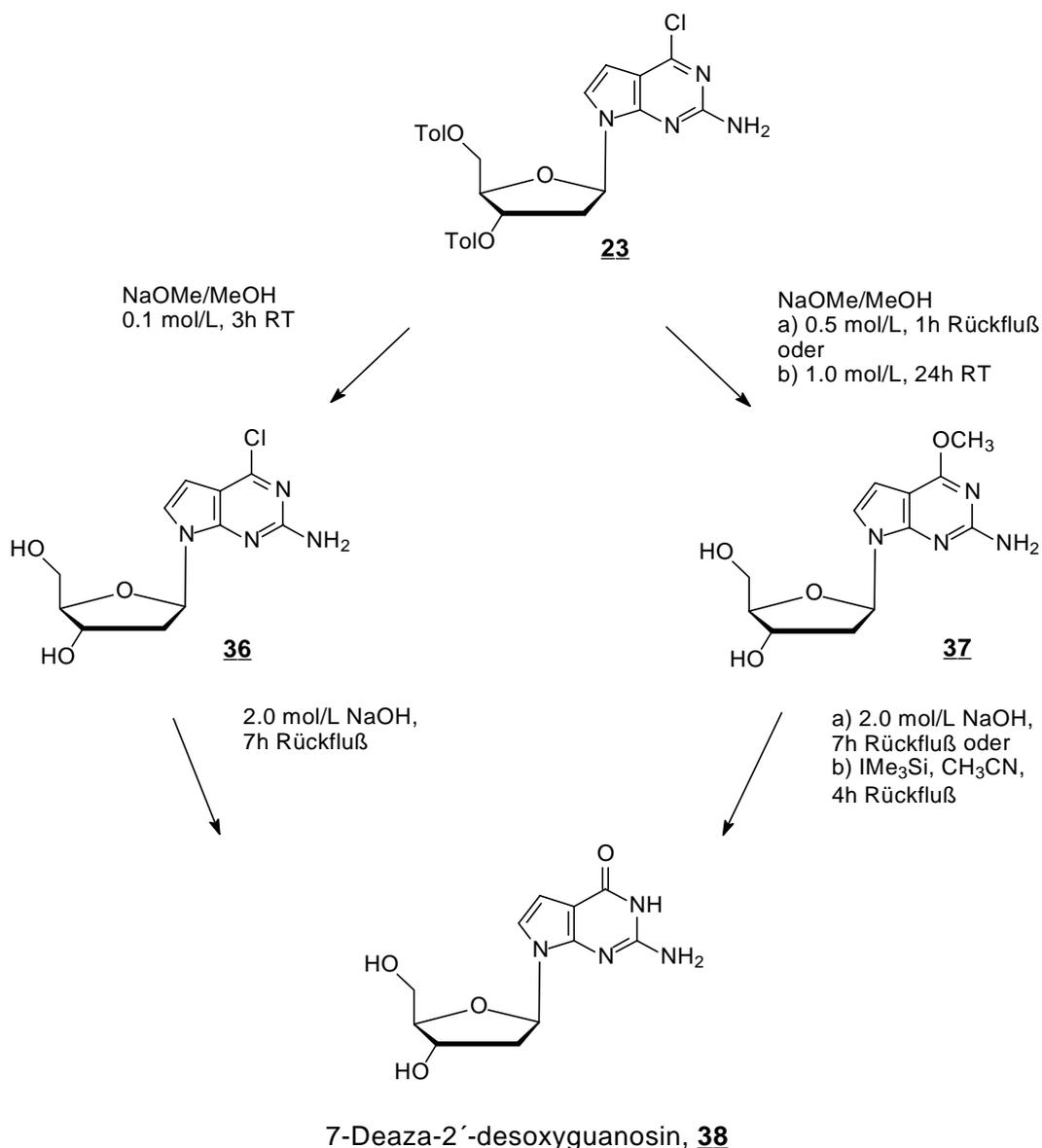


Abbildung 19: Wege zur Überführung des Glykosidierungsproduktes **23** in die Zielverbindung **38** (7-Deaza-2'-desoxyguanosin)

Die Abtrennung der Reaktionsnebenprodukte sowie das Entsalzen des Reaktionsgemisches erfolgte auf einfache Weise an einer Ionenaustauschersäule (Amberlite XAD-4). Die ebenfalls in der Literatur zu findende Abspaltung der Methylgruppe aus **37** mit *in situ* aus Natriumiodid und TMS-Chlorid dargestelltem Iodtrimethylsilan in abs. Acetonitril als Lösungsmittel¹³² brachte keine höheren Reaktionsausbeuten, so daß an der zuerst beschriebenen Variante festgehalten wurde.

4 Chemische Festphasensynthese von Oligodesoxynukleotiden

4.1 Die Phosphoamiditmethode

Die Phosphoamidit-Methode ist die bislang effizienteste Methode zur Synthese von Oligonukleotiden. Sie ist als eine Weiterentwicklung der von Letsinger 1975 vorgestellten Phosphitriester-Methode^{141,142} zu verstehen, die sich Phosphochloridite und -imidazole als reaktiver Spezies bediente. Deren Hauptnachteil war die extreme Empfindlichkeit der reaktiven Spezies gegen Spuren von Wasser, womit nur eine bedingte Anwendbarkeit für die Festphasensynthese von Oligonukleotiden gegeben war. Die in Arbeiten von Beaucage und Caruthers¹⁴³ vorgestellten Phosphoamidite sind dagegen, bei vergleichbarer Reaktivität, Verbindungen, die sich als Feststoffe isolieren und über Jahre lagern lassen. Zur bedeutendsten Verbesserung der Methode zur Anpassung an die Bedürfnisse der automatisierten Festphasensynthese¹⁴⁴ gehörte die Einführung der Cyanoethoxyschutzgruppe^{76,171,172} anstelle der anfangs verwendeten Methoxy-Funktion als permanente Schutzgruppe am Phosphor-Atom. Während zur späteren Abspaltung der Methoxy-Funktion eine Lösung von Thiophenol und Triethylamin in Dioxan erforderlich war¹⁴⁵, kann die Cyanoethoxy-Gruppe bereits unter deutlich milderen Bedingungen durch β -Eliminierung freigesetzt werden. Dies ist durch wäßrige Ammoniumhydroxid-Lösung möglich, also unter den Bedingungen, unter denen auch die Aminoschutzgruppen der Basen abgespalten werden. Ein weiterer noch viel gravierender Nachteil beim Einsatz der Methoxyschutzgruppe zeigte sich in der Beobachtung einer partiellen Methylierung der Basen, insbesondere in der N³-Position von Thymin¹⁴⁶.

Ein typischer Syntheseyklus zur Verlängerung um ein Nukleotid besteht aus vier Teilschritten. Zuerst wird die terminale 5'-O-Dimethoxytrityl-Gruppe eines meistens an porösen Glaskügelchen (CPG)^{147,148} als Träger gebundenen (Oligo-)Nukleotids unter dem Einfluß einer wasserfreien Säure wie Dichlor- oder Trifluoressigsäure, oder v.a. bei Synthesen in Lösung einer Lewis-Säure (z.B. wasserfreies Zinkbromid¹⁴⁹) abgespalten (vgl. Abbildung 20, Schritt A). Die intensive Orangefärbung des Tritylkations eignet sich, um den Verlauf der Synthese zu verfolgen. Alle DNA-Synthesizer führen daher am Anfang eines jeden Syntheseschrittes eine photometrische Bestimmung der aus der Reaktionssäule austretenden Flüssigkeit durch.

Der so erhaltene Trityl-Assay gibt Auskunft über den Erfolg und Verlauf der Synthese. In der sich anschließenden Kondensationsreaktion (Schritt B) wird mit dem durch Tetrazol oder Tetrazolderivaten^{150,151} aktivierten Phosphoamidit¹⁵² an der frei zugänglichen 5'-OH-Funktion des letzten Nukleotids die Sequenz um ein Nukleotid unter Ausbildung eines Phosphittriesters verlängert.

Bei den üblicherweise angewendeten Amiditüberschüssen von 5 - 10 Äquivalenten betragen die erreichten Kopplungsraten etwa 99.5 %. Dennoch verbleiben nicht umgesetzte 5'-OH-Funktionalitäten, die mit Acetanhydrid, aktiviert durch Dimethylaminopyridin (DMAP) oder N-Methylimidazol, verestert werden („capping“) und somit für weitere Reaktionen nicht mehr zur Verfügung stehen (Schritt C). Nachfolgend wird der Phosphitriester in der Regel durch wäßrige Iod-Oxidation zum wesentlich stabileren Phosphotriester oxidiert (Schritt D). Diese Reaktionsfolge wird solange wiederholt, bis die gewünschte Sequenz synthetisiert wurde¹⁵³.

Die anschließende Abspaltung des Oligonukleotides vom Trägersupport (meistens makroporöse Glasträger¹⁵⁴) erfolgt z.B. mit konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung, begleitet durch die Abspaltung der Phosphatschutzgruppe. Die Deacylierung der exozyklischen Aminogruppen der Basen erfordert i.d.R. eine anschließende Inkubation der Lösung bei erhöhter Temperatur. Ist eine Reinigung der Synthese-Produkte durch RP-HPLC¹⁵⁵ (oder bei einfachen Trennproblemen mit Hilfe von OligopacTM-Reinigungssäulen) vorgesehen, verbleibt die unter alkalischen Bedingungen sehr stabile, äußerst lipophile DMT-Schutzgruppe am Oligonukleotid und wird erst nach erfolgter Reinigung abgespalten. Zur Synthese kürzerer, nichtmodifizierter Oligonukleotide wie Primer für biochemische Reaktionen ist eine HPLC-Aufreinigung häufig nicht notwendig, da die Reinheit des Rohproduktes der Synthese vollkommen ausreichend ist, so daß die DMT-Gruppe noch vor Lösen des Oligonukleotides vom Trägersupport durch Einwirkung von TCA in Dichlormethan abgespalten wird.

Durch die Verwendung modifizierter Amidite lassen sich eine Vielzahl von Markierungen wahlweise an das 3'- oder 5'-Ende oder auch an Positionen innerhalb einer DNA-Sequenz einbringen¹⁵⁶. So ist eine Biotinylierung von Oligonukleotiden bereits bei der Synthese durch Verwendung von Biotin-Amiditen möglich. Derartige Sequenzen werden zum Beispiel als Primer in biochemischen Reaktionen verwendet und ermöglichen eine sehr einfache Aufarbeitung über Streptavidin-Beads von Proben für die Analytik, z.B. für die MALDI-TOF Massenspektrometrie.^{157,158}

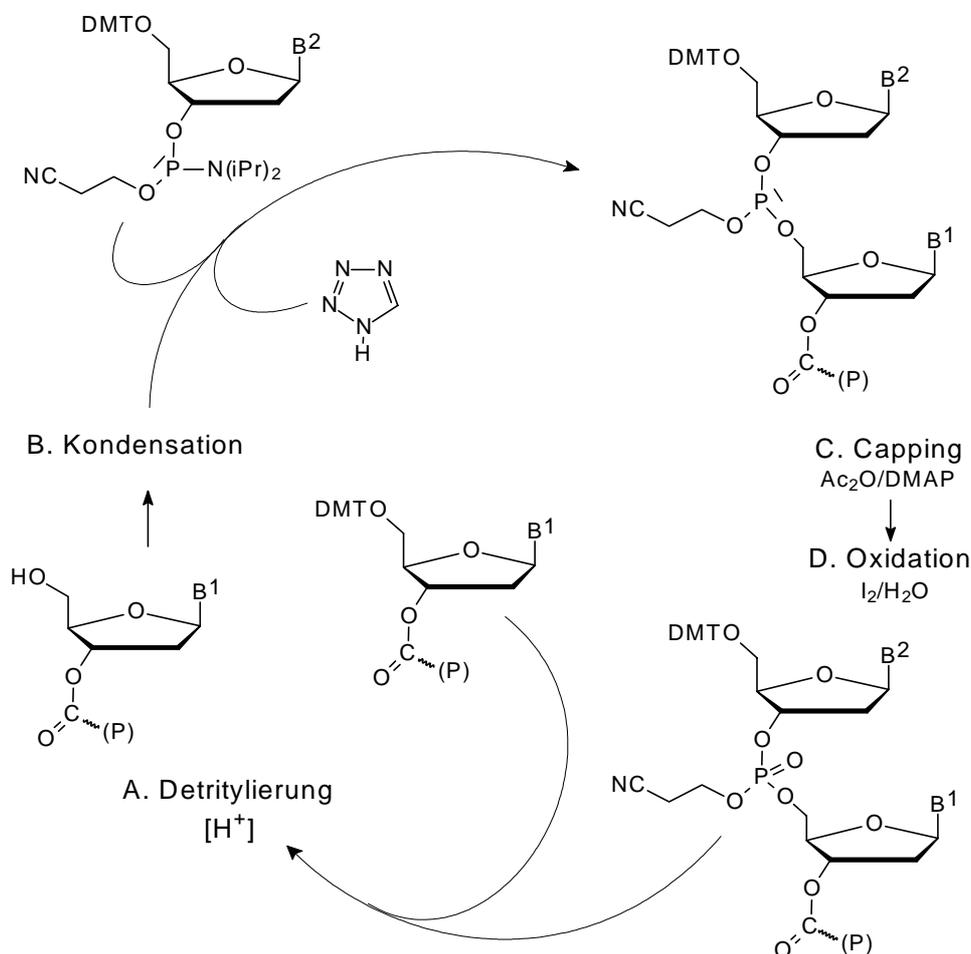


Abbildung 20: Chemische Synthese eines Oligonukleotids nach dem Festphasenphosphoramidit-Verfahren. Das 3'-Nucleotid wird zunächst an einen inerten Träger aus kleinen Glaskügelchen (CPG) geheftet, die man in ein Reaktionsgefäß füllt. Das Oligonukleotid entsteht nun, indem das Molekül in einem Drei-Schritt-Prozess jeweils um ein Nucleotid in 3'-5'-Richtung wächst. Beim ersten Schritt entfernt man die Dimethoxytrityl-(DMT-)Gruppe, welche die 5'-OH-Position des Nucleotids schützt (A). Im zweiten Schritt gibt man dann den Nucleotidvorläufer mit der Base 2 zu. Die 5'-Hydroxylgruppe von Nucleotid 1 reagiert mit dem 3'-gebundenen Phosphor von Nucleotid 2 (B). Im dritten Schritt wird das instabile dreiwertige Phosphit zum stabilen Phosphat oxidiert (D). Damit ist der erste Zyklus abgeschlossen und der Vorgang kann wiederholt werden. Am Ende spaltet man das fertige Oligonukleotid vom Glasträger und entfernt die Schutzgruppen für die Phosphate und Basen.

4.2 Darstellung von Monomeren für die DNA-Synthese

Um mögliche Nebenreaktionen zu vermeiden, bedarf es bei der chemischen Oligonukleotidsynthese einer ausgefeilten, orthogonalen Schutzgruppenstrategie. Die wichtigsten Anforderungen dabei sind eine gute Umsetzung mit dem zu schützenden Nukleosid, die Stabilität während der folgenden Reaktionen und Reinigungsschritte, sowie eine selektive und quantitative, zusätzlich möglichst schnelle Abspaltbarkeit. Außerdem sollten die verwendeten Basen-, Zucker- und Phosphatschutzgruppen möglichst leicht zugänglich, billig, wenig toxisch und vom Produkt gut zu trennen sein.

Zum Schutz der exozyklischen Aminofunktion haben sich im wesentlichen die seit langem verwendeten, basenlabilen Acylschutzgruppen bewährt^{159,160}; dabei wird die Aminofunktion des Guanin isobutyryliert, die des Adenin benzyliert. Die Verwendung von besonders basenlabilen Schutzgruppen, wie der 4-*tert*-Butylphenoxyacetylenschutzgruppe¹⁶¹ oder der Phenoxyacetylenschutzgruppe, bringt bei der Synthese von Nukleinsäuren gegenüber dem Einsatz von Isobutyryl- und Benzoylgruppe einige Vorteile mit sich. Die Wahl der von Khorana und Coautoren eingeführten Isobutyryl- und Benzoylgruppen zum Schutz der exozyklischen Aminofunktionen von Guanin, Adenin und Cytosin geht bereits auf die Einführung der Phosphodiestermethode zur Oligodesoxyribonukleotidsynthese zurück¹⁶². Hier erforderten die Reaktionsbedingungen noch relativ stabile Schutzgruppen für die exozyklischen Aminogruppen. Berücksichtigt man die im Bereich der Phosphotriester und Phosphoamidit-Synthese gemachten Fortschritte, bergen diese Schutzgruppen heutzutage u.U. einige Nachteile: Die durch Einführung der Schutzgruppe entstehende Amidbindung ist von so großer Stabilität, daß eine Entschützung nur unter recht drastischen Bedingungen möglich ist (üblicherweise 20 h in konzentriertem Ammoniak bei 55 °C in verschlossenen Reaktionsgefäßen). Selbst unter diesen Bedingungen erfolgt, je nach G-Anteil des hergestellten Oligonukleotides, nicht immer eine quantitative Abspaltung der sehr stabilen Isobutyrylgruppe von den Desoxyguanosinresten¹⁶³.

Weiterhin muß die 5'-OH Position der Desoxyriboseeinheit mit einer im Laufe des Synthesesyklus selektiv abspaltbaren Funktion blockiert werden. Hierzu werden säurelabile oder neutralspaltbare Verbindungen eingesetzt. In der Festphasensynthese von Oligodesoxynukleotiden findet heute ausschließlich die Bis(4-methoxyphenyl)-phenylmethylgruppe (Dimethoxytrityl-) Verwendung¹⁶⁴. Sie bietet den Vorteil der selektiven Einführung in der gewünschten Position auf Grund ihrer hohen sterischen Ausdehnung, der leichten spektroskopischen Nachweisbarkeit und guter chromatographischer Eigenschaften. Darüber hinaus ermöglicht sie durch ihre lipophilen Eigenschaften die RP-HPLC Aufreinigung des synthetisierten Oligonukleotides.

Gegenüber der unsubstituierten Tritylverbindung zeichnet sich diese durch eine erhöhte Säurelabilität aus, die sich in erheblich verkürzten Zeiten für die jeweiligen Syntheseyklen und einer Minimierung der Gefahr der Depurinierung niederschlägt. Die schließlich am Phosphor-III-Atom eingesetzte Cyanoethoxyschutzgruppe läßt sich im Gegensatz zu anderen Phosphat-schutzgruppen, bei denen recht drastische Methoden zu ihrer Abspaltung angewendet werden, einfach und selektiv als Acrylnitril eliminieren. Der Angriff des als Base verwendeten Ammoniaks erfolgt dabei am β -C-Atom und nicht am Phosphor, so daß ein Bruch der Oligonukleotidkette fast ausgeschlossen wird.

Für die selektive Einführung der Aminoschutzgruppe existieren zwei alternative Wege: zum einen die temporäre Silylierung, zum anderen der Peracylierung mit anschließender selektiver Deacylierung.

4.2.1 Temporäre Silylierung

a) 1982 stellte Jones¹⁶⁵ ein Konzept der temporären Schützung (transient protection) zur Synthese geschützter Desoxynucleoside, insbesondere für 2'-Desoxyadenosin, vor. Hierzu werden die Desoxynucleoside zunächst mit Chlortrimethylsilan in Pyridin versetzt, um die Hydroxylgruppen als Trimethylsilylester zu schützen (die dabei entstehenden Verbindungen wurden bisher nicht isoliert), und danach mit dem Acylierungsreagenz (z.B. Benzoylchlorid oder Isobuttersäureanhydrid) versetzt. Die Hydrolyse der Trimethylsilylgruppen erfolgt anschließend innerhalb weniger Minuten mit verdünntem Ammoniak. Dabei wird außerdem als Nebenprodukt entstehendes *N,N*-Dibenzoyl-desoxyadenosin in das gewünschte monoacylierte Produkt überführt. Die aminogeschützten Nucleoside können dann anschließend mit DMT-Chlorid in Pyridin selektiv in 5'-OH-Position als Ether geschützt werden.

b) Für die Umsetzung mit Desoxyadenosin wurde eine Eintopfsynthese beschrieben¹⁶⁵, die die Einführung der Schutzgruppen in umgekehrter Reihenfolge zusammenfaßt. Im ersten Schritt wird mit DMT-Chlorid umgesetzt, das überwiegend in der 5'-OH-Position eintritt. Als Nebenprodukt entsteht aber auch eine $N^6,5'$ -O-bis-dimethoxytritylierte Verbindung. Bei der nachfolgenden Umsetzung mit Chlortrimethylsilan und Benzoylchlorid wird jedoch beschrieben, daß in hoher Ausbeute das gewünschte 6-Benzoylamino-2'-desoxy-5'-O-dimethoxytrityladenosin entsteht, so daß die Benzoylgruppe die Dimethoxytritylgruppe anscheinend aus der N-Position verdrängt. Es stellte sich aber auch heraus, daß diese Methode nicht zum Schützen von Desoxyguanosin geeignet ist, da dieses bevorzugt an N^2 und nicht in der gewünschten 5'-OH-Position trityliert wird. Die Acylierungsausbeute konnte hier durch Zusatz einer katalytischen Menge an *N,N*-Dimethylaminopyridin als Coreagenz gesteigert werden¹⁶⁶.

4.2.2 Peracylierung nach Khorana¹⁶⁷

Nach dieser Methode, die insbesondere häufig zum Einführen der Aminoschutzgruppe in Desoxyguanosin angewandt wird, wird das zu schützende Nukleosid zunächst mit dem Anhydrid der betreffenden Säure peracyliert. Die Tatsache, daß Ester reaktiver als Säureamide sind, wird im Anschluß gezielt genutzt, um durch selektives Entschützen der OH-Gruppen mit Natronlauge das triacylierte Zwischenprodukt in die angestrebte mono-N-acylierte Zielverbindung zu überführen. In einer nachgelagerten Reaktion kann dann wieder die DMT-Funktion in der 5'-OH-Position eingeführt werden.

4.3 Benzoyl- und Isobutyryl-Gruppe als exozyklische Aminoschutzgruppen

4.3.1 Synthese von 4-(Benzoylamino)-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**42**)

2'-Deoxytubercidin (**35**) wurde zunächst durch Reaktion der 4-Aminogruppe mit frisch destilliertem Benzoylchlorid nach dem oben zuerst beschriebenen Verfahren, bei dem die glykonischen Hydroxylgruppen temporär durch Trimethylsilylreste geschützt werden, in etwa 85 % Ausbeute zu Verbindung **42** umgesetzt (Abbildung 21). Es hat sich gezeigt, daß für die Reaktionsführung ein wesentlich höherer Überschuß an TMS-Chlorid im Vergleich zu dem in der Literatur für 2'-Deoxyadenosin beschriebenen günstig ist. Die Benzoylierung an der 4-Aminogruppe ergibt sich am deutlichsten aus dem ¹H-NMR-Spektrum durch das Verschwinden des Signales der Aminogruppe bei 7 ppm und dem Auftreten eines Signales bei 11 ppm, welches dem Amidproton zugeordnet werden kann. Darüber hinaus findet man im ¹³C-Spektrum eine Hochfeldverschiebung der 4-C, 4a-C und 5-C-Signale.

4.3.2 Synthese von 4-(Benzoylamino)-7-(2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**43**)

Die 4,4'-Dimethoxytritylierung von **42** führte in etwa 90 % Ausbeute zu **43**. Die Tritylierungsposition wird sowohl durch das Fehlen des 5'-OH-Triplets im ¹H-NMR-Spektrum als auch durch die Hochfeldverschiebung des 5'-C-Signals um 2 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum angezeigt. Zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten durch Detritylierung des Nukleosides am sauren Kieselgel war unbedingt dem zur Säulenchromatographie verwendeten Lösungsmittelsystem ein geringer Anteil an Pyridin oder auch Triethylamin zuzugeben.

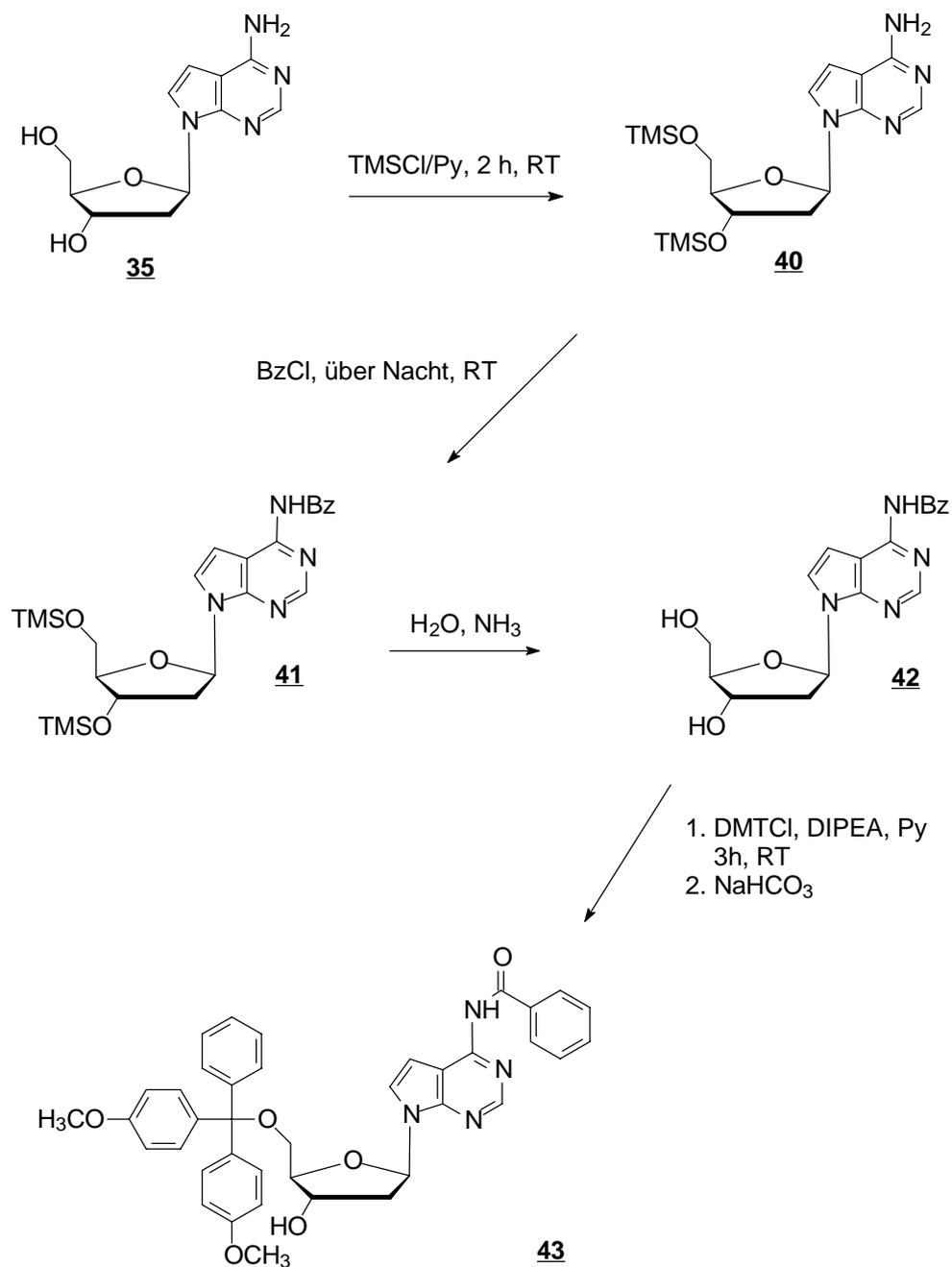


Abbildung 21: Synthese von 4-(Benzoylamino)-7-(2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**43**)

4.3.3 Darstellung von 2-[2-Methylpropanoylamino]-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on (**46**)

Es stellte sich heraus, daß die Einführung der Isobutyrylgruppe auf dem Weg der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen temporären Silylierung im Falle des 7-Deazaguanosinderivates nur zu völlig unzufriedenstellenden Ausbeuten führte (< 20 %). Auf die möglichen Gründe hierzu wird unter 4.3.4 bei der Diskussion der ebenfalls bei der Einführung der 4-*tert*-Butylphenoxyacetylenschutzgruppe beobachteten Probleme noch näher eingegangen.

Es wurde daher das aminogeschützte Nukleosid 2-[2-Methylpropanoylamino]-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (**46**) nach der bereits weiter oben beschriebenen Methode von Khorana (vgl. 4.2.2.), der Peracylierung mit anschließender selektiver Deacylierung, dargestellt. Hierzu wurde 7-Deaza-2'-desoxyguanosin (**38**) zunächst mit einem großen Überschuß Isobuttersäureanhydrid in Pyridin zu **44** in guter Ausbeute peracyliert. In der nachfolgenden Reaktion wurde dann aus der säulenchromatographisch isolierten Verbindung **44** durch eine selektive Hydrolyse der reaktiveren Esterbindungen unter Erhaltung der gewünschten Amidbindung das aminogeschützte Nukleosidderivat erhalten. Dies gelang durch schnelles Erreichen eines sehr hohen pH (> 12) bei niedriger Temperatur. Mit Hilfe eines mit Pyridin beladenen Ionenaustauschers (DOWEX™ X8) konnte dann gleichzeitig die Reaktion abgebrochen und die Lösung entsalzt werden. Das Produkt kann an Kieselgel mit Hilfe des Harzes Amberlite XAD-4 säulenchromatographisch in guten Ausbeuten isoliert werden.

4.3.4 Synthese von 2-(2-Methylpropanoylamino)-7-[2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on (**47**)

Die anschließende Umsetzung der 5'-OH-Position des aminogeschützten Nukleosides mit Dimethoxytritylchlorid in Pyridin in Anwesenheit des tertiärenamins Ethyldiisopropylamin lieferte nach säulenchromatographischer Aufarbeitung die an 5'-O veretherte Verbindung 2-(2-Methylpropanoylamino)-7-[2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on (**47**) in fast quantitativen Ausbeuten (vgl. Abbildung 22).

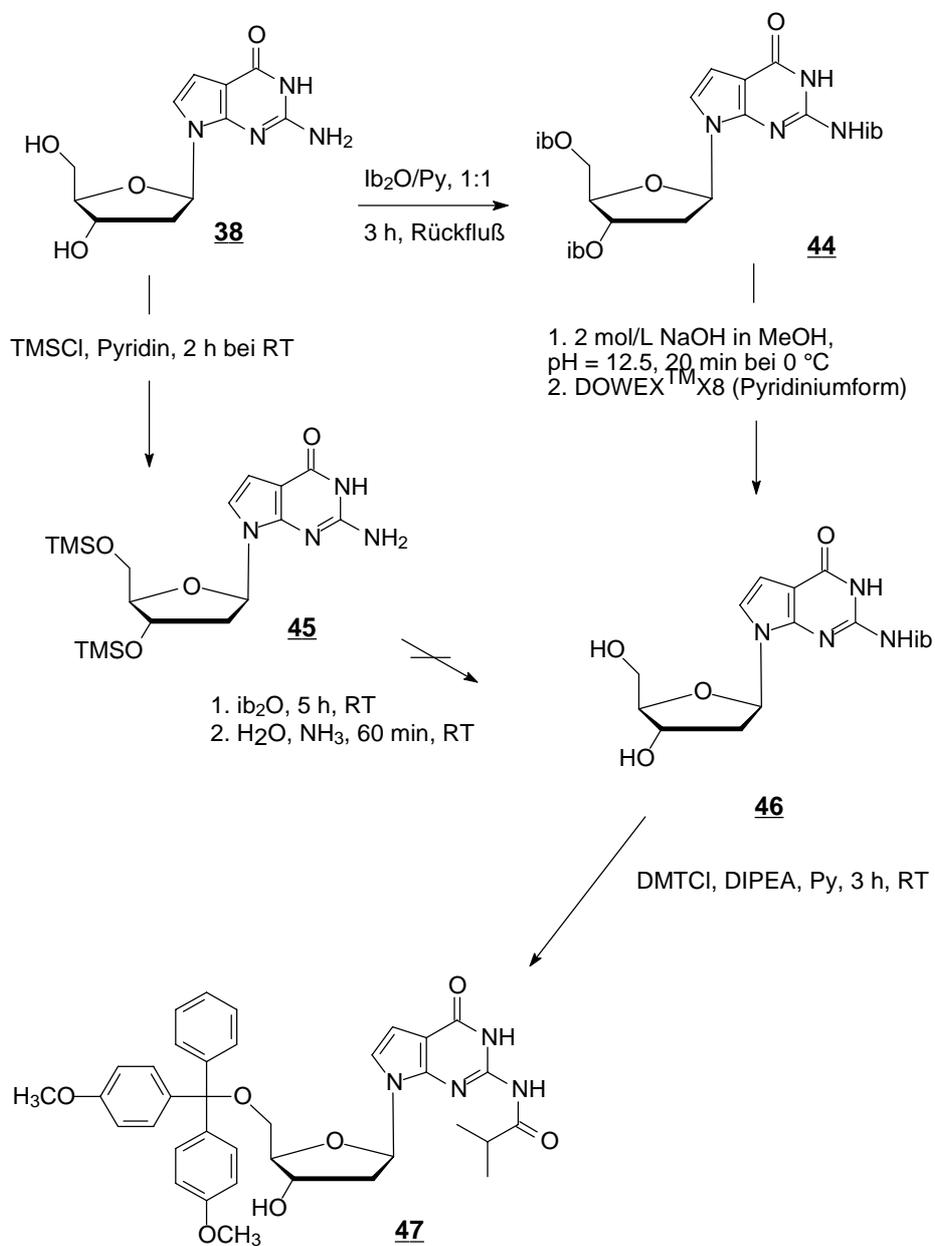


Abbildung 22: alternative Synthesewege zur Darstellung von 7-Deaza-2'-desoxy-5'-dimethoxytrityl-2-(2-methylpropanoylamino)-guanosin (**47**)

4.4 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäure als Schutzgruppe für exozyklische Aminogruppen

4.4.1 Darstellung von N⁴-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**51**)

Die Synthese der Aminoschutzgruppe ist einfach, da das Säurechlorid über Williamson'sche Ethersynthese durch nukleophile Substitution von Chloressigsäure mit 4-*tert*-Butylphenolat und anschließende Umsetzung mit Thionylchlorid zugänglich ist. Das Anhydrid konnte käuflich erworben werden.

Zunächst wurde versucht, **51** entsprechend der bei 4.2.1. unter b) beschriebenen Eintopfreaktion darzustellen. Dazu wurde das Nukleosid **35** in Pyridin mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.5 Eq. DMT-Chlorid, 1.5 Eq. Triethylamin und 0.1 Eq. DMAP) zur 5'-O-dimethoxytritylierten Verbindung **52** umgesetzt. Zu der Lösung wurde direkt TMS-Chlorid zur Blockierung der 3'-OH-Gruppe gegeben und anschließend mit 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäurechlorid versetzt. **51** konnte so in maximal 10 %iger Ausbeute isoliert werden.

Lief die Dimethoxytritylierung zu **52** laut DC-Kontrolle glatt, entstand bei der anschließenden Umsetzung zu **51** ein komplexes Produktgemisch, vermutlich durch durch *N,N*-Bisacylierung, durch nicht komplett erfolgte Silylierung der 3'-OH-Gruppe und auch durch Zersetzung mit dem aggressiven 4-*tert*-Butylphenoxyacetylchlorid. Von Relevanz ist sicherlich auch das bei der Umsetzung von 2'-Desoxyadenosin beschriebene Auftreten einer N⁴,5'-O-bis-tritylierten Spezies. Die geringe Reaktivität der Amidbindung im 7-Dezaanalogon dürfte die gewünschte Substitution der Trityl- durch die Aminoschutzgruppe im Reaktionsverlauf deutlich erschweren.

Als weiterer Syntheseweg bot sich die sukzessive Einführung der beiden Schutzgruppen in zwei getrennten Reaktionen an, die bereits bei der Synthese von **47** zum Erfolg geführt hatte. Eine laut DC-Kontrolle vollständige Silylierung wurde mit einem großen Überschuß an Hexamethyldisilazan in DMF innerhalb von fünf Stunden erreicht. Das silylierte Zwischenprodukt wurde dann mit 4-*tert*-Butylphenoxyacetylchlorid durch Aktivierung mit einer katalytischen Menge an DMAP umgesetzt. Weder eine Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu dreitägiges Rühren bei RT noch die Erhöhung der Reaktionstemperaturen führten zu einer quantitativen Umsetzung. Als problematisch erwies sich auch die anschließende selektive Spaltung der Trimethylsilylether. Während dies in Anwesenheit der Benzoylgruppe mit verd. Ammoniak gelang, so wurde hingegen in Gegenwart der basenlabilen 4-*tert*-Butylphenoxyacetylgruppe nicht nur die selektive Entschützung der OH-Gruppen beobachtet, sondern auch die nicht erwünschte hydrolytische Abspaltung der N-Acylgruppe.

Ein in der Literatur in anderem Zusammenhang vorgeschlagenes Verfahren zur schonenderen Desilylierung mit Methanol/Wasser/Pyridin erwies sich ebenfalls als nicht optimal, da wie bei der Umsetzung von Desoxyadenosin mit Benzoylchlorid beschrieben, auch eine *N,N*-bis-4-*tert*-butylphenoxyacetylierte Spezies auftritt, die unter diesen Bedingungen ebenfalls aufgrund der deutlich reduzierten Reaktivität der Amidbindung im 7-Deazapurin recht stabil ist. N^4 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**50**) konnte daher nie mit mehr als 25 % Ausbeute isoliert werden.

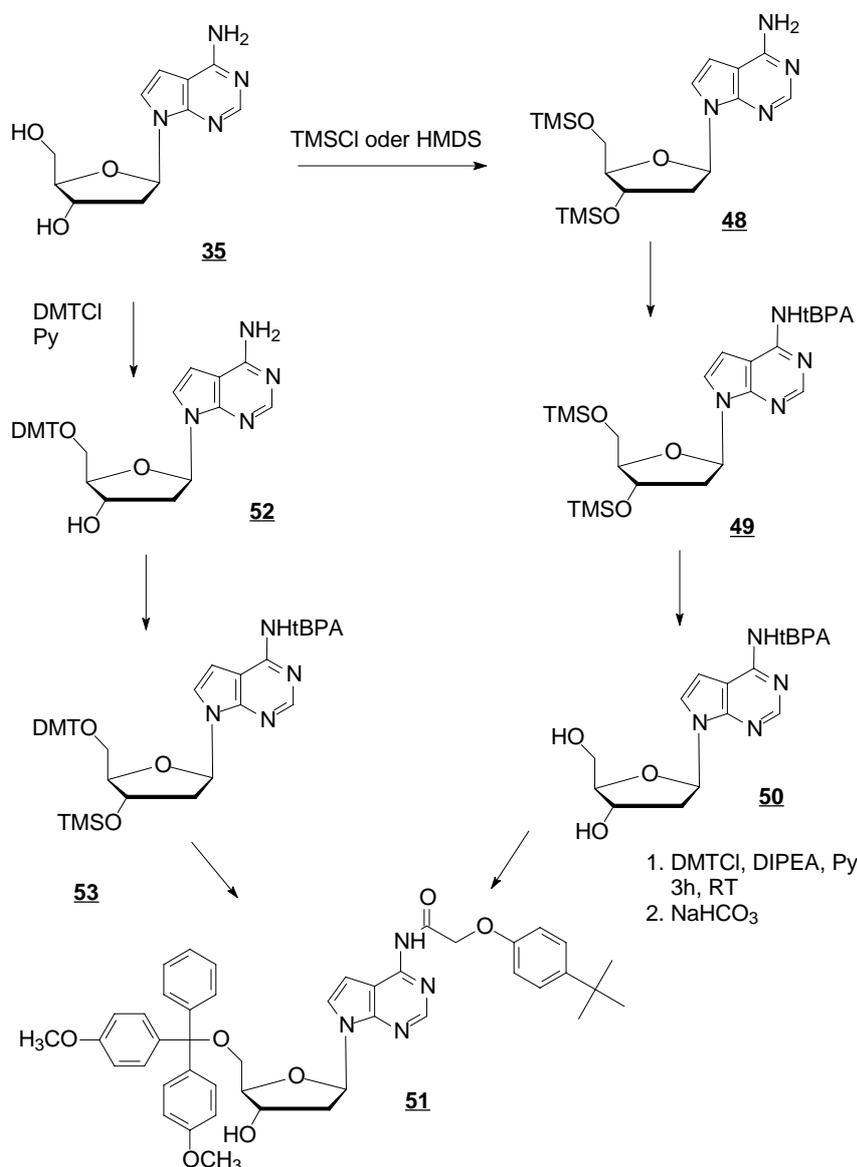


Abbildung 23: Darstellung von N^4 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin aus 7-Deaza-2'-desoxyadenosin auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen

Die anschließende Umsetzung des aminogeschützten Nukleosides **50** mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin (in Anwesenheit von *N,N*-Diisopropylethylamin) lieferte nach säulenchromatographischer Isolierung die Verbindung N^4 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**51**) in hoher Ausbeute.

4.4.2 Synthese von 2-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetylamino]-7-[2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**56**)

Da bereits beim Einführen der Isobutyrylgruppe auf dem Weg der temporären Silylierung Probleme auftraten, wurde zunächst versucht, N^2 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**56**) ebenso nach der Methode von Khorana darzustellen. Dies schlug jedoch fehl. Zwar ließ sich **38** zu **55** peracylieren, nur die anschließende Entschützung der Hydroxylgruppen erfolgte jedoch selbst unter mildesten Bedingungen (Triethylamin/Pyridin/Wasser¹⁶⁸) und bei niedrigen Temperaturen niemals selektiv. Es entstand stets nach kurzer Zeit das vollständig entschützte Edukt **38**. Eine Beobachtung, die auch von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Seela gemacht wurde¹⁶⁹. Die deutlich geringere Nukleophilie der exozyklischen Aminogruppe im 7-Deazapurinringsystem führt offensichtlich dazu, daß die Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit der Amidbindung im Vergleich zur Esterbindung der Hydroxylgruppen wesentlich geringer sind als dies in normalen Purinnukleosiden der Fall ist. Bei Verwendung einer Schutzgruppe, die ohnehin durch leichte Hydrolysierbarkeit gekennzeichnet ist, sind die Unterschiede in der Reaktivität zu gering, um noch eine selektive Spaltung der Bindungen beobachten zu können.

Es wurde daher der Weg der temporären Silylierung beschritten. Zur Silylierung wurden wie bei der Synthese des aminogeschützten 7-Deaza-2'-desoxyadenosin verschiedene Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln getestet. Hier führte ausschließlich die von McGee¹⁷⁰ zur Synthese von Isobutyryldeoxyguanosin beschriebene Umsetzung mit einem etwa zehnfachen Überschuß an Hexamethyldisilazan in DMF zu einer auf dem DC kompletten Silylierung zu **54**. Es wurde sodann versucht, mit 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäureanhydrid in bis zu zehnfachem Überschuß in Pyridin analog zur Synthese des isobutyrylgeschützten Derivates eine Umsetzung von **54** zu **58** zu erreichen. Die Reaktion lief selbst nach mehrtägigem Rühren bei RT nie quantitativ, da die Reaktivität des Anhydrides offensichtlich zu gering war. Das Acylierungsreagenz muß neben der Acylierung der freien Aminofunktion auch in der Lage sein, die TMS-Gruppe aus dieser Position zu verdrängen, da davon auszugehen ist, daß auch diese zumindest teilweise silyliert ist.

Umsetzungen mit 4-*tert*-Butylphenoxyacetylchlorid führten, wie auch beim 7-Deaza-2'-desoxyadenosin beobachtet, zur teilweisen Zersetzung des Nucleosides und zu gefärbten Nebenprodukten. Daher wurde eine schonendere Umsetzung mit dem *in situ* dargestellten 3-Hydroxybenzotriazolid der 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäure⁴⁵ versucht. Es wurden so zwar weniger Nebenprodukte erhalten, aber die Umsetzung war trotzdem auch hier nur mäßig.

Um zur N²-4-*tert*-Butylphenoxyacetylverbindung **56** zu gelangen, mußten die Trimethylsilyletherbindungen nach Reaktionsende wieder gespalten werden. Hierbei wurde aber wie bereits bei der Darstellung von **50** ein teilweiser Verlust der Schutzgruppe, aufgrund deren hoher Basenlabilität, beobachtet. Als deutlich schonender und deshalb praktikabler erwies sich hier die Desilylierung mit wässrigem methanolischem Pyridin. Durch anschließende Umsetzung des Produktes mit Dimethoxytritylchlorid in Pyridin konnte so 2-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetylamino]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**57**) erhalten werden. Bei einem Reaktionsansatz, um **56** in die 5'-O-tritylierte Verbindung zu überführen, wurde der vollständige Verlust der 4-*tert*-Butylphenoxyacetylgruppe beobachtet. Es konnten lediglich die Verbindungen 7-(2'-desoxy-N²,5'-O-Bis(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**59a**) und 7-(2'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**59b**) isoliert werden. Offensichtlich wurde die Aminoschutzgruppe während der Reaktion abgespalten. Das Auftreten einer N-tritylierten Verbindung steht in Einklang mit dem in der Literatur bei 2'-Desoxyguanosin beschriebenen, bevorzugten Eintreten der DMT-Funktion in der Amino-Position.

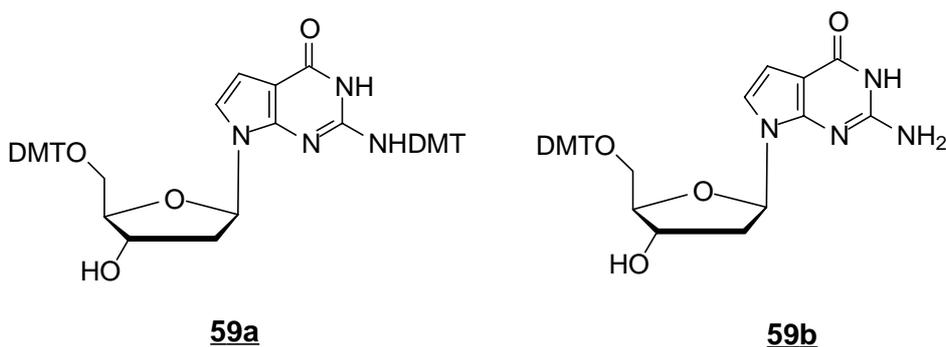


Abbildung 24: Bei der Darstellung von **57** beobachtete Nebenprodukte

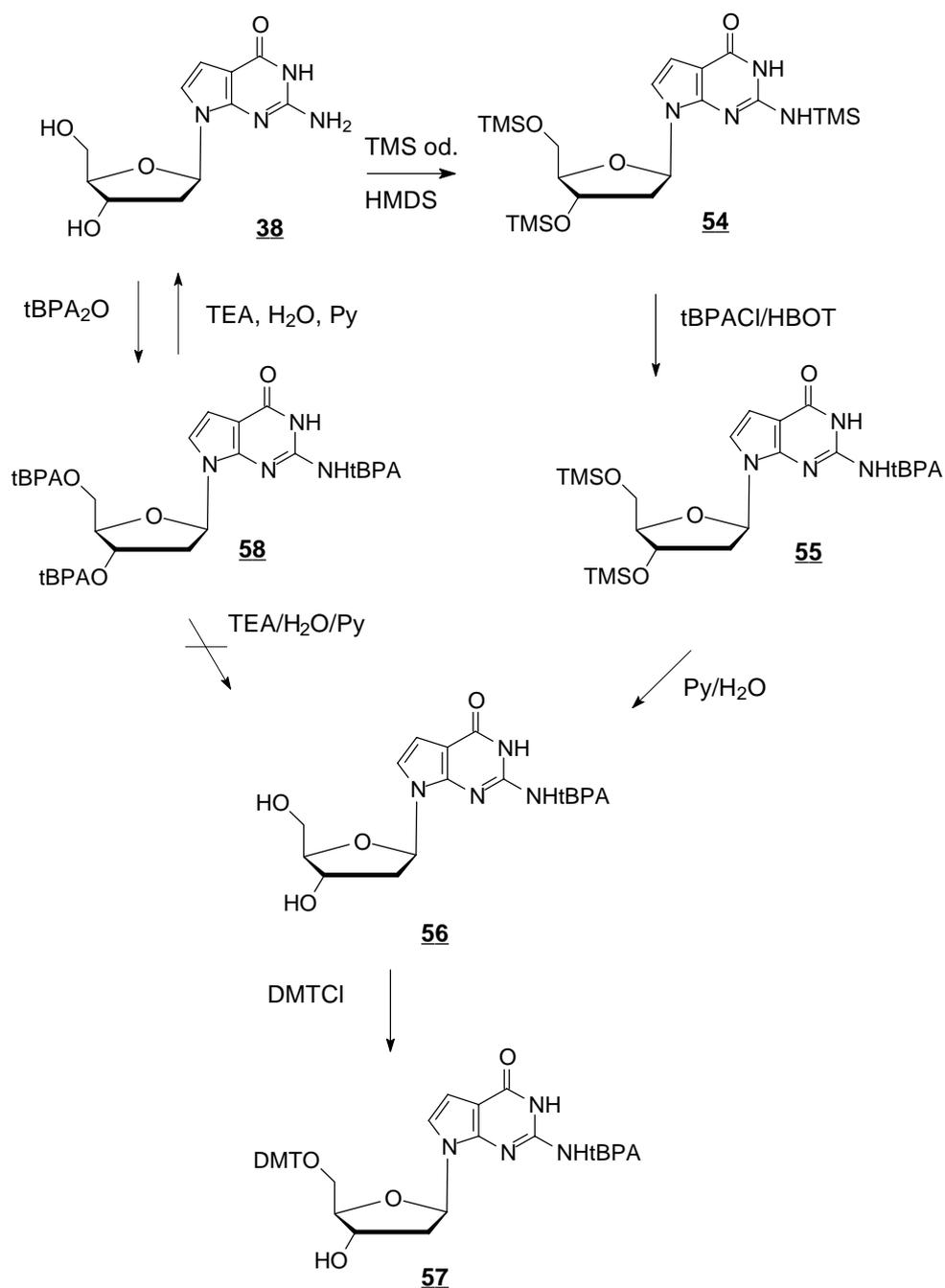


Abbildung 25: Gegenüberstellung zweier denkbarer Synthesewege zur Darstellung von 2-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl-amino]-7-[2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (**57**)

Insgesamt erwies sich die Synthese unter Verwendung von 4-Butylphenoxyessigsäure als optimierungsbedürftig. Zwar gab es Veröffentlichungen, die die erfolgreiche Synthese unter Verwendung der Phenoxyacetylgruppe für 7-Deaza-2'-desoxyadenosin beschreiben, aber keine für das 7-Deaza-2'-desoxyguanosin. Gespräche mit Prof. Seela und Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe bestätigten die hier gemachten Beobachtungen.

Da sich aber gerade 2'-Desoxyguanosin und noch vielmehr 7-Deaza-2'-desoxyguanosin durch die längsten Zeiten für die ammoniakalische Abspaltung der Aminoschutzgruppe im Vergleich zu den anderen Basen auszeichnen, wurde letztlich bei der Synthese größerer Mengen an Amiditen auch für das 7-Deaza-2'-desoxyadenosin auf die 4-*tert*-Butylphenoxyacetyl-schutzgruppe verzichtet und auf die Isobutyryl- und die Benzoylschutzgruppe zurückgegriffen.

4.5 Phosphoamiditsynthese

Die Synthese von reaktiven *N,N*-Diisopropyl-cyanoethoxy-phosphoamiditen wurde entsprechend einer von Köster et al. publizierten Methode durchgeführt^{171,172}. Das geschützte Nukleosid wurde hierzu über Nacht am Hochvakuum aufbewahrt, durch mehrmalige Koevaporation mit abs. THF weiter getrocknet und anschließend in abs. THF mit Monochlor-*N,N*-diisopropylamino- β -cyanoethoxyphosphin (2 Eq.) als Phosphitylierungsreagenz in Anwesenheit von DIPEA (4 Eq.) umgesetzt. Die Verwendung eines sterisch anspruchsvollen Amins anstelle von z.B. der *N,N*-Dimethylaminogruppe vereinfacht die Gewinnung der Kopplungsmonomeren erheblich. Neben größerer Stabilität gegen Luftoxidation und Hydrolyse gewährt diese wesentlich bessere Lösungs- und Kristallisationseigenschaften des gebildeten Amidites¹⁷³. Das Reaktionsende wurde dünnschichtchromatographisch bestimmt. Nach üblicher Aufarbeitung und säulenchromatographischer Trennung wurden die gewünschten Phosphoamidite in etwa 60-95 % iger Ausbeute als Gemisch der Diastereomeren erhalten. Es stellte sich heraus, daß der säulenchromatographischen Reinigung gegenüber der Aufreinigung nur durch Präzipitation, die im technischen Maßstab Anwendung findet, eindeutig der Vorzug zu geben ist. Im ³¹P-NMR-Spektrum war eine deutlich höhere Reinheit der erhaltenen Amidite zu beobachten, da die Hydrolyseprodukte überschüssigen Phophitylierungsreagenzes so vollständig abgetrennt werden können.

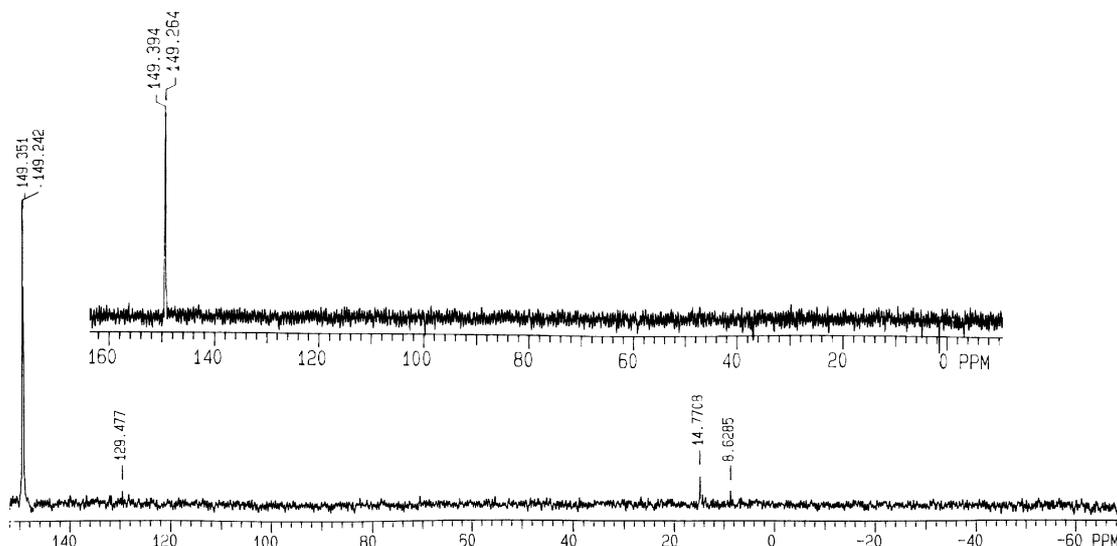


Abbildung 26: Unten das ^{31}P -NMR-Spektrum eines Amidites, das durch Präzipitation aufgereinigt wurde. Deutlich zu sehen sind Reste des Phosphitierungsreagenzes zwischen 0 und 20 ppm. Zum Vergleich darüber das ^{31}P -NMR-Spektrum eines Amidites nach säulenchromatographischer Reinigung. Die Verdoppelung des Hauptsignals entsteht durch die asymmetrische Umgebung des Phosphoratoms, die zum Vorliegen des Amidites in Form zweier Diastereomere führt.

Zur Optimierung der Bedingungen für die Amiditsynthese und der Reinigungsprozedur wurde zunächst käufliches N^6 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-dimethoxytrityl-2'-desoxyadenosin (**60**) umgesetzt, um sodann nach der gleichen Methode die Amidite N^4 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl} pyrrolo[2,3-d]-7*H*-pyrimidin (**62**), sowie in größerer Menge (einige Gramm) 4-(Benzoylamino)-7-{5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)-(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**61**) und 2-(2-Methylpropanoylamino)-7-{5'-O-[dimethoxytrityl]-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl} pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on (**64**) in bis zu 95 % Ausbeute darzustellen. Die gelungene Synthese der Phosphoamidite wurde durch ^1H , ^{13}C und ^{31}P -NMR-Spektrometrie bestätigt.

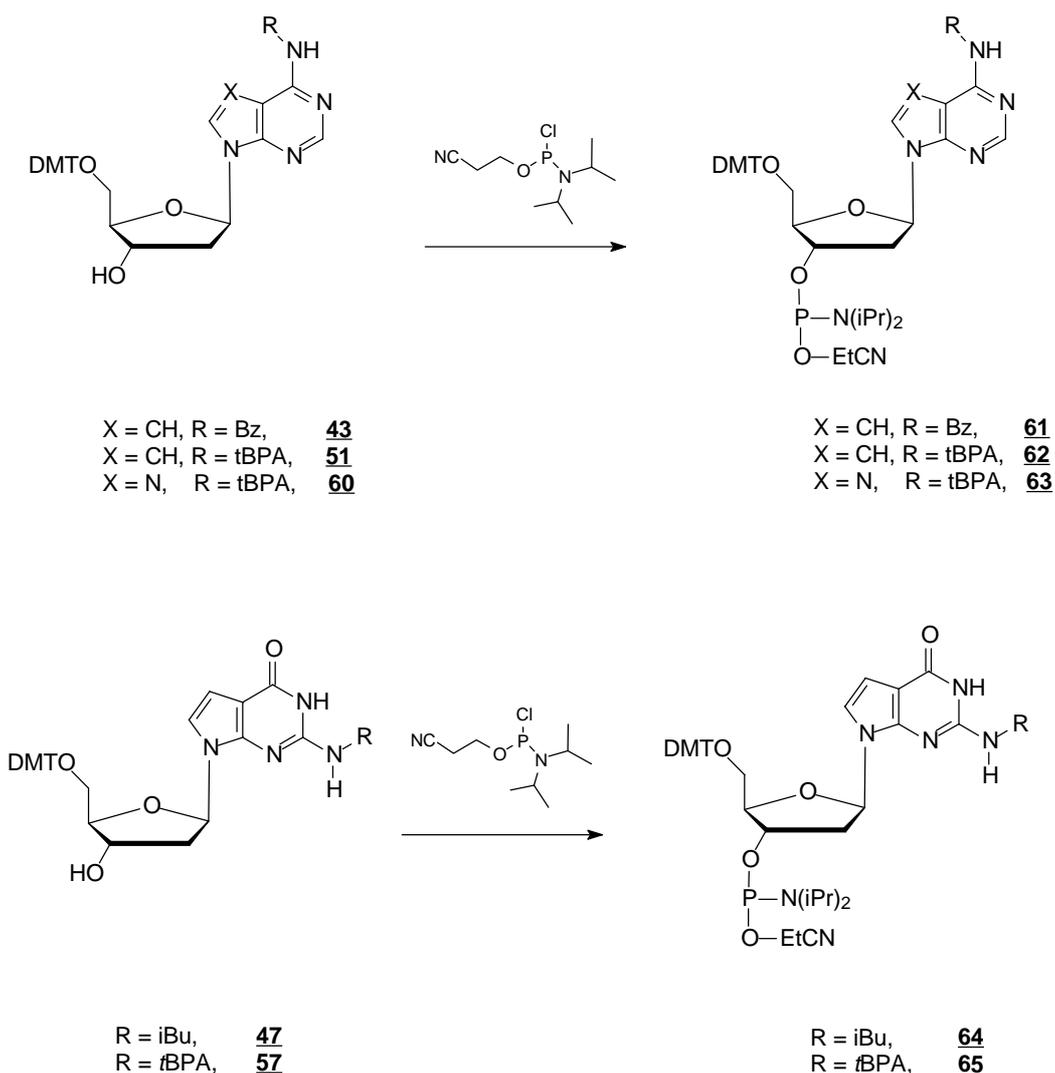


Abbildung 27: Darstellung von Phosphoramiditen als Bausteine für die chemische DNA-Festphasensynthese

4.6 Festphasengebundene Synthese modifizierter Nukleinsäuren

Modifizierte Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe der Amiditchemie nach dem in Abbildung 20 beschriebenen Verfahren an fester Phase durchgeführt. Die modifizierten c^7 A- und c^7 G-Amidite, deren Darstellung in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, wurden zusammen mit regulären C- und T-Amiditen, sowie auch in Kombination mit käuflich erworbenem 2'-Fluoro-C-amidit (vgl. Abb. 28, die Bedeutung der Modifikation wird in Kapitel 9 diskutiert) eingesetzt, um mit Hilfe der automatisierten Festphasen-DNA-Synthese eine Reihe von homo- und heteropolymeren, modifizierten DNA-Sequenzen mit einer Länge von bis zu 100 Basenpaaren herzustellen.

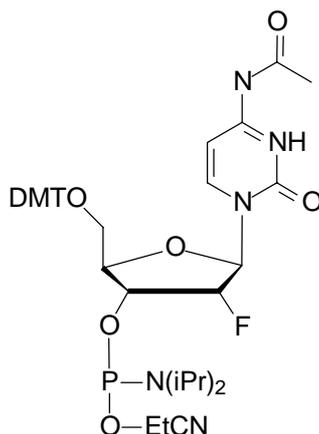


Abbildung 28

4.6.1 Wahl des Trägers

Übliche Träger für die DNA-Festphasensynthese bestehen aus einem 5'-O-tritylierten Nucleosid, das über eine basenlabile Bindung an einen aliphatischen Spacer gebunden ist, der seinerseits mit der festen Phase kovalent verknüpft ist. Da die Synthese von DNA an der festen Phase in 3'→5'-Richtung erfolgte, stellt das auf dem Träger vorgegebene Nucleosid den 3'-Terminus des späteren Oligonucleotides dar. Dies ist bei der Wahl der zu synthetisierenden Sequenz zu berücksichtigen. Es wäre wenig sinnvoll, bei der Synthese eines 7-deaza-modifizierten Oligonucleotides die Sequenz mit einem A oder einem G zu beginnen, da diese Base vom Trägersupport stammt und somit nicht modifiziert wäre, was sich aber negativ auf die massenspektrometrischen Eigenschaften des Oligonucleotides auswirken würde. Homopolymere Sequenzen eines modifizierten Nucleotides mußten so mit einem T beginnen, da dies das einzige Nucleotid ist, das unter den Bedingungen der Massenspektrometrie stabil ist.

Schon seit längerem im Gebrauch sind universelle Träger zur Synthese von modifizierten Oligonucleotiden, die eine Amino-, Thio- oder Phosphatgruppe am 3'-Terminus tragen. Auf diesem Wege gelangt man zu Oligonucleotiden, die an ihrem 3'-Ende eine über eine Phosphodiesterbindung angeheftete Modifikation tragen. Erst gegen Ende dieser Arbeit wurde ein echter „Universal Support“ kommerziell verfügbar¹⁷⁴ mit dem es gelingt, Oligonucleotide mit einem freien 3'-OH-Terminus zu synthetisieren. Die Struktur des Moleküles ist in Abbildung 29 dargestellt. Es zeigte sich, daß der Träger ohne Veränderungen des Syntheseprotokolls auch zur Synthese von modifizierten Oligonucleotiden eingesetzt werden konnte. Die Abspaltung des Moleküles vom synthetisierten Oligonucleotid erfolgt während des Schrittes der ammoniakalischen Abspaltung der Schutzgruppen. Allerdings müssen hier nach dem Protokoll des Herstellers etwas drastischere Bedingungen als in Standardentschützungs-

protokollen angewendet werden. Wahlweise wird das synthetisierte Oligonukleotid 17 h bei 80 °C statt üblicherweise bei 55 °C mit Ammoniumhydroxid behandelt, oder die Entschützung erfolgt bei 55 °C mit einer Lösung von 40 % Methylamin in konzentriertem Ammoniumhydroxid. In dieser Arbeit wurde auf letztere Variante zurückgegriffen. Da dieser Linker zur Zeit nur auf CPG mit einer Porengröße von 500 Å immobilisiert bezogen werden kann, war dieses Material nicht zur Synthese von Oligonukleotiden mit mehr als 50 Basen geeignet. Eine Synthese von längeren Oligonukleotiden gelingt an dieser festen Phase deshalb nicht, da es zu einer sterischen Behinderung im Verlauf der Synthese durch die große räumliche Dichte der wachsenden Oligonukleotidsequenzen und somit einem Verstopfen der Poren kommt. Zur Synthese von Oligonukleotiden mit einer Länge von mehr als 50 Basenpaaren mußten daher herkömmliche Träger auf CPG mit einer Porengröße von 1000 Å eingesetzt werden.

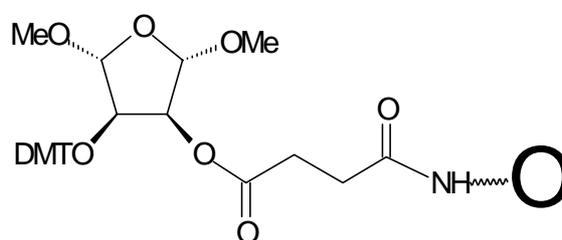


Abbildung 29: Struktur eines universellen Trägers für die DNA-Festphasensynthese (Fa. Glen Research)

4.6.2 Variation der Synthesebedingungen

Um die Menge an für die Synthese benötigtem Amidit zu minimieren, wurden zunächst Oligonukleotidsynthesen im 50 nmolaren Maßstab durchgeführt. Die Kopplungsausbeuten stellten sich aber bei der Synthese von modifizierten Oligonukleotiden als äußerst unbefriedigend heraus. Bessere Ergebnisse wurden bei Syntheseansätzen von 200 nmol erzielt. Die Größe des Syntheseansatz berechnet sich dabei nach der Menge an für die Synthese eingesetztem CPG in Verbindung mit der vom Hersteller angegebenen Beladungsdichte des Materials und gibt somit die in der Theorie maximal erreichbare Menge an Oligonukleotid an. Die Darstellung von Sequenzen, die 7-Deaza-2'-desoxyguanosin enthielten, gelang im 1 µmolaren Synthesemaßstab am besten. Um die Kopplungsausbeuten mit den modifizierten Amiditen zu maximieren, wurden Synthesesyklen programmiert, die eine etwa dreiminütige an Stelle der im Standardsyntheseprotokoll vorgegebenen einminütigen Kopplungszeit (Schritt B) verwenden. Hierbei wurde die Fließgeschwindigkeit (flow) der mit Tetrazol versetzten Lösung des Amidites über die feste Phase auf ein Drittel gesenkt. Es wurden auch längere Kopplungszeiten sowie höhere Überschüsse des eingesetzten Amidites ebenso wie unterschiedliche

Zeiten für die Einwirkung des Oxidationsmittels (Schritt D) und des Detritylierungsreagenzes (Schritt A) getestet, dies hatte aber keinen nachhaltig positiven Effekt auf die Synthesergebnisse. Für Syntheseschritte, in denen 2'-Fluoro-C in die zu verlängernde Sequenz eingebaut werden sollte, wurde, wie vom Hersteller vorgeschlagen, eine auf 15 Minuten verlängerte Kopplungszeit gewählt. Diese Kopplungszeit wurde ebenso zur Synthese 5'-biotinylierter Oligonukleotide verwendet (Abbildung 30 zeigt die Struktur des zur Einführung dieser Modifikation verwendeten Amidits).

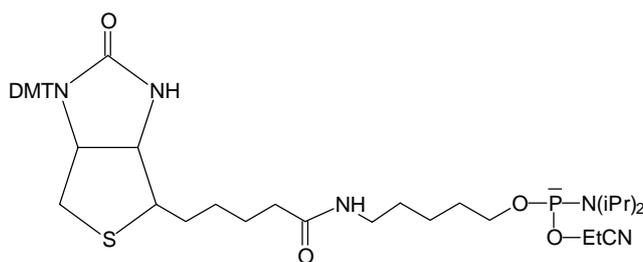


Abbildung 30: Struktur eines zur Synthese von 5'-biotinylierten Oligonukleotiden verwendeten Phosphoramidites

Erhebliche Probleme traten bei der Synthese von Oligodesoxynukleotiden auf, die 7-Deaza-2'-desoxyguanosin enthielten. Regelmäßig wurden deutliche Einbrüche im Trityl assay nach jedem Einbau eines solchen Amidites in die zu synthetisierende Sequenz beobachtet. Ähnliche Probleme waren zwischenzeitlich auch in der Literatur beschrieben worden. Hier wurde sogar berichtet, daß ein Einbau von mehr als zwei 7-Deaza-2'-desoxyguanosin in einer Sequenz unmöglich wäre¹⁷⁵. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß dieses Nucleosid unter den Bedingungen der wäßrigen Iod-Oxidation (Schritt D des in Abb. 20 dargestellten Synthesesyklus) nicht stabil wäre.

Zur Überprüfung dieser These wurden Oligonukleotide unter Verwendung eines alternativen Oxidationsmittels synthetisiert. Schon während der Entwicklung der Phosphoramiditmethode gab es Bestrebungen, das wasserhaltige Iodreagenz zur Oxidation des in der Kondensationsreaktion gebildeten, dreiwertigen Phosphittriesters durch nichtwäßrige Reagenzien zu ersetzen. Erfolgreich verwendete, milde und wasserfreie Oxidationsmittel, die ebenso schnell wie vollständig die Oxidation zum Phosphat triester bewirken, sind z.B. *t*-Butylhydroperoxid, *m*-Chlorperbenzoesäure, sowie (1S)-(+)-10-Camphersulfonyloxaziridin^{176,177}. Letzteres wurde in Acetonitril gelöst hier bei der Synthese von regulären und modifizierten Oligodesoxynukleotiden verwendet.

Hierzu wurde im Syntheseprotokoll nach der Beschickung der Reaktionssäule mit dem Reagenz im Oxidationszyklus ein dreiminütiger Warteschritt eingefügt. Dieses berücksichtigt die etwas geringere Geschwindigkeit der Reaktion mit dem wasserfreien Oxidationsmittel. Es wurden insgesamt etwas bessere Syntheseausbeuten für normale und modifizierte Oligonukleotide beobachtet. Aber auch bei diesem Verfahren traten deutliche Syntheseeinbrüche nach jedem Einbau eines 7-Deaza-2'-desoxyguanosinamidites auf.

Die geschilderten Beobachtungen widersprechen Veröffentlichungen von Seela¹⁷⁸, der einen problemlosen Einbau auch von 7-Deaza-2'-desoxyguanosinamiditen in modifizierte DNA-Sequenzen berichtete. Allerdings waren die von ihm beschriebenen Oligonukleotide auch relativ kurz und enthielten nur sehr wenige dieser Modifikationen. Eine kleine Menge des Amidites konnte zu Testzwecken freundlicherweise von Herrn Prof. Seela bezogen werden. Allerdings zeigte auch dieses Amidit dieselben Eigenschaften in der DNA-Synthese. Bei dem verwendeten DNA-Synthesizer war es nicht möglich, die Amidite direkt am Synthesizer unter Schutzgas zu lösen. Statt dessen mußten die Amidite schon vorher in Reaktionsgefäßen zur Lösung gebracht werden, die anschließend erst an den Synthesizer angeschlossen werden konnten. Es ist bei verschiedenen modifizierten Amiditen bekannt, daß diese besonders hydrolyseempfindlich sind. Es besteht daher die Vermutung, daß an diesem Synthesizer konstruktionsbedingt der Wassergehalt der Amiditlösung für die Verwendung von 7-Deaza-2'-desoxyguanosinamidit zu hoch war.

Synthesen mit recht guten Ausbeuten gelangen schließlich in 1 μ molaren Synthesemaßstäben unter Beibehaltung der normalen Iod-Oxidation, unter Verwendung eines sogenannten LCAA-Trägersupports. Bei diesen Materialien ist das erste Nukleosid über einen sehr viel längeren Spacer (long chain aminoacyl-) an der festen Phase immobilisiert als es bei Standard-Trägermolekülen der Fall ist. Dies führt insbesondere bei den ersten Zyklen zu besseren Syntheseausbeuten, da nun der 5'-OH Terminus einer wachsenden Oligonukleotidkette einen größeren Abstand von der festen Phase hat, und damit die Kopplung mit dem sich in Lösung befindlichen Amidit effektiver wird. Das gekaufte 2'-Fluoro-C-Amidit sowie das synthetisierte 7-Deaza-A-Amidit zeigten nur minimal geringere Syntheseausbeuten als reguläre Amidite. Es konnten so bis zu 100 Basenpaare lange Homopolymere des 7-Deaza-2'-desoxyadenosin für die massenspektrometrische Analyse synthetisiert werden.

4.6.3 Reinigung und Charakterisierung der modifizierten Oligonukleotide

Nach Ende der Synthese wurden die Oligonukleotide mit Ammoniak bei RT von der festen Phase abgespalten und anschließend in konzentriertem Ammoniak, oder bei Synthesen an Universal Support in einem Gemisch aus Methylamin und Ammoniak, bei 55 °C für 24 h inkubiert. Insbesondere bei längeren 7-Deaza-A-homopolymeren zeigte sich bei der massenspektrometrischen Analyse, daß unter diesen Bedingungen noch keine vollständige Hydrolyse der Aminoschutzgruppen erfolgte. Vollständige Entschützung der Aminogruppen wurde erst bei einer Inkubation in konzentriertem Ammoniak von zwei Tagen bei 55 °C oder nach 4 Tagen bei Raumtemperatur erreicht. Unter diesen extremen Bedingungen gewann allerdings die stets als Nebenreaktion beobachtete Hydrolyse der Phosphatdiesterbindungen zunehmend an Bedeutung und verursachte insbesondere bei langen Sequenzen Ausbeuteverluste.

Alle Oligonukleotide wurden DMT-on, d.h. unter Belassen der DMT-Schutzgruppe am 5'-Terminus der Sequenz, synthetisiert. Dies ermöglichte die einfache Aufreinigung der Syntheseprodukte über RP-HPLC. Hierbei wurden für 7-deazamodifizierte Nukleinsäuren längere Retentionszeiten im Vergleich zur regulären Sequenz beobachtet. Bei einer Länge des synthetisierten Oligonukleotides von 100 Basenpaaren schließlich waren die Unterschiede zwischen der tritylierten Spezies und den Rumpfsequenzen in ihrer Lipophilie zu gering, um noch eine Grundlinienauflösung der Signale zu erreichen. Da es allerdings Hauptziel war, kürzere Primersequenzen für enzymatische Reaktionen von 20 Basenpaaren Länge zu synthetisieren, wirkte sich dieses kaum nachteilig aus. Die Charakterisierung der synthetisierten Oligodesoxynukleotide erfolgte mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie.

5 Enzymatische Darstellung modifizierter Nucleinsäuren

5.1 Die Polymerasekettenreaktion

Bei der PCR-Methode^{179,180} macht man sich bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation zu nutze. Neben einer Nucleinsäure als Matrize (engl. „Template“) werden hierzu eine geeignete DNA-Polymerase sowie deren Substrate Desoxynucleosidtriphosphate und Oligonucleotide (Amplimere bzw. Primer) benötigt.

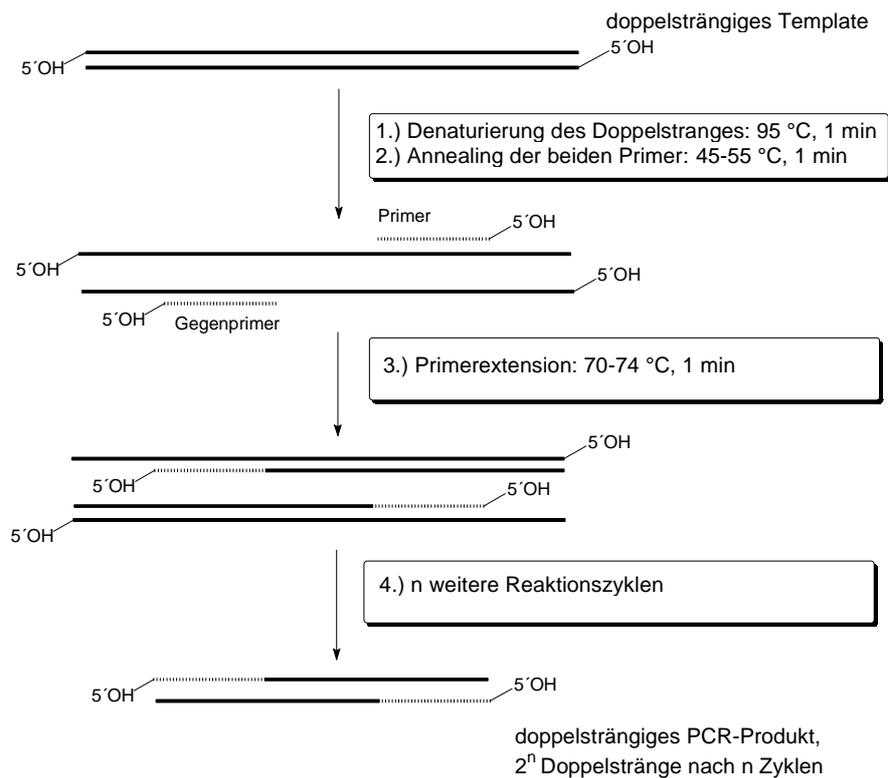


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Polymerasekettenreaktion

Jeder PCR-Zyklus (vgl. Abbildung 31) beginnt mit der Hitzedenaturierung eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes beliebiger Herkunft zu zwei einzelsträngigen Matrizen (1.), deren sich die thermostabile DNA-Polymerase als Vorlage für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges bedienen kann. Um die Synthese beginnen zu können (engl.: „to prime“), benötigt die Polymerase einen kurzen doppelsträngigen DNA-Abschnitt. Dieser wird im zweiten Schritt der PCR gebildet. Da die enzymatische Synthese ausschließlich in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung verläuft, werden hierzu zwei regiospezifische, komplementäre Oligonucleotide („Primer“) benötigt, die in diesem Schritt der Reaktion mit den beiden $3'$ -Enden der doppelsträngigen DNA-Zielsequenz gepaart („Annealing“) werden (2.).

Dies ist die wichtigste Eigenschaft der PCR: durch die Auswahl eines bestimmten Primers kann man den Startpunkt der Reaktion festlegen und somit zielgerichtet bestimmte DNA-Bereiche vervielfältigen. Die richtige Wahl der Reaktionstemperatur in diesem Schritt ist entscheidend für den Erfolg der Reaktion. Liegt sie zu niedrig, kann es dazu kommen, daß der Primer auch an Stellen hybridisiert, die nicht vollständig zu seiner eigenen komplementär sind. Aufgrund des exponentiellen Reaktionsverlaufes, kann hier aus einem solchen falschen Amplifikat leicht das Hauptprodukt der Reaktion werden. Liegt die gewählte Annealingtemperatur zu hoch, kann sich kein DNA-Duplex ausbilden und im nächsten Schritt kann es zu keiner Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase kommen. Im dritten Schritt der Reaktion (3.) erfolgt dann die Verlängerung der Primer mit Nukleosidtriphosphaten zu zwei doppelsträngigen DNA-Stücken - jedes identisch mit dem Original, welche als Edukt für den zweiten Synthesezyklus dienen (Denaturierung, Primer-Annealing und Polymerasereaktion).

Bei jeder Wiederholung dieses Vorgangs verdoppelt sich theoretisch die Zahl der entstehenden DNA-Moleküle. Nach Durchlaufen von n Zyklen erhält man also bis zu 2^n doppelsträngige Zielmoleküle. Nach 30 Zyklen wäre dies die 2^{30} fache Menge an eingesetztem Template. In der Praxis erreicht man aber häufig bereits nach 25 Zyklen¹⁸¹ ein Plateau mit einer Vervielfachung der Zielsequenz um den Faktor 10^6 .

5.2 Wahl von Primer-Template-Systemen für die PCR

Verschiedene Primer-Template-Systeme wurden zur Synthese doppelsträngiger DNA in Längen von 99 bis 400 bp konstruiert, um die Anwendbarkeit der MALDI-TOF Massenspektrometrie für die schnelle Analyse kurzer PCR-Produkte und um die Auswirkungen der Verwendung von 7-Deazapurintriphosphaten in der PCR zu untersuchen. Die so erhaltenen PCR-Produkte enthielten, aus den Primersequenzen stammend, noch zwischen 10 und 25 % nichtmodifizierte Basen (vgl. Tabelle 4). Als Templates für die PCR wurden der doppelsträngige Vektor pHis₆Bap¹⁸² mit einer Länge von 4002 bp und der in Sequenziersystemen verwendete Bakteriophage M13mp18 mit einer Länge von 7250 bp gewählt.

Aus pHis₆Bap wurde ein 99 Basenpaare langes PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 32), das sich aufgrund deutlicher Ungleichverteilung von Pyrimidin- und Purinbasen in der Sequenz (Tabelle 4) durch einen starken Unterschied in der Masse der beiden Einzelstränge auszeichnete. Es sollte dadurch der Untersuchung dienen, ob die angestrebte Modifikation der Purinbasen dazu führt, daß die Massen der beiden Einzelstränge auch bei einem Molekül dieser Größe im MALDI-Spektrum aufgelöst werden können. Weitere Gegenprimer wurden konzipiert, um PCR-Produkte von 200, 300 und 400 bp Länge amplifizieren zu können.

III. Ergebnisse und Diskussion - Biochemie und Massenspektrometrie

Die Länge der Primeroligonukleotide wurde so gewählt, daß die Schmelztemperatur des aus Primer und Template während des Annealingschrittes der PCR gebildeten Doppelstranges bei etwa 56°C lag. Die Abschätzung der Schmelztemperatur erfolgte dabei mit Hilfe einer Inkrementformel, die die unterschiedliche Stabilität der Basenpaarung von G mit C bzw. A mit T berücksichtigt.

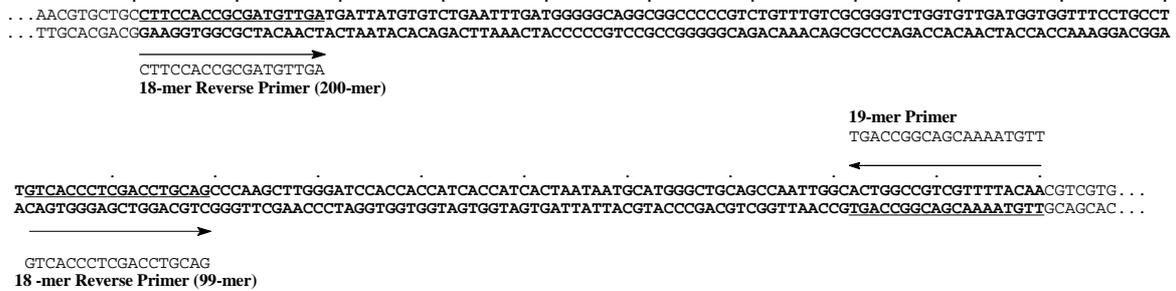


Abbildung 32: Ausschnitt aus der Sequenz des Vektors pHis₆Bap, der als Template für die Synthese von 99-mer und 200-mer Nukleinsäuren verwendet wurde, zusammen mit den Sequenzen des Primers sowie der beiden Gegenprimer für die PCR. In der Darstellung der Sequenz des PCR-Produktes sind die Anteile, die aus den beiden Primern stammen, durch Unterstreichung hervorgehoben.

Aus dem Phagen M13mp18¹⁸³ wurde aus der PolyLinker-Region ein doppelsträngiger 103-mer Abschnitt mit Hilfe der PCR vervielfältigt. Dazu wurde der in M13-Sequenziersystemen standardmäßig eingesetzte universale Sequenzierprimer (USP) zusammen mit einem passenden Gegenprimer (RP) verwendet.

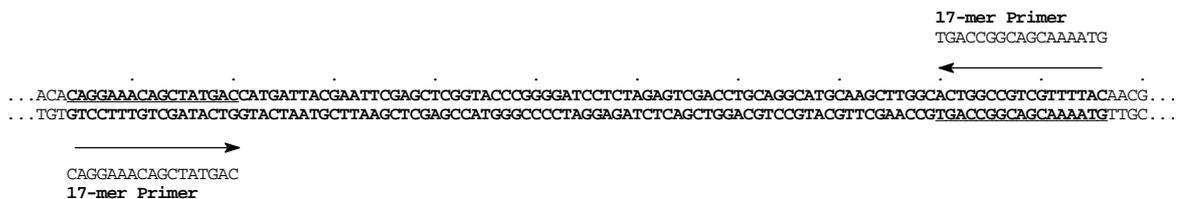


Abbildung 33: Ausschnitt der Sequenz von M13mp18 aus der mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion ein 103-mer DNA-Fragment synthetisiert wurde.

5.3 Wahl einer geeigneten DNA-Polymerase für die PCR

Von entscheidender Bedeutung war die Möglichkeit, alle während des Amplifizierungsschrittes der PCR eingebauten Purinnukleotide substituieren zu können. Dies war nicht selbstverständlich, obwohl die Verwendung von 7-Deaza-G_dTP in Kombination mit normalen G_dTP zur Unterdrückung der Bandenkompression in GC-reichen Regionen einer DNA schon seit langem bei der Chain-Termination Methode zur DNA-Sequenzierung Routine ist^{184,185}. Durch Seela¹⁸⁶ war gezeigt worden, daß 7-Deaza-A_dTP (im Gegensatz zu 7-Deaza-G_dTP) von der

Taq DNA-Polymerase nur in Gegenwart von A_dTP als Substrat akzeptiert wird. Auch in diesem Fall wurde es nur zu 40 % eingebaut. Entgegen dieser Beobachtung konnten im Rahmen dieser Arbeit aber DNA-Polymerasen gefunden werden, die in der Lage waren, die beiden modifizierten Triphosphate gleichzeitig und in Abwesenheit unmodifizierter Purin-triphosphate als Substrat zu akzeptieren.

5.4 Erfolgreicher Einbau der modifizierten Triphosphate

Analytische Gelelektrophorese von 10 %-Aliquoten der Reaktionsansätze zeigte als Produkt der Polymerasekettenreaktion mit normalen wie mit modifizierten Triphosphaten eine einzige Bande eines 99-mer bzw. eines 103-mer DNA-Doppelstranges. Auch modifizierte 200, 300 und 400-mer DNA-Abschnitte konnten mit Hilfe der PCR und modifizierter Triphosphate laut gelelektrophoretischen Vergleichs der Mobilität mit einem jeweils passenden Längenstandard erfolgreich synthetisiert werden. Es stand hiermit eine Methode zur Verfügung, purinmodifizierte Nukleinsäuren auf enzymatischem Wege zu erhalten. Abbildung 34 zeigt die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von modifizierten und normalen 99-mer und 103-mer PCR-Produkten, die für die Analyse mit MALDI-TOF MS konditioniert wurden. Der Abbildung kann man entnehmen, daß die PCR-Produkte in etwa auf gleicher Höhe eines 100-mer Fragmentes des Längenmarkers laufen.

Allerdings war die Ausbeute an modifizierten PCR-Produkten nach Abschätzung aus dem Polyacrylamidgel geringer. Interessanterweise konnten für die PCR mit modifizierten Triphosphaten deutlich mehr Reaktionszyklen am Thermocycler programmiert werden, ohne daß wie sonst bei PCR mit normalen Triphosphaten zu befürchten, Reaktionsnebenprodukte auftraten. Offensichtlich schien durch die Verwendung von 7-deazamodifizierten Substraten die enzymatische Vervielfältigung des DNA-Templates selektiver zu erfolgen. Veränderungen der Annealing-Temperatur um ± 3 K sowie der Zeiten für den Schritt des Annealing bzw. der enzymatischen Verlängerung des Primers um ± 1 min hatten nur unwesentliche Auswirkungen auf die über Gelelektrophorese abgeschätzte Reaktionsausbeute.

5.5 Effektivität des Einbaus von 7-Deazanukleosidtriphosphaten

Die Detektion von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Trennung mit Hilfe von Ethidiumbromid erfolgt nur indirekt. Sie beruht auf Interkalation dieses planaren π -elektronenreichen Moleküls zwischen die gestapelten Basen eines DNA-Doppelstranges, die zu unterschiedlich intensiver Färbung der Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht führt. Aufgrund dieses indirekten Nachweisverfahrens war es denkbar, daß die geringe Bandenintensität, die auf dem Gel für DNA, die 7-Deazapurinnukleotide enthielt, beobachtet wurde, nur ein Artefakt war, das lediglich auf unterschiedlicher Färbbarkeit beruhte.

Um einen eindeutigen Vergleich der Ausbeuten von PCR mit und ohne Verwendung von 7-Deazapurintriphosphaten zu ermöglichen, wurde ein direkter Nachweis der entstandenen DNA durch Verwendung von Primern in der PCR, die in der 5'-Position mit ^{32}P markiert waren, durchgeführt.

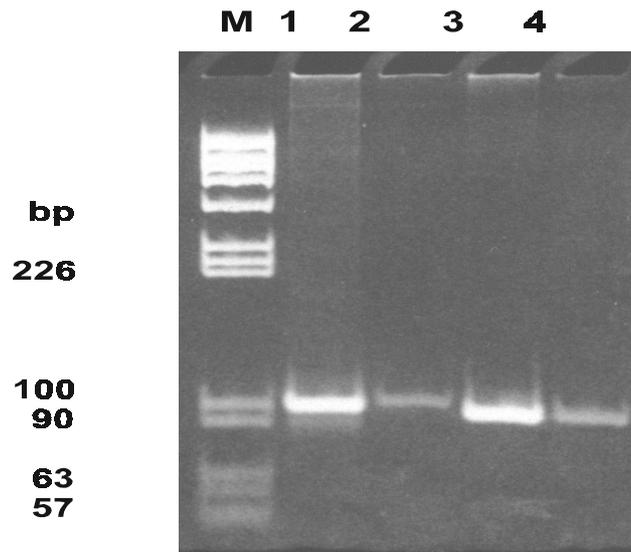


Abbildung 34: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die für die MALDI-TOF MS Analyse aufgereinigt und konzentriert wurden. M: Längensstandard, Bahn 1 und 2: unmodifiziertes und 7-deazapurinhaltiges 103-mer, Bahn 3 und 4: unmodifiziertes und 7-deazapurinhaltiges 99-mer PCR-Produkt

Das Autoradiogramm (Abbildung 35) zeigt geringere Ausbeuten für das modifizierte PCR-Produkt, aber auch daß die relative Ausbeute bei unterschiedlichen Primer-Template-Systemen recht stark variierte. Um die Banden quantifizieren zu können, wurden die Gelplatten auf die entwickelten Negative der Autoradiogramme aufgelegt, die entsprechenden Bereiche mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Gel ausgeschnitten und die Proben sodann einer Szintillationsmessung unterzogen. Die relative Ausbeuten in der PCR bei Verwendung von 7-Deaza- A_dTP und 7-Deaza- G_dTP schwankten zwischen 42 % und 72 % im Vergleich zu der PCR mit normalen Nukleosidtriphosphaten.



Abbildung 35: Autoradiogramm der Polyacrylamid-Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die mit 5'-³²P-markierten Primern dargestellt wurden: Spuren 1 und 2 zeigen das nicht- und 7-deazapurinmodifizierte 103-mer (55321 und 23520 Counts), Spuren 3 und 4 das nicht- und 7-deazapurinmodifizierte 200-mer (71123 und 39582 Counts) und Spuren 5 und 6 das nicht- und 7-deazapurinmodifizierte 99-mer PCR Produkt (173216 und 94400 Counts).

Die prinzipielle Aussage, die schon aus den Ethidiumbromid gefärbten PAGE-Gelen gewonnen wurde, daß der Einbau der 7-Deazanukleotide weniger effektiv ist, konnte somit bestätigt werden. Allerdings zeigte das Autoradiogramm auch, daß die z.T. drastisch geringere Bandenintensität der modifizierten Oligonukleotide auch auf eine geringere Anfärbbarkeit zurückzuführen war. Dies zeigte sich umso mehr bei späteren Experimenten mit vollständig 7-deazamodifizierten PCR-Produkten zu deren Herstellung ebenfalls modifizierte Primer eingesetzt wurden. Bei derartigen PCR-Produkten war in der Regel keine Anfärbung der Banden eines Gels mit Ethidiumbromid¹⁸⁷ mehr möglich, so daß in solchen Fällen auf andere Färbemethoden wie dem Silver-Staining oder der Färbung mit Hilfe von StainsAll™ (4,5,4',5'-Dibenzo-3,3'-diethyl-9-methylthiacarbocyaninbromid¹⁸⁸) zurückgegriffen werden mußte. Diese Färbemethoden sind von der elektronischen Struktur der DNA unabhängig und können daher sogar zur Anfärbung von Proteinen verwendet werden.

Darüber hinaus sind beide Verfahren äußerst nachweisempfindlich. Mit Hilfe der StainsAll®-Färbung kann man sogar tritylierte Oligonukleotide von nicht tritylierten Oligonukleotiden durch unterschiedliche Färbung unterscheiden. Dafür hatten diese Färbemethoden den Nachteil, daß der Prozeß des Färbens des Gels deutlich zeitaufwendiger war.

In einem weiteren Experiment wurden die thermostabilen DNA-Polymerasen *exo*⁻*Pfu*, *exo*⁻*DeepVent* und *Vent* miteinander bezüglich ihrer Effektivität beim Einbau modifizierter Nukleosidtriphosphate in der Polymerasekettenreaktion verglichen. Dem in Abbildung 36 dargestellten Autoradiogramm läßt sich dabei entnehmen, daß alle drei DNA-Polymerasen die beiden 7-deazamodifizierten Triphosphate gleichzeitig als Substrat akzeptierten. Wobei bei Verwendung von *exo*⁻*DeepVent* DNA-Polymerase die Bande des modifizierten PCR-Produktes annähernd dieselbe Intensität aufwies wie die des nichtmodifizierten PCR-Produktes.

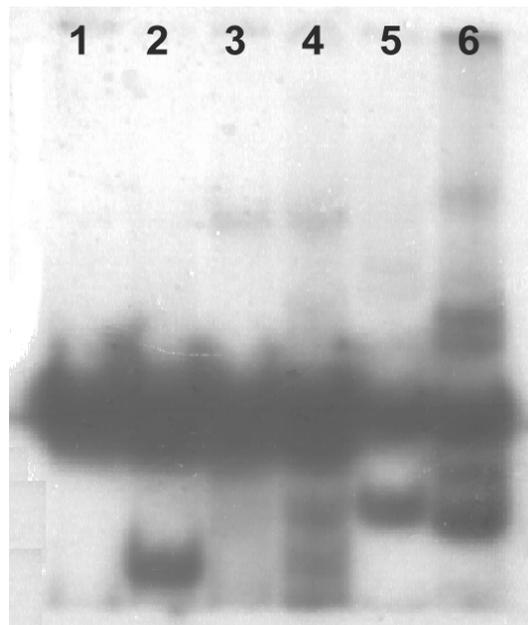


Abbildung 36: Autoradiogramm der Polyacrylamid-Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die mit 5'-³²P-markiertem Primer erhalten wurden:

Spuren 1, 3 und 5, 7-deazapurinhaltiges 99-mer; Spuren 2, 4 und 6, nicht modifiziertes 99-mer PCR-Produkt. Spuren 1 und 2, PCR mit *exo*⁻*Pfu* (158027 und 218710 Counts), Spuren 3 und 4; PCR mit *exo*⁻*DeepVent* (103132 und 111758 Counts); Spuren 5 und 6, PCR mit *Vent*-DNA-Polymerase (28669 und 56670 Counts).

Bei Verwendung der *Vent* DNA-Polymerase war die relative Reaktionsausbeute am geringsten. Weiterhin fiel auf, daß mit exo^- -modifizierten Enzymen, also solchen Klonen, die keine $3' \rightarrow 5'$ -Exonuklease-Aktivität mehr besitzen, deutlich weniger Nebenprodukte in der PCR entstanden als bei Verwendung der *Vent*-Polymerase. Darüber hinaus zeigten solche Reaktionsansätze mit C^7 -modifizierten Triphosphaten generell weniger Nebenprodukte als die mit nicht modifizierten.

Beim Vergleich zwischen exo^- -*Pfu* und exo^- -*DeepVent* stellte sich die exo^- -*Pfu* Polymerase als die geeignetste heraus, da sie sowohl hohe Syntheseausbeuten als auch sehr geringe Mengen an Nebenprodukt lieferte. Das verringerte Auftreten von Amplifikationsnebenprodukten bei Verwendung von 7-Deazapurinnukleosidtriphosphaten kann unter anderem durch eine Minimierung der Primer-Mismatch-Paarungen erklärt werden, da die Stabilität des Komplexes aus Primer und dem 7-Deazapurinbasen enthaltenden Template, welches während der PCR gebildet wird, geringer sein dürfte. Ergebnisse von Seela aus Schmelzpunktmessungen an Duplex-DNA, die 7-Deazapurine enthielt, stützen diese Vermutungen¹⁸⁹.

Vermutlich dürfte auch der eigentliche Kondensationsschritt, der zur enzymatischen Verlängerung des DNA-Stranges um eine Base führt, durch die veränderte Struktur des Substrates und seiner damit erschwerten Erkennung durch die DNA-Polymerase verlangsamt sein. Dieses könnte sich im dritten Schritt der Polymerasekettenreaktion, in dem der mit dem Template gepaarte Primer verlängert wird, besonders stark auswirken so daß bevorzugt nur korrekt annealende Primersequenzen von der DNA-Polymerase verlängert werden. Das vermehrte Auftreten kürzerer DNA-Fragmente als das erwartete PCR-Amplifikat bei Verwendung der *Vent*-Polymerase ist wohl auch auf die bei diesem Enzym noch vorhandene Exonuklease-Aktivität zurückzuführen.

6 Analytik doppelsträngiger DNA mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Aspekte der Probenvorbereitung spielen wie in jedem Analyseverfahren auch bei der MALDI-TOF MS eine entscheidende Rolle. In den Anfängen wurden zur Probenkonditionierung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie Verfahren angewandt, die auf einer gelelektrophoretischen Reinigung der Probe mit anschließendem Blotten oder Ausschneiden der gewünschten Banden und Elution aus der Gelmatrix beruhten¹⁹⁰. Solche Verfahren sind aus dem Gedanken geboren, die Bestimmung der Molmasse mit einem Massenspektrometer lediglich als Verifikation des Ergebnisses einer Gelelektrophorese anzusehen. Diese Verfahren sind äußerst zeitaufwendig und widersprechen dem Ansatz, die arbeitsintensive, fehlerbehaftete Gelelektrophorese komplett zu ersetzen. Eine einfache Alternative der Probenkonditionierung stellte die Aufreinigung durch Diafiltration mit Hilfe sogenannter Microspin-Columns dar¹⁹¹. Es handelt sich hierbei um Membranen aus regenerierter Cellulose, die nach dem Prinzip der Größenausschlußchromatographie größere Moleküle ab einem definierten Molekulargewicht (z.B. NMWG = 30,000 g/mol) zurückhalten.

Die oligonukleotidhaltige Lösung wurde zum Austausch der an das Phosphatdiesterrückgrat der DNA gebundenen Alkalikationen¹⁹² vor der Filtration mit einem Ammoniumcitratpuffer versetzt. Diese Vorgehensweise führt zu einem deutlich schärferen Molekülpeak unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS, da die Kationenheterogenität¹⁹³ des Analytmoleküles reduziert und somit das Auftreten von Kationenadduktensignalen minimiert wird. Die Purifikation eines enzymatischen Reaktionsansatzes über Ultrazentrifugation bietet die Vorteile, daß die Methode sehr schnell, einfach und weniger verlustreich ist im Vergleich zu Verfahren, die eine Gelelektrophorese zur Reinigung der Probe vorschalten. Nachteil wirkte sich jedoch aus, daß nur niedermolekulare Verunreinigungen (Nukleosidtriphosphate, Primer und Detergenzien aus den Reaktions- und Lagerpuffern des Enzyms) abgetrennt wurden. Deshalb sieht man in den Spektren der 100-mer PCR-Produkte z.T. noch deutliche Signale durch Kontamination der Probe mit der verwendeten DNA-Polymerase.

Erst bei noch längeren PCR-Produkten, zu deren Aufreinigung dann Membranen mit einer Ausschlußgrenze von 100,000 g/mol verwendet werden konnten, war eine vollständige Abtrennung von Proteinresten möglich. Für die Massenspektrometrie von 200-mer und 300-mer PCR-Produkten stellte es sich als notwendig heraus, mehrere PCR-Reaktionsansätze zu poolen. Hierbei zeigte es sich als vorteilhaft, diese erst nach separater Aufreinigung auf mehreren Membranen zusammen zu geben, da sonst die Poren der Membrane durch zu hohe

Beladung verstopften. Zur Vorbereitung für die MALDI-TOF Analyse erwies es sich als am günstigsten, die Oligodesoxynukleotidproben nach der Filtration erst in einem etwas größeren Volumen Millipur®-Wasser von der Membran wieder in Lösung zu bringen, sie danach gefrierzutrocknen und dann erst in dem für die massenspektrometrische Untersuchung gewünschten Volumen reinsten Wassers ($R = 18.2 \text{ M}\Omega$) zu lösen. Zur Vermeidung einer Kontamination mit Kationen, durfte dieses Wasser selbstverständlich nur in Kunststoffgefäßen und nicht in Glasbehältnissen gelagert werden.

Für die Aufnahme der auf den nächsten Seiten gezeigten Massenspektren wurden in der Regel gleiche Volumina von Analyt- und Matrixlösung nacheinander auf den Probensteller aufgetragen. Es fiel auf, daß Signalintensität und -breite der gleichen und unterschiedlicher Komponenten zueinander von einem Laserschuß zum anderen, ebenso wie zwischen verschiedenen Orten auf der Probenoberfläche variieren konnten. Dies geschah vermutlich sowohl aufgrund Fluktuation in der Stärke des Laserstrahls als auch Variation der Morphologie der Probe in lateraler als auch in vertikaler Richtung. Als Ergebnis war es möglich, daß bei einer gegebenen Probe während des Aufsummierens mehrerer Einzelschußspektren (in der Regel etwa zwanzig bis hundert) eines oder mehrere gesättigte Ionensignale produziert werden, die somit die Meßgenauigkeit senkten.

Zur Verbesserung der Auflösung wurde der Probenkristall daher systematisch nach sogenannten „good spots“ durchsucht, von denen dann jeweils eine ganze Serie von Einzelspektren aufgenommen werden konnte. Diese Suche nach solchen „good spots“ war mitunter mit erheblichem Zeitaufwand verbunden und konnte bei der Vermessung der 300-mer PCR-Produkte mitunter mehrere Stunden in Anspruch nehmen. Die Qualität der erhaltenen Spektren hing stark von der Kristallisation des Analyt-Matrix-Gemisches auf dem Probensteller ab. Insbesondere erhöhte Umgebungstemperaturen in Verbindung mit hoher Luftfeuchtigkeit führten zu schlechtem Kristallisationsverhalten.

Zum Auftragen der Probe wurde anfänglich die Matrixlösung in mehreren Spots auf den Probensteller pipettiert und die Analytlösung noch vor Kristallisation der Matrixlösung in diese injiziert. Eine Technik, bei der die verwendete Matrix zunächst auf den Probensteller pipettiert und nach Kristallisation mit der Analysenlösung resuspendiert wurde, verlangte etwas mehr Geschick bei der Präparationstechnik, lieferte aber deutlich reproduzierbarere Ergebnisse. Offensichtlich handelte es sich um einen Effekt, der durch die in der Analyt-Matrix-Lösung hierdurch bereits vorhandenen Kristallisationskeime erzeugt wurde. Ebenso zeigte sich bei Beschichtung des Probenstellers mit Tesafilm®, auf dem dann Matrix und Analyt nacheinander

aufgetragen wurden, ein reproduzierbareres Kristallisationsverhalten. Bei neueren MALDI-TOF Massenspektrometern finden auch Probenteller mit aufgerauter Oberfläche an Stelle solcher mit einer extrem glatt polierten Edelstahloberfläche, die bei älteren Geräten zu finden sind, Einsatz. Auch dies wirkt sich vermutlich aus ähnlichem Grund positiv auf das Kristallisationsverhalten des Analyt-Matrix-Gemisches aus..

6.1 Analyse der 103-mer PCR-Produkte aus M13mp18

Verschiedene PCR Produkte wurden mit MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Die Erfahrung aus anderen Experimenten mit Oligonukleotiden zeigte, daß der Grad der Depurierung, die in einem Spektrum zu sehen ist, in großem Maße von der Stärke der zur Desorption und Ionisation der Probe angewendeten Laserenergie abhängt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Spektren von modifizierten und unmodifizierten PCR-Produkten wurde daher bei der Aufnahme der in Abb. 37-44 gezeigten Spektren dieselbe relative Laserenergie verwendet.

Abbildung 37 und 38 zeigen die Massenspektren einer modifizierten und einer unmodifizierten 103-mer Nukleinsäure. Im Falle des nicht modifizierten 103-mer ist ein breites $(M+H)^+$ -Signal der Einzelstränge zu beobachten, welches durch Peaktailing in Folge von Fragmentierung stark deformiert ist. Als Folge hiervon ist das Maximum des Signals zu niedrigeren Massen hin verschoben, so daß die zugeordnete Masse eher einem Mittelwert aus der des eigentlichen $(M+H)^+$ -Signals und denen der Fragmentionen entspricht. Durch die verzerrte Signalform bedingt, ist es hier nur sehr schwierig, dem Signal eine genaue Masse zu zuordnen. Die Tatsache, daß die Peakbreite bei halber Signalthöhe für das unmodifizierte Oligonukleotid etwa 1350 u beträgt, veranschaulicht die Folgen der Depurinierung deutlich.

Obwohl das 7-deazamodifizierte 103-mer PCR-Produkt immerhin zu 20 % die Purinbasen A und G aus den Primersequenzen enthält (vgl. Tabelle 4), ist ein deutlich reduziertes Auftreten von Fragmentionen zu beobachten, was sich in wesentlich schmaleren und symmetrischeren Signalen widerspiegelt. Das Peaktailing zu niedrigeren Massen hin wird so drastisch reduziert. Die gemessene Masse liegt zwar auch bei dieser Probe noch unterhalb der kalkulierten, die Abweichung ist aber wesentlich geringer.

Das in Abbildung 37 zu beobachtende, recht scharfe Signal bei 69000 u ist auf eine Verunreinigung durch die in der PCR-Reaktion eingesetzte DNA-Polymerase zurückzuführen. Da normales und modifiziertes PCR-Produkt identisch aufgereinigt wurden, wäre in beiden Spektren ein starkes Signal des Proteins zu erwarten gewesen. Da dies nicht der Fall ist, läßt sich eventuell dadurch erklären, daß die modifizierte DNA so gut zu desorbieren ist, daß die

geringe Verunreinigung der Probe durch die DNA-Polymerase in diesem Spektrum weniger gut zu sehen ist. In dem in Abbildung 37 gezeigten Spektrum hingegen wirkt sich evtl. die höhere Ionenausbeute des Proteins im Vergleich zu normaler DNA aus. Auch ist dies auf unterschiedliches Kristallisationsverhalten der verschiedenen Analytmoleküle zurückzuführen. Denn innerhalb des Probenspots des modifizierten PCR-Produktes gab es auch Positionen, von denen fast ausschließlich das Protein desorbiert werden konnte. Wohingegen im Falle des nichtmodifizierten PCR-Produktes sich Protein und DNA während des Kristallisationsvorganges besser zu mischen schienen.

Für die nichtmodifizierte Probe wurde im Spektrum das $(M+H)^+$ -Signal der Einzelstränge bei 31670 u beobachtet, was einer Abweichung um 97 u oder 0.3 % zur berechneten Masse entspricht. Bei der modifizierten Probe hingegen verringert sich diese Abweichung auf nur noch 10 u oder 0.03 %. Diese Beobachtung spiegelt sich ebenso in einer deutlich gesteigerten Massenauflösung wieder für das $(M+H)^+$ -Signal der beiden Einzelstränge mit $m/\Delta m = 67$ statt 18 für die nichtmodifizierte Probe, wobei m der Breite des Signals bei halber Intensität (fwhm = full width at half maximum) und Δm der Differenz aus gemessener und berechneter Masse entspricht. Dieser Wert liegt deutlich über den bisher an unmodifizierten Proben vergleichbarer Masse erzielten Auflösungen von etwa 20 bis 40. Da die beiden Einzelstränge des PCR-Produktes sich in ihrer Masse nur um 8 u unterschieden, war eine Auflösung der Signale hier nicht zu beobachten.

Ebenso wurde ein deutlich verbessertes Desorptionsverhalten der basenmodifizierten DNA-Probe beobachtet, wie das etwas schwächere Matrixsignal im Vergleich mit dem Spektrum der unmodifizierten Probe zeigt. Für das Spektrum der modifizierten Probe wurden lediglich drei Einzelschußspektren aufaddiert. Um eine vergleichbare Signalintensität im Spektrum der nicht modifizierten Probe zu erzielen, waren hingegen 12 Schüsse erforderlich. Bei den 7-deazapurinmodifizierten DNA-Proben ist die Intensität des Signals der beiden ungepaarten Einzelstränge im Verhältnis zu der des Doppelstranges deutlich stärker als bei der Vergleichsprobe. Weiterhin kann man ein geringeres Drifting der Grundlinie beobachten.

Besonders bemerkbar machte sich das verbesserte Desorptionsverhalten in einem Faktor, der sich hier nur schlecht dokumentieren läßt, nämlich bei der Suche nach „good spots“ zur Aufnahme der Spektren. Mußte man normalerweise den Probenkristall nach Positionen absuchen, von denen man die Probe gut desorbieren konnte, war es bei den 7-deazamodifizierten Proben möglich, mit fast jedem Schuß gute Spektren aufzunehmen.

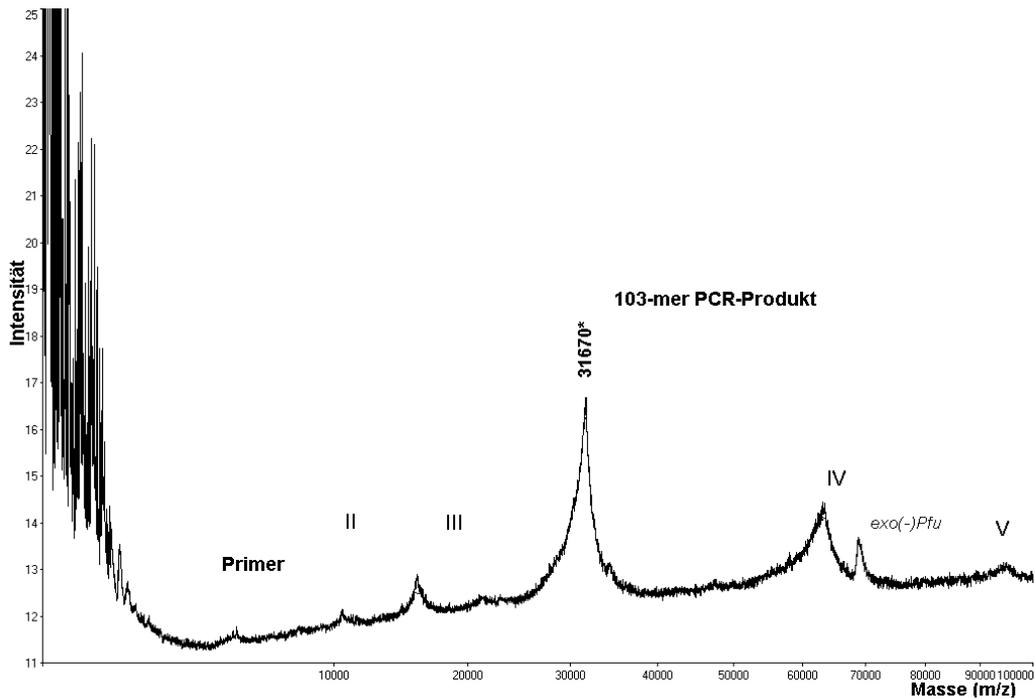


Abbildung 37: MALDI-TOF Massenspektrum eines 103-mer PCR-Produktes (Summe von 12 Einzelspektren). Der berechnete Mittelwert der Massen der beiden Einzelstränge beträgt 31763 u, gefunden wurden 31670 u. Die Massenauflösung beträgt 18.

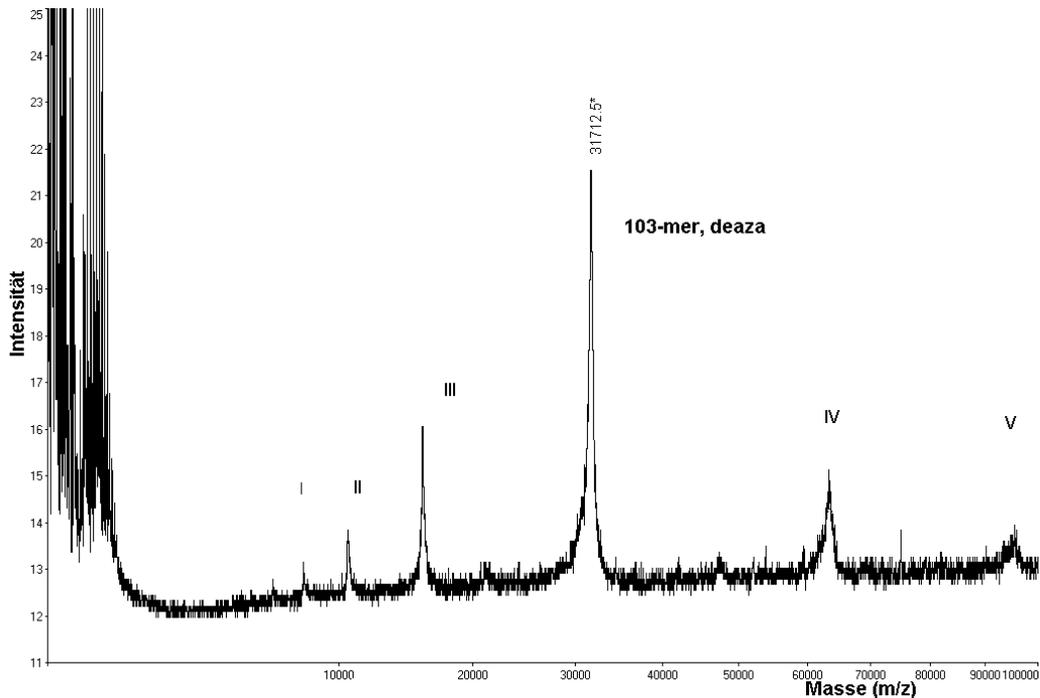


Abbildung 38: MALDI-TOF Massenspektrum eines 7-dezapurinhaltenen 103-mer PCR-Produktes (Summe von drei Einzelspektren). Berechneter Mittelwert der Massen der beiden Einzelstränge ist 31723 u, gefunden wurden 31713 u. Die Massen-Auflösung beträgt 67. I,II,III,IV,V stehen für die $(M+4H)^{4+}$, $(M+3H)^{3+}$, $(M+2H)^{2+}$, $(2M+H)^{+}$ und $(3M+H)^{+}$ -Tochtersignale der Einzelstränge des PCR-Produktes.

6.2 Analyse der 99-mer PCR-Produkte aus pHis6Bap

Betrachtet man die Spektren der 99-mer DNA-Fragmente, wird der Effekt der gesteigerten Massenauflösung 7-deazapurinhaltiger DNA noch deutlicher. Die beiden Einzelstränge der nicht modifizierten DNA-Probe (Abb. 39+41) konnten nicht aufgelöst werden, obwohl die Massendifferenz zwischen den beiden Einzelsträngen mit 526 u auf Grund sehr unterschiedlicher Verteilung von Purin- und Pyrimidinbasen, sehr hoch gewählt war. Es wurde nur ein einziges sehr breites $(M+H)^+$ -Signal durch Überlagerung der Signale der beiden Einzelstränge erhalten. Bei allen Signalen konnte zu geringeren Massen hin ein sehr ausgeprägtes durch Fragmentierung des Mutterions hervorgerufenen Tailing beobachtet werden.

Im Gegensatz hierzu zeigte das Spektrum der modifizierten DNA (Abb. 40+42) zwei aufgelöste Signale für die beiden Einzelstränge bei $(M+H)^+ = 30764$ und 30251 u. Das ebenfalls zu erwartende Signal des Doppelstranges bei einer Masse von $(M+H)^+ = 60986$ u, $M_{\text{calc}} = 60974$ u war sehr schwach und breit, da es sicherlich zusätzlich durch die Signale der Homodimeren der beiden Einzelstränge überlagert war. Des Weiteren waren Tochterionen bei exakt halber Masse von $(M+2H)^{2+} = 15378$ und 15235 u, entsprechend den doppelt protonierten Einzelsträngen, ebenso wie ein weiteres bei $(M+3H)^{3+}$ zu detektieren. Bei etwa 93.000 u trat ein Signal von Trimeren der Einzelstränge auf. Dieses war nicht überraschend, da es bekannt ist, daß 7-deazapurinmodifizierte Nukleinsäuren sehr leicht auch DNA-Triplizes ausbilden. Wieder wurde ein deutlich geringer fwhm-Wert für die DNA-Probe, die modifizierte Purine enthielt, gemessen. Die Breite des $(M+H)^+$ -Signals auf halber Höhe des Peaks war mit etwa 1100 u nur halb so groß wie die des korrespondierenden Signals der Nukleinsäure ohne Modifikation. Vergrößert man das Signal bei $(M+H)^+ = 30764$, wird noch ein weiteres Signal bei $(M-160+H)^+$ sichtbar, das dem Verlust von G entspricht. Dies war auch zu erwarten, da der Strang ja nicht vollständig modifiziert war. Die Möglichkeit, bei dieser hohen Molekülmasse aber noch ein einzelnes Depurinierungs-Signal auflösen zu können, zeigt ebenfalls die erheblich verbesserte Massenauflösung durch Inkorporation von 7-deazamodifizierten Purinnukleotiden.

Bei allen MALDI Massenspektren beobachtet man im unteren Massenbereich durch die Matrix hervorgerufene Signale. Die Intensität und der Massenbereich, die von diesen Signalen eingenommen werden, hängen vor allem von der Laserenergie bei der Aufnahme der Spektren ab. Nahm man die Spektren nicht mit derselben Laserenergie, sondern mit der Threshold-Energie, die mindestens zum Auftreten eines Signals notwendig war, auf, konnte man eine deutliche Verbesserung beim 7-deazamodifizierten 99-mer feststellen, wenn man in den Spektren die Intensität des $(M+H)^+$ -Signals im Verhältnis zu den von der Matrix erhaltenen

III. Ergebnisse und Diskussion - Biochemie und Massenspektrometrie

Signalen verglich. Obwohl mit deutlich geringerer Laserenergie aufgenommen, war die Intensität des Molekülions der modifizierten und der nicht modifizierten DNA vergleichbar. Durch die Möglichkeit, die Massen beider Einzelstränge bestimmen zu können wird die Überlegenheit der Massenspektrometrie gegenüber gelelektrophoretischen Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung besonders gut demonstriert. Auch wenn keine Grundlinien-Auflösung zu beobachten war, so konnten die Massen den beiden Einzelsträngen mit einer Genauigkeit von 0.1 % zugeordnet werden. ($\Delta m = 27$ u für den leichteren Strang, dessen berechnete Masse 30224 u beträgt und $\Delta m = 14$ u für den schwereren Strang, dessen berechnete Masse 30750 u beträgt).

Basenzusammensetzung der 99-mer, 103-mer und 200-mer PCR Amplifikationsprodukte (unmodifiziert und 7-deazapurin modifiziert)							
DNA-Fragmente ^a	C	T	A	G	c ⁷ -A	c ⁷ -G	relativer Anteil der Modifikation (%) ^b
99-mer s	34	21	24	20	--	--	--
mod. 99-mer s	34	21	6	5	18	15	75
99-mer a	20	24	21	34	--	--	--
mod. 99-mer a	20	24	3	5	18	30	87
103-mer s	28	23	24	28	--	--	--
mod. 103-mer s	28	23	6	5	18	23	79
103-mer a	28	24	23	28	--	--	--
mod. 103-mer a	28	24	7	4	16	24	78
200-mer s	54	34	56	56	--	--	--
mod. 200-mer s	54	34	6	5	50	51	90
200-mer a	56	56	34	54	--	--	--
mod. 200-mer a	56	56	3	4	31	50	--

Tabelle 4: ^as und a bezeichnen Sense und Antisense Strang des doppelsträngigen PCR-Produktes, ^brelative Modifikation als prozentualer Anteil der 7-deazapurinmodifizierten Nukleotide an der Gesamtzahl an Purinnukleotiden der jeweiligen DNA-Sequenz

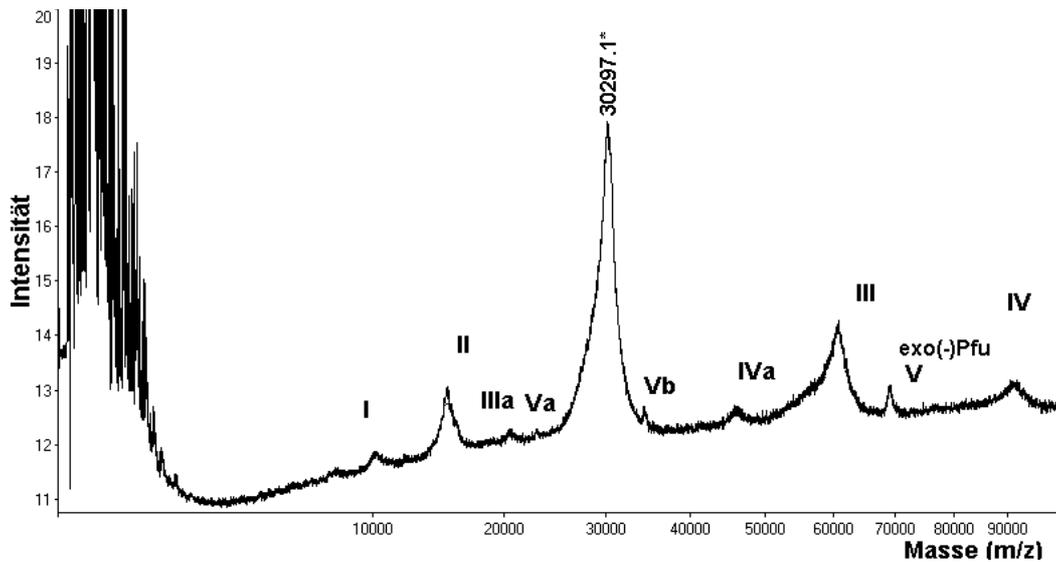


Abbildung 39: MALDI-TOF Massenspektrum eines unmodifizierten 99-mer PCR-Produktes (Summe von 20 Einzelspektren).

I bis IV: $(M+3H)^{3+}$, $(M+2H)^{2+}$, $(2M+H)^+$, $(3M+H)^+$ Tochterionen der DNA-Einzelstränge;
V und VI: $(M+3H)^{3+}$, $(M+2H)^{2+}$, $(M+H)^+$ der *Pfu*-DNA-Polymerase

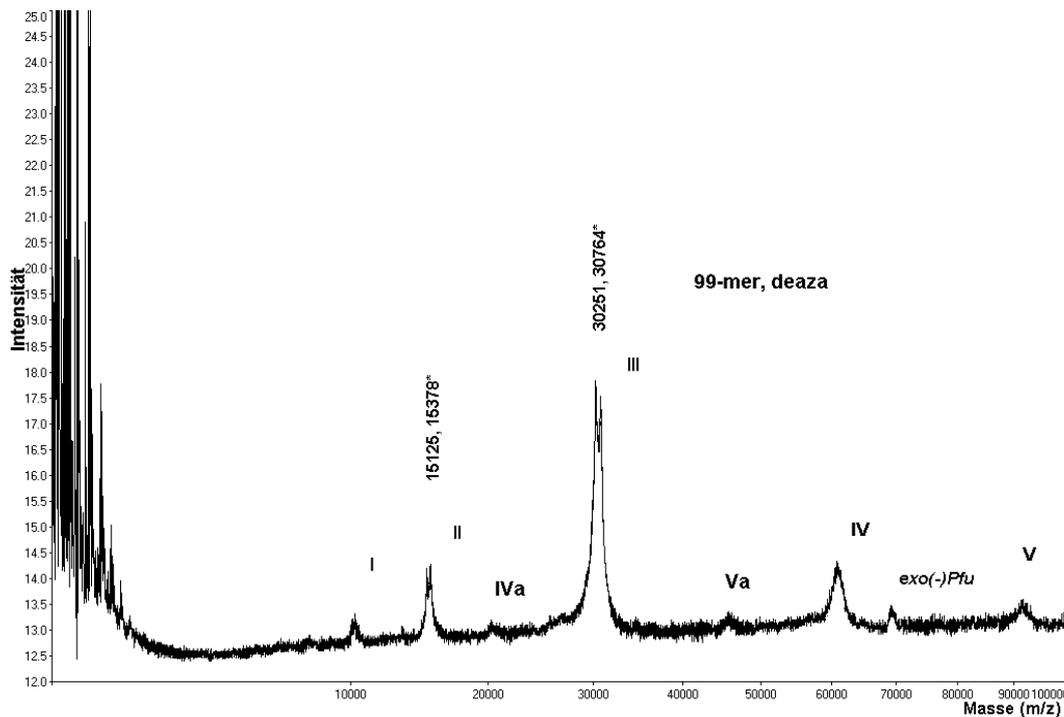


Abbildung 40: MALDI-TOF Massenspektrum eines 7-deazapurinhaltenen 99-mer PCR-Produktes (Summe aus 12 Einzelschußspektren).

I, II, II, IV und V stehen dabei für die $(M+3H)^{3+}$, $(M+2H)^{2+}$, $(M+H)^+$, $(2M+H)^+$, $(3M+H)^+$ -Signale der beiden Einzelstränge des PCR-Produktes. IV steht für das Signal des dreifachgeladenen Sekundärions $(2M+3H)^{3+}$ der Duplex-DNA und Va für das Signal des doppeltgeladenen Ions $(3M+2H)^{2+}$ einer Triplex-DNA.

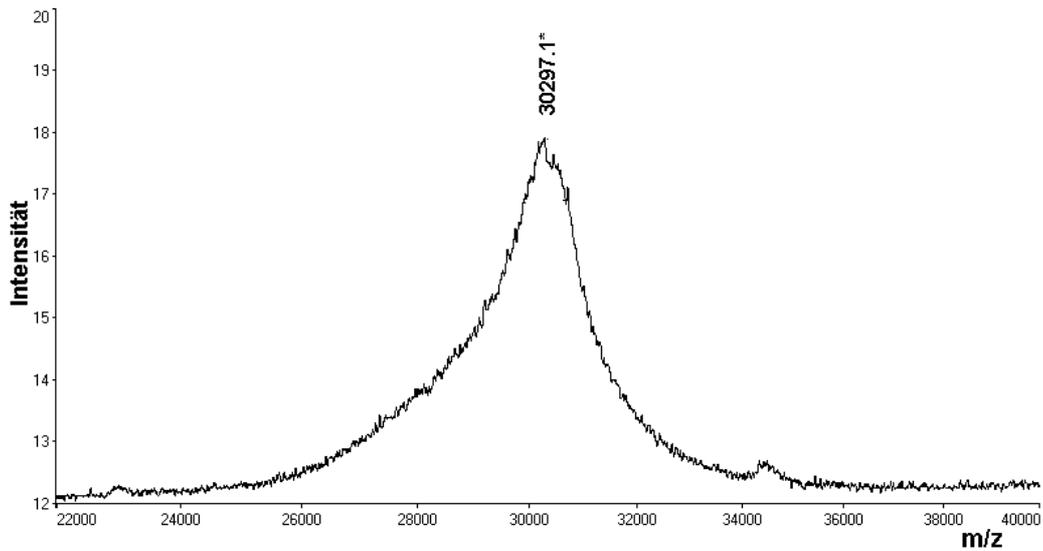


Abbildung 41: Vergrößerter Ausschnitt des Molekülsignales der Einzelstränge des unmodifizierten 99-mer PCR-Produktes. Berechnete Masse der beiden Einzelstränge: 30261 und 30794 u gefunden wurden 30297 u. Trotz des hohen Massenunterschiedes ist keine Auflösung der Signale der Einzelstränge zu beobachten. Die Breite des Signals bei halber Intensität beträgt $fwhm = 2200$ u.

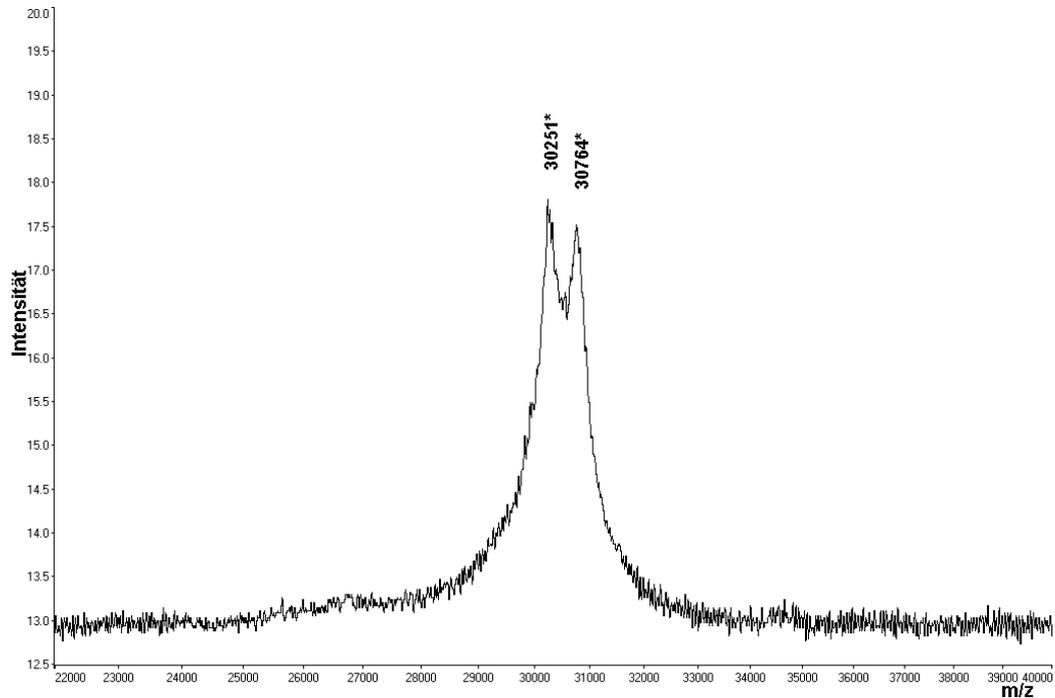


Abbildung 42: Vergrößerter Ausschnitt des Molekülsignales des modifizierten PCR-Produktes. Deutlich zu sehen die nun aufgelösten Signale der Einzelstränge des doppelsträngigen PCR-Produktes mit 30251 und 30764 u (berechnete Massen: 30224 und 30750 u). Die Breite des Signals bei halber Intensität sinkt auf $fwhm = 1100$ u.

Bei der Massenspektrometrie der 99-mer und 103-mer Nukleinsäuren beobachtete man eine deutlich höhere Nachweisempfindlichkeit, falls in der PCR-Reaktion 7-Deazapurinnukleotide eingebaut wurden und das obwohl diese noch immer ca. 20 % nicht modifizierte Purin-Nukleotide enthielten (vgl. Tabelle 4). Um ein vergleichbares Signal-Rausch-Verhältnis bei ähnlichen Intensitäten für das $(M+H)^+$ -Signal zu erzielen, mußten vom nicht modifizierten 99-mer 20 Laserschüsse im Gegensatz zu 12 beim modifizierten und im Fall des 103-mer zwölf Schüsse für die unmodifizierte Probe im Gegensatz zu drei beim 7-Deazapurinnukleotide enthaltenden PCR-Produkt aufaddiert werden.

6.2.1 Weitere PCR-Produkte aus pHis₆Bap

Auch die Spektren der modifizierten und nicht modifizierten 200-mer Amplifikate zeigen den Effekt einer enorm verbesserten Massenauflösung und gesteigerten Signalintensität. Im Falle eines 300-mer PCR-Produktes war sogar nur noch die 7-deazamodifizierte DNA zu detektieren. Eine 400-mer DNA konnte im MS nicht mehr nachgewiesen werden. Ein weiterer interessanter Effekt fällt beim Vergleich der beiden 200-mer Spektren auf. Während beim nicht modifizierten PCR-Produkt (Abb. 43) der DNA-Duplex bzw. die Dimere der beiden Einzelstränge das Signal mit höchster Intensität im Spektrum darstellen, beobachtet man im Spektrum der modifizierten DNA (Abb. 44) das Signal der beiden Einzelstränge als das dominierende Hauptsignal. Da die Massendifferenz zwischen Doppelstrang und Dimer zweier identischer Einzelstränge zu gering ist, um aufgelöst zu werden, ist es nicht ganz einfach zu beweisen, ob das Signal im Bereich von $[2M+H]^+$ tatsächlich vom doppelsträngigen PCR-Produkt oder von einem unspezifischen Addukt der Einzelstränge stammt.

Das Auftreten von Adduktensignalen ist eines der Probleme, daß die Anwendbarkeit der Massenspektrometrie einschränkt, da diese Adduktbildung zur Verringerung der Intensität des Hauptsignals führt und Spektren von Probengemischen kompliziert. Analysiert man einzelsträngige Nukleinsäuren beobachtet man in der Tat stets ebenfalls ein Signal, das hier nur dem Dimer des Einzelstranges zuzuordnen ist, aber stets eine erheblich geringere Intensität als das Molekülion aufweist. Bei der Vermessung von PCR-Produkten hingegen treten gelegentlich $[2M+H]^+$ -Signale mit sehr hoher Intensität auf. Dabei schien die Intensität des Signals von der Probenvorbereitung abhängig zu sein. Bei der Aufreinigung von PCR über Quia-Quick Säulen wurde der Doppelstrang häufiger gefunden als bei der Aufreinigung über Membrane. Daher ist davon auszugehen, daß diese Signale nur dem als Doppelstrang desorbierten PCR-Produkt zuzuordnen sind^{194,195}, denn die Bildung eines DNA-Duplex in der Gasphase kann kaum von der Art der Aufreinigung der Probe abhängen. Eine Interpretation, die von anderen Autoren durch weitere Experimente bestätigt wurde^{196,197}.

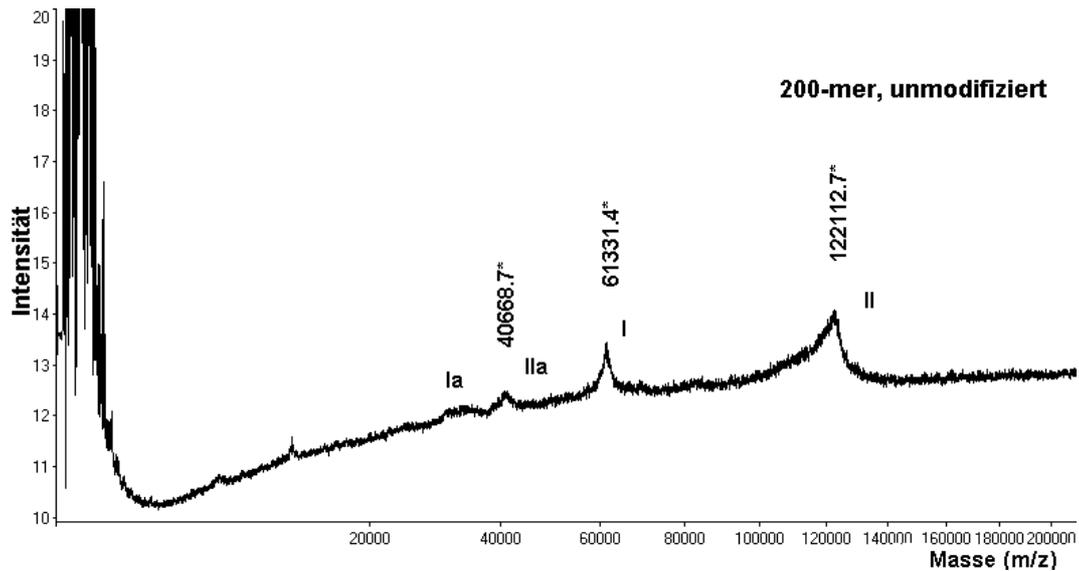


Abbildung 43: MALDI-TOF Massenspektrum eines unmodifizierten 200-mer PCR Produktes (Summe aus 30 Einzelschuß-Spektren). Der Mittelwert der berechneten Massen für die beiden Einzelstränge (61783 und 61595 u) beträgt 61734 u, gefunden wurden 61331.4 u (I). Die Massenauflösung beträgt 28. Auffällig ist, daß hier das Signal des DNA-Duplex bei 122113 u (II) das Spektrum dominiert, so daß die Signale bei 61000 u und 40700 u (IIa) am ehesten als mehrfachgeladene Tochterionen des DNA-Duplex zu interpretieren sind. Allerdings sind bei 30000 u schwach Signale (Ia) der doppelgeladenen Einzelstränge zu erkennen.

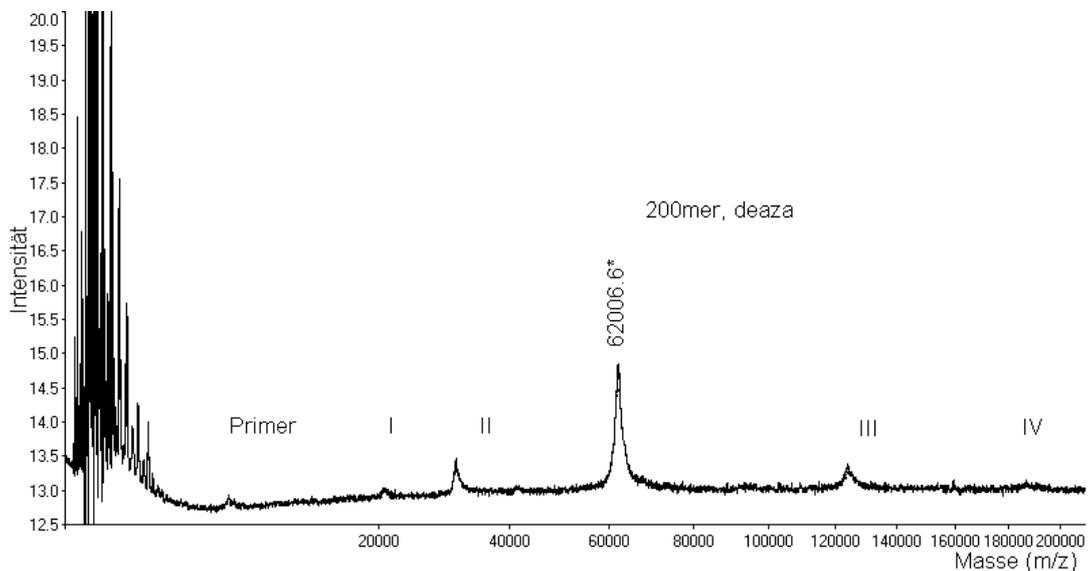
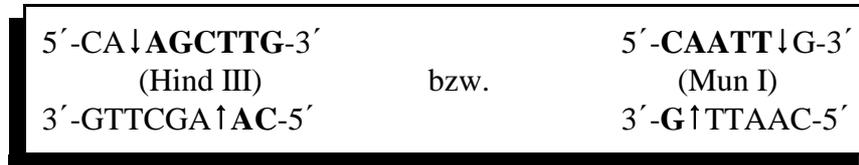


Abbildung 44: MALDI-TOF Massenspektrum desselben, aber 7-dezapurinmodifizierten, 200-mer PCR-Produktes (Summe von 30 Einzelschuß-Spektren). Der Mittelwert der berechneten Massen der Einzelstränge (61772 und 61514 u) beträgt 61643 u, gefunden wurden 62007 u. Die Massenauflösung ist mit 39 um 50 % höher als für das entsprechende Signal der unmodifizierten Probe.

Die Signale I bis IV stammen von mehrfachgeladenen Tochterionen, sowie von Di- und Trimeren Signalen der 200-mer DNA-Einzelstränge.

6.3 Restriktionsverdau der 99-mer PCR-Produkte

Das doppelsträngige 99-mer PCR-Produkt (Sequenz: Abb. 32) enthielt je eine Restriktionsschnittstelle für Hind III und Mun I, die aus den folgenden palindromen Sequenzen bestehen:



Schema 2

Palindrome Sequenzen bezeichnen dabei solche Abschnitte der DNA, bei denen die in 5'-3'-Richtung gelesene Sequenz des sense identisch mit der 5'-3'-Sequenz des antisense Stranges ist. Diese Abschnitte besitzen somit eine C₂-Symmetrieachse.

Nach Behandlung des PCR-Produktes mit beiden Restriktionsendonukleasen sollte demnach ein aus zwei 51 Basenpaaren langen Einzelsträngen bestehender Doppelstrang folgender Sequenz entstehen, der bei Verwendung von 7-Deaza-A_dTP und 7-Deaza-G_dTP als Substrate in der PCR-Reaktion kein unmodifiziertes A und G mehr enthielte:



Schema 3

Es wurden PCR-Reaktionen unter Verwendung von A_dTP und G_dTP und mit Substitution derselben durch 7-Deaza-A_dTP und -G_dTP im Reaktionsansatz durchgeführt und anschließend nacheinander ein enzymatischer Verdau des PCR-Produktes mit Mun I und Hind III durchgeführt. Gelelektrophorese bestätigte, daß aus dem nicht modifizierten PCR-Produkt ein Doppelstrang entstanden war, der in etwa auf der Höhe des 49-mers eines auf demselben Gel aufgetragenen Oligodesoxynukleotidstandards lief. Hingegen erhielt man im Falle der 7-deazapurinmodifizierten DNA, nur eine einzige sehr schwache Bande, die gleich mit der Bande eines 100mer des auf demselben Gel aufgetragenen Oligonukleotidstandards lief. Offensichtlich wurden die modifizierte Sequenz von den Endonukleasen Hind III und Mun I nicht als Substrat akzeptiert. Letzteres stimmt mit Beobachtungen überein, die Seela²¹ mit anderen Endodesoxynukleasen machte, nach denen das Vorhandensein des N⁷-Atomes in Guanin und Adenin einen Teil des Erkennungsmotives für diese Endonukleasen darstellt.

6.4 Ribomodifizierte Primer zur Darstellung 7-deaza-modifizierter Nukleinsäuren

Da der einfachste Weg, zu vollständig modifizierter DNA zu gelangen, durch spezifische enzymatische Spaltung eines PCR-Produktes mit Endonukleasen, wie oben beschrieben nicht möglich ist, wurde eine andere Strategie angewendet: Es wurde ein 100-mer PCR-Produkt hergestellt, bei dem die Primer jeweils eine Ribo-Modifikation enthielten.

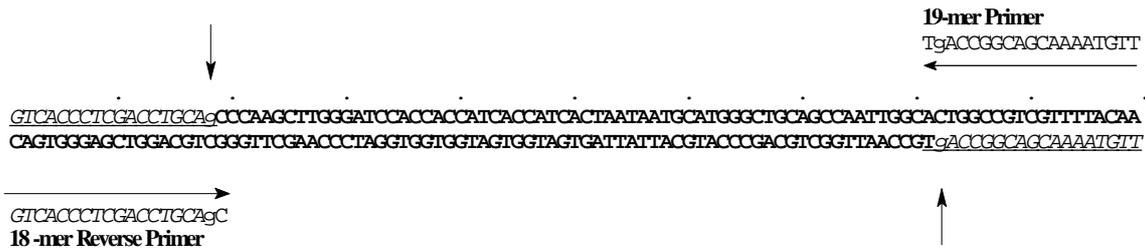


Abbildung 45: Darstellung der Sequenzen des 100-mer PCR-Produktes und der verwendeten Primer. Die Positionen, an denen die Sequenz Ribonukleotide enthält, sind mit einem kleinen Buchstaben markiert. Nicht modifizierte Purinbasen sind in der Sequenz kursiv dargestellt.

Es ist bekannt, daß RNA, im Gegensatz zu DNA leicht mit NaOH hydrolytisch gespalten werden kann¹⁹⁸. Es bot sich daher an, diese Eigenschaft nutzbar zu machen, in dem man durch Modifikation der Primer mit jeweils einem Ribonukleotid die nachträgliche Abspaltung der Primersequenzen aus dem PCR-Produkt ermöglicht. Durch enzymatischen Verdau des jeweiligen 3'-Sequenzüberhanges kann bei Bedarf aus der DNA mit „sticky ends“ auch ein Doppelstrang mit blunt ends erhalten werden. Für den Fall, daß eine Hydrolyse mittels NaOH ungünstig ist, ist auch eine enzymatische Spaltung mit RNase H möglich.

Abbildung 47 zeigt, daß die Behandlung mit Natronlauge erfolgreich war. Sowohl das hydrolysierte PCR-Produkt als auch die beiden freigesetzten Primer werden detektiert. Im Spektrum ist ebenfalls eine geringe Menge des Eduktes zu beobachten. Die Massengenauigkeit ist bei der Vermessung der nun vollständig modifizierten DNA nochmals erhöht. Diese Methode ist insbesondere für die MALDI-TOF Analyse von sehr kurzen PCR-Produkten nützlich, da der prozentuale Anteil unmodifizierter Purinbasen, die aus den Primern stammen, am Gesamt-oligonukleotid mit geringerer Länge der zu amplifizierenden Sequenz steigt und so die Vorteile durch den Einbau der modifizierten Basen zunehmend kompensiert.

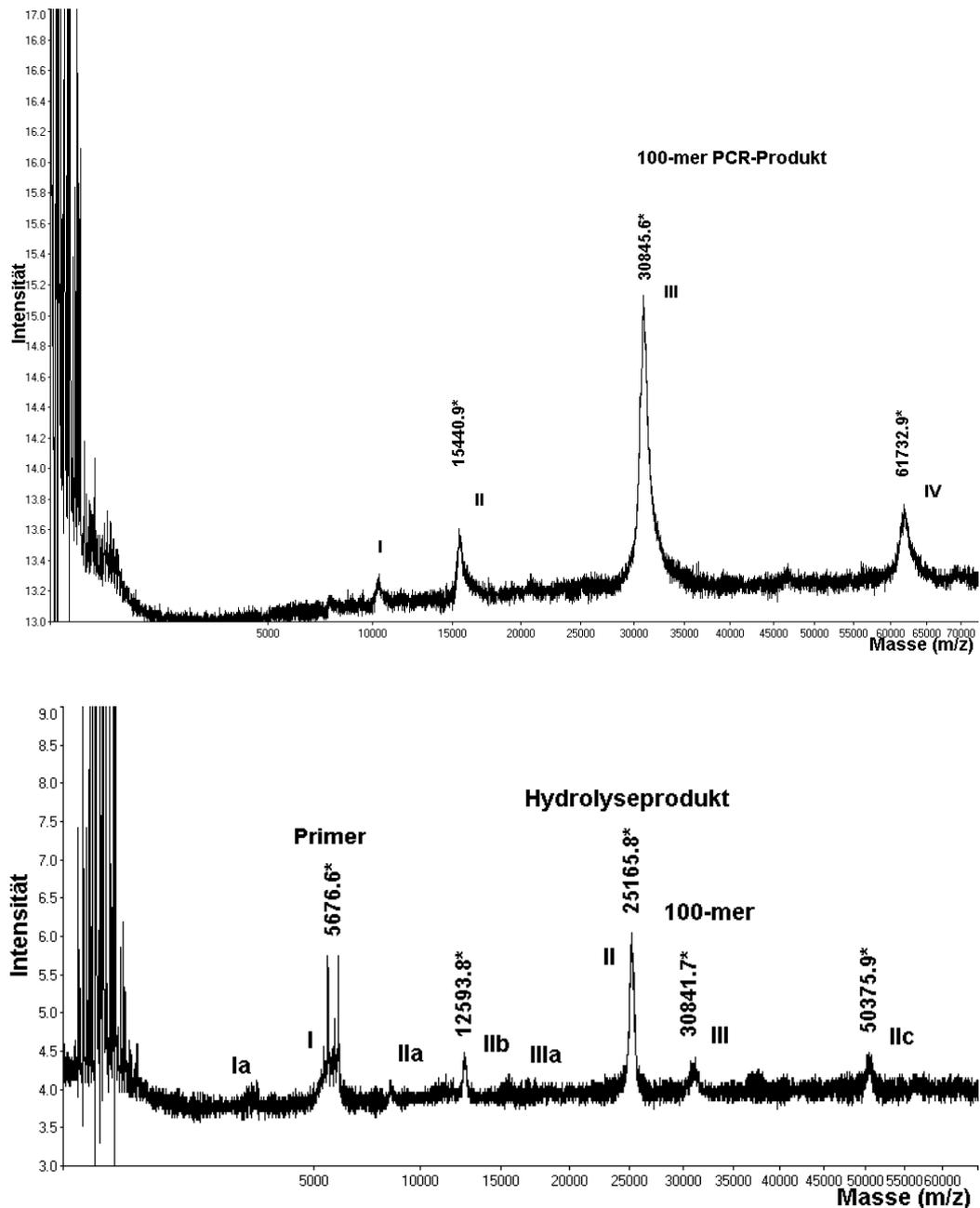


Abbildung 46: Die obere Abbildung zeigt das MALDI-TOF Massenspektrum einer 7-deaza 100-mer DNA aus einer PCR mit ribomodifizierten Primern. Der Mittelwert der Massen der beiden Einzelstränge beträgt 30812 u, gefunden werden 30846 u.

I und II repräsentieren mehrfach geladene Tochterionen, IV Homo- und Heterodimere der Einzelstränge des PCR-Produktes.

In der unteren Abbildung sieht man das Spektrum des PCR-Produktes nach hydrolytischer Abspaltung der Primer durch kurzzeitige Einwirkung von 0.2 mol/L NaOH bei 95°C. Der berechnete Mittelwert der Massen der beiden Einzelstränge beträgt 25167 u, gefunden wird eine Masse von 25166 u (II). Zu sehen ist auch das ursprüngliche PCR-Produkt (III) und die durch Hydrolyse freigesetzten Primer (I).

Mit kleinen Buchstaben sind jeweils die Signale mehrfachgeladener Tochterionen gekennzeichnet. IIc steht für das Signal der Dimeren der Einzelstränge II.

7 Massenspektrometrie einzelsträngiger DNA

7.1 Analytik synthetischer Homopolymere von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin

Noch viel mehr als bei der Massenspektrometrie von doppelsträngiger DNA, sollte sich eine chemische Modifikation auf das Verhalten einzelsträngiger DNA auswirken. Während die längste Nukleinsäure, deren Detektion mit Hilfe der MALDI-TOF MS in der Literatur beschrieben wurde, eine doppelsträngige 500-mer DNA war, konnte einzelsträngige DNA

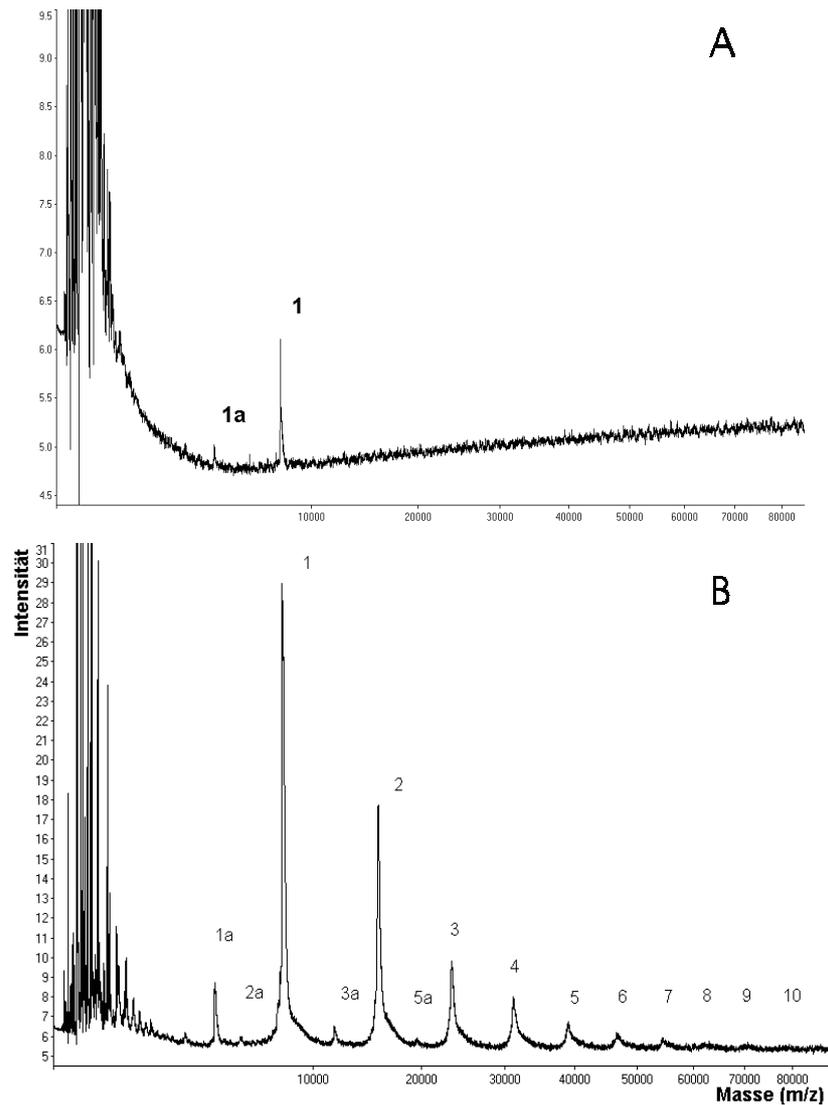


Abbildung 48: A und B: Massenspektren eines modifizierten, synthetischen 25-mer Oligonukleotids aus 24 c^7A und einem T, von dem in A 5 fmol und in B 15 pmol aufgetragen wurden. Die Spektren wurden aus je 100 Einzelschußspektren aufsummiert.

Das Signal 1 von 7730 u repräsentiert das $(M+H)^+$ -Ion des Einzelstranges (theoretische Masse 7727 u). Die Signale 2 bis 10 stammen von Multimeren des 25-mers. Die Signale 1a, 2a, 3a und 5a stehen für die $(M+2H)^{2+}$ Signale des jeweiligen Multimers bzw. des 25-mer Einzelstranges.

lediglich mit einer Länge von maximal 89 bp²⁰⁷ detektiert werden.

Bei der Massenspektrometrie von Homopolymeren von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin in einer Länge von 25 bis 100 Basenpaaren, zeigte sich die Auswirkung auf die Stabilität der DNA besonders deutlich. Es konnten keine Fragmentationen mehr detektiert werden. Die Auflösung und die Signalintensität waren um ein vielfaches höher als bei der entsprechenden regulären DNA. Ein 25-mer, dessen Spektrum in Abbildung 48A dargestellt ist, konnte noch in einer Menge von 5 fmol mit einer Auflösung von $(m/z)/fwhm = 200$ detektiert werden. Damit lag die Nachweisempfindlichkeit für die modifizierte DNA um etwa eine Größenordnung höher als für normale DNA auf dem verwendeten Massenspektrometer.

Bei der Massenspektrometrie der 7-dezomodifizierten DNA zeigte sich ein weiterer interessanter Effekt: In Abhängigkeit von der Konzentration der vermessenen Probe war eine ganze Serie von Multimersignalen zu detektieren. In dem in Abb. 48B gezeigten Massenspektrum einer 30 $\mu\text{mol/L}$ Lösung des Oligonukleotids ist noch ein Nonamer des Einzelstranges nachzuweisen. Auch für das Tetramer des Einzelstranges wird noch das doppelt geladene $(M+2H)^{2+}$ -Signal beobachtet. Bei Lösungen mit einer Konzentration unter 0.1 $\mu\text{mol/L}$ wurden hingegen keine Multimeren mehr beobachtet. Durch die hohe Auflösung der Spektren der modifizierten DNA, machte sich das Auftreten von Kationenaddukten mit zunehmender Konzentration der Lösung besonders bemerkbar. Es zeigte sich, daß die Auflösung des Spektrums nach Zugabe eines mit Ammonium beladenen Kationenaustauscherharzes (DOWEX) zu der Analytlösung deutlich zunahm.

7.2 Das Streptavidin-Biotin-System zur verbesserten Probenkonditionierung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten über Diafiltration oder mittels Chromatographie an QuiaquickTM-Fertigsäulen hat sich als einfach und schnell erwiesen und, wie oben gezeigt, bereits zu sehr guten Ergebnissen geführt. Dennoch hat diese Methode z.B. den Nachteil, daß sie nur das doppelsträngige PCR-Produkt liefert. Darüber hinaus liefert die Methode bei kürzeren PCR-Produkten keine optimale Abtrennung von Protein-Resten. Das Streptavidin-Biotin System¹⁹⁹ ist ein gängiges Hilfsmittel, um biotinylierte Materialien, z.B. die Produkte von PCR oder Sequenzierungsreaktionen, vor ihrer Detektion und Analyse aufzureinigen²⁰⁰.

Biotin besitzt eine sehr große Affinität zu dem bakteriellen Protein Streptavidin ($M \approx 66,000$ g/mol), das aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Jede Untereinheit trägt eine hoch affine Bindungsstelle für Biotin ($K_d = 10\text{-}15$ mol/L) bzw. Biotin-Konjugate. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist im Vergleich zu der mit Avidin von höherer Spezifität²⁰¹. Obwohl der Biotin-Streptavidin-Komplex nur durch non-kovalente Bindungen stabilisiert ist, ist er

etwa eine Million mal stabiler als bei den meisten Antikörper-Antigen Wechselwirkungen. Biotinyliert man ein Oligonukleotid (z.B. einen PCR-Primer), kann dieses an das Protein Streptavidin reversibel gebunden werden. Immobilisiert man nun dieses Protein zusätzlich an Kunststoffoberflächen, die einen magnetischen Kern umschließen, erhält man ein äußerst effektives und sehr einfach anzuwendendes System, um DNA aus biochemischen Reaktionsansätzen zu isolieren und zu reinigen²⁰².

Die biotinylierten Moleküle, die an die feste Phase komplexiert sind, können mit Hilfe eines Magneten für nachfolgende Manipulationen isoliert werden. Solche Schritte können die Abtrennung überschüssiger Reaktionskomponenten wie Puffersalze, Enzyme oder N_dTP beinhalten. Läßt sich eine zu untersuchende enzymatische Reaktion auch an der Festphase durchführen, wie z.B. nukleolytischer Verdau oder Sequenzierung, so kann diese in demselben Reaktionsgefäß ohne Substanzverlust durchgeführt werden. Nach anschließender Reinigung können die Analytmoleküle wieder freigesetzt und detektiert werden.

Als wenig vorteilhaft erwiesen sich zuvor etablierte Verfahren zur Freisetzung biotinylierter Nukleinsäuren aus immobilisierten Streptavidin-Biotin-Komplexen durch Behandlung mit Phenol, Harnstoff oder Formamid²⁰³ für die anschließende massenspektrometrische Analyse, da diese Substanzen allesamt den Kristallisationsvorgang, der einen entscheidenden Schritt bei der massenspektrometrischen Analyse darstellt, auf dem Target des MALDI-TOF Massenspektrometers extrem negativ beeinflussen.

Als Methode der Wahl erwies es sich, die zu untersuchende DNA nach erfolgter Aufreinigung durch Einwirkung von konzentriertem Ammoniak^{204,205} freizusetzen. Auf diesem Wege wird die in der Massenspektrometrie störende Kationenheterogenität des DNA-Stranges minimiert. Störende Kationen werden durch das für die MALDI-TOF MS-Analyse günstigere „flüchtige“ Ammoniumion²⁰⁶ ersetzt, ohne das ein zusätzlicher Schritt zum Ionenaustausch erforderlich wäre. Die Behandlung mit konzentriertem Ammoniak bei RT denaturiert immobilisierte doppelsträngige DNA ohne den Biotin-Streptavidin-Komplex zu destabilisieren, so daß selektiv der nicht biotinylierte Strang freigesetzt wird. Behandlung bei erhöhter Temperatur führt zur Dissoziation des Biotin-Streptavidin Komplexes und setzt die biotinylierte DNA frei.

7.3 Asymmetrische PCR mit biotinmodifizierten Primern

Mit den oben beschriebenen Vorteilen bietet sich die Verwendung von biotinylierten Oligonukleotiden in enzymatischen Reaktionen an, um der schnellen und einfachen Analyse der Proben mit Hilfe der Massenspektrometrie ein ebenso einfaches und schnelles Verfahren zur Probenkonditionierung zur Verfügung zu stellen. Aufgrund der höheren Affinität der Bindung an Streptavidin zugunsten von Oligonukleotiden kürzerer Länge, ist es ganz besonders wichtig eine vollständige Umsetzung der eingesetzten biotinylierten Primer in der enzymatischen Reaktion zu garantieren.

Als sehr nützlich erwies sich hierbei die Verwendung der asymmetrischen PCR. Hier wird der biotinylierte Primer mit einem deutlichen Überschuß des Gegenprimers in der PCR-Reaktion eingesetzt. Diese Variante garantiert eine vollständige Umsetzung des biotinylierten Primers. Überschüssige Moleküle des Gegenprimers werden beim sich anschließenden Reinigungsschritt entfernt. An alle immobilisierten, biotinylierten DNA-Einzelstränge sind die bei der PCR gebildeten nicht biotinylierten Komplementärstränge durch Hybridisierung gebunden, während nicht umgesetzter Gegenprimer aufgrund der deutliche geringeren Affinität zum immobilisierten Biotinstrang in Lösung bleibt und somit bei den Waschschritten entfernt wird.

In Abbildung 49 werden die Massenspektren der biotinylierten Produkte von PCR gezeigt, bei denen biotinylierter Primer und Gegenprimer in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in der Reaktion eingesetzt wurden. Als Template diente wieder M13mp18, aus dem nun mit 7-deazapurinmodifizierten Primern ein 103-mer PCR-Produkt amplifiziert wurde. Zur Aufnahme der Spektren wurden jeweils 20 pmol PCR-Produkt auf den Probenträger des Massenspektrometers aufgetragen. Während in Spektrum A einer symmetrischen PCR der unverlängerte biotinylierte Primer und seine Tochterionen (a, b und c) dominieren, ist in Spektrum B (Primer im Verhältnis 2:5 eingesetzt) das 103-mer PCR-Produkt bei 32355 u bereits zu detektieren. Aber noch immer dominiert das Signal des nicht umgesetzten biotinylierten Primers bei 5800 u das Spektrum. Spektrum C schließlich zeigt ein PCR-Produkt, bei dem biotinylierter Primer und nichtbiotinylierter Gegenprimer im Verhältnis von eins zu fünf in der PCR eingesetzt wurden. Das $(M+H)^+$ -Signal des PCR-Produktes wird jetzt zum Hauptsignal. Aber auch das Signal des biotinylierten Primers ist noch immer deutlich zu erkennen.

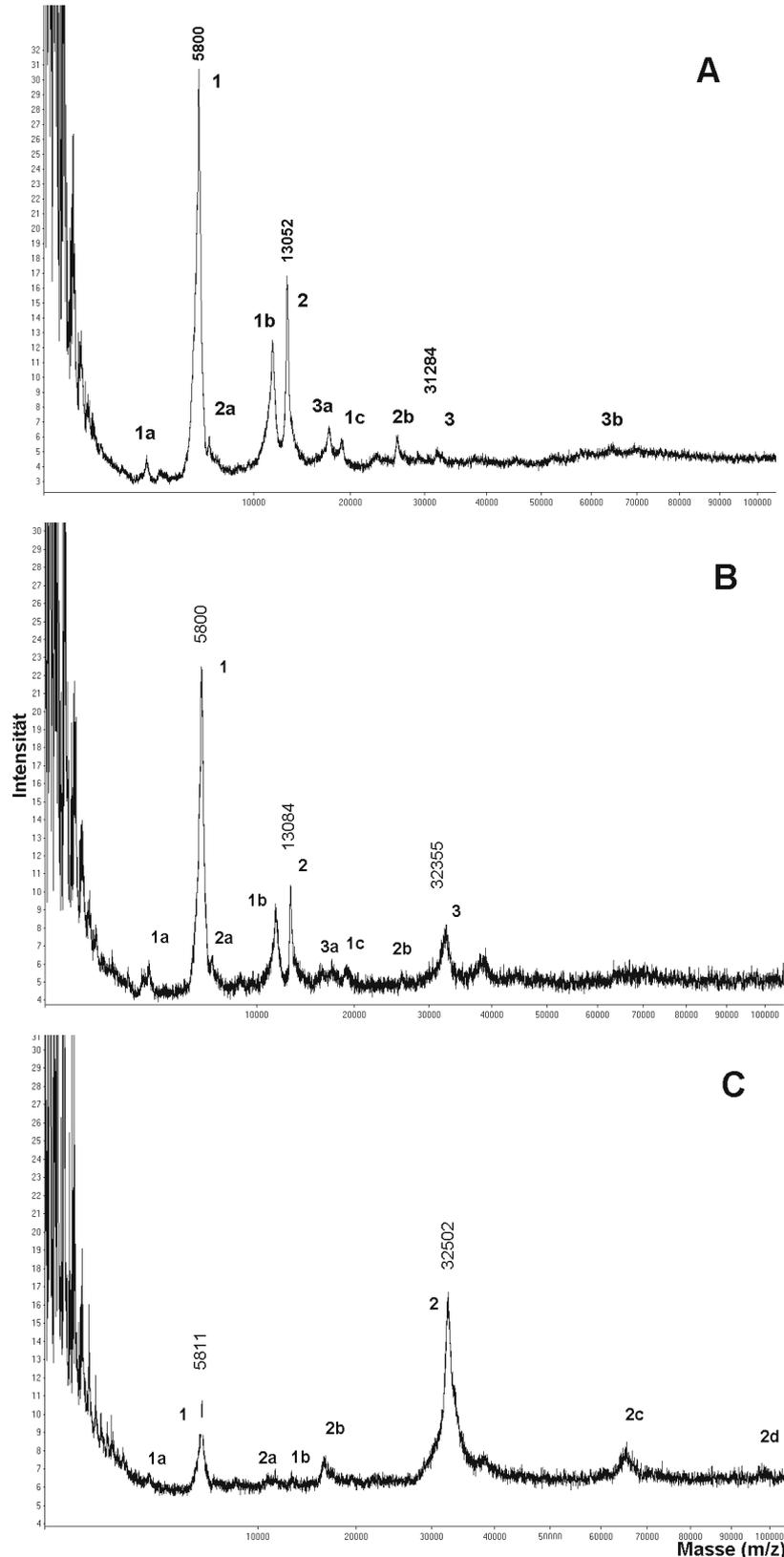


Abbildung 49: MALDI-Spektren eines biotinylierten 103-mer Einzelstranges, der unter verschiedenen PCR-Bedingungen synthetisiert wurde. Das Signal bei 5811 u repräsentiert nicht umgesetzten Primer, das bei 13000 u stammt von Streptavidin, das bei 32500 steht für das eigentliche PCR-Produkt. Mit kleinen Buchstaben sind die jeweiligen Tochterionen der Signale kenntlich gemacht.

In Abbildung 50 ist zum Vergleich das MALDI-Spektrum des nicht biotinylierten Gegenstranges desselben PCR-Produktes dargestellt. Mit derselben Zahl von Schüssen aufgenommen wie das Spektrum in Abbildung 49C, zeichnet sich das Signal des Moleküls des 103-mers durch eine höhere Signalintensität und Auflösung aus. Zusätzlich ist das Signal unverlängerten Primers deutlich geringer. Diese Beobachtung ist relativ einfach zu erklären: Im ersten Schritt des Aufreinigungsverfahrens hybridisiert nur der komplementäre Gegenstrang des erhaltenen PCR-Produktes mit dem an der festen Phase immobilisierten biotinylierten Strang, dadurch kommt es zu einer sehr effektiven Abtrennung von unverlängerten, nicht biotinylierten Primersequenzen, die im Überstand verbleiben. Gleichzeitig ist aber die Bindung kürzerer biotinylierter Oligonukleotide gegenüber der Anbindung längerer bevorzugt. Dies erklärt, daß das Spektrum des biotinylierten Stranges des PCR-Produktes stets auch nicht umgesetzten biotinylierten Primer zeigt. Da bei derselben aufgetragenen Probenmenge der Anteil des gewünschten PCR-Produktes an den desorbierten Molekülen so geringer wird, sieht auch das Signal des PCR-Produktes insgesamt schlechter aus.

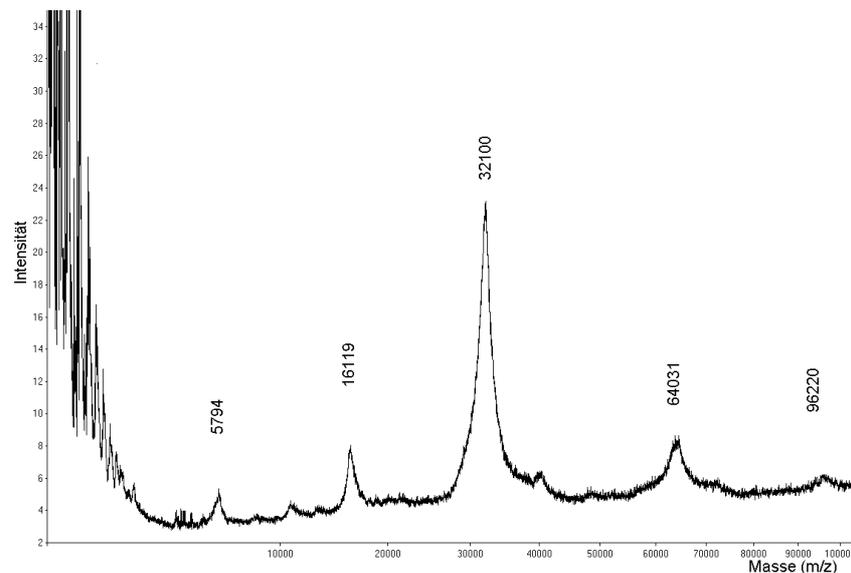


Abbildung 50: Spektrum des nicht biotinylierten Gegenstranges des 103-mer PCR-Produktes. Summe aus 51 Einzelspektren.

Es fällt auf, daß das Signal der Primers kaum noch detektieren ist, während das Molekülsignal des PCR-Produktes im Vergleich zu dem im Spektrum des biotinylierten Stranges (Abb. 49C) sich durch höhere Intensität und Auflösung auszeichnet.

7.4 Darstellung und Massenspektrometrie komplett c⁷-modifizierter Nukleinsäuren

Verwendet man in einer PCR-Reaktion nicht nur modifizierte Triphosphate, sondern zusätzlich auch Primer, die wie in Kapitel 4.6 beschrieben ebenfalls mit der entsprechenden Modifikation versehen sind, gelangt man zu Nukleinsäuren, in denen alle Purinbasen der Sequenz durch die entsprechenden 7-Deaza-Homologen ersetzt sind.

Als Primersequenzen wurden wieder USP und der entsprechende reverse Primer gewählt, die wie bereits oben gezeigt (Abb. 37 + 38) aus M13mp18 ein 103-mer PCR Produkt ergaben. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der PCR wurden zunächst zwei nicht biotinylierte, aber 7-deazamodifizierte Primer verwendet. In PCR mit solchen Primern mußte die Magnesiumkonzentration des Reaktionspuffers drastisch erhöht werden, um überhaupt ein PCR-Produkt zu erhalten. Beim Vergleich der Einbaueffektivität verschiedener DNA-Polymerasen zeigte sich die *Tth*-Polymerase als am geeignetsten, da sie nicht nur mit allen gewählten Templates gute PCR-Ausbeuten ergab, sondern der Reaktionspuffer unter denen der anderen verglichenen DNA-Polymerasen zusätzlich die geringste Anzahl an weiteren Kationen und Detergenzien enthielt. Dies verbesserte die Qualität der Massenspektren der so gewonnenen DNA-Proben erheblich, da auch nur geringe Konzentration an Detergenz das Kristallisationsverhalten der Analytlösung erheblich verschlechterten.

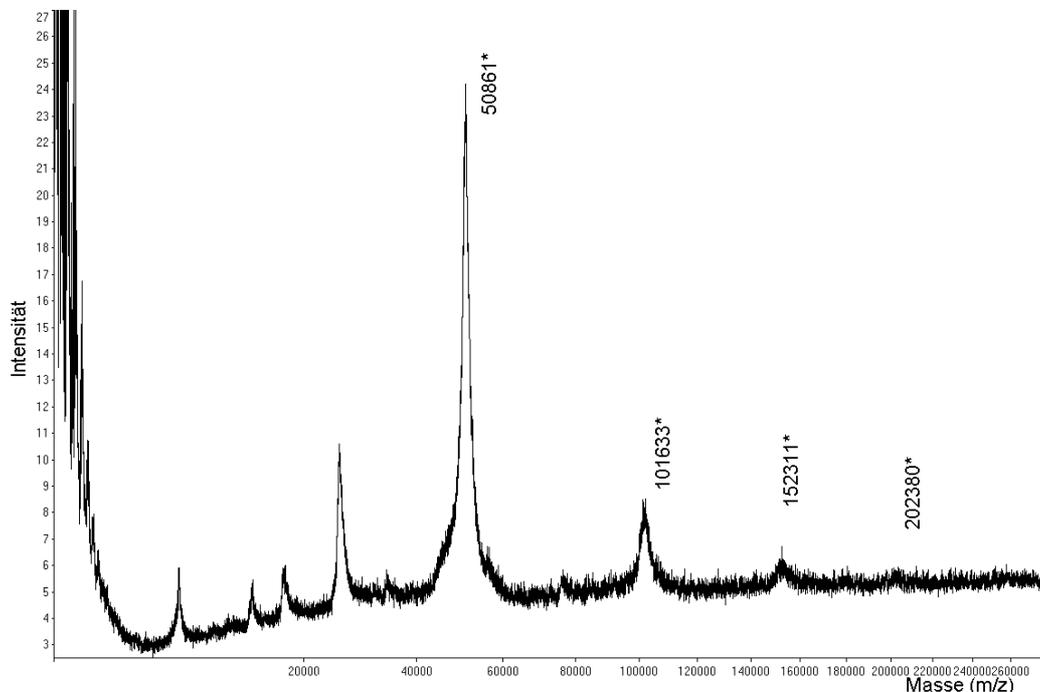


Abbildung 51: Massenspektrum des nicht biotinylierten Gegenstranges eines vollständig 7-deazapurinmodifizierten 165-mer PCR-Produktes. Es wurden 50 % einer Reaktion mit 20 pmol Primer aufgetragen. Das Spektrum wurde aus 10 Einzelspektren aufsummiert, die Massenauflösung des Molekülsignales der Einzelstränge beträgt $(m/z)/fwhm = 31$.

Während das längste einzelsträngige Oligonukleotid, dessen Analyse mit MALDI-TOF MS in der Literatur beschrieben wurde, lediglich eine Länge von 89 Nukleotiden²⁰⁷ hatte, ließen sich problemlos 7-deazamodifizierte DNA-Einzelstränge von bis zu 315 bp Länge untersuchen (Abb. 52), wobei nur eine geringe DNA-Menge (30 pmol Primer in der PCR) nötig war. Wie die Detektion des 630 Basenpaare langen Homodimers des PCR-Produktes in diesem Spektrum zeigt, ist prinzipiell auch eine Detektion doppelsträngiger DNA jenseits der bislang in der Literatur beschriebenen Grenze von lediglich 500 Basenpaaren^{208,209} durch die Modifikation mit 7-Deazapurinen möglich. In dem in Abb. 51 gezeigten Spektrum war sogar das Homotrimere eines 165 Basenpaare langen DNA-Einzelstranges mit einer Masse von über 200000 u noch zu detektieren.

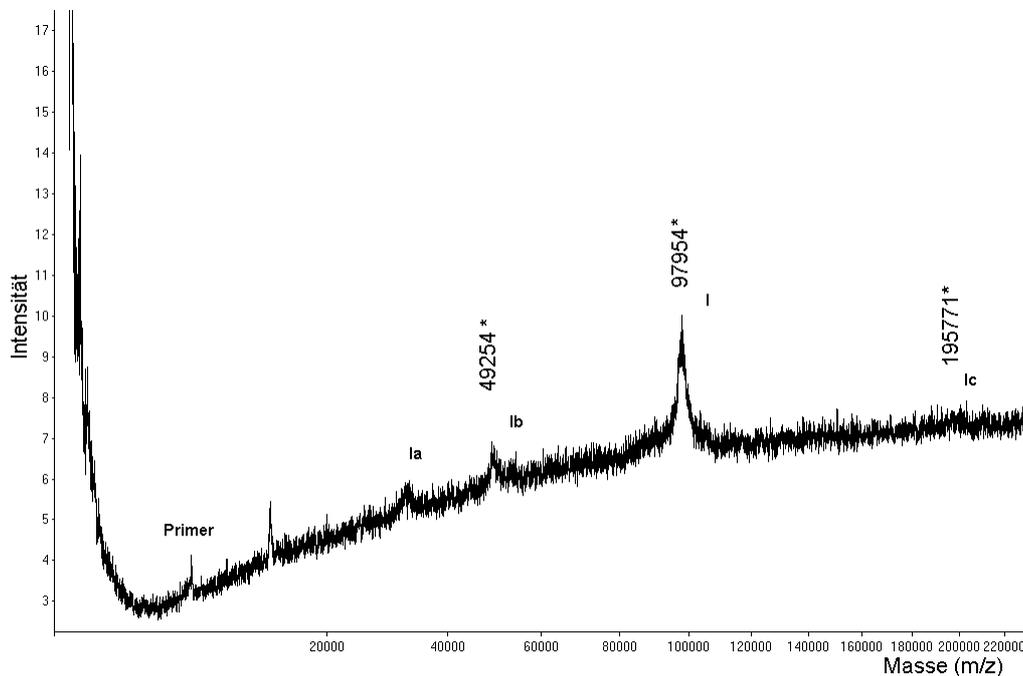


Abbildung 52: Spektrum des nicht biotinylierten Stranges eines vollständig purin-modifizierten 315-mer PCR-Produktes (I). Nur sehr schwach ist das $(2M+H)^+$ -Signal bei 196000 u (Ic).

Zur Aufnahme des Spektrums wurde die Hälfte von zwei PCR mit 30 pmol Primer aufgetragen. Summe von 29 Einzelschüssen. Die Auflösung des $(M+H)^+$ -Signales beträgt $(m/z)/fwhm = 45$.

Auch wenn modifizierte PCR-Produkte bis zu 650 bp Länge auf dem Silbergel noch nachgewiesen werden konnten, waren die Ausbeuten mit den zur Verfügung stehenden DNA-Polymerasen in der PCR so klein, daß es nicht gelang, noch größere DNA-Fragmente massenspektrometrisch direkt zu detektieren. Vermutlich waren auch die Laser- und die Ionenoptik in dem zur Verfügung stehenden Finnigan-Massenspektrometer nicht hinreichend optimiert, um auch in diesem Massenbereich noch eine ausreichende Ionenausbeute zu erhalten.

Im Massenbereich über 250000 u war bereits ein sehr starkes Drifting der Grundlinie zu beobachten. Auf weiteren zur Verfügung stehenden moderneren Massenspektrometern von Bruker war eine Weiterführung dieser Experimente nicht möglich, da diese Geräte über keinen High-Mass-Detektor mehr verfügen, sondern ausschließlich nur auf die Detektion kleiner Massen bis etwa 30000 g/mol optimiert sind. Auch auf diesen Geräten zeigte sich jedoch, trotz der durch die Delayed-Extraction ohnehin erhöhten Auflösung der Signale, noch immer eine deutlich gesteigerte Massenauflösung und Signalintensität für 7-deazapurinmodifizierte Nukleinsäuren.

7.4.1 Ansätze zur Erklärung des besonderen massenspektrometrischen Verhaltens der 7-deazamodifizierten DNA

Für die bemerkenswerten Eigenschaften der 7-deazapurinmodifizierten Nukleinsäuren bei der Analyse durch MALDI-TOF Massenspektrometrie gibt es eine ganze Reihe von möglichen Erklärungen. So kann man z.B. von effektiverer Desorption und/oder Ionisation und einer erhöhten Stabilität der im MS erzeugten Ionen ausgehen. Bei der Vermessung doppelsträngiger PCR-Produkte läßt sich darüber hinaus eine niedrigere Energie, die zur Denaturierung der doppelsträngigen purinmodifizierten Nukleinsäure erforderlich ist, postulieren. Der Austausch des N-7 im Puringerüst gegen eine Methin-Gruppe zerstört einen Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen. Dieses verringert die Möglichkeiten einer so modifizierten Nukleinsäure Sekundärstrukturen durch Nicht-Watson-Crick Basenpaarung einzugehen²¹⁰, was sich in einer erleichterten Desorption während des MALDI-Prozesses zeigen sollte.

Die bei der chemischen Glykosidierung von 7-Deazapurinen bereits angesprochene niedrigere Elektronendichte des aromatischen Systemes sollte sich in diesem Zusammenhang in einer schwächeren Watson-Crick Basenpaarung und damit niedrigeren Schmelzpunkten²¹¹ eines so modifizierten Doppelstranges auswirken. Dieser Effekt könnte möglicherweise ebenfalls zur Verringerung der Energie führen, die während des MALDI-Prozesses zur Denaturierung eines Doppelstranges benötigt wird.

Mit dem Austausch des N-7 gegen eine Methingruppe geht darüber hinaus eine Position verloren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine positive Ladung trägt, womit 7-deazapurinmodifizierte Nukleinsäuren weniger polar und damit besser desorbierbar sein sollten. Aufgrund der Abwesenheit des N-7 Atomes als Protonenakzeptor und der geringeren Polarisierung der C1'-N-Bindung ist in 7-Deazapurinnukleosiden eine Depurinierung nach dem für die Hydrolyse in Lösung etablierten Mechanismus verhindert.

Zwar ist eine direkte Korrelation von Reaktionen in Lösung und in Gasphase problematisch, dennoch kann eine geringere Neigung zur Depurinierung so modifizierter Nukleinsäuren während des MALDI Prozesses erwartet werden. Die Depurinierung kann einerseits von Ladungsverlust der zu untersuchenden DNA gefolgt sein, so daß die Ausbeute an geladenen Spezies sinkt oder es können geladene Fragmentionen entstehen, womit ebenfalls die Intensität des Signales des nicht fragmentierten Moleküls verringert wird.

Die Beobachtung, daß bei 7-deazapurinhaltigen DNA-Fragmenten sowohl die Sensitivität zunimmt als auch das Peaktailing des $(M+H)^+$ -Signales zu geringeren Massen drastisch reduziert ist, bestätigt, daß das Vorhandensein des N⁷-Atoms auch im Mechanismus der Depurinierung während des MALDI-Prozesses essentiell ist. Die deutlich gesteigerte Reproduzierbarkeit der Aufnahme von Spektren der DNA von verschiedenen Orten des Probenkristalles läßt auf ein homogeneres Kristallisationsverhalten des DNA/Matrix-Gemisches schließen. Dies könnte evtl. eine Folge einerseits der veränderten Sekundärstruktur der modifizierten DNA als auch ihrer geringeren Polarität sein. So zeigen z. B. Circular-Dichroismusspektren, daß 7-Deazapurinnukleotide deutlich flexibler als Purinnukleotide sind. Eine Eigenschaft, die sich evtl. auf die Kristallisationseigenschaften von Nukleinsäuren, die solche Nukleotide enthalten positiv auswirken könnte²¹². Abschließend läßt sich feststellen, daß sich 7-deazapurinmodifizierte Nukleinsäuren durch drastisch erhöhte Ionenstabilität und erhöhte Empfindlichkeit unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie auszeichnen und dadurch höhere Massenauflösung und damit bessere Massengenauigkeit ermöglichen.

8 DNA-Sequenzanalyse

Die massenspektrometrische Analyse von DNA-Sequenzleitern, die z.B. mit Hilfe der klassischen Sanger-Sequenzierung generiert wurden, spielt noch immer eine bedeutende Rolle bei den Anstrengungen, MALDI-TOF Massenspektrometrie als die Methode der Wahl zur DNA Sequenzverifikation und zur Detektion von Mutationen zu etablieren. Auch wenn die erreichbare Leselänge noch immer weit von denen gelelektrophoretischer Methoden entfernt ist, ist die Massenspektrometrie nicht von den Nachteilen betroffen, die die gelbasierende Analyse von Sequenzierprodukten beeinträchtigt, wie z.B. Bandenkompensation und Stops der DNA-Polymerasen. Verwendet man die Masse zur direkten Zuordnung des Produktes, können Full-Stops der Polymerase leicht entdeckt werden. Daher ist der massenspektrometrische Ansatz vielleicht weniger zum *de novo* Sequenzieren langer Genabschnitte als viel mehr zur schnellen und fehlerfreien DNA-Analyse im vergleichenden und diagnostischen DNA-Sequenzieren von besonderem Interesse²¹³.

8.1 Vermessung einer modifizierten synthetischen DNA-Leiter

Das Rohprodukt der Festphasensynthese der Sequenz $T(c^7A)_{99}$ eignete sich hervorragend zur Simulation einer Sequenzleiter, z.B. eines enzymatischen Verdaus der synthetisierten Sequenz. Es handelt sich *de facto* um ein Gemisch von 100 verschiedenen Oligonukleotiden von T bis $T(c^7A)_{99}$. Durch die Verwendung des Rohproduktes der Synthese liegen die verschiedenen Abbruchsequenzen nicht alle in gleichen Mengen vor, so daß dies auch umso besser das Produkt einer enzymatischen Reaktion simulieren kann, als dies bei einem Experiment der Fall wäre, bei dem die verschiedenen Oligonukleotide im gleichen Mengenverhältnis vermischt würden (vgl. Abbildung 53).

Die Sequenz mußte wie in 4.6 diskutiert ein T enthalten, da der Träger für die Festphasensynthese bereits mit einer Base beladen ist und T von den vier möglichen, die zur Auswahl stehen, die einzige ist, bei der im Massenspektrum keinerlei Fragmentierung zu beobachten ist. Die Auflösung des aus der Addition von 100 Einzelschußspektren erhaltenen Massenspektrums war ausreichend, um die möglichen Fehlsequenzen von $T(c^7A)_4$ bis $T(c^7A)_{99}$ über einen großen Bereich zuordnen zu können. Die Interpretation des Spektrums war sehr schwierig, da neben den Molekülsignalen ebenso doppelt geladene Ionen und Dimere als Tochterionen der jeweiligen Hauptsignale ebenso wie Kationenaddukte auftraten. Insbesondere im Bereich des Molekülsignals des Hauptproduktes sowie des doppeltgeladenen Tochterions war die Zuordnung der Signale deutlich erschwert. Die Signale von dimeren Oligonukleotiden der Sequenzleiter konnten bis zu einer Länge von etwa 135 Basenpaaren verfolgt werden.

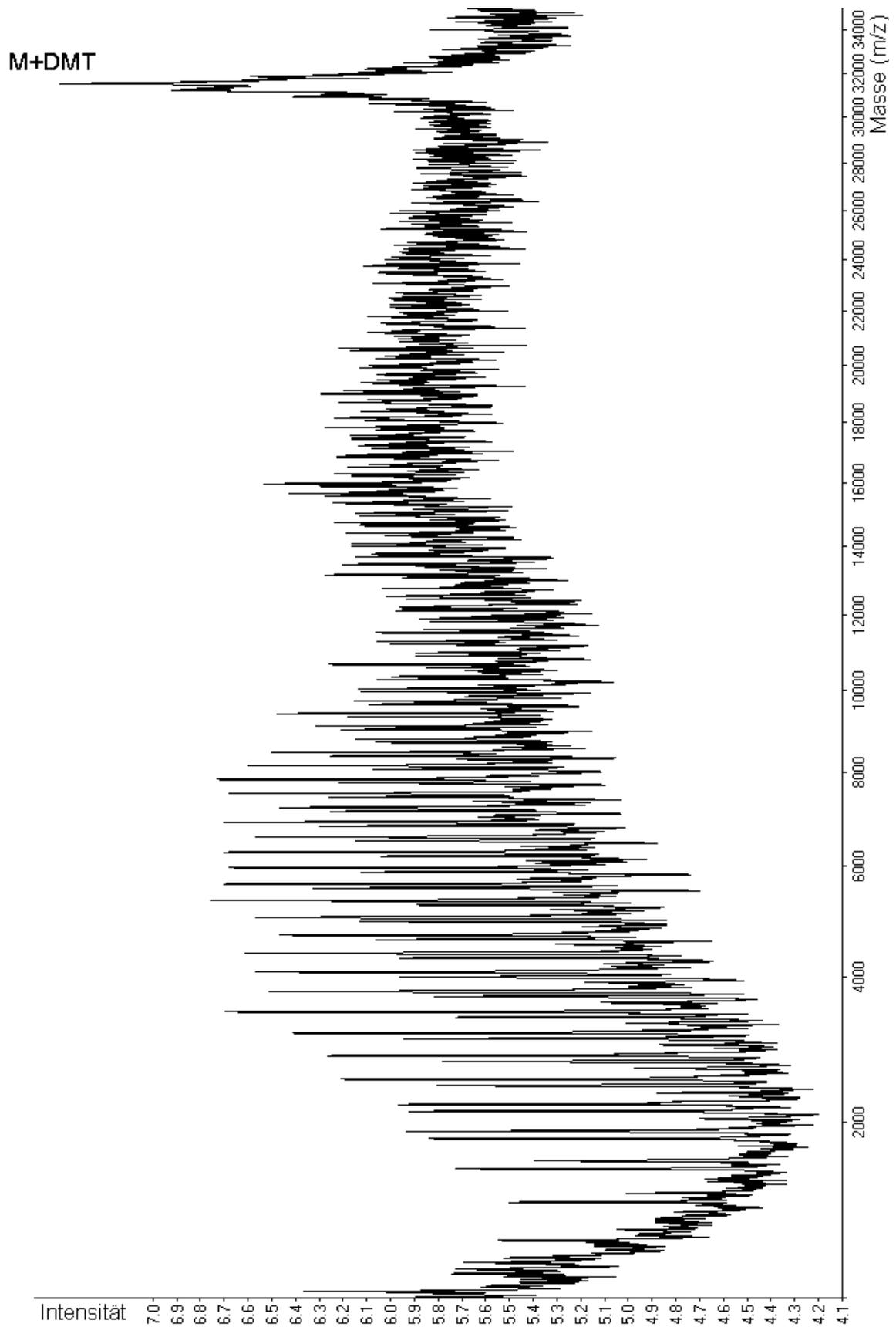


Abbildung 53: Spektrum des Syntheserohproduktes eines synthetischen 100-mer Oligodesoxynucleotids, das 99 7-Deazaadenosinnucleotide enthält.

Somit ist zu erkennen, daß die 7-Deazamodifikation von DNA eine deutlichere Erweiterung des Lesebereiches der Sequenzierung mit Hilfe der Massenspektrometrie erwarten läßt. Wie der vergrößerte Ausschnitt des Spektrums in Abbildung 54 verdeutlicht ist allerdings die Entwicklung geeigneter Software zur Dekonvolution und zur Interpretation der Spektren dringend angezeigt, da die manuelle Auswertung sehr schnell äußerst aufwendig wird.

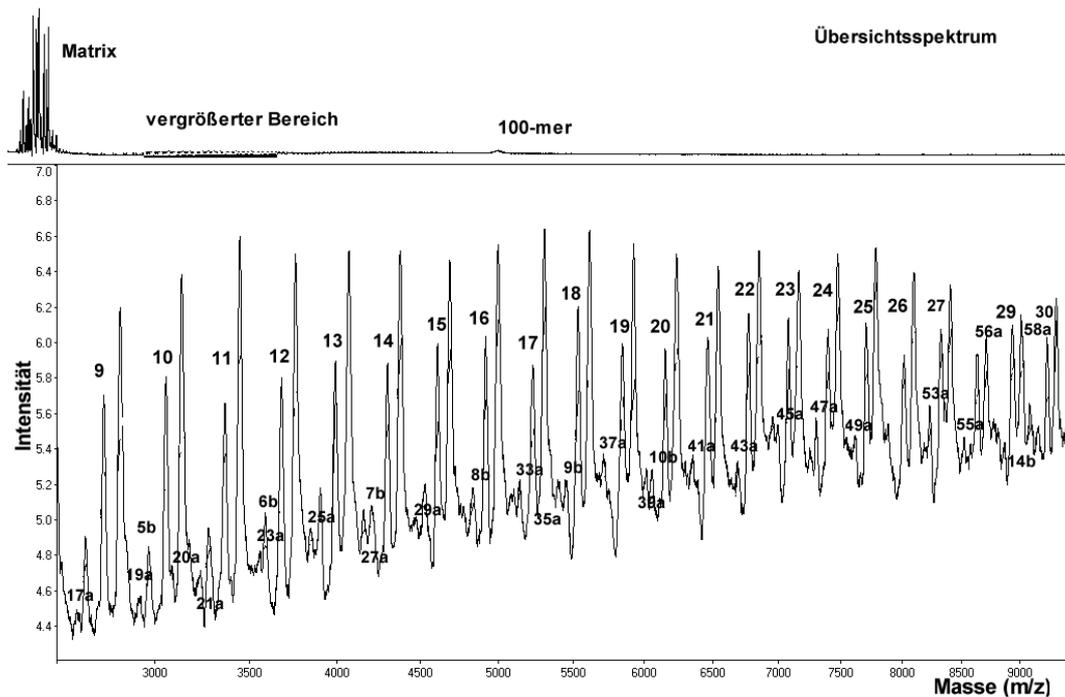


Abbildung 54: Vergrößerter Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Rohproduktes der Synthese von T(c⁷A)₉₉-DMT: Zu erkennen sind die (M+H)⁺-Signale der Rumpfsequenzen einer Länge von 9 bis 30 bp.

Mit dem Index a sind die (M+2H)²⁺-Signale und mit b die (2M+H)⁺-Signale der entsprechenden Sequenzen bezeichnet. Zur Aufnahme des Spektrums wurden 15 pmol DNA aufgetragen und 100 Einzelschußspektren aufsummiert.

Neben den Signalen der Rumpfsequenzen beobachtet man eine zweite Serie von Signalen, die untereinander ebenfalls eine Massendifferenz von 310 u aufweisen, die einem 7-deaza-A entspricht und deren Signale gegenüber dem jeweiligen Signal der Rumpfsequenz um 80 u verschoben sind. Da diese Massendifferenz einer Phosphatgruppe entspricht, ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um solche Fragmente handelt, die erst bei der ammoniakalischen Entschützung des Oligonukleotides im Anschluß an die Synthese durch hydrolytische Spaltung der Phosphatdiesterbindung entstanden sind. Dies ist sicherlich nicht überraschend, bedenkt man daß die zur vollständigen Abspaltung der Aminoschutzgruppen benötigte Reaktionszeit bei 60 h Stunden bei einer Temperatur von 55 °C lag.

8.2 DNA-Sequenzierung mit Hilfe einer Endonuklease

Die Verwendung von 7-Deazapurintriphosphaten hat zu einer erheblichen Verbesserung der Ergebnisse bei der Sequenzierung von DNA mit Hilfe der Massenspektrometrie geführt²¹⁴ und die erreichbare Leselänge deutlich erweitert. Dennoch sind die bislang etablierten Verfahren zum Sequenzieren mit MALDI-TOF, die Sanger-Sequenzierung²¹⁵ bzw. ihre Variante Cycle Sequencing²¹⁶ sowie das Sequenzieren mit Exonucleasen²¹⁷ für die Sequenzanalyse von 7-deazapurinmodifizierter DNA nicht optimal geeignet. Als Folge der veränderten Struktur des Puringerüsts, durch die ein Wasserstoffbrückenakzeptor im Pyrrolring verloren geht, können nicht alle Enzyme diese Basen korrekt als Substrat erkennen. Für Exonucleasen stellt diese Modifikation häufig einen Inhibitor dar, womit DNA mit derart modifizierten Purinbasen für eine Sequenzierung auf diesem Wege nur schwer zugänglich ist. Die bei der Sanger-Sequenzierung eingesetzten Enzyme sind zwar in der Lage 7-deazapurinmodifizierte Triphosphate einbauen und die so erzeugte Sequenzleitern können auch wesentlich besser massenspektrometrisch untersucht werden, aber gerade bei besonders purinreichen DNA-Abschnitten kommt es immer wieder zu erheblichen Problemen, v.a. durch Stops der Polymerase, die das Lesen der Sequenz z.T. unmöglich machen²¹⁸.

Der Einsatz unspezifischer Endonuklease²¹⁹ zur DNA-Sequenzierung ist ein Lösungsansatz, um die z.T. mangelnde Akzeptanz modifizierter Purinbasen als Substrat in enzymatischen Reaktionen zu umgehen. Endonucleasen schneiden unspezifisch das Phosphatdiesterrückgrat eines doppelsträngigen DNA-Templates und werden somit von einer Basenmodifikationen nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt. Um zu verhindern, daß man anschließend ein hoffnungsloses Sammelsurium kleiner DNA-Stücke erhält, deren ursprüngliche Reihenfolge nicht mehr zu konstruieren ist, wurde ein biotinyliertes Template verwendet. Ein solches kann man mit Hilfe der PCR erhalten, indem man einen biotinylierten Primer verwendet (vgl. 7.3).

Dieses Verfahren nutzt zudem den Vorteil der massenspektrometrischen Detektion der generierten Sequenzleiter. Statt, wie bei allen anderen gängigen Sequenzierverfahren der Fall, verschiedene basenspezifische Reaktionen für die Bestimmung der Abfolge von A, C, G und T parallel durchzuführen, kann auf diese Weise die Information über die Basenabfolge der untersuchten Sequenz direkt aus der Massendifferenz der durch den enzymatischen Verdau generierten DNA-Bruchstücke abgelesen werden. Der Einsatz von teuren Didesoxynukleosidtriphosphaten und für den Einbau dieser Triphosphate modifizierter Enzyme zur Generierung der Sequenzleiter wird bei diesem Verfahren ebenso überflüssig wie das Markieren der erzeugten DNA-Bruchstücke mit Fluoreszenz oder Radioaktivität.

III. Ergebnisse und Diskussion - Biochemie und Massenspektrometrie

Entscheidende Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens ist allerdings eine hinreichende Massenauflösung, um auch noch den geringen Unterschied in der Masse zwischen einem c^7A und einem T von nur 8 u zuordnen zu können. Diese Voraussetzung ist bei der massenspektrometrischen Analyse von unmodifizierten DNA-Templates nicht gegeben.

Als Template für die Sequenzierreaktion wurde ein 60-mer PCR-Produkt aus der Poly-Linker-Region des Phagen M13mp18 verwendet. Als Primer wurde wieder ein biotinylierter 7-deaza-modifizierter USP zusammen mit einem passend gewählten, nicht modifizierten Gegenprimer (RP60) eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde über das Streptavidin-Biotin-System isoliert und noch an der festen Phase immobilisiert direkt für den sich anschließenden enzymatischen Verdau eingesetzt. Als Endonuklease wurde das Enzym DNase I verwendet, da es sich als für solche Reaktionen geeignet gezeigt hat. Im Gegensatz zu anderen Endonukleasen wie z.B. S1 und MBN zeigte DNase I in Untersuchungen von Collazo²¹⁹ eine deutlich geringer ausgeprägte Nukleotidspezifität bzw. eine niedrigere Sensitivität gegenüber Sekundärstrukturen des zu spaltenden DNA-Templates.

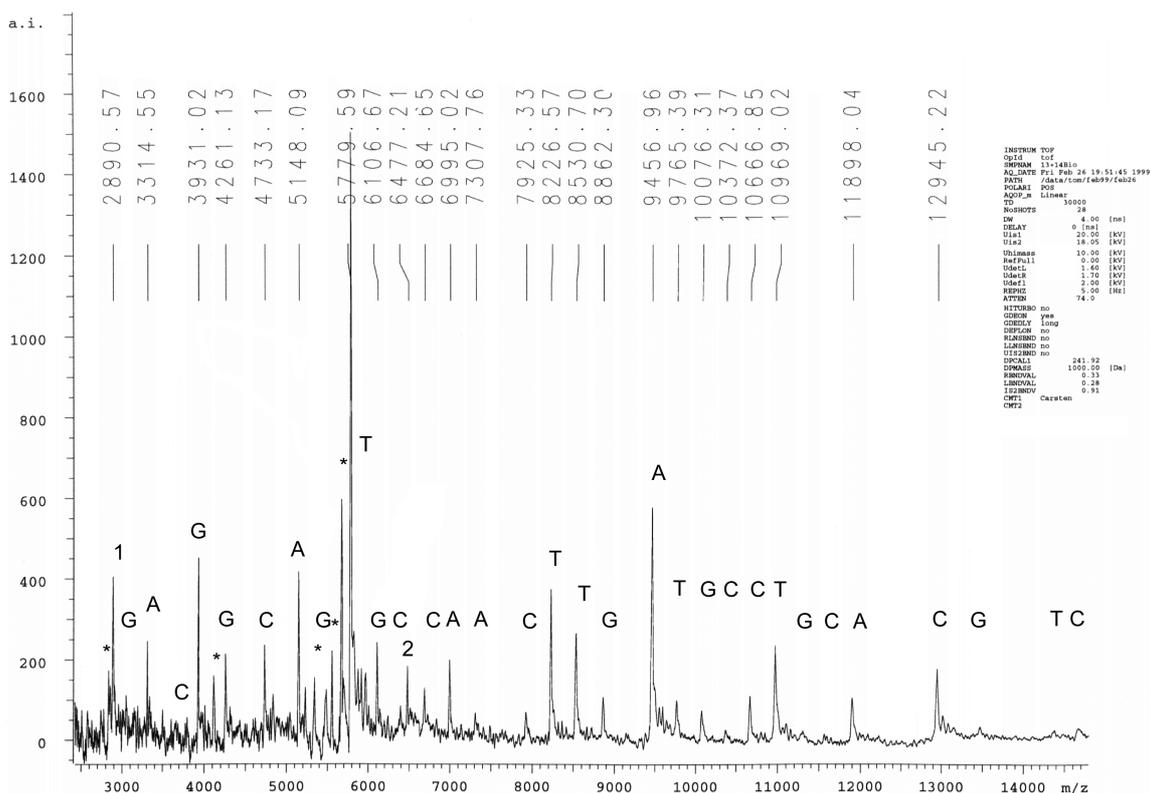


Abbildung 55: Spektrum der biotinylierten Produkte des DNase I Verdau eines komplett 7-deaza-modifizierten 60-mer PCR-Produktes.

Summe von 28 Einzelschußspektren. Mit einem * werden durch Decytidinylierung entstandene Fragmentationen bezeichnet. 1 und 2 markieren doppelt geladene Tochterionen.

Aus dem Massenspektrum, das in Abb. 55 gezeigt ist, kann die Abfolge der einzelnen Basen im Bereich zwischen der zehnten und der 41. Position der Sequenz des PCR-Produktes direkt aus der Differenz der Massen der unterschiedlichen Signale abgelesen werden. Die so gewonnene Sequenz weist gegenüber der Originalsequenz wenige Lücken auf, die ausschließlich bei G und bei C auftreten. Daher ist davon auszugehen, daß die Reaktion mit DNase I doch eine gewisse Sequenzspezifität besitzt, die auch damit zusammenhängen kann, daß ein festphasen-gebundenes DNA-Template eingesetzt wurde. Zur Aufnahme dieses Spektrums wurden lediglich 28 Einzelschußspektren aufaddiert, während bei Sequenzierreaktionen ohne einen modifizierten Primer i.d.R. zwischen 100 und 200 Einzelschußspektren aufsummiert werden müssen, um zu einem akzeptablen Signal-Rausch-Verhältnis zu gelangen. Dies unterstreicht wiederum die durch die Verwendung der 7-Deazamodifikation ermöglichte Steigerung in der Nachweisempfindlichkeit.

Recht überraschend war das Auftreten der mit einem Stern gekennzeichneten Signale in dem in Abbildung 55 gezeigten Spektrum. Da die dem enzymatischen Verdau unterworfenen DNA nur 7-deazamodifizierte Purine enthielt, konnte es sich nicht um die Signale von durch Depurinierung entstandenen Fragmentationen handeln. Die Signale traten jeweils mit einer Differenz von etwa 110 u links neben Signalen aus der Sequenzleiter auf. Die Massendifferenz entspricht exakt dem Verlust der Base Cytosin. Offensichtlich ist die Neigung einer DNA zur Decytidinylierung unter den Bedingungen der MALDI Massenspektrometrie ähnlich ausgeprägt wie die zur Depurinierung. Hierbei handelte es sich um ein recht überraschendes Ergebnis. Um diese Interpretation zu verifizieren und auszuschließen, daß es sich bei der Beobachtung evtl. um ein in der Sequenz oder dem Gerät begründetes Artefakt handelte, wurde der 7-deazamodifizierte Primer auf verschiedenen Massenspektrometern vermessen. Alle drei Spektren, die in den folgenden Abbildungen 56 und 57 dargestellt sind, weisen deutlich durch Decytidinylierung entstandene Fragmentationen auf.

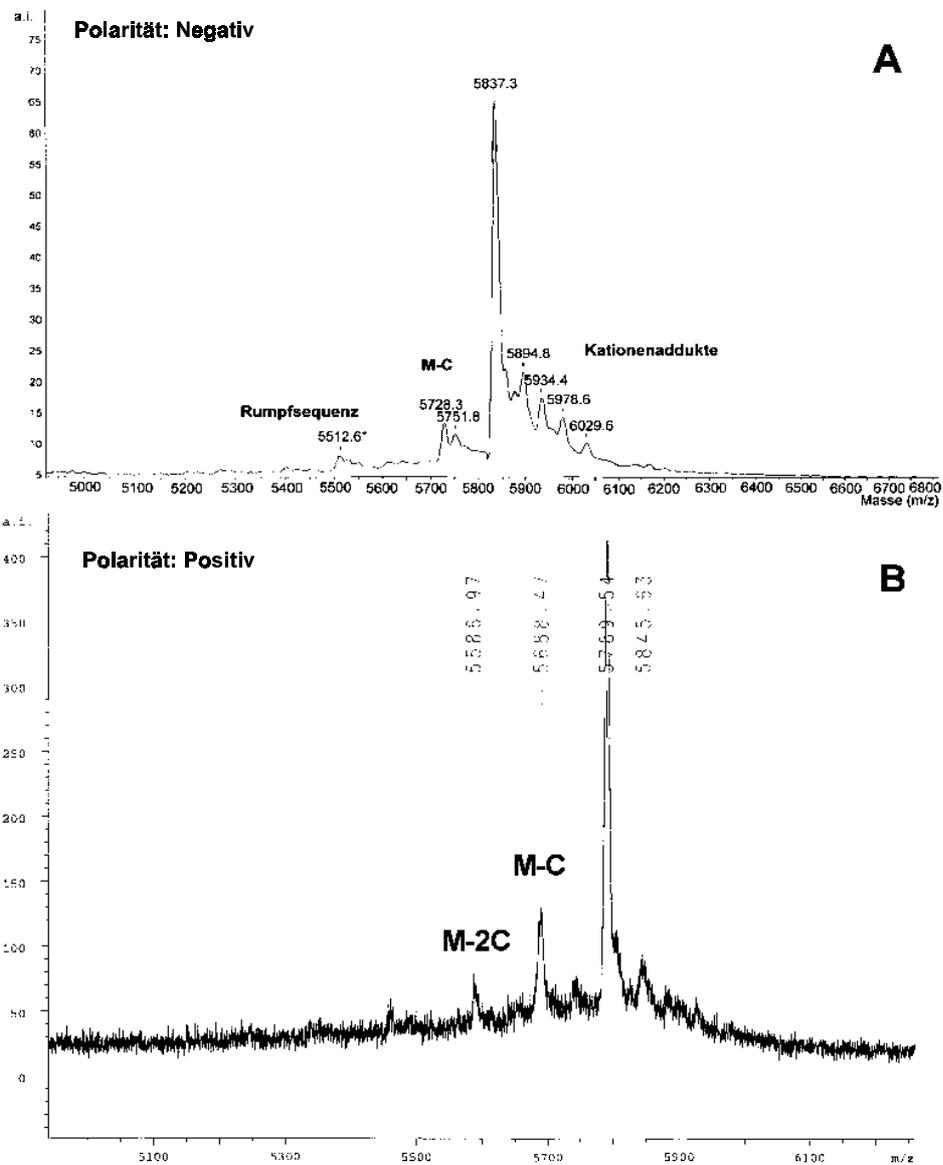


Abbildung 56:

A: Spektrum des als PCR-Primer verwendeten 7-deazamodifizierten Bio-USB auf einem Dynamo-Massenspektrometer im Negativionenmodus und mit Delayed Ion Extraction aufgenommen. Es ist der Verlust eines C aus dem Molekülion zu beobachten. Die Serie von Ionen rechts des Hauptsignals ist auf Kationenaddukte zurückzuführen. Das Signal bei 5512.8 u stammt von einer bei der Synthese entstandenen Rumpfsequenz, des um ein c^7G verkürzten Oligonukleotides.

B: Auch auf einem MALDI-TOF Massenspektrometer der neuesten Gerätegeneration mit Delayed Ion Extraction ist noch der Verlust von mehreren C aus dem Oligonukleotid zu beobachten. Dieses Spektrum wurde im Positivionen-Reflektormodus des Gerätes aufgenommen.

Bei einer vergleichenden Betrachtung der Massenspektren wird der Einfluß der verzögerten Ionenextraktion (DE) offensichtlich. Im Spektrum in Abbildung 57, das auf einem Massenspektrometer ohne DE aufgenommen wurde, können die Signale der durch Decytidinylierung entstandenen Fragmentationen nicht bis zur Grundlinie und Kationenadduktssignale überhaupt nicht aufgelöst werden. Die Fragmentierung des Oligonukleotides ist im Vergleich zu den Spektren in Abb. 56 deutlich ausgeprägter. Die Massenauflösung liegt bei etwa 300 im Vergleich zu einem Wert von etwa 1400 für das Molekülsignal in dem in Abbildung 56B gezeigten Spektrum, das mit Delayed Extraction aufgenommen wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren in den Abbildungen 56B und 57 beide im Reflektormodus des jeweiligen Massenspektrometers aufgenommen.

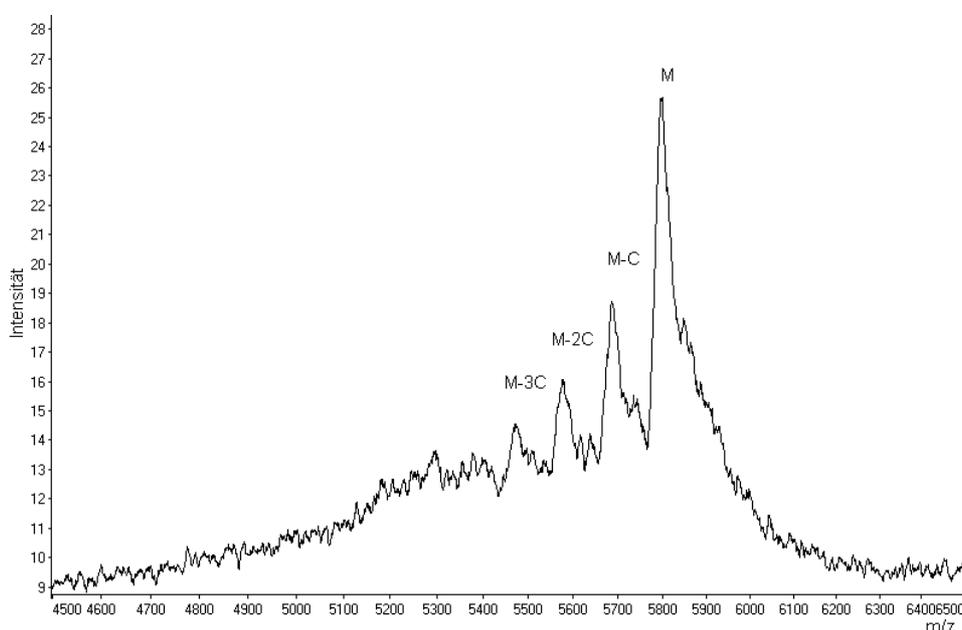


Abbildung 57: Auf einem Finigan-Massenspektrometer ohne Delayed Ion Extraction aufgenommenes Spektrum des synthetischen 17-mer Oligonukleotids (Bio-USP). Deutlich zu sehen eine ganze Serie von Fragmentationen, die in ihrer Massendifferenz dem Verlust von Cytidin entsprechen.

Beim Vergleich eines im Negativ-Ionenmodus aufgenommenen Spektrums (Abb. 56A) mit einem im Positiv-Ionen-Modus aufgenommenen Spektrum (Abb. 56B) stellt man nur sehr geringe Unterschiede fest. Die gelegentlich in der Literatur beschriebene deutlich erhöhte Stabilität von Nukleinsäuren bei Aufnahme von Spektren im Negativ-Ionen-Modus wird zumindest in diesem Fall nicht bestätigt. Vermutlich ist der Effekt der Delayed Extraction bereits so groß, daß ein eventueller Effekt durch eine Messung im Negativ-Ionenmodus nicht mehr zum tragen kommt.

9 Modifikation des Zuckers zur Stabilisierung der DNA

Ribonukleotide erfahren eine enorme Stabilisierung der N-glykosidischen Bindung durch die 2'-Hydroxylgruppe unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie^{220,221}. Allerdings erfordert das Handling von RNA, aufgrund der geringeren Hydrolysestabilität (vgl. Kapitel 6.4) und der Notwendigkeit, in Abwesenheit von ubiquitär auftretenden RNasen zu arbeiten, einen deutlich erhöhten präparativen Aufwand. Darüber hinaus sind enzymatische Techniken wie PCR und Sequenzierung noch nicht so weit entwickelt²²² wie es die entsprechenden DNA-Techniken sind. Ein interessanter Aspekt wäre die Untersuchung, ob auch weitere Modifikationen zu einer ähnlichen Stabilisierung der DNA im MALDI Prozeß führen.

Es ist eine allgemein bekannte Regel, daß Glykoside von 2-Desoxyzuckern im Gegensatz zu 2-Hydroxyzuckern deutlich leichter durch Hydrolyse in 1-Stellung gespalten werden²²³. Offensichtlich übt also die 2-Hydroxylgruppe durch ihren induktiven Effekt einen hemmenden Einfluß auf die Glykosid-Spaltung aus. Ähnliche Vorteile sollten daher aufgrund ihrer elektronischen Eigenschaften auch 2'-Desoxy-2'-fluoronukleotide bieten. Man sollte daher erwarten, daß so modifizierte Nukleinsäuren ebenfalls die Vorteile einer erhöhten Stabilität unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie aufweisen. Aufgrund des sehr kleinen Ionenradius des Fluoratoms könnte ein solches Molekül aber sterisch seinem 2'-Desoxy-Analogon ähneln und somit in enzymatischen Reaktion wie ein 2'-Desoxynukleotid einzusetzen sein. So konnte gezeigt werden, daß auf diese Weise modifizierte Nukleinsäuren im Gegensatz zu RNA resistent gegen Nukleasen wie RNase H sind und z.B. die Translation von Hepatitis C Virus RNA inhibieren²²⁴.

9.1 Enzymatische Reaktionen mit 2'-Fluoro-2'-desoxynukleosidtriphosphaten

Zur Überprüfung der Frage, ob 2'-fluoromodifizierte Nukleinsäuren mit Hilfe der PCR synthetisiert werden können, wurde auf das bereits weiter oben verwendete, auf M13mp18 beruhende, Primer-Template-System zurückgegriffen, das eine 103-mer Nukleinsäure liefert. Die Purinnukleosidtriphosphate 2'-F-A_dTP und 2'-F-G_dTP konnten in Kombination mit den drei anderen natürlichen Nukleosidtriphosphaten von einer großen Anzahl von Enzymen (*Taq*, *Pfu*, *DeepVent*, *Ultma* und *Tfl*) in einer normalen PCR-Reaktion eingebaut werden. Bei Kombinationen dieser Nukleosidtriphosphate sowie bei Substitution von C_dTP durch 2'-Fluoro-C_dTP konnte kein PCR-Produkt erhalten werden. Auch eine Kombination von 7-Deaza-Nukleosidtriphosphaten mit 2'-Fluoro-Nukleosidtriphosphaten führte zu keinen PCR-Produkten. Modifizierte man die Reaktion derart, daß nur ein einziger Reaktionszyklus programmiert wurde, bei dem die Reaktionslösung über sechs Stunden auf 72 °C gehalten wurde, erhielt man z.B. mit *Tth* für alle drei 2'-Fluoro-Nukleosidtriphosphate ein Verlänge-

rungsprodukt der korrekten Länge wie die Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigte. Möglicherweise kann der während der PCR synthetisierte modifizierte DNA-Strang nicht als Template in den weiteren Schritten der PCR fungieren. Daher wurde die Reaktion etwas modifiziert. In einer vorgeschalteten PCR wurde eine 103-mer Nukleinsäure durch den Einbau normaler Triphosphate hergestellt. Mit Hilfe des Biotin-Streptavidin-Systems wurde anschließend der nicht biotinylierte Strang isoliert.

Dieses einzelsträngige Template wurde zusammen mit dem Primer Bio-USP und unterschiedlichen Kombinationen verschiedener Triphosphate in einer Fill-In-Reaktion eingesetzt. Unter diesen vereinfachten Bedingungen gelang es auch durch eine Kombination der Enzyme *Tth* und *Ultma* einen Einbau der drei verschiedenen 2'-Fluoronukleosidtriphosphate auf dem Gel nachzuweisen. Auch eine Kombination von 2'-Fluoro-ATP und 2'-Fluoro-GTP führte, wenn auch schwach, auf dem Gel zu einer Bande der erwarteten Länge. Jede Kombination eines 2'-Fluoropyrimidin- mit einem 2'-Fluoropurin- oder mit einem 7-Deazapurintriphosphat hingegen führte zu keiner nachweisbaren Menge eines Primerverlängerungsproduktes. Da die 7-Deazamodifikation der Purinbasen bereits sehr gute Ergebnisse bei der Stabilisierung der DNA unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS gezeigt hatte, wäre aber gerade die Kombination mit 2'-Fluorocytidin wünschenswert gewesen. Auf dem Gel zeigten solche Reaktionen, bei denen 2'-Fluoroadenosintriphosphat in die DNA-Sequenz eingebaut wurde, die besten Ausbeuten. Es gelang jedoch nicht, von derart modifizierten Nukleinsäuren ein eindeutiges Massenspektrum aufzunehmen. Offensichtlich führt die 2'-Fluoromodifikation zu einem schlechteren Kristallisations- und/oder Desorptionsverhalten der modifizierten DNA.

9.2 2'-Fluorocytidin in einem synthetischen Oligonukleotid

Um die Auswirkung der 2'-Fluoro-C-Modifikation bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie dennoch untersuchen zu können, wurde zunächst ein 50-mer Oligonukleotid der Sequenz $T_{15}(2'F-C)_5T_{10}(2'F-C)_5T_{15}$ synthetisiert. Obwohl das Nukleotid immerhin 10 modifizierte Nukleotide enthält, sind in dem Spektrum fast keine Rumpfsequenzen zu identifizieren, was einen sehr guten Einbau des Amidites während der Reaktion zeigt. Auch bei starker Vergrößerung des Molekülsignales finden sich keine durch Verlust von Cytidin entstandene Fragmentationen. Auffällig war hingegen das für ein synthetisches 50-mer Oligonukleotid sehr schlechte Desorptionsvermögen. Zur Aufnahme des Spektrums in Abbildung 58 mußten relativ hohe Laserenergien aufgebracht werden. Dennoch konnte nur von wenigen Positionen des Probenkristalles ein Spektrum aufgenommen werden. Somit verwundert es nicht, daß die durch enzymatische Verlängerung mit 2'-Fluoro-nukleosidtriphosphaten synthetisierten 103-mer Sequenzen zuvor im Massenspektrometer nicht zu detektieren waren.

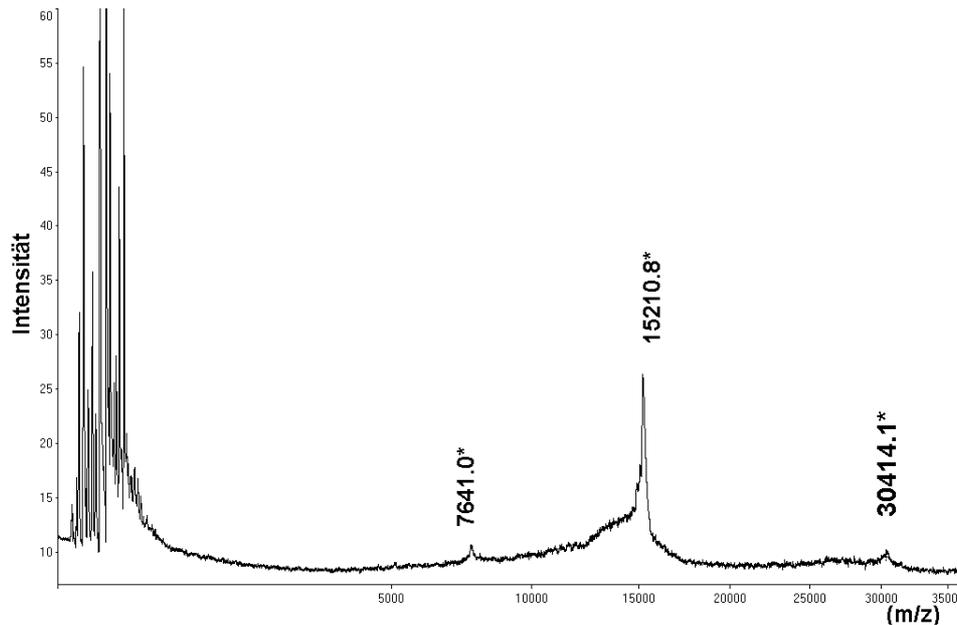
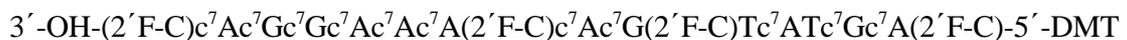


Abbildung 58: MALDI-TOF Massenspektrum des Syntheserohproduktes eines synthetischen Oligonukleotides, dessen Sequenz aus zehn 2'-Fluorocytidin- und 40 Thyminnukleotiden besteht.

Das Spektrum ist die Summe von 20 Einzelschußspektren. Die berechnete Masse beträgt 15189.19 u, die gefundene Masse 15211 u. $\Delta M = 22 \text{ u} / 0.14 \%$. Die Massenauflösung beträgt $(m/z)/fwhm = 350$.

9.3 Kombination von Basen- und Zuckermodifikation

Ein Oligonukleotid, das nur aus den Basen 7-Deaza-2'-desoxyadenosin, 7-Deaza-2'-desoxyguanosin, 2'-Desoxy-2'-fluorocytidin und Thymin aufgebaut ist, sollte unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie keinerlei Fragmentationen mehr aufweisen. Hierzu wurde ein synthetisches Oligonukleotid mit der Sequenz des reversen Universal Sequencing Primers hergestellt, in dem die Basen A, C und G durch die entsprechend modifizierten substituiert wurden.



3: Sequenz eines synthetischen Oligonukleotides mit 2'-Fluoro- und 7-Deazamodifikation

Abb. 59 zeigt das Massenspektrum des Oligonukleotides nach Abspaltung der Schutzgruppen, ohne chromatographische Aufreinigung. Das intensivste Signal ist das des gewünschten Oligonukleotides, rechts daneben das Signal der tritylierten Verbindung. Das Signal bei 4265 u stammt von einer Fehlsequenz. Die Massenauflösung beträgt etwa 2000. Als zweit intensivstes Signal im Spektrum ist das einer um ein 2'-Fluoro-C-Nukleotid verkürzten Rumpfsequenz zu erkennen. Deutlich schwächer sind die Signale dreier weiterer Rumpf-

sequenzen. Solche Produkte entstehen während der chemischen DNA-Synthese durch eine nicht quantitative Kopplungsreaktion (Schritt B, Abbildung 20). Das Capping (Schritt C) der 5'OH-Gruppe der nicht verlängerten Kette verhindert eine weitere Verlängerung dieser Rumpfsequenzen in den folgenden Syntheszyklen. Durch einen nicht quantitativen Capping-Schritt oder durch eine nicht quantitative Detritylierung (Schritt A) kann es aber dazu kommen, daß die Rumpfsequenz im folgenden Syntheszyklus um ein falsches Nukleotid verlängert wird. Dieses würde die Entstehung des mit einem „?“ markierten Signals bei 4264 u erklären. Eine durch Kettenabbruch resultierende Rumpfsequenz in diesem Massenbereich hätte eine Masse von 4311 u aufweisen müssen. Auch dieses Beispiel zeigt wiederum die enormen Vorteile der massenspektrometrischen Analytik gegenüber anderen Verfahren, da man über die Auswertung der Massen der Rumpfsequenzen eine Information über deren Sequenz erhält. Durch die gezielte Auswertung solcher Informationen, kann man Fehlerquellen bei der chemischen DNA-Synthese gezielt eingrenzen.

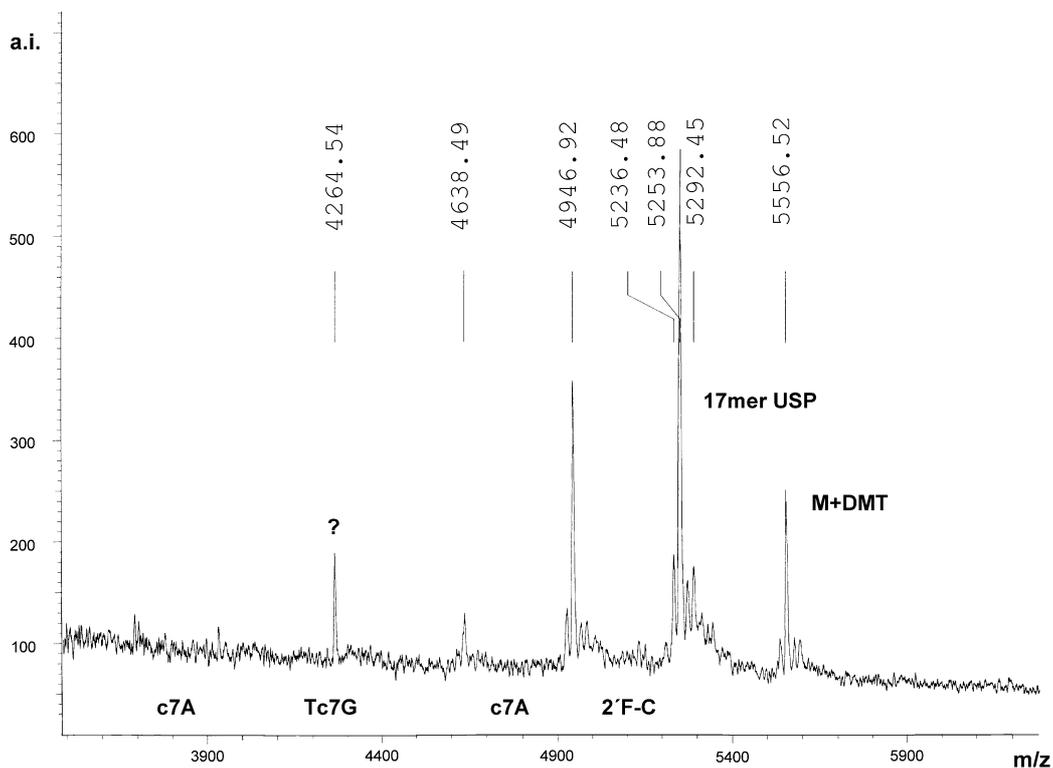


Abbildung 59: Massenspektrum des Syntheserohproduktes eines 17-mer Universal Sequencing Primers (USP), in welchem die Purinbasen der Sequenz gegen ihre 7-Deazaanaloge und Cytidin durch 2'-Fluoro-2'-desoxycytidin ersetzt wurden.

Rechts neben dem Molekülsignal bei 5254 u ($M_{\text{calc}} = 5256$ u) findet sich das Signal des tritylierten Oigonukleotides, links davon die Signale mehrerer Rumpfsequenzen. Keines der Signale ist durch das eines durch den Verlust einer Base entstandenen Sekundärons begleitet. Es ist somit gelungen, eine unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS stabile Nukleinsäure darzustellen.

Bei keinem der Signale ist das Auftreten von Fragmentationen durch den Verlust einer Base zu beobachten. Die einzigen Tochterionen, die in dem Spektrum zu beobachten sind, sind solche von Kationenaddukten und eines $(M-18+H)^+$ -Signal, das dem Verlust von H_2O aus dem Molekül entspricht. In der Literatur wurde die Dehydratisierung bei 7-deazapurinmodifizierten Nucleinsäuren als Teil des Mechanismus der hier besonders häufig beobachteten Bildung einer Triplex-DNA beschrieben²²⁵. Die Auflösung der einzelnen Signale liegt mit einer Breite von 4 u bei halber Signalintensität über 2000, wobei die Signalbreite schon allein aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung des Kohlenstoffes in dieser Größenordnung liegen muß.

Durch die Kombination der Nucleobasen- mit einer Zuckermodifikation ist es somit erstmals gelungen, bei einer Nucleinsäure, die alle vier Basen einer DNA enthält, das Auftreten von Fragmentationen durch Verlust einzelner Basen unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie zu unterbinden. Neben der hohen Stabilität während des MALDI-Prozesses zeichnet sich dieses Molekül durch die Vorteile der 7-Deazamodifikation, durch ein hervorragendes Desorptionsvermögen aus. Von jeder beliebigen Position des Probenkristalles konnten Spektren gleicher Qualität aufgenommen werden.

Leider war es nicht möglich, zu derart modifizierten Oligonucleotiden auch auf enzymatischen Wege zu gelangen. Bei unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen und unter Kombination der verschiedensten DNA-Polymerasen wurden keine Bedingungen gefunden, unter denen gleichzeitig 7-Deazapurintriphosphate und 2'-Fluortriphosphate als Substrate in einer enzymatischen Primer-Verlängerungsreaktion akzeptiert wurden. Da jedes Triphosphat für sich von verschiedenen Polymerasen als Substrat akzeptiert wurde, eine enzymatische Verlängerung des durch Kombination von 2'-Fluoro- und 7-Deazamodifikation synthetisierten Primers jedoch nicht gelang, ist zu vermuten, daß es sich hierbei nicht nur um ein Problem der Substraterkennung des 2'-fluoromodifizierten Nucleosidtriphosphates durch die DNA-Polymerase handelte.

Es kann angenommen werden, daß die Hybridisierungseigenschaften einer auf diese Weise veränderten DNA sehr ungünstig sind. Vermutlich führt die elektronische Struktur der 2'-Fluoro-Modifikation zu einer RNA-ähnlichen A-Konfiguration des Zuckers solcher Nucleotide, so daß eine mit 2'-Fluoro-C modifizierte DNA ein Hybrid aus RNA(A)- und DNA(B)-Konformation darstellt. Kürzlich wurde beschrieben, daß 2'-fluoromodifizierte RNA eine im Vergleich zu RNA deutlich reduzierte Affinität zu doppelsträngiger DNA besitzt. Dies wurde unter anderem auf die Tatsache zurückgeführt, daß eine Wechswirkung zwischen einem 2'-Fluor-Atom und einem negativ geladenen Phosphatrest unmöglich ist²²⁶.

Die Tatsache, daß das 2'-Fluoro-G_dTP und 2'-Fluoro-A_dTP von verschiedenen DNA-Polymerasen eher als Substrat akzeptiert wurde als 2'-Fluoro-C_dTP deutet auf unterschiedliche Mechanismen in der Substraterkennung für Purin- und Pyrimidinnukleosidtriphosphate hin.

Eine weitere Beobachtung wurde bei der näheren Betrachtung des in Abbildung 59 dargestellten sowie bei anderen Massenspektren von dimethoxytritylierten Oligonukleotiden gemacht. Trotz der sauren Eigenschaften der für den MALDI-Vorgang als Matrix verwendeten Hydroxypikolinsäure, findet man im Spektrum stets einen sehr hohen Anteil der tritylierten Spezies. Die saure hydrolytische Spaltung der DMT-Schutzgruppe erfolgt um ein vielfaches schneller als der Verlust der Base in Purinnukleotiden. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß der Vorgang der Depurinierung weniger durch eine intermolekulare Wechselwirkung mit der sauren Matrix als durch intramolekularen Protonentransfer vom Phosphatrückgrat des Oligonukleotides initiiert wird.

10 Konzept eines massenspektrometrischen Polymerase-Inkorporations-Assays

Abschließend soll ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Anwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie auf eine biochemische Fragestellung präsentiert werden. Sowohl die 7-Deaza- als auch die 2'-Fluoromodifikation führten zu einer deutlichen Stabilisierung der DNA unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS. Gleichzeitig zeigte sich aber auch, daß die Triphosphate so veränderter Nukleoside schlechter, oder z.T. gar nicht mehr von einer DNA-Polymerase als Substrat akzeptiert wurden.

Aufgrund der erheblichen Vorteile, die derart modifizierte Nukleinsäuren bei der Massenspektrometrie gezeigt haben, wäre es erstrebenswert, entweder Polymerasen zu finden, die sich durch eine größere Akzeptanz für solche Moleküle auszeichnen, oder bestehende DNA-Polymerase so zu modifizieren, daß sie auch solche Substrate akzeptieren. Da inzwischen von einer ganzen Reihe von DNA-Polymerasen nicht nur die Aminosäuresequenz, sondern auch die 3-D-Struktur des aktiven Zentrums bekannt sind und Modelle für die Substraterkennung bestehen, kann man sich auf relativ wenige Aminosäuren in der Sequenz konzentrieren, die man durch Mutation austauschen würde. So wurde zum Beispiel vor kurzem entdeckt, daß nur ein einziger Aminosäurerest in Reverser Transkriptase dafür verantwortlich ist, ob das Enzym Ribo- oder Desoxyribonukleotide als Substrate für den Einbau in eine wachsende DNA-Kette selektiert²²⁷. Derart modifizierte DNA-Polymerasen könnten z.B. in der Lage sein, auch 2'-Desoxy-2'-fluoronukleosidtriphosphate in einen DNA-Strang zu inkorporieren.

Die massenspektrometrische Analytik bietet sich in Kombination zur Entwicklung eines Assays an, um schnell und einfach eine Vielzahl von Polymerasen auf ihre Effektivität beim Einbau bestimmter Substrate zu testen. Dieses System würde komplett auf radioaktive Markierungsmethoden²²⁸ verzichten, die in der klassischen biochemischen Analytik für diese Fragestellung angewendet würden. Es wurde zusammen mit Pauk²²⁹ ein Konzept entwickelt, um verschiedene DNA-Polymerasen auf ihre Fähigkeit zu testen, das Ribonukleotid riboGTP und das Didesoxynukleotid ddGTP anstelle des natürlichen Substrates einzubauen. Das System wurde sehr einfach gewählt, da es in erster Linie um die Frage ging, ob es überhaupt möglich sei, die MALDI-TOF Massenspektrometrie für dieses Problem anzuwenden.

Das System bestand aus drei verschiedenen 40-mer Templates, die eine zum universellen Sequenzierprimer USP komplementäre Sequenz enthielten. Die Sequenzen wurden so gewählt, daß der Primer bei Zugabe von GTP als alleinigem Substrat in einer PCR um ein, bei zusätzlicher Zugabe von TTP um vier Nukleotide verlängert würde. Die Templates unterschieden sich dadurch, daß die Polymerase den Primer entweder nacheinander um mehrere G, abwechselnd mit G und T oder um ein G und dann um mehrere T zu verlängern hätte. Bietet man der Polymerase modifizierte Guanosintriphosphate als Substrat an, kann man so untersuchen, welche Auswirkungen der wiederholte Einbau von Modifikationen auf die Effektivität der Kettenverlängerung hat. Als Primer wurde ein biotinylierter Primer verwendet, so daß eine einfache Isolation der Verlängerungsprodukte möglich war.

Die einzelnen Ergebnisse des Assays sollen an dieser Stelle nicht besprochen werden, statt dessen wird nur ein einzelnes Spektrum exemplarisch dargestellt. In Abb. 60 sind neben dem unverlängerten Primer, mehrere Verlängerungsprodukte zu erkennen. Aufgrund der Massendifferenzen kann ermittelt werden, um welche und um wieviele Nukleotide der Primer verlängert wurde. Die Folgen der systematischen Variation verschiedener Parameter kann nun einfach durch den Vergleich der Verteilung der unterschiedlichen Reaktionsprodukte in verschiedenen Massenspektren verfolgt werden.

Dabei stellte sich heraus, daß der Primer nicht nur unterschiedlich effektiv mit den richtigen Nukleotiden verlängert wurde, sondern daß auch in einem unterschiedlichen Ausmaß, je nach Reaktionsbedingung und Enzym, falsche Nukleotide eingebaut wurden. Dem hier abgebildeten Spektrum ist z.B. zu entnehmen, daß der Primer um eins, drei und 4 G verlängert wurde.

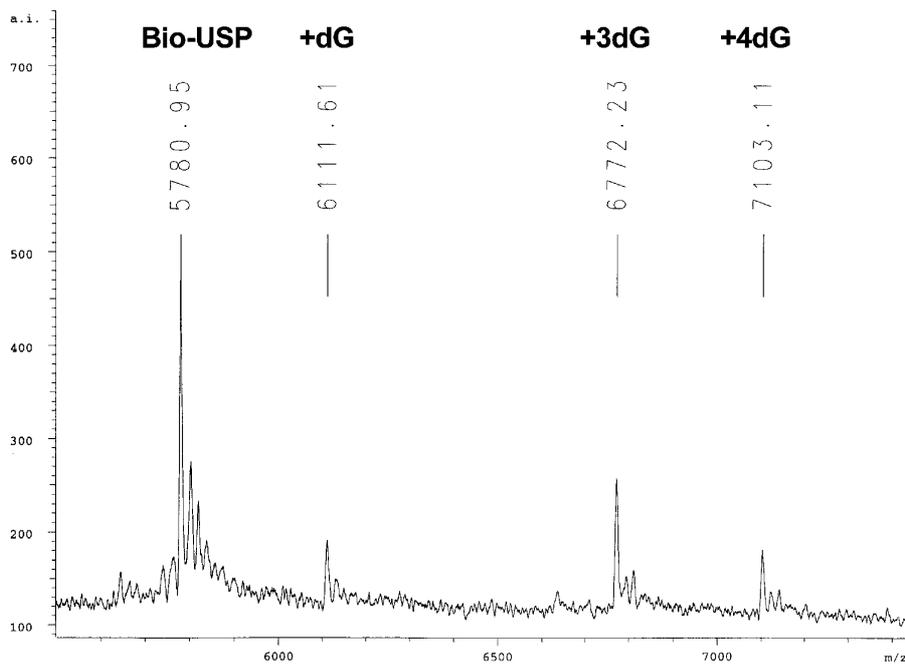


Abbildung 60: Massenspektrum einer enzymatischen Primerverlängerungsreaktion.

Man kann also beobachten, daß es zum Teil zu einem Abbruch der Verlängerung des Primers nach Einbau des ersten Nukleosidtriphosphates kommt. Zum anderen ist festzustellen, daß es auch zu einer unspezifischen Verlängerung des Amplifikates kommt. Denn bei einer korrekten Verlängerung des Primers, hätte dieser nur um drei G verlängert werden sollen.

Diese Methode hat somit eine ganze Reihe von Vorzügen gegenüber einem Assay, der auf der Verlängerung eines radioaktiv markierten Primers beruht. Neben den üblichen Vorteilen, die sich zum einen aus der schnelleren Gewinnung von Ergebnisse durch den Einsatz massenspektrometrische Analytik der Reaktionsprodukte und aus den geringeren Sicherheitsrisiken durch den Verzicht auf radioaktives Arbeiten ergeben, wird die Aussagefähigkeit des Assays durch die Bestimmung der Masse der Produkte der enzymatischen Reaktion um eine ganz entscheidende Komponente erweitert: Durch die Ermittlung der Masse der Produkte der enzymatischen Reaktion ist es im Gegensatz zu gelelektrophoretischen Verfahren möglich über die Massendifferenz zu bestimmen welches Nukleotid durch die DNA-Polymerase eingebaut wurde, wenn unterschiedliche Substrate angeboten wurden. Somit ist es erstmals schnell und einfach möglich, verschiedene Enzyme unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen nicht allein auf die Möglichkeit zum Einbau bestimmter Nukleotidtriphosphate zu untersuchen, sondern auch die Art und die Zahl der Fehler, die bei der Kettenverlängerung auftreten zu verfolgen und zumindest halbquantitativ abzuschätzen.

IV Zusammenfassung

Massenspektrometrie ist eine anerkannte Methode zur Bestimmung der Molmasse von organischen Verbindungen. Mit neuen schonenden Ionisierungsmethoden (soft-ionization) wie z.B. der Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) gelingt die Massenbestimmung von labilen, hochmolekularen Biomolekülen. Diese universell einsetzbare Technik stößt allerdings bei der Analytik von Desoxyribonukleinsäuren noch immer schnell an ihre Grenzen. Durch die Verwendung organischer Säuren sowie durch intramolekularen Protonentransfer kommt es während des MALDI-Vorgangs zu einer Spaltung der säurelabilen Bindungen, insbesondere der Purinnukleotide. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit den Auswirkungen der chemischen Modifikation eines Oligonukleotides auf seine Stabilität unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS. Hierzu wurden die sich ergänzenden Konzepte der festphasengebunden chemischen und der enzymatischen Synthese modifizierter Nukleinsäuren verfolgt.

Da 7-Deazapurindesoxynukleosidtriphosphate im Handel erhältlich waren, wurde zunächst mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) versucht, den enzymatischen Zugang zu höhermolekularen Nukleinsäuren zu ermöglichen. Es konnten tatsächlich für eine Reihe von DNA-Polymerasen geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, um modifizierte doppelsträngige DNA mit mehr als 600 Basenpaaren darzustellen. Durch die Verwendung ³²P-markierter Primer wurde die Effizienz des Einbaus der modifizierten Nukleosidtriphosphate bei verschiedenen Primer-Template-Systemen und durch unterschiedliche Enzyme untersucht. Diese durch den Einbau modifizierter Purintriphosphate dargestellten Nukleinsäuren zeigten unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie bereits eine deutlich Steigerung der Nachweisempfindlichkeit und deutlich reduzierte Fragmentierung. Es gelang, die Signale der beiden Einzelstränge einer modifizierten 99-mer DNA aufzulösen und ihre Massen mit einer Genauigkeit von 0.1 % zuzuordnen. Für eine 103-mer Nukleinsäure wurde bei einer gegenüber dem unmodifizierteren PCR-Produkt verdreifachten Auflösung eine Massenauflösung von 0.01% erzielt.

Die Purinnukleoside der in der PCR verwendeten unmodifizierten Primer stellten weiter eine Quelle der Fragmentierung dar. Um diesen Nachteil zu überwinden, der sich v.a. bei kürzeren PCR-Produkten auswirkt, wurde zunächst der Ansatz der Einfügung einer chemischen Sollbruchstelle zwischen Primer und Verlängerungsprodukt durch den Einsatz von Primern, die ein basenlabiles Ribonukleotid enthielten, verfolgt.

Durch Einwirkung von NaOH gelang die Abspaltung des Primers aus dem PCR-Produkt und somit der Zugang zu vollständig purinmodifizierten DNA-Fragmenten.

Um modifizierte Nukleinsäuren beliebiger Sequenz und auch purinmodifizierte PCR-Primer synthetisieren zu können, beschäftigte sich der folgende Teil der Arbeit mit der chemischen Nukleosidsynthese. Als modifizierte Bausteine für die chemische Festphasensynthese wurden in konvergenter Totalsynthese die 7-deazapurinmodifizierten Amidite 4-(Benzoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)-(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin und 2-(2-Methylpropanoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl}pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on dargestellt. Hierbei wurden verschiedene in der Literatur vorgeschlagene Wege zur Darstellung von Desoxynukleosiden aus einem modifizierten Aglykon und unterschiedlichen Glykosyldonoren bezüglich ihrer Reaktionsausbeuten und der Stereoselektivität der Knüpfung der N-glykosidischen Bindung miteinander verglichen und weiter optimiert. Mit Hilfe der modifizierten Amidite wurden verschiedene homo- und heteropolymere Nukleinsäuren bis zu einer Länge von 100 Basenpaaren dargestellt. Derart modifizierte Oligonukleotide erwiesen sich als Primer in Kombination mit entsprechend modifizierten Nukleosidtriphosphaten zu etablierten enzymatischen Reaktionen als kompatibel und für die massenspektrometrische PCR-Analytik und DNA-Sequenzierung einsetzbar.

Die 7-Deaza-Modifikation führte zu deutlichen Vorteilen bei der massenspektrometrischen DNA-Analytik, indem Signalintensität, Auflösungsvermögen und Reproduzierbarkeit der aufgenommenen Spektren erheblich gesteigert wurden. So war es erstmals möglich, DNA-Einzelstränge mit einer Länge von bis zu 315 Basenpaaren und Multimere von Einzelsträngen bis zu einer Länge von 660 Basenpaaren zu detektieren. Die Kombination von Nukleobasen- und Zuckermofifikation bewirkte, daß synthetische Oligodesoxynukleotide, die sowohl 7-Deazapurinbasen als auch 2'-Fluorocytidin enthielten, unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie überhaupt nicht mehr fragmentierten. Die kombinierte Anwendung dieser unterschiedlichen Methoden der chemischen Modifikation von DNA kann in Zukunft zu einer weiteren Steigerung der Bedeutung der Massenspektrometrie in der DNA-Analytik führen.

V Summary

Mass spectrometry is a well established method to determine the molecular weights of organic compounds. Soft ionization procedures like Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) made labile biopolymers of high molecular weights for the first time accessible to mass spectrometric investigation. Unfortunately, the applicability of this highly versatile method is still limited, when measuring oligodeoxynucleic acids. Both the need to use organic acids as matrices as well as intramolecular proton transfer mechanisms that occur during the MALDI process result in a cleavage of the acid-labile N-glycosylic bonds, especially of those in purine nucleotides. Therefore, the effects of chemical modification of nucleic acids to their behaviour under the conditions of MALDI-TOF-MS were investigated. Different concepts were followed, employing solid phase and enzymatic synthesis of modified nucleic acids.

As N⁷-deazapurine modified nucleoside triphosphates were commercially available, it was first tried out to make use of the polymerase chain reaction (PCR) to get access to larger nucleic acids. Indeed, in this study conditions could be found for a series of different DNA-polymerases to synthesize modified double stranded nucleic acids up to 600 base pairs in length. ³²Phosphorous labelled primers were used to investigate the effectiveness of the incorporation of such modified purine nucleoside triphosphates when using different enzymes and primer-template-systems. Nucleic acids that were synthesized by the incorporation of N⁷-deazapurine modified nucleoside-triphosphates already showed increased signal sensitivity and drastically reduced fragmentation during the MALDI process. Due to the increased mass resolution it was possible to resolve the signals of the two single-strands of a double-stranded 99-mer nucleic acid and to assign their masses with an accuracy of 0.1 %. A 103-mer nucleic acid showed a threefold increase in mass resolution compared to the unmodified one. Its mass could be assigned with an accuracy of 0.01 %.

Since unmodified primers were employed during PCR, such nucleic acids still contained unmodified purinnucleotides that could provide for fragmentation during MALDI-MS. Especially for the investigation of short PCR products that consist to a high percentage of nucleotides originating from the primer sequences this disadvantage had to be overcome. One method was the introduction of a chemical cleavage site into the sequence in between primer and extension product. By the use of sodium hydroxide the primer sequences could be cleaved off the extension product resulting into a fully 7-deaza purine modified DNA fragment.

V. Summary

To get access to purine modified primers and to modified nucleic acids of any desired sequence another part of this work was on the chemical synthesis of nucleosides. As building blocks for the solid-phase synthesis of nucleic acids the 7-deazapurine modified amidites 4-(benzoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-deoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)-(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-*erythro*-pentofuranosyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine and 2-(2-methylpropanoylamino)-7-{5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-deoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-*erythro*-pentofuranosyl}pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-4(3*H*)-one were synthesized. Different literature methods to synthesize deoxynucleosides from a modified aglycone and different glycosyl donors were compared and further optimized with respect to their overall yield and the stereocontrol of the formation of the N-glycosylic bond. The modified amidites were used to synthesize homo- and heteropolymeric nucleic acids with a length of up to 100 base pairs. In combination with modified nucleoside triphosphates such modified nucleic acids proved to be compatible with established enzymatic DNA chemistry and could therefore be employed in mass spectrometric PCR analysis and DNA sequencing.

The 7-deaza modification technology facilitated great advantages in mass spectrometric DNA analysis by drastically increasing signal intensity, signal resolution and reproducibility of spectra acquired from such modified nucleic acids. For the first time single stranded nucleic acids of up to 315 base pairs in length and multimers of such with a length of up to 660 base pairs could be detected on a UV-MALDI-TOF mass spectrometer. A combination of base and sugar backbone modification was employed to chemically synthesize a nucleic acid that contained 7-deaza modified purine nucleotides and 2'-fluoro modified cytidine. This nucleic acid showed to be completely stable under the conditions of MALDI-TOF MS. The combination of different strategies of DNA modification might therefore be a way to further increase the importance of mass spectrometry to DNA analysis in the near future.

VI Diskussion und Ausblick

Betrachtet man die in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse zusammen mit den in Arbeiten anderer Autoren beschriebenen zahlreichen Anwendungen, stellt man fest, daß sich die MALDI-TOF Massenspektrometrie als eine schnelle, einfache und genaue Methode zur Detektion und Analytik auch von DNA bewährt hat und in zahlreichen Fällen bereits eine ernsthafte Alternative zur Gelelektrophorese darstellt²¹². So kann diese Methode zur Detektion von Ligationsprodukten aus der LCR (Ligasereaktion)²³⁰, zur Analyse von PCR-Produkten^{194,231,232}, zur Untersuchung von Terminationsprodukten aus Sanger-Sequenzierreaktionen^{233,234,235} oder Abbauprodukten aus enzymatischen Reaktionen^{236,237} eingesetzt werden. Durch die bei diesem Verfahren besonders schonende Ionisierung der Probe gelang es jüngst sogar Protein-DNA-Wechselwirkungen^{238,239} auf einfachste Art und Weise zu untersuchen.

Im Gegensatz zur Gelelektrophorese ist ein Markieren (z.B. durch Fluoreszenz oder Radioaktivität) oder ein Färben zur Detektion der Probe überflüssig. Während die Molekulargewichtsinformation, die aus der Gelelektrophorese gewonnen wird, in Wahrheit ein Wert ist, der nur mit der Mobilität der Probe in der Gelmatrix korreliert, gibt die Massenspektrometrie eine direkte Auskunft über die Masse der Probe bei gleichzeitig höherer Genauigkeit. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es durch einfache chemische Modifikationen möglich ist, die Fragmentierung von DNA unter den Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie zu unterbinden. Die Verwendung von N⁷-Deazapurintriphosphaten zur Synthese von modifizierten Nukleinsäuren stellt eine sehr einfache Methode dar, die Qualität der Spektren auch auf bereits vorhandenen MALDI-TOF Massenspektrometern erheblich zu verbessern. Gerade für den universellen Einsatz zur Analyse von DNA über einen großen Massenbereich erwies sich die UV-MALDI-TOF Massenspektrometrie als Methode der Wahl.

Neben den hier vorgestellten Modifikationen sind noch eine ganze Reihe weiterer denkbar. Eines der Haupterschwerisse bei der massenspektrometrischen Sequenzierung von DNA ist der äußerst geringe Massenunterschied zwischen einem A und einem T von weniger als 10 u. Ein Einsatz von massenmodifizierten Nukleotiden könnte dieses Problem lösen^{240,241}. In der Literatur wurde beschrieben, daß gerade N⁷-Deazapurine besonders leicht an C⁷ alkyliert werden können²⁴². Probleme könnte es bei der Akzeptanz so modifizierter Nukleosidtriphosphate als Substrate durch DNA-Polymerasen geben. Anstelle der N⁷-Deazamodifikation wäre auch ein Einsatz von Furo[3,2-d]pyrimidinnukleotiden²⁴³ oder N⁷-deaza-7-thienomodifizierten Purinnukleotiden²⁴⁴ denkbar.

Beide Modifikationen hätten den Vorteil, daß der für die Substraterkennung durch einige Enzyme benötigte Wasserstoffbrückenakzeptor im Pyrrolring des Purinnukleosides erhalten bliebe und derartig modifizierte Nucleosidtriphosphate und Nucleinsäuren eventuell noch universeller in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden könnten, als es bei der N⁷-Deazamodifikation der Fall ist. Die in dieser Arbeit beobachtete Stabilität von N⁷-Deazapurinen unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS bestätigten die in Kapitel II. diskutierte Vermutung, daß die Fragmentierung des Nucleotides durch Protonierung des N⁷-Atomes eingeleitet wird. Durch die geringeren basischen Eigenschaften von Sauerstoff und Schwefel im Vergleich zu Stickstoff, könnte also eine ähnliche stabilisierende Wirkung einer solchen Modifikation erhofft werden. Kombinatorische Ansätze der gerichteten Evolution²⁴⁵ könnten helfen, vorhandene Enzyme in ihrer Substratspezifität für die Verwendung modifizierter Nucleosidtriphosphate zu optimieren. Mit Hilfe moderner molekularbiologischer Techniken könnte man Enzymlibliotheken erzeugen, die in Kombination mit einem auf massenspektrometrischer Detektion beruhenden Assay die Identifizierung verbesserter Biokatalysatoren ermöglichen.

Da der systematische Einsatz von modifizierten Nucleinsäuren mit gewissen Kosten verbunden ist, sollte die Synthese solcher Nucleoside noch weiter optimiert werden. Als Hauptengpaß erwies sich die Glykosidierungsreaktion der modifizierten Base. In der Literatur finden sich bei der Synthese von Pyrimidinnucleosiden verschiedene vielversprechende Ansätze, die eventuell auch auf die Synthese von Purinnucleosiden übertragbar sind. So wurde die stereo-kontrollierte Synthese von β -D-2'-Desoxyribonucleotiden mit Hilfe intramolekularer Glykosidierung am Beispiel der Verbindungen Phenyl-2-desoxy-5-O-(2-pyrimidyl)- und 2-desoxy-5-O-(4-methoxy-2-pyrimidyl)-1-thio-D-ribofuranosid durch Aktivierung mit Dimethyl(methylthio)sulfoniumtetrafluoroborat vorgestellt²⁴⁶. Besonders hohe Ausbeuten wurden auch bei der Umsetzung von 2'-Desoxyribofuranosyl-N,N,N',N'-tetramethylphosphoramidaten²⁴⁷ beschrieben. Eine weitere Möglichkeit wäre sicherlich eine enzymatische Glykosidierungsreaktion in Anlehnung an die *in vivo* Purinbiosynthese. Auch ein Aufbau des Heterozyklus des Nucleosides am Zucker wurde kürzlich als weiterer Zugang zur Klasse der Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinnucleoside²⁴⁸ beschrieben.

Aufgrund des hohen präparativen Aufwandes bei der Synthese modifizierter Phosphoramidite, ist auch eine weitere Steigerung der Ausbeuten bei der chemischen Festphasensynthese von Oligonucleotiden erstrebenswert. Da Phosphoramidite relativ hydrolyseempfindlich sind, könnte eventuell eine *in situ* Phosphitylierung am DNA-Synthesizer zur Darstellung der reaktiven Spezies interessant sein.

Als kompatibel mit der automatisierten DNA-Synthese zeigte sich z.B. die Verwendung von 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamino-3-nitro-1,2,4-triazolylphosphinen²⁴⁹ als Phosphitylierungsreagenz in Anwesenheit eines tertiären Amines wie DIPEA.

Neben der UV-MALDI Massenspektrometrie gibt es noch weitere schonende Ionisierungsverfahren wie Electrospray-Ionization (ESI) und IR-MALDI, die beide insbesondere im Bereich hoher Molekülmassen Vorteile aufweisen. So konnten durch den Einsatz eines Infrarot-Lasers jüngst DNA-Proben bis etwa 500000 u detektiert werden²⁵⁰. Die Massengenauigkeit war mit 0.5 % allerdings nur für RNA bis zu einer Masse von etwa 400000 u diskutabel. IR-MALDI wurde daher von den Autoren zur Untersuchung von ribosomaler RNA als eine interessante Alternative zu UV-MALDI vorgeschlagen. Im Bereich niedriger Massen bis 50.000 u bleibt UV-MALDI aber aufgrund einer vielfach höheren Auflösung, insbesondere in Kombination mit der Delayed-Extraction-Technologie (DE) und dem in dieser Arbeit vorgestellten Einsatz der chemischen Modifikation deutlich überlegen. Auch aufgrund ihres erheblich höheren Preises dürften IR-Laser-MALDI-Kombinationen zumindest derzeit nur auf spezielle Anwendungen beschränkt bleiben. Interessant wäre die Untersuchung, welche Auswirkungen die in dieser Arbeit diskutierten chemischen Modifikationen von DNA in Kombination mit IR-MALDI haben, da auch hier sicherlich ähnliche Mechanismen zur Fragmentierung der DNA angenommen werden können. Es ist zu vermuten, daß sich so auch der Massenbereich dieser Methode noch deutlich steigern ließe.

Die ESI-Massenspektrometrie weist derzeit noch einige gravierende Nachteile im Vergleich zur MALDI-MS auf. Neben einer niedrigeren Auflösung im Bereich kleiner Massen ist der größte Nachteil das Auftreten einer großen Anzahl von mehrfach geladenen Sekundärionen, die die Anwendbarkeit dieser Methode für die Sequenzanalyse von Peptiden und Nukleinsäuren deutlich einschränkt²⁵¹. Jüngste Weiterentwicklungen der Technik ermöglichen eine verbesserte Auflösung im Bereich niedriger Massen durch Verwendung der Fourier-Transformation in Kombination mit Ionen-Zyklotronresonanz (ESI-FTICR-MS²⁵²). Ansätze zu einer besseren Kontrolle der Ladungszustands der ionisierten Probe²⁵³ könnten diese Methode in naher Zukunft auch für die DNA-Analytik interessanter werden lassen.

Aber auch bei der Technik der MALDI-TOF Massenspektrometrie gab es in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte in der Gerätetechnik. Eine deutliche Steigerung der Massenauflösung bringt die auch in dieser Arbeit bereits angewandte Methode der verzögerten Extraktion der Ionen nach Einwirkung des Laserimpulses (DE), insbesondere im niedrigen bis mittleren Massenbereich. Bei diesem Verfahren wird zudem das für die Auswertung der

Massenspektren von Oligonukleotidgemischen störende Auftreten von mehrfachgeladenen Ionen und Signale von Multimeren verringert. Einen noch erheblich größeren Zugewinn in der Auflösung verheißen noch in der Entwicklung befindliche Multi-Reflektor Massenspektrometer, auf denen durch verbesserte Ionen-Optiken für Insulin ($M = 5734 \text{ g/mol}$) in Einzelschußspektren bereits eine Massenauflösung von $31,000^{254}$ erzielt werden konnte.

Wie sich auch in dieser Arbeit herausstellte, spielt die Probenkonditionierung eine ganz erhebliche Rolle bei der Qualität der erhaltenen Massenspektren. Der Einsatz von Festphasentechniken erleichterte die Probenvorbereitung erheblich. Allerdings zeigte das hier verwendete Biotin-Streptavidin-System auch Schwächen. Bei der Analytik von längeren Oligonukleotiden ergaben sich Ausbeuteverluste, da in der Biotin-Streptavidin-Bindung eine Selektionierung zugunsten kürzerer Oligonukleotidsequenzen stattfindet. In der PCR-Analytik ist dieser Effekt nicht ganz so entscheidend, da durch den Einsatz der asymmetrischen PCR eine quantitative Umsetzung der kurzen Primersequenzen erreicht werden kann. Bei der Analyse der Produkte von Sequenzierungsreaktionen, bei der Probengemische von Oligonukleotiden verschiedener Längen untersucht werden, limitiert dieser Effekt aber die Leselänge zu größeren Massen hin. Auch zeigte sich das Streptavidin unter den Bedingungen der Freisetzung der immobilisierten DNA als nicht völlig stabil. Immer wieder wurden bei 12.900 u Signale des Proteins beobachtet, die sich zum einem im Massenspektrum negativ auswirken, falls die zu untersuchende DNA im selben Massenbereich liegt, zum anderen ist davon auszugehen, daß auf diesem Weg auch Ausbeuteverluste auftreten. Enzymatische Reaktionen mit an Streptavidin immobilisierten Oligonukleotiden sind nicht ohne Einschränkung möglich, da der Abstand der immobilisierten Nukleinsäure von der festen Phase für einige Reaktionen nicht ausreichend groß ist, so daß sterische Hinderungen auftreten. Dieser Effekt könnte durch die Verwendung längerer Linkermoleküle zwischen Biotin und DNA verringert werden. Weitere Fortschritte werden beim Übergang zu derivatisiertem Silizium als Träger-Phase erwartet, da dieses Material eine sehr gleichmäßige Oberfläche und nicht zuletzt auch im Proben-Handling ganz erhebliche Vorteile aufweist. Durch die Immobilisierung der DNA mit Hilfe von photolabilen Linkern, wäre es sogar möglich ein Oligonukleotid im Massenspektrometer direkt von der festen Phase zu desorbieren.

Erhebliche Fortschritte bei der Probenvorbereitung verspricht die zunehmende Entwicklung von Systemen, die hocheffiziente Chromatographieverfahren direkt mit dem Massenspektrometer koppeln. Insbesondere ESI bietet Vorteile in der on-line Kopplung mit Chromatographiesystemen an. Daher gehört z.B. die on-line Kopplung der Kapillarzonenlektrophorese mit ESI-MS inzwischen zu einer Routinemethode zur Qualitätskontrolle von Proteinen²⁵⁵.

Aber auch die Kopplung der MALDI-TOF Massenspektrometrie mit hochleistungsfähigen Chromatographiesystemen wird in jüngster Zeit verstärkt in der Literatur beschrieben. Hierdurch wird die Bedeutung der Methode auch in der Routine-Analytik in naher Zukunft noch stark zunehmen. So wurde jüngst neben einer off-line Kopplung der Kapillarelektrophorese (CE) mit MALDI zur klinischen Analyse²⁵⁶ auch eine on-line Kopplung²⁵⁷ dieser beiden Verfahren vorgestellt. Für spezielle Anwendungen wurde die Kopplung von ein- und mehrdimensionaler Gelelektrophorese mit MALDI entwickelt, die sich insbesondere durch eine extrem hohe Nachweisempfindlichkeit^{258,259} auszeichnet. Die geringe Automatisierbarkeit der Gelelektrophorese eliminiert bei dieser Kopplung zwar einen entscheidenden Vorteil der massenspektrometrischen Detektion, allerdings wird so das Spektrum der Einsatzmöglichkeiten der Methode für spezielle Fragestellungen der Forschung erweitert.

Große Bedeutung hat selbstverständlich auch die Art und Weise der Auftragung der Probe auf das Target des Massenspektrometers. Offensichtlich scheinen hydrophobe Oberflächen das Kristallisationsverhalten des Matrix-Analyt-Gemisches positiv zu beeinflussen. So wie ein positiver Effekt bei der Desorption von Tesafilm beobachtet wurde, beschreiben andere Autoren ähnlich günstige Auswirkungen bei der Verwendung von mit Teflon²⁶⁰ oder Parafilm²⁶¹ beschichteten Probentellern. Auch die Wahl des Lösungsmittel^{262,263,264} ebenso wie eine Kontrolle des Wassergehaltes des Lösungsmittels wird von verschiedenen Autoren diskutiert. Nicht zuletzt hat die Wahl der richtigen Matrix, mit der die Analytlösung kokristallisiert wird, entscheidenden Einfluß: So erlaubt die Wahl von 6-Aza-2-thiothymine (ATT) als Matrix die Verwendung von wäßrigen Lösungsmitteln. Dieses ermöglichte die On-Target Analyse von Glykokonjugaten durch Exoglykosidaseverdau²⁶⁵. Da allerdings bei dem äußerst polaren Molekül DNA die Kationenheterogenität eine erheblich größere Auswirkung auf die Spektrenqualität hat, wird es wohl nicht ohne weiteres möglich sein, enzymatische Reaktion auch mit Oligonukleotiden direkt auf dem Probenteller durchzuführen und ohne jede weitere Aufreinigung massenspektrometrisch zu analysieren. Alle bisher in der Literatur als Matrix vorgeschlagenen Substanzen wurden rein empirisch gefunden. Eine systematische Untersuchung des Kristallisationsvorganges könnte sicherlich die Suche nach noch besser geeigneten Substanzen erleichtern.

Einige der beim manuellen Proben-Handling festgestellten Probleme wie die in der Heterogenität des Analytkristalles bedingte Suche nach „good spots“, werden durch die Auftragung der Proben mit Hilfe von piezoelektrischen Pipetten²⁶⁶ im Nanolitermaßstab umgangen. Die Probenspots sind nun so klein sind, daß sie durch einen einzigen Laserschuß vollständig verdampft werden. Weitere Miniaturisierung durch den Einsatz der Nanotechnologie er-

möglichst es sogar Probenmengen im Pikoliterbereich zu handeln²⁶⁷. Besonders interessant wäre eine weitere Integration von Kapillar-Array-Elektrophorese²⁶⁸ und Miniatur-Durchfluß-PCR²⁶⁹. Hierdurch könnte der gesamte Prozeß der enzymatischen Reaktion, Probenkonditionierung und anschließenden Detektion auf einem einzigen Chip durchgeführt werden. Hierdurch ließen sich automatisierte Assays und durch parallele Probenverarbeitung (Multiplexen) Hochdurchsatzanalysen durchführen²⁷⁰. Die bei solchen Prozessen äußerst geringen Probenvolumina erfordern aber auch eine hohe Sensitivität der verwendeten Nachweisverfahren. Eine Erhöhung der massenspektrometrischen Nachweisempfindlichkeit könnte durch die chemische Modifikation von DNA erreicht werden. Die Kosten der Modifikation würden bei den äußerst geringen Mengen an Substanz, die bei solchen Verfahren benötigt würden, nur noch eine untergeordnete Rolle spielen.

Die einfache Probenvorbereitung, die hohe Geschwindigkeit des Messvorgangs und der daraus resultierende hohe Probendurchsatz und nicht zuletzt das hohe Automatisierungspotential zählen zu den entscheidenden Vorteilen der massenspektrometrischen DNA-Analytik. Insbesondere durch die Kombination mit speziell für die Massenspektrometrie optimierten enzymatischen Verfahren wie der DNA-Sequenzierung mit Hilfe von Endo- und Exonukleasen²⁷¹ oder des Primer-Oligo-Base-Extension-Assay (PROBE™) zur Analytik von Punktmutationen^{272,273,274} wird die Methodik für kommerzielle Anwendungen äußerst attraktiv. In jüngster Veröffentlichung konnte gezeigt werden, daß sich durch eine Kombination der MALDI-TOF Massenspektrometrie mit der DNA-Chip-Technologie²⁷⁵ die Möglichkeit eines enorm hohen Probendurchsatzes ergibt. Durch die Analyse von Single-Nucleotide-Polymorphismen^{276,277} (SNP) und Short-Tandem-Repeats (STR) mit MALDI-TOF MS²⁷⁸ erweist sich diese Methode als nützlich zur Lokalisierung, Identifizierung und zur Charakterisierung der Funktion spezifischer Gene. In der Zukunft könnte sich damit ein Einsatzpotential für die massenspektrometrische DNA-Analytik auf dem Gebiet der Pharmacogenomics ergeben, um den an die jeweilige genetische Situation eines Patienten maßgeschneiderten Einsatz von Arzneimitteln zu ermöglichen^{279,280,281}.

VII Experimenteller Teil

1 Geräte

1.1 Autoklav

Reaktionen, die einen Autoklav erforderten, wurden in einem 500 mL Hochdruck Laborautoklaven (Modell IV) der Carl Roth GmbH, Karlsruhe mit Heizung und Duranglaseinsatz durchgeführt.

1.2 DNA-Festphasensynthese

Die Chemische Synthese von Oligonukleotiden wurden an einem DNA-Synthesizer, Typ MilliGen 7500 der Firma Millipore sowie an einem DNA-Synthesizer, Typ Expedite 8909, der Firma Perseptive Biosystems unter Anwendung der Phosphoramiditchemie in Maßstäben zwischen 50 nmol und 1.0 μ mol durchgeführt.

1.3 FAB-Massenspektren

FAB-Massenspektren wurden an einem Gerät der Fa. Finnigan, Typ MAT 911A unter Verwendung der Matrix *metha*-Nitrobenzylalkohol aufgenommen.

1.4 Filmentwicklungsmaschine

Autoradiogramme wurden in einer Filmentwicklungsmaschine FPM-100A von Fuji Foto Film GmbH, Düsseldorf entwickelt.

1.5 Geldokumentation

Zur Aufnahme von Gelen oder zur Schnelldokumentation von Dünnschichtchromatogrammen wurde die DocuGel 1000 Station der MWG Biotech AG, Ebersberg verwendet.

1.6 Hochleistungsflüssigchromatographie

HPLC mit Umkehrphasen (RP-HPLC) wurde an einem Delta Prep 4000 Chromatographie-System der Firma Waters mit Hilfe einer Edelstahlsäule der Fa. Whatman (500 x 9.4 mm ID), die mit dem Trennmaterial PARTSIL 10 ODS2 M9 (10 μ m Korn) befüllt war, durchgeführt. Die Aufreinigung von Oligodesoxynukleotiden mit 5'-O-DMT-Schutzgruppe erfolgte mit einem Gradienten aus Eluent A (0.1 mol/L Triethylammoniumacetat-Puffer, pH 7.0, durch Verdünnung aus einer 1.0 mol/L Stammlösung (Merck, Darmstadt)) und Eluent B (Acetonitril) bei einem Durchfluss von 4 mL/min (5 min isokratisch, 5 bis 40 % B in 35 min, 20 min isokratisch mit 40 % B).

Anionenaustauschchromatographie erfolgte mit einem Laufmittel von 25 mmol/L Tris-HCl und 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) und einem Natriumchloridgradienten bis zu einer Konzentration von 1 mol/L NaCl auf einem SMART System auf einer Säule MonoQ PC 1.6/5 der Firma Pharmacia LKB Biotechnology. Zur anschließenden Probenentsalzung wurde die Fast Desalting Column PC 3.2/10 (Pharmacia) verwendet.

1.7 IR-Spektroskopie

Die Spektrenaufnahme erfolgte mit einem Gerät der Fa. Perkin-Elmer, Typ 399 in KBr oder auf NaCl.

1.8 MALDI-TOF-Massenspektren

wurden mit einem Vision 2000 Massenspektrometer der Fa. Finnigan MAT GmbH sowie an einem Biflex III und einem Reflex III der Fa. Bruker GmbH, i.d.R. im "positive ions reflector mode" mit ca. 20 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Die Massenkalisierung erfolgte bei allen Vision-Spektren extern auf einen 50-mer Oligodesoxynukleotidstandard. Messungen auf den Bruker Geräten wurden auf ein Gemisch aus Bombesin und Insulin kalibriert. Spektren auf Bruker-Geräten wurden im Reflektormodus mit einer um 500 ns verzögerten Ionenextraktion und mit einem Massen-Cut-off von 1000 bis 2000 g/mol aufgenommen. Als Matrix diente eine Lösung von 0.7 mol/L 3-Hydroxypikolinsäure und 0.07 mol/L Ammoniumcitrat in ACN/Wasser [1:1, v/v]).

1.9 NMR-Spektroskopie

^1H -NMR-Spektren (500 MHz) und ^{13}C -NMR-Spektren (126 MHz) wurden mit einem Spektrometer Typ DRX 500, ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) und ^{13}C -NMR-Spektren (101 MHz) mit einem Spektrometer Typ AMX 400 und ^1H -NMR-Spektren (250 MHz) und ^{13}C -NMR-Spektren (63 MHz) mit einem WM 250 der Firma Bruker aufgenommen. Die Spektren wurden nach der 1. Ordnung ausgewertet, wo erforderlich, mit Hilfe von zusätzlichen ^1H , ^1H bzw. ^1H , ^{13}C -COSY-Experimenten. Als interner Standard diente entweder 0.5 % Tetramethylsilan oder das Signal des nicht deuterierten Anteils des verwendeten Lösungsmittels. ^{31}P -NMR-Spektren wurden mit einem Varian Gemini 200 BB bei 80 MHz aufgenommen. Als externer Standard diente 85%ige Phosphorsäure in CD_3CN .

1.10 PCR

wurden mit einem Omni-Gene Hybaidcycler von MWG, Ebersberg und einem Cycler Modell 5330plus von Eppendorf, Hamburg in Reaktionsvolumina zwischen 20 und 100 μL durchgeführt.

1.11 pH-Meter

pH-Messungen erfolgten mit dem pH 537 der WTW GmbH, Weilheim mit der pH Elektrode InLab 410 von Mettler-Toledo, Gießen.

1.12 Schmelzpunkte

wurden mit einem Reichert Heitztischmikroskop ermittelt und sind unkorrigiert.

1.13 Szintillationsmessungen

wurden mit einem TRI-CARB 460 C Liquid Scintillation System der Firma Canberra Packard, Dreieich durchgeführt.

1.14 UV/VIS-Spektroskopie

Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem Biochrom LKB 4060 Photometer der Firma Pharmacia in Quarzglasküvetten mit 1 cm Schichtdicke.

2 Chemische Synthesen

2.1 Allgemeine Hinweise

2.1.1 Absoluierte Lösungsmittel

Diethylether	destilliert von Natrium/Benzophenon und über 0.4 nm Molsieb aufbewahrt
Essigsäure	durch Ausfrieren von 100% Eisessig, unter Inertgas aufbewahrt
Ethanol	von Natrium/Pthalsäurediethylester destilliert und über Molekularsieb 0.3 nm aufbewahrt
Ethylacetat	von P_4O_{10} dekantiert und über eine 40 cm Vigreuxkolonne destilliert
Methanol	destilliert von Mg und über Molekularsieb 0.3 nm aufbewahrt
Toluol	von CaH_2 destilliert und über Molekularsieb 0.4 nm aufbewahrt

Pyridin, Acetonitril, DMF, THF für die Synthese der geschützten Nukleoside sowie zur Phosphoamiditsynthese wurden von den Firmen Aldrich und Fluka mit einem Restwassergehalt von 10 ppm in kleinen, mit Septum verschlossenen Gebinden, über Molsieb gelagert, bezogen.

2.1.2 Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigfolie (Kieselgel 60 F₂₄₅, Fa. Merck) verfolgt. Proben aus Für RP-Dünnschichtchromatographien wurden Fertigplatten RP-18 F₂₄₅ (Fa. Merck) verwendet. Ansätzen, die Pyridin oder DMF enthielten, wurden dabei mit Diethylether vorentwickelt, um erst dann mit dem eigentlichen Laufmittelsystem entwickelt zu werden. Detektion erfolgte 1.) visuell unter UV-Licht, 2.) nach Abdampfen flüchtiger Komponenten (z.B. Pyridin) mit einem Fön nochmals unter UV-Licht zur Unterscheidung flüchtiger und nichtflüchtiger UV-aktiver Verbindungen, 3.) Nach Besprühen mit einem Sprühreagenz (4 mL *p*-Anisaldehyd, 2 mL konz. H₂SO₄ und 0.5 mL Eisessig in 80 mL EtOH) und anschließender thermischer Behandlung mit einem Heißluftfön:

- Orangefärbung DMT-haltiger Komponenten (bereits bei RT sichtbar),
- Blaufärbung nukleosidischer bzw. zuckerhaltiger Komponenten,
- Grünfärbung durch Überlagerung von a) und b) und
- dunkelrot- bzw. Purpurfärbung: z.B. schwerflüchtige Säureanhydride.

2.1.3 Säulenchromatographie

Präparative, chromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 (Korngröße 0.040 - 0,063 mm, Merck) mit 0.05 - 0.5 bar N₂-Überdruck (Flash-Chromatographie). Für die Trennung von 7-Deaza-2'-Desoxyguanosin wurde auf Grund dessen hoher Polarität das Harz XAD 4 (Fa. Serva) als RP-Phase verwendet. Vor dem Packen der Säule wurde dieses Material über Nacht in Wasser Quellen gelassen und mehrmals mit Milli-Q Wasser gewaschen.

2.1.4 Laufmittelsysteme(LS) für die Dünnschicht- und Säulenchromatographie

A: 0.25 mol/L LiCl in Wasser, B: DCM/MeOH, 85:15, C: Chloroform/MeOH, 95:5, D: Diethylether, E: Toluol/EE, 70:30, F: DCM, G: DCM/EE, 95:5, H: Cyclohexan/EE, 3:2, I: Toluol/Aceton, 90:10, J: Chloroform/MeOH, 90:10, K: Chloroform/MeOH, 80:20, L: DCM/MeOH, 80:20, M: EE, N: EE/DCM/Triethylamin, 45:45:1, O: DCM/MeOH, 90:10, P: PE₅₀₋₆₀/EE, 6:4, Q: DCM/MeOH, 98:2, R: Wasser/MeOH, 6:4, S: PE₅₀₋₆₀/EE 7:3, T: PE₅₀₋₆₀/EE 8:2

Um reproduzierbare R_F-Werte zu erhalten, wurden die Laufmittelsysteme zur Ermittlung der hier angegebenen Werte stets frisch angesetzt.

2.2 Synthese von 2-Amino-3,7-dihydropyrrolo [2,3-d]pyrimidin-4-on (4)

2.2.1 2-Cyan-4,4-diethoxybuttersäure-ethylester (1)

Bromacetaldehyddiethylacetal (51 mL, 330 mmol), Cyanessigsäureethylester (175 mL, 1.6 mol), Kaliumcarbonat (wasserfrei, 45.5 g) und Natriumiodid (wasserfrei, 3.25 g) wurden bei etwa 145-150 °C solange unter Rückfluß gekocht, bis die heftige Reaktion (Freisetzung von CO₂) beendet war (ca. 3.5 h). Anschließend wurde weitere vier Stunden bei 140 - 145 °C gehalten. Nach Abkühlen wurden etwa 300 mL Wasser zu dem Reaktionsgemisch gegeben und dreimal mit insgesamt 300 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Abdestillieren des Lösungsmittels über eine 25 cm Vigreux-Kolonnen fraktioniert. 33.0 g des farblosen Esters (1) traten bei einem Druck von 10 Torr bei 125 °C über, Ausbeute: (38 - 48 % d. Th., Lit.: 46% d. Th., bezogen auf Bromacetaldehyddiethylacetal²⁸²).

M = 229.13g/mol, C₁₁H₁₉NO₄

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.15 (t, 3 H, Acetal-CH₃), 1.30 (t, 3 H, Ester-CH₃), 2.15 - 2.31 (m, 2 H, CH₂), 3.49 - 3.59 (m, 2 H, Acetal-CH₂), 3.64 - 3.74 (m, 3 H, Acetal-CH₂ + 2-H), 4.26 (q, 2 H, Ester-CH₂), 4.69 (t, 1 H, 4-H) ppm

³J_{Acetal CH₂, CH₃} = 7.1, ³J_{Ester CH₂, CH₃} = 7.1, ³J_{4-H, 3-CH₂} = 5.1 Hz

^{13}C -NMR (101MHz, CDCl_3): $\delta = 13.99$ (Ester- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 15.22 und 15.24 (2 Acetal- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 33.62 ($\underline{\text{C}}\text{H}$), 33.73 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 62.65 und 62.66 (2 Acetal- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 62.80 (Ester- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 100.06 (Acetal- $\underline{\text{C}}$), 116.40 ($\underline{\text{C}}\text{N}$), 165.95 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm

Brechungsindex: $n_D^{20} = 1.4300$

2.2.2 2,6-Diamino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidin-4-ol (**2**)

8.5 g (89 mmol) Guanidin-hydrochlorid (wasserfrei), gelöst in 175 mL abs. Ethanol, wurden mit insgesamt 175 mL ethanolischer 1 mol/L Natriumethylat-Lösung portionsweise versetzt. In die Lösung wurden 20.4 g (89 mmol) 2-Cyan-4,4-diethoxybuttersäure-ethylester (**1**) eingetragen. Man ließ vier Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß unter Rückfluß kochen, dampfte das Lösungsmittel anschließend ab und löste den schaumigen Rückstand in 140 mL Wasser. Nach Versetzen mit fünf mL (89 mmol) Eisessig kristallisierte das Reaktionsprodukt aus. Es wurde abfiltriert und anschließend am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 10.5 g gelbliche Spieße (**3**) nach Umkristallisation aus abs. Ethanol, Ausbeute: 45 - 50 % d. Th.

$M = 242.14 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$

MS (FAB): $m/z = 245.8$ ($(\text{M}+3\text{H})^+$, 75 %), 507.6 ($(\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4+\text{Matrix})^+$, 20 %), 267.2 ($(\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5)^+$, 100 %), 215.2 ($(\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4)^+$, 25 %) u

^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 1.08$ (t, 6 H, Acetal- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 2.43 (d, 2 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.34 - 3.43 (m, 2 H, Acetal- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.48 - 3.57 (m, 2 H, Acetal- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 4.43 (t, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}$), 5.55 und 6.03 (s, 4 H, 2 x $\underline{\text{N}}\text{H}_2$), 9.92 (s, 1 H, $\underline{\text{O}}\text{H}$, breit) ppm. $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 5.6$, $^3J_{\text{OCH}_2,\text{CH}_3} = 7.1$ Hz

^{13}C -NMR (61 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 15.25$ (2 Acetal- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 28.57 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 61.30 (2 Acetal- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 83.31 ($\underline{\text{C}}-5$), 102.85 ($\underline{\text{C}}\text{H}$), 153.29 ($\underline{\text{C}}-6$), 162.70 ($\underline{\text{C}}-2$), 162.77 ($\underline{\text{C}}-4$) ppm

DC(LS A): $R_F = 0.36$, Schmelzpunkt: $T_{\text{mp}} = 186$ °C (Lit. 187 bis 189 °C¹⁰⁷)

2.2.3 2-Amino-3,7-dihydropyrrolo [2,3-d]pyrimidin-4-on (**4**)

10.5 g (42 mmol) 2,6-Diamino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidin-4-ol (**2**) wurden in 160 mL 0.2 mol/L HCl gelöst und drei Stunden bei RT aufbewahrt. Unlösliches Material wurde abfiltriert und das Reaktionsprodukt aus dem Filtrat nach Neutralisation mit NH_3 (zu erkennen am Umschlag der Farbe der Lösung von strohgelb nach fleischfarben) auskristallisiert. Man erhielt nach Trocknen am Hochvakuum blass rosafarbene Nadeln (**4**), die bis 300 °C nicht schmolzen. Ausbeute: 5.22 g (35 mmol, 83 % d.Th., Lit.: 80 % d.Th.¹⁰⁷)

$M = 150.05 \text{ g/mol}$, $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}$

MS (EI, 70 V): $m/z = 150$ (M^+ , 100 %), 135 ($(M-NH)^+$, 7 %), 134 ($(M-NH_2)^+$, 8 %), 133 ($(M-OH)^+$, 25 %), 109 ($(M-H_2C_2NH)^+$, 10 %), 108 ($(M-CH_2N_2)^+$, 25 %), 80 ($C_4H_4N_2^+$, 25 %), 69 ($C_2HN_2^+$, 18 %), 57 ($CH_3N_3^+$, 25 %) u

1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 6.01$ (s, 2 H, NH_2), 6.18 (dd \approx m, 1 H, 5- H), 6.60 (dd \approx m, 1 H, 6- H), 10.19 und 10.94 (s, 2 H, 2 x NH) ppm

^{13}C -NMR (101 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 99.79$ (4a- C), 101.47 (5- CH), 116.49 (6- CH), 151.05 (7a- C), 152.1 (2- C), 158.76 (4- C) ppm

DC (LS A): $R_F = 0.75$

2.3 Synthese von 3,7-Dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (6)

2.3.1 6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)-2-mercaptopyrimidin-4-ol (3)

2.3 g (100 mmol) Natrium wurden in 160 mL abs. EtOH eingetragen und die Lösung mit 7.5 g (100 mmol) Thioharnstoff und 20.4 g (89 mmol) 2-Cyan-4,4-diethoxy-buttersäure-ethylester (**1**) versetzt. Danach wurde 3 h unter Rückfluß gekocht, abgedampft, in wenig Wasser aufgenommen und das Reaktionsprodukt durch Zusatz von 4.6 g Eisessig auskristallisiert. Nach Umkristallisation des gelblichen Rohproduktes aus EtOH erhielt man farblose Plättchen (**3**), die bis 310 °C nicht schmolzen. Ausbeute: 16.1 g (70 % d. Th., Lit.: 62 % d. Th.¹⁰⁸)

$M = 260.11$ g/mol, $C_{10}H_{18}N_3O_3S$

MS (FAB): $m/z = 262.5$ ($(M+2H)^+$, 40 %), 245.8 ($(M-NH)^+$, 5 %), 232.7 ($(M-C_2H_2)^+$, 5 %), 216.2 ($(M-OC_2H_5)^+$, 100 %) u

1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 1.24$ (t, 6 H, 2 Acetal- CH_3), 2.61 (d, 2 H, CH_2), 3.34 - 3.43 (q \approx m, 2 H, OCH_2), 3.48 - 3.57 (q \approx m, 2 H, OCH_2), 4.67 (t, 1 H, CH), 6.22 (s, 2 H, NH_2 , breit), 11.87 (s, breit, 1 H, SH) ppm $^3J_{Acetal\ CH_2,CH_3} = 3.6$, $^3J_{CH_2,CH} = 5.6$ Hz

^{13}C -NMR (101 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 15.24$ (2 Acetal- CH_3), 27.91 (CH_2), 61.63 (2 Acetal- CH_2), 85.67 ($C-5$), 101.76 (CH), 152.07 (6- C), 161.76 (4- C), 172.86 (2- C) ppm

DC (LS A): $R_F = 0.43$

2.3.2 3,7-Dihydro-2-mercaptopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (5)

15.5 g 6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)-2-mercaptopyrimidin-4-ol (**3**, 60 mmol) wurden in 750 mL 0.2 mol/L wäßriger HCl suspendiert und über Nacht bei RT gerührt. Man saugte ab und erhielt nach Trocknen farblose Nadeln (**5**), die bis 310 °C nicht schmolzen. Eine weitere Aufreinigung, etwa durch Umkristallisation, war nicht erforderlich. Ausbeute: 8.86 g (90 % d.Th., Lit.: 94 % d.Th.¹⁰⁸)

M = 167.02 g/mol, C₆H₅N₃OS

MS (EI, 70 V): m/z = 167 (M⁺, 100 %), 151 ((M-NH)⁺, 6 %), 139, ((M-CO)⁺, 10 %), 134 ((M-HS)⁺, 24 %), 109 ((M-H₃CNS)⁺, 50 %), 80 (C₃N₂NH₂⁺, 40 %), 79 (C₄HNNH⁺, 14 %), 53 (NC₂NH⁺, 36 %) u

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 6.33 (ddd≈dd, 1 H, 5-H), 6.72 (dd≈t, 1 H, 6-H), 11.22 (s, 1 H, OH), 11.82 (s, 1 H, SH), 13.15 (s, 1 H, NH) ppm; ³J_{5,6} = 3, ³J_{5,NH} = 2, ⁴J_{5,NH} = 2 Hz

¹³C-NMR (101 MHz, d₆-DMSO): δ = 102.23 (4a-C), 102.85 (5-CH), 118.25 (6-CH), 138.26 (7a-C), 157.62 (4-C), 171.74 (2-C) ppm

DC (LS A): R_F = 0.84

2.3.3 3,7-Dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (**6**)

2.0 g 3,7-Dihydro-2-mercapto-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (14 mmol, **5**) wurden in 250 mL Wasser mit ca. zehn mL Raney-Nickel (Fa. Merck, aktiviert für Hydrierungen, 50 % susp. in Wasser) und 16 mL konz. Ammoniak versetzt und drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Man filtrierte den Katalysator **heiß** ab, dampfte ein und kristallisierte aus Wasser um¹⁰⁸. Blaß rosafarbene Nadeln 1.09 g (Ausbeute: 69 % d.Th.), die sich bei etwa 345 °C zersetzen.

M = 135.04 g/mol, C₆H₅N₃O

MS (EI, 70 V): m/z = 135 (M⁺, 100 %), 119 ((M-NH₂)⁺, 6 %), 108 ((M-CO)⁺, 10 %), 93 ((M-NCO)⁺, 10 %), 80 (C₄HNNH⁺, 22 %), 77 (C₄HN₂⁺, 2 %) u

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 6.42 (dd, 1H, 5-H), 7.03 (pseudo-t, 1H, 6-H), 7.84 (s, 1 H, 2-H), 11.76 und 11.84 (s, 2 H, 2 Ring-NH, breit) ppm. ³J_{5,6} = 3, ⁴J_{5,OH} = 2, ³J_{6,NH} = 2 Hz

¹³C-NMR (101 MHz, d₆-DMSO): δ = 101.88 (5-CH), 107.57 (4a-C), 120.22 (6-CH), 143.01 (2-CH), 147.98 (7a-C), 158.36 (4-C) ppm

DC (LS A): R_F = 0.68

2.4 Synthese der Aglyconvorstufen

2.4.1 2-Amino-4-chlor-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**8**)

Methode A: 3.72 g (25 mmol) 2-Amino-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (**4**) wurden in 37 mL wasserfreiem Acetonitril mit 3.0 g (13 mmol) TEBA, 13.4 mL (0.11 mol) *N,N*-Dimethylanilin (frisch destilliert) und 22 mL (0.25 mol) Phosphorylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde unter Rückfluß gekocht bis die Lösung klar wurde. Nach Abkühlen wurde mit 200 mL Eiswasser hydrolysiert, eine weitere Stunde rühren gelassen und dann unter Eiskühlung das Reaktionsgemisch mit konz. NH₃ auf pH = 4 ge-

VII. Experimenteller Teil

bracht. Das Präzipitat wurde abgesaugt, getrocknet und aus viel Toluol umkristallisiert. Man erhielt schwach gelbliche Nadeln (**8**), Ausbeute: 2.33 g (76 % d.Th.).

DC (LS C): $R_F=0.40$, Schmelzpunkt: 214-218°C (Lit.: 216-218°C¹¹⁰).

Die spektroskopischen Daten waren identisch mit denen der nach Methode B erhaltenen Verbindung.

Methode B: 10.0 g (66 mmol) 2-Amino-3,7-dihydro-4*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on (**4**) wurden mit zwei mL *N,N*-Dimethylanilin (frisch destilliert) und 100 mL POCl₃ versetzt und zwei Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde überschüssiges POCl₃ weitgehend im Vakuum entfernt und der sirupartige Rückstand sehr langsam auf 200 g Eis getropft. Anschließend wurde die gelbe Suspension kurz erhitzt und nach Abkühlen auf RT ungelöstes Material abfiltriert. Das Filtrat wurde mit konz. NH₃ auf pH = 4 und das Reaktionsprodukt im Laufe von etwa zwölf Stunden zur Kristallisation gebracht. Nach Filtration, Waschen mit Wasser und Trocknung am Ölpumpenvakuum erhielt man gelbliche Kristalle (**8**), die aus Toluol umkristallisiert wurden. Ausbeute: 5.8 g (70 % d.Th.).

M = 168.02 g/mol, C₆H₅ClN₄

MS (EI, 70 V): $m/z = 168$ (M⁺, 100 %), 134, ((M-Cl)⁺, 4 %), 133 ((M-HCl)⁺, 70 %), 106 ((M-HCl-CN)⁺, 44 %), 92 ((M-Cl-C₂H₂NH)⁺, 4 %), 76 (C₄N₂⁺, 6 %), 64 (C₄H₂N⁺, 8 %) u

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): $\delta = 6.25$ (dd, 1 H, 5-H), 6.46 (s, 2 H, NH₂), 7.08 (dd, 1 H, 6-H), 11.45 (s, 1 H, Ring-NH) ppm. ³J_{5,6} = 3.7, ³J_{6,NH} = 2.2 Hz

¹³C-NMR (63 MHz, d₆-DMSO): $\delta = 98.56$ (5-CH), 108.52 (4a-C), 123.05 (6-CH), 150.81 (4-C), 154.50 (7a-C), 159.23 (2-C) ppm

DC (LS C): $R_F = 0.40$

2.4.2 4-Chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**7**)

Die Lösung von 3.8 g (29 mmol) 3,7-Dihydropyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on (**6**) in 60 mL POCl₃ (frisch destilliert) und 5.2 mL *N,N*-Dimethylanilin (frisch destilliert) wurde 45 min unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig in 0.4 L Eiswasser gegossen, 1 h bei RT rühren gelassen und, nachdem man mit konz. NH₃ unter Eiskühlung auf pH = 4 gebracht hat, mit DCM extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Einengen des Lösungsmittels kristallisierte **7** in farblosen Nadeln. Ausbeute: 2.27 g (52 % d.Th., Lit.: 71 % d.Th.²⁸³)

M = 153.01 g/mol, C₆H₄N₃Cl

MS (EI, 70 V): $m/z = 153$ (M^+ , 100 %), 118 ($(M-Cl)^+$, 90 %), 91 ($(M-Cl-HCN)^+$, 22 %), 77 ($C_4HN_2^+$, 6 %), 64 (C_4N^+ , 38 %) u

1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 6.59$ (d, 1 H, 5-H), 7.68 (d, 1 H, 6-H), 8.57 (s, 1 H, 2-H), 12.6 (s, 1 H, NH, breit) ppm. $^3J_{5,6} = 3.6$ Hz

^{13}C -NMR (101 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 99.64$ (5-CH), 117.42 (4a-C), 129.24 (6-CH), 151.14 (2-C), 151.31 (7a-C), 152.65 (4-C) ppm

DC (LS E): $R_F = 0.22$

2.5 Synthese von Donoren für Glykosidierungsreaktionen

2.5.1 1-Chloro-2-desoxy-3,5-di-O-(*para*-toluoyl)- α -D-erythro-pentofuranose (**12**)

2.5.1.1 1-O-Methyl-2-desoxy-D-erythro-pentofuranose (**10**)

9.3 g (69 mmol) 2'-Desoxy-D-ribose (**9**) wurden in 265 mL abs. MeOH gelöst und nach Zugabe einer katalytischen Menge Acetylchlorid (etwa 2 mL) wurde 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von wenig $KHCO_3$ neutralisiert und die Lösung filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei $T \leq 40^\circ C$ abdestilliert und der erhaltene Sirup mehrmals mit kleinen Mengen Pyridin koevaporiert, um Reste von MeOH und Wasser zu entfernen. Es entstand ein Gemisch der beiden Anomeren von **10**, wobei das DC noch leichte Verunreinigung durch Edukt und verschiedene Stellungsisomere zeigte. Der Grad der Verunreinigung war jedoch so gering (unter 10 %), daß das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung für die nächste Reaktion eingesetzt werden konnte. Ausbeute: 10 g (98 % d.Th., Lit.: 72 % d.Th.²⁸⁴)

$M = 148.07$ g/mol, $C_6H_{12}O_4$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.72$ (ddd, 1 H, 2'-H_b(α)), 2.05(ddd \approx m, 1 H, 2'-H_b(β)), 2.15 (ddd \approx m, 1 H, 2'-H_a(β)) 2.35 (ddd \approx m, 1 H, 2'-H_a(α)), 3.29 und 3.31 (2 s, 6 H, 2 OCH₃($\alpha+\beta$)), 3.40-3.61 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.78 (m, 1 H, 4'-H), 4.02 (m, 1 H, 3'-H(α)), 4.19 (m, 1 H, 3'-H(β)), 4.98 (dd, 1 H, 1'-H(α)), 5.06 (dd, 1 H, 1'-H(β)) ppm

α -Anomer: $^3J_{1',2'b} = 2.4$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 5.7$ Hz, $^3J_{2'a,3'} = 8.1$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 4.6$, $^2J_{2'a,2'b} = 13.5$ Hz

β -Anomer: $^3J_{1',2'b} = 2.6$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 5.2$ Hz, $^3J_{2'a,3'} = 6.6$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 4.1$, $^2J_{2'a,2'b} = 13.3$ Hz

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 41.50, 42.34$ (2'-CH₂($\alpha+\beta$)), 54.95, 55.43 (OCH₃($\alpha+\beta$)), 63.00, 63.58 (5'-CH₂($\alpha+\beta$)), 71.96, 72.70 (3'-CH($\alpha+\beta$)), 87.22, 87.37 (4'-CH($\alpha+\beta$)), 105.48, 105.55 (1'-CH($\alpha+\beta$)) ppm

DC (LS B): $R_F = 0.55$

2.5.1.2 1-O-Methyl-2-desoxy-3,5-di-O-(*para*-toluoyl)-D-*erythro*-pentofuranose (**11**)
 10 g (76 mmol) des Rohproduktes von 1-O-Methyl-2-desoxy-D-*erythro*-pentofuranose (**10**)
 wurden in 90 mL abs. Pyridin gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf 4 °C wurden 24 mL (179
 mmol) *p*-Toluoylchlorid (frisch destilliert) langsam hinzu getropft, so daß die Temperatur 40
 °C nicht überschritt. Die Lösung wurde nun

- über Nacht bei Raumtemperatur oder
- zwei Stunden bei 40-50 °C unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von etwa 90 mL Wasser beendet und das
 ölige Produkt mit insgesamt 250 mL Ether extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit
 Wasser, danach mit verdünnter Schwefelsäure pyridinfrei und anschließend mit einer gesättig-
 ten, wäßrigen NaHCO₃-Lösung säurefrei gewaschen. Nach Trocknen über NaHSO₄ wurde das
 Lösungsmittel abdestilliert, und man erhielt nach weiterem Trocknen im Hochvakuum ein
 Anomerengemisch von (**11**) als gelbes Wachs, das nach mehreren Wochen Stehen langsam
 kristallisierte. Der Kristallisationsprozeß setzte in der Regel bei Ansätzen mit Rühren über
 Nacht wesentlich schneller ein. Ausbeute: 26.6 g (92 % d. Th. des Sirup, Lit. 70 % d. Th. nach
 Kristallisation¹¹³)

M = 384.16 g/mol, C₂₂H₂₄O₆

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.3 (s, 6 H, 2 CH₃), 2.46 (m, 4 H, 2'-H_{a+b, α+β}), 3.3 und 3.4
 (2 s, 6 H, 2 OCH₃), 4.45 (m, 3 H, 4'-H + 5'-H_{a+b}), 5.13 (m, 1 H, 3'-H), 5.34 (m, 1 H, 1'-H_β),
 5.52 (m, 1 H, 1'-H_α), 7.16 (m, 4 H, 3+5-H-Ar), 7.86 (m, 4 H, 2+6-H-Ar) ppm

¹³C-NMR (63 MHz, d₆-DMSO): δ = 21.09, 21.25 (CH₃), 38.37, 38.44 (2'-CH₂ α+β), 54.44,
 54.51 (OCH₃ α+β), 64.14, 64.67 (5'-CH₂ α+β), 74.5, 75.05 (3'-CH α+β), 80.56, 81.00 (4'-CH α+β),
 104.56, 104.95 (1'-CH α+β), 126.46, 126.59 (4-Ar-C), 129.02, 129.16, 129.19, 129.24, 129.26,
 129.33, 129.81, 130.41 (2,3,5,6-Ar-CH), 143.64, 143.77 (1-Ar-C), 165.40, 165.52 (C=O) ppm
 DC (LS D): R_F = 0.7 bzw. 0.79 (2 Anomere)

2.5.1.3 1-Chloro-2-desoxy-3,5-di-O-(*para*-toluoyl)-α-D-*erythro*-pentofuranose (**12**)
 11 g (28.6 mmol) 1-O-Methyl-2-desoxy-3,5-di-O-(*p*-toluoyl)-D-*erythro*-pentofuranose (**11**)
 wurden in möglichst wenig abs. Diethylether gelöst und zu 20 mL einer bei 10 °C mit HCl-
 Gas gesättigten Lösung von abs. Eisessig getropft. Es wurde weiter ein kräftiger HCl-Strom
 bei fortgesetzter Eiskühlung durch das Reaktionsgemisch geleitet, das nach 10 bis 20 min zu
 einem Kristallbrei erstarrte. HCl wurde für weitere fünf min eingeleitet und das Reaktions-

VII. Experimenteller Teil

gemischt anschließend filtriert, gründlich mit eiskaltem abs. Diethylether gewaschen und nach Abdestillieren des Lösungsmittels das Rohprodukt am Hochvakuum getrocknet und unter Argon bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Da aber selbst bei diesen Bedingungen eine langsame und in Lösung oder an Luft eine sehr schnelle Zersetzung des Produktes zu beobachten war, empfiehlt es sich, nur kleine Mengen, die sofort umgesetzt werden, frisch herzustellen. Durch Umkristallisation aus abs. Tetrachlorkohlenstoff oder abs. Toluol konnten Proben für die Bestimmung der physikalisch-chemischen Daten erhalten werden²⁸⁵. Ausbeute: 4.5 - 5.5 g (40 - 49 %, Lit.: 70 %¹¹³).

$M = 388.11\text{ g/mol}$, $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{Cl}$

MS (EI, 70V): $m/z = 353$ ((M-HCl)⁺, 95 %), 216 ((M-HCl-2 x TolOH)⁺), 136 ($\text{H}_3\text{CC}_5\text{H}_4\text{-COOH}^+$, 82 %), 120 ($\text{CH}_3\text{C}_5\text{H}_4\text{COH}^+$, 74 %), 91 ($\text{H}_5\text{C}_6\text{CH}_2^+$, 96 %), 81 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{O}^+$, 100 %), 65 (C_6H_5^+ , 78 %) u

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.33$ und 2.34 (s, 6 H, 2 CH_3), 2.70 (2 ddd \approx m, 2 H, 2' - $\text{H}_{\text{a+b}}$), 4.55 (2 dd \approx m, 2 H, 5' - $\text{H}_{\text{a+b}}$), 4.78 (ddd \approx q, 1 H, 4' - H), 5.47 (ddd \approx m, 1 H, 3' - H), 6.4 (dd \approx d, 1 H, 1' - H), 7.18 (m, 4 H, 3+5- H-Ar), 7.86 (m, 4 H, 2+6- H-Ar) ppm, $^3\text{J}_{1',2'a} = 4.8\text{ Hz}$

IR (KBr, cm^{-1}): 3071 + 3036, Aryl-C-H, v, w; 2951 + 2920, CH_2 , v, s; 1720 + 1707, C=O, v, s; 1611, 1578 und 1510, C=C (Ar), v, m; 1275 + 1208, v, s; 754, Cl, $\nu_{\text{as,s}}$; 658, ν_{s} , m

Elementaranalyse: Berechnet: C 64.87 %, H 5.44 %, gefunden: C 65.28 %, 65.45 %, H 5.31 %, 5.35 %

Schmelzpunkt.: $T_{\text{mp}} = 108\text{-}109\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zersetzung, Lit.: $109\text{ }^{\circ}\text{C}$)

2.5.2 1-Bromo-2,3,5-tris-O-benzyl- α -D-ribofuranose (**21**)

2.5.2.1 1-O-Methyl-D-ribofuranose (**17**)

5 g (30 mmol) Ribose wurden in 100 mL abs. MeOH gelöst und nach Abkühlen auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 0.5 mL konz. H_2SO_4 angesäuert und über Nacht unter Luftausschluß mit etwas Molsieb 3 Å bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit K_2CO_3 neutralisiert, das Lösungsmittel abdestilliert, noch mehrmals mit Aceton kodestilliert und das Produkt aus Essigester zur Kristallisation gebracht. Man erhielt 3.8 g (23 mmol) farblose Kristalle (69 % d.Th.)²⁸⁶.

$M = 164.07\text{ g/mol}$, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 3.37$ (s, 6 H, 2 OCH_3), 3.57, 3.66 (m, 2 H, 5' - $\text{H}_{\text{a+b}}$), 3.84 - 3.92 (m, 2 H, 4' - $\text{H}+2'$ - H), 3.93-4.00 (m, 1 H, 3' - H), 4.73 (d, 1 H, OH), 4.77 (dd, 1 H, OH), 4.92 (d, 1 H, 1' - H), 5.12 (d, 1 H, 1' - H) ppm

$${}^3J_{1',2'} = 6.6 \text{ Hz}, {}^3J_{2',3'} = 11.4 \text{ Hz}, {}^3J_{3',4'} = 1.04 \text{ Hz}$$

${}^{13}\text{C}$ -NMR (D_6 -DMSO, 101 MHz): 54.60 (OCH_3), 63.53 ($5' \text{-CH}_2$), 71.3 ($3' \text{-CH}$), 74.59 ($4' \text{-CH}$), 83.96 ($2' \text{-CH}$), 108.42 ($1' \text{-CH}$) ppm

2.5.2.2 1-O-Methyl-2,3,5-tris-O-benzyl-D-ribofuranose (**18**)

40 g (0.24 mol) 1-O-Methylribose wurden in 350 mL abs. THF gelöst, mit 100 g gepulvertem KOH (wasserfrei) und 250 mL Benzylchlorid versetzt und 24 h Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei sich die zunächst bildende gummiartige Masse nach ca. einer Stunde Reaktionszeit zu lösen begann und das Reaktionsgemisch dann leicht gerührt werden konnte. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung filtriert und das Filtrat mehrere male mit THF gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte ergaben nach Einengen am Hochvakuum 89 g (205 mmol) eines honigfarbenen Sirup. Ausbeute: 85 % d.Th.²⁸⁸

$$M = 434.21 \text{ g/mol}, \text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_5$$

${}^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 3.42$ (s, 6 H, 2 OCH_3), 3.55 - 3.78 (m, 2 H, $5' \text{-H}_{a+b}$), 4.09 - 4.20 (m, 2 H, $4' \text{-H} + 2' \text{-H}$), 4.3 (m, 1 H, $3' \text{-H}$), 4.65 - 4.86 (m, 6 H, OCH_2), 5.2 (s, 1H, $1' \text{-H}$), 7.46 - 7.56 (m, 15 H, Ar-H) ppm

${}^{13}\text{C}$ -NMR (d_6 -DMSO, 101 MHz): $\delta = 54.7$ (OCH_3), 71.7 ($5' \text{-CH}_2$), 78.5 ($3' \text{-CH}$), 79.6 ($4' \text{-CH}$), 80.3 ($2' \text{-CH}$), 106.1 ($1' \text{-CH}$), 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.57, 128.64 (15 C, Ar-CH), 138.4, 138.5, 138.7 (3 C, 1-Ar-C) ppm

2.5.2.3 2,3,5-Tris-O-benzyl-D-ribofuranose (**19**)

4.46 g (10.3 mmol) 1-O-Methyl-2,3,5-tris-O-benzyl- β -D-ribofuranose (**18**) wurden in 100 mL Dioxan gelöst, mit 25 mL 0.1 mol/L Salzsäure angesäuert und drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Neutralisation mit 1 mol/L NaOH wurde die Lösung am Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in DCM gelöst und dreimal mit Wasser gewaschen. Die Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend zur Trockene eingengt, um 3.6 g (Ausbeute: 84 % d.Th.) eines gelben Sirup zu ergeben²⁸⁸.

$$M = 420.19 \text{ g/mol}, \text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_5$$

${}^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 3.53$ - 3.66 (m, 2 H, $5' \text{-H}_{a+b}$), 3.88 (dd, 1 H, $2' \text{-H}$), 4.05 - 4.14 (m, 2 H, $3' \text{-H} + 4' \text{-H}$), 4.52 - 4.78 (m, 6 H, OCH_2), 5.30 (dd, 1 H, $1' \text{-H}$) 6.62 (d, 1 H, $1' \text{-OH}$), 7.34 - 7.48 (m, 15 H, Ar-H) ppm ${}^3J_{1',\text{OH}} = 5$, ${}^3J_{1',2'} = 1.7$, ${}^3J_{2',3'} = 4.5$ Hz

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 101 MHz): $\delta = 71.9$ ($5'$ - $\underline{\text{CH}}_2$), 77.0 ($4'$ - $\underline{\text{CH}}$), 79.2 ($3'$ - $\underline{\text{CH}}$), 81.7 ($2'$ - $\underline{\text{CH}}$), 100.08 ($1'$ - $\underline{\text{CH}}$), 127.7 , 127.8 , 127.9 , 128.0 , 128.06 , 128.07 , 128.6 , 128.7 (15 C, Ar- $\underline{\text{CH}}$), 138.1 , 138.3 , 138.5 (3 C, Ar- $\underline{\text{C}}$) ppm

2.5.2.4 2,3,5-Tris-O-benzyl-1-O-*para*-nitrobenzoyl- β -D-ribofuranose (**20**)

4.32 g (10.3 mmol) 2,3,5-Tris-O-benzyl-D-ribose (**19**) wurden in 10 mL abs. DCM gelöst und unter Kühlung mit einer Lösung von 2.1 g (11.3 mmol) *para*-Nitrobenzoylchlorid in 50 mL abs. DCM und 15 mL Pyridin versetzt. Nach einer Stunde Rühren bei RT wurde die Lösung mit etwas Eis versetzt und weiter gerührt. Nach weiteren 30 min wurde die organische Phase nacheinander mit gleichen Volumina 1 mol/L Salzsäure, gesättigter Na_2CO_3 -Lösung und Wasser extrahiert und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Zweimalige Umkristallisation aus Isopropanol ergab **20** als 1.95 g eines gelben Feststoffes. Ausbeute: 33 % d.Th.²⁸⁸

$M = 569.20$ g/mol, $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{NO}_8$

^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 3.55$ (dd, 1 H, $5'$ - $\underline{\text{H}}_b$), 3.66 (dd, 1 H, $5'$ - $\underline{\text{H}}_a$), 4.3 (m, 1 H, $4'$ - $\underline{\text{H}}$), $4.3 - 4.8$ (m, 9 H, $2'$ - $\underline{\text{H}}$, $3'$ - $\underline{\text{H}}$ + OCH_2), 6.33 (d, 1 H, $1'$ - $\underline{\text{H}}$), $7.34 - 7.44$ (m, 15 H, Bn- $\underline{\text{H}}$), 8.1 (d, 1 H, 2+6-Ar- $\underline{\text{H}}$), 8.2 (d, 1 H, 3+5-Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm

$^3\text{J}_{2,3=5,6\text{-Ar-H}} = 8$, $^4\text{J}_{1,6\text{-Ar-H}} = 2.3$, $^4\text{J}_{2,5\text{-Ar-H}} = 2.0$, $^2\text{J}_{5'a,5'b} = 11.2$, $^3\text{J}_{5'a,4'}$ = 2.8, $^3\text{J}_{5'b,4'}$ = 4.5 Hz.

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 101 MHz): $\delta = 71.6$ ($5'$ - $\underline{\text{CH}}_2$), 78.5 ($4'$ - $\underline{\text{CH}}$), 79.6 ($3'$ - $\underline{\text{CH}}$), 80.9 ($2'$ - $\underline{\text{CH}}$), 99.7 ($1'$ - $\underline{\text{CH}}$), 127.7 , 127.8 , 127.9 , 128.0 , 128.06 , 128.08 , 128.4 , 128.6 , 128.7 , 129.5 , 129.9 (15 C, Ar- $\underline{\text{CH}}$), 138.5 , 138.7 , 138.8 (3 C, Ar- $\underline{\text{C}}$) ppm

2.5.2.5 1-Bromo-2,3,5-tris-O-benzyl- α -D-ribofuranose (**21**)

Zu einer Lösung von 5 g (10 mmol) 2,3,5-Tris-O-benzyl-1-O-*p*-nitrobenzoyl- β -D-ribofuranose (**20**) in 25 mL abs. DCM werden 25 mL bei -20 °C mit HBr gesättigtes abs. DCM gegeben. Die dabei ausgefallene *para*-Nitrobenzoesäure wurde unter Luftausschluß abfiltriert und der Niederschlag mit einer kleinen Menge kalten DCM gewaschen. Abdestillieren des Lösungsmittels ergab ein gelbes Öl, welches in ACN gelöst und direkt für die nachfolgende Reaktion eingesetzt wurde.

$M = 483.08$ g/mol, $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{BrO}_4$

2.5.3 5-O-[(1,1-Dimethylethyl)dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- α -D-ribofuranosylchlorid (**16**)2.5.3.1 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose (**14**)

25 g Ribose (0.2 mol) wurden in 500 mL abs. Aceton und 21 mL (0.25 mol) 2,2-Dimethoxypropan aufgeschlämmt und mit 25 μ L konz. H_2SO_4 angesäuert. Anschließend wurde 20 h bei 4 °C unter Feuchtigkeitsausschluß und in der Gegenwart von 5 g Molekularsieb, 4 Å rühren gelassen, wobei sich der Niederschlag auflöste. Danach wurde die Lösung mit Na_2CO_3 neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Man erhielt 33.3 g eines farblosen Sirup, der ohne weitere Aufreinigung für die nächste Reaktion eingesetzt wurde (Ausbeute: 88 % d.Th.).

M = 190.08 g/mol, $C_8H_{14}O_5$

MS (EI, 70 V): m/z = 191 ((M+H)⁺, 2 %), 175 ((M-CH₃)⁺, 20 %), 159 ((M-CH₂OH)⁺, 12 %), 157 ((M-CH₃-H₂O)⁺, 10 %), 59 (C₃H₇O⁺, 100 %) u

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.33, 1.49 (2 s, 6 H, CH₃), 3.64 - 3.81 (m, 2 H, 5' -H_{a+b}), 4.4 (m, 1 H, 4' -H), 4.6 (d, 1 H, 2' -H), 4.8 (d, 1 H, 3' -H), 5.0 (s, breit, 1 H, OH), 5.4 (s, 1 H, 1' -H) ppm, ³J_{2',3'} = 5.9, ³J_{5'a,4'} = 2.3, ³J_{5'b,4'} = 3.2 Hz

¹³C-NMR (CDCl₃, 101 MHz): δ = 24.7, 26.4 (CH₃), 63.6 (5' -CH₂), 81.7 (3' -CH), 86.9 (2' -CH), 87.8 (4' -CH), 102.9 (1' -CH), 112.0 (C(CH₃)₂) ppm

IR (KBr): ν = 3400 (3.28 %, OH), 2985 (13 %), 2941 (10 %), CH-Aliphatisch, 1376 (8 %, *t*-Butyl), 1068 (1.66 %), 1043(2.4 %), COC

DC (LS O): R_F = 0.5

2.5.3.2 5-O-[(1,1-Dimethylethyl)dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- β -D-ribofuranose (**15**)

Zu einer Lösung aus 30 g (0.16 mol) 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose (**14**) und 30 g (0.44 mol) Imidazol in 60 mL abs. DMF wurden 25 g (0.17 mol) *t*-BuMe₂SiCl (TBDMSCl) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin drei Stunden bei RT gerührt und anschließend mit 250 mL Wasser versetzt. Das Produkt wurde dreimal mit 250 mL EE extrahiert und die vereinigten organischen Phasen noch zweimal mit 125 mL Wasser gewaschen und getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhielt man 50.61 g eines Sirup. Dieser wurde dann der säulenchromatographischen Trennung (LS P) unterzogen. Man erhielt 24.3 g eines weißen Feststoffes. Ausbeute: 52 % d. Th. Nicht umgesetztes Edukt wurde zurückgewonnen und anschließend nochmals umgesetzt.

M = 304.17 g/mol, C₁₄H₂₈O₅Si

¹H-NMR (d₆-DMSO, 400 MHz): δ = 0.06 (s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.88 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.25 und 1.37 (2 s, 6 H, 2 OCH(CH₃)₂), 3.59 (d, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.95 (td, 1 H, 4'-H), 4.46 (d, 1 H, 2'-H), 4.63 (dd, 1 H, 3'-H), 5.19 (d, 1 H, 1'-H), 6.44 (d, 1 H, 1'-OH) ppm

³J_{1',OH} = 4.5, ³J_{2',3'} = 6.0, ³J_{3',4'} = 1.1, ³J_{4',5'} = 7.15 Hz

¹³C-NMR (d₆-DMSO, 101 MHz): δ = -5.14 (2 Si(CH₃)₂), 18.16 ((CH₃)₃CSi), 25.11, (OCH(CH₃)₂), 26.14 (SiC(CH₃)₃), 26.74 (OCH(CH₃)₂), 64.49 (5'-CH₂), 82.03 (3'-CH), 85.77 (2'-CH), 86.13 (4'-CH), 102.03 (1'-CH), 111.34 ((CH₃)₂C) ppm

DC (LM P): R_F = 0.77

Schmelzpunkt: T_{mp} = 56 °C (Lit.: 55-57 °C²⁸⁷)

2.5.3.3 5-O-[(1,1-Dimethylethyl)dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)-α-D-ribofuranosylchlorid (**16**)

Zu einer Lösung von 1.5 g (3.9 mmol) **15** in 25 mL abs. THF wurden durch ein Septum 0.6 mL (6.2 mmol) abs. Tetrachlorkohlenstoff gegeben. Nach Abkühlen auf -78 °C wurde zu der Lösung 1.0 mL (5.7 mmol) Tris(dimethylamino)phosphan tropfenweise über einen Zeitraum von 15 Minuten gegeben. Die Lösung wurde noch weitere zwei Stunden bei dieser Temperatur gehalten und dann langsam auf RT erwärmt. Für die Glykosidierungsreaktion wurde die Lösung am Vakuum auf etwa die Hälfte des Volumens eingengt und direkt eingesetzt.

M = 322.62 g/mol, C₁₄H₂₇ClO₄Si

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = -0.02 (s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.81 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.31, 1.58 (2 s, 6 H, 2 OCH(CH₃)₂), 3.71 (d, 2 H, 5'-H_{a+b}), 4.31 (td, 1 H, 4'-H), 4.70 (m, 2 H, 2'-H, 3'-H), 6.08 (d, 1 H, 1'-H) ppm

DC (LM P): R_F = 0.9

2.6 Darstellung von 2'-Desoxyribonukleotiden

2.6.1 6-Chloro-9-(2'-desoxy-3',5'-di-O-para-toluoyl-β-D-erythro-pentofuranosyl)purin (**27**)

Eine Suspension aus 257 mg (1.35 mmol) 6-Chloropurin und 209 mg (1.41 mmol) NaH (60% in Petroleum) in 17 mL abs. ACN wurde 30 min bei RT unter Luftausschluß gerührt. 0.66 g (1.7 mmol) 1-Chloro-2-desoxy-3,5-di-O-para-toluoyl-α-D-erythro-pentofuranose (**12**) wurden sodann portionsweise innerhalb von 20 Minuten hinzu gegeben und die Lösung für

VII. Experimenteller Teil

weitere 15 Stunden gerührt. Abdestillieren des Lösungsmittels ergab einen öligen Rückstand, der anschließend der Säulenchromatographie (LS I) unterworfen wurde. Ausbeute nach Umkristallisation aus Ethanol: 39 % d.Th.

M = 506.13 g/mol, C₂₆H₂₃N₄O₅Cl

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.48 und 2.51 (2 s, 6 H, 2 CH₃), 2.95 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 3.50 (ddd≈q, 1 H, 2'-H_a), 4.72 (m, 3 H, 4'-H, 5'-H_{a+b}), 5.95 (m, 1 H, 3'-H), 6.75 (m, 1 H, 1'-H), 7.48 und 7.49 (2 d, 4 H, 4 x 3+5-Ar-H), 7.90 und 8.06 (2 d, 4 H, 4 x 2+6-Ar-H), 8.84 (d, 1 H, 2-H), 8.86 (s, 1 H, 8-H) ppm

¹³C-NMR(50 MHz, d₆-DMSO): δ = 21.5, (2 CH₃), 36.0 (2'-CH₂), 64.1 (5'-CH₂), 75.0 (3'-CH), 82.4 (4'-CH), 85.0 (1'-CH), 129.2, 129.5, 129.6, 129.8 (10 Ar-CH), 144.4, 144.0, (1-Ar-C), 146.5 (4-C), 151.9 (2-C), 165.6, 165.7 (2 C=O) ppm

Elementaranalyse (506.9): gefunden (%) C 60.32, 59.97, H 4.36, 4.45, N 10.64, 10.65, berechnet (%) C 61.60, H 4.57, N 11.05

Schmelzpunkt: T_{mp} = 107-109°C

Als Nebenprodukt der Reaktion konnte eine kleine Menge des Isomeren 6-Chloro-7-(2'-desoxy-3,5-di-O-para-toluoyl-α-D-erythro-pentofuranosyl)purin (**27a**) isoliert werden. Ausbeute nach Umkristallisation aus EtOH 5 % d.Th.

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.47, 2.51 (2 s, 6 H, 2 CH₃), 3.11 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 3.27 (ddd≈q, 1 H, 2'-H_a), 4.69 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 4.79 (1 H, m, 4'-H), 5.86 (m, 1 H, 3'-H), 6.99 (m, 1 H, 1'-H), 7.38, 7.48 (2 d, 4 H, 4 x 3+5-Ar-H), 7.87, 8.05 (2 d, 4 H, 4 x 2+6-Ar-H), 8.97 (d, 1 H, 2-H), 9.26 (s, 1 H, 8-H) ppm

2.6.2 2-Amino-6-chloro-7-(2-desoxy-3',5'-di-O-para-toluoyl-β-D-erythro-pentofuranosyl)purin (**28**)

Analog wurde eine Suspension aus 206 mg (1.2 mmol) 2-Amino-6-chloropurin und 209 mg (1.41 mmol) Natriumhydrid (60% in Petroleum) in 17 mL ACN 30 min bei RT unter Luftaus-schluß gerührt. 0.66 g (1.7 mmol) **12** wurden dann portionsweise innerhalb von 20 Minuten hinzugegeben und die Lösung für weitere 15 Stunden gerührt. Abdestillieren des Lösungsmittels ergab einen öligen Rückstand, der anschließend der Säulenchromatographie mit (LM I) unterworfen wurde. Die Ausbeute betrug 30 % d.Th.

M = 521.15 g/mol, C₂₆H₂₄ClN₅O₅

VII. Experimenteller Teil

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.48, 2.51 (2 s, 6 H, 2 CH₃), 2.85 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 3.15 (ddd≈q, 1 H, 2'-H_a), 4.72 (m, 3 H, 4'-H, 5'-H_{a+b}), 5.95 (m, 1 H, 3'-H), 6.55 (m, 1 H, 1'-H), 7.48 (d, 4 H, 4 x 3+5-Ar-H), 7.95 (d, 4 H, 4 x 2+6-Ar-H), 8.86 (s, 1 H, 8-H) ppm

Als Hauptprodukt wurde 1,3,5-Di-O-*para*-toluoyl-D-*erythro*-pentofuranose (**12a+b**) isoliert.

M = 503.21 g/mol, C₃₀H₃₁O₇

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.47 (s, 9 H, 3 CH₃), 2.85 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 3.15 (ddd≈q, 1 H, 2'-H_a), 4.72 (m, 3 H, 4'-H, 5'-H_{a+b}), 5.95 (m, 1 H, 3'-H), 6.55 (m, 1 H, 1'-H), 7.48 (d, 6 H, 3+5-Ar-H), 7.95 (d, 6 H, 2+6-Ar-H) ppm

2.6.3 2-Amino-4-chloro-7-(2'-desoxy-3',5'-di-O-*para*-toluoyl-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**23**)

Methode A ("Natriumhydrid-Methode"): Zu einer Suspension von 2-Amino-4-chloro-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**8**, 0.48 g, 3 mmol) in abs. Acetonitril (100 mL) wurde NaH (3.13 mmol) bei RT gegeben und das Reaktionsgemisch für eine halbe Stunde gerührt. Nach Zugabe von **12** (1.2 g, 3.1 mmol) wurde für weitere zwei Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach filtriert und im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (LS G) gereinigt. Die produktthaltige Hauptfraktion wurde, nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum, aus MeOH/2-Propanol (3:2) umkristallisiert. Man erhielt gelbliche Kristalle von **23** in einer Ausbeute von 0.58 g (39 % d.Th.).

DC(LS H): R_F = 0.5, Schmelzpunkt: T_{mp} = 117 °C (Lit.: 118 °C¹³²), Die spektroskopischen Daten waren identisch mit denen der nach Methode B gewonnenen Substanz.

Methode B ("fest-flüssig Phasentransferkatalyse"): Eine Suspension von feingemörsertem KOH (1.2 g, 21.4 mmol) in 40 mL abs. Acetonitril wurde unter Luftausschluß bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Suspension wurden TDA-1 (100mg, 0.31 mmol), nach 15 min Rühren 2-Amino-4-chloro-7H-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin (**8**, 1.05 g, 6.23 mmol) und nach weiteren 10 min die Halogenose **12** (2.45 g, 6.31 mmol) gegeben. Nach 30 min Reaktionszeit wurde von unlöslichem Rückstand abfiltriert und zur Trockene eingedampft. Zur säulenchromatographischen Trennung wurde erst mit LS F gewaschen (bis die gelbe Front den unteren Säulenrand erreichte) und anschließend mit LS G eluiert. Nach Umkristallisation aus 2-Propanol/MeOH erhielt man **23** als gelbliche Nadeln. Ausbeute: 1.87 g (55 % d.Th., Lit.: 70 % d.Th.¹³⁴)

VII. Experimenteller Teil

M = 520.15 g/mol, C₂₇H₂₅ClN₄O₅

MS (FAB): m/z = 521.5 ((M+H)⁺, 100 %), 385.5 ((M-Tol)⁺, 10 %), 353.5 ((M-Base)⁺, 10 %), 251.7 ((M-2 x Tol)⁺, 10 %) u

¹H-NMR (d₆-DMSO, 400 MHz): δ = 2.38, 2.41 (2 s, 6 H, CH₃), 2.65 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 2.99 (ddd≈quintett, 1 H, 2'-H_a), 4.50 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 4.59 (m, 1 H, 4'-H), 5.68 (m, 1 H, 3'-H), 6.38 (d, 1 H, 5-H), 6.55 (dd, 1 H, 1'-H), 6.76 (s, 2 H, NH₂), 7.34 (d, 1 H, 6-H), 7.33, 7.37 (2 d, 4 H, 3+5-Ar-H), 7.88, 7.94 (2 d, 4 H, 2+6-Ar-H) ppm

³J_{1',2'a} = 8.6, ²J_{1',2'b} = 6.08, ³J_{2'b,3'} = 2.6, ²J_{2'a,2'b} = 14.2, ³J_{5,6} = 3.56, ³J_{o,m} = 8.1 Hz

¹³C-NMR (101 MHz, d₆-DMSO): δ = 21.09, 21.13 (2 CH₃), 35.62 (2'-CH₂), 64.16 (5'-CH₂), 75.08 (3'-CH), 80.96 (4'-CH), 82.4 (1'-CH), 100.25 (5-CH), 108.89 (4a-C), 122.64 (6-CH), 126.47, 126.54 (2 x 4-Ar-C), 129.21, 129.25, 129.35 (8 x 2,3-Ar-CH), 143.76, 144.99 (2 x 1-Ar-C), 151.30 (4-C), 153.89 (7a-C), 159.37 (2-C), 165.14, 165.40 (2 C=O) ppm

DC(LS H): R_F = 0.5

2.6.4 4-Chloro-7-(2'-desoxy-3',5'-di-O-(*para*-toluoyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo [2,3-d]pyrimidin (**22**)

Zu einer Suspension von 4-Chlor-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**7**, 540 mg, 3.5 mmol) in abs. ACN (22 mL) wurde NaH (60% in Paraffin, 156 mg, 3.8 mmol) gegeben und das Gemisch für 30 min unter Luftausschluß gerührt. **12** (1.37 g, 3.5 mmol) wurde in einer Portion hinzugegeben und das Gemisch weitere zwei Stunden bei 50°C unter Luftausschluß gerührt. Anschließend wurde von unlöslichem Material durch Filtration abgetrennt. Einengen im Vakuum ergab einen bräunlichen Sirup, der säulenchromatographisch (LS I) getrennt wurde. Die produkthaltigen Fraktionen wurden nach Abdestillieren des Lösungsmittels aus EtOH umkristallisiert, um das Produkt in gelblichen Schuppen zu ergeben.

Ausbeute: 1.37 g Sirup (71 % d.Th., Lit.: 71 % d.Th.⁷⁷), 0.97g kristallines **22** (52 % d.Th. nach Umkristallisation).

M = 505.14 g/mol, C₂₇H₂₄N₃O₅Cl

MS (FAB): m/z = 506.5 ((M+H)⁺, 100 %), 370.4 ((M-Tol)⁺, 8 %), 353.4 ((M-Base)⁺, 20 %), 234.6 ((M-2 Tol)⁺, 5 %), 218.3 ((M-Base-Tol)⁺, 3 %) u

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.59 und 2.62 (2 s, 6 H, 2 CH₃), 2.99 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 3.38 (ddd≈q, 1 H, 2'-H_a), 4.78 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 4.84 (m, 1 H, 4'-H), 5.98 (m, 1 H, 3'-H), 6.96 (d, 1 H, 5-H), 6.99 (m, 1 H, 1'-H), 7.51 und 7.58 (2 d, 4 H, 4 x 3+5-Ar-H), 8.06, 8.17 (2 d, 4 H, 4 x 2+6-Ar-H), 8.17 (d, 1 H, 6-H), 8.86 (s, 1 H, 2-H) ppm

$^3J_{1',2'a} = 8.2$, $^2J_{1',2'b} = 6.1$, $^3J_{2'b,3'} = 2.6$, $^2J_{2'a,2'b} = 14$, $^3J_{5,6} = 4.1$, $^3J_{o,m} = 8.1$ Hz

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 21.09$, 21.14, (2 $\underline{\text{CH}_3}$), 36.01 (2' $\underline{\text{-CH}_2}$), 63.99 (5' $\underline{\text{-CH}_2}$), 74.78 (3' $\underline{\text{-CH}}$), 81.35 (4' $\underline{\text{-CH}}$), 83.87 (1' $\underline{\text{-CH}}$), 100.01 (5 $\underline{\text{-CH}}$), 117.52 (4a $\underline{\text{-C}}$), 126.45, 126.51 (2 x 4-Ar $\underline{\text{-C}}$), 128.41 (6 $\underline{\text{-CH}}$), 129.2, 129.25, 129.41 (8 2,3-Ar $\underline{\text{-CH}}$), 143.74, 143.99, (1-Ar $\underline{\text{-C}}$), 150.54 (2 $\underline{\text{-C}}$), 150.77 (7a $\underline{\text{-C}}$), 150.89 (4 $\underline{\text{-C}}$), 165.57, 165.37 (2 $\underline{\text{C=O}}$) ppm

DC (LS H): $R_F = 0.6$

2.7 Darstellung von Ribonukleosiden

2.7.1 2-Amino-4-chloro-7-(2',3',5'-tris-O-benzyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**32**)

Weg A: 150 mg (1 mmol) 2-Amino-4-chloro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**8**) und 210 mg (0.4 mmol) 2,3,5-Tris-O-benzyl-1-O-*p*-nitrobenzoyl- β -D-ribofuranose (**20**) wurden in 10 mL abs. Acetonitril suspendiert, auf -20°C abgekühlt und danach unter Luftausschluß mit 500 μL Trimethylsilyltrifluormethansulfonat versetzt und zusammen mit etwas Molsieb, 3 \AA so lange bei RT gerührt bis keine 4-Nitrobenzoesäure mehr auskristallisierte (ca. 3 h). Die Reaktionslösung wurde anschließend mit derselben Menge gesättigter wäßriger NaHCO_3 - Lösung versetzt. Die wäßrige Phase wurde dreimal mit 20 mL DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zum Sirup eingengt. Anschließende Säulenchromatographie (LS S) ergab 40 mg eines farblosen Wachses, Ausbeute: 26 % d.Th. bezogen auf **20**.

Weg B: 0.2 g gepulvertes KOH (am Ölpumpenvakuum getrocknet) wurden zweimal mit 10 mL abs. ACN ko-evaporiert und anschließend in 20 mL abs. ACN suspendiert. Nach 10 min Rühren wurden zu dem Reaktionsgemisch 15 μL TDA-1, nach weiteren 30 min Rühren 100 mg (0.7 mmol) 2-Amino-4-chloro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin hinzugegeben. Nach weiteren 10 min Rühren bei RT wurden 0.3 g (0.6 mmol) frisch hergestellte **21** in 5 mL abs. ACN den Reaktionsgemisch durch ein Septum zugetropft. Nach Rühren über Nacht wurde von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Der Rückstand mit etwas ACN gewaschen und bis zum Sirup eingengt. Das Rohprodukt wurde einer säulenchromatographischen Reinigung (LS S) unterzogen, Ausbeute: 35 % d.Th.

$M = 612.14$ g/mol, $\text{C}_{32}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O}_7$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 3.55$ (dd, 1 H, 5' $\underline{\text{-H}_b}$), 3.66 (dd, 1 H, 5' $\underline{\text{-H}_a}$), 4.3 (m, 1 H, 4' $\underline{\text{-H}}$), 4.3 - 4.8 (m, 9 H, 2' $\underline{\text{-H}}$, 3' $\underline{\text{-H}}$ + OCH_2), 6.33 (d, 1 H, 1' $\underline{\text{-H}}$), 7.34 - 7.44 (m, 15 H, Bn $\underline{\text{-H}}$), 8.1 (d, 1 H, 2+6-Ar $\underline{\text{-H}}$), 8.2 (d, 1 H, 3+5-Ar $\underline{\text{-H}}$) ppm

VII. Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 101 MHz): $\delta = 71.6$ ($5'$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 78.5 ($4'$ - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 79.6 ($3'$ - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 80.9 ($2'$ - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 98.97 (5 - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 99.7 ($1'$ - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 119.32 (6 - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 127.7 , 127.8 , 127.9 , 128.0 , 128.06 , 128.08 , 128.4 , 128.6 , 128.7 , 129.5 , 129.9 (15 C, Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 138.5 , 138.7 , 138.8 (3 C, 1-Ar- $\underline{\text{C}}$), 154.10 (7a - $\underline{\text{C}}$), 159.67 (2 - $\underline{\text{C}}$), 162.60 (4 - $\underline{\text{C}}$) ppm

2.7.2 2-Amino-4-Chlor-7-{ $5'$ -O[(1,1-dimethylethyl)-dimethylsilyl]- $2',3'$ -O-(1-methylethyliden)- β -ribofuranosyl]- $7H$ -pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**32**)

Gepulvertes KOH (140 mg, 2.5 mmol) wurde 10 min in 10 mL abs. ACN gerührt. 5 μL (16 μmol) TDA-1 wurden anschließend zugegeben und die Lösung für weitere zehn min gerührt. Danach wurde das Gemisch mit 135 mg (0.8 mmol) 4-Chlor- $7H$ -pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-2-amin (**8**) versetzt und nach weiteren 10 min Rühren 0.4 mmol (von 100 % Ausbeute ausgehend) frisch dargestelltes 5-O-[(1,1-Dimethylethyl)dimethylsilyl]-2,3-O-(1-methylethyliden)- α -D-ribofuranosylchlorid (**16**)²⁸⁹ in abs. THF durch ein Septum zutropft. Es wurde weitere 20 h bei RT gerührt, unlösliches Material abfiltriert und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (LS T). Einengen am Vakuum ergab **32** als ein gelbliches Wachs (Ausbeute: 83 mg, 46 %).

$M = 597.13$ g/mol, $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_7$

^1H -NMR (500 MHz, D_6 -DMSO): $\delta = -0.04$ (s, 6 H, ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂Si), 0.82 (s, 9 H, ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃C), 1.32 , 1.52 (2 s, 6 H, C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂), 3.70 (m, 2 H, $5'$ - $\underline{\text{H}}$), 4.08 (m, 1 H, $4'$ - $\underline{\text{H}}$), 4.96 (m, 1 H, $3'$ - $\underline{\text{H}}$), 5.16 (m, 1 H, $2'$ - $\underline{\text{H}}$), 6.12 (d, 1 H, $1'$ - $\underline{\text{H}}$), 6.38 (d, 1 H, 5 - $\underline{\text{H}}$), 6.80 (s, 2 H, NH_2), 7.30 (d, 1 H, 6 - $\underline{\text{H}}$)
DC (LS P) = 0.8

2.7.3 4-Chloro-7-($2',3',5'$ -tris-O-benzyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**29**)

Es wurden 210 mg **20** mit 120 mg 4-Chlor- $7H$ -pyrrolo[2,3-d]pyrimidin und 300 μL TMS-Triflat umgesetzt. Reaktionsbedingungen und Aufarbeitung wie bei **32**, entsprechend Weg A, Ausbeute 20 mg (15 % d.Th.) eines gelben Öles.

$M = 597.13$ g/mol, $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_7$

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.55$ (dd, 1 H, $5'$ - $\underline{\text{H}}_b$), 3.66 (dd, 1 H, $5'$ - $\underline{\text{H}}_a$), 4.3 (m, 1 H, $4'$ - $\underline{\text{H}}$), $4.3 - 4.8$ (m, 8 H, $2'$ - $\underline{\text{H}}$, $3'$ - $\underline{\text{H}}$ + 3 OCH_2), 6.68 (d, 1 H, 5 - $\underline{\text{H}}$), 6.77 (d, 1 H, $1'$ - $\underline{\text{H}}$), $7.04 - 7.36$ (m, 15 H, Bn- $\underline{\text{H}}$), 7.80 (d, 1 H, 6 - $\underline{\text{H}}$ J = 2.7), 9.06 (s, 1 H, 2 - $\underline{\text{H}}$) ppm.

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 101 MHz): $\delta = 71.63$ ($5'$ -CH₂), 78.52 ($4'$ -CH), 79.48 ($3'$ -CH), 80.9 ($2'$ -CH), 99.7 ($1'$ -CH), 121.54 (6-CH), 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.06, 128.08, 128.4, 128.6, 128.7, 129.5, 129.9 (15 C, Ar-CH), 138.5, 138.7, 138.8 (3 C, 1-Ar-C), 149.47 (7a-C), 151.41 (2-CH), 157.37 (4-C) ppm

2.7.4 4-Chlor-7-{5'-O[(1,1-dimethylethyl)-dimethylsilyl]-2',3'-O-(1-methylethyliden)- β -ribofuranosyl}-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**33**)

Verbindung **33** wurde entsprechend wie für **32** beschrieben dargestellt, ausgehend von 131 mg (0.8 mmol) 4-Chlor-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin. Nach Säulenchromatographie (LS S) wurden 76 mg eines gelben honiggelben Waxes erhalten, Ausbeute: 38 % d. Th.

^1H -NMR (500 MHz, D_6 -DMSO) -0.04 (s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.82 (s, 9 H, (CH₃)₃C), 1.32, 1.52 (2 s, 6 H, C(CH₃)₂), 3.70 (m, 2 H, 5'-H), 4.08 (m, 1 H, 4'-H), 4.96 (m, 1 H, 3'-H), 5.16 (m, 1 H, 2'-H), 6.12 (d, 1 H, 1'-H), 6.38 (d, J=3.8, 1 H, 5-H), 7.30 (d, 1 H, 6-H), 8.04 (s, 1 H, 2-H)

2.8 7-Deaza-2'-desoxyguanosin (**38**)

2.8.1 2-Amino-4-methoxy-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**37**)

Methode A: Eine Lösung von 1.00 g (1.8 mmol) 2-Amino-4-chloro-7-(2'-desoxy-3',5'-di-O-*p*-toluoyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**23**) in 0.5 mol/L NaOMe/MeOH (10 mL) wurde eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in einem Eis-Wasser-Bad gekühlt und mit 6 mol/L HCl neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit 2-Propanol (20 mL) digeriert, wieder zur Trockene eingedampft, erneut mit MeOH (35 mL) aufgenommen, kurz zum Sieden erhitzt, nach Abkühlen filtriert und anschließend erneut eingedampft. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Eluent: LS F mit steigendem Anteil Methanol) gereinigt und konnte zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Daten aus Aceton/Hexan umkristallisiert werden. Ausbeute: 0.37 g (68 % d.Th., Lit.: 86 % d.Th.¹²⁹) als Sirup.

DC (LS B): R_F = 0.12

Methode B: 500 mg 2-Amino-4-chloro-7-(2-desoxy-3,5-di-O-*p*-toluoyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (1 mmol) **23** wurden 25 h bei RT in einer 1 mol/L Lösung von Natriummethanolat in Methanol gerührt. Es wurde mit 80 % Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel abdestilliert. Aufarbeitung s.o. Ausbeute: 170 mg (67 % d.Th.)

$M = 280.12 \text{ g/mol } C_{12}H_{16}N_4O_4$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 2.11$ (ddd \approx dd, 1 H, 2'- \underline{H}_b), 2.39 (ddd \approx m, 1 H, 2'- \underline{H}_a), 3.45 (ddd \approx m, 2 H, 5'- \underline{H}_{a+b}), 3.79 (m, 1 H, 4'- \underline{H}), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 4.31 (m, 1 H, 3'- \underline{H}), 4.93 (t \approx s, breit, 1 H, 5'- $\underline{\text{OH}}$), 5.18 (d \approx s, breit, 1 H, 3'- $\underline{\text{OH}}$), 6.13 (s, breit, 2 H, $\underline{\text{NH}}_2$), 6.26 (d, 1 H, 5- \underline{H}), 6.42 (dd \approx t, 1 H, 1'- \underline{H}), 7.08 (d, 1 H, 6- \underline{H}) ppm

$^3J_{1',2'a} = 7.1$, $^3J_{1',2'b} = 5.32$, $^2J_{2'a,2'b} = 13.0$, $^3J_{5,6} = 3.56 \text{ Hz}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 39.39$ (2'- $\underline{\text{CH}}_2$), 52.69 (OCH_3), 62.02 (5'- $\underline{\text{CH}}_2$), 71.00 (3'- $\underline{\text{CH}}$), 82.27 (1'- $\underline{\text{CH}}$), 86.88 (4'- $\underline{\text{CH}}$), 97.14 (4a- $\underline{\text{C}}$), 98.97 (5- $\underline{\text{CH}}$), 119.32 (6- $\underline{\text{CH}}$), 154.14 (7a- $\underline{\text{C}}$), 159.37 (2- $\underline{\text{C}}$), 162.80 (4- $\underline{\text{C}}$) ppm

2.8.2 2-Amino-4-chlor-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**36**)

Es wurden 0.123 g (0.24 mmol) 2-Amino-4-chloro-7-(2-desoxy-3,5-di-O-*p*-toluoyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin **23** drei Stunden in 8 mL 0.1 mol/L NaO-Me/MeOH bei RT aufbewahrt. Man neutralisierte mit 1 mol/L HCl und dampfte das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der trockene Rückstand wurde mit 5 g Kieselgel und Chloroform aufgeschwemmt und auf den Kopf einer Kieselgelsäule (Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1) gegeben. Aus der langsam wandernden Hauptzone wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 40 mg (59 % d.Th., Lit.: 68 % d.Th.²⁹⁰) farblose Nadeln.

$M = 284.06 \text{ g/mol, } C_{11}H_{13}ClN_4O_3$

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400 MHz): $\delta = 2.14$ (ddd, 1 H, 2'- \underline{H}_b), 2.41 (ddd, 1 H, 2'- \underline{H}_a), 3.52 (ddd \approx m, 2 H, 5'- \underline{H}_{a+b}), 3.76 (m, 1 H, 4'- \underline{H}), 4.29 (m, 1 H, 3'- \underline{H}), 4.91 (t, 1 H, 5'- $\underline{\text{OH}}$), 5.25 (d, 1 H, 3'- $\underline{\text{OH}}$), 6.35 (d, 1 H, 5- \underline{H}), 6.43 (dd, 1 H, 1'- \underline{H}), 6.69 (s, breit, 2 H, $\underline{\text{NH}}_2$), 7.35 (d, 1 H, 6- \underline{H}) ppm.

$^3J_{1',2'a} = 8.64 \text{ ppm}$. $^3J_{1',2'b} = 6.08$, $^3J_{2'a,3'} = 7.6$, $^2J_{2'a,2'b} = 13.2$, $^3J_{2'b,3'} = 2.56$, $^3J_{\text{OH},3'-\text{H}} = 3.9$, $^3J_{\text{OH},5'-\text{H}} = 5.5$, $^3J_{5,6} = 3.56 \text{ Hz}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (61 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 39.39$ (2'- $\underline{\text{CH}}_2$), 61.95 (5'- $\underline{\text{CH}}_2$), 71.00 (3'- $\underline{\text{CH}}$), 82.38 (1'- $\underline{\text{CH}}$), 87.18 (4'- $\underline{\text{CH}}$), 97.14 (4a- $\underline{\text{C}}$), 99.85 (5- $\underline{\text{CH}}$), 108.88 (4a- $\underline{\text{C}}$), 123.11 (6- $\underline{\text{CH}}$), 151.17 (4- $\underline{\text{C}}$), 153.80 (7a- $\underline{\text{C}}$), 159.39 (2- $\underline{\text{C}}$) ppm

DC (LS C): $R_F = 0.34$

2.8.3 2-Amino-7-(2-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (2'-Desoxy-7-deazaguanosin, **38**)

Methode A: Eine Lösung von 2-Amino-4-methoxy-7-(2-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**37**, 0.48 g, 1.7 mmol) in 100 mL abs. ACN wurde mit 0.27 g Natriumiodid (1.8 mmol, vorher getrocknet) und Chlortrimethylsilan (frisch destilliert, 0.19 g, 1.8 mmol) versetzt, eine Stunde unter Luftausschluß gerührt und anschließend noch weitere vier Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Ende der Reaktion wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 46 mg (10 % d.Th., Lit.: 92 % d.Th.¹³²).

Methode B: 500 mg (1.8 mmol) **37** wurden in 13 mL 2 mol/L NaOH für 6 bis 8 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf einem Eisbad wurde mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert. Das Filtrat wurde auf eine Säule aus Amberlite XAD-4 aufgetragen und mit 9:1 (v/v) Wasser-Isopropylalkohol eluiert. Aus der Hauptzone wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Wasser eine weitere Fraktion von **38** erhalten. Ausbeute: 399 mg (83 % d.Th., Lit: 96 % d.Th.²⁸⁸).

M = 266.10 g/mol, C₁₁H₁₄N₄O₄

MS (EI, 70V): m/z = 266 (M⁺, 6 %), 235 ((M-CH₂OH)⁺, 1 %), 150 ((Base+H)⁺, 100 %), 133 ((M-NH₂)⁺, 18 %), 108 (C₄H₂N₃O⁺, 22 %)

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.08 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 2.41 (ddd, 1 H, 2'-H_a), 3.52 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.77 (m, 1 H, 4'-H), 4.29 (m, 1 H, 3'-H), 4.87 (t, 1 H, 5'-OH), 5.18 (d, 1 H, 3'-OH), 6.22 (s, 2 H, NH₂), 6.26 (d, 1 H, 5-H), 6.33 (dd, 1 H, 1'-H), 6.91 (d, 1 H, 6-H), 10.38 (s, breit, 1 H, Ring-NH) ppm ³J_{1',2'a} = 8.4, ³J_{1',2'b} = 5.7, ²J_{2'a,2'b} = 13, ³J_{2'a,3'} = 5.6, ³J_{2'b,3'} = 2.3, ³J_{3',3'OH} = 3.9, ³J_{5'OH,5'a,5'b} = 5.5, ³J_{5,6} = 3.56 Hz

¹³C-NMR (101 MHz, d₆-DMSO): δ = 39.49 (2'-CH₂), 61.99 (5'-CH₂), 70.94 (3'-CH), 82.18 (1'-CH), 86.84 (4'-CH), 99.98 (4a-C), 102.19 (5-CH), 116.66 (6-CH), 150.48 (4-C), 152.43 (7a-C), 158.55 (2-C) ppm

UV (200-400 nm, in Wasser, RT): λ_{\max} = 201, 218, 259.5: 275 - 295 (breite Schulter) nm, λ_{\min} = 205, 235 nm, ϵ (260 nm) = 5.4 cm²/μmol

DC (LS K): R_F = 0.4

2.9 4-Amino-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (2'-Desoxytubercidin, 7-Deaza-2'-desoxyadenosin, 35)

Eine Lösung von 4-Chloro-7-(2-desoxy-3,5-di-O-*p*-toluoyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**22**, 1.4 g, 3.1 mmol) in NH₃/MeOH (abs. MeOH, gesättigt mit über KOH getrocknetem Ammoniak bei 0 °C) wurde in einem Autoklaven bei ca. 130 °C für 60 h nach Zugabe von etwas frisch gemörsertem Molsieb gerührt und anschließend, nach Filtration von ungelösten Bestandteilen, im Vakuum zu einer breiigen Masse eingedampft. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (Eluent: LS L) nach Aufschlämmen des Breies mit DCM und Kieselgel und Auftragen auf den Kopf einer Kieselgelsäule. Nicht umgesetztes Edukt wurde zurückgewonnen und nochmals umgesetzt. Ausbeute: 630 mg (81.6 % d.Th., Lit.: 72 % d.Th.²⁸⁹)

M = 250.11 g/mol, C₁₁H₁₄N₄O₃

MS (EI, 70V): m/z = 250 (M⁺, 3 %), 203 ((M-CH₂OH)⁺, 0.3 %), 161 ((Base+CHO)⁺, 10 %), 134 ((Base+H)⁺, 100 %)

¹H-NMR(400 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.16 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 2.52 (ddd \approx m, 1 H, 2'-H_a), 3.53 und 3.58 (2 dd, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.80 (m, 1 H, 4'-H), 4.33 (m, 1 H, 3'-H), 4.91 (s, breit, 1 H, 5'-OH), 5.25 (d, breit, 1 H, 3'-OH), 6.48 (dd, 1 H, 1'-H), 6.58 (d, 1 H, 5-H), 6.97 (s, breit, 2 H, NH₂), 7.39 (d, 1 H, 6-H), 8.04 (s, 1 H, 2-H) ppm

³J_{1',2'a} = 8.4, ³J_{1',2'b} = 6.2, ²J_{2'a,2'b} = 13.2, ³J_{2'a,3'} = 5.6, ³J_{2'b,3'} = 2.5, ²J_{5'a,5'b} = 12, ³J_{5,6} = 3.6 Hz
¹³C-NMR (63 MHz, d₆-DMSO): δ = 39.74 (2'-CH₂), 62.03 (5'-CH₂), 71.03 (3'-CH), 83.49 (4'-CH), 87.2 (1'-CH), 99.56 (5-CH), 102.86 (4a-C), 121.54 (6-CH), 149.50 (7a-C), 151.44 (2-CH), 157.34 (4-C) ppm

DC: R_F (J) = 0.19

2.10 4-Amino-7-(β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (Tubercidin, 7-Deaza-adenosin, 31)

M = 266.10 g/mol, C₁₁H₁₄N₄O₄

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 3.52 (m, 1 H, 5'-H_b), 3.62 (dt, 1 H, 5'-H_a), 3.89 (dd, 1 H, 4-H_b), 4.08 (ddd, 1 H, 3'-H), 4.42 (q, 1 H, 2'-H), 5.11 (d, 1 H, 3'-OH), 5.28 (d, 1 H, 2'-OH), 5.35 (dd, 1 H, 5'-OH), 6.05 (d, 1 H, 1'-H), 6.58 (d, 1 H, 5-H), 7.05 (s, breit, 2 H, NH₂), 7.33 (d, 1 H, 6-H), 8.04 (s, 1 H, 2-H) ppm

$^3J_{1',OH} = 6.3$, $^3J_{1',2'} = 6.5$, $^3J_{2',3'} = 5.6$, $^3J_{3',4'} = 4.7$, $^2J_{5'a,5'b} = 12$, $^3J_{5',OH} = 4.8$, 5.7 , $^3J_{5,6} = 3.66$ Hz
 ^{13}C -NMR (63 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 62.21$ ($5'$ - \underline{CH}_2), 71.08 ($3'$ - \underline{CH}), 74.00 ($2'$ - \underline{CH}), 85.43 ($4'$ - \underline{CH}), 87.95 ($1'$ - \underline{CH}), 99.88 (5 - \underline{CH}), 103.46 ($4a$ - \underline{C}), 122.67 (6 - \underline{CH}), 150.24 ($7a$ - \underline{C}), 151.89 (2 - \underline{CH}), 157.89 (4 - \underline{C}) ppm

Schmelzpunkt: $T_{mp} = 148-150^\circ C^{290}$

2.11 Schutzgruppen für die Oligodesoxynukleotidsynthese

2.11.1 4-(*tert*-Butyl)phenoxyessigsäure als basenlabile Aminoschutzgruppe

2.11.1.1 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäure²⁹¹

10 g (67 mmol) 4-*tert*-Butylphenol und eine Lösung von 3 g (75 mmol) NaOH in 3.3 mL H_2O wurden unter Eiskühlung zusammengegeben. Es bildete sich ein pastenartiges Salz. In einem zweiten Gefäß wurden 19 g (200 mmol) Chloressigsäure zu einer Lösung von 8 g (200 mmol) Natriumhydroxid in 3.3 mL Wasser ebenfalls unter Eiskühlung gegeben, wobei eine stark viskose Flüssigkeit entstand. Die beiden Lösungen wurden vereinigt, weitere 7.5 g (188 mmol) NaOH zugegeben und auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Verfestigen der Substanz (etwa 10 min) wurde noch eine Stunde weiter erhitzt. Nach Abkühlen wurde mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert, der erhaltene Niederschlag in Ether aufgenommen, mit $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und das dabei auskristallisierende Rohprodukt abfiltriert. Es wurde noch einmal angesäuert, mit Ether aufgenommen und anschließend nach Abdestillieren des Lösungsmittels aus Petrolether umkristallisiert, Ausbeute: 8.4 g, 60 % d.Th.

$M = 208.11$ g/mol, $C_{12}H_{16}O_3$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.28$ (s, 9 H, \underline{CH}_3), 4.65 (s, 2 H, $O\underline{CH}_2$), 6.82 (d, 2 H, 2+6-Ar- \underline{H}), 7.25 (d, 2 H, 3+5-Ar- \underline{H}), 10 (s, sehr breit, 1 H, $COO\underline{H}$) ppm. $^3J_{o,m} = 11$ Hz

^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 31.46$, 31.53 (\underline{CH}_3), 64.94 ($O\underline{CH}_2$), 114.12 , 114.75 (2 x 3+5-Ar- \underline{CH}), 126.49 , 126.40 (2 x 4+6-Ar- \underline{CH}), 144.88 (4-Ar- \underline{C}), 155.15 (1-Ar- \underline{C}), 174.81 (\underline{COOH}) ppm

2.11.1.2 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäurechlorid

4.1 g 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäure (*t*BPA) wurden in 20 mL Thionylchlorid (frisch destilliert) gelöst und unter Rückfluß gekocht. Nach Beendigung der Gasentwicklung (HCl) wurde noch eine weitere Stunde unter Rückfluß gekocht. Überschüssiges Thionylchlorid wurde anschließend abdestilliert und der Rückstand fraktioniert destilliert. Bei $142^\circ C$ und etwa 5 Torr Druck traten 3.0 g *t*-BPA als stark viskose, an Luft rauchende Flüssigkeit über. Ausbeute: 3.00 g (67 %). Die Lagerung erfolgte in Stickstoffatmosphäre bei $-20^\circ C$.

M = 226.08 g/mol, C₁₂H₁₅ClO₂

IR (NaCl): 3062, 3043, w, v (Aryl-CH), 2963, s, 2906, m, v_{as,s} (CH₃), 2361, 2341, m, v (OCH₂), 1809, s, v (C=O), 1609, m, 1586, w, 1512, s, v (C=C), 1465, m, δ_{as} (CH₃), 1395, 1365, m, δ_s (C(CH₃)₃), 1224, s, v (C-O-C), 830, s, (Ar-C-H), 758, s, v_{as} (C-Cl), 654, w, v_s (C-Cl)

2.11.2 N²-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxy-trityl)-7-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**57**)

2.11.2.1 N²-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-7-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**56**)

Weg A: (Analog zur Synthese von N²-Phenoxyacetyl-2'-desoxyguanosin²⁹²)

Versuch 1: 107 mg (0.4 mmol) **38** wurden zweimal mit Pyridin koevaporiert und in 2 mL in Kolben 1 suspendiert. Dazu wurden 2.9 mL (2 mmol) TMSCl durch ein Septum gegeben und es wurde 25 min bei RT gerührt. Gleichzeitig wurden 86 mg (0.64 mmol) HOBT mit abs. ACN koevaporiert und nach Suspension in 300 μL abs. ACN und 300 μL abs. Pyridin in Kolben 2 durch ein Septum tropfenweise mit 110 μL (0.6 mmol) *t*BPA-Chlorid versetzt. Anschließend wurde der Inhalt von Kolben 1 mit einer Glasspritze durch ein Septum unter Eiskühlung zu Kolben 2 getropft. Der Ansatz wurde unter Feuchtigkeitsausschluß über Nacht rühren gelassen. Nach Quenchen der Reaktion mit 200 μL Wasser und Desilylieren durch Zugabe von 200 μL konz. NH₃ ergab DC-Kontrolle (LS K), daß fast keine Umsetzung stattgefunden hatte. Das Edukt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (LS L) zurückgewonnen.

Versuch 2: 107 mg (0.4 mmol) **38** wurden zweimal mit Pyridin azeotrop getrocknet und in 2 mL Pyridin suspendiert. Zu der Suspension wurden 5.8 mL (4 mmol) TMSCl durch ein Septum gegeben, und es wurde fünf Stunden bei RT gerührt. DC-Kontrolle zeigte keine vollständige Silylierung. Das Edukt wurde durch Hydrolyse der TMS-Gruppen unter Zugabe von 400 μL Ammoniak, Abdestillieren des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Wasser zurückgewonnen.

Weg B: (Analog zur Synthese von N⁶-Phenoxyacetyl-2'-desoxyadenosin⁷⁹)

100 mg des Nukleosid **38** (0.4 mmol) wurden in 2.5 mL Pyridin suspendiert und mit 700 mg (2.25 mmol) *t*-BPAAanhydrid 90 min bei RT gerührt. DC-Kontrolle (LS K) zeigte vollständige Umsetzung zur peracylierten Verbindung (RF = 0.9). Daraufhin wurde mit 300 μL Wasser gequench, das Produkt in 15 mL Chloroform aufgenommen, mit 5 % NaHCO₃ und H₂O nacheinander gewaschen und nach Trocknen über Na₂SO₄ zur Trockene eingedampft (T ≤

VII. Experimenteller Teil

40°C). Der Sirup wurde mit 10 mL TEA/Pyridin/H₂O (1/1/3) übergossen und bei RT gerührt. Im Minutenabstand wurden DC-Proben genommen. Zu keinem Zeitpunkt aber war eine Anreicherung der N-Acylverbindung zu beobachten. Nach vollständiger Deacylierung wurde das Edukt säulenchromatographisch (Eluent L) zurückgewonnen.

Weg C: (Analog zur Synthese von N²-Isobutyryl-2'-desoxy-guanosin²⁹³)

210 mg (0.79 mmol) des Nucleosides **38** wurden durch Koevaporation mit zweimal 5 mL Toluol und 5 mL abs. DMF getrocknet und in 2.2 mL abs. DMF suspendiert. Es wurde durch ein Septum 1.1 mL HMDS (5.5 mmol, frisch destilliert) zugegeben. Nach etwa 15 min Rühren bei RT erhielt man eine klare Lösung. Nach weiteren 6 h Rühren bei RT war die Silylierung nach DC-Kontrolle quantitativ und dem Reaktionsgemisch wurden 393 mg (0.99 mmol) *t*BPAanhydrid in 2.2 mL abs. Pyridin zugegeben. Auch nach drei Tagen Rühren und portionsweise Zugabe von weiteren 65 µL (0.4 mmol) *t*BPA-Chlorid zeigte DC-Kontrolle keine quantitative Umsetzung. Es wurde nach Zugabe von 200 µL MeOH weitere 3 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle der vollst. Desilylierung), das Lösungsmittel bei T ≤ 40°C abdestilliert, und noch zweimal azeotrop mit Toluol destilliert, um Reste an Pyridin und DMF zu entfernen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit Chloroform und Ether nacheinander extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nach Trocknen über Na₂SO₄ zum Sirup eingengt und nach Lösen in 1 mL DCM in 30 mL Hexan (1 Tropfen Pyridin) präzipitiert. Das erhaltene Rohprodukt, das auf dem DC nur eine einzige zuckerpositive Komponente zeigte, wurde direkt für die anschließende Dimethoxytritylierung eingesetzt.

M = 428.13 g/mol, C₂₀H₂₀N₄O₇

¹H-NMR (250 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.0 (ddd≈m, 1 H, 2'-H_a), 2.35 (ddd≈m, 1 H, 2'-H_b), 3.53 (dd≈m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.80 (m, 1 H, 4'-H), 4.17 (m, 1 H, 3'-H), 4.69 (s, 2 H, OCH₂), 5.08 (d, breit, 1 H, 3'-OH), 6.34 (dd≈m, 1 H, 1'-H), 6.6 (d, 1 H, 5-H), 6.96 (d, 2 H, Ar-H), 7.0 (d, 1 H, 6-H), 7.36 (d, 2 H, Ar-H), 9.08 (s, breit, 1 H, NH), 11.48 (s, 1 H, Ring-NH) ppm. ³J_{5,6} = 3.6 Hz

DC (LS L): R_F = 0.58

VII. Experimenteller Teil

2.11.2.2 N²-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**57**)

Das Rohprodukt von **56** (300 mg) wurde nach mehrmaliger Koevaporation mit Toluol in 5 mL abs. Pyridin gelöst und nacheinander mit 200 mg DMT-Chlorid (0.6 mmol), 100 μ L (0.6 mmol) DIPEA und 3 mg (0.09 mmol) DMAP versetzt. DC-Kontrolle zeigte nach Rühren bei RT über Nacht quantitative Umsetzung. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 500 μ L Wasser beendet. Daraufhin wurden 20 mL NaHCO₃ (5%) zugegeben und das Produkt dreimal mit Essigester extrahiert. Nach Trocknen mit Na₂SO₄ wurde die Lösung im Vakuum bei Temperaturen unter 40 °C zum Sirup eingengt. Die Produktisolierung erfolgte säulenchromatographisch, nach Waschen mit Diethylether, durch Elution mit DCM (0.05 % Pyridin) mit wachsendem Gehalt an MeOH (bis zu 10%). Nach Einengen zum Sirup, Lösen in wenig Chloroform und Kristallisation aus Hexan erhielt man **57** als schwach gelbliches Pulver. Ausbeute: 40 mg (51 μ mol, 7 % über beide Stufen)

M = 786.33 g/mol, C₄₅H₄₆N₄O₉

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.20 (s, 9 H, 3 CH₃), 2.0 (m, 1 H, 2'-H_b), 2.35 (m, 1 H, 2'-H_a), 3.22 (m, 3 H, 5'-H_{a+b} + 4'-H), 3.76 (s, 6 H, OCH₃), 4.17 (m, 1 H, 3'-H), 4.48 (s, 2 H, OCH₂), 5.95 (d, 1 H, 3'-OH), 6.57 (dd, 1 H, 1'-H), 6.63(d, 1 H, 5-H), 6.75-7.45 (m, 17 H, ArH, 6-H), 9.15 (s, 1 H, NH), 11.48 (s, 1 H, Ring-NH) ppm, ³J_{5,6} = 3.6 Hz

¹³C (101 MHz, d₆-DMSO): δ = 31.27 (C(CH₃)₃), 40.40 (2'-CH₂), 54.95 (OCH₃), 63.37 (5'-CH₂), 67.55 (OCH₂), 71.87 (3'-CH), 82.87 (1'-CH), 85.00 (4'-CH), 85.89 (Ar₃C), 100.46 (5-CH), 102.37 (4a-C), 112.97, 113.34 (3+5-Ar_{PhOCH₃}-CH+ m-Ar-CH), 124.77 (4-Ar_{Ph}-CH), 125.20 (6-CH), 126.06 (3+5-Ar_{Ph}-CH), 127.67, 127.84, 128.00, 128.53 (2+6-Ar_{Ph}-CH + 3+5-Ar-CH), 129.85, 129.94 (2+6-Ar_{PhOCH₃}-CH), 137.38, 137.40 (1-Ar_{PhOCH₃}-C), 144.84 (C(CH₃)₃), 145.52 (1-Ar_{Ph}-C), 148.76 (4-C), 149.82 (7a-C), 155.55 (4-Ar-C), 157.74 (2-C), 158.28, 158.46 (4-Ar_{PhOCH₃}-C), 166.64 (C=O) ppm

DC (LS J): R_F = 0.56

Isoliert wurden außerdem die folgenden Nebenprodukte:

VII. Experimenteller Teil

- a $N^2,5'$ -O-Bis(4,4'-dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**59a**)

M = 901.38 g/mol, C₅₄H₅₃N₄O₉

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.95 (ddd, 1 H, 2'-H_b), 2.05 (m, 1 H, 2'-H_a), 3.18 und 3.22 (2 dd \approx m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.7 (s, 12 H, OCH₃), 3.8 (m, 1 H, 4'-H), 4.17 (m, 1 H, 3'-H), 6.08 (dd, 1 H, 1'-H) 6.14(d, 1 H, 5-H), 6.65(d, 1 H, 6-H), 6.75-7.45 (m, 26 H, ArH), 10.4 (s, 1 H, NH) ppm. ³J_{5,6} = 3.6 Hz, DC (LS J): R_F = 0.59

- b 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3*H*)-on (**59b**)

M = 568.23 g/mol, C₃₂H₃₂N₄O₆

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.0 (m, 1 H, 2'-H_b), 2.35 (m, 1 H, 2'-H_a), 3.18 und 3.22 (2 dd, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.76 (s, 6 H, OCH₃), 3.9 (m, 1 H, 4'-H), 4.35 (m, 1 H, 3'-H), 5.3 (s, breit, 3'-OH), 5.85 (dd \approx m, 1 H, 1'-H), 6.0 (s, breit, 2 H, NH₂), 6.15(d, 1 H, 5-H), 6.45(d, 1 H, 6-H), 6.75-7.45 (m, 13 H, ArH), 10.3 (s, 1 H, NH) ppm. ³J_{5,6} = 3.6 Hz

¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ = 40.91 (2'-CH₂), 55.28 (OCH₃), 63.28 (5'-CH₂), 73.26 (3'-CH), 82.87 (1'-CH), 85.00 (4'-CH), 85.9 (Ar₃C), 102.41 (5-CH), 110.33 (4a-C), 114.10 (3+5-Ar_{PhOCH₃}-CH), 124.77 (4-Ar_{Ph}-CH), 125.20 (6-CH), 127.52 (3+5-Ar_{Ph}-CH), 128.58, 128.66 (2+6-Ar_{Ph}-CH), 130.60 (2+6-Ar_{PhOCH₃}-CH), 133.26 (4-Ar_{Bz}-CH), 136.48, 136.99 (1-Ar_{PhOCH₃}-C), 145.74 (1-Ar_{Ph}-C), 150.49 (4-C, 7a-C), 158.91 (2-CH), 159.04 (4-Ar_{PhOCH₃}-C) ppm
DC (LS J): R_F = 0.3

- 2.11.3 N⁴-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxy-trityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**51**)

Methode A:

- 2.11.3.1 4-Amino-7-(2-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**52**)

80 mg (0.3 mmol) **35**, die zuvor dreimal durch azeotropes Destillieren mit Pyridin getrocknet worden waren, wurden in 3 mL abs. Pyridin suspendiert und mit 250 mg (0.75 mmol) DMT-Chlorid, 105 μ L TEA und 1 mg (8 μ mol) DMAP versetzt. Nach 5 h Rühren bei RT (Stickstoffatmosphäre) zeigte die DC-Kontrolle das Ende der Reaktion an.

$M = 552.62 \text{ g/mol}$, $C_{32}H_{32}N_4O_5$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 2.31$ (ddd \approx m, 1 H, $2'$ -H_a), 2.58 (ddd \approx m, 1 H, $2'$ -H_b), 3.38 (m, 2 H, $5'$ -H_{a+b}), 3.71 (2 s, 6 H, OCH₃), 3.96 (m, 1 H, $4'$ -H), 4.39 (m, 1 H, $3'$ -H), 5.35 (d, 1 H, $3'$ OH), 6.66 (m, 1 H, $1'$ -H), 6.74 (d, 1 H, 5-H), 6.9 bis 7.44 (m, 15 H, Ar-H + NH₂), 7.21 (d, 1 H 6-H), 8.16 (s, 1 H, 2-H), 10.92 (s, NH) ppm

DC (LS J): $R_F = 0.35$

2.11.3.2 N^4 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**51**)

Zu dem Reaktionsansatz von **52** wurden 220 μL (1.5 mmol) TMS-Chlorid gegeben. Nach 30 min bei RT wurden 275 μL (1.5 mmol) *t*BPA-Chlorid hinzu getropft und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nun unter Eiskühlung mit 300 μL Wasser versetzt. Nach 5 min wurden 600 μL konz. Ammoniak zugesetzt und weitere 30 min bei RT gerührt. Die Lösung wurde zum Sirup eingengt, in 15 mL DCM aufgenommen, mit 5% wäßriger NaHCO₃ extrahiert und die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet, zum Sirup eingengt, der Sirup in DCM gelöst und durch Zutropfen in Hexan zur Kristallisation gebracht. Nach weiterer säulenchromatographischer Reinigung (Ether, EE, DCM→EtOH) wurde **51** als gelbes Pulver isoliert. Ausbeute 24 mg (10%). Die spektroskopischen Eigenschaften waren identisch mit der nach Methode B gewonnen Verbindung.

DC (LS M): $R_F = 0.80$

Methode B:

2.11.3.3 N^4 -[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**50**)

470 mg (2 mmol) **35** wurden nach mehrmaliger azeotroper Trocknung mit Toluol in 4.4 mL abs. DMF aufgenommen und mit 3.3 mL HMDS versetzt. Nach fünf h Rühren bei RT zeigte DC-Kontrolle quantitative Silylierung und dem Reaktionsgemisch wurden nacheinander 5 mL Pyridin und 1.07 g (2.7 mmol) *t*BPA-Chlorid zugegeben. Nach drei Tagen Rühren bei RT zeigt sich keine vollständige Umsetzung. Zu dem Ansatz wurden 1.4 mL MeOH und nach drei Stunden noch einmal 400 μL konz. NH₃ getropft. Nun wurde 10 mL Eiswasser zugegeben, das Präzipitat mit EE/Hexan (0°C) gewaschen, in EE aufgenommen und mit NaHCO₃ extrahiert, nach Trocknen über Na₂SO₄ zum Sirup eingengt und nach Lösen in DCM durch Zugabe zu Hexan gefällt. Man erhielt 760 mg (92.5% d.Th.) Rohprodukt, das noch stark mit 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäurederivaten verunreinigt war. Ein kleiner Teil wurde zur Bestimmung der Struktur säulenchromatographisch (LS L) gereinigt.

VII. Experimenteller Teil

M = 441.09 g/mol, C₂₃H₂₉N₄O₅

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.35 (s, 9 H, CH₃), 2.3 (dd, 1 H, 2'-H_b), 3.13 (ddd, 1 H, 2'-H_a), 3.82, 3.99 (d, dd, 2 H, 5'-H_{a+b}), 4.19 (m, 1 H, 4'-H), 4.69 (s, 2 H, OCH₂), 4.78 (m, 1 H, 3'-H), 6.34 (dd≈t, 1 H, 1'-H), 6.96 (d, 2 H, Ar-H), 7.07 (d, 1 H, 5-H), 7.22 (d, 1 H, 6-H), 7.36 (d, 2 H, Ar-H), 8.56 (s, 1 H, 2-H), 9.08 (s, breit, 1 H, NH) ppm

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 1.40 (s, 9 H, CH₃), 2.06 (dd, 1 H, 2'-H_b), 2.36 (ddd, 1 H, 2'-H_a), 3.38 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.67 (m, 1 H, 4'-H), 4.21 (m, 1 H, 3'-H), 4.80 (m, 3 H, 5'-OH + OCH₂), 5.13 (d, 1 H, 3'-OH), 6.49 (d, 2 H, 5-H), 6.52 (dd, 1 H, 1'-H), 7.36 (t, 1 H, m-Ar-H), 7.46 (t, 1 H, o-Ar-H), 7.54 (d, 1 H, 6-H), 7.90 (d, 1 H, p-Ar-H), 8.42 (s, 1 H, 2-H), 10.96 (s, breit, 1 H, NH) ppm. ³J_{3'-OH, H-3'} = 4.6, ³J_{5'-OH, H-5'} = 5.6, ³J_{1',2'a} = 9.1, ³J_{1',2'b} = 5.6, ²J_{2'a,2'b} = 13.8, ²J_{5'a,5'b} = 12.8, ³J_{o,m} = 7.6, ⁴J_{o,p} = 9.16, ³J_{5,6} = 3.6 Hz

¹³C-NMR(100 MHz, d₆-DMSO): δ = 31.3 (C(CH₃)₃), 40.24 (2'-CH₂), 63.38 (5'-CH₂), 67.55 (OCH₂), 73.40 (3'-CH), 88.69 (1'-CH), 89.20 (4'-CH), 103.37 (5-CH), 110.95 (4a-C), 113.96, 114.18 (m-Ar-CH), 126.38, 126.57 (o-Ar-CH), 126.90 (6-CH), 145.30 (C(CH₃)₃), 149.44 (4-C, 7a-C), 149.71 (2-CH), 154.46 (p-Ar-C), 166.63 (C=O) ppm

DC (LS J): R_F = 0.55

a N⁴-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl]-7-[2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-*erythro*-pentofuranosyl]7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**51**)

Das aus obiger Reaktion erhaltene Rohprodukt von **50** wurde in 10 mL Pyridin gelöst und nacheinander mit 466 mg (1.4 mmol) DMT-Chlorid, 100 μL DIPEA und 7mg (0.2 mmol) DMAP versetzt. Nach 3 h war eine quantitative Umsetzung zu beobachten. Dem Reaktionsansatz wurden 20 mL 5 % NaHCO₃ zugesetzt, und es wurde dreimal mit insgesamt 50 mL EE extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und nach Einengen im Vakuum der erhaltene Sirup auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Nach Waschen mit Ether und EE, wurde mit DCM eluiert. Nach Umkristallisation aus DCM/Hexan wurde **19** als gelbliche amorphe Substanz erhalten.

Ausbeute: 140 mg (25 % über beide Stufen)

M = 743.22 g/mol, C₄₄H₄₇N₄O₇

MS (FAB): M/z = 743.6 ((M⁺, 30 %), 553.5 (M-tBPA)⁺, 5 %), 439.4 ((M-DMT)⁺, 15 %), 423.4 ((M-DMTO)⁺, 10 %), 325.3 (tBPA-Base⁺, 30 %), 303.3 (DMT⁺, 100%)

VII. Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ = 1.25 (s, 9 H, CH_3), 2.31 (ddd \approx m, 1 H, $2' \text{-H}_b$), 2.58 (ddd \approx m, 1 H, $2' \text{-H}_a$), 3.38 (m, 2 H, $5' \text{-H}_{a+b}$), 3.71 (2s, 6 H, OCH_3), 3.96 (m, 1 H, $4' \text{-H}$), 4.39 (m, 1 H, $3' \text{-H}$), 4.97 (s, 2 H, OCH_2), 5.35 (d, 1 H, $3' \text{OH}$), 6.66 (m, 1 H, $1' \text{-H}$), 6.8 bis 7.4 (m, 31 H, $\text{Ar-H} + 5\text{-H}$), 7.51 (d, 1 H, 6-H), 8.53 (s, 1 H, 2-H), 10.85 (s, 1 H, NH) ppm

$^3\text{J}_{3' \text{-OH}, \text{H-3}'} = 4.1$, $^3\text{J}_{5,6} = 3.6$ Hz

^{13}C (101 MHz, d_6 -DMSO): δ = 31.27 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 40.40 ($2' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 54.95 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 62.82 ($5' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 67.55 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 71.66 ($3' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 83.59 ($1' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 85.44 ($4' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 86.38 ($\text{Ar}_3\underline{\text{C}}$), 104.28 ($5\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 110.33 ($4a\text{-}\underline{\text{C}}$), 112.7, 113.07, 113.91, 114.06 ($3+5\text{-Ar}_{\text{PhOCH}_3}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H} + 3+5\text{-Ar}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 124.77 ($4\text{-Ar}_{\text{Ph}}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 125.20 ($6\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 126.06 ($3+5\text{-Ar}_{\text{Ph}}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 127.71, 128.87 ($2+6\text{-Ar}_{\text{Ph}}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H} + 2+6\text{-Ar}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 129.68 ($2+6\text{-Ar}_{\text{PhOCH}_3}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 136.48, 136.99 ($1\text{-Ar}_{\text{PhOCH}_3}\text{-}\underline{\text{C}}$), 143.21 ($1\text{-Ar}_{\text{Ph}}\text{-}\underline{\text{C}} + \underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 150.49 ($4\text{-}\underline{\text{C}}$, $7a\text{-}\underline{\text{C}}$), 151.24 ($2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 155.55 ($4\text{-Ar}\text{-}\underline{\text{C}}$), 157.97, 157.99 ($4\text{-Ar}_{\text{PhOCH}_3}\text{-}\underline{\text{C}}$), 166.64 ($\text{C}=\text{O}$) ppm

DC (LS M): $R_F = 0.8$

2.11.4 Isobuttersäure und Benzoesäure als Aminoschutzgruppen

2.11.4.1 N^4 -Isobutyryl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on (**47**)

a $\text{N}^2,3'$ -O,5'-O-Tris-isobutyryl-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on (**46**)

503 mg (1.89 mmol) 2'-Desoxy-7-deazaguanosin, **38** wurden in einem 1:1 Gemisch aus abs. Pyridin und frisch destilliertem Isobuttersäureanhydrid gelöst und drei Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend zur Trockene eingeeengt und einer säulenchromatographischen Trennung (LS Q) unterzogen. Man erhielt farblose Nadeln in einer Ausbeute von 770 mg (1.62 mmol, 85.5 % d.Th.)

$M = 476.23$ g/mol, $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_7$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ = 1.00 (s, 6 H, CH_3), 2.34 (ddd, 1 H, $2' \text{-H}_b$), 2.52 (ddd, 1 H, $2' \text{-H}_a$), 2.70 (m, 1 H, CH), 4.09 (m, 1 H, $4' \text{-H}$), 4.15 (m, 2 H, $5' \text{-H}_{a+b}$), 5.21 (d, 1 H, $3' \text{-OH}$), 6.33 (dd, 1 H, $1' \text{-H}$), 6.45 (d, 2 H, 5-H), 7.17 (d, 1 H, 6-H), 11.42 und 11.79 (2 s, 2 H, NH) ppm. $^3\text{J}_{1',2'a} = 9.9$, $^3\text{J}_{1',2'b} = 5.6$, $^2\text{J}_{2'a,2'b} = 13.8$, $^2\text{J}_{5'a,5'b} = 12.8$, $^3\text{J}_{5,6} = 3.6$ Hz

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, d_6 -DMSO): δ = 19.51 - 19.81 (6 $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 33.97 (2 $\text{O}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{C}}\text{H}$), 35.59 ($\text{NHOC}\underline{\text{C}}\text{H}$), 36.75 ($2' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 64.44 ($5' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 75.17 ($3' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 82.08 ($4' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 83.52 ($1' \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 104.25 ($5\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 105.19 ($4a\text{-}\underline{\text{C}}$), 120.02 ($6\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 147.85 ($4\text{-}\underline{\text{C}}$), 148.89 ($7a\text{-}\underline{\text{C}}$), 157.44 ($2\text{-}\underline{\text{C}}$), 176.50, 176.77 (2 $\text{OC}=\text{O}$) 180.85 ($\text{NHC}=\text{O}$) ppm

DC (LS O): $R_F = 0.96$

VII. Experimenteller Teil

b 2-(2-Methylpropanolyamino)-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on (**46**)

Weg A: 1.5 g (3.2 mmol) N², 3'-O, 5'-O-Trisisobutyryl-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on, **44**) wurden in 100 mL Methanol bei 0 °C gelöst und die Lösung wurde mit 2 mol/L NaOH (0 °C) auf pH = 12.5 gebracht. Nach 20 min Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von DOWEXTM X8 (Pyridiniumform) beendet. Die Reaktionslösung wurde filtriert und der Rückstand mit reichlich MeOH gewaschen. Der weiße, amorphe Feststoff, der nach Entfernen des Lösungsmittels zurückblieb, wurde aus Wasser umkristallisiert. Man erhielt 750 mg (2.2 mmol) in weißen, schuppenförmigen Kristallen, entsprechend einer Ausbeute von 70 % d.Th.

Weg B: 100 mg (0.38 mmol) 2'-Desoxy-7-deazaguanosin (**38**) wurden in 5 mL abs. Pyridin gelöst und mit 3 mL frisch destilliertem TMS-Chlorid versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurden zu dem Ansatz 500 μ L frisch destilliertes Isobuttersäureanhydrid durch ein Septum gegeben und es wurde weitere 5 h bei RT bis zum verschwinden des Edukts auf dem DC gerührt. Anschließend wurden zu dem Ansatz 1 mL H₂O und nach 10 min Rühren 0.1 mL konz. NH₃ gegeben und weitere 60 min gerührt. Es konnte nach Säulenchromatographie (LS O) lediglich 60 mg (0.09 mmol, 23.5 % d.Th.) **46** isoliert werden.

M = 336.143369 g/mol, C₁₅H₂₀N₄O₅

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 1.10 (2s, 6 H, CH₃), 2.15 (dd, 1 H, 2'-H_b), 2.34 (ddd, 1 H, 2'-H_a), 2.84 (m, 3 H, CH), 3.55 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.82 (m, 1 H, 4'-H) 4.29 (m, 1 H, 3'-H), 4.79 (t, 1 H, 5'-OH), 5.23 (d, 1 H, 3'-OH), 6.45 (dd, 1 H, 1'-H), 6.55 (d, 2 H, 5-H), 7.25 (d, 1H, 6-H), 8.56 (s, 1 H, 2-H), 9.08 (s, breit, 1H, NH) ppm

³J_{1',2'a} = 9.1, ³J_{1',2'b} = 5.6, ²J_{2'a,2'b} = 13.8, ²J_{5'a,5'b} = 12.8, ³J_{o,p} = 9.16, ³J_{5,6} = 3.6 Hz

¹³C-NMR(101 MHz, d₆-DMSO): δ = 19.76, 19.78 (CH₃), 35.60 (CH), 40.52 (2'-CH₂), 62.73 (5'-CH₂), 73.75 (3'-CH), 83.30 (4'-CH), 88.02 (1'-CH), 103.77 (5-CH), 104.86 (4a-C) 120.40 (6-CH), 147.63 (4-C), 148.33 (7a-C), 157.49 (2-C), 180.78 (C=O) ppm

UV (Methanol): λ_{\max} = 219, 272, 288 nm, DC (LS O): R_F = 0.33

VII. Experimenteller Teil

c 2-(2-Methylpropanoylamino)-7-[2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) β -D-erythro-pentofuranosyl]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on (**47**)

750 mg (2.2 mmol) N²-Isobutyryl-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on, **46** wurden durch zweimalige Koevaporation mit abs. Pyridin getrocknet und in 15 mL abs. Pyridin aufgenommen. Nach Zugabe von 750 μ L DIPEA und 1.0 g (3.0 mmol, 1.35 Eq) DMT-Chlorid wurde die Reaktionslösung 3 h bei RT gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 70 mL 5 % wäßriger NaHCO₃ beendet. Nach Extraktion mit EE, Trocknen der wäßrigen Phase und Abdestillieren des Lösungsmittels und anschließender säulenchromatographischer Reinigung (LS C, dem einige Tropfen Pyridin zugegeben wurden) erhielt man 1.2 g (2.0 mmol, 92.5 % d. Th.) einer schwachgelben, schaumigen Substanz.

M = 638.27 g/mol C₃₆H₃₈N₄O₇

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.23 (2d, 6 H, ib-CH₃), 2.32 (ddd \approx m, 1 H, 2'-H_b), 2.44 (ddd \approx m, 1 H, 2'-H_a), 3.0 (m, 1 H, ib-CH), 3.38 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.79 (s, 6 H, OCH₃), 4.03 (m, 1 H, 4'-H), 4.55 (m, 1 H, 3'-H), 6.66 (m, 1 H, 1'-H), 6.72 (d, 1 H, 5-H), 6.82 (pseudo t von d, 4 H, 3+5-Ar_{OCH₃}-H), 7.10 (dd, 1 H, 6-H), 7.20 bis 7.34 (m, 7 H, 4+6-Ar_{OCH₃}-H, 4+6-Ar-H und p-Ar-H), 7.42 (m, 2 H, 3+5-Ar-H) 11.71 und 12.89 (2s, 2 H, Ring-NH und NH) ppm

¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ = 19.44, 19.54 (ib-CH₃), 36.11 (ib-CH), 39.64 (2'-CH₂), 55.23 (OCH₃), 63.82 (5'-CH₂), 72.56 (3'-CH), 83.31 (1'-CH), 85.33 (4'-CH), 86.72 (Ar₃C), 103.25 (5-CH), 107.45 (4a-C), 113.25 (Ar-CH), 119.46 (6-CH), 127.02 (3+5-Ar_{Ph}-CH), 127.96, 128.19 (2+6-Ar_{Ph}-CH), 130.10 (2+6-Ar_{PhOCH₃}-CH), 135.69 (1-Ar_{PhOCH₃}-C), 144.56 (4-C), 148.34 (7a-C), 158.66 (2-C), 160.96 (4-Ar_{PhOCH₃}-C), 179.65 (C=O) ppm

IR: 844.6, 1034.7, 1066.3, 1091.8, 1152.9, 1179.9, 1250.61, 1297.0, 1353.6, 1384.4, 1426.2, 1443.7, 1464.6, 1509.3, 1606.2, 1673.4, 1725.4, 2837.7, 1908.9, 2935.3, 2975.1, 3407.1, 3425.5

UV (Wasser, DMSO, 2:1): λ_{\max} = 230, 237, 275, ϵ_{260} = 11.907 cm²/mol

DC (LS M): R_F = 0.8

VII. Experimenteller Teil

- 2.11.4.2 4-(Benzoylamino)-7-(2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin
- a 4-(Benzoylamino)-7-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin, **42**

1.5 g (6.0 mmol) 7-Deaza-2'-desoxyadenosin, **35** wurden durch zweimalige Koevaporation mit Pyridin getrocknet, anschließend in 40 mL abs. Pyridin gelöst und durch ein Septum mit 10 mL frisch destilliertem TMS-Chlorid versetzt. Nach zwei Stunden wurde 1 mL frisch destilliertes Benzoylchlorid zugegeben und es wurde unter Luftausschluß über Nacht weiter bei RT gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde erst mit 5 mL Wasser und nach 10 min Rühren bei RT mit 10 mL konz. NH₃ versetzt. Die wäßrige Phase wurde mit EE extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert. Anschließend wurde entweder an Kieselgel (LS O) oder an XAD-4 (LS R) säulenchromatographisch getrennt. Die Ausbeute betrug 1.8 g (5.1 mmol, 84.7 % d.Th.)

M = 354.13 g/mol, C₁₈H₁₈N₄O₄

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.06 (dd, 1 H, 2'-H_b), 2.36 (ddd, 1 H, 2'-H_a), 3.38 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.67 (m, 1 H, 4'-H), 4.21 (m, 1 H, 3'-H), 4.80 (t, 1 H, 5'-OH), 5.13 (d, 1 H, 3'-OH), 6.49 (d, 2 H, 5-H), 6.52 (dd, 1 H, 1'-H), 7.36 (t, 2 H, 3+5-Ar-H), 7.46 (t, 1 H, 4-Ar-H), 7.54 (d, 1 H, 6-H), 7.90 (d, 2 H, 2+6-Ar-H), 8.42 (s, 1 H, 2-H), 10.96 (s, breit, 1 H, NH) ppm. ³J_{3'-OH, H-3'} = 4.6, ³J_{5'-OH, H-5'} = 5.6, ³J_{1',2'a} = 9.1, ³J_{1',2'b} = 5.6, ²J_{2'a,2'b} = 13.8, ²J_{5'a,5'b} = 12.8, ³J_{o,m} = 7.6, ³J_{5,6} = 3.6 Hz

¹³C-NMR(101 MHz, d₆-DMSO), δ = 40.40 (2'-CH₂), 62.82 (5'-CH₂), 71.88 (3'-CH), 83.68 (1'-CH), 88.23 (4'-CH), 104.18 (5-CH), 110.35 (4a-C), 125.40 (6-CH), 129.30, 129.34 (2+6-, 3+5-Ar-CH), 133.25, (4-Ar-CH), 147.63 (4-C), 148.33 (7a-C), 151.96 (1-Ar-C), 153.01 (2-CH), 166.63 (C=O) ppm

UV (Wasser): λ_{\max} = 206, 222 (Schulter), 301 nm

DC (LS O): R_F = 0.31

VII. Experimenteller Teil

b 4-(Benzoylamino)-7-(2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (43)

1.8 g (5.1 mmol) N⁴-Benzoyl-7-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin, **42** wurden durch zweimalige Koevaporation mit abs. Pyridin getrocknet und in 40 mL abs. Pyridin aufgenommen. Nach Zugabe von 1.8 mL DIPEA und 2.6 g (7.7 mmol, 1.75 Eq) DMT-Chlorid wurde die Reaktionslösung 3 h bei RT gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 70 mL 5 % wäßriger NaHCO₃ beendet. Nach Extraktion mit EE, Trocknen der wäßrigen Phase und Abdestillieren des Lösungsmittels erhielt man 10 g eines Sirup, der säulenchromatographisch (LS DCM/Aceton 75:25 → 70:30, dem einige Tropfen Pyridin zugegeben wurden) gereinigt wurde. Die Ausbeute betrug 2.9 g (4.4 mmol, entsprechend 86 % d. Th.).

M = 656.26 g/mol, C₃₉H₃₆N₄O₆

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ = 2.24 (ddd \approx m, 1 H, 2'-H_b), 2.53 (ddd, 1 H, 2'-H_a), 3.09 (m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.63 (s, 6 H, OCH₃), 3.89 (m, 1 H, 4'-H), 4.32 (m, 1 H, 3'-H), 5.30 (d, 1 H, 3'-OH), 6.58 (d, 1 H, 5-H), 6.62 (m, 1 H, 1'-H), 6.76 (dd, 4 H, 3+5-Ar_{PhOCH₃}-H), 7.15 (m, 8 H, 2+6-Ar_{PhOCH₃}-H, 2+6-, 3+5-Ar_{Ph}-H), 7.29 (m, 1 H, 4-Ar_{Ph}-H), 7.36 (t + d, 3 H, 3+5-Ar_{Bz}-H + 6-H), 7.46 (m, 1 H, 4-Ar_{Bz}-H), 7.98 (d, 1 H, 2+6-Ar_{Bz}-H) 8.51 (s, 1 H, 2-H), 11.07 (s, breit, 1 H, NH) ppm.

³J_{1',2'a} = 6.6, ³J_{1',2'b} = 3.5, ²J_{2'a,2'b} = 13.7, 3J_{3'-OH,3'-H} = 4.0, J_{4',5'} = 4.6, ²J_{5'a,5'b} = 12.8, ³J_{5,6} = 4.0, ³J_{m,p-ArBz} = 7.6, ³J_{m,p-ArPh} = 6.5 Hz

¹³C (101 MHz, d₆-DMSO): δ = 40.40 (2'-CH₂), 55.87 (OCH₃), 65.04 (5'-CH₂), 71.66 (3'-CH), 83.59 (1'-CH), 86.22 (4'-CH), 86.38 (Ar₃C), 104.28 (5-CH), 110.33 (4a-C), 113.64, 114.02 (3+5-Ar_{PhOCH₃}-CH), 124.77 (4-Ar_{Ph}-CH), 125.20 (6-CH), 127.52 (3+5-Ar_{Ph}-CH), 128.58, 128.66 (2+6-Ar_{Ph}-CH), 129.31, 129.34 (2+6-, 3+5-Ar_{Bz}-CH), 130.60 (2+6-Ar_{PhOCH₃}-CH), 133.26 (4-Ar_{Bz}-CH), 136.48, 136.99 (1-Ar_{PhOCH₃}-C), 145.74 (1-Ar_{Ph}-C), 150.49 (4-C, 7a-C), 151.24 (2-CH), 152.00 (1-Ar_{Bz}-C), 158.91 (4-Ar_{PhOCH₃}-C), 166.64 (C=O) ppm

DC (LS J): R_F = 0.68

UV (Wasser, pH = 8): λ_{\max} = 274 (sehr breit), 315 nm

2.12 Synthese von Phosphoamiditen

Das geschützte Nucleosid wurde über Nacht am Ölpumpenvakuum getrocknet und zur Entfernung letzter Feuchtigkeitsreste unmittelbar vor der Reaktion noch zweimal mit THF azeotrop getrocknet. Unter Argonatmosphäre wurden die Verbindungen in frisch destilliertem abs. THF (7.5 mL/mmol) gelöst und durch ein Septum mit DIPEA (3.0 Eq) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde auf einem Eisbad gekühlt, anschließend wurde Monochloro-*N,N*-dialkylamino- β -cyanoethoxyphosphin²⁹⁴ (2.0 Eq) durch eine Glasspritze hinzugegeben. 10 min später wurde das Eisbad entfernt. Das Reaktionsende wurde per DC-Kontrolle ermittelt. Anschließend wurde von festem Aminhydrochlorid unter Argon abfiltriert, die klare Lösung konzentriert und der Rückstand in stickstoffgesättigtem EE aufgenommen und mit 10 % (w/v) Natriumcarbonat-Lösung (frisch hergestellt und mit N₂ entgast) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und nach Abziehen des Lösungsmittels säulenchromatographisch mit Argon-Überdruck gereinigt (Elution mit LS N). Die Fraktionen wurden unter Argon auffangen.

7.2.12.1 4-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl-amino]-5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)-phenylmethyl]-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphoamidito]-adenosin (**63**)

Nach der Standardphosphitylierungsprozedur wurden 140 mg (0.2 mmol) **60** umgesetzt. Ausbeute: 107 mg (60 %, Lit.: 50-90%²⁹⁵)

M = 945.09 g/mol, C₅₂H₆₃N₇O₈P

³¹P-NMR(CD₃CN): δ = 149.47, 149.35 ppm (zwei Signale der beiden diastereomeren Phosphoamiditderivate).

DC(LS N): R_F = 0.85 (zwei Spots der beiden Diastereomeren)

7.2.12.2 4-[4-(*tert*-Butyl)phenoxyacetyl-amino]-7-{5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)-phenylmethyl]-2'-desoxy-3'-O-[(*N,N*-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**62**)

Nach der Standardphosphitylierungsmethode wurden 140 mg (0.2 mmol) **51** umgesetzt. Ausbeute: 98 mg (55 %).

M = 944.10 g/mol, C₅₃H₆₄N₆O₈P

VII. Experimenteller Teil

^{31}P -NMR(CD_3CN): $\delta = 149.35, 149.24$ ppm (zwei Signale der beiden diastereomeren Phosphoamiditderivate).

DC (Laufmittel N): $R_F = 0.95$ (keine Auflösung der Diastereomere zu sehen)

7.2.12.3 4-(Benzoylamino)-7-{5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-desoxy-3'-O-[(N,N-diisopropylamino)-(β -cyanoethoxy)-phosphoamidito]- β -D-erythro-pentofuranosyl]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (61)

Nach der Standardphosphitylierungsprozedur wurden z.B. 1.13 g (1.5 mmol) **43** mit 500 μL Monochloro-N,N-dialkylamino- β -cyanoethoxyphosphin (2.25 mmol, 1.5 Eq) umgesetzt. Ausbeute: 1.35 g (94 % d.Th.)

$M = 856.96$ g/mol, $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_7\text{P}$

^1H -NMR (400 MHz, CD_3CN): $\delta = 1.12, 1.22$ (d, m, 12 H, iPr- CH_3), 2.57 (ddd \approx t, $J = 6.02$ Hz, 2 H, 2'- H_b + CH_aCN), 2.68 (m, $J = 5.95$, 1 H, CH_bCN), 2.82 (m, 2 H, 2'- H_a), 3.27 (m, 2 H, 5'- H_{a+b}), 3.41 (m, 2 H, iPr-CH), 3.72 (m, 1 H, POCH_a) 3.77, 3.78 (2 s, 6 H, OCH_3), 3.92 (m, 1 H, POCH_b), 4.19 (m, 1 H, 4'- H), 4.80 (m, 1 H, 3'- H), 6.74 (ddd, 1 H, 1'- H), 6.84 (m, 4 H, 3+5- $\text{Ar}_{\text{PhOCH}_3}$ - H) 6.89 (d, 1 H, 5- H), 7.25 - 7.34 (t + 2 m, 7 H, 2+6- Ar_{Ph} - H + 4- Ar_{Ph} - H + 2+6- $\text{Ar}_{\text{PhOCH}_3}$ - H , $J = 7.8$), 7.44 (m, 3 H, 3+5- Ar_{Ph} - H + 6- H), 7.57 (m, 2 H, 3+5- Ar_{Bz} - H), 7.67 (m, 1 H, 4- Ar_{Bz} - H), 8.04 (d, 1 H, 2+6- Ar_{Bz} - H), 8.55 (d, 1 H, 2- H) ppm

$^3J_{1',2'a} = 6.9$, $^3J_{1',2'b} = 3.5$, $^3J_{5,6} = 3.88$, $^3J_{m,p-\text{ArBz}} = 7.6$, $^3J_{m,p-\text{ArPh}} = 7.2$, $^3J_{o,m-\text{OCH}_3-\text{Ar}} = 7.9$, $^4J_{\text{OCH}_3-\text{Ar}} = 1.9$, $^5J_{\text{OCH}_3-\text{Ar}} = 1.0$, $^4J_{p,o-\text{Ar}} = 1.7$ Hz

^{13}C (101 MHz, CD_3CN): $\delta = 19.71$ (CH_2CN), 23.51, 23.55, 23.63 (iPr- CH_3), 38.44, 38.64 (2'- CH_2), 42.65, 42.77 (iPr-CH), 54.56 (OCH_3), 58.03, 58.30 (POCH_2), 63.16, 63.30 (5'- CH_2), 72.68, 73.36 (3'-CH), 83.03, 83.09 (1'-CH), 85.74 (4'-CH), 86.18 (Ar_3C), 103.76 (5-CH), 108.80 (4a-C), 112.69 (Ar-CH), 126.47 (6-CH), 127.47, 127.67 (3+5- Ar_{Ph} -CH), 127.85 (2+6- Ar_{Ph} -CH), 128.28 (2+6-, 3+5- Ar_{Bz} -CH), 129.71, 129.74 (2+6- $\text{Ar}_{\text{PhOCH}_3}$ -CH), 132.17 (4- Ar_{Bz} -CH), 135.51, 135.55 (1- $\text{Ar}_{\text{PhOCH}_3}$ -C), 144.77 (1- Ar_{Ph} -C) 149.42 (4-C + 7a-C), 149.42 (2-CH), 157.0 (4- $\text{Ar}_{\text{PhOCH}_3}$ -C), 158.57 (C=O) ppm

^{31}P -NMR(CD_3CN): $\delta = 149.26, 149.39$ ppm (zwei Signale der beiden diastereomeren Phosphoamiditderivate)

DC(LS N): $R_F = 0.75, 0.88$ (zwei Spots der beiden Diastereomeren)

VII. Experimenteller Teil

7.2.12.3.1 2-(2-Methylpropanoylamino)-7-{5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-desoxy-3'-O-[(N,N-diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)-phosphanyl]- β -D-erythro-pentofuranosyl}pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (64)

Nach der Standardphosphitylierungsmethode wurde bei Umsetzung von 1.0 g (1.57 mmol) **47** mit 500 μ L Monochloro-*N,N*-dialkylamino- β -cyanoethoxyphosphin (2.25 mmol, 1.4 Eq) i.d.R. eine Ausbeute von 1.1 g (1.3 mmol, 82.8 % d.Th.) erzielt.

M = 838.38 g/mol, C₄₅H₅₅N₆O₈P

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): δ = 1.19, 1.21 (2 d, 6 H, iPr-CH₃), 1.30 (m, 12 H, ib+iPr-CH₃), 2.31 (ddd \approx m, 1 H, 2'-H_b), 2.80 (m, 2 H, 2'-H_a + CH₂CN), 3.00 (m, 2 H, ib-CH, CH₂CN), 3.35(m, 2 H, 5'-H_{a+b}), 3.75 (m, 2 H, iPr-CH), 3.82 (m, 2 H, POCH₂), 3.90 und 3.91 (2 s, 6 H, OCH₃), 4.20 (m, 1 H, 4'-H), 4.76 (m, 1 H, 3'-H), 6.60 (ddd = pseudo-t, 1 H, 1'-H), 6.68 (d, 1 H, 5-H), 7.03 (pseudo t von d, 4 H, 3+5-Ar_{PhOCH₃}-H), 7.30 (dd, 1 H, 6-H), 7.37 bis 7.48 (m, 7 H, 2+6-Ar_{PhOCH₃}-H, 2+6-Ar_{Ph}-H und 4-Ar_{Ph}-H), 7.54 (pseudo t von d, 2 H, 3+5-Ar_{Ph}-H), 11.71 und 12.05 (s, breit, 1 H, NH und Ring-NH) ppm, ³J_{CH₃,OCCH} = 6.7 Hz, ³J_{5,6} = 3.6 Hz, ³J_{o,m-OCH₃-Ar} = 8.2 Hz, ⁴J_{OCH₃-Ar} = 1.9 Hz, ⁵J_{OCH₃-Ar} = 1.0 Hz ³J_{Ar} = 8 Hz, ⁴J_{p,o-Ar} = 1.7 Hz

¹³C (101 MHz, d₆-DMSO, CD₃CN): δ = 19.26, 19.28 (ib-CH₃), 20.15 (CH₂CN), 24.53, 24.62, 24.69, 24.75 (iPr-CH₃), 35.08 (ib-CH), 38.44, 38.64 (2'-CH₂), 42.82, 42.86, 42.93, 42.98 (iPr-CH), 55.38 (OCH₃), 58.59, 58.65, 58.78 (POCH₂), 63.90 (5'-CH₂), 73.88 (3'-CH), 82.66, 82.80 (1'-CH), 84.84 (4'-CH), 86.38 (Ar₃C), 102.62 (5-CH), 107.42 (4a-C), 113.49 (4-Ar-CH), 119.46 (6-CH), 127.08 (3+5-Ar_{Ph}-CH), 128.00, 128.06 (2+6-Ar_{Ph}-CH), 130.03, 130.07 (2+6-Ar_{PhOCH₃}-CH), 136.99 (1-Ar_{PhOCH₃}-C), 146.51 (4-C+1-Ar_{Ph}-C), 148.34 (7a-C), 157.3 (2-C), 158.91 (4-Ar_{PhOCH₃}-C), 180.78 (C=O) ppm

³¹P-NMR (CD₃CN): δ = 149.37, 149.22 ppm (zwei Signale der beiden diastereomeren Phosphoamiditderivate)

DC (LS N): R_F = 0.64 (keine Auflösung der Diastereomere zu sehen)

7.3 Chemische Synthese von Oligodesoxynukleotiden

7.3.1 Verwendete Chemikalien

Sämtliche Materialien wurden in der vom Hersteller gelieferten Reinheit (DNA Synthesis grade) verwendet.

7.3.1.1 Trägermateriale

LcAA-CPG, MWG Biotech

Universal Support 500, 31 $\mu\text{mol/g}$ Beladungsdichte, Eurogentec

DMT-Thymidin-CPG und DMT-Guanosin-CPG (500 Å, Beladung: 34 $\mu\text{mol/g}$)

7.3.1.1.1 Amidite

7-deaza-dA und 7-deaza-dG-CE Phosphoramidit wie oben beschrieben synthetisiert, zusätzlich als Vergleichssubstanzen: 5-Dimethoxytrityl- N^2 -dimethylaminomethyliden-7-deaza-2'-desoxyguanosin, 3-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit, $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}$, Fa. Eurogentec und c^7G -Amidit, $\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$, Chembiotech (Prof. Seela)

2'-Fluoro-Ac-C-CE Phosphoramidit (5'-Dimethoxytrityl-N-acetyl-2'-fluoro-2'-desoxycytidin, 3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit) $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{FN}_5\text{O}_8\text{P}$, Fa. Eurogentec
Biotin-Amidit, A-, C-, G- und T-Phosphoramidit, Fa. PerSeptive Biosystems (Perkin Elmer)
Adenin und Cytidin waren N^4 - bzw. N^6 -benzoyliert, während Guanin N^2 -isobutyryliert war.

7.3.1.2 Synthesizerchemikalien

Pro Zyklus werden benötigt:

Acetonitril, Fa. Roth, Fa. Eurogentec

Activator-Solution (1H-Tetrazol in Acetonitril), PerSeptive Biosystems

Cap A (Essigsäureanhydrid in THF), PerSeptive Biosystems

Cap B (N-Methylimidazol in THF), PerSeptive Biosystems

Deblocksolution (DCA oder TCA in DCM), PerSeptive, Eurogentec, Biosyntech, Hamburg

Oxidizer Solution (Iod in Pyridin und THF), Fa. PerSeptive Biosystems

(1S)-(+)-(10-Camphersulfonyl)oxaziridin, Fa. Aldrich, Ser. No. 34,535-0

Reaktionssäulen inkl. Filtermembrane, Fa. Eurogentec

7.3.2 Festphasensynthese von Oligonukleotiden

Für die Synthese werden entweder mit, mit einem DMT-Nukleosid beladenem, CPG befüllte Fertigsäulen eingesetzt oder es wird das CPG in jeweils für die Größe des Reaktionsansatzes passend dimensionierte Säulen eingewogen. Zur Kontrolle des Syntheseerfolges wird die am Beginn eines jeden Zyklus erfolgende Detritylierung des am Träger befindlichen Oligonukleotides vom Synthesizer selbsttätig photometrisch (498 nm) quantifiziert. Die Synthese eines 17-mer Oligonukleotides nach Standardprotokoll dauert am Milligen-Synthesizer etwa 3.5 h, an dem von Pharmacia etwa eine Stunde. Bei Einsatz von 7-Deazaamiditen erfolgte die Oligonukleotidsynthese unter Verwendung eines „sulfurization cycles“, bei dem nach Zufuhr der Lösung des Oxidationsmittels auf die Säule ein Wartezeit von drei Minuten in das Programm eingefügt wurde. Für Biotin-Amidite wurde die Kopplungszeit auf 10 Minuten, für 2'-Fluoro-C-Amidite sogar auf 15 Minuten verlängert.

7.3.2.1 Nichtwäßrige Oxidation mit 10-Camphersulfonyl-Oxaziridin

1 g (1S)-(+)-(10-camphersulfonyl)oxaziridin wurden in 8.72 mL Acetonitril für die DNA-Synthese in Argonatmosphäre gelöst, um eine 0.5 mol/L Lösung zu erhalten. Nach vollständigem Auflösen des Feststoffes wurde die Lösung in einer Spritze aufgenommen und durch ein lösungsmittelresistentes Filter (0.22 - 0.45 μm), das auf die Spitze der Spritze gesteckt wurde, in eine mit einem Septum verschlossene Flasche für den DNA-Synthesizer gegeben.

7.3.3 Abspaltung vom Träger und Basenentschützung

Das CPG wurde 30 min mit 500 μL 32%iger Ammoniak-Lösung behandelt. Hierbei erfolgte Entschützung am P-Atom (Eliminierung der Cyanoethyl-Gruppe), und die Oligonukleotide wurden vom Trägersupport abgespalten. Die Lösung (Feststoffe wurden von den Membranen, die die Synthesensäulen verschlossen, zurückgehalten) wird in ein 500 μL Eppendorftube überführt. Zur Abspaltung der Capping-, Isobutyryl-, Benzoyl-Gruppen wurde 20 h bei 55 °C inkubiert. Die Zeit zur vollständigen Entschützung von Oligonukleotiden, die 7-Deazapurinnukleotide enthalten, betrug ca. 36 h bei 55 °C oder 100 h bei RT. Das Öffnen der Eppendorftubes infolge des entstehenden Überdruckes wurde durch Einschrauben in eine Metallfassung unterbunden. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung zunächst auf -70 °C abgekühlt, um Überführungsverluste durch Verspritzen durch ausgasendes Ammoniak zu vermeiden. Bei Synthesen an Universal Support CPG, wurde ein Gemisch von konz. Ammoniak/40 % Methylamin in Wasser (1:1, v/v) verwendet. Die Abspaltung des Oligonukleotides vom Träger, sowie die Abspaltung der Basenschutzgruppen erfolgte dann analog zu den oben beschriebenen Bedingungen.

7.3.4 Detritylierung

Alle Oligodesoxynukleotide wurden DMT-on synthetisiert, d. h. unter verbleib der DMT-Schutzgruppe an der 5'-OH-Funktion des letzten Nukleotides der entstandenen Sequenz. Die mit CPG gepackten Säulen wurden, wenn keine RP-HPLC Aufreinigung erfolgen sollte, nach Beendigung des letzten Synthese-Zyklus für 15 min mit zwei mL 2% DCA/DCM (w/v) behandelt, um die 5'-OH Gruppen der am Träger befindlichen Oligonukleotide zu detritylieren. Anschließend wurde mit 20 mL Acetonitril gewaschen, um Reste von DCA zu beseitigen. Andernfalls erfolgte die Detritylierung nach der Aufreinigungsprozedur, indem 100 µL einer wässrigen Lösung des Oligonukleotides mit 100 µL 80 % Essigsäure vermischt und 30 min bei RT stehen gelassen wurde. Zur Reinigung wurde anschließend eine *tert*-Butanol-fällung durchgeführt.

7.3.5 1-Butanol-Fällung

Durch Fällen der Oligonukleotide in 1-Butanol wurde von organischen Nebenprodukten abgetrennt. Dazu wurde mit dem vierfachen Volumen 1-Butanol versetzt und nach gründlichem Durchmischen der Lösung (Vortex) 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde vom erhaltenen Pellet abpipettiert. Noch verbleibendes Lösungsmittel wurde mit Hilfe einer Speedvac-Zentrifuge am Wasserstrahlpumpenvakuum bei 40 °C entfernt.

7.3.6 Reinigung der synthetisierten Oligonukleotide

Die Aufreinigung der vom Trägersupport abgespaltenen Oligodesoxynukleotide erfolgte nach Abspaltung der Schutzgruppen bei DMTon Oligonukleotiden mit Hilfe der RP-HPLC, wie unter 1.6 beschrieben, oder bei einfachen Trennproblemen mit Hilfe sogenannter Oligonucleotide Purification Catridges (OPC™, Fa. Applied Biosystems). Hierzu wurden die Säulen zuerst mit 5 mL ACN, gefolgt von 5 mL 2 mol/L TEAA gewaschen und anschließend die 1:1 mit Reinstwasser verdünnte ammoniakalische, oligonukleotidhaltige Lösung über die Säule gegeben. Hierbei durfte die Tropfgeschwindigkeit am Säulenauslass nicht mehr als 1 mL/min betragen. Die aufgefangene Lösung wurde nochmals auf die Säule gegeben. Rumpfsequenzen wurden nun mit 1.5 mol/L Ammoniak, gefolgt von 10 mL Reinstwasser eluiert. Die Oligonukleotide konnten nun entweder noch auf der Säule befindlich detrityliert werden. Oder sie wurden als DMT-on Oligo mit 1 mL 40 % ACN in 100 mmol/L TEAAc, pH 7.0 eluiert. Die erhaltenen Lösungen wurden lyophilisiert, in 5 % ACN, 100 mmol/L TEAAC aufgenommen und mittels UV-Spektroskopie quantifiziert.

7.3.7 Quantifizierung

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden wurden mit folgenden Inkrementen berechnet: G 11.7, A 15.4, T 8.8 und C 7.3 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$. Der Extinktionskoeffizient von USP ergab sich so zum Beispiel zu $\epsilon_{\text{USP}} = 197.7 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$. Bei modifizierten Oligonukleotiden wurde der berechnete Extinktionskoeffizient des unmodifizierten Oligonukleotides als Näherungswert verwendet. Die Reinheit von DNA kann durch die Bestimmung des Quotienten der Extinktionen bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm abgeschätzt werden. Ein Wert von größer 1.8 deutet eine für biochemische Reaktionen ausreichende Reinheit an. Die Bestimmung dieses Wertes war bei 7-deazamodifizierten Oligonukleotiden allerdings so nicht möglich, da hier das Absorptionsmaximum bis 275 nm verschoben war.

7.3.8 Synthetisierte Sequenzen

USP

3'-TGA CCG GCA GCA AAA TG-DMT

2'F,c⁷-Protokoll, I₂-Ox, 1.0 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 1.54 * 10^6$, $E_{16.\text{Kopplung}} = 1.27 * 10^6$

Standard-Protokoll, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 1.08 * 10^6$, $E_{16.\text{Kopplung}} = 1.04 * 10^6$

Deaza-Protokoll, CSO-Ox, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 1.28 * 10^6$, $E_{16.\text{Kopplung}} = 1.00 * 10^6$, $\lambda_{\text{min}} = 228$ nm, $\lambda_{\text{max}} = 257$ nm, $M_{\text{calc}} = 5228.40$ u, $M_{\text{found}} = 5230.19$ u, m/fwhm = 953 (DE-MALDI)

7-deaza-USP

3'-Tc⁷Gc⁷A CCc⁷G c⁷Gc⁷A c⁷Gc⁷A c⁷Ac⁷Ac⁷A Tc⁷G-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 8.32 * 10^5$, $E_{16.\text{Kopplung}} = 6.47 * 10^5$, $M_{\text{calc}} = 5236.5$ u, $M_{\text{found}} = 5219.3$ u, m/fwhm = 189

Biotin-7-deaza-USP

3'-Tc⁷Gc⁷A CCc⁷G c⁷Gc⁷A c⁷Gc⁷A c⁷Ac⁷Ac⁷A Tc⁷G-Biotin-DMT

Deaza Protokoll mit ext. couple A+G, red. CSO, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 9.07 * 10^5$, $E_{17.\text{Kopplung}} = 5.41 * 10^5$, $M_{\text{found}} = 5860.56, 5757.81, 5658.06, 5529.55$ u

0.2 μmol Scale, (Deaza Protokoll, ext. couple, iodine-oxidation) 500 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 5.73 * 10^5$, $E_{17.\text{Kopplung}} = 3.90 * 10^5$, $M_{\text{calc (ohne Biotin)}} = 5236.5$, $M_{\text{found}} = 5213.7$

2'-Fluoro-C,7-Deaza-A+G-USP

3'-Tc⁷Gc⁷A_{2'F} C_{2'F}Cc⁷G c⁷G_{2'F}Cc⁷A c⁷G_{2'F}Cc⁷A c⁷Ac⁷Ac⁷A Tc⁷G-DMT

2'F,c⁷-Protokoll, 1 μmol Scale, Deaza-Protokoll, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.32 * 10⁶, E_{16.Kopplung} = 7.85 * 10⁵

2'F,c⁷-Protokoll, 1 μmol Scale, Deaza-Protokoll, 500 Å DMT-lcaa-T-CPG, M_{found} = 5308.6, 4988.5, 4747.1 2'F,c⁷-Protokoll, 50 nmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 6.76 * 10⁶, E_{16.Kopplung} = 5.90 * 10⁵, λ_{min} = 218, λ_{max} = 263

1.0 μmol Scale, Amidite an modification ports, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.57 * 10⁶, E_{17.Kopplung} = 4.38 * 10⁵ M_{calc} = 5230 u, M_{found} = 5230.19, 5094.22 u

Bio-GOF

3'-GTA CCT GAC ACC AGT ACT CAG GAA Bio-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-G-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.07 * 10⁵, E_{24.Kopplung} = 9.63 * 10⁵, λ_{min} = 228 nm, λ_{max} = 258 nm, M_{calc} = 7331 u, M_{found} = 7336 u, m/fwhm = 193

Bio-CFEx10F48Deaza

3'-Tc⁷Ac⁷A c⁷Ac⁷Ac⁷G c⁷Ac⁷Ac⁷A Tc⁷A Cc⁷A Cc⁷Gc⁷G TC-Bio-DMT

Kopplungszeit = 180 s für c⁷A, 90 s für c⁷G, 140 s Oxidation mit CSO, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 9.21 * 10⁵, E_{20.Kopplung} = 5.26 * 10⁵, M_{calc} = 6134

revUSP'

3'-TCA GGA AAC AGC TAT GAC

Standard-Protokoll, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-T-lcaa-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.29 * 10⁶, E_{17.Kopplung} = 1.04 * 10⁶

7-Deaza-revUSP

3'-Cc⁷Ac⁷G Tc⁷AT Cc⁷Gc⁷A Cc⁷Ac⁷A c⁷Ac⁷Gc⁷G c⁷AC-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 8.32 * 10⁵, E_{16.Kopplung} = 6.47 * 10⁵, M_{calc} = 5212.4 u, M_{found} = 5219.3 u

Deaza-Protokoll, verlängerte Kopplungszeiten für c⁷A, c⁷G, weniger CSO, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 9.51 * 10⁵, E_{16.Kopplung} = 6.32 * 10⁵

2'-Fluoro-C-7-Deaza-A+G-revUSP:

3'-Cc⁷Ac⁷G Tc⁷AT2'F Cc⁷Gc⁷A2'F Cc⁷Ac⁷A c⁷Ac⁷Gc⁷G c⁷A2'FC-DMT

1.0 μmol Scale, 500 Å DMT-C-CPG, 7-Deaza-Protokoll, 15 min Kopplung für 2'F-C, CSO-Oxidation, Trityl-Monitor: E_{max} = 1.35 * 10⁶, E_{16.Kopplung} = 1.10 * 10⁶, λ_{min} = 246 nm, λ_{max} = 267 nm

1.0 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG, 7-Deaza-Protokoll, 15 min Kopplung für 2'F-C, CSO-Oxidation, Trityl-Monitor: E_{max} = 1.35 * 10⁶, E_{16.Kopplung} = 1.10 * 10⁶, λ_{min} = 246 nm, λ_{max} = 267 nm, M_{calc} = 5261, M_{found} = 5556.52 (M+DMT+H⁺), 5253.88 (M+H⁺), 5236.18 (M-H₂O+H⁺) u, m/fwhm = 2800 (DE-MALDI)

2'-Fluoro-C-7-Deaza-A+G-revUSP':

3'-TCc⁷Ac⁷G Tc⁷AT2'F Cc⁷Gc⁷A2'F Cc⁷Ac⁷A c⁷Ac⁷Gc⁷G c⁷A2'FC-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-C-CPG, CSO-Oxidation,. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 1.57 * 10^6$, $E_{17.Kopplung} = 4.39 * 10^5$, $\lambda_{\min} = 244$ nm, $\lambda_{\max} = 266$ nm, $M_{\text{found}} = 5508.11, 5285.8$ u

Primer(pHis6Bap)1

5'-DMT-GTC ACC CTC GAC CTG CAG

0.2 μmol - Scale. 500 Å DMT-G-CPG, Ausbeute: 49.2 %

99rev

3'-CGT CCA GCT CCC ACT GTT-DMT (Standard-Protokoll)

0.2 μmol Scale. 500 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.68 * 10^5$, $E_{17.Kopplung} = 8.87 * 10^5$

7-Deaza-99rev

3'-Cc⁷GT CCc⁷A c⁷GCT CCC c⁷ACT c⁷GTT-DMT

Deaza-Protokoll, 0.05 μmol Scale. 500 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 7.56 * 10^5$, $E_{17.Kopplung} = 5.09 * 10^5$

0.2 μmol - Scale, 500 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.36 * 10^5$, $E_{17.Kopplung} = 6.99 * 10^5$, $M_{\text{Calc}} = 5386.6$, $\lambda_{\min} = 232$ nm, $\lambda_{\max} = 264$ nm, $M_{\text{calc}} = 5387$, $M_{\text{found}} = 5393.5$, m/fwhm = 150

Primer(pHis6Bap)2

3'-TGA CCG GCA GCA AAA TGT T-DMT

200 nmol, DMT-T-CPG, 53 % Ausbeute

c⁷-Primer(pHis6Bap)2

3'-Tc⁷Gc⁷A CCc⁷G c⁷GCc⁷A c⁷GCc⁷A c⁷Ac⁷Ac⁷A Tc⁷GT T-DMT

0.05 μmol Scale, 500 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 6.70 * 10^5$, $E_{18.Kopplung} = 3.49 * 10^5$, $\lambda_{\min} = 234$ nm, $\lambda_{\max} = 270$ nm $M_{\text{calc}} = 5853$ u

Bio-c⁷-Primer(pHis6Bap)2

3'-c⁷-Primer(pHis6Bap)2-Bio-DMT

7-Deaza-Protokoll, CSO-Oxidation, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 7.60 * 10^5$, $E_{20.Kopplung} = 5.19 * 10^5$

3'-T(c⁷-A)₂₄-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.32 * 10^5$, $E_{24.Kopplung} = 8.94 * 10^5$, maximale Ausbeute:, $\lambda_{\min} = 244$ nm, $\lambda_{\max} = 270$ nm, $M_{\text{calc}} = 7735$ u, $M_{\text{found}} = 8051$ (M+DMT⁺, 96 %), 7748 (M⁺) u, m/fwhm = 390

3'-TA₂₄-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.32 * 10^5$, $E_{24.Kopplung} = 8.94 * 10^5$, maximale Ausbeute:, $\lambda_{\min} = 228$ nm, $\lambda_{\max} = 257$ nm, $M_{\text{calc}} = 7759$ u, $M_{\text{found}} = 7760$ (M-DMT⁺), 7608 ([M-DMT-A]⁺, 67.6 %, m/fwhm = 260), 7461 ([M-DMT-2A]⁺, 15 %), 3804

(M+2H²⁺) u

3'-T₁₀(c⁷G)₅T₁₀-DMT

7-deaza-Protokoll, 1 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.36 * 10⁵, E_{24.Kopplung} = 6.42 * 10⁵

3'-C₂₅-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.19 * 10⁶, E_{24.Kopplung} = 9.93 * 10⁵, maximale Ausbeute:, λ_{min} = 249 nm, λ_{max} = 275 nm

40-mer

3'-AGT GCT GCA ACA TTT TGC TGC CGG TCA CGG TTC GAA CGT A-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-A-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 8.60 * 10⁵, E_{39.Kopplung} = 8.09 * 10⁵, maximale Ausbeute:, λ_{min} = 231 nm, λ_{max} = 258 nm

3'-TA₄₉-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 9.12 * 10⁶, E_{49.Kopplung} = 7.52 * 10⁵, λ_{min} = 232 nm, λ_{max} = 256 nm, M_{calc} = 15599 u, M_{found} = 15445 (M-A+H⁺) u

3'-T(c⁷-A)₄₉-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 9.39 * 10⁵, E_{49.Kopplung} = 8.23 * 10⁵, maximale Ausbeute:, λ_{min} = 244 nm, λ_{max} = 268 nm, M_{calc} = 15550 u, M_{found} = 15860 (M+H⁺), 15553 (M-DMT+H⁺) u, m/fwhm = 311

3'-T₁₀C₅T₂₀C₅T₁₀-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.7 * 10⁶, E_{49.Kopplung} = 1.22 * 10⁵, maximale Ausbeute:, λ_{min} = 236 nm, λ_{max} = 266 nm

3'-T₄₀C₁₀-DMT

0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.27 * 10⁶, E_{49.Kopplung} = 1.22 * 10⁵, λ_{min} = 236 nm, λ_{max} = 266 nm

3'-T₁₀(2'FC)₅T₂₀(2'FC)₅T₁₀-DMT

7-Deaza-Protokoll, 15 min Kopplung für 2'-F-C, 0.2 μmol Scale, 500 Å DMT-USP-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.31 * 10⁶, E_{49.Kopplung} = 7.80 * 10⁵, λ_{min} = 238 nm, λ_{max} = 267 nm, M_{found} = 15219.5 u

3'-C₅₀-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.10 * 10⁶, E_{49.Kopplung} = 6.98 * 10⁵, λ_{min} = 249 nm, λ_{max} = 273 nm

60-mer

1 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: E_{max} = 1.60 * 10⁶, E_{49.Kopplung} = 1.24 * 10⁶, λ_{min} = 232 nm, λ_{max} = 258 nm

3'-T(c⁷-A)₇₄-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.45 * 10^5$, $E_{74.\text{Kopplung}} = 3.90 * 10^5$, $\lambda_{\max} = 255 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 273 \text{ nm}$, $M_{\text{calc}} = 23346 \text{ u}$, $M_{\text{found}} = 23715 \text{ (M+H}^+)$, $(\text{M-DMT+H})^+ = 23401 \text{ u}$, $m/\text{fwhm} = 135$

3'-TA₇₄-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 1.01 * 10^6$, $E_{74.\text{Kopplung}} = 5.20 * 10^5$

3'-C₇₅-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 1.30 * 10^6$, $E_{74.\text{Kopplung}} = 5.50 * 10^5$, $\lambda_{\min} = 249 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 271 \text{ nm}$

75-mer

3'-CGA ACC CTA GGT GGT GGT AGT GGT AGT GAT TAT TAC TAC CCC GAC GTC
GGT TAA CCG TGA CCG GCA GCA AAA TGT-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.00 * 10^5$, $E_{74.\text{Kopplung}} = 3.39 * 10^5$, $\lambda_{\min} = 229 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$

75-merDeaza

3'-Cc⁷Gc⁷A c⁷ACC CTe⁷A c⁷Gc⁷GT c⁷Gc⁷GT c⁷Gc⁷GT c⁷Ac⁷GT c⁷Gc⁷GT c⁷Ac⁷GT c⁷Gc⁷AT
Tc⁷AT Tc⁷AC c⁷Tc⁷A CCC c⁷Gc⁷AC c⁷GTC c⁷Gc⁷GT Tc⁷Ac⁷A CCc⁷G Tc⁷Gc⁷A CCc⁷G
c⁷GCc⁷A c⁷GCc⁷A c⁷Ac⁷Ac⁷A Tc⁷GT-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.00 * 10^5$, $E_{74.\text{Kopplung}} = 3.39 * 10^5$

85-mer

3'-AGT GCT GCA ACA TTT TGC TGC CGG TCA CGG TTC GAA CGT ACG GAC GTC
CAG CTG AGA TCT CCT AGG GGC CCA TGG CTC GAG CTT A-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 1.13 * 10^6$, $E_{49.\text{Kopplung}} = 8.91 * 10^5$, $\lambda_{\min} = 232 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$

3'-T(c⁷-A)₉₉-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.36 * 10^5$, $E_{99.\text{Kopplung}} = 3.28 * 10^5$, maximale Ausbeute:, $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 271 \text{ nm}$, $M_{\text{calc}} = 31150 \text{ u}$, $M_{\text{found}} = 31543 \text{ (M+DMT+H}^+)$, $31234 \text{ (M+H}^+) \text{ u}$

3'-TA₉₉-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-T-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 9.54 * 10^5$, $E_{99.\text{Kopplung}} = 3.76 * 10^5$, $\lambda_{\max} = 238 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$

3'-C₁₀₀-DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\max} = 1.23 * 10^6$, $E_{99.\text{Kopplung}} = 3.58 * 10^5$, $\lambda_{\min} = 248 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$

103-mer

3'-CAT TTT GCT GCC GGT CAC GGT TCG AAC GTA CGG ACG TCC AGC TGA GAT
CTC CTA GGG GCC CAT GGC TCG AGC TTA AGC ATT AGT ACC AGT ATC GAC
AAA GGA C DMT

1 μmol Scale, 1000 Å DMT-C-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 1.22 * 10^6$, $E_{102.\text{Kopplung}} = 5.20 * 10^5$, $\lambda_{\text{min}} = 232 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$

rev103-mer

3'-GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC TTA AGC TCG AGC CAT GGG CCC
CTA GGA GAT CTC AGC TGG ACG TCC GTA CGT TCG AAC CGT GAC CGG CAG
CAA AAT G DMT

0.2 μmol Scale, 1000 Å DMT-G-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 1.21 * 10^6$, $E_{102.\text{Kopplung}} = 3.74 * 10^5$, $\lambda_{\text{min}} = 232 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$

110-mer

3'-AGT GCT GCA ACA TTT TGC TGC CGG TCA CGG TTC GAA CGT ACG GAC GTC
CAG CTG AGA TCT CCT AGG GGC CCA TGG CTC GAG CTT AAG CAT TAG TAC
CAG TAT CGA CAA AG-DMT

1 μmol Scale, 1000 Å DMT-A-CPG. Trityl-Monitor: $E_{\text{max}} = 1.62 * 10^5$, $E_{109.\text{Kopplung}} = 1.05 * 10^6$, $\lambda_{\text{min}} = 232 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$

7.4 Biochemische Reaktionen

7.4.1 Allgemeine Hinweise

7.4.1.1 Chemikalien

2'-Fluoro-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, $C_9H_{11}N_3O_{12}FP_3Na_4$, United States Biochemical, $\lambda_{max} = 278.5 \text{ nm}$ ($A_{max} : 1.40 * 10^2$)

2'-Fluoro-2'-desoxyadenosin-5'-triphosphat, $C_{10}H_{11}FN_5O_{12}P_3Na_4$, United States Biochemical, $\lambda_{max} = 260 \text{ nm}$ ($A_{max} : 1.56 * 10^3$)

2'-Fluoro-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat, $C_{10}H_{11}FN_5O_{13}P_3Na_4$, United States Biochemical, $\lambda_{max} = 252.1 \text{ nm}$

7-deaza- A_d TP, Lithiumsalz, Fa. Boehringer Mannheim, $\lambda_{max} = 270 \text{ nm}$ ($\epsilon_{max} : 12.3 * 10^3$)

7-deaza- G_d TP, Lithiumsalz, Fa. Boehringer Mannheim

Ammoniak, min. 25 %, Suprapur von Merck in Kunststoffgebinden

Acrylamid, 38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid, Fa. Roth

N_d TP-Set, Lithiumsalz, Boehringer Mannheim

Dynabeads™ M-280 Streptavidin, 2.8 μm Durchmesser, 4-8 m^2/g Oberfläche, magnetische Massenssuszeptibilität $10^{-4} \text{ m}^3/\text{kg}$

γ - ^{32}P -ATP, 250 μCi (25 μL), NEG 502A, Du Pont de Nemours

Röntgenfilme, X-OMAT AR, Fa. Kodak

Ultrazentrifugations-Membrane, 10000 - 100000 NMWG, Fa. Millipore

7.4.1.2 Enzyme und Puffer

B&W Puffer (2-fach konzentriert): 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1mmol/L EDTA, 2.0 mol/L NaCl (Endkonzentration = 1.0 mol/L)

Desoxyribonuklease I (EC 3.1.21.1), Boehringer Mannheim

DNase-Reaktionspuffer: 65 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 115 mmol/L NH_4Cl

Exo *Pfu* DNA Polymerase, Stratagene, 2.5 U/ μL

Storage-Buffer: 50 mmol/L TrisCl (pH = 8.2), 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.1% NP40, 0.1% Tween®20 (v/v), 50% Glycerol

10x Reaction Buffer: 100 mmol/L KCl, 100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mmol/L Tris-Cl (pH = 8.8), 20 mmol/L MgSO_4 , 1% Triton®X-100 und 1 mg/L BSA ("bovine serum albumine").

UITma DNA Polymerase (EC 2.7.7.7.), Perkin Elmer, 6U/ μL

Storage-Buffer: 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0), 100 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 0.5 % Tween 20, 50 % Glycerol

10 x *UITma* Buffer: 100 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.8), 100 mmol/L KCl, 0.02 % Tween 20

Tth DNA Polymerase, MasterAmp™, Biozym Diagnostik GmbH (Oldendorf), 5U/ μL

Storage Buffer: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 100 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 %

VII. Experimenteller Teil

Tween 20, 0.5 % NP-40, 1mmol/L DTT, 50 % Glycerol

20 x PCR Buffer: 400 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 mol/L TrisxHCl (pH = 9.0)

DeepVent (exo⁻), Vent DNA-Polymerase, New England Biolabs, 2 U/ μL

Lagerpuffer: 100 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L DTT, 0.1% Triton X-100, and 50 % glycerol

10 x PCR Puffer: 100 mmol/L KCl, 100 mmol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 mol/L Tris-HCl (pH = 8.8), 20 mmol/L MgSO_4 , 0.1 % Triton X-100

Polynukleotidkinase (EC 2.7.1.78), Boehringer Mannheim, 10 U/ μL

10 x Phosphorylierungspuffer: 500 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L DTT, 1 mmol/L Spermidin, pH 8.2 (bei 25°C).

7.4.1.3 Oligonukleotide

Die unter 3.8 beschriebenen, selbst synthetisierten Oligodesoxynukleotide sowie:

CS 400, 401, 402, 40-mer, Fa. Eurogentec

3' GTC AGT GCT GCA ACA **TTT TGC TGC CGG TCA CAC** ATG CGT T

3' GTC AGT GCT GCA ACA **TTT TGC TGC CGG TCA CAA** ATG CGT T

3' GTC AGT GCT GCA ACA **TTT TGC TGC CGG TCA CCC** ATG CGT T

pBR 322 DNA, *AluI* geschnitten, MBI Fermentas, Vilnius

pHis6Bap DNA wurde von Herrn Dr. F. Feyerabend, Univ. HH zur Verfügung gestellt,

M13mp18 RF, Fa. Pharmacia

auf **M13** basierende Plasmide mit verschieden langen Inserts von Frau C. Pauk, Univ. HH und Herrn Dr. C. Jurinke, Fa. Sequenom.

USP, 17mer, M = 5228.47 u, Dr. R. Wörl, Univ. HH

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT

5'-Bio-USP, 17mer, M = 5720.98 u, Pharmacia Biotech

5'-Bio-GTA AAA CGA CGG CCA GT

5'-Bio-c7-USP, 17mer, M = 5784.6 u, Eurogentec, Belgien

5'-Bio-c⁷GTC⁷A c⁷Ac⁷Ac⁷A Cc⁷Gc⁷A Cc⁷Gc⁷G Ccc⁷A c⁷GT

rUSP, 17mer, Dr. R. Wörl, Univ. HH

5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC

RP 60, 17mer, M = 5211.43, Pharmacia Biotech

5'-CCG GGG ATC CTC TAG AG

RiboPrimer, 19mer, M_{calc} = 5727 u, M_{found} = 5751 u, Fa. Biometra

5'-GTC ACC CTC GAC CTG CAg C

RiboRP, 20mer, $M_{\text{calc}} = 6183$ u, $M_{\text{found}} = 6172$ u, Fa. Biometra

5'-GTT GTA AAA CGA CGG CCA gT

wobei g jeweils für eine Modifikation mit Ribo-G steht

RP Bap200, 18mer, $M = 5451$ g/mol, Fa. MWG-Biotech

5'-CTT CCA CCG CGA TGT TGA

RP Bap300, 18mer, $M = 5526$ g/mol, Fa. MWG-Biotech

5'-AGC AGG GCC GTC GAT CCG

RP Bap400, 20mer, $M = 6049$ g/mol, Fa. MWG-Biotech

5'-TGT TCT TAC CGA TTG CTT CA

7.4.2 Allgemeine Methoden

7.4.2.1 ^{32}P -Markierung von Oligonukleotiden

Zur spezifischen Phosphorylierung der 5'-OH Gruppe eines Oligonukleotides wurden zu den gelösten dephosphorylierten DNA-Fragmenten (20 pmol 5'-OH-Enden) im Eisbad 2 μL 10 x Phosphorylierungspuffer und 20 pmol γ - ^{32}P -ATP ($c \geq 10$ $\mu\text{mol/L}$) in wäßriger Lösung gegeben. Mit Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 19 μL aufgefüllt. Zum Reaktionsgemisch gab man 10 Einheiten T4 PNK hinzu, mischte gut und inkubierte 30 min bei 37 °C. Danach wurde das Enzym deaktiviert, indem die Reaktionslösung 15 min bei 72 °C gehalten wurde. Die Abtrennung des nicht eingebauten γ - ^{32}P -ATP erfolgte durch Chromatographie an Sephadex G25 in einem entsprechend präparierten 1 mL Reaktionsgefäß.

7.4.2.2 Phosphorylierung

Zur Synthese von 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden wurden 100 pmol Oligonukleotide mit 20 U PNK und 1 nmol ATP 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Die Analyse mit MALDI-TOF MS ergab einen Phosphorylierungsgrad von etwa 70 %.

7.4.2.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE):

Puffer und Materialien: AA: 40%ige wäßrige Acrylamid-Stammlösung sowie 1,2 % N,N' -Methylenbisacrylamid als Quervernetzer (w/v). APS: 10 %ige wäßrige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (Polymerisationsinitiator). TEMED: N,N,N',N' -Tetraethylendiamin (Polymerisationsbeschleuniger). 10xTBE: 0.4 mol/L Tris, 50 mmol/L Natriumacetat, pH 7.8 bei 20°C. Formamid-Ladepuffer: 98% (v/v) Formamid, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, 0.05% (w/v) Xylencyanol ff (XC) in 10 mmol/L EDTA (Lagerung bei -20°C).

Für ein 7.5 %iges Gel wurden 1.3 mL AA, 100 μL APS, 100 μL TEMED und 1 mL 10x Agarosepuffer zu 7.7 mL Reinstwasser gegeben. Die Gele wurden zwei Stunden in vertikalen Mini-PAGE-Kammern der Firma Keutz bei RT polymerisiert. Zur Abtrennung von

nicht umgesetztem Acrylamid wurde an die Gele vor dem Auftragen der Proben für 20 min eine Spannung von 70 V angelegt.

In der Regel wurden 10 % eines enzymatischen Ansatz mit der entsprechenden Menge des 2 x Ladepuffers vor Auftragen auf das Gel vermischt. Als interner Standard diente 1 μL eines Oligonukleotidstandards, hergestellt durch Alu I Restriktionsverdau von pBR322 DNA. Die Gelelektrophorese wurde mit einer anfänglichen Spannung von 90 V, die dann auf 125 V gesteigert wurde, durchgeführt. Bandendetektion erfolgte nach 20 min Anfärben mit EtBr unter UV-Licht. Für die Detektion von 7-deazamodifizierten Oligonukleotiden hat sich auch Silberfärbung und Anfärben mit Stains AllTM bewährt.

7.4.2.4 Gelfärbung mit Stains AllTM

Die Ethidiumbromidfärbung zick sich für einzelsträngige wie für in hohem Anteil 7-deazapurinmodifizierte DNA als ungeeignet. Eine sehr einfache Alternative war die Färbung von Gelen mit Stains AllTM (3,3'-Diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbocyanin). Die Färbelösung wurde frisch aus 10 mL Stock-Solution (100 mg Stains All in 100 mL Formamid), 10 mL Formamid, 50 mL Isopropanol angesetzt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 200 mL aufgefüllt. Tritylierte Oligonukleotide wiesen bei dieser Färbemethode eine violette Färbung auf, untritylierte Oligonukleotide wurden hingegen türkis gefärbt. Die Färbezeit betrug je nach Konzentration der DNA auf dem Gel von zwei Stunden bis Färbung über Nacht.

7.4.2.5 Silberfärbung von DNA-PAGE-Gelen²⁹⁶

Fixierlösung:	10 % EtOH, 0.5 % Essigsäure
Färbelösung:	0.1 % Silbernitrat
Entwicklerlösung:	3 g NaOH auf 200 mL H ₂ O, anschließend versetzt mit 20 mg NaBH ₄ und 0.8 mL 37 % Formaldehydlösung
Stopfbad:	0.75 % Natriumcarbonat in Wasser

Das Gel wurde zunächst 10 min in die Fixierlösung getaucht, optional kann danach der Puffer gewechselt werden und das Gel zeitlich unbegrenzt darin aufbewahrt werden. Zum Färben wurde das Gel anschließend 10 min im Färbepuffer inkubiert und danach 2 mal mit Wasser kurz gewaschen. Die Entwicklung erfolgte dann solange bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht haben, ca. 20 Minuten. Zum Stoppen des Entwicklungsvorganges wurde fünf bis zehn Minuten im Stopfbad inkubiert. Nach kurzem Wässern wurde das Gel dokumentiert und in Folie eingeschweißt.

7.4.2.6 Immobilisierung und Aufreinigung biotinylierter PCR-Produkte

Zur Immobilisierung biotinylierter PCR Produkte wurden 10 bis 20 μL Streptavidin Dynabeads pro aufzureinigendem Reaktionsansatz zunächst zweimal mit derselben Menge 1 x Amino-B/W Puffer gewaschen, wobei die magnetischen Partikel beim Abnehmen des Überstandes mit Hilfe eines MPC (Magnetic Particle Collector) der Firma Dynal im Reaktionsgefäß zurückgehalten wurden. Danach wurde in 20 μL 2x Amino-B/W Puffer (für 20 μL Reaktionsansatz) resuspendiert.

7.4.2.6.1 Immobilisierung biotinylierter DNA an Beads

Die DNA-haltige Lösung wurde nun 30 min bei RT mit der wie oben beschrieben zubereiteten Suspension der Dynabeads unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln inkubiert und der Überstand anschließend abgenommen.

7.4.2.6.2 Denaturieren des Doppelstranges

Der Überstand wurde entfernt und die Beads zweimal mit 10 μL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) gewaschen. Anschließend wurde anfangs zweimal in je 25 μL 25 % Ammoniak resuspendiert und jeweils zwei Minuten bei RT inkubiert, die Überstände vereinigt und anschließend die DNA wie unten beschrieben mit Ethanol gefällt. Später stellte sich heraus, daß auch nach einmaligen Inkubieren mit ca. 5 μL 25 % Ammoniak bei 40 °C eine vollständige Abtrennung des nicht biotinylierten Stranges erreicht werden konnte. Solche Proben wurden nicht einer Ethanol-Fällung unterzogen, sondern das Lösungsmittel einfach durch Stehenlassen bei RT verdampft.

7.4.2.6.3 Freisetzung des biotinylierten Einzelstranges

Die Beads wurden anschließend zweimal mit 50 μL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) gewaschen, wobei dieser Schritt z.T. auch ausgelassen werden konnte. Die Abspaltung des biotinylierten Einzelstranges von den Streptavidin-Dynabeads erfolgte, indem die Beads zweimal in je 50 μL 25 % Ammoniak suspendiert und 8 min bei 60 °C inkubiert wurden. Die Überstände wurden vereinigt und aufbewahrt.

7.4.2.6.4 Ethanol-Präzipitation

Dazu wurden 100 μL Lösung mit 1.5 μL seeDNATM oder 1 μL Glykogen versetzt und gründlich gemischt. Hierzu wurden 300 μL (bei Fällung mit seeDNA stellten sich 250 μL als geeigneter heraus) EtOH (96%) gegeben und die Lösung 30 min im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde 15-20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das erhaltene Pellet noch einmal mit 120 μL eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen (bei seeDNA : 50 μL). Anschließend wurde das Pellet bei RT an Luft trocknen gelassen und schließlich in 0.7 - 1 μL Millipur-Wasser wieder aufgelöst.

7.4.2.7 Aufreinigung von PCR-Reaktionsansätzen mit Hilfe der Ultrafiltration

Die PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von überschüssigem Primer, Nukleotiden, Enzymen und im Reaktionspuffer enthaltenen Detergenzien über Ultrafiltrationsmembranen aufgereinigt. Das Ausschlußgewicht variierte, je nach Masse des aufzureinigenden PCR-Produktes, zwischen 10,000 und 100,000.

Die Proben, evtl. nach Poolen mehrerer PCR, wurden mit 0.07 mol/L Ammoniumcitrat-Puffer auf 400 µL aufgefüllt. Die Lösung wurde auf eine Microspin-Column aufgetragen, die zuvor mit 400 µL Wasser glycerinfrei gewaschen wurde. Die Spin-Column wurde in ein 1.5 mL Eppendorftube eingesetzt und 15 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, und es wurde noch zweimal mit je 400 µL Wasser abzentrifugiert. Die auf der Membran zurückgehaltene DNA wurde in 3 * 25 µL Wasser aufgenommen, lyophilisiert und anschließend in der gewünschten Menge Milli-Q Wasser für die Massenspektrometrie aufgenommen.

7.4.2.8 Ligation

Ligationsexperimente wurden mit jeweils 1 U *T4* DNA-Ligase und einer Konzentration von 1 mmol/L ATP bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht.

7.4.3 Synthese von 7-deazapurinmodifizierten Oligonukleotiden mit Hilfe der PCR mit pHis6Bap

a) 99mer PCR-Produkt

Substanz	zugebene Menge [µL] nicht modifiziert	zugegebene Menge [µL] modifiziert
Primer RP Bap1 (100 mmol/L)	1.0	1.0
Primer Bap2 (90 mmol/L)	1.1	1.1
A _d TP/c ⁷ A _d TP (10 mmol/L)	2.0	2.0
G _d TP (10 mmol/L) bzw. c ⁷ G _d TP (5 mmol/L)	2.0	4.0
T _d TP, C _d TP (je 10 mmol/L)	je 2.0	je 2.0
exo ⁻ Pfu (2.5 U /µL)	2.5	2.5
10 x exo ⁻ Pfu-Reaktionspuffer	10.0	10.0
Template, pHis6Bap (0.6 ng/µL)	1.4	1.4
Wasser	76	74
Summe	100	100

Tabelle A:Pipettierschema für 99mer PCR-Amplifikat aus pHis6Bap (100 pmol Ansatz)

VII. Experimenteller Teil

Temperaturprogramm

95°C, 4 min, danach 30 Reaktionszyklen: 95°C, 1 min, 51°C, 1 min, 72°C, 1 min, abschließend 72°C, 5 bis 10 min

Die Reaktionsbedingungen wurden durch Variation der Anzahl der Reaktionszyklen, der Annealingtemperatur, der Dauer von Annealing und Extension sowie der Enzymkonzentration optimiert.

b) 200 mer, 300mer, 400mer PCR-Produkt

Wie unter a), nur daß die Gegenprimer RP Bap200, 300 und 400 an Stelle von RP Bap1 eingesetzt wurden.

7.4.3.1 PCR mit M13mp18RFI-DNA

Substanz	zugegebene Menge [μ L]	
	nicht modifiziert	c ⁷ -modifiziert
Primer USP und rUSP (20 mmol/L)	je 5.0	je 5.0
A _d TP / G _d TP (10 mmol/L)	je 2.0	---
c ⁷ -A _d TP (10 mmol/L)	---	2.0
c ⁷ -G _d TP (5 mmol/L)	---	4.0
T _d TP und C _d TP (10 mmol/L)	je 2.0	je 2.0
exo ⁻ Pfu (2.5 U / μ L)	1.0	1.0
10 x exo(-)Pfu-Reaktionspuffer	10.0	10.0
Template, M13mp18RFI (0.1 g/L)	1.0	1.0
Wasser	68	66
Summe	100	100

Tabelle B: Pippetierrschema für ein 103mer PCR-Amplifikat aus M13mp18RFI, 100 pmol Ansatz

Temperaturprogramm

95°C, 4 min, danach 30 Reaktionszyklen für normales PCR-Produkt bzw. 40 für das deaza-modifiziertes 95°C, 1 min, 40°C, 4 min, 72°C, 2 min, abschließend 72°C, 10 min

Als PCR-Produkt wurde hier ein 103mer Einzelstrang erhalten.

VII. Experimenteller Teil

7.4.4 Untersuchungen zur Effektivität des Einbaus von 7-deaza-Nukleotiden mit Hilfe radioaktiv markierter Primer

Primer Bap und USP wurden wie oben beschrieben radioaktiv markiert

Substanz	zugegebene Menge [μ L] nicht modifiziert	zugegebene Menge [μ L] modifiziert
Primer Bap2 (100 mmol/L) und RP Bap1 bzw. RP Bap 200 (100 mmol/L)	1.0	1.0
32 P-Bap2	20	20
A _d TP / G _d TP (10 mmol/L)	je 2.0	
c ⁷ -A _d TP/c ⁷ -G _d TP (10 mmol/L, 5 mmol/L)		2.0/4.0
T _d TP, C _d TP (je 10 mmol/L)	je 2.0	je 2.0
exo ⁻ <i>Pfu</i> (2.5 U / μ L) oder exo ⁻ <i>DeepVent</i> oder <i>Vent</i>	2.5	2.5
10 x exo ⁻ <i>Pfu</i> oder <i>Vent</i> -Reaktionspuffer	10.0	10.0
Template, pHis6Bap (0.6 ng/ μ L)	2	2
Wasser	55	57
Summe	100	100

Tabelle C:Pipetierschema für 99mer PCR-Amplifikat aus pHis6Bap (100 pmol Ansatz)

Substanz	zugegebene Menge [μ L] nicht modifiziert	zugegebene Menge [μ L] c ⁷ -modifiziert
Primer USP und rUSP (100 mmol/L)	je 5.0	je 5.0
32 P-modifizierter Primer	40	40
A _d TP, G _d TP (10 mmol/L)	2.0	---
c ⁷ -G _d TP/c ⁷ -A _d TP (5 mmol/L, 10 mmol/L)	---	4.0/2.0
T _d TP und C _d TP (10 mmol/L)	je 2.0	je 2.0
exo ⁻ <i>Pfu</i> (2.5 U / μ L)	1.0	1.0
10 x exo ⁻ <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	10.0	10.0
Template, M13mp18RFI (0.1 g/L)	1.0	1.0
Wasser	28	30
Summe	100	100

Tabelle D:Pipetierschema für ein 103mer PCR-Amplifikat aus M13mp18RFI, 100 pmol Ansatz

In der PCR wurde dem nichtmarkierten Primer 10 % des markierten Primers zugesetzt. Es wurden zum einen je zwei PCR, die ein 99-mer, ein 103-mer und ein 200-mer ergaben, unter Verwendung von *exo*Pfu als DNA-Polymerase angesetzt. Zum anderen wurden je zwei PCR die ein 99-mer ergaben, unter Verwendung der Polymerasen *exo*Pfu, *exo*DeepVent, *Vent* angesetzt. Hierbei wurde nur 5 % markierter Primer zugegeben. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte jeweils durch Elektrophorese auf einem 10 % Polyacrylamidgel. Nachdem Autoradiogramme von den Gelen angefertigt wurden, wurden die entsprechenden Banden aus den Gelen mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe eines Flüssigszintillationssystems quantifiziert.

7.4.5 Endonukleaseverdau mit MunI und Hind III

PCR-Ansätze, modifiziert und nichtmodifiziert aus pHis6Bap unter Verwendung von Primer Bap2 und rBap1 wurden wie folgt einer enzymatischen Spaltung unterzogen:

1.) Spaltung mit MunI

90 μ L eines 100 μ L PCR-Ansatzes wurden mit 10 μ L Ammoniumacetatpuffer und 300 μ L eiskaltem 80 % EtOH versetzt, es wurde 10 min stehen gelassen und anschließend 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene DNA-Pellet mit 200 μ L 80% EtOH²⁹⁷ gewaschen. Nach Trocknen an Luft wurde mit 47.5 μ L Wasser, 5.6 μ L MunI-Reaktionspuffer und 3 μ L Mun I Enzymlösung versetzt und die Lösung 1 h bei 36 °C inkubiert.

2.) Spaltung mit Hind III

Zum MunI-Verdau wurde 5.6 μ L Ammoniumacetatpuffer und 200 μ L 80 % EtOH gegeben, und nach 10 minütigem Stehen wird 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 200 μ L 80 % EtOH gewaschen. Der Rückstand wird nach Trocknen an Luft mit 42 μ L Wasser aufgenommen und mit 3 μ L HindIII-Enzymlösung und 5 μ L HindIII-Reaktionspuffer versetzt und wieder 1 h bei 36 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA wieder mit Ethanol gefällt und das Reaktionsprodukt mit Hilfe von Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

7.4.6 PCR unter Verwendung eines ribomodifizierten Primers

PCR

Substanz	Zugebene Menge in μL
Primer Ribo, 100 pmol/ μL	1
Primer RiboRP, 100 pmol/ μL	1
N_dTP , 10 pmol/ μL	je 2
10 x <i>exo</i> -Pfu-Reaktionspuffer	10
Enzym, <i>exo</i> -Pfu	1.5
Template, pHis6Bap, 1 pmol/ μL	1.4
Wasser	75.1
Gesamtvolumen	100

$\text{N}_d\text{TP} = \text{A}_d\text{TP}, \text{G}_d\text{TP}, \text{C}_d\text{TP}, \text{T}_d\text{TP}$ oder $c^7\text{-A}_d\text{TP}, c^7\text{-G}_d\text{TP}, \text{C}_d\text{TP}, \text{T}_d\text{TP}$

Temperaturprogramm

95 °C 4 min, danach 35 Zyklen: 95 °C, 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, anschließend 72 °C 5 min, Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 100 bp.

Aufarbeitung

Jeweils zwei Reaktionsansätze wurden vereinigt und mittels einer Filter-Membran 30.000 NMWG wie weiter oben beschrieben aufgereinigt. Eine Probe wurde direkt für die MALDI-Vermessung in 10 μL H_2O gelöst.

Hydrolyse

Die PCR-Ansätze wurden in 100 μL 0.1 mol/L, 0.2 mol/L und 0.3 mol/L NaOH aufgenommen. Die Lösungen wurden jeweils 10 min bei 95 °C (0.2 mol/L zusätzlich 20 min und 25 min) inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen in einen 60 °C warmen Heizblock gestellt und langsam auf RT abgekühlt. Danach wurde mit der jeweils erforderlichen Menge 1 mol/L HCl neutralisiert.

Die Aufreinigung erfolgte über Spin-Membranen, 10.000 NMWG. Die Proben wurden in 4 * 25 μL Wasser wieder in Lösung gebracht, lyophilisiert und in je 5 μL H_2O für die Massenspektrometrie gelöst.

VII. Experimenteller Teil

7.4.7 PCR mit biotinylierten 7-deazamodifizierten Primern

Substanz	zugegebene Menge [μL] nicht modifiziert	zugegebene Menge [μL] c^7-modifiziert
Primer Bio-USP und rUSP (20 mmol/L)	je 5.0	--
Primer Bio-Deaza-USP und Deaza- rUSP (20 mmol/L)	--	je 5.0
$A_d\text{TP}$ / $G_d\text{TP}$ (10 mmol/L)	je 2.0	---
c^7 - $A_d\text{TP}$ / c^7 - $G_d\text{TP}$ (10 mmol/L)	---	20
$T_d\text{TP}$ und $C_d\text{TP}$ (10 mmol/L)	je 2.0	je 2.0
<i>Th</i> (2.5 U / μL)	1	1
20 x <i>Th</i> -Reaktionspuffer	5	5
Mg^{2+} (25 mmol/L)	2.5	10
Template pG10ApBHI(+) (40 mg/L)	1	1
Wasser	72.5	65
Summe	100	100

Tabelle F:Pipetierschema für ein 165mer PCR-Amplifikat aus pG10ApBHI (40 ng/ μL)

7.4.7.1 asymmetrische PCR

Substanz	zugegebene Menge [μL] nicht modifiziert	zugegebene Menge [μL] c^7-modifiziert
Primer Bio-USP (20 mmol/L) und rUSP (100 mmol/L)	je 2.0	--
Primer Bio-Deaza-USP (20 mmol/L) und Deaza-rUSP (100 mmol/L)	--	je 1.0
$A_d\text{TP}$ / $G_d\text{TP}$ (10 mmol/L)	je 1.0	---
c^7 - $A_d\text{TP}$ / c^7 - $G_d\text{TP}$ (10 mmol/L)	---	je 1.0
$T_d\text{TP}$ und $C_d\text{TP}$ (10 mmol/L)	je 1.0	je 1.0
<i>Th</i> (2.5 U / μL)	0.5	0.5
20 x <i>Th</i> -Reaktionspuffer	2.5	2.5
Mg^{2+} (25 mmol/L)	5	20
Template pG10ApBHI(+) (40 mg/L)	0.5	0.5
Wasser	33.5	18.5
Summe	100	100

Tabelle G:Pipetierschema für ein 315mer PCR-Amplifikat aus pG10ApBgII (40 ng/ μL)

VII. Experimenteller Teil

7.4.8 PCR mit 2'-F-N_dTP

Substanz	Zugebene Menge in μL
Primer Bio-USP, 20 pmol/ μL	1
Primer rev-USP, 20 pmol/ μL	1
N _d TP, 10 pmol/ μL	je 2
10 x <i>exo-Pfu</i> -Reaktionspuffer	10
Enzym, <i>exo-Pfu</i>	1.5
Template, M13mp18RF	1.4
Wasser	77.1
Gesamtvolumen	100

Tabelle H:Pipettierschema für ein 103mer PCR-Amplifikat

In der PCR wurde jeweils eines der Nukleosidtriphosphate durch das entsprechende 2'-fluoro-analoge Triphosphat substituiert. Als weitere Polymerasen wurden *exo-DeepVent*, *Tth*, *Taq*, *Tfl*, *TAP 8*, *TAP 11* und *Ultma* getestet.

7.4.8.1 Fill-In-Reaktionen

Wie weiter oben beschrieben wird aus M13mp18 ein biotinyliertes doppelsträngiges 103mer PCR-Produkt synthetisiert. Durch die Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systemes werden die Einzelstränge getrennt und isoliert. Diese wurden zusammen mit dem passenden Primer für Fill-In Experimente verwendet, bei denen die natürlichen Nukleosidtriphosphate in unterschiedlichen Kombinationen durch modifizierte Nukleosidtriphosphate substituiert wurden. Weiterhin wurden die Magnesiumkonzentration, die Enzyme und das PCR-Programm variiert.

VII. Experimenteller Teil

7.4.9 DNase-Verdau einer 7-deazamodifizierten 60-mer DNA

7.4.9.1 PCR

Zur Synthese eines 60mer Doppelstranges für den DNase I-Verdau wurden zunächst die PCR-Bedingungen durch Variation von Magnesium-Zugabe, der Annealing-Temperatur und Verwendung von entweder *exoPfu*, *Tth*, *DeepVent* und *Ultma* oder nur *DeepVent* optimiert.

Substanz	Zugegebene Menge in μL
Primer Bio-c ⁷ -USP, 20 pmol/ μL	1
Primer RP 60, 20 pmol/ μL	5
N _d TP, 10 pmol/ μL	je 1
10 x <i>DeepVent</i> -Reaktionspuffer	5
Enzym, <i>DeepVent</i>	je 1
Template, M13 mp 18	1
Magnesium (100 mmol/L)	5
Wasser	28
Gesamtvolumen	50

Temperaturprogramm:

95°C, 5 min, 35 Zyklen 95°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C, 1 min, anschließend 72°C 10 min

7.4.9.2 DNase I-Abbau

40 pmol PCR-Produkt (2 Ansätze) wurden wie oben beschrieben an je 35 μL Beads immobilisiert. Anschließend wurde der B/W-Puffer verworfen, einmal mit dem Reaktionspuffer gewaschen und in je 49 μL Puffer suspendiert. Pro Reaktionsansatz wurden 0.05 U DNase I zugegeben. Es wurde 2, 4, 6 und 8 min bei RT inkubiert. Hiernach wurde der Reaktionspuffer abgenommen und die Beads wie oben beschrieben weiter bearbeitet. Sowohl biotinylierte als auch nicht-biotinylierte Produkte des Verdau wurden mit Hilfe von MS untersucht.

VII. Experimenteller Teil

7.4.10 Polymerase-Inkorporationsassay

Substanz	Zugegebene Menge in μL
Primer Bio-USP, 20 pmol/ μL	1
Template, CS 400-402, 1 pmol/ μL	2
Nukleotid, 5 mmol/ μL	1
10 x Reaktionspuffer	2
Enzym	x
Wasser	y
Gesamtvolumen	20

Enzymmenge variabel (abhängig vom verwendeten Enzym), unterschiedliche Nukleotide werden zugegeben

Temperaturprogramm

95°C 5min, danach 25 Zyklen: 95°C, 1 min, 49°C 1 min, 72°C 1 min

7.4.11 Aufarbeitung

- a) Ethanol-Fällung oder
- b) durch Anbindung an Dynabeads

VIII Literaturverzeichnis

1. Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M., rekombinante DNA, **1993**, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
2. Judson, H. F., Der 8. Tag der Schöpfung, **1980**, Meyster, Wien
3. Strachan, T., The Human Genome, **1992**, BIOS Scientific Publishers
4. Cooper, D. N., and Krawczak, M., Human Genome Mutations, **1993**, BIOS Scientific Publishers
5. St. George-Hyskop, P. H., et al., Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder, *Nature*, **1990**, 347, 194-97
6. Kerem, B.-S., Rommens, J. M., and Buchanan, J. A., Markiewicz, D, Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L.-C., Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis, *Science*, **1989**, 245, 1073-80
7. Wilfond, B. S., and Fost, N., The cystic fibrosis gene: medical and social implications for heterozygote detection, *J. Am. Med. Assoc.*, **1990**, 263, 2777-83
8. Braun, A., Little, D. P., and Köster, H., Detecting CFTR gene mutations using primer oligo base extension and mass spectrometry, *Clin. Chem.*, **1997**, 43, 1151-8
9. Emery, A. E., Duchenne Muscular Dystrophy, **1988**, rev. ed., Oxford University Press, Oxford, England
10. McKusick, V. A., *Genomics*, **1989**, 5, 385
11. Cantor, C. R., Orchestrating the Human Genome Project, *Science*, **1990**, 49-51
12. U.S. Dep. of Health and Human Services & U.S. Dep. of Energy, Understanding our genetic Inheritance - The U.S. Human Genome Project: The First Five Years FY 1991-1995, **1990**, National Technical Information Service, U.S. Dep. of Commerce, Springfield, VA
13. Collins, F. S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravarti, A., Gesteland, R., and Walters L., the members of the DOE and NIH planning groups, New Goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003, *Science*, **1998**, 5382 (282), 682
14. Hubbard, R., Lewontin, R. C., *N. Engl. J. Med.*, **1996**, 334, 1192
15. Priestman, T. J., Cancer chemotherapy, **1989**, Springer Verlag, Berlin
16. Ou, C.-Y., et. al., DNA amplification for the direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells, *Science*, **1988**, 239, 295-97
17. Bisson-Noel, A., et. al., Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples, *Lancet*, **1989**, ii, 1069-71
18. Thompson, J. S., Thompson, M. W., eds., Genetics in Medicine, **1991**, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA
19. Edman, J. C., Evans-Hom, M. E., Marich, J. E., and Ruth, J. L., *Nucleic Acids Res.*, **1988**, 16, 6235
20. Ballantyne, J. G., Sensabaugh, J. A., and Witkowski, eds., DNA Technology and Forensic Science, *Banbury Report 32*, **1989**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

VIII. Literaturverzeichnis

21. Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., and Weber-Rolf, I., PCR: Clinical Diagnostics and Research, **1992**, Springer-Verlag, Berlin/New York
22. Arnheim, N., Levenson, C. H., *Chem. Eng. News*, **1990**, 68, 36
23. Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Ehrlich, H., and Arnheim, N., *Science*, **1985**, 230, 1350
24. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R. Horn, G. T., Mullis, K. B., and Ehrlich, H. A., *Science*, **1988**, 239, 487-91
25. *Bundesanzeiger*, 04.04.1997, 63, 4477
26. Heller, C., Instrumentierung in der Genomforschung, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1999**, 47 (4), 396-400
27. Beck, S., and Köster, H., *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2258-70
28. Beck, S., O'Keeffe, T., Coull, J. M., and Köster, H., Chemiluminescent detection of DNA: application for DNA sequencing and hybridization, *Nucl. Acids Res.*, **1989**, 17, 5115-23
29. Jett, J. H., et al., High-Speed DNA sequencing: an approach based upon fluorescent detection of single molecules., *J. Biomol. Struct. and Dynamics*, **1989**, 301-09
30. Köster, H., Beck, S., Coull, J. M., Dunne, T., Gildea, B. D., Kissinger, C., and O'Keeffe, T., Oligonucleotide synthesis and multiplex DNA sequencing using chemiluminescent detection, *Nucleic Acids Res. Symposium Ser.*, **1991**, 24, 318-22
31. Frank, R. and Köster, H., DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of oligodeoxyribonucleotides in a polyacrylamide-gels, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 6 (6), 2069-87
32. Siegert, C., Schwerpunktarbeit, **1993**, Universität Hamburg
33. Vastola, F. J., Mumma, R. O. and Piron, A. J., *Org. Mass. Spectrom.*, **1970**, 3, 101
34. Posthumus, M. A., Kistemaker, P. G., Meuzelaar, H. L. C., and Ten Noever der Brauw, M. C., *Anal. Chem.*, **1978**, 50, 985
35. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F., *Int. J. Mass. Spectrom. Ion. Proc.*, **1987**, 78, 53-68
36. Karas, M., and Hillenkamp, F., *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-301
37. Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., and Hillenkamp, F., *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 241, 175
38. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yoshida, T., *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 151-53
39. Zhu, L., Parr, G. R., Fitzgerald, M. C., Nelson, C. M., and Smith, L. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6048-56
40. Wu, K. J., Steding, A., and Becker, C., *Rapid Commun. Mass Spec.*, **1993**, 7, 142-46
41. Karas, M., and Giessmann, U., Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Massenspektrometrie, *Labor 2000*, **1992**, 71-83
42. Alikhanov, S. G., and Expti, J., *Theoref. Phys. (U.S.S.R.)*, **1956**, 31, 517
43. Mamyrin, B. A., Karateev, V. I., Shmikk, D. V., and Zagulin, V. A., *Sov. Phys. JETP*, **1973**, 37, 45

44. Wiley, W. C., and McLaren, I. H., Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution, *Rev. Sci. Instrum.*, **1955**, 26, 1150
45. Kaufmann, R., Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology, *J. Biotechnol.*, **1995**, 41 (2-3), 155-75
46. Beavis, R. C., and Chait, B., T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1989**, 3, 432-35
47. Vorm, O., and Mann, M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5, 955-58
48. Cotter, R. J., Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 1027A-1039A
49. Bai, J., Liu, Y.-H., Cain, T. C., and Lubman, D. M., Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Using an Active Perfluorosulfonated Ionomer Film Substrate, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3423-30
50. Schriemer, D. C., and Li, L., *Anal. Chem.*, **1998**, 68, 2721-25
51. Köster, H., et. al., *Biomed. Environ. Mass Spec.*, **1987**, 14, 111-16
52. Pang, H., Smith, D. L., Crain, P. F., Yamaizumi, K., Nishimura, S., and McCloskey, J. A., Identification of nucleosides in hydrolysates of transfer RNA by high-resolution mass spectrometry, *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 127, 459-71
53. Wu, K. L., Steding, A., and Becker, C. H., Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 142-46
54. Tang, K., Taranenko, N. I., Allman, S., L., Chen, C. H., Chang, L. Y. and Jacobson, K. B., Picolinic acid as a matrix for laser mass spectrometry of nucleic acids and proteins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 673-7
55. Tang, K., Taranenko, N. I., Allman, S. L., Chang, L. Y., and Chen, C. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 727-30
56. Fitzgerald, M. C., Zhu, L., and Smith, L. M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 895-97
57. Schneider, K., and Chait, B. T., Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry of Homopolymer Oligodeoxyribonucleotides. Influence of Base Composition on the Mass Spectrometric Response, *Organic Mass Spectrom.*, **1993**, 28, 1353-61
58. Maxam, A. M. and Gilbert, W., Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, *Methods Enzymol.*, **1980**, 65, 499-560
59. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1977**, 74, 560-64
60. Sanger, F., Sequences, sequences and sequences, *Annu. Rev. Biochem.*, **1988**, 57, 1-28
61. Smith, A. J. H., DNA sequence analysis by primed synthesis, *Methods Enzymol.*, **1980**, 65, 560-80
62. Nordhoff, E. Cramer, R., Karas, M., Hillenkamp, F., Kirpekar, F., Kristiansen, K., and Roepstorff, P., Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3347-57
63. Tang, K., Allmann, S. L., and Chen, C. H., *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 943

64. Cohen, S. L., and Chait, B. T., Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 31-37
65. Tang, W., Nelson, C. M., Zhu, L., and Smith, L. M., Positive Ion Formation in the UV-MALDI Analysis of Oligonucleotides Using 2,5-Dihydroxybenzoic Acid, *J. Am. Mass Spectrom.*, **1997**
66. Michalak, L., Fisher, K. J., Alderdice, D. S., Jardine, D. R., and Willett, G. D., C₆₀-assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry, *Org. Mass Spec.*, **1994**, 29, 512-15
67. Colby, S. M., King, T. B., and Reilly, J. P., *Rapid Commun. Mass Spec.*, **1994**, 8, 865
68. Takach, E. J., Hines, W. M., et al., Accurate mass measurements using MALDI-TOF with delayed extraction, *J. Protein Chem.*, **1997**, 16 (5), 363-69
69. Roger, M. and Hotchkiss, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1961**, 47, 653-69
70. Suzuki, T., Ohsumi, S., and Makino, K., Mechanistic studies on depurination and apurinic site chain breakage in oligodeoxyribonucleotides, *Nucleic Acids Research*, **1994**, 23, 4997-5003
71. Zoltewitz, J. A., Clark, D. F., Sharpless, T. W., and Grahe, G., Kinetics and Mechanism of the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Some Purine Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92 (6), 1741-50
72. York, J. L., Effect of the Structure of the Glycon on the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Adenine Nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 2171-73
73. Shabarova, Z., and Bogdanov, A., in: *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, ed.: Kellersohn, T., **1994**, Verlag Chemie, Weinheim, 63-65
74. Seela, F., Regio- and stereospecific synthesis of 7-Deazapurine 2'-deoxyribonucleosides and incorporation of nucleoside isosteres into oligonucleotides, *GBF Monographs*, **1987**, (8), Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig
75. Seela, F., and Röling, A., 7-Deazapurine containing DNA: efficiency of c⁷G_dTP, c⁷A_dTP and c⁷I_dTP incorporation during PCR-amplification and protection from endodeoxyribonuclease hydrolysis, *Nucleic Acids Research*, **1992**, 20 (1), 55-61
76. Köster, H., and Sinha, N. D., Process for the preparation of oligonucleotides, United States Patent, Ser. No. 4,725,677, issued **1988**, Feb. 16
77. Seela, F., 2'-Desoxytubercidin - Synthese eines 2'-Desoxyadenosin-Isosteren durch Phasentransferglykosylierung, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 876-84
78. Johnson, T. B., Researches on pyrimidines: Synthesis of cytosine-5-acetic-acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1911**, 33, 758-66
79. Nashimura, H., et al., Toyocamycin, a new anticandida antibiotics, *J. Antibiot.*, **1956**, Ser. A 9, 60-62
80. Tolman, R. L., Robins, R. K., and Townsend, L. B., Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleoside antibiotics, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 524-26
81. Anzai, K., *J. Antibiot.*, **1957**, Ser. A 10, 20-23
82. Anzai, K., *J. Antibiot.*, **1957**, Ser. A 10, 201-204
83. Smith, C. G., Gray, G. D., Carlson, R. G., and Hanze, A. R., Biochemical and biological studies with tubercidin (7-deazaadenosine), 7-deazainosine and certain

- nucleotide derivatives of tubercidin, *Adv. Enzyme Regul.*, **1967**, 5, 121-51
84. Bloch, A., Leonard, R. J., and Nichol, C. A., On the mode of action of 7-deaza-adenosine (tubercidin), *Biochim. Biophys. Acta*, **1967**, 138 (1), 10-25
85. Bailey, V. C., Sethi, J. K., Fort, S. M., Galione, A., and Potter, B. V., 7-Deaza cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose: first example of a Ca(2+)-mobilizing partial agonist related to cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose, *Chem. Biol.*, **1997**, 4(1), 51-61
86. Mitchell, S. S., Pomerantz, S. C., Concepcion, G. P., Ireland, C. M., Tubercidin analogs from the ascidian *Didemnum voeltzkowii*, *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59(10), 1000-1
87. Crick, F. H. C., *J. Mol. Biol.* **1966**, 19, 552
88. Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T., and Masaki, H., *Science*, **1999**, 283, 2097-2100
89. Katze, J. R., Basile, B., and McCloskey, J. A., Queuine, a modified base incorporated posttranscriptionally into eukariotic transfer RNA: wide distribution in nature, *Science*, **1982**, 216, 55-6
90. Gunduz, U., Elliott, M. S., Seubert, P. H., Houghton, J. A., Houghton, P. J., Trewyn, R. W., and Katze, J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1139 (3), 229-38
91. Kersten, H., The nutrient factor queuine: biosynthesis, occurrence in transfer RNA and function, *Biofactors*, **1988**, 1 (1), 27-9
92. Gunduz, U., Elliott, M. S., Seubert, P. H., Houghton, J. A., Houghton, P. J., Trewyn, R. W., and Katze, J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1139 (3), 229-38
93. Morris, R. C., Brooks, B. J., Hart, K. L., and Elliott, M. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, 1311, 2, 124-32
94. Sznajdman, M. L., et al., The Antiinfluenza activity of pyrrolo[2,3-d]pyrimidines, *Bioorganic&Medicinal Chem. Lett.*, **1996**, 6 (5), 565-568
95. Cass, C. E., Selner, M., Tan, T. H., Muhs, W. H., and Robins, M. J., Comparison of the effects on cultured L1210 leukemia cells of the ribosyl, 2'-deoxyribosyl, and xylosyl homologs of tubercidin and adenosine alone or in combination with 2'-deoxycoformycin, *Cancer Treat. Rep.*, **1982**, 66, 317-326
96. Seeburger, P. H., and Caruthers, M. H. in Stein, C. A. and Krieg, A. M. (eds.), *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*, **1998**, Wiley-Liss, New York, NY, 51-71
97. Faruqi, A. F., Krawczyk, S. H., Matteucci, M. D., and Glazer, P. M., Potassium-resistant triple helix formation and improved intracellular gene targeting by oligodeoxyribonucleotides containing 7-deazaxanthine, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25(1), 633-40
98. Buhr, C. A., Wagner, R. W., Grant, D., Froehler, B. C., Oligodeoxynucleotides containing C-7 propyne analogs of 7-deaza-2'-deoxyguanosine and 7-deaza-2'-deoxyadenosine, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24(15), 2974-80
99. Wagner, R. W., Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides, *Nature*, **1994**, 372, 333-5
100. Brockmann, R. W., Rundles, R. W. et al., Purines, *Med. Pediatr. Oncol.*, **1983**, 11, A 388-392
101. Robins, R. K., Revankar, G. R., Purine analogs and related nucleosides and nucleotides as antitumor agents, *Med. Res. Rev.*, **1985**, 5, 273-96

102. Seela, F., Tran-Thi, Q.-H., Mentzel, H., and Erdmann, V. A., *Biochemistry*, **1981**, 20, 2559
103. Fletcher, T. M., Salazar, M., and Chen, S. F., Human telomerase inhibition by 7-deaza-2'-deoxypurine nucleoside triphosphates, *Biochemistry*, **1996**, 35, 15611-7
104. Davoll, J., Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines, *J. Org. Chem.*, **1960**, 131-138
105. Noell, C. W., Robins, R. K., Aromaticity in heterocyclic systems. II. The application of NMR in a study of the synthesis and structure of certain imidazo[1,2-c]pyrimidines and related pyrrolo[2,3-d]pyrimidines, *J. Heterocyclic Chem.*, **1964**, 1, 34-41
106. Taylor, E. C., Hendress, R. W., Synthesis of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. The Aglycone of Toyocamycin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 1995-2003
107. Seela, F., Mannich-Reaktion am 2-Amino-3,7-dihydropyrrolo[2,3d]-pyrimidin-4-on, dem Chromophor des Ribonucleosids "Q", *Chem. Ber.*, **1977**, 110, 1462-69
108. Seela, F., Richter, R., Aminomethylierung von 3,7-Dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidinen an C-5 - ein Weg zur Synthese von Aglycon-Analoga des Nucleosids "Q", *Chem. Ber.*, **1978**, 111, 2925-30
109. Seela, F., Bußmann, W., Götze, A, et al., Nucleotides, Nucleosides, and Their Biological Applications, **1983**, Academic Press, New York, 181-208
110. Seela, F., Winkeler, H.-D., Synthese von Acyclo-7-desazaguanosin durch regio-spezifische Phasentransferalkylierung von 2-Amino-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 137-146
111. Robins, M. J., and Uznanski, B., *Can. J. Chem.*, **1981**, 59, 2608-12
112. Seela, F., Steker, H., Driler, H., Bindig, U., 2-Amino-2'-desoxytubercidin und verwandte Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinyl-2'-desoxyribofuranoside, *Liebigs Ann. Chem.*, **1987**, 15-19
113. Hoffer, M., α -Thymidin, *Chem. Berichte*, **1960**, 93, 2777-81
114. Deriaz, R. E., Overend, W. G., Stacey, M., and Wiggins, L. F., Deoxy-Sugars. Part VI. The Constitution of β -Methyl-2-deoxy-L-ribofuranoside and of $\alpha\beta$ -Methyl-2-deoxy-L-ribofuranoside, *J. Chem. Soc.*, **1949**, 2836-41
115. Köster, H., and Schramm, G., Zum Mechanismus der Nucleosidsynthese mit Polyphosphorsäurephenylester, *Chem. Ber.*, **1969**, 102, 3868-76
116. Nakata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1989**, 62, 2618-2635
117. He, D. Y., et al., Studies on Carbohydrates X, A New Method for the Preparation of Isopropylidene Saccharides, *Synthetic Communications*, **1992**, 22, 2653-8
118. Kaskar, B., Heise, G. L., Michalak, R. S., and Vishnuvajjala, B. R., A Convenient Large Scale Synthesis of Protected D-Ribonolactone From D-Ribose, *Synthesis*, **1990**, 1031-2
119. Johnson, D. A., Taubner, L. M., Efficient Method for the t-Butyldimethylsilylation of Alcohols with N,O-Bis(t-butyldimethylsilyl)acetamide, *Tet. Lett.*, **1996**, 37, 5, 605-8
120. Downie, I. M., Lee, J. B., and Matough, M. F. S., The Reaction of Alcohols with Carbon Tetrachloride and Phosphorus Trisdimethylamide, *Chem. Comm.*, **1968**, 1350-1
121. Winkeler, H.-D., Seela, F., 4-Amino-7-(β -D-arabinofuranosyl)pyrrolo[2.3-d]pyrimidin - die Synthese von Ara-Tubercidin durch Phasentransferkatalyse, *Chem. Ber.*, **1980**,

- 113, 2069-80
122. Walker, R. T., in comprehensive Organic Chemistry (D. Barton und W.O. Ollis, eds.), **1979**, Pergamon Press, Oxford, Bd. 5, 53
123. Seela, F., Winkeler, H.-D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1979**, 18, 536
124. Holy, A., Sorm, F., *Collect Czech. Chem. Commun.*, **1969**, 34, 3383
125. Kondo, T., Ohgi, T., Goto, T., *Agric. Biol. Chem.*, **1977**, 41, 1501
126. Girgis, N. S., Michael, M. A., Smee, D. F., Alaghamandan, H. A., Robins, R. K., and Cottam, H. B., Direct C-Glycosylation of Guanine Analogues: The Synthesis and Antiviral Activity of Certain 7- and 9-Deazaguanine C-Nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2750-5
127. Sudhakar Rao, T., Lewis, A. F., Durland, R. H., and Revankar, G. R., A Total Synthesis of 2'-Deoxy-9-deazaguanosine(9-Deaza-G) and its Incorporation into Triple Helix Forming Oligodeoxyribonucleotides with Antiparallel Motif, *Tet. Lett.*, **1993**, 34, 6709-12
128. Seela, F., 2'-Desoxytubercidin - Synthese eines 2'-Desoxyadenosin-Isosteren durch Phasentransferglykosylierung, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 876-884
129. Soula, G., Tris(polyoxaalkyl)amines (Trident), a New Class of Solid-Liquid Phase-Transfer Catalysts, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 3717-21
130. Seela, F., Winter, H., and Möller, M., Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine 2'-Deoxy- and 2',3'-Dideoxyribonucleosides: Studies on the Glycosylation of 4-Methoxypyrazolo[3,4-d]pyrimidin, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, 76, 1450-8
131. Kazimierczuk, Z., Revankar, G. R., and Robins R. K., Synthesis of 2'-Deoxytubercidin, 2'-Deoxyadenosine, and related 2'-Deoxynucleosides via a novel direct stereospecific sodium salt glycosylation procedure, *Journal Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6379-82
132. Ramasamy, K., A facile and improved synthesis of tubercidin and certain related pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleosides by the stereospecific sodium salt glycosylation procedure, *J. Heterocyclic Chem.*, **1988**, 25, 1893-8
133. Kolick, M. P., Szantay, C., and Bardos, T. J., *J. Org. Chem.*, **1969**, 34, 3806
134. Seela, F., Liquid-liquid and solid-liquid phase-transfer glycosylation for Pyrrolo[2,3-d]-pyrimidines: stereospecific synthesis of 2-Deoxy- β -D-ribofuranosides related to 2'-Deoxy-7-carbaguanosine, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **1988**, 697-702
135. Wierenga, W. and Skulnick, H. I., Stereochemical control as a function of protecting group participation in 2-Deoxy-D-erythro-pentofuranosyl nucleosides, *Carbohydr. Res.*, **1981**, 90, 41-52
136. Chapeua, M.-C., and Marnett, L. J., Pentenyl Ribosides: New Reagents for Purine Nucleoside Synthesis, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 7258-62.
137. Kawakami, H., et al., Stereoselectivities in the Coupling Reactions between 2-Deoxyribose Derivative and Silylated Adenine, *Chem. Lett.*, **1989**, 1365-68
138. Downie, I. M., Lee, J. B., and Matough, M. F. S., The Reaction of Alcohols with Carbon Tetrachloride and Phosphorous Trisdimethylamide, *Chem. Com.* **1968**, 1350-1
139. Wilcox, C. S., and Otoski, R. M., *Tet. Lett.*, **1986**, 27 (9), 1011-4

140. Wirsching, J., Dissertation, **1999**, Universität Hamburg
141. Letsinger, R. L., Lunsford, W. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98 (12), 3655-61
142. Köster, H., Blocker, H., Frank, R., Geussenhainer, S., and Kaiser, W., Total synthesis of a structural gene for the human peptide hormone angiotensin, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **1975**, 356 (10), 1585-93
143. Beaucage, S. L., Caruthers, M. H., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22 (20), 1859-62
144. Biernat, J., Hasselmann, H., Hofer, B., Kennedy, N., and Köster, H., *Protein Eng.*, **1987**, 1 (4), 345-51
145. Daub, G. W., Tamelen, van, E. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 3526-8
146. Gao, X., Gaffney, B.L., Senior, M., Riddle, R. R., and Jones, R. A., *Nucleic Acids Res.*, **1985**, 13, 573-84
147. Sinha, N. D., Großbruchhaus, V., and Köster, H., *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 9, 877-80
148. Cramer, F., Köster, H., Synthesis of oligonucleotides on a polymeric carrier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1968**, 7(6), 473-4
149. Köster, H., Hoppe, N., Kohli, V., Kropelin, M., Kaut, H., and Kulikowski, K., Some improvements in the synthesis of DNA of biological interest, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1980**, 7, 39-60
150. Köster, H., Stumpe, A., and Wolter, A., *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 8, 747-50
151. Sproat, B. S., Bannwarth, W., *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 51, 5771-4
152. Beaucage, S. L., Caruthers, M. H., *Tetrahedron Letters*, **1981**, 22, 20, 1859-62
153. Caruthers, M. H., Barone, A. D., Beaucage, S. L., et al., Chemical synthesis of deoxy-oligonucleotides by the phosphoramidite method, *Meth. Enzymol.*, **1987**, 154, 287-313
154. Köster, H., Stumpe, A., and Wolter, A., *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 8, 747-50
155. Lyttle, M. H., Wright, P. B., Sinha, N. D., Bain, J. D., and Chamberlin, A. R., *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 4608-15
156. Beaucage, S. L., Iyer, R. P., *Tetrahedron*, **1993**, 49 (10), 1925-63
157. Tang, K., Fu, D., Kötter, S., Cotter, R. J., Cantor, C. R., and Köster, H., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23 (16), 3126-31
158. Jurinke, C., Zöllner, B., Feucht, H., Jacob, A., Kirchhübel, J., Lüchow, A., Boom, van den D., Laufs, R., and Köster, H., Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum Samples via Nested PCR and MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Genet. Anal. Biomolecular Engineering*, **1996**, 13, 67-71
159. Agarwal, K. L., Yamazaki, A., Cashion, P. J., and Khorana, H. G., *Angew. Chem.*, **1972**, 84, 489
160. Kohli, V., Blöcker, H., and Köster, H., *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2683-6
161. Sinha, N. D., Davis, P., Usman, N., Pérez, J., Hodge, R., Kremsky, J., and Casale, R., Labile exocyclic amine protection of nucleosides in DNA, RNA and oligonucleotide analog synthesis facilitating N-deacylation, minimizing depurination and chain degradation, *Biochimie*, **1993**, 75, 13-23

162. Schaller, H., Weimann, G., Lerch, B., and Khorana, H.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3821-7
163. Schulhof, J. C., Molko, D., Teoule, R., The final deprotection step in oligonucleotide synthesis is reduced to a mild and rapid ammonia treatment by using labile base-protecting groups, *Nucl. Acids Res.*, **1987**, 15, 397-416
164. Stawinski, J., Hozumi, T., Narang, S.A., Bahl, C. P., and Wu, R., *Nucleic Acids Res.*, **1977**, 4, 353
165. Ti, G. S., Gaffney, B. L., and Jones, R. A., Transient Protection: Efficient One-Flask Synthesis of Protected Deoxynucleosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 1316-9
166. Chaudhary, S. K., Hernandez, O., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 99
167. Büchi, H., Khorana, H. G., *J. Mol. Biol.*, **1972**, 72, 251-288
168. Guy, A., Duplaa, A.-M., Harel, P., and Téoule, R., *Helv. Chim. Acta*, **1988**, 71, 1566-72
169. Winkeler, H. D., persönliche Mitteilung, **1998**
170. McGee, D. P. C., Martin, J. C., and Webb, A. S., A Simple High Yield Synthesis of N²-(2-Methylpropanoyl)-2-deoxyguanosin, *Synthesis*, **1983**, 540-41
171. Sinha, N. D., Biernat, J., McManus, J., and Köster, H., Betacyanoethyl-*N,N*-dialkyl-amino/*N*-morpholino monochloro phosphoramidites: new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 5843
172. Sinha, N. D., Biernat, J., McManus, J., and Köster, H., Polymer support oligonucleotide synthesis: XVIII. Use of betacyanoethyl-*N,N*-dialkylamino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product, *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12 (11), 4539
173. McBrigde, L. C., Caruthers, M. H., *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 3243-6
174. Scott, S., Hardy, P., Sheppard, R. C., and McLean, M. J., Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis, 3rd International Symposium, **1994**, Ed. Roger Epton, Mayflower Worldwird, 115-124
175. Schneider, K., and Chait, B. T., *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 9, 1570-5
176. Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Scheinder, K. C., Wellnhofer, G., and Moroney, S. E., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 25, 5600-7
177. Maréchal, D., persönliche Mitteilung, **1997**, Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien
178. Seela, F., Palindromic Octa- and Dodecanucleotides Containin 2'-Deoxytubercidin: Synthesis, Hairpin Formation, and Recognition by the Endodeoxyribonuclease EcoRI, *Biochem.*, **1987**, 26, 2232-38.
179. Mullis, K. B., Eine Nachtfahrt und die Polymerasekettenreaktion, *Spektrum der Wissenschaft*, **1990**, 6, 60-67
180. Newton, C., and Graham, A., PCR, **1994**, Spektrum Verlag, Heidelberg
181. Seminar molekulare Lebensmittelanalytik, **1999**, Hamburg, Fa. Perseptive Biosystems
182. Feyerabend, S., Dissertation, **1999**, Universität Hamburg
183. Boom, van den, D., *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **1995**

184. Fernandez-Rachubinski, F., Eng, B., Murry, W. W., Blajchman, M. A., and Rachubinski, R. A., Incorporation of 7-deaza dGTP during the amplification step in the polymerase chain reaction procedure improves subsequent DNA sequencing, *DNA Seq.*, **1990**, 1, 137-40
185. McConlogue, L., Brow, M. A., and Innis, M. A., Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine, *Nucleic Acids Res.*, **1988**, 16 (20), 9869
186. Seela, F., Rosemeyer, H., Krecmerova, M., and Roling, A., Solid-phase synthesis of oligo(2'-desoxyxylonucleotides) and PCR amplification of base-modified DNA fragments, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1991**, 24, 87-90
187. Le Pecq, J-B., Use of ethidium bromide for separation and determination of nucleic acids of various conformational forms and measurement of their associated enzymes. In *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 20 (D. Glick, ed.), **1971**, John Wiley & Sons, New York, 41-86
188. Kay, R. E., Walwick, E. R., Gifford, C. K., Spectral Changes in a Cationic Dye Due to Interaction with Macromolecules, *J. of Physical Chem.*, **1964**, 68 (7), 1896-1906
189. Mitzusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F., *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 1319-1324
190. Shaler, T. A., Tan, Y., Wickham, J. N., Wu, K. J., and Becker, C. H., *Rapid Commun. Mass Spec.*, **1995**, 9, 942-947
191. Jurinke, C., *Diplomarbeit*, **1995**, Universität Hamburg
192. Pieves, U., Zürcher, W., Schär, M., and Moser, H. E., *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3191
193. Nordhoff, E., Cramer, R. C., Karas, M., Hillenkamp, F., Kirpekar, F., Kristiansen, K., and Roepstorff, P., *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3348-57
194. Siegert, C., *Diplomarbeit*, **1995**, Universität Hamburg
195. Siegert, C. W., Jacob, A., and Köster, H., Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Detection of Polymerase Chain Reaction Products Containing 7-Deazapurine Moieties, *Anal. Biochem.*, **1996**, 243, 55-65
196. Little, D. P., Jacob, A., Becker, T., Braun, A., Darnhofer-Demar, B., Jurinke, C., Boom, van den D., and Köster, H., Direct Detection of synthetic and biologically directed double-stranded DNA by MALDI-TOF MS, *Int. J. Mass-Spectrom. Ion Processes*, **1997**, 169/170, 133-40
197. Lecchi, P. and Pannel, L. K., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, 6, 972-75
198. Köster, H., Albersmeyer, K., and Skroch, D., *Z. Physiol. Chem.*, **1978**, 359, 1570-89
199. Hultman, T. Ståhl, S., Hornes, E., and Uhlen, M., *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 4937-46
200. Tang, X. and Smith, L. M., *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2672-77
201. Pähler, A., Hendrickson, W. A., Grawinowicz Kolks, M. A., Argaraña, C. E., and Cantor, C. R., Characterization and crystallization of core streptavidin, *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 13933-7
202. Tang, X., and Smith, L. M., *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2672-77
203. Cocuzza et al., United States Patent, **1996**, Ser. No. 05/484,701

-
204. Jurinke, C., van den Boom, D., and Köster, H., A Method for Dissociating Biotin Complexes. US Patent Application, **1996**, Ser. No. 08/649,876
205. Jurinke, C., van den Boom, D., Collazo, V., Lüchow, A., Jacob, A., and Köster, H., Recovery of Nucleic Acids from Immobilized Biotin-Streptavidin Complexes using Ammonium Hydroxide and Applications in MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 904-10
206. Nordhoff, E., Cramer, R., Karas, M., Hillenkamp, F., Kirekepar, F., Kristiansen, K., and Roepstorff, P., *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3347-57
207. Wu, K. J., Shaler, T. A., and Becker, C. H., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1637-45
208. Tang, K., Taranenko, N. E., Allman, S. L., Chang, L. Y., and Chen, C. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 727-30
209. Bai, J., Liu, Y., Liang, X., Zhu, Y., and Lubman, D.M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, 9, 1172-76
210. Seela, F., and Kehne, A., *Biochemistry*, **1987**, 26, 2232-38
211. Mizusawa, S., Nishimura, S., and Seela, F., *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 1319-24
212. Seela, F., Tran-Thi, Q. H., and Franzen, D., Poly(7-deazaguanylic acid), the homopolynucleotide of the parent nucleoside of queuosine, *Biochem.*, **1982**, 21, 4338-43
213. Boom, v. d. D., Jurinke, C., Higgins, S., Becker, Th., and Köster, H., Mass spectrometric DNA diagnostics, *Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, 17, 2157-64
214. v. d. Boom, D., Entwicklung neuer Verfahren zur DNA-Sequenzanalyse unter Anwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie, *Dissertation*, **1998**, Universität Hamburg
215. Sanger, F., and Coulson, A. R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, **1975**, 94, 444-48
216. Yamakawa, H., and Ohara, O., A DNA cycle sequencing reaction that minimizes compressions on automated fluorescent sequencers, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 6, 1311-12
217. Henikoff, S., Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted break-points for DNA sequencing, *Gene*, **1984**, 28, 351-59
218. van den Boom, D., persönliche Mitteilung, **1998**, Fa. Sequenom Industrial Genomics
219. Collazo, V., Untersuchungen von Endonucleasen in der DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **1996**
220. Kirpekar, F., Nordhoff, E., Kristiansen, K., Roepstorff, P., Lezius, A., Hahner, S., Karas, M., and Hillenkamp, F., Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 3866-70
221. Nordhoff, E., Cramer, R., Karas, M., Hillenkamp, F., Kirpekar, F., Kristiansen, K., and Roepstorff, P., *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 3357-57
222. Faulstich, K., Wörner, K., Brill, H., and Engels, J. W., A Sequencing Method for RNA Oligonucleotides Based on Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4349-53
223. Habermehl, G., und Hamann, P., *Naturstoffchemie: Eine Einführung*, **1992**, 1. Aufl., Springer, Berlin, 388

224. Brown-Driver, V., Eto, T., Lesnik, E., Anderson, K. P., and Hanecak, R. C., Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1999**, 9, 2, 145-54
225. Kim, M. G., and Camerini-Otero, R. D., An alteration in the structure of the minor groove of duplex DNA induced by the formation of an intermolecular d(GA)_n:d(GA)_n:d(TC)_n triplex, *Mol. Cells*, **1997**, 7 (5), 641-47
226. Wilds, C. J., and Damha, M. J., *Bioconjug Chem.*, **1999**, 10 (2), 299-305
227. Gao, G., Orlova, M., Georgiadis, M. M., Hendrickson, W. A., and Goff, S. P., Conferring RNA polymerase Activity to a DNA polymerase: A single residue in reverse transcriptase controls substrate selection, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, 94, 407-11
228. Jacutin, S., Zhang, A. J., Russell, D. H., Gibbs, R. A., and Burgess, K., *Nucleic Acids Research*, **1997**, 25 (24), 5072-76
229. Pauk, C., *Dissertation*, in Vorbereitung, Universität Hamburg
230. Jurinke, C., v. d. Boom, D., Jacob, A., Tang, K., Wörl, R., and Köster, H., Analysis of Ligase Chain Reaction Products via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight-Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, **1996**, 237, 174-81
231. Köster, H., et al., DNA Diagnostics Based on Mass Spectrometry, U.S. Patent, Ser. 5,606,798, issued **1997** to Sequenom Inc., CIP of Ser. 178,216, Jan 6 1994, U.S. Patent Ser. 5,547,835
232. Köster, H., Tang, K., Fu, D.-J., Siegert, C. W., Little, D. P., Higgins, G. S., Jurinke, C., van den Boom, D., Xiang, G., and Lough, D., DNA Diagnostics Based on Mass Spectrometry, filed **1996**, CIP of Ser.No. 08/617,256 and 08/406,199
233. Roskey, M. T., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, 93, 4724-9
234. Shaler, T. A., *Rapid Comm. Mass Spec.*, **1995**, 942-7
235. Köster, H., Tang, K., Fu, D. J., Braun, A., van den Boom, D., Smith, C. L., Cotter, R. J. and Cantor, C.R., A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry, *Nature Biotech.*, **1996**, 14, 1123-8
236. Bourdat, A. G., Gasparutto, D., and Cadet, J., *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27(4), 1015-24
237. Fu, D. J., Tang, K., Braun, A., Reuter, D., Darnhofer-Demar, B., Little, D. P., O'Donnell, M. J., Cantor, C. R., and Köster, H., Sequencing exons 5 to 9 of the p53 gene by MALDI-TOF mass spectrometry, *Nature Biotech.*, **1998**, 16 (4), 381-4
238. Lin, S., Cotter, R. J., Woods, A. S., Detection of non-covalent interaction of single and double stranded DNA with peptides by MALDI-TOF, *Proteins*, **1998**, Suppl. 2, 12-21
239. Thiede, B., von Janta-Lipinski, M., *Rapid Commun. Mass Spec.* **1998**, 12, 1889-94
240. Fei, Z., Ono, T., and Smith, L. M., MALDI-TOF mass spectrometric typing of single nucleotide polymorphism with mass-tagged ddNTPs, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 2827-8
241. Jacob, A., *Dissertation*, **1999**, Universität Hamburg
242. Seela, F., and Thomas, H., Synthesis of Certain 5-Substituted 2'-Deoxytubercidin Derivatives, *Helv. Chim. Acta*, **1994**, 77, 897-903
243. Attrott, S., *Diplomarbeit*, **1997**, Universität Hamburg

-
244. Patil, S. A., Otter, B. A., and Klein, R. S., *J. Heterocyclic Chem.*, **1993**, 30, 509-15
245. Bornscheuer, U. T., Gerichtete Evolution von Enzymen, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 3285-88
246. Sujino, K. and Sugimura, H., Stereocontrolled Synthesis of β -D-2'-Deoxyribonucleosides by Intramolecular Glycosylation, *Chem. Lett.*, **1993**, 1187-90
247. Limori, T., Kobayashi, H., Hashimoto, S., and Ikegami, S., *Heterocycles*, **1996**, 485-8
248. Taylor, E. C., and Hu, B., A Fischer-Indole Approach to Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines, *Heterocycles*, **1996**, 43, 323-38
249. Zhang, Z., and Tang, J. Y., A Novel Phosphitylating Reagent for in situ Generation of Deoxyribonucleoside Phosphoramidites, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 3, 331-4
250. Berkenkamp, S., Kirpekar, F., and Hillenkamp, F., Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids, *Science*, **1998**, 5374, 281, 260-2
251. Owens, D. R., Bothner, B., Phung, Q., Harris, K., and Siuzdak, G., Aspects of oligonucleotide and peptide sequencing with MALDI and electrospray mass spectrometry, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6(9), 1547-54
252. Hannis, J. C., and Muddiman, D. C., *Rapid Commun. Mass Spec.*, **1999**, 13, 954-62
253. Scalf, M., Westphall, M. S., Krause, J., Kaufmal, S. L., and Smith, L. M., Controlling charge states of large ions, *Science*, **1999**, 5399, 283, 194-7
254. Piyadasa, C. K., Hakansson, P., and Ariyaratne, T. R., A high resolving power multiple reflection matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13 (7), 620-4
255. Gysler, J., Helk, B., Dambacher, S., Tjaden, U. R., and v. d. Greef, J., *Pharm. Res.*, **1999**, 16 (5), 695-701
256. Choudhary, G., Chakel, J., Hancock, W., Torres-Duarte, A., McMahon, G., and Wainer, I., Investigation of the potential of capillary electrophoresis with off-line matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for clinical analysis: examination of a glycoprotein factor associated with cancer cachexia, *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (4), 855-9
257. Preisler, J., Foret, F., and Karger, B. L., On-line MALDI-TOF MS using a continuous vacuum deposition interface, *Anal. Chem.*, **1998**, 70 (24), 5278-87
258. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M., *Electrophoresis*, **1999**, 20 (3), 601-5
259. Nilsson, C. L., Puchades, M., Westman, A., Blennow, K., and Davidsson, P., *Electrophoresis*, **1999**, 20 (4-5), 860-5
260. Hung, K. C., Ding, H., and Guo, B., Use of poly(tetrafluoroethylene)s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins, *Anal. Chem.*, **1999**, 71(2), 518-21
261. Hung, K. C., Rashidzadeh, H., Wang, Y., Guo, B., Use of paraffin wax film in MALDI-TOF analysis of DNA, *Anal. Chem.*, **1998**, 70 (14), 3088-93
262. Figueroa, I. D., Torres, O., and Russell, D. H., Effects of the water content in the sample preparation for MALDI on the mass spectra, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 4527-33

-
263. Jespersen, S., Niessen, W. M., Tjaden, U. R., and v. d. Greef, J., Basic matrices in the analysis of non-covalent complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **1998**, 33(11), 1088-93
264. Yalcin, T., Dai, Y., and Li, L., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer analysis: solvent effect in sample preparation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9(12), 1303-10
265. Geyer, H., Schmitt, S., Wuhrer, M., and Geyer, R., Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS, *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (2), 476-82
266. Little, D. P., Cornish, T. J., O'Doneel, M. J., Braun, A., Cotter, R. J., and Köster, H., MALDI on a Chip: Analysis of Arrays of Low-Femtomole to Subfemtomole Quantities of Synthetic Oligonucleotides and DNA Diagnostic Products Dispensed by a Piezoelectric Pipet, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4540-6
267. Picoliter sample preparation in MALDI-TOF MS using a micromachined silicon flow-through dispenser, *Anal. Chem.*, **1998**, 70 (22), 4755-60
268. Simpson, P. C., Roach, D., Woolley, A. T., Thorsen, T., R. Johnston, G. F., Sensabaugh, and Mathies, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 2256-61
269. Kopp, M. U., Mello, A. J., and Manz, A., *Science*, **1998**, 280, 1046-48
270. Zorbas, H., Miniatur-Durchfluß-PCR: ein Durchbruch?, *Angew. Chem.*, **1999**, 111 (8), 1121-24
271. Köster, H., DNA Sequencing by Mass Spectrometry via exonuclease degradation, U.S. Patent, Ser. No. 5,872,003, issued **1999** to Sequenom, Inc.
272. Braun, A., Little, D. P., and Köster, H., *Clin. Chem.*, **1997**, 43, 1151-8
273. Little, D. P., Braun, A., Darnhofer-Demar, B., and Köster, H., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **1997**, 35, 545-8
274. Little, D. P., Braun, A., Darnhofer-Demar, B., Frilling, A., Li, Y., McIver, R., T. Jr., and Köster, H., *J. Mol. Med.*, **1997**, 75, 745-750
275. O'Donell, M. J., Tang, K., Köster, H., Smith, C. L., and Cantor, C. R., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 2438-43
276. Griffin, T. J., Hall, J. G., Prudent, J. R., and Smith, L. M., Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96 (11), 6301-6
277. Ross, P., Hall, L., Smirnov, I., and Haff, L., High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry, *Nature Biotech.*, **1998**, 16 (13), 1347-51
278. Taranenko, N. I., Potter, N. T., Allman, S. L., Golovlev, V. V., and Chen, C. H., *Genet. Anal.*, **1999**, 15 (1), 25-31
279. Kerk, A., DNA-Chips: Diagnostik vom Fließband?, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1999**, 47 (7), 777-9
280. Ullrich, K., Hinnen, A. und Saluz, H., Bedeutung der Biochips für den Weltmarkt, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1999**, 47(7), 780-1
281. Auf viele Fragen eine Antwort - aber noch nicht heute, Interview mit Bartram, C. R., in *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1999**, 47(7), 782

VIII. Literaturverzeichnis

282. Taylor, E. C., Hendress, R. W., Synthesis of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. The Aglycone of Toyocamycin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 1995-2003
283. Lüpke, U., Seela, F., Ribosidierung von 7*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on an N-3, *Chem. Ber.*, **1979**, 112, 232-235
284. Ness, R. K., McDonald, D. L., Fletcher, Jr., H. G., 2-Deoxy-D-ribose. VII. Crystalline 2-Deoxy-3,5-di-O-p-nitrobenzoyl-D-ribosyl Chloride and Related Derivatives, **1961**, 26, 2895-99
285. Siegert, C., Erasmus-Projekt, **1992**, University of Newcastle upon Tyne
286. Barker, R., and Fletcher Jr., H. W., 2,3,5-Tri-O-D-ribosyl and -L-arabinosyl Bromides, *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 4605-13
287. Rosemeyer, H., and Seela, F., Stereoselective Synthesis of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine α - and β -D-Ribonucleosides from Anomerically Pure D-Ribofuranosyl Chlorides: Solid-Liquid Phase-Transfer Glycosylation and ¹⁵N-NMR Spectra, *Helv. Chim. Acta*, **1988**, 71, 1573-85
288. Seela, F., Driller, H., Steker, H., Synthesis of 7-Deazapurine Nucleosides under Phase-transfer Conditions in "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides" - Section III: Nucleosides, **1987**, Townsend, L. B., Ed., Plenum Press New York, 302-308
289. Kazimierczuk, Z., Revankar, G. R., Robins R. K., Synthesis of 2'-Deoxytubercidin, 2'-Deoxyadenosine, and related 2'-Deoxynucleosides via a novel direct stereospecific sodium salt glycosylation procedure, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6379-82
290. Seela, F., Bußmann, W., *Liebigs Ann. Chem.*, **1984**, 1972
291. Entsprechend einer Praktikumsvorschrift aus dem organisch chemischen Praktikum für Biochemiker der Universität Hamburg
292. Schulhof, J. C., Molko, D., Teoule, R., The final deprotection step in oligonucleotide synthesis is reduced to a mild and rapid ammonia treatment by using labile base-protecting groups, *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 397-416
293. McGee, D. P. C., Martin, J. C., Webb, A. S., A Simple High Yield Synthesis of N²-(2-Methylpropanoyl)-2-deoxyguanosin, *Synthesis*, **1983**, 540-541
294. Köster, H., Biernat, J., McManus, J., Wolter, A., Stumpe, A., Narang, C.K., Sinha, N.D., *Tetrahedron*, **1984**, 40, 1 103-112
295. Sinha, N. D., et al., Labile exocyclic amine protection of nucleosides in DNA, RNA and oligonucleotide analog synthesis facilitating N-deacylation, minimizing depurination and chain degradation, *Biochimie*, **1993**, 75, 13-23
296. Schumacher, J., LKB Sonderdruck RE040, **1985**
297. Sternbach, H., Chromatographische Methoden in der Biochemie, **1991**, Thieme Verlag, Stuttgart