

**Synthese von Nucleotid-Derivaten mit
Phosphorsäureamid-Verknüpfung:
Fluoreszenz-Markierung für die quantitative
Bestimmung
und neuartige P2Y-Rezeptor-Liganden**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Christiane Danhauser
aus
Mindelheim

Bonn 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller

2. Referent: Prof. Dr. Gerd Bendas

Tag der Promotion: 23.11.2010

Erscheinungsjahr: 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2004 bis November 2007 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. C. E. Müller für ihre Unterstützung, ihre stetige Diskussionsbereitschaft und vor allem ihre zahlreichen Anregungen die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei Prof. Gerd Bendas für die freundliche Übernahme des Koreferates bedanken.

***Für meinen Vater
Heinz Joachim Danhauser***

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	4
2.1	Kapillarelektrophorese	4
2.1.1	Der elektroosmotische Fluss	4
2.1.2	Detektoren	8
2.1.3	Probenaufgabe	8
2.1.4	Puffersysteme	10
2.1.5	Kapillarelektrophoretische Methoden	11
2.1.5.1	Kapillaronenelektrophorese	11
2.1.5.2	Elektrokinetische Chromatographie	11
2.1.5.3	Kapillargelelektrophorese	13
2.2	Fluoreszenzmarkierung	13
2.2.1	Charakteristika moderner Fluoreszenzmarker	14
2.2.1.1	Eigenschaften von Fluorescein-Farbstoffen	15
2.2.1.2	Eigenschaften von Dansyl-Farbstoffen	15
2.2.1.3	Eigenschaften von BODIPY-Fluorophoren	15
2.2.2	Ankergruppen	16
2.3	Derivatisierungsreaktionen für Nucleotide und Nucleoside	16
2.3.1	N ⁶ - Ethenopurine	16
2.3.2	Malaprade-Spaltung	18
2.3.3	Derivatisierung von Guanin-Derivaten mit Phenylglyoxal	18
2.3.4	Derivatisierung von Cytidin-Derivaten mit Phenacylbromid	18
2.3.5	Komplexierung der vicinalen Dirole mit Borsäurederivaten	19
2.3.6	Derivatisierung von Nucleotiden durch Phosphoramid-Verknüpfung	20
3	Aufgabenstellung	21
4	Fluoreszenzmarkierung von Nucleotiden mittels Boronsäuren	22
4.1	Umsetzung in wasserfreiem Medium	24
4.1.1	Durchführung	24
4.1.2	Ergebnisse	25
4.2	Umsetzung in wässrigem Medium	26
4.2.1	Durchführung	26
4.2.2	Ergebnisse	27
4.3	Zugabe von Phenylboronsäure zum Laufpuffer	27
4.3.1	Einfluss von Adenosin auf die Fluoreszenzquantenausbeute von m-Dansylaminophenylboronsäure	28
4.3.1.1	Durchführung	28
4.3.1.2	Ergebnisse	28
4.3.2	Vergleich der Migrationszeiten mit und ohne Phenylboronsäure im Laufpuffer	30
4.3.2.1	Durchführung	30
4.3.2.2	Ergebnisse	31
4.4	Zugabe von m-Dansylaminophenylboronsäure zum Laufpuffer	32
5	Fluoreszenzmarkierung von Nucleotiden mittels Phosphoramid- Verknüpfung	33
5.1	Stand der Forschung	33

5.2 Umsetzung von Nucleotiden mit Dansylaminoethylamin unter Verwendung von N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC) als Kupplungsreagenz.....	37
5.2.1 Synthese von Dansylaminoethylamin (1)	37
5.2.2 Umsetzung von AMP mit Dansylaminoethylamin	38
5.2.2.1 Durchführung	38
5.2.2.2 Ergebnisse	39
5.2.3 Anwendung des He-Cd-Lasers nach Umsetzung von AMP, GMP und ATP mit Dansylaminoethylamin.....	41
5.2.3.1 Durchführung	41
5.2.3.2 Ergebnisse	42
5.2.4 Optimierungsversuche	42
5.2.4.1 Optimierung der EDC-Konzentration	43
5.2.4.2 Optimierung des pH-Wertes des 1-Methylimidazol-Puffers	44
5.2.4.3 Optimierung der Pufferkonzentration	44
5.2.4.4 Optimierung des Volumens an Dansylaminoethylamin-Lösung	45
5.2.4.5 Optimierung des Lösungsmittels.....	46
5.2.4.6 Optimierung der Puffermenge.....	46
5.2.5 Die entwickelte Derivatisierungsmethode.....	47
5.2.6 Validierung der Derivatisierung mit Dansylaminoethylamin	48
5.2.6.1 Bestimmung der Umsetzungsrate.....	48
5.2.6.1.1 Synthese von Dansyl-AMP (2).....	48
5.2.6.1.2 Herstellung der Probelösungen	49
5.2.6.1.3 Ergebnisse	49
5.2.6.2 Probenvorbereitung für die Validierung	50
5.2.6.3 Nachweis und Bestimmungsgrenze.....	50
5.2.6.4 Linearität und Wiederfindung	51
5.2.6.5 Präzision der Migrationszeit und der Peakfläche.....	52
5.2.6.6 Robustheit der Methode.....	52
5.2.6.7 Validierungsdaten von Dansyl-AMP	54
5.2.7 Diskussion.....	54
5.3 Verknüpfung von Nucleotiden mit einem Fluorescein-Derivat.....	56
5.3.1 Synthese eines Fluorescein-Derivatisierungsreagenzes durch Amidkupplung	56
5.3.2 Reinheitsprüfung mittels Kapillarelektrophorese	62
5.3.3 Kupplungsversuche mit dem Fluorescein-Fluorophor 8	63
5.3.3.1 Durchführung	63
5.3.3.2 Ergebnisse	64
5.3.4 Optimierung der Derivatisierung	65
5.3.4.1 Optimierung der EDC-Konzentration	65
5.3.4.2 Wiederholte Zugabe von EDC	66
5.3.4.3 Optimierung des 1-Methylimidazol-Puffer-pH-Wertes	67
5.3.4.4 Optimierung der 1-Methylimidazol-Pufferkonzentration.....	68
5.3.5 Neue Derivatisierungsmethode	69
5.3.6 Micellare elektrokinetische Chromatographie.....	69
5.3.7 Verwendung einer beschichteten Kapillare	69
5.3.7.1 Methodenfindung	70
5.3.7.2 Weitere Optimierung der Derivatisierung mit Verbindung 8	70
5.3.8 Diskussion.....	72
5.4 Derivatisierung von Nucleotiden mit 8-(5-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (9).....	73
5.4.1 Micellare elektrokinetische Chromatographie.....	73
5.4.1.1 Durchführung	73
5.4.1.2 Ergebnisse	74
5.4.2 CE-Detektion von ATP, ADP und AMP nach Umsetzung mit BODIPY-Derivat (9)	75
5.4.2.1 Durchführung	76
5.4.2.2 Ergebnisse	76
5.4.3 Zeitlicher Ablauf der Reaktion.....	79
5.4.3.1 Durchführung	79
5.4.3.2 Ergebnisse	79
5.4.4 Bestimmung der Umsetzungsrate von ATP, ADP, UTP und UDP mit Verbindung 9.....	80

5.4.4.1	Durchführung	80
5.4.4.2	Ergebnisse	80
5.4.5	Stabilität der Derivatisierungslösungen: 2-Tages-Vergleich.....	83
5.4.5.1	Stabilität der ATP-Derivatisierungslösung	83
5.4.5.1.1	Durchführung	83
5.4.5.1.2	Ergebnisse	84
5.4.5.2	Stabilität der UTP-Derivatisierungslösungen	84
5.4.6	Validierung der Umsetzung von ATP, ADP, UTP und UDP mit BODIPY-Derivat (9)	85
5.4.6.1	Probenvorbereitung für die Validierung	85
5.4.6.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	85
5.4.6.3	Linearität und Wiederfindung	86
5.4.6.4	Präzision der Migrationszeit und der Peakfläche.....	87
5.4.6.5	Validierungsdaten der Bestimmung von ATP, ADP, UTP und UDP	88
5.4.7	Messung an Tagen mit Temperaturen über 30°C	92
5.4.8	Verwendung von 3,5-Disulfobenzoesäure als internen Standard	93
5.4.8.1	Umsetzung von 3,5-Disulfobenzoesäure mit dem Fluorophor.....	94
5.4.8.1.1	Durchführung	94
5.4.8.2	Ergebnisse	95
5.4.9	Validierung der Bestimmung von ATP, ADP, UTP und UDP mit 3,5-Disulfobenzoesäure als internem Standard.....	96
5.4.9.1	Probenvorbereitung für die Validierung	96
5.4.9.2	Linearität und Wiederfindung	97
5.4.9.3	Präzision der Migrationszeit und der Peakfläche.....	100
5.4.9.4	Validierungsdaten der Bestimmung von ATP, ADP, UTP und UDP unter Verwendung von 3,5-Disulfobenzoesäure als internem Standard.....	101
5.4.10	Diskussion	105
6	P2-Rezeptoren	106
6.1	Verteilung P2Y-Rezeptoren	107
6.2	Therapeutisches Potential der P2Y-Rezeptoren	109
6.2.1	Blutplättchenaggregation	110
6.2.2	Cystische Fibrose (Mukoviszidose)	111
6.2.3	Trockenes Auge.....	111
6.3	Variation der Phosphatkette.....	112
6.4	Dinucleotide	113
6.5	Entwicklung neuer P2Y-Rezeptor-Liganden	115
7	Synthese von Nucleotid-Derivaten.....	116
7.1	Synthese von Phosphoramiden.....	116
7.1.1	Aufreinigung der Phosphoramide	116
7.1.2	Umsetzung von ATP	118
7.1.3	Umsetzung von UTP.....	123
7.1.3.1	Besonderheiten bei der Reaktion von UTP.....	127
7.1.4	Spaltung der Methyl und Ethylester	133
7.1.5	Hydrogenolytische Spaltung von Benzylestern	136
7.1.6	Stabilität von Phosphoramiden	137
7.2	Synthese von Adenosintetraphosphat (Ap ₄ , 60).....	138
7.2.1	Aufreinigung von Adenosintetraphosphat (60)	144
7.3	Analytik der neu dargestellten Verbindungen	145
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	154
9	Experimenteller Teil.....	160
9.1	Allgemeiner Teil	160
9.2	Synthesen.....	168

10 Anhang	266
10.1 Abkürzungsverzeichnis	266
10.2 Literaturverzeichnis	268
10.3 Danksagung	276
10.4 Lebenslauf.....	278

1 Einleitung

Vor über 100 Jahren wurde das Gesetz der unabhängigen Ionenwanderung (1. Gesetz von Kohlrausch) formuliert:

Geladene Teilchen wandern in Lösung unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Unter dem Begriff Elektrophorese versteht man die unterschiedliche Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Tiselius führte die Elektrophorese im Jahr 1937 als Trenntechnik ein.¹ Platzierte man in einem Tubus Proteinmischungen zwischen Elektrolytlösungen und legte ein elektrisches Feld an, so stellte er fest, dass Proteine in Richtungen und mit Geschwindigkeiten wanderten, die durch ihre Ladung und Mobilität bestimmt wurden.² Für seine Arbeiten auf dem Gebiet der Trenntechnik insbesondere der Serumproteine des Blutes erhielt Tiselius 1948 den Nobelpreis für Chemie. Die Trennleistung elektrophoretischer Trennungen in Lösung, wie von Tiselius durchgeführt, ist durch thermische Diffusion und Konvektion stark begrenzt. Aus diesem Grund werden Gele oder mit Elektrolytlösung imprägnierte Papierstreifen eingesetzt. Die traditionelle Elektrophorese verwendet anti-konvektive Medien wie Polyacrylamid oder Agarose-Gele, mit denen Biopolymere, die als Polyanionen oder Kationen mit gleichem Oberflächen-Ladungsverhältnis vorliegen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt werden können. Obwohl die klassische Elektrophorese gerade auf dem Gebiet der Protein- oder Nucleinsäuretrennung weit verbreitet ist, hat ihre Anwendung bedeutende Nachteile:

- Quantitative Auswertungen sind nur mit Remissionsmessungen möglich, wobei z. B. Proteine erst nach Anfärbung ausgewertet werden können.
- Um ein Austrocknen der Gele durch zu hohe Joulesche Wärme zu vermeiden, dürfen nur relativ kleine Spannungen angelegt werden. Dies hat relativ lange Analysenzeiten und geringe Effizienzen zur Folge.
- Trennungen über Flachbett-Gelelektrophorese sind nicht automatisierbar.

Eine Alternative zum Flachbett-Format ist die elektrophoretische Trennung in engen offenen Rohren beziehungsweise Kapillaren. Die erste Trennung in einer offenen

Glasröhre wurde 1967 von Hjertén beschrieben,³ der eine thermische Stabilisierung durch Rotation der Röhre um ihre eigene Achse erreichte. Gegen Ende der 70er Jahre führten Mikkers, Everaerts und Verheggen Trennungen in Glas und Teflonkapillaren mit Innendurchmessern von 200-500 μm durch.⁴ In den frühen 80er Jahren entwickelten Jorgenson und Lucaks diese Technik durch die Verwendung von aus der Gaschromatographie bekannten Quarz-Kapillaren weiter.^{5,6} Diese Kapillaren mit Innendurchmessern von 50 bis 200 μm ermöglichen hocheffiziente Trennleistungen durch das günstige Oberfläche-Volumen-Verhältnis und der daraus resultierenden starken Verminderung der störenden thermisch induzierten Konvektion. Des Weiteren ermöglichen diese Glaskapillaren den Einsatz von Online-Detektoren. Jorgenson beschrieb zudem die Theorie und die Zusammenhänge zwischen Trennleistung und Trennparametern, so dass diese Arbeiten als der Beginn der Kapillarelektrophorese in ihrer heutigen Form gelten. Die Verwendung von Kapillaren erweiterte das Anwendungsspektrum der Elektrophorese über das Feld der Trennung von Makromolekülen hinaus bis hin zur simultanen Analyse kleiner Kationen, Anionen und sogar neutraler Moleküle.

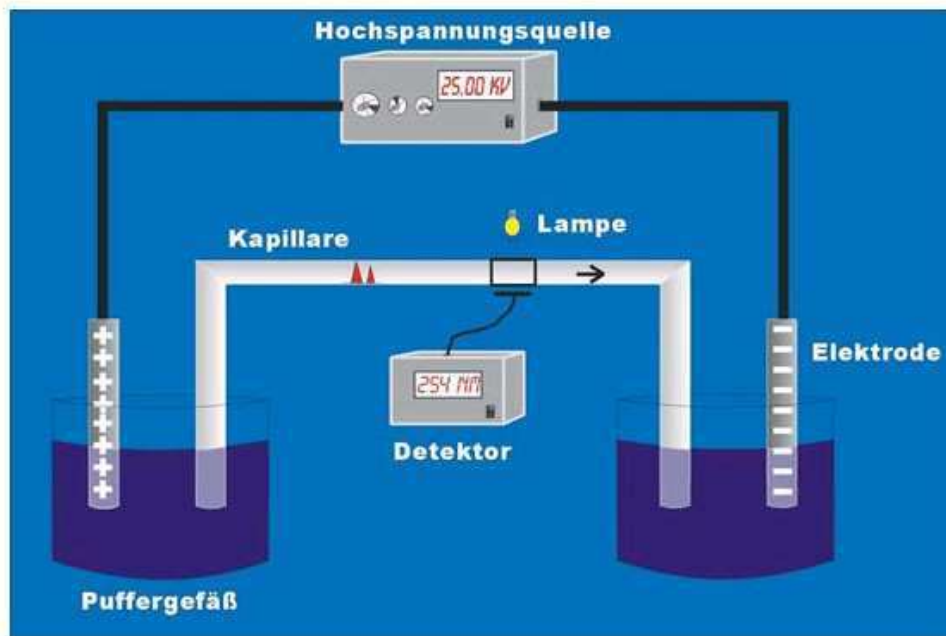


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Geräts

Die Kapillarelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem die Trennung in Kapillaren mit 25-100 μm Durchmesser unter Anlegen einer Hochspannung von 2-30 kV stattfindet. Die Moleküle werden aufgrund unterschiedlicher Ladung, Größe und

Mobilität getrennt. Die dünne Quarzkapillare (25-100 μm) überbrückt die beiden Puffergefäße, zwischen denen eine Spannung von bis zu 30 kV angelegt wird. Ein relativ kurzer Probenpfropfen (einige nl) wird an der anodischen Seite aufgegeben, dies geschieht durch Anlegen von Druck auf das Probengefäß, durch Anlegen von Vakuum auf das kathodische Pufferreservoir oder durch elektrophoretische Wanderung der Probenbestandteile in die Kapillare. Die Trennung der Proben erfolgt durch Anlegen einer Spannung zwischen den Puffergefäßen. Das sich in der Kapillare ausbildende elektrische Feld bewirkt die Migration der Probenzonen. Die Migration der Probenionen ist immer durch einen mehr oder weniger starken elektroosmotischen Fluss überlagert, der aktiv zum Transport der Probenionen, nicht aber zur Trennung beiträgt. Dieser EOF hängt stark von den Oberflächeneigenschaften der Kapillare ab. Er kann so groß sein, dass nicht nur neutrale Moleküle bewegt werden, sondern selbst negative Ionen entgegen ihrer elektrophoretischen Migration zum Detektor an der Kathode transportiert werden können.⁷ Somit können sowohl Kationen als auch Anionen detektiert werden.

Durch Verwendung der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie können auch ungeladene Teilchen detektiert werden; bei dieser Trennmethode wird dem Trennpuffer ein Detergens, meist Natriumdodecylsulfat, zugegeben.⁸

Die Kapillaronenelektrophorese kann bei allen geladenen Molekülen oder bei Molekülen, bei denen durch pH-Wert-Veränderung oder Komplexbildung eine Ladung entsteht, angewandt werden; die Substanzen sollten löslich in Wasser sein.⁹

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Kapillarelektrophorese

Elektrophoretische Trennungen beruhen auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten gelöster Ionen in einem elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit der Ionen ist abhängig von ihrer Ladung und Masse. Des Weiteren hängt sie von der Temperatur, dem pH-Wert, der Viskosität des Trennmediums und der applizierten Feldstärke ab.

Es gilt:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \frac{z_i e_0 E}{6\pi\eta r_i}$$

v_{ep} = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit

μ_{ep} = elektrophoretische Mobilität

E = Feldstärke

z_i = Ladungszahl des Teilchens

e_0 = elektrische Elementarladung

η = Viskosität

r_i = Stokescher Radius des Ions

Für die elektrophoretische Mobilität gilt somit:

$$\mu_{ep} = \frac{z_i e_0}{6\pi\eta r_i}$$

Die direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität ist aufgrund der Molekül- und Puffer-spezifischen Größen nicht möglich, da obige Gleichung nur für sphärische Teilchen in unendlich verdünnten Lösungen gilt. Ferner ist der Stokesche Radius nicht bekannt und auch nicht aus den messbaren Ionenradien in Kristallgittern herzuleiten.

2.1.1 Der elektroosmotische Fluss

Ein wesentlicher Effekt bei kapillarelektrophoretischen Trennungen ist der elektroosmotische Fluss (EOF). Man versteht darunter die Bewegung einer Elektrolytlösung relativ zu einer geladenen Oberfläche, hervorgerufen durch ein elektrisches Feld. Die Elektroosmose basiert nach Helmholtz und Stern auf einem Zwei-Phasen-System bestehend aus einer stationären Phase (Kapillarwand) und

einer mobilen Phase (Elektrolyt), wobei sich durch das Anlegen eines elektrischen Feldes eine elektrische Doppelschicht bildet.¹⁰ Nahezu alle Oberflächen tragen eine Ladung. Im Falle von Quarzkapillaren sind das negative Ladungen durch Dissoziation der Silanolgruppen. Diesen Oberflächenladungen stehen entsprechend gegensinnig geladene Ionen in der Flüssigkeit gegenüber. In dieser Doppelschicht überwiegen in Quarzkapillaren die positiven Ionen, die sich in einer starren und einer beweglichen Schicht an der Oberfläche anordnen. Das sich aufgrund der Ladungsverteilung aufbauende Potential wird nach der Theorie von Stern in zwei Regionen aufgeteilt, einer linearen Abnahme des Potentials im Bereich der starren Grenzschicht und einer exponentiell Abnahme des Potentials in der diffusen Grenzschicht. Diese exponentiell Abnahme ist verantwortlich für die Elektroosmose und wird als Zeta-Potential bezeichnet.¹¹

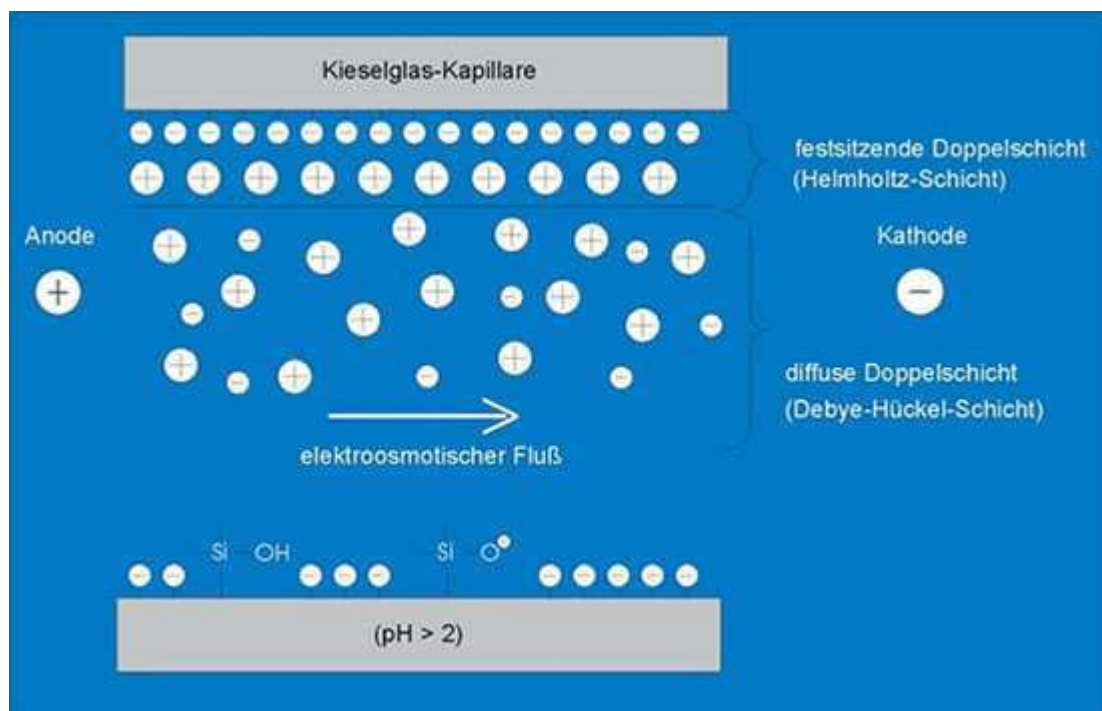


Abbildung 2.1: Zustandekommen des Potentials

Liegt nun parallel zur Oberfläche ein elektrisches Feld an, so zieht das Feld die Gegenionen der mobilen Schicht längs seiner Achse an und bewegt so die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. Im Falle von Quarzkapillaren mit einer Anreicherung von positiven Ionen in der Grenzschicht wird der EOF daher zur Kathode hin induziert. Es bildet sich ein extrem flaches (stempelförmiges Strömungsprofil) aus. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Bandenverbreiterung als bei

hydrodynamischen Flüssen, wo das stark vom Kapillarradius abhängige parabolische Hagen-Poiseuillesche-Strömungsprofil auftritt. In Kapillaren mit Innendurchmesser von 25 μm bis 100 μm kann das Strömungsprofil als nahezu ideal pfropfenförmig gelten.⁷

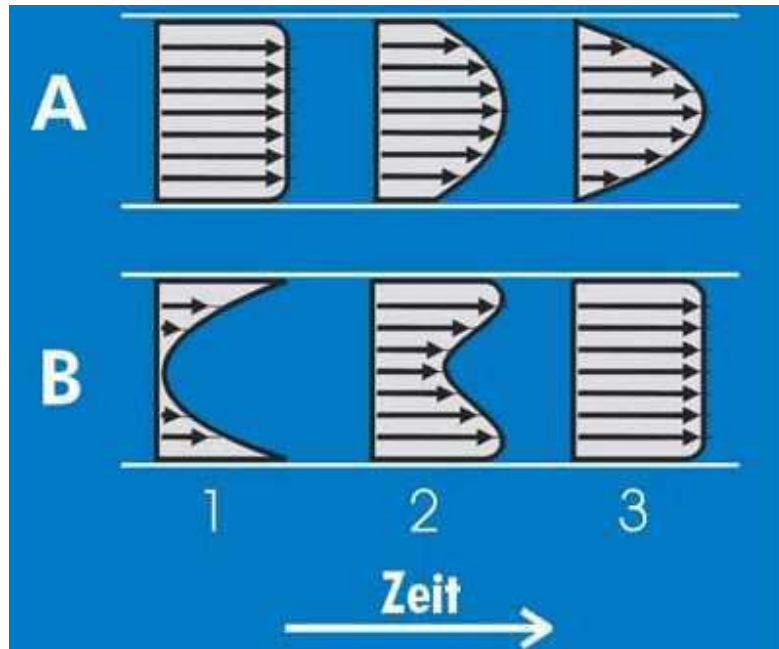


Abbildung 2.2: Unterschiedliche Strömungsprofile A: Laminares Strömungsprofil, B: Stempelförmiges Strömungsprofil

Zur mathematischen Beschreibung des Zeta-Potentials und somit des elektroosmotischen Flusses geht man von dem Modell des Plattenkondensators aus. Dieses beschreibt Doppelschichten zwischen zwei sich zueinander relativ bewegenden Phasen:¹²

$$\zeta = \frac{\omega}{P_{DH} \varepsilon}$$

ζ = Zeta-Potential

ω = Ladungsdichte an der Wandoberfläche

P_{DH} = Debye-Hückel-Parameter

ε = Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten

Der Debye-Hückel-Parameter berechnet sich aus:¹³

$$P_{DH} = \sqrt{\frac{2000F^2}{\epsilon_0 \epsilon RT}} \sqrt{u}$$

F = Faraday-Konstante

R = Gaskonstante

u = Ionenstärke

T = Temperatur

ϵ_0 = Dielektrizitätskonstante des Vakuums

Die Ionenstärke u ist definiert als:

$$u = \frac{1}{2} \sum c_i z_i$$

c_i = Konzentration aller Pufferbestandteile

z_i = Ladungszahl der Ionen

Aus obigen Gleichungen wird deutlich, dass das Zeta-Potential und damit der elektroosmotische Fluss umgekehrt proportional zur Ionenstärke und direkt proportional zur Ladungsdichte an der Kapillarwand ist. Somit bewirkt eine Konzentrationserhöhung des Puffers eine Verringerung des elektroosmotischen Flusses, während die Steigerung des pH-Wertes aufgrund zunehmender Ionisation der Kapillarwand eine Erhöhung zur Folge hat.

Die Beeinflussung der Geschwindigkeit der Volumenströmung beschreibt die Smoluchowski-Gleichung:¹⁰

$$v_{eof} = -\frac{\epsilon \zeta}{\eta} E$$

v_{eof} = Geschwindigkeit der Volumenströmung

Damit ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität μ_{eof} :

$$\mu_{eof} = -\frac{\epsilon \zeta}{\eta}$$

Ein kathodischer elektroosmotischer Fluss übt eine Kraft auf die Analytmoleküle in Richtung Kathode aus. Somit ergibt sich die effektive Mobilität μ_{eff} eines Ions aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Mobilität des Ions μ_{ep} und der elektroosmotischen Mobilität im jeweiligen System:

$$\mu_{eff} = \mu_{eof} \pm \mu_{ep}$$

Dadurch ist es möglich durch geeignete Wahl des elektroosmotischen Flusses Kationen, Anionen und ungeladene Moleküle zur Kathode zu bewegen. Dazu muss gewährleistet sein, dass $\mu_{ep(\text{Anion})} < \mu_{eof}$ ist, so dass der elektroosmotische Fluss die in Richtung Anode gerichtete elektrophoretische Migration negativ geladener Ionen überkompensiert. Somit ergibt sich ein Elutionsprofil in der Reihenfolge:

Kationen vor ungeladenen Molekülen vor Anionen.

2.1.2 Detektoren

Es werden verschiedene Arten von Detektoren eingesetzt. Am gebräuchlichsten sind Dioden-Array-Detektoren mit einem Wellenlängenbereich von 190-600 nm. Des Weiteren verwendet man Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektion und UV-Detektoren, sowie Massenspektrometer.^{7,14,15} Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Arten der Detektion:

- *On-column*-Detektion

Hierbei erfolgt die Detektion direkt in der Kapillare. Eingesetzt werden üblicherweise UV- oder Fluoreszenz-Detektoren. Wegen des geringen Kapillardurchmessers und der daraus resultierenden geringen Schichtdicke (Innendurchmesser von 25-100 μm) müssen die Detektoren hohen Ansprüchen bezüglich Empfindlichkeit, Rauschen, Streulicht u.ä. genügen. Bei der Fluoreszenz-Detektion werden neben den gebräuchlichen Deuterium- und Xenon-Blitzlampen auch Laser als Lichtquelle eingesetzt.

- *Post-column*-Detektion

Bei diesen Detektoren werden die Probenkomponenten erst am Kapillarende detektiert. Eingesetzt werden zum Beispiel massenselektive Detektoren wie ESI-Massenspektrometer. In der Literatur werden noch weitere Arten beschrieben, wie zum Beispiel MALDI-TOF¹⁶ oder Autoradiographie radioaktiv markierter Analyten nach erfolgtem Blotting am Kapillarende.¹⁷

2.1.3 Probenaufgabe

Die quantitative Präzision der Kapillarelektrophorese hängt stark von der Probenaufgabe ab. Im Allgemeinen werden zwei Arten der Probenaufgabe angewandt, zum einen die hydrodynamische und zum anderen die elektrokinetische Probenaufgabe.¹⁸ Vergleiche der beiden Arten der Probenaufgabe ergaben, dass mit

der hydrodynamischen Injektion reproduzierbarere Ergebnisse erhalten werden. Die relative Standardabweichung liegt in den besten Fällen bei unter 1%.¹⁹ Dies spiegelt wider, dass bei der elektrokinetischen Injektion die injizierte Probenmenge stärker von der Zusammensetzung und der elektrophoretischen Mobilität der Probe abhängt. Trotzdem wird in bestimmten Fällen die elektrokinetische Injektion bevorzugt; dies ist dadurch begründet, dass eine höhere Selektivität und Sensitivität erreicht werden kann.

Da die injizierten Volumina nur wenige nl betragen, werden an das Probenaufgabesystem hohe Anforderungen gestellt. Die Größe des Probepfropfens sollte etwa 1% der Kapillarlänge betragen. Dies bedeutet eine zur Verfügung stehende Injektionslänge von wenigen Millimetern. Unter Berücksichtigung des Kapillardurchmessers ergeben sich Injektionsvolumina von 1-50 nl. Dies ist von Vorteil wenn nur geringe Probenmengen zur Verfügung stehen, limitiert aber gleichzeitig die Sensitivität für verdünnte Lösungen.

Sowohl bei elektrokinetischen als auch bei hydrodynamischen Injektionen lässt sich das Injektionsvolumen berechnen.

- Hydrodynamische Injektion

Die aufgetragene Flüssigkeitsmenge berechnet sich nach dem Hagen-Poiseulleschen Gesetz für laminare Flüssigkeiten in einem Rohr:²⁰

$$V_i = \frac{\Delta p \pi r^4 t_{inj}}{8 \eta L_{ges}}$$

V_i = Injektionsvolumen

Δp = Druckdifferenz

r = Innenradius der Kapillare

t_{inj} = Injektionszeit

L_{ges} = Gesamtlänge der Kapillare

η = Viskosität

Der schnelle Anstieg und Abfall des Druckes über dem Probengefäß führt zu Druckspitzen, die eine exakte Reproduzierbarkeit der Injektionsvolumina ausschließen. Aus diesem Grund verwendet man in der Praxis ein Produkt aus Druck und Injektionszeit, welches reproduzierbarere Injektionsvolumina gewährleisten soll.

- Elektrokinetische Injektion

Bei der elektrokinetischen Injektion nutzt man die Tatsache aus, dass das elektrische Feld in der Kapillare eine elektrophoretische und elektroosmotische Bewegung

erzeugt. Wenn das Inlet in ein Probengefäß eintaucht und eine Spannung angelegt wird, migrieren die geladenen Probenkomponenten in die Kapillare. Die Konzentration der geladenen Probenbestandteile berechnet sich wie folgt:²⁰

$$Q_i = \frac{(\mu_i + \mu_{eof})\pi r^2 U c_i t_{inj}}{L_{ges}}$$

- Q_i = Konzentration der injizierten Species i
 c_i = Konzentration der Species i im Probengefäß
 μ_i = elektroforetische Mobilität der Species i
 U = angelegte Spannung

Die Konzentration der injizierten Probenmenge kann durch die angelegte Spannung oder die Injektionszeit variiert werden. Sie ist vom elektroforetischen Fluss in der Kapillare und von ihrer eigenen elektroforetischen Mobilität abhängig. Somit kommt es zu einer Diskriminierung der aufgrund einer geringeren elektroforetischen Mobilität langsamer wanderenden Komponenten. Deshalb spiegelt die injizierte Menge nicht die Ausgangskonzentrationen im Probengefäß wider. Darüber hinaus sinkt die Konzentration an Komponenten hoher Mobilität im Probengefäß und führt zu einer veränderten Zusammensetzung der Probe, was bei Mehrfachmessungen berücksichtigt werden muss. Diesen Nachteilen der elektrokinetischen Injektion steht die Anreicherung der Probenionen im Probenpfropfen gegenüber. Verwendet man mit Gel gefüllte Kapillaren stellt die elektrokinetische Injektion allerdings die einzig Mögliche dar.

2.1.4 Puffersysteme

Für alle kapillarelektrophoretischen Methoden gilt, dass die Auswahl des Puffers den größten Einfluss auf die Trennleistung ausübt und daher sehr sorgfältig vorgenommen werden sollte. Ein Trennpuffer muss folgende Anforderungen erfüllen:⁷

- Selektivität für die zu trennenden Ionen
- Ausreichende Pufferkapazität im gewünschten pH-Bereich
- Stabilität des Puffers
- Geringe Mobilität des Gegenions
- Entsprechende Mobilität der Puffer- und Analytione

Da viele Moleküle im Wässrigen als Säure oder Base reagieren, hat der pH-Wert des Puffers einen großen Einfluss auf die Selektivität einer Methode.^{9,21}

Bei der Methodenfindung sollten daher Standardpuffer mit verschiedenen pH-Werten ausprobiert werden. Für die Auftrennung von Neutralstoffen gilt diese Regel nicht.

2.1.5 Kapillarelektrophoretische Methoden

Das einfache Prinzip kapillarelektrophoretischer Trennungen eröffnet eine große Anzahl unterschiedlicher Applikationen. Die wichtigsten Ausführungstechniken sind die Kapillarzonenelktrophorese, die Kapillargelelektrophorese und die elektrokinetische Chromatographie.

2.1.5.1 Kapillarzonenelktrophorese

Bei der Kapillarzonenelktrophorese (CZE) findet die Trennung in einer lediglich mit Puffer gefüllten Kapillare statt. Nach der Probenaufgabe wird eine Spannung zwischen Inlet und Outlet angelegt und unter dem Einfluss des elektrischen Feldes migrieren die Probenkomponenten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten zu den entsprechenden Elektroden. Da in Quarz-Kapillaren der elektroosmotische Fluss zur Kathode gerichtet ist und in den meisten Fällen die Elektromigration der Anionen überkompensiert, können sowohl Kationen als auch Anionen am kathodischen Ende der Kapillare detektiert werden.

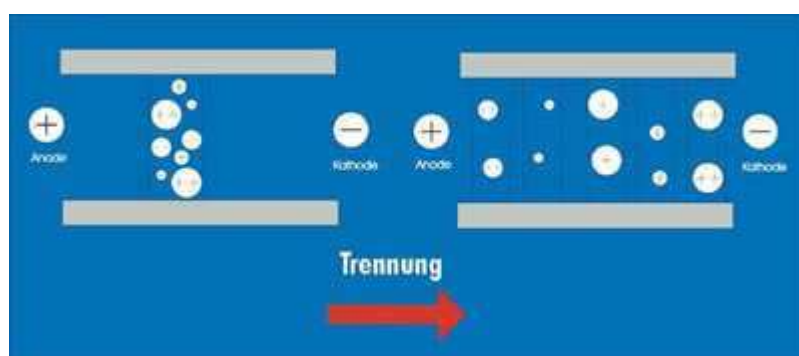


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Kapillarzonenelktrophorese

2.1.5.2 Elektrokinetische Chromatographie

Die micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) stellt eine Kombination aus elektrophoretischen und micellaren flüssigkeitschromatographischen Trennprinzipien dar. Diese Technik wurde von Terabe et al. zur Trennung ungeladener

Probenkomponenten eingeführt.²² Sie beruht auf dem Verteilungsgleichgewicht zwischen einer mobilen, durch Elektroosmose bewegten Phase und einer „pseudo-stationären“ Phase, gebildet durch Micellen. Als Micellbildner werden Tenside oberhalb ihrer kritischen micellaren Konzentration eingesetzt. Die dabei verwendeten Detergentien können sowohl anionisch (Natriumdodecylsulfat (SDS)) als auch kationisch (Hexadecyltrimethylammoniumchlorid (CTAB)) sein. Die Micellbildung tritt als direkte Konsequenz des Hydrophobieeffektes auf, wenn die für jedes Detergens spezifische kritische micellare Konzentration überschritten wird. Dann richten sich die hydrophoben Reste zum Zentrum der Aggregate, während die hydrophilen, meist geladenen Köpfe nach außen orientiert sind. Die äußere, geladene Sphäre der Micellen erzeugt im elektrischen Feld eine elektrophoretische Mobilität. In Abhängigkeit vom Vorzeichen der Ladung ist die elektrophoretische Mobilität in Richtung Anode oder Kathode gerichtet.

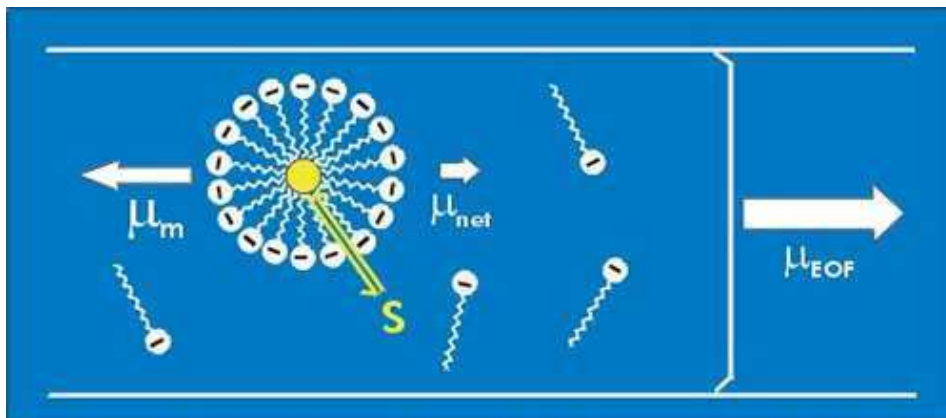


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der micellaren elektrokinetischen Chromatographie

Da, bei Verwendung von SDS als Micellbildner, die elektrophoretische Mobilität μ_M der Micellen zur Anode gerichtet ist und durch den zur Kathode gerichteten elektroosmotischen Fluss der Mobilität μ_{eof} überlagert wird, ergibt sich die Netto-Micellenmobilität μ_{net} in Richtung der Kathode. Polare, ungeladene Moleküle, die sich ausschließlich in der wässrigen Phase aufhalten und keine Wechselwirkungen mit den Micellen zeigen, wandern mit der Geschwindigkeit des EOF und erreichen mit der Totzeit t_0 den Detektor. Hydrophobe Probenkomponenten, die sich ausschließlich in der Micelle befinden, wandern mit der Geschwindigkeit v_{MC} durch die Kapillare und erreichen den Detektor in der Zeit t_{MC} . Die zeitliche Differenz dieser beiden Grenzfälle - keine Wechselwirkung mit der Micelle und ausschließliches Aufhalten in der Micelle - wird als micellares Fenster bezeichnet. Je größer dieses Fenster ist,

desto höher ist die Selektivität. Probenkomponenten, die mit der Gleichgewichtskonstante k mit den Micellen wechselwirken, eluieren innerhalb dieses micellaren Fensters.

2.1.5.3 Kapillargelelektrophorese

Bei der Kapillargelelektrophorese (CGE) erfolgt die Trennung aufgrund deutlicher Größenunterschiede der Probenkomponenten. Insbesondere biologische Makromoleküle, die als Polyanionen oder Polykationen vorliegen, unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Ladungsdichten und somit in ihrer elektrophoretischen Mobilität. Ist aber die Kapillare mit einer Polymerlösung gefüllt, die ein dreidimensionales Netzwerk darstellt, wird die Mobilität der Probenkomponenten größenabhängig beeinflusst. Somit beruht der Transport durch die Kapillare auf der Ladung der Makromoleküle, die Migrationszeit hängt jedoch von der Molekülgröße ab. Viele in der CGE verwendete Gele besitzen keine feste Struktur und sind besser durch den Begriff „polymeres Netzwerk“ oder „sieving buffer“ beschrieben. Die verwendeten Polymere in der CGE können kovalent miteinander verknüpft (Bis-Polyacrylamid), durch Wasserstoffbrücken verbunden (Agarose) sein, oder als Netzwerk linearer Polymerlösungen (Polyacrylamid oder Methylcellulose) vorliegen.

2.2 Fluoreszenzmarkierung

Radioaktive Markierungen ermöglichen den Nachweis sehr geringer Substanzmengen. Allerdings ist der Einsatz radioaktiver Isotope mit erheblichen Nachteilen behaftet. Die Vorkehrungen zur Vermeidung gesundheitlicher Folgen, die Entsorgungskosten, sowie die erforderlichen behördlichen Umgangsgenehmigungen führen zu einer zunehmenden Verdrängung dieser Methodik durch Fluorophore und Luminophore.²³

Die dabei eingesetzten Fluoreszenzmarker bestehen aus zwei getrennt zu betrachtenden Molekülteilen, dem Fluorophor als Signal-gebendem Baustein und der Ankergruppe, welche als Kupplungseinheit die Anbindung an das zu markierende Molekül ermöglicht. Zur Vermeidung unerwünschter Wechselwirkungen zwischen markierter Substanz und Signal-gebendem Baustein befindet sich meist ein Abstandshalter (Spacer) zwischen Ankergruppe und Fluorophor. Voraussetzungen für den Einsatz einer luminiszierenden Verbindung als Fluoreszenzmarker sind:

- eine ausreichende Fluoreszenzquantenausbeute;
- die Stabilität des Analyten und des Fluorophors muss unter den nötigen Derivatisierungsbedingungen gewährleistet sein;
- das Auftreten von Nebenprodukten sollte auf ein Minimum beschränkt werden, dies spielt vor allem bei der *pre-column*-Derivatisierung eine große Rolle, da Nebenprodukte zu störenden Signalen führen können und die Messung beeinträchtigen;
- die Fluoreszenz des Reaktionsproduktes sollte über die nötige Empfindlichkeit verfügen;
- die Unterschiede der spektroskopischen Eigenschaften zwischen Fluoreszenzmarker und Reaktionsprodukt müssen groß genug sein, dies ist vor allem bei der *post-column*-Derivatisierung von Bedeutung, da die Tatsache, dass der Fluoreszenzmarker in großem Überschuss zugegeben wird zu einem sehr hohen Hintergrundrauschen führen kann;
- die Reinheit, Stabilität und kommerzielle Verfügbarkeit des Fluoreszenzmarkers sollte gegeben sein.

Idealerweise läuft eine Derivatisierungsreaktion schnell und unter milden Bedingungen ab und führt zu einem, nämlich dem gewünschten Produkt, welches stark fluoreszierend ist.²⁴ Um diese Kriterien möglichst alle zu erfüllen, werden unterschiedliche Fluorophore mit immer neueren Ankergruppen kombiniert, so dass sich immer mehr Anwendungsgebiete eröffnen.

2.2.1 Charakteristika moderner Fluoreszenzmarker

Als Fluorophore werden heutzutage zumeist Rhodamin-, Fluorescein-, Cyanin-, Coumarin- und BODIPY-Farbstoffe eingesetzt. Eine günstige, allerdings nicht so stark fluoreszierende Alternative bieten Dansylderivate.²⁵ Durch Derivatisierung der verschiedenen fluorophoren Grundgerüste sind die spektroskopischen Eigenschaften dieser Marker in weiten Bereichen variierbar, so dass für jeden gewünschten Wellenlängenbereich ein geeigneter Farbstoff zur Verfügung steht.

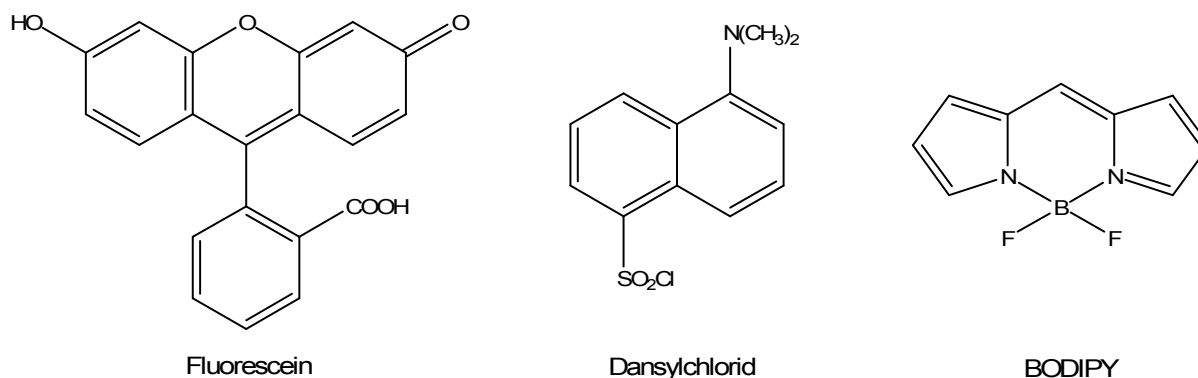


Abbildung 2.5: Grundgerüste der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

2.2.1.1 Eigenschaften von Fluorescein-Farbstoffen

Fluorescein-Derivate besitzen hohe Fluoreszenzquantenausbeuten ($\phi = 0.92$) bei einem pH-Wert > 8 .²⁶ Fluorescein kann in wässrigem Milieu je nach pH-Wert als Kation, neutral, als Anion, oder als Dianion vorliegen. Die verschieden geladenen Teilchen besitzen jeweils unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften. Der pK_a -Wert von Fluorescein beträgt 6.4, so liegt Fluorescein bei einem physiologischem pH-Wert zu einem großen Teil in der nicht fluoreszierenden Spirolactonform vor ($\phi = 0.37$ bei pH 5.4).²⁶ Fluorescein-Derivate besitzen ein breites Emissionsspektrum, so dass ihr Einsatz in Untersuchungen, bei denen mehrere Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionsmaxima eingesetzt werden, limitiert ist.

2.2.1.2 Eigenschaften von Dansyl-Farbstoffen

Dansylchlorid ist ein vielfach genutztes Reagenz zur Identifizierung und Quantifizierung von Aminosäuren, da die entsprechenden Amidderivate eine intensive Fluoreszenz aufweisen.²⁷ Die Anregungswellenlänge liegt normalerweise bei 325 nm, dies entspricht der Wellenlänge des He-Cd-Lasers.²⁷ Die Fluoreszenzquantenausbeute der Dansyl-Derivate ist $< 0,40$, was die Empfindlichkeit einschränkt.²⁸ Dansylchlorid hat den großen Vorteil relativ kostengünstig zu sein.

2.2.1.3 Eigenschaften von BODIPY-Fluorophoren

BODIPY-Derivate nehmen unter den Fluorophoren eine Sonderstellung ein, da sie relativ unpolar sind und der Chromophor keine Ladung trägt. Eine Ausnahme stellen die sulfonierten BODIPY-Derivate dar, die negativ geladen sind. Die Fluoreszenzintensität ist daher pH-Wert-unabhängig und wird wenig beeinflusst durch Änderungen der Polarität von Lösungsmitteln.²⁹ Durch Luftoxidation

ausgelöstes Quenchen der Fluorophore beeinflusst die Fluoreszenzintensität zu weniger als 5%.²⁹ Sie besitzen eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute $\phi > 0.8$, unabhängig vom Lösungsmittel²⁹ und hohe Extinktionskoeffizienten ($\epsilon > 80000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$).³⁰ BODIPY-Derivate besitzen eine schmale, scharfe Emissionsbande mit einer höheren Peakintensität als Fluorescein. Diese Eigenschaft macht sie zu wertvollen Werkzeugen für HPLC- und Elektrophorese-Untersuchungen.²⁵ Das Emissionsmaximum überlagert sich kaum mit den Absorptionsbanden von roten Fluorophoren, wie z.B. Texas Red oder Tetramethylrhodamin, dadurch eignen sie sich besonders für Untersuchungen, die mit mehreren Fluorophoren durchgeführt werden.²⁵ Darüber hinaus sind BODIPY-Derivate deutlich photostabiler als Fluorescein- und Rhodamin-Derivate.²⁵

2.2.2 Ankergruppen

Ein wichtiges Kriterium für die Wahl des Markers sind die funktionellen Gruppen, die für eine Markierung zu Verfügung stehen. So gibt es Derivatisierungsreaktionen für primäre und sekundäre Amine, Oligosaccharide, Aldehyde, Carbonsäuren, Thiole und Nucleotide.

2.3 Derivatisierungsreaktionen für Nucleotide und Nucleoside

Um Nucleotide und Nucleoside mittels Fluoreszenzdetektion analysieren zu können sind in der Literatur eine Reihe von Derivatisierungsreaktionen beschrieben. Viele dieser Derivatisierungsreaktionen beschränken sich jedoch nur auf eine bestimmte Base und sind somit nicht auf alle Nucleoside bzw. Nucleotide anwendbar.

2.3.1 N⁶-Ethenopurine

Kochetkov et al. entdeckten 1971 ein fluoreszierendes Produkt, das bei der Reaktion von Chloracetaldehyd mit Adenin-Derivaten in wässriger Lösung entsteht.³¹ Secrist et al. charakterisierten die Derivate 1972.³² Die Derivatisierung von Adenin-Derivaten wie zu Beispiel Adenosin, AMP, ADP, ATP und cAMP mit 2-Chloroacetaldehyd³³⁻³⁵ oder Bromacetaldehyd³⁶ führt zu fluoreszierenden 1,N⁶-Ethenoadenin-Derivaten, welche bei einer Wellenlänge von 325 nm angeregt werden können.

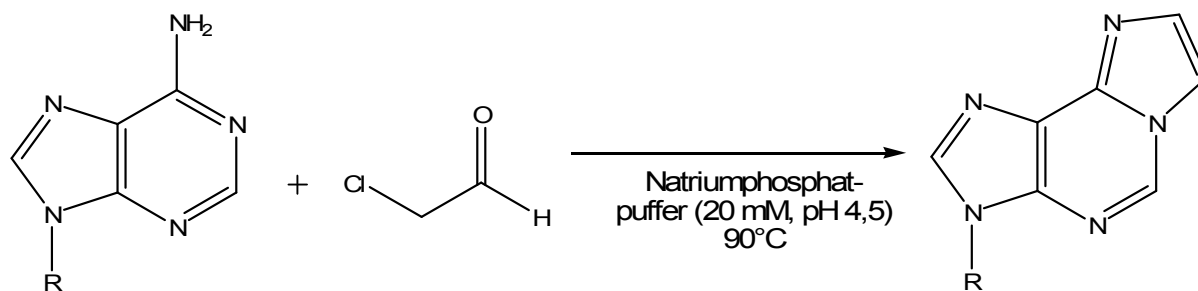


Abbildung 2.6: Reaktion von Adenin-Derivaten mit Chloracetaldehyd

Die Reaktion verlief innerhalb von 20 min quantitativ ab und ist daher gut als Derivatisierungsreaktion für analytische Zwecke geeignet, jedoch ist sie auf Adenin-Derivate beschränkt. Mikkola et al. setzten Adenin-Derivate mit Brom- oder Chlormalonaldehyden im wässrigem Medium, bei pH-Werten von 4,5, um.³⁷ Diese Reaktion führt zu 11-Formyl-1,N⁶-Ethenoadenin-Derivaten. Durch die zusätzliche reaktive Aldehydfunktion können diese weiter derivatisiert werden. So können sie mit einem stärkeren Fluorophor, wie zum Beispiel mit dem aus der Fluoreszenz-Derivatisierung von reduzierenden Kohlenhydraten bekanntem Fluoreszenzfarbstoff 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure (APTS) umgesetzt werden.³⁸

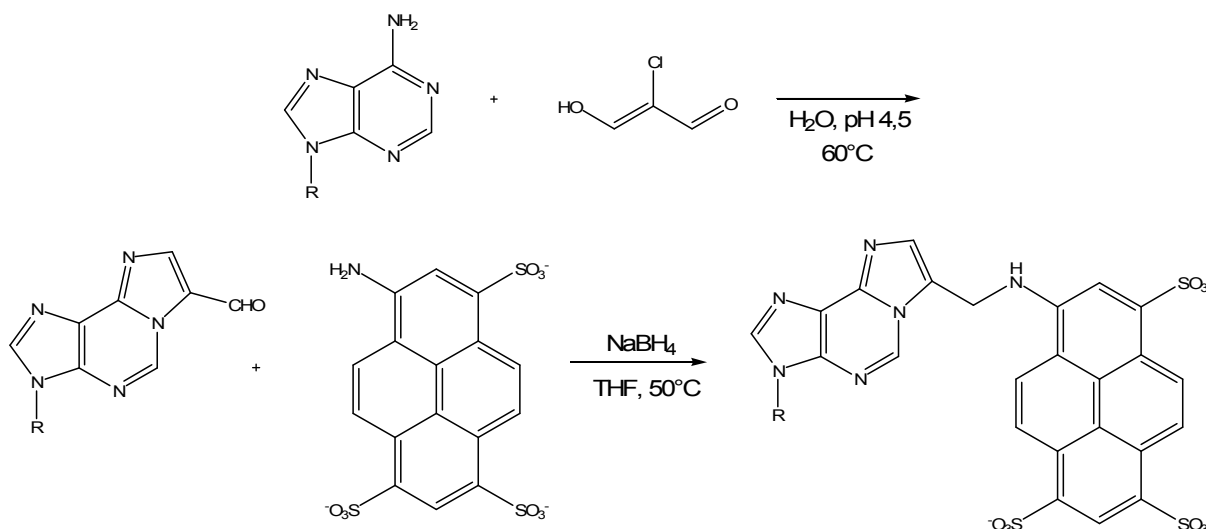


Abbildung 2.7: Reaktion von Adenin-Derivaten mit Chlormaldehyd

2.3.2 Malaprade-Spaltung

Eine einfache Methode, um die Nucleotide in reaktivere Verbindungen zu überführen, ist die Malaprade-Spaltung mit Natriumperiodat. Hierbei wird der Riboserest am Diol gespalten, es entsteht ein 2',3'-Dialdehyd. Die Aldehydgruppen sind sehr reaktiv und können mit Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. APTS oder Dansylaminoethylamin reagieren.³⁹⁻⁴¹ Nachteil dieser Methode ist es, dass nicht immer beide Aldehydfunktionen reagieren, was zu einem Produktgemisch führen kann.

Nach einer anderen Methode werden, die an der 2'- und 3'-Position entstandenen Aldehydfunktionen zuerst mit Ethylendiamin versetzt, um sie anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat umzusetzen.⁴² Diese Methode eignet sich nur für Ribonucleoside und Nucleotide, nicht jedoch für Desoxyribo-Derivate.

2.3.3 Derivatisierung von Guanin-Derivaten mit Phenylglyoxal

Yonekura et al. bestimmten Guanosin und dessen Nucleotide in Erythrocyten. Hierfür wurden Guanosin und dessen Nucleotide mittels Ionenpaarchromatographie aufgetrennt und *online* mit Phenylglyoxal *post-column* derivatisiert. Die Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt, die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 515 nm gemessen. Dadurch, dass nur Guanosin-Derivate auf diese Weise reagierten, konnte eine hohe Selektivität erzielt und eine gute Trennschärfe der zu quantifizierenden Peaks erreicht werden. Es wurde ein Detektionslimit von 160-500 nM je nach Guanosin-Derivat ermittelt.⁴³

2.3.4 Derivatisierung von Cytidin-Derivaten mit Phenacylbromid

Eisenberg et al. derivatisierten Cytidin und dessen Derivate mit Phenacylbromid zu 2-Phenyl-3,N⁴-ethenocytidin-Derivaten. Nach der Derivatisierung wurden die Produkte mittels HPLC aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 305 nm, die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm gemessen. Während die Umsetzung von Adenin-Derivaten mit Chloracetaldehyd oder Bromacetaldehyd zu stark fluoreszierenden Produkten führte, ist bei der Umsetzung von Cytidin mit Halogenacetaldehyden nur eine schwache Fluoreszenz zu erkennen. Aufgrund dessen bietet die Reaktion keine Vorteile gegenüber der UV-Detektion. 2-Phenyl-substituierte 3,N⁴-Ethenocytidin-Derivate

verfügen über eine stärkere Fluoreszenz, daher wurde die Derivatisierung mit Phenacylbromid durchgeführt. Die Umsetzung fand in einer Lösung bestehend aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure (80:19:1) bei 80°C statt. Mit dieser Derivatisierungsreaktion lässt sich u.a. das Virustatikum Cidofovir derivatisieren und quantifizieren.⁴⁴

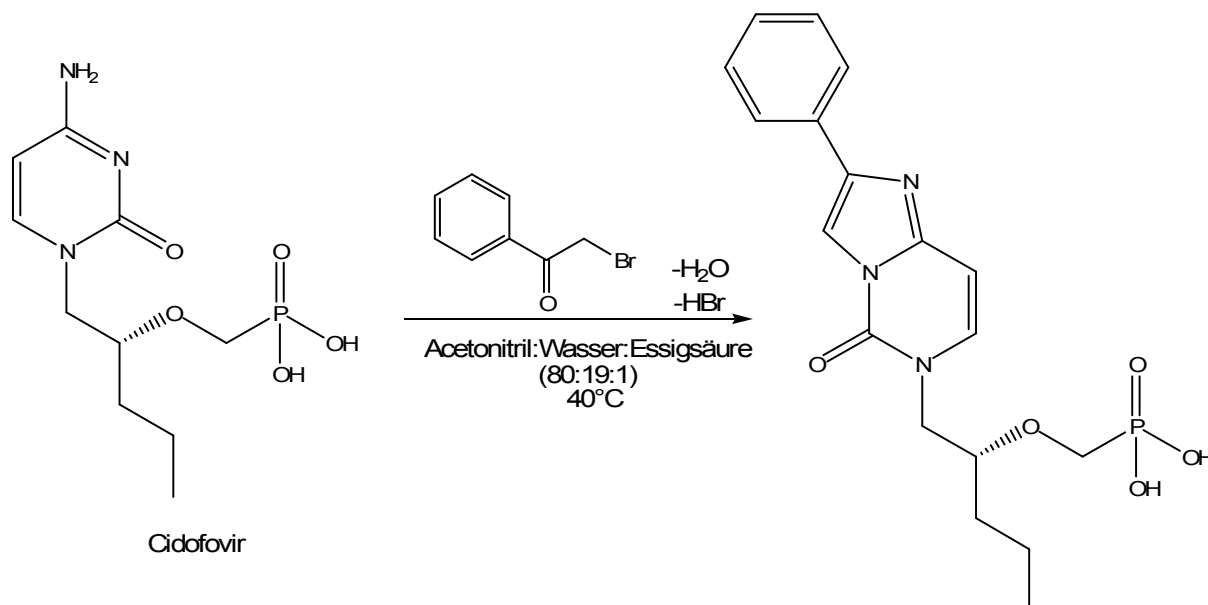


Abbildung 2.8: Reaktion von Cidofovir mit Phenacylbromid

2.3.5 Komplexierung der vicinalen Dirole mit Borsäurederivaten

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von vicinalen Diolen ist deren Komplexbildung mit fluoreszierenden Borsäurederivaten. Borsäure ist eine Lewisäure und kann ein Hydroxyl-Ion binden, dabei bildet sich das Borat-Anion (Abbildung 2.9, B⁻). Die Borsäure und das Borat-Anion können mit einem vicinalen Diol (Abbildung 2.9, L) reagieren, dies führt zu einem Borsäureester (Abbildung 2.9, B⁰L) oder zu einem Boratmonoester (Abbildung 2.9, B⁻L). diese Ester können mit einem zweiten vicinalen Diol reagieren und ergeben dann einen Borsäure-Diester (Abbildung 2.9, B⁻L₂).⁴⁵

3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine universell einsetzbare, automatisierbare Nachweismethode für Nucleotide im nanomolaren Konzentrations-Bereich in wässrigen Medien entwickelt werden. Die erforderliche Sensitivität sollte durch die Derivatisierung mit Fluoreszenzmarkern erreicht werden. Dazu musste eine Derivatisierungsmethode entwickelt werden, die in wässrigem Milieu nahezu quantitativ abläuft, einfach durchzuführen und auf alle Nucleotide anwendbar ist. Ein Fluoreszenzmarker mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm (Helium-Cadmium-Laser) oder 488 nm (Argon-Laser), der die Trennung und die Detektion nicht beeinflusst, musste gefunden werden. Die derivatisierten Nucleotide sollten kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden und mittels Laser-induzierter Fluoreszenz detektiert und quantifiziert werden; hierfür sollte eine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt werden.

Viele der bisher entwickelten Derivatisierungen von Nucleotiden erfordern aufwendige Synthesen in organischen Lösungsmitteln, so dass sie für eine Derivatisierungsreaktion im analytischen Maßstab nicht geeignet sind. Andere sind nur auf Nucleotide mit bestimmten Basen anwendbar. Die Komplexbildung mit Borsäure-Derivaten (siehe Kapitel 2.3.5) und die Phosphoramid-Verknüpfung (siehe Kapitel 2.3.6) erfüllen das Kriterium, dass sie auf alle (Ribo-)Nucleotide anwendbar sind. Daher beschäftigt sich der analytische Teil meiner Arbeit mit diesen beiden Derivatisierungsreaktionen.

4 Fluoreszenzmarkierung von Nucleotiden mittels Boronsäuren

Borsäurepuffer werden in der Kapillarzonenelektrophorese zur Auftrennung von Zuckern eingesetzt, welche vicinale Diole besitzen. Vorteil dieser Puffer ist es, dass sich Borsäurekomplexe ausbilden, die negativ geladen sind. Dadurch ist die Auftrennung ungeladener Moleküle, welche eine vicinale Diolstruktur besitzen, möglich ohne weitere Pufferzusätze, wie zum Beispiel Micellbildner, zu verwenden.⁴⁶ Die Zonen-Elektrophorese von Zuckern in Gegenwart von Borsäure wurde bereits in den 50iger Jahren entwickelt. Seitdem wurden viele Untersuchungen durchgeführt, um die Struktur der Borsäurekomplexe zu ermitteln. Dawber et al. kamen zu dem Schluss, dass vorwiegend das Tetrahydroxyborat-Ion, und nicht die Borsäure, Komplexe im Wässrigen eingeht.⁴⁷ Die entstehenden Komplexe können durch folgende Gleichungen beschrieben werden:



L = vicinales Diol

B = Tetrahydroxyborat-Ion $B[OH]_4^-$

Bei den Gleichungen aus (1) und (2) handelt es sich um dynamische Gleichgewichte. Für die Komplexbildung muss die sterische Anordnung der Alkoholfunktionen am Zucker axial-äquatorial sein. Die Ribose erfüllt in der 2',3'-Position diese Bedingung. Die Trennung von Nucleotiden und Nucleosiden kann aufgrund dieser Komplexbildung durch einen Borsäurepuffer erfolgen.⁴⁸

Über die Stabilität von Borsäurekomplexen im Wässrigen und deren pH-Abhängigkeit ist in der Literatur keine systematische Untersuchung zu finden. Van Duin et al. beschrieben, dass nur bei hohen pH-Werten Boratester gebildet werden. Sie gingen davon aus, dass der pH-Wert größer als der pK_a -Wert der Borsäure (9,07) sein muss. In ihren Experimenten war ein pH-Wert > 8 ausreichend.⁴⁵ Dies stimmt mit den Aussagen von Hofstetter-Kuhn et al. überein.⁴⁶

Im Wasserfreien sind die Borsäurekomplexe so stabil, dass sie sogar als Schutzgruppe für Nucleoside fungieren können. So verwenden Yurkevich et al.

Phenylboronsäure in Pyridin.⁴⁹ Die Schutzgruppe wird unter wässrigen Bedingungen bei pH 6,5 wieder abgespalten.

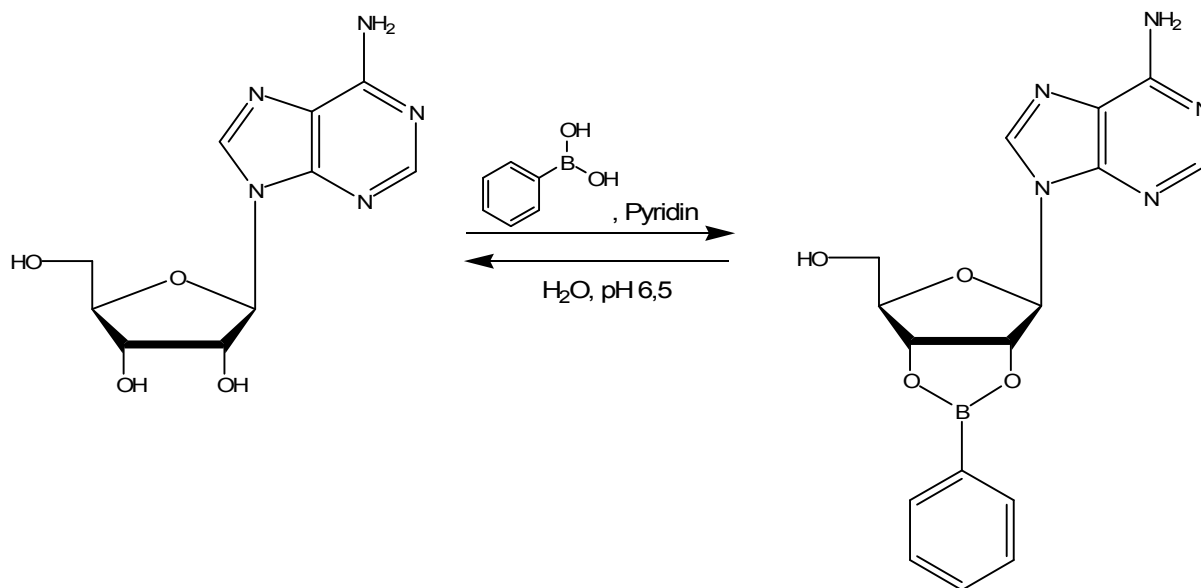


Abbildung 4.1: Komplexbildung von Adenosin mit Phenylboronsäure in wasserfreiem Pyridin

Verschiedene fluoreszierende Boronsäurederivate wurden zur Komplexbildung von Strukturen mit vicinalen Diolen eingesetzt, wie zum Beispiel *m*-Dansylaminophenylboronsäure für die Detektion von glykosyliertem Albumin. Der Vergleich der Spektren von *m*-Dansylaminophenylboronsäure in Wasser und *m*-Dansylaminophenylboronsäure in der Albuminlösung zeigte eine Verschiebung des Emissionsmaximums von 530 auf 490 nm und eine Erhöhung des Signals.⁵⁰

Für die Analyse zahlreicher Zucker wurde eine Reihe weiterer fluoreszierender Phenylboronsäure-Derivate synthetisiert. Bei der Quantifizierung wurde jeweils die Verschiebung des Emissionsmaximums und die Erhöhung der Emission ausgenutzt und mittels eines Fluorimeters ohne weitere Auftrennung vermessen.⁵¹⁻⁵³

Gamoh et al. wandten Boronsäurekomplexe für die HPLC-Analytik von Brassinosteroiden an.^{54,55} Aufgrund der Komplexbildung von 9-Phenanthrenboronsäure mit den vicinalen Diolen von Brassinosteroiden konnten diese mittels eines Fluoreszenzdetektors bestimmt werden. Die Derivatisierungsbedingungen waren folgende: 10 mg 9-Phenanthrenboronsäure wurden in 1 ml 0,1% Pyridin in Acetonitril gelöst. 100 µl dieser Lösung wurden auf einen Pflanzenextrakt gegeben und für 10 min auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlung wurde die Lösung direkt per HPLC aufgetrennt und vermessen, wobei als mobile Phase ein Gemisch aus 8 Teilen Acetonitril und 2 Teilen Wasser verwendet wurde.⁵⁴

Diese Methode sollte auf die Kapillarelektrophorese und die Bestimmung von Nucleosiden übertragen werden. Es wurden Probelösungen von Adenosin und Uridin mit Phenylboronsäure in verschiedenen Medien unter diversen Bedingungen zur Reaktion gebracht. Die Lösungen wurden mittels Kapillarelektrophorese vermessen. Die ursprüngliche Annahme, dass der Komplex stabil genug sei, um im Elektropherogramm zwei Peaks, bzw. bei einer quantitativen Umsetzung einen Peak mit einer späteren Migrationszeit erkennen zu können, wurde schnell verworfen. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass der Komplex nicht stabil genug ist, um den Trennbedingungen der Kapillarelektrophorese stand zu halten. Lediglich bei der Umsetzung im Wasserfreien konnte eine Komplexbildung detektiert werden. Das Problem liegt vor allen Dingen in der Hydrolyseempfindlichkeit des Komplexes. Selbst bei pH-Werten des Laufpuffers von 8,5 und 10,0 hält der Komplex den Trennbedingungen der Kapillarelektrophorese nicht stand. Dieses Problem tritt bei HPLC-Analysen in geringerem Maße auf, da man dort mit einem viel geringeren Wasseranteil auskommt.

4.1 Umsetzung in wasserfreiem Medium

Erste Versuche wurden im wasserfreien Medium durchgeführt, hierbei wurde die Methode von Gamoh et al.⁵⁴ leicht modifiziert.

4.1.1 Durchführung

In Anlehnung an die zur Bestimmung von Brassinosteroiden verwendete Methode⁵⁴ wurden die Nucleoside Adenosin und Uridin mit Phenylboronsäure umgesetzt und mittels Kapillarelektrophorese vermessen.

CE-Bedingungen

Für die Trennung der Nucleoside wurde eine Quarzkapillare (70 cm (60 cm effektive Länge) x 75 µm Innendurchmesser) verwendet. Zur Trennung wurde eine konstante Spannung von 15 kV angelegt, als Trennpuffer wurde Phosphatpuffer (20 mM, pH 7,4; pH 8,5 oder pH 10) verwendet. Die Analyten wurden bei einer Wellenlänge von 190-300 nm mit einem Dioden-Array-Detektor detektiert. Die für die Auswertung der Elektropherogramme verwendete Wellenlänge betrug 254 nm. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder

Messung wurde die Kapillare mit Natronlauge 0,1 M, mit demineralisiertem Wasser und mit Puffer für je 2 min gespült.

Herstellung der Probelösungen

Folgende Stammlösungen wurden hergestellt:

- Adenosin-Lösung (250 mg/ml in Acetonitril)
- Uridin-Lösung (250 mg/ml in Acetonitril)
- Phenylboronsäure-Lösung (10 mg/ml in Acetonitril mit 0,1% Pyridin)
- Phenylboronsäure-Lösung (5 mg/ml in Acetonitril mit 0,1% Pyridin)

Stammlösungen der Nucleotide konnten nicht hergestellt werden, da diese in organischen Lösungsmitteln nicht löslich sind. Je 10 µl der Nucleosid-Lösungen wurden in ein Eppendorff-Vial pipettiert und mit 100 µl einer der Phenylboronsäure-Lösungen versetzt. Die Lösungen wurden für 10 min auf 70°C erhitzt.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der Probelösungen

Probe	Adenosin-Lösung [µl]	Uridin-Lösung [µl]	Phenylboronsäure- Lösung (10 mg/ml) [µl]	Phenylboronsäure- Lösung 5 (mg/ml) [µl]	Reaktions- bedingungen
1	10	10	100	-	70°C, 10 min
2	10	10	-	100	70°C, 10 min

4.1.2 Ergebnisse

Die Elektropherogramme zeigten, dass bei pH-Werten des Laufpuffers von 7,4 und von 8,5 der Komplex den Trennungen nicht standgehalten hat. Bei dem Laufpuffer mit einem pH-Wert von 10,0 konnten neben den Nucleosid-Peaks noch zwei weitere Peaks detektiert werden. Jedoch ist der Adenosin-Komplex in nur sehr geringen Mengen entstanden. Die Peakform von Uridin und dessen Komplex ist sehr breit. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich während der Auftrennung die Komplexe zum Teil bereits wieder zersetzt haben.

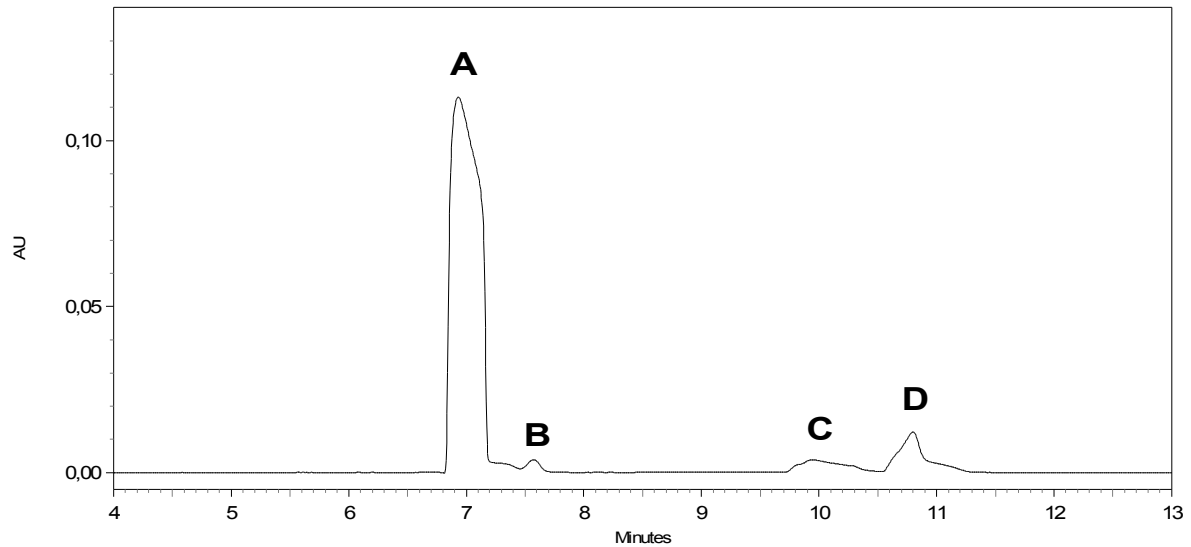


Abbildung 4.2: Elektropherogramm von Adenosin und Uridin umgesetzt mit einer 10 mM Phenylboronsäure-Lösung im Wasserfreien. Laufpuffer: 20 mM Phosphatpuffer pH 10, AU = Absorption Units, A = Adenosin + EOF, B = komplexiertes Adenosin, C = Uridin, D = komplexiertes Uridin

4.2 Umsetzung in wässrigem Medium

Nucleoside sind nur sehr schlecht löslich in Acetonitril, Nucleotide konnten in Acetonitril gar nicht in Lösung gebracht werden. Es wurden daher weitere Probelösungen im wässrigen Medium hergestellt.

4.2.1 Durchführung

Eine wässrige Adenosin-Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml, ein 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,5) und ein 50 mM-Phosphatpuffer (pH 10) jeweils mit und ohne Phenylboronsäure (6 mM) wurden hergestellt. Als Zusätze wurden Methanol, Acetonitril oder Natronlauge zu den Probelösungen gegeben (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Probelösungen

Probe	Adenosin-Stamm-lösung [μ l]	Phosphatpuffer pH 10 [μ l]	Phosphatpuffer pH 8 [μ l]	Methanol [μ l]	Acetonitril [μ l]	NaOH 1 mM [μ l]	Phenylboron-säure 6 mM (im Puffer bereits enthalten)	Reaktionsbedingungen
1	50	1450	-	-	-	-	+	70°C, 10 min
2	50	1450	-	-	-	-	-	70°C, 10 min
3	50	-	1450	-	-	-	+	70°C, 10 min
4	50	-	1450	-	-	-	-	70°C, 10 min
5	50	1250	-	200	-	-	+	70°C, 10 min
6	50	1250	-	200	-	-	-	70°C, 10 min
7	50	-	1250	200	-	-	+	70°C, 10 min
8	50	-	1250	200	-	-	-	70°C, 10 min
9	50	1250	-	-	200	-	+	70°C, 10 min
10	50	1250	-	-	200	-	-	70°C, 10 min
11	50	-	1250	-	200	-	+	70°C, 10 min
12	50	-	1250	-	200	-	-	70°C, 10 min
13	50	1200	-	200	-	50	+	70°C, 10 min
14	50	1200	-	200	-	50	-	70°C, 10 min
15	50	-	1200	-	200	50	+	70°C, 10 min
16	50	-	1200	-	200	50	-	70°C, 10 min

4.2.2 Ergebnisse

Bei keiner der Lösungen konnte eine Komplexbildung detektiert werden. Die Elektropherogramme mit und ohne Phenylboronsäure sahen jeweils gleich aus. Vermutlich hat sich der Komplex bei der Auftrennung zersetzt.

4.3 Zugabe von Phenylboronsäure zum Laufpuffer

Durch die Komplexbildung von fluoreszierenden Phenylboronsäure-Derivaten mit vicinalen Diolen kommt es zu einem photoinduzierten Elektronen-Transfer (PET). Dies führt zu einer Vergrößerung der Quantenausbeute und zu einer hypsochromen Verschiebung des Emissionsmaximums.^{50,53} Die Überlegung war, *m*-Dansylaminophenylboronsäure in geringer Konzentration dem Laufpuffer zuzusetzen, um

durch diesen Effekt ein positives Detektorsignal für die Nucleotide zu erhalten. Zuerst wurde mittels eines Fluorimeters überprüft, ob die Komplexbildung von Adenosin mit *m*-Dansylaminophenylboronsäure zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führt. Danach wurde Phenylboronsäure dem Laufpuffer zugefügt, um zu sehen, ob unter den Trennbedingungen eine Komplexierung der Nucleotide stattfindet. Dies konnte durch die Verschiebung der Migrationszeiten nachgewiesen werden, da der Borsäurekomplex im Wässrigen negativ geladen ist. Phenylboronsäure ist kostengünstiger als *m*-Dansylaminophenylboronsäure und wurde daher für die Vorversuche als Pufferzusatz verwendet.

4.3.1 Einfluss von Adenosin auf die Fluoreszenzquantenausbeute von *m*-Dansylaminophenylboronsäure

Um den Einfluss von Adenosin auf die Fluoreszenzquantenausbeute *m*-Dansylaminophenylboronsäure zu ermitteln, wurden verschiedene Probelösungen mit verschiedenen pH-Werten hergestellt und jeweils mit und ohne Zugabe von Adenosin vermessen.

4.3.1.1 Durchführung

Es wurden drei 0,3 μ M-*m*-Dansylaminophenylboronsäure-Lösungen in Phosphatpuffer (20 mM, pH 7,4; 8,5 und 10,0), hergestellt und jeweils dreimal mit einem Fluorimeter vermessen. Ein Emissionswellenlängenbereich von 350 nm bis 800 nm wurde gescannt. Adenosin, in der Konzentration von 50 mM, wurde zugefügt und die Lösungen wurden ein zweites Mal vermessen. Die jeweiligen Spektren wurden miteinander verglichen.

4.3.1.2 Ergebnisse

Bei der Komplexbildung von *m*-Dansylaminophenylboronsäure mit Adenosin war bei allen pH-Werten eine starke Zunahme der Emission und eine leicht hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums zu beobachten. Die Zunahme der Emission war bei einem pH-Wert von 10,0 am größten. Dies stimmt mit der Theorie, dass Borsäurekomplexe im Alkalischen stabiler sind, überein (Abbildung 4.3).

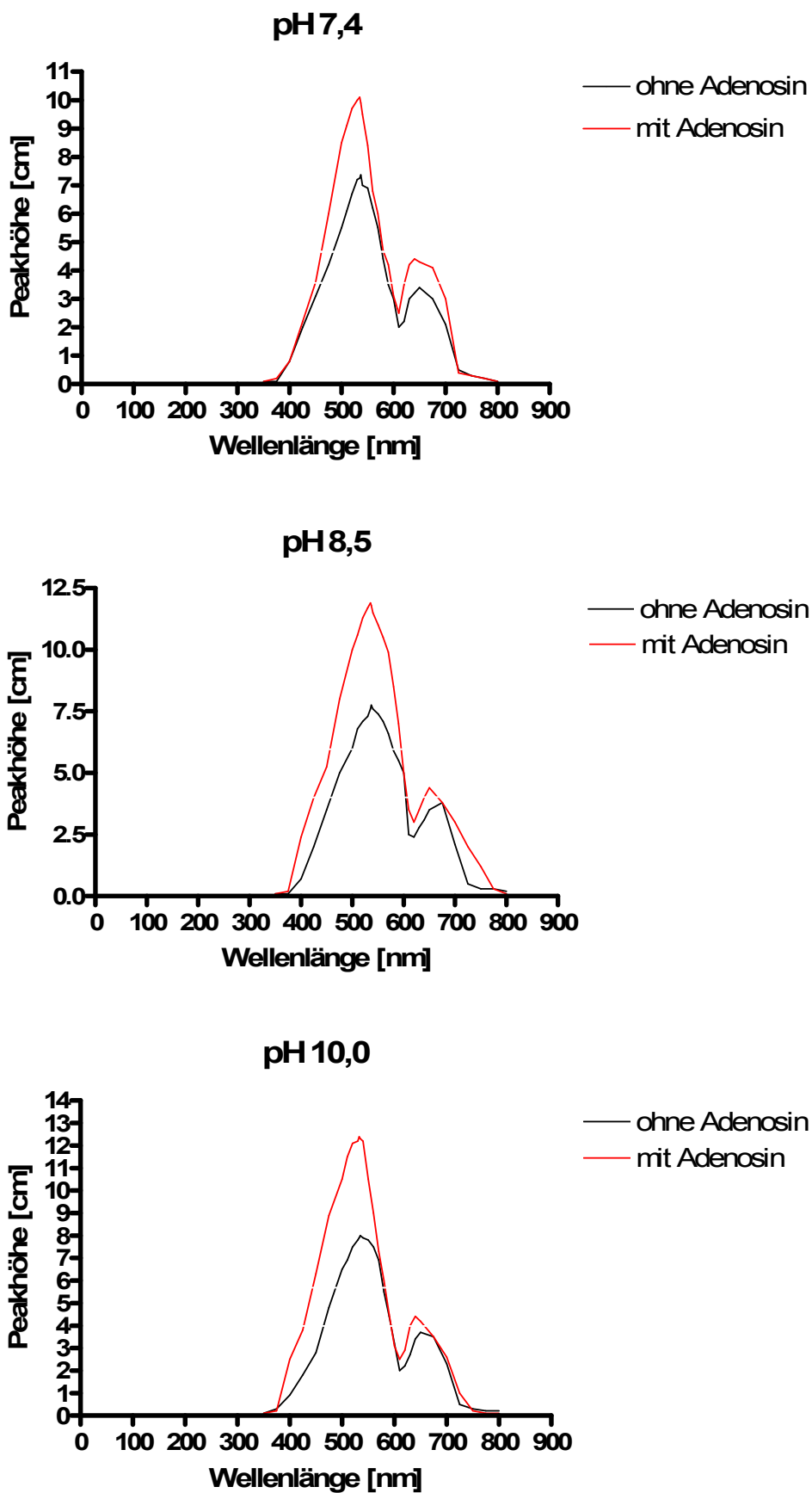


Abbildung 4.3: Fluoreszenzspektren von Dansylaminophenylboronsäure mit und ohne Adenosin bei verschiedenen pH-Werten

Die Verschiebungen der Emissionsmaxima waren sehr gering und nicht signifikant, sie betragen nur einige nm (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Verschiebung der Emissionsmaxima

pH-Wert	Wellenlängen der Emissionsmaxima ohne Adenosin [nm]	Wellenlängen der Emissionsmaxima mit Adenosin [nm]
7,4	537	535
8,5	535	534
10,0	535	533

4.3.2 Vergleich der Migrationszeiten mit und ohne Phenylboronsäure im Laufpuffer

Durch Verwendung eines Laufpuffers mit einer 6 mM-Konzentration an Phenylboronsäure und einem pH-Wert von 8,5 oder 10,0 konnte eine deutliche Auftrennung von Adenosin, Uridin und dem EOF erreicht werden. Die Phenylboronsäure ist im gesamten Puffer vorhanden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass aufgrund des dynamischen Gleichgewichts der Borsäurekomplexe alle Analyten komplexiert vorliegen und über eine negative Ladung mehr als ursprünglich verfügen.

4.3.2.1 Durchführung

Zur Trennung wurde eine konstante Spannung von 15 kV angelegt und als Laufpuffer wurde Phosphatpuffer (50 mM, pH-Wert 8,5 oder 10,0 mit und ohne Phenylboronsäure-Zusatz in der Konzentration von 6 mM) verwendet. Als Kapillare wurde eine Quarzkapillare (70 cm (60 cm effektive Länge) x 75 µm Innendurchmesser) verwendet. Die Analyten wurden bei einer Wellenlänge von 190-300 nm mit einem DAD detektiert. Die für die Elektropherogramme verwendete Wellenlänge betrug 254 nm. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare jeweils mit Natronlauge 0,1 M, mit demineralisiertem Wasser und mit Puffer für je 2 min gespült.

Probelösungen der folgenden Konzentrationen wurden hergestellt:

- Adenosin-Lösung (500 µg/ml in Wasser)
- AMP-Lösung (500 µg/ml in Wasser)
- UMP-Lösung (500 µg/ml in Wasser)
- Uridin-Lösung (500 µg/ml in Wasser)

Jeweils 100 µl von jeder Lösung wurden in ein Probenvial pipettiert und mit demineralisiertem Wasser auf 1500 µl aufgefüllt. Die Probelösung wurde mit den zwei verschiedenen Laufpuffern vermessen, jeder Laufpuffer wurde dreimal vermessen.

4.3.2.2 Ergebnisse

In den Tabellen 4.4 und 4.5 sind Verschiebungen der Migrationszeiten dargestellt. Die Komplexbildung bei einem pH-Wert von 10,0 war deutlich stärker als die bei einem pH-Wert von 8,5. Die Differenzwerte der Migrationszeiten bei einem pH-Wert von 8,5 sind geringer, dennoch sind noch deutliche Verzögerungen der Migrationszeiten zu erkennen. Durch die Anwesenheit von Phenylboronsäure im Laufpuffer ließ sich Adenosin vom EOF abtrennen. Uridin wurde auch ohne die Anwesenheit von Phenylboronsäure vom EOF getrennt, da es bei den angewandten pH-Werten von 8,5 und 10,0 bereits deprotoniert vorlag. Bei einem Laufpuffer-pH-Wert von 8,5 konnte UMP nicht detektiert werden, da die Messzeit mit 35 min zu kurz eingestellt war (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.4: Migrationszeiten bei pH 10

Laufpuffer	Migrationszeit Adenosin [min]	Migrationszeit Uridin [min]	Migrationszeit AMP [min]	Migrationszeit UMP [min]
Phosphatpuffer (50 mM, pH 10,0)	7,364 ± 0,016	9,113 ± 0,071	16,655 ± 0,115	23,610 ± 0,060
Phosphatpuffer (50 mM, pH 10,0), Phenylboronsäure (6 mM)	10,930 ± 0,084	11,634 ± 0,040	27,207 ± 0,062	30,978 ± 0,031
Differenz	3,566	2,521	10,552	7,368

Tabelle 4.5: Migrationszeiten bei pH 8,5

Laufpuffer	Migrationszeit Adenosin [min]	Migrationszeit Uridin [min]	Migrationszeit AMP [min]	Migrationszeit UMP [min]
Phosphatpuffer (50 mM, pH-Wert 8,5)	8,812 ± 0,062	9,136 ± 0,039	28,069 ± 0,065	32,345 ± 0,083
Phosphatpuffer (50 mM, pH-Wert 8,5) Phenylboronsäure (6 mM)	11,079 ± 0,037	11,529 ± 0,035	32,811 ± 0,072	-
Differenz	2,267	2,293	4,742	-

4.4 Zugabe von *m*-Dansylaminophenylboronsäure zum Laufpuffer

Die Zugabe von *m*-Dansylaminophenylboronsäure zum Laufpuffer und die Detektion der Nucleotide mittels Fluoreszenzdetektion blieben ohne Erfolg. *m*-Dansylaminophenylboronsäure wurde im Gegensatz zur Phenylboronsäure in einer Konzentration von nur 6 µM zugesetzt, da bei höheren Konzentrationen der Fluoreszenzhintergrund für eine Messung zu hoch war. Dennoch ließen sich die Nucleoside und Nucleotide nur mittels indirekter Fluoreszenzmessung bestimmen. Trotz der Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute, die in Kapitel 4.3.1. nachgewiesen wurde, kam es zu keinen positiven Detektorsignalen. Es wurde daher in den folgenden Experimenten eine alternative Derivatisierungsstrategie verfolgt.

5 Fluoreszenzmarkierung von Nucleotiden mittels Phosphoramid-Verknüpfung

5.1 Stand der Forschung

Chu et al. stellten 1983 eine effektive Methode vor, um Mono- und Oligonucleotide im wässrigen Medium unter Carbodiimid-Aktivierung mit Ethylendiamin zu verknüpfen.⁵⁶ Dabei wurde das 5'-Phosphatende der Nucleotide in ein reaktives Imidazolid überführt, welches in Anwesenheit von Aminen mit 85%iger Ausbeute zu 5'-Phosphoramiden umgesetzt werden konnte.

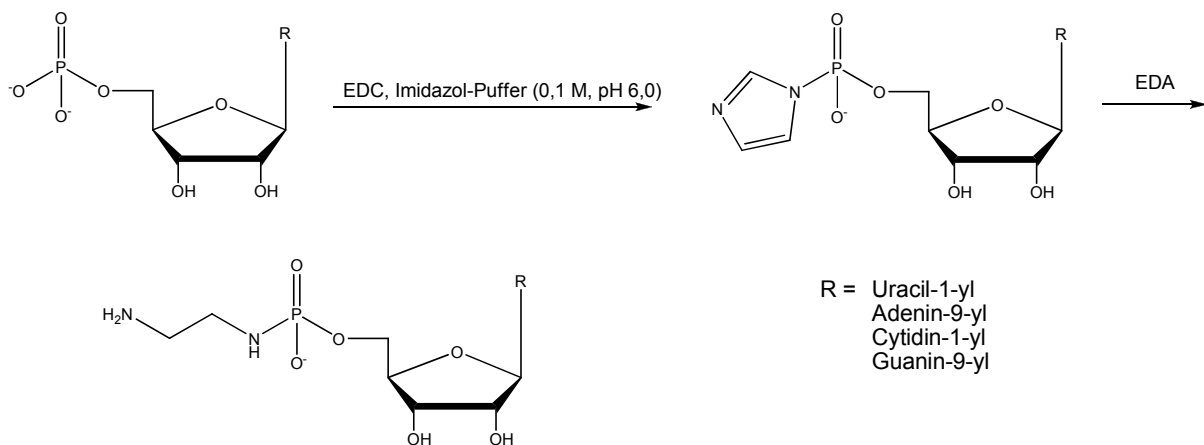


Abbildung 5.1: Darstellung von Nucleosid-5'-ethyldiaminphosphoramiden nach Chu et. al.⁵⁶ EDC = N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl, EDA = Ethylendiamin

Diese Synthesestrategie eröffnet nun die Möglichkeit, geeignete Fluoreszenzmarker über die generierte primäre Aminogruppe an Nucleotide zu koppeln. So beschrieben Kelman et al. 1988 erstmals die Synthese dansylierter Desoxynucleosid-5'-monophosphate durch Umsetzung von 2'-Desoxynucleosid-5'-ethyldiaminphosphoramiden mit Dansylchlorid zu fluoreszierenden Konjugaten.⁵⁷

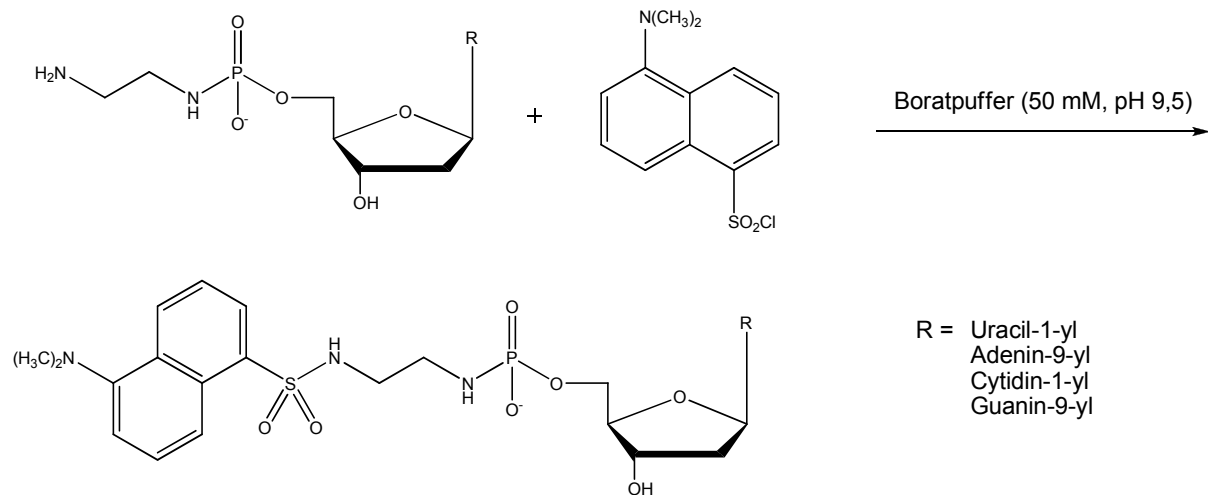


Abbildung 5.2: Darstellung dansylierter 2'-Desoxynucleosid-5'-phosphate nach Kelman et al.⁵⁷

Sharma et al. setzten diese Methode zur Analyse von methylierten DNA- und RNA-Nucleotiden mittels HPLC ein.^{58,59}

Basierend auf dem gleichen Prinzip stellten Al-Deen et al. 1990 Fluorescein-konjugierte Nucleotide vor,⁶⁰ auch hier wurden die 2'-Desoxynucleosid-5'-phosphate⁵⁶ zunächst in Ethylendiamin-Phosphoramide überführt. Die Darstellung fluoreszenzmarkierter Nucleotide erfolgte dann durch die Umsetzung der primären Aminogruppe mit Fluoresceinisothiocyanat, wobei eine stabile Thioharnstoff-Verknüpfung gebildet wird.

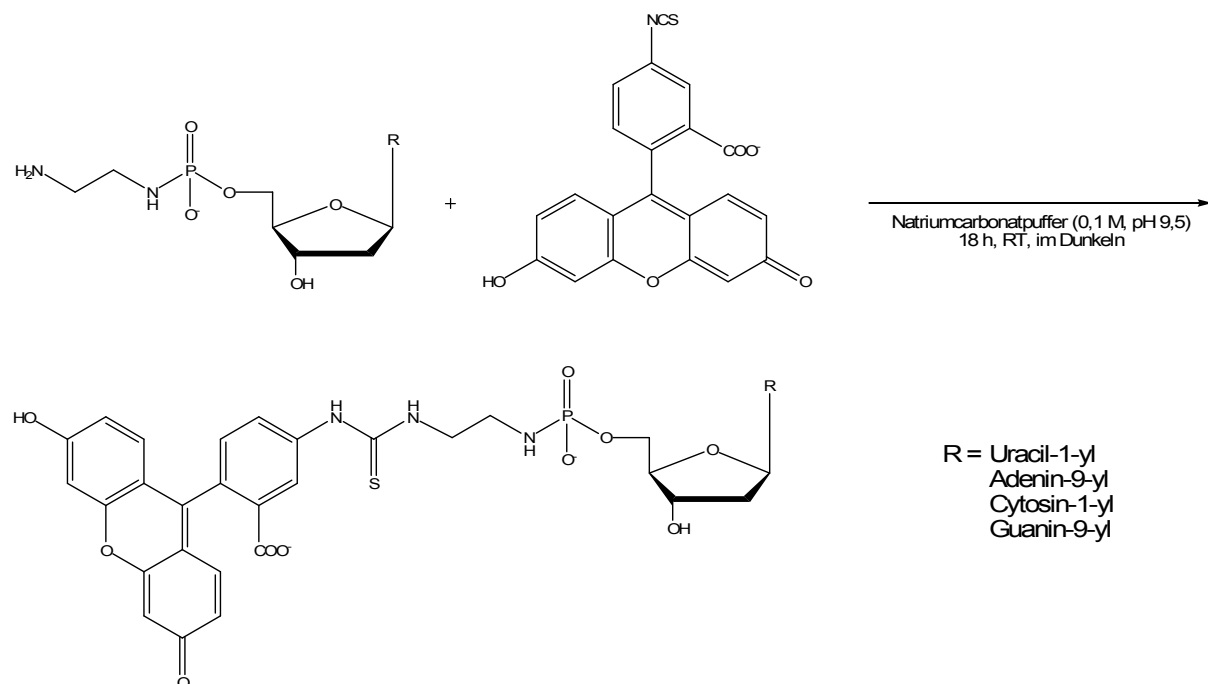


Abbildung 5.3: Darstellung Fluorescein-markierter 2'-Desoxynucleosid-5'-monophosphate nach Al-Deen et al.⁶⁰

Diese Methode der Derivatisierung wurde 1992 von Li et al. wieder aufgegriffen. Die Fluorescein-markierten Desoxynucleotide wurden per HPLC aufgereinigt und dann mittels Kapillarelektrophorese vermessen.⁶¹

Wang und Giese stellten 1993 eine Derivatisierungstechnik vor, die ebenfalls auf dem beschriebenen Prinzip der Konjugation einer Aminogruppe an die 5'-Phosphatgruppe von Mononucleotiden unter Carbodiimid-Aktivierung beruhte.⁶² Sie machten sich die von Chu et al.⁵⁶ beschriebene Imidazolid-Bildung zunutze, indem sie einen N-Acetyl-L-Histidin-gekuppelten Fluorophor, ein BODIPY-Derivat, einsetzten (Abb. 3.4). Dieses Konjugat koppelt über den Imidazol-Ring des Histidins an die 5'-Phosphatgruppe der Mononucleotide unter Ausbildung eines Nucleotid-Fluorophor-Imidazols. Da allerdings die N1- und N3-Position nicht äquivalent sind, kommt es bei der Reaktion zu regioisomeren Gemischen.⁶³

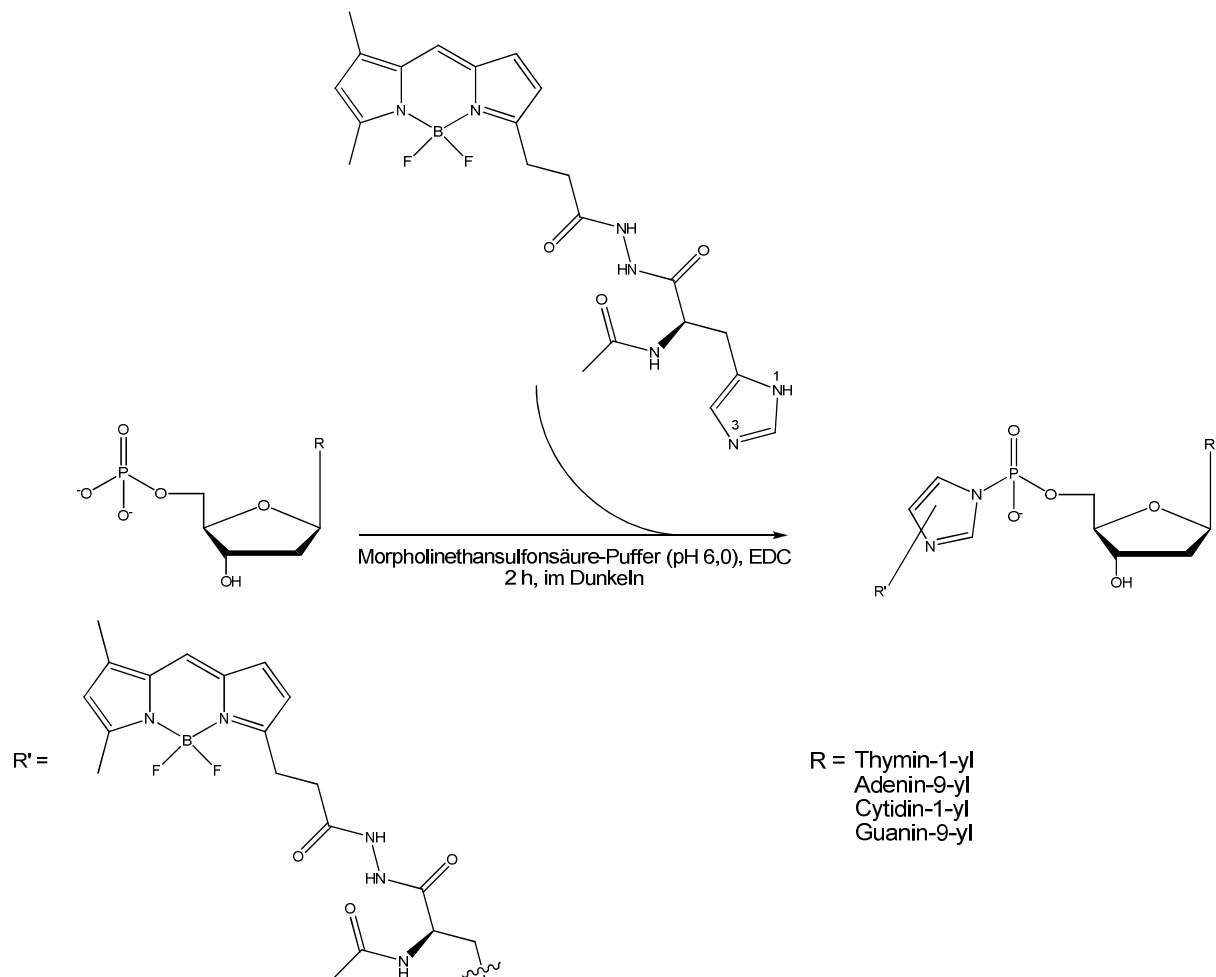


Abbildung 5.4: Darstellung Fluoreszenz-markierter 2'-Desoxynucleotid-5'-monophosphate nach Wang und Giese⁶², EDC = N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl

In einer zweiten Publikation stellte die gleiche Arbeitsgruppe 1999 einen neuen Fluorophor vor, welcher mit einem He-Cd-Laser angeregt werden kann.⁶⁴

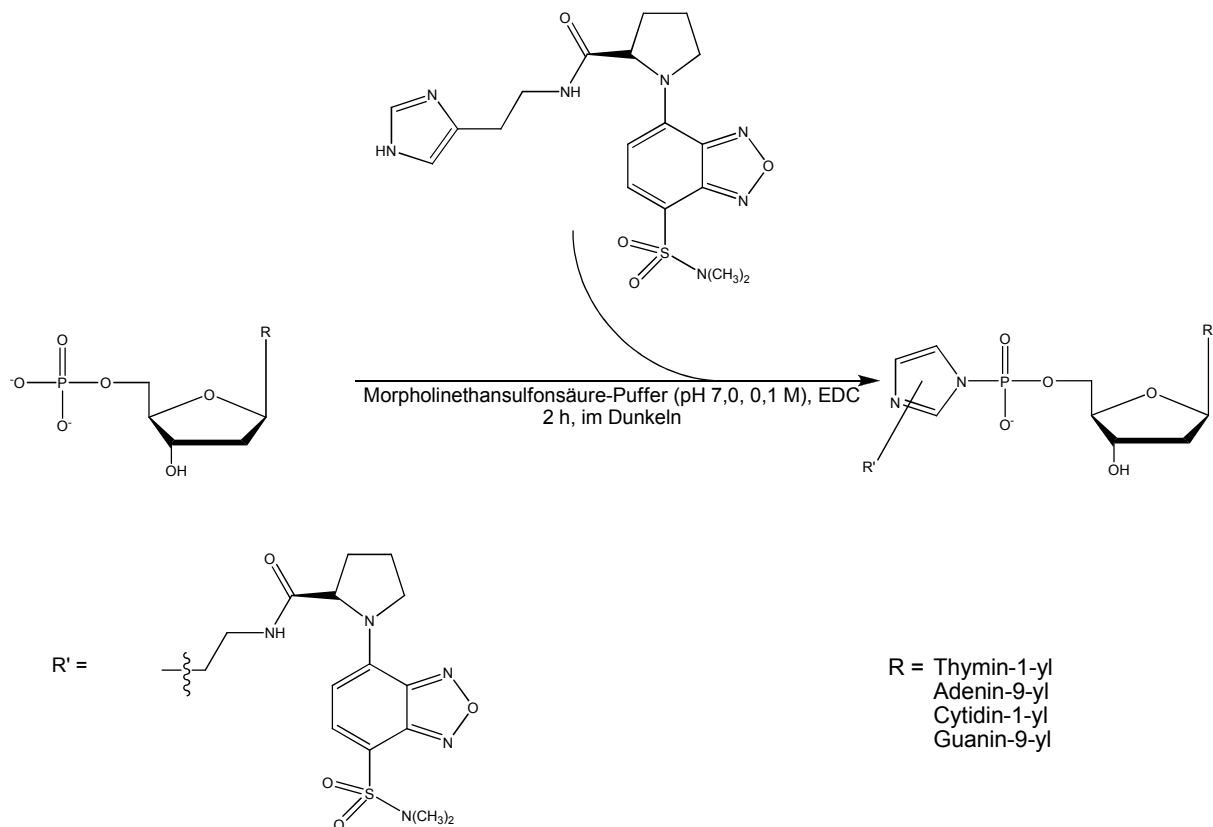


Abbildung 5.5: Darstellung Fluoreszenz-markierter 2'-Desoxynucleotid-5'-monophosphate nach Lan et al.⁶⁴, EDC = N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl

Ivaniskaya et al. führten die Phosphoramid-Verknüpfung mit verschiedenen Aminen in einer wässrigen Lösung, die mit 6 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 4,5-5,5 eingestellt wurde, durch. Als Kupplungsreagenz wurde wiederum EDC verwendet.⁶⁵ Sonoki et al. ließen die Reaktion in 1-Methylimidazol-Puffer ablaufen.⁶⁶ Beide Varianten führen direkt zum Phosphoramid, die Zwischenstufe einer Imidazolidbildung wird hierbei übersprungen.

Für die Fluoreszenzmarkierung mit Dansylchlorid sind in der Literatur mehrere Varianten beschrieben. Entweder wurde die 5'-Phosphatgruppe des Nucleotids zuerst mit Ethylendiamin umgesetzt und dann Dansylchlorid zugegeben,^{57,59} oder es wurde zuerst Dansylaminoethylamin synthetisiert und dieses direkt als Aminkomponente zugegeben. Die zweite Variante hat den Vorteil, dass es zu keinen unerwünschten Nucleotid-Dimeren kommt, da nur noch eine Aminofunktion des Ethylendiamins reaktiv ist. Während mit den bisher vorgestellten Methoden nur Monophosphate derivatisiert wurden, wandten Sonoki et al. 1994 die Konjugation mit Dansylaminoethylamin auch für die Bestimmung von Di- und Triphosphaten mittels HPLC an.⁶⁷

5.2 Umsetzung von Nucleotiden mit Dansylaminoethylamin unter Verwendung von *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC) als Kupplungsreagenz

Im ersten Schritt wurde für die Umsetzung mit den Nucleotiden Dansylaminoethylamin (**1**) synthetisiert.

5.2.1 Synthese von Dansylaminoethylamin (**1**)

Dansylaminoethylamin (**1**) ist nicht kommerziell erhältlich und wurde daher nach Literaturvorschrift synthetisiert.⁶⁸ Eine Lösung aus Dansylchlorid in Dimethylformamid wurde langsam zu einer Lösung aus Ethylendiamin (10%iger Überschuss) in DMF zugetropft. Das DMF wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde über Kieselgel aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen wurden getrocknet. Zur besseren Kristallisation wurde der Rückstand zwei Tage lang in Diethylether gerührt. Dadurch, dass Ethylendiamin in 10%igem Überschuss vorlag und die Dansylchlorid-Lösung nur langsam hinzugefügt wurde, ließ sich die Bildung von zweifach gekuppeltem Ethylendiamin reduzieren. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 75% isoliert werden. NMR- und eine LC/MS-Analysen wurden angefertigt (siehe experimenteller Teil). In der Literatur⁶⁸ wurden keine weiteren Angaben zur Ausbeute oder zur Analyse der Verbindung **1** gemacht.

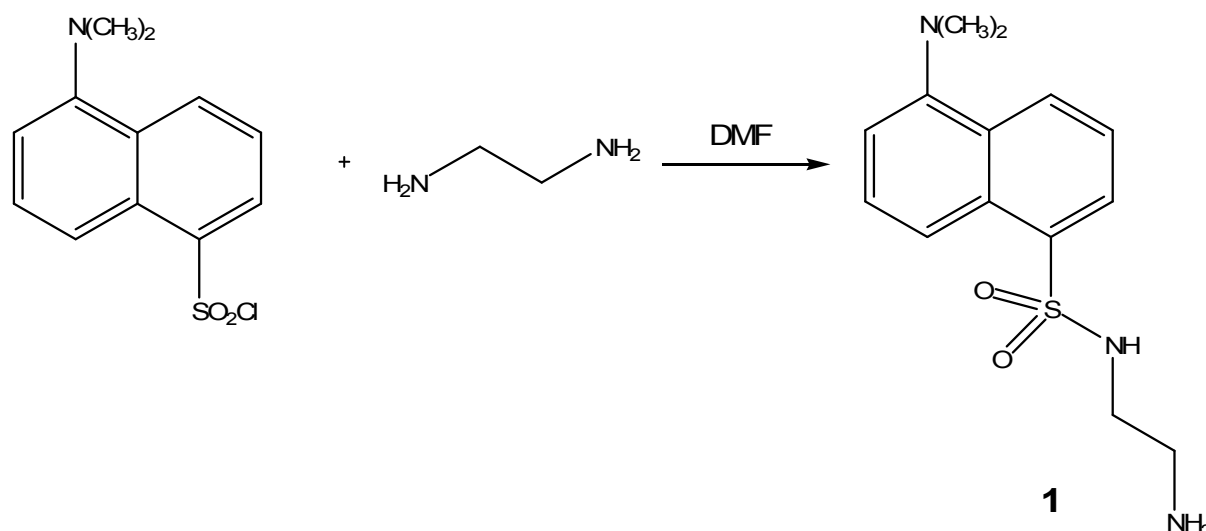


Abbildung 5.6: Darstellung von Dansylaminoethylamin (**1**) nach Sonoki et al.⁶⁸

5.2.2 Umsetzung von AMP mit Dansylaminoethylamin

In einem ersten Versuch sollte Adenosinmonophosphat (AMP) mit Dansylaminoethylamin (**1**) zum Phosphoramid umgesetzt werden. Die Reaktion wurde in zwei verschiedenen Puffern durchgeführt, in 1-Methylimidazol-Puffer⁶⁶ und in Imidazol-Puffer. Bei der Reaktion in 1-Methylimidazol-Puffer reagiert AMP nach Aktivierung der Phosphatgruppe mit N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl (EDC) direkt zum Phosphoramid^{65,66}, während bei der Reaktion in Imidazol-Puffer der Zwischenschritt der Imidazolidbildung postuliert wird.⁵⁹

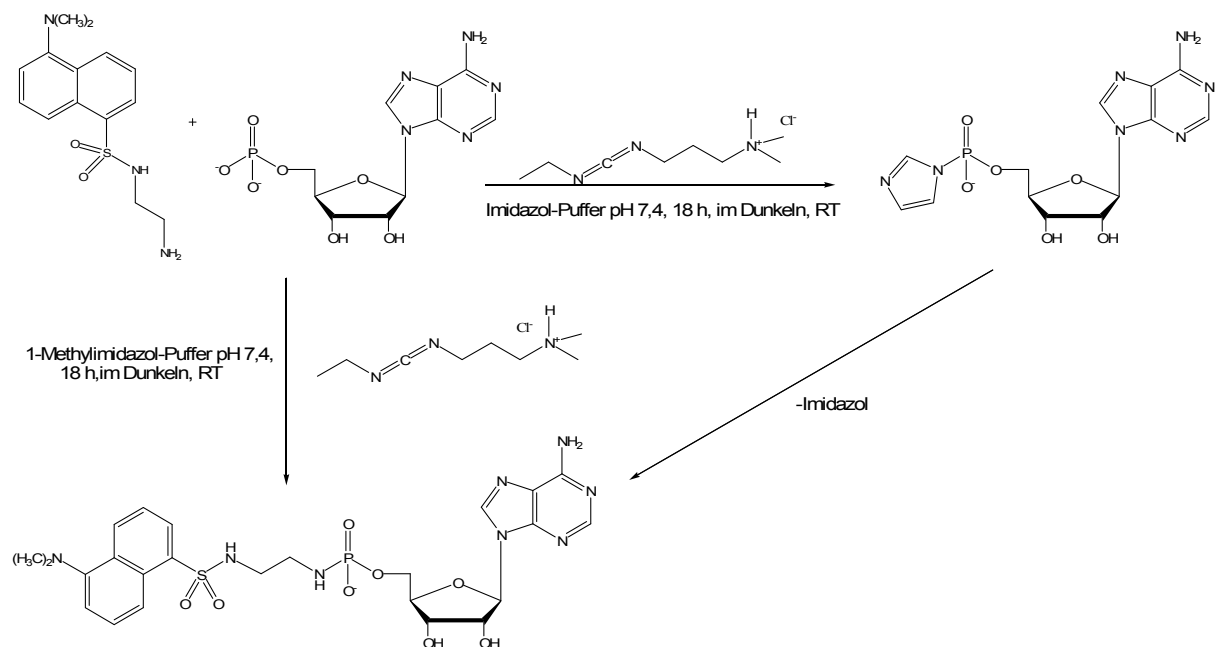


Abbildung 5.7: Reaktion von AMP mit Dansylaminoethylamin in 1-Methylimidazol-Puffer und Imidazol-Puffer.^{59,65,66}

5.2.2.1 Durchführung

Die Probelösungen wurden wie folgt hergestellt:

Je 30 µl einer AMP-Lösung (15, 30 oder 60 mM in Wasser) wurden mit 600 µl 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 7,4) verdünnt, 30 µl EDC-Lösung (0,1 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,1 M, pH 7,4) und 120 µl Dansylaminoethylamin-Lösung (50 mM in DMSO) wurden hinzugefügt. Die Lösungen wurden für 18 h im Dunkeln bei 20°C auf einem Eppendorff-Thermomixer gerührt. Anschließend wurden die Lösungen 1:1 mit 1-Methylimidazol-Puffer verdünnt. Jede Konzentration wurde

dreimal vermessen. In einem zweiten Versuch wurde genauso verfahren, anstatt 1-Methylimidazol-Puffer wurde Imidazol-Puffer (0,1 M, pH 7,4) verwendet.

CE-Bedingungen

Als Kapillare wurde eine Quarzkapillare (70 cm (60 cm effektive Länge) x 75 µm Innendurchmesser) verwendet. Zur Trennung wurde eine konstante Spannung von 15 kV angelegt, als Trennpuffer wurde ein 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 verwendet. Die Analyten wurden bei einer Wellenlänge von 190-300 nm mit einem Dioden-Array-Detektor detektiert, die für die Auswertung der Elektropherogramme verwendete Wellenlänge betrug 254 nm. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare je 2 min zuerst mit Natronlauge 0,1 M, dann mit demineralisiertem Wasser und schließlich mit Puffer gespült.

5.2.2.2 Ergebnisse

In den erhaltenen Elektropherogrammen ließen sich die einzelnen Peaks gut erkennen und zuordnen. Mit zunehmender Konzentration der eingesetzten AMP-Lösung wird auch der Dansyl-AMP Peak größer, dies wurde als Bestätigung gewertet, dass es sich bei dem Peak um Dansyl-AMP handelt, es hat sich jedoch nur ein geringer Teil umgesetzt. Der AMP-Peak ist noch deutlich zu erkennen.

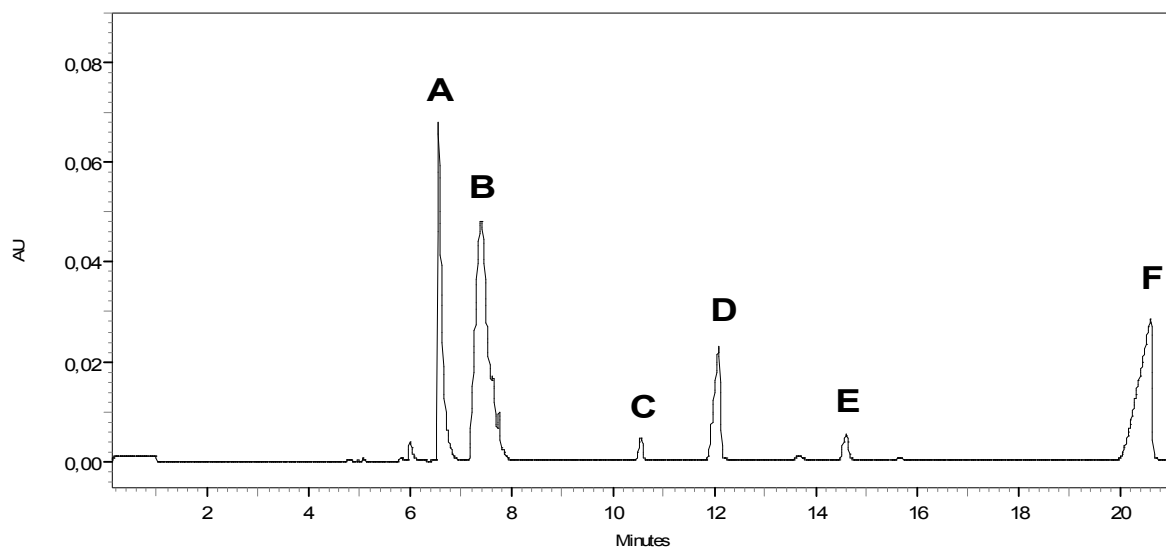


Abbildung 5.8: Umsetzung von AMP in Imidazol-Puffer, c (AMP) 60 mM, AU = Absorption Unit, A = Dansylaminoethylamin, B = Imidazol + EOF, C = Dansyl-AMP, D = Imidazolid, E = Dansylsulfonsäure, F = AMP

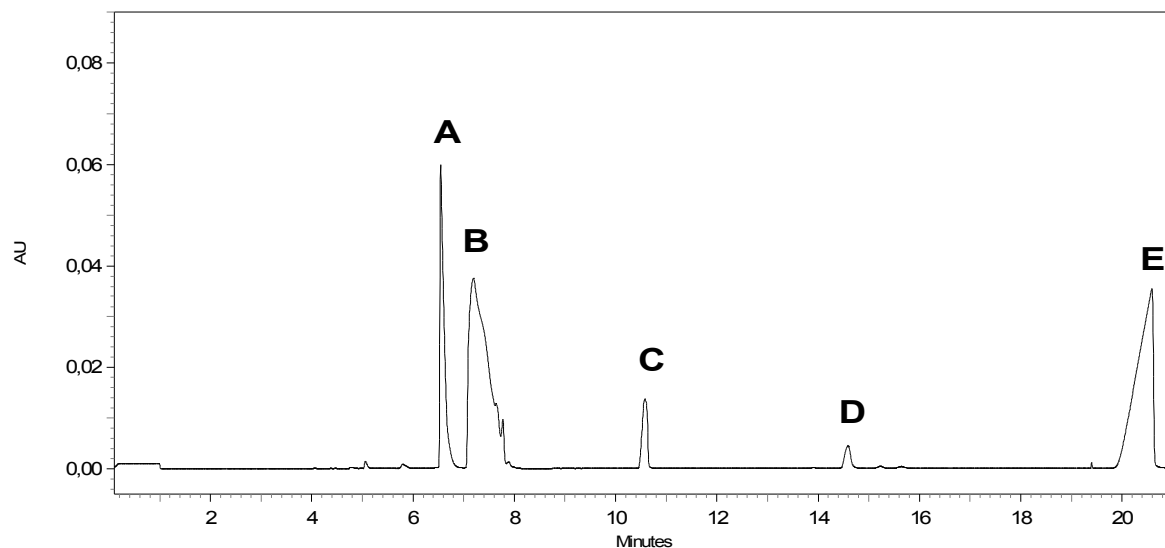


Abbildung 5.9: Umsetzung von AMP in 1-Methylimidazol-Puffer, c (AMP) 60 mM, AU = Absorption Unit, A = Dansylaminoethylamin, B = 1-Methylimidazol + EOF, C = Dansyl-AMP, D = Dansylsulfonsäure, E = AMP

Bei der Umsetzung in Imidazol-Puffer erhält man noch einen weiteren Peak, vermutlich das Imidazolid, welches sich nicht weiter umgesetzt hat. In der Literatur ist zwar beschrieben, dass sich das Imidazolid unter diesen Bedingungen vollständig mit dem Amin umsetzt,⁵⁹ dies konnte hier jedoch nicht bestätigt werden. Daher wurden alle weiteren Versuche mit 1-Methylimidazol-Puffer durchgeführt. Der Dansylsulfonsäure-Peak wurde durch Spiking identifiziert, Dansylsulfonsäure als Standard wurde durch Hydrolyse des entsprechenden Säurechlorids erhalten. Ein geringer Teil der Verbindung **1** hydrolysierte während der Derivatisierung zur Dansylsulfonsäure.

Tabelle 5.1: AMP-Konzentrationen und zugehörige Peakflächen nach Umsetzung mit Verbindung **1** in 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 7,4)

c (AMP) [mM]	Peakfläche Dansyl-AMP (Mittelwert aus 3 Messungen)	Peakfläche AMP (Mittelwert aus 3 Messungen)	Peakflächen-Verhältnis Dansyl-AMP/AMP
15	31787 ± 55,29	161255,33 ± 234,18	0,20
30	53027 ± 123,27	272732 ± 78,21	0,19
60	100370 ± 115,15	773539 ± 86,22	0,13

Die Umsetzung in 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 7,4) fand zwar statt, jedoch nur mit einer geringen Umsetzungsrate, wie in Tabelle 1.1 deutlich zu erkennen ist. Die Methode wurde im Folgenden optimiert.

5.2.3 Anwendung des He-Cd-Lasers nach Umsetzung von AMP, GMP und ATP mit Dansylaminoethylamin

Mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm ist der He-Cd-Laser gut für Dansyl-Derivate geeignet.⁶⁹ Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektoren haben eine höhere Intensität des eingestrahlt Lichts im Gegensatz zu Quecksilber- oder Quecksilber-Cadmium-Lampen.

Die Fluoreszenzintensität berechnet sich wie folgt:

$$F = 2,3 \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d$$

- F = Fluoreszenzintensität
- Φ_F = Quantenausbeute
- I_0 = Intensität der Strahlungsquelle
- ε = molarer Extinktionskoeffizient
- c = molare Konzentration
- d = Schichtdicke

In der Fluoreszenzphotometrie ist demnach die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Intensität der anregenden Strahlung. Durch Verstärken der Lichtquelle ist daher meistens auch eine Steigerung der Fluoreszenzintensität möglich.⁷⁰

5.2.3.1 Durchführung

Folgende Stammlösungen wurden hergestellt:

- AMP-Lösung (1 mM in Wasser)
- GMP-Lösung (1 mM in Wasser)
- ATP-Lösung (1 mM in Wasser)

Je 30 µl der Stammlösungen wurden mit 600 µl 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 7,4) verdünnt und mit 30 µl EDC-Lösung (0,1 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,1 M, pH 7,4) und 120 µl Dansylaminoethylamin-Lösung (50 mM in DMSO) versetzt. Die Lösungen wurden für 18 h im Dunkeln bei 27°C auf einem Eppendorff-Thermomixer gerührt. Anschließend wurde die Lösung 1:1 mit 1-Methylimidazol-Puffer verdünnt und jede Konzentration dreimal vermessen.

CE-Bedingungen

Als Kapillare wurde eine Quarzkapillare (70 cm (60 cm effektive Länge)) x 75 µm Innendurchmesser) verwendet. Zur Trennung wurde eine konstante Spannung von 15 kV angelegt, als Trennpuffer wurde ein Phosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) eingesetzt. Die Anregungswellenlänge des Helium-Cadmium-Lasers betrug 325 nm. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare je 2 min lang mit Natronlauge 0,1 M, demineralisiertem Wasser und Puffer gespült. Die Kapillare wurde am Beginn jedes Tages mit Natronlauge 0,1 M für 15 min und mit demineralisiertem Wasser für 10 min konditioniert.

5.2.3.2 Ergebnisse

Auch bei Einsatz der Fluoreszenzdetektion lassen sich die einzelnen Peaks sehr gut erkennen und zuordnen. Die Derivatisierung eines Triphosphats, in diesem Fall ATP, gelang ebenfalls. Wie im Kapitel 5.2.2.2 beschrieben, läuft die Derivatisierung unter den bisher angewandten Bedingungen jedoch nicht quantitativ ab. Es wurden daher verschiedene Optimierungsschritte durchgeführt. Die Lösungen wurden je 3mal vermessen

5.2.4 Optimierungsversuche

Die ursprüngliche Versuchsbeschreibung (vgl. Kapitel 5.2.3.1) wurde jeweils um einen Parameter verändert und optimiert. Die Reaktion wurde bei verschiedenen EDC-Konzentrationen, pH-Werten des Puffers, 1-Methylimidazol-Konzentrationen, Lösungsmittel und Puffermengen durchgeführt.

5.2.4.1 Optimierung der EDC-Konzentration

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Nucleotid-Stammlösungen:	je 30 μ l
EDC-Lösung (in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,1 M, pH 8,5):	30 μ l
1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 8,5):	600 μ l
Dansylaminoethylamin-Lösung (50 mM in DMSO):	120 μ l

Tabelle 5.2: Verschiedene EDC-Konzentrationen und zugehörige Peakflächen

EDC-Konzentration [M]	Peakfläche AMP	Peakfläche GMP	Peakfläche ATP
0,1	3347066 \pm 344	4205287 \pm 266	11315765 \pm 234
0,20	6489517 \pm 256	8171507 \pm 242	17549464 \pm 645
0,50	12355047 \pm 3287	14452062 \pm 172	20161456 \pm 786
0,75	11318844 \pm 352	11303595 \pm 892	16257618 \pm 234
1,00	12493458 \pm 238	10470005 \pm 1028	14829783 \pm 657
1,50	12302913 \pm 576	12717076 \pm 261	14320357 \pm 978
1,75	11610870 \pm 1969	10284837 \pm 352	13334174 \pm 674
2,00	12433160 \pm 1922	11112069 \pm 382	13781433 \pm 578

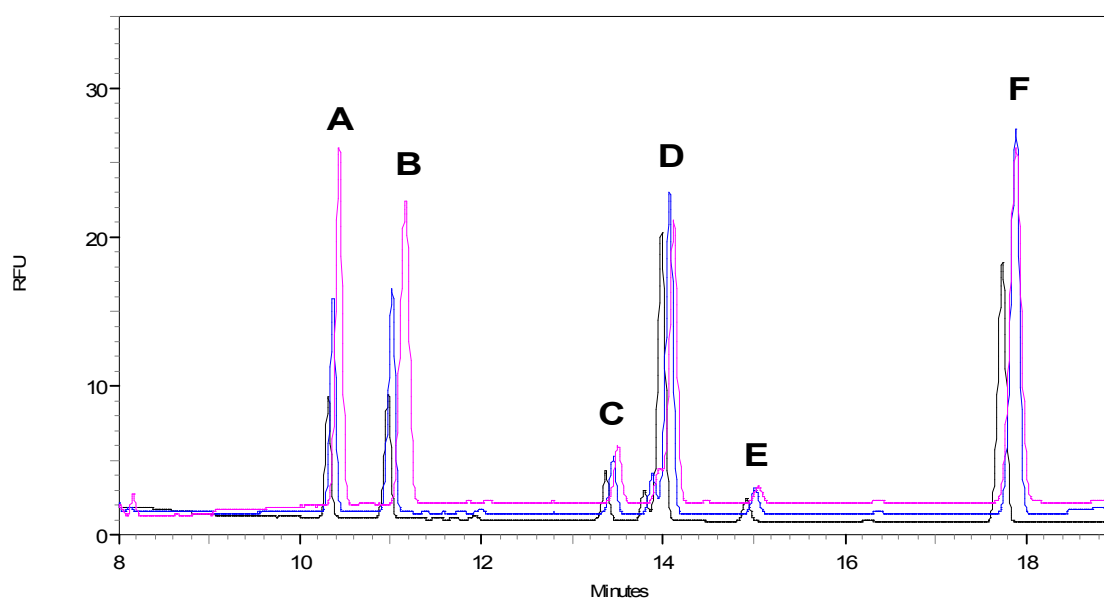


Abbildung 5.10: Überlagerung dreier Elektropherogramme: Die einzelnen Derivatisierungsreaktionen wurden mit unterschiedlichen EDC-Konzentrationen durchgeführt. RFU = Relative Fluorescence Units, A = Dansyl-AMP, B = Dansyl-GMP, C = nicht identifiziertes Nebenprodukt, D = Dansylsulfonsäure, E = nicht identifiziertes Nebenprodukt, F = Dansyl-ATP, Schwarz: c (EDC) = 0,1 M; Blau: c (EDC) = 0,2 M; Pink: c (EDC) = 0,5 M

Bei einer Konzentration der EDC-Lösung von 0,5 M war die Umsetzung am besten. Die optimierte EDC-Konzentration wurde für die folgenden Optimierungsversuche beibehalten.

5.2.4.2 Optimierung des pH-Wertes des 1-Methylimidazol-Puffers

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Nucleotid-Stammlösungen:	je 30 µl
EDC-Lösung (0,5 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,1 M):	30 µl
1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M):	600 µl
Dansylaminoethylamin-Lösung (50 mM in DMSO):	120 µl

Tabelle 5.3: Verschiedene pH-Werte und zugehörige Peakflächen

pH-Wert des 1-Methylimidazol-Puffers	Peakfläche AMP	Peakfläche GMP	Peakfläche ATP
6,0	371779 ± 187	410944 ± 344	1132639 ± 127
7,4	6636794 ± 982	8023654 ± 1524	12360849 ± 876
<u>8,0</u>	<u>11331347 ± 1245</u>	<u>13638618 ± 728</u>	<u>17260892 ± 183</u>
8,5	790284 ± 183	8873762 ± 286	14060316 ± 536
9,0	8123189 ± 473	9444985 ± 392	14514038 ± 837

Die beste Umsetzung konnte bei einem pH-Wert, des 1-Methylimidazol-Puffers, von 8,0 erreicht werden. Die weiteren Versuche wurden bei pH 8,0 durchgeführt.

5.2.4.3 Optimierung der Pufferkonzentration

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Nucleotid-Stammlösung:	je 30 µl
EDC-Lösung (0,5 M in 1-Methylimidazol-Puffer, pH 8,0):	30 µl
1-Methylimidazol-Puffer (pH 8,0):	600 µl
Dansylaminoethylamin-Lösung (50 mM in DMSO):	120 µl

Tabelle 5.4: Verschiedene Pufferkonzentrationen und zugehörige Peakflächen

Konzentration [M]	Peakfläche AMP	Peakfläche GMP	Peakfläche ATP
0,05	7377822 ± 286	10627489 ± 1263	13313855 ± 647
0,10	7859591 ± 239	12197582,33 ± 967	12196815 ± 837
0,15	7000236 ± 567	10199959 ± 2314	12414119 ± 673
0,20	8949986 ± 675	15202681,5 ± 653	15520890 ± 784
<u>0,25</u>	<u>11509844 ± 475</u>	<u>17174961 ± 849</u>	<u>16884162 ± 564</u>
0,30	10542137 ± 485	15638925 ± 475	14852575 ± 374

Bei einer Pufferkonzentration des 1-Methylimidazol-Puffers von 0,25 M konnte die beste Umsetzung erreicht werden. Diese Pufferkonzentration wurde für die weiteren Versuche verwendet.

5.2.4.4 Optimierung des Volumens an Dansylaminoethylamin-Lösung

Das Volumen an 50 mM Dansylaminoethylamin-Lösung im Reaktionsgemisch wurde erhöht, entsprechend wurde das Volumen des 1-Methylimidazol-Puffers verringert.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Nucleotid-Stammlösungen:	je 30 µl
EDC-Lösung (0,5 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,25 M, pH 8,0):	30 µl
1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,0):	250-600 µl
Dansylaminoethylamin-Lösung (50 mM in DMSO):	60-350 µl

Tabelle 5.5: Verschiedene Volumina an Dansylaminoethylamin-Lösung und zugehörige Peakflächen

Volumen Dansylaminoethylamin- Lösung [ml]	Peakfläche AMP	Peakfläche GMP	Peakfläche ATP
60	8959700 ± 564	8778848 ± 594	1354282 ± 485
120	9008571 ± 384	10317743 ± 578	16786365 ± 283
180	9947687 ± 364	16121299 ± 489	17683862 ± 394
240	10971179 ± 463	19146493 ± 904	17070756 ± 457
<u>300</u>	<u>11161046 ± 785</u>	<u>19665766 ± 894</u>	<u>18595548 ± 679</u>
350	10568743 ± 984	19039485 ± 748	17685857 ± 454

Ein Volumen von 300 µl an 50 mM Dansylaminoethylamin-Lösung wurde als optimales Volumen ermittelt.

5.2.4.5 Optimierung des Lösungsmittels

Es wurden drei verschiedene Lösungsmittel für Dansylaminoethylamin ausprobiert. Der Austausch des Lösungsmittels DMSO brachte den Vorteil mit sich, dass die Isolierung der Referenzsubstanz einfacher wurde, da sich DMSO aufgrund des hohen Siedepunkts nur schlecht abziehen lässt.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Nucleotid-Stammlösungen:	je 30 µl
EDC-Lösung (0,5 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,25 M, pH 8,0):	30 µl
1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,0):	420 µl
Dansylaminoethylamin (50 mM in DMSO, Methanol oder DMF)	300 µl

Tabelle 5.6: Verschiedene Lösungsmittel zur Herstellung der Dansylaminoethylamin-Lösung und zugehörige Peakflächen

Lösungsmittel	Peakfläche AMP	Peakfläche GMP	Peakfläche ATP
DMSO	5604982 ± 545	11658742 ± 456	10910666 ± 423
MeOH	7426972 ± 375	13473874 ± 453	7665728 ± 899
<u>DMF</u>	<u>7067708 ± 346</u>	<u>14587639 ± 908</u>	<u>12735632 ± 453</u>

Die beste Umsetzung erhielt man durch die Verwendung von DMF. Für die weiteren Versuche wurde DMF als Lösungsmittel verwendet.

5.2.4.6 Optimierung der Puffermenge

Es wurden verschiedene Puffermengen verwendet, um das optimale Puffervolumen für die Reaktion zu finden. Vor der Messung wurden die einzelnen Proben mit der Menge an Puffer aufgefüllt, die ein Endvolumen der Probe von 1000 µl ergab, ohne die Konzentration der Reaktionspartner zu ändern.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Nucleotid-Stammlösungen:	je 30 µl
EDC-Lösung (0,5 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,25 M, pH 8,0):	30 µl
Dansylaminoethylamin-Lösung (50 mM, in DMF)	300 µl

Tabelle 5.7: Verschiedene Puffervolumina und zugehörige Peakflächen

Puffervolumen in µl	Peakfläche AMP	Peakfläche GMP	Peakfläche ATP
50	2698691 ± 564	6913030 ± 457	991899 ± 896
100	3324336 ± 366	11983762 ± 346	1056474 ± 958
150	5539907 ± 467	12738035,33 ± 568	1098763 ± 756
210	6233213 ± 357	14150498 ± 235	1292738 ± 879
250	5784736 ± 457	13456733 ± 455	1193763 ± 235
300	5619882 ± 346	12683662,33 ± 675	1284738 ± 346
350	2698691 ± 457	6913030 ± 567	1084738 ± 655
420	5578332 ± 678	11221222,33 ± 767	12147338 ± 456

Bei einem Puffervolumen von 210 µl konnte die beste Umsetzung festgestellt werden.

5.2.5 Die entwickelte Derivatisierungsmethode

Aufgrund der oben aufgeführten Optimierungsversuche wurde die folgende Derivatisierungsreaktion verwendet.

Je 10 µl der Nucleotid-Lösungen wurden in ein lichtundurchlässiges Eppendorff-Cap gegeben und mit 70 µl 1-Methylimidazol-Puffer (0,25M, pH 8,0) aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden 10 µl EDC-Lösung (0,5 M gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer) und 100 µl Verbindung **1** (50 mM gelöst in DMF) gegeben. Das Eppendorff-Cap wurde verschlossen und auf dem Eppendorff-Thermomixer für 18 h bei 27°C zur Reaktion gebracht.

5.2.6 Validierung der Derivatisierung mit Dansylaminoethylamin

Die in Kapitel 5.2.5 beschriebene Derivatisierungsmethode wurde für die Validierung angewandt. Die einzelnen Proben wurden bis zur Messung im Gefrierschrank aufbewahrt. Vor der Validierung wurde die Umsetzungsrate bestimmt, um zu sehen ob die Methode auch für quantitative Bestimmungen geeignet ist.

Die für die Validierung verwendeten CE-Bedingungen waren dieselben wie bereits in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben.

5.2.6.1 Bestimmung der Umsetzungsrate

Zur Bestimmung der Umsetzungsrate wurde Dansyl-AMP (**2**) synthetisiert und anschließend bei verschiedenen Konzentrationen vermessen. In gleicher Weise wurde mit der Testlösung verfahren. Die Peakflächen der einzelnen Konzentrationen aus Testlösung und Kalibrierlösung wurden gegeneinander aufgetragen; aus der Steigung ergibt sich die Umsetzungsrate.

5.2.6.1.1 Synthese von Dansyl-AMP (**2**)

AMP (0,32 mmol) wurde eingewogen, in 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 8,0) gelöst und mit einem fünffachen Überschuss an EDC, gelöst in 2 ml 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 8,0), versetzt. Nach 1 min wurde ein 8facher Überschuss an Dansylaminoethylamin (**1**), gelöst in 5 ml DMF, zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 h im Dunkeln gerührt. Wasser und DMF wurden anschließend im Vakuum entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde per HPLC auf einer semipräparativen RP-18-Säule aufgereinigt. Anschließend wurden die Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung entfernt. Dansyl-AMP (**2**) wurde als Ammoniumsalz erhalten, (M = 639 g/mol). NMR- und LC/MS-Analysen wurden angefertigt (siehe Experimenteller Teil). In der Literatur ist die Synthese von Verbindung **2** zwar beschrieben, allerdings sind keine NMR-Daten angegeben.^{57-59,65}

5.2.6.1.2 Herstellung der Probelösungen

Lösungen verschiedener AMP-Konzentrationen wurden hergestellt und mit der in Kapitel 5.2.5 beschriebenen Methode derivatisiert. Jede Lösung wurde dreimal vermessen. Vergleichslösungen mit Dansyl-AMP (**2**) als Referenzsubstanz derselben Konzentration wurden ebenfalls dreimal vermessen. Um die Lösungen vergleichen zu können, wurde darauf geachtet, dass die Referenzlösungen dieselbe Ionenstärke besitzen. Dies wurde dadurch erreicht, dass genau dieselbe Zusammensetzung des Lösungsmittels verwendet wurde.

5.2.6.1.3 Ergebnisse

Folgende Peakflächen der Referenz- und der Testlösung wurden ermittelt.

Tabelle 5.8: Peakflächen der Referenzlösungen

c (AMP) [mM]	Peakfläche 1. Messung	Peakfläche 2. Messung	Peakfläche 3. Messung	Mittelwert
0,1	1000312	1003134	984842	996096 ± 9847,86
0,075	717525	695481	718819	709275 ± 12022,33
0,05	495863	519023	517936	510940,67 ± 13068,95
0,025	262101	258556	257479	259378,67 ± 2418,33

Tabelle 5.9: Peakflächen der Testlösungen

c (AMP) [mM]	Peakfläche 1. Messung	Peakfläche 2. Messung	Peakfläche 3. Messung	Mittelwert
0,1	922107	895190	896717	904671,3 ± 15119,02
0,075	679569	702881	691876	691442 ± 11662,06
0,05	486864	478521	489463	489463 ± 5716,76
0,025	240239	246085	238529	238529 ± 3962,17

Die Peakflächen der Referenz und der Testlösung jeder Konzentration wurden gegeneinander aufgetragen. Aus der dadurch erhaltenen Geraden wurde die Umsetzungsrate bestimmt.

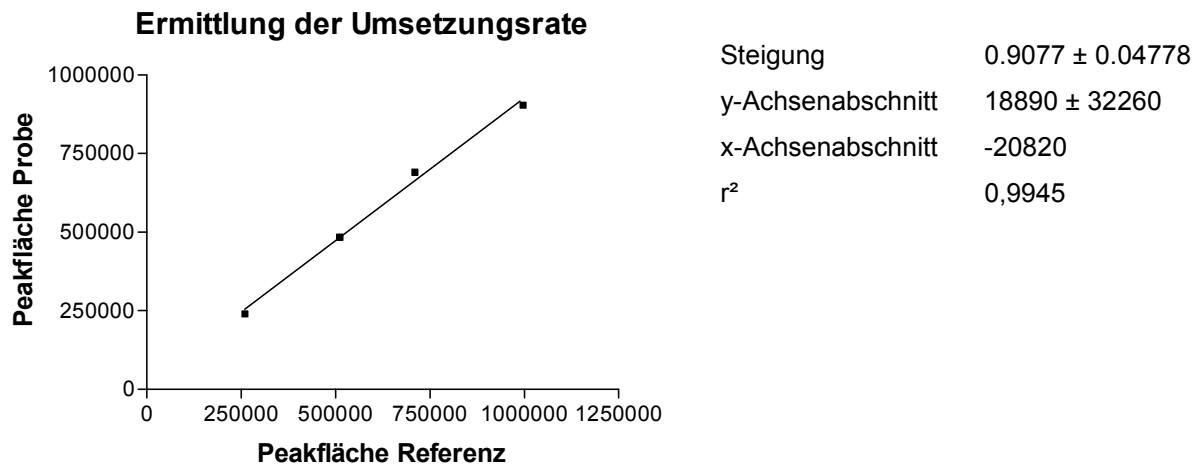


Abbildung 5.11: Lineare Darstellung der Umsetzungsrate

Die Gerade hat eine Steigung von 0.91 ± 0.05 . Dies bedeutet, dass die Umsetzung bei 91% liegt. Die Methode eignet sich somit sehr gut für die quantitative Bestimmung von Nucleotiden.

5.2.6.2 Probenvorbereitung für die Validierung

Das Nucleotid AMP wurde in 10 mM Konzentration in demineralisiertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde dann 1:100 mit demineralisiertem Wasser verdünnt ($c(\text{AMP}) = 100 \mu\text{M}$). Für die Analyt-Lösungen erfolgten weitere Verdünnungsschritte. Die Konzentrationen für die Derivatisierung und die anschließende Validierung betragen 25,0; 10,0; 7,5; 5,0 und 2,5 μM . Eine Blindprobe (ohne Nucleotid) wurde ebenfalls vermessen. Die Derivatisierung fand mit der in Kapitel 5.2.5 beschriebenen Methode statt. Bei der Validierung wurden die Linearität, die Präzision und die Robustheit der Methode überprüft, sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt.⁷¹

5.2.6.3 Nachweis und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Analyt-Konzentration, die noch klar detektiert werden kann, das Signal-Rauschverhältnis muss größer als drei sein.⁷²

Die Bestimmungsgrenze ist die Analyt-Konzentration, die mit einer ausreichenden Präzision bestimmt werden kann. Das Signal-Rauschverhältnis muss größer als 10 sein.⁷²

5.2.6.4 Linearität und Wiederfindung

Um die Linearität und die Wiederfindungsrate zu bestimmen wurden die in Kapitel 5.2.6.2 hergestellten AMP-Lösungen derivatisiert und je 3mal vermessen. Eine Blindprobe ohne AMP wurde ebenfalls vermessen. Mittels des Statistikprogramms „Prism“ wurde eine Kalibriergerade angefertigt. Durch lineare Regression erhält man die Linearitätsgleichung. Es wurde Linearität nachgewiesen.

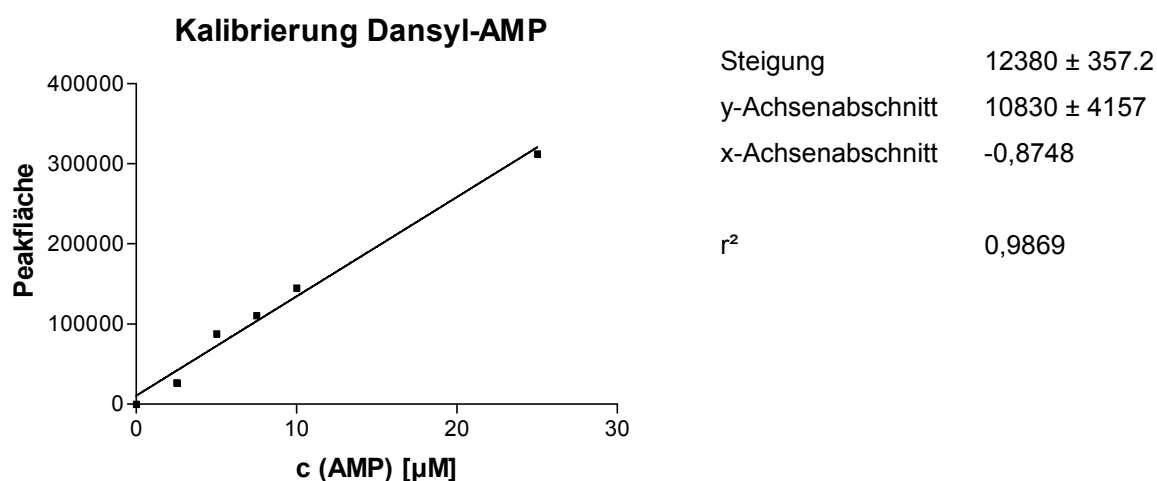


Abbildung 5.12: Kalibriergerade von Verbindung 2

Die gefundenen Konzentrationen wurden aus der erstellten linearen Regressionsgerade berechnet und als Funktion der ursprünglichen Konzentration in ein Diagramm eingetragen. Durch Bildung der linearen Regression konnte man die Gleichung für die Wiederfindung erhalten. Die Gleichung der Wiederfindungsgerade war:

$$y = 0,9843x + 2184 \quad (R^2 = 0,9863)$$

Um die Prüfung auf Linearität zu optimieren und bessere Werte für die Wiederfindung zu erhalten, könnte man einen internen Standard zusetzen. Da die Methode jedoch nur als Vorversuch diente, wurde darauf verzichtet.

5.2.6.5 Präzision der Migrationszeit und der Peakfläche

Für die Bestimmung der Präzision der Migrationszeit wurde eine Probelösung mit einer eingesetzten AMP-Konzentration von 25 μM derivatisiert und über zwei Tage insgesamt 30mal vermessen. Die Standardabweichung und die relative Standardabweichung wurden berechnet. Es gab nur einen geringen Unterschied der Migrationszeiten wie in Tabelle 5.10 zu sehen ist. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 1,68 und 1,79% was für die Quarzkapillare ein typischer Wert ist, da die Migrationszeiten bedingt durch den elektroosmotischen Fluss immer leichte Unterschiede zeigen. Die Präzision der Peakfläche wurde ermittelt, indem eine Probelösung mit einer eingesetzten AMP-Konzentration von 7,5 μM 3mal injiziert wurde. Die Standardabweichung der Peakflächen ist in Tabelle 5.10 angegeben.

5.2.6.6 Robustheit der Methode

Um die Robustheit der Methode zu ermitteln wurde die Stabilität von Dansyl-AMP bei -20°C untersucht. Zwei verschiedene Konzentrationen an AMP-Lösng (1 mM und 0,1 mM) wurden derivatisiert und an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils dreimal vermessen. Wenn die Probe nicht für die Messung gebraucht wurde, wurde sie sofort wieder ins Gefrierfach gestellt. Als interner Standard diente GMP welches an den zwei Tagen jeweils frisch zugegeben wurde. Die Peakflächen wurden gegen die Zeit aufgetragen.

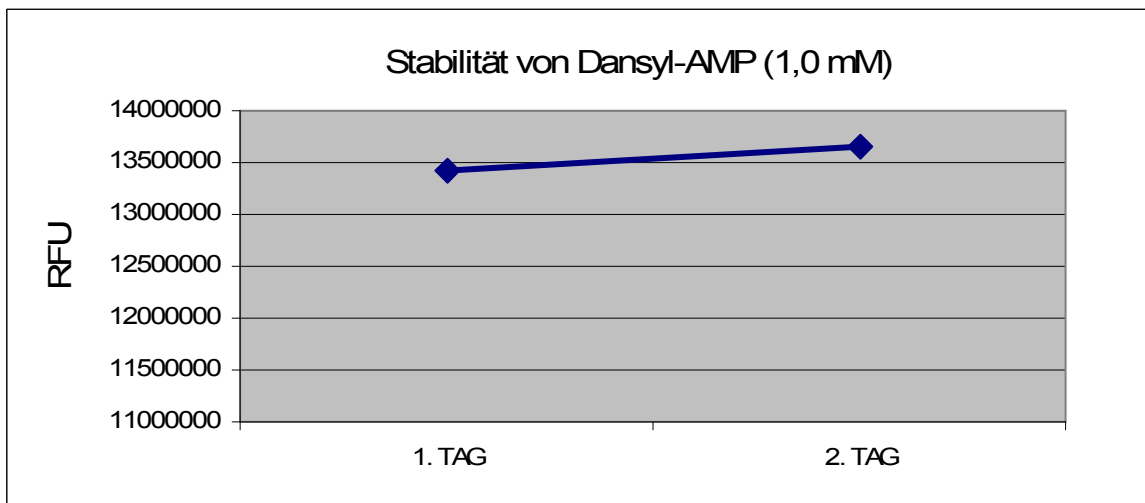
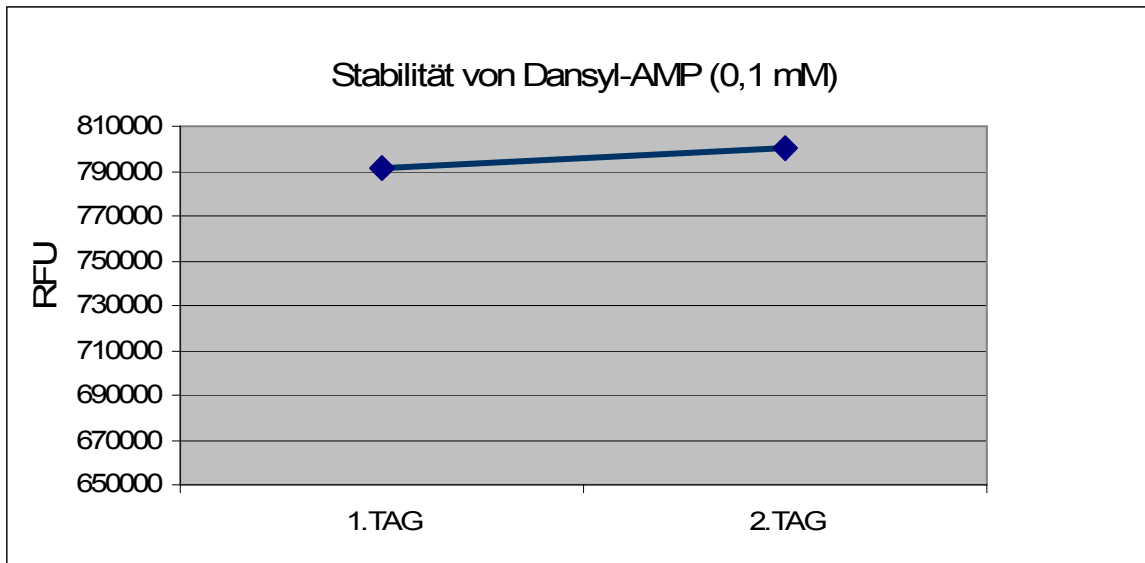


Abbildung 5.13: Stabilitätsuntersuchung von Dansyl-AMP, oben: $c(\text{AMP}) = 0,1 \text{ mM}$, unten: $c(\text{AMP}) = 1,0 \text{ mM}$

Wie aus den beiden Diagrammen hervorgeht, bleiben die Verbindungen bei dieser Art der Lagerung stabil. Man kann keinerlei Zersetzung erkennen. Die Mittelwerte am zweiten Tag sind geringfügig höher. Jedoch liegen diese Schwankungen nur in einem Bereich von höchstens 2%, was mit den natürlichen Schwankungen des CE-Gerätes zusammenhängen kann. Da alle Proben nur zur Messung aus dem Gefrierfach genommen wurden, ist davon auszugehen, dass sich die Proben nicht verändert haben und die Konzentration an Dansyl-AMP (**2**) in der jeweiligen Probe konstant geblieben ist.

5.2.6.7 Validierungsdaten von Dansyl-AMP

Die vollständigen Validierungsdaten der Umsetzung von AMP mit Verbindung **1** sind in Tabelle 5.10 zusammengefasst.

Tab.5.10: Validierungsdaten von AMP, umgesetzt mit Verbindung **1**

	<u>Dansyl-AMP</u>
^a Nachweisgrenze [μM] \pm STABWN [μM]	0,88
^b Bestimmungsgrenze [μM] \pm STABWN [μM]	2,5
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 18)	11,32
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,19
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	1,68
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 12)	11,81
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,21
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	1,79
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2-Tages-Vergleich (n = 30)	11,31
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,19
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	1,70
Wiederfindungsrate [%]	98,43 \pm 5,800
R ² der Wiederfindungsrate	0,9863
Mittelwert der Peakflächen (c(AMP) = 7,5 μM , n = 3)	134157
^c STABWN der Peakflächen	2045,35
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	1,54

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmals so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

5.2.7 Diskussion

Durch die Derivatisierung von Nucleotiden mit Dansylaminoethylamin konnte eine reproduzierbare Methode entwickelt werden, Nucleotide mittels Laser-induzierter Fluoreszenz zu detektieren. Allerdings sind Detektions- und Bestimmungsgrenzen höher als bei der herkömmlichen UV-Absorptions-Detektion, bei welcher die Nachweisgrenzen für Nucleotide zwischen 0,16 und 0,28 μM und die Bestimmungsgrenzen zwischen 0,23 und 0,42 μM liegen.⁷¹ Dies liegt zum einen

daran, dass Dansylderivate keine hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzen und dass die Derivatisierungslösungen sehr großvolumig sind. Außerdem haben die gewählten CE-Bedingungen den Nachteil, dass das Derivatisierungsreagenz vor dem Produkt migriert, was zu einer zusätzlichen Erhöhung des Signal-Rauschverhältnisses führt. Dies wiederum stört die Empfindlichkeit der Methode erheblich. Des Weiteren ist der He-Cd-Laser bereits etwas älter und läuft nicht mehr sonderlich stabil. Für die weiteren Versuche wurde aus den oben genannten Gründen ein neuer Fluorophor mit einer besseren Fluoreszenzquantenausbeute gesucht und mit einem Argon-Ionen-Laser gearbeitet. Des Weiteren wurde versucht, die Trennmethode zu verbessern.

5.3 Verknüpfung von Nucleotiden mit einem Fluorescein-Derivat

Fluorescein-Derivate sind die am häufigsten verwendeten Fluorophore in der Proteinanalytik. Die Vorteile des Fluoresceins bestehen darin, dass Fluorescein eine sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzt und in Wasser sehr gut löslich ist. Fluorescein besitzt ein Anregungsmaximum bei 494 nm, was sehr nah bei der emittierten Wellenlänge des Argonlasers von 488 nm liegt. Zusätzlich handelt es sich bei dem Natriumsalz des Fluoresceins um eine wasserlösliche und sehr kostengünstige Chemikalie.

5.3.1 Synthese eines Fluorescein-Derivatisierungsreagenzes durch Amidkupplung

Um ein geeignetes Derivatisierungsreagenz für die Phosphoramid-Verknüpfung zu erhalten, muss in den Fluorophor eine Aminofunktion eingeführt werden. Fluorescein besitzt eine Carboxylgruppe welche aktiviert und mit Ethylendiamin umgesetzt werden kann. Die Überführung von Carbonsäuren zu Amiden ist eine Standard-Reaktion in der organischen Chemie. Es steht eine Vielzahl an Kupplungsreagenzien zur Verfügung. Die wohl häufigste Methode ist die Überführung der Carbonsäure in ein Säurechlorid. Hierfür werden meist Thionylchlorid oder Oxalylchlorid verwendet. Ein großer Nachteil dieser Chlorierungsreagenzien ist die Entstehung von HCl. Dadurch kommt die Methode für säurelabile Reaktanden, wie zum Beispiel *Boc*-geschützte Aminosäuren, nicht in Frage.⁷³ Es wurde daher nach einer schonenden Variante der Amidverknüpfung gesucht, die auch bei aromatischen Carbonsäuren eingesetzt werden kann. Aufgrund der sterischen Hinderung der Carbonsäurefunktion des Fluoresceins ist die Reaktivität herabgesetzt. Die Anwendung der Carbodiimide N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl (EDC) bzw. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und auch der Einsatz von Carbonyldiimidazol als Kupplungsreagenzien führte nicht zu dem gewünschten Produkt.⁷⁴

Erst die Kupplung mit Isobutylchloroformiat unter Bildung eines gemischten Anhydrids⁷⁵ und die weitere Reaktion mit Ethylendiamin führten zum gewünschten Produkt, welches jedoch nicht mehr fluoreszierte, was auf eine intramolekulare Spirolactambildung zurückzuführen ist.⁷⁶

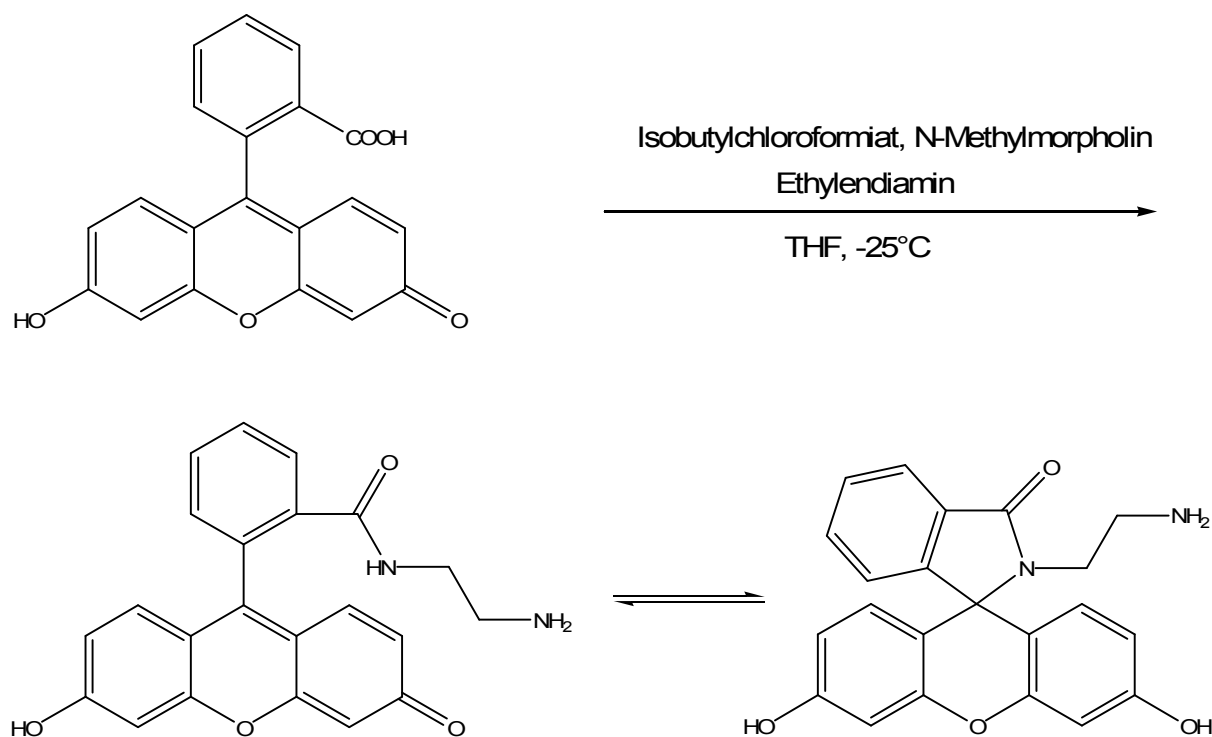


Abbildung 5.14: Umsetzung von Fluorescein mit Ethylendiamin und Bildung eines Spirolactams⁷⁶

Die Synthesestrategie wurde daher von uns geändert. Das Problem der Ausbildung einer Spiroverbindung kann durch die Verwendung eines sekundärenamins umgangen werden. Es entsteht ein tertiäres Amid. Durch die Umsetzung von Fluorescein mit Piperazin kann keine Spiroverbindung mehr gebildet werden. Jedoch hat man als reaktive Gruppe ein sekundäres Amin, und es muss daher ein Linker eingesetzt werden. Der Linker muss eine bifunktionelle Struktur aufweisen: eine Carboxylfunktion zur Amidverknüpfung mit dem sekundären Amin und eine Aminogruppe zur Kupplung an die Nucleotide. Die Wahl fiel hierbei auf β -Alanin. Zweckmäßig für die Synthesestrategie wurde dieses in einer an der Aminofunktion mit der tert-Butyloxycarbonylschutzgruppe (*Boc*-Schutzgruppe) versehenen Form erworben. Die weitere Reaktion der zweiten Amino-Funktion des Piperazins mit *Boc*-geschütztem β -Alanin und die Abspaltung der *Boc*-Schutzgruppe liefert das primäre Amin, welches für die Derivatisierung mit Nucleotiden benötigt wird. Dieser Weg scheiterte jedoch daran, dass Piperazin mit Isobutylchloroformiat unter Bildung eines gemischten Anhydrids nicht reagierte, da Piperazin nur schlecht in Tetrahydrofuran löslich ist. Auch die Verwendung von DMF oder 1,4-Dioxan als Lösungsmittel führte nicht zum gewünschten Produkt. Mittels Dünnschichtchromatographie war zwar eine geringe Umsetzung festzustellen, das Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden. Außerdem war bei dieser Synthesestrategie die Gefahr der Dimer-Bildung gegeben.

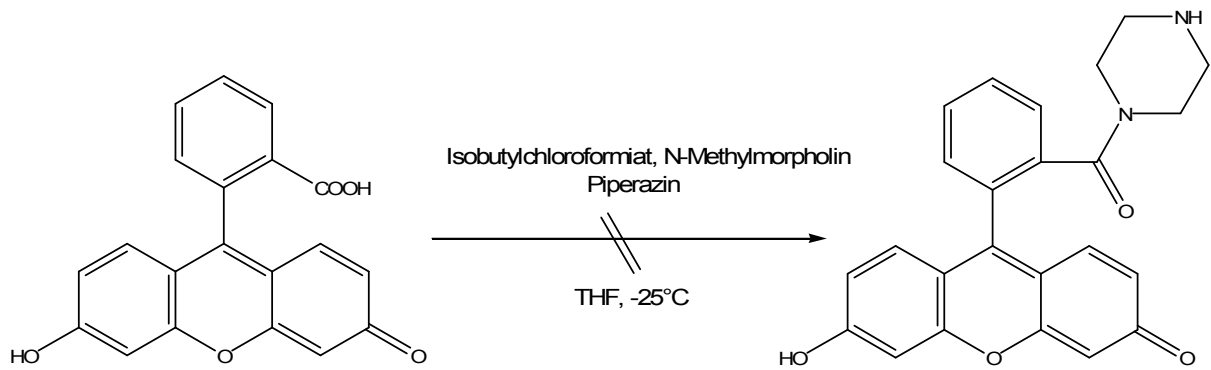


Abbildung 5.15: gescheiterte Umsetzung von Fluorescein mit Piperazin

Aufgrund der schlechten Löslichkeit wurde die Synthesestrategie geändert. Es wurde 1-Z-geschütztes Piperazin eingesetzt, welches kommerziell zu erwerben ist. Die Verwendung von 1-Z-geschütztem Piperazin hat zwei Vorteile, zum einen liegt es als Flüssigkeit vor und zum anderen kann es nicht zu einer Dimer-Bildung kommen. Das 1-Z-geschützte Piperazin wurde zuerst mit der *Boc*-geschützten Aminosäure zur Reaktion gebracht; die Reaktion lief unter Verwendung der gemischten Anhydrid-Methode mit einer Ausbeute von 80% ab.

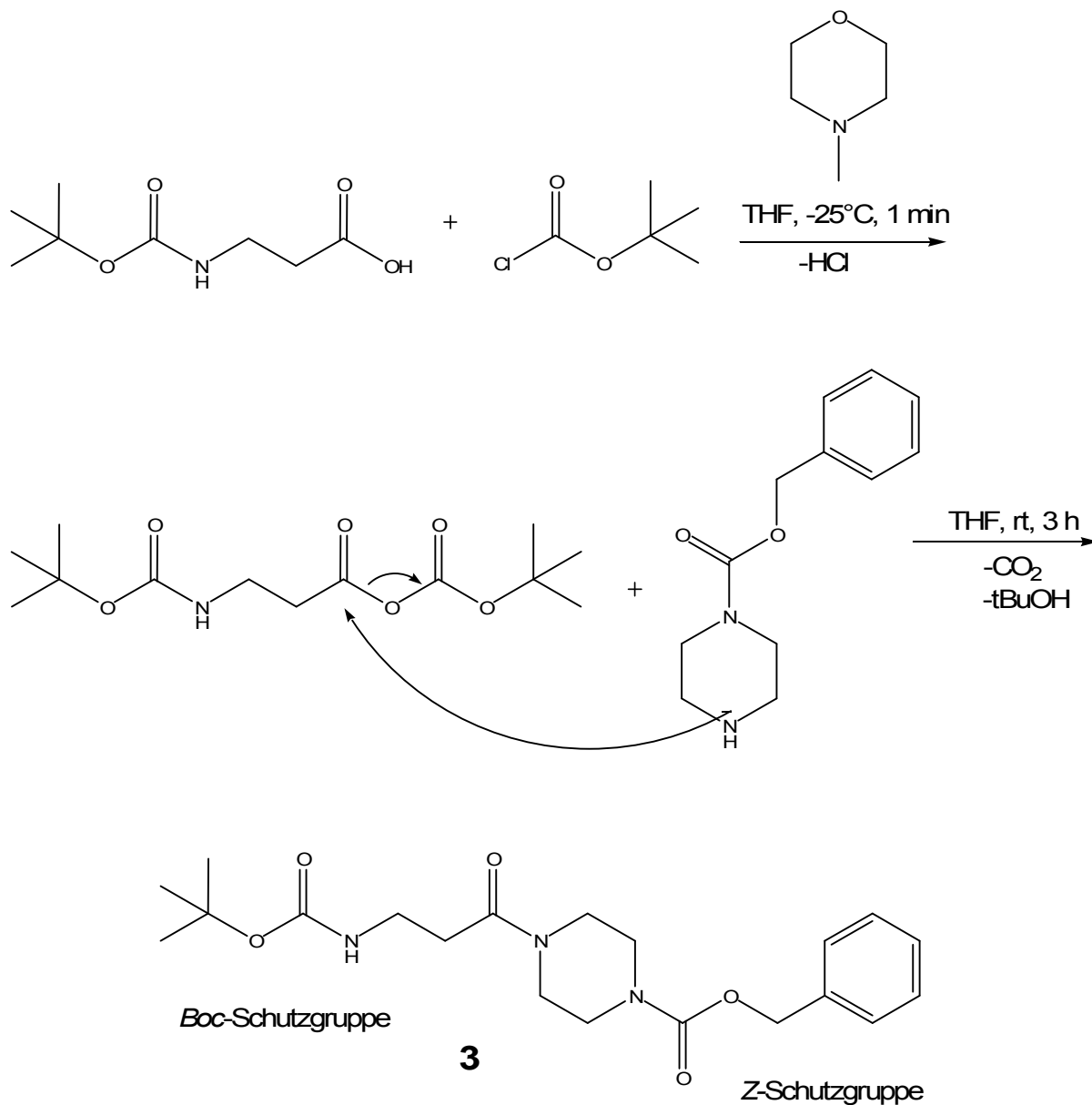


Abbildung 5.16: Umsetzung von *Boc*-geschütztem β-Alanin mit 1-*Z*-geschütztem Piperazin zu Verbindung **3**

Im zweiten Schritt wurde die *Z*-Schutzgruppe durch Wasserstoff-Gas abgespalten und man erhielt das freie Amin **4**. Zur Katalyse diente Palladium auf Aktivkohle. Die Umsetzung verlief nahezu quantitativ (Abbildung 5.17).

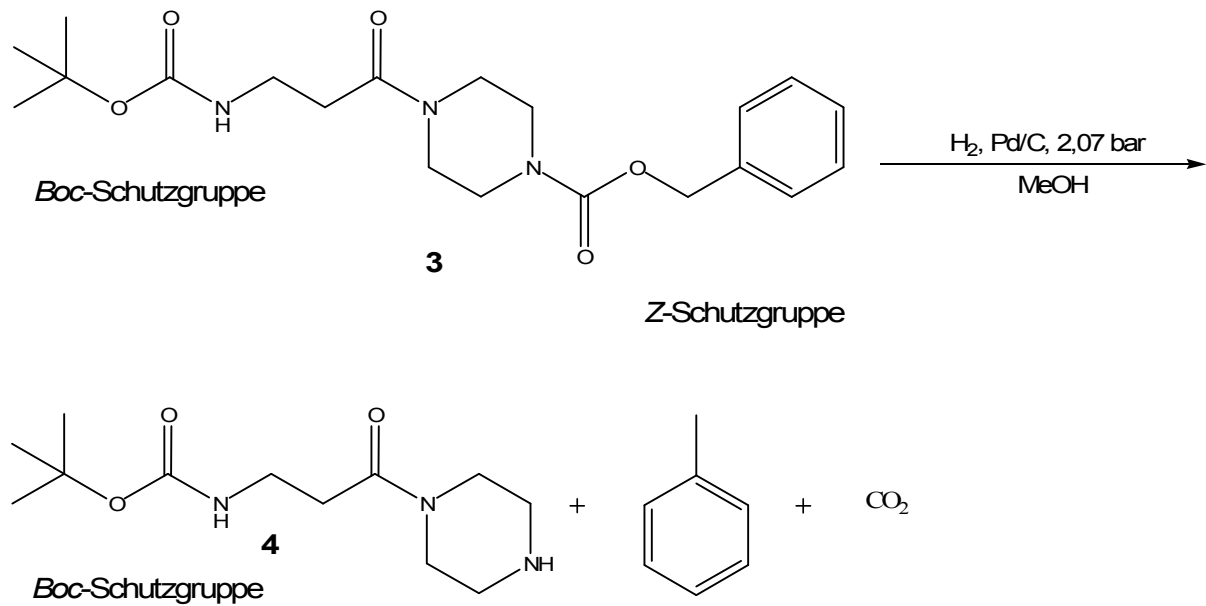
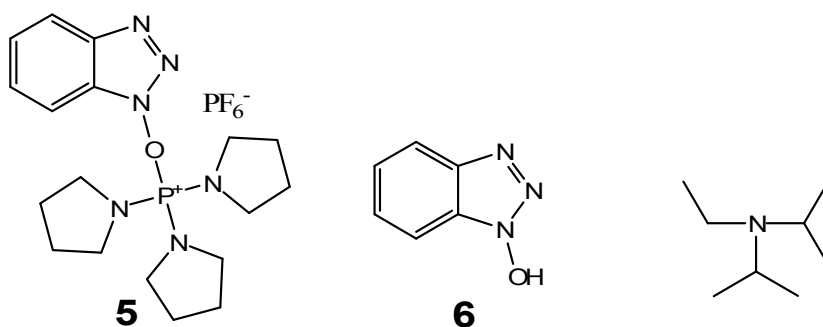
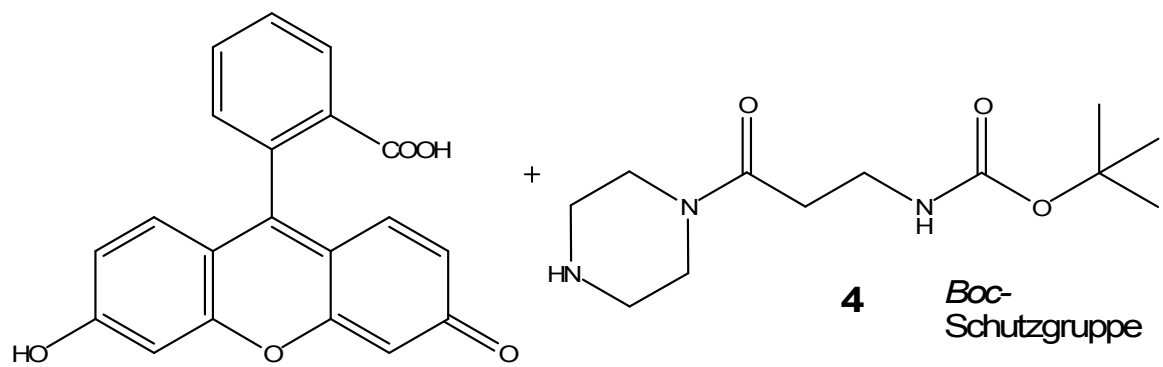


Abbildung 5.17: Abspaltung der Z-Schutzgruppe

Das entstandene Produkt **4** wurde in einem dritten Schritt an die Carbonsäuregruppe des Fluoresceins gekuppelt. Die Umsetzung mit Isobutylchloroformiat lief nur mit sehr geringer Ausbeute ab. Daher wurde nach einer effektiveren Methode Ausschau gehalten. Uri et al. konnten erfolgreich 2',3'-Isopropylidenadenosin-4'-carbonsäure mit dem N-Terminus von an Wang-Harz gebundenen kleinen Peptiden unter Verwendung des Kupplungsreagenzes 1-Benzotriazolylxytripyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP, **5**), des Acylierungskatalysators Hydroxybenzotriazol (HOBt, **6**) und der Hilfsbase Diisopropylethylamin umsetzen.⁷⁷ Die Strukturformeln von PyBOP und HOBt sind in Abbildung 5.18 aufgeführt. An diese Arbeit angelehnt wurde das entstandene Produkt an die Carbonsäurefunktion des Fluoresceins gekuppelt.



DMF, RT

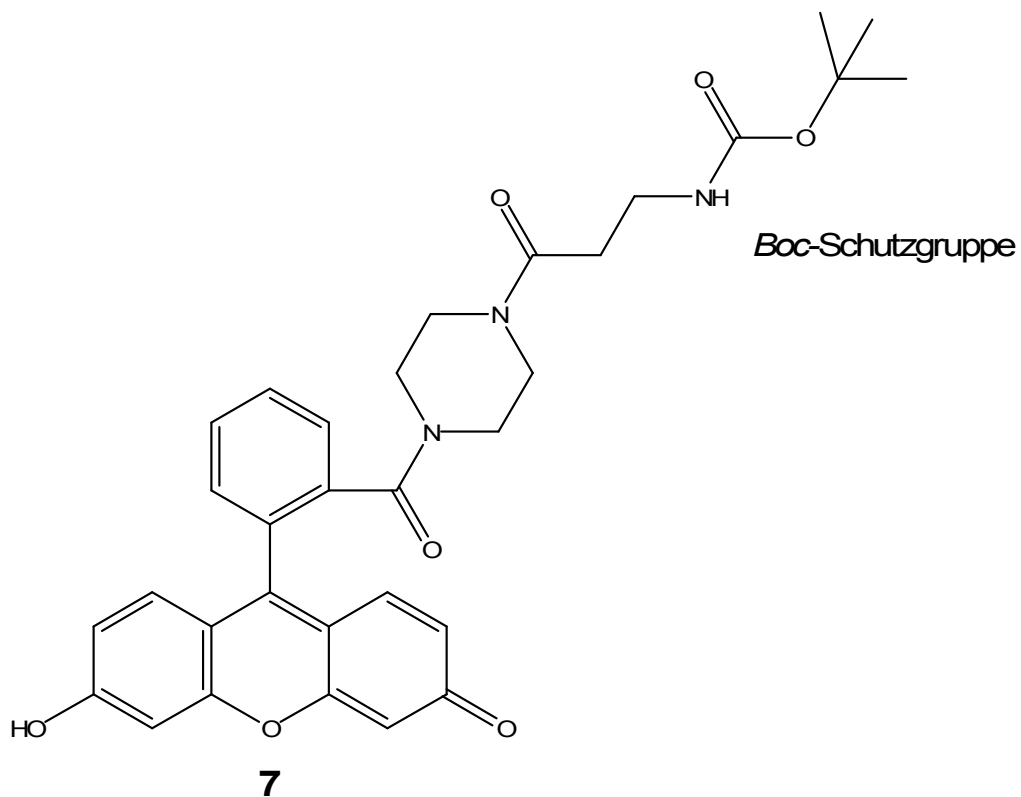


Abbildung 5.18: Umsetzung von Fluorescein mit **4**

In einem letzten Schritt wurde die *Boc*-Schutzgruppe von **7** in 1,4-Dioxan mit HCl abgespalten. Das erhaltene Produkt **8** wurde als Fluorophor eingesetzt.

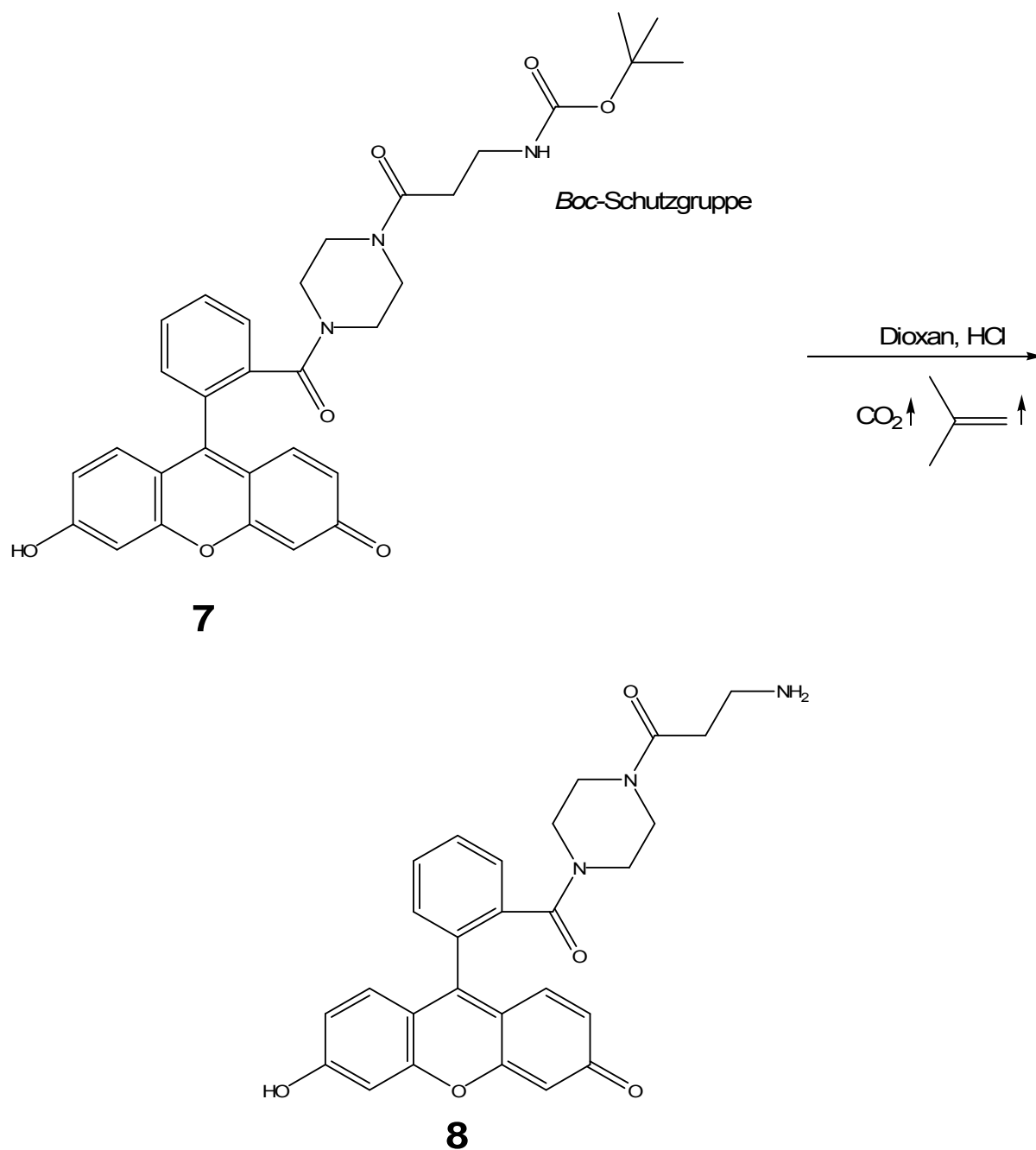


Abbildung 5.19: Abspaltung der *Boc*-Schutzgruppe

Durch diesen Syntheseweg konnte der gewünschte neue Fluorophor **8** in 13%iger Ausbeute erhalten werden.

5.3.2 Reinheitsprüfung mittels Kapillarelektrophorese

Die neu synthetisierte Verbindung **8** wurde mittels Kapillarelektrophorese vermessen (Methode H, siehe Experimentieller Teil).

Das Elektropherogramm (Abbildung 5.20) zeigt einen Peak bei 8,01 min. Trotz der sehr hohen eingesetzten Konzentration von 1 μM sind keine weiteren Peaks zu detektieren, dies stimmt mit den LC/MS-Daten überein (siehe experimenteller Teil).

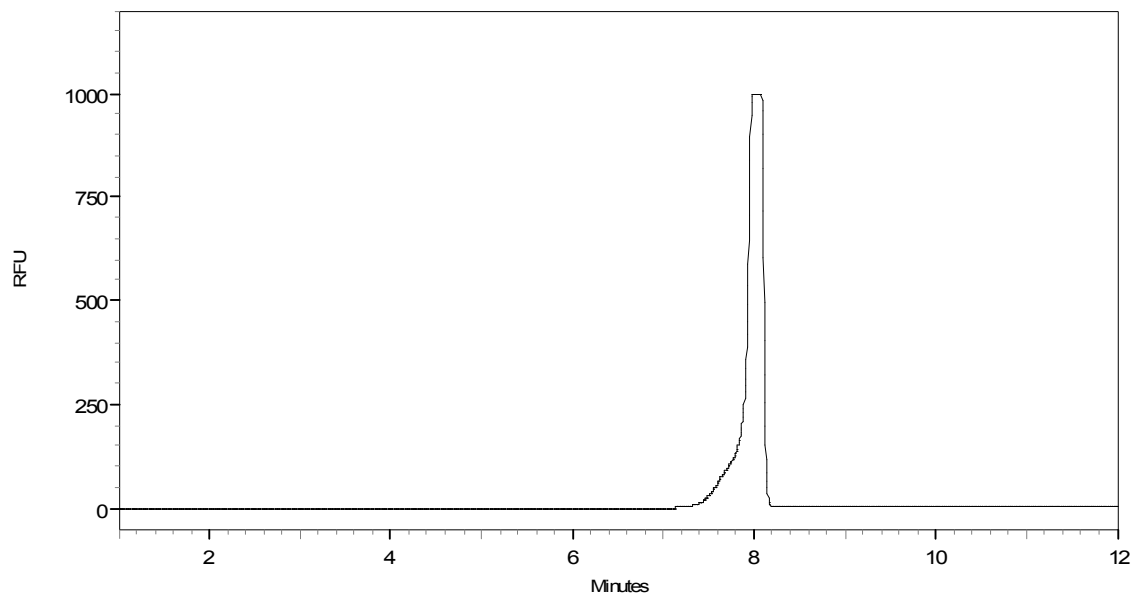


Abbildung 5.20: Elektropherogramm von **8**, RFU = Relative Fluorescence Units

5.3.3 Kupplungsversuche mit dem Fluorescein-Fluorophor **8**

Für die ersten Versuche wurden eine 0,5 mM- und eine 1 mM-AMP-Lösung hergestellt. Die Lösungen wurden mit der in Kapitel 5.2.5 beschriebenen Methode umgesetzt. Aufgrund der hohen Fluoreszenzquantenausbeute von **8** mussten die Lösungen vor dem Vermessen 1:10 verdünnt werden.

5.3.3.1 Durchführung

Je 10 μl der 1 mM- oder 0,5 mM-AMP-Lösung wurden in ein lichtundurchlässiges Eppendorff-Cap gegeben und mit 70 μl 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,0) aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden 10 μl EDC-Lösung (0,5 M in 1-Methylimidazol-Puffer) und 100 μl einer Lösung von Verbindung **8** (10 mM in 1-Methylimidazol-Puffer) gegeben. Das Eppendorff-Cap wurde verschlossen und auf dem Eppendorff-Thermomixer für 18 Stunden bei 27°C zur Reaktion gebracht. Die erhaltene Lösung wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und mittels Kapillarelektrophorese vermessen (Methode H, siehe experimenteller Teil).

5.3.3.2 Ergebnisse

Wie sich in den Elektropherogrammen zeigt (Abbildung 5.21), findet eine messbare Umsetzung statt. Bei den Peaks mit einer Migrationszeit von 5-15 min handelt es sich um den Fluorophor und dessen Zersetzungsprodukte. Der Peak mit der Migrationszeit von 36 min ist das derivatisierte AMP. Es ist sehr gut zu erkennen, dass der Peak bei doppelter Konzentration doppelt so groß ist. Aufgrund dessen, dass die Kapillare ausgetauscht wurde und nun Quarzkapillaren von Polymicros anstatt von Beckman-Coulter verwendet wurden, ist die Migrationszeit mit 36 min sehr lang.

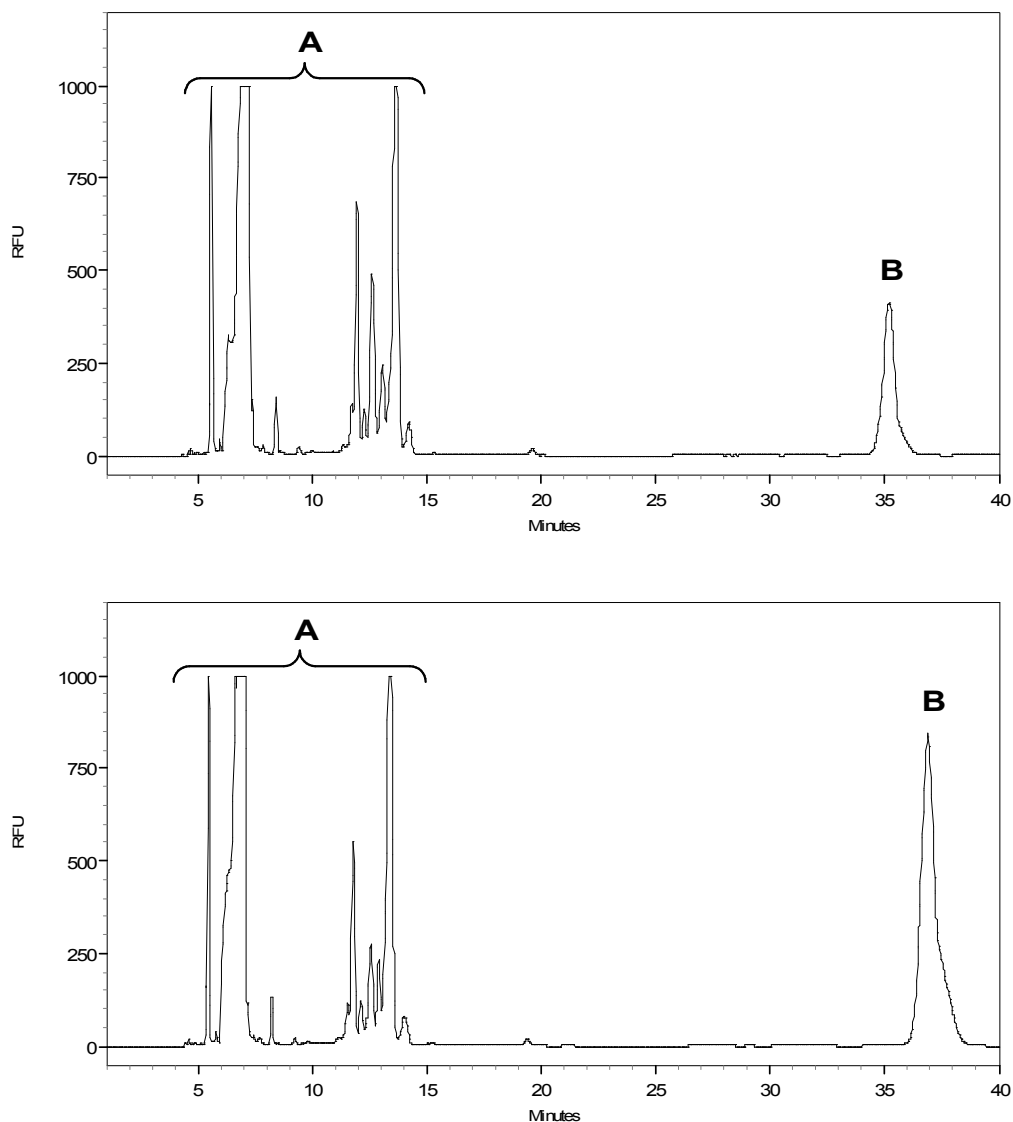


Abbildung 5.21: Elektropherogramme von AMP umgesetzt mit Verbindung **8**, oben $c(\text{AMP}) = 0,05$ mM, unten: $c(\text{AMP}) = 0,1$ mM, RFU = Relative Fluorescence Units, A = Fluorophor **8** und dessen Zersetzungsprodukte, B = AMP umgesetzt mit Verbindung **8**

5.3.4 Optimierung der Derivatisierung

Um die Sensitivität weiter zu erhöhen wurde die Derivatisierung nochmals optimiert. Der Fluorophor **8** ist in Wasser löslich und kann daher im Gegensatz zu Dansylaminoethylamin in 1-Methylimidazol-Puffer gelöst werden. Dadurch kann man die Menge an AMP-Lösung erhöhen, da die Derivatisierungs-Lösung stärker gepuffert ist. AMP wurde weiterhin in Wasser gelöst eingesetzt, da die Vorversuche auf die Derivatisierung von Zellüberständen abzielen, und hierbei die Nucleotide nicht in 1-Methylimidazol-Puffer gelöst vorliegen. Für die Derivatisierung wurde mit einer AMP-Lösungsmenge von 150 μ l begonnen. Wegen der höheren Wassermenge wurde die Konzentration des 1-Methylimidazol-Puffers von 0,25 mM auf 1 M erhöht. Da die Migrationszeit mit 36 min sehr lang war, wurde eine kürzere Kapillare (anstatt 60 cm nur 40 cm absolut) verwendet. Die Migrationszeit für AMP konnte dadurch auf 26 min verkürzt werden. Des Weiteren wurde versucht, die Migrationszeit durch Erhöhung der Stromstärke und durch Erhöhung des pH-Wertes zu verkürzen, jedoch wurde hierdurch die Auftrennung beeinträchtigt.

5.3.4.1 Optimierung der EDC-Konzentration

Es wurden Lösungen mit verschiedenen EDC-Konzentrationen hergestellt. Vor Vermessen der Lösungen wurden diese 1:10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

AMP-Lösung (5 μ M in Wasser):	150 μ l
EDC-Lösung (in 1-Methylimidazol-Puffer, 1,0 M, pH 8,5):	20 μ l
Fluorophor 8 (20 mM) gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer (1,0 M, pH 8,5):	30 μ l

Tabelle 5.11: Verschiedene EDC-Konzentrationen und zugehörige Peakflächen

EDC - Konzentration [M]	Peakfläche 1. Messung	Peakfläche 2. Messung	Peakfläche 3. Messung	Mittelwert
0,5	632287544	633278479	633139868	632901964 \pm 536597
0,75	730372716	729378459	728606131	729452435 \pm 885612
1,0	834858736	837247585	834448326	835518216 \pm 1511670
1,25	794757493	792647384	799394721	795599866 \pm 3451642

EDC - Konzentration [M]	Peakfläche 1. Messung	Peakfläche 2. Messung	Peakfläche 3. Messung	Mittelwert
1,5	855352735	856378960	858977715	856903137 ± 868472
1,75	875354758	873656597	872574339	873861898 ± 1401532
<u>2,0</u>	<u>1057364852</u>	<u>1045759603</u>	<u>1054481164</u>	<u>1052535206 ± 6042393</u>
2,25	1013585731	1039574936	1010175366	1021112011 ± 16080029
2,5	1027365394	1004736485	1006821343	1012974407 ± 12506479
2,75	1037473626	1055476446	1035148905	1042699659 ± 11125906

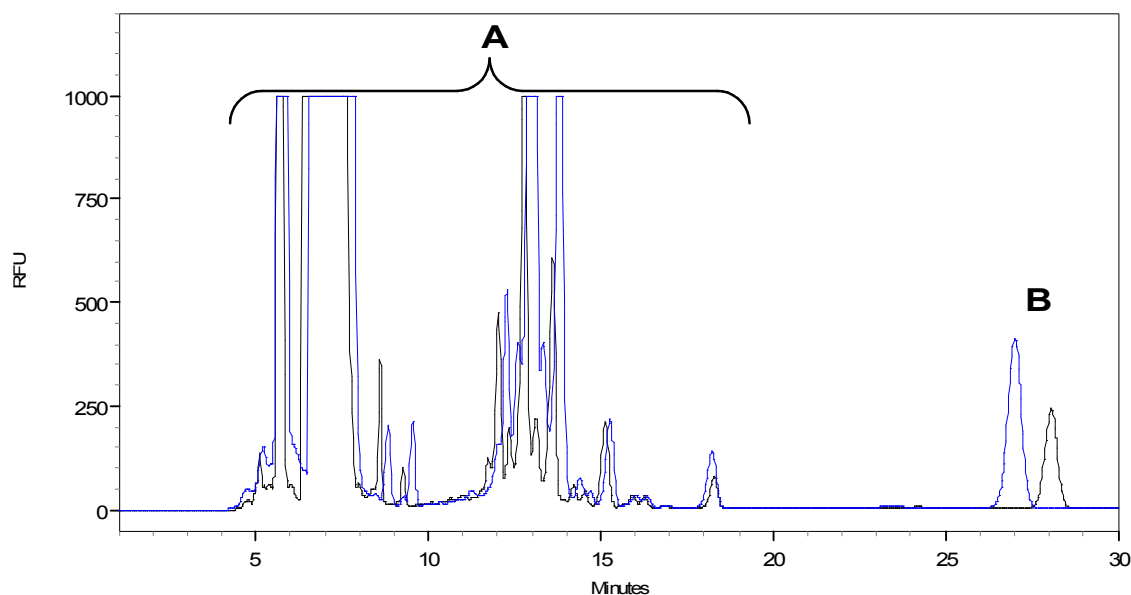


Abbildung 5.22: Vergleich zweier Elektropherogramme: Die beiden Derivatisierungsreaktionen wurden mit unterschiedlichen EDC-Konzentrationen durchgeführt. RFU = Relative Fluorescence Units, A = Fluorophor **8** und dessen Zersetzungsprodukte, B = AMP umgesetzt mit Verbindung **8**, Grün: c (EDC) = 0,5 M; Blau: c (EDC) = 2,0 M

Bei einer EDC-Konzentration von 2 M konnte die beste Umsetzung festgestellt werden, es wurde daher mit dieser Konzentration weitergearbeitet.

5.3.4.2 Wiederholte Zugabe von EDC

Nach 4, 5, 6 und 7 Stunden wurde jeweils erneut 20 µl einer frisch hergestellten EDC-Lösung (1 oder 2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 1,0 M, pH 8,5) zugegeben, um die Umsetzung zu verbessern. Bei der Synthese von Phosphoramiden im

präparativen Maßstab führte dies zu einer entscheidenden Erhöhung der Ausbeute.⁷⁸
Die Lösungen wurden für weitere 6 h gerührt.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

AMP-Lösung (5 µM in Wasser):	150 µl
EDC-Lösung (1 oder 2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 1,0 M, pH 8,5):	20 µl
Fluorophor 8 (20 mM) gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer (pH 8,5, 1,0 M)	30 µl

Vor dem Vermessen der Lösung wurde diese 1:10 verdünnt. Im Gegensatz zu den beschriebenen Synthesen⁷⁸ fand hierbei jedoch keine verbesserte Umsetzung statt.

5.3.4.3 Optimierung des 1-Methylimidazol-Puffer-pH-Wertes

Die Reaktion wurde bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, hierfür wurden 1-Methylimidazol-Puffer hergestellt, welche mit Salzsäure auf die unterschiedlichen pH-Werte eingestellt wurden.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

AMP-Lösung (5 µM in Wasser):	150 µl
EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 1,0 M):	20 µl
Fluorophor 8 (20 mM) gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer (1,0 M)	30 µl

Tabelle 5.12: Verschiedene pH-Werte und zugehörige Peakflächen

pH-Wert	Peakfläche 1.Messung	Peakfläche 2.Messung	Peakfläche 3.Messung	Mittelwert
6,0	-	-	-	-
6,5	-	-	-	-
7,0	145684531	145632823	144738373	145351909 ± 531966
7,5	406728247	407564793	405867758	406720266 ± 848545
8,0	323913058	326458596	327484058	325951904 ± 1838630
8,5	712504285	713846585	714264896	713538589 ± 919828
9,0	619895470	620475869	623736758	621369366 ± 2070658
9,5	691718290	693474939	692747596	692646942 ± 882639
10,0	675734359	673975940	673849450	674519916 ± 1053638

Aus der obigen Tabelle ist sehr gut zu erkennen, dass die Reaktion sehr stark pH-Wert abhängig ist. In schwach saurem Milieu findet keine Umsetzung statt. Dies steht im Gegensatz zu den Literaturangaben, in welchen ein schwach saurer bis neutraler pH-Wert bevorzugt wird.^{57,59,65-68}

5.3.4.4 Optimierung der 1-Methylimidazol-Pufferkonzentration

Für die Reaktion ist die Einstellung des richtigen pH-Wertes sehr wichtig, zusätzlich kommt es auf eine ausreichende Pufferung an. Diese kann mit der Konzentration des 1-Methylimidazol-Puffers beeinflusst werden. Durch Verwendung verschieden konzentrierter Puffer wurde die optimale Konzentration ermittelt.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

AMP-Lösung (5 µM in Wasser)	150 µl
EDC-Lösung (2 M gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer, pH 8,5):	20 µl
Fluorophor 8 20 mM gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer (pH 8,5)	30 µl

Tabelle 5.13: Verschiedene 1-Methylimidazol-Puffer-Konzentrationen und zugehörige Peakflächen

c (1-Methylimidazolpuffer) [M]	Peakfläche 1. Messung	Peakfläche 2. Messung	Peakfläche 3. Messung	Mittelwert
0,25	554639723	546744859	553647586	551677389 ± 4300404
0,5	526032009	527463226	527637847	527044361 ± 881059
<u>0,75</u>	<u>566709761</u>	<u>567585736</u>	<u>563829184</u>	<u>566041560 ± 1965398</u>
1,0	448790104	450277859	462739595	453935853 ± 7660467
1,25	431248247	431748978	436475886	433157704 ± 2884516
1,5	415737879	412637848	415237474	414537734 ± 1664264
1,75	416268098	416374749	412737648	415126832 ± 2069780
2,0	412721937	415253738	415262736	414412804 ± 1464340

Die Konzentration des 1-Methylimidazol-Puffers von 0,75 M führte zu den besten Ergebnissen.

5.3.5 Neue Derivatisierungsmethode

Aufgrund der oben aufgeführten Optimierungsversuche wurde die folgende Derivatisierungsreaktion verwendet: 150 µl der Nucleotid-Lösung wurden in ein lichtundurchlässiges Eppendorff-Cap gegeben und mit 20 µl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5) versetzt. Zu dieser Lösung wurden 30 µl einer Lösung von Fluorophor **8** (20 mM gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer) gegeben. Das Eppendorff-Cap wurde verschlossen und auf dem Eppendorff-Thermomixer für 18 h bei 27°C zur Reaktion gebracht.

Da bei Verwendung einer Quarzkapillare die Zersetzungsprodukte vor dem gewünschten Produkt migrierten, wurde versucht die Trennbedingungen zu optimieren.

5.3.6 Micellare elektrokinetische Chromatographie

In nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob sich die Zersetzungsprodukte des Fluorophors in die Micellen einlagern und somit erst nach dem Produkt migrieren. Die Zugabe von Natriumdodecylsulfat, in einer Konzentration von 100 mM, als pseudostationäre Phase zum Trennpuffer brachte jedoch keine Verbesserung. Die Zersetzungsprodukte des Fluorophors **8** sind zu hydrophil, sie lagern sich nicht in die Micellen ein und migrieren weiterhin vor dem Produkt.

5.3.7 Verwendung einer beschichteten Kapillare

Da die Retentionszeiten bei Verwendung der Quarzkapillare sehr lang sind, und das Derivatisierungsreagenz vor dem gewünschten Produkt migriert, wodurch ein sehr starkes Rauschen entsteht und die Empfindlichkeit erheblich herabsetzt wird, wurde die Quarzkapillare durch eine mit Polyacrylamid beschichtete Kapillare ersetzt. Die nach der Methode von Chiari et al.⁷⁹ beschichtete Kapillare wurde von der Firma CS-Chromatographie bezogen.

Bei einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare ist die Oberfläche nicht mehr geladen sondern neutral. Es existiert daher kein elektroosmotischer Fluss mehr. Die Detektion von Anionen erfolgt nun an der Anode, da die Anionen nicht mehr vom EOF in Richtung Kathode befördert werden. Des Weiteren kommt es zu einer Umkehr der Migrationszeit, das heißt, dass mehrfach geladene kleine Teilchen vor einfach geladenen Teilchen migrieren. Da bei Quarzkapillaren das

Derivatisierungsreagenz und dessen Zersetzungsprodukte vor dem Produkt-Peak migrieren, wurde davon ausgegangen, dass bei neutralen Kapillaren Reagenz **8** und die Zersetzungsprodukte nach dem Produkt-Peak migrieren und die Detektion nicht mehr stören würden. Allerdings wurde festgestellt, dass bei der Reaktion mehrere Verunreinigungen entstehen, so dass auch bei neutralen Kapillaren diverse nicht identifizierte Verunreinigungen vor dem Produkt migrierten.

5.3.7.1 Methodenfindung

Um die geeignete Methode zu finden, wurde zunächst eine Polyacrylamid beschichtete Quarzkapillare (30,2 cm (20 cm effektive Länge) x 50 µm Innendurchmesser) eingesetzt. Zur Trennung wurde eine konstante Stromstärke von 30 µA angelegt. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare mit Wasser und mit Puffer für je 1 min gespült. Die Anregungswellenlänge des Argon-Lasers betrug 488 nm. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen. Als Trennpuffer wurde ein Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) verwendet. Bei dieser Methode kommt es jedoch zu keiner guten Auftrennung. Deshalb wurde zunächst die Stromstärke auf 20 µA erniedrigt, wodurch die Migrationszeit erhöht wurde. Jedoch hatte dies auch nicht den gewünschten Effekt der besseren Auftrennung. Auch die Verwendung höher konzentrierter Trennpuffer, wie 100 mM-Phosphatpuffer (pH 7,0), führten nicht zum Erfolg. Durch Verlängerung der Kapillare auf 40,2 cm konnte schließlich die Trennleistung verbessert werden, jedoch war immer noch ein sehr starkes Signal-Rauschverhältnis aufgrund der Nebenprodukte vorhanden, was den limitierenden Faktor der Detektionsgrenze darstellte.

5.3.7.2 Weitere Optimierung der Derivatisierung mit Verbindung **8**

Um die Empfindlichkeit der Analysemethode weiter zu verbessern, wurde die Menge an eingesetzter AMP-Lösung erhöht. Die Reaktionsgemische wurden für 18 h im Dunkeln gerührt. Anschließend wurden die zu vermessenden Lösungen 1:10 verdünnt und vermessen.

Die Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

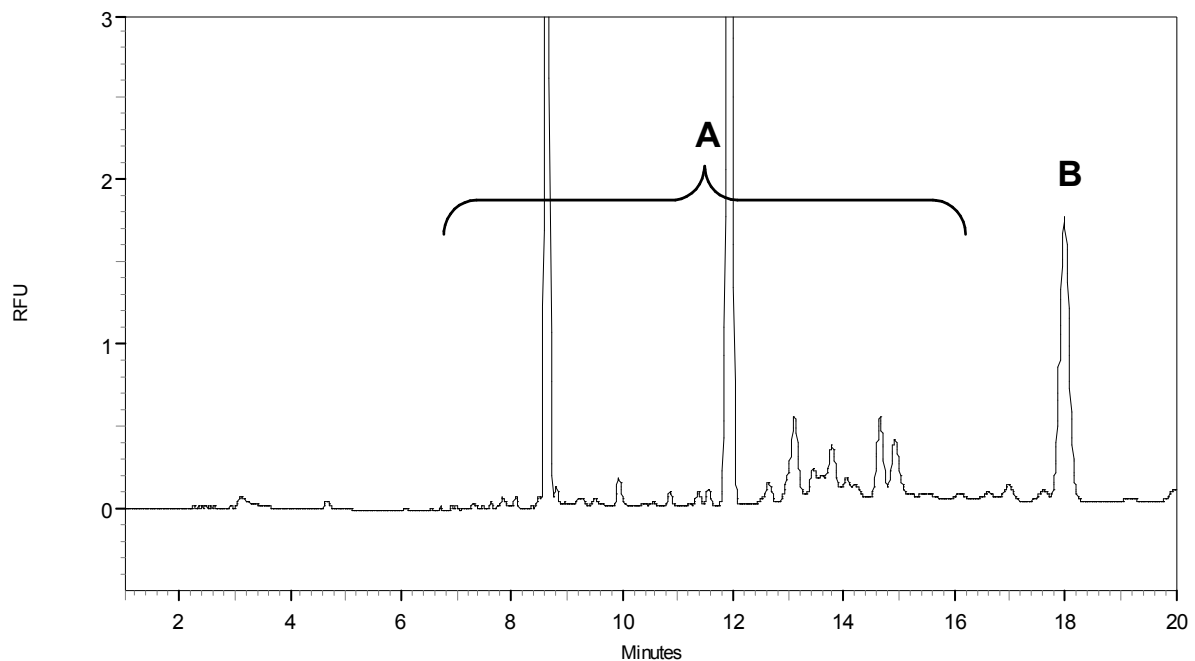
AMP-Lösung (0,01 oder 1,0 μM in Wasser): 175-350 μl

EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5): 20 μl

Fluorophor **8** (20 mM) gelöst in 1-Methylimidazol-Puffer (0,75 M, pH 8,5): 30 μl

Tabelle 5.14: Verschiedene Konzentrationen und Volumina an AMP-Lösung und zugehörige Peakflächen

c (AMP) [μM]	Volumen an AMP- Lösung [μl]	Peakfläche 1. Messung	Peakfläche 2. Messung	Peakfläche 3. Messung	Mittelwert
1,0	150	1673625	1686758	1647373	1669252 \pm 20053
0,01	150	155463	156287	154637	155462 \pm 825
<u>1,0</u>	<u>175</u>	<u>1989386</u>	<u>1997362</u>	<u>1997373</u>	<u>1994707 \pm 4608</u>
<u>0,01</u>	<u>175</u>	<u>208189</u>	<u>206736</u>	<u>207262</u>	<u>207396 \pm 735</u>
1,0	225	1628870	1646229	1638278	1637792 \pm 8689
0,01	225	164213	162767	162689	163223 \pm 858
1,0	250	1564456	1563976	1536787	1555073 \pm 15837
0,01	250	153361	157668	158877	156635 \pm 2899
1,0	300	180245	182789	188908	183980 \pm 4452
0,01	300	20790	19675	20879	20448 \pm 670



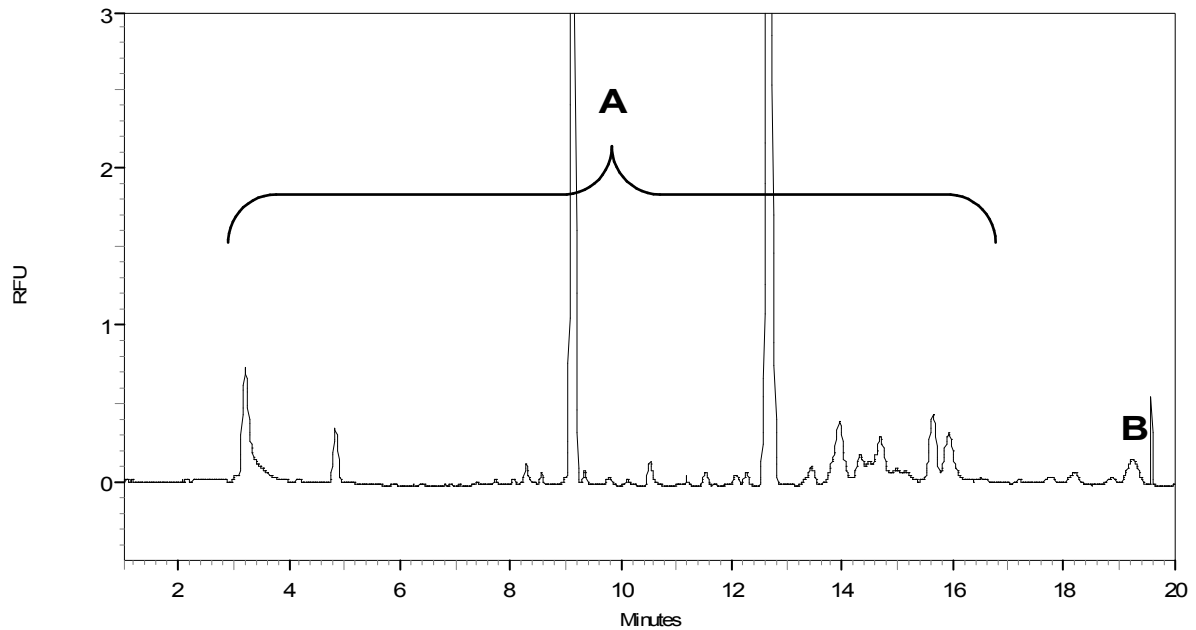


Abbildung 5.23: Elektropherogramme der Umsetzung von AMP mit Verbindung **8**, oben: c (AMP) 1,0 μM , V (AMP-Lösung) 175 μl , unten: c (AMP) 0,1 μM , V (AMP-Lösung) 175 μl , RFU = Relative Fluorescence Units, A = Verunreinigungen, B = AMP umgesetzt mit Verbindung **8**

Bei einem Volumen von 175 μl wurden die größten Peak-Flächen ermittelt. Bei höheren Volumina an Nucleotid-Lösung reichte die Pufferung nicht mehr aus und die Umsetzung ging zurück.

5.3.8 Diskussion

Eine Konzentration von 0,01 μM der eingesetzten AMP-Lösung konnte im Elektropherogramm gerade noch zugeordnet werden. Durch die Verwendung einer beschichteten Kapillare erhielt man eine um ca. 1 bis 2 Zehnerpotenzen bessere Empfindlichkeit als bei Verwendung einer Quarzkapillare, jedoch wurde die Erwartung, dass vor dem Nucleotid keine Nebenprodukte migrieren, leider nicht erfüllt. Die maximale Menge, die an AMP-Lösung zugeführt werden konnte, betrug 175 μl , danach wurde die Umsetzungsrate geringer. Aufgrund dessen, dass sich der Fluorophor **8** während der Reaktion sehr stark zersetzte, wurde diese Methode nicht weiter verwendet.

5.4 Derivatisierung von Nucleotiden mit 8-(5-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (9)

Der Nachteil der vorhergehenden Derivatisierungsmethoden war jeweils, dass vor dem Produktpeak ein sehr großer Peak des Fluorophors migrierte, was die Detektion sehr beeinträchtigt hat. Es wurde daher versucht, die Migrationszeit des Fluorophors zu verlängern, so dass das derivatisierte AMP zuerst eluiert. Dadurch verbessert sich die Empfindlichkeit, da ein besseres Signal-Rauschverhältnis vorliegt. Das BODIPY-Derivat 8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (9) ist ein sehr lipophiler Fluorophor. Aufgrund der hohen Lipophilie kommt es für die micellare elektrokinetische Chromatographie in Frage.

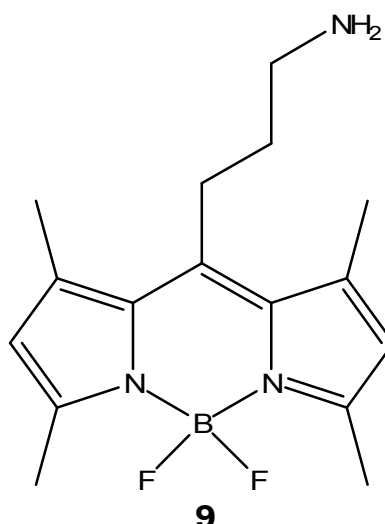


Abbildung 5.24: 8-(5-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (9)

5.4.1 Micellare elektrokinetische Chromatographie

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, entstehen durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat zum Trennpuffer Micellen, in die sich die aufzutrennenden Stoffe je nach Lipophilie einlagern können.

5.4.1.1 Durchführung

Für die micellare elektrokinetische Chromatographie wurden die folgenden Bedingungen gewählt:

Als Kapillare wurde eine Quarzkapillare (40,2 cm (30 cm effektive Länge) x 75 µm

Innendurchmesser) verwendet. Zur Trennung wurde eine konstante Stromstärke von 100 μA angelegt. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Als Trennpuffer diente ein Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0, SDS 100 mM). Vor jeder Messung wurde die Kapillare für jeweils zwei min mit Natronlauge 0,1 M, demineralisiertem Wasser und mit Puffer gespült. Die Anregungswellenlänge des Argon-Lasers betrug 488 nm. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen.

Herstellung der Probelösungen:

Je 175 μl AMP-Lösung (100 oder 50 μM in Wasser) wurden in je ein lichtundurchlässiges Eppendorff-Cap gegeben. Zu dieser Lösung wurden 30 μl EDC-Lösung (2,0 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5) und 30 μl Verbindung **9** (20 mM) gelöst in DMF gegeben. Das Eppendorff-Cap wurde verschlossen und mit einem Eppendorff-Thermomixer für 18 Stunden bei 27°C zur Reaktion gebracht. Die Lösung wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und mittels Kapillarelektrophorese vermessen.

5.4.1.2 Ergebnisse

Durch die Zugabe von SDS zum Trennpuffer wurde das Derivatisierungsreagenz 8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**9**) in die Micelle eingeschlossen, somit kam das derivatisierte AMP zuerst am Detektor an. Das Derivatisierungsreagenz migrierte viel später und störte somit die Messung nicht. Das Signal-Rauschverhältnis konnte hierdurch deutlich verbessert werden (Abbildung 5.25).

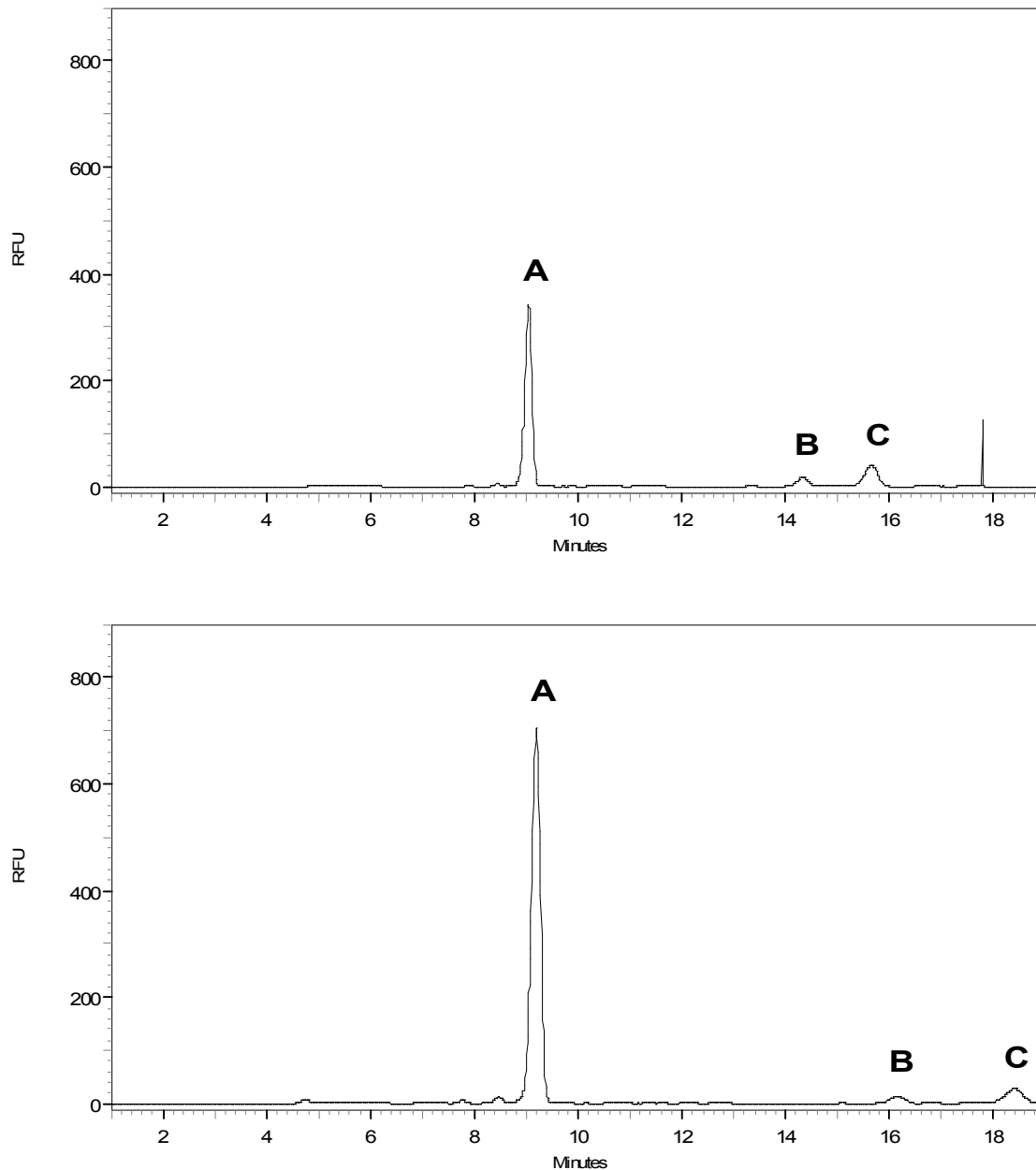


Abbildung 5.25: Elektropherogramm von AMP derivatisiert mit Derivat **9**, oben: c (AMP): 50 μ M, unten: c (AMP) 100 μ M, RFU = Relative Fluorescence Units, A = AMP umgesetzt mit Verbindung **9**, B, C = Zersetzungsprodukte des Fluorophors

5.4.2 CE-Detektion von ATP, ADP und AMP nach Umsetzung mit BODIPY-Derivat (**9**)

Um die Migrationszeiten zu verkürzen und eine Detektion von Mono-, Di- und Trinucleotiden zu ermöglichen, wurde eine Polyacrylamid-beschichtete Kapillare⁷⁹ eingesetzt. Die Migrationszeiten konnten soweit verkürzt werden, dass eine Analysezeit von 15 min für alle drei Nucleotide ausreichte.

5.4.2.1 Durchführung

Für die Analyse mit einer beschichteten Kapillare wurden folgende CE-Bedingungen angewandt: Es wurde eine Polyacrylamid-beschichtete Quarzkapillare (30,2 cm (20 cm effektive Länge) x 50 µm Innendurchmesser) verwendet. Als Trennpuffer wurde ein Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) verwendet. Zur Trennung wurde eine konstante Stromstärke von -40 µA angelegt. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare mit Wasser und mit Puffer für je 1 min gespült. Die Anregungswellenlänge des Argon-Lasers betrug 488 nm. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen.

Herstellung der Lösungen:

Je 20 µl einer ATP-, ADP- bzw. AMP- Lösung (jeweils 0,01 mM in Wasser), 15 µl Verbindung **9** (20 mM) gelöst in DMF und 15 µl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5) wurden zusammen pipettiert. Des Weiteren wurden Probelösungen hergestellt, welche nur eines der drei Nucleotide enthielten. Die Lösungen wurden über Nacht bei 20°C gerührt, dann 1:10 verdünnt und mittels CE vermessen.

5.4.2.2 Ergebnisse

Wie sich aus den Elektropherogrammen deutlich erkennen lässt, setzen sich die Nucleotide zu den jeweiligen Phosphoramiden um. Die einzelnen Peaks wurden mittels Spiking identifiziert. Bei dieser Methode wurde dem zu vermessenden Nucleotidgemisch jeweils eine der Probelösungen (10 µl), welche nur ein Nucleotid enthält, zugesetzt. Die Peaks konnten nun aufgrund der Veränderung der Peakgröße identifiziert werden. Die verwendete Methode führte zu einer guten Auftrennung der einzelnen Peaks. Vorteil der Neutralkapillare war, dass der Fluorophor, welcher unter den Trennbedingungen positiv geladen war, nicht vor den Nucleotiden am Detektor ankommt und dadurch die Detektion nicht beeinträchtigt wurde. Bei dieser Methode ließen sich je nach Chargenqualität der Kapillare alle drei Nucleotide erfassen. Bei einer schlechten Charge kam AMP nicht am Detektor an, selbst wenn die Stromstärke von -40 µA auf -60 µA erhöht wurde. Mit höheren Stromstärken sollte

nicht gearbeitet werden, da aufgrund der starken Temperaturentwicklung die Kapillaroberfläche zerstört werden kann.

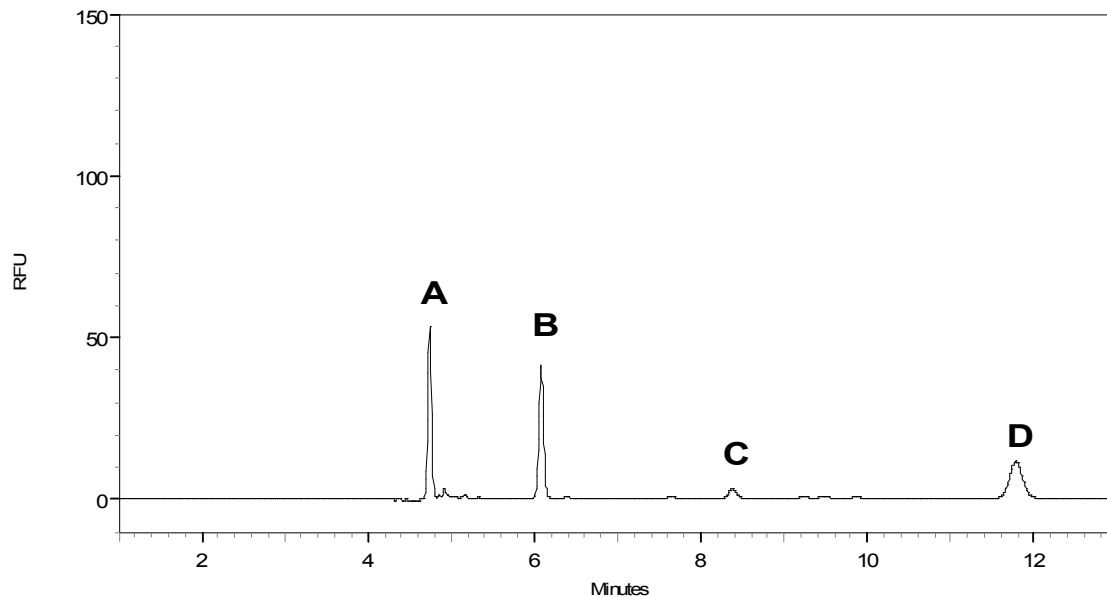


Abbildung 5.26: Elektropherogramm der Derivatisierungs-Lösung, ATP, ADP und AMP umgesetzt mit Verbindung **9**, RFU = Relative Fluorescence Units, A = ATP, B = ADP, C = nicht identifiziertes Zersetzungsprodukt, D = AMP

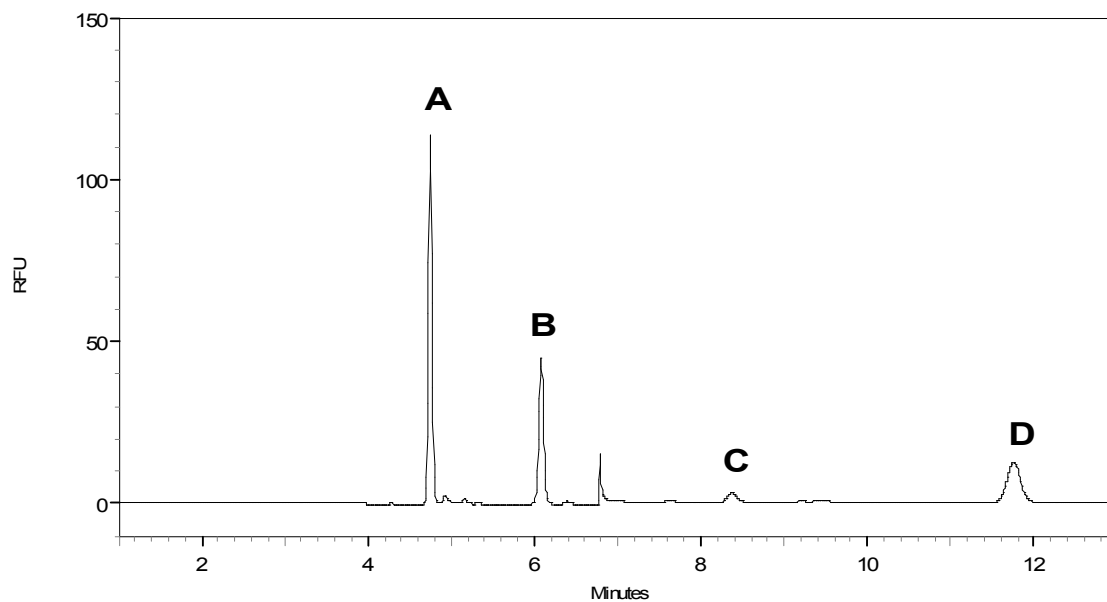


Abbildung 5.27: Elektropherogramm der Derivatisierungs-Lösung, ATP, ADP und AMP umgesetzt mit Verbindung **9** gespikt mit umgesetzten ATP, RFU = Relative Fluorescence Units, A = ATP, B = ADP, C = nicht identifiziertes Zersetzungsprodukt, D = AMP

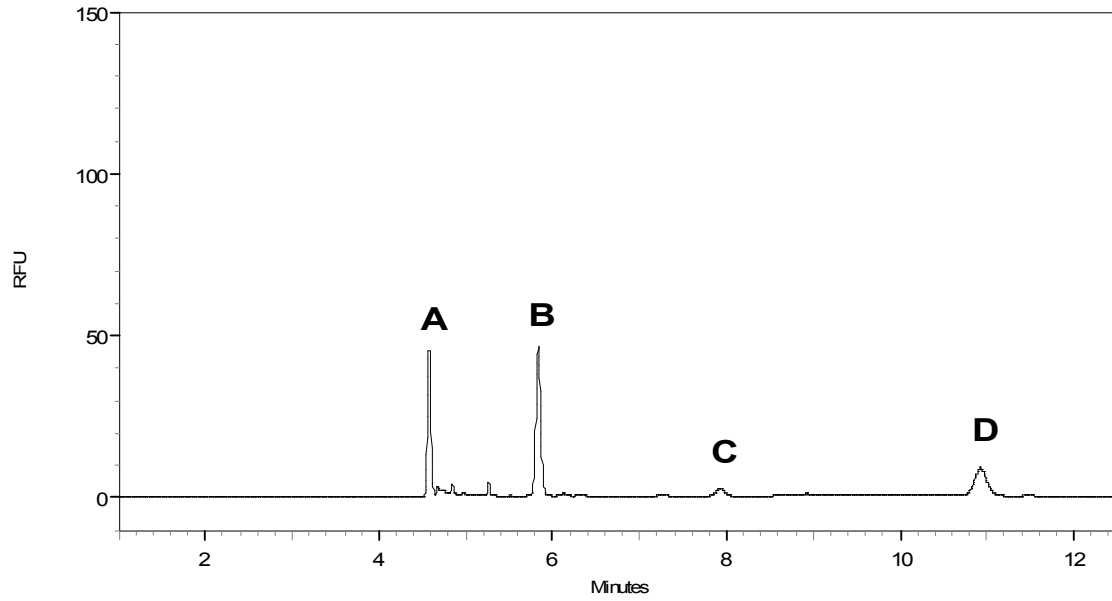


Abbildung 5.28: Elektropherogramm der Derivatisierungs-Lösung, ATP, ADP und AMP umgesetzt mit Verbindung **9** gespikt mit umgesetzten ADP, RFU = Relative Fluorescence Units, A = ATP, B = ADP, C = nicht identifiziertes Zersetzungsprodukt, D = AMP

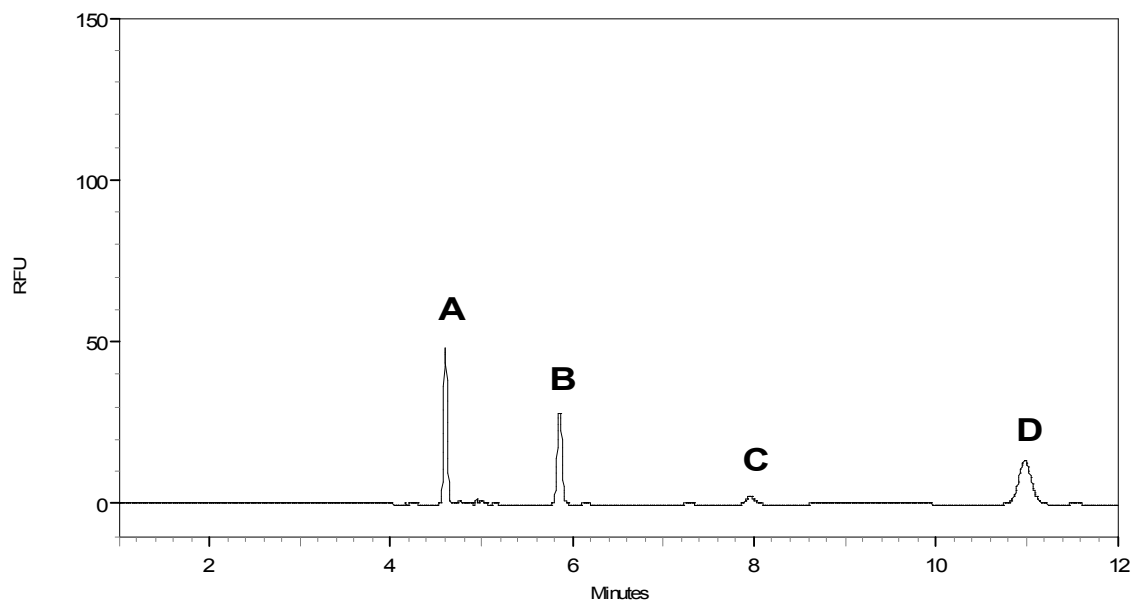


Abbildung 5.29: Elektropherogramm der Derivatisierungs-Lösung, ATP, ADP und AMP umgesetzt mit Verbindung **9** gespikt mit umgesetzten AMP, RFU = Relative Fluorescence Units, A = ATP, B = ADP, C = nicht identifiziertes Zersetzungsprodukt, D = AMP

5.4.3 Zeitlicher Ablauf der Reaktion

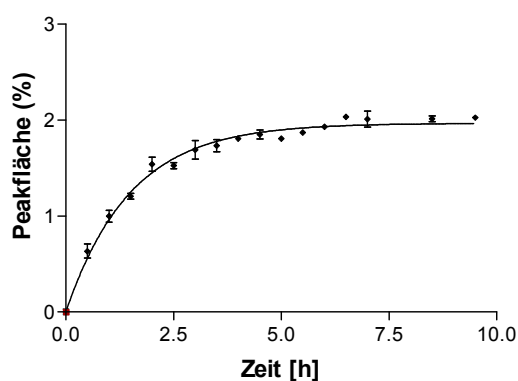
Bisher wurde die Reaktion immer über Nacht durchgeführt. Um die Möglichkeit einer eventuellen *online*-Derivatisierung zu eruieren wurde die Reaktionsdauer bestimmt. Dabei wurde die Reaktionslösung alle halbe Stunde vermessen. Der Versuch wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt. Als interner Standard diente Fluorescein. Da die Fluorescein-Lösung kurz vor dem Vermessen der Probe zugegeben wurde, konnte eine eventuell erfolgte Amidkupplung mit der Carbonsäure des Fluoresceins vernachlässigt werden. Außerdem ist die Carbonsäuregruppe des Fluoresceins nur sehr wenig reaktiv.

5.4.3.1 Durchführung

210 μl einer ATP-Lösung (5 μM in Wasser), 45 μl einer Lösung von Verbindung **9** (20 mM) gelöst in DMF und 45 μl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5) wurden in ein Eppendorff-Cap pipettiert. Die Lösungen wurden bei 20°C inkubiert. Jeweils nach einer halben Stunde wurden 10 μl Lösung entnommen und mit einer Fluorescein-Lösung (0,5 μM in Wasser) 1:1 verdünnt. Die Lösungen wurden mittels Kapillarelektrophorese vermessen.

5.4.3.2 Ergebnisse

Wie aus der Kurve (Abbildung 5.30) ersichtlich ist, war die Reaktion nach ca. 7,5 Stunden abgeschlossen. Es fand keine weitere Umsetzung mehr statt. Die Derivatisierung über Nacht durchzuführen wurde beibehalten. Für eine *online*-Derivatisierung kommt die Reaktion nicht in Frage, da hierfür kürzere Reaktionszeiten benötigt werden.



$$t_{1/2} = 1,058 \text{ h} \pm 0,232 \text{ h}$$

Die Punkte stellen Mittelwerte aus je 3 Messungen dar. Die Standardabweichung der einzelnen Messwerte wird durch die Balken angegeben

Abbildung 5.30: Zeitlicher Ablauf der Derivatisierung

5.4.4 Bestimmung der Umsetzungsrate von ATP, ADP, UTP und UDP mit Verbindung 9

5.4.4.1 Durchführung

Für die Herstellung der Probelösungen wurden je 70 µl ATP-, ADP-, UTP- oder UDP-Lösung (1,0 mM; 0,1 mM oder 0,01 mM in Wasser), 15 µl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5) und 15 µl einer Lösung von Verbindung **9** (20 mM) gelöst in DMF in ein Eppendorff-Cap pipettiert. Die Lösungen wurden bei 20°C über Nacht inkubiert. Vor der Messung wurden die Lösungen mit Wasser 1:1 verdünnt.

Für die Herstellung der Vergleichslösungen wurden je 70 µl der Nucleotid-Standardlösungen (1,0; 0,1 und 0,01 mM in Wasser) mit 15 µl 1-Methylimidazol-Puffer und 15 µl DMF versetzt, 1:1 verdünnt und ebenfalls vermessen. Die Peakflächen des Standards wurden mit den Peakflächen des nicht umgesetzten Nucleotids der Probelösung ins Verhältnis gesetzt und die Umsetzungsrate wurde berechnet.

Für die Auftrennung der Nucleotide wurde eine Polyacrylamid-beschichtete Quarzkapillare (30,2 cm (20 cm effektive Länge) x 50 µm Innendurchmesser) verwendet. Als Trennpuffer diente ein Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5). Zur Trennung wurde eine konstante Stromstärke von -40 µA angelegt. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare mit Wasser und mit Puffer für je 1 min gespült. Die Analyten wurden bei einer Wellenlänge von 190-520 nm mit einem DAD detektiert. Die für die Auswertung der Elektropherogramme verwendeten Wellenlängen waren 488 nm und 254 nm.

5.4.4.2 Ergebnisse

Wie aus Tabelle 5.15 ersichtlich ist, sind bei Konzentrationen von 1,0 und 0,1 mM die Umsetzungsraten nicht sonderlich hoch, bei einer Konzentration von 0,01 mM hingegen ist bereits eine deutliche Steigerung der Umsetzung festzustellen. Dies liegt daran, dass das Verhältnis der Reaktanden günstiger ist. Kleinere Konzentrationen waren mittels UV-Detektion nicht messbar, da das Detektionslimit erreicht war. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass die Umsetzung im nM Bereich noch besser

sein müsste. Dadurch, dass bei der Validierung eine sehr gute Linearität festgestellt wurde, kann die Umsetzungsrate im validierten Bereich als konstant angesehen werden.

Tabelle 5.15: Umsetzungsrate der verschiedenen Nucleotide

	Umsetzungsrate c (1,0 mM) [%]	Umsetzungsrate c (0,1 mM) [%]	Umsetzungsrate c (0,01 mM) [%]
ATP	79 ± 1,15	79 ± 1,38	92 ± 1,98
ADP	69 ± 2,24	76 ± 2,03	90 ± 0,87
UTP	70 ± 0,94	75 ± 1,03	91 ± 2,01
UDP	74 ± 0,51	76 ± 0,73	93 ± 1,78

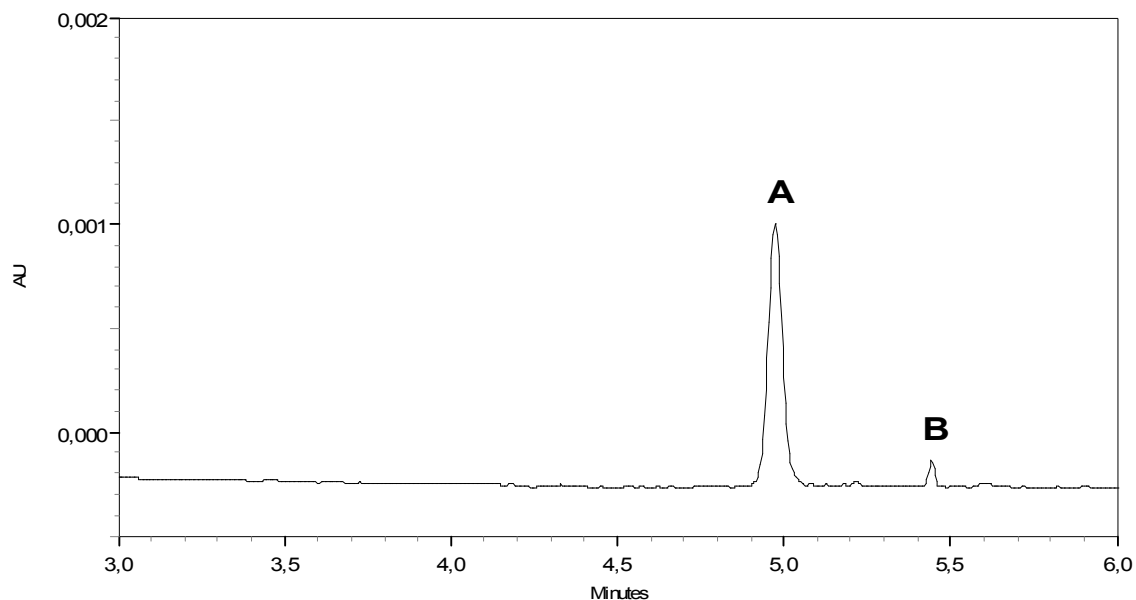


Abbildung 5.31: Elektropherogramm der ATP-Vergleichslösung, gemessen bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Konzentration der eingesetzten ATP Lösung war 0,01 mM, AU = Absorption Units, A = ATP, B = nicht identifizierte Verunreinigung

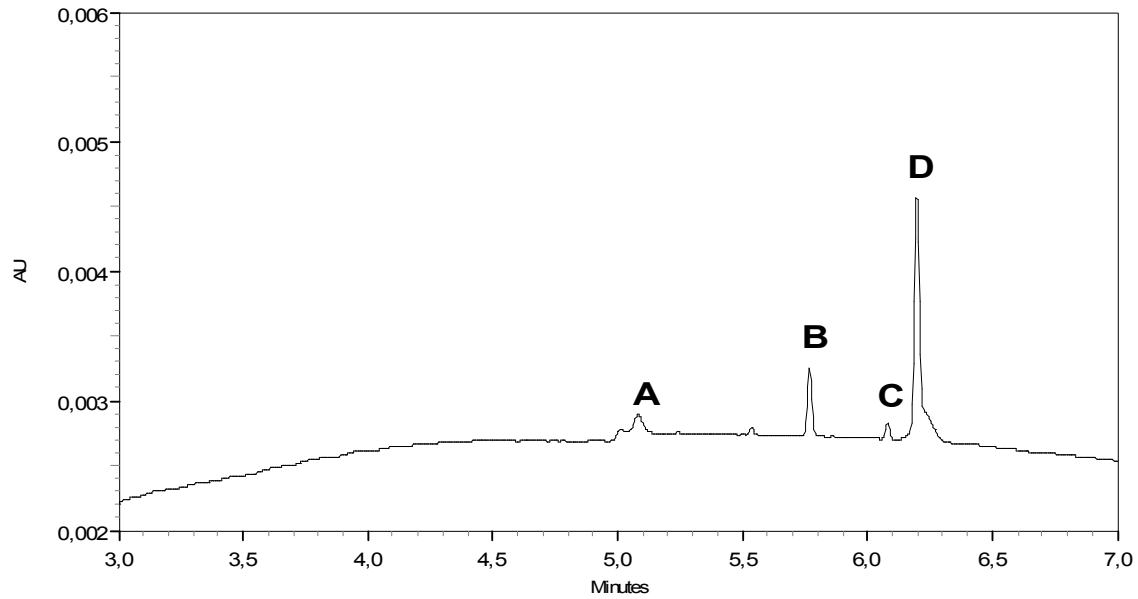


Abbildung 5.32: Elektropherogramm der ATP-Probelösung, gemessen bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Konzentration der eingesetzten ATP-Lösung war 0,01 mM. AU = Absorption Units, A = ATP, B = nicht identifizierte Verunreinigung, C = nicht identifizierte Verunreinigung, D = ATP umgesetzt mit Verbindung **9**

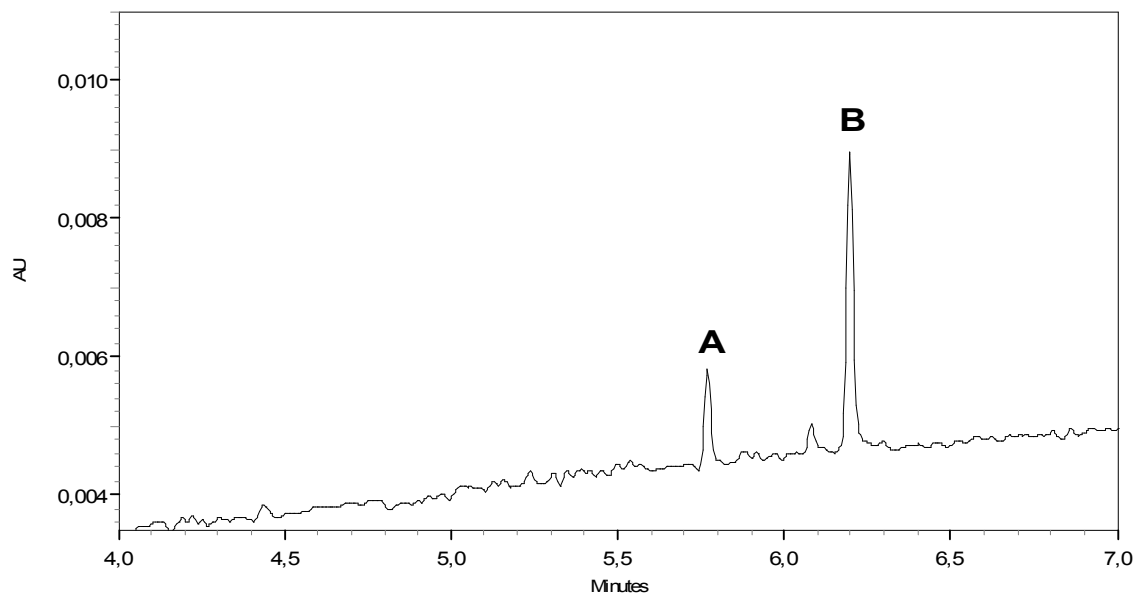


Abbildung 5.33: Elektropherogramm der ATP-Probelösung, gemessen bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Konzentration der eingesetzten ATP-Lösung war 0,01 mM, AU = Absorption Units, A = nicht identifizierte Verunreinigung, B = ATP umgesetzt mit Verbindung **9**

Der ATP-Peak der ATP-Vergleichslösung (Abbildung 5.31) ist größer als der Peak des derivatisierten ATP gemessen bei 254 nm (Abbildung 5.33). Dies ist durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums bedingt.

5.4.5 Stabilität der Derivatisierungslösungen: 2-Tages-Vergleich

Um die Stabilität der Lösungen zu ermitteln wurden die Probelösungen an zwei aufeinander folgenden Tagen vermessen. Die Lösung des internen Standards wurde jeweils frisch hergestellt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine eventuelle Zersetzung des internen Standards zu vermeiden.

5.4.5.1 Stabilität der ATP-Derivatisierungslösung

Die Stabilität der ATP-Derivatisierungslösung wurde über zwei Tage geprüft. Hierbei wurde eine ATP-Lösung umgesetzt und mit einer Lösung an derivatisiertem UDP, als internem Standard, versetzt. Die UDP-Derivatisierungslösung wurde an beiden Tagen jeweils frisch hergestellt.

5.4.5.1.1 Durchführung

Die Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt, die ATP-Probelösung wurde doppelt hergestellt.

ATP-Probelösung (Lösung 1)

70 µl ATP-Lösung (100 nM in Wasser)

15 µl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5)

15 µl Verbindung **9** (20 mM) gelöst in DMF

Lösung des internen Standards (Lösung 2)

70 µl UDP-Lösung (10 µM in Wasser)

15 µl EDC-Lösung (2M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5)

15 µl Verbindung **9** (20 mM) gelöst in DMF

Die Lösungen wurden über Nacht auf einem Eppendorff-Thermomixer bei 20°C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion wurden 10 µl von **Lösung 2** zur einer der beiden ATP Derivatisierungslösungen pipettiert. Dieses Gemisch wurde 1:1 mit Wasser verdünnt und dreimal vermessen. Die zweite ATP-Lösung wurde über Nacht ins Gefrierfach gestellt. Sie wurde am zweiten Tag mit 10 µl einer am Vortag frisch hergestellten **Lösung 2** versetzt und wiederum dreimal vermessen.

5.4.5.1.2 Ergebnisse

Das Verhältnis von ATP zu UDP wurde in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 5.34). Wie gut zu erkennen ist, bleibt die ATP-Lösung stabil. Das Peakflächen-Verhältnis war am zweiten Tag geringfügig größer, was auf ein minimales Verdunsten des Lösungsmittels zurückgeführt werden kann.

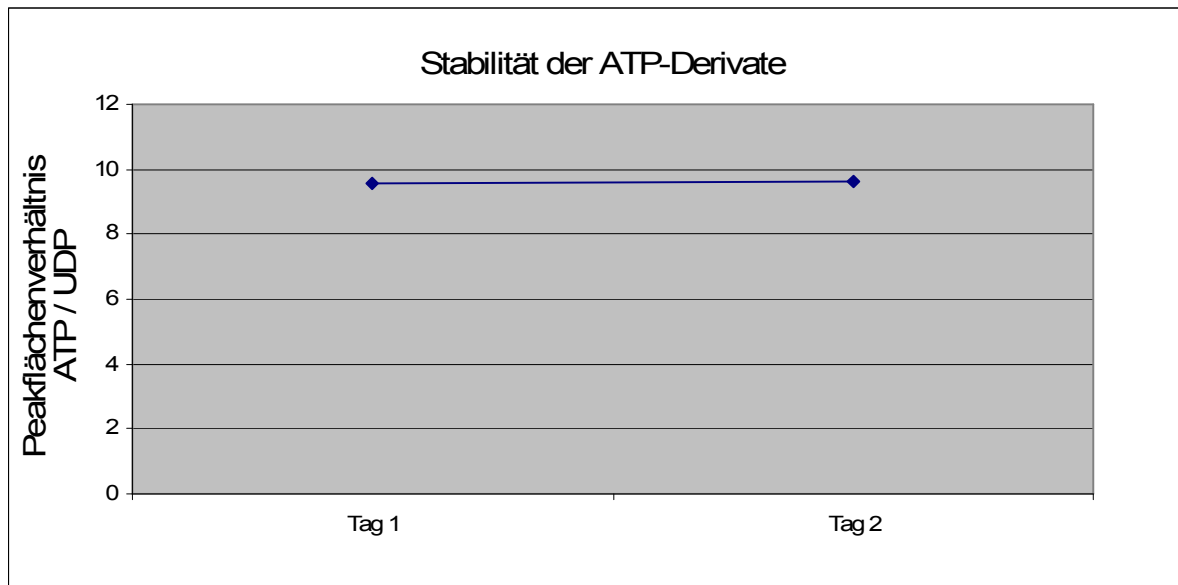


Abbildung 5.34: Stabilität der ATP-Lösung: 2-Tages-Vergleich

5.4.5.2 Stabilität der UTP-Derivatisierungslösungen

Die Stabilität des derivatisierten UTP wurde ebenfalls ermittelt, es wurde dieselbe Methode wie bei der ATP-Stabilitätsuntersuchung angewandt (vgl. Kapitel 5.4.5.1), als interner Standard wurde ADP verwendet.

Das Verhältnis von UTP zu ADP wurde in einem Diagramm dargestellt. Wie in Abbildung 5.35 ersichtlich ist, bleibt auch die UTP-Lösung stabil. Das Peakflächen-Verhältnis war am zweiten Tag geringfügig größer was auf ein minimales Verdunsten des Lösungsmittels zurückgeführt werden kann.

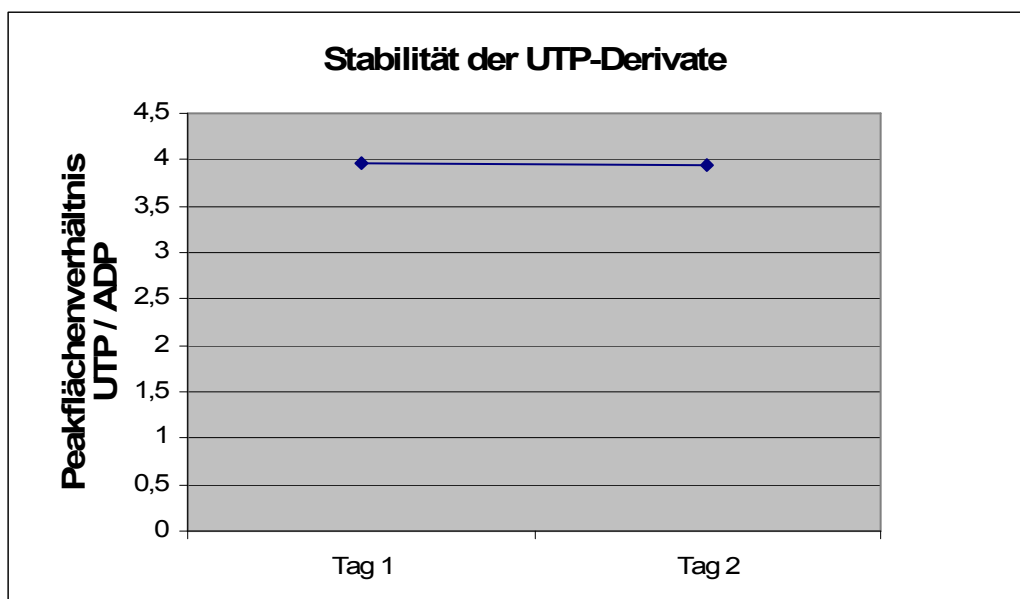


Abbildung 5.35: Stabilität der UTP-Lösung: 2-Tages-Vergleich

5.4.6 Validierung der Umsetzung von ATP, ADP, UTP und UDP mit BODIPY-Derivat (9)

Um die Methode zu validieren wurde die Derivatisierung der Nucleotide ATP, ADP, UTP und UDP durchgeführt und die Derivatisierungslösungen mit der in Kapitel 5.4.2.1 beschriebenen CE-Methode vermessen. Hierbei wurde überprüft, ob die Umsetzung der Nucleotide mit Verbindung **9** jeweils die nötige Genauigkeit aufweist und für die Quantifizierung der Nucleotide geeignet ist.

5.4.6.1 Probenvorbereitung für die Validierung

Je 70 µl einer wässrigen Nucleotid-Lösung wurden mit 10 µl einer Lösung an internem Standard (0,05 mM in Wasser) versetzt. es wurden 15 µl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5) und 15 µl einer Lösung von Verbindung **9** (20 mM in DMF) zugefügt. Die Lösungen wurden über Nacht bei 20°C zur Reaktion gebracht, 1:1 verdünnt und mittels Kapillarelektrophorese vermessen.

Für das Nucleotid ATP diente UDP, für ADP diente UTP, für UDP diente ATP und für UTP diente ADP als interner Standard.

5.4.6.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde nach der in Kapitel 5.2.6.3 dargestellten Definition bestimmt.

5.4.6.3 Linearität und Wiederfindung

Um die Linearität und die Wiederfindungsrate zu bestimmen wurden unterschiedliche Konzentrationen an Nucleotid-Lösung und die Blindprobe je 3mal vermessen. Mittels des Statistikprogramms „Prism“ wurde eine Kalibriergerade angefertigt. Durch lineare Regression erhielt man die Linearitätsgleichung. Es wurde bei allen vier Nucleotiden Linearität nachgewiesen (siehe Abbildungen 5.36-5.39).

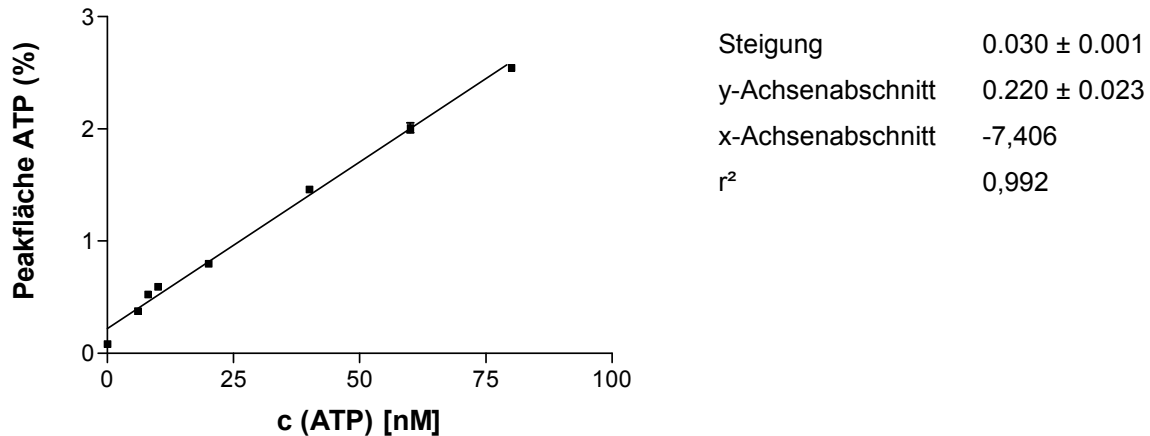


Abbildung 5.36: Kalibriergerade von ATP derivatisiert mit Verbindung **9**; interner Standard UDP

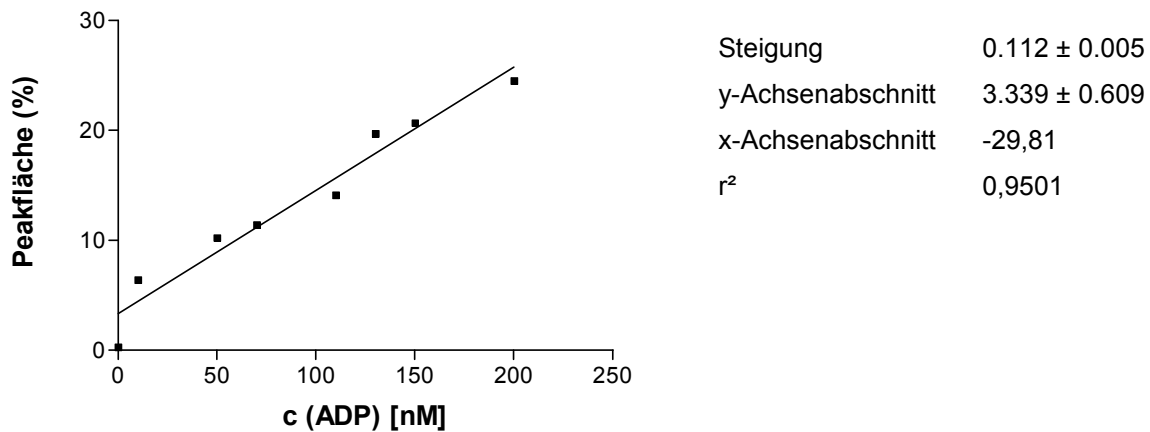


Abbildung 5.37: Kalibriergerade von ADP derivatisiert mit Verbindung **9**; interner Standard UTP

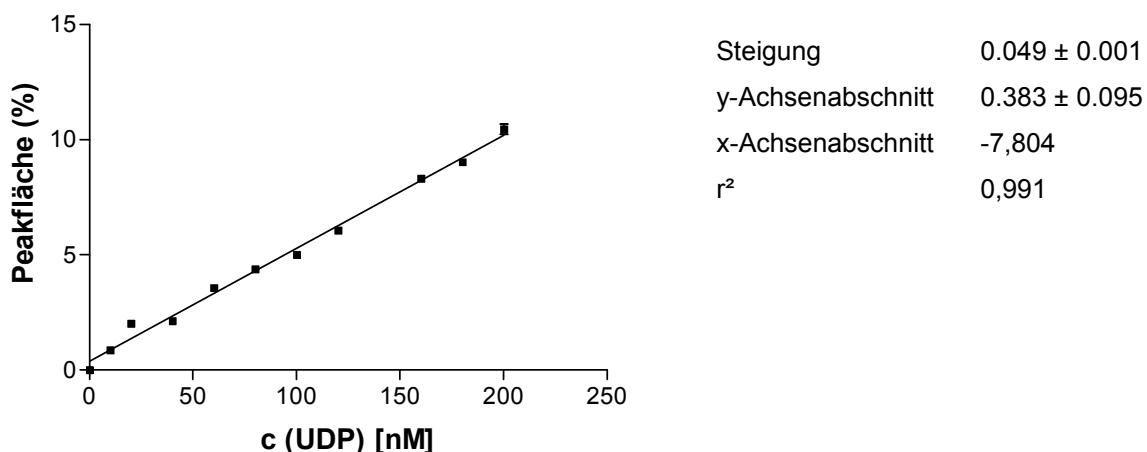


Abbildung 5.38: Kalibriergerade von UDP derivatisiert mit BODIPY **9**; interner Standard ATP

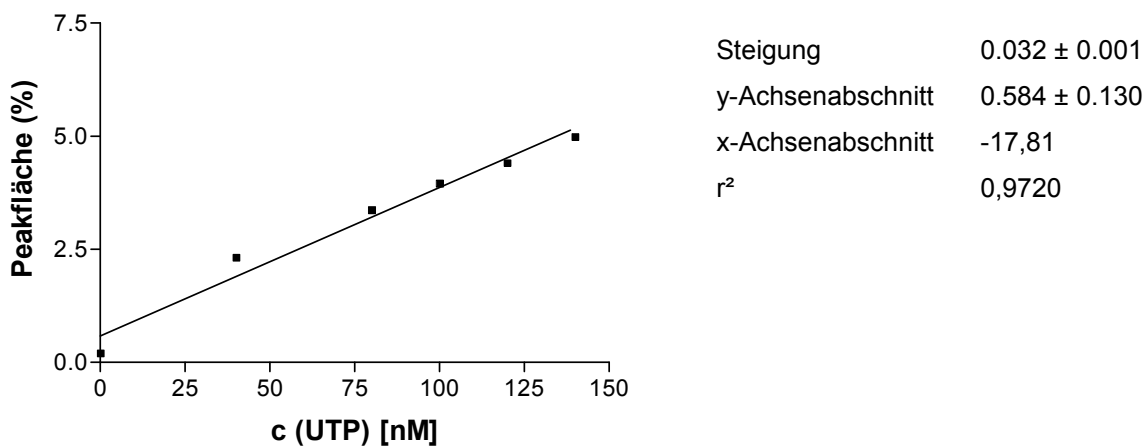


Abbildung 5.39: Kalibriergerade von UTP derivatisiert mit Verbindung **9**; interner Standard ADP

5.4.6.4 Präzision der Migrationszeit und der Peakfläche

Für die Bestimmung der Präzision der Migrationszeit wurde eine Probelösung mit einer eingesetzten Nucleotid-Konzentration von 40 nM derivatisiert und über zwei Tage insgesamt 20mal vermessen. Die Standardabweichung und die relative Standardabweichung wurden berechnet. Die Präzision der Peakfläche wurde ermittelt, indem eine Nucleotid-Probelösung mit einer eingesetzten Nucleotid-Konzentration von 100 nM 3mal injiziert wurde. Die Standardabweichung und die relative Standardabweichung wurden berechnet.

5.4.6.5 Validierungsdaten der Bestimmung von ATP, ADP, UTP und UDP

Die Validierung der Derivatisierung von ATP ergab die in Tabelle 5.16 dargestellten Parameter. Als interner Standard wurde UDP verwendet; ADP eignet sich in diesem Fall nicht als interner Standard, da ATP bereits ADP als Verunreinigung enthalten kann.

Tabelle 5.16: Validierungsdaten für ATP derivatisiert mit Verbindung **9**; interner Standard: UDP

^a Nachweisgrenze [nM]	1
^b Bestimmungsgrenze [nM]	6
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	3,03
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,01
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	0,30%
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	3,25
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0121
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	3,50
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	3,14
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,14
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	4,32
Wiederfindungsrate [%]	100,1 ± 1,515
R ² der Wiederfindungsrate	0,9957
Mittelwert der Peakflächen (c = 100 nM, n = 3)	43302544,5
^c STABWN der Peakflächen	1309709,6
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	3,02

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmal so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

Die Validierung der Derivatisierung von ADP führte zu folgenden Ergebnissen (Tabelle 5.17).

Tab.5.17: Validierungsdaten für ADP derivatisiert mit Verbindung **9**; interner Standard: UDP

^a Nachweisgrenze [nM]	1
^b Bestimmungsgrenze [nM]	10
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	7,1534
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,07
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	0,10
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	7,52
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,09
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	1,23
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	7,34
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,21
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	2,81
Wiederfindungsrate [%]	100,0 ± 4,146
R ² der Wiederfindungsrate	0,9684
Mittelwert der Peakflächen (c = 100 nM, n = 3)	8264750,10
^c STABWN der Peakflächen	243168,40
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	2,94

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmal so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

Die Umsetzung von UDP mit Verbindung **9** führte zu folgenden Validierungsdaten (Tabelle 5.18).

Tab.5.18: Validierungsdaten für UDP derivatisiert mit Verbindung **9**; interner Standard: ATP

^a Nachweisgrenze [nM]	1
^b Bestimmungsgrenze [nM]	10
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	7,42
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,06
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	0,8
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	7,35
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,11
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	1,45
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	7,39
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,09
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	1,22
Wiederfindungsrate [%]	99,99 ± 1,878
R ² der Wiederfindungsrate	0,9902
Mittelwert der Peakflächen (c = 100 nM, n = 3)	1341804,80
^c STABWN der Peakflächen	17102,31
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	1,27

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmal so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

Die Ergebnisse der Validierung der Bestimmung von UTP sind in Tabelle 5.19 dargestellt.

Tab.5.19: Validierungsdaten für UTP derivatisiert mit Verbindung **9**; interner Standard: ADP

^a Nachweisgrenze [nM]	10
^b Bestimmungsgrenze [nM]	40
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	3,99
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,02
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	0,37
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	3,98
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,02
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	0,42
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	3,98
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,02
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	0,42
Wiederfindungsrate [%]	99,95 ± 1,174
R ² der Wiederfindungsrate	0,9982
Mittelwert der Peakflächen (c = 100 nM, n = 3)	1034035,5
^c STABWN der Peakflächen	16514,13
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	1,60

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmals so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

5.4.7 Messung an Tagen mit Temperaturen über 30°C

Für alle durchgeführten Derivatisierungs-Reaktionen wurde ein Eppendorff-Thermomixer verwendet, dadurch wurde gewährleistet, dass die Reaktionstemperatur immer gleich war. Allerdings wurde beobachtet, dass Lösungen, die bei Temperaturen von über 30°C gelagert wurden, nicht vermessen werden konnten, da sich die Produkte während der Messung oder bereits zuvor zersetzt hatten. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten waren an diesen Tagen ebenfalls nicht gegeben. Dies war ein Problem in dem unklimatisierten Labor, wenn im Sommer Temperaturen von über 30°C erreicht wurden. In den Abbildungen 5.40 und 5.41 sind zwei Elektropherogramme dargestellt, bei beiden handelt es sich um dieselbe Derivatisierung, einmal vermessen an einem kühlen Tag und einmal vermessen an einem heißen Tag. Als CE-Methode wurde die in Kapitel 5.4.2.1 beschriebene Methode angewandt.

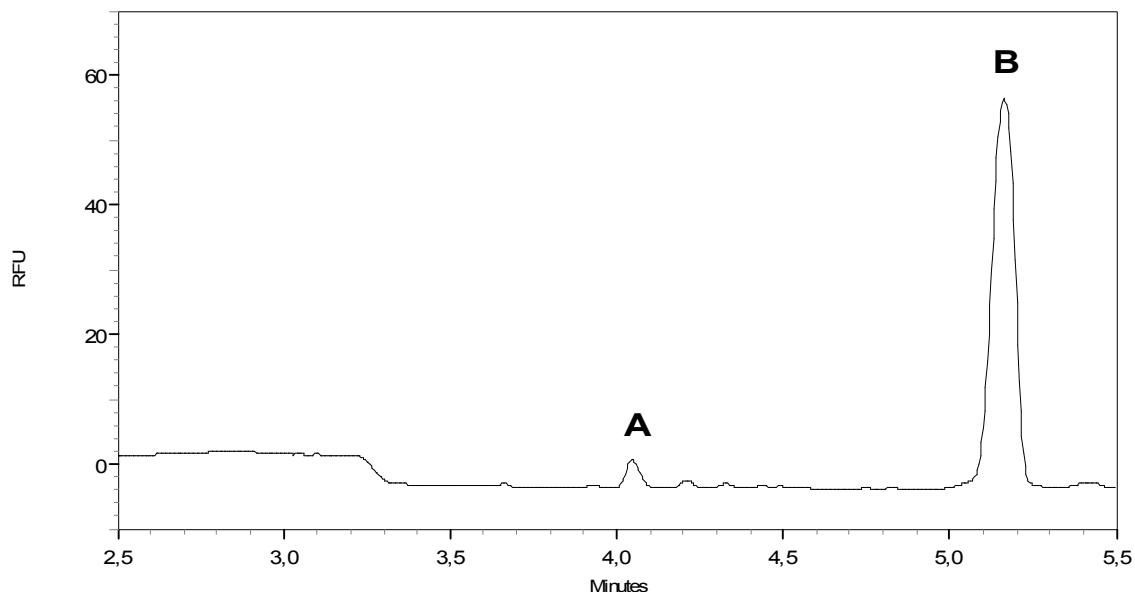


Abbildung 5.40: Elektropherogramm (UTP 100 nM, interner Standard ADP 0,005 mM, derivatisiert mit Verbindung **9**), kühler Tag, RFU = Relative Fluorescence Units, A = UTP, B = ADP

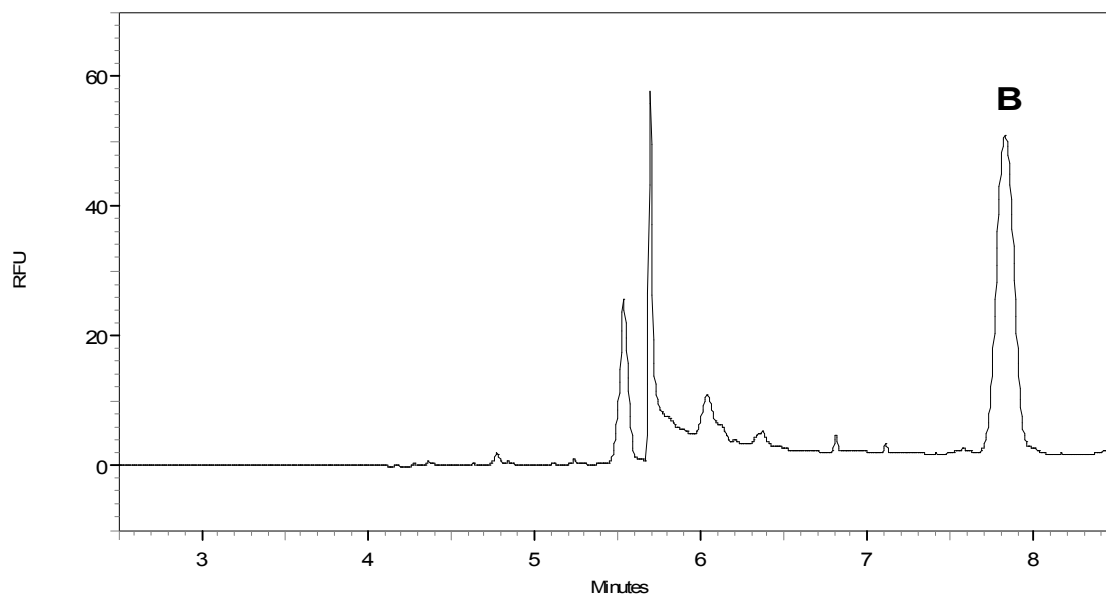


Abbildung 5.41: Elektropherogramm (UTP 100 nM, interner Standard ADP 0,005 mM, derivatisiert mit Verbindung **9**), heißer Tag, RFU = Relative Fluorescence Units, B = ADP

Aus dem Vergleich der beiden Elektropherogramme (Abbildung 5.40 und 5.41) ist sehr gut ersichtlich, dass an schwülen Sommertagen eine Zuordnung der Peaks nur schwer möglich war und keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden konnten.

5.4.8 Verwendung von 3,5-Disulfobenzoessäure als internen Standard

Für das Vermessen von biologischen Proben benötigt man einen internen Standard, welcher nicht in biologischen Proben vorkommt. Daher ist die Verwendung von Nucleotiden nicht geeignet. Die Anforderungen an einen internen Standard sind, dass er sich mit EDC und dem Fluoreszenzmarker umsetzen lässt und dass nach Umsetzung idealerweise noch zwei negative Ladungen vorhanden sind, da dies für die gewählte kapillarelektrophoretische Methode am günstigsten ist. Als interner Standard wurde daher 3,5-Disulfobenzoessäure ausgewählt.

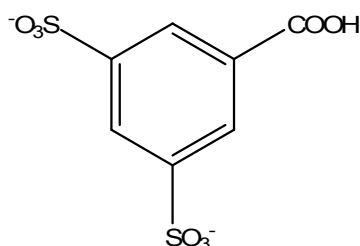


Abbildung 5.42 Struktur von Disulfobenzoessäure

Die Migrationszeit dieser Substanz liegt zwischen der Migrationszeit von Trinucleotiden und Dinucleotiden, so dass sie für alle verwendeten Nucleotide als interner Standard verwendet werden kann.

5.4.8.1 Umsetzung von 3,5-Disulfobenzoessäure mit dem Fluorophor

Bevor 3,5-Disulfobenzoessäure als interner Standard verwendet werden konnte, musste überprüft werden, ob die Umsetzung mit dem Fluorophor **9** gegeben ist. Dies wurde überprüft, indem Lösungen dreier Konzentrationen (1,0 mM, 0,1 mM, 0,01 mM) an 3,5-Disulfobenzoessäure hergestellt wurden. Die Lösungen wurden mit Verbindung **9** umgesetzt und mittels Kapillarelektrophorese vermessen.

5.4.8.1.1 Durchführung

Für die Herstellung der Probelösungen wurden je 70 µl einer 3,5-Disulfobenzoessäure-Lösung (1,0 mM, 0,1 mM und 0,01 mM in Wasser), 15 µl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75M, pH 8,5) und 15 µl einer Lösung von Verbindung **9** (20 mM, in DMF) in ein lichtundurchlässiges Eppendorff-Cap pipettiert. Die Lösungen wurden bei 20°C inkubiert. Vor der Messung wurden die Lösungen mit Wasser 1:1 verdünnt.

Für die Herstellung der Vergleichslösungen wurden je 70 µl einer 3,5-Disulfobenzoessäure-Lösung (1,0, 0,1 und 0,01 mM in Wasser) mit 15 µl 1-Methylimidazol-Puffer und 15 µl DMF versetzt. Die Lösung wurde 1:1 verdünnt und ebenfalls vermessen. Die Peakflächen des Standards wurden mit den Peakflächen der Probelösung ins Verhältnis gesetzt und die Umsetzungsrate berechnet.

Für die Kapillarelektrophorese-Messung wurde eine Polyacrylamid-beschichtete Quarzkapillare (30,2 cm (20 cm effektive Länge) x 50 µm Innendurchmesser) verwendet. Als Trennpuffer wurde ein 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5 eingesetzt. Zur Trennung wurde eine konstante Stromstärke von -40 µA angelegt. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare mit Wasser und mit Puffer für je eine min gespült. Die Analyten wurden bei einer Wellenlänge von 190-520 nm mit einem DAD detektiert. Die für die Auswertung der Elektropherogramme verwendeten Wellenlängen waren 488 und 214 nm.

5.4.8.2 Ergebnisse

Während es bei einer Konzentration von 1,0 mM zu einer 88%igen Umsetzung kam, war bei einer Konzentration von 0,01 mM bereits eine 95%ige Umsetzung zu beobachten. Kleinere Konzentrationen waren mittels UV-Detektion nicht messbar, da das Detektionslimit erreicht war.

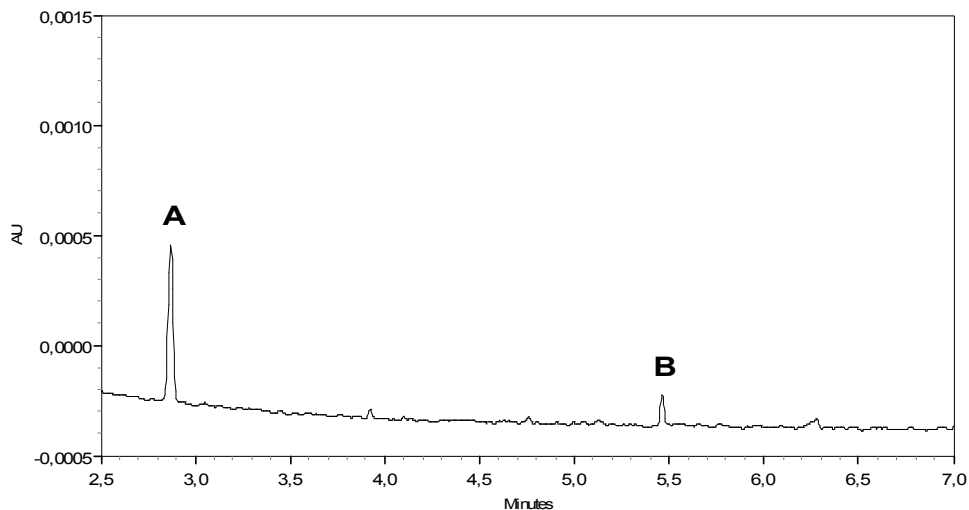


Abbildung 5.43: Elektropherogramm der 3,5-Disulfobenzoesäure-Vergleichslösung gemessen bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die Konzentration der eingesetzten 3,5-Disulfobenzoesäure-Lösung war 0,01 mM. AU = Absorption Units, A = 3,5-Disulfobenzoesäure, B = nicht identifizierte Verunreinigung

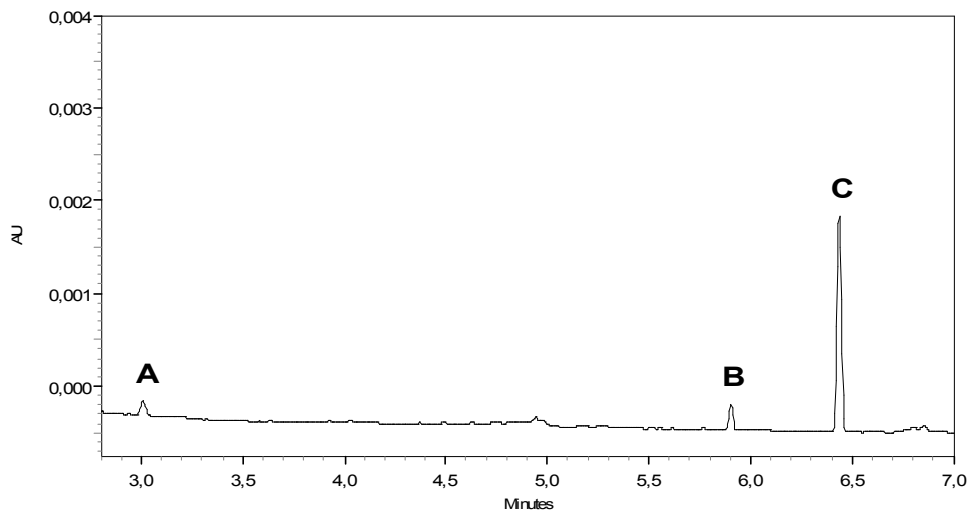


Abbildung 5.44: Elektropherogramm der 3,5-Disulfobenzoesäure-Probeflösung gemessen bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die Konzentration der eingesetzten 3,5-Disulfobenzoesäure Lösung war 0,01 mM. AU = Absorption Units, A = 3,5-Disulfobenzoesäure, B = nicht identifizierte Verunreinigung, C = derivatisierte 3,5-Disulfobenzoesäure

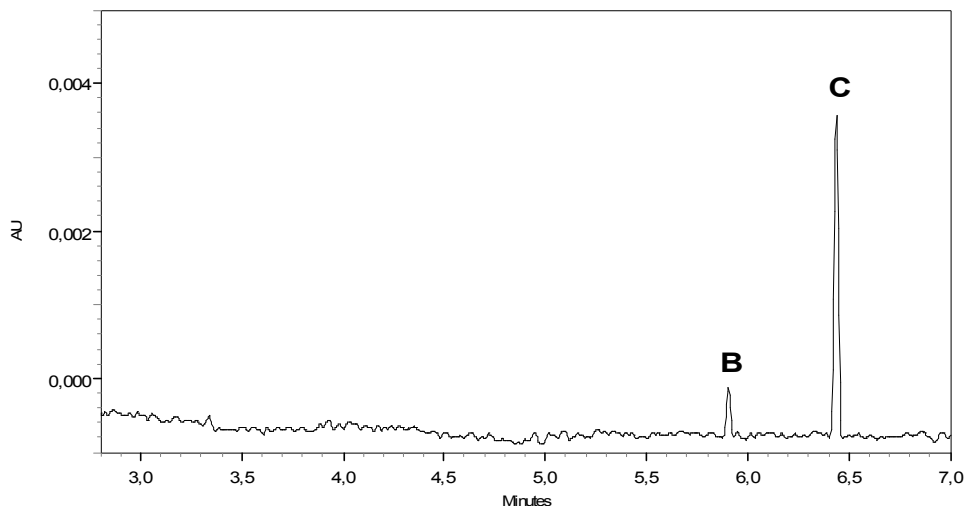


Abbildung 5.45: Elektropherogramm der 3,5-Disulfobenzoesäure-Probeflösung gemessen bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Konzentration der eingesetzten 3,5-Disulfobenzoesäure Lösung war 0,01 mM. AU = Absorption Units, B = nicht identifizierte Verunreinigung, C = derivatisierte 3,5-Disulfobenzoesäure

Aus den Elektropherogrammen (Abbildung 5.43-5.45) ist die Umsetzung der 3,5-Disulfobenzoesäure sehr gut zu erkennen. Aus Abbildung 5.44 ist deutlich ersichtlich, dass sich der größte Teil der eingesetzten 3,5-Disulfobenzoesäure umgesetzt hat.

5.4.9 Validierung der Bestimmung von ATP, ADP, UTP und UDP mit 3,5-Disulfobenzoesäure als internem Standard

Nachdem die Umsetzungsrate von 3,5-Disulfobenzoesäure bestimmt wurde und das Ergebnis von 95% für deren Verwendung als internem Standard geeignet ist wurde, die Derivatisierungsmethode für die Bestimmung von Nucleotiden durch Fluoreszenzdetektion validiert.

5.4.9.1 Probenvorbereitung für die Validierung

Je 70 μl einer wässrigen Nucleotid-Lösung wurden mit 10 μl einer 3,5-Disulfobenzoesäure-Lösung (0,05 mM in Wasser) versetzt. Es wurden 15 μl EDC-Lösung (2 M in 1-Methylimidazol-Puffer, 0,75 M, pH 8,5) und 15 μl einer Lösung von Verbindung **9** (20 mM in DMF) zugefügt. Eine Blindprobe wurde ebenfalls hergestellt. Die Lösungen wurden über Nacht bei 20°C zur Reaktion gebracht, 1:1 verdünnt und mittels Kapillarelektrophorese vermessen.

5.4.9.2 Linearität und Wiederfindung

Um die Linearität und die Wiederfindungsrate zu bestimmen wurden unterschiedliche Konzentrationen an Nucleotid-Lösung und die Blindprobe je 3mal an 3 verschiedenen Tagen vermessen. Mittels des Statistikprogramms „Prism“ wurde eine Kalibriergerade angefertigt. Durch lineare Regression erhielt man die Linearitätsgleichung. Es wurde bei allen vier Nucleotiden Linearität nachgewiesen

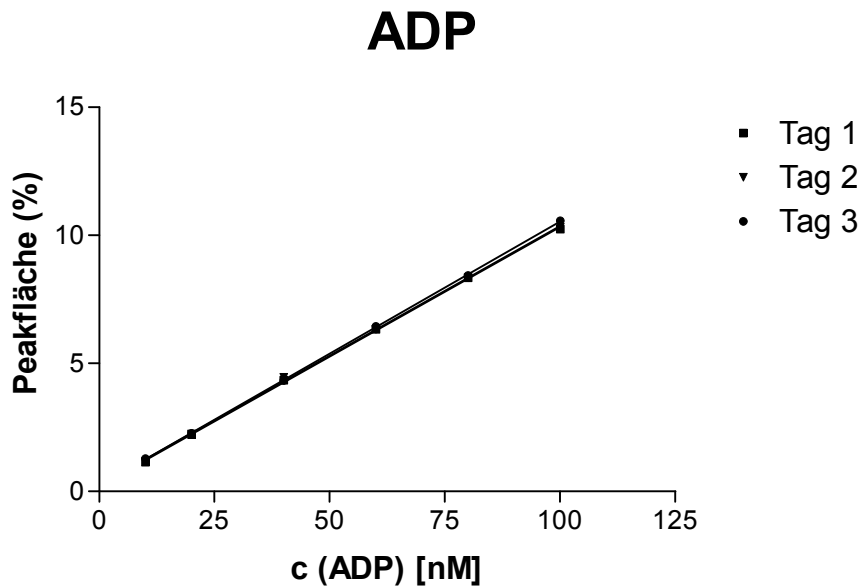


Abbildung 5.46: Kalibriergerade von ADP derivatisiert mit BODIPY; interner Standard: 3,5-Disulfobenzoesäure

Tabelle 5.20: Daten der Kalibriergeraden

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Steigung	$0,101 \pm 0,001$	$0,101 \pm 0,001$	$0,103 \pm 0,001$
y-Achsenabschnitt	$0,206 \pm 0,039$	$0,247 \pm 0,058$	$0,220 \pm 0,056$
x-Achsenabschnitt	2,038	-2,435	-2,127
R ²	0,999	0,999	0,999

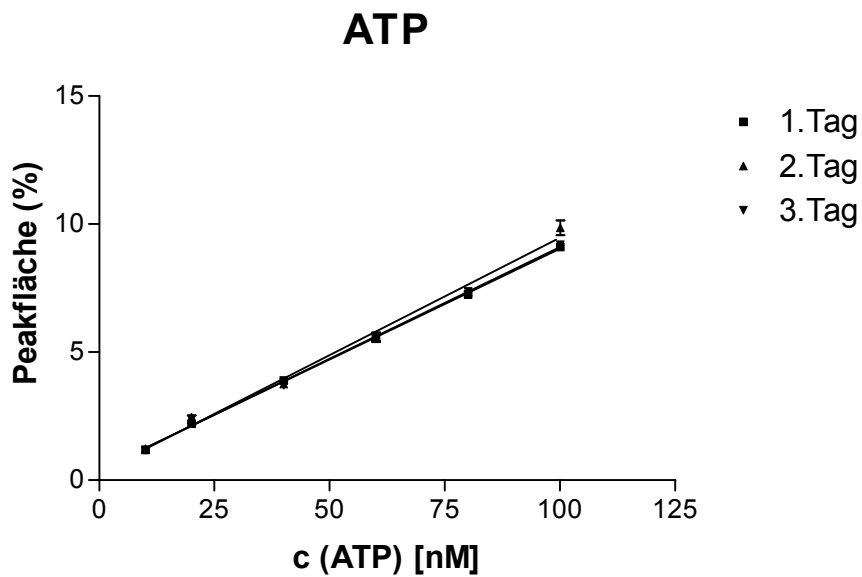


Abbildung 5.47: Kalibriergerade von ATP derivatisiert mit BODIPY (9); interner Standard: 3,5-Disulfobenzoessäure

Tabelle 5.21: Daten der Kalibriergeraden

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Steigung	$0,087 \pm 0,001$	$0,092 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,002$
y-Achsenabschnitt	$0,384 \pm 0,079$	$0,303 \pm 0,157$	$0,377 \pm 0,101$
x-Achsenabschnitt	-4,433	-3,300	-4,320
R ²	0,996	0,988	0,994

Die Derivatisierung von ATP ist im getesteten Konzentrationsbereich reproduzierbar und kann für die quantitative Bestimmung verwendet werden.

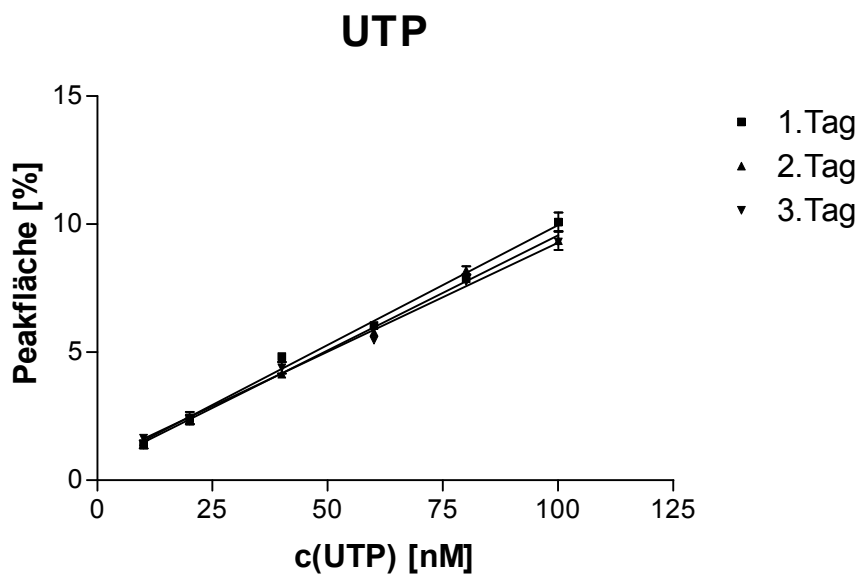


Abbildung 5.49: Kalibriergerade von UTP derivatisiert mit BODIPY (9); interner Standard: 3,5-Disulfobenzoesäure

Tabelle 5.22: Daten der Kalibriergeraden

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Steigung	$0,0467 \pm 0,002$	$0,048 \pm 0,001$	$0,047 \pm 0,002$
y-Achsenabschnitt	$0,133 \pm 0,144$	$-0,102 \pm 0,082$	$-0,036 \pm 0,148$
x-Achsenabschnitt	-2,843	2,139	0,768
R ²	0,973	0,991	0,972

Die Derivatisierung von UTP weist eine etwas geringere Reproduzierbarkeit auf als die der anderen Nucleotide. Jedoch ist die Linearität immer noch gegeben.

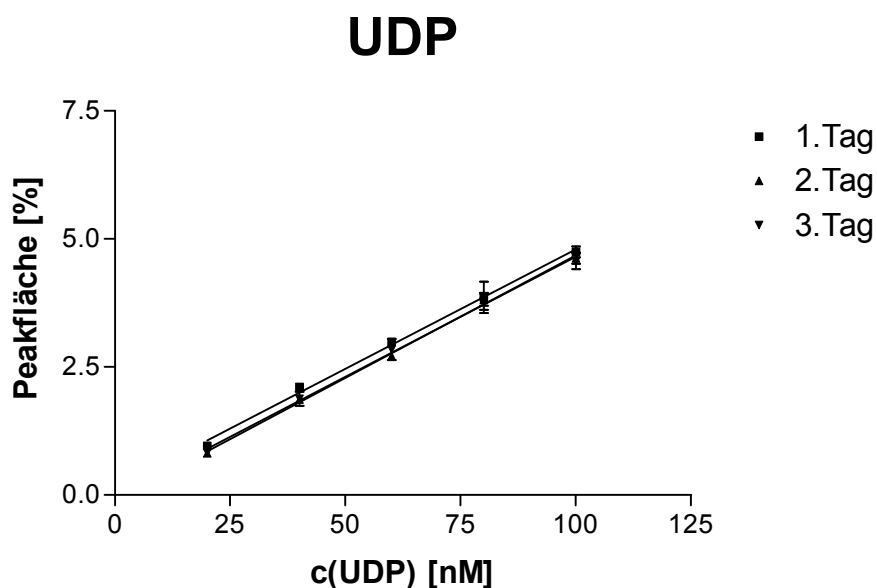


Abbildung 5.48: Kalibriergerade von UDP derivatisiert mit BODIPY (9); interner Standard: 3,5-Disulfobenzoesäure

Tabelle 5.23: Daten der Kalibriergeraden

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Steigung	$0,047 \pm 0,002$	$0,048 \pm 0,001$	$0,047 \pm 0,002$
y-Achsenabschnitt	$0,133 \pm 0,144$	$-0,102 \pm 0,082$	$-0,036 \pm 0,148$
x-Achsenabschnitt	-2,843	2,139	0,768
R ²	0,972	0,991	0,972

Die Bestimmung beider Uracil-Nucleotide wiesen damit eine geringere Genauigkeit auf als die der Adenin-Nucleotide. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine geringere Reinheit der eingesetzten Uracil-Nucleotide.⁷¹

5.4.9.3 Präzision der Migrationszeit und der Peakfläche

Für die Bestimmung der Präzision der Migrationszeit wurde eine Probelösung mit einer eingesetzten Nucleotid-Konzentration von 40 nM derivatisiert und über zwei Tage insgesamt 20mal vermessen. Die Standardabweichung und die relative Standardabweichung wurden berechnet. Die Präzision der Peakfläche wurde ermittelt, indem eine Nucleotid-Probelösung mit einer eingesetzten Nucleotid-Konzentration von 150 nM 3mal injiziert wurde. Die Standardabweichung und die relative Standardabweichung wurden berechnet.

5.4.9.4 Validierungsdaten der Bestimmung von ATP, ADP, UTP und UDP unter Verwendung von 3,5-Disulfobenzoessäure als internem Standard

Die Validierungsdaten der Umsetzung von ATP sind in Tabelle 5.24 dargestellt.

Tabelle 5.24: Validierungsdaten für ADP

^a Nachweisgrenze [nM]	1
^b Bestimmungsgrenze [nM]	10
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	7,43
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,014
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	0,19
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	7,43
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,02
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	0,29
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	7,43
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,02
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	0,24
Wiederfindungsrate [%]	100,1 ± 0. 9455
R ² der Wiederfindungsrate	0,9986
Mittelwert der Peakflächen (c = 150 nM, n = 10)	3232725
^c STABWN der Peakflächen	122446,49
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	3,79
Mittelwert der prozentualen Peakflächen	15,49
^c STABWN der Peakflächen	0,13
^d R.STABWN der Peakflächen	0,84

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmal so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

Die Validierung der Bestimmung von ATP führte zu folgenden Validierungsdaten (Tabelle 5.25).

Tabelle 5.25: Validierungsdaten der Bestimmung von ATP

^a Nachweisgrenze [nM]	1
^b Bestimmungsgrenze [nM]	10
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	5,71
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,04
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	0,68
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	5,81
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,05
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	0,78
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	5,76
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,06
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	1,11
Wiederfindungsrate [%]	100,0 ± 1,502
R ² der Wiederfindungsrate	0,9964
Mittelwert der Peakflächen (c = 150 nM, n = 10)	4480370,64
^c STABWN der Peakflächen	116952,03
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	2,61
Mittelwert der prozentualen Peakflächen	11,98
^c STABWN der Peakflächen	0,04
^d R.STABWN der Peakflächen	0,33

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmals so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

Die Validierungsdaten der Derivatisierung von UDP sind in Tabelle 5.26 dargestellt.

Tabelle 5.26: Validierungsdaten der Derivatisierung für UDP

^a Nachweisgrenze [nM]	9
^b Bestimmungsgrenze [nM]	20
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	5,61
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,067708
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	0,01
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	5,65
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,04
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	0,64
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	5,63
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,06
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	0,99
Wiederfindungsrate [%]	99,99 ± 4,635
R ² der Wiederfindungsrate	0,9728
Mittelwert der Peakflächen (c = 150 nM, n = 10)	3759996,3
^c STABWN der Peakflächen	208450,28
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	5,54
Mittelwert der prozentualen Peakflächen	10,68
^c STABWN der Peakflächen	0,04
^d R.STABWN der Peakflächen	0,41

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmals so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

Die Validierungsdaten der Derivatisierung von UTP gehen aus Tabelle 5.27 hervor.

Tabelle 5.27: Validierungsdaten der Derivatisierung von UTP

^a Nachweisgrenze [nM]	1
^b Bestimmungsgrenze [nM]	10
Mittelwert der Migrationszeit [min] 1. Tag (n = 10)	5,59
^c STABWN der Migrationszeit [min] 1.Tag	0,07806415
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 1. Tag	1,39
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2. Tag (n = 10)	5,83
^c STABWN der Migrationszeit [min] 2.Tag	0,19
^d R. STABWN der Migrationszeit [%] 2. Tag	3,31
Mittelwert der Migrationszeit [min] 2Tages-Vergleich (n = 20)	5,71
^c STABWN der Migrationszeit [min]	0,19
^d R. STABWN der Migrationszeit [%]	3,31
Wiederfindungsrate [%]	102,1 ± 3,568
R ² der Wiederfindungsrate	0,9808
Mittelwert der Peakflächen (c = 150 nM, n = 10)	3385619,2
^c STABWN der Peakflächen	123203,91
^d R.STABWN der Peakflächen [%]	3,63
Mittelwert der prozentualen Peakflächen	13,91
^c STABWN der Peakflächen	0,06
^d R.STABWN der Peakflächen	0,4

^aDer Substanzpeak ist mind. dreimal so groß wie das Grundrauschen

^bDer Substanzpeak ist mind. zehnmal so groß wie das Grundrauschen

^cSTABWN = Standardabweichung

^dR.STABWN = relative Standardabweichung

5.4.10 Diskussion

Die Umsetzung der Nucleotide mit dem BODIPY-Derivat **9** führte in allen Fällen zu reproduzierbaren Ergebnissen. Das Ziel, eine sehr empfindliche Methode zu erarbeiten, mit welcher Nucleotide nach der Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese durch Fluoreszenz-Detektion quantifiziert werden können, wurde erreicht. Die Detektionsgrenze und die Quantifizierungsgrenze sind für alle Nucleotide im niedrigen nanomolaren Bereich. Durch die Verwendung von 3,5-Disulfobenzoesäure als internem Standard wurde eine Methode erhalten, die auch für biologische Proben sehr gut geeignet ist.

Die Derivatisierung der Adenin-Nucleotide wies eine höhere Reproduzierbarkeit auf, als die der Uracil-Nucleotide, dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die zur Verfügung stehenden Adenin-Nucleotide über eine höhere Reinheit verfügen.

6 P2-Rezeptoren

Extrazelluläre Nucleotide, wie z.B. die Purin-Nucleotide ATP und ADP oder die Pyrimidin-Nucleotide UTP und UDP, binden an und aktivieren transmembranäre Rezeptoren der Zelle, die als P2-Rezeptoren bezeichnet werden. Die Familie der Nucleotid-Rezeptoren kann in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt werden. P2X-Rezeptoren sind ATP-aktivierte, ionotrope Rezeptoren, zu denen bis heute sieben identifizierte Säugetier-Rezeptorsubtypen zählen (P2X₁₋₇).^{80,81}

Bei der Familie der P2Y-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie beinhaltet zehn klonierte und funktionell charakterisierte Rezeptoren, von denen acht Subtypen in menschlichen Geweben exprimiert sind (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}).⁸² Anhand ihrer Aminosäuresequenzen können sie in zwei Gruppen unterteilt werden (P2Y_{1,2,4,6,11} und P2Y_{12,13,14}). Eine hohe Sequenzhomologie der Rezeptoren von 17-61% besteht besonders zwischen den transmembranären Regionen TM3, 6 und 7. Die Subtypen P2Y_{1,2,4,6} sind Phospholipase-C-gekoppelte Rezeptoren, deren Stimulierung zu einem Anstieg der intrazellulären IP₃-Konzentration und in Folge dessen der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Während der P2Y₁₁-Rezeptorsubtyp sowohl an eine Stimulierung der Adenylatcyclase als auch an eine Aktivierung der Phospholipase C gekoppelt sein kann, handelt es sich bei den P2Y_{12,13,14}-Subtypen um Gi-gekoppelte Rezeptoren, welche die Adenylatcyclase inhibieren.⁸²⁻⁸⁴ Die unterschiedlichen humanen P2Y-Rezeptorsubtypen werden von verschiedenen Nucleotiden aktiviert (Tabelle 6.1). P2Y₁, P2Y₁₂ und P2Y₁₃ sind ADP-Rezeptoren. P2Y₆ ist ein UDP-Rezeptor, während der physiologische Agonist am P2Y₁₄-Rezeptor UDP-Glucose ist. Der P2Y₂-Rezeptor wird von UTP und ATP mit gleicher Potenz, der P2Y₄-Rezeptor wird von UTP und der P2Y₁₁-Rezeptor wird von ATP aktiviert.

Tabelle 6.1: Humane P2Y-Rezeptorsubtypen

Rezeptor	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	P2Y ₁₄
Physiologische Liganden	ADP	UTP ATP	UTP	UDP	ATP	ADP	ADP	UDP-Glucose
Effektor	PLC	PLC	PLC	PLC	PLC; AC (G _s)	AC (G _i)	AC (G _i)	AC (G _i)

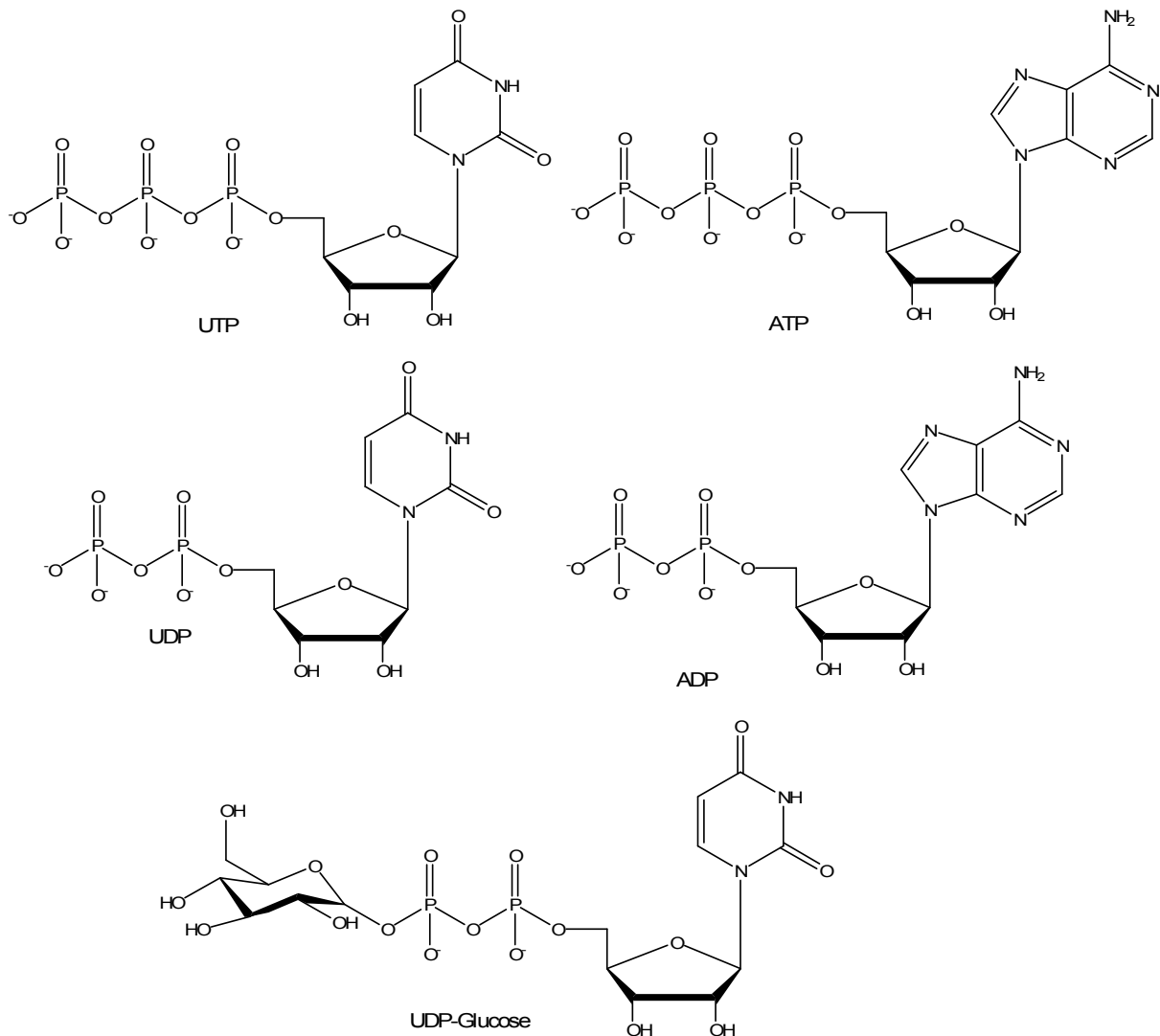


Abbildung 6.1: Physiologische Agonisten der P2Y-Rezeptoren

6.1 Verteilung P2Y-Rezeptoren

Der P2Y₁₂-Rezeptor wird im Gehirn und in Blutplättchen exprimiert. Garcia et al. wiesen den P2Y₁₂-Rezeptor in der INS-1 β -Zelllinie nach, welche in ihren Experimenten als Modell für die β -Zellen des Pankreas verwendet wurden.⁸⁵ Van Crombuggen et al. beschrieben die Expression von P2Y₁₂-Rezeptoren im Plexus myentericus, hierbei handelt es sich um Anhäufungen von Ganglien und von ihnen ausgehender Nervenfasern zwischen der Ring- (*Stratum circulare*) und Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale*) der glatten Muskulatur der Wand des Verdauungssystems.⁸⁶

P2Y₁-Rezeptoren findet man in Blutplättchen, in Blutgefäßen, in der glatten Muskulatur, im Hoden, in der Prostata, in den Ovarien, im Herzen und in neuronalen Geweben.⁸⁷

Die P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptoren gehören zu den Uracil-Nucleotid-aktivierten Rezeptoren. Der P2Y₂-Rezeptor ist der bisher am besten erforschte Uracil-Nucleotid-Rezeptor. Bei Mäusen wurde P2Y₂-Rezeptor-mRNA in der Milz, den Hoden, den Nieren, der Leber, dem Herz und dem Gehirn gefunden.⁸⁸ Bei Hunden wurde die P2Y₂-Rezeptor-mRNA in der Skelett-Muskulatur, der Milz, den Nieren, der Lunge und der Leber entdeckt.⁸⁹ P2Y₂-Rezeptoren werden von Zellen des Immunsystems, den T-Zellen und den Monozyten, exprimiert.^{90,91} Des Weiteren wurde er in Osteoblasten⁹² und in humaner Plazenta⁹³ nachgewiesen. Der P2Y₂-Rezeptor wurde aus Maus-⁸⁸, Ratten-⁹⁴, Hundegewebe⁸⁹ und humanem Gewebe⁹⁵ kloniert. Der humane Rezeptor ist in seiner Aminosäuresequenz zu 89% identisch mit dem Maus-Rezeptor.⁹⁵ Er wird von UTP und ATP aktiviert und scheint selektiv für Nucleotidtriphosphate zu sein. In der Literatur wird UDP entweder als schwacher partieller Agonist^{89,96,97} oder als inaktiv beschrieben,⁹⁸ während ADP und Nucleotidmonophosphate inaktiv sind. P2Y₂-Rezeptoren sind an G_q-Proteine gekoppelt. An den Epithelien der Atemwege, und den Epithelzellen der Gallenblase führt die Aktivierung der P2Y₂-Rezeptoren zur Öffnung Ca²⁺-abhängiger Chlorid-Kanäle welche an der Sekretion von Epithelflüssigkeit beteiligt sind. In verschiedenen Zelltypen des Auges wurde eine hohe P2Y₂-Rezeptor-Expression gefunden. Die Aktivierung dieser P2Y₂-Rezeptoren scheint die Hydratisierung der Augenoberfläche zu regulieren, indem es die Schleimbildung und die Chloridsekretion stimuliert.

Der P2Y₄-Rezeptor wurde aus humaner Plazenta^{99,100} und aus Rattenherzgewebe kloniert.^{101,102} Der P2Y₄-Rezeptor hat mehr Ähnlichkeit mit dem P2Y₂-Rezeptor als mit dem P2Y₆-Subtyp.¹⁰³ Eine hohe Rezeptordichte wurde in der Plazenta entdeckt, während in der Lunge und im vaskulären glatten Muskelgewebe nur eine geringe Rezeptordichte vorhanden ist. Eventuell spielt der Rezeptor bei der Immunabwehr eine Rolle.¹⁰³ Der humane P2Y₄-Rezeptor wird von UTP aktiviert. ATP wirkt viel schwächer und scheint ein partieller Agonist oder ein Antagonist zu sein. Im Gegensatz zum humanen P2Y₄-Rezeptor wird der P2Y₄-Rezeptor der Ratte von UTP und ATP gleichermaßen aktiviert. Andere Nucleosid-Triphosphate wie CTP, GTP und ITP wirken ebenfalls agonistisch am P2Y₄-Rezeptor der Ratte.^{104,105}

Die P2Y₆-Rezeptoren der Ratte,¹⁰⁶ der Maus¹⁰⁷ und des Menschen¹⁰⁸ wurden bisher kloniert. Der humane P2Y₆-Rezeptor zeigt in der Aminosäuresequenz eine 37%ige Übereinstimmung mit dem humanen P2Y₂-Rezeptor und eine 40%ige Übereinstimmung mit dem humanen P2Y₄-Rezeptor.¹⁰⁸ Der P2Y₆-Rezeptor wird in

der Milz, dem Dünndarm, dem Thymus, der Plazenta, der Lunge und in Leukozyten exprimiert^{103,108}. In der Ratte wurde P2Y₆-Rezeptor-mRNA in der Aorta, der Lunge, der Milz und im Darm gefunden.^{103,106} Viele Zelllinien wie Jurkat-T-Zellen, C6-2B-Ratten-Gliomazellen und humane Caco-2-Zellen exprimieren P2Y₆-Rezeptoren. In der Lunge wurden P2Y₆-Rezeptoren zusammen mit P2Y₂-Rezeptoren gefunden. Eine P2Y₆-Rezeptor Aktivierung bei Monozyten führt zu einer Interleukin-8-Produktion, welches an der Immunabwehr beteiligt ist.¹⁰⁹ Der P2Y₆-Rezeptor der Gallenblase ist möglicherweise ein Target für die Therapie der Mukoviszidose.¹⁰⁷ Der P2Y₁₁-Rezeptor spielt eine Rolle bei der Neutropenie,¹¹⁰ dem akutem Myokard-Infarkt¹¹¹ und beim Reifeprozess von Dendritenzellen.¹¹² Die Aminosäuresequenz des P2Y₁₁-Rezeptors ist zu 33% mit der des P2Y₁-Rezeptors identisch. Der P2Y₁₃-Rezeptor ist, wie auch der P2Y₁₂-Rezeptor, G_i-Protein gekoppelt. Der Rezeptor wird vor allem im Gehirn und in der Milz exprimiert, was zur Annahme geführt hat, dass er vor allem im Nervensystem und im Immunsystem eine Rolle spielt. Communi et al. definierten 2001 den P2Y₁₃-Rezeptor als ADP-Rezeptor.¹¹³ Dieses Ergebnis wurde, unter Verwendung eines anderen Expressionsystems, von Zhang et al. 2002 bestätigt.¹⁵ Die Aminosäuresequenz des P2Y₁₃-Rezeptors ist zu 48% mit der des P2Y₁₂-Rezeptors identisch.

6.2 Therapeutisches Potential der P2Y-Rezeptoren

Aus der Gewebeverteilung und der Funktion der P2Y-Rezeptoren ergeben sich eine Reihe möglicher Therapieansätze (Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten für P2Y-Rezeptorliganden

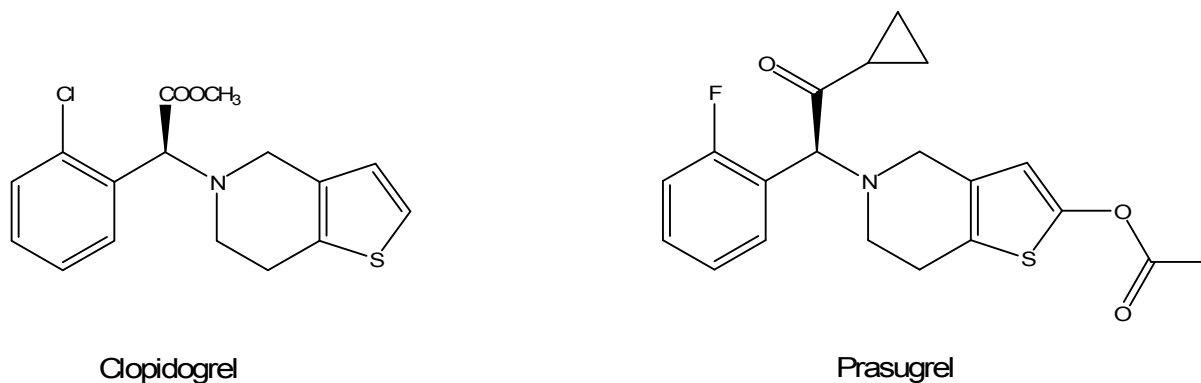
Rezeptor	Therapeutisches Potential	
	Agonist	Antagonist
P2Y ₁	Neuroprotektion ¹¹⁴	Thrombozytenaggregation, ¹¹⁵ Schmerz, ¹¹⁶ Osteoporose ¹¹⁷
P2Y ₂	Neuroprotektion, ¹¹⁸ Glaukom, ¹¹⁹ Tumore, ¹²⁰⁻¹²² Gallensekretion, ¹²³ Mukoviszidose, ¹²⁴ Trockenes Auge ¹²⁵	Arteriosklerose, ^{126,127} Inhibition der Chemotaxis, ¹²⁸ Bluthochdruck, ¹²⁹ Nierenerkrankungen ¹³⁰

Rezeptor	Therapeutisches Potential	
	Agonist	Antagonist
P2Y₄	Tumore ¹³¹	
P2Y₆	Mukoviszidose, ¹²³ Diabetes Mellitus Typ 2, ¹³² Glaukom ¹³³	Entzündliche Darmerkrankung, ¹³⁴ Osteoporose ¹³⁵
P2Y₁₁		Inhibition der Chemotaxis ¹²⁸
P2Y₁₂		Thrombozytenaggregation ¹¹⁵

Für den P2Y₁₂- und den P2Y₂-Rezeptor sind bereits verschiedene Wirkstoffe auf dem Markt, beziehungsweise in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Prüfung.

6.2.1 Blutplättchenaggregation

Adenin-Nucleotide beeinflussen die Blutplättchenaggregation indem sie mit drei verschiedenen Rezeptoren interagieren: dem P2Y₁-, dem P2Y₁₂- und dem P2X₁-Rezeptor. Die gleichzeitige Stimulierung der beiden P2Y-Rezeptoren induziert die Blutplättchenaggregation.¹³⁶ Die P2Y₁-Rezeptor Aktivierung ist zum Teil an der Änderung der Gestalt der Thrombozyten beteiligt.¹³⁶ ADP ist ein voller Agonist am P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor. ATP-Derivate wirken am P2Y₁₂-Rezeptor antagonistisch. Clopidogrel, ein P2Y₁₂-Antagonist, wird für die Thrombozytenaggregationshemmung eingesetzt. Durch die Blockierung der Bindung von ADP an seine Rezeptoren unterbleibt die ADP-induzierte Vernetzung der Thrombozyten über den GP-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex, so dass die Thrombozytenaggregation gehemmt wird. Neben der Langzeitanwendung zur Thrombozytenaggregationshemmung bei Patienten mit Unverträglichkeit gegen Acetylsalicylsäure wird diese Substanzklasse zur Vorbeugung von Restenosen bei Stent-Implantationen eingesetzt.¹³⁷ Prasugrel, welches wie Clopidogrel zur Substanzklasse der Thienopyridine gehört, wirkt stärker und schneller als Clopidogrel¹³⁸ und ist seit Februar 2009 auf dem europäischen Markt.

Abbildung 6.2: P2Y₁₂-Antagonisten

6.2.2 Cystische Fibrose (Mukoviszidose)

Denufosol, ein selektiver P2Y₂-Rezeptoragonist, befindet sich zur Zeit in der klinischen Phase III zur Behandlung der Mukoviszidose.¹³⁹ Studien, in denen Denufosol zur Behandlung des trockenen Auges eingesetzt wurde, wurden wieder eingestellt.

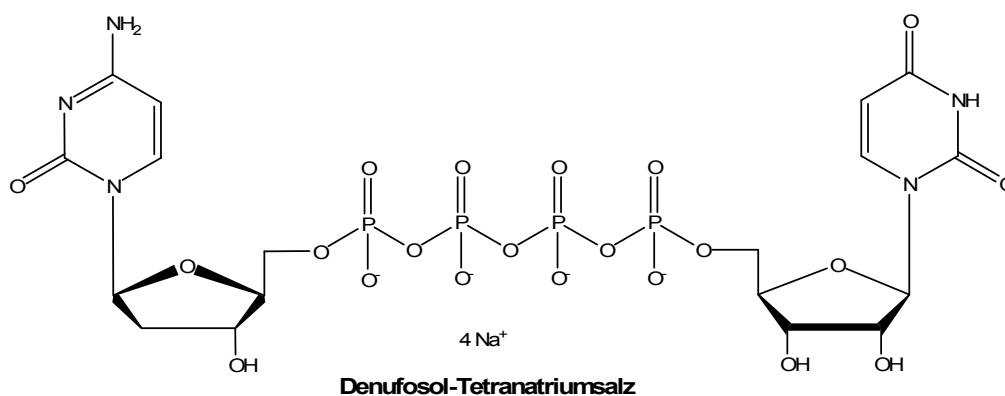


Abbildung 6.3: Denufosol-Tetranatriumsalz

6.2.3 Trockenes Auge

Für Diquafosol Tetranatriumsalz zur Behandlung des trockenen Auges ist die Zulassung beantragt.

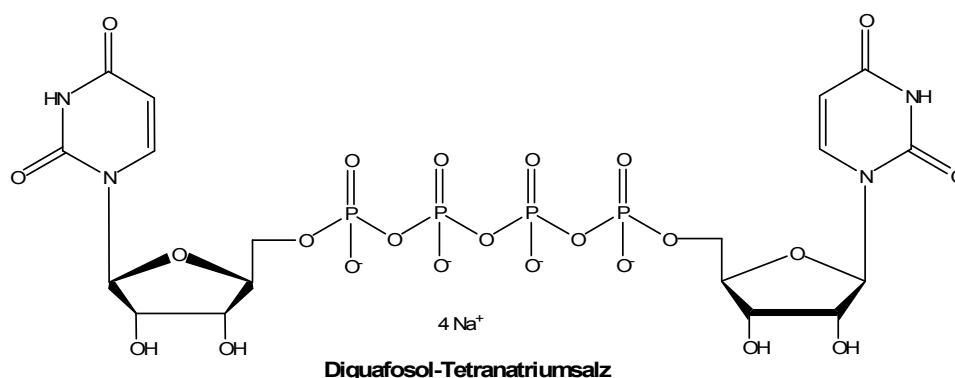


Abbildung 6.4: Diquafosol-Tetranatriumsalz

6.3 Variation der Phosphatkette

Um die chemische und metabolische Stabilität von P2Y-Rezeptoragonisten zu erhöhen, wurde die Phosphatkette modifiziert. UTP γ S (Abbildung 6.5) zeigte eine erhöhte metabolische Stabilität im Vergleich zu UTP.¹⁴⁰ Es war am P2Y₂-Rezeptor nahezu so potent wie UTP selbst. Eine Selektivität von UTP γ S war nicht gegeben, da es auch am P2Y₄-Rezeptor Aktivität aufwies. Die gleiche Modifikation von ATP, welche zu ATP γ S (Abbildung 6.5) führte, hatte am P2Y₂-Rezeptor eine 75fach geringere Aktivität,⁹⁷ am P2Y₁-Rezeptor jedoch war es ein etwas stärkerer Agonist als ATP.¹⁴¹ ADP β S (Abbildung 6.5) war ein potenter Agonist am P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor.¹⁴¹ Adenosin-5'-(α -boranotriphosphat)-Derivate, wie zum Beispiel das 2-Methylthio-substituierte Derivat (Abbildung 6.6), waren wirksame Agonisten am P2Y₁-Rezeptor.¹⁴²

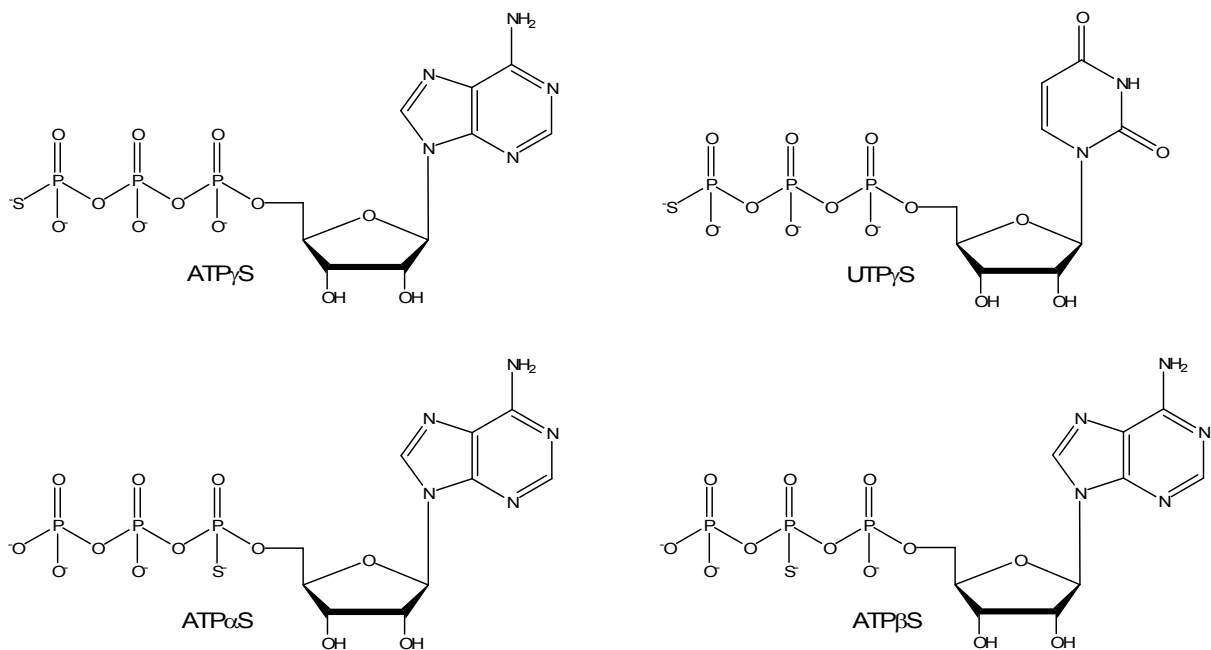


Abbildung 6.5: Thiophosphate

Die Phosphatkette von UTP wurde weiter verändert, indem die β,γ -Sauerstoffbrücke durch eine NH-, CH₂- oder eine CF₂-Brücke ersetzt wurde, man erhielt β,γ -Imido-UTP (Abbildung 6.6, UppNHp), β,γ -Methyl-UTP (Abbildung 6.6, UppCH₂p) und β,γ -Difluormethyl-UTP (Abbildung 6.6, UppCF₂p). Alle diese Modifikationen führten zu einer Abnahme der Aktivität am P2Y₂-Rezeptor. Die Testung von β,γ -Imido-ATP (Abbildung 6.6, AppNHp) zeigte parallele Effekte. α,β -Methyl-ATP (Abbildung 6.6, AppCH₂pp) und ATP α S (Abbildung 6.5) waren am P2Y₂-Rezeptor inaktiv^{97,143}. β,γ -

Methyl-ATP (Abbildung 6.6, AppCH₂p) war ebenfalls inaktiv. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die α,β -Sauerstoffbrücke und die β,γ -Sauerstoffbrücke als Wasserstoffbrücken-Bindungsakzeptoren für die Bindung am P2Y₂-Rezeptor vorhanden sein müssen.

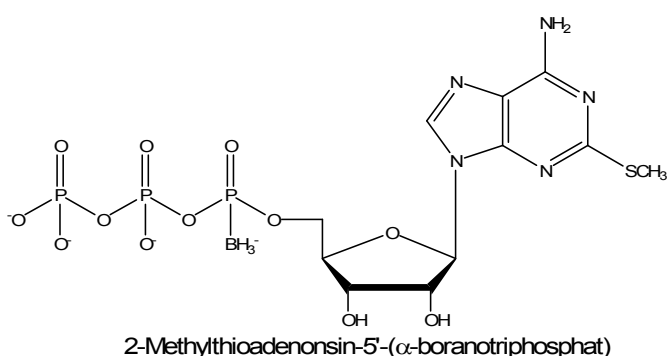
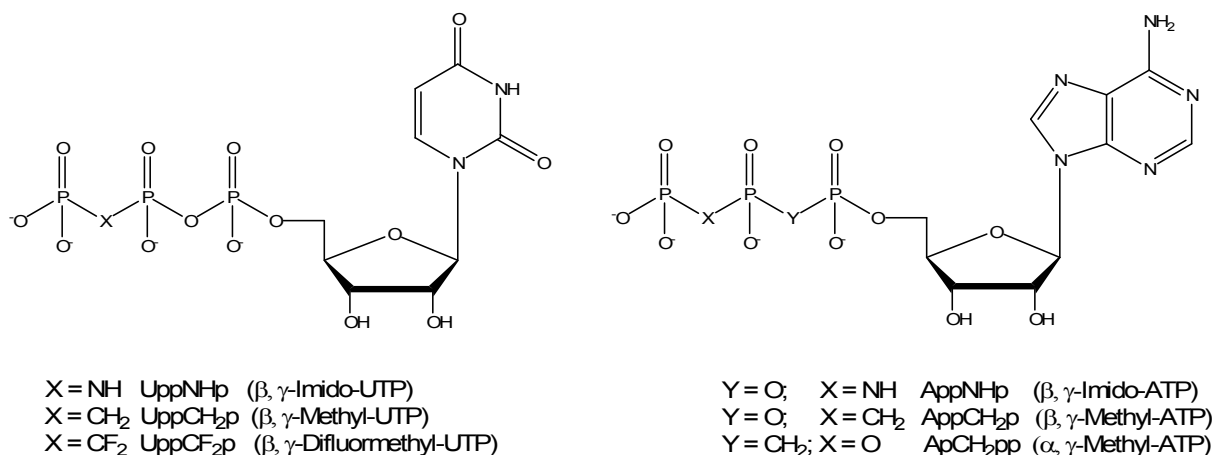


Abbildung 6.6: ATP- und UTP-Derivate mit modifizierten Phosphatketten

6.4 Dinucleotide

Diadenosinpolyphosphate sind physiologisch vorkommende Substanzen. Die Substanzklasse ist am P2Y₂-Rezeptor relativ potent, die aktivste Substanz ist Ap₄A.^{143,144} Wie ATP und UTP besitzt Ap₄A vier negative Ladungen bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 und ist nur 3fach weniger potent als ATP. Ap₄A ist nicht P2Y₂-Rezeptor-selektiv, es interagiert auch mit P2Y₄- und P2X-Subtypen.¹⁴⁵ Ap₃A, ist ein potenter Agonist des P2Y₁-Rezeptors, dessen natürlicher Agonist ADP ist. Up₄U zeigt am P2Y₂-Rezeptor die gleiche Aktivität wie UTP.¹⁴⁶ Up₄U ist auch unter dem Trivialnamen Diquafosol bekannt (siehe Kapitel 6.2.3). Die gleichen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden am P2Y₄-Rezeptor beobachtet. Up₃U ist ein Agonist am P2Y₆-Rezeptor.¹⁴⁷

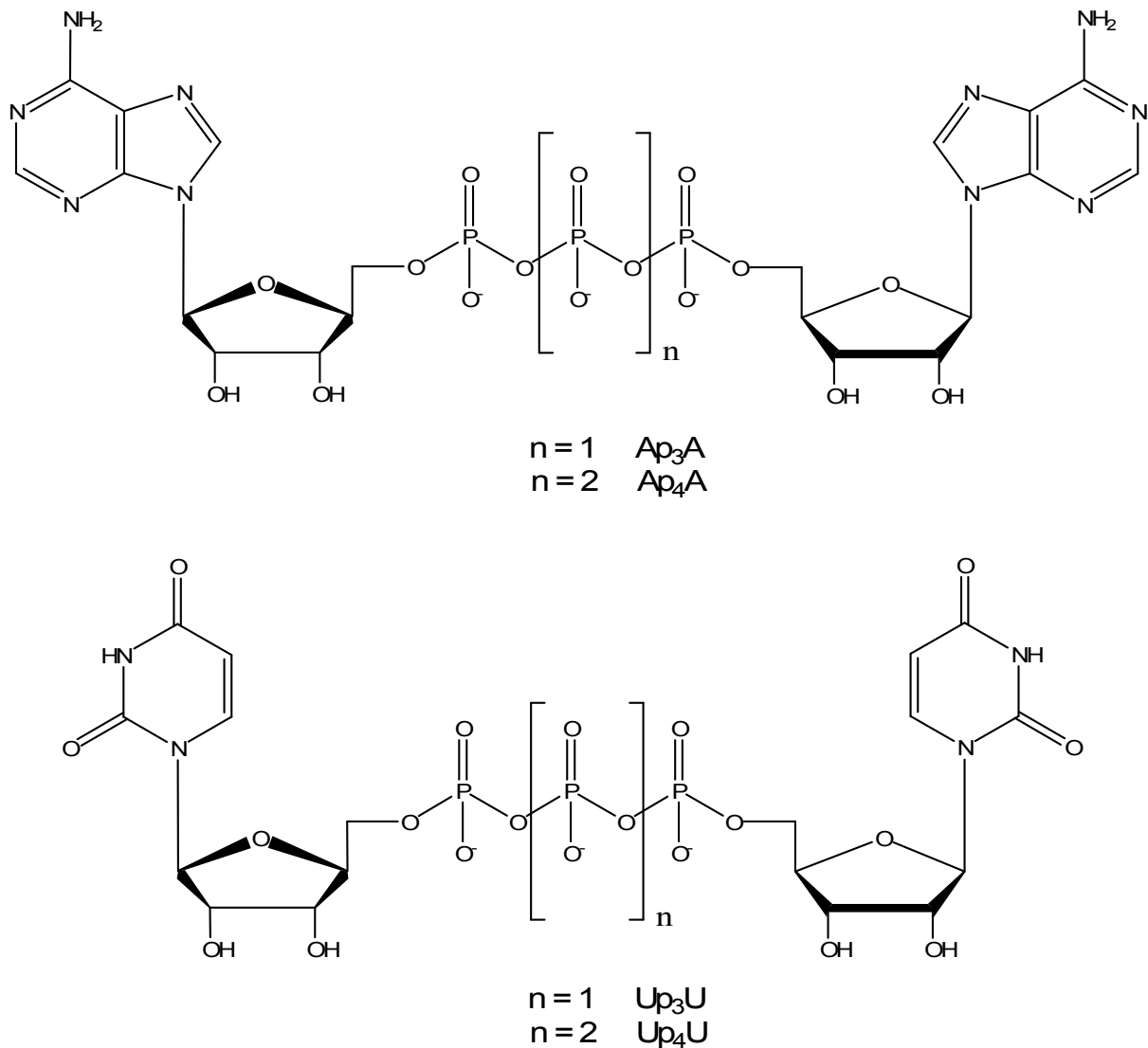


Abbildung 6.7: Diadenosin- und Diuridinpolyphosphate

Cytosin-Nucleotide haben an den P2Y-Rezeptoren nur einen schwachen Effekt. Die Erwartung, dass die entsprechenden symmetrischen Dinucleotide welche Cytidin oder Deoxycytidin enthalten ebenfalls nur schwach wirksam sind, wurde bestätigt.¹⁴⁷ Gemischte Dinucleotide weisen eine gewisse Selektivität auf. Ap_4C hat den stärksten Effekt am P2Y₁-Rezeptor und Up_4C weist am P2Y₂-Rezeptor die höchste Aktivität auf.¹⁴⁷ Ein Vorteil der Dinucleotide gegenüber den Mononucleotiden ist die höhere chemische und metabolische Stabilität.¹⁴⁷ Diadenosinpolyphosphate werden zu ATP, ADP, AMP und weiter zu Adenosin abgebaut.¹⁴⁸ Der Abbau von Uracil-Nucleotiden verläuft langsamer als der der Adenin-Nucleotide.¹⁴⁹ Nahum et al. synthetisierten Diadenosin- und Diuridin-Polyboranophosphat-Analoga um die Stabilität weiter zu erhöhen.¹⁵⁰

6.5 Entwicklung neuer P2Y-Rezeptor-Liganden

Die Modifizierung der Phosphatkette durch eine Phosphoramid-Verknüpfung stellt eine weitere Variante für neue P2Y-Liganden dar. Aufgrund dessen, dass die ATP- und UTP-Derivate jeweils über eine Ladung weniger verfügen als die nicht derivatisierten Nucleotide, wurde erwartet, dass die ADP- oder UDP sensitiven Rezeptoren P2Y₁, P2Y₆, und P2Y₁₂-Rezeptoren potentielle Targets für die neu synthetisierten Verbindungen darstellten. Es wurden verschiedene Aminosäureethylester, Aminodicarbonsäureester, sowie aromatische Amine über eine Phosphoramid-Bildung an das γ -Phosphat von ATP oder UTP geknüpft.

7 Synthese von Nucleotid-Derivaten

7.1 Synthese von Phosphoramiden

Bei der Darstellung von Phosphoramiden im präparativen Maßstab wurde die für die Fluoreszenz-Derivatisierung von Nucleotiden entwickelte Methode modifiziert. Die Konzentration der einzelnen Reaktanden wurde deutlich erhöht, um eine hohe Umsatzrate zu erreichen. ATP oder UTP (0,2 mmol) wurden unter Verwendung von N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl (EDC, 7,5facher Überschuss) als Kupplungsreagenz mit verschiedenen Aminen (7facher Überschuss) umgesetzt. Der bedeutende Vorteil von EDC als Kupplungsreagenz besteht darin, dass die Reaktion im wässrigen Milieu abläuft, während andere zu Verfügung stehende Carbodiimide wie zum Beispiel Dicyclohexylcarbodiimid oder Diisopropylcarbodiimid in wässrigen Medien nicht löslich sind. Durch die Verwendung eines wässrigen 1-Methylimidazol-Puffers als Lösungsmittel konnten die Nucleosidtriphosphate, welche als Natriumsalze vorlagen, direkt eingesetzt werden und mussten nicht in organische Salze wie zum Beispiel Tributylammoniumsalze überführt werden. Die Reaktion zeigte anfänglich jedoch nur sehr geringe Ausbeuten. Erst durch ein wiederholtes Zugeben einer frisch hergestellten EDC-Lösung nach 12 Stunden konnten die Ausbeuten verbessert und die Produkte isoliert werden.⁷⁸

7.1.1 Aufreinigung der Phosphoramide

Beim Abdestillieren des hochsiedenden Lösemittelgemisches (DMF, H₂O) aus der Reaktionslösung war es wichtig, bei T < 40°C und im Hochvakuum zu arbeiten, da sonst die synthetisierten Phosphoramide wieder zum jeweiligen Ausgangsnucleotid hydrolysieren können. Dies konnte allerdings nicht vollständig verhindert werden, außerdem war die Umsatzrate der Reaktion zwar sehr gut, jedoch läuft die Reaktion nie zu 100% ab, so dass die Aufgabe darin bestand, das über eine Ladung weniger verfügende Phosphoramid vom Triphosphat zu trennen.

In der Literatur wird dieses Trennproblem meist durch mehrere aufeinander folgende Reinigungsschritte gelöst.¹⁵¹ Die Anionenaustauschchromatographie spielt hierbei die entscheidende Rolle. Unter Verwendung von unterschiedlichen positiv geladenen Ionentauschern, welche über Diethylaminoethyl-Reste verfügen (z.B. DEAE-Sephadex-A25,^{152,153} DEAE-Cellulose^{154,155} oder DEAE-Toyo-pearl¹⁵⁶) können die

Nucleotid-Mono-, Di- und Triphosphate aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung aufgetrennt werden. Je nach Ladungsanzahl werden die Nucleotide unterschiedlich stark von der Säulenmatrix zurückgehalten und dann mit zunehmender Konzentration des Elutionspuffers eluiert. Aufgrund der hohen Pufferkonzentrationen, die bei der Ionenaustauschchromatographie angewandt werden, ist in der Regel dann noch eine Entsalzung dieser Fraktionen notwendig. Hierzu bietet sich eine präparative Rp-HPLC-Methode an. Bei allen chromatographischen Schritten muss darauf geachtet werden, dass nur Lösemittel bzw. Puffer (z.B. Acetat-, Formiat- oder Hydrogencarbonat-Puffer) zum Einsatz kommen, die nach der Trennung der Produkte wieder aus dem Gemisch entfernt werden können. Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit der Triphosphate sollte dies unter möglichst milden Bedingungen geschehen (z.B. durch Gefriertrocknung).

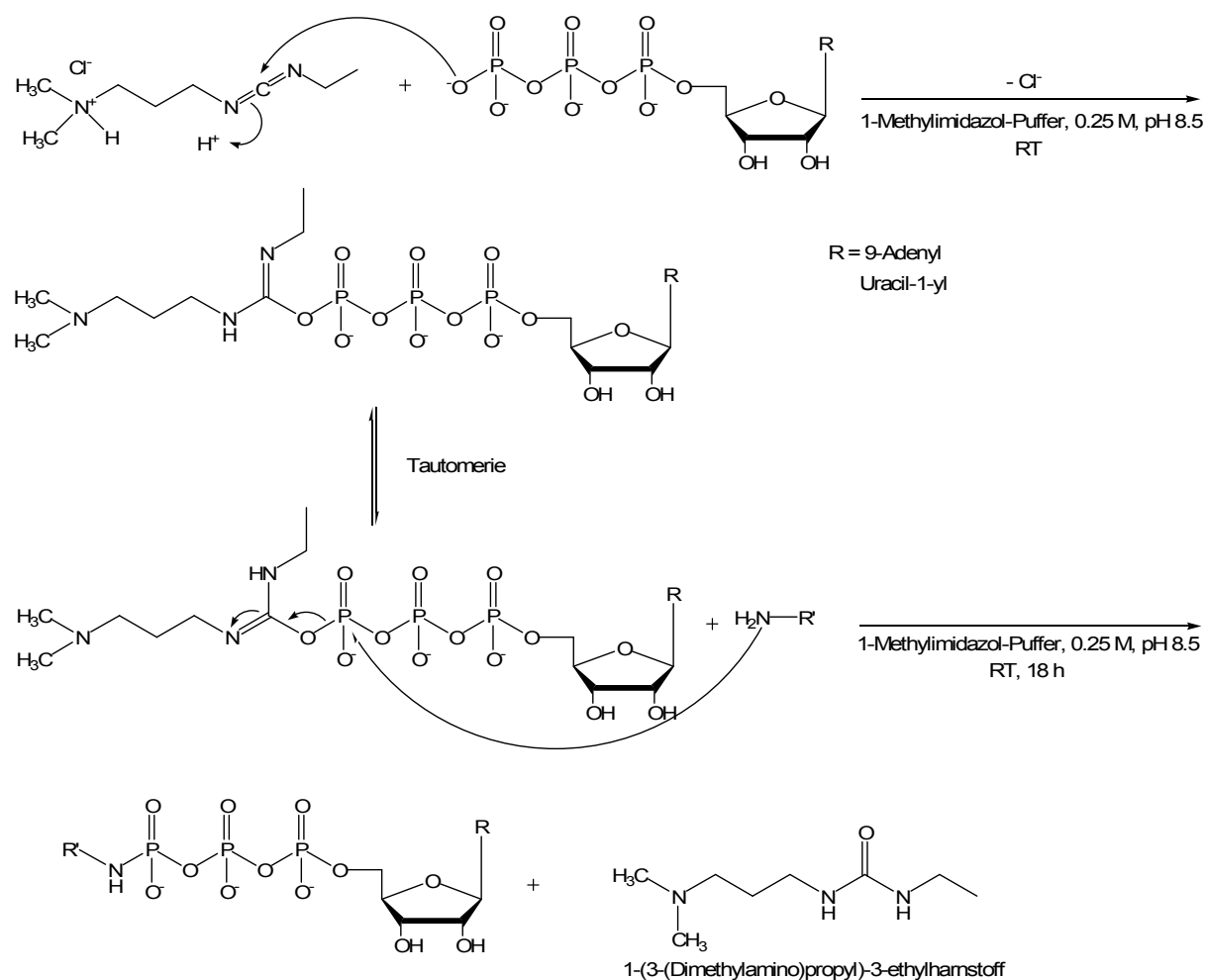
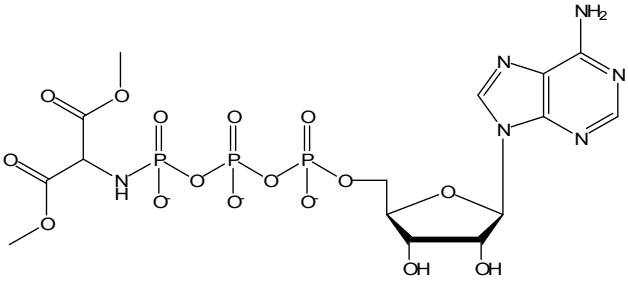
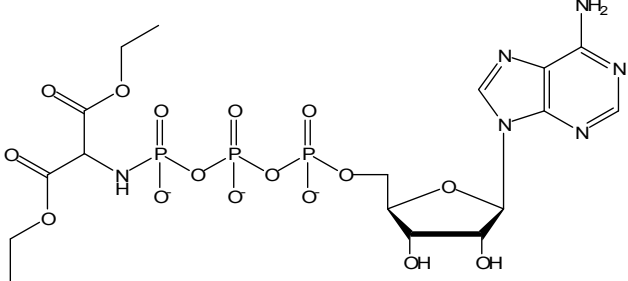
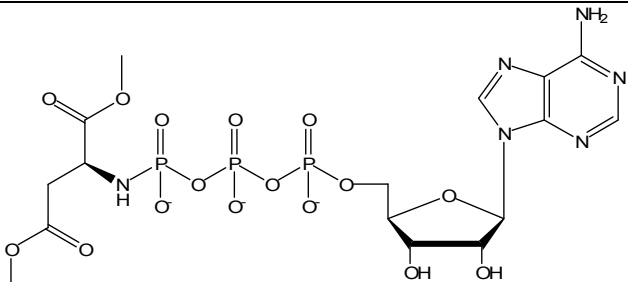
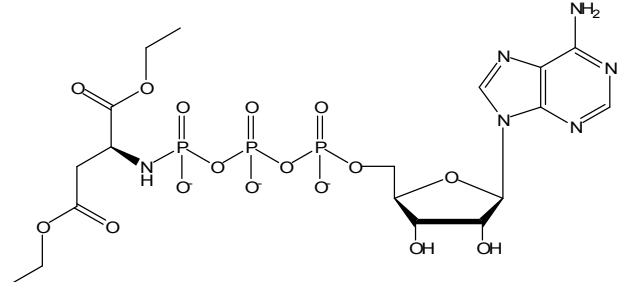


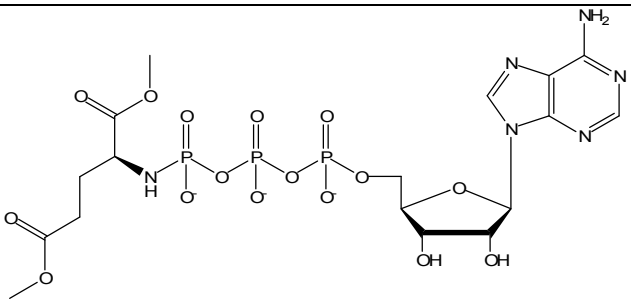
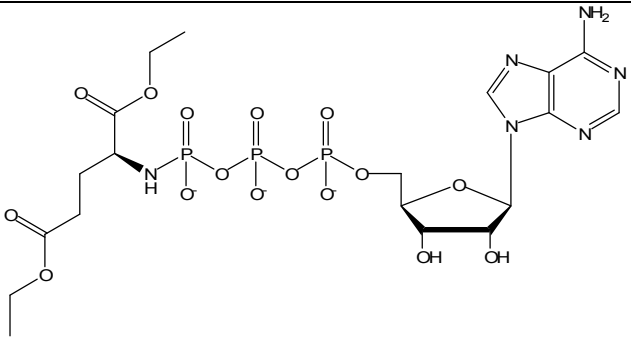
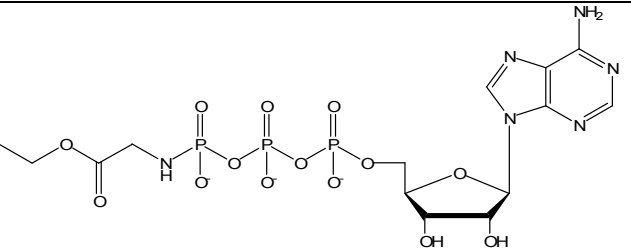
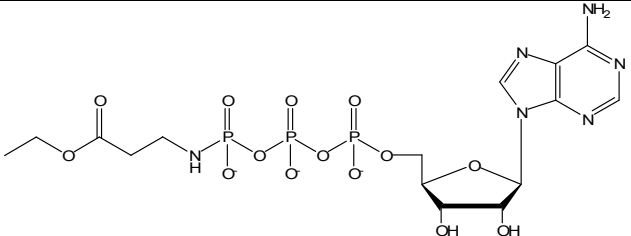
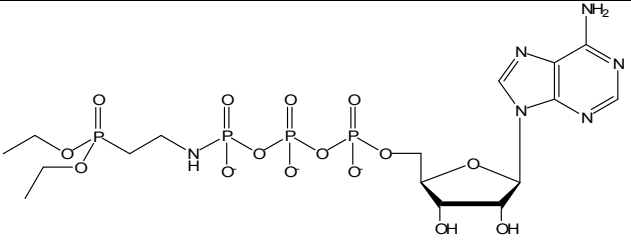
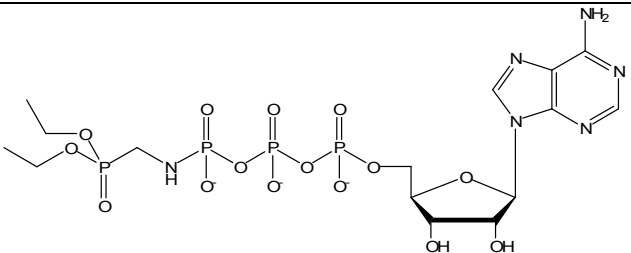
Abbildung 7.1: Synthese von Phosphoramiden

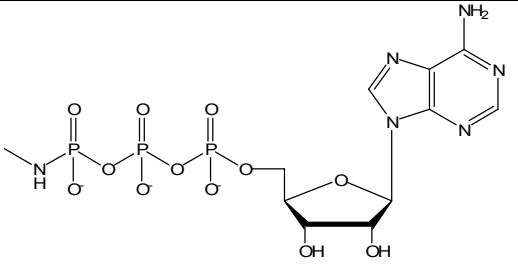
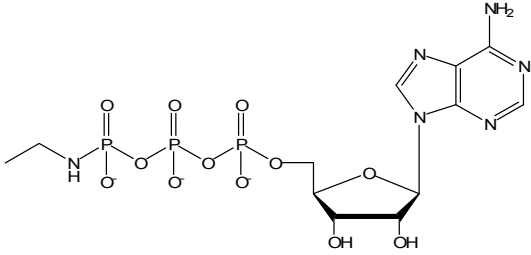
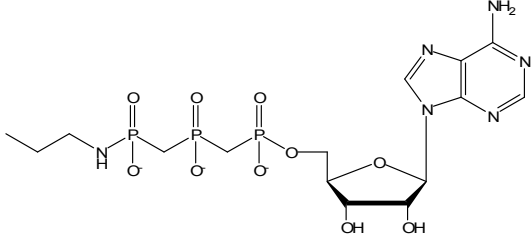
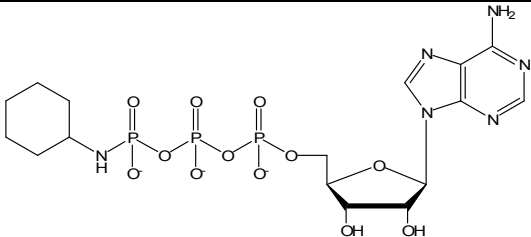
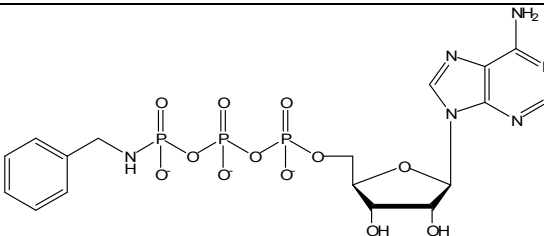
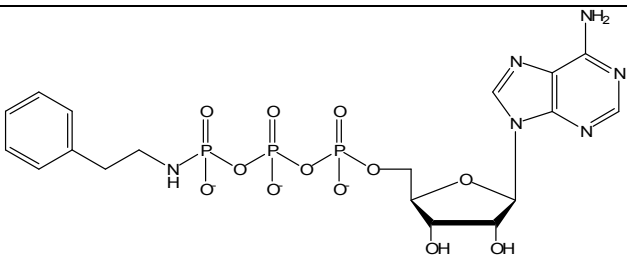
7.1.2 Umsetzung von ATP

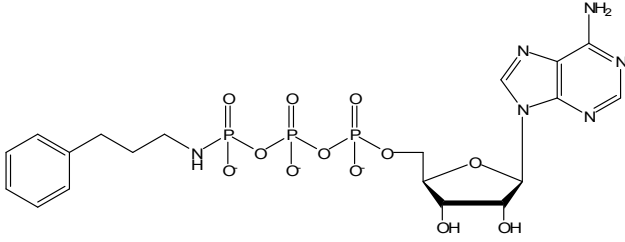
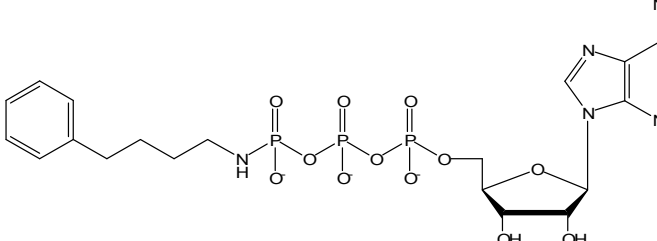
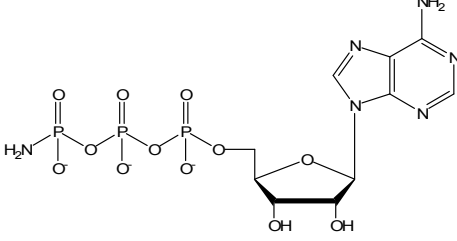
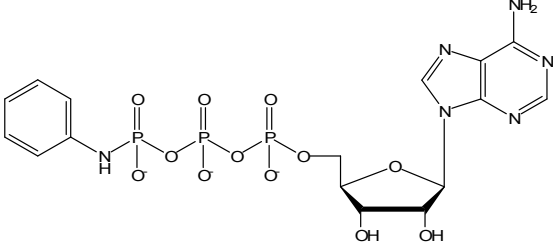
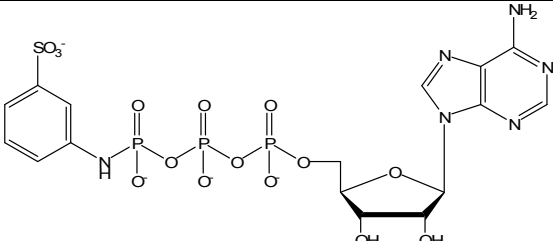
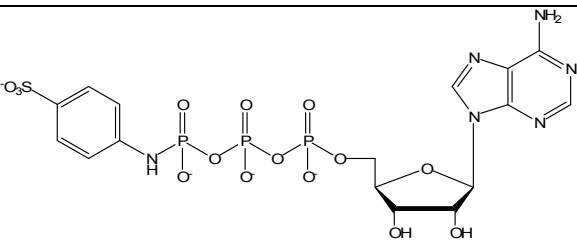
Durch die Umsetzung von ATP mit verschiedenen Aminen gelangte man zu den Produkten **10-33**

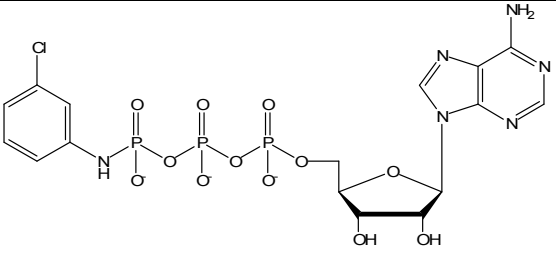
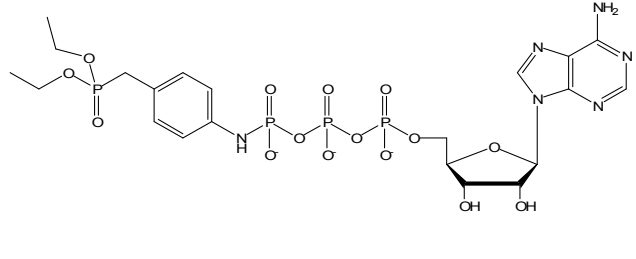
Tabelle 7.1: Reaktionsprodukte der Umsetzung von ATP mit verschiedenen Aminen

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
	<p style="text-align: center;">Amino- malonsäuredimethylester- HCl</p>	10
	<p style="text-align: center;">Amino- malonsäurediethylester- HCl</p>	11
	<p style="text-align: center;">S-Asparaginsäure- dimethylester- HCl</p>	12
	<p style="text-align: center;">S-Asparaginsäure- diethylester- HCl</p>	13

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
	S-Glutaminsäure- dimethylester- HCl	14
	S-Glutaminsäure- diethylester- HCl	15
	Glycinethylester- HCl	16
	β -Alaninethylester- HCl	17
	Diethyl- (2-aminoethyl)phosphonat- HCl	18
	Diethyl- (2-aminomethyl)phosphonat- HCl	19

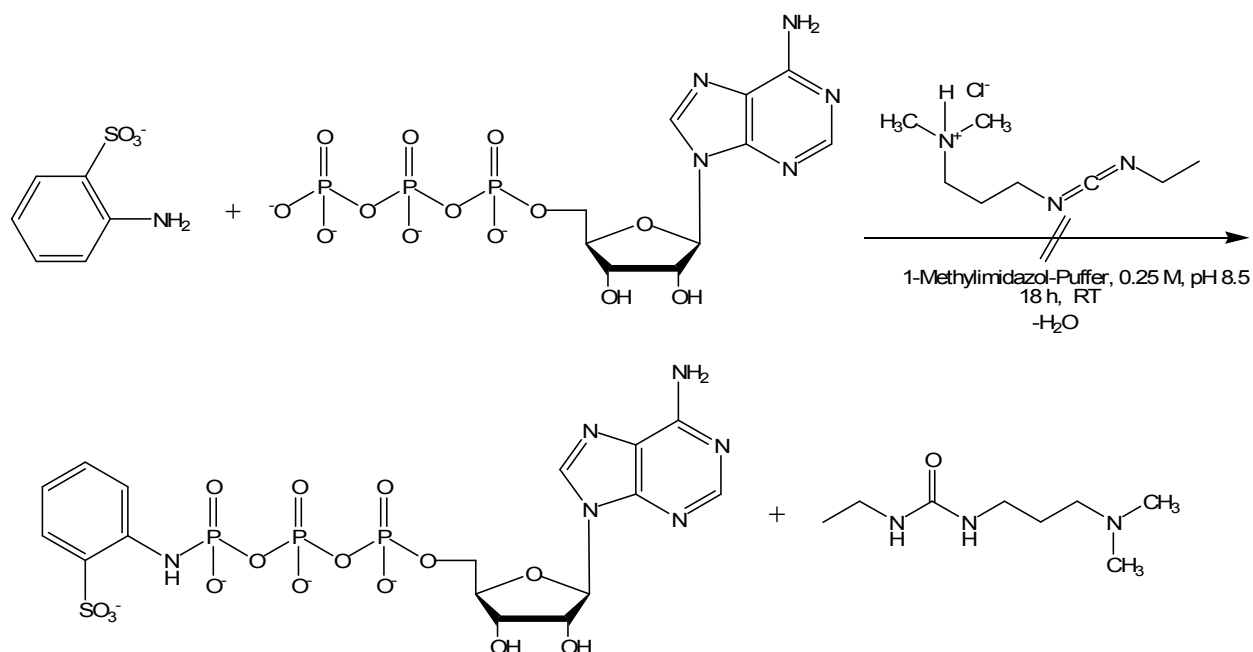
Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
 <p>The structure shows a methylamino group (CH₃NH-) attached to the gamma phosphate of ATP. The ATP backbone consists of three phosphate groups linked by oxygen atoms, with the terminal phosphate connected to the 5' carbon of a ribose sugar. The ribose sugar is linked to the adenine base at the 1' position. The adenine base has an amino group (NH₂) at the 6-position.</p>	Methylamin- HCl	20
 <p>The structure shows an ethylamino group (CH₃CH₂NH-) attached to the gamma phosphate of ATP. The rest of the molecule (ATP backbone and adenine base) is identical to the methylamin-ATP structure.</p>	Ethylamin- HCl	21
 <p>The structure shows a propylamino group (CH₃CH₂CH₂NH-) attached to the gamma phosphate of ATP. The rest of the molecule is identical to the ethylamin-ATP structure.</p>	Propylamin	22
 <p>The structure shows a cyclohexylamino group (a cyclohexane ring attached to an NH-) attached to the gamma phosphate of ATP. The rest of the molecule is identical to the ethylamin-ATP structure.</p>	Cyclohexylamin	23
 <p>The structure shows a benzylamino group (a benzene ring attached to a CH₂NH-) attached to the gamma phosphate of ATP. The rest of the molecule is identical to the ethylamin-ATP structure.</p>	Benzylamin	24
 <p>The structure shows a 2-phenylethylamino group (a benzene ring attached to a CH₂CH₂NH-) attached to the gamma phosphate of ATP. The rest of the molecule is identical to the ethylamin-ATP structure.</p>	2-Phenylethylamin	25

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
 <p>The structure shows a benzene ring attached to a three-carbon propyl chain. The terminal carbon of the propyl chain is bonded to the nitrogen of a primary amine group (-NH₂). This amine group is linked to a triphosphate chain (three phosphate groups connected in series), which is in turn attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The ribose sugar is also attached to the adenine base at the 1' position.</p>	3-Phenylpropylamin	26
 <p>The structure is similar to the previous one, but the propyl chain is replaced by a four-carbon butyl chain. The terminal carbon of the butyl chain is bonded to the nitrogen of a primary amine group (-NH₂), which is linked to a triphosphate chain, which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The ribose sugar is also attached to the adenine base at the 1' position.</p>	4-Phenylbutylamin	27
 <p>The structure shows a primary amine group (-NH₂) attached to a triphosphate chain, which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The ribose sugar is also attached to the adenine base at the 1' position.</p>	Ammoniumchlorid	28
 <p>The structure shows an aniline group (a benzene ring attached to a primary amine group, -NH₂) attached to a triphosphate chain, which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The ribose sugar is also attached to the adenine base at the 1' position.</p>	Anilin	29
 <p>The structure shows a methanesulfonic acid group (a benzene ring with a sulfonate group, -SO₃⁻, at the 3-position and a primary amine group, -NH₂, at the 1-position) attached to a triphosphate chain, which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The ribose sugar is also attached to the adenine base at the 1' position.</p>	Metanilsäure	30
 <p>The structure shows a sulfanilic acid group (a benzene ring with a sulfonate group, -SO₃⁻, at the 4-position and a primary amine group, -NH₂, at the 1-position) attached to a triphosphate chain, which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The ribose sugar is also attached to the adenine base at the 1' position.</p>	Sulfanilsäure	31

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
	3-Chloranilin	32
	Diethyl- (4-aminobenzyl)phosphonat- HCl	33

Die Reaktion von Aminomalonsäuredimethylester-HCl, Ethylamin-HCl, Propylamin, 2-Phenylethylamin und 3-Phenylpropylamin mit ATP führte zwar zu den jeweiligen Phosphoramiden **10**, **21**, **22**, **25** und **26** durch die LC/MS-Analyse konnte die gewünschte Masse detektiert werden, jedoch konnten die Produkte nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden. Vermutlich zersetzten sich die beiden Substanzen während der Aufreinigung in die Edukte. So wurde bei den Analysen mittels LC/MS jeweils eine Verunreinigung von ca. 20% ATP gefunden, auch die wiederholte Aufreinigung führte nicht zur gewünschten Reinheit.

Überraschenderweise reagierte ATP mit Sulfanilsäure zu **31**, obwohl durch die Sulfonsäuregruppe in para-Stellung ein phenyloges Sulfonamid vorliegt, was die Reaktionsfähigkeit der Aminofunktion stark herabsetzt. Die Reaktion mit o-Sulfanilsäure führte hingegen zu keiner Umsetzung. Eine Erklärung hierfür ist zum einen der stärker ausgeprägte vinyloge Sulfonamidcharakter, sowie die sterische Hinderung der Aminofunktion.

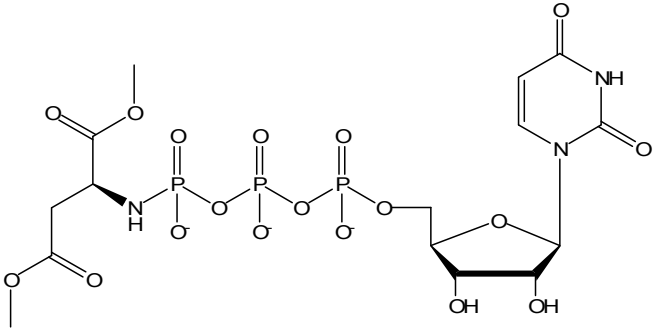
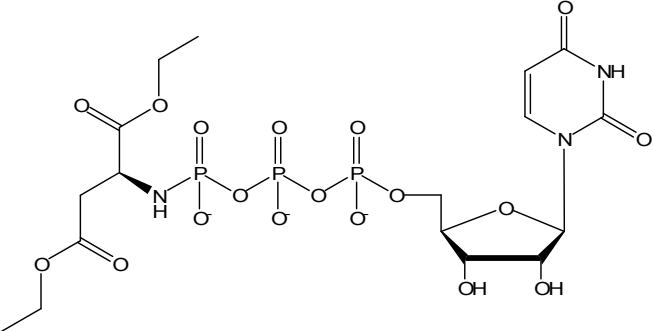
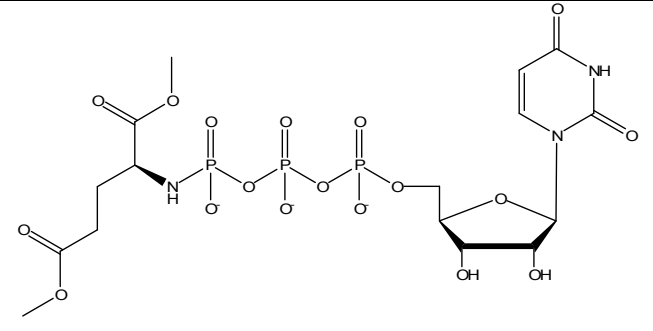
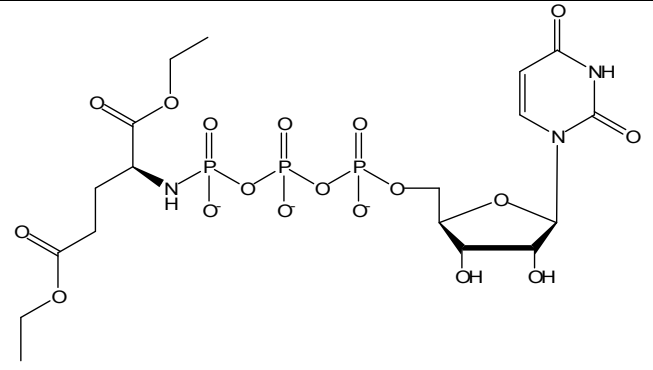
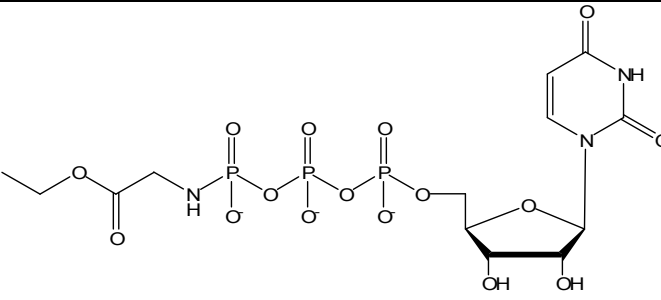
Abbildung 7.2: Gescheiterte Reaktion mit *o*-Sulfanilsäure

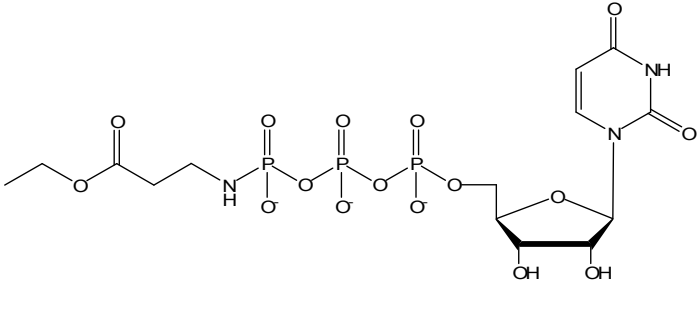
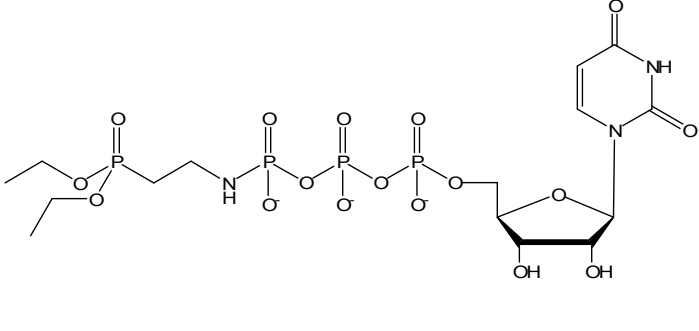
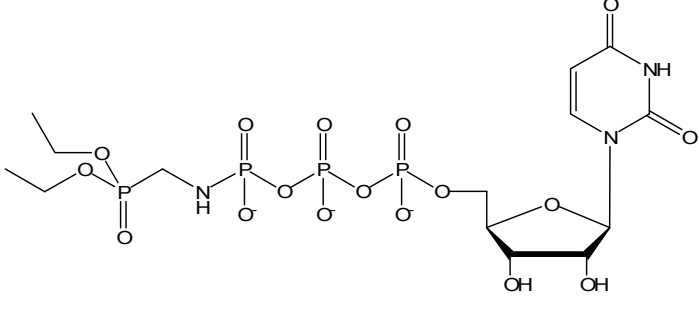
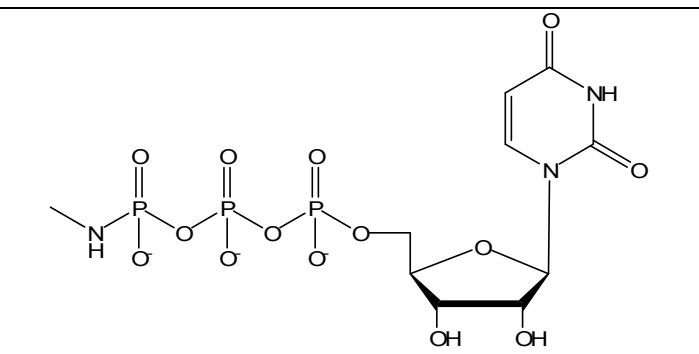
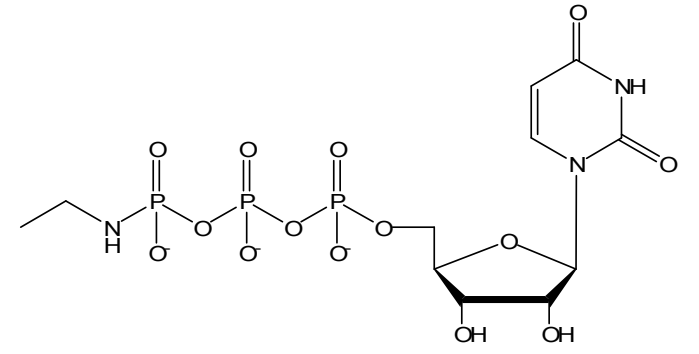
7.1.3 Umsetzung von UTP

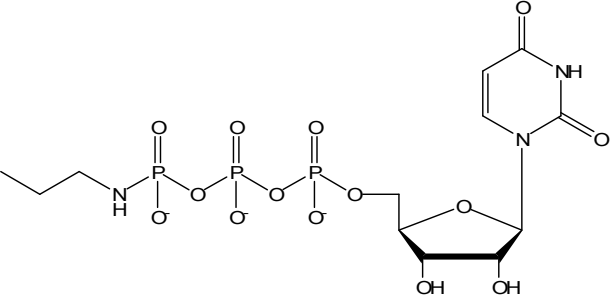
Die Reaktion von UTP mit verschiedenen Alkylaminen führte zu den Produkten **34-46**.

Tabelle 7.2: Reaktionsprodukte der Umsetzung von UTP mit verschiedenen Aminen

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
	Aminomalonsäure-dimethylester-HCl	34
	Aminomalonsäure-diethylester-HCl	35

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
	S-Asparaginsäure- dimethylester-HCl	36
	S-Asparaginsäure- Diethylester-HCl	37
	S-Glutaminsäure- dimethylester-HCl	38
	S-Glutaminsäure- diethylester-HCl	39
	Glycinethylester-HCl	40

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
 <p>The structure shows a beta-alanine ethylester group (CH₃CH₂O-C(=O)-CH₂-CH₂-NH-) linked to a phosphate chain (three phosphate groups) which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The 5' carbon of the ribose is attached to the N9 position of an adenine base.</p>	β-Alaninethylester-HCl	41
 <p>The structure shows a diethyl-(2-aminoethyl)phosphonate group (diethyl phosphonate-CH₂-CH₂-NH-) linked to a phosphate chain (three phosphate groups) which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The 5' carbon of the ribose is attached to the N9 position of an adenine base.</p>	Diethyl- (2-aminoethyl)phosphonat-HCl	42
 <p>The structure shows a diethyl-(2-aminomethyl)phosphonate group (diethyl phosphonate-CH₂-NH-) linked to a phosphate chain (three phosphate groups) which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The 5' carbon of the ribose is attached to the N9 position of an adenine base.</p>	Diethyl- (2-aminomethyl)phosphonat HCl	43
 <p>The structure shows a methylamino group (CH₃-NH-) linked to a phosphate chain (three phosphate groups) which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The 5' carbon of the ribose is attached to the N9 position of an adenine base.</p>	Methylamin-HCl	44
 <p>The structure shows an ethylamino group (CH₃CH₂-NH-) linked to a phosphate chain (three phosphate groups) which is attached to the 3' carbon of a ribose sugar. The 5' carbon of the ribose is attached to the N9 position of an adenine base.</p>	Ethylamin-HCl	45

Struktur	Eingesetztes Amin	Nr.
	Propylamin	46

Bei der Reaktion von UTP mit Diethyl-(2-aminoethyl)phosphonat-HCl, Methylamin-HCl, Ethylamin-HCl und Propylamin konnte zwar mittels CE eine Umsetzung festgestellt werden, jedoch ließen sich die Produkte **42**, **44**, **45** und **46** nicht isolieren, da sie sich während der Auftrennung zersetzten.

7.1.3.1 Besonderheiten bei der Reaktion von UTP

Die Umsetzung von UTP mit Cyclohexylamin und Benzylamin führte zu den N-Acylharnstoffaddukten **47a** bzw. **47b**. Durch LC/MS- und NMR-Analyse ist nicht feststellbar, welche der beiden tautomeren Formen sich zum N-Acylharnstoff-Derivat umlagert, oder ob beide Formen vorkommen (Abbildung 7.3).

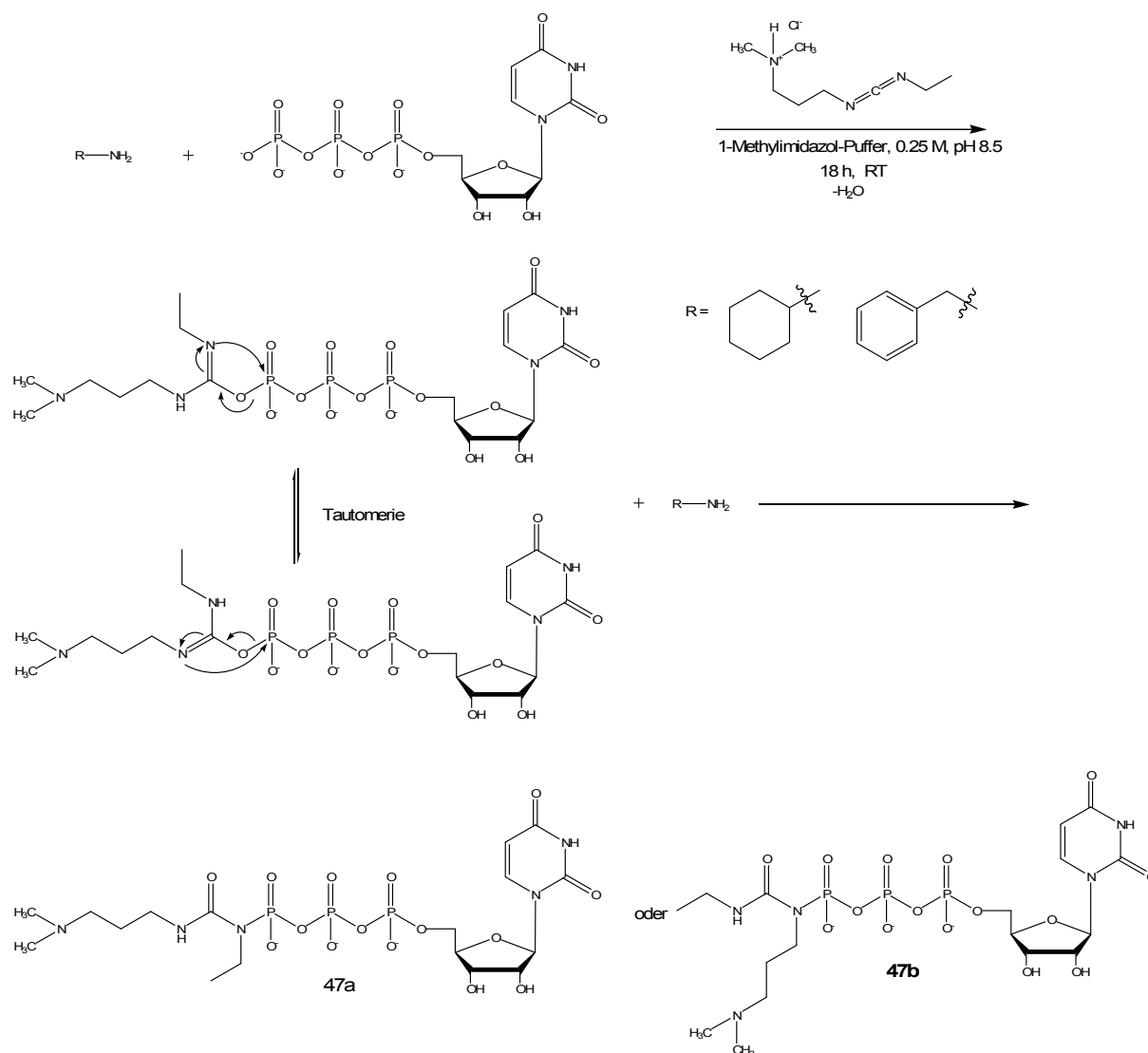


Abbildung 7.3: Bildung von N-Acylharnstoff-Addukten

Der Einsatz von 3-Phenylpropylamin, 4-Phenylbutylamin und Diethyl-4-aminobenzylphosphonat als Aminkomponente führte zu den jeweiligen Phosphoramiden **48a**, **48b**, **49a**, **49b** und **50a**, **50b**, an welche zusätzlich ein N-Acylharnstoff gebunden war. Ein möglicher Mechanismus ist in Abbildung 7.4 dargestellt.

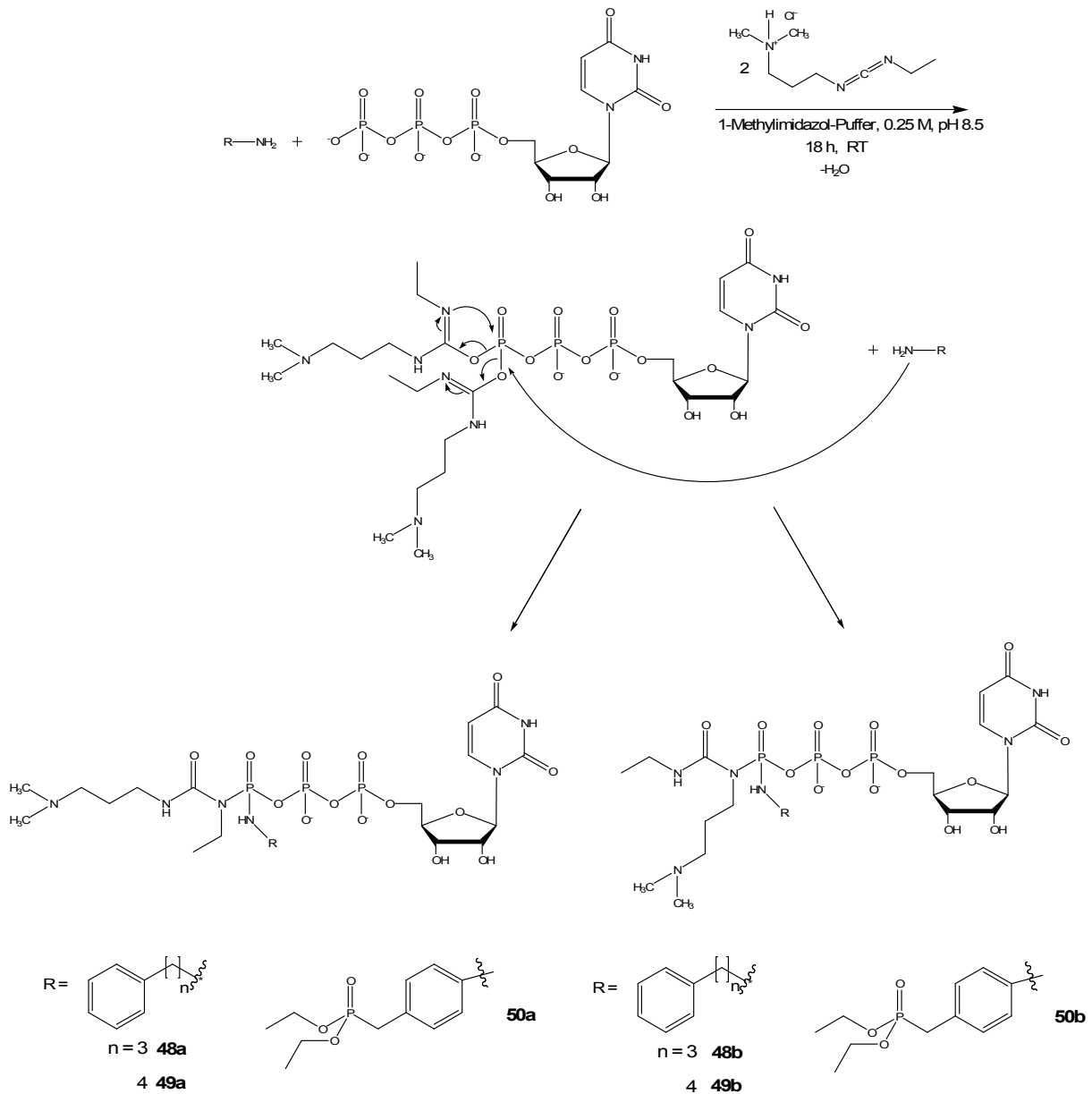


Abbildung 7.4: Reaktionsschema von UTP mit 3-Phenylpropylamin, 4-Phenylbutylamin bzw. Diethyl-4-aminobenzylphosphonat

Bei beiden Reaktionsverläufen reagierte das Produkt nicht mehr weiter. Das gewünschte einfache Phosphoramid konnte nicht isoliert werden. Die Bildung eines unreaktiven N-Acylharnstoffderivats ist in der Peptidsynthese bei Verwendung von Carbodiimiden als Kupplungsreagenz bereits bekannt.¹⁵⁷ So wird die Bildung durch Verwendung von Triethylamin als Lösungsmittel begünstigt und durch Acetonitril oder Methylenchlorid unterdrückt.¹⁵⁸ Eine andere Möglichkeit, die Bildung der unerwünschten N-Acylharnstoff-Addukte zu unterdrücken, ist die Zugabe von Additiven wie zum Beispiel Hydroxybenzotriazol (HOBt, **6**). Durch die Zugabe von HOBt (**6**) kommt es zur Bildung eines aktivierten Esters, welcher sofort mit der

Aminkomponente reagiert. Laut Literatur werden Additive jeweils in ein- oder zweifachem Überschuss zugegeben.¹⁵⁹ Um diese Reaktion auf die Bildung von Phosphoramiden zu übertragen wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an HOBt (**6**) hergestellt und mittels Kapillarelektrophorese vermessen. Die Versuche fanden vorerst alle mit Diethyl-4-aminobenzylphosphonat als Aminkomponente statt. Durch die Zugabe von HOBt (**6**) wird die N-Acylharnstoff-Bildung zurückgedrängt. Bei einem Verhältnis HOBt : EDC = 1:3 ging die N-Acylharnstoffbildung deutlich zurück (Abbildung 7.6, **C**) und es entstand vorwiegend das Phosphoramid (Abbildung 7.6, **E**). Bei höheren Konzentrationen an Hydroxybenzotriazol (**6**) ging die Phosphoramid-Bildung wieder zurück, zudem entstand ein höherer Prozentsatz an Nebenprodukt **NP1** (Abbildung 7.7, **D**) und ein weiteres Nebenprodukt **NP2**, (Abbildung 7.7, **F**). Die beiden Nebenprodukte wurden nicht näher identifiziert.

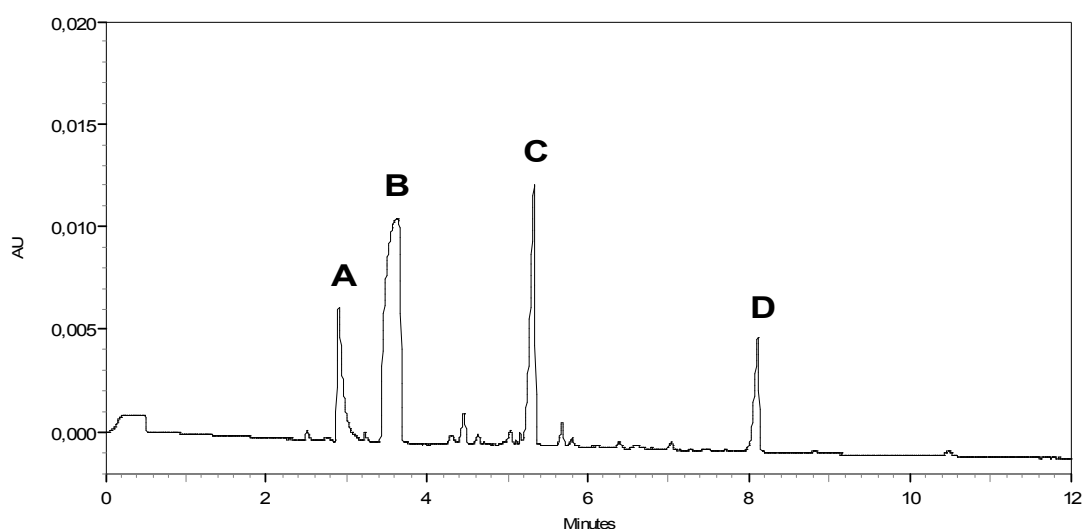


Abbildung 7.5: Elektropherogramm des Reaktionsansatzes der Blindprobe ohne Hydroxybenzotriazol. Der Reaktionsansatz besteht aus 25 μ l EDC (1,5 mmol/ml) in 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5); 25 μ l UTP (0,2 mmol/ml) in 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5) und 25 μ l Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat (1,4 mmol/ml) in DMF. AU = Absorption Units, A = Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat, B = 1-Methylimidazol und EOF, C = Verbindung **50a** oder **50b**, D = nicht identifiziertes Nebenprodukt **NP1**, CE-Bedingung: Methode G

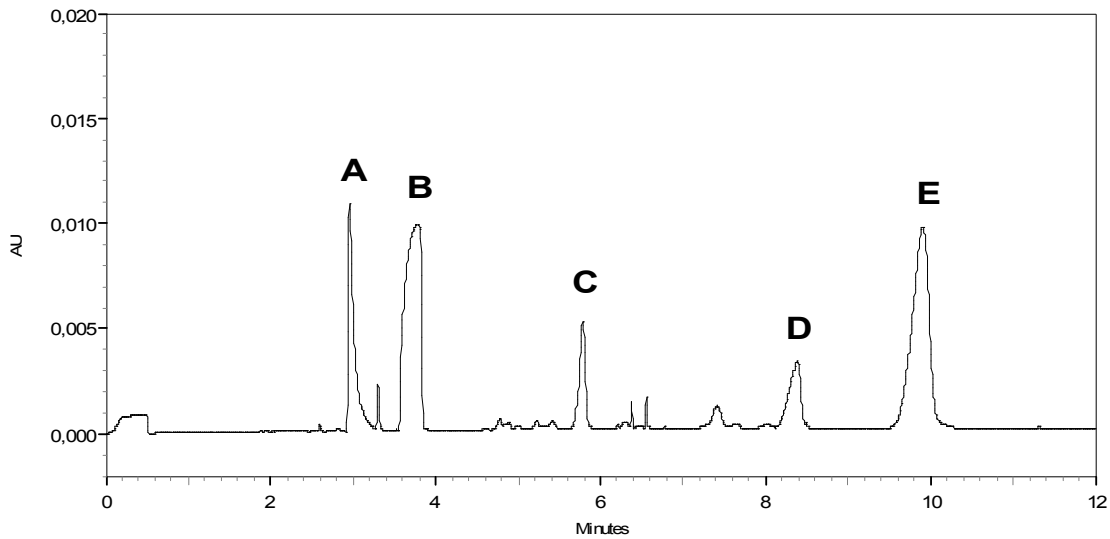


Abbildung 7.6: Elektropherogramm des Reaktionsansatzes mit Hydroxybenzotriazol im Verhältnis HOBT : EDC = 1:3. Der Reaktionsansatz besteht aus 25 μ l EDC (1,5 mmol/ml) in 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5); 25 μ l UTP (0,2 mmol/ml) in 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5); 25 μ l Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat (1,4 mmol/ml) in DMF und 5 μ l Hydroxybenzotriazol (2,25 mmol/ml) in DMF. AU = Absorption Units, A = Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat, B = 1-Methylimidazol, Hydroxybenzotriazol und EOF, C = Verbindung **50a** oder **50b**, D = nicht identifiziertes Nebenprodukt **NP1**, E = Verbindung **57**, CE-Bedingung: Methode G

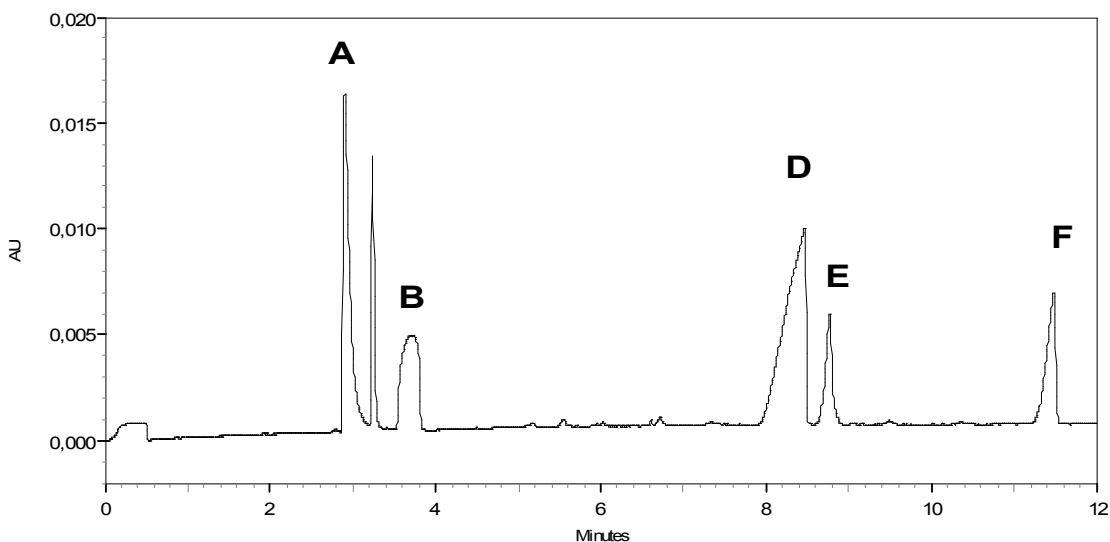


Abbildung 7.7: Elektropherogramm des Reaktionsansatzes mit Hydroxybenzotriazol im Verhältnis HOBT : EDC = 1:1. Der Reaktionsansatz besteht aus 25 μ l EDC (1,5 mmol/ml) in 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5); 25 μ l UTP (0,2 mmol/ml) in 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5); 25 μ l Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat (1,4 mmol/ml) in DMF und 5 μ l Hydroxybenzotriazol (7,5 mmol/ml) in DMF. AU = Absorption Units, A = Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat, B = 1-Methylimidazol, Hydroxybenzotriazol und EOF, C = Verbindung **50a** oder **50b**, D = nicht identifiziertes Nebenprodukt **NP1**, E = Verbindung **57**, F = nicht identifiziertes Nebenprodukt **NP2**, CE-Bedingung: Methode G

Da der Peak von Nebenprodukt **NP1** und der des gewünschten Produktes bei einem Verhältnis HOBT : EDC = 1:1 sehr nah beieinander lagen, und von der CE-Methode auch Rückschlüsse auf die FPLC Trennung gemacht werden konnten, wurde für die Synthese ein HOBT : EDC Verhältnis von 1:3 gewählt. Durch die geringere Konzentration an HOBT (**6**) entstand weniger **NP1** und die Produkte ließen sich leichter voneinander trennen. Die Verbindungen **51**, **52**, **56** und **57** konnten auf diese Weise gewonnen werden (Abbildung 7.9).

Bei einer Kohlenstoffkette zwischen Aromat und Amin länger als 1 kommt es jedoch nur zu einer geringen Umsetzung. Die Produkte **53-55** konnten wegen dieser geringen Umsetzungsrate nicht in der gewünschten Reinheit isoliert werden. Dies wird auch bei einem Vergleich der FPLC-Chromatogramme von **52** und **55** noch einmal verdeutlicht (Abbildung 7.8). Es lässt sich erkennen, dass das Produkt **52** in ausreichender Menge entstanden ist, und sich gut von den Nebenprodukten abtrennen ließ. Die Umsetzungsrate bei Produkt **55** hingegen war deutlich geringer, zusätzlich war die Peakschärfe schlechter, so dass es nicht gelang, das Produkt in ausreichender Reinheit zu isolieren, da es nicht möglich war, das jeweilige Phosphoramid von einem Nebenprodukt des Hydroxybenzotriazols, vermutlich einem Dimer, abzutrennen. Die LC/MS-Analyse ergab eine Masse von 270 g/mol, was der doppelten Molekülmasse von Hydroxybenzotriazol entspricht.

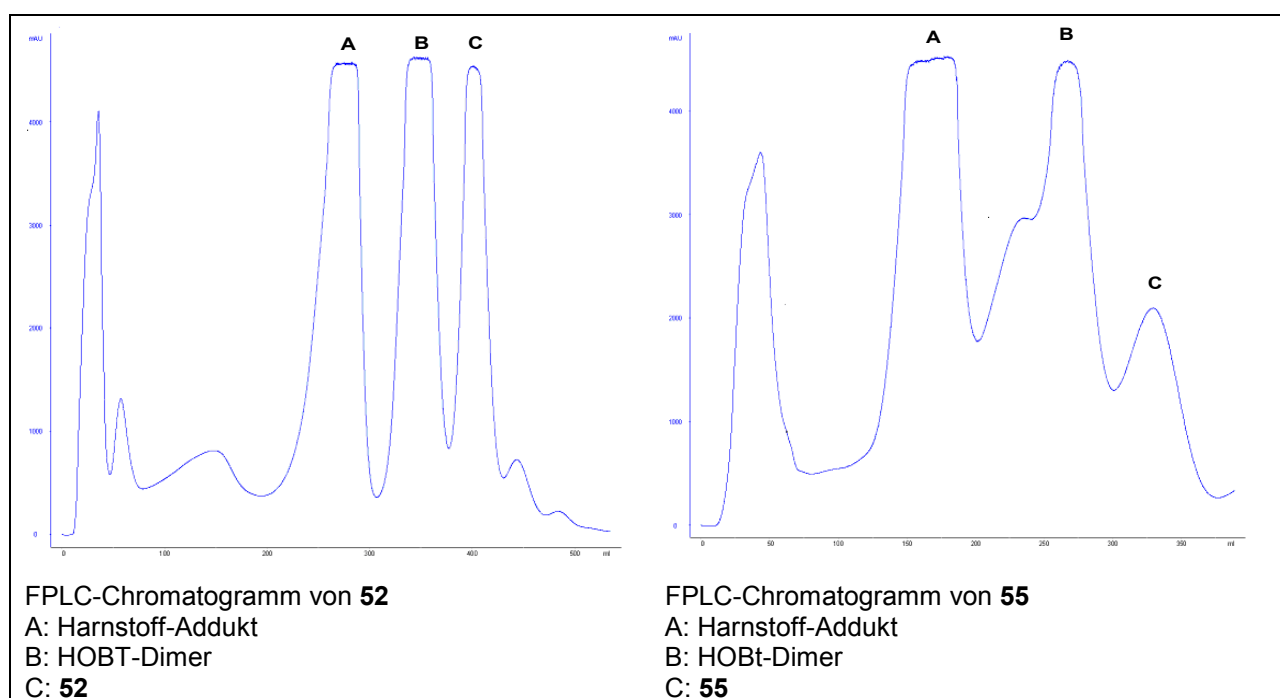


Abbildung 7.8: FPLC-Chromatogramme von **52** und **55**

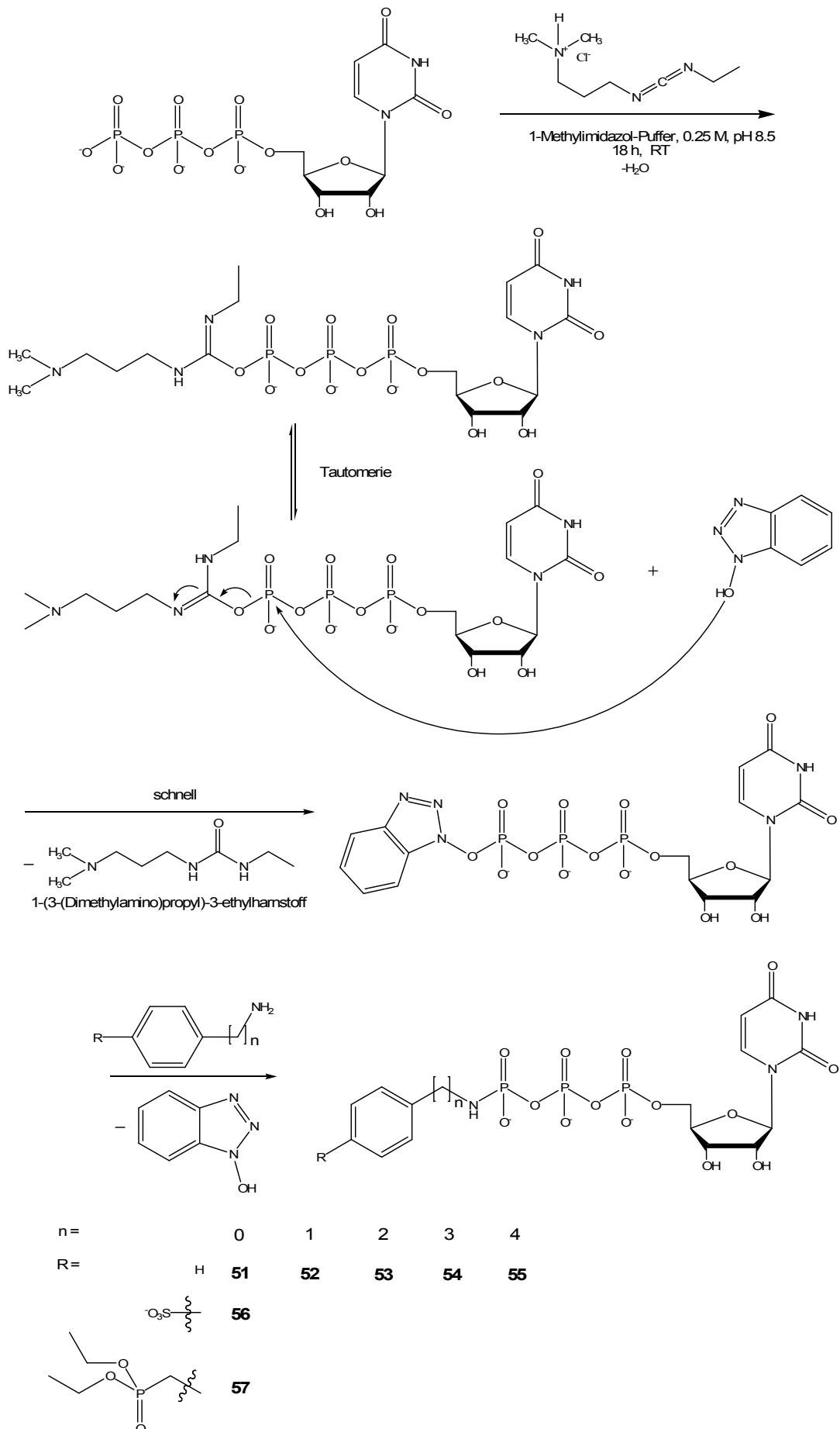


Abbildung 7.9: Reaktionsmechanismus mit Hydroxybenzotriazol als Katalysator

7.1.4 Spaltung der Methyl- und Ethylester

Die Spaltung der Methyl- beziehungsweise Ethylester bei Phosphoramiden, welche mit einem Aminosäureester oder einem Aminodicarbonsäureester verknüpft sind, sollte zu Verbindungen mit sauren Funktionen führen. Aufgrund dessen, dass Triphosphate sehr hydrolyseempfindlich sind, kommt jedoch eine alkalische oder saure Esterspaltung nicht in Frage. Diese Methoden wären für die Produkte viel zu aggressiv; sowohl die Phosphoranhydridbindung als auch die Phosphoramid-Bindung würden diesen Bedingungen nicht standhalten. Als Alternative zu dieser aggressiven Methode ist der Einsatz von Schweineleberesterase (PLE, Pig Liver Esterase, E.C. 3.1.1.1) in wässriger, auf pH 8 gepufferter Lösung beschrieben.^{160,161} Unter diesen Bedingungen blieben die Phosphoramide stabil. Die Reaktion wurde mit den beiden Verbindungen **12** und **17** durchgeführt. Jeweils 1 mg von Verbindung **12** oder **17** wurde eingewogen, in 200 µl Puffer gelöst und mit 3 mg Schweineleberesterase versetzt. Als Puffer wurde mit Natriumhydrogenphosphat- und Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (100 oder 150 mM, pH 8,0) verwendet. Die Ansätze wurden über Nacht auf einem Eppendorff-Thermomixer bei 25 °C gerührt, zentrifugiert und ohne weitere Verdünnung mittels Kapillarelektrophorese vermessen (Abbildung 7.10).

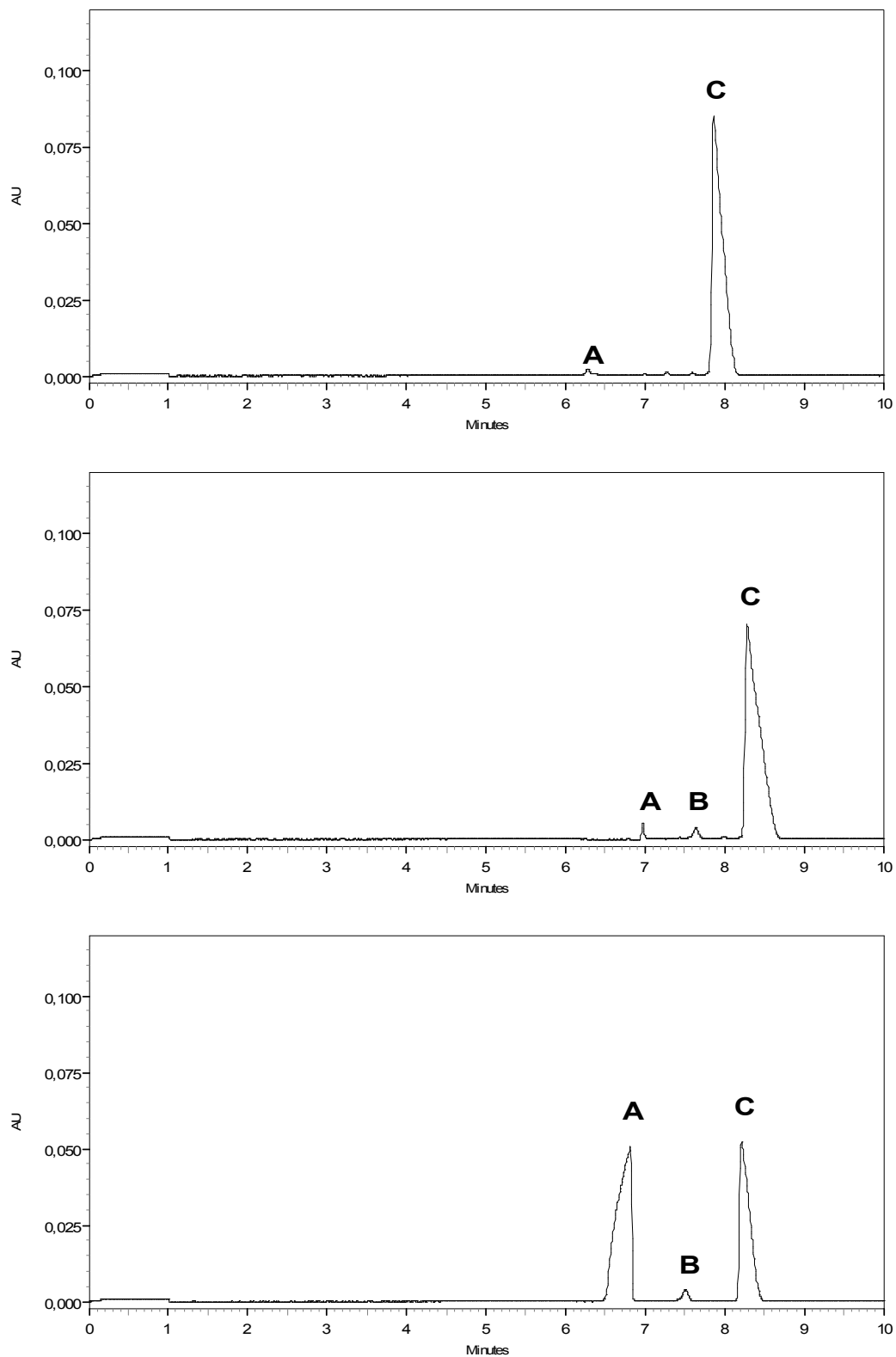


Abbildung 7.10: Elektropherogramme der Methylesterspaltung: oben: Verbindung **12** (1,0 mg gelöst in 200 μ l K_2HPO_4 -Puffer (150 mM, pH 8,0)), mitte: Verbindung **12** nach Reaktion mit 3 mg Schweineleber-Esterase in K_2HPO_4 -Puffer (150 mM, pH 8,0), unten: Verbindung **12** nach Reaktion mit 3 mg Schweineleberesterase in K_2HPO_4 -Puffer (150 mM, pH 8,0) gespikt mit ATP, AU = Absorption Units, A = ATP, B = vermutlich Verbindung **58a** oder **58b**, C = Verbindung **12**, CE-Bedingungen: Methode F

Bei der Reaktion von **12** mit der Esterase ist im Elektropherogramm ein Peak zu sehen, welcher dem einfach hydrolysiertem Produkt entsprechen könnte, allerdings liegt die Umsetzung nur bei ca. 2% (Abbildung 7.10, Mitte). Welche der beiden Methylgruppen abgespalten wurde, ließ sich nicht ermitteln (Abbildung 7.11). Die Ausbeute ist jedoch für synthetische Zwecke viel zu gering, da das Produkt noch isoliert werden müsste.

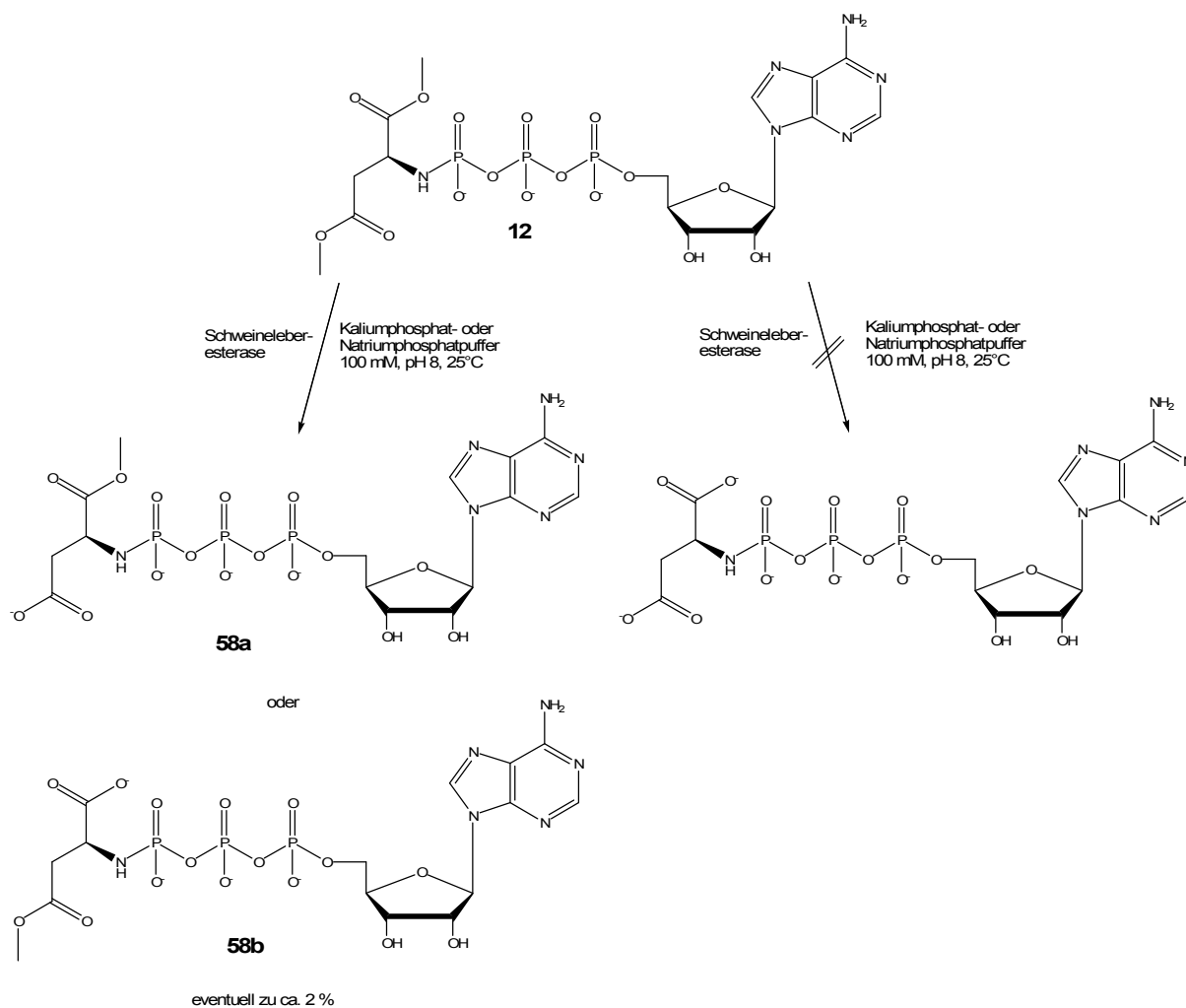


Abbildung 7.11: Enzymatische Esterhydrolyse von **12**

Die Ethylestergruppe von **17** wurde bei keinem der Lösungsansätze abgespalten, obwohl die Schweineleberesterase relativ unspezifisch ist. Es ist jedoch möglich, dass es aufgrund sterischer Hinderung zu keiner Spaltung gekommen ist (Abbildung 7.12).

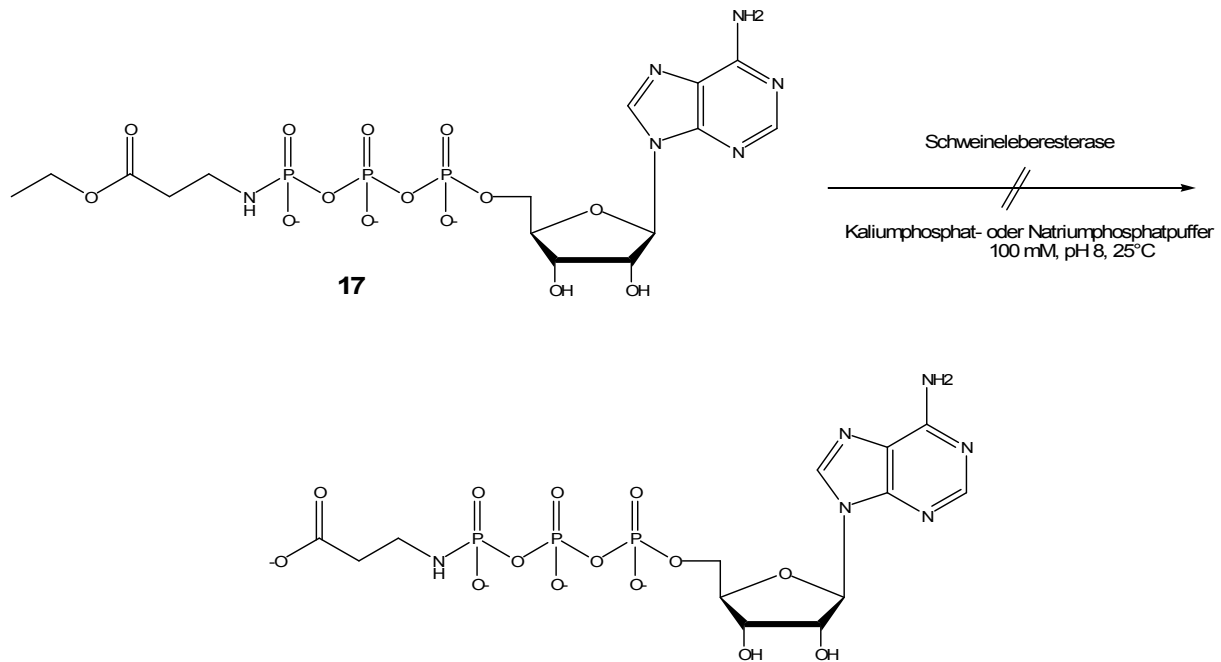


Abbildung 7.12: Gescheiterter Versuch der enzymatischen Esterhydrolyse von **17**

7.1.5 Hydrogenolytische Spaltung von Benzylestern

Aufgrund dessen, dass die enzymatische Abspaltung der Alkylester nicht funktioniert hatte, wurde eine Alternative gesucht, freie Aminosäure-Derivate zu erhalten. Carbonsäuredibenzylester lassen sich durch katalytische Hydrierung spalten.¹⁶²⁻¹⁶⁴

Die Umsetzung von ATP mit S-Asparginsäuredibenzylester-HCl nach der in Kapitel 7.1 beschriebenen Methode führte zu Produkt **59**. Dieses wurde durch LC/MS-Analyse charakterisiert.

Die klassische katalytische Hydrierung von **59** mit verschiedenen Katalysatoren (Pd/C, Pd(OH)₂/C, Pd/BaSO₄, Pd/CaCO₃) und H₂ bei Atmosphärendruck (Ballon) über Nacht und erhöhtem Druck (Wasserstoffgenerator, 2 bar) über zwei Stunden in Methanol/Wasser-Gemischen führte jedoch jeweils zur Abspaltung der γ -Phosphatgruppe (Abbildung 7.13).

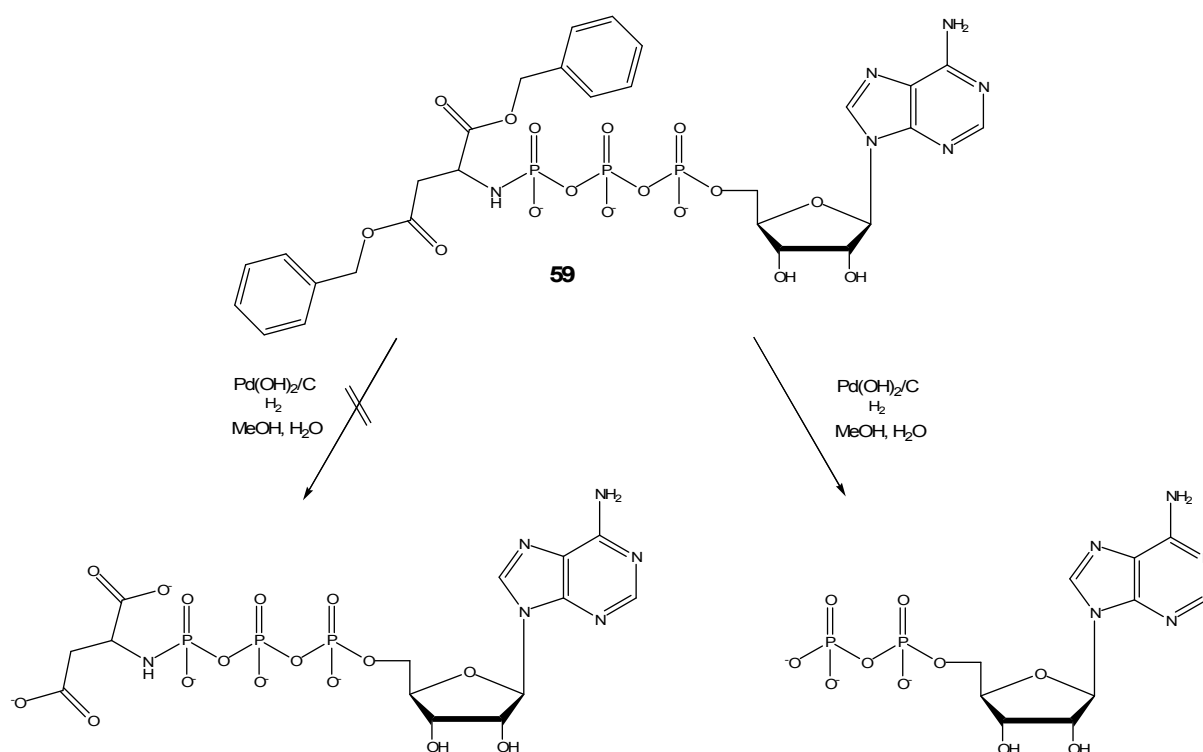


Abbildung 7.13: Versuch der Spaltung von Benzylestern

7.1.6 Stabilität von Phosphoramiden

Da die Produkte **15** und **31** nicht reproduzierbare Testergebnisse am P2Y₆-Rezeptor ergaben, wurden die beiden Testlösungen Verbindungen noch einmal per LC/MS analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Substanzen, die für die Testung in einem Wasser/DMSO-Gemisch gelöst worden waren, sich zu über 90% in die Edukte zersetzt hatten. Die Produkte **10**, **21**, **22**, **25**, **26**, **42**, **44**, **45** und **46** konnten, wie zuvor beschrieben, aufgrund von Zersetzung nicht in der gewünschten Reinheit isoliert werden. Es fand entweder schon bei der chromatographischen Auftrennung oder bei der Analytik eine Zersetzung in die Edukte statt.

J.D. Chanley und Edward Feageson untersuchten 1962 die Hydrolyse von Phosphoramiden und Phosphorsäureestern.¹⁶⁵ Die Phosphoramidsäure hydrolysierte unter allen verwendeten Bedingungen mit einer Kinetik erster Ordnung. Die Hydrolyse wurde in Wasser und in Wasser-Methanol-Gemischen (50%), bei einem pH-Bereich von 2-8 und bei einer Temperatur von 36,8°C, untersucht. Mit zunehmenden pH-Wert wurde die Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse kleiner, bei pH 10 fand selbst bei 60°C keine Hydrolyse mehr statt. Die komplett ionisierte Form $(\text{NH}_2\text{PO}_3)^{2-}$ war am stabilsten. Die hohe Säure-Instabilität der neutralen Form kann durch die entstehende zwitterionische Form erklärt werden $(\text{H}_3\text{N}^+\text{PO}_3\text{H})^0$. Die

Hydrolyse wurde bei pH-Werten unter 2 im Wässrigen bzw. bei pH-Werten unter 3 in Wasser-Methanol-Gemischen durch Säure katalysiert. Die Hydrolysegeschwindigkeit stieg mit sinkenden pH-Werten stark an. Bei pH-Werten über 3 fand keine signifikante Säurekatalyse mehr statt. Ein Vergleich des Effektes verschiedener Lösungsmittel auf die Hydrolyse zeigte, dass Methanol, Ethanol und Dioxan die Hydrolyserate der Phosphoramidsäure steigerten, während D₂O die Hydrolysegeschwindigkeit absenkte.¹⁶⁵ Diese Ergebnisse wurden von Halmann et al. bestätigt.¹⁶⁶ Oney und Caplow untersuchten 1967 die Stabilität von Monomethylphosphoramiden; sie fanden heraus, dass die P-N Bindung hydrolysierte, währenddessen die P-O und die C-O Bindung intakt blieben. Kanavarioti untersuchte 1985 die Stabilität von Guanosin-5'-Phosphor-2-methylimidazol, wobei nach Hydrolyse wiederum GMP und 2-Methylimidazol entstand, also die P-N Bindung gespalten wurde.¹⁶⁷ Diese Ergebnisse, dass Phosphoramide sehr säurelabil sind, wurde auch bei einer eigenen Stabilitätsuntersuchung mittels LC/MS festgestellt. Die Verbindung **35** wurde hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber künstlichem Magensaft, simuliertem Dünndarmmilieu und Rattenlebermikrosomen untersucht, als Vergleich diente eine wässrige Lösung von **35**. Sowohl im Wässrigen als auch in simuliertem Dünndarmmilieu war **35** stabil, währenddessen sich die Verbindung in simuliertem Magensaft schon nach einer Inkubationszeit von 2 h vollständig zersetzt hatte. Es ist daher unerlässlich, den pH-Wert der Testlösungen zu kontrollieren.

7.2 Synthese von Adenosintetraphosphat (Ap₄, 60)

Adenosintetraphosphat Ap₄ ist ein natürlich vorkommendes Nucleotid, welches an der 5'-Position der Ribose über eine Kette von vier Phosphatresten verfügt. Die Substanz wurde zum ersten Mal 1953 als Kontamination, von aus dem Ochsenmuskel isoliertem ATP entdeckt.¹⁶⁸ Später wurde es im Pferdemuskel,¹⁶⁹ im Kaninchenmuskel, im Rattenmuskel und in Hefesporen nachgewiesen.¹⁷⁰⁻¹⁷²

In vivo wird Adenosintetraphosphat von mehreren Enzymen synthetisiert, unter anderem, von der Aminoacyl-tRNA-Synthetase,¹⁷³ der Phosphoglycerat-Kinase aus Hefesporen,¹⁷¹ der Adenyat-Kinase,¹⁷⁴ der Luciferase des Leuchtkäfers¹⁷⁵ und aus der Acetyl-CoA-Synthetase der Hefe.¹⁷⁶

Die physiologische Rolle von Ap₄ ist weitgehend unbekannt. Es werden jedoch verschiedene pharmakologische Funktionen angenommen. Zum Beispiel ist Ap₄ ein

kompetitiver Inhibitor von zytosolischen asymmetrischen Dinucleotid-Tetraphosphat-hydrolasen.¹⁷⁷

Ap₄ kommt nicht nur in chromaffinen Zellen sondern auch in den Blutplättchen vor und greift in die Blutplättchenaggregation¹⁷⁸ und in die Regulation des Blutdrucks ein. Es aktiviert sowohl P2Y- als auch P2X-Rezeptoren.⁸⁰

In der Literatur sind mehrere Methoden der Phosphoranhydridbildung von Nucleotiden und Dinucleotiden beschrieben. Shimazu et al. aktivierten AMP, indem sie ein Phosphorimidazolid nach der Methode von Lohrmann et al.¹⁷⁹ herstellten. Dieses wurde in einem wässrigen N-Ethylmorpholin-HCl-Puffer unter Anwesenheit von Cd²⁺ oder Mn²⁺ als Katalysatoren mit anderen Nucleotiden zur Reaktion gebracht (Abbildung 7.14). Es entstanden hierbei Dinucleotide.¹⁸⁰ Der Vorteil, die Reaktion im Wässrigen durchzuführen, besteht darin, dass die Natriumsalze der Nucleotide nicht erst in die jeweiligen Tributylammoniumsalze überführt werden müssen.

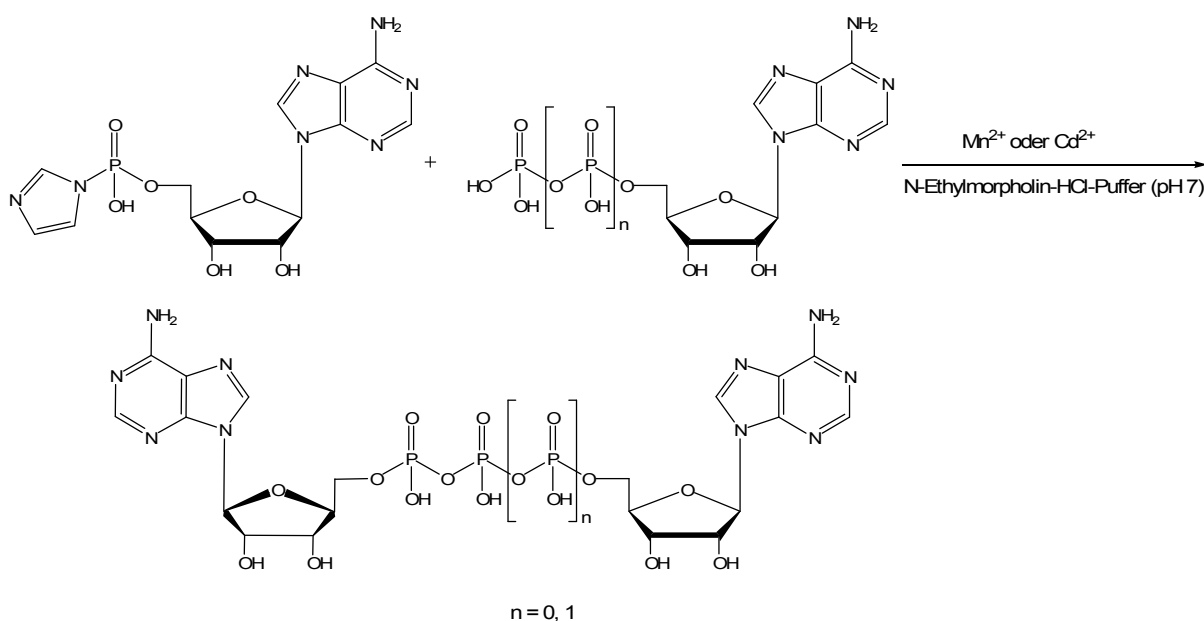


Abbildung 7.14: Darstellung von Dinucleotiden nach Shimazu et al.¹⁸⁰

Guranowski et al. synthetisierten Methylenanaloga von Adenosintetraphosphat, indem sie 5'-Adenosinmethylenbisphosphonat gelöst in Diphenylphosphin und 2,2-Dithiodipyridin in das Imidazolid überführten. Das aktivierte 5'-Adenosinmethylenbisphosphonat wurde danach mit einem vierfachen Überschuss an Pyrophosphat, welches als Triethylammonium-Salz vorlag, versetzt.¹⁸¹

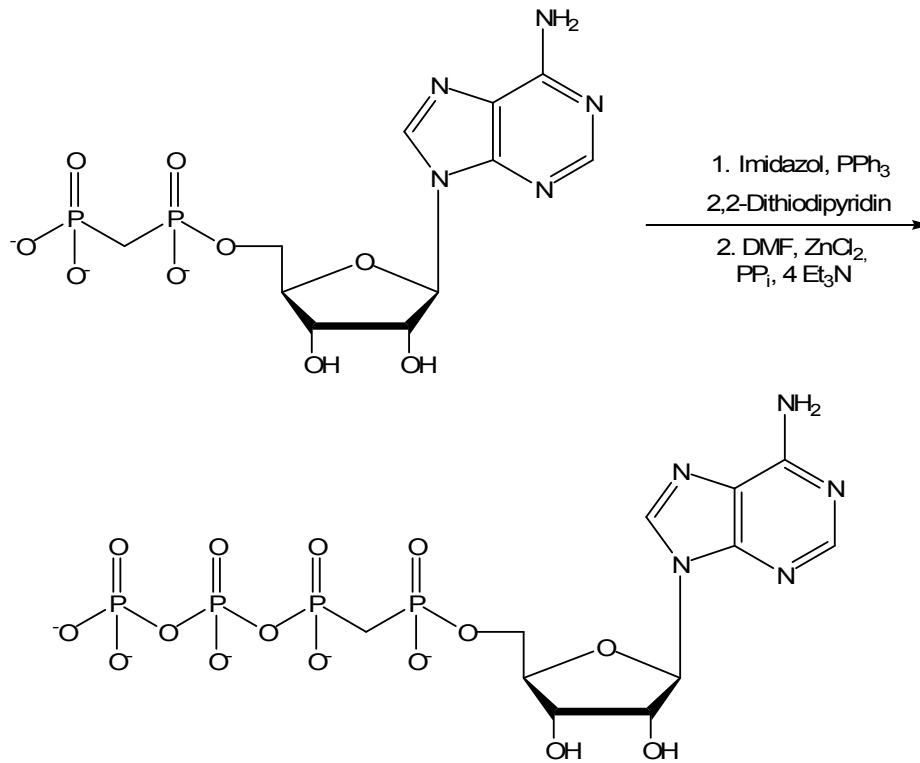


Abbildung 7.15: Synthese des α -Methylenanalogen von Adenosintetraphosphat nach Guranowski et al.¹⁸¹

In zwei weiteren Synthesestrategien wurde Carbonyldiimidazol als Kupplungsreagenz eingesetzt. Kruse et al. synthetisierten 1988 γ -Phenyl-ATP, indem ADP vorliegend als Tributylammoniumsalz in trockenem Aceton mit einem dreifachen Überschuss an Carbonyldiimidazol aktiviert und mit Phenylphosphat-Tributylammoniumsalz gekuppelt wurde.¹⁸²

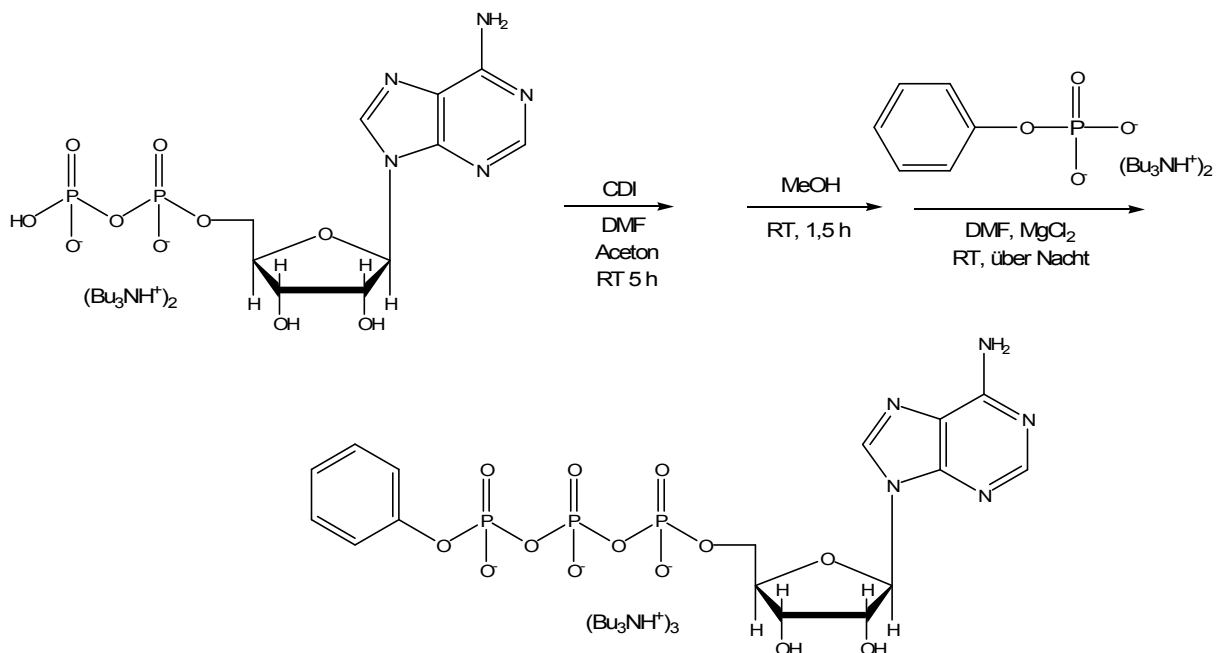


Abbildung 7.16: Synthese von γ -Phenyl-ATP nach Kruse et al.¹⁸²

Nahum et al. stellten 2006 Diadenosin-Polyboranophosphat-Analoga vor (Abbildung 7.17). ADP, vorliegend als Tributylammoniumsalz, wurde mit einer fünffachen Menge an Carbonyldiimidazol versetzt. Die Reaktion fand in wasserfreiem DMF statt. Das so aktivierte ADP wurde nach Entfernung des restlichen Carbonyldiimidazols durch trockenes Methanol mit Boranophosphat, ebenfalls als Tributylammoniumsalz vorliegend, versetzt. 8 Äquivalente Magnesiumchlorid wurden als Katalysator zugefügt.¹⁵⁰

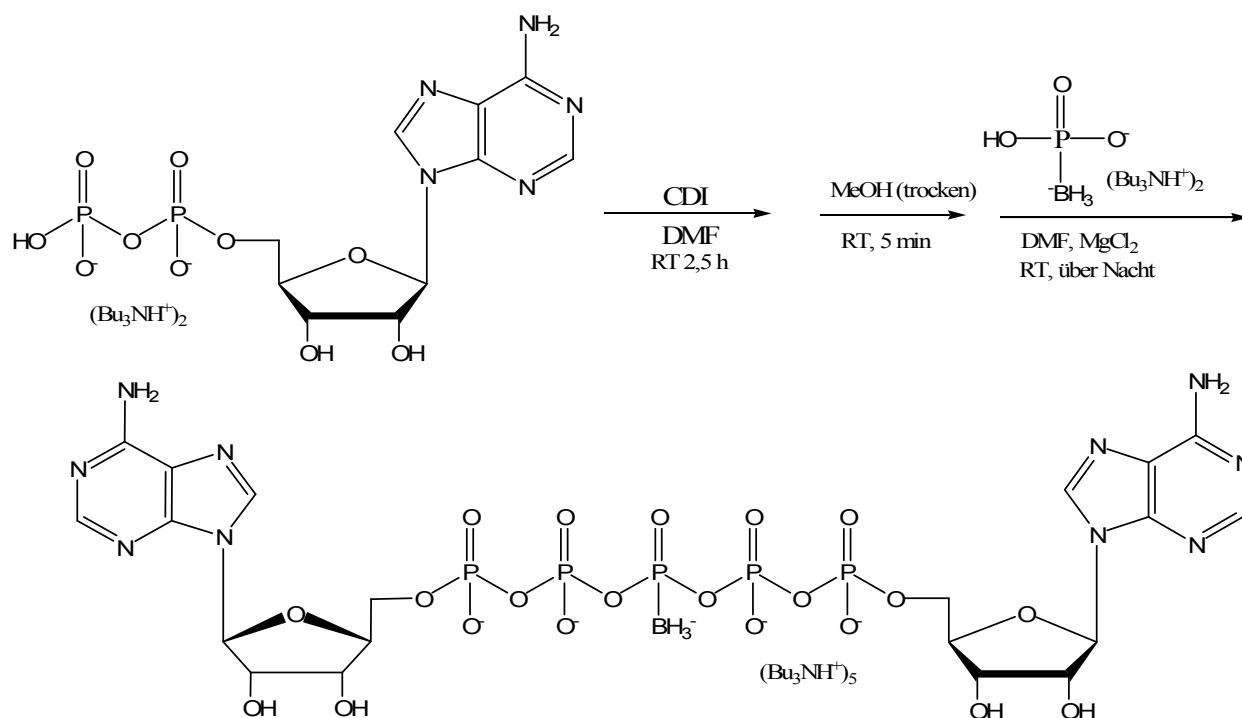


Abbildung 7.17: Synthese eines Diadenosin-Polyboranophosphat-Analogons nach Nahum et al.¹⁴²

Die von uns entwickelte Synthesestrategie für Adenosintetraphosphat ging zunächst von der Umsetzung von ATP mit Carbonyldiimidazol aus. Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz wurde hierfür in das Tetrabutylammoniumsalz überführt und mit verschiedenen Konzentrationen an Carbonyldiimidazol in trockenem DMF oder Aceton versetzt. Das überschüssige Carbonyldiimidazol wurde mit trockenem Methanol entfernt. Dihydrogenphosphat-Tributylammoniumsalz wurde zugefügt und der Ansatz wurde über Nacht gerührt. Das gewünschte Produkt ist dabei allerdings nicht entstanden. Weitere Versuche mit Carbonyldiimidazol, die Umsetzung von ADP mit einem Diphosphat beziehungsweise die Umsetzung von AMP mit einem Triphosphat, führten ebenfalls nicht zu dem gewünschten Produkt.

Die Synthese von Adenosintetraphosphat im Wässrigen konnte ebenfalls nicht erfolgreich durchgeführt werden. Weder bei der Reaktion nach Shimazu et al.¹⁸⁰ noch

bei der für die Synthese der Phosphoramide angewandten Methode (Kapitel 7.1) fand eine Umsetzung statt. Durch die Reaktion nach Guranowski et al.¹⁸¹ konnte das Produkt ebenfalls nicht isoliert werden.

Durch die Verwendung von Diphenylphosphorchloridat als Kupplungsreagenz konnte Adenosintetraphosphat in 10%iger Ausbeute gewonnen werden. Hierbei wurde das wasserfreie ATP-Tetrabutylammoniumsalz mit einem 4,5fachen Überschuss an Diphenylphosphorchloridat und Tributylamin als Hilfsbase in wasserfreiem Dioxan versetzt. Anschließend wurde das aktivierte Adenosintriphosphat in wasserfreiem Ether unter Eiskühlung ausgefällt. Danach wurde Dihydrogenphosphat, als Tributylammonium-Salz vorliegend, gelöst in 5 ml wasserfreiem Pyridin und 1 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid als Cosolvens, zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.¹⁸³

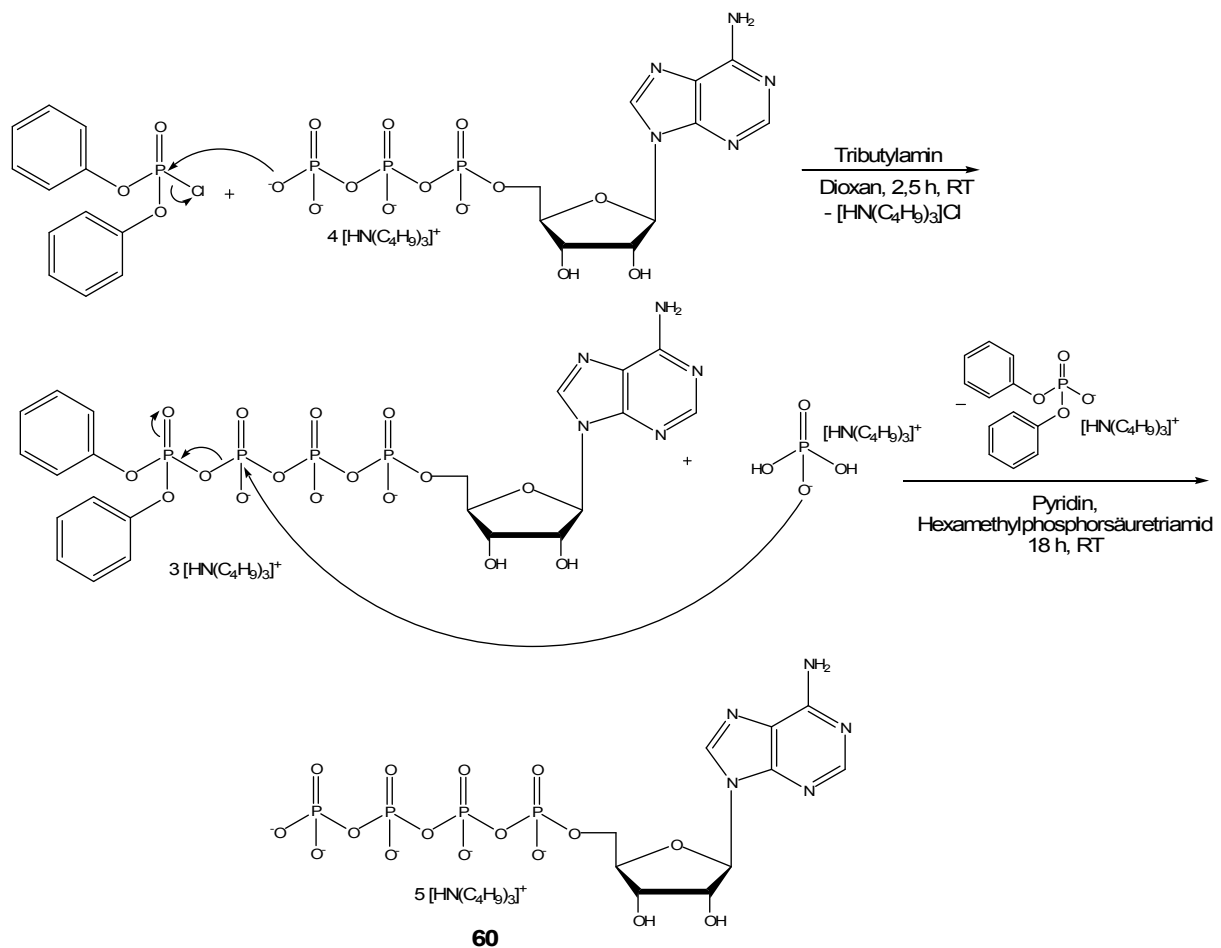


Abbildung 7.18: Aktivierung von ATP mit Diphenylphosphorchloridat und anschließende Umsetzung zu Adenosintetraphosphat (**60**)

Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. Es haben sich ca. 30% ATP umgesetzt (Abbildung 7.19).

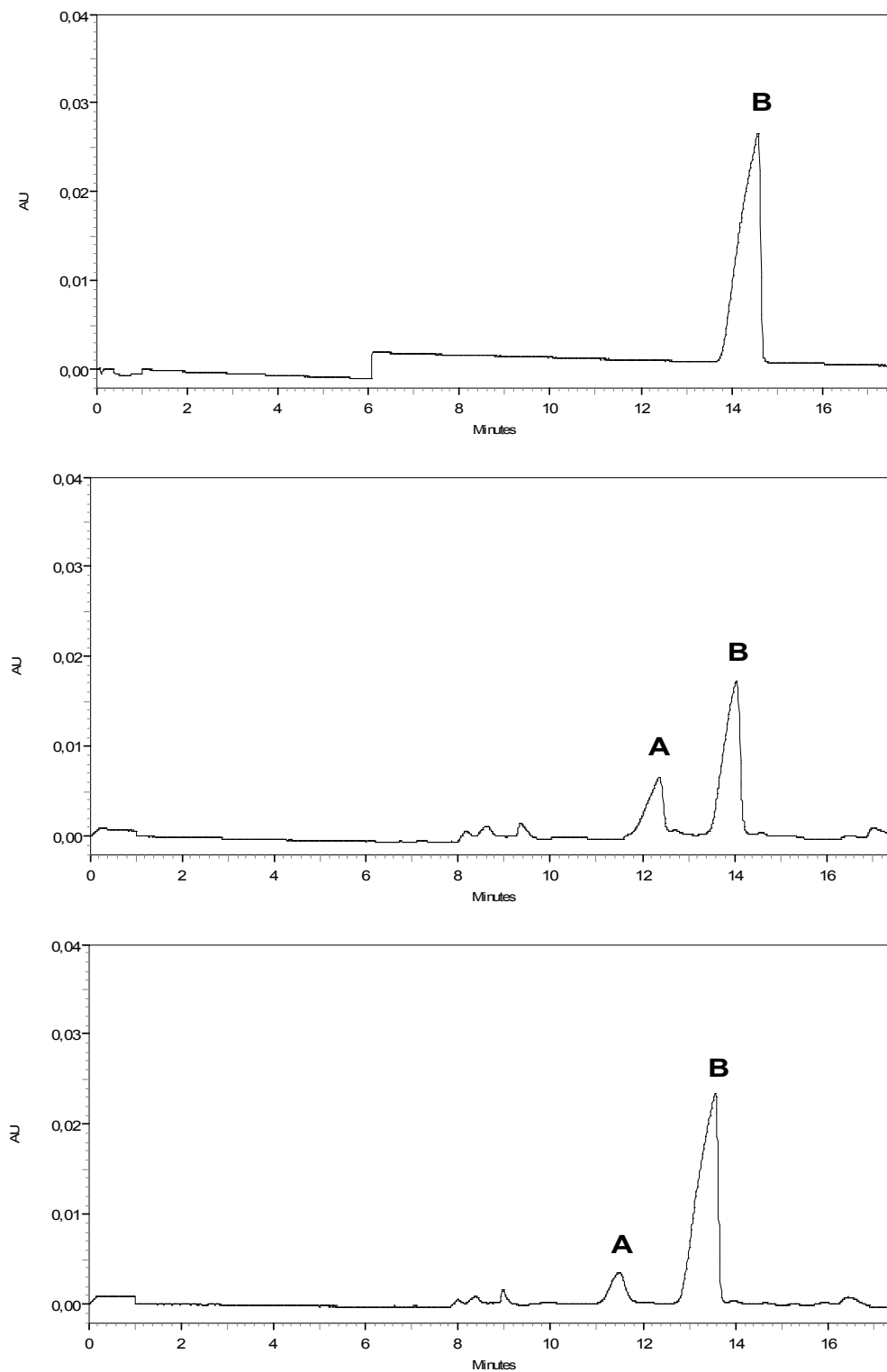


Abbildung 7.19: Elektropherogramme der Ap_4 -Synthese, oben: ATP-Lösung (5 mM in Wasser), mitte: Rückstand (1 mg gelöst in 500 μ l Wasser), unten: (1 mg gelöst in 500 μ l Wasser), gespikt mit 500 μ l ATP-Lösung (5mM in Wasser), AU = Absorption Units, A = Ap_4 (60), B = ATP, CE-Bedingungen: Methode F

7.2.1 Aufreinigung von Adenosintetraphosphat (60)

Die Auftrennung von Adenosintetraphosphat (**60**) wurde zuerst mit der bereits für die Phosphoramide verwendeten Ionenaustauschchromatographie-Methode versucht. Hierbei kam es jedoch zu keiner Auftrennung, das Tetraphosphat ließ sich nicht von ATP abtrennen. Auch durch das Verwenden eines flacheren Gradienten konnten die beiden Substanzen nicht voneinander getrennt werden. Durch das Austauschen der Säule konnte Ap_4 isoliert werden. Für die Auftrennung wurde eine HiPrep 16/10 Q FF-Säule verwendet. Die Säule ist bereits fertig gepackt. Im Gegensatz zu dem für die Auftrennung der Phosphoramide verwendeten Säulenmaterial, welches über Diethylaminoethylgruppen verfügt (schwacher Ionenaustauscher) hat man bei der HiPrep 16/10 Q FF ein Säulenmaterial, welches über Trimethylaminogruppen verfügt (starker Ionenaustauscher). Die einzelnen Fraktionen wurden hierdurch sauber aufgetrennt. Aufgrund des hohen ATP-Anteils, der noch im Reaktionsgemisch verblieben ist, musste die Auftrennung zweimal durchgeführt werden. Zur Abtrennung der letzten Nucleotidtriphosphat-Reste und zum Umsalzen des Produkts (die Ammoniumsalze, oder teilweise Ammoniumsalze sind nicht so hygroskopisch wie die reinen Triethylammoniumsalze) wurde mit der wässrigen Lösung des Rohprodukts eine Reversed-phase-Chromatographie an einer präparativen HPLC-Säule durchgeführt (Methode E).

7.3 Analytik der neu dargestellten Verbindungen

Sämtliche neu synthetisierten Verbindungen wurden umfassend durch ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren charakterisiert. Des Weiteren wurden Identität und Reinheit mit LC/MS und durch Kapillarelektrophorese überprüft. Die mit HPLC aufgereinigten Produkte wiesen eine Reinheit von über 95% auf.

Beispielhaft für die neu synthetisierten Verbindungen sind ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren der Verbindung **39** abgebildet.

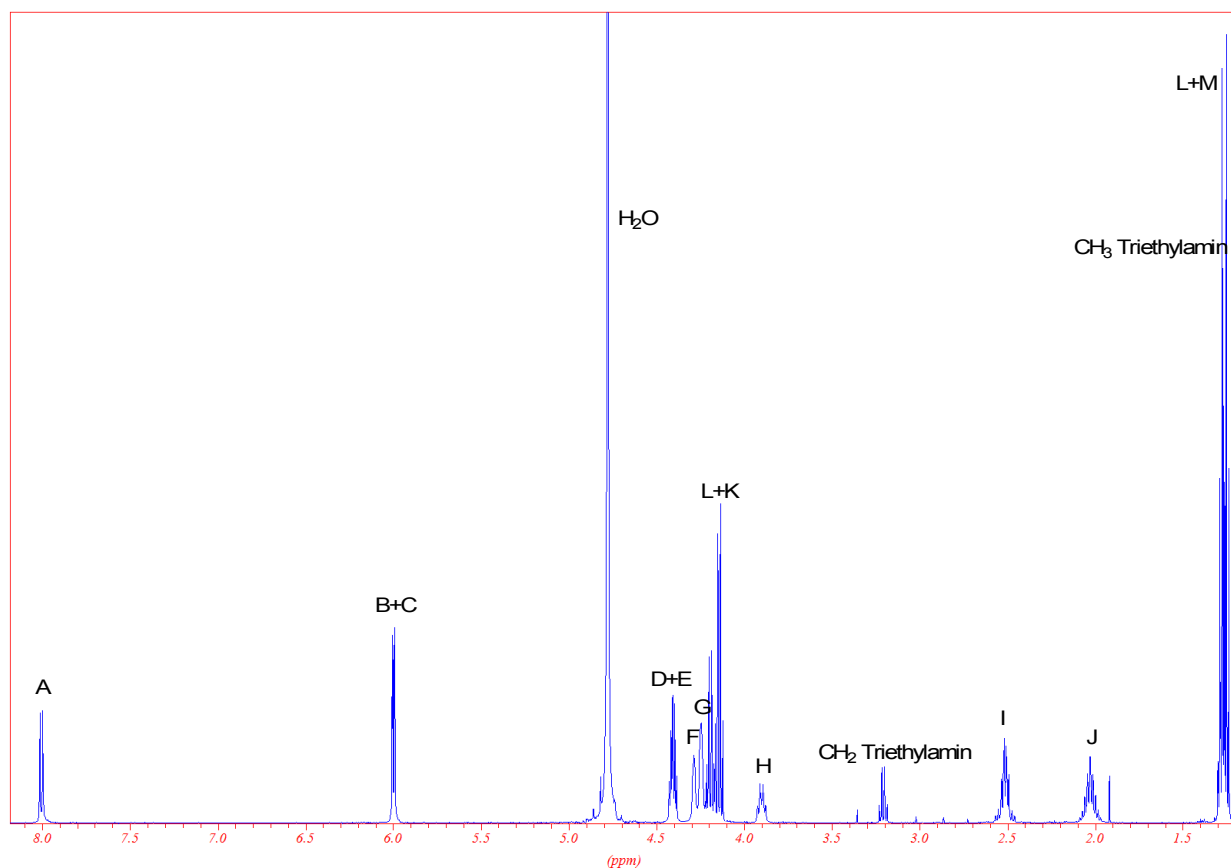
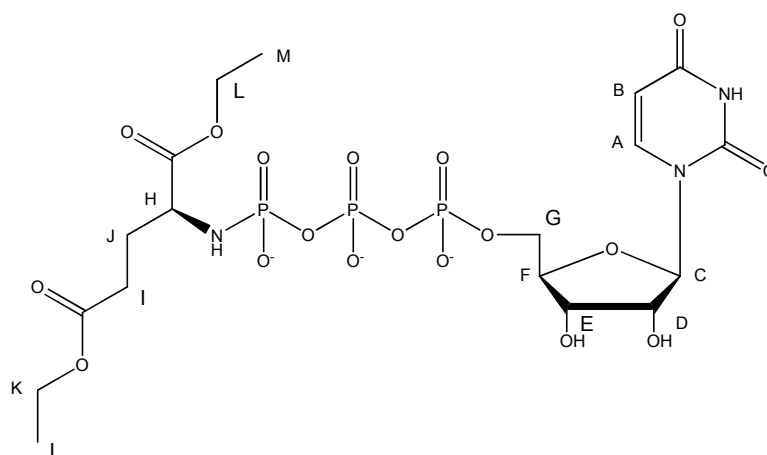


Abbildung 7.20: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **39** (Lösungsmittel: D_2O)

Die Nucleobase Uracil zeigte im ^1H -Spektrum sehr leicht zuzuordnende Signale im aromatischen Bereich, das Signal von H-5 des Uracils und H-1' der Ribose fielen zusammen (Abbildung 7.20, H-6: 8.00 ppm, A; H-5 und H-1': 6.00 ppm, B + C). Als Aminosäure wurde bei **39** S-Glutaminsäurediethylester eingesetzt. Die α -Methylengruppe des Glutaminsäurediethylesters zeigte nicht das zu erwartende Triplett sondern ein durch Diastereotopie bedingtes AB-System mit einer Kopplungskonstante $^2J = 9,14$ (Abbildung 7.20, H).

Obwohl die Produkte durch eine HPLC-Aufreinigung entsalzt wurden, lagen sie teilweise als Triethylammoniumsalze vor. Daraus ergaben sich zwei Signale, ein Quartett bei 3.21 ppm (Abbildung 7.20, CH_2 des Triethylamins) und ein Triplett bei 1,26 ppm (Abbildung 7.20, CH_3 des Triethylamins, teilweise überlagert vom Ethylester). Durch Integrieren dieser beiden Signale ließ sich berechnen, welcher Anteil als Triethylammoniumsalz vorlag, dies wurde bei der Berechnung der Molmasse berücksichtigt. Produkt **39** zum Beispiel lag als 0,1-faches Ammoniumsalz und 2,9-faches Triethylammoniumsalz vor.

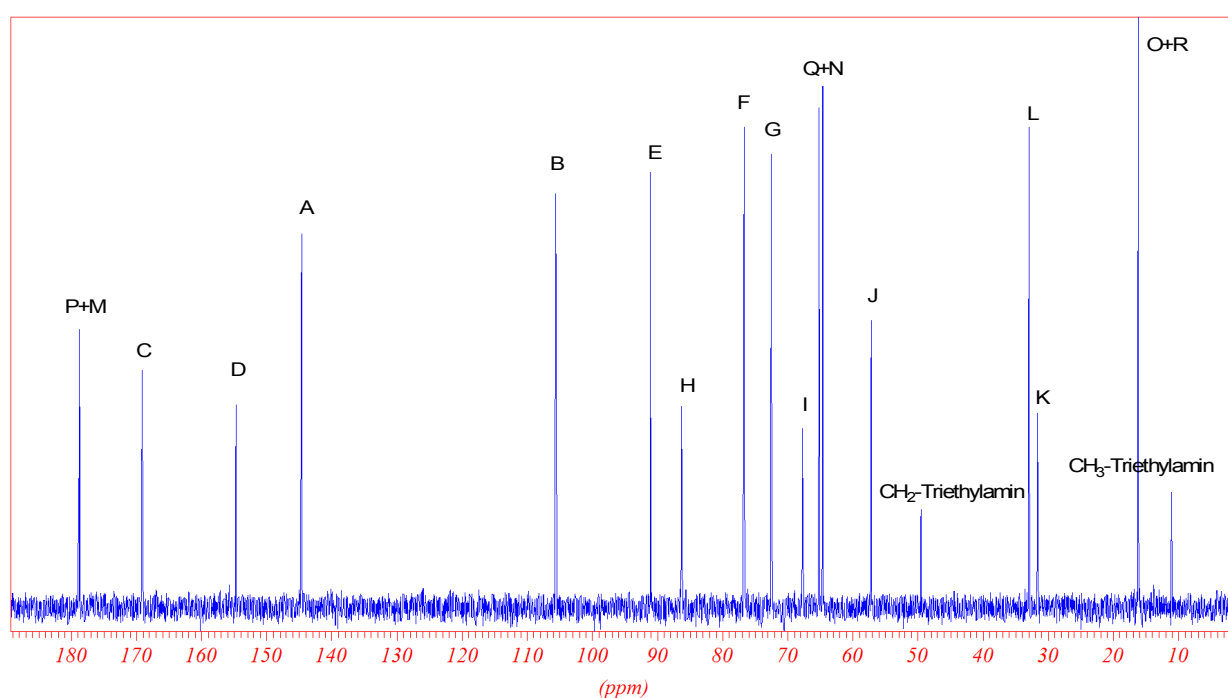
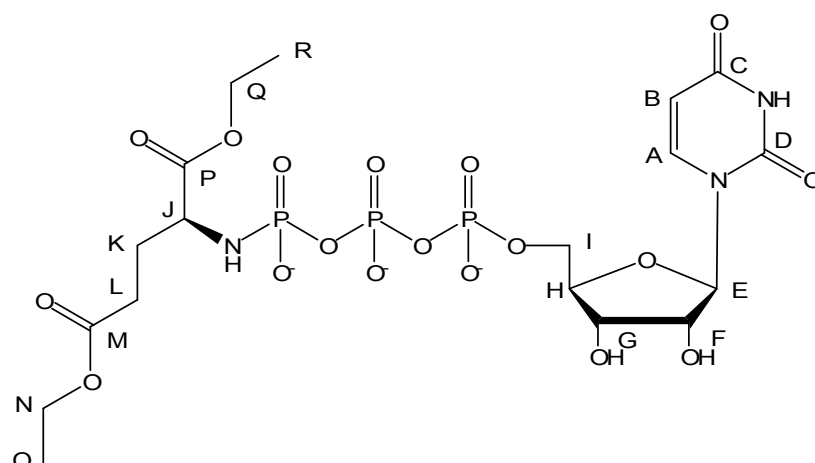


Abbildung 7.21: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **39**

Die Signale des Triethylamins fanden sich auch in den ^{13}C -Spektren wieder (Abbildung 7.21). Die beiden Carboxylfunktionen des eingesetzten S-Glutaminsäurediethylesters sind leicht zuzuordnen und fielen zusammen (Abbildung 7.21, P+M). Die Carbonylfunktionen der Nucleobase Uracil zeigten im ^{13}C -Spektrum charakteristische Signale bei 154 ppm und bei 145 ppm (Abbildung 7.21, D und A). Durch die Aufnahme eines ^{13}C -Spektrums im DEPT-Verfahren konnten die CH_2 -Gruppen eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 7.22, I, Q+N, L und K).

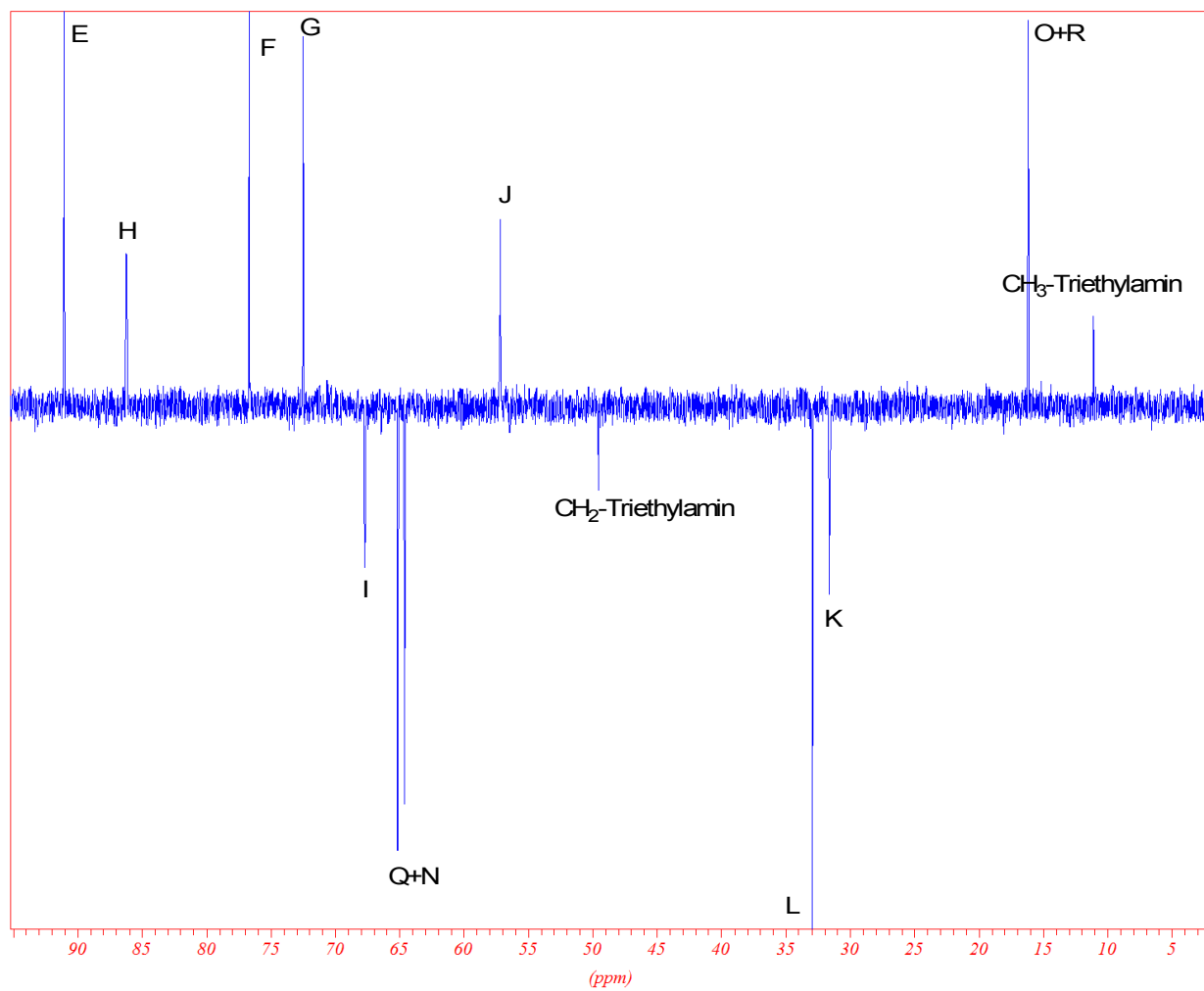


Abbildung 7.22: Ausschnitt aus dem ^{13}C -DEPT-NMR Spektrum von Verbindung 39

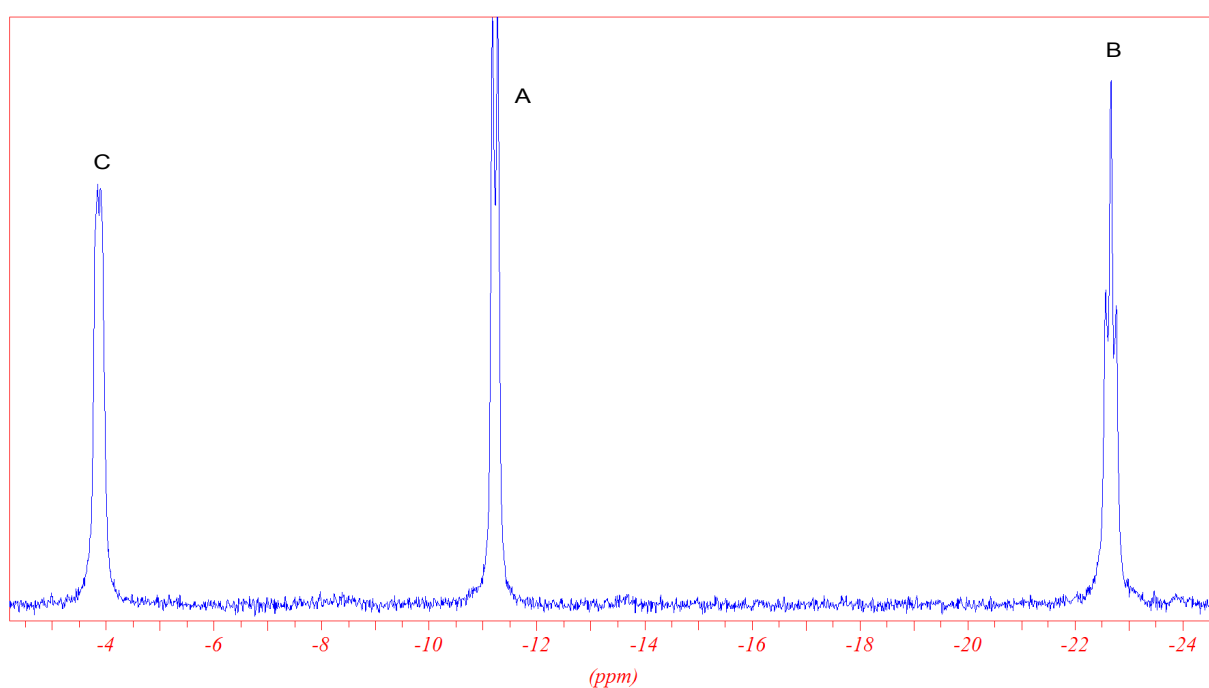
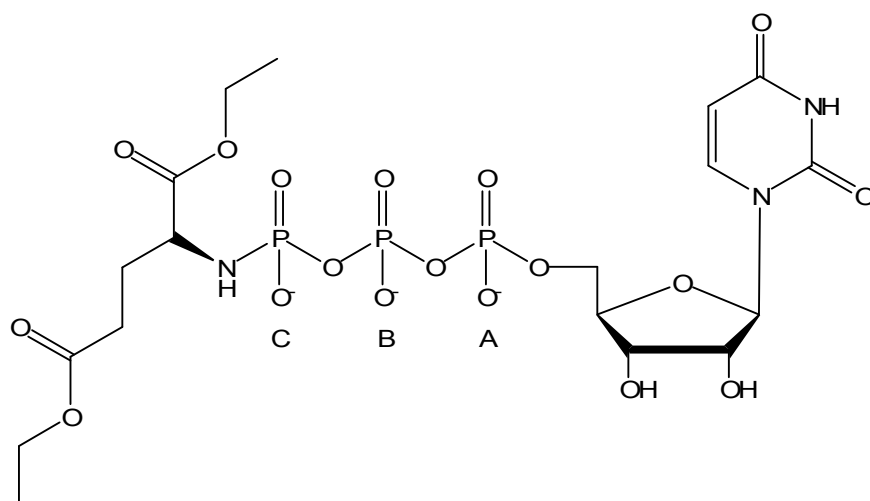


Abbildung 7.23: ^{31}P -NMR Spektrum von Verbindung **39**

Das ^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung **39** zeigte drei Signale, Das α - und das γ -Phosphat ergaben jeweils ein Duplett bei -11.23 und -3.87 ppm (Abbildung 7.23, A und C). Das β -Phosphat ergab ein Triplet bei -22.67 ppm (Abbildung 7.23, C).

Während die Signale der α - und β -Phosphate nahezu keine Veränderung bei den verschiedenen Produkten zeigten, verschiebt sich das Signal des γ -Phosphats je nach Substituent. In Tabelle 7.7 sind die Verschiebungen der Signale der α -, β -, γ -Phosphate der ATP-Derivate dargestellt.

Tabelle 7.7: Signalverschiebung im ^{31}P -NMR-Spektrum ATP-Derivate bei verschiedenen Substituenten (Lösungsmittel D_2O)

Produkt	$\text{P}\gamma$ [ppm]	$\text{P}\alpha$ [ppm]	$\text{P}\beta$ [ppm]
ATP	-10,30	-11,13	-22,54
11	-5,28	-11,20	-22,53
12	-4,23	-11,10	-22,47
13	-4,21	-11,14	-22,51
14	-3,82	-11,09	-22,47
15	-3,84	-11,11	-22,58
16	-2,08	-11,15	-22,53
17	-1,47	-11,10	-22,56
18	-2,08	-11,15	-22,53
19	-2,54	-11,14	-22,54
20	0,79	-11,13	-22,54
23	-3,21	-12,15	-23,69
24	-1,37	-11,03	-22,42
26	-0,74	-11,17	-22,57
27	-0,12	-10,73	-21,72
28	-0,65	-11,07	-22,23
29	-9,81	-11,12	-22,84
30	-10,53	-11,07	-22,79
31	-11,07	-11,07	-22,79
32	-10,56	-10,56	-22,20
33	-9,90	-11,09	-22,74

Wie sich aus der Tabelle sehr gut erkennen lässt, wurde das Signal für $\text{P}\gamma$ durch verschiedene elektronenziehende Substituenten sehr stark verschoben. Die Verschiebungen der $\text{P}\alpha$ - und $\text{P}\beta$ -Signale hingegen waren gering. Bei dem Produkt **31** waren die Verschiebungen der Signale des α - und γ -Phosphats sogar identisch (siehe Abbildung 7.24, A+C)

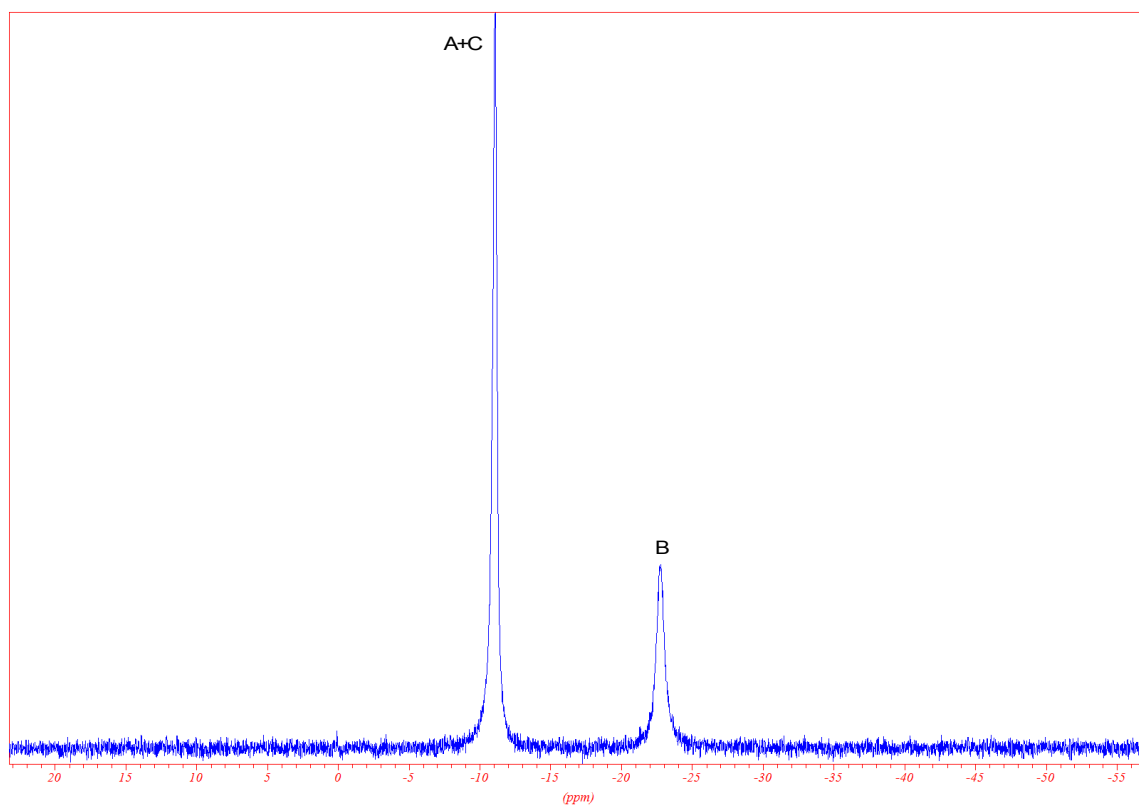
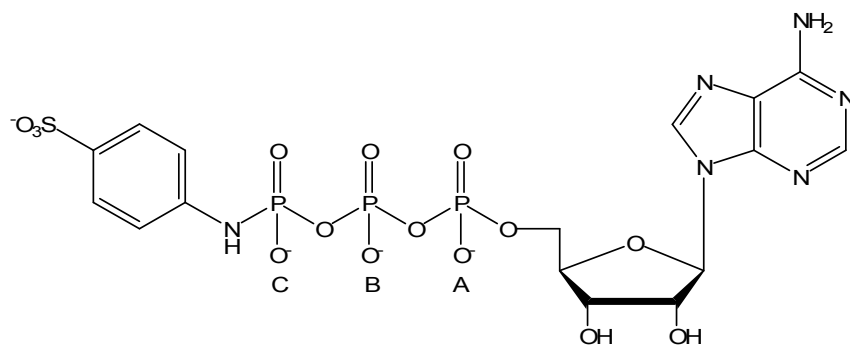


Abbildung 7.24: ^{31}P -NMR Spektrum von Verbindung **31**

Die Zersetzung der Phosphoramide zu den Edukten konnte zum einen mittels LC/MS ermittelt werden, zum anderen war aber auch das jeweilige ^{31}P -NMR sehr charakteristisch (Abbildung 7.25, ^{31}P NMR von **21**). Das ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **21** zeigte vier Signale, das Signal bei -10,30 war das γ -Phosphat des Edukts ATP.

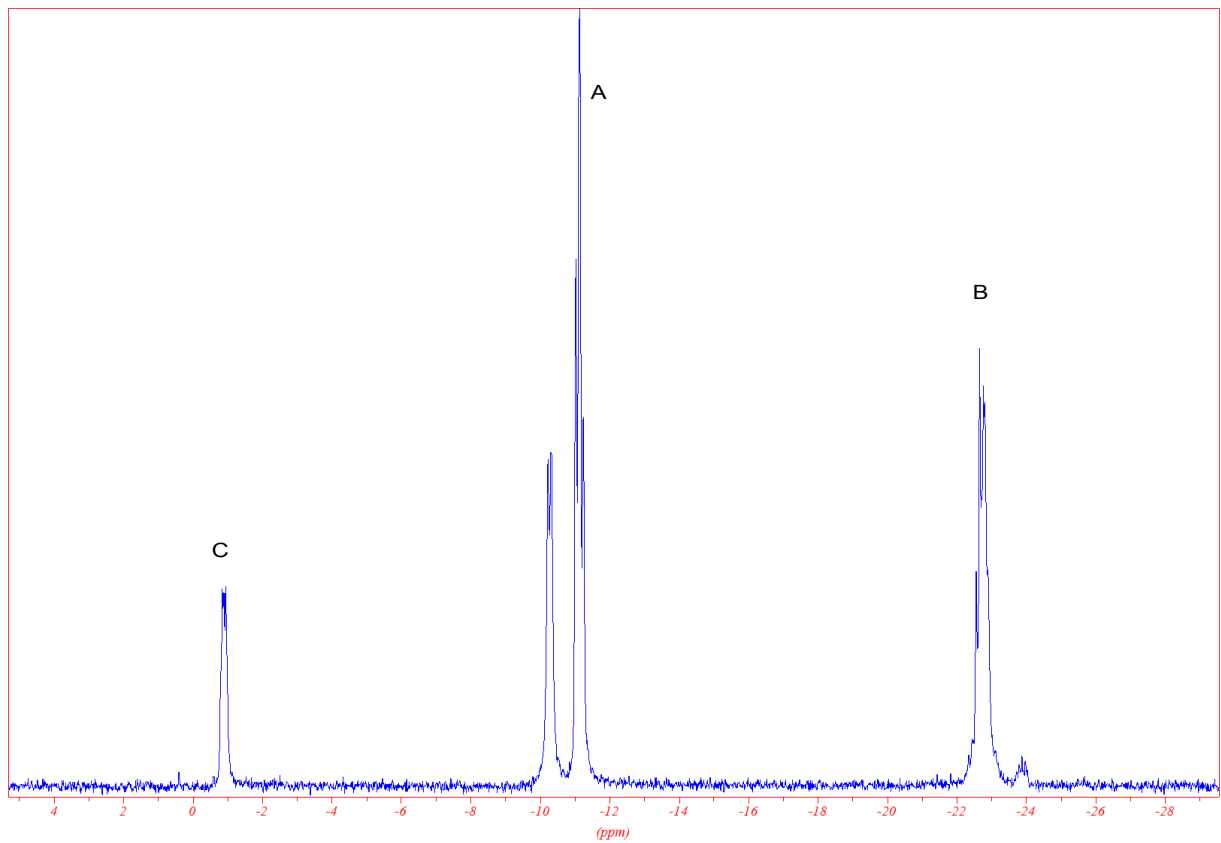
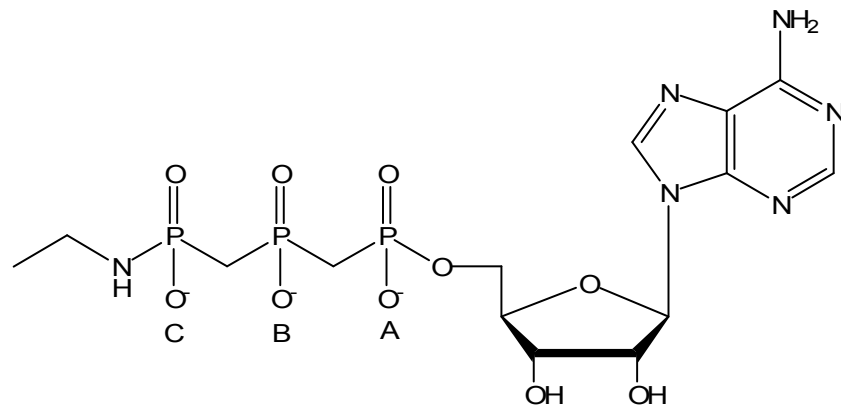


Abbildung 7.25: ^{31}P -NMR-Spektrum von **21** verunreinigt mit ATP

Verbindungen, bei der die Aminkomponente über einen Aminophosphonsäureester-Gruppe verfügten (Verbindung: **18**, **19**, **33**, **43** und **57**), zeigten im ^{31}P -NMR vier Signale. Beispielhaft ist das ^{31}P -NMR von **33** abgebildet (Abbildung 7.26).

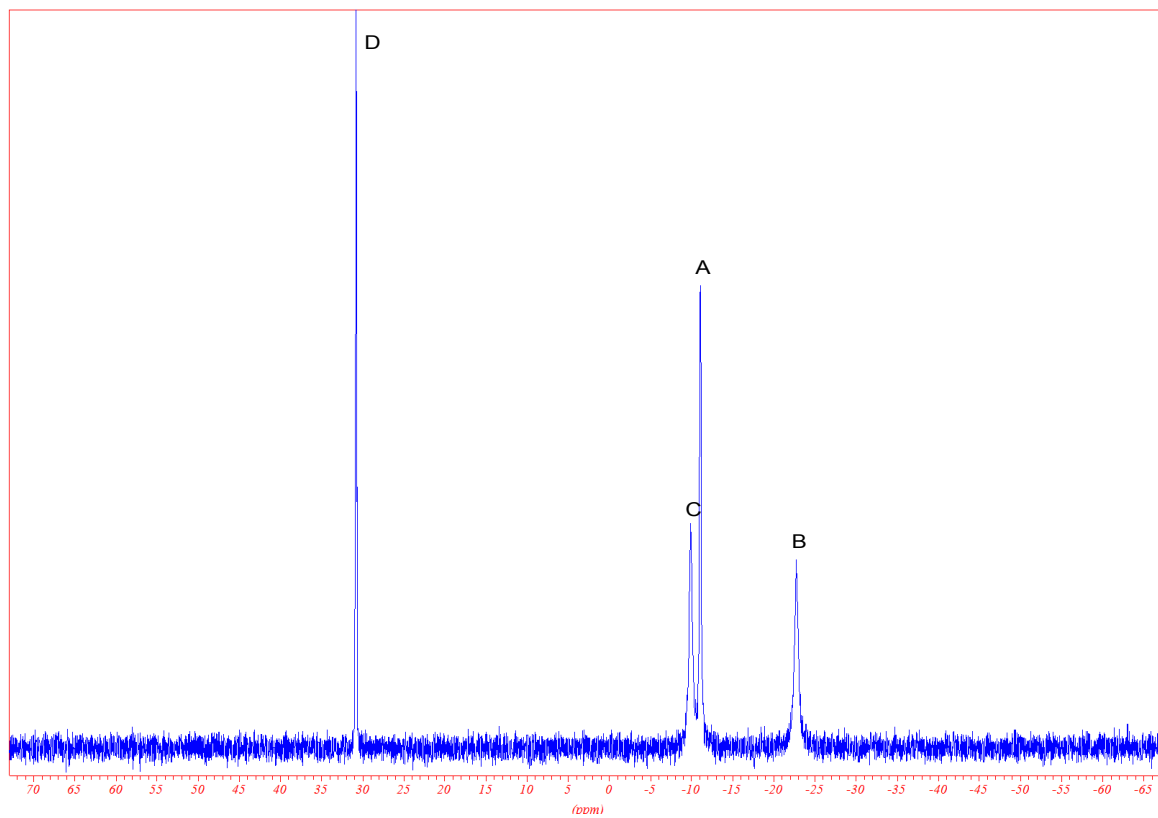
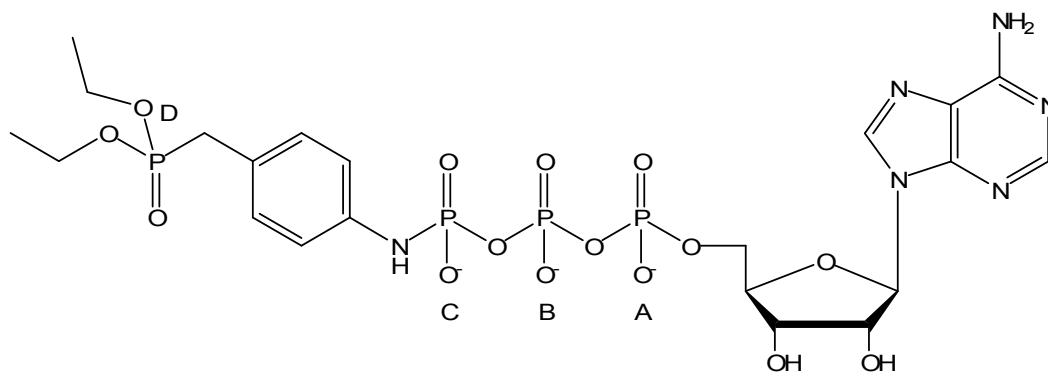


Abbildung 7.26: ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **33**

8 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zum empfindlichen Nachweis von Nucleotiden mittels Fluoreszenzmarkierung und anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion entwickelt. Zu diesem Zweck musste eine Derivatisierungsstrategie gefunden werden, die eine reproduzierbare und möglichst effiziente Kupplung von Nucleotid-Mono-, -Di- und Triphosphaten mit geeigneten Fluoreszenzmarkern ermöglicht. Es wurde gezeigt, dass die Komplexbildung des vicinalen Diols der Ribose in der 2',3'-Position mit fluoreszierenden Boronsäurederivaten aufgrund der Instabilität des Komplexes im Wässrigen nicht für die kapillarelektrophoretische Auftrennung geeignet ist. Demgegenüber eröffnet die Kupplung eines Fluoreszenzmarkers, der über eine primäre aliphatische Aminogruppe als Ankergruppe verfügt, die selektive Derivatisierung der terminalen Phosphatgruppe von Nucleotiden nach Carbodiimid-Aktivierung. Anhand eines Modells zur Umsetzung von AMP, GMP und ATP mit Dansylaminoethylamin (1), welches mit einem He-Cd-Laser angeregt werden kann, wurden Reaktionsparameter für die Derivatisierung der Nucleotide entwickelt, die eine einfache und effiziente Umsetzung unter milden Bedingungen mit einem vertretbaren finanziellen Aufwand ermöglichen sollten. Als unabdingbare Voraussetzung stellte sich heraus, dass der Fluoreszenzmarker wie auch der zur Aufrechterhaltung des geeigneten pH-Wertes einzusetzende Puffer frei von Carbodiimid-aktivierbaren funktionellen Gruppen wie Carbonsäuren oder Phosphatgruppen sein muss. Die mit diesem Modell gefundenen Reaktionsbedingungen konnten zur Fluoreszenzmarkierung von Nucleotiden in wässrigem Medium eingesetzt werden.

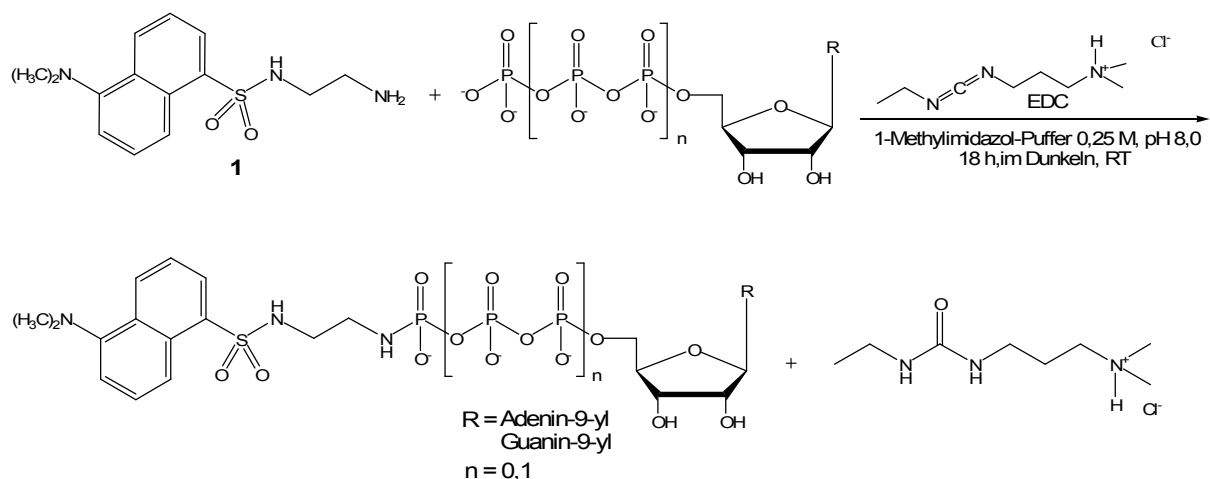


Abbildung 8.1: Derivatisierung der terminalen Phosphatgruppe von Nucleotiden nach Carbodiimid-Aktivierung mit Dansylaminoethylamin (**1**); EDC = N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl

Durch Synthese eines neuen Fluorescein-Derivatisierungsreagenzes (**8**) und der Verwendung eines Argon-Lasers zur Anregung, konnte die Derivatisierungsmethode weiter optimiert und eine bessere Empfindlichkeit erreicht werden.

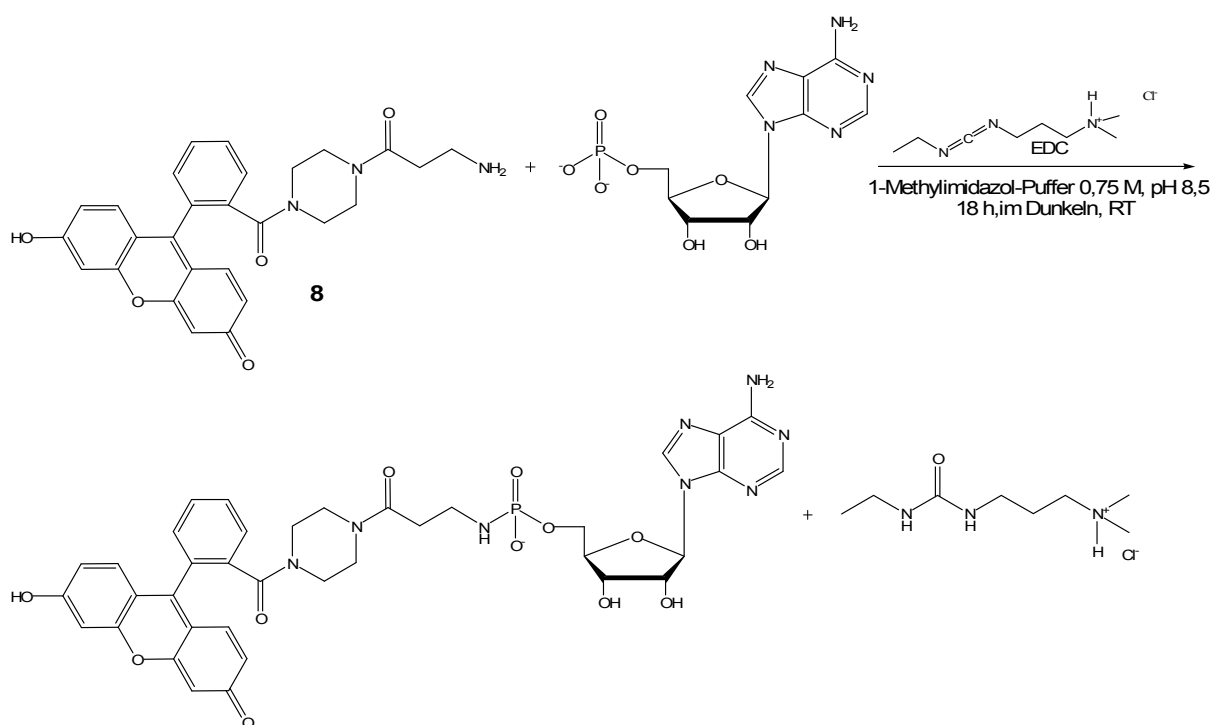


Abbildung 8.2: Derivatisierung der terminalen Phosphatgruppe von Nucleotiden nach Carbodiimid-Aktivierung mit Verbindung **8**; EDC = N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur Trennung der Fluoreszenz-markierten Nucleotide. Dabei erwies sich die Trennung mittels micellarer elektrokinetischer Chromatographie und die Verwendung eines lipophilen Fluorophors, einem BODIPY-Derivat (**9**), als geeignet (Abbildung 8.3), wobei aufgrund der starken lipophilen Wechselwirkungen des Fluoreszenzmarkers ein hinreichend großes micellares Fenster gewährleistet und eine Überlagerung der Nucleotid-Signale durch Marker-Überschuß vermieden werden konnte. Dadurch konnte die Derivatisierungslösung direkt, ohne weitere Aufreinigung, vermessen werden. Eine weitere Erhöhung der Empfindlichkeit erreichte man durch die Verwendung neutraler, Polyacrylamid-beschichteter Kapillaren. Mit dieser Methode konnte das Detektionslimit der Nucleotide auf bis zu 1 nM gesenkt werden. Mit 3,5-Disulfobenzoesäure als internem Standard wurde eine Verbindung gefunden, die sich unter den verwendeten Bedingungen mit dem Fluorophor (**9**) derivatisieren lässt und deren kapillarelektrophoretische Eigenschaften für die angewandte Trennmethode geeignet waren. Damit wurde eine hohe Reproduzierbarkeit der Methode gewährleistet.

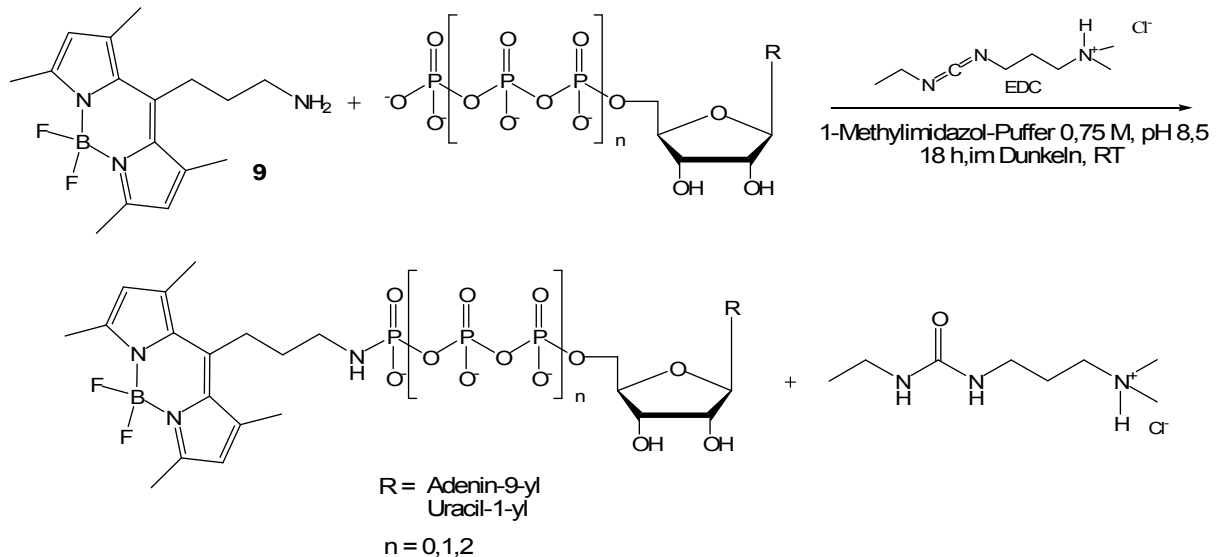


Abbildung 8.3: Derivatisierung der terminalen Phosphatgruppe von Nucleotiden, nach Carbodiimid-Aktivierung, mit Verbindung **9**; EDC = N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl

Die Phosphoramid-Verknüpfung stellte des Weiteren eine Möglichkeit zur Synthese neuer P2Y-Rezeptorliganden dar. Es wurden UTP- und ATP-Derivate der in Abbildung 8.4 dargestellten Struktur synthetisiert.

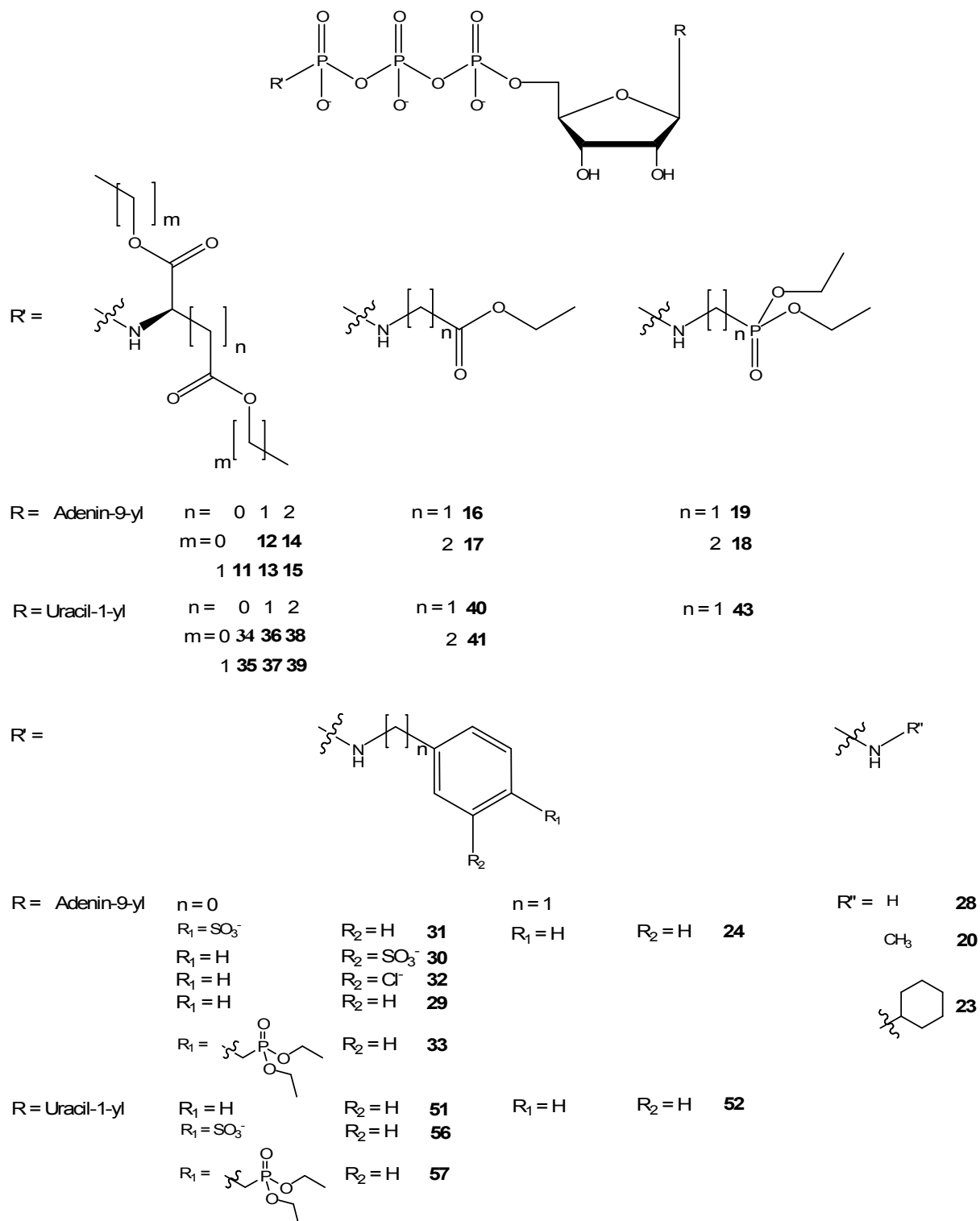


Abbildung 8.4: Dargestellte Nucleotid-Phosphorsäureamide

Ausgehend von ATP oder UTP konnte eine einfache Methode entwickelt werden, um Nucleosidtriphosphorsäureester- γ -amide zu synthetisieren. Die terminale Phosphatgruppe der Nucleotide wurde durch N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl (EDC) aktiviert und die Aminkomponente wurde direkt zugegeben. Die Eintopfsynthese wurde in 1-Methylimidazol-Puffer bei einem pH-Wert von 8,5 durchgeführt. Die bei der Umsetzung von UTP mit aromatischen Aminen auftretende N-Acyllarnstoffbildung konnte durch die Zugabe von Hydroxybenzotriazol (HOBt) unterdrückt werden.

Des Weiteren gelang die Synthese von Adenosintetraphosphat aus ATP durch die Umsetzung mit Diphenylphosphorchloridat und anschließender Reaktion mit Dihydrogenphosphat (vorliegend als Tributylammoniumphosphat) im Wasserfreien.

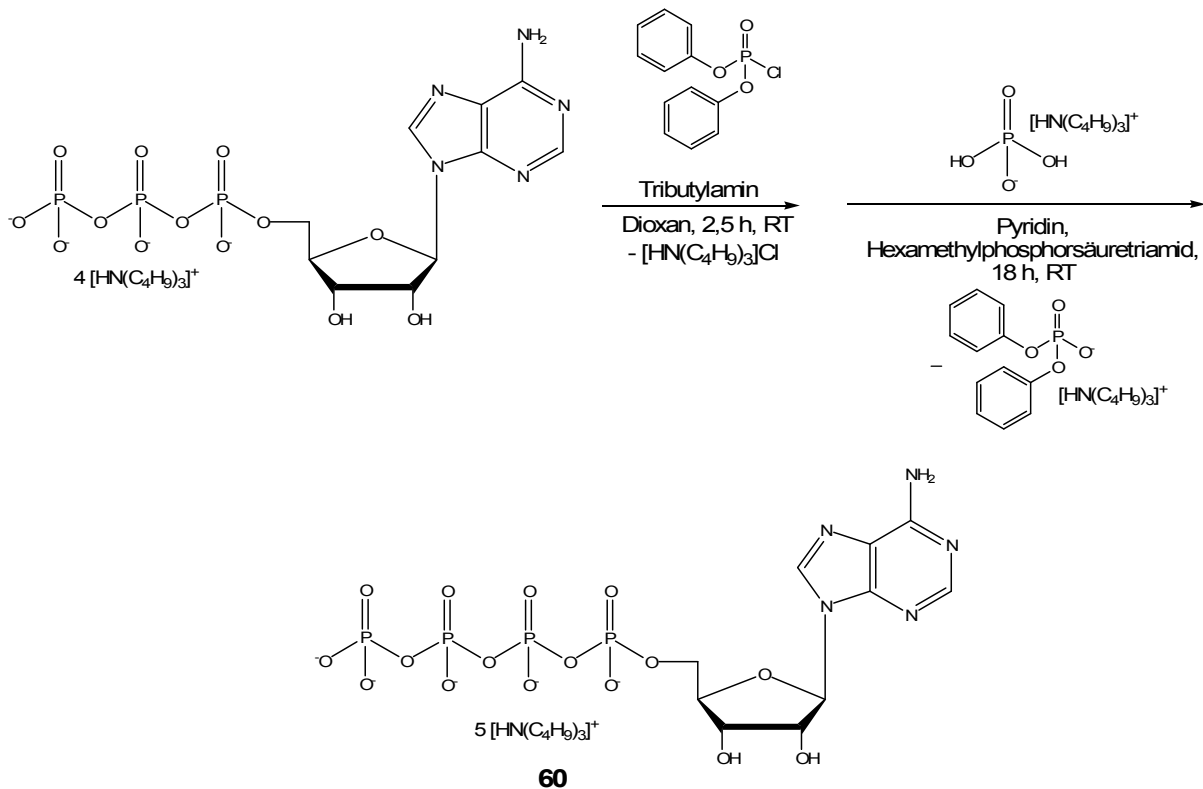


Abbildung 8.5: Darstellung von Adenosintetraphosphat

Für die dargestellten Verbindungen konnte eine zweistufige Reinigungsmethode entwickelt werden. Zuerst wurden die einzelnen organischen Reaktionsprodukte durch Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt, bevor die Entsalzung der Rohprodukte durch präparative Reversed-Phase HPLC-Chromatographie erfolgte. Die Amide der Nucleosidtriphosphate ließen sich in einer für diese Verbindungsklasse sehr hohen Reinheit von 95-99% isolieren. Die pharmakologische

Testung der synthetisierten Phosphoramide steht noch aus, da die Stabilitätsuntersuchungen noch nicht abgeschlossen sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Fluoreszenzdetektion von Nucleotiden sollte sich auf biologische Proben übertragen lassen und stellt aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit eine neue Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Nucleotiden dar, die den bisher bekannten Methoden - insbesondere was Uracilnucleotide betrifft - deutlich überlegen ist.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeiner Teil

Für die Darstellung und Charakterisierung der Verbindungen wurden die im Folgenden aufgeführten Materialien und Geräte verwendet.

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (über VWR, Siegburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Lösungsmittel

Dichlormethan zur Säulenchromatographie und zur Synthese wurde über Calciumhydrid destilliert. Der absolut trockene Ether wurde durch Trocknung mit Natrium und anschließender Destillation erhalten. Die Lagerung erfolgte über Molekularsieve 2 Å. Alle anderen Lösungsmittel wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität verwendet. Trockene Lösungsmittel, z.B. DMF, Pyridin, THF und 1,4-Dioxan, von der Firma Acros Organics wurden in Gebinden mit Septum eingesetzt.

Puffer

Herstellung des Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffers:

Triethylamin (2 mol, 202 g) wurde mit Wasser auf zwei 2 l aufgefüllt, es wurde solange Trockeneis zugefügt bis ein pH-Wert von 7,4 erreicht war. Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier überprüft.

Herstellung des 1-Methylimidazol-Puffers:

1-Methylimidazol (0,025 mmol, 0,002 g) wurde in einen 100 ml Messkolben gegeben und mit Wasser aufgefüllt, der pH-Wert von 8,5 wurde mit konz. HCl mittels eines pH-Meters eingestellt.

Herstellung des Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers:

Ammoniumhydrogencarbonat (100 mmol, 7,9 g) wurde mit Wasser auf 2 l aufgefüllt.

Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionskontrolle wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt), sowie mit RP-Kieselgel-beschichtete Aluminiumplatten RP-18 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) verwendet.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde als Flash-Chromatographie mit einem System der Firma Büchi (Essen), bestehend aus Pumpe C-601, Pumpensteuergerät C-610 und Fraktionssammler C-660 auf Kieselgel 60, Korngröße 0,040-0,063 mm (Merck, Darmstadt), durchgeführt.

Ionenaustauschchromatographie mittels FPLC

Die Ionenaustauschchromatographie wurde an einer Amershan Bioscience Äkta FPLC durchgeführt. Es wurde entweder eine XK-16-Säule der Abmessungen 200 x 26 mm (Pharmacia), befüllt mit Sephadex DEAE-A-25-Gel oder eine Hiprep 16/10 Q FF-Säule verwendet. Die Flußrate betrug 1,8-2,0 ml/min. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus deionisiertem Wasser oder 0,05 M-Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH 7,4) und 1 M-Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH 7,4) verwendet.

DEAE-A25-Sephadex (Anionenaustausch-Chromatographie)

DEAE-A25-Sephadex-Pulver (13 g zum Befüllen einer Pharmacia XK-16-Säule) wurden in Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (1 M, pH 7.4) suspendiert und bei Raumtemperatur 48 h lang gequollen, dabei wurde gelegentlich umgeschüttelt. Der Überstand wurde entfernt und das Gel über einen Büchner-Trichter mit Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (1 M, pH 7,4) gewaschen. Das Gel wurde in Wasser suspendiert, 1 h gequollen und über einen Büchner-Trichter mit viel Wasser gewaschen, bis das Waschwasser neutral reagierte. Das Gel wurde erneut in Wasser suspendiert und im Vakuum entgast. Der Überstand wurde abdekantiert bevor die Säule langsam über einen Glasstab mit dem Gel befüllt wurde.

Bedingungen der Ionenaustauschchromatographie

Methode A:

Verwendete Elutionsmittel:

Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (1 M, pH 7,4)

Demineralisiertes Wasser

Start: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (40%)

318 ml Gradient bis Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (100%).

Verwendete Säule:

Sephadex-DEAE-Gel befüllte XK-16-Säule mit einem Säulenvolumen von 106 ml.

Methode B

Verwendete Elutionsmittel:

Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (1 M, pH 7,4)

Demineralisiertes Wasser

Start: Wasser (100%)

106 ml Gradient bis Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (20%), dann

318 ml Gradient bis Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (100%).

Verwendete Säule:

Sephadex-DEAE-Gel befüllte XK-16-Säule mit einem Säulenvolumen von 106 ml.

Methode C

Verwendete Elutionsmittel:

Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (1 M, pH 7,4)

Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (0,05 M, pH 7,4)

Start: 1 M-Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (15%)

212 ml Gradient bis 1 M-Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (30%), dann

424 ml Gradient bis 1 M-Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (100%).

Verwendete Säule:

HiPrep 16/10 Q FF-Säule, mit einem Säulenvolumen von 20 ml.

Die gesammelten Fraktionen wurden gefriergetrocknet und mittels HPLC aufgearbeitet, dieser Schritt diente der Aufreinigung und der Entsalzung der Produkte.

Präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung der Endprodukte wurde mit einer HPLC, die folgende Systemkomponenten enthielt, durchgeführt:

Pumpe Wellchrome K-1800 (Knauer GmbH, Berlin), Probenauftragsschleife mit 7 ml Fassungsvermögen (Knauer GmbH, Berlin), Spectrophotometer WellChrome K-2600 (Knauer GmbH, Berlin), Fraktionssammelventil (Knauer GmbH, Berlin) und Eurospher 100-Säule, Abmessungen 250 x 20 mm (innerer Durchmesser), gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer GmbH, Berlin). Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Methanol (HPLC-Grade, Merck, Darmstadt) und deionisiertem Wasser, in einigen Fällen unter Zusatz von je 0,1% Trifluoressigsäure (> 99% pur, Merck, Darmstadt) verwendet, die Flußrate betrug 20 ml/min.

Bei Verwendung eines Gradienten aus Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (50 mM) und Acetonitril wurde die Auftrennung an einer semipräparativen HPLC, die folgende Systemkomponenten enthielt, durchgeführt:

Pumpe Knauer HPLC 64, Probenauftragsschleife mit 1 ml Fassungsvermögen, Detektor Knauer Variable Wavelength Monitor und Eurospher 100-Säule, 200 mm x 20 mm Innendurchmesser gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 7 µm (Knauer GmbH, Berlin), die Flußrate betrug 10 ml/min.

Bedingungen der RP-HPLC:

Methode D

Elutionsmittel:

Deionisiertes Wasser, Zusatz von 0,1% Trifluoressigsäure

Methanol

10 min isokratisch mit Methanol 10%, dann

30 min Gradient bis Methanol 60%.

Methode E

Elutionsmittel:

Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer 50 mM

Acetonitril

Start: Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer 100%, dann

5 min Gradient bis Acetonitril 5%, dann

5 min Gradient bis Acetonitril 7%, dann

5 min Gradient bis Acetonitril 10%, dann

15 min Gradient bis Acetonitril 50%.

Die gesammelten Fraktionen wurden lyophilisiert, bei Bedarf wurde eine zweite HPLC-Aufreinigung durchgeführt.

Gefriertrocknung

Die schonende Isolierung von Produkten aus wässrigen Lösungsmitteln wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, GmbH, Osterode) vorgenommen.

Hydrierapparat

Katalytische Hydrierungen wurden mit dem Wasserstoffgenerator Hogen[®] GC Hydrogen Generator der Firma Proton Energy Systems (Wallingford, CT, USA) durchgeführt. Dieser war über ein Reduzierventil mit einem Reaktionsgefäß, dem „Micro Vial, 5 ml“ der Firma Kimble & Kontes (Owens, IL, USA) verbunden.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker 500 Spektrometer (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz, ³¹P: 202 MHz) aufgenommen. Die Kopplungskonstanten werden in Hertz [Hz] und die chemischen Verschiebungen in parts per million [ppm] angegeben. Die verwendeten Lösungsmittel DMSO-d₆, D₂O und CDCl₃ dienten jeweils als interner Standard: ¹H: δ [ppm] DMSO-d₆: 2,49; MeOD: 3,35; D₂O: 4,65; CDCl₃: 7,24. ¹³C: δ [ppm] DMSO-d₆: 37,7; MeOD: 49,3; D₂O: TMS wurde als interner Standard verwendet; CDCl₃: 77,0. Bei der Aufnahme der ³¹P-Spektren diente 85%ige Phosphorsäure als externer Standard. Signalaufspaltungen werden mit folgenden

Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br = breit, p = pseudo.

Kapillarelektrophese

Alle Messungen wurden an einem P/ACE Kapillarelektrophese-Gerät MDQ Capillary Electrophoresis (Beckman Coulter Instruments, Fullerton CA, USA) durchgeführt.

CE-Bedingungen zur Reinheitsbestimmung und zur Reaktionskontrolle

Methode F

Es wurde eine Polyacrylamid-beschichtete Quarzkapillare (30,2 cm (20 cm effektive Länge) x 50 µm Innendurchmesser) verwendet. Als Trennpuffer wurde ein 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) eingesetzt. Die zur Trennung angelegte Stromstärke betrug -60 µA. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare mit Wasser und mit Puffer für je 1 min gespült. Detektiert wurde mit einem DAD-Detektor, die Elektropherogramme wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm ausgewertet.

Methode G

Als Kapillare wurde eine Quarzkapillare (50,2 cm (40 cm effektive Länge)) x 75 µm Innendurchmesser) verwendet. Die zur Trennung angelegte Spannung betrug 15 kV als Trennpuffer wurde ein 20 mM Phosphatpuffer (pH 6.5) verwendet. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare für jeweils zwei min mit Natronlauge 0,1 M, demineralisiertem Wasser und mit Puffer gespült. Detektiert wurde mit einem DAD-Detektor, die Elektropherogramme wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm ausgewertet.

Methode H

Zur Trennung wurde eine konstante Spannung von 20 kV angelegt, als Trennpuffer wurde ein 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 verwendet. Als Kapillare wurde eine Quarzkapillare (50,2 cm (40 cm effektive Länge) x 75 µm Innendurchmesser)

eingesetzt. Die Anregungswellenlänge des Argon-Lasers betrug 488 nm. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen. Die einzelnen Proben wurden hydrodynamisch mit einem Druck von 0,5 psi für 5 s injiziert. Vor jeder Messung wurde die Kapillare für je 2 min mit Natronlauge 0,1 M, mit demineralisiertem Wasser und mit Puffer gespült.

Reinheitsbestimmung der Phosphoramide mittels Kapillarelektrophorese

Die Reinheitsuntersuchungen der Phosphorsäureamide erfolgten mittels Kapillarelektrophorese. Es wurde jeweils eine 500 µM Lösung des jeweiligen Phosphorsäureamids in Wasser hergestellt und vermessen.

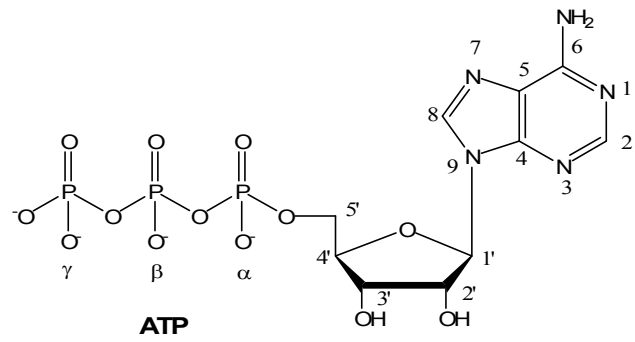
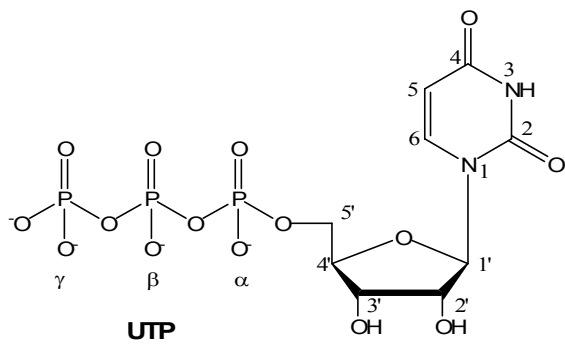
CE-Bedingung: Methode F

HPLC/MS

Reinheit und Identität der Endprodukte wurden zudem mit einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit einem DAD-Detektor und einer Massenspektrometrie, bestimmt. Die zu prüfende Substanz (1 mg) wurde in 1 ml 2 mM-Natriumacetat-Puffer gelöst. Davon wurden 10 µl in eine HPLC-Anlage (Agilent 1100) mit Phenomenex Luna C-18-Säule, Korngröße 3 µm injiziert und nach Gradientenelution (kontinuierlicher Gradient von Acetonitril 1% nach 100% über 20 min) mit einem DAD Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm und einem API 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) gemessen. Der Analyt wurde per ESI (Electron Spray Ionisation) ionisiert.

Verwendetes Wasser

Bei dem für sämtliche Synthesen und Puffer verwendeten Wasser handelt es sich um demineralisiertes Wasser, welches zusätzlich über eine Milliporanlage aufgereinigt wurde.

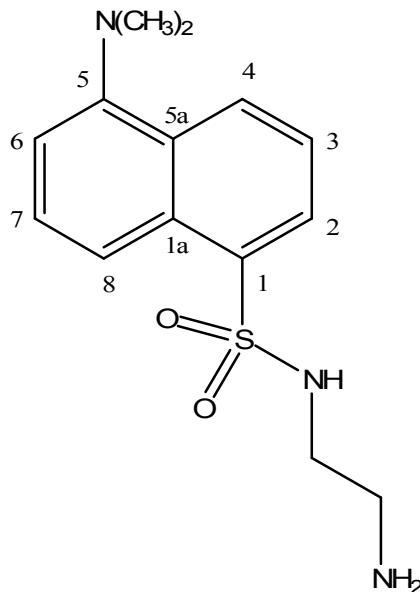
IUPAC-Zählweise der Nucleotide

9.2 Synthesen

9.2.1 Darstellung von N-(2-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)naphthyl-1-sulfonamid (Dansylaminoethylamin, 1)⁶⁸

Eine Lösung aus Dansylchlorid (3.7 mmol, 1 g) gelöst in Dimethylformamid wurde langsam zu einer Lösung aus Ethylendiamin (10%iger Überschuss), gelöst in 2 ml DMF, getropft. Das DMF wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde über Kieselgel aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen wurden getrocknet (Fließmittel: Dichlormethan:Methanol:Triethylamin (100:5:2)). Zur besseren Kristallisation wurde der Rückstand zwei Tage lang in 50 ml Diethylether gerührt. Dadurch, dass Ethylendiamin in 10%igem Überschuss vorlag und die Dansylchlorid-Lösung nur langsam hinzugefügt wurde, ließ sich die Bildung von zweifach gekuppeltem Ethylendiamin reduzieren. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 75% isoliert werden.

Struktur:



Ausbeute: 75%, 0,81 g

Aussehen: Schwach gelber Feststoff

Leicht löslich in: Wasser, DMF, Methanol

Berechnete Molekülmasse: 293 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 2.83 (6H, s, 2 x CH_3); 3.29 (m, 4H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, 2 x CH_2); 7.26 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, H-6); 7.59 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz und $^3\text{J} = 8.75$ Hz, H-7); 7.63 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz und $^3\text{J} = 8.50$ Hz, H-3); 8.12 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.3$ Hz, H-8); 8.27 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.5$ Hz, H-4); 8.48 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.5$ Hz, H-2).

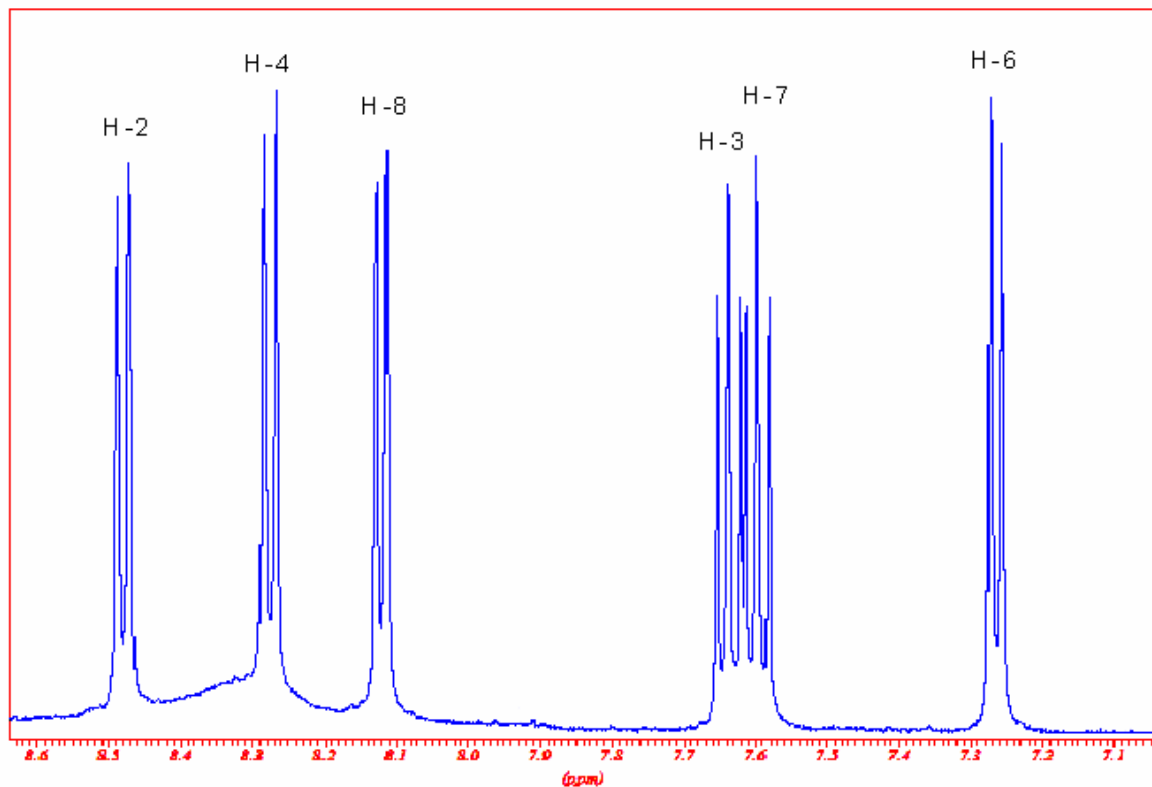


Abbildung 9.1: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 1

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 38.80 ($\underline{\text{CH}_2\text{-NH}_2}$); 39.70 (2 x CH_3); 40.20 ($\text{SO}_2\text{-CH}_2$), 115.40 (C-6); 119.10 (C-8); 123.73 (C-2); 128.19 (C-3); 128.66 (C-7); 129.10 (C-5a); 129.25 (C-1a); 129.84 (C-4); 135.31 (C-1); 151.57 (C-5).

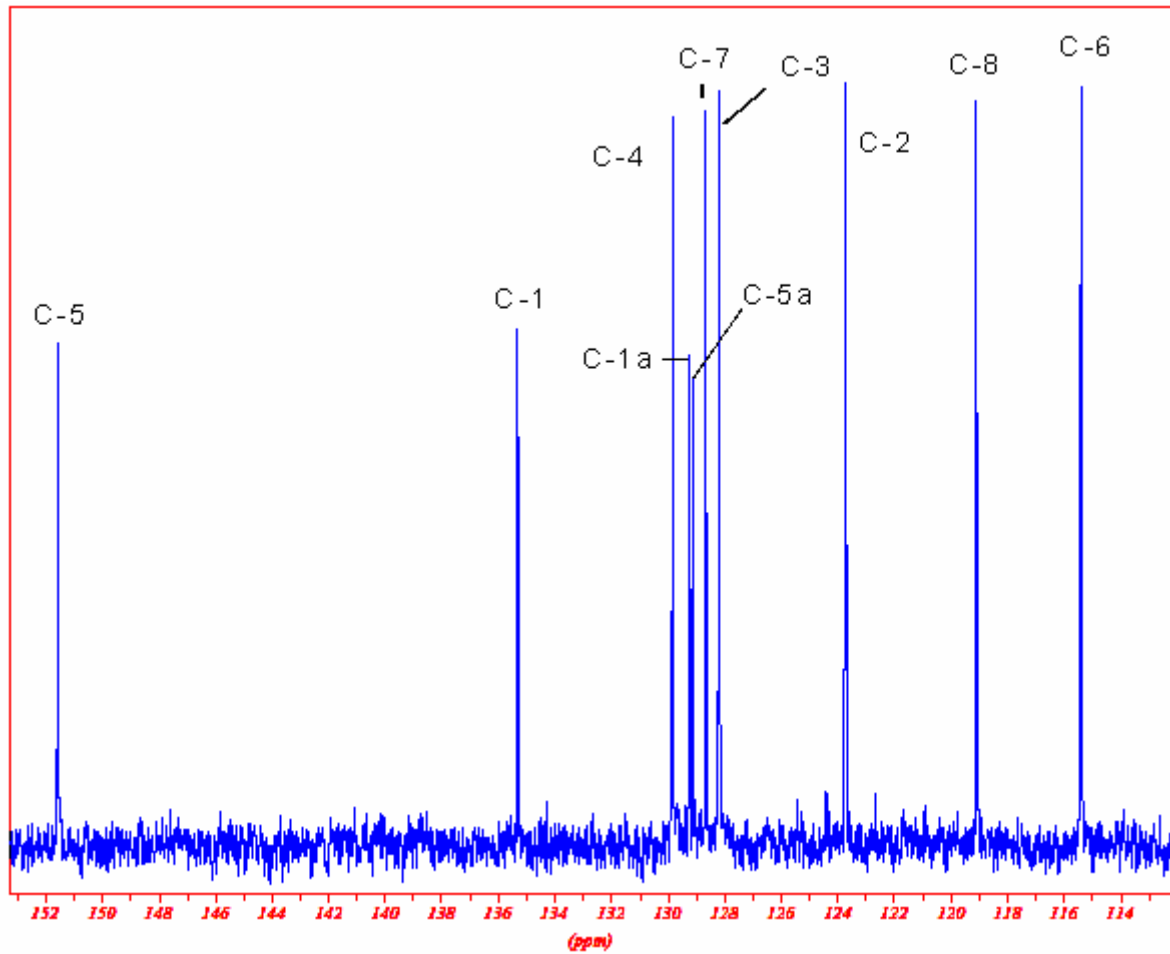


Abbildung 9.2: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung 1

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 294.1

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 292.1

Reinheit HPLC: 100%

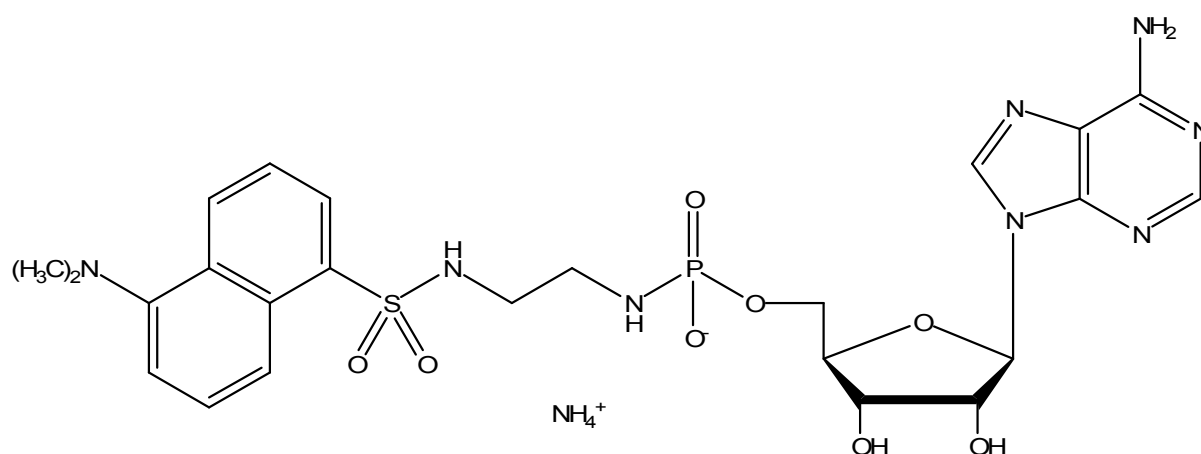
Reinheit CE: 100%, (Methode G)

9.2.2 Darstellung von ((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methylphosphorsäure-2-(1-(dimethylamino)naphthyl-5-sulfonamido)ethyl-amid, (Dansyl-AMP, 2)⁶⁸

AMP (0,32 mmol) wurde eingewogen, in 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M pH 8,0) gelöst und mit einem 5fachen Überschuss an EDC, gelöst in 2 ml 1-Methylimidazol-Puffer (0,1 M, pH 8,0), versetzt. Nach 1 min wurde ein 8facher Überschuss an Dansylaminoethylamin in 5 ml DMF zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 h im Dunkeln gerührt, Wasser und DMF wurden anschließend im Vakuum entfernt.

Das Reaktionsgemisch wurde per HPLC aufgearbeitet (Methode E) und die gesammelte Fraktion lyophilisiert.

Struktur:



Ausbeute: 40%, 81,79 mg

Aussehen: schwach gelbes Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 639 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 2.82 (s, 6H, 2 x CH_3); 3.15 (m, 4H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, 2 x CH_2), 3.81 (m, 2H, $^3\text{J} = 2.20$ Hz, H-5'); 4.11 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 2.2$ Hz, H-4'); 4.30 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 4.75$ Hz, H-3'); 4.47 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz, H-2'); 5.85 (d, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz, H-1'); 7.23 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz, H-6); 7.45 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz und $^3\text{J} = 7.6$ Hz, H-7); 7.54 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 8.8$ Hz und $^3\text{J} = 7.6$ Hz, H-3); 7.98 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.25$, H-8); 8.10 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.8$ Hz, H-4); 8.19 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.29 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.5$ Hz, H-2); 8.47 (s, 1H, H-2, Adenin).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6) δ 42.62 ($\text{H}_2\text{C-N-P}$); 43.61 ($\text{SO}_2\text{-CH}_2$); 47.77 (2 x CH_3); 66.04 (C-5'); 72.75 (C-3'); 77.07 (C-2'); 86.23 (C-4'); 89.98 (C-1'); 118.57 (C-6); 121.61 (C-5, Adenin); 126.52 (C-8); 131.35 (C-2); 131.52 (C-3); 131.76 (C-7); 132.59 (C-5a); 132.64 (C-1a); 133.22 (C-4); 136.48 (C-1); 142.19 (C-8, Adenin); 151.37 (C-4, Adenin); 153.25 (C-5); 155.35 (C-2, Adenin); 158.11 (C-6, Adenin).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 623.2

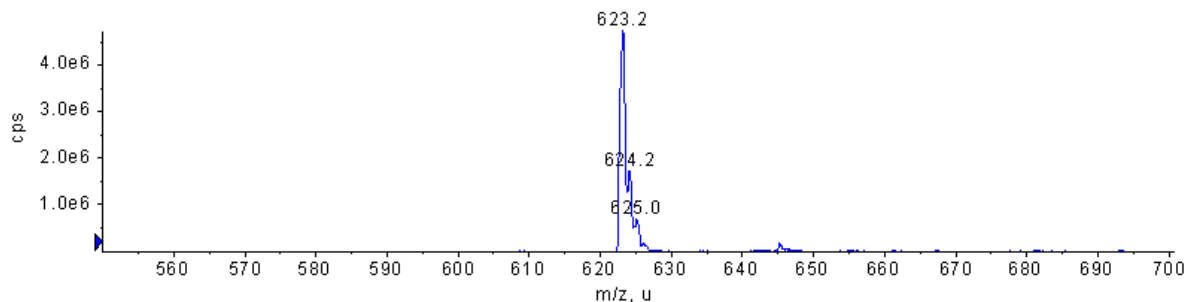


Abbildung 9.3: Massenspektrum von Verbindung **2** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

$[\text{M-H}]^-$: 621.3

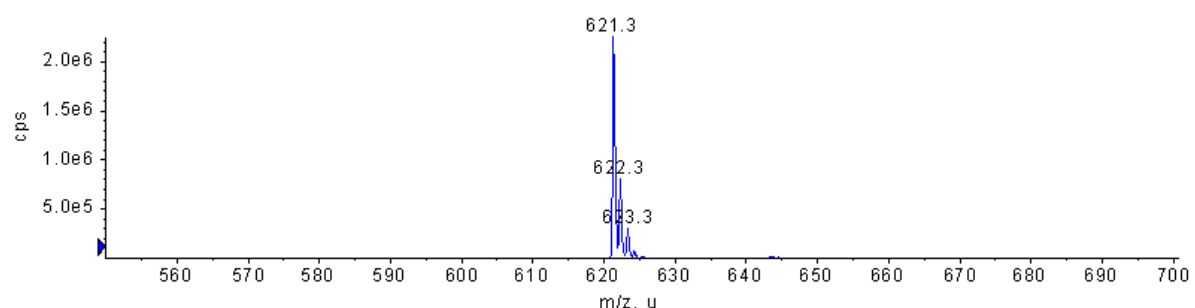
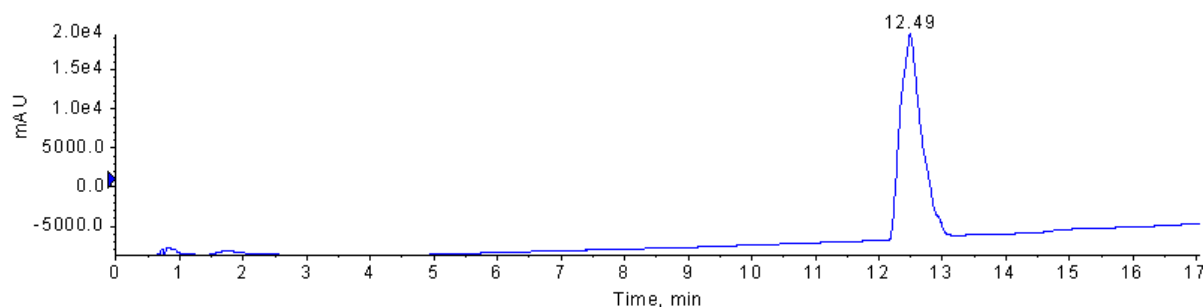


Abbildung 9.4: Massenspektrum von Verbindung **2** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 99%Abbildung 9.5: Chromatogramm von Verbindung **2**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

9.2.3 Darstellung von 6-Hydroxy-9-{2-[1-(3-aminopropanoyl)piperazin-4-carbonyl]phenyl}-3H-xanthen-3-on (**8**)

Boc-geschütztes β -Alanin (0,770 g, 4,0 mmol) wurde eingewogen und in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, N-Methylmorpholin (0,406 g, 4,0 mmol) wurde zugesetzt. Die Lösung wurde in einem Isopropanolbad mit Trockeneis auf -25°C abgekühlt, Isobutylchloroformiat (0,546 g, 0,522 ml, 4,077 mmol) wurde zugegeben. Nach einer Minute wurde 1,0 g 1-Z-geschütztes Piperazin, gelöst in 3 ml THF, zugefügt. Die Lösung wurde 3 h gerührt. THF wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in 50 ml Wasser aufgenommen, mit einer 2 M Natriumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die gesammelten Fraktionen an Ethylacetat wurden dreimal mit einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Ethylacetat unter reduziertem Druck entfernt.

Das so gewonnene Amid (300 mg) wurde in ein Hydriergefäß eingewogen und in 4 ml Methanol gelöst, 40 mg Palladium 10% auf Aktivkohle wurden, als Katalysator, zugefügt. Das Gefäß wurde an den Wasserstoffgenerator angeschlossen und es wurde für 4 h bei 2.07 bar Wasserstoff eingeleitet.

Die Aktivkohle wurde über einer Fritte abfiltriert und mit 50 ml Wasser, 50 ml Methanol:Wasser (50:50) und 50 ml Methanol gespült. Das Filtrat wurde gesammelt, und lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Produkt (0,68 mmol) wurde in 2 ml wasserfreiem DMF aufgenommen.

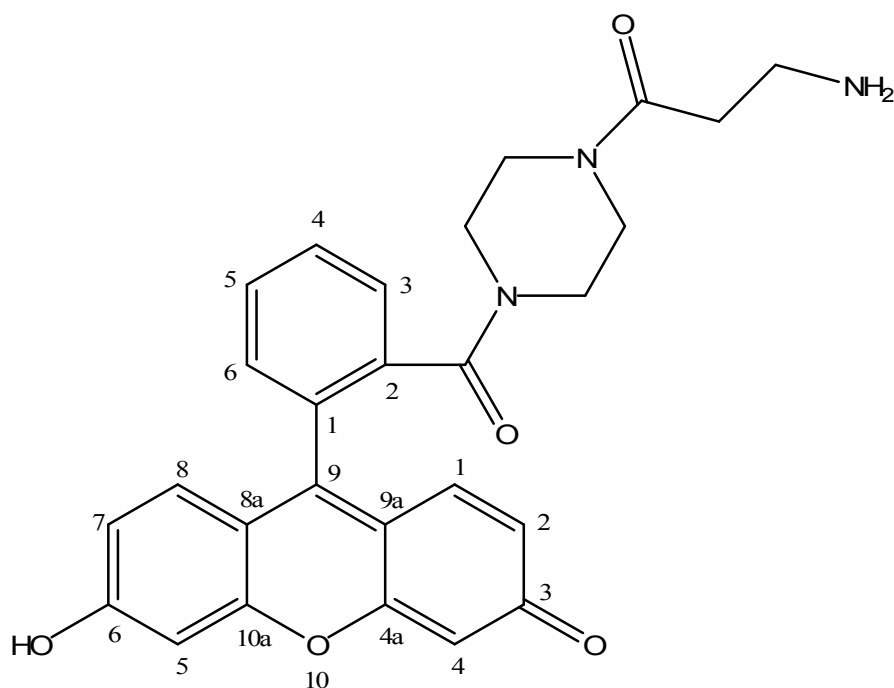
Fluorescein (0,46 mmol, vorliegend als freie Säure, gewonnen durch saures Ausschütteln des Natriumsalzes mit Ethylacetat), 0,75 mmol PyBOP und 0,75 mmol

Hydroxybenzotriazol wurden in einen 50 ml Zweihalskolben eingewogen. Der Kolben wurde evakuiert und mit Argon belüftet. Über ein Septum wurde 1 ml wasserfreies DMF zugefügt. Unter Rühren wurde Diisopropylethylamin (DIPEA, 0,1 ml) zugegeben. Nach 1 min wurde die in wasserfreiem DMF gelöste Aminkomponente zugegeben. Die Reaktion wurde für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde DMF im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel aufgetrennt (Fließmittel: CH₂Cl₂:MeOH (20:1)).

Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen.

Die *Boc*-Schutzgruppe wurde in 1,4-Dioxan mit HCl abgespalten, der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, in 7 ml H₂O:MeOH (10:1) aufgenommen und per HPLC aufgereinigt (Methode D). Die gesammelten Fraktionen wurden lyophilisiert.

Struktur:



Ausbeute: 17%, 36 mg

Aussehen: Roter Feststoff

Leicht löslich in: Wasser, DMF, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, 1,4-Dioxan

Berechnete Molekülmasse: 471 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ = 2.81 (t, 2H, ^3J = 6.32 Hz, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 3.25 (t, 2H, ^3J = 6.31 Hz, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 3.36 (m, 8H, Piperazin); 7.20 (2 x d, 2H, ^3J = 9.15 Hz, H-7 und H-8, Xanthen); 7.27 (2 x s, 2H, H-4 und H-5, Xanthen); 7.62 (t, 1H, ^3J = 5.00 Hz und ^3J = 3.50 Hz, H-4, Phenyl); 7.70 (2 x d, 2H, ^3J = 9.50 Hz und ^3J = 9.45 Hz, H-1 und H-2, Xanthen); 7.75 (m, 1H, ^3J = 3.15 Hz und ^3J = 5.70 Hz, H-5, Phenyl); 7,86 (2 x d, 2H, ^3J = 5.05 und ^3J = 6.00, H-3 und H-6, Phenyl).

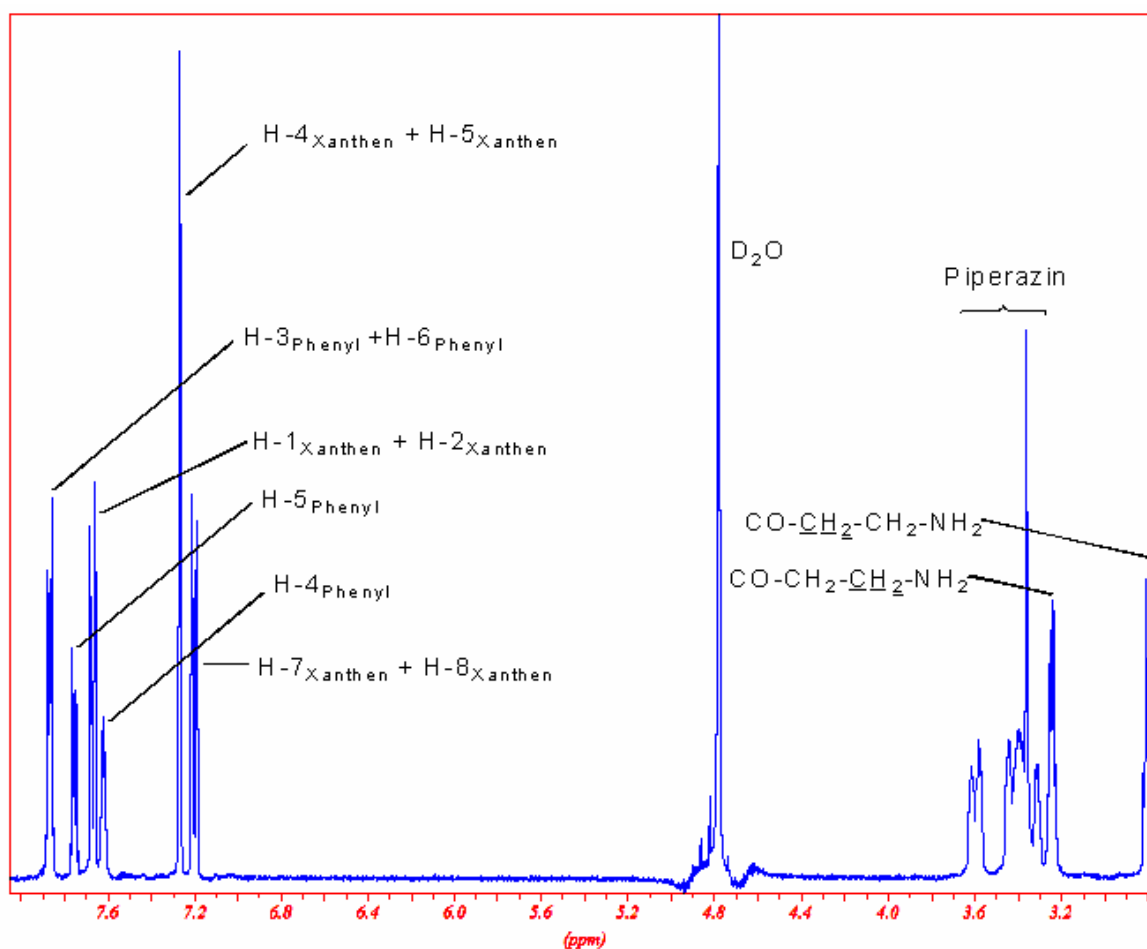


Abbildung 9.6: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **8**

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O), δ 32.3 (CH_2 , $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 38.3 (CH_2 , $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 44.40 (CH_2 , Piperazin); 44.64 (CH_2 , Piperazin); 46.94 (CH_2 , Piperazin); 49.48 (CH_2 , Piperazin); 105.56; 118.03; 119.63; 120.35; 123.01; 130.69; 132.97; 133.38; 133.63; 133.77; 136.03; 136.53; 162.09; 166.16; 172.30; 173.29; 173.33; 173.95.

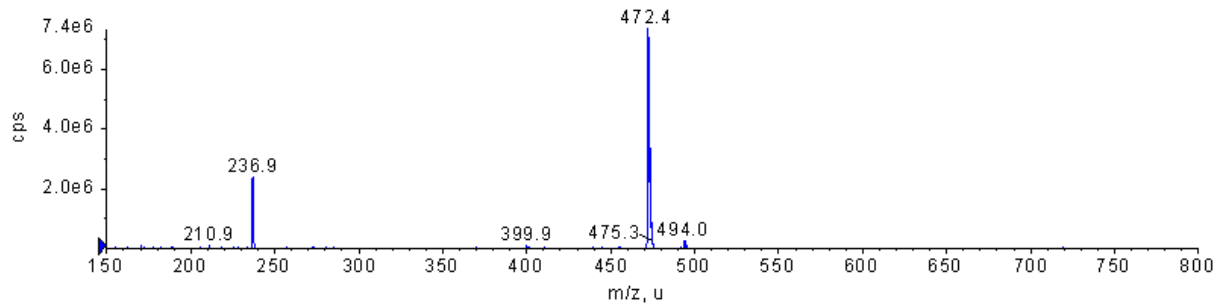
LC/ESI-MS:**[M+H]⁺: 472.4**

Abbildung 9.7: Massenspektrum von Verbindung **8** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

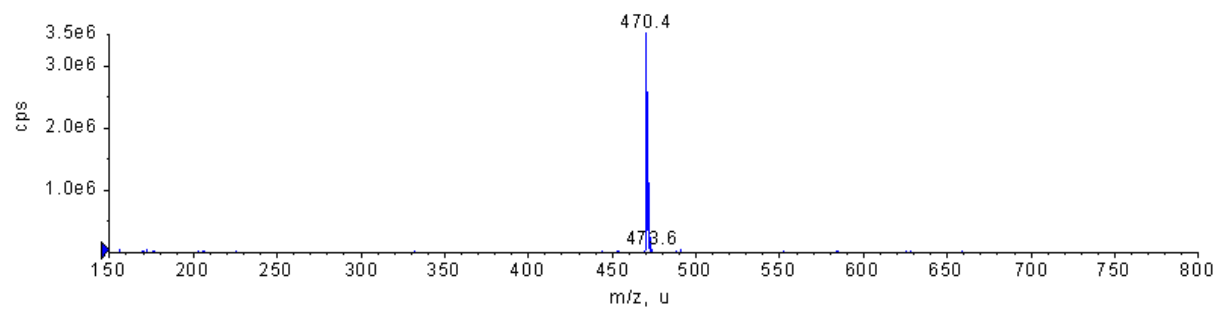
[M-H]⁻: 470.4

Abbildung 9.8: Massenspektrum von Verbindung **8** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

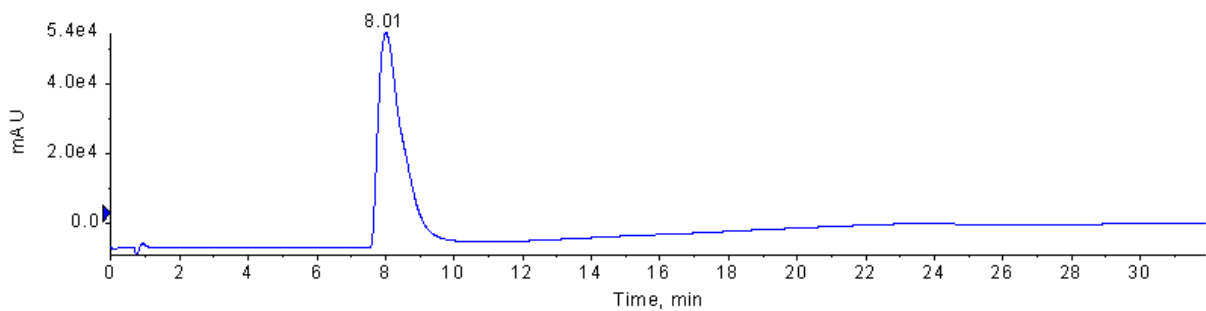
Reinheit HPLC: 100%

Abbildung 9.9: Chromatogramm von Verbindung **8**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 100% (Methode H)

9.2.4 Allgemeine Versuchsvorschrift für die Darstellung von Nucleosidtriphosphorsäureester- γ -amiden

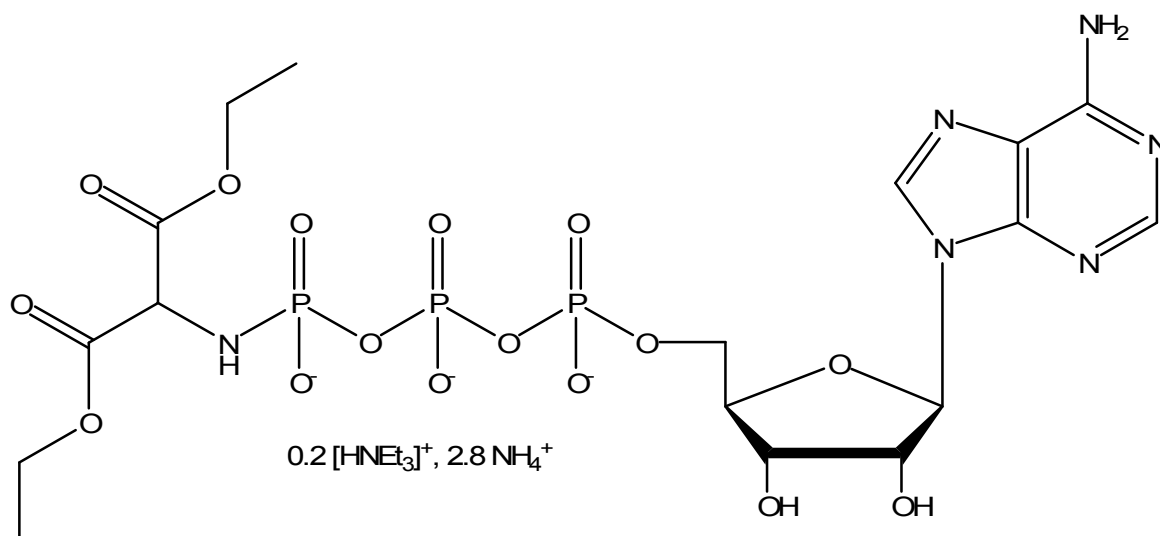
Das Dinatrium-Salz eines Nucleosidtriphosphats (ATP oder UTP, 0,2 mmol) wurde in 1 ml wässrigem 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5) bei Raumtemperatur gelöst. Dazu wurden EDC (288 mg, 1.5 mmol) und die Aminkomponente (1,4 mmol), jeweils in 1 ml 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5) gelöst, gegeben und der Reaktionsansatz wurde 16 h gerührt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde ein zweites Quantum an EDC (288 mg, 1.5 mmol), gelöst in 1 ml 1-Methylimidazol-Puffer, zugegeben und weitere 6 h gerührt. Die Lösung wurde mit 50 ml deionisiertem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Um das Produkt rein zu isolieren, wurde der Rückstand der Gefriertrocknung per Ionenaustauschchromatographie gereinigt und per RP-HPLC entsalzt. Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert.

9.2.4.1 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -1,3-diethoxy-1,3-dioxopropan-2-ylamid (11)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 Aminomalonsäurediethylester-HCl: 1.4 mmol (296 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 18%, 26,5 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 735 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.23 (m, 2 x 3H, $^3\text{J} = 4.42$ Hz, CH_3 , Ethylester); 1.27 (2,04H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_3 , Triethylamin); 3.21 (q, 1,36H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_2 , Triethylamin); 4.22 (m, 1 x 2H und 2 x 2H und 1 x 1H, H-5', CH_2 , Ethylester, C-H, Aminomalonsäure); 4.40 (m, 1H, H-4'); 4.60 (m, 2H, H-2' und H-3'); 6.15 (d, 1H, $^3\text{J} = 5.99$ Hz, H-1'); 8.27 (s, 1H, H-8); 8.56 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 16.05 (2 x CH_3 , Ethylester); 49.53 (CH_2 , Triethylamin); 59.31 (2 x CH_2 , Ethylester); 66.15 (C-N, Aminomalonsäure); 68,01 (C-5'); 73.29 (C-3'); 77.23 (C-2'); 89.54 (C-4'); 91.16 (C-1'); 116.63 (C-5); 133.84 (C-8); 142.83 (C-4); 144.95 (C-2); 155.71 (C-6); 166.45 (2 x C=O).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -5.28 (d, $^3\text{J} = 19.69$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11.20 (d, $^3\text{J} = 22.15$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22.53 (t, $^3\text{J} = 22.15$ Hz und $^3\text{J} = 19.68$ Hz, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 665.2

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 663.2

Reinheit HPLC: 91%

Reinheit CE: 90%

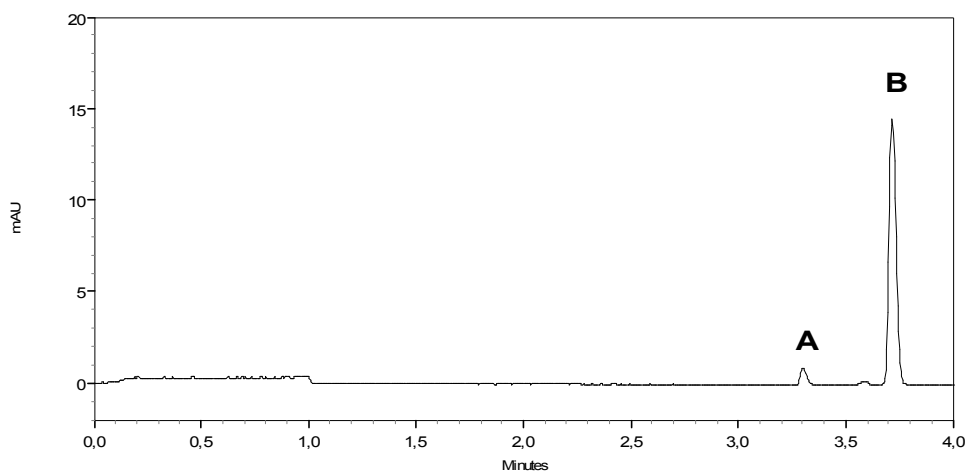


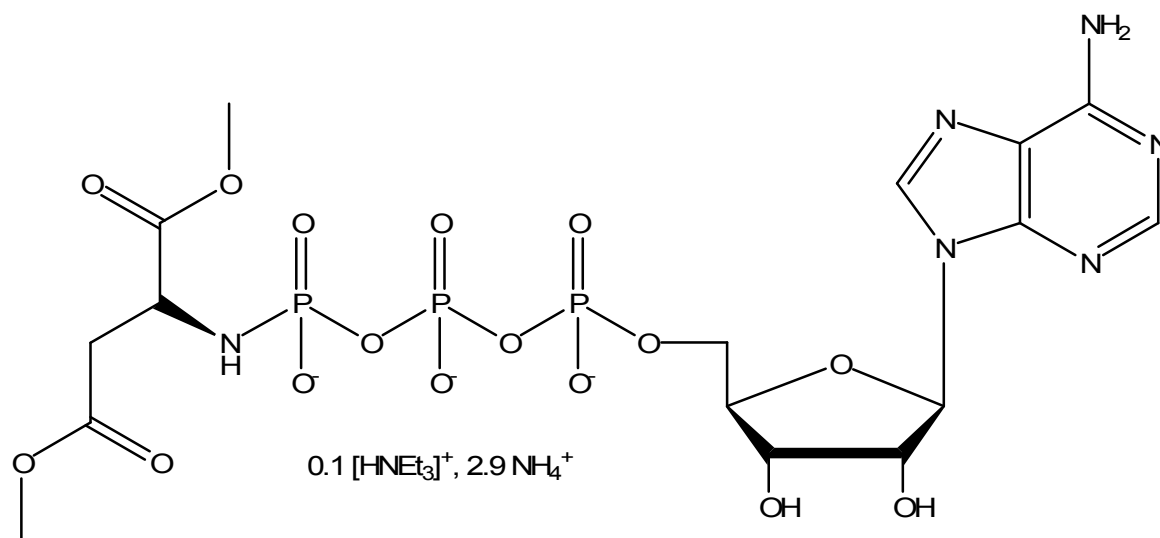
Abbildung 9.10: Elektropherogramm von Verbindung **11**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **11**

9.2.4.2 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -(R)-1,4-dimethoxy-1,4-dioxobutan-2-ylamid (12)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 S-Asparaginsäuredimethylester-HCl: 1.4 mmol (275 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 28%, 39,7 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 709 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O), δ 1.26 (t, 0.9H, $^3\text{J} = 7.26$ Hz, CH_3 , Triethylamin); 2.87 und 2.94 (2 x m, 2 x 1H, CH_2 , Asp); 3.18 (q, 0,57H, $^3\text{J} = 7.26$ Hz, CH_2 , Triethylamin); 3.71 (m, 7H, 2 x CH_3 , Asp, N-CH, Asp); 4.22 (m, 3H, H-4', H-5'); 4.40 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz und $^3\text{J} = 5.68$ Hz, H-3'); 4.56 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 3.47$ Hz und $^3\text{J} = 5.04$ Hz, H-2'); 6.13 (d, 1H, $^3\text{J} = 5.68$ Hz, H-1'); 8.23 (s, 1H, H-8); 8.52 (s, 1H, H-2).

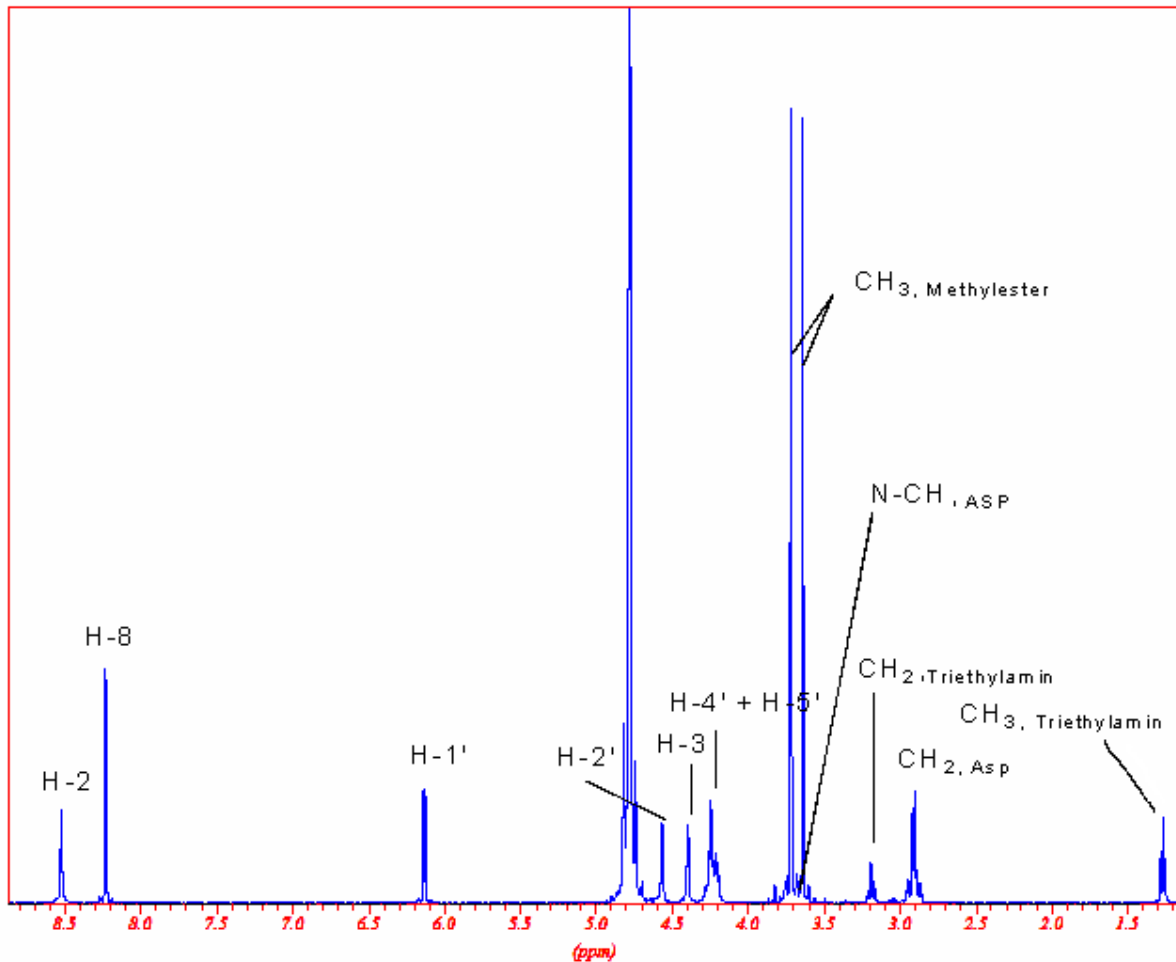


Abbildung 9.11: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **12**

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O), δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 41.22 (CH_2 , Asp); 49.51 (CH_2 , Triethylamin); 54.30 (N-CH, Asp); 55.19 und 55.78 (2 x CH_3 , Asp); 68.03 (C-5'); 73.22 (C-3'); 77.18 (C-2'); 86.84 (C-4'); 89.65 (C-1'); 121.48 (C-5); 142.74 (C-8); 151.98 (C-4); 155.67 (C-2); 158.45 (C-6); 176.52 und 178.16 (2 x C=O, Asp).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O), δ -4.23 (m, $^3\text{J} = 19,69$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11,10 (d, $^3\text{J} = 19,69$ Hz, $\alpha\text{-P}$); 22,47 (t, $^3\text{J} = 19,69$ Hz und $^3\text{J} = 19,68$ Hz, $\beta\text{-P}$).

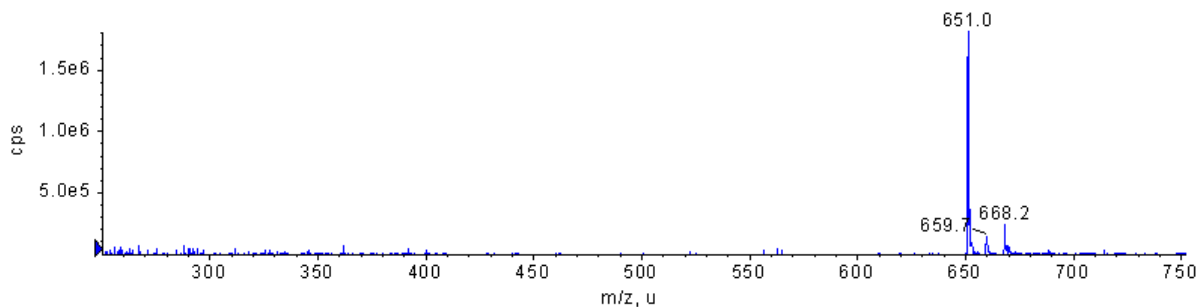
LC/ESI-MS: $[M+H]^+$: 651.0

Abbildung 9.12: Massenspektrum von Verbindung **12** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

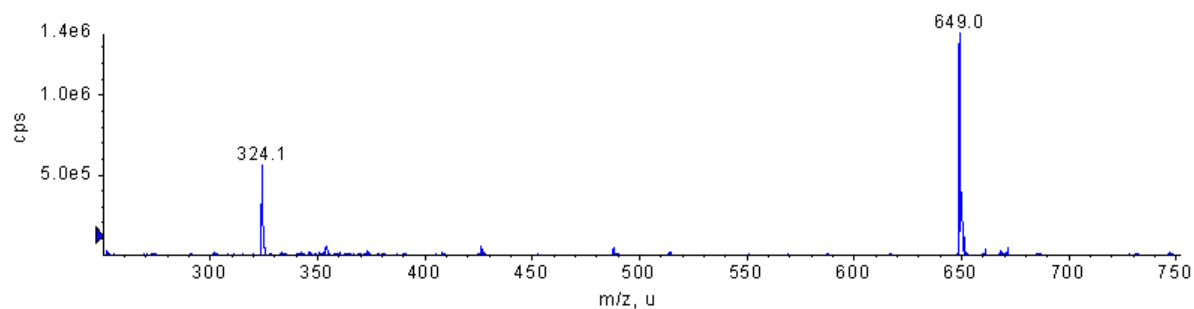
 $[M-H]^-$: 649.0

Abbildung 9.13: Massenspektrum von Verbindung **12** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

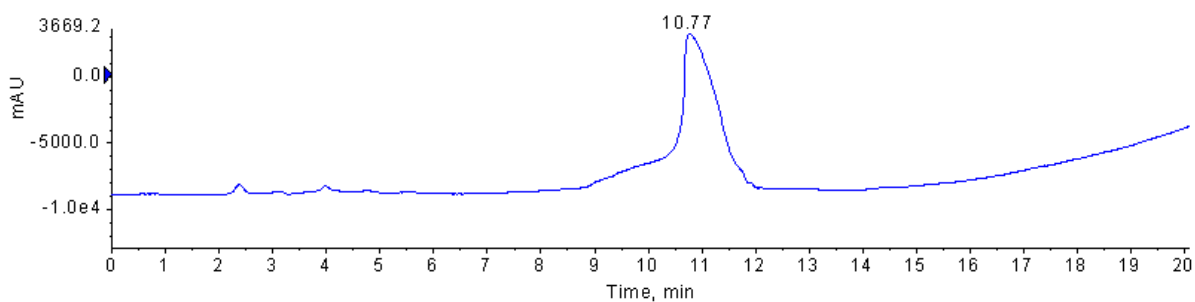
Reinheit HPLC: 99%

Abbildung 9.14: Chromatogramm von Verbindung **8**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 99%

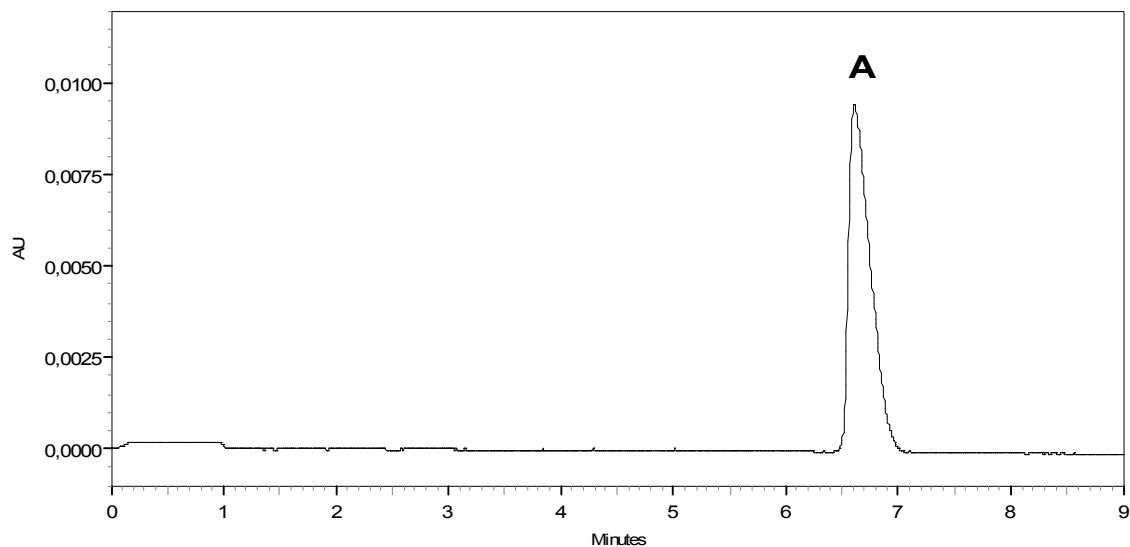


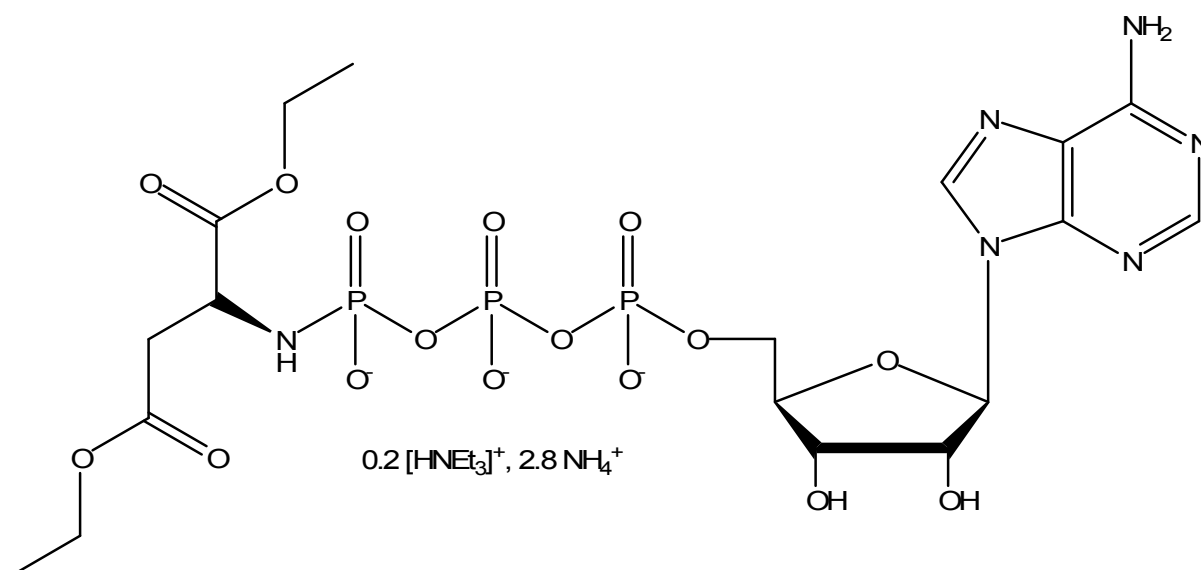
Abbildung 9.15: Elektropherogramm von Verbindung 12, AU = Absorption Units, A = Verbindung 12

9.2.4.3 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -(R)-1,4-diethoxy-1,4-dioxobutan-2-ylamid (13)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 S-Asparaginsäurediethylester-HCl: 1.4 mmol (315 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 26%, 38,79 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 746 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O), δ 1.20 (t, 6H, $^3\text{J} = 7,25$ Hz und $^3\text{J} = 6,94$ Hz, 2 x CH_3 , Ethylester); 1.26 (t, 1H, $^3\text{J} = 7,26$ Hz, CH_3 , Triethylamin); 2.89 (dd, 2H, $^3\text{J} = 4,41$, CH_2 , Asp); 3.18 (q, 0.66H, $^3\text{J} = 7,26$ Hz, CH_2 , Triethylamin); 4.19 (m, 8H, 2 x CH_2 , Asp, N-CH, Asp, H-5', H-4'); 4.40 (m, 1H, $^3\text{J} = 3,15$ Hz und $^3\text{J} = 2,52$ Hz, H-3'); 4.56 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 3,47$ Hz und $^3\text{J} = 5,05$ Hz, H-2'); 6.14 (d, 1H, $^3\text{J} = 5,99$ Hz, H-1'); 8.25 (s, 1H, H-8); 8.54 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O), δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 16.11 (CH_3 , Ethylester) 41.56 (CH_2 , Asp); 49.51 (CH_2 , Triethylamin); 64.79 (N-CH, Asp); 66.53 und 66.58 (2 x CH_2 , Ethylester); 68.03 (C-5'); 73.22 (C-3'); 77.23 (C-2'); 86.87 (C-4'); 89.66 (C-1'); 121.48 (C-5); 142.74 (C-8); 151.98 (C-4); 155.67 (C-2); 158.45 (C-6); 176.52 und 178.16 (2 x C=O, Asp).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O), δ -4.20 (t, $^3\text{J} = 19,69$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11,10 (d, $^3\text{J} = 17,23$ Hz, $\alpha\text{-P}$); 22,50 (t, $^3\text{J} = 19,69$ Hz und $^3\text{J} = 17,54$ Hz, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 678.8

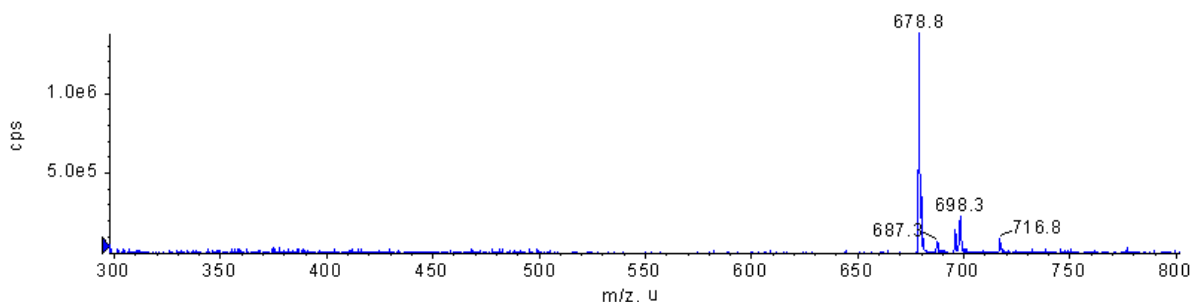


Abbildung 9.16: Massenspektrum von Verbindung **13** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

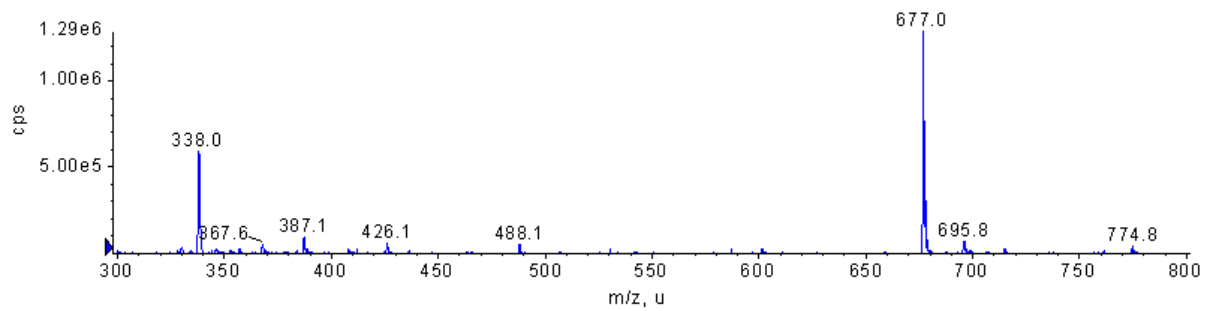
[M-H]⁻: 677.0

Abbildung 9.17: Massenspektrum von Verbindung **13** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 96%

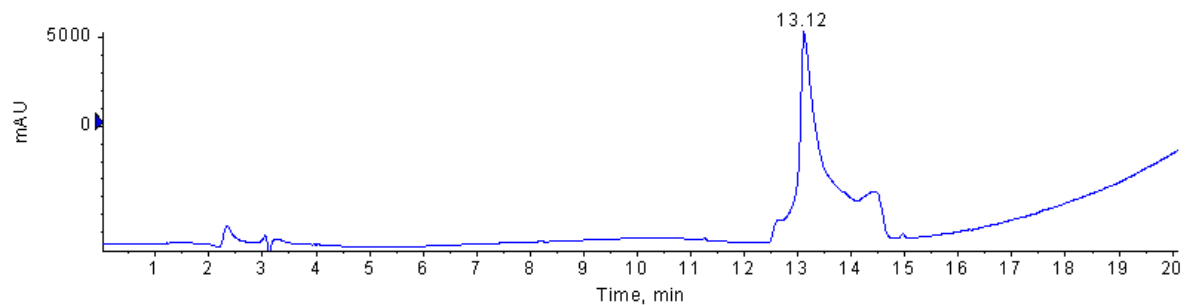


Abbildung 9.18: Chromatogramm von Verbindung **13**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 95%

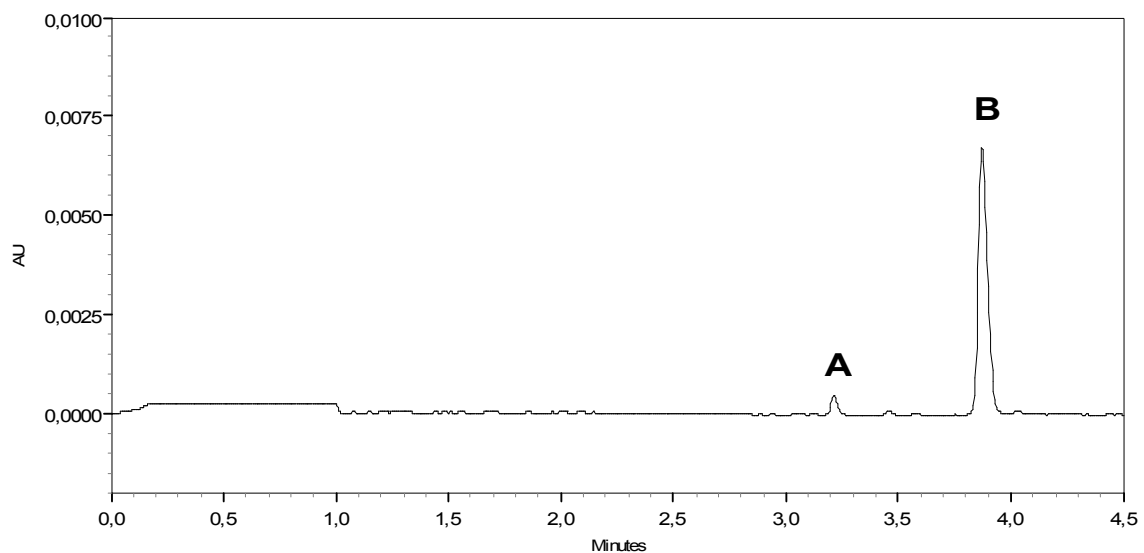


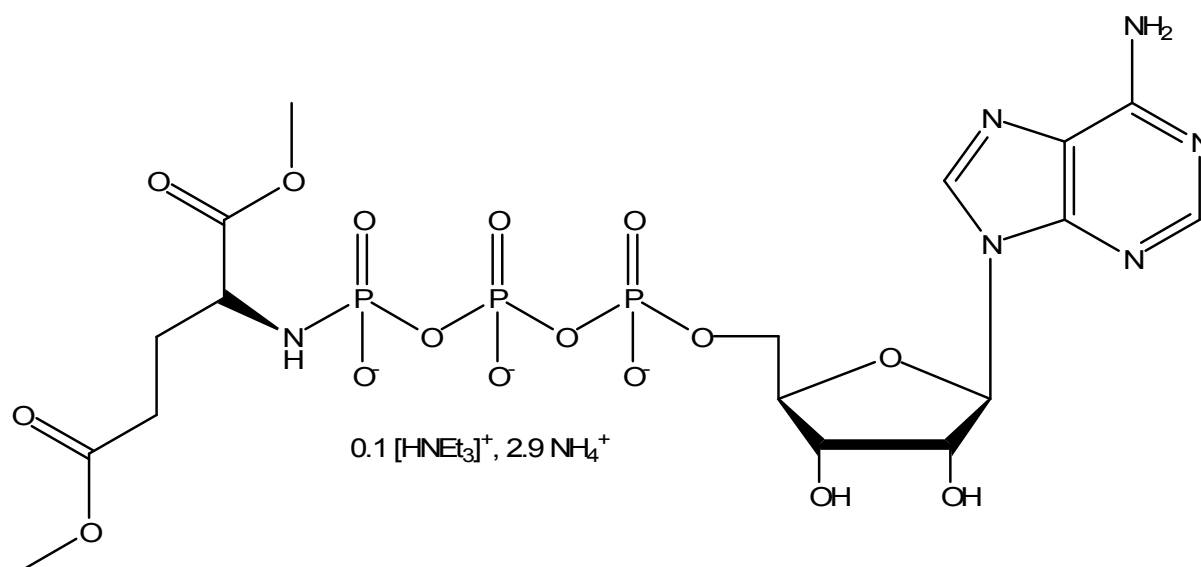
Abbildung 9.19: Elektropherogramm von Verbindung **13**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **13**

9.2.4.4 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -(R)-1,5-dimethoxy-1,5-dioxopentan-2-ylamid (14)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 S-Glutaminsäuredimethylester-HCl: 1.4 mmol (296 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 27%, 38,8 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 720 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.27 (t, 0.57H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 1.92 und 1.98 (2 x m, 2 x 1H, ³J = 7.56 Hz und ³J = 6.9 Hz, CH₂, Glu); 2.44 (m, 2H, ³J = 7.57 Hz und ³J = 6.9 Hz, O=C-CH₂, Glu); 3.21 (q, 0.38H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 3.65 und 3.71 (2 x s, 2 x 3H, 2 x CH₃, Methylester); 3.87 (m, 1H, ³J = 6.62 Hz und ³J = 6.6 Hz, N-CH, Glu); 4.22 (m, 3H, H-5' und H-4'); 4.39 (pseudo-t, 1H, ³J = 2.85 Hz und ³J = 2.85 Hz, H-3'); 4.56 (dd, 1H, ³J = 3.78 Hz und ³J = 3,80 Hz, H-2'); 6.13 (d, 1H, ³J = 5.99, H-1'); 8.25 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.55 (s, 1H, H-2, Adenin).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.09 (CH₃, Triethylamin); 31.48 (CH₂, Glu); 32.58 (O=C-CH₂, Glu); 49.51 (CH₂, Triethylamin); 55.04 und 55.47 (2 x CH₃, Glu); 57.07 (N-CH,

Glu); 67.99 (C-5'); 73.20 (C-3'); 77.24 (C-2'); 86.78 (C-4'); 89.72 (C-1'); 121.46 (C-5); 142.91 (C-8); 151.91 (C-4); 155.20 (C-2); 158.11 (C-6); 179.06 und 179.21 (2 x C=O, Glu).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -3.82 (d, $^3J = 17.23$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11,09 (d, $^3J = 19.28$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22,47 (t, $^3J = 17.22$ Hz und $^3J = 19.29$ Hz, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 665.0

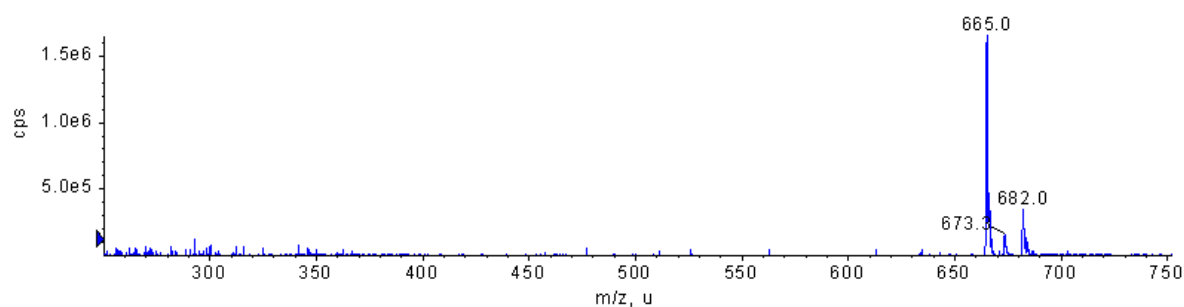


Abbildung 9.20: Massenspektrum von Verbindung **14** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 662.8

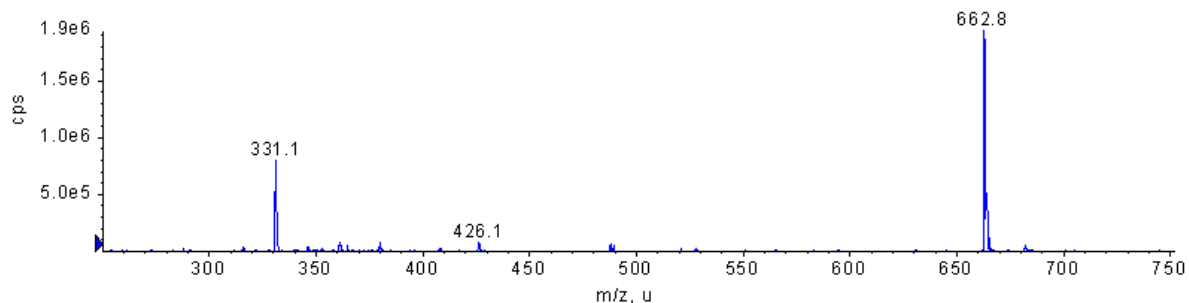
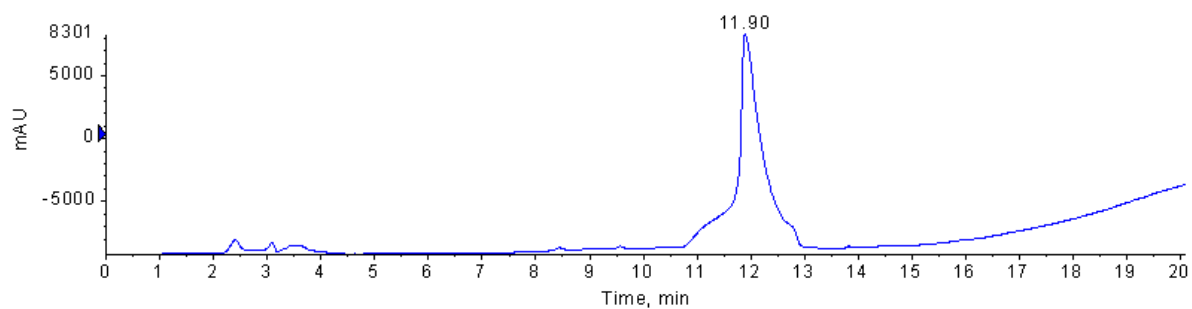
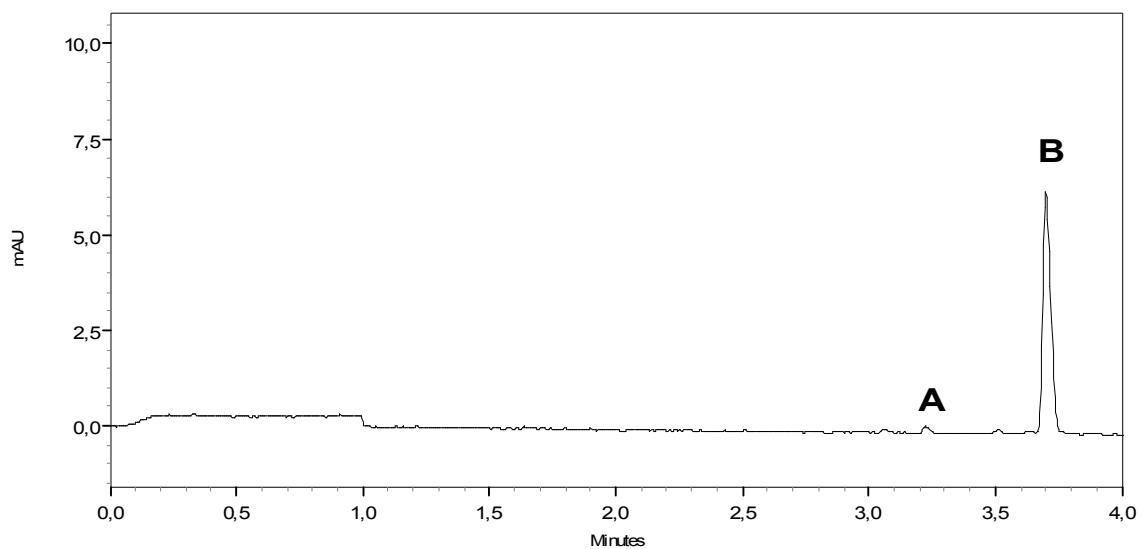


Abbildung 9.21: Massenspektrum von Verbindung **14** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

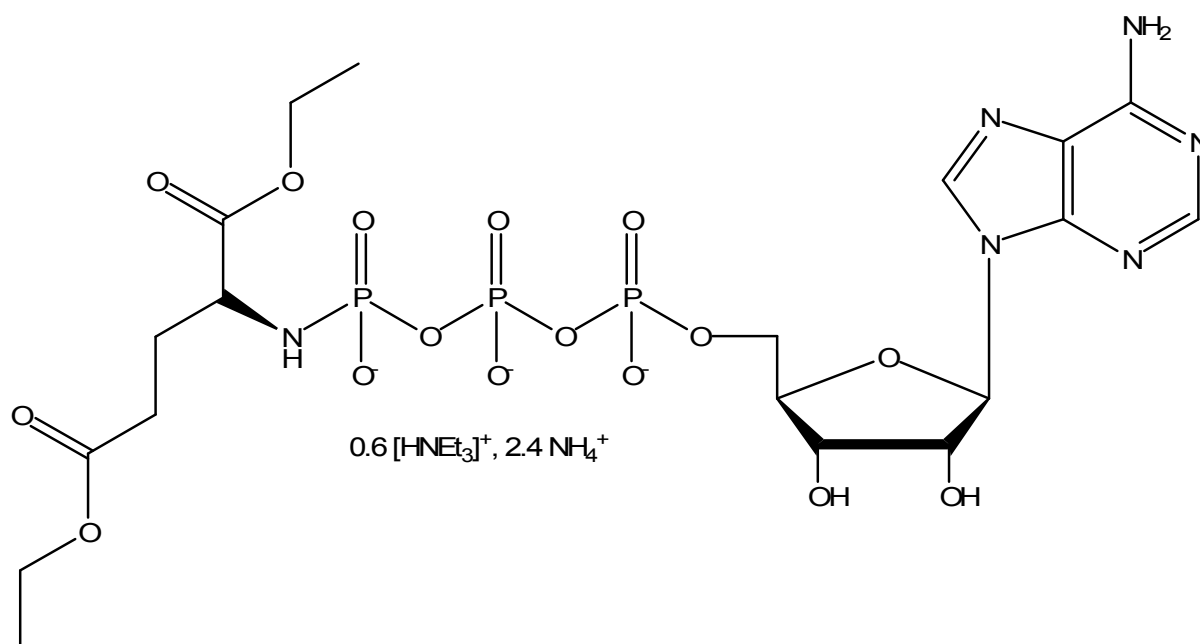
Reinheit HPLC: 97%Abbildung 9.22: Chromatogramm von Verbindung **14**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm**Reinheit CE: 96%**Abbildung 9.23: Elektropherogramm von Verbindung **14**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **14**

9.2.4.5 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -(R)-1,5-diethoxy-1,5-dioxopentan-2-ylamid (15)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
S-Glutaminsäurediethylester-HCl: 1.4 mmol (334 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 21%, 33,5 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 797.17 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.27 (m, 6H, ³J = 7,25 Hz und ³J = 6.94 Hz, 2 x CH₃, Ethylester); 1.28 (t, 5.73H, J = 7.26 Hz, CH₃, Triethylamin); 1.96 (m, 2H, ³J = 7.57 Hz und ³J = 6.94 Hz, CH₂, Glu); 2.42 (m, 2H, ³J = 7.57 Hz und ³J = 7.62 Hz, O=C-CH₂); 3.20 (q, 3.82H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin), 3.85 (m, 1H, ³J = 6.94 Hz, N-CH, Glu); 4.12 (m, 2 x 2H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 6.94 Hz, 2 x CH₂, Ethylester, Glu); 4.26 (m, 3H, ³J = 2.21 und ³J = 5.67, H-5' und H-4'); 4.58 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.73 Hz

und $^3J = 3.47$ Hz, H-3'); 4.40 (pseudo-t, 1H, H-2'); 6.14 (d, 1H, $^3J = 5.99$ Hz, H-1'); 8.26 (s, 1H, H-8); 8.56 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 16.01 (2 x CH_3 , Ethylester, Glu); 31.53 (CH_2 , Glu); 32.84 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$, Glu); 49.52 (CH_2 , Triethylamin); 57.15 (N-CH, Glu); 65.08 (CH_2 , Ethylester); 68.02 (C-5'); 73.25 (C-3'); 77.25 (C-2'); 86.88 (C-4'); 89.62 (C-1'); 121.50 (C-5); 142.80 (C-8); 152.03 (C-4); 155.68 (C-2); 158.48 (C-6); 178.58 (2 x C=O, Glu).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -3.84 (d, $^3J = 19.85$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11.11 (d, $^3J = 19.69$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22.58 (t, $^3J = 19.69$ Hz, $\beta\text{-P}$).

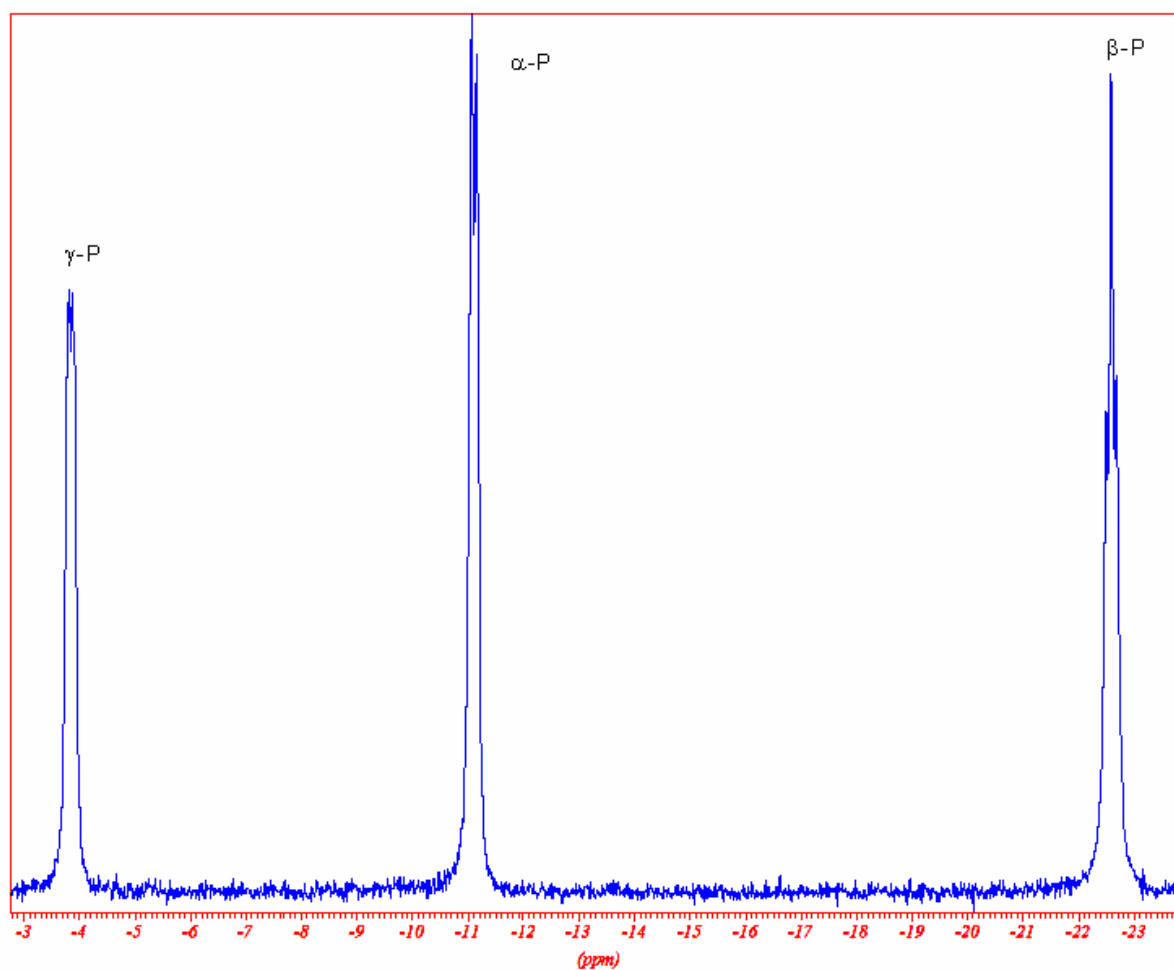


Abbildung 9.24: $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **15**

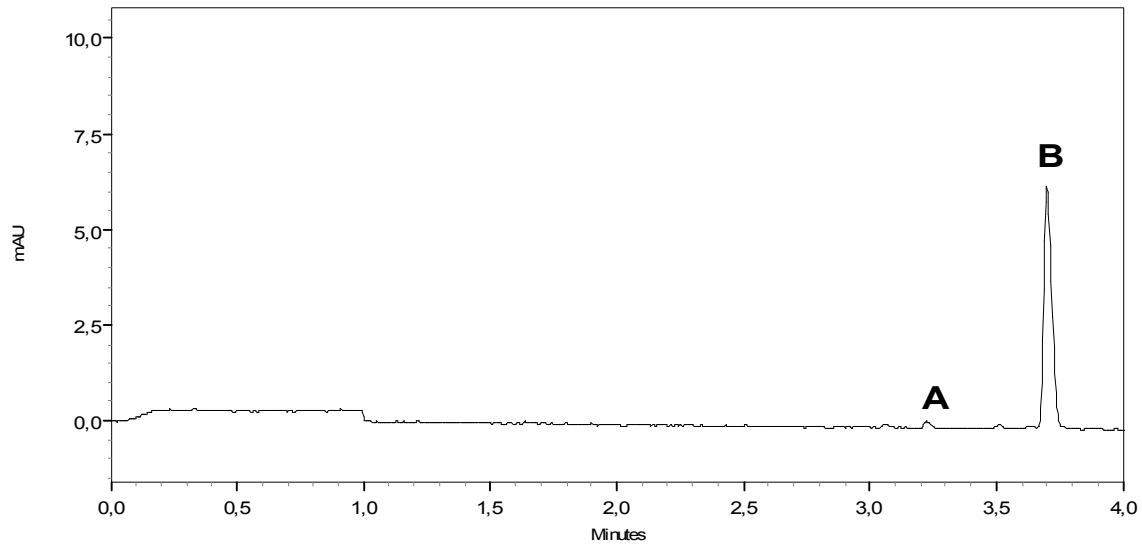
LC/ESI-MS:[M+H]⁺: 693.3[M-H]⁻: 691.3**Reinheit HPLC:** 100%**Reinheit CE:** 98%

Abbildung 9.25: Elektropherogramm von Verbindung **15**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **15**

9.2.4.6 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -2-ethoxy-2-oxoethylamid (16**)**

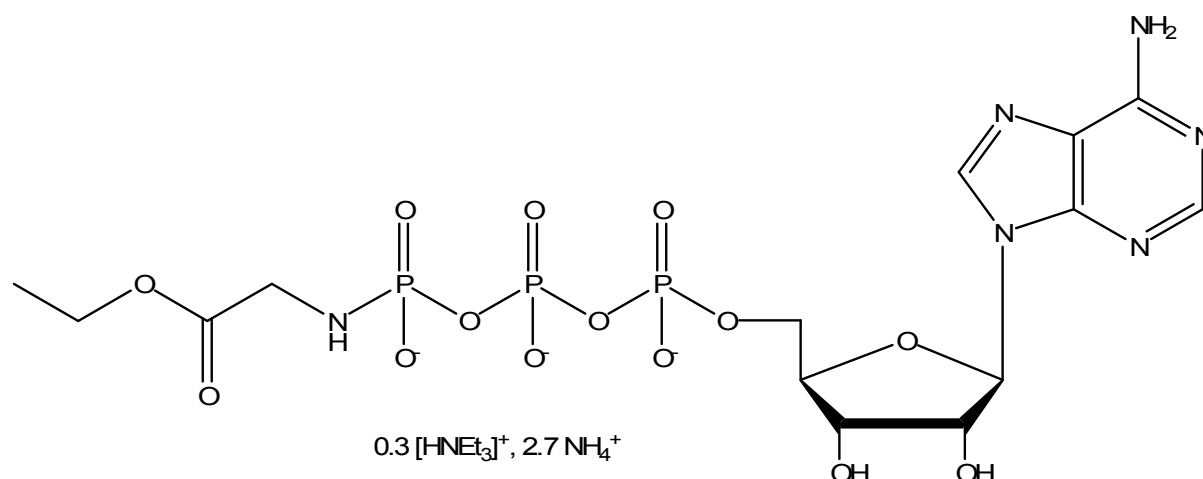
Ansatz: ATP-Dinatriumsalz Dihydrat: 0.2 mmol (110 mg)

Glycinsäureethylester-HCl: 1.4 mmol (194 mg)

EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:**Ausbeute:** 23%, 30 mg**Aussehen:** Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)**Leicht löslich in:** Wasser**Schwer löslich in:** Ethanol, Diethylether, Dichlormethan**Berechnete Molekülmasse des Salzes:** 648.2 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.19 (t, 2.33H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 1.29 (t 3H, ³J = 6.93 Hz, CH₃, Ethylester); 3.19 (q, 1.55H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 3.80 (d, 2H, ²J = 9.8 Hz, CH₂, Gly); 4.09 (q, 2H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Ethylester); 4.25 (m, 3H, ³J = 2.83 Hz, H-5' und H-4'); 4.41 (pseudo-t, 1H, ³J = 2.84 Hz und ³J = 2.83 Hz, H-3'); 4.57 (pseudo-t, 1H, ³J = 3.47 Hz und ³J = 3.78 Hz, H-2'); 6.15 (d, 1H, ³J = 5.99 Hz, H-1'); 8.26 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.55 (s, 1H, H-2, Adenin).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 16.07 (CH₃, Ethylester); 46.45 (CH₂, Gly); 49.51 (CH₂, Triethylamin); 64.87 (CH₂, Ethylester); 68.2 (C-5'); 73.22 (C-3'); 77.24 (C-2'); 86.82 (C-4'); 89.54 (C-1'); 121.31 (C-5); 142.77 (C-8); 152.06 (C-4); 155.65 (C-2); 158.47 (C-6); 177.07 (C=O, Gly).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ -2.59 (d, ³J = 17.23 Hz, γ-P); -11.01 (d, ³J = 19.68 Hz, α-P); -22.45 (t, ³J = 17.23 Hz und ³J = 19.67 Hz, P-β).

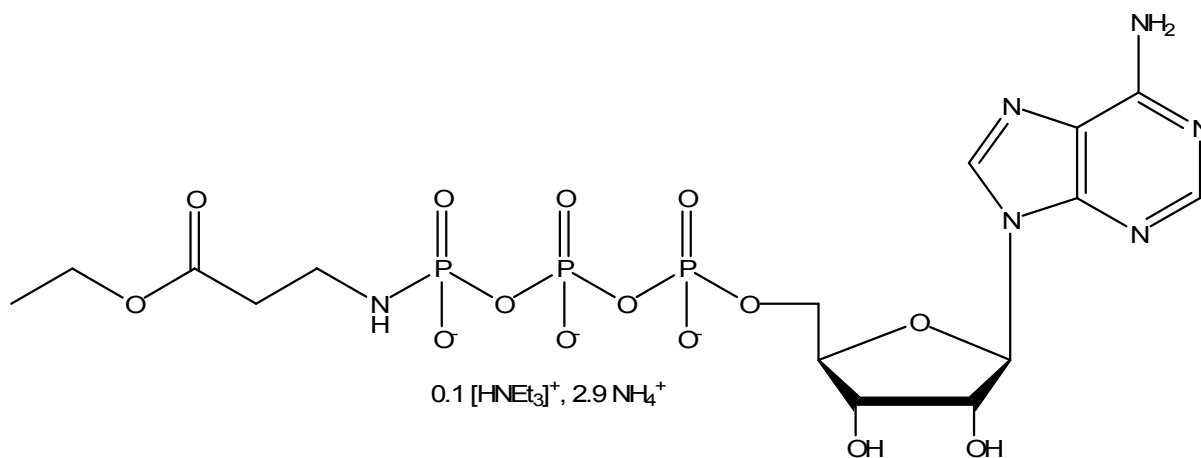
LC/ESI-MS:[M+H]⁺: 592.8[M-H]⁻: 590.8**Reinheit HPLC:** 95%**Reinheit CE:** 96%

9.2.4.7 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-ethoxy-3-oxopropylamid (17)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 β -Alaninethylester-HCl: 1,4 mmol (214 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 40%, 53,2 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 665,44 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.20 (t, 3H, ³J = 6.93 Hz, CH₃, Ethylester); 1.26 (t, 1H, J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 2.50 (t, 2H, ³J = 6.94 Hz, N-CH₂, β -Alanin); 3.12 (m, 2H, ³J = 6.93 Hz, CH₂-C=O, β -Alanin); 3.18 (q, 0.76H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.07 (q, 2H, ³J = 6.93 Hz, CH₂, Ethylester); 4.29 (m, 3H, ³J = 2.21 Hz und ³J = 2.84 Hz, H-4' und H-5'); 4.40 (pseudo-t, 1H, ³J = 6.31 Hz und ³J = 2.84 Hz, H-3'); 4.57 (pseudo-t, 1H, ³J = 3.47 Hz und ³J = 6.93 Hz, H-2'); 6.14 (d, 1H, ³J = 3.79 Hz, H-1'); 8.26 (s, 1H, H-8); 8.54 (s, 1H, H-2).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 16.12 (CH₃, Ethylester), 39.18 (N-CH₂); 40.17 (CH₂-C=O); 49.52 (CH₂, Triethylamin); 64.44 (CH₂, Ethylester); 68.05

(C-5'); 73.20 (C-3'); 77.20 (C-2'); 86.86 (C-4'); 89.65 (C-1'); 121.49 (C-5); 142.76 (C-8); 151,99 (C-4); 155.64 (C-2); 158.45 (C-6); 177.80 (C=O).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -1,47 ($\gamma\text{-P}$); -11,10 ($\alpha\text{-P}$); -22,56 ($\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 607.2

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 605.3

Reinheit HPLC: 100%

Reinheit CE: 97%

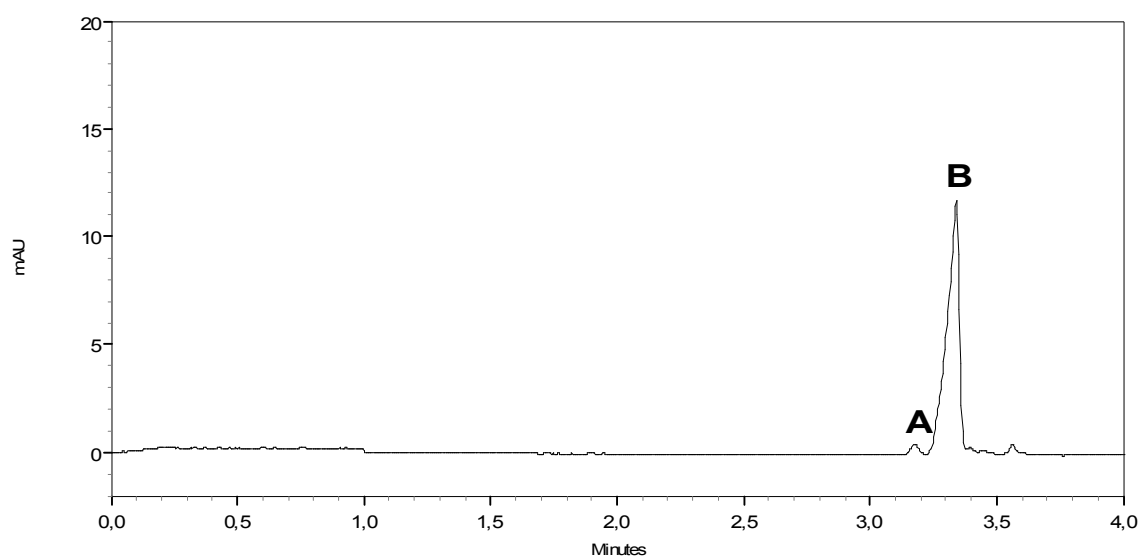
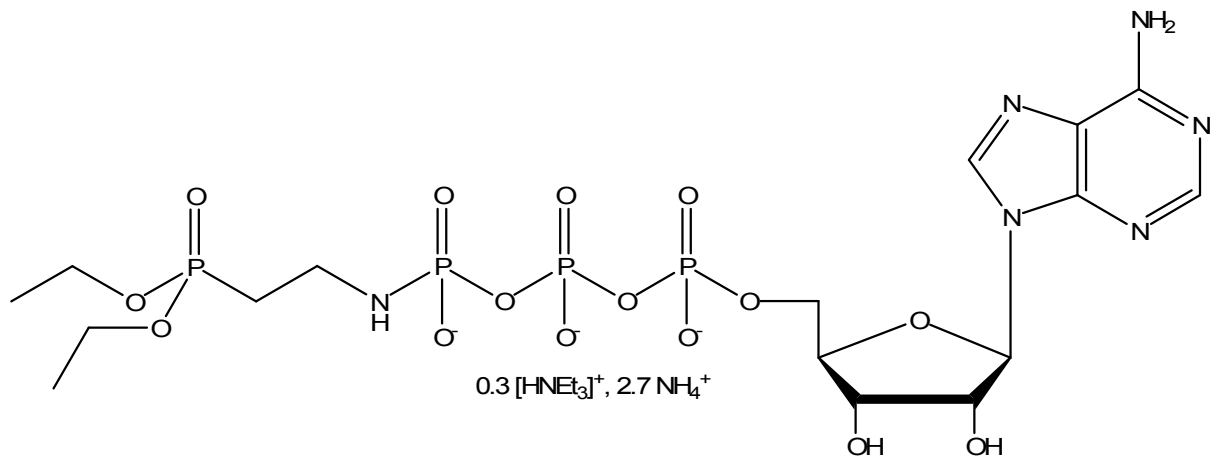


Abbildung 9.26: Elektropherogramm von Verbindung 17, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung 17

9.2.4.8 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -2-(diethoxyphosphoryl)-ethylamid (18)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 Diethyl-(2-aminoethyl)phosphonat-HCl: 1.4 mmol (305 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 30%, 44,8 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 746.2 g/mol

NMR-Daten:

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.28 (t, 2 x 3H, ³J = 3.46 Hz, CH₃, Ethylphosphonat); 1.34 (t, 3H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 2.21 (AB-System mit A t und B t, 2H, ²J_{H,P} = 17.85 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 3.17 (m, 2H, N-CH₂); 3.21 (q, 1.9H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin,); 4.08 (q, 4H, ³J = 3.46 Hz, 2 x CH₂, Ethylphosphonat); 4.18 (m, 2H, ³J = 4.73 Hz, H-5'); 4.25 (m, 1H, ³J = 4.1 Hz und ³J = 2.55 Hz, H-4'); 4.40 (m, 1H, ³J = 2.52 Hz und ³J = 3.15 Hz, H-3'); 4.57 (m, 1H, ³J = 3.47 und ³J = 5.0 Hz, H-2'); 6.13 (d, 1H, ³J = 5.99 Hz, H-1'); 8.27 (s, 1H, H-8); 8.56 (s, 1H, H-2,).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O), δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 18.45 (2 x CH₃, Ethylphosphonat); 25.19, (C-N, Ethylphosphonat); 38.27 (P-CH₂, Ethylphosphonat); 49.51 (CH₂, Triethylamin); 66.87 und 66.91 (2 x CH₂, Ethylphosphonat); 68.09 (C-5'); 73.25 (C-3'); 77.21 (C-2'); 86.87 (C-4'); 89.57 (C-1'); 121.52 (C-5); 142.79 (C-8); 151.05 (C-4); 155.63 (C-2); 158.44 (C-6).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 28.94 (C-P); -2,08 (d, ³J = 19.69 Hz, γ-P); -11,15 (d, ³J = 19.69 Hz, α-P); -22,53 (t, ³J = 19.69 Hz und ³J = 17.69 Hz, β-P).

LC/ESI-MS:

[M+H]⁺: 672.2

[M-H]⁻: 669.5

Reinheit HPLC: 95%

Reinheit CE: 94%

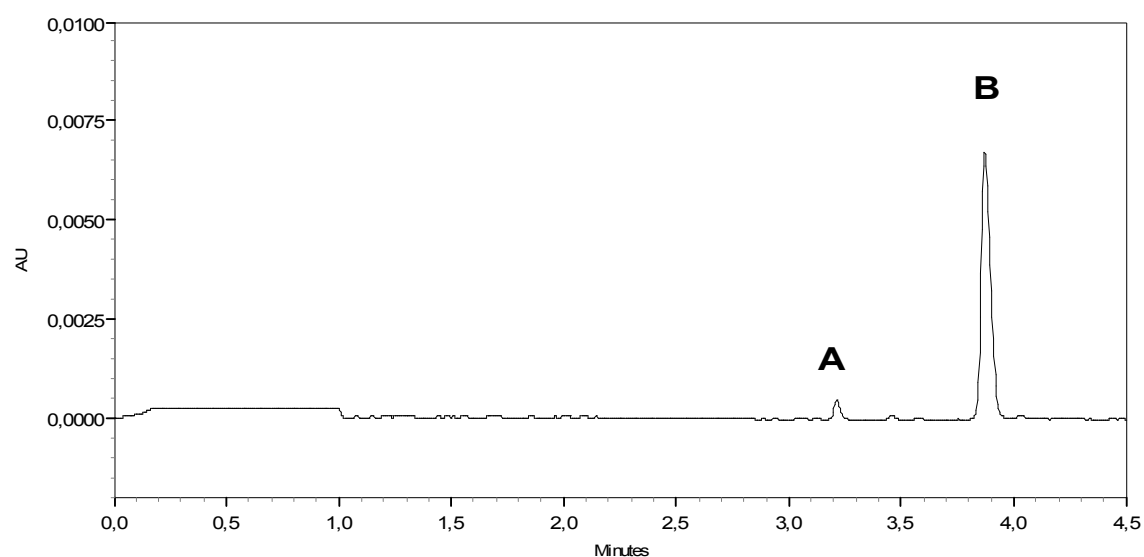


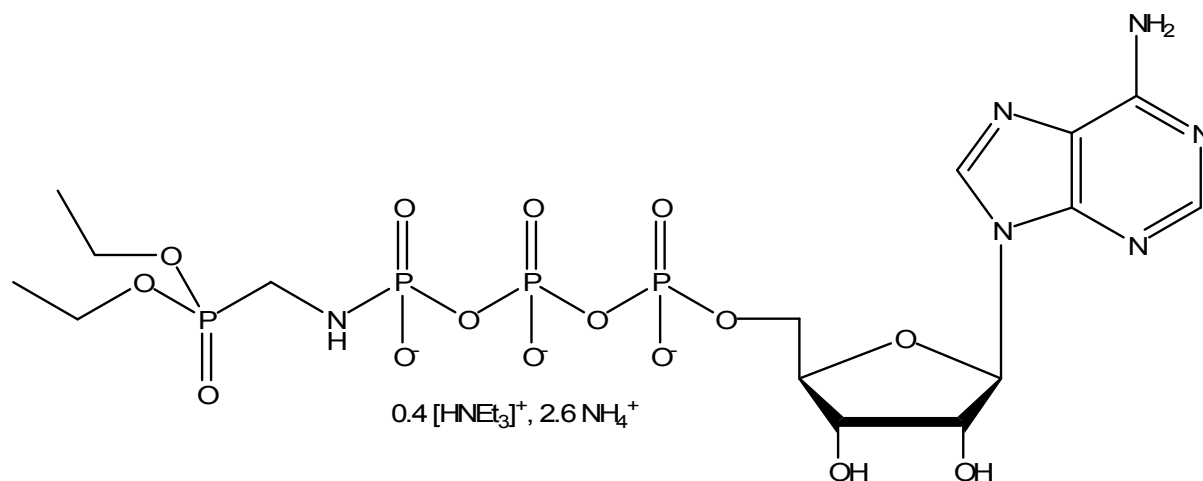
Abbildung 9.27: Elektropherogramm von Verbindung **18**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **18**

9.2.4.9 Darstellung α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-(diethoxyphosphoryl)-propylamid (**19**)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
Diethyl-(2-aminomethyl)phosphonat HCl: 1.4 mmol (285 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 30%, 44,4 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 740.6 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm) 1.26 (m, 4H, CH₃, Triethylamin, ³J = 7.25 Hz und 6H, ³J = 6.94 Hz, CH₃, Methylphosphonat); 3.20 (q, 2.7H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 3.39 (AB-System mit A d und B d, 2H, ²J_{HP} = 10.40 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 4.13 (m, 4H, ³J = 6.31 Hz, CH₂, Methylphosphonat); 4.26 (m, 3H, ³J = 4.73 Hz und ³J = 1.58 Hz und ³J = 1.89 Hz, H-5' und H-4'); 4.41 (pseudo-t, 1H, ³J = 2.52 Hz, ³J = 3.15 Hz, H-3'); 4.56 (dd, 1H, ³J = 3.47 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-2'); 6.13 (d, 1H, ³J = 5.99 Hz, H-1'); 8.28 (s, 1H, H-8); 8.56 (s, 1H, H-2).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 18.53 (2 x CH₃, Methylphosphonat); 38.93 (CH₂, CH₂-P, Methylphosphonat); 49.51 (CH₂, Triethylamin); 66.87 (2 x CH₂, Ethylphosphonat); 68.05 (C-5'); 73.26 (C-3'); 77.18 (C-2'); 86.87 (C-4'); 89.69 (C-1'); 121.51 (C-5); 142.90 (C-8); 151.99 (C-4); 155.23 (C-2); 158.13 (C-6).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 28.40 (C-P); -2,54 (d, ³J = 17.89, γ-P); -11,14 (d, ³J = 19.46, α-P); -22,54 (t, ³J = 19.55 und ³J = 17.69, β-P).

LC/ESI-MS:

[M+H]⁺: 657.0

[M-H]⁻: 655.0

Reinheit HPLC: 98%

Reinheit CE: 99%

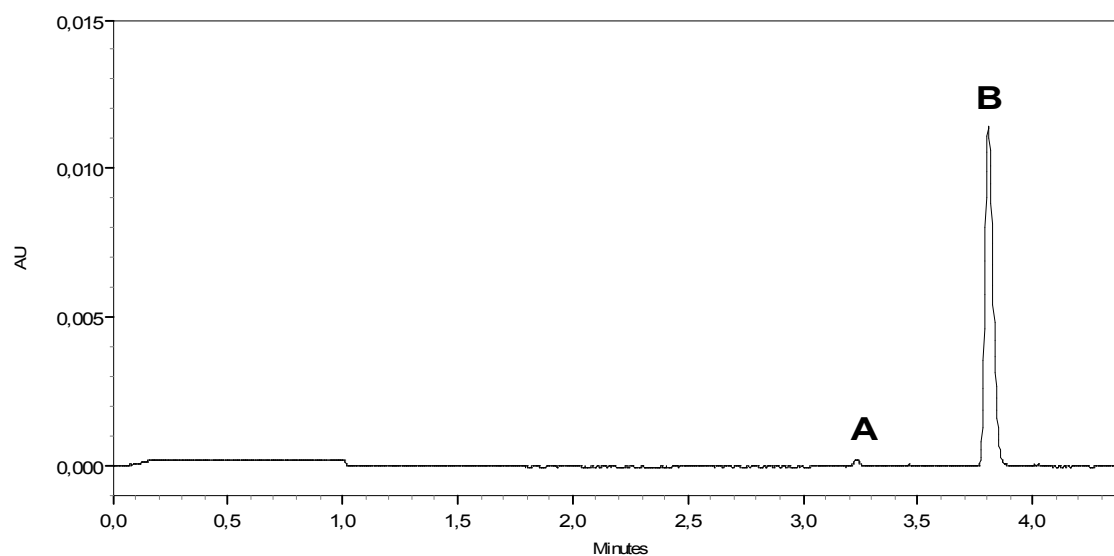


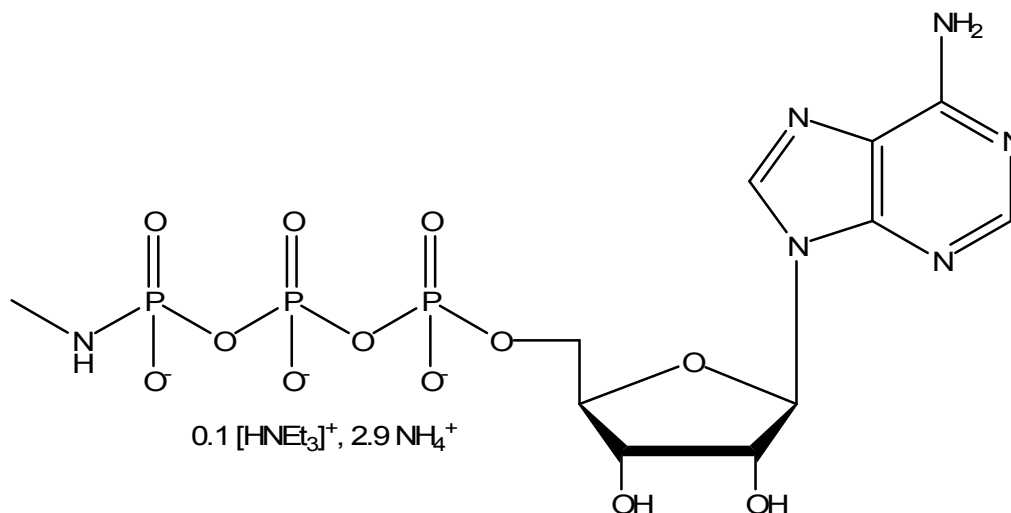
Abbildung 9.28: Elektropherogramm von Verbindung **19**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **19**

9.2.4.10 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -methylamid (**20**)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
Methylamin-HCl: 1.4 mmol (94 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 30%, 35 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 579.31 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.26 (t, 0.55H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_3 , Triethylamin); 2.51 (s, 3H, CH_3); 3.18 (q, 0.33H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_2 , Triethylamin); 4.24 (m, 2H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz, H-5'); 4.39 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz und $^3\text{J} = 3.15$ Hz, H-4'); 4.56 (dd, 1H, $^3\text{J} = 3.78$ Hz und $^3\text{J} = 3.45$ Hz, H-3'); 4.76 (m, 1H, $^3\text{J} = 3.78$ Hz, H-2'); 6.13 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.3$ Hz, H-1'); 8.22 (s, 1 H, H-8), 8.50 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 30.53 (CH_3); 49.51 (CH_2 , Triethylamin); 68.10 (C-5'); 73.22 (C-3'); 77.10 (C-2'); 86.80 (C-4'); 89.57 (C-1'); 121.47 (C-5); 142.68 (C-8); 151.99 (C-4); 155.73 (C-2); 158.49 (C-6).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O), δ 0.79 ($\gamma\text{-P}$); -11,13 ($\alpha\text{-P}$); -22,54 ($\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 521.0

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 518.8

Reinheit HPLC: 96%

Reinheit CE: 97%

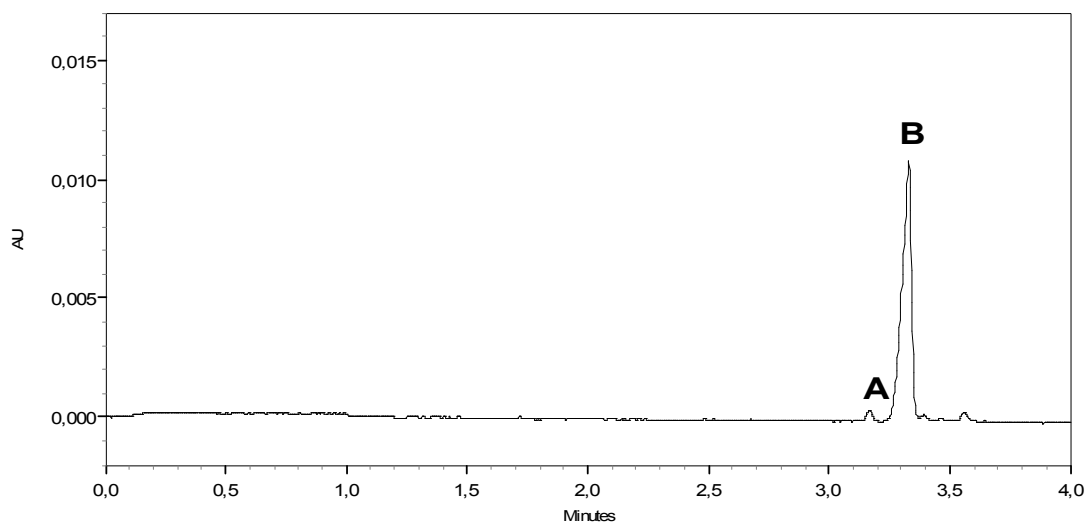


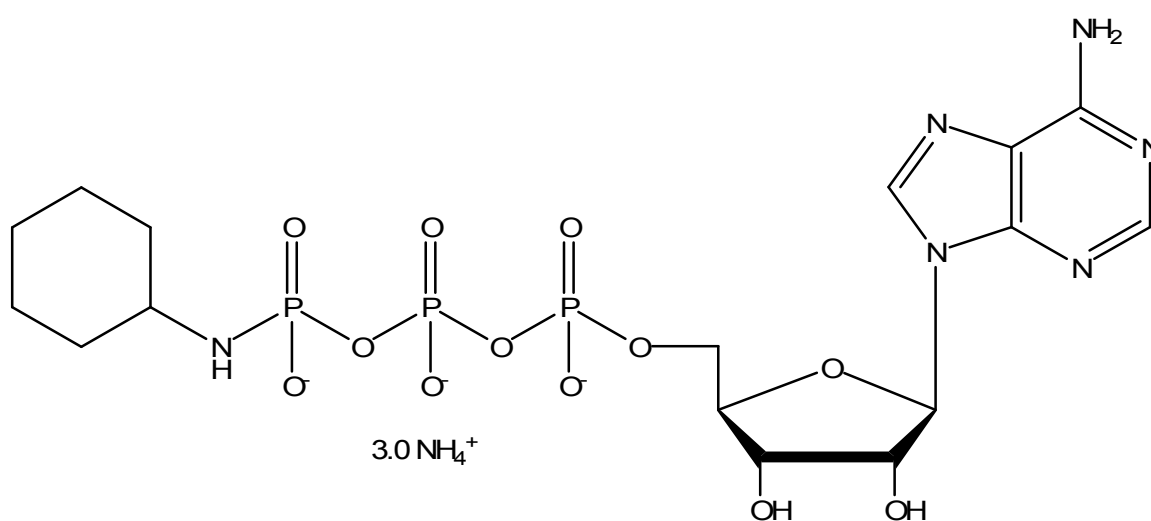
Abbildung 9.29: Elektropherogramm von Verbindung **20**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **20**

9.2.4.11 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -cyclohexylamid (23)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
Cyclohexylamin: 1.4 mmol (134 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 30%, 38,5 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 642 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.01 (m, 10H, Cyclohexylamin); 2.88 (m, 1H, N-CH); 4.25 (m, 2H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz, H-5'); 4.39 (t, 1H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz, H-4'); 4.55 (m, 1H, $^3\text{J} = 3.78$ Hz, H-3'); 4.70 (m, 1H, $^3\text{J} = 3.78$ Hz, H-2'); 6.12 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.3$ Hz, H-1'); 8.23 (s, 1H, H-8); 8.53 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 22.18 (C-3 und C-5, Cyclohexylamin); 28.24 (C-4, Cyclohexylamin); 32.75 (C-2 und C-6, Cyclohexylamin); 48.96 (C-1, Cyclohexylamin); 63.05 (C-5'); 68.16 (C-3'); 77.23 (C-2'); 81.78 (C-4'); 84.81 (C-1'); 116.47 (C-5,

Adenin); 138.01 (C-8, Adenin); 149.37 (C-4, Adenin); 152.76 (C-2, Adenin); 156.50 (C-6, Adenin).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -3.21 (d, $^3J = 19.69$, $\gamma\text{-P}$); -12.15 (d, $^3J = 20.02$, $\alpha\text{-P}$); -23.69 (t, $^3J = 19.69$ $^3J = 20.13$, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 588.8; $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 606.0

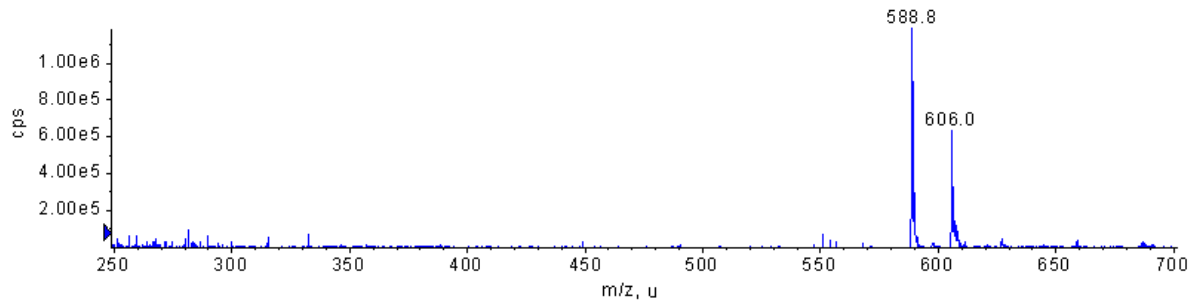


Abbildung 9.30: Massenspektrum von Verbindung **23** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 587.2

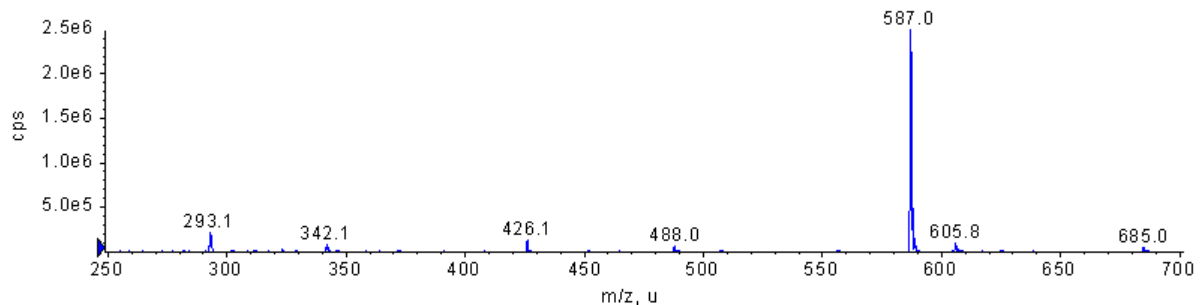


Abbildung 9.31: Massenspektrum von Verbindung **23** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 97%

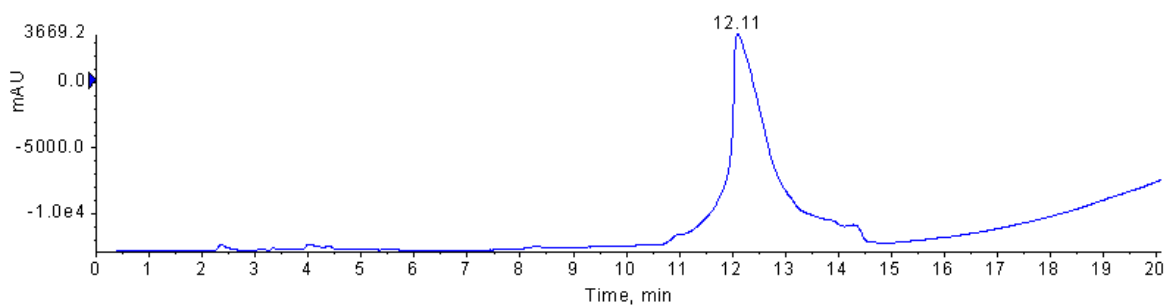


Abbildung 9.32: Chromatogramm von Verbindung **23**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 95%

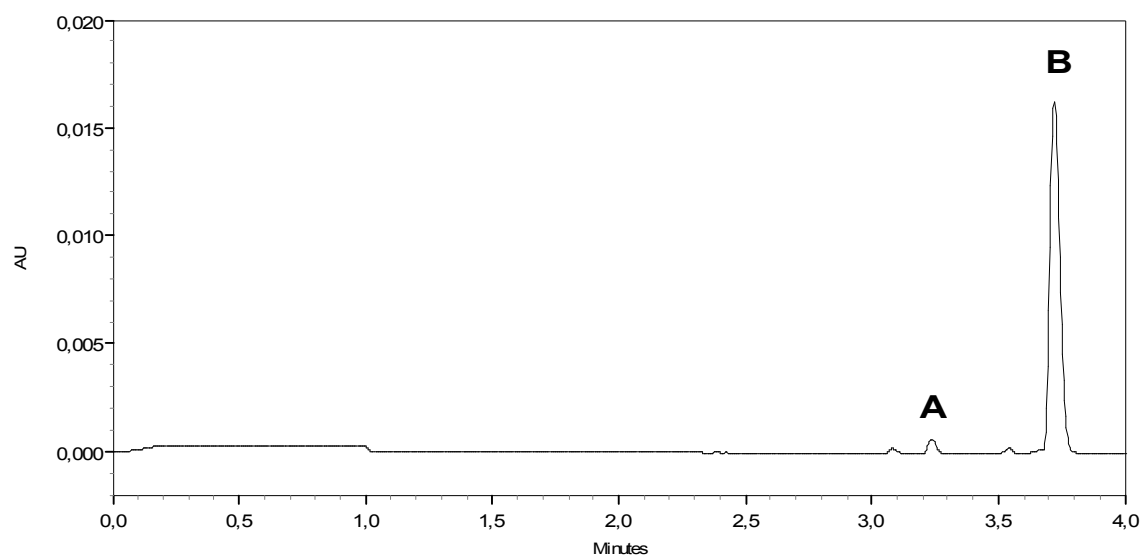


Abbildung 9.33: Elektropherogramm von Verbindung **23**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **23**

9.2.4.12 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -benzylamid (24)*

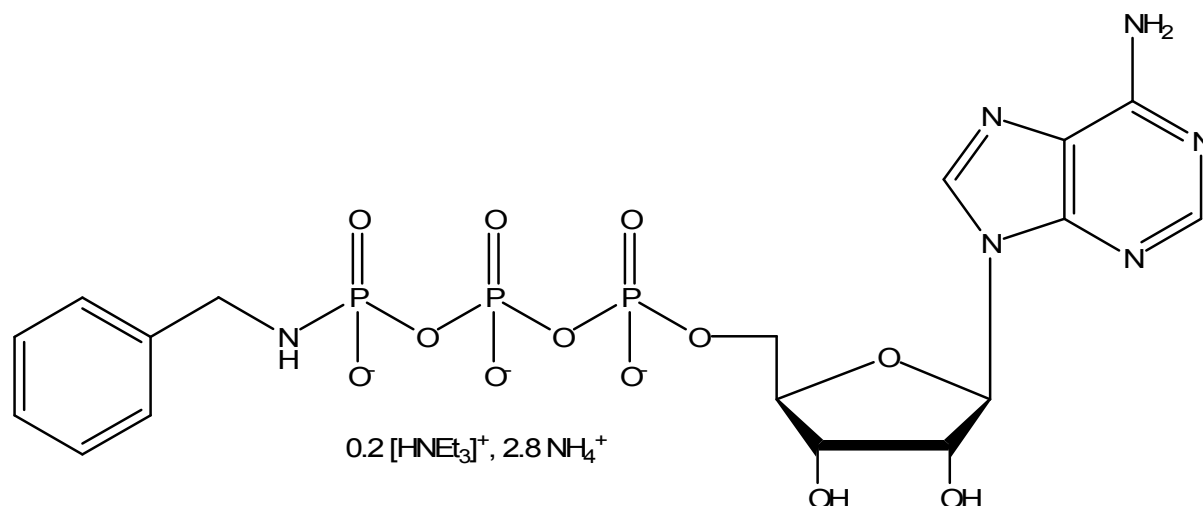
Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)

Benzylamin: 1.4 mmol (150 mg)

EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode A

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 36%, 48 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 667 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.20 (m, 2.16H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.19 (q, 1.44H, ³J = 7,25 Hz, CH₂, Triethylamin); 3.92 (d, 2H, ²J = 7.88 Hz, CH₂, Benzyl); 4.28 (m, 2H, ³J = 6.63 Hz, H-5'); 4.39 (m, 1H, ³J = 3.79 Hz und ³J = 6.62 Hz, H-4'); 4.51 (m, 1H, ³J = 3.78 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-3'); 4.66 (t, 1H, ³J = 5,36 Hz, H-2'); 6.02 (d, 1H, ³J = 5.67 Hz, H-1'); 7.06(m, 1H, H-4, Benzyl); 7.07 (m, 2 x 2H, H-2 und H-6, H-3 und H-5, Benzyl); 8.15 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.45, (s, 1H, H-2, Adenin).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 48.09 (CH₂, Benzyl); 49.52 (CH₂, Triethylamin); 67,98 (C-5'); 73,03 (C-3'); 77,27 (C-2'); 86,65 (C-4'); 89,66 (C-1'); 121,40 (C-5, Adenin); 129.38 (C-4, Benzyl); 129.83 (C-2 und C-6, Benzyl); 130.93 (C-3 und C-5, Benzyl); 142.31 (C-8, Adenin); 151.61 (C-4, Adenin); 155,45 (C-2, Adenin); 158.31 (C-6, Adenin).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ -1,40 (m, γ-P); -11,05 (m, α-P); -22,57 (m, β-P).

LC/ESI-MS:

[M+H]⁺: 597.0

[M-H]⁻: 595.0

Reinheit HPLC: 100%

Reinheit CE: 97%

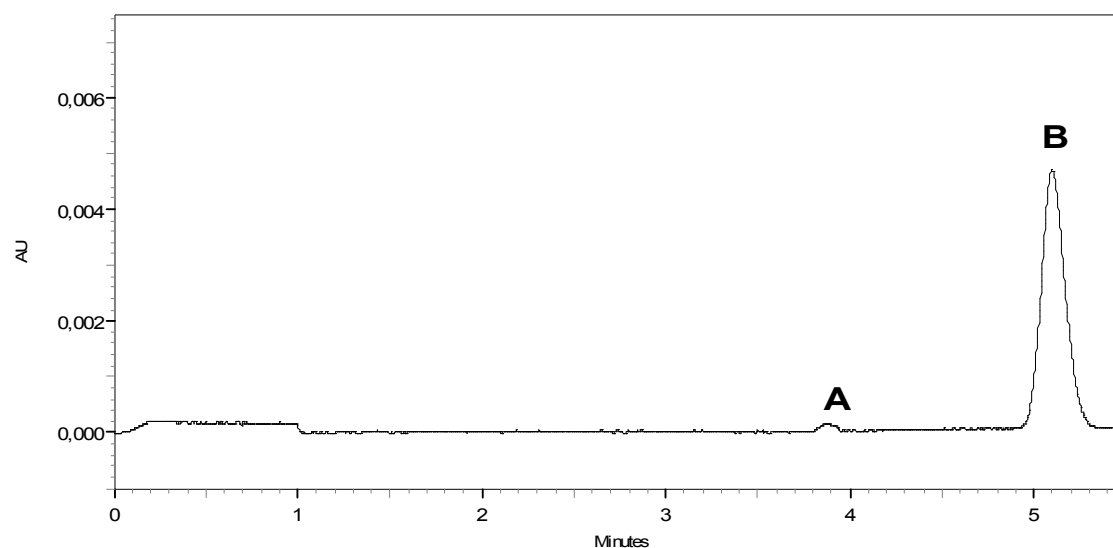


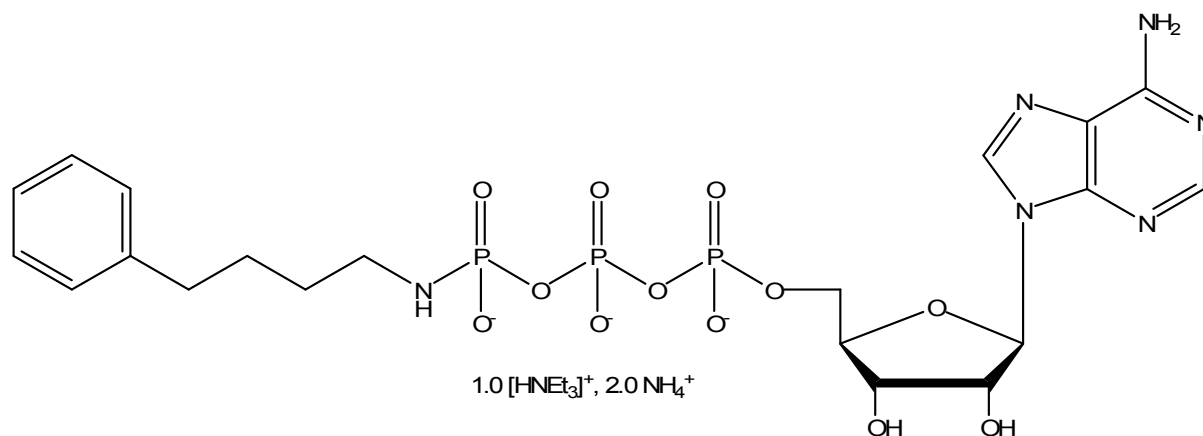
Abbildung 9.34: Elektropherogramm von Verbindung **24**, AU = Absorption Units, A = unbekannte Verunreinigung, B = Verbindung **24**

9.2.4.13 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -4-phenylbutylamid (**27**)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
4-Phenylbutylamin: 1.4 mmol (208 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode A
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 28%, 43,3 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 773 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.30 (t, 9H, ³J = 7.5 Hz, CH₃, Triethylamin); 1.38 (m, 2 x 2H, 2 x CH₂, Ph-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.38 (t, 2H, CH₂, ³J = 6.95 Hz, CH₂-Ph); 2.85 (t, 2H, ³J = 9.45 Hz, CH₂-N); 3.20 (q, 6H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.25 (m, 2H, H-5'); 4.38 (m, 1H, H-4'); 4.51 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.7 Hz und ³J = 4.1 Hz, H-3'); 4.69 (t, 1H, ³J = 5.05 Hz und ³J = 5.65 Hz, H-2'); 6.09 (d, 1H, ³J = 5.0 Hz, H-1'); 7.09 (d, 2H, ³J = 7.6 Hz, H-2 und H-6, Aromat); 7.13 (pseudo-t, 1H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 7.25 Hz, H-4, Aromat); 7.22 (pseudo-t, 2H, ³J = 7.55 Hz und ³J = 7.6 Hz, H-3 und H-5, Aromat); 8,18 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.50 (s, 1H, H-2, Adenin).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.09 (CH₂, Triethylamin); 30.85 (Ph-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N); 33.40 (Ph-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N); 37.45 (Ph-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N); 44.30 (Ph-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N); 49.54 (CH₂, Triethylamin); 61.84 (C-5'); 73.10 (C-3'); 77.34 (C-2'); 86.56 (C-4'); 89.82 (C-1'); 121.47 (C-5, Adenin); 128.45 (C-4, Adenin); 131.05 (C-2 und C-6, Aromat); 131.17 (C-3 und C-5, Aromat); 142.56 (C-1, Aromat); 145.79 (C-8, Adenin); 151.77 (C-4, Adenin); 155.64 (C-2, Adenin); 158.40 (C-6, Adenin).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ -0.17 (d, ³J = 12.3 Hz, γ-P); -10.73 (d, ³J = 19.7 Hz, α-P); -21.72 (t, ³J = 12.1 Hz und ³J = 19.7 Hz, β-P).

LC/ESI-MS:

[M+H]⁺: 639.0

[M-H]⁻: 637.3

Reinheit HPLC: 97%

Reinheit CE: 96%

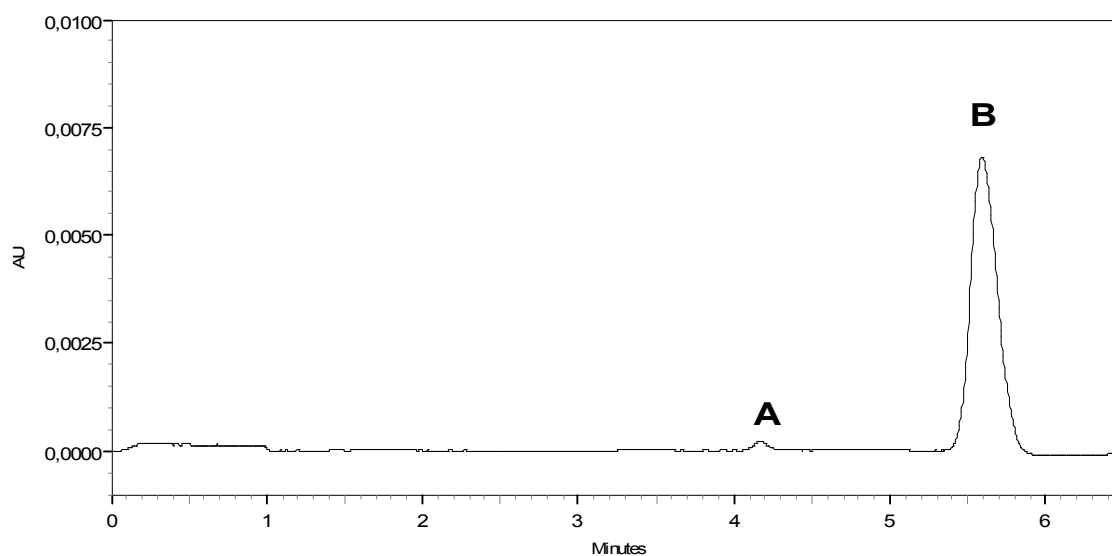


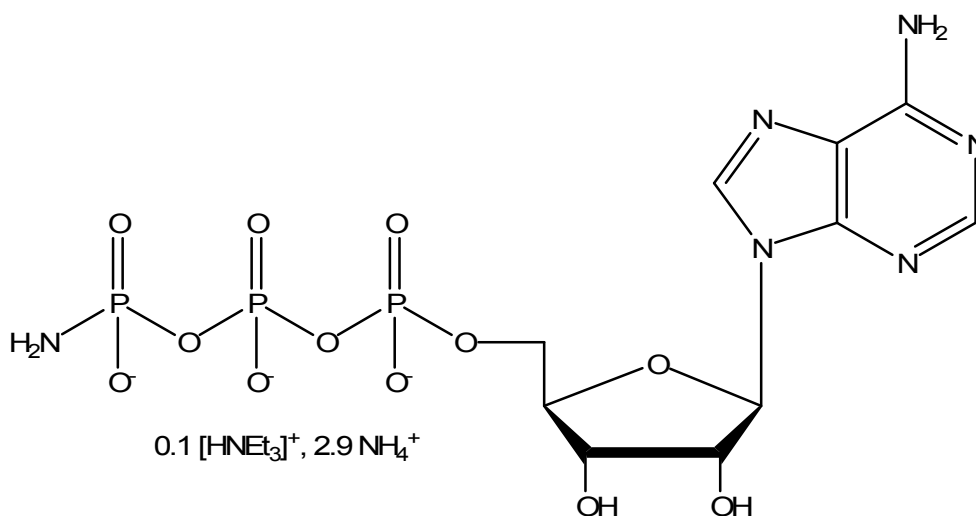
Abbildung 9.35: Elektropherogramm von Verbindung **27**, AU = Absorption Units, A = unbekannte Verunreinigung, B = Verbindung **27**

9.2.4.14 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -amid (**28**)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 Ammoniumchlorid: 1.4 mmol (75 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 27%, 30,56 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 566 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O), δ 1.25 (t, 1.03H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz; CH_3 , Triethylamin); 3.16 (q, 0.67H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, N- CH_2 , Triethylamin); 4.23 (m, 3H, 2 x H-5', H-4'); 4.39 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 2.85$ Hz und $^3\text{J} = 2.83$ Hz, H-3'); 4.35 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz und $^3\text{J} = 3.78$ Hz, H-2'); 6.10 (d, 1H, $^3\text{J} = 5.99$ Hz, H-1'); 8.19 (s, 1H, H-8); 8.47 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O), δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 49.51 (N- CH_2 , Triethylamin); 68.07 (C-5'); 73.17 (C-3'); 77.09 (C-2'); 86.69 (C-4'); 89.64 (C-1'); 121.43 (C-5); 142.64 (C-8); 151.91 (C-4); 155.69 (C-2); 158.42 (C-6).

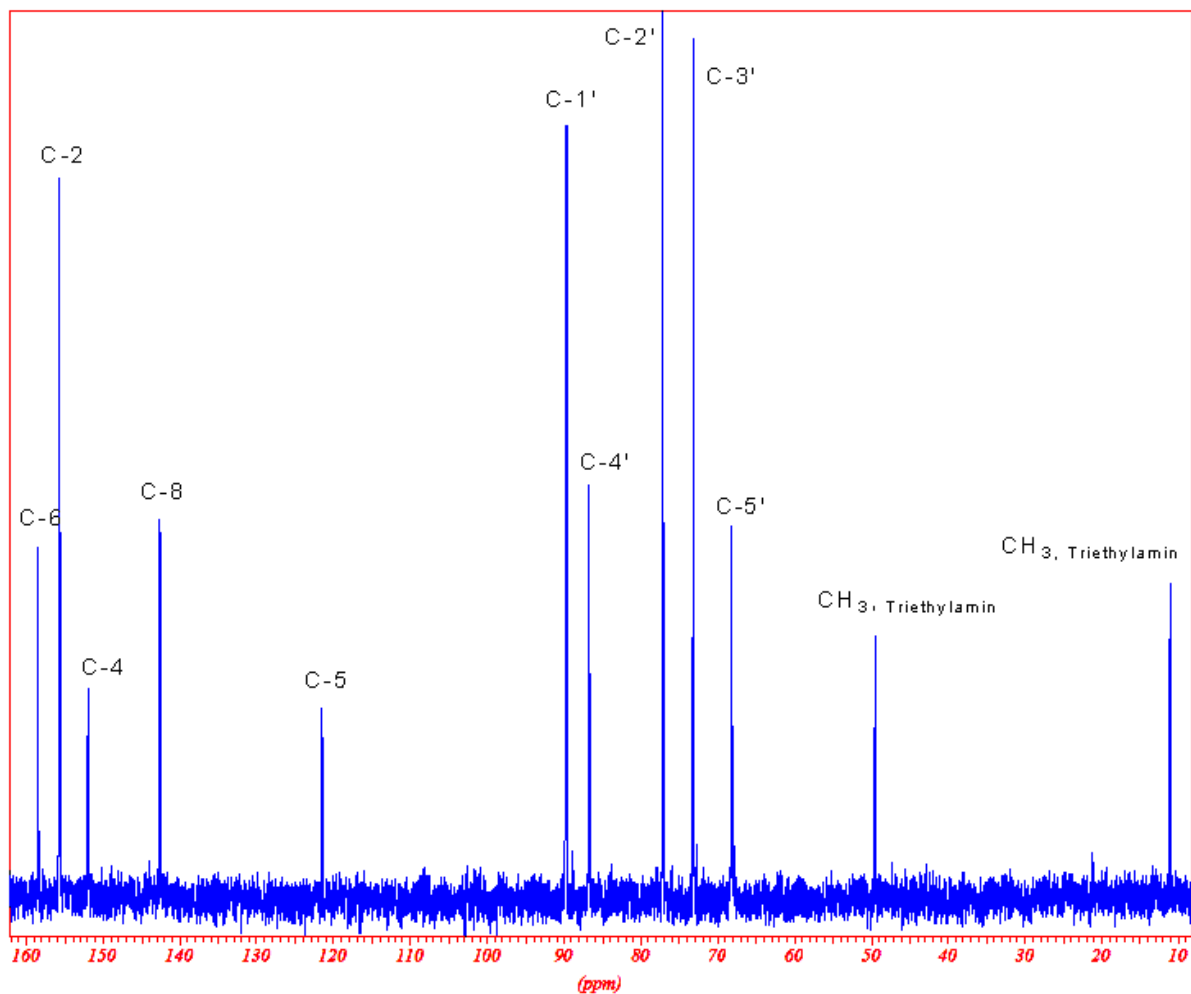


Abbildung 9.36: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **28**

^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O), δ -0.65 (d, $^3J = 19.69$ Hz, γ -P); -11.07 (d, $^3J = 19.68$ Hz, α -P); -22.23 (t, $^3J = 17.23$ und $^3J = 19.68$ Hz, β -P).

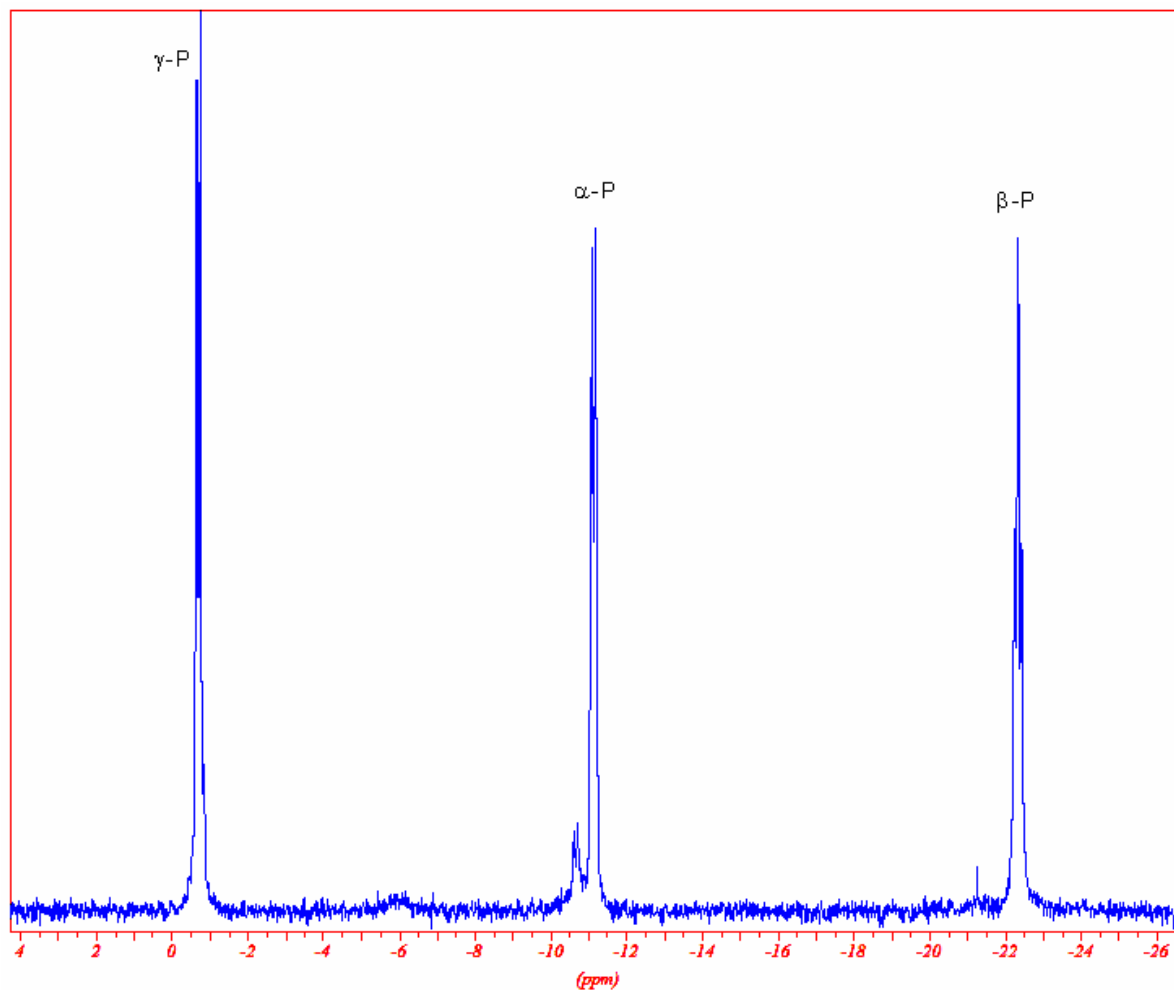


Abbildung 9.37: ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **28**

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 507.1

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 505.0

Reinheit HPLC: 92%

Reinheit CE: 93%

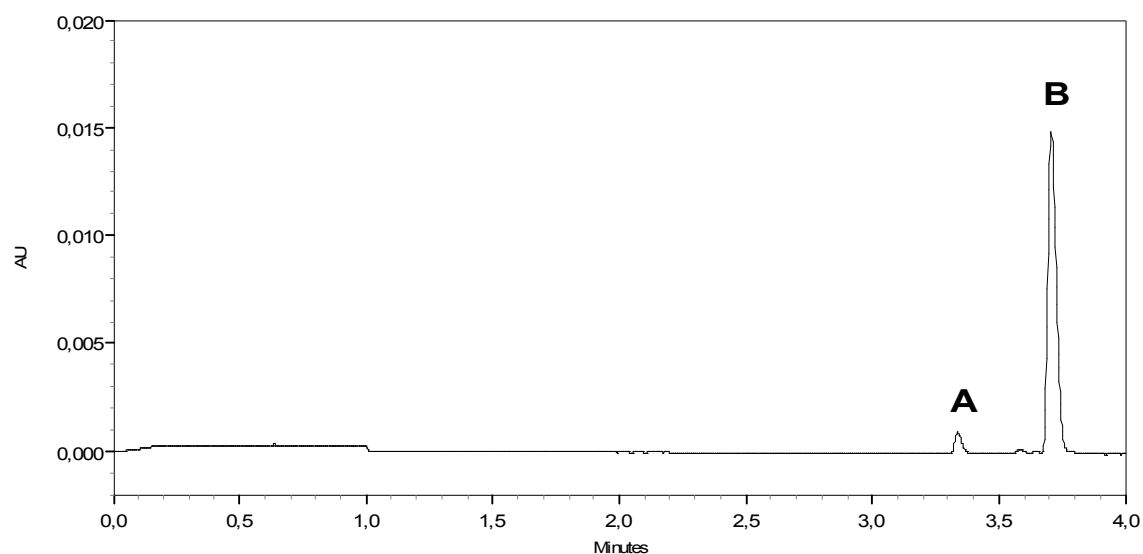


Abbildung 9.38: Elektropherogramm von Verbindung **28**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **28**

9.2.4.15 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -phenylamid (**29**)*

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)

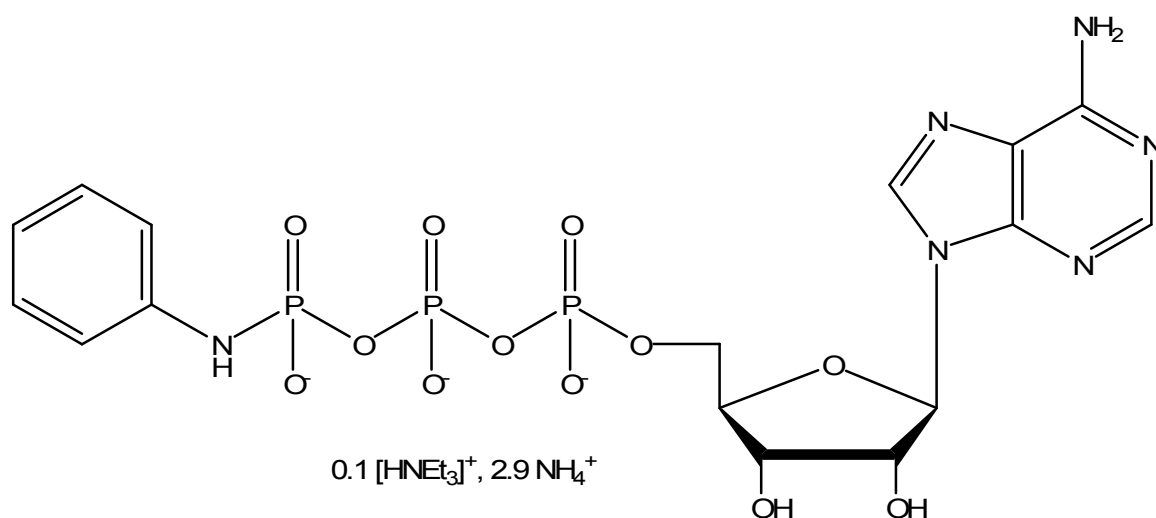
Anilin: 1.4 mmol (130 mg)

EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode A

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 19%, 24,5 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 645,6 g/mol

NMR-Daten:

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.27 (t, 1,31H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.20 (q, 0,87H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.13 (m, 2H, H-5'); 4.37 (m, 1H, H-4'); 4.38 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.10 Hz und ³J = 4.45 Hz, H-3'); 4.46 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.04 Hz und ³J = 4.73 Hz, H-2'); 6.05 (d, 1H, ³J = 5.05 Hz, H-1'); 6.70 (pseudo-t, 1H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 7.55 Hz, H-4, Anilin); 6.96 (d, 2H, ³J = 7.85 Hz, H-2 und H-6, Anilin); 7.07 (pseudo-t, 2H, ³J = 7.60 Hz, ³J = 7.85 Hz, H-3 und H-5, Anilin); 8.26 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.45 (s, 1H, H-2, Adenin).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 49.52 (CH₂, Triethylamin); 67.69 (C-5'); 72.65 (C-3'); 77.35 (C-2'); 86.52 (C-4'); 90.19 (C-1'); 120.13 und 120.18 (C-2 und C-6, Anilin); 122.84 (C-5, Adenin); 131.76 (C-3 und C-5, Anilin); 143.00 (C-1, Anilin); 144.62 (C-8, Adenin); 151.29 (C-4, Adenin); 151.50 (C-2, Adenin); 154.02 (C-6, Adenin).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ -9.81 (d, ³J = 19.68 Hz, γ-P); -11,12 (d, ³J = 19.69 Hz, α-P); -22,84 (t, ³J = 19.68 Hz, β-P).

LC/ESI-MS:

[M+H]⁺: 583.0

[M-H]⁻: 581.3

Reinheit HPLC: 100%

Reinheit CE: 98%

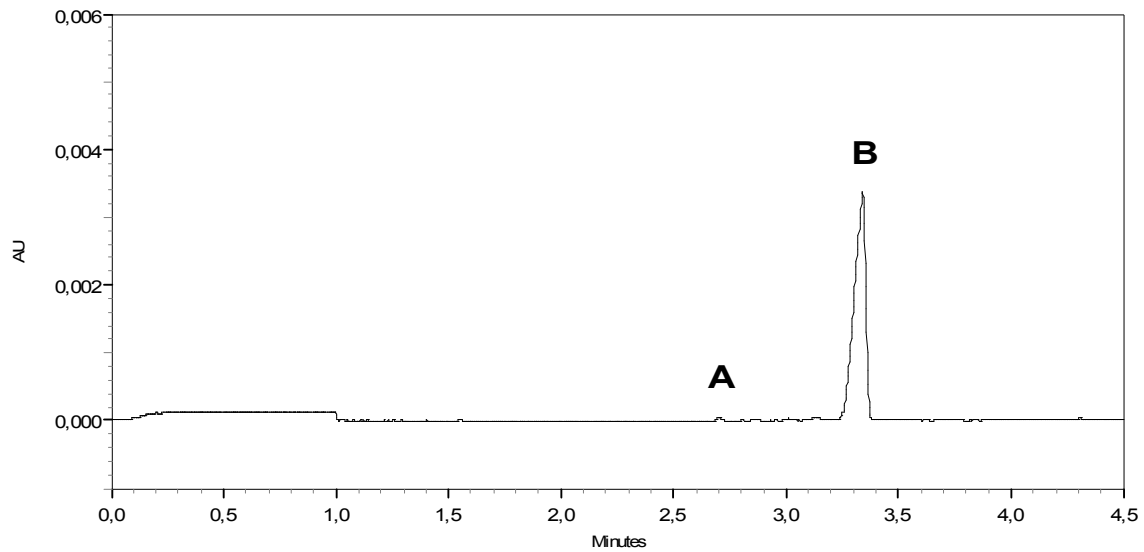


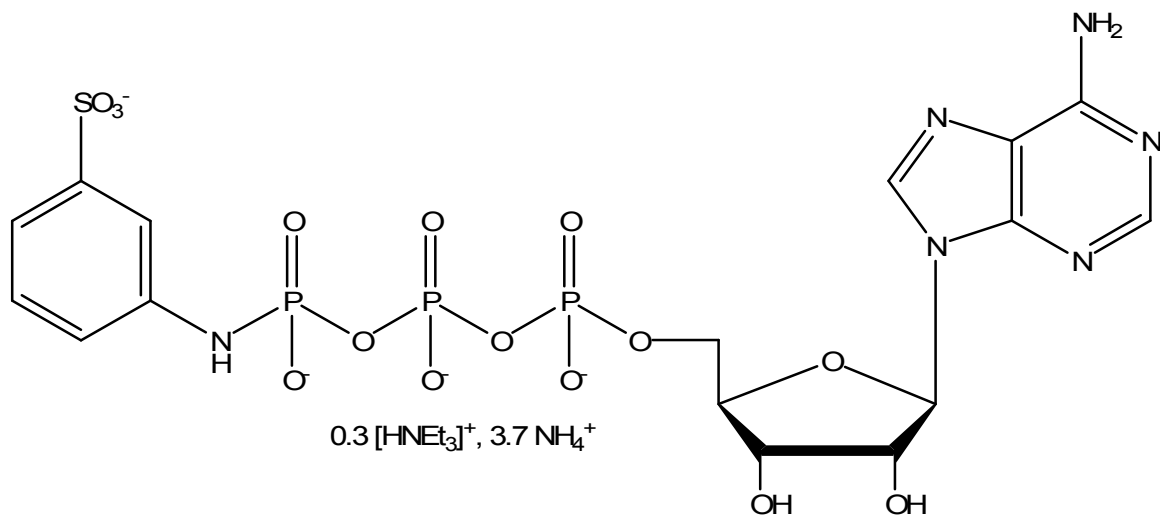
Abbildung 9.39: Elektropherogramm von Verbindung **29**, AU = Absorption Units, A = ATP, B = Verbindung **29**

9.2.4.16 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-sulfophenylamid (**30**)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 Metanilsäure: 1.4 mmol (240 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode A
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 27%, 41 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 755.2 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O), δ 1.24 (t, 2.3H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.15 (q, 1.5H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.09 (m, 2H, ³J = 2.84 Hz, H-5'); 4.27 (m, 1H, ³J = 2.84 Hz, H-4'); 4.36 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.45 Hz und ³J = 4.40 Hz, H-3'); 4.55 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-2'); 6.05 (d, 1H, ³J = 5.36 Hz, H-1'); 7.15 (d, 1H, ³J = 4.75 Hz, H-6, Metanilsäure,); 7.21 (m, 2H, H-4 und H-5, Metanilsäure); 7.32 (s, 1H, H-2, Metanilsäure); 8.23 (s, 1H, H-8); 8.45 (s, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O), δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 49.50 (CH_2 , Triethylamin); 67.84 (C-5'); 72.89 (C-3'); 77.33 (C-2'); 86.57 (C-4'); 90.06 (C-1'); 116.79 (C-2, Metanilsäure); 119.64 (C-4, Metanilsäure); 121.42 (C-5, Adenin); 122.65 (C-6, Metanilsäure); 132.46 (C-5, Metanilsäure); 143.10 (C-8, Adenin); 145.35 (C-1, Metanilsäure); 145.84 (C-3, Metanilsäure); 151.62 (C-4, Adenin); 153.98 (C-2, Adenin); 157.18 (C-6, Adenin).

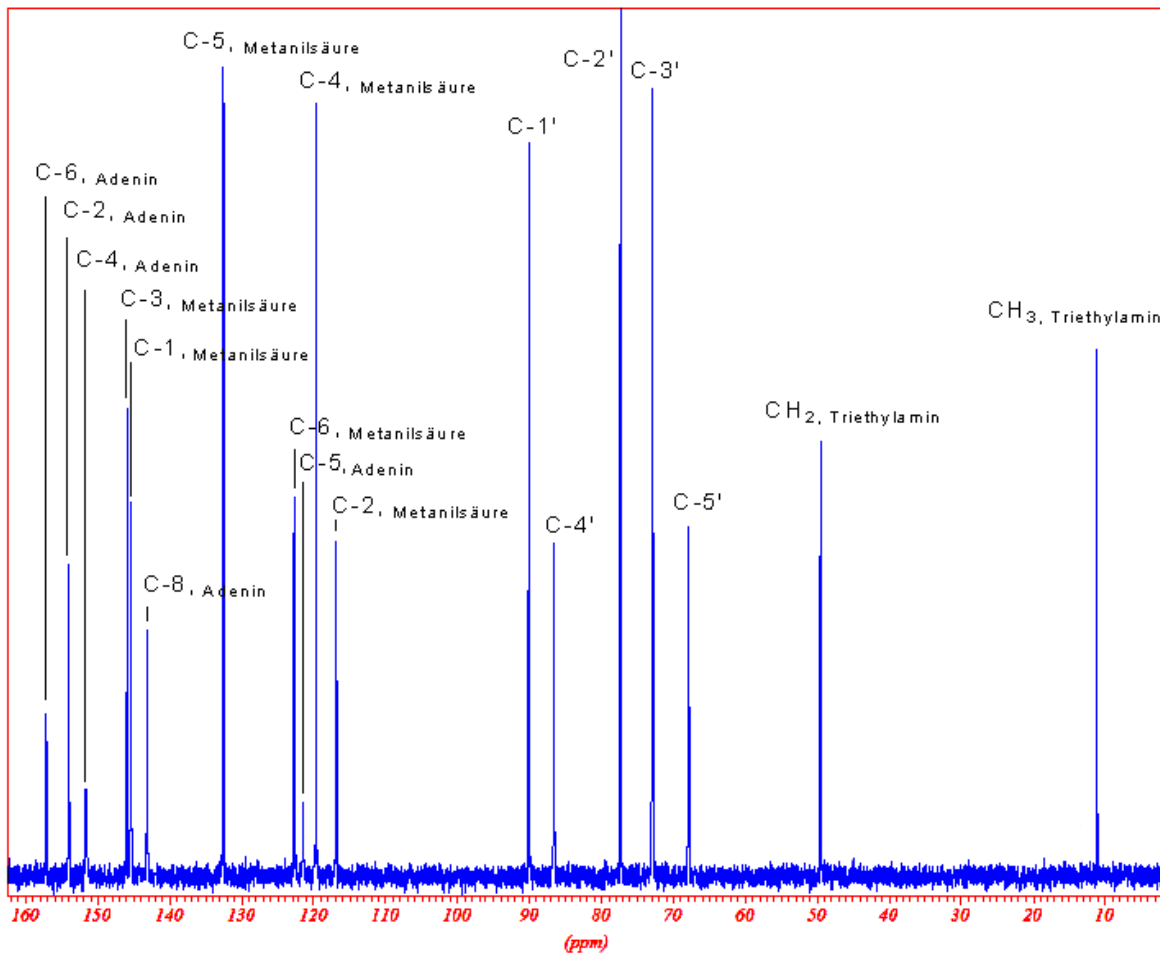


Abbildung 9.40: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **30**

^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O), δ -10.53 (γ -P); -11.07 (α -P); -22.79 (β -P).

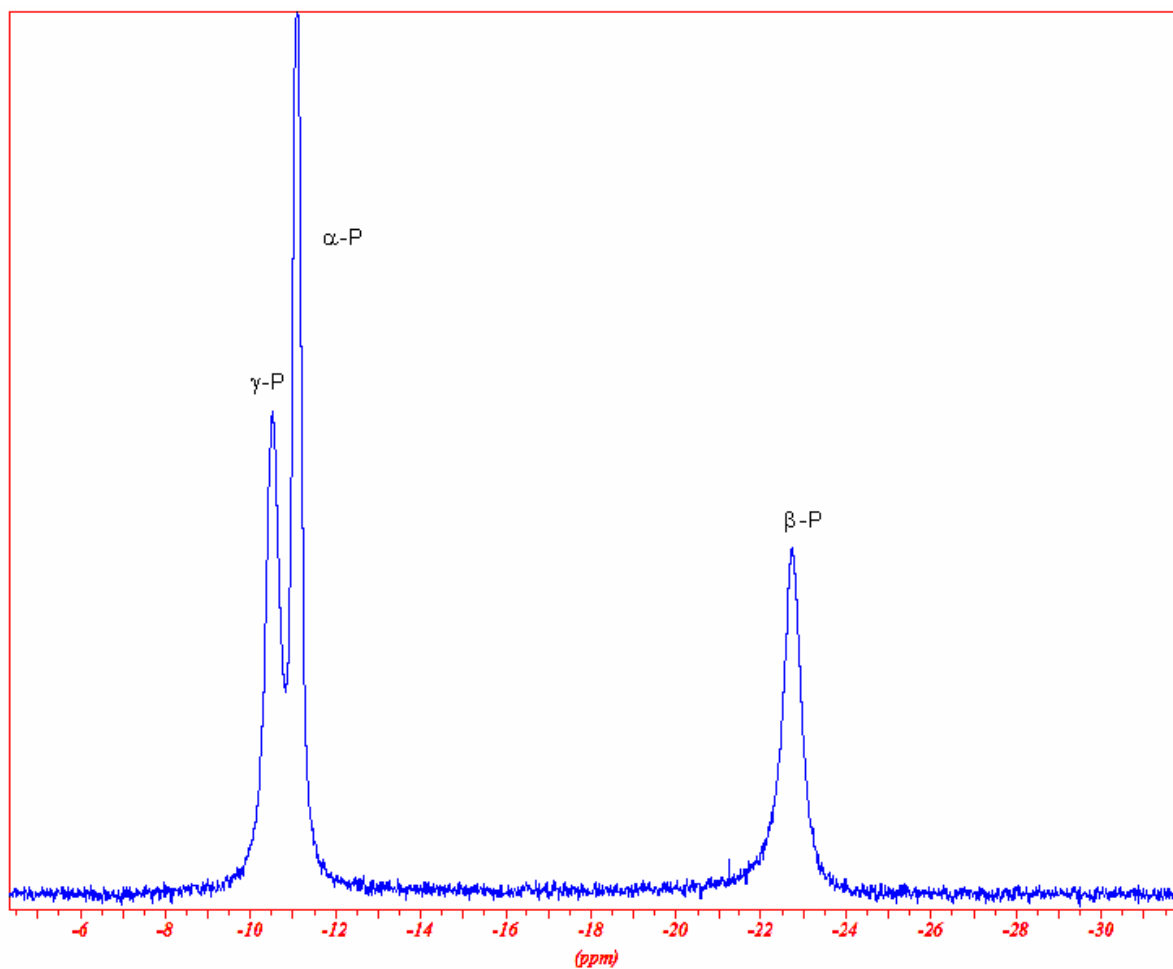


Abbildung 9.41: ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **30**

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 662,8

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 661,0

Reinheit HPLC: 99%

Reinheit CE: 97%

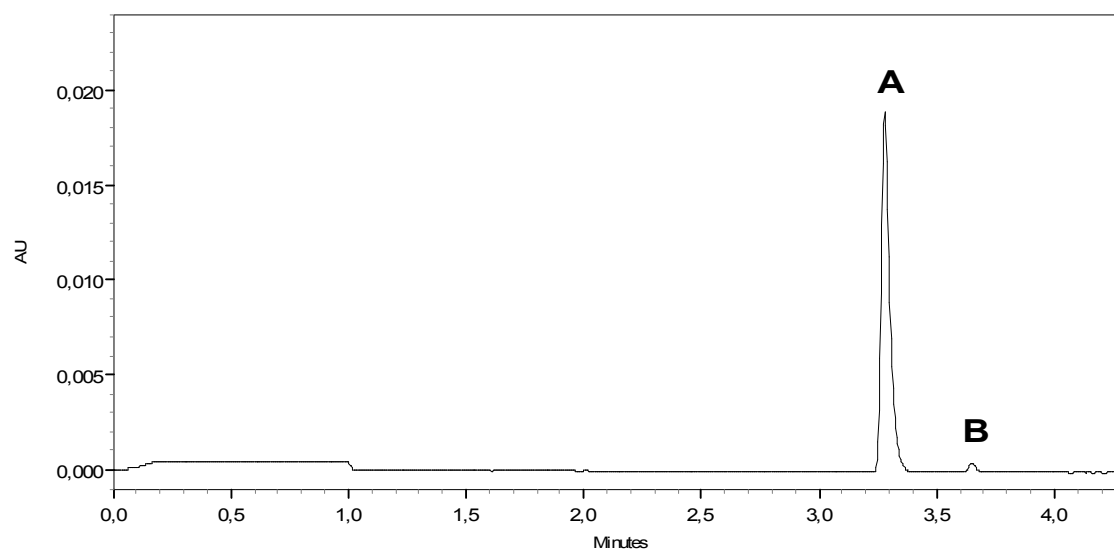


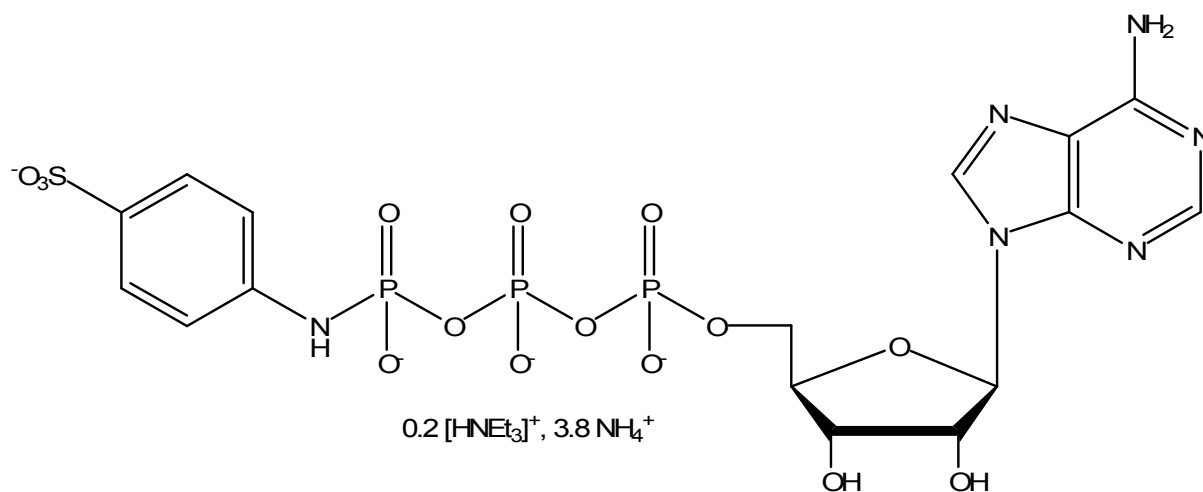
Abbildung 9.42: Elektropherogramm von Verbindung **30**, AU = Absorption Units, A = Verbindung **30**, B = ATP

9.2.4.17 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -4-sulfophenylamid (**31**)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
Sulfanilsäure: 1.4 mmol (240 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode A
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 29%, 44 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 744 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.25 (t, 1.55H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); (q, 1.01H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.22 (m, 2H, ³J = 2.84 Hz, H-5'); 4.27 (m, 1H, H-4'); 4.35 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.04 Hz und ³J = 4.73 Hz, H-3'); 4.48 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.03 Hz und ³J = 5.04 Hz, H-2'); 6.05 (d, 1H, ³J = 5.36 Hz, H-1'); 7.06 (d, 2H, ³J = 8.51 Hz, H-2 und H-6, Sulfanilsäure); 7.51 (d, 2H, ³J = 8.51 Hz, H-3 und H-5, Sulfanilsäure); 8.24 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.46 (s, 1H, H-2, Adenin).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O), δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 49.50 (CH_2 , Triethylamin); 67.80 (C-5'); 72.71 (C-3'); 77.34 (C-2'); 86.49 (C-4'); 90.21 (C-1'); 119.53 (C-2 und C-6, Sulfanilsäure); 129.38 (C-3 und C-5, Sulfanilsäure); 136.34 (C-5, Adenin); 143.11 (C-4, Sulfanilsäure); 147.85 (C-8, Adenin); 151.57 (C-1, Sulfanilsäure); 153.90 (C-2, Adenin); 157.13 (C-6, Adenin).

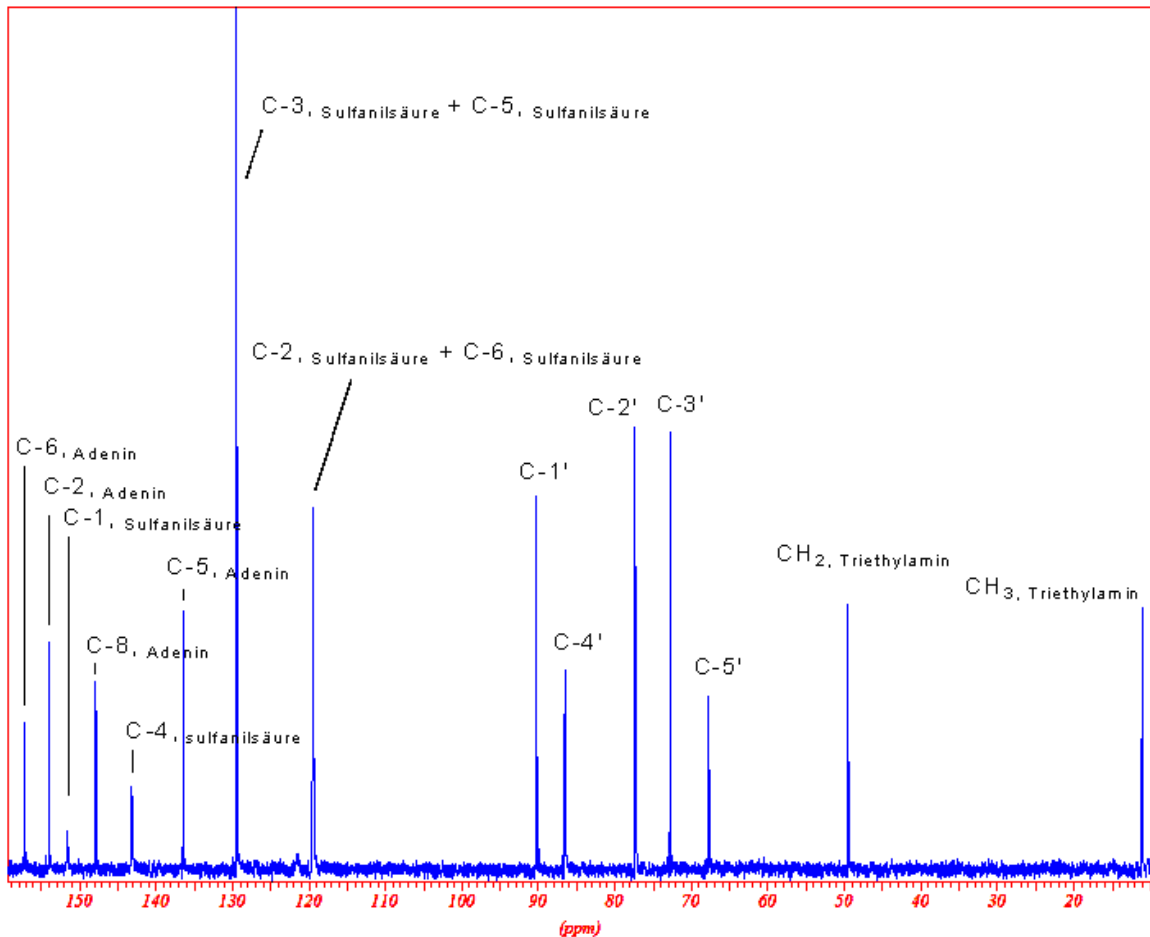


Abbildung 9.43: ^{13}C -Spektrum von Verbindung **31**

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O), δ -11,07 ($\gamma\text{-P}$ und $\alpha\text{-P}$); -22,79 ($\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 662,8

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 661,0

Reinheit HPLC: 100%

Reinheit CE: 97%

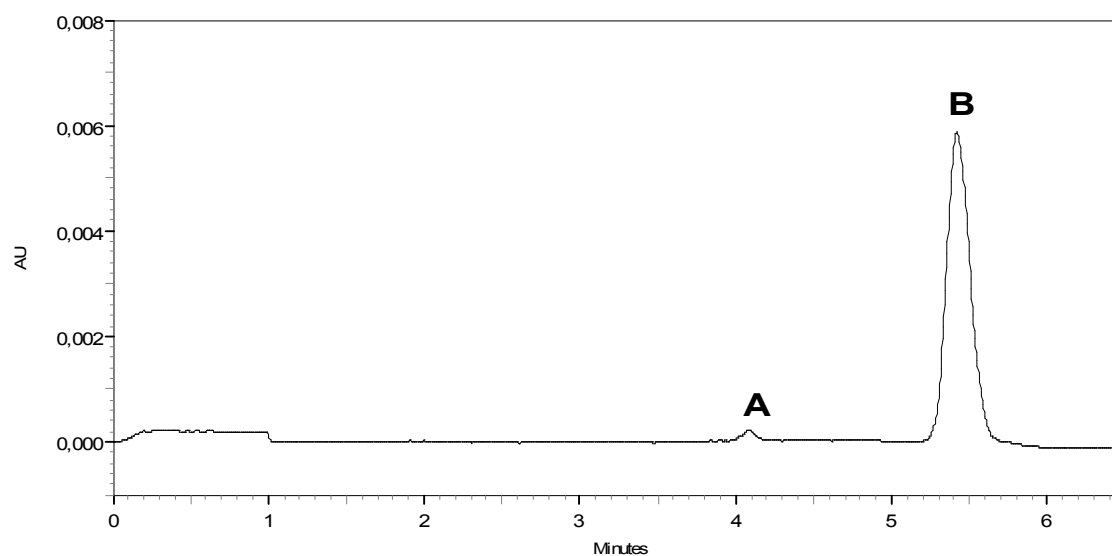


Abbildung 9.44: Elektropherogramm von Verbindung **31**, AU = Absorption Units, A = unbekannte Verunreinigung, B = Verbindung **31**

9.2.4.18 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-chlorophenylamid (**32**)

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)

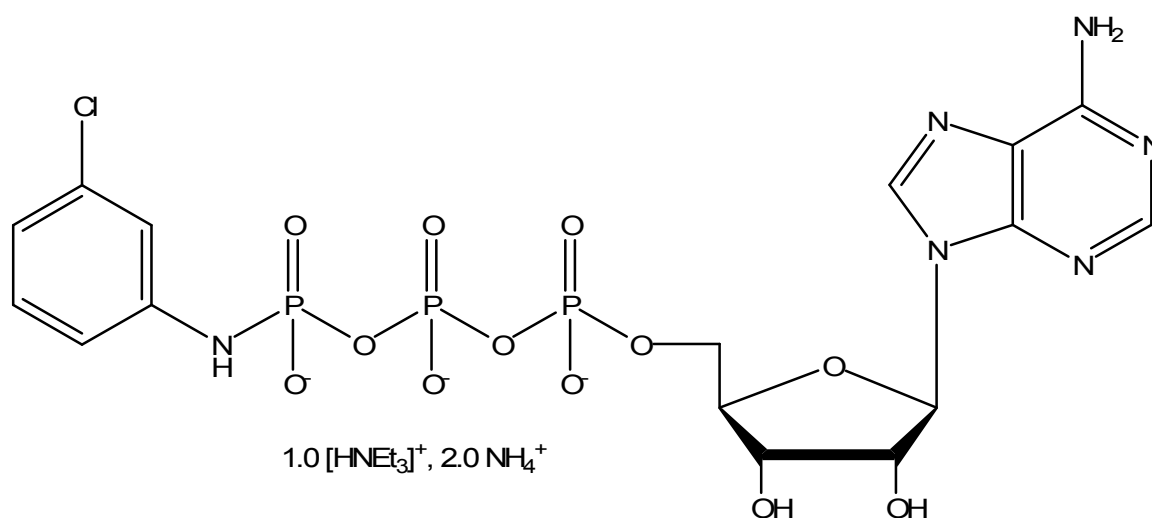
3-Chloranilin: 1.4 mmol (178 mg)

EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode A

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 30%, 41 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 751 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.27 (t, 8.86H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.19 (q, 5.01H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.16 (m, 2H, ³J = 2.83 Hz, H-5'); 4.30 (m, 1H, ³J = 2.84 Hz, H-4'); 4.40 (pseudo-t, 1H, ³J = 2.84 Hz und ³J = 2.83 Hz, H-3'); 4.52 (pseudo-t, 1H, ³J = 3.47 Hz und ³J = 3.78 Hz, H-2'); 6.05 (d, 1H, ³J = 5.99 Hz, H-1'); 6.59 (d, 1H, ³J = 6.35 Hz, H-6, Aromat); 6.87 (m, 2H, ³J = 7.88 Hz, H-2 und H-4, Aromat); 6.99 (pseudo-t, 1H, ³J = 7.88 Hz, H-5); 8.25 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.60 (s, 1H, H-2, Adenin).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 49.52 (CH₂, Triethylamin); 68.70 (C-5'); 72.74 (C-3'); 77.57 (C-2'); 86.54 (C-4'); 90.41 (C-1'); 118.36 (C-6, Aromat); 119.57 (C-1, Aromat); 120.28 (C-4, Aromat); 122.41 (C-5, Adenin); 132.86 (C-5, Aromat); 136.44 (C-3, Aromat); 143.61 (C-8, Adenin); 143.80 (C-1, Aromat); 146.08 (C-4, Adenin); 152.13 (C-2, Adenin); 155.86 (C-6, Adenin).

^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O) δ -10.56 (m, γ -P und α -P); -22.20 (t, β -P).

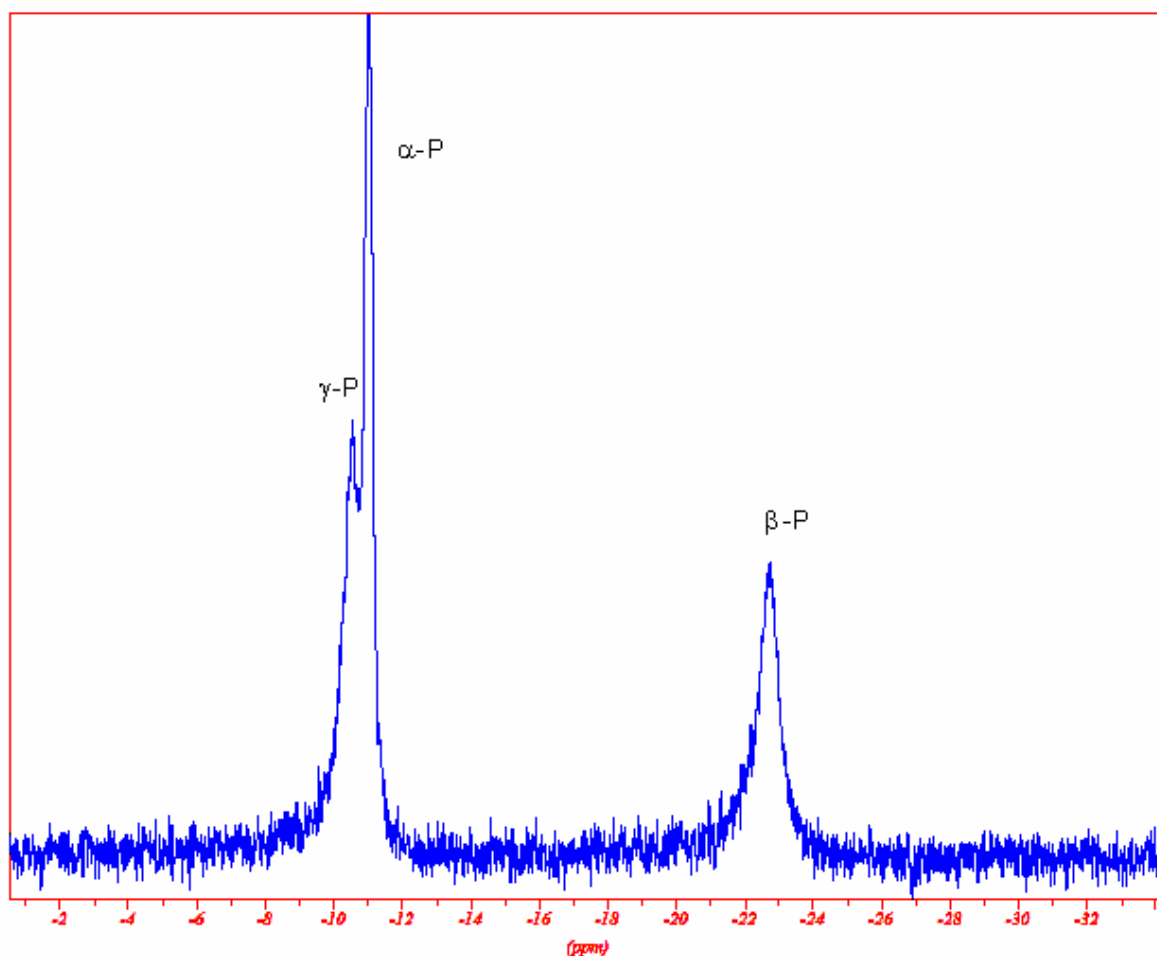


Abbildung 9.45: ^{31}P -Spektrum von Verbindung **32**

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 617.5

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 615.3

Reinheit HPLC: 99%

Reinheit CE: 99%

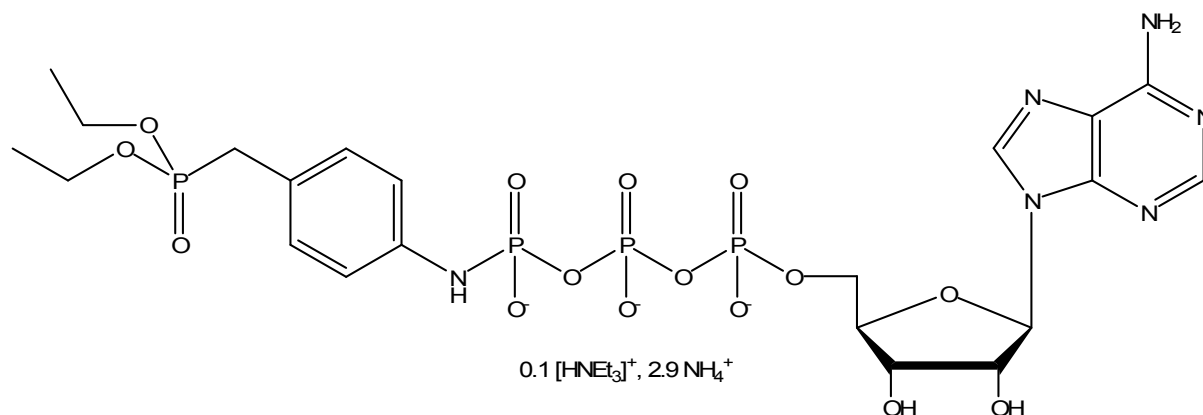
9.2.4.19 α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -4-diethylphosphonomethylphenylamid (33**)**

Ansatz: ATP-Dinatriumsalz: 0.2 mmol (110 mg)
 Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat-HCl: 1.4 mmol (340 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode A

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 25%, 39,6 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 792 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.24 (m, 2 x 3H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Ethylester, 1.01H, ³J = 6.94 Hz, CH₃, Triethylamin); 2.92 (m, 2H, ²J = 5.36 Hz, CH₂, Benzylphosphonat); 3.20 (q, 0.67H, ³J = 6.94 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.02 (q, 2 x 2H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Ethylester); 4.09 (m, 2H, ³J = 2.84 Hz, H-5'); 4.24 (pseudo-t, 1H, ³J = 2.52 Hz und ³J = 4.10 Hz, H-4'); 4.34 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.41 Hz und ³J = 4.73 Hz, H-3'); 4.38 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.04 Hz und ³J = 5.04 Hz, H-2'); 66.04 (d, 1H, ³J = 5.05 Hz, H-1'); 6.87 (d, 2H, ³J = 8.55 Hz, H-2 und H-6, Aromat); 6.91 (d, 2H, ³J = 8.55 Hz, H-3 und H-5, Aromat); 8.26 (s, 1H, H-8, Adenin); 8.44 (s, 1H, H-2, Adenin).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 18.36 (CH₃, Ethylester); 34.06 (CH₂, Benzylphosphonat); 49.52 (CH₂, Triethylamin); 6.54 (CH₂, Ethylester); 67.60 (C-5'); 72.62 (C-3'); 77.47 (C-2'); 86.38 (C-4'); 90.10 (C-1'); 120.38 (C-2 und C-6, Aromat); 124.22 (C-5, Adenin); 124.29 (C-4, Aromat); 132.88 (C-3 und C-5, Aromat); 142.67 (C-8, Adenin); 143.78 (C-1, Aromat); 155.22 (2 C, C-4 und C-2, Adenin); 158.18 (C-6, Adenin).

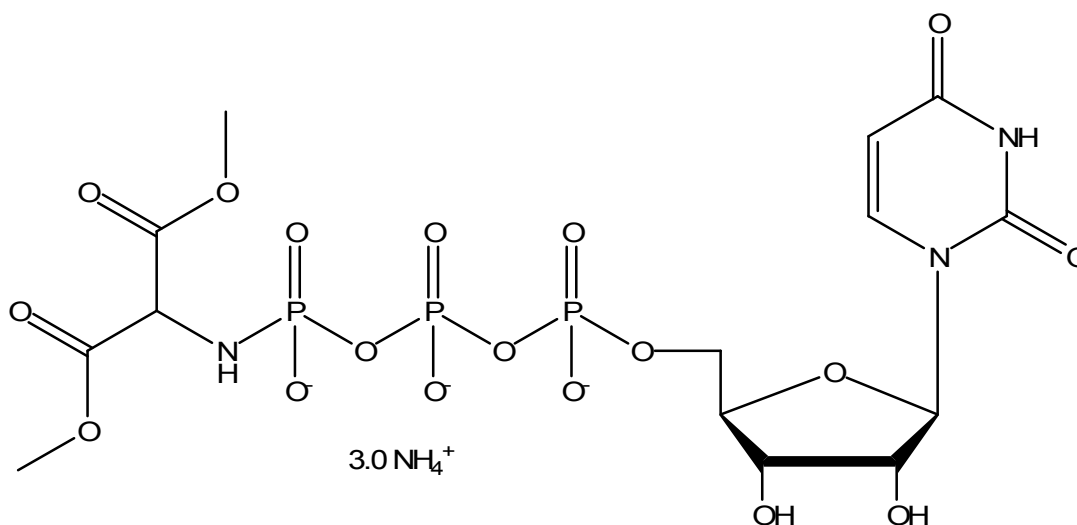
³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 30.78 (s, C-P); -9.90 (γ-P); 11.08 (α-P); -22.74 (β-P).

LC/ESI-MS:[M+NH₄]⁺: 733.0[M-H]⁻: 731.0**Reinheit HPLC:** 100%**Reinheit CE:** 99%

9.2.4.20 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -1,3-dimethoxy-1,3-dioxopropan-2-ylamid (34)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 Aminomalonsäuredimethylester-HCl: 1.4 mmol (256 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:**Ausbeute:** 30%, 39.8 mg**Aussehen:** Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)**Leicht löslich in:** Wasser**Schwer löslich in:** Ethanol, Diethylether, Dichlormethan**Berechnete Molekülmasse des Salzes:** 664 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 3.84 (m, 2 x 3H und 1H, 2 x CH₃, Methylester, N-CH, 2-Aminomalonsäure); 4.24 (m, 2H, ³J = 2.55 Hz, H-5'); 4.29 (pseudo-t, 1H, ³J = 3.15 Hz und ³J = 2.85 Hz, H-4'); 4.40 (m, 2H, ³J = 4.73 Hz und ³J = 5.36 Hz, H-3' und H-2');

5.99 (m, 2 x 1H, $^3J = 2.85$ Hz und $^3J = 6.30$ Hz, H-1' und H-5); 7.99 (d, 1H, $^3J = 7.85$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 56.50 (CH_3 , Methylester); 61.60 (N-CH, Aminomalonsäure); 67.78 (C-5'); 72.53 (C-3'); 76.65 (C-2'); 86.27 (C-4'); 91.06 (C-1'); 105.58 (C-5); 144.58 (C-6); 154.75 (C-2); 169.13 (C-4); 173.09 (2 x C=O, Aminomalonsäure).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -5.39 (d, $^3J = 17.23$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11.24 (d, $^3J = 19.69$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22.54 (t, $^3J = 19.69$ Hz, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 631.0

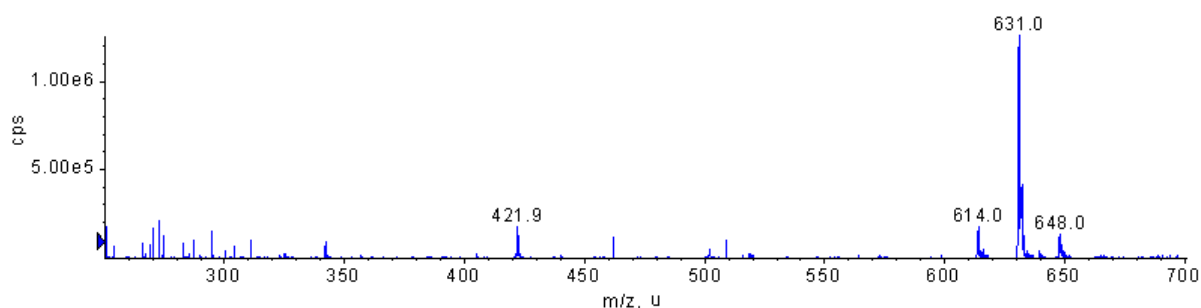


Abbildung 9.46: Massenspektrum von Verbindung **34** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

$[\text{M-H}]^-$: 612.0

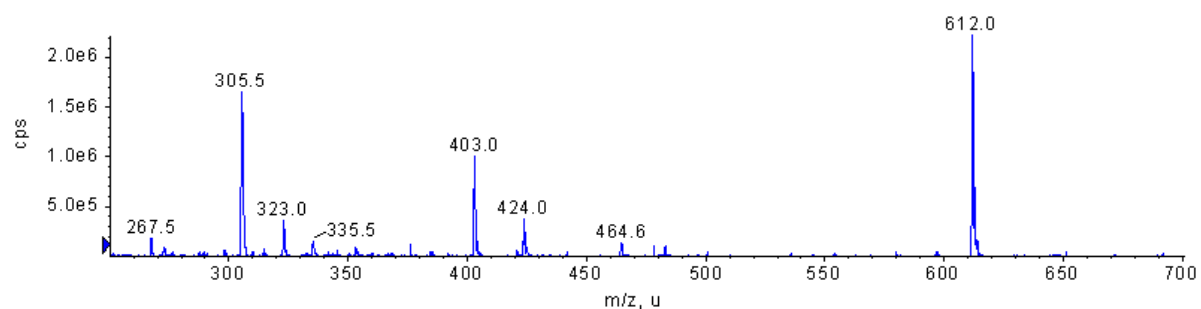


Abbildung 9.47: Massenspektrum von Verbindung **34** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 99%

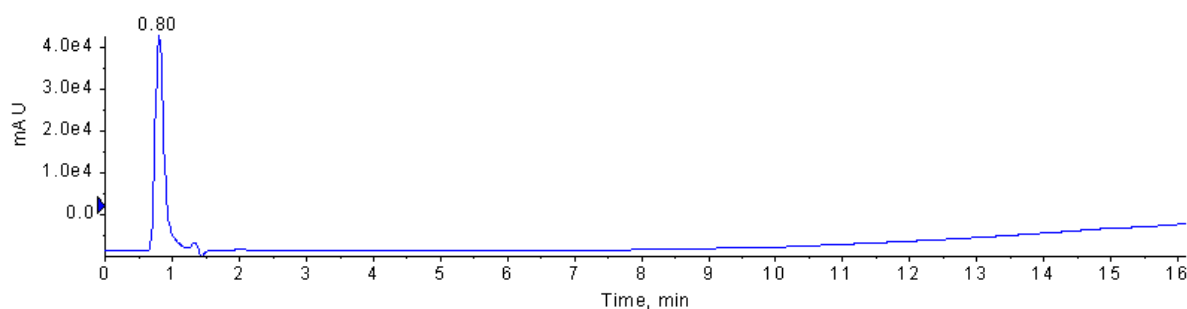


Abbildung 9.48: Chromatogramm von Verbindung **34**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 96%

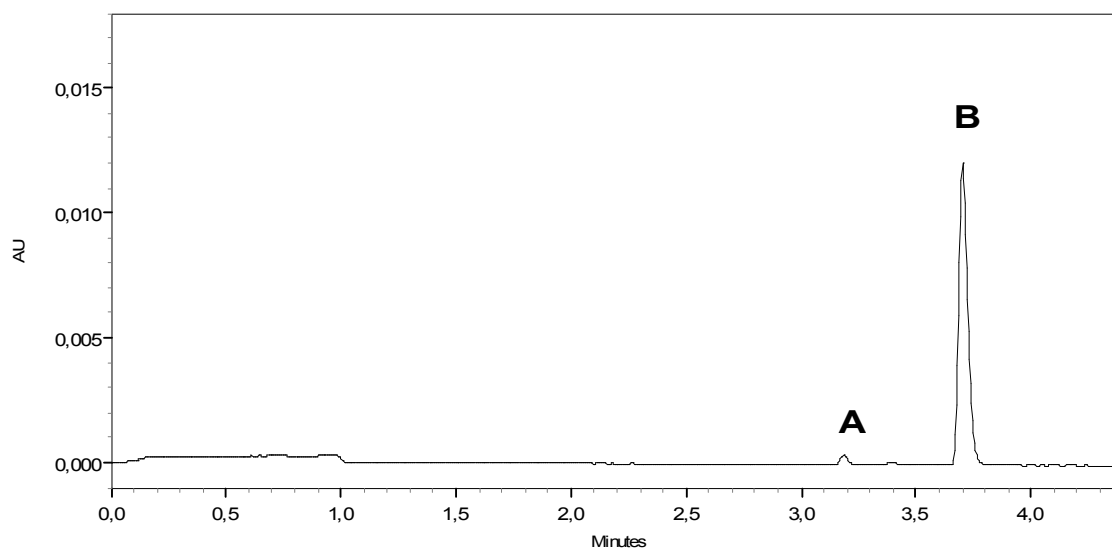
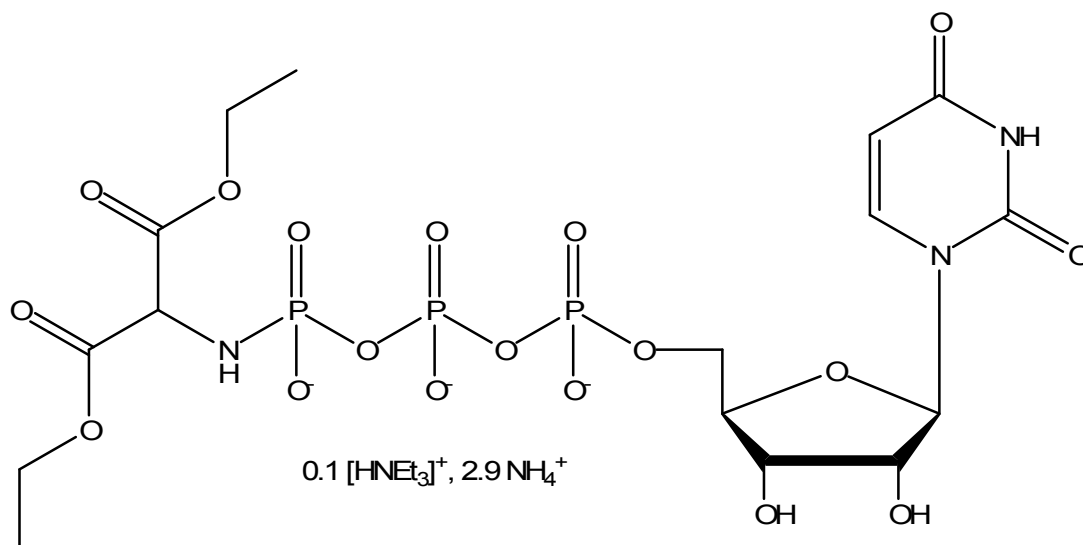


Abbildung 9.49: Elektropherogramm von Verbindung **34**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **34**

9.2.4.21 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -1,3-diethoxy-1,3-dioxopropan-2-ylamid (35)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 Aminomalonsäurediethylester-HCl: 1.4 mmol (296 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 25%, 35 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 699 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.27 (t, 0.75H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 1.29 (m, 6H, ³J = 4.42 Hz, 2 x CH₃, Ethylester); 3.21 (q, 0.5H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.24 (m, 2 x 2H und 1H, ³J = 4.42 Hz, 2 x CH₂, Ethylester, N-CH, 2-Aminomalonsäure); 4.28 (m, 3H, ³J = 4.41 Hz und ³J = 4.41 Hz, H-5' und H-4'); 4.41 (m, 2H, ³J = 4.73 Hz und ³J = 5.36 Hz, H-2' und H-3'); 5.99 (2 x 1H, ³J = 4.73 Hz und ³J = 8.19 Hz, H-1' und H-5); 7.99 (d, 1H, ³J = 7.88 Hz, H-6).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 16.05 (2 x CH₃, Ethylester); 49.53 (CH₂, Triethylamin); 66.92, (2 x CH₂, Ethylester); 66.85 (NC-H), 67.78 (C-5'); 72.53 (C-3'); 76.66 (C-2'); 86.22 (C-4'); 91.01 (C-1'); 105.59 (C-5); 144.60 (C-4); 154.74 (C-2); 169.11 (C-6); 172.84 (C=O, Ethylester).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ -5.31 (d, ³J = 17.25 Hz, γ-P); -11.19 (d, ³J = 19.69 Hz, α-P); -22.57 (t, ³J = 17.23 Hz und ³J = 19.68 Hz, β-P).

LC/ESI-MS:

[M+NH₄]⁺: 659.9

[M-H]⁻: 640.0

Reinheit HPLC: 96%

Reinheit CE: 95%

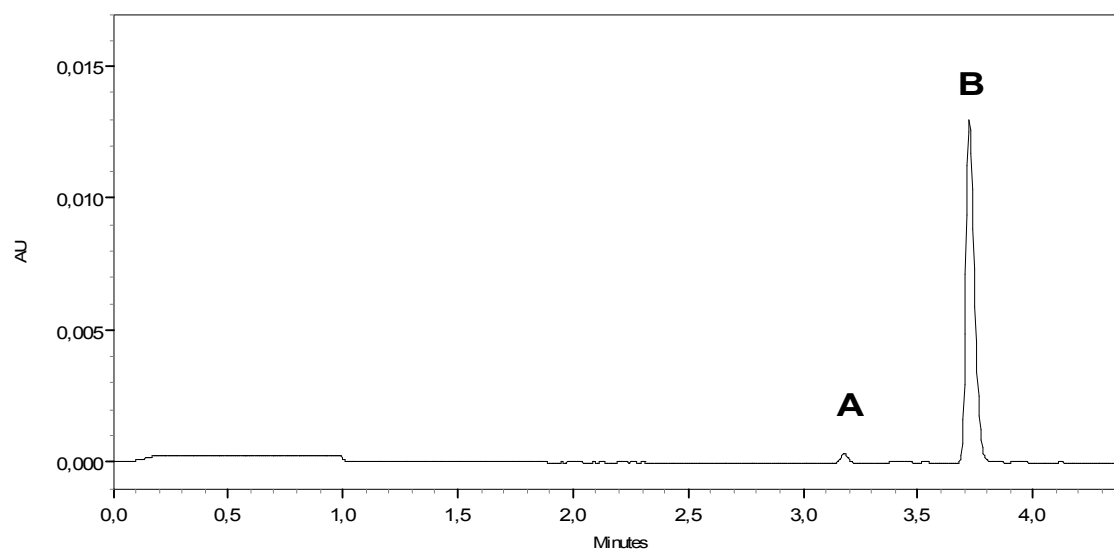
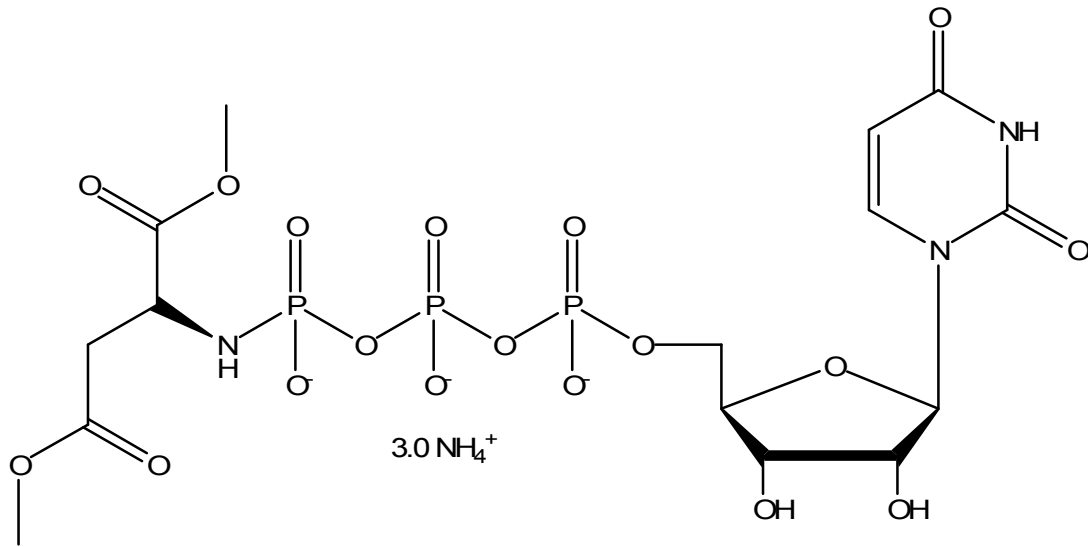


Abbildung 9.50: Elektropherogramm von Verbindung **35**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **35**

9.2.4.22 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -1,3-dimethoxy-1,3-dioxopropan-2-ylamid (36)*

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 S-Asparaginsäuredimethylester-HCl: 1.4 mmol (275 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 32%, 43.26 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 676 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 2.96 und 3.01 (2 x m, 2 x 1H, CH_2 , Asp); 3.70 und 3.75 (2 x s, 2 x 3H, 2 x CH_3 , Methyl ester); 4.25 (m, 4H, N-CH, Asp, H-5' und H-4'); 4.40 (m, 2H, $^3\text{J} = 4.41$ Hz und $^3\text{J} = 3,16$ Hz, H-2' und H-3'); 5.99 (m, 2 x 1H, $^3\text{J} = 5.36$ Hz und $^3\text{J} = 4.09$ Hz, H-1' und H-5); 7.99 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 41.32 (CH_2 , Asp); 54.34 (N-CH, Asp); 55.24 und 55.82 (2 x CH_3 , Methyl ester); 67.76, (C-5'); 72.50 (C-3'); 76.65 (C-2'); 86.17 (C-4'); 91.12 (C-1'); 105.57 (C-5); 144.59 (C-6); 154.73 (C-2); 169.11 (C-4); 176.58 und 178.21 (2 x C=O, Asp).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -4.27 (d, $^3\text{J} = 12.31$ Hz, γ -P); -11.23 (d, $^3\text{J} = 17.22$ Hz, α -P); -22.46 (t, $^3\text{J} = 17.22$ Hz, β -P).

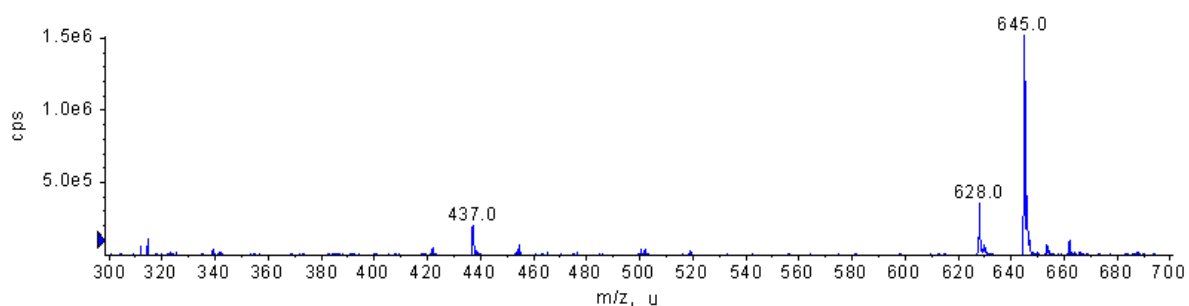
LC/ESI-MS: $[M+NH_4]^+$: 645.0

Abbildung 9.51: Massenspektrum von Verbindung **36** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

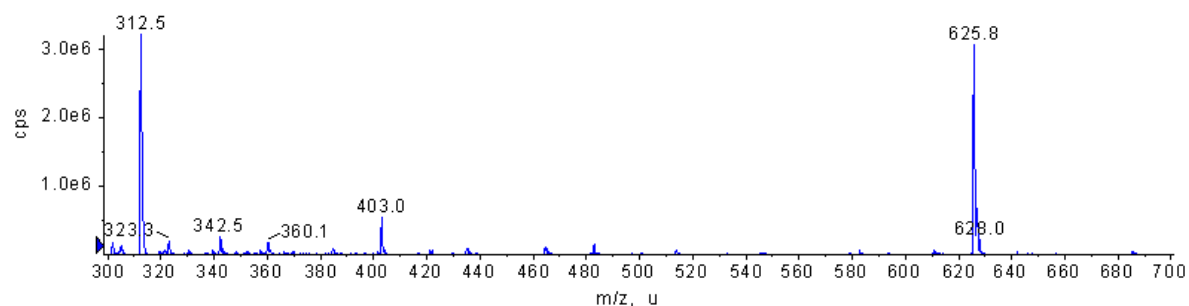
 $[M-H]^-$: 625.8

Abbildung 9.52: Massenspektrum von Verbindung **36** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

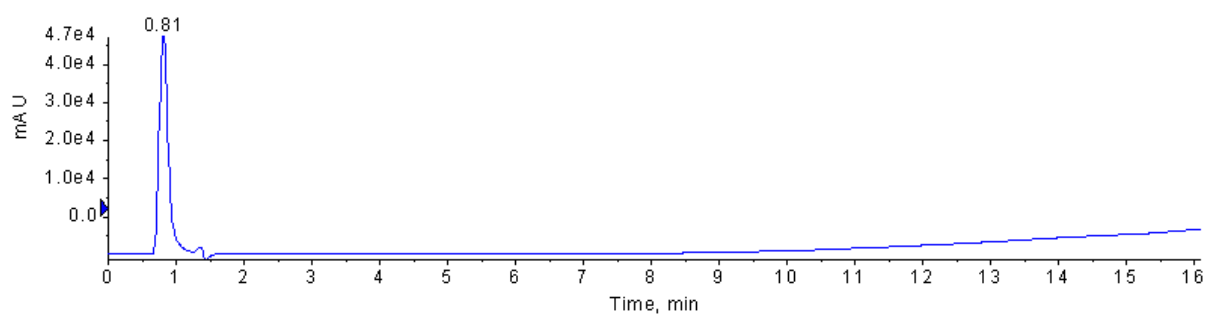
Reinheit HPLC: 100%

Abbildung 9.53: Chromatogramm von Verbindung **36**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 98%

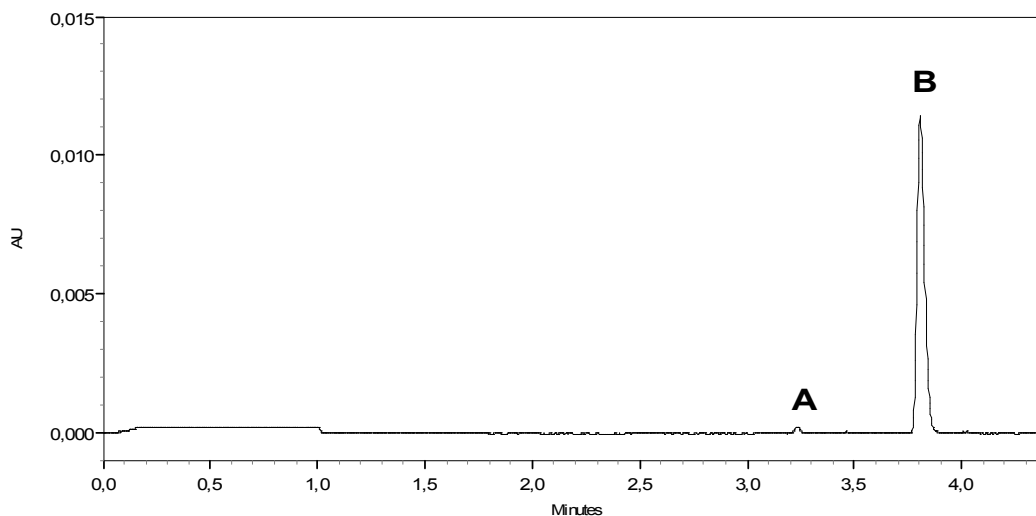


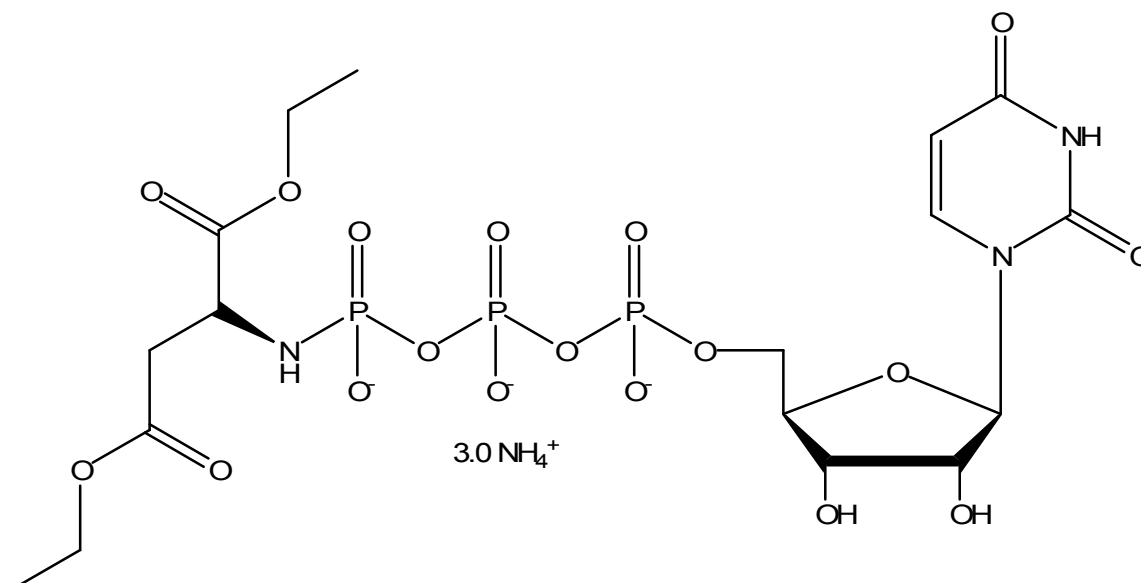
Abbildung 9.54: Elektropherogramm von Verbindung 36, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung 36

9.2.4.23 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -1,3-diethoxy-1,3-dioxopropan-2-ylamid (37)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
S-Asparaginsäurediethylester-HCl: 1.4 mmol (315 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 31%

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 712 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.25 (q, 6H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz und $^3\text{J} = 6.94$ Hz, 2 x CH_3 , Ethylester); 2.87 und 2.94 (2 x m, 2 x 1H, CH_2 , Asp); 4.15 (m, 7H, 2 x CH_2 , Asp, N-CH, Asp, H-5'); 4.29 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 3.80$ Hz und $^3\text{J} = 2.50$ Hz, H-4'); 4.41 (m, 2H, $^3\text{J} = 5.36$ Hz und $^3\text{J} = 5.04$ Hz, H-3' und H-2'); 6.01 (m, 2 x 1H, $^3\text{J} = 5.35$ Hz und $^3\text{J} = 2.55$ Hz, H-1' und H-5); 8.00 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.69$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 16.15 (2 x CH_3 , Ethylester); 41.65 (CH_2 , Asp); 54.41 (N-CH, Asp); 64.86 und 65.41 (2 x CH_2 , Ethylester); 67.74 (C-5'); 72.49 (C-3'); 76.66 (C-2'); 86.20 (C-4'); 91.06 (C-1'); 105.58 (C-5); 144.60 (C-6); 154.73 (C-2); 169.10 (C-4); 176.13 und 177.68 (2 x C=O, Asp).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -4.23 (d, $^3\text{J} = 12.31$ Hz, γ -P); -11,23 (d, $^3\text{J} = 17.22$ Hz, α -P); -22,67 (t, $^3\text{J} = 17.22$ Hz, β -P).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 673.0

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 654.0

Reinheit HPLC: 98%

Reinheit CE: 98%

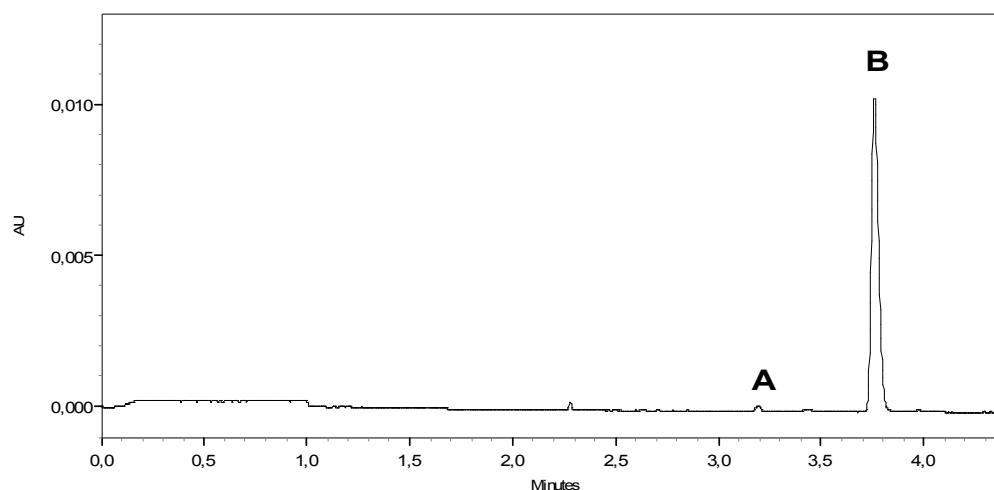


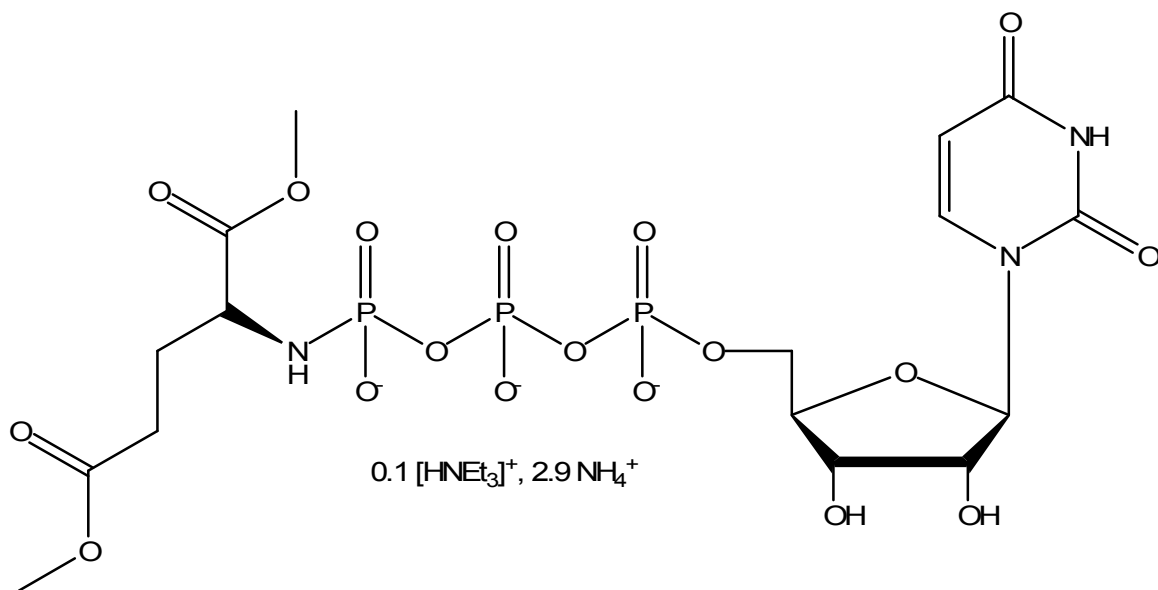
Abbildung 9.55: Elektropherogramm von Verbindung **37**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **37**

9.2.4.24 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -(R)-1,5-dimethoxy-1,5-dioxopentan-2-ylamid (38)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
S-Glutaminsäuredimethylester-HCl: 1.4 mmol (296 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 27%, 38 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 702 g/mol

NMR-Daten:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.17 (t, 1.17H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_3 , Triethylamin); 2.02 (m, 2H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz und $^3\text{J} = 6.99$ Hz, CH_2 , Glu); 2.53 (m, 2H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz und $^3\text{J} = 6.93$ Hz, $\text{O}=\text{C}-\underline{\text{CH}_2}$); 3.21 (q, 2H, $J = 7.25$ Hz, CH_2 , Triethylamin); 3.69 und 3.74 (2 x s, 3H, 2 x CH_3 , Methylester); 3.92 (m, 1H, $^3\text{J} = 6.93$ Hz, $\text{N}-\underline{\text{CH}}$, Glu); 4.25 (m, 2H, $^3\text{J} = 2.21$ Hz, H-5'); 4.29 (m, 1H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz, H-4'); 4.40 (m, 2H, $^3\text{J} = 3.47$ Hz, H-3' und H-2'); 5.99 (m, 2 x 1H, $^3\text{J} = 4.73$ Hz und $^3\text{J} = 6.62$ Hz, H-1' und H-5); 7.99 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-6).

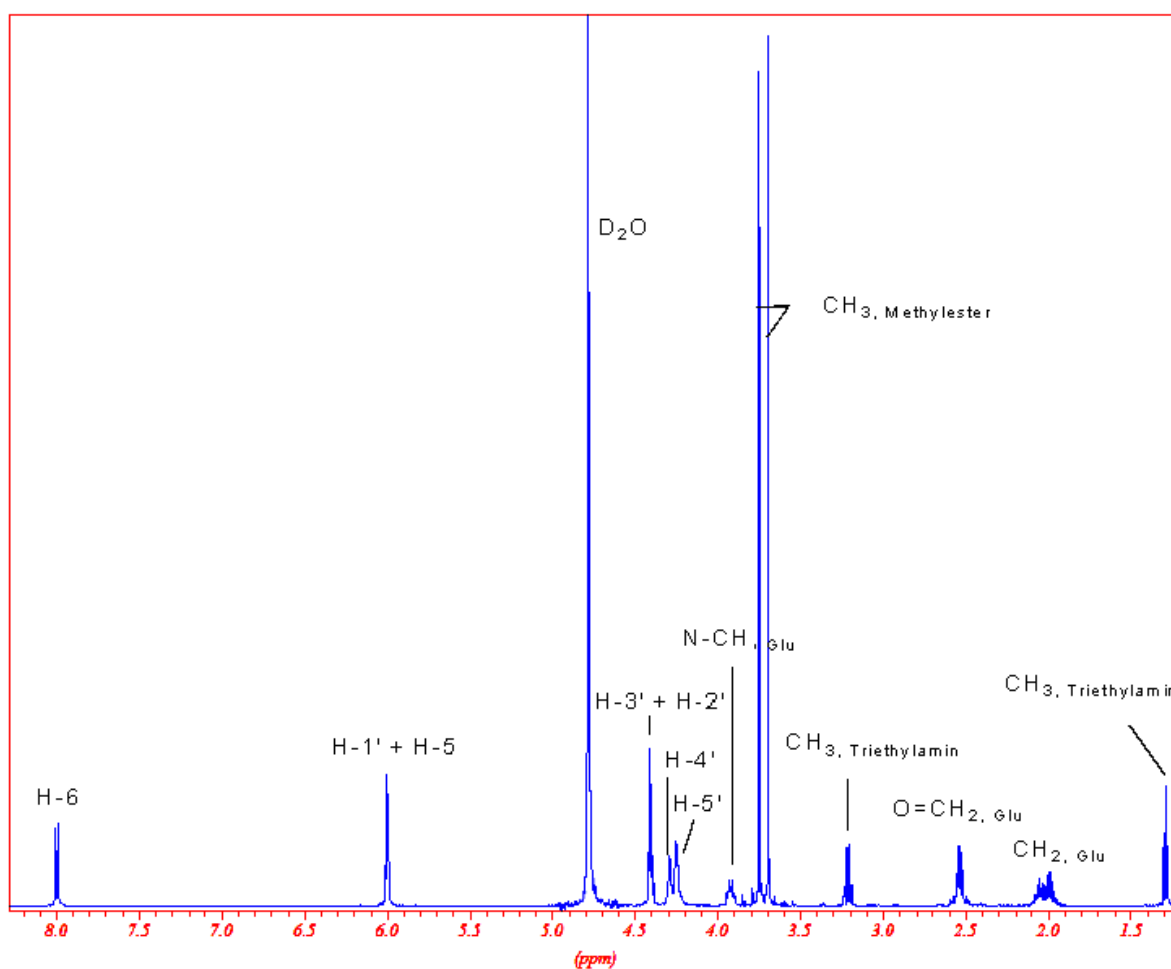


Abbildung 9.56: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 38

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.12 (CH_3 , Triethylamin); 31.58 (CH_2 , Glu), 32.69 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$, Glu); 49.54 (CH_2 , Triethylamin); 55.11 und 55.54 (2 x CH_3 , Methylester); 57.11 ($\text{N}-\underline{\text{CH}}$, Glu); 67.72 ($\text{C}-5'$); 72.48 ($\text{C}-3'$); 76.68 ($\text{C}-2'$); 86.22 ($\text{C}-4'$); 91.15 ($\text{C}-1'$); 105.58 ($\text{C}-5$); 144.61 ($\text{C}-6$); 154.73 ($\text{C}-2$); 169.11 ($\text{C}-4$); 179.18 (2 x $\text{C}=\text{O}$, Glu).

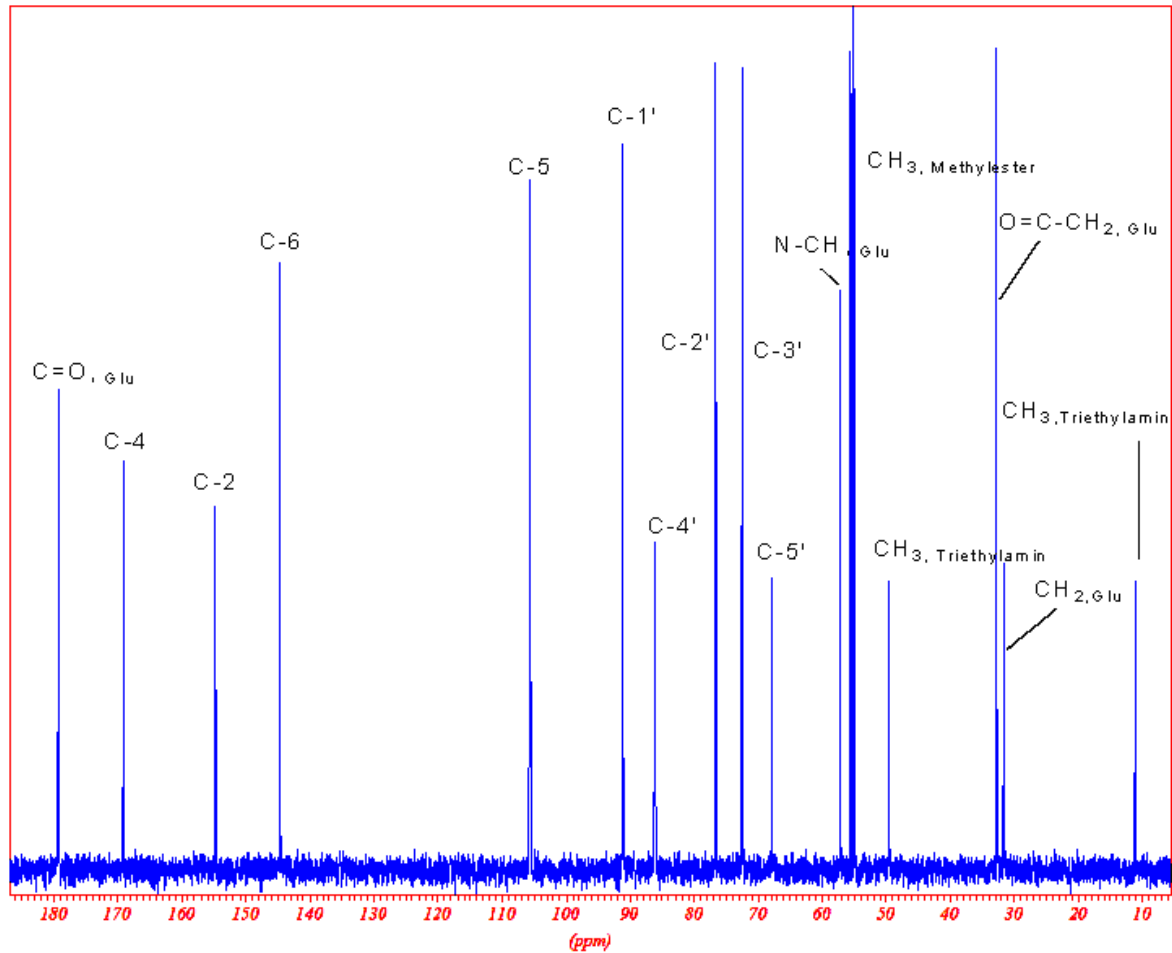


Abbildung 9.57: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **38**

^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O) δ -3.74 (γ -P); -11,12 (α -P); -22,44 (β -P).

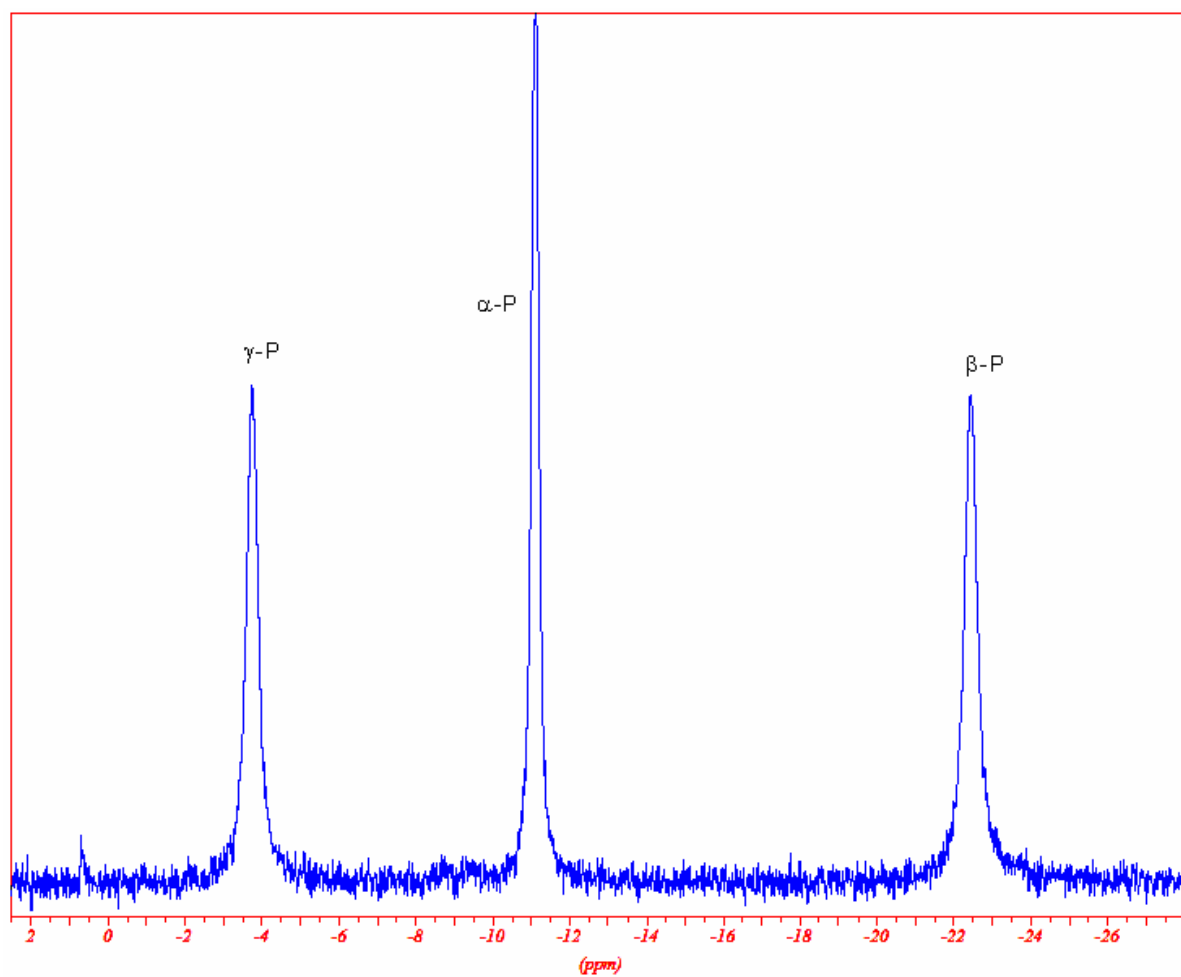


Abbildung 9.58: ^{31}P -NMR- Spektrum von Verbindung **38**

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 642.0

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 539.8

Reinheit HPLC: 97%

Reinheit CE: 96%

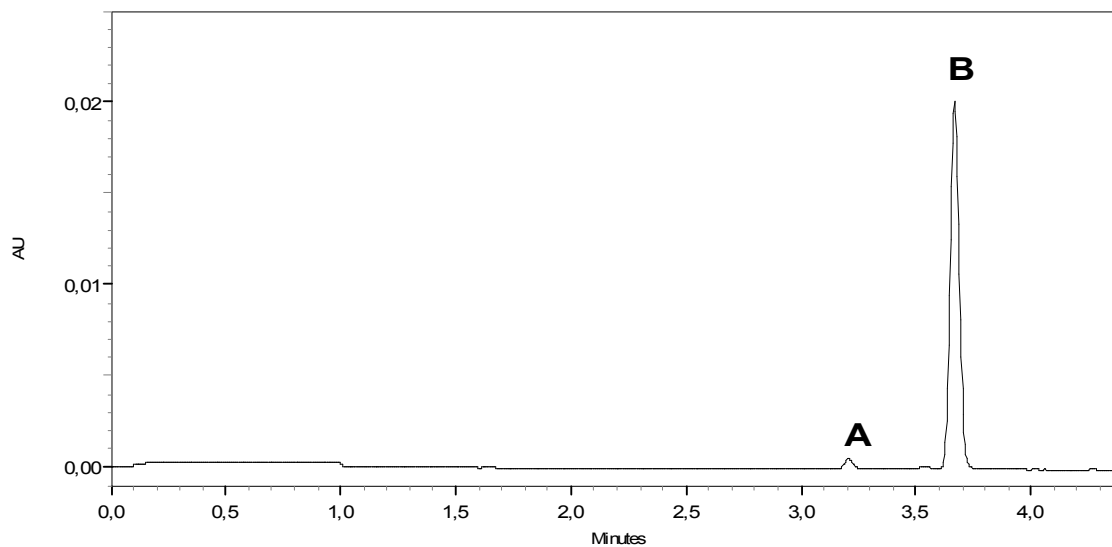
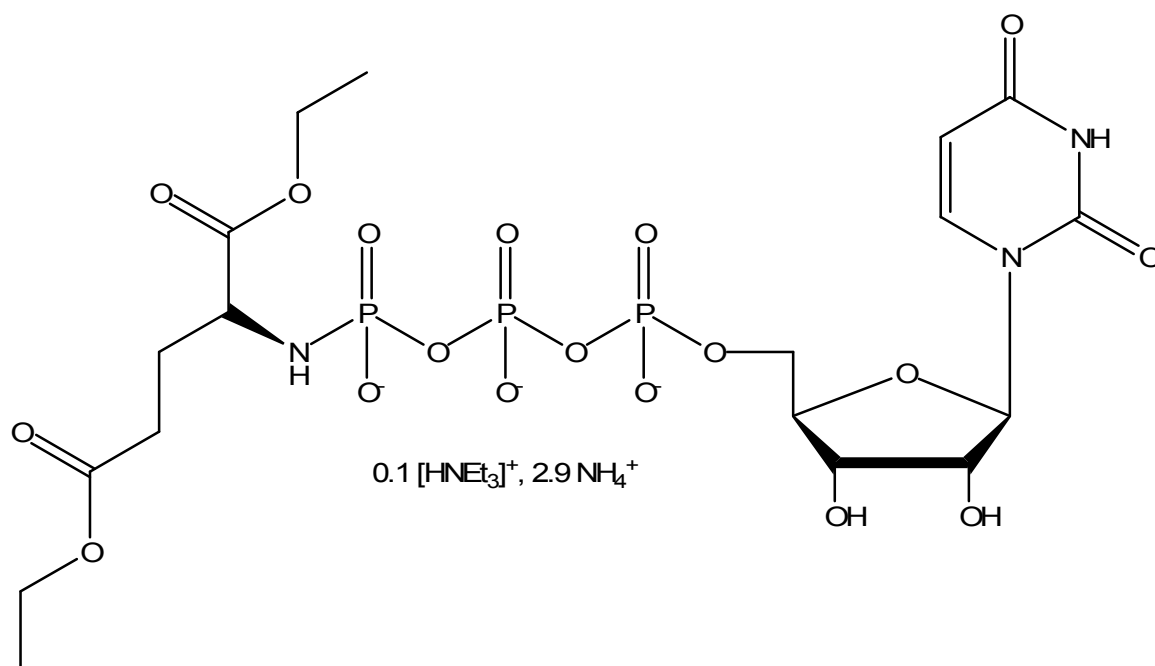


Abbildung 9.59: Elektropherogramm von Verbindung **38**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **38**

9.2.4.25 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -(R)-1,5-diethoxy-1,5-dioxopentan-2-ylamid (39)*

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 S-Glutaminsäurediethylester-HCl: 1.4 mmol (334 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 20%, 29 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 727 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.26 (m, 2 x 3H, ³J = 7,25 Hz und ³J = 6.94 Hz, 2 x CH₃, Ethylester, 0.75H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 1.99 (m, 2H, ³J = 7.57 Hz und ³J = 6.99 Hz, CH₂, Glu); 2.50 (m, 2H, ³J = 7.57 Hz und ³J = 7.63 Hz, O=C-CH₂); 3.20 (q, 0,5H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 3.90 (m, 1H, ³J = 6.63 Hz, N-CH, Glu); 4.17 (m, 2 x 2H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 6.93 Hz, 2 x CH₂, Ethylester, Glu); 4.21 (m, 2H, H-5'); 4.29 (m, 1H, H-4'); 4.41 (m, 2H, ³J = 6.62 Hz, H-3' und H-2'); 6.00 (m, 2 x 1H, ³J = 6.62 Hz und ³J = 6.62 Hz, H-1' und H-5); 8.00 (d, 1H, ³J = 7.69 Hz, H-6).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.09 (CH₃, Triethylamin); 16.01 (2 x CH₃, Ethylester); 31.64 (CH₂, Glu); 32.95 (O=C-CH₂, Glu); 49.54 (CH₂, Triethylamin); 57.19 (N-CH, Glu); 65.15 (2 x CH₂, Ethylester); 67.73 (C-5'); 72.49 (C-3'); 76.67 (C-2'); 86.19 (C-4'); 91.52 (C-1'); 105.58 (C-5); 144.61 (C-6); 154.73 (C-2); 169.09 (C-4); 178.80 (2 x C=O, Glu).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ -3.87 (d, ³J = 12.31 Hz, γ-P); -11,23 (d, ³J = 17.22 Hz; α-P); -22,67 (t, ³J = 19.69 Hz, β-P).

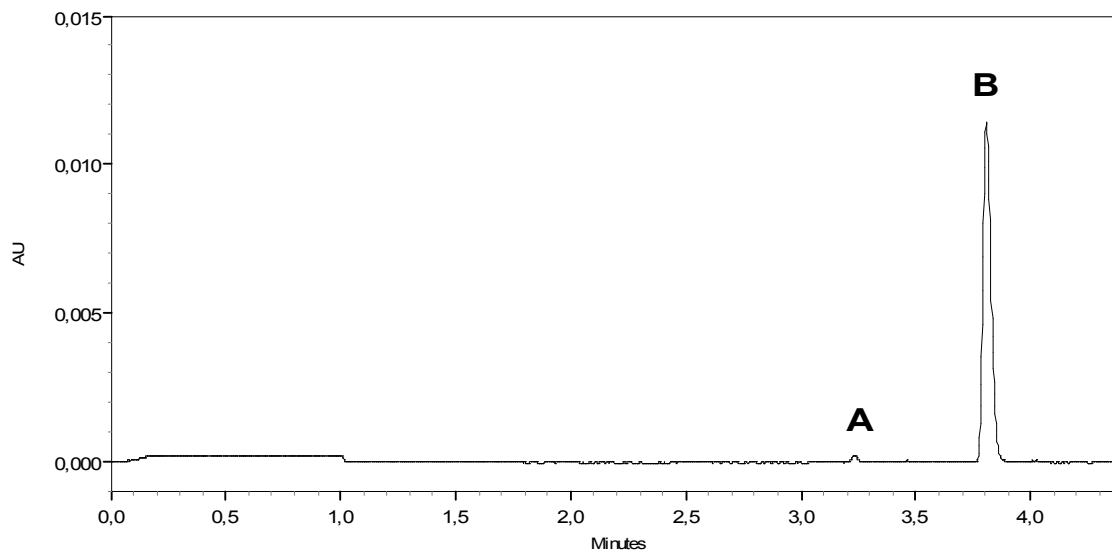
LC/ESI-MS:[M+H]⁺: 670.0[M-H]⁻: 668.5**Reinheit HPLC:** 99%**Reinheit CE:** 99%

Abbildung 9.60: Elektropherogramm von Verbindung **39**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **39**

9.2.4.26 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -2-ethoxy-2-oxoethylamid (**40**)*

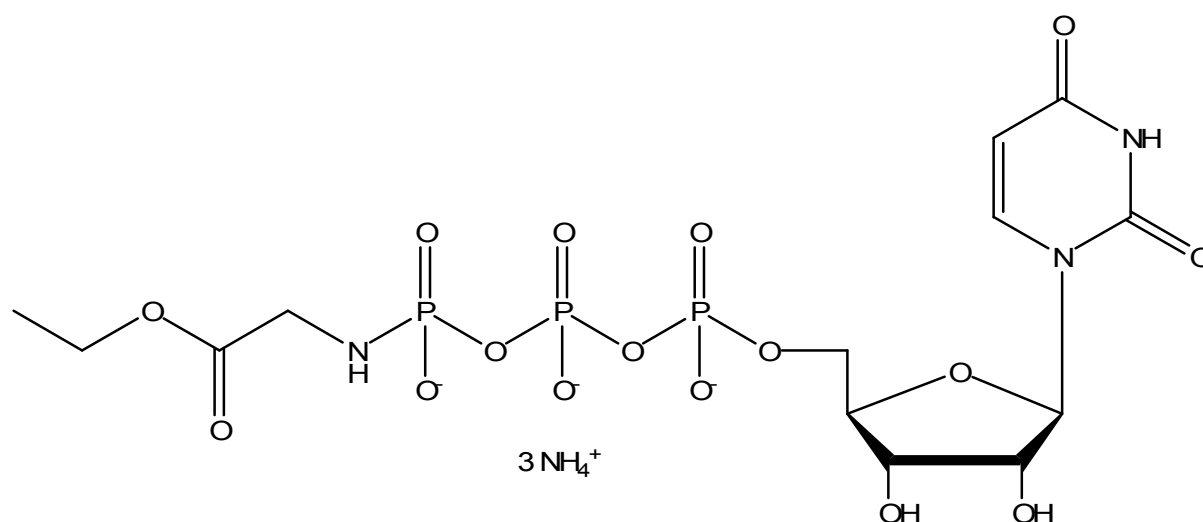
Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)

Glycinsäureethylester-HCl: 1.4 mmol (194 mg)

EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 33%, 41 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 620 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.28 (m, 3H, $^3\text{J} = 7,25$ Hz, CH_3 , Ethylester); 3.74 (d, 2H, $^2\text{J} = 9,75$ Hz, CH_2 , Gly); 4.19 (q, 2H, $^3\text{J} = 7,25$ Hz, CH_2 , Ethylester); 4.25 (m, 2H, $^3\text{J} = 2,52$ Hz, H-5'); 4.29 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 3,46$ Hz und $^3\text{J} = 2,84$ Hz, H-4'); 4.41 (m, 2H, $^3\text{J} = 5,36$ Hz und $^3\text{J} = 3,46$ Hz, H-2' und H-3'); 5.99 (2 x 1H, $^3\text{J} = 5,04$ Hz, H-1' und $^3\text{J} = 8,19$ Hz, H-5); 7.98 (d, 1H, $^3\text{J} = 8,20$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 16.16 (CH_3 , Ethylester); 46.53 (CH_2 , Gly); 64.96 (CH_2 , Ethylester); 67.77 (C-5'); 72.49 (C-3'); 76.64 (C-2'); 86.17 (C-4'); 91.08 (C-1'); 105.57 (C-5); 144.55 (C-6); 154.71 (C-2); 169.09 (C-4); 177.15 (C=O, Gly).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -2.67 (d, $^3\text{J} = 17,23$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11,26 (d, $^3\text{J} = 19,68$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22,57 (t, $^3\text{J} = 17,23$ Hz und $^3\text{J} = 19,68$ Hz, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 587.3

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 668.2

Reinheit HPLC: 98%

Reinheit CE: 97%

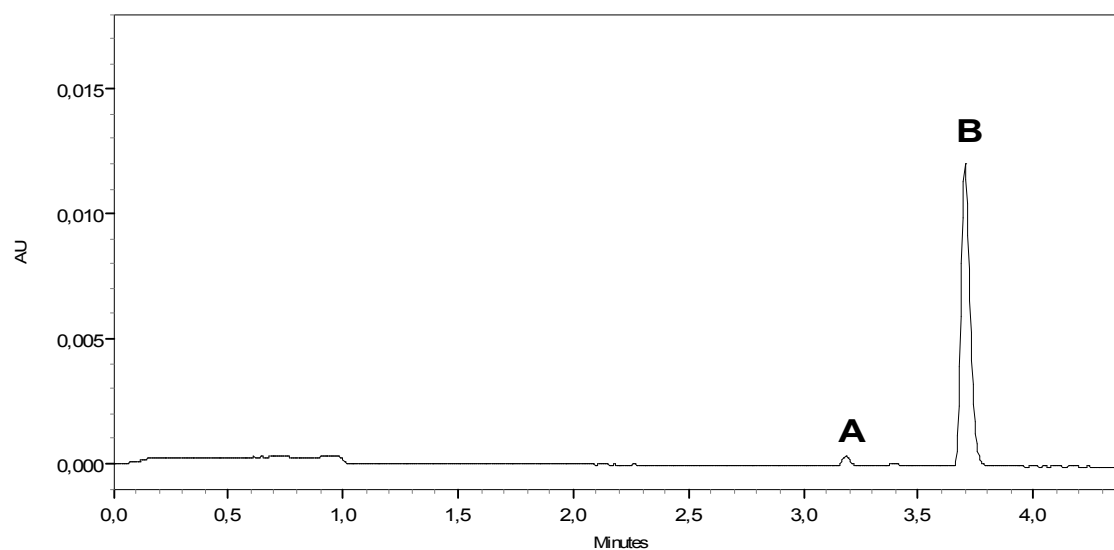
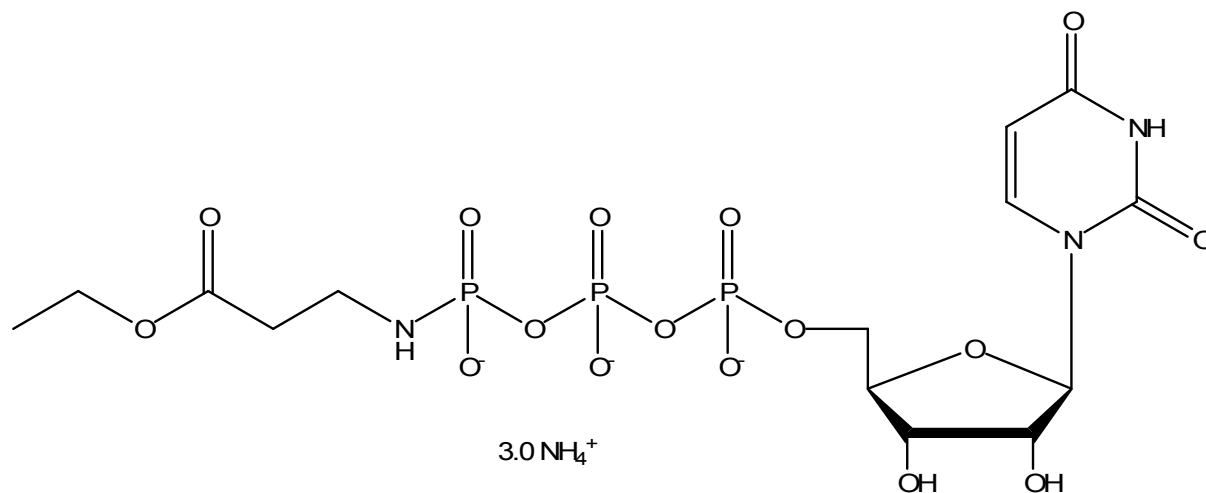


Abbildung 9.61: Elektropherogramm von Verbindung **40**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **40**

9.2.4.27 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-ethoxy-3-oxopropylamid (41)*

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 β -Alaninethylester-HCl: 1,4 mmol (214 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 40%, 50,7 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 634 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.3 (t, 3H, $^3\text{J} = 7,25$ Hz, CH_3 , Ethylester); 2.59 (t, 2H, $^3\text{J} = 6,93$ Hz, N- CH_2 , β - Alanin); 3.19 (m, 2H, $^3\text{J} = 6,93$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C=O}$, β -Alanin); 4.18 (q, 2H, $^3\text{J} = 7,25$ Hz, CH_2 , Ethylester); 4.26 (m, 2H, $^3\text{J} = 2,52$ Hz, H-5'); 4.29 (m, 1H, $^3\text{J} = 3,78$ Hz und $^3\text{J} = 2,53$ Hz, H-4'); 4.41 (m, 2H, $^3\text{J} = 5,04$ Hz und $^3\text{J} = 4,1$ Hz, H-3' und H-2'); 5.99 (m, 2 x 1H, $^3\text{J} = 4,73$ Hz, H-1' und $^3\text{J} = 8,19$ Hz, H-5); 7.99 (d, 1H, $^3\text{J} = 8,2$ Hz, H-6).

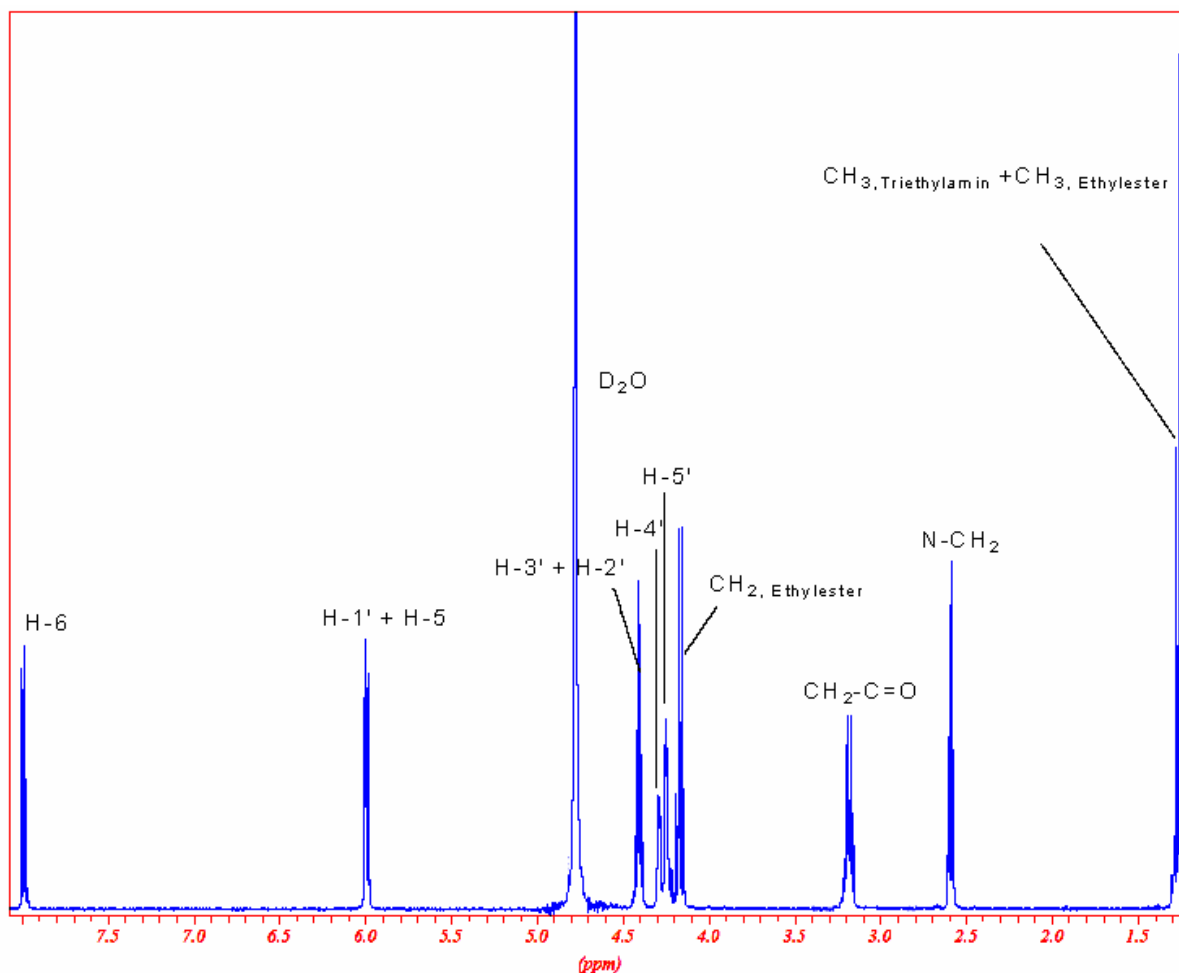


Abbildung 9.62: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **41**

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 16.94 (CH_3 , Ethylester); 39.31 (N- CH_2); 40.26 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$); 64.52 (CH_2 , Ethylester); 67.77 (C-5'); 72.50 (C-3'); 76.65 (C-2'); 86.19 (C-4'); 91.08 (C-1'); 105.56 (C-5); 144.58 (C-6); 154.73 (C-2); 169.10 (C-4); 177.97 (C=O, Ethylester).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -1.44 (d, $^3\text{J} = 19,69$ Hz, γ -P); -11.15 (d, $^3\text{J} = 19,69$ Hz, α -P); -22.55 (t, $^3\text{J} = 19,69$ Hz, β -P).

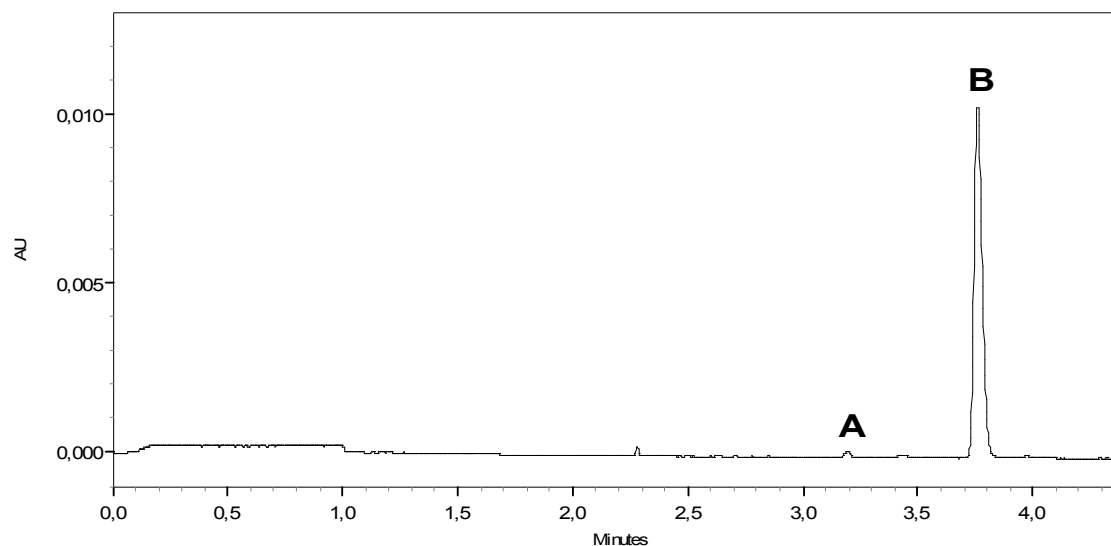
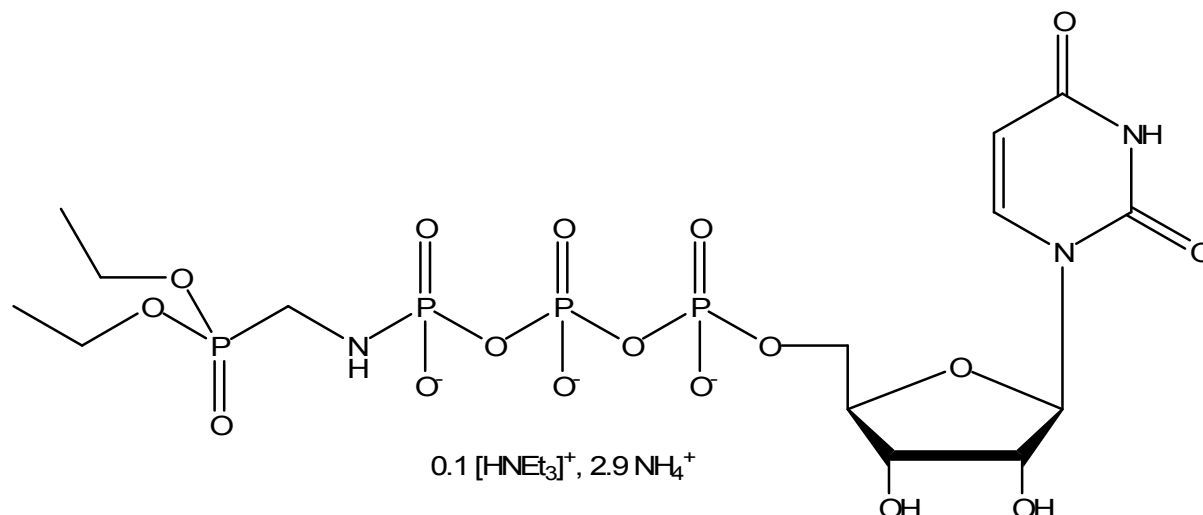
LC/ESI-MS:[M+H]⁺: 584.3[M-H]⁻: 582.3**Reinheit HPLC:** 98%**Reinheit CE:** 99%

Abbildung 9.63: Elektropherogramm von Verbindung **41**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **41**

9.2.4.28 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -(diethoxyphosphoryl)methylamid (**43**)*

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 Diethyl(2-aminomethyl)phosphonat-HCl: 1.4 mmol (285 mg)
 EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 25%, 34.4 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 688 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.28 (t, 0.45H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 1.36 (m, 6H, ³J = 6.90 Hz, 2 x CH₃, Ethylester); 3.21 (q, 0.3H, ³J = 7.5 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.44 (AB-System mit A d und B d, 2H, ²J_{HP} = 8.2 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 4.21 (m, 4H, ³J = 7.5 Hz, CH₂, Ethylester); 4.25 (m, 2H, ³J = 5.65 Hz, H-5'); 4.28 (m, 1H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 5.45 Hz, H-4'); .4.40 (m, 2H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 4.75 Hz, H-3' und H-2'); 5.99 (2 x 1H, ³J = 4.10 Hz und ³J = 6.30 Hz, H-1' und H-5); 8.98 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 18.56 (2 x CH₃, Ethylester); 35.76 (CH₂, CH₂-P, Methylphosphonat); 49.53 (CH₂, Triethylamin); 66.92 (2 x CH₂, Ethylphosphonat); 66.98 (C-5'), 72.51 (C-3'); 76.66 (C-2'); 86.19 (C-4'); 91.06 (C-1'); 105.60 (C-5); 144.55 (C-6); 154.71 (C-2); 169.08 (C-4).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 28.40 (C-P); -2,54 (d, ³J = 19.69 Hz, γ-P); -11,14 (d, ³J = 19.69 Hz, α-P); -22,54 (t, ³J = 19.69 Hz, β-P).

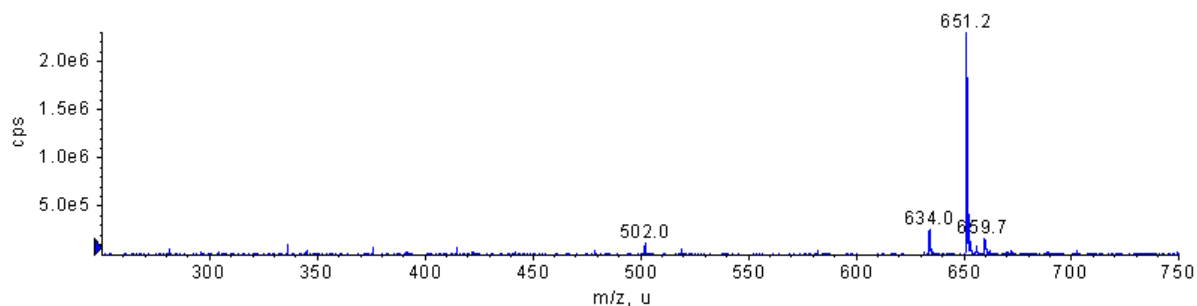
LC/ESI-MS:[M+NH₄]⁺: 651.2

Abbildung 9.64: Massenspektrum von Verbindung **43** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

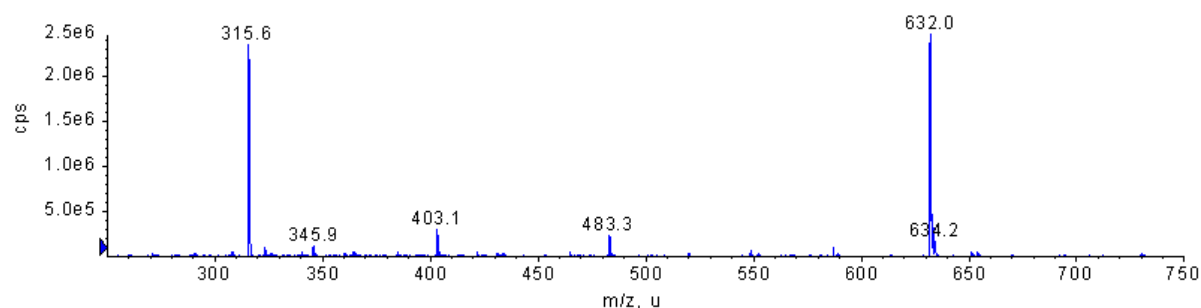
[M-H]⁻: 632.0

Abbildung 9.65: Massenspektrum von Verbindung **43** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

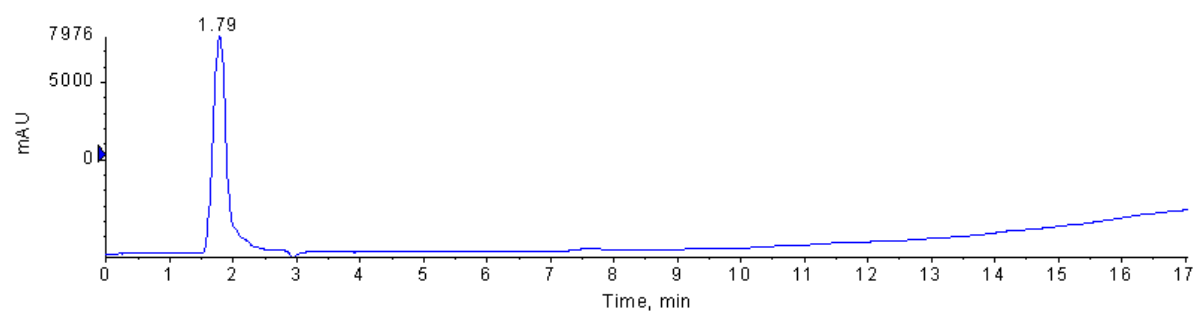
Reinheit HPLC: 99%

Abbildung 9.66: Chromatogramm von Verbindung **43**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 98%

9.2.4.29 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-(3-dimethylaminopropyl)-1-ethylureidylamid bzw α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-ethyl-1-(3-dimethylaminopropyl)ureidylamid (47a, 47b)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)

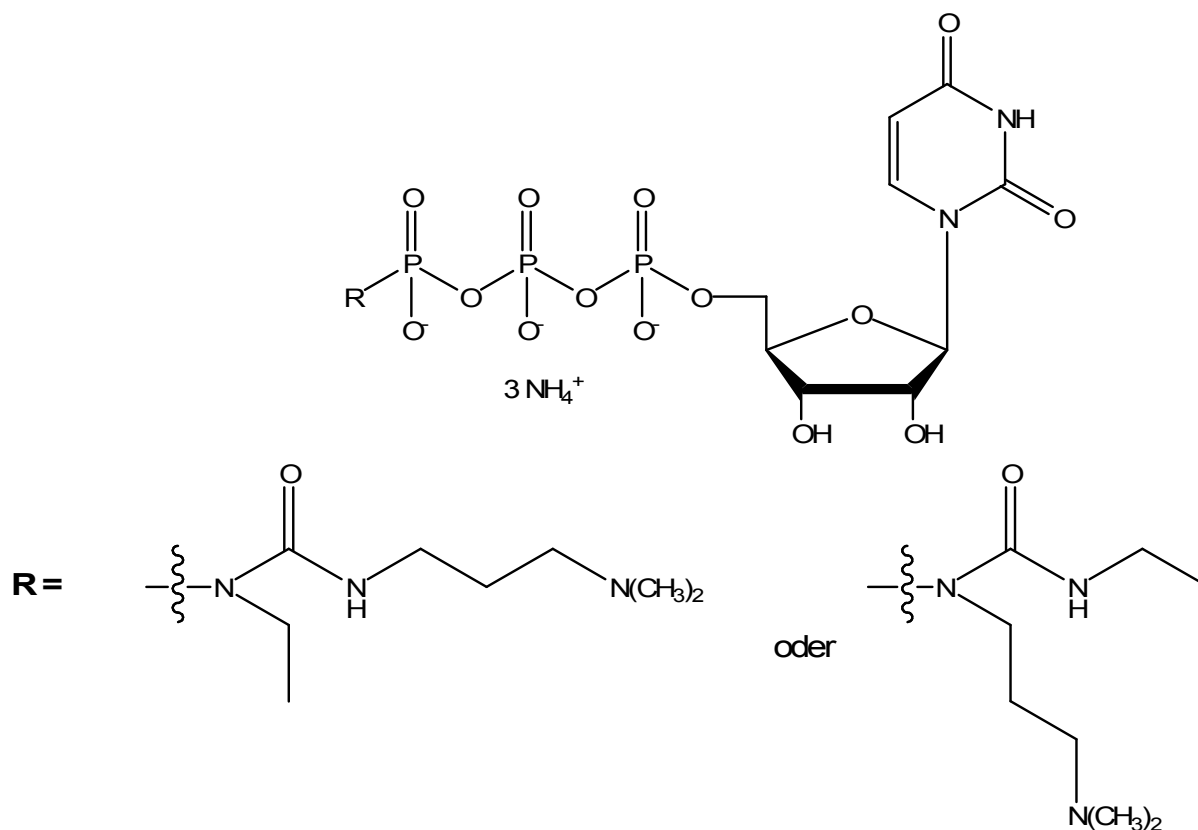
Cyclohexylamin: 1.4 mmol (139 mg)

EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 18%, 25 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 690 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.34 (t, 3H, CH_3 , Ethylamin); 2.17 (m, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$); 2.90 (s, 6H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$); 3.18 (m, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$

$\underline{\text{CH}_2\text{-N(CH}_3)_2}$; 3.52 (m, 4H, $-\underline{\text{CH}_2\text{-NH-CO-NH-CH}_2-}$); 4.33 (m, 5H, H-5', H-4', H-3', H-2'); 6.09 (m, 2H, H-5, H-1'); 8.15 (s, 1H, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 16.54 (CH_3 , Ethylamin); 25.08 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$); 41.36 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$); 45.63 (2 x CH_3), 49.58 (CH_2 , Ethylamin); 57.56 (2 x CH_2 , $-\underline{\text{CH}_2\text{-NH-CO-NH-CH}_2-}$); 67.70 (C-5'); 72.76 (C-3'); 76.88 (C-2'); 86.67 (C-4'); 92.17: (C-1'); 104.84 (C-5); 145.62 (C-6); 152.14 (C-2); 159.09 (C=O, Harnstoff); 169.02 (C-4).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -10.34 (d, $^3\text{J} = 19.69$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11.23 (d, $^3\text{J} = 17.23$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22.96, (m, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 640.0

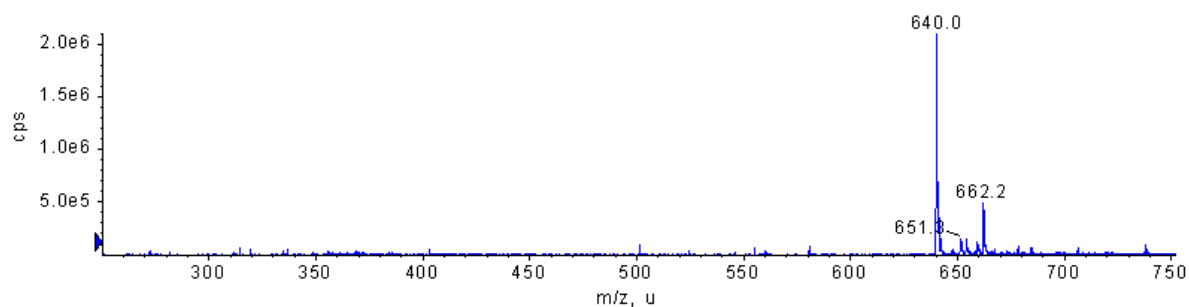


Abbildung 9.67: Massenspektrum von Verbindung (**47a**, **47b**) im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

$[\text{M-H}]^-$: 638.2

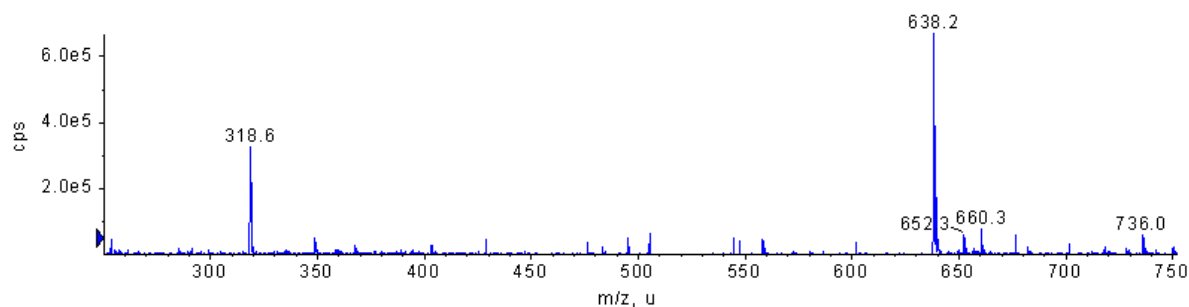


Abbildung 9.68: Massenspektrum von Verbindung (**47a**, **47b**) im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 100%

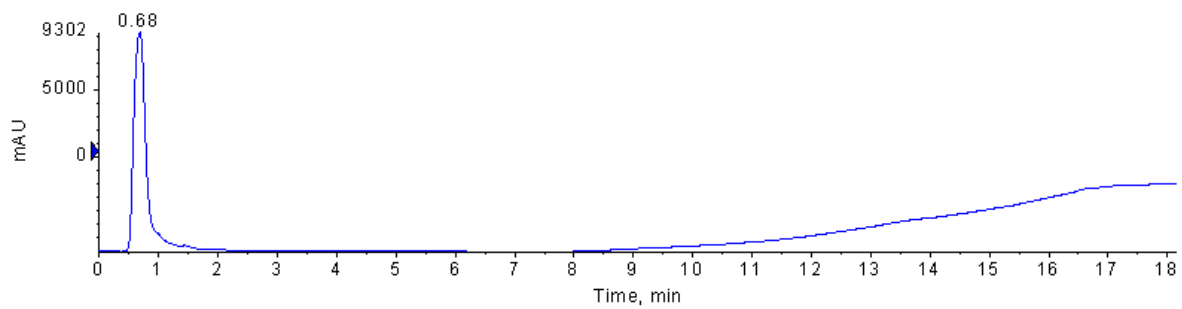
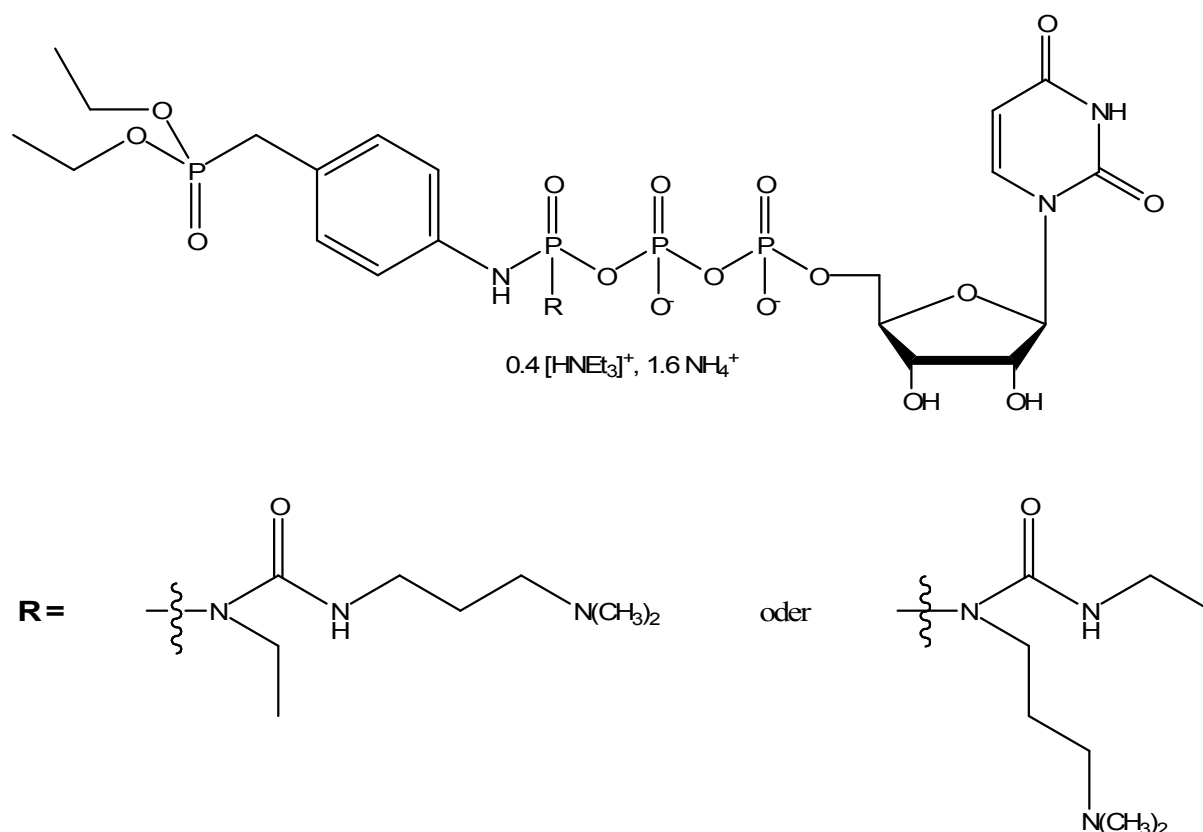


Abbildung 9.69: Chromatogramm von Verbindung (47a, 47b), AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

9.2.4.30 *Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-(3-dimethylaminopropyl)-1-ethylureidyl- γ -4-diethylphosphonomethylphenylamid bzw. α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -3-ethyl-1-(3-dimethylaminopropyl)ureidyl- γ -4-diethylphosphonomethyl-phenylamid (50a, 50b)*

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
Diethyl(4-aminobenzyl)phosphonat-HCl: 1.4 mmol (340 mg)
EDC: zweimal 1.5 mmol (zweimal 288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
Präparative HPLC: Methode E

Struktur:**Ausbeute:** 10%, 18.41 mg**Aussehen:** Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)**Leicht löslich in:** Wasser**Schwer löslich in:** Ethanol, Diethylether, Dichlormethan**Berechnete Molekülmasse des Salzes:** 920 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.28 (6H, 2 x CH₃, Ethylester, 3H, 1 x CH₃, Ethylamin, 4H, CH₃, Triethylamin); 2.05 (m, HN-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂); 2.88 (m, 8H, NH-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂); 3.23 (m, 6.6H, 2 x CH₂, H₂C-N-CO-N-CH₂, CH₂, Triethylamin); 4.10 (q, 4H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Ethylester); 4.21 (m, 2H, H-5'); 4.44 (m, 3H, H-4' und H-3' und H-2'); 5.96 (m, 2H, H-5 und H-1'); 7.08 (d, 2H, ³J = 7.6 Hz, H-2 und H-6, Benzylphosphonat); 7.20 (d, 2H, ³J = 6.0, H-3 und H-5, Benzylphosphonat); 8.12 (d, 1H, ³J = 7.69, H-6, Uracil).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.09 (CH₃, Ethylamin, CH₃, Triethylamin); 18.40 (CH₃, Ethylester); 33.16 (NH-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂); 34.24 (CH₂, Benzyl-phosphonat); 45.61 (NH-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂); 49.53 (CH₂, Ethylamin, CH₂, Triethylamin); 57.56 (NH-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂); 66.60 (CH₂, Ethylester); 67.02 (C-5'); 72.62 (C-3'); 76.62 (C-2'); 86.75 (C-4'); 92.04 (C-1'); 104.87 (C-5, Uracil); 120.60 (C-2 und C-6,

Benzylphosphonat); 124.69 (C-4, Benzylphosphonat); 133.25 (C-1, Benzylphosphonat); 133.30 (C-3 und C-5, Benzylphosphonat); 144.06 (C-6, Uracil); 152.11 (C-2, Uracil); 164.72 (C-4, Uracil); 168.46 (C=O, Harnstoff).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ 31.06 (C-P); -10.16 (d, $^3J = 17.25$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11.31 (d, $^3J = 19.69$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -23.06 (t, $^3J = 17.23$ Hz und $^3J = 19.68$ Hz, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 865,0

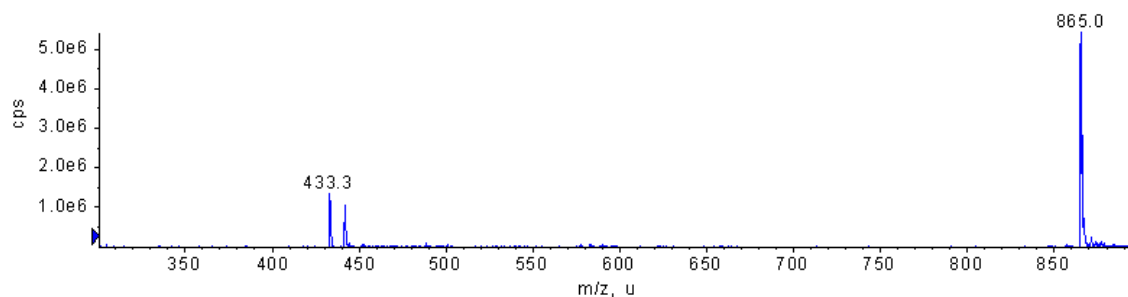


Abbildung 9.70: Massenspektrum von Verbindung (50a, 50b) im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 863,2

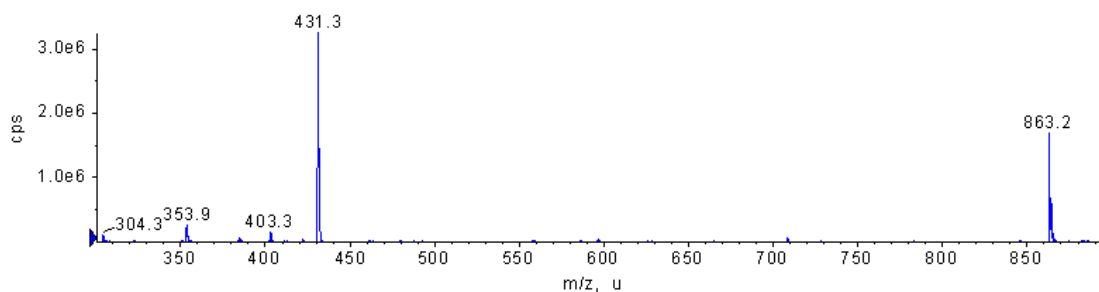


Abbildung 9.71: Massenspektrum von Verbindung (50a, 50b) im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 99%

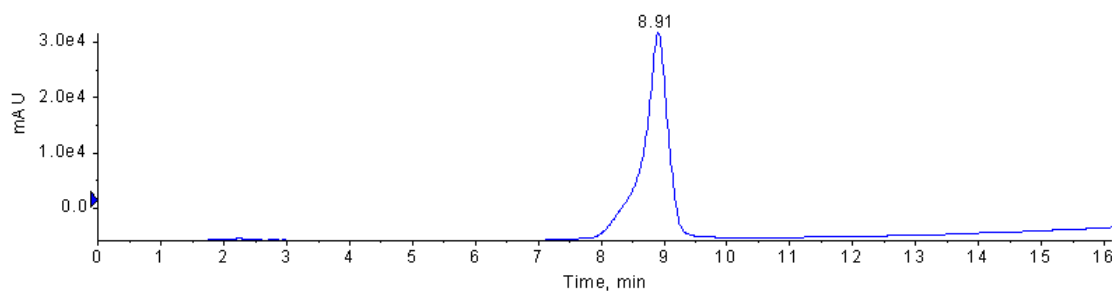


Abbildung 9.72: Chromatogramm von Verbindung (50a, 50b), AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

9.2.5 Allgemeine Versuchsvorschrift für die Darstellung der γ -Amido-UTP-Derivate mit Anilin- bzw. Benzylamin-Substituion

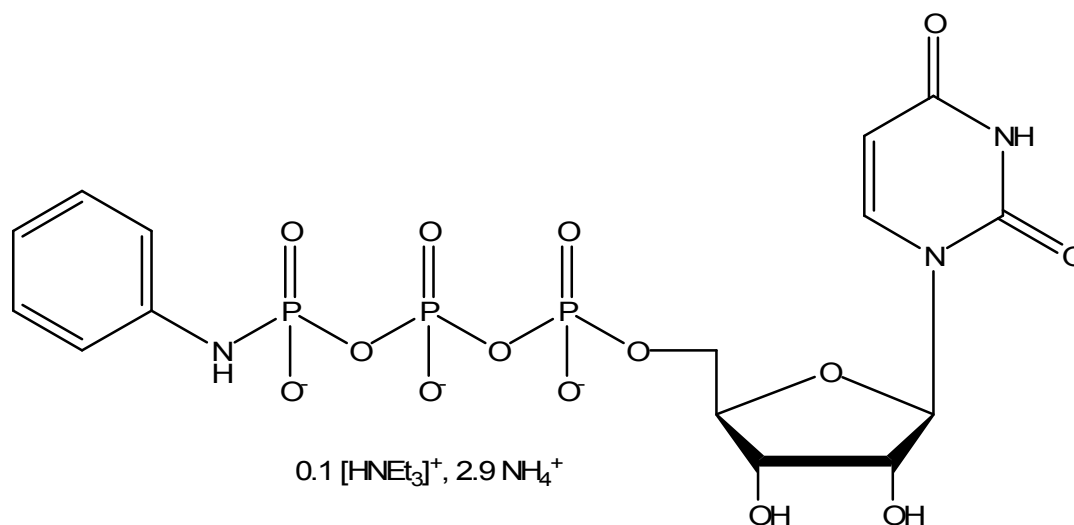
Das Trinatrium-Salz von UTP wurde in 1 ml wässrigem 1-Methylimidazol-Puffer (0,25 M, pH 8,5) gelöst. Dazu wurden EDC (288 mg, 1.5 mmol), gelöst in 1 ml 1-Methylimidazol-Puffer, und HOBT (0,45 mmol), gelöst in 100 μ l DMF, gegeben. Nach einer Minute wurde die Aminkomponente (1,4 mmol), gelöst in 1 ml DMF, zugefügt und der Reaktionsansatz für 32 h gerührt. Die Lösung wurde mit 50 ml deionisiertem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Um das Produkt rein zu isolieren, wurde der, bei der Gefriertrocknung erhaltene Rückstand per Ionenaustauschchromatographie gereinigt und mit RP-HPLC entsalzt. Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert. Für die Reaktionskontrolle wurde die Kapillarelektrophorese verwendet.

9.2.5.1 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -phenylamid (51)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 HOBT: 0.45 mmol (60.5 mg)
 Anilin: 1.4 mmol (130 mg)
 EDC: 1.5 mmol (288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 23%, 28.42 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 618 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.25 (t, 1.3H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_3 , Triethylamin); 3.18 (q, 0.86H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_2 , Triethylamin); 4.11 (m, 5H, H-5', H-4', H-3', H-2'); 5.81 (m, 2H, H-5, Uracil, H-1'); 6.86 (m, 1H, H-4, Aromat); 7.02 (m, 2H, H-2 und H-6, Aromat); 7.21 (m, 2 H, H-3 und H-5, Aromat); 7.86 (d, 1H, H-6, Uracil).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.08 (CH_3 , Triethylamin); 49.52 (CH_2 , Triethylamin); 67.33 (C-5'); 72.02 (C-3'); 76.78 (C-2'); 85.95 (C-4'); 91.23 (C-1'); 105.41 (C-5, Uracil); 120.19 (C-2 und C-6, Aromat); 123.03 (C-4, Aromat); 131.99 (C-3 und C-5, Aromat); 144.23 (C-6, Uracil); 154.50 (C-2, Uracil); 169.13 (C-4, Uracil).

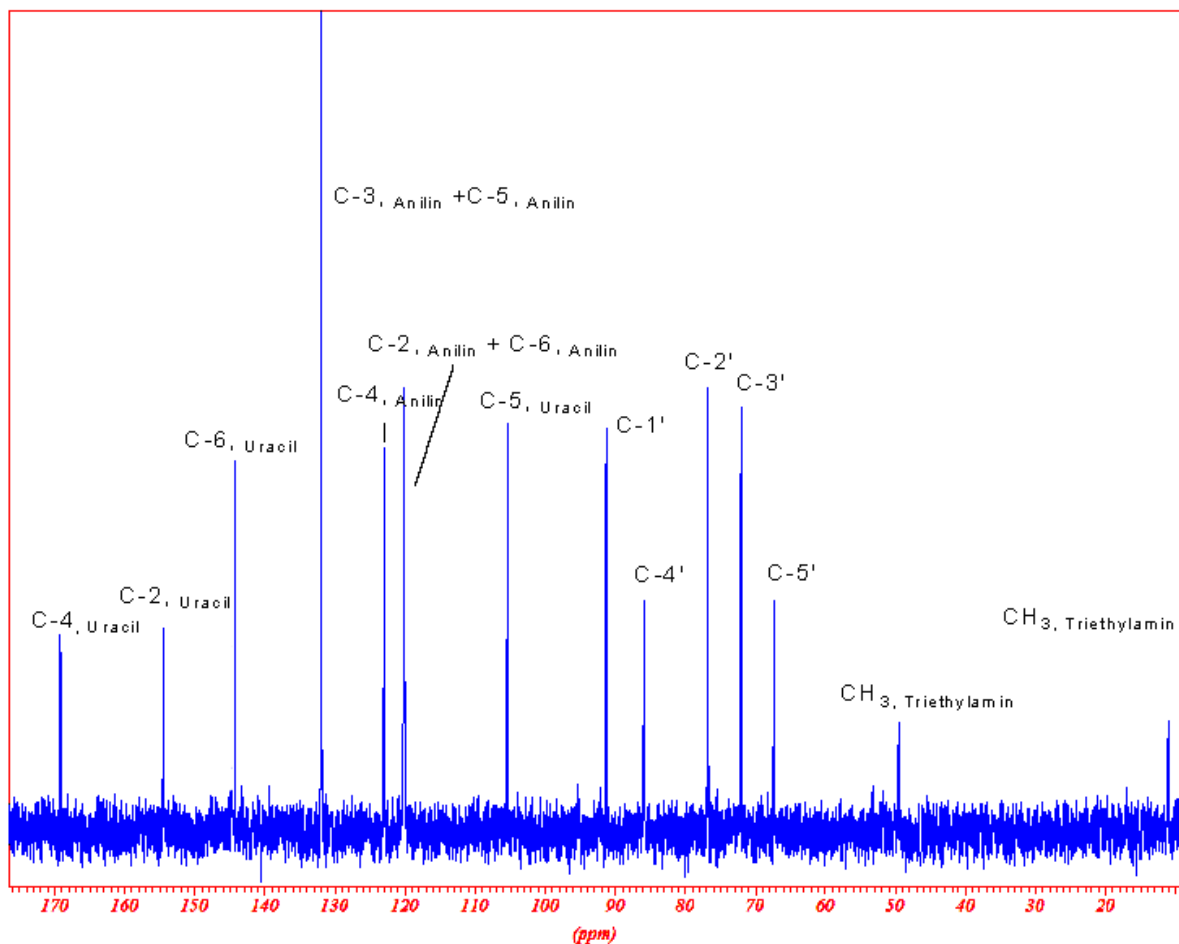


Abbildung 9.73: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 51

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -9.86 (d, $^3J = 19.44$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11.17 (d, $^3J = 17.02$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22.89 (t, $^3J = 19.44$ Hz und $^3J = 19.44$ Hz, $\beta\text{-P}$).

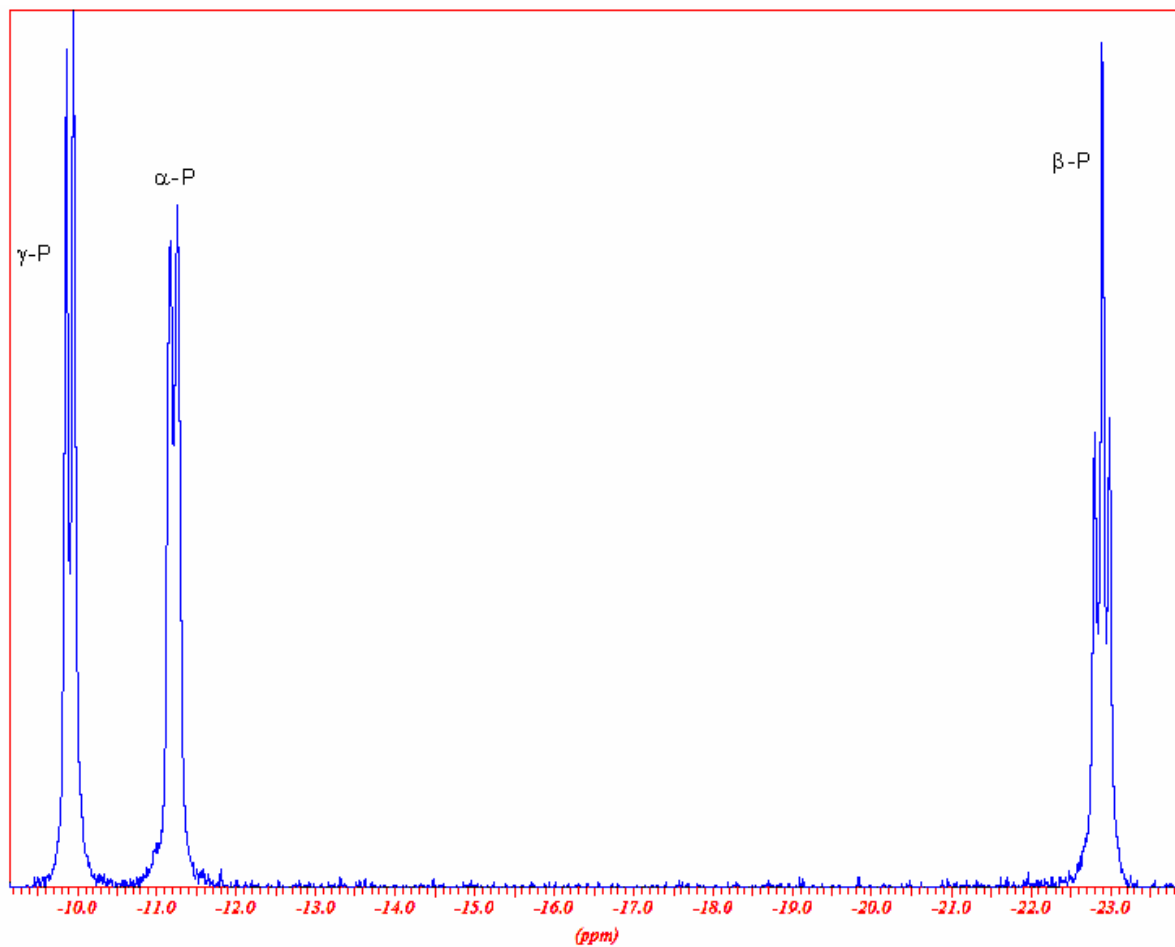


Abbildung 9.74: $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **51**

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 559.8; $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 576.8

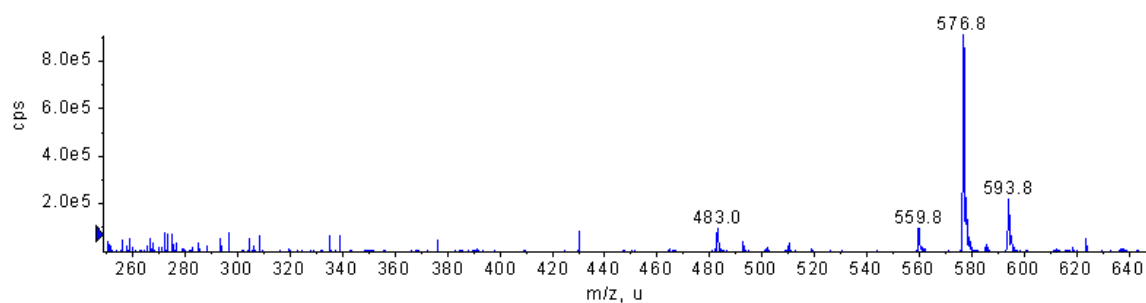


Abbildung 9.75: Massenspektrum von Verbindung **51** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

[M-H]⁻: 557,8

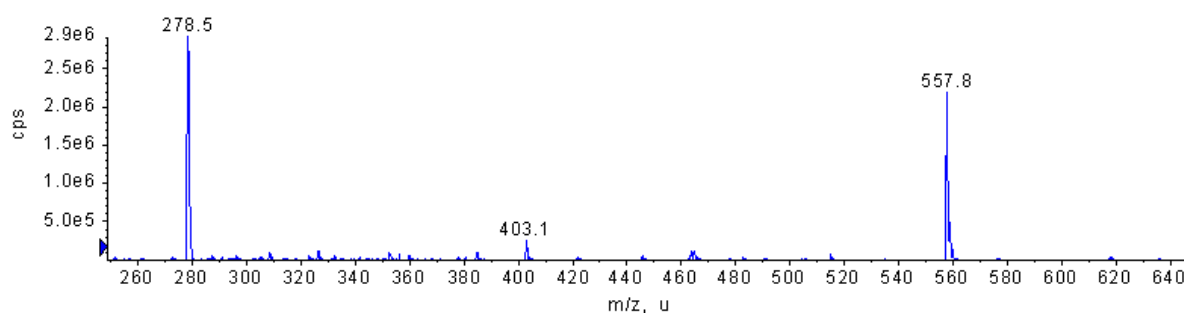


Abbildung 9.76: Massenspektrum von Verbindung **51** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 100%

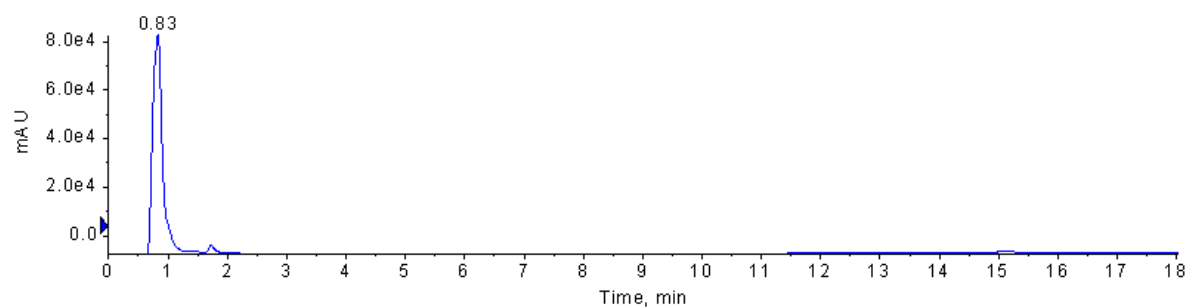


Abbildung 9.77: Chromatogramm von Verbindung **51**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 100%

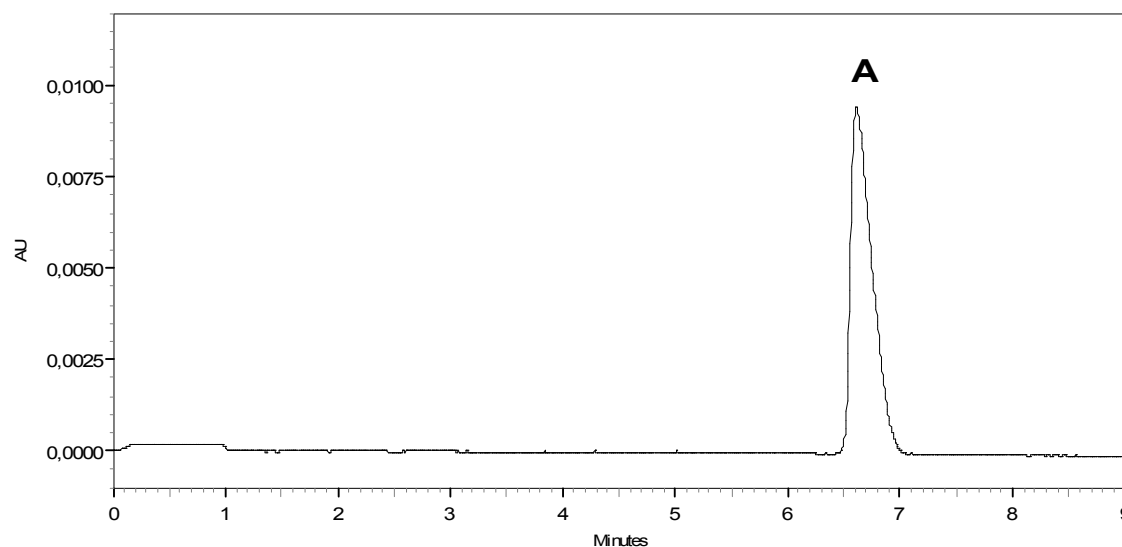


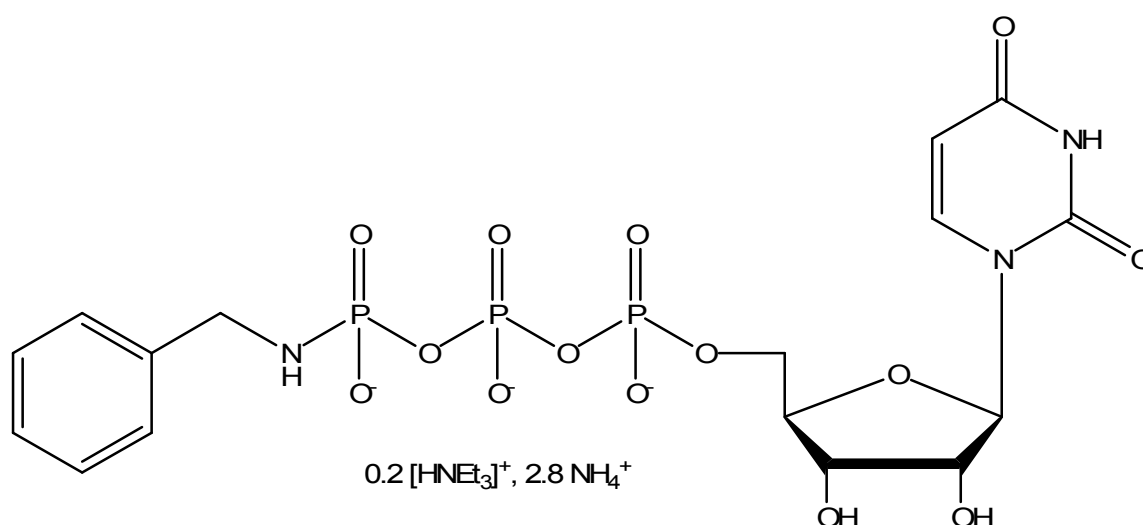
Abbildung 9.78: Elektropherogramm von Verbindung **51**, AU = Absorption Units, A = Verbindung **51**

9.2.5.2 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -benzylamid (52)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 HOBT: 0.45 mmol (60,5 mg)
 Benzylamin: 1.4 mmol (150 mg)
 EDC: 1.5 mmol (288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 12%, 15.28 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 637 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.28 (t, 3H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.20 (q, 0,9H, ³J = 7.26 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.08 (d, 2H, ²J = 8.2 Hz, CH₂, Benzyl); 4.24 (m, 2H, ³J = 2.52 Hz, H-5'); 4.29 (m, 2H, ³J = 5.04 Hz und ³J = 2.53 Hz, H-4' und H-3'); 4.35 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.73 Hz und ³J = 5.04 Hz, H-2'); 5.89 (m, 2 x 1H, ³J = 2.85 Hz und ³J = 3.15 Hz, H-1' und H-5, Uracil); 7.29 (m, 1H, ³J = 2.25 Hz und ³J = 1.90 Hz, H-4, Aromat); 7.38 (m, 4H, H-2,H-6, H-3, H-5, Aromat); 7.91 (d, 1H, ³J = 7.85 Hz, H-6, Uracil).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.10 (CH_3 , Triethylamin); 48.23 (CH_2 , Benzyl); 49.54 (CH_2 , Triethylamin); 67,65 (C-5'); 72.29 (C-3'); 76.65 (C-2'); 85.96 (C-4'); 91.17 (C-1'); 105.51(C-5, Uracil); 129.85 (C-4, Aromat); 130.23 (C-2 und C-6, Aromat); 131.36: (C-3 und C-5, Aromat); 143.71 (C-6, Uracil); 144.26 (C-1, Aromat); 154.48 (C-2, Uracil); 168.94 (C-4, Uracil).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -1.28 (d, $^3J = 19.69$ Hz, $\gamma\text{-P}$); -11.12 (d, $^3J = 17.23$ Hz, $\alpha\text{-P}$); -22.44, (t, $^3J = 19.69$ Hz, $\beta\text{-P}$).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 573.8

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 571.8

Reinheit HPLC: 99%

Reinheit CE: 99%

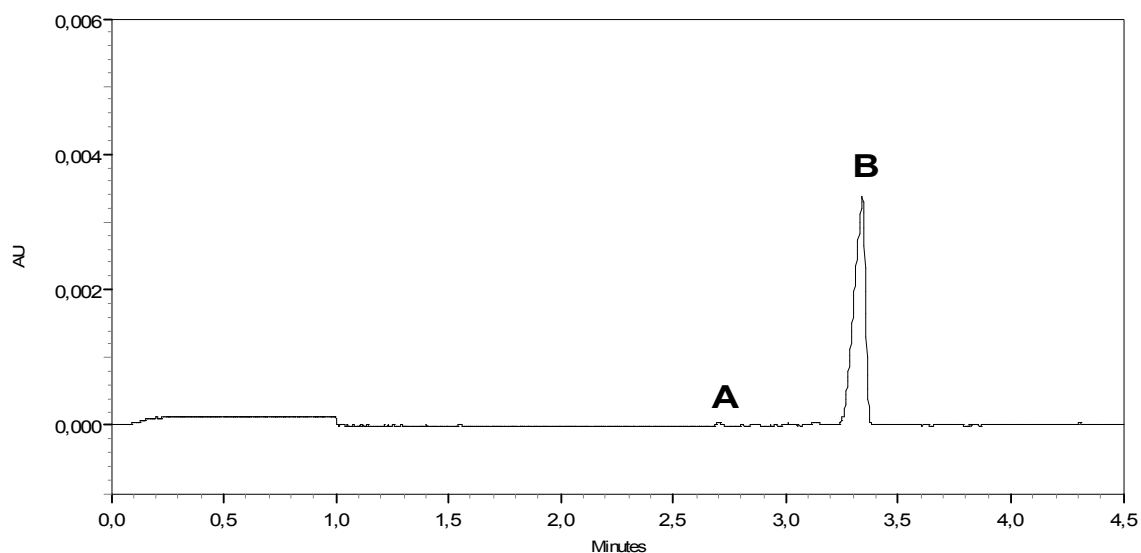


Abbildung 9.79: Elektropherogramm von Verbindung **52**, AU = Absorption Units, A = UTP, B = Verbindung **52**

9.2.5.3 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -4-sulfophenylamid (**56**)

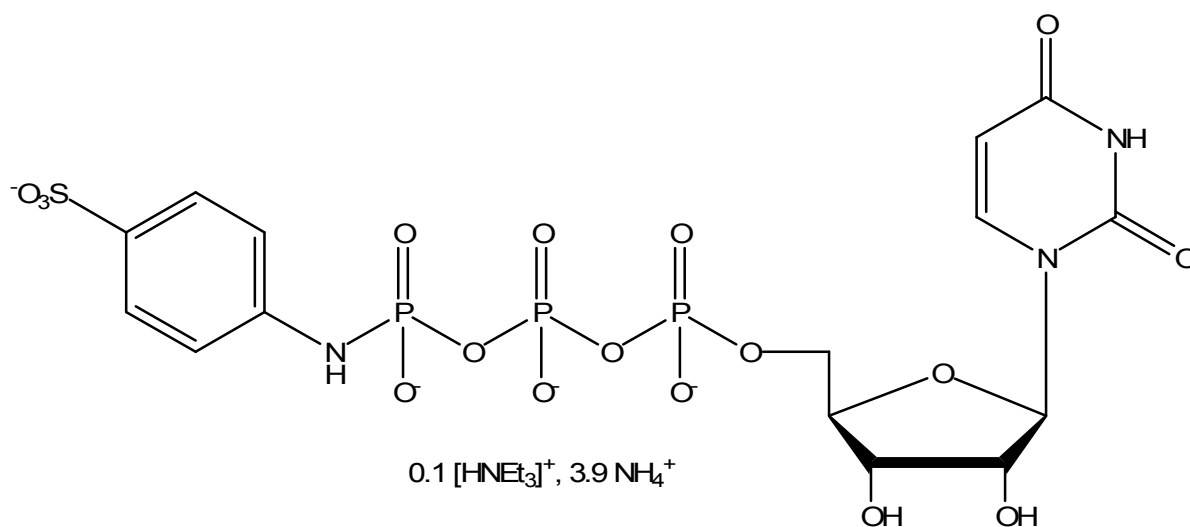
Ansatz:

- UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
- HOBT: 0.45 mmol (60.5 mg)
- Sulfanilsäure: 1.4 mmol (242 mg)
- EDC: 1.5 mmol (288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B

Präparative HPLC: Methode E

Struktur:



Ausbeute: 15%, 21 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 715 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.27 (t, 0.81H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.18 (q, 0.54H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, Triethylamin); 4.08 (m, 2H, ³J = 2.84 Hz, H-5'); 4.16 (m, 1H, ³J = 2.84 Hz, H-4'); 4.20 (m, 2H, ³J = 5.03 Hz und ³J = 5.04 Hz, H-3' und H-2'); 5.90 (m, 2 x 1H, ³J = 2.21 Hz und ³J = 8.20 Hz, H-1' und H-5, Uracil); 7.13 (d, 2H, ³J = 8.51 Hz, H-2 und H-3, Aromat); 7.60 (d, 2H, ³J = 8.51 Hz, H-3 und H-5, Aromat); 7.88 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6, Uracil).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.10 (CH_3 , Triethylamin); 49.52 (CH_2 , Triethylamin); 67.58 (C-5'); 72.24 (C-3'); 77.73 (C-2'); 86.97 (C-4'); 91.24 (C-1'); 105.40 (C-5, Uracil); 119.54 (C-3 und C-5, Aromat); 129.54 (C-2 und C-6, Aromat); 136.42 (C-1, Aromat); 144.34 (C-6, Uracil); 147.99 (C-4, Aromat); 154.49 (C-2, Uracil); 169.04 (C-4, Uracil).

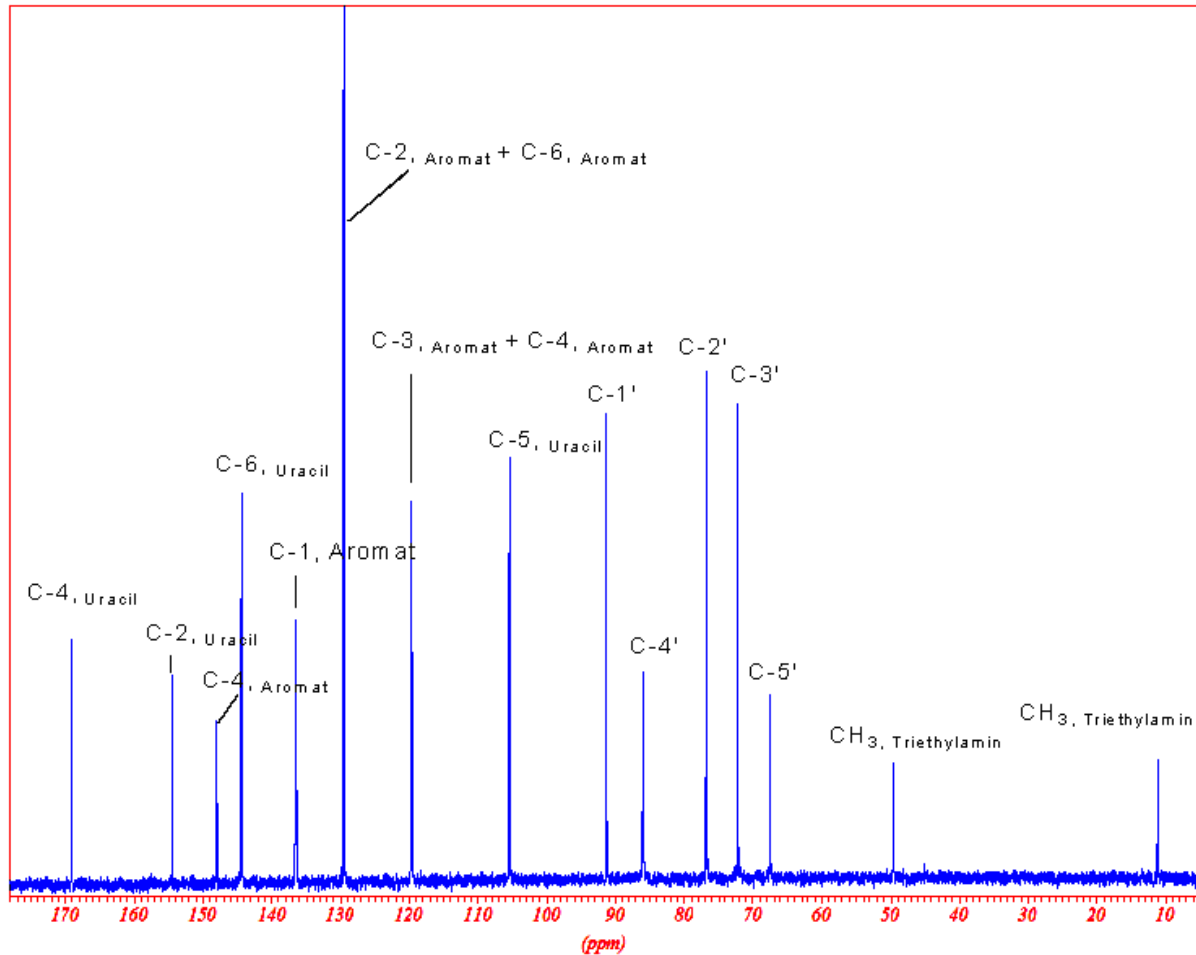


Abbildung 9.80: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **56**

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ -11,16 (m, $^3J = 19.67$ Hz, $\gamma\text{-P}$, $\alpha\text{-P}$); -22,90 (m; $^3J = 19.68$ Hz; $\beta\text{-P}$).

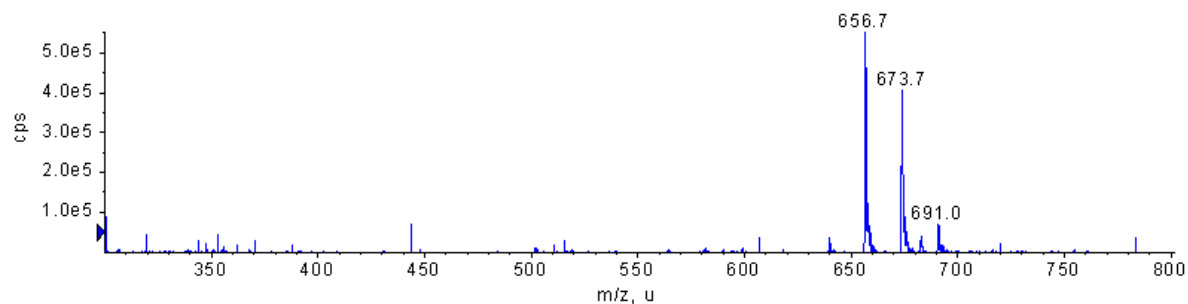
LC/ESI-MS: $[M+NH_4]^+$: 656.7

Abbildung 9.81: Massenspektrum von Verbindung **56** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

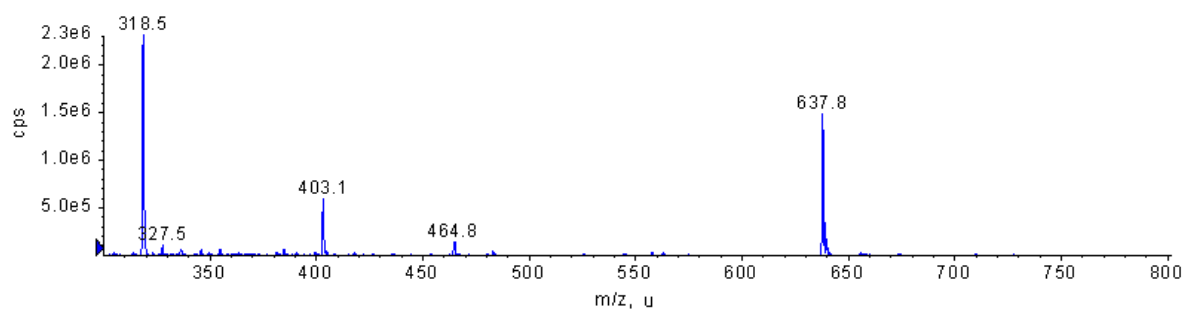
 $[M-H]^-$: 637.8

Abbildung 9.82: Massenspektrum von Verbindung **56** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

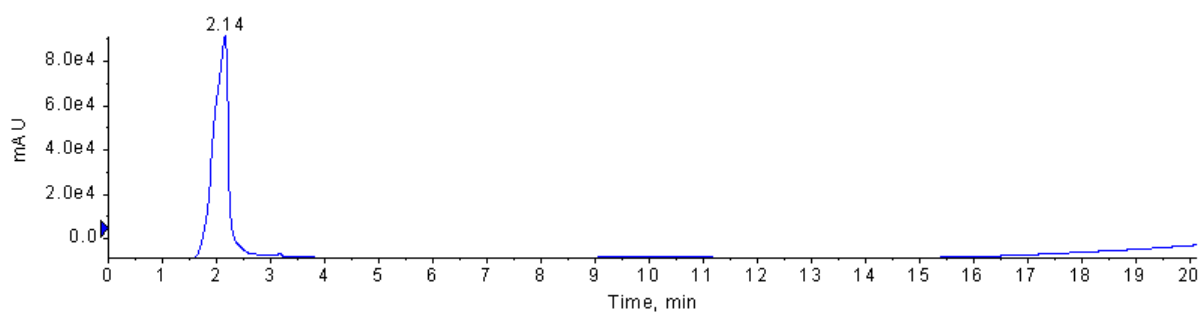
Reinheit HPLC: 100%

Abbildung 9.83: Chromatogramm von Verbindung **56**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm

Reinheit CE: 99%

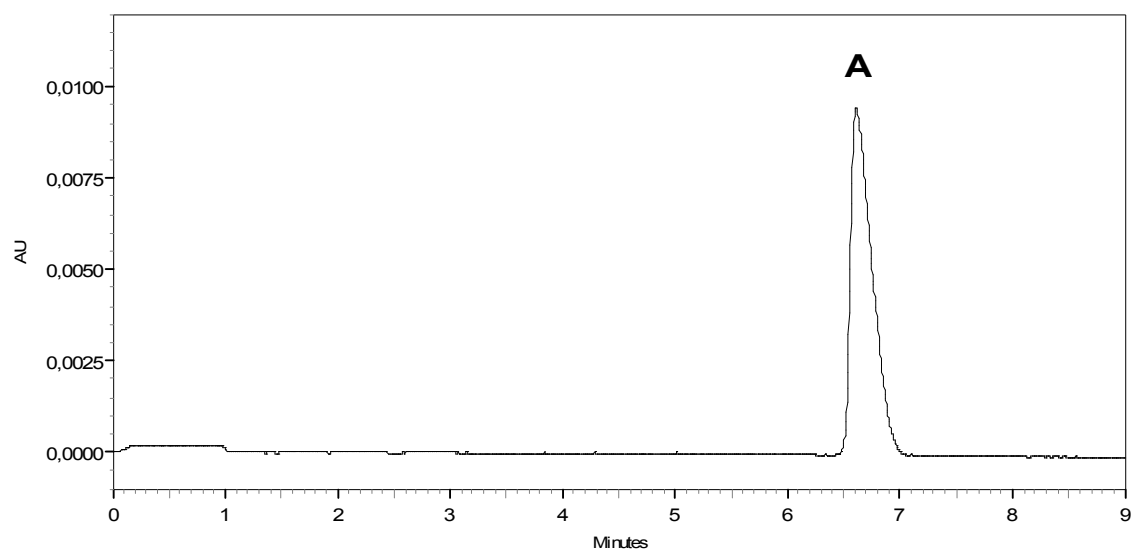
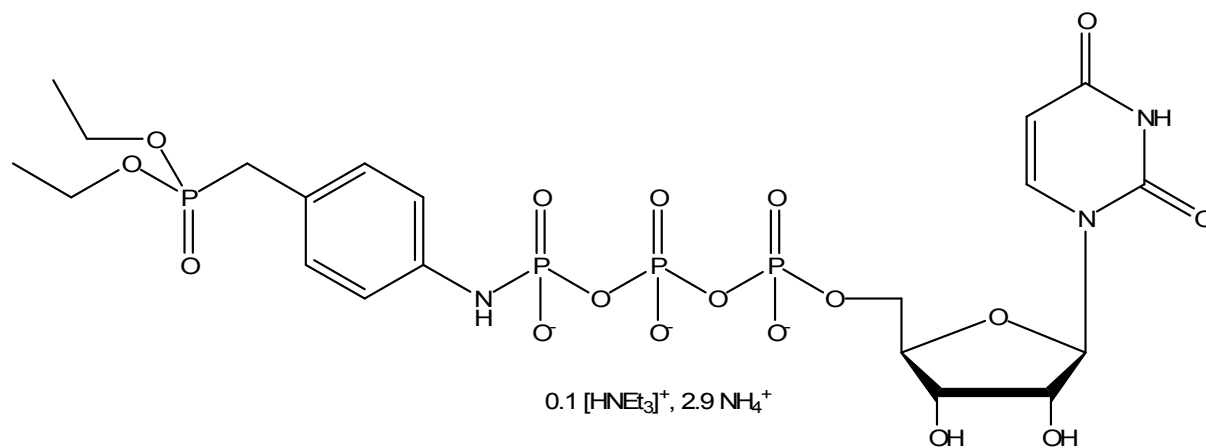


Abbildung 9.84: Elektropherogramm von Verbindung **56**, AU = Absorption Units, A = Verbindung **56**

9.2.5.4 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltriphosphorsäure- γ -4-diethylphosphonomethylphenylamid (**57**)

Ansatz: UTP-Trinatriumsalz-Dihydrat: 0.2 mmol (117 mg)
 HOBT: 0,45 mmol (60.5 mg)
 Diethyl-(4-aminobenzyl)phosphonat-HCl: 1,4 mmol (340 mg)
 EDC: 1.5 mmol (288 mg)

Aufreinigung: Ionenaustauschchromatographie: Methode B
 Präparative HPLC: Methode E

Struktur:

Ausbeute: 15%, 536 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 715 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.27 (m, 0.81H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_3 , Triethylamin und 2 x 3H, $^3\text{J} = 6.95$ Hz, CH_3 , Ethylester); 3.19 und 3.23 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2\text{J}_{\text{HP}} = 20.50$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 3.25 (q, 0.54H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_2 , Triethylamin); 4.08 (m, 2H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz, H-5' und 2 x 2H, $^3\text{J} = 6.95$ Hz, 2 x CH_2 , Ethylester); 4.16 (m, 1H, $^3\text{J} = 2.84$ Hz, H-4'); 4.20 (m, 2H, $^3\text{J} = 5.03$ Hz und $^3\text{J} = 5.04$ Hz, H-3' und H-2'); 5.90 (m, 2 x 1H, $^3\text{J} = 2.5$ Hz und $^3\text{J} = 5.05$ Hz, H-1' und H-5, Uracil); 7.13 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.51$ Hz, H-2 und H-3, Aromat); 7.60 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.51$ Hz, H-3 und H-5, Aromat); 7.88 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.35$ Hz, H-6, Uracil).

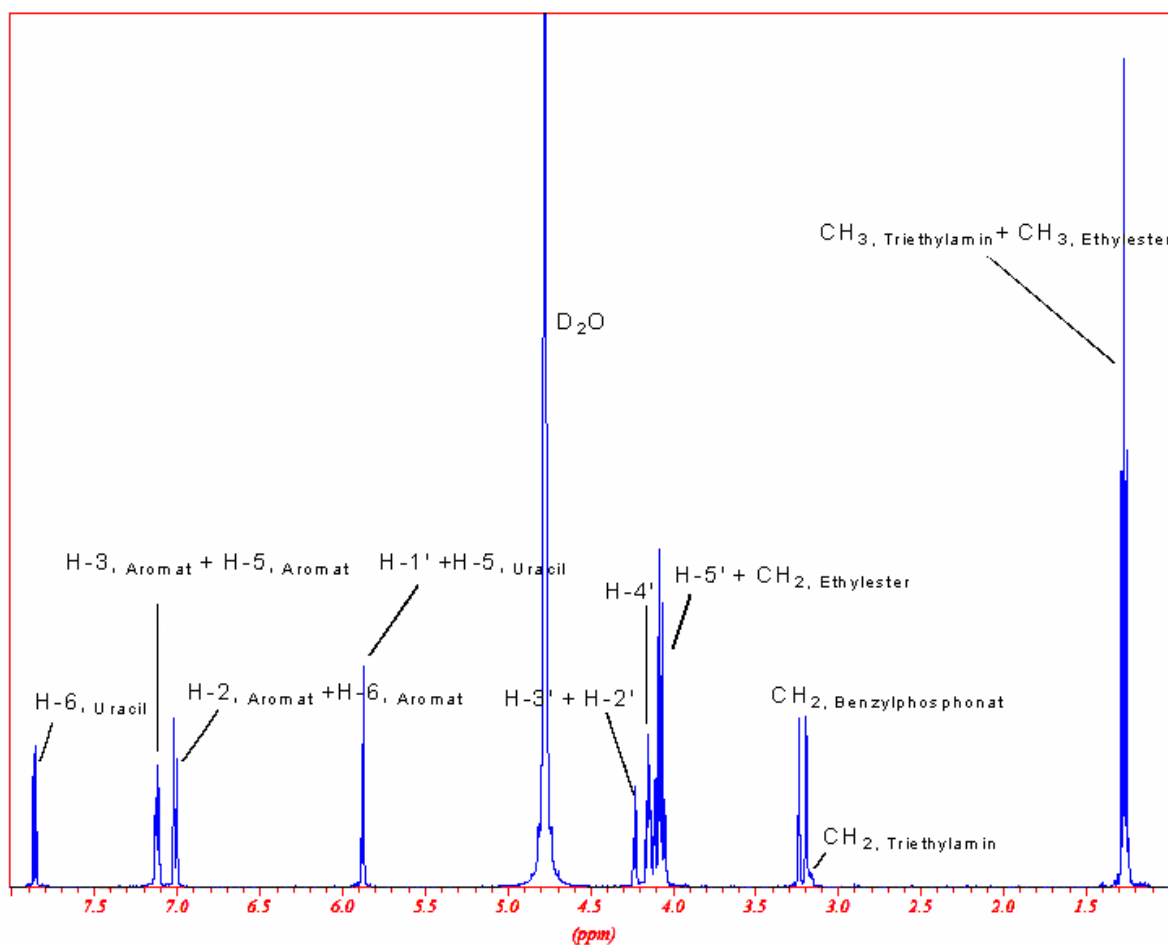


Abbildung 9.85: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **57**

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 11.10 (CH_3 , Triethylamin); 18.38 und 18.42 (2 x CH_3 , Ethylester); 33.17 und 34.25 (2 x CH_2 , Ethylester); 49.52 (CH_2 , Triethylamin); 67.42 (CH_2 , Benzylphosphonat); 67.58 (C-5'); 72.24 (C-3'); 77.73 (C-2'); 86.97 (C-4'); 91.24 (C-1'); 105.40 (C-5, Uracil); 120.49 (C-2 und C-6, Aromat); 124.59 (C-1, Aromat); 133.20 (C-3 und C-5, Aromat); 144.01 (C-6, Uracil); 144.24 (C-1, Aromat); 154.53 (C-2, Uracil); 169.08 (C-4, Uracil).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ 31.06 (s, C-P); -10.00 (γ -P); -11.11 (α -P); -22.85 (β -P).

LC/ESI-MS:

$[\text{M}+\text{H}]^+$: 709.8; $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 726.8

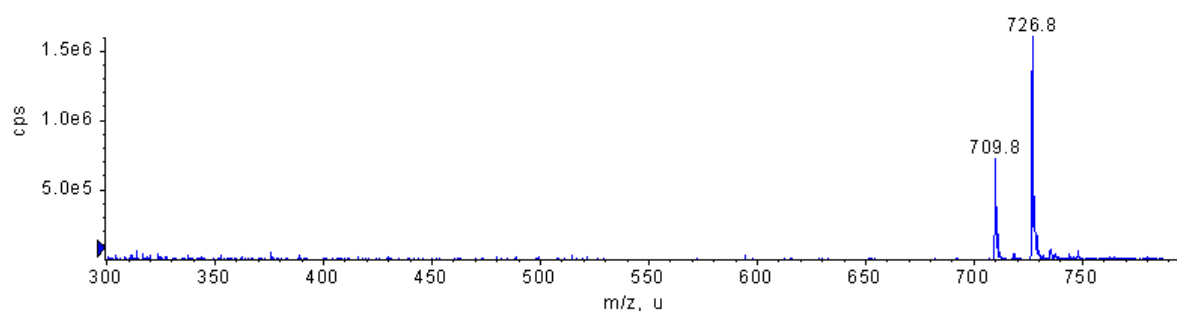


Abbildung 9.86: Massenspektrum von Verbindung **57** im positiven Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 708.0

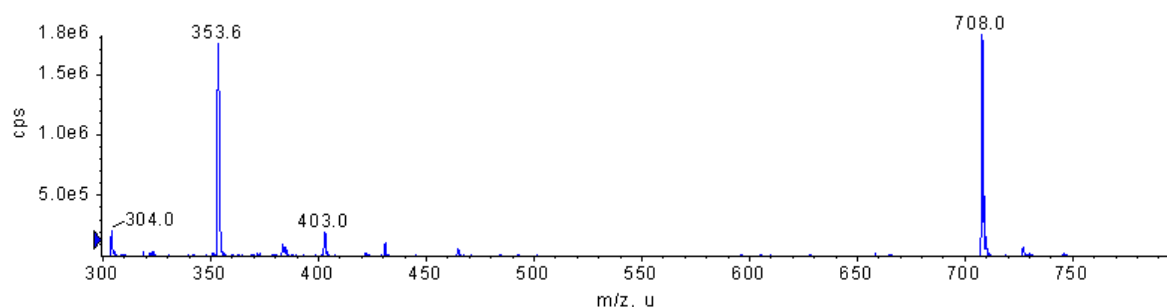
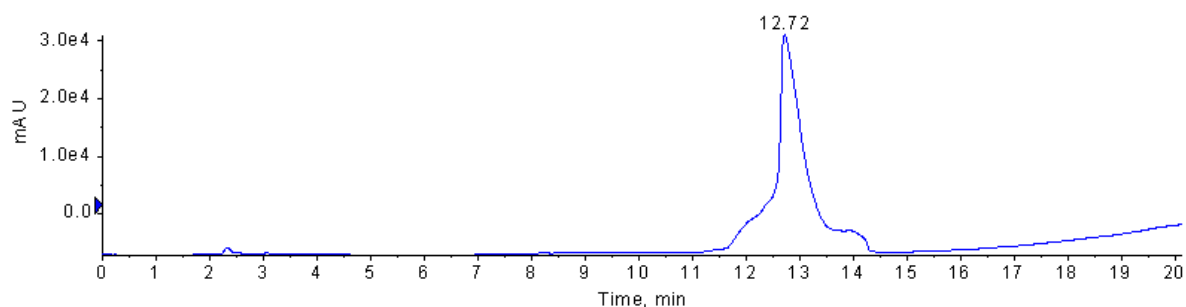
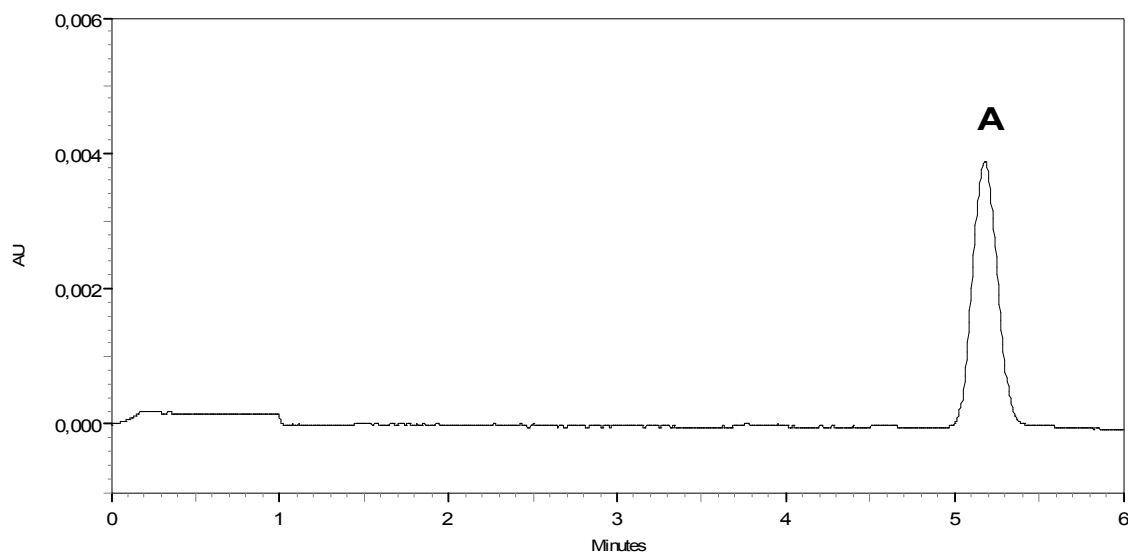


Abbildung 9.87: Massenspektrum von Verbindung **57** im negativen Modus, cps = counts per second, m/z = Masse:Ladung, u = units

Reinheit HPLC: 99%Abbildung 9.88: Chromatogramm von Verbindung **57**, AU = Absorption Unit, Wellenlänge 254 nm**Reinheit CE: 100%**Abbildung 9.89: Elektropherogramm von Verbindung **57**, AU = Absorption Units, A = Verbindung **57**

9.2.6 Darstellung von α -((2R,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyltetraphosphorsäure (**Ap₄, 60**)¹⁸³

Der Kationenaustauscher Dowex[®] 50W x 8 H⁺ Form wurde in 50 ml deionisiertem Wasser aufgeschlämmt und abfiltriert. Der Rückstand wurde mehrmals mit deionisiertem Wasser gespült, bis das Filtrat nicht mehr sauer reagierte.

ATP-Dinatriumsalz (2 mmol, 1,1 g) wurden in 20 ml Wasser gelöst und durch Zugabe von 5 g gespülten Dowex[®] 50W x 8 H⁺-Form in die freie Säure überführt. Die Lösung wurde abfiltriert und mit 50 ml Wasser und 50 ml Wasser-Methanol (1:1) nachgespült. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abgezogen.

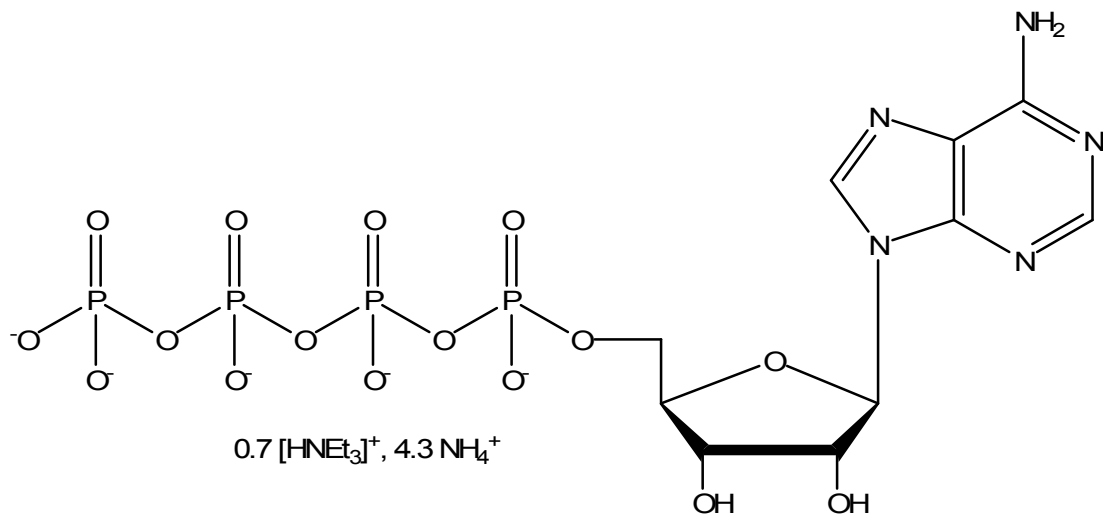
Der sirupartige Rückstand wurde in einer Lösung bestehend aus 1,9 ml Tributylamin (8 mmol) und 30 ml Methanol aufgenommen und ca. 20 min bis zur vollständigen Auflösung gerührt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und durch Koevaporation mit wasserfreiem DMF (3 mal mit je 5 ml) im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Das wasserfreie ATP-Tetrabutylammoniumsalz wurde in 10 ml wasserfreiem Dioxan gelöst, mit 0,9 ml (4,5 mmol) Diphenylphosphorchloridat und 1 ml (4 mmol) Tributylamin versetzt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen und das aktivierte Adenosintriphosphat unter Rühren bei Eiskühlung mit 70 ml wasserfreiem Diethylether ausgefällt. Nach weiteren 30 min Rühren bei 0°C wurde der Überstand abdekantiert, der Rückstand in 5 ml wasserfreiem Dioxan aufgenommen und durch erneutes Konzentrieren im Rotationsverdampfer getrocknet.

Eine Lösung aus 5 mmol Orthophosphat als Tributylammoniumsalz vorliegend (erhalten durch Lösen von 0,5 g (5 mmol) Orthophosphorsäure und 5 mmol Tributylamin in 10 ml Methanol und anschließendem azeotropen Trocknen mit 3 mal 5 ml wasserfreiem Pyridin), 5 ml Pyridin und 1 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid wurde zugegeben. Die Reaktionslösung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Ölpumpenvakuum entfernt.

Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Kapillarelektrophorese (Methode A). Es haben sich ca. 30% ATP umgesetzt.

Nach erfolgter Reaktionskontrolle wurde das Reaktionsgemisch mittels Ionenaustauschchromatographie (Methode C) zweimal aufgereinigt. Anschließend wurde eine HPLC-Aufarbeitung (Methode E) durchgeführt

Struktur:

Ausbeute: 9%, 128,3 mg

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

Berechnete Molekülmasse des Salzes: 712,8 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.19 (t, 1.99H, ³J = 7.25 Hz, CH₃, Triethylamin); 3.11 (q, 1.27H, CH₂, Triethylamin, ³J = 7.25 Hz); 4.17 (m, 2H, ³J = 2.83 Hz, H-5'); 4.33 (m, H-4', ³J = 2.84 Hz); 4.51 (pseudo-t, 1H, H-3', ³J = 2.84 Hz und ³J = 2.83 Hz); 4.66 (pseudo-t, 1H, ³J = 3.47 Hz und ³J = 3.78 Hz, H-2'); 6.07 (d, 1H, ³J = 5.99 Hz, H-1'); 8.19 (s, 1H, H-8); 8.47 (s, 1H, H-2).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 11.08 (CH₃, Triethylamin); 49.51 (CH₂, Triethylamin); 68.2 (C-5'); 73.3 (C-3'); 77.1 (C-2'); 87.1 (C-4'); 89.61 (C-1'); 122.31 (C-5); 142.14 (C-8); 152.01 (C-4); 154.87 (C-2); 157.91 (C-6).

^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O) δ -10.3 (δ -P); -11,17 (α -P); -22,75 (γ -P).

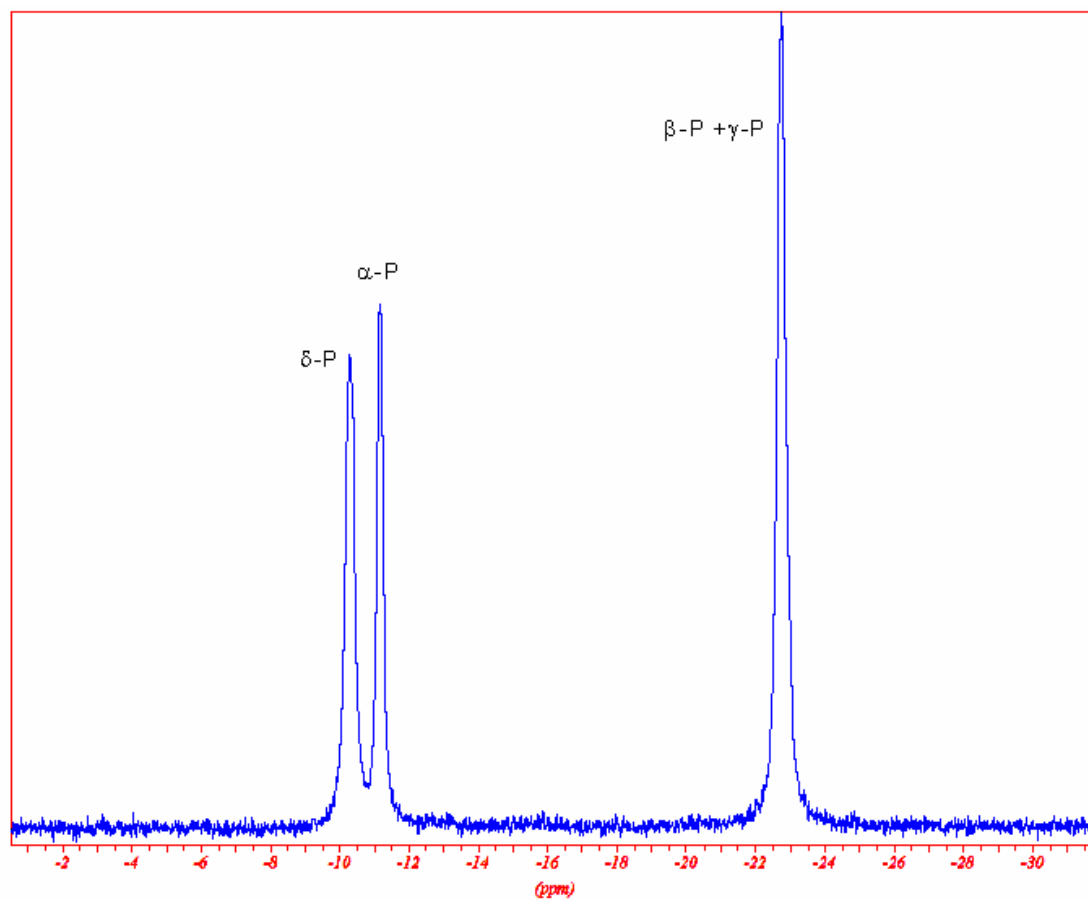


Abbildung 9.90: ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **60**

MS/ESI:

$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 605.3

$[\text{M}-\text{H}]^-$: 586.3

Reinheit HPLC: 98%

Reinheit CE: 97%

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APTS	8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BODIPY	Bordipyrrrol
Br	breit
Cd	Cadmium
CE	Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
d	Duplett
D ₂ O	deutერიertes Wasser
DIPEA	Diisopropylamin (Hünig-Base)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDA	Ethylendiamin
EDC	N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl
EOF	elektroosmotischer Fluss
ESI	Electron Spray Ionisation
GMP	Guanosinmonophosphat
h	Stunde
He	Helium
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
LC	Liquid Chromatography
m	Multipllett, meta
MALDI-TOF	matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight

MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
MeOD	deuteriertes Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMR	magnetische Kernresonanz
o	ortho
p	para; pseudo
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PLE	Pig Liver Esterase
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyyrolidino- phosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
s	Singulett
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
t	Triplett
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

10.2 Literaturverzeichnis

1. Tiselius, A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 524-531.
2. Tiselius, A. Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem. J.* **1937**, *31*, 1464-1477.
3. Hjerten, S. Free zone electrophoresis. *Chromatogr. Rev.* **1967**, *9*, 122-219.
4. Mikkers, F.; Ringoir, S.; De Smet, R. Analytical isotachopheresis of uremic blood samples. *J. Chromatogr.* **1979**, *162*, 341-350.
5. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. Capillary zone electrophoresis. *Science* **1983**, *222*, 266-272.
6. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 1551-1553
7. Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T. Kapillarelektrophorese, Methoden und Möglichkeiten. *Vieweg&Sohn Verlagsgesellschaft mbH*, Braunschweig/Wiesbaden **1994**.
8. Geldart, S. E.; Brown, P. R. Analysis of nucleotides by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1998**, *828*, 317-336.
9. Wätzig, H.; Dette, C. Capillary electrophoresis (CE)-a review. Strategies for method development and applications related to pharmaceutical and biological sciences. *Pharmazie* **1994**, *49*, 83-96.
10. Atkins, P. W.; de Paula, J. *Physikalische Chemie*. 4. Auflage., *Wiley-VCH*, Berlin, **2006**.
11. Adamson, A. W. *Physical Chemistry of Surfaces*. *Wiley & Sons*, Hoboken, **1976**.
12. Bockris, J. O. M.; Reddy, A. K. N.; Gamboa-Aldeco, M. E. *Modern Electrochemistry 1: Ionics*. 2. Auflage, *Plenum Press*, New York, **1998**.
13. Hunter, R. J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. 2. Auflage, *Academic Press*, London, **1981**.
14. Lee, T. T.; Yeung, E. S. High-sensitivity laser-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **1992**, *595*, 319-325.
15. Zhang, F. L.; Luo, L.; Gustafson, E.; Palmer, K.; Qiao, X.; Fan, X.; Yang, S.; Laz, T. M.; Bayne, M.; Monsma, F., Jr. P2Y(13): identification and characterization of a novel Galphai-coupled ADP receptor from human and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 705-713.
16. Preisler, J.; Foret, F.; Karger, B. L. On-line MALDI-TOF MS using a continuous vacuum deposition interface. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5278-5287.
17. Swinney, K.; Bornhop, D. J. Detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1239-1250.
18. Williams, S. J.; Goodall, D. M. Quantitative aspects of capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.* **1991**, *10*, 272-279.
19. Moring, S. E.; Colburn, J. C.; Grossman, P. D.; Lauer, H. H. Analytical aspects of an automated capillary electrophoresis system. *LC GC* **1990**, *8*, 34-46.
20. Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. *Springer Verlag*, Berlin, **1993**.
21. Watzig, H.; Degenhardt, M.; Kunkel, A. Strategies for capillary electrophoresis: method development and validation for pharmaceutical and biological applications. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2695-2752.
22. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111-113.
23. Mayer, A.; Neuenhofer, S. Luminescent Labels - More than Just an Alternative to Radioisotopes? *Angew. Chemie* **1994**, *33*, 1044-1072.
24. Bardelmeijer, H. A.; Lingeman, H.; de Rooter, C.; Underberg, W. J. Derivatization in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1998**, *807*, 3-26.
25. Haugland. *The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. *In Molecular Probes Inc*: **2006**.
26. Sun, W. C.; Gee, K. R.; Klauber, D. H.; Haugland, R. P. Synthesis of fluorinated fluoresceins. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.
27. Riollot, P.; Couderc, F. A catalogue of selected derivatization reactions to label molecules in the subnanomolar or nanomolar range for CE and micro-HPLC with LIF detection. *J. Capill. Electrophor. Microchip. Technol.* **2004**, *9*, 1-11.
28. Pesch, S. Entwicklung einer neuartigen Methode zur fluorimetrischen Detektion von Stickstoffmonoxid (NO•) in biologischer Umgebung durch Einsatz radikalischer Messsonden. *Dissertation*, Düsseldorf, **2004**.

29. Karolin, J.; Johansson, B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801-7806.
30. Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure & Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1370-1380.
31. Kochetkov, N. K.; Shibaev, V. N.; Kost, A. A. New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acids modification. *Tet. Lett.* **1971**, 1993-1996.
32. Secrist, J. A.; Barrio, J. R.; Leonard, N. J.; Weber, G. Fluorescent Modification of Adenosine-Containing Coenzymes. *Biological Activities and Spectroscopic Properties. Biochemistry* **1972**, *11*, 3499-3506.
33. Davis, W. M.; White, D. C. Fluorometric determination of adenosine nucleotide derivatives as measures of microfouling, detrital, and sedimentary microbial biomass and physiological status. *Appl. and environ. Microbiol.* **1980**, *40*, 539-548.
34. Ramos-Salazar, A.; Baines, A. D. Fluorometric determination of adenine nucleotides and adenosine by ion-paired, reverse-phase, high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **1985**, *145*, 9-13.
35. Tseng, H. C.; Dadoo, R.; Zare, R. N. Selective determination of adenine-containing compounds by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 55-58.
36. Yoshioka, M.; Yamada, K.; Abu-Zeid, M. M.; Fujimori, H.; Fuke, A.; Hirai, K.; Goto, A.; Ishii, M.; Sugimoto, T.; Parvez, H. Analyses of adenosine and adenine nucleotides in biological materials by fluorescence reaction-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1987**, *400*, 133-141.
37. Mikkola, S.; Koissi, N.; Ketomäki, K.; Rauvala, S.; Neuvonen, K.; Lönnberg, H. Reactions of Adenosine with Bromo- and Chloromalonaldehydes in Aqueous Solution: Kinetics and Mechanism. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2315-2323.
38. Qurishi, R. Qualitative und quantitative kapillarelektrophoretische Untersuchungen von Nukleosiden, Nukleotiden und deren Derivaten-Methodenentwicklung und Validierung. *Dissertation*, Bonn **2002**.
39. Hileman, R. E.; Parkhurst, K. M.; Gupta, N. K.; Parkhurst, L. J. Synthesis and characterization of conjugates formed between periodate-oxidized ribonucleotides and amine-containing fluorophores. *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 436-444.
40. Wu, T. P.; Ruan, K. C.; Liu, W. Y. A fluorescence-labeling method for sequencing small RNA on polyacrylamide gel. *Nucleic. Acids. Res.* **1996**, *24*, 3472-3473.
41. Kurata, S.; Ohtsuki, T.; Suzuki, T.; Watanabe, K. Quick two-step RNA ligation employing periodate oxidation. *Nucleic. Acids Res.* **2003**, *31*, e145.
42. Proudnikov, D.; Mirzabekov, A. Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. *Nucleic. Acids Res.* **1996**, *24*, 4535-4542.
43. Yonekura, S.; Iwasaki, M.; Kai, M.; Ohkura, Y. Determination of guanine and its nucleosides and nucleotides in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization using phenylglyoxal reagent. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1994**, *654*, 19-24.
44. Eisenberg, E. J.; Cundy, K. C. High-performance liquid chromatographic determination of cytosine-containing compounds by precolumn fluorescence derivatization with phenacyl bromide: application to antiviral nucleosides and nucleotides. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1996**, *679*, 119-127.
45. Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. G. G.; van Bekkum, H. Studies on borate esters. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 2901-2911.
46. Hoffstetter-Kuhn, S.; Paulus, A.; Gassmann, E.; Widmer, H. M. Influence of Borate Complexation on the Electrophoretic Behaviour of Carbohydrates in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1541-1547.
47. Dawber, J. D.; Hardy, G. E. Polarimetric study of the interaction of electrolytes with mannitol and sorbitol. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1984**, *80*, 2467-2478.
48. Ralston, N. V.; Hunt, C. D. Diadenosine phosphates and S-adenosylmethionine: novel boron binding biomolecules detected by capillary electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1527*, 20-30.
49. Yurkevich, A. M.; Kolodkina, I. I.; Varshavskaya, L.S. The Reaction of Phenylboronic Acid with Nucleosides and Mononucleotides. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 477-484.
50. Hayashi, Y.; Makino, M. Fluorometric measurement of glycosylated albumin in human serum. *Clin. Chim. Acta* **1985**, *149*, 13-19.
51. DiCesare, N.; Lakowicz, J. R. New sensitive and selective fluorescent probes for fluoride using boronic acids. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 111-116.

52. Cao, H.; McGill, T.; Heagy, M. D. Substituent effects on monoboronic acid sensors for saccharides based on N-phenyl-1,8-naphthalenedicarboximides. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2959-2966.
53. Phillips, M. D.; James, T. D. Boronic acid based modular fluorescent sensors for glucose. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 549-559.
54. Gamoh, K.; Okamoto, N.; Takatsuto, S. Determination of traces of natural brassinosteroids as dansylaminohenyboronates by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *228*, 101-105.
55. Gamoh, K.; Omote, K.; Okamoto, N.; Takatsuto, S. High-performance liquid chromatography of brassinosteroids in plants with derivatisation using 9-phenanthrenboronic acid. *J. Chromatogr.* **1989**, *469*, 424-428.
56. Chu, B.C. F.; Wahl, G. M.; Orgel, L. E. Derivatization of unprotected polynucleotides. *Nucl. Acids Res.* **1983**, *11*, 6513-6529.
57. Kelman, D. J.; Lilga, K. T.; Sharma, M. Synthesis and application of fluorescent labeled nucleotides to assay DNA damage. *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *66*, 85-100.
58. Jain, R.; Isac, T. V.; Sharma, M. Fluorescence postlabeling assay of RNA modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 1239-1244.
59. Sharma, M.; Freund, H. G. Development of laser-induced fluorescence detection to assay DNA damage. In: *Optical Methods for Ultrasensitive Detection and Analysis: Techniques and Applications* **1991**, *1435*, 280-291.
60. Al-Deen, A. N.; Cecchini, D. C.; Abdel-Baky, S.; Moneam, N. M.; Giese, R. W. Preparation of ethylenediaminephosphoramidates of nucleotides and derivatization with fluorescein isothiocyanate. *J. Chromatogr.* **1990**, *512*, 409-414.
61. Li, W.; Moussa, A.; Giese, R. W. Capillary electrophoresis of fluoresceine-ethylendiamine-5'-deoxynucleotides. *J. Chromatogr.* **1992**, *608*, 171-174.
62. Wang, P.; Giese, R. W. Phosphate-specific fluorescence labeling under aqueous conditions. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3518-3520.
63. Wang, P.; Giese, R. W. Phosphate-specific fluorescence labeling with BO-IMI: reaction details. *J. Chromatogr. A* **1998**, *809*, 211-218.
64. Lan, Z. H.; Qian, X.; Giese, R. W. Preparation of an IMI dye (imidazole functional group) containing a 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole fluorophore for labeling of phosphomonoesters. *J. Chromatogr. A* **1999**, *831*, 325-330.
65. Ivanovskaya, M. G.; Gottikh, M. B.; Shabarova, Z. A. Modification of oligo(poly)nucleotide phosphomonoester groups in aqueous solutions. *Nucleosides & Nucleotides* **1987**, *6*, 913-934.
66. Sonoki, S.; Hisamatsu, S.; Kiuchi, A. High-performance liquid chromatographic determination of DNA base composition with fluorescence detection. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2776.
67. Sonoki, S.; Sanda, A.; Hisamatsu, S. Simultaneous determination of Mono-, Di-, and Trinucleotides by high-performance liquid chromatography using N-(Dansyl)ethylenediamine as a fluorescent derivatizing reagent. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17*, 1057-1064.
68. Sonoki, S.; Kadoike, Y.; Kiyokawa, M.; Hisamatsu, S. High-performance liquid chromatographic analysis of 2'-Deoxynucleoside-5'-Monophosphate using N-(Dansyl)ethylenediamine as a fluorescent derivatizing reagent. *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 2731-2739.
69. Liu, X.; Takahashi, L. H.; Fitch, W. L.; Rozing, G.; Bayle, C.; Couderc, F. Capillary electrochromatography-laser-induced fluorescence method for separation and detection of dansylated dialkylamine tags in encoded combinatorial libraries. *J. Chromatogr. A* **2001**, *924*, 323-329.
70. Schwedt, G. *Fluorimetrische Analyse, Methoden und Anwendungen.* Verlag Chemie, Weinheim, **1981**.
71. Qurishi, R.; Kaulich, M.; Muller, C. E. Fast, efficient capillary electrophoresis method for measuring nucleotide degradation and metabolism. *J. Chromatogr. A* **2002**, *952*, 275-281.
72. Wätzig, H.; Baumann, K. Regression and calibration for analytical separation techniques. *Process control and quality* **1997**, *10*, 59-73.
73. Han, S. Y.; Kim, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
74. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
75. Wieland, T. Peptide Synthesis. *Angew. Chem.* **1951**, *63*, 7-14.
76. Adamczyk, M.; Grote, J. Synthesis of novel spiro lactams by reaction of fluoresceine methyl ester with amines. *Tet. Lett.* **2000**, *41*, 807-809.

77. Uri, A.; Jaerlebark, L.; von Kuegelgen, I.; Schoenberg, T.; Uden, A. A new class of compounds, peptide derivatives of adenosine 5'-carboxylic acid, includes inhibitors of ATP receptor mediated responses. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1099-1105.
78. Rancour, D. M.; Anant, K. M. Identification of endoplasmic reticulum proteins involved in glycan assembly and characterization of P3-(4-azidoanilido)uridine-5'-triphosphate, a membrane-topological photoaffinity probe for uridine diphosphate-sugar binding proteins. *Biochem. J.* **1998**, *333*, 661-669.
79. Chiari, M.; Nesi, M. Movement of DNA fragments during capillary zone electrophoresis in liquid polyacrylamide. *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 31-39.
80. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 445-475.
81. Illes, P.; Ribeiro, A., J. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *483*, 5-17.
82. Burnstock, G. Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 793-803.
83. Boehm, S. Signaling via nucleotide receptors in the sympathetic nervous system. *Drug News Perspect.* **2003**, *16*, 141-148.
84. Brunschweiler, A.; Mueller, C. E. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 289-312.
85. Lugo-Garcia, L.; Filhol, R.; Lajoix, A. D.; Gross, R.; Petit, P.; Vignon, J. Expression of purinergic P2Y receptor subtypes by INS-1 insulinoma beta-cells: a molecular and binding characterization. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 54-60.
86. Van Crombuggen, K.; Van Nassauw, L.; Timmermans, J. P.; Lefebvre, R. A. Inhibitory purinergic P2 receptor characterization in rat distal colon. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 257-271.
87. Ayyanathan, K.; Webbs, T. E.; Sandhu, A. K.; Athwal, R. S.; Barnard, E. A.; Kunapuli, S. P. Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *218*, 783-788.
88. Lustig, K. D.; Shiau, A. K.; Brake, A. J.; Julius, D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5113-5117.
89. Zambon, A. C.; Hughes, R. J.; Meszaros, J. G.; Wu, J. J.; Torres, B.; Brunton, L. L.; Insel, P. A. P2Y(2) receptor of MDCK cells: cloning, expression, and cell-specific signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2000**, *279*, 1045-1052.
90. Koshiba, M.; Apasov, S.; Sverdlov, V.; Chen, P.; Erb, L.; Turner, J. T.; Weisman, G. A.; Sitkovsky, M. V. Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 831-836.
91. Santiago-Perez, L. I.; Flores, R. V.; Santos-Berrios, C.; Chorna, N. E.; Krugh, B.; Garrad, R. C.; Erb, L.; Weisman, G. A.; Gonzalez, F. A. P2Y(2) nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *J. Cell Physiol.* **2001**, *187*, 196-208.
92. Bowler, W. B.; Birch, M. A.; Gallagher, J. A.; Bilbe, G. Identification and cloning of human P2U purinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **1995**, *10*, 1137-1145.
93. Buvinic, S.; Poblete, M. I.; Donoso, M. V.; Delpiano, A. M.; Briones, R.; Miranda, R.; Huidobro-Toro, J. P. P2Y1 and P2Y2 receptor distribution varies along the human placental vascular tree: role of nucleotides in vascular tone regulation. *J. Physiol.* **2006**, *573*, 427-443.
94. Godecke, S.; Decking, U. K.; Godecke, A.; Schrader, J. Cloning of the rat P2U receptor and its potential role in coronary vasodilation. *Am. J. Physiol.* **1996**, *270*, C570-577.
95. Parr, C. E.; Sullivan, D. M.; Paradiso, A. M.; Lazarowski, E. R.; Burch, L. H.; Olsen, J. C.; Erb, L.; Weisman, G. A.; Boucher, R. C.; Turner, J. T. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3275-3279.
96. Knoblauch, B. H.; Müller, C. E.; Jarlebark, L.; Lawoko, G.; Kottke, T.; Wikstrom, M. A.; Heilbronn, E. 5-Substituted UTP derivatives as P2Y2 receptor agonists. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 809-824.
97. Lazarowski, E. R.; Watt, W. C.; Stutts, M. J.; Boucher, R. C.; Harden, T. K. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 1619-27.
98. Nicholas, R. A.; Watt, W. C.; Lazarowski, E. R.; Li, Q.; Harden, K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of an UDP-selective, an UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 224-229.

99. Suarez-Huerta, N.; Pouillon, V.; Boeynaems, J.; Robaye, B. Molecular cloning and characterization of the mouse P2Y4 nucleotide receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *416*, 197-202.
100. Communi, D.; Pirotton, S.; Parmentier, M.; Boeynaems, J. M. Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30849-30852.
101. Webb, T. E.; Henderson, D. J.; Roberts, J. A.; Barnard, E. A. Molecular cloning and characterization of the rat P2Y4 receptor. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 1348-1357.
102. Bogdanov, Y. D.; Wildman, S. S.; Clements, M. P.; King, B. F.; Burnstock, G. Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124*, 428-30.
103. Communi, D.; Boeynaems, J. M. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 83-86.
104. Kennedy, C.; Qi, A. D.; Herold, C. L.; Harden T. K.; Nicholas, R. A. ATP, an agonist at the rat P2Y(4) receptor, is an antagonist at the human P2Y(4) receptor. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 926-931.
105. Wildman, S. S.; Unwin, R. J.; King, B. F. Extended pharmacological profiles of rat P2Y2 and rat P2Y4 receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 1177-1186.
106. Chang, K.; Hanaoka, K.; Kumada, M.; Takuwa, Y. Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 26152-26158.
107. Lazarowski, E. R.; Rochelle, L. G.; O'Neal, W. K.; Ribeiro, C. M.; Grubb, B. R.; Zhang, V.; Harden, T. K.; Boucher, R. C. Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *297*, 43-49.
108. Communi, D.; Parmentier, M.; Boeynaems, J. M. Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, *222*, 303-308.
109. Warny, M.; Aboudola, S.; Robson, S. C.; Sevigny, J.; Communi, D.; Soltoff, S. P.; Kelly, C. P. P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 26051-26056.
110. Boeynaems, J. M.; Robaye, B.; Janssens, R.; Suarez-Huerta, N.; Communi, D. Overview of P2Y receptors as therapeutic targets. *Drug Dev. Res.* **2001**, *52*, 187-189.
111. Amisten, S.; Melander, O.; Wihlborg, A. K.; Berglund, G.; Erlinge, D. Increased risk of acute myocardial infarction and elevated levels of C-reactive protein in carriers of the Thr-87 variant of the ATP receptor P2Y11. *Eur. Heart J.* **2007**, *28*, 13-18.
112. Wilkin, F.; Duhant, X.; Bruyins, C.; Suarez-Huerta, N.; Boeynaems, J. M.; Robaye, B. The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 7172-7177.
113. Communi, D.; Gonzalez, N. S.; Detheux, M.; Brezillon, S.; Lannoy, V.; Parmentier, M.; Boeynaems, J. M. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41479-41485.
114. Shinozaki, Y.; Koizumi, S.; Ishida, S.; Sawada, J.; Ohno, Y.; Inoue, K. Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* **2005**, *49*, 288-300.
115. Packham, M. A.; Mustard, J. F. Platelet aggregation and adenosine diphosphate/adenosine triphosphate receptors: a historical perspective. *Semin. Thromb. Hemost.* **2005**, *31*, 129-138.
116. Ruan, H. Z.; Burnstock, G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem. Cell Biol.* **2003**, *120*, 415-426.
117. Orriss, I. R.; Knight, G. E.; Ranasinghe, S.; Burnstock, G.; Arnett, T. R. Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation. *Bone* **2006**, *39*, 300-309.
118. Chorna, N. E.; Santiago-Perez, L. I.; Erb, L.; Seye, C. I.; Neary, J. T.; Sun, G. Y.; Weisman, G. A.; Gonzalez, F. A. P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J Neurochem* **2004**, *91*, 119-32.
119. Pintor, J.; Peral, A.; Pelaez, T.; Carracedo, G.; Bautista, A. H. New possibilities of nucleotides as therapeutic agents in the eye. *Drug Dev. Res.* **2003**, *56*, 136-145.
120. Hopfner, M.; Maaser, K.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Hanski, C.; Riecken, E. O.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int. J. Colorectal Dis.* **2001**, *16*, 154-166.
121. Katzur, A. C.; Koshimizu, T.; Tomic, M.; Schultze-Mosgau, A.; Ortmann, O.; Stojilkovic, S. S. Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 4085-4091.

122. Maaser, K.; Hopfner, M.; Kap, H.; Sutter, A. P.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 636-644.
123. Dubyak, G. R. Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 773-776.
124. Deterding, R. R.; Lavange, L. M.; Engels, J. M.; Mathews, D. W.; Coquillotte, S. J.; Brody, A. S.; Millard, S. P.; Ramsey, B. W. Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosol tetrasodium in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *176*, 362-369.
125. Murakami, T.; Fujihara, T.; Horibe, Y.; Nakamura, M. Diquafosol elicits increases in net Cl-transport through P2Y2 receptor stimulation in rabbit conjunctiva. *Ophthalmic. Res.* **2004**, *36*, 89-93.
126. Seye, C. I.; Kong, Q.; Erb, L.; Garrad, R. C.; Krugh, B.; Wang, M.; Turner, J. T.; Sturek, M.; Gonzalez, F. A.; Weisman, G. A. Functional P2Y2 nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation* **2002**, *106*, 2720-2726.
127. Shen, J.; Seye, C. I.; Wang, M.; Weisman, G. A.; Wilden, P. A.; Sturek, M. Cloning, up-regulation, and mitogenic role of porcine P2Y2 receptor in coronary artery smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1265-1274.
128. Schnurr, M.; Toy, T.; Stoitzner, P.; Cameron, P.; Shin, A.; Beecroft, T.; Davis, I. D.; Cebon, J.; Maraskovsky, E. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* **2003**, *102*, 613-620.
129. Wihlborg, A. K.; Balogh, J.; Wang, L.; Borna, C.; Dou, Y.; Joshi, B. V.; Lazarowski, E.; Jacobson, K. A.; Arner, A.; Erlinge, D. Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 970-976.
130. Vallon, V. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2008**, *294*, F10-27.
131. White, N.; Burnstock, G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, *27*, 211-217.
132. Parandeh, F.; Abaraviciene, S. M.; Amisten, S.; Erlinge, D.; Salehi, A. Uridine diphosphate (UDP) stimulates insulin secretion by activation of P2Y6 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *370*, 499-503.
133. Markovskaya, A.; Crooke, A.; Guzman-Aranguez, A. I.; Peral, A.; Ziganshin, A. U.; Pintor, J. Hypotensive effect of UDP on intraocular pressure in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *579*, 93-97.
134. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281-341.
135. Korcok, J.; Raimundo, L. N.; Du, X.; Sims, S. M.; Dixon, S. J. P2Y6 nucleotide receptors activate NF-kappaB and increase survival of osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16909-16915.
136. Leon, C.; Ravanat, C.; Freund, M.; Cazenave, J. P.; Gachet, C. Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 1941-1947.
137. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M. Arzneimittelwirkungen. 8. Auflage; *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*: Stuttgart, **2001**.
138. Wallentin, L.; Varenhorst, C.; James, S.; Erlinge, D.; Braun, O. O.; Jakubowski, J. A.; Sugidachi, A.; Winters, K. J.; Siegbahn, A. Prasugrel achieves greater and faster P2Y12 receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur. Heart J.* **2008**, *29*, 21-30.
139. Kellerman, D.; Rossi Mospan, A.; Engels, J.; Schaberg, A.; Gorden, J.; Smiley, L. Denufosol: A review of studies with inhaled P2Y(2) agonists that led to Phase 3. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2007**.
140. Lazarowski, E. R.; Watt, W. C.; Stutts, M. J.; Brown, H. A.; Boucher, R. C.; Harden, T. K. Enzymatic synthesis of UTP gamma S, a potent hydrolysis resistant agonist of P2U-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 203-209.
141. Jacobson, K. A.; Jarvis, M. F.; Williams, M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4057-4093.
142. Nahum, V.; Zundorf, G.; Levesque, S. A.; Beaudoin, A. R.; Reiser, G.; Fischer, B. Adenosine 5'-O-(1-boranotriphosphate) derivatives as novel P2Y(1) receptor agonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5384-5396.

143. Erb, L.; Lustig, K. D.; Sullivan, D. M.; Turner, J. T.; Weisman, G. A. Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2U purinergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10449-10453.
144. Patel, K.; Barnes, A.; Camacho, J.; Paterson, C.; Boughtflower, R.; Cousens, D.; Marshall, F. Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321N1 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *430*, 203-210.
145. Jacobson, K. A.; King, B. F.; Burnstock, G. Pharmacological characterization of P2 (nucleotide) receptors. *Celltransmissions* **2000**, *16*, 3-16.
146. Pendergast, W.; Yerxa, B. R.; Douglass, J. G.; Shaver, S. R.; Dougherty, R. W.; Redick, C. C.; Sims, I. F.; Rideout, J. L. Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 157-160.
147. Shaver, S. R.; Rideout, J. L.; Pendergast, W.; Douglass, J. G.; Brown, E. G.; Boyer, J. L.; Patel, R. I.; Redick, C. C.; Jones, A. C.; Picher, M.; Yerxa, B. R. Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 183-191.
148. Verspohl, E. J.; Blackburn, G. M.; Hohmeier, N.; Hagemann, J.; Lempka, M. Synthetic, nondegradable diadenosine polyphosphates and diinosine polyphosphates: their effects on insulin-secreting cells and cultured vascular smooth muscle cells. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1554-1562.
149. Kaulich, M.; Qurishi, R.; Mueller, C. E. Extracellular metabolism of nucleotides in neuroblastoma x glioma NG108-15 cells determined by capillary electrophoresis. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2003**, *23*, 349-364.
150. Nahum, V.; Tulapurkar, M.; Levesque, S. A.; Sevigny, J.; Reiser, G.; Fischer, B. Diadenosine and diuridine poly(borano)phosphate analogues: synthesis, chemical and enzymatic stability, and activity at P2Y1 and P2Y2 receptors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1980-1990.
151. Jankowski, J.; Potthoff, W.; Zidek, W.; Schluter, H. Purification of chemically synthesised dinucleoside(5',5') polyphosphates by displacement chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *719*, 63-70.
152. Ludwig, J.; Eckstein, F. Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates using 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635.
153. Zimmet, J.; Järlebark, L.; Hamarberg, T.; van Galen, P. J. M.; Jacobson, K. A.; Heilbronn, E. Synthesis and biological activity of novel 2-thio derivatives of ATP. *Nucleosides & Nucleotides* **1993**, *12*, 1-20.
154. Ludwig, J. A new route to nucleoside 5'-triphosphates. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131-133.
155. Moffat, J. G. A general synthesis of nucleoside-5' triphosphates. *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 599-604.
156. Shirokova, E. A.; Tarusova, N. B.; Shipitsin, A. V.; Semizarov, D. G.; Krayevsky, A. A. Novel acyclic nucleotides and nucleoside 5'-triphosphates imitating 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydronucleotides: synthesis and biological properties. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3739-3748.
157. Klausener, S.; Bodansky, M. Coupling reagents in Peptide Synthesis. *Synthesis* **1972**, 453-463.
158. Goodman, J. C.; Goodman, M.; Hess, G. P. Peptide Derivatives Containing Hydroxyamino Acids. *J. Amer. Soc.* **1956**, *78*, 1367.
159. König, W.; Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolinen. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
160. Gais, H. J.; Bülow, G.; Zatorski, A.; Jentsch, M.; Maidonis, P.; Hemmerle, H. Enzyme catalyzed asymmetric Synthesis. Enantioselectivity of Pig liver Esterase Catalyzed Hydrolyses of 4-Substituted Meso Cyclopentane-1,2-Diesters. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5115-5122.
161. Tamm, C. Pig liver esterase catalyzed hydrolysis: substrate specificity and stereoselectivity. *Pure & Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1187-1191.
162. Johnson, D. C.; Widlanski, T. S. Facile Deprotection of O-Cbz-Protected Nucleosides by Hydrogenolysis: An Alternative to O-Benzyl Ether-Protected Nucleosides. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4643-4646.
163. Pearlman, W. M. Noble metal hydroxides on carbon nonpyrophoric dry catalysts. *Tet. Lett.* **1967**, 1663-1664.
164. Watkins, B. E.; Kiely, J. S.; Rapoport, H. Synthesis of oligodeoxyribonucleotides using N-(benzyloxycarbonyl)-blocked nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5702-5708.

165. Chanley, J. D.; Feageson, E. A Study of the Hydrolysis of Phosphoramides. II. Solvolysis of Phosphoramidic Acid and Comparison with Phosphate Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *85*, 1181-1190.
166. Halmann, M.; Lapidot, A.; Samuel, D. The mechanism of hydrolysis of phosphoramidic acid. *J. Chem. Soc.* **1963**, 1299 - 1303.
167. Kanavarioti, A. Kinetics of the Hydrolysis of Guanosine 5'- Phospho-2-Methylimidazolid. *Origins of Life* **1986**, *17*, 85-103.
168. Marrian, D. H. A new adenine nucleotide. *Biochem. Biophys. Acta* **1953**, *12*, 492.
169. Liebermann, I. Identification of adenosine tetraphosphate from horse muscle. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3373-3375.
170. Lobaton, C. D.; Vallejo, C. G.; Sillero, A.; Sillero, M. A. Diguadenosintetraphosphatase from rat liver: activity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate. *Eur. J. of Biochem.* **1975**, *50*, 495-501.
171. Small, G. D.; Cooper, C. Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate. *Biochemistry* **1966**, *5*, 26-33.
172. Van Dyke, K.; Robinson, R.; Urquilla, P.; Smith, D.; Taylor, M.; Trush, M. An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* **1977**, *15*, 377-391.
173. Zamenick, P. C.; Stephenson, M. L. A possible regulatory site located at the gateway to protein synthesis. *Regulatory Mechanisms for Protein synthesis in Mammalian Cells*, Academic Press, New York **1968**, 3-16.
174. Kupriyanov, V. V.; Ferretti, J. A.; Balaban, R. S. Muscle adenylate kinase catalyzes adenosine 5'-tetraphosphate synthesis from ATP and ADP. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *869*, 107-111.
175. Ortiz, B.; Sillero, A.; Gunther Sillero, M. A. Specific synthesis of adenosine-(5')-tetraphospho-(5')-nucleoside and adenosine(5')oligophospho(5')adenosine (n > 4) catalyzed by firefly luciferase. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 263-270.
176. Gualix, J.; Abal, M.; Pintor, J.; Miras-Portugal, M. T. Presence of epsilon-adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of epsilon-ATP. *FEBS Lett.* **1996**, *391*, 195-198.
177. Cameselle, J. C.; Costas, M. J.; Sillero, M. A.; Sillero, A. Bis-(5'-guanosyl) tetraphosphatase in rat tissues. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 405-410.
178. Lee, J. W.; Jeon, S. J.; Kong, I. D. Identification of adenosine 5'-tetraphosphate in rabbit platelets and its metabolism in blood. *Korean. Journal of Physiology* **1995**, *29*, 217-223.
179. Lohrmann, R.; Orgel, L. E. Preferential formation of (2'-5')-linked internucleotide bonds in non-enzymatic reactions *Tetrahedron* **1978**, *34*, 853-855.
180. Shimazu, M.; Shinozuka, K.; Sawai, H. Facile synthesis of nucleotides containing polyphosphates by Mn(II) and Cd (II) Ion catalyzed Pyrophosphate bond formation in aqueous Solution. *Tet. Lett.* **1990**, *31*, 235-238.
181. Guranowski, A.; Starzynska, E.; Pietrowska-Borek, M.; Jemielity, J.; Kowalska, J.; Darzynkiewicz, E.; Thompson, M. J.; Blackburn, G. M. Methylene analogues of adenosine 5'-tetraphosphate. Their chemical synthesis and recognition by human and plant mononucleoside tetraphosphatases and dinucleoside tetraphosphatases. *FEBS Lett.* **2006**, *273*, 829-838.
182. Kruse, C. H.; Holden, K. G.; Offen, P. H.; Pritchard, M. L.; Feild, J. A.; Rieman, D. J.; Bender, P. E.; Ferguson, B.; Greig, R. G.; Poste, G. Synthesis and evaluation of multisubstrate inhibitors of an oncogene-encoded tyrosine-specific protein kinase. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1768-1772.
183. Ostermann, N. Struktur-Aktivitätsuntersuchungen antiviraler Vorläufermedikamente an Thymidylatkinasen Proteindesign für die gentherapeutische Pharmakomodulation der zellulären AZT-Aktivierung in der HIV-Therapie. *Dissertation*, Dortmund **2000**.

10.3 Danksagung

Allen denjenigen, die mich bei meiner Arbeit und auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Zuallererst gilt mein Dank meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Prof. Dr. Christa Müller, da sie mir ermöglicht hat, in ihrem Arbeitskreis dieses Thema zu bearbeiten. Ich konnte dabei sehr eigenständig arbeiten und bekam durch viele hilfreiche Diskussionen Impulse und stete Unterstützung. Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Bendas bedanken für die Übernahme des Koreferats.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren möchte ich mich bei Sabine Terhart-Krabbe, Annette Reiner und Marion Schneider bedanken, für die LC/MS-Analytik und Stabilitätsuntersuchungen meiner Substanzen möchte ich mich bei Marion Schneider und Frank Umbach bedanken.

Anja Scheiff, Younis Baqi und Aliaa Abdelraman möchte ich für die biologische Testung meiner Substanzen danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Jamshed Iqbal für seine Hilfe und für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken, Dr. Ali El-Tayeb möchte ich für die Einweisung in die HPLC und FPLC danken.

Frank Umbach, Heiko Meyer, Wolfgang Bosse, Markus Hubert und Philipp Seufert möchte ich dafür danken, dass sie bei kleinen und großen Computerproblemen stets ein offenes Ohr hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Fabian Heisig und Sabrina Gollos möchte ich für die Synthese des BODIPY-Fluorophors danken.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitskreise Müller und Gütschow für das angenehme Arbeiten und die gute, kollegiale Atmosphäre im Pharmazeutischen Institut Poppelsdorf und Enderich. Insbesondere möchte ich mich bei Andreas, Thomas, Heiko, Frank, Sabrina, Claudia, Marion und Julia für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Büro und viele lustige Abende danken.

Als Assistentin im 7. Semester habe ich mich sehr wohl gefühlt und durfte mit sehr lieben Kollegen zusammenarbeiten hierfür möchte ich mich bei Dr. Ralf Mayer, Dr.

Henrik Müller, Claudia Marzian, Anne Pick, Younis Baqi, Bernt Alsdorf, Peter Ripphausen und Aliaa El-Tayeb bedanken.

Ein außerordentlich großer Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter, die mich in meinem bisherigen Leben immer unterstützt hat, und auf die ich immer zählen kann, sowie meinen Geschwistern Daniela, Katharina, Birgit und Christoph. Danke, dafür dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir Mut gemacht habt. Insbesondere Katharina möchte ich für das Lesen der Arbeit danken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Manuel Willi für seine liebevolle persönliche Unterstützung und sein Verständnis danken.