

# Synthese basenmodifizierter Nukleosidtriphosphate und ihre enzymatische Polymerisation zu funktionalisierter DNA

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn



Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Oliver Thum

aus Koblenz

Bonn 2002



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

1. Referent: Prof. Dr. Michael Famulok

2. Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. Heinrich Wamhoff

Tag der Promotion:



---

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Natur als Vorbild: Evolution.....	1
1.2	Evolutionäre Methoden der biologischen Chemie .....	3
1.2.1	Verfahren zur Gewinnung funktionaler Peptide bzw. Proteine .....	3
1.2.2	Verfahren zur Gewinnung funktionaler Nucleinsäuren .....	6
2	Aufgabenstellung und Zielsetzung .....	13
3	Ergebnisse und Diskussion .....	15
3.1	Synthese und Charakterisierung der Nucleotide .....	15
3.1.1	Syntheseplanung .....	15
3.1.2	Synthese 8-modifizierter 2'-Desoxyadenosine .....	19
3.1.3	Synthese 7-modifizierter N-7-Deaza-2'-desoxypurine .....	23
3.1.4	Analytik und Charakterisierung der modifizierten Triphosphate .....	27
3.2	Molekularbiologische Experimente .....	30
3.2.1	Einbauversuche <i>via</i> PCR .....	30
3.2.2	Einbauversuche <i>via</i> Primer-Verlängerung.....	35
3.2.2.1	Einbaustudien unter Verwendung eines Modelltemplats .....	37
3.2.2.2	Untersuchungen an weiteren Templaten .....	42
3.2.2.3	Übertragung auf größere Ansätze .....	44
3.2.2.4	Untersuchungen unter Verwendung unterschiedlicher Nucleotide.....	45
3.2.3	fDNA als Templat für molekularbiologische Reaktionen.....	47
3.2.3.1	PCR-Amplifikation von fDNA .....	47
3.2.3.2	Restriktionsverdau von fDNA .....	50
3.3	Theoretische Untersuchungen .....	52
4	Zusammenfassung .....	63
5	Ausblick .....	64
6	Material und Methoden.....	66
6.1	Verwendete Materialien und Geräte .....	66
6.2	Synthesen.....	67
6.2.1	Synthese allgemein benötigter Vorstufen.....	68

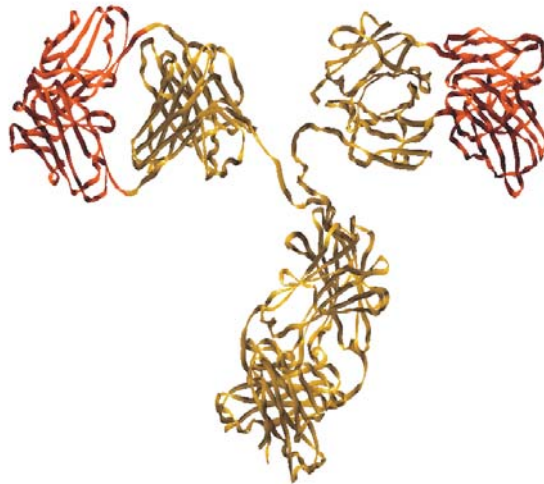
6.2.2	Synthese 8-modifizierter 2'-Desoxyadenosine .....	72
6.2.3	Synthese 7-modifizierter <i>N</i> -7-Deaza-2'-desoxyadenosine .....	83
6.2.4	Synthese 7-modifizierter <i>N</i> -7-Deaza-2'-desoxyguanosine .....	97
6.3	Molekularbiologische Methoden .....	107
6.3.1	5'-Markierung von DNA mit <sup>[32]</sup> P .....	107
6.3.2	Elektrophoretische Methoden .....	107
6.3.2.1	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	107
6.3.2.2	Agarosegelelektrophorese .....	108
6.3.3	Primer-Verlängerungsreaktionen .....	108
6.3.3.1	Analytische Primer-Verlängerung mit 5'-[ <sup>32</sup> P]-markierten Primern .....	109
6.3.3.2	Präparative Primer-Verlängerung mit biotinylierten Templaten .....	110
6.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	110
6.3.4.1	PCR mit modifizierten dNTPs .....	110
6.3.4.2	PCR mit fdNA-Templaten .....	111
6.3.5	Sequenzierung von PCR-Produkten .....	112
6.3.6	Restriktionsverdau .....	112
6.4	Quantenchemische Methoden .....	113
7	Literaturverzeichnis .....	114
8	Anhang .....	119
8.1	Ausgewählte Spektren .....	119
8.1.1	Charakterisierung von Verbindung <b>39</b> .....	119
8.1.2	Charakterisierung von Verbindung <b>47</b> .....	123
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	126
8.3	Übersicht über die verwendeten Nukleosidtriphosphate .....	128
8.3.1	Purinderivate .....	128
8.3.2	Pyrimidinderivate .....	129
8.4	Abbildungsverzeichnis .....	130
8.5	Danksagungen .....	137
9	Lebenslauf .....	139

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Natur als Vorbild: Evolution

Die Evolution ist eine der größten Faszinationen der Natur. Der kontinuierliche Zyklus aus Mutation (Veränderung), Selektion (Auslese) und Amplifikation (Vermehrung) ist der Schlüssel zur Artenvielfalt. Dies bildet die Grundlage des Lebens, wie wir es heute kennen.<sup>[1]</sup>

Die Entstehung neuer Spezies steht am Ende eines langen Prozesses, bestehend aus vielen kleinen evolutiven Schritten. Durch kontinuierliche Evolution passen sich Lebewesen ständig ihrer Umwelt und sich ändernden Lebensbedingungen an. Im Folgenden sollen zwei Beispiele die Fähigkeit lebender Systeme demonstrieren, in kurzer Zeit hochspezifische und wirkungsvolle molekulare Werkzeuge auf Proteinbasis zu generieren.



**Abbildung 1:** Kristallstruktur eines Antikörpers<sup>[2]</sup>, die variablen Regionen sind rot, die konstanten Regionen gelb dargestellt. Der Aufbau als Heterodimer, sowie die charakteristische Y-förmige Struktur sind gut zu erkennen.

Organismen besitzen Mechanismen, mit denen sie auf das Eindringen von Fremdstoffen, sogenannten Antigenen, reagieren können. Bei Vertebraten (Wirbeltieren) übernimmt diese Aufgabe das Immunsystem. Die Grundlage der humoralen Immunität bilden Antikörper, von B-Lymphozyten im Knochenmark produzierte Glycoproteine, welche die eingedrungenen Antigene hochspezifisch binden und neutralisieren oder für die Zerstörung durch Phagozyten vorbereiten. Die enorme Leistungsfähigkeit der Immunabwehr beruht auf der sich anpassenden Struktur der Antikörper (siehe Abbildung 1). Neben ausgeprägten konstanten Regionen, die für eine einheitliche Y-förmige Struktur sorgen, verfügen sie über variable Regionen, durch die sie spezifische Bindungsstellen generieren können. Die Gesamtstruktur ist jedoch

bei allen Antikörpern dieselbe, deshalb fasst man sie unter dem Begriff Immunglobuline zusammen. Somatische Mutationsvorgänge erhöhen das durch relativ wenige Gene codierte Immunglobulin-Repertoire nochmals um mehrere Zehnerpotenzen, so dass man von einer Gesamtzahl von  $10^{12}$  bis  $10^{14}$  verschiedener Antikörper ausgeht, die von einem Vertebraten theoretisch gebildet werden könnten.[3]

Darüber können Organismen binnen kurzer Zeit ihr Enzymrepertoire modifizieren, um sich so veränderten Bedingungen anzupassen. Bakterien können z. B. Resistenzen gegen Antibiotika entwickeln. Eine Vielzahl von Antibiotika sind Inhibitoren der Mureinsynthese, d. h. sie verhindern den Aufbau der bakteriellen Zellwand. Es bilden sich aber immer wieder Mutanten, die ihrerseits durch Evolution geeigneter Enzyme der antibakteriellen Wirkung entgehen. Im Falle der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wird z. B. durch  $\beta$ -Lactamasen spezifisch die Amidbindung des Lactams gespalten und somit die für ihre Wirkung notwendige zyklische Struktur zerstört. Eines der z. Zt. wirksamsten erhältlichen Antibiotika ist das Vancomycin, ein Glykopeptid, das von *Streptomyces orientalis* produziert wird. Es inhibiert ebenfalls die Mureinsynthese, indem es das endständige *N*-Acyl-D-Ala-D-Ala von Pentapeptidbausteinen, die als *Crosslinker* beim Aufbau der Zellwand fungieren, spezifisch bindet. Es stellt eine der letzten Möglichkeit zur Behandlung von Nosokomialinfektionen durch multiresistente Bakterien, z. B. durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, dar. Inzwischen haben sich auch vancomycinresistente Bakterienstämme gebildet, die dabei auf ein erstaunlich ausgeklügeltes System zurückgreifen. Diese Stämme haben es innerhalb weniger Jahre geschafft, insgesamt fünf verschiedene Proteine zu entwickeln, davon vier Enzyme mit ganz unterschiedlichen Funktionen, die letztlich das obige natürliche Pentapeptid in eine Variante umwandeln, die mit *N*-Acyl-D-Ala-D-Lac endet. Durch den formalen Austausch einer Peptid- durch eine Esterbindung geht ein Wasserstoffbrückendonator verloren, die Affinität des Vancomycins zu dem mutierten Baustein sinkt um den Faktor 1000 und die antibakterielle Wirkung lässt nach.[4]

Diese zwei Beispiele demonstrieren eindrucksvoll die Fähigkeit lebender Systeme, in kurzer Zeit maßgeschneiderte Biopolymere zu generieren, um ihr eigenes Überleben zu gewährleisten. Das Ziel vieler Forscher ist es, diese komplexen Vorgänge in das molekularbiologische Labor zu übertragen und künstlich Moleküle zu erzeugen, die vorgegebene Bindungs- oder Katalyseeigenschaften haben. Dabei sollten diese Verfahren Idealerweise folgende Eigenschaften haben:



- Sie sollten vollständig *in vitro* ablaufen.
- Sie sollten möglichst einfach, schnell und robust durchführbar sein.
- Sie sollten hochfunktionale Moleküle liefern, die in ihren Bindungs- bzw. Katalyseeigenschaften mit ihren natürlichen Vorbildern konkurrieren oder sie sogar überbieten können.

Da die entwickelten Techniken letztlich alle die Evolution nachahmen und analog zu der potentiellen Vielfalt tierischer Antikörper auf dem Vorliegen großer Molekülbibliotheken beruhen, fasst man diese Methoden unter dem Begriff der „evolutiven Kombinatorik“ zusammen. Sie bilden damit einen komplementären Ansatz zum rationalen Design solcher Substanzen, das durch die Komplexität von auf Biopolymeren basierenden Molekülen mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden nicht oder nur sehr eingeschränkt durchführbar ist.

Bis heute ist es nicht gelungen, evolutive Verfahren zu entwickeln, die ausschließlich auf Peptidbasis beruhen, d. h. reine Peptidbibliotheken verwenden (alternative Ansätze zur kombinatorischen Gewinnung funktionaler Proteine, die auf einer Verknüpfung des Peptids mit für sie kodierenden Nukleinsäuren beruhen, sind in Kapitel 1.2.1 beschrieben). Der Hauptgrund hierfür ist, dass die benötigten molekularbiologischen Werkzeuge zum Umgang mit Proteinen nicht vorhanden oder nur unzureichend brauchbar sind. So ist es z. B. nicht möglich, isolierte Peptide oder Proteine direkt zu amplifizieren. Auch bei der Sequenzierung solcher Moleküle stößt man schnell an die Grenzen der Verfahren, vor allem bezüglich der maximalen Größe.

Weltweit versuchen Forscher daher, Verfahren zu entwickeln, die den Idealvorstellungen möglichst nahe kommen. Dazu müssen entweder Kompromisse bezüglich der Vorgaben eingegangen oder gänzlich neue Methoden entwickelt werden. Kapitel 1.2 liefert einen kurzen Überblick über die wichtigsten etablierten Techniken auf diesem Gebiet.

## **1.2 Evolutive Methoden der biologischen Chemie**

### **1.2.1 Verfahren zur Gewinnung funktionaler Peptide bzw. Proteine**

Ein Ansatz zur Gewinnung neuer Enzyme bleibt dabei sehr nahe an seinen natürlichen Vorbildern. Seit längerem ist bekannt, dass ein Hauptaspekt der Enzymwirkung die Bindung und die damit einhergehende Stabilisierung des Übergangszustandes der zu katalysierenden Reaktion ist. Daraus entstand die Hypothese, dass ein Molekül, z. B. ein Antikörper, das spezifisch einen Übergangszustand bindet, in der Lage sein müsste, die zu Grunde liegende Reaktion zu

katalysieren. Also wurden stabile Übergangszustandsanaloga synthetisiert, an Trägerproteine gekoppelt und in Ratten oder Kaninchen injiziert. Tatsächlich konnten aus den Immunzellen der Milz nach Vermehrung durch Hybridisierung mit schnellwachsenden Myelomzellen Antikörper isoliert werden. Diese binden nicht nur das zugesetzte Analogon, sondern katalysieren auch die gewünschte chemische Reaktion, z. B. Diels-Alder Reaktionen.<sup>[5]</sup> Auf diese Art gewonnene Proteine nennt man katalytische Antikörper.<sup>[6,7]</sup> Diese Methode hat allerdings große Nachteile: Neben dem notwendigen präparativ-chemischen Aufwand müssen Versuchstiere und eine Zellkultur vorhanden sein, außerdem können die erhaltenen Antikörper in ihren katalytischen Fähigkeiten nicht mit natürlichen Enzymen konkurrieren.

Einen alternativen Ansatz, sich weiter an die in Kapitel 1.1 definierten Vorgaben anzunähern liefern die sogenannten Display-Techniken: Als erste wurde 1990 das Phagen-Display etabliert.<sup>[8,9]</sup> Hierbei wird die Eigenschaft von Bakteriophagen (Viren, die Bakterien infizieren) ausgenutzt, auf der äußeren Seite ihrer Hülle Proteine zu exprimieren. Von den elf im Phagen-genom codierten Proteinen (nummeriert von gIp bis gXIp) gehören fünf zu diesen Hüllproteinen, wobei gVIIIp mit etwa 2700 Kopien den Hauptteil der Phagenhülle ausmacht. Dabei lässt der Phage durchaus bestimmte Variationen und Veränderungen in der Sequenz dieser Proteine zu. Dies eröffnet die Möglichkeit, die natürlichen Proteine durch zusätzliche Aminosäuren zu modifizieren. Werden DNA-Sequenzen, die randomisierte, bzw. speziell konstruierte Bereiche tragen, an die Stelle des Phagen-genoms kloniert, die für den N-Terminus eines dieser Hüllproteine kodiert, präsentieren diese Phagen eine Proteinbibliothek an ihren Oberflächen. Dabei exprimiert jeder einzelne Phage nur ein zusätzliches Peptid, da er nur eine definierte DNA-Sequenz der verwendeten Bibliothek enthält. Meist dient gIIIp als Basis für diese Fusionsproteine, seltener gVIp oder gVIIIp. Nun können die Phagen auf einer Oberfläche inkubiert werden, auf welcher der gewünschte Bindungspartner („Target“) immobilisiert ist. Nicht bindende Phagen werden wegwaschen, die verbleibenden Phagen durch Infektion von *E. coli* vermehrt und dieser Zyklus wiederholt, bis die gewünschte Anreicherung erfolgt ist. Mit diesem Verfahren können nicht nur kleine Peptidsequenzen sondern auch ganze Proteine bis zu einer Größe von etwa 80 kD exprimiert werden.<sup>[10]</sup> Allerdings werden mit diesem Verfahren auf Grund der relativ eingeschränkten Diversität für gewöhnlich keine Proteine *de novo* generiert, sondern vorhandene durch Mutagenisierung optimiert oder variiert. Ein aktuelles Beispiel hierfür ist die Evolution einer RNA-Polymerase aus einer DNA-Polymerase.<sup>[11]</sup>

Zwei Weiterentwicklungen, die nach dem gleichen Prinzip funktionieren, nämlich der Verknüpfung von Phänotyp (exprimiertes Protein) und Genotyp (codierende DNA), vereinfachen diese Methode, da sie reine *in vitro*-Systeme sind. In dem Ribosomen-Display<sup>[12,13]</sup> wird eine randomisierte mRNA durch isolierte Ribosomen in das entsprechende Protein translatiert. Da die verwendete mRNA ohne Stopcodons versehen ist, unterbleibt nach der vollständigen Translation die Bindung der *Release*-Faktoren und damit die Abdissoziation des Ribosoms von der RNA. Der Komplex aus Ribosom, mRNA und gebildetem Protein wird durch Abkühlen auf 4 °C und Einstellung hoher  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen zusammengehalten. Analog zum Phagen-Display erfolgt die Selektion, hier *Panning* genannt, gegen das exprimierte Protein. Anschließend wird die mRNA der selektierten Komplexe isoliert und durch RT-PCR und nachfolgender reverser Transkription amplifiziert. Diese so erhaltene mRNA-Bibliothek wird dann erneut der Translation unterworfen, bis die gewünschte Anreicherung erfolgt ist.

In dem neuesten dieser Verfahren, dem mRNA-Display<sup>[14,15]</sup> oder *peptide-fusion*-System, wird die mRNA an ihrem 3'-Ende mit einer DNA-Sequenz versehen, die 3'-terminal mit dem Antibiotikum Puromycin, einem Analogon der Tyrosyl-tRNA, verknüpft ist. Wie beim Ribosomen-Display erfolgt eine *in vitro*-Translation, die beim Erreichen des ersten Desoxynukleotids endet. In diesem Moment gelangt das Puromycin in die freie A-Bindungsstelle des Ribosoms, wo durch Transpeptidierung der Peptidstrang kovalent mit dem Puromycin und dadurch mit der mRNA verknüpft wird. Diese stabile kovalente Verknüpfung erlaubt es, im Laufe der Selektion auch Bedingungen anzuwenden, unter denen der Ribosomen-mRNA-Komplex des Ribosomen-Displays instabil ist und zerfällt.

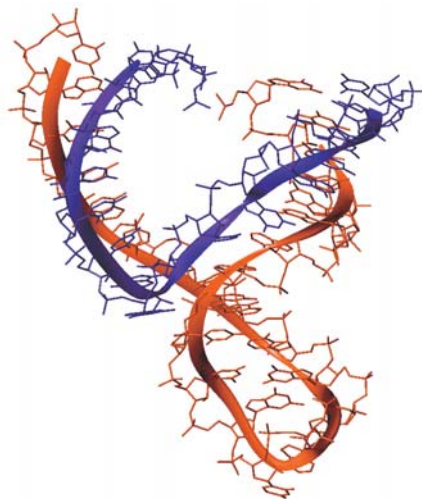
Alle hier beschriebenen Display-Methoden haben aber auch große Nachteile, vor allem technischer Natur. Beispielsweise kann nicht immer gewährleistet werden, dass sich die exprimierten Proteine korrekt falten oder Disulfidbrücken bilden. Darüber hinaus sind einige der notwendigen Schritte sehr zeitaufwändig, andere liefern relativ schlechte Ausbeuten. So liegt die Translationseffizienz des Ribosomen- und des mRNA-Displays nur in der Größenordnung von 1 %, was die Diversität der eingesetzten Bibliothek an dieser Stelle um zwei Zehnerpotenzen senkt.

All diese Methoden führen zwar zu dem gewünschten Ziel, der Gewinnung funktionaler Peptide und Proteine aus kombinatorischen Bibliotheken, sie erfüllen aber noch nicht alle Anforderungen, wie sie in Kapitel 1.1 definiert wurden. Vor allem können sie in Einfachheit und Schnelligkeit nicht mit den *in vitro*-Selektionen funktionaler Nukleinsäuren konkurrieren

(siehe Kapitel 1.2.1), die inzwischen voll automatisiert am Roboter in 2 bis 3 Tagen durchgeführt werden können.<sup>[16]</sup>

### 1.2.2 Verfahren zur Gewinnung funktionaler Nukleinsäuren

Ganz neue Möglichkeiten boten sich durch die bahnbrechende Entdeckung, dass Nukleinsäuren entgegen langjähriger Annahmen nicht nur für die Speicherung und Weitergabe der genetischen Information verantwortlich sind, sondern auch funktionelle Eigenschaften haben können: CECH und Mitarbeiter isolierten aus *Tetrahymena thermophila* eine rRNA, die ihr eigenes Splicen, also ihre eigene sequenzspezifische Spaltung katalysiert.<sup>[17]</sup> Etwa zeitgleich konnten ALTMAN und Mitarbeiter zeigen, dass bei der RNase P aus *E. coli*, einem wichtigen Enzym bei der posttranskriptionalen Prozessierung der tRNA, eine 377 NT lange RNA-Komponente für die enzymatische Aktivität verantwortlich ist.<sup>[18]</sup>



**Abbildung 2:** Kristallstruktur<sup>[19]</sup> des Hammerhead-Ribozyms, einem der ersten und bekanntesten natürlich vorkommenden Ribozyme, welches die sequenzspezifische Spaltung von RNA katalysiert. In dieser Struktur ist katalytisch aktive Region rot, und der zu spaltende Strang blau eingefärbt.

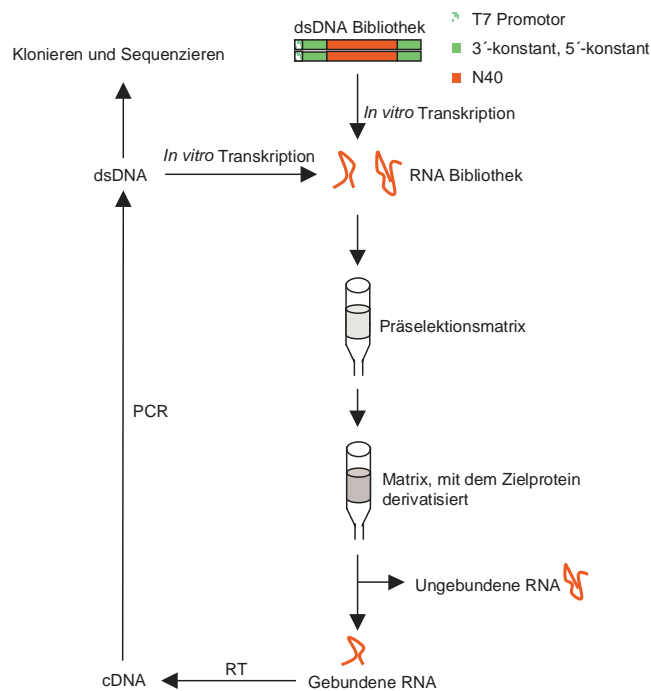
Inzwischen wurden weitere natürlich vorkommende katalytische Nukleinsäuren (Ribozyme) identifiziert. Eine der bedeutendsten Entdeckung in jüngster Zeit ist sicherlich, dass das katalytische Element des Ribosoms seine vorhandene 23S-rRNA ist, und sein Proteinanteil vermutlich hauptsächlich zur Strukturbildung dient.<sup>[20,21]</sup> Kleine Ribozyme, z. B. das Hammerhead-Ribozym (siehe Abbildung 2), haben inzwischen auch Anwendung in biotechnologischen Verfahren gefunden, z. B. im Screening von Substanzbibliotheken auf pharmakologische Eigenschaften.<sup>[22]</sup>

Da manche natürlich vorkommende Nucleinsäuren Katalyseeigenschaften zeigen, lag es nahe anzunehmen, dass sie, analog zu Antikörpern oder Rezeptoren, auch Moleküle erkennen und spezifisch binden können müssten (Antikörper auf Nucleinsäurebasis, sogenannte Aptamere). Gestärkt wurde diese Idee durch die Feststellung, dass sowohl Proteinenzyme als auch Ribozyme in ihren aktiven Formen definierte Sekundär- bzw. höhere Strukturen einnehmen. Diese Strukturen sind Grundlage ihrer Funktion, z. B. durch Bildung von Bindungstaschen. Beiden Enzymgattungen liegen ähnliche Struktur- und Katalyseprinzipien zu Grunde: Sowohl die Ausbildung der räumlichen Struktur als auch die Bindung der Reaktionspartner erfolgt im Wesentlichen durch nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen.[23]

Für evolutive Techniken interessant werden Nucleinsäuren durch die Existenz aller nötigen Techniken, die den einfachen Umgang mit ihnen ermöglichen: DNA lässt sich beliebig über die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizieren, in RNA transkribieren und aus RNA durch reverse Transkription erzeugen. Dies sind alle Methoden, die für Proteine nicht verfügbar sind. Weiterhin lässt sie sich, analog zu Peptiden, automatisierbar sequenzieren und an der Festphase in guten Ausbeuten synthetisieren. Schließlich lassen sich unterschiedliche Nucleinsäuremoleküle auch durch Klonierung in Vektoren und Gewinnung monoklonaler Kulturen wieder aus komplexen Gemischen trennen - eine notwendige Bedingung zur Charakterisierung und Identifizierung mit kombinatorischen Verfahren gewonnener Verbindungen.

Anfang der neunziger Jahre wurde ein Verfahren entwickelt, dass die Selektion von funktionalen Nucleinsäuren aus großen, randomisierten Bibliotheken ermöglicht: die *in vitro*-Selektion[24], auch SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)[25] genannt (Abbildung 3). Beginnend mit einer Startbibliothek von bis zu  $10^{15}$  verschiedenen Molekülen (diese Zahl übertrifft das tierische Antikörperrepertoire und lässt sich am DNA-Synthesizer herstellen) werden durch Affinitätschromatographie diejenigen Moleküle isoliert („selektiert“), welche die gewünschten Eigenschaften am besten erfüllen. Um die Spezifität der Bindung zu erhöhen, wird zunächst eine Präselektion ohne Target durchgeführt. So wird der Anteil an Molekülen minimiert, die nicht das Target, sondern die Matrix oder einen anderen Bestandteil der Reaktionsmischung binden. Im späteren Verlauf kann die Spezifität weiter erhöht werden, indem Analoga des Targets zur Präselektion verwendet werden, z. B. Enantiomere oder, etwa bei Protein-Targets, ähnliche Domänen. Statt der Affinitätschromatographie kann auch ein beliebiges anderes Verfahren, dass auf einer Wechselwirkung zwischen Nuk-

leinsäure und dem Target beruht, verwendet werden, z. B. die Mobilitätsänderung von Komplexen aus Nucleinsäuren und Target in nativen Gelen.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung einer Aptamerselektion auf RNA-Basis, hier gegen ein Protein, entnommen aus Lit.[26] Die verwendete Nucleinsäurebibliothek enthielt neben den konstanten 3'- und 5'-Primer-Regionen die Sequenz für den T7-Promoter und einen 40 NT umfassenden randomisierten Bereich (N40)

Nach ihrer Abtrennung werden die Oligonukleotide mittels PCR (im Falle von RNA durch RT-PCR, gefolgt von *in vitro*-Transkription) amplifiziert und erneut diesem Verfahren unterworfen. Von Runde zu Runde wird durch Anpassung der Reaktionsbedingungen ein höherer Selektionsdruck ausgeübt, die Stringenz wird erhöht. Dies geschieht z. B. durch Verkürzung der Inkubationszeiten oder durch Verringerung der eingesetzten Targetmenge, bis nur noch die Moleküle mit den besten Bindungs- oder Katalyseeigenschaften selektiert werden. Eine Anreicherung aktiver Sequenzen erfolgt in der Regel nach 5-15 Selektionszyklen. Die erhaltenen Nucleinsäuren können nun sequenziert und die Eigenschaften jedes einzelnen Oligonukleotids experimentell bestimmt werden. Mit diesem Verfahren sind inzwischen etwa 50 verschiedene Ribozyme<sup>[27,28]</sup> und mehr als 200 verschiedene Aptamere<sup>[29]</sup> gewonnen worden, von denen einige sogar erfolgversprechende Anwendungen *in vivo*<sup>[30,31]</sup> fanden (sogenannte *Intramere*). Tabelle 1 zeigt einige ausgewählte Beispiele funktionaler, durch *in vitro*-Selektion gewonnener Nucleinsäuren.

Klasse	verwendete Nukleinsäuren	Funktion
Aptamer	RNA	$\alpha$ -Thrombin-Binder <sup>[32]</sup>
	RNA	FMN-Binder <sup>[33]</sup>
	2'-F-/2'-MeO-RNA	Tenascin-C-Binder <sup>[34]</sup>
	DNA	ATP-Binder <sup>[35]</sup>
Intramer	RNA	Cytohesin-Binder <sup>[36]</sup>
Ribozym	RNA	Michaelase <sup>[37]</sup>
	RNA	Diels-Alderase <sup>[38]</sup>
	DNA	RNase <sup>[39]</sup>
	mod. DNA	RNase <sup>[40]</sup>

**Tabelle 1:** Auswahl einiger durch *in vitro*-Selektion gewonnener funktionaler Nukleinsäuren.

Die auf Nukleinsäuren basierenden Methoden haben aber auch Nachteile im Vergleich zu den Verfahren, die Proteine verwenden: Während Proteine aus 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, die posttranslational noch weiter modifiziert werden können, sind Nukleinsäuren auf vier Nukleotide limitiert, die zudem noch eine beschränkte Auswahl an funktionellen Gruppen tragen. Wird DNA statt RNA verwendet, weil diese stabiler und einfacher zu handhaben ist, geht mit der 2'-OH-Gruppe noch eine der wenigen vorhandenen Funktionen verloren. Zwar wird versucht, diesen Mangel auszugleichen, indem durch Verwendung sehr großer Bibliotheken der Sequenzraum vergrößert wird, nach der Selektion durch Mutagenisierung die Eigenschaften weiter optimiert oder Kofaktoren zugegeben werden. Der intrinsische Nachteil der eingeschränkten Funktionalitäten kann aber nur beschränkt kompensiert werden. Daher gibt es Targets bzw. chemische Reaktionen, für die bis heute keine oder nur mittelmäßige Aptamere bzw. Ribozyme selektiert wurden.

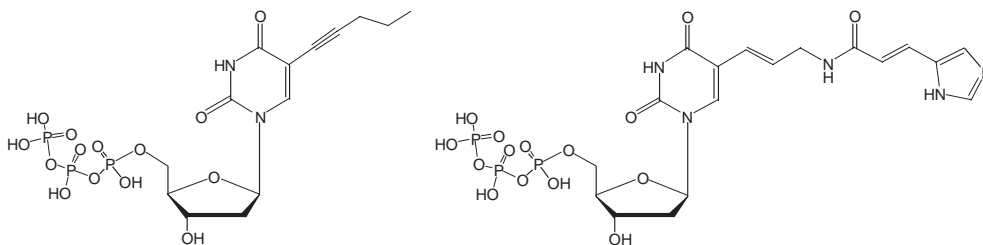
Während also die *in vitro*-Selektionen mit dem Problem der eingeschränkten Funktionalität zu kämpfen haben, sind die Display-Techniken (siehe Kapitel 1.2.1) noch immer zu aufwändig. Außerdem ist allen Verfahren gemeinsam, dass die gewonnenen Moleküle oftmals nicht mit den Bindungs- oder Katalysefähigkeiten der entsprechenden natürlichen Proteine konkurrieren können. Es besteht also weiterhin großer Bedarf an neuen Techniken, die alle in Kapitel 1.1 definierten Vorgaben erfüllen.

Eine Idee, die existierenden Methoden in dieser Hinsicht zu verbessern, besteht darin, den Vorteil der direkten enzymatischen Amplifikation von Nukleinsäuren mit der chemischen Diversität der funktionellen Gruppen von Peptiden zu kombinieren. Im Unterschied zu den



Display-Techniken, wo dies durch Verknüpfung von Proteinen mit ihren codierenden mRNA- oder DNA-Sequenzen geschieht, stellt das Einbringen proteinogener Funktionen in die Nukleinsäure selbst eine interessante Alternative dar: Wenn es gelingt, die Nukleinsäure durch Einbau von Nukleotiden zu modifizieren, die funktionelle Gruppen besitzen, wie sie in Aminosäuren vorkommen, und diese modifizierten Nukleinsäuren ihre natürlichen Analoga in allen notwendigen molekularbiologischen Techniken ersetzen können, sollten auch sie die Grundlage einer evolutiven Technik bilden können. Diese wäre mit der Einfachheit der *in vitro*-Selektion durchzuführen, die verwendeten Biopolymere könnten aber das Potenzial von Proteinen erreichen.

Erste Ansätze solcher Verfahren sind seit längerem bekannt, vor allem, da auch die Natur sich solcher Modifikationen bedient: So ist etwa die Hälfte der Thyminpositionen in der DNA des Phagen  $\phi$ W-14 durch 5-(4-Aminobutylaminomethyl)uracil ersetzt, eine Strategie, mit der sich dieses Virus gegen Restriktionsverdau schützt.[41,42] Erste Experimente zur enzymatischen Generierung derart modifizierter Nukleinsäuren stammen aus den 90er Jahren und wurden hauptsächlich an RNA durchgeführt,[43] schließlich wurden auch funktionalisierte Uridine in der Selektion von zwei Ribozymen eingesetzt.[44,45] Aufgrund des leichteren Umgangs mit DNA fokussierten sich die Arbeiten später auf die Synthese von modifizierten 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten und Untersuchungen zu deren enzymatischem Einbau in DNA durch DNA-Polymerasen. Im Wesentlichen beschränken sich diese Arbeiten aber auf die Modifikation von Thymin, da hier der geringste präparative Aufwand nötig ist, um solche Derivate zu erhalten. Das erste Beispiel stammt aus dem Jahr 1994, in dem LATHAM et al. ein an Position C-5 mit Pektin substituiertes 2'-Desoxyuridinderivat (siehe Abbildung 4) als Ersatz für Thymin zur *in vitro*-Selektion eines  $\alpha$ -Thrombin-Aptamers einsetzten.[46]



**Abbildung 4:** Darstellung der von LATHAM et al. (links) und SANTORO et al. (rechts) verwendeten 5'-modifizierten 2'-Desoxyuridintriphosphate.



Arbeiten vom SAKTHIVEL et al. aus dem Jahre 1998<sup>[47]</sup> zeigten zum ersten Mal das Potenzial dieser Methode auf, indem eine ganze Reihe von 2'-Desoxyuridinderivaten hergestellt wurde, die mit unterschiedlichen Aminosäuren modifiziert waren und fast alle durch verschiedene DNA-Polymerasen als Substrat akzeptiert wurden.

Später haben BATTERSBY et al. versucht, den Einfluss eines modifizierten Nukleotids auf die Selektion eines Aptamers systematisch zu untersuchen.<sup>[48]</sup> Dazu führten sie parallel die Selektion eines Adenosinnukleotid-Aptamers sowohl mit natürlicher DNA als auch mit DNA durch, die statt Thymidin ein propargylamin-modifiziertes 2'-Desoxyuridin als Baustein verwendete. Die Autoren konnten aus allen Ansätzen Aptamere mit guten Bindungseigenschaften gewinnen, allerdings waren keine dramatischen Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den Molekülen aus natürlicher DNA und denen aus modifizierter DNA zu erkennen.

SANTORO et al.<sup>[40]</sup> wiesen dann nach, dass die Verwendung modifizierter Nukleotide bei der Selektion katalytischer Nukleinsäuren zu Ribozymen führen kann, in der die gewonnenen Sequenzen günstigere Eigenschaften haben, als ihre entsprechenden Analoga, die aus natürlicher DNA gewonnen wurden. In einer früheren Arbeit selektierten SANTORO und JOYCE ein DNA-Analogon der RNase A, also ein RNA-spaltendes Desoxyribozym, das allerdings nur in Anwesenheit von 10 mM  $Mg^{2+}$ -Ionen maximal aktiv war.<sup>[39]</sup> Diese Selektion wurde dann unter Verwendung eines dUTP-Derivats wiederholt, das mit einer Imidazolgruppe funktionalisiert war (siehe Abbildung 4). Ausgehend von der gleichen Startbibliothek konnten sie ein DNAzym selektieren, das über ähnliche kinetische Parameter verfügt wie sein Analogon aus natürlicher DNA. Dazu benötigt es aber neben mikromolaren Mengen von  $Zn^{2+}$  nur ein Zehntel der  $Mg^{2+}$ -Konzentration, 1 mM statt 10 mM. Nach Bestimmung des Minimalmotivs wurde eines der kleinsten bekannten Nukleinsäureenzyme erhalten, dessen Wert für  $k_{cat}$  darüber hinaus etwa zehnmal größer ist als bei den anderen Ribozymen ähnlicher Größe.

Inzwischen wurde in ein weiteres Analogon der RNase A selektiert, das durch die gleichzeitige Inkorporation eines Allylamin-modifizierten Uridins und eines Imidazol-modifiziertes Adenosins ganz ohne Metallkofaktoren auskommt.<sup>[49]</sup> Weiterhin konnte gezeigt werden, dass prinzipiell auch Cytidin-<sup>[50]</sup> und Guanosinderivate<sup>[51]</sup> erfolgreich enzymatisch in DNA inkorporiert werden können.

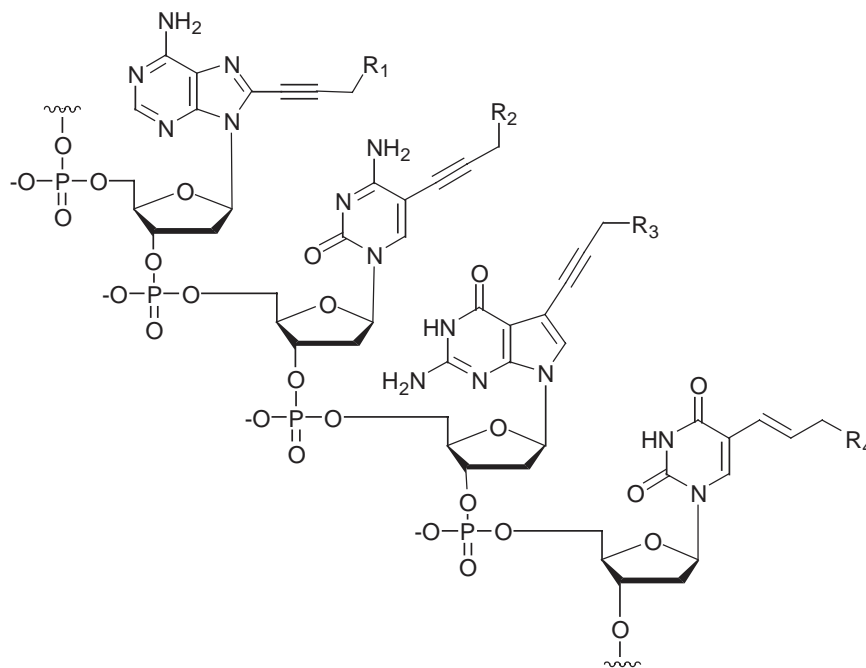
Diese ersten Ergebnisse deuten darauf hin, dass modifizierte Nukleotide tatsächlich die Bindungs- und Katalyseeigenschaften von Desoxyribonukleinsäuren positiv beeinflussen können. Zwar zeigen die selektierten Aptamere, die zusätzliche Funktionalitäten tragen, keine wesent-

lich besseren Bindungseigenschaften als vergleichbare Sequenzen aus natürlicher DNA, aber bis jetzt wurden auch nur solche Selektionen mit modifizierter DNA durchgeführt, aus denen bereits erfolgreich funktionale Nukleinsäuren auf Basis von natürlicher DNA gewonnen worden waren. Interessanter werden solche modifizierten Nukleotide aber wahrscheinlich für die Selektion von Aptameren gegen Substanzklassen, gegen die bisher erfolglos versucht wurde, mit natürlicher DNA zu selektieren oder von Ribozymen, die komplexere chemische Reaktionen katalysieren sollen.

Trotzdem ist die eigentliche Leistungsfähigkeit dieser Methode, nämlich alle vier Bausteine der natürlichen DNA mit vier unterschiedlichen chemischen Funktionen zu versehen und damit einer DNA die zusätzliche Funktionalität vergleichbar mit der von vier Aminosäuren zu geben, nicht ausgeschöpft. Ziel muss es sein, für jede Base einen Satz von Analoga mit verschiedenen funktionellen Gruppen verfügbar zu haben. Mit Hilfe einer solchen „Tool-Box“ wäre das maßgeschneiderte Design von DNA-Bibliotheken, angepasst an das jeweilige Target oder aber die zu katalysierende Reaktion möglich. So könnten zur Selektion von Aptameren gegen sehr unpolare Targets, wie z. B. Steroide, eher unpolare Modifikationen verwendet werden, während bei einem sehr polaren Target, z. B. einem Peptid, die passenden polaren Verbindungen zum Einsatz kämen.

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist es, eine funktionalisierte DNA (fDNA) herzustellen, in der jede natürliche Base durch eine Variante ersetzt ist, die jeweils eine andere zusätzliche chemische Funktionalität trägt. So soll ein Biopolymer erzeugt werden, das auf Basis von DNA vier verschiedene funktionelle Gruppen bereitstellt, wie sie für gewöhnlich in wichtigen Aminosäuren vorkommen. Diese fDNA muss voll kompatibel zu den Techniken und Methoden der *in vitro*-Selektion funktionaler Nukleinsäuren sein. Das heißt, die fDNA muss von DNA-Polymerasen durch eine templatgesteuerte enzymatische Polymerisation aus den entsprechenden modifizierten Nukleosidtriphosphaten gebildet werden können und selbst wiederum als Templat einer enzymatischen Amplifikation durch eine Polymerasekettenreaktion dienen können. Dabei ist zu gewährleisten, dass sowohl der Einbau als auch die Replikation sequenzspezifisch erfolgt.



**Abbildung 5:** Schematisches Beispiel der zu generierenden fDNA. In diesem DNA-Strang sind vier mögliche Verknüpfungsmöglichkeiten für die einzuführenden Funktionalitäten dargestellt (von oben links nach unten rechts): Ein 8-alkinmodifiziertes 2'-Desoxyadenosin, ein 5-alkinmodifiziertes 2'-Desoxycytidin, ein 7-alkinmodifiziertes *N*-7-Deaza-2'-desoxyguanosin sowie ein 5-alkenmodifiziertes 2'-Desoxyuridin.

Hierzu sollen geeignete Derivate der Purinnukleotide 2'-Desoxyadenosintriphosphat und 2'-Desoxyguanosintriphosphat aus leicht erhältlichen Vorstufen in Mengen synthetisiert werden, die *in vitro*-Selektionsexperimente ermöglichen. Der enzymatische Einbau dieser Verbindungen und der entsprechenden Derivate der Pyrimidinnukleotide 2'-Desoxycytidintriphosphat und 2'-Desoxythymidintriphosphat (hergestellt von Herrn Dipl.-Chem. Stefan JÄGER) durch

kommerziell erhältliche DNA-Polymerasen soll untersucht werden. Hierzu sollen zunächst an Modelltemplaten die einzelnen Parameter der enzymatischen fDNA-Generierung und ihrer Amplifikation dahingehend optimiert werden, dass der gleichzeitige Einbau von vier modifizierten Nukleotiden erfolgreich ist. Der Erfolg ist zu dokumentieren, indem ein formaler Selektionszyklus erfolgreich durchlaufen wird, bestehend aus:

- Enzymatischer Generierung der fDNA
- Reinigung der einzelsträngigen fDNA
- Amplifikation der fDNA

Um zu beweisen, dass der Einbau der modifizierten Nukleotide sequenzspezifisch erfolgt, sind zunächst geeignete Kontrollexperimente durchzuführen. Der abschließende Nachweis des korrekten Einbaus und der sequenzgetreuen Amplifikation muss schließlich durch Sequenzierung der fDNA-Amplifikate, d. h. der PCR-Produkte, erfolgen.

Um die Anwendbarkeit für *in vitro*-Selektionen zu zeigen, ist es wichtig, dass das Verfahren nicht nur an Modelltemplaten funktioniert, sondern auch generell anwendbar ist. Daher sind die an den Modelltemplaten gewonnenen Ergebnisse mit anderen Templaten zu wiederholen, die entweder anspruchsvollere Sequenzen oder größere randomisierte Bereiche tragen. Mit einer erfolgreichen Übertragung auf diese Template sollte die allgemeine Anwendbarkeit hinreichend demonstriert sein, so dass die Basis für entsprechende Selektionsexperimente bereitgestellt ist.

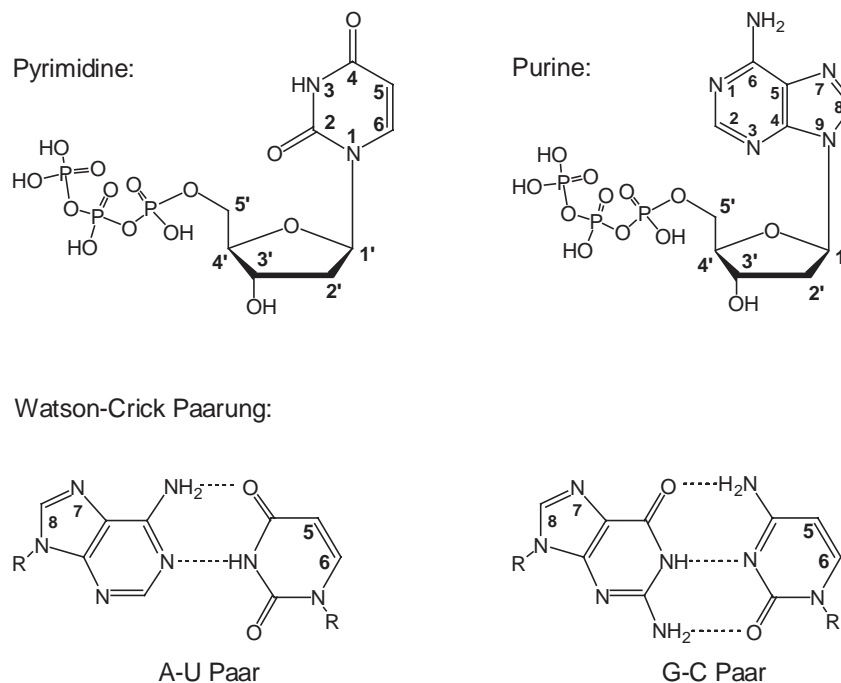
Schließlich sollen erste Charakterisierungen der erzeugten fDNA vorgenommen werden, um das Verhalten dieser Biopolymere analysieren zu können, soweit diese Untersuchungen nicht bereits im Rahmen der Inkorporationsstudien durchgeführt wurden. So soll z. B. die Aktivität von Restriktionsendonukleasen an fDNA-Templaten untersucht werden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Synthese und Charakterisierung der Nukleotide

#### 3.1.1 Syntheseplanung

Den Beginn des Projekts bildete die Synthese der modifizierten Purinnukleoside und deren Überführung in die entsprechenden Triphosphate. Um eine erfolgreiche Erkennung und Inkorporation durch DNA-Polymerasen zu gewährleisten, war eine sorgfältige, rationale Planung der Zielmoleküle nötig. Die bereits bekannten Studien zum Einbau modifizierter Pyrimidin-Derivate zeigten, dass die Position C-5 der Nukleobase geeignet ist, unter bestimmten Randbedingungen zusätzliche funktionelle Gruppen anzubringen. In der durch enzymatischen oder synthetischen Einbau entstandenen doppelsträngigen DNA (dsDNA) zeigen diese Gruppen in die große Furche (*major groove*) und minimieren daher störende Einflüsse auf die Raumstruktur. Außerdem liegt die Position C-5 außerhalb der an der WATSON-CRICK-Paarung beteiligten Seite der Pyrimidinbasen (siehe Abbildung 6), so dass sowohl der sequenzgetreue Einbau, als auch die korrekte Replikation möglich sind.



**Abbildung 6:** Übersicht über die Struktur und Nummerierung der Triphosphate vom Pyrimidin- und Purintyp (oben), sowie über die WATSON-CRICK Basenpaarung in dsDNA.

Theoretisch denkbar sind natürlich auch Modifikationen an anderer Stelle des Nukleotids, z. B. am Zucker. Vorliegende Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen aber, dass bereits geringe Modifikationen am Zucker einen signifikanten Einfluss auf den Einbau solcher

Nukleotide in DNA<sup>[52]</sup> und auf ihre Erkennung im Primer und im Templat haben.<sup>[53]</sup> Auch eine Manipulation der Triphosphatgruppe scheidet im Wesentlichen aus. Zum einen wird nur eine Phosphatgruppe in das Oligonukleotid eingebaut, zum anderen ist diese Gruppe für den Ablauf der chemischen Reaktion, die der Polymerisation zu Grunde liegt, nötig, so dass sich hier nur wenig Spielraum für Modifikationen ergibt.

Nur wenige Studien haben sich bisher mit dem optimalen Design der eingeführten funktionellen Gruppen beschäftigt. Die vorhandenen Ergebnisse legen allerdings nahe, dass diese optimalerweise über Linker mit eingeschränkter Flexibilität eingebracht werden. Während zum Beispiel synthetisch hergestellte dsDNA, die alkynyl- oder alkenylsubstituierte Pyrimidine trägt, höhere Schmelztemperaturen zeigt als ihre natürlichen Varianten, wird die Schmelztemperatur von analogen Alkansubstituenten gesenkt.<sup>[54]</sup> Dies ist ein Hinweis auf eine Stabilisierung der doppelsträngigen Struktur der DNA durch starre, konformativ eingeschränkte Modifikationen, wohingegen die flexiblen Alkanderivate zu einer deutlichen Destabilisierung führen. Ebenso wurde gezeigt, dass die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) alkynyl- oder alkenylsubstituierte Thymidintriphosphate als Ersatz für TTP in Polymerasekettenreaktionen (PCR) akzeptiert, nicht jedoch die entsprechenden gesättigten Derivate.<sup>[55]</sup> Ähnliche Effekte wurden beobachtet, wenn im Falle von auf Allylamin basierenden Linkern die Flexibilität durch Verwendung von Amin- statt Amidbindungen zum Verknüpfen mit weiteren funktionellen Gruppen erhöht wurde.<sup>[47]</sup>

Bei den Purinbasen sind im Vergleich zu den Pyrimidinen deutlich weniger Studien bekannt, die sich mit der Verwendung von modifizierten Analoga in DNA beschäftigen. Daher müssen beide Positionen, die eine Modifikation ohne Beeinflussung der Basenerkennung ermöglichen, nämlich *N*-7 und *C*-8, in Betracht gezogen werden. Die erstere entspricht dabei am ehesten der Position *C*-5 von Pyrimidinen, vor allem bezüglich ihrer räumlichen Ausrichtung in der dsDNA. Die Literatur liefert allerdings widersprüchliche Aussagen über die optimale Positionierung von Seitenketten. Zwar wird seit langem von destabilisierenden Effekten 8-modifizierter Purine berichtet,<sup>[56]</sup> in jüngster Zeit deuten aber UV- und CD-spektroskopische Experimente darauf hin, dass diese Effekte auch bei großen Substituenten relativ gering ausfallen können.<sup>[57]</sup> Auch ist ein Beispiel eines 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosins beschrieben, das erfolgreich enzymatisch eingebaut und zur *in vitro*-Selektion verwendet wurde.<sup>[49,58]</sup> 8-Modifizierte Purine sind leicht aus den natürlichen 2'-Desoxynukleosiden zugänglich, so dass mit geringem präparativen Aufwand solche Derivate herstellbar sind.

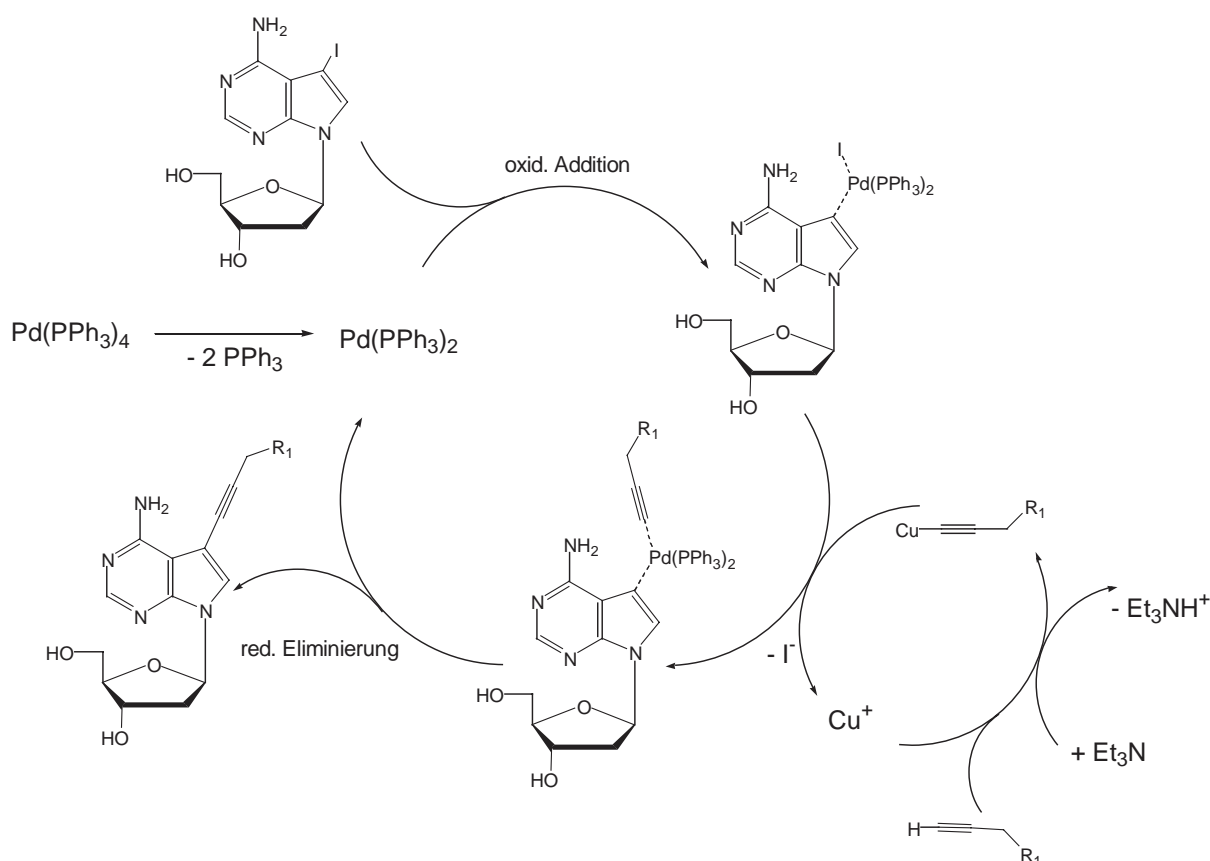
Auf der anderen Seite sind stabile Derivatisierungen an *N*-7 wegen des dadurch entstehenden quartären Stickstoffzentrums nicht möglich. Um an Position 7 zusätzliche Seitenketten anzubringen, werden gewöhnlich *N*-7-Deazapurine verwendet, in denen *N*-7 durch ein Kohlenstoffatom ersetzt ist und die *de novo* synthetisiert werden müssen. Sie leiten sich von dem antiviral wirksamen Tubercidin ab, das aus Mikroorganismen (*Streptomyces spp.*) isoliert wurde.<sup>[59]</sup> Die erste molekularbiologische Anwendung fanden *N*-7-Deazapurintriphosphate in PCR-Experimenten, bei denen sie ihre entsprechenden natürlichen Nukleotide vollständig ersetzten, was zu Oligonukleotiden mit neuen, wünschenswerten Eigenschaften führte, z. B. der Absenkung der Schmelztemperatur von dsDNA (interessant bei GC-reichen DNA-Sequenzen) oder der verbesserten Auflösung von DNA-Banden in der Polyacrylamidgelelektrophorese. Daher wird z. B. *N*-7-Deaza-dGTP heute für die Sequenzierung von DNA mit der Kettenabbruchmethode verwendet.<sup>[60]</sup> Später zeigte sich, dass auch 7-modifizierte *N*-7-Deaza-2'-desoxypurine problemlos in die helikale Struktur der dsDNA eingebracht werden und teilweise ihre Stabilität sogar erhöhen können.<sup>[61-63]</sup> Interessanterweise werden auch solche Nukleoside in der Natur gefunden. So wurde z. B. das 5-Iodo-2'-desoxytubercidin aus der Rotalge *Hypnea valendiae* isoliert.<sup>[64]</sup> Schließlich wurden kürzlich in zwei Arbeiten 7-modifizierte *N*-7-Deazapurintriphosphate hergestellt und enzymatisch durch Polymerasekettenreaktion inkorporiert<sup>[51,65]</sup>. Es wurde also der Nachweis erbracht, dass derartige Verbindungen als Ersatz für ihre natürlichen Analoga in enzymatischen Reaktionen prinzipiell geeignet sind.

Da sowohl 8-modifizierte 2'-Desoxypurine als auch die entsprechenden 7-modifizierten *N*-7-Deaza-2'-desoxypurine für die angestrebten Experimente in Frage kamen, sollten zunächst die einfacher zu synthetisierenden 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosintriphosphate hergestellt und ihre Eignung zum Einsatz in enzymatischen Polymerisationen überprüft werden. Anhand der daraus gewonnenen Erkenntnisse bezüglich ihres Einbaus in DNA sollten dann weitere Synthesen, auch für Guanosinderivate, geplant werden.

Da, wie oben beschrieben, laut Literaturangaben die Verwendung ungesättigter Linker positive Auswirkungen auf die Fähigkeit modifizierter Nukleotide hat, als Ersatz für die natürlichen Substrate zu dienen, wurden terminale Alkine zur Derivatisierung der Nukleoside gewählt. Diese lassen sich in guten Ausbeuten durch Palladiumkatalyse in Sinne einer SONOGASHIRA-Kupplung<sup>[66]</sup> mit entsprechend halogenierten Vorstufen verknüpfen und sind daher zur Deri-

vatisierung von Nucleosiden geeignet. Einige Beispiele finden sich bereits in der Literatur.[67-70]

Bei der SONOGASHIRA-Kupplung (siehe Abbildung 7) handelt es sich um eine Variante der HECK-Reaktion[71], die ihrerseits auch erfolgreich zur Basenmodifikation, vor allem von Pyrimidinen eingesetzt wurde.[47] In der SONOGASHIRA-Kupplung wird zunächst das terminale Alkin deprotoniert und in ein Cuprat überführt, was anschließend auf Palladium(0) transmetalliert wird, das vorher bereits im Sinne einer oxidativen Addition mit dem entsprechenden Halogenid reagiert hat. Das Palladiumatom fungiert nun als Templat für die Knüpfung der neuen C-C-Bindung, setzt das Produkt in einer reduktiven Eliminierung frei und steht für einen neuen Katalysezyklus zur Verfügung.



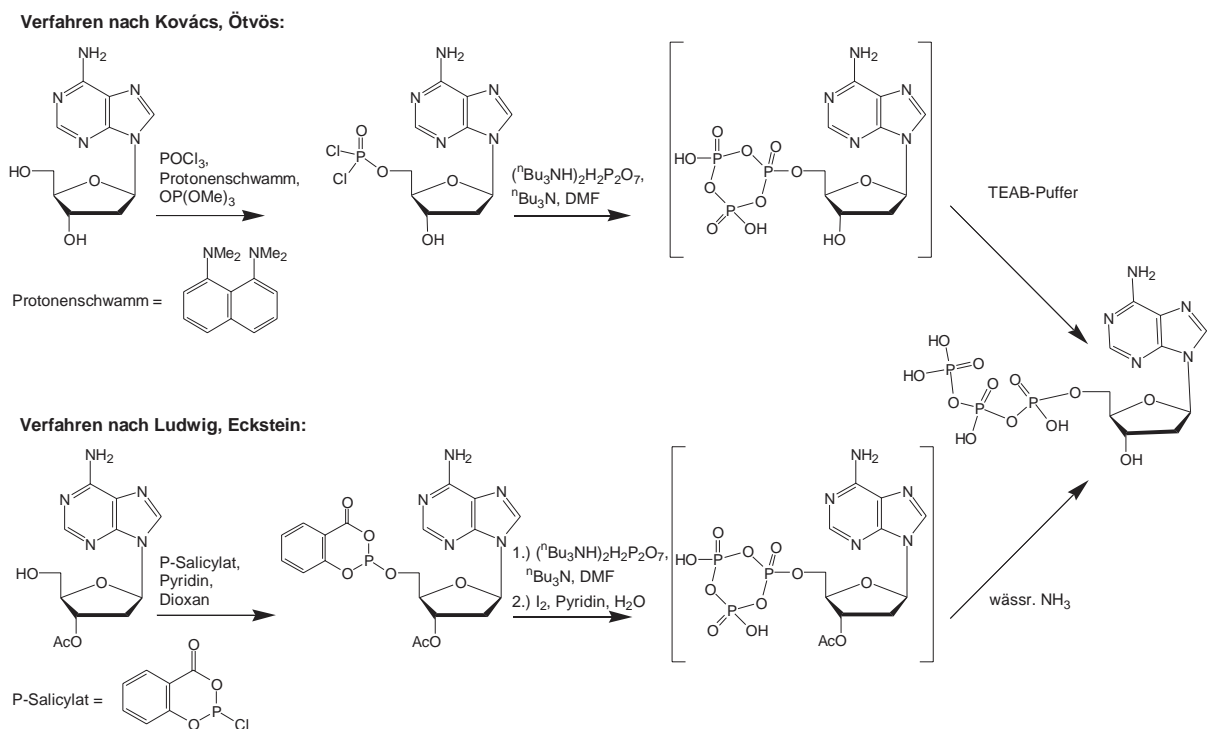
**Abbildung 7:** Der Katalysezyklus der SONOGASHIRA-Reaktion am Beispiel der Reaktion von *N*-7-Deaza-2'-desoxyadensin mit einem terminalen Alkin.

Ein weiterer Schlüsselschritt ist die Überführung der Nucleoside in ihre entsprechenden Triphosphate.[72] Zwei moderne Methoden haben sich hierfür durchgesetzt (siehe Abbildung 8). In der Einfacheren, die von KOVÁCS und ÖTVÖS[73] erstmals beschrieben wurde, erfolgt zunächst eine regioselektive Phosphorylierung am ungeschützten Nucleosid unter Verwen-



dung der Base 1,8-Bis-(*N,N*-dimethyl)aminonaphtalin (Protonenschwamm<sup>®</sup>) in dem Lösungsmittel Phosphorsäuretrimethylester. Anschließend wird das Zwischenprodukt durch Zugabe von Pyrophosphat in das Triphosphat überführt. Nachteile dieses Verfahrens sind die relativ geringe Ausbeute, wenn andere Basen als Thymidin verwendet werden, und die sehr aufwändigen Reinigungsschritte, die nötig sind, um den massiven Reagenzüberschuss und die diversen Nebenprodukte<sup>[74]</sup> abzutrennen.

Das zweite Verfahren, erstmals von LUDWIG und ECKSTEIN<sup>[75]</sup> veröffentlicht, ist insgesamt aufwändiger, da aufgrund fehlender Regioselektivität das Einführen einer Schutzgruppe am 3'-O Atom nötig ist, liefert aber das Produkt in höherer Ausbeute und mit geringeren Verunreinigungen. Hierbei wird das Nukleosid zunächst mit einem Salicylsäure abgeleiteten Phosphor(III)-Reagenz umgesetzt, die weiteren Phosphatgruppen auch hier durch Zugabe von Pyrophosphat eingebracht und abschließend mit Iod in wässrigem Pyridin zu Phosphor(V) oxidiert.

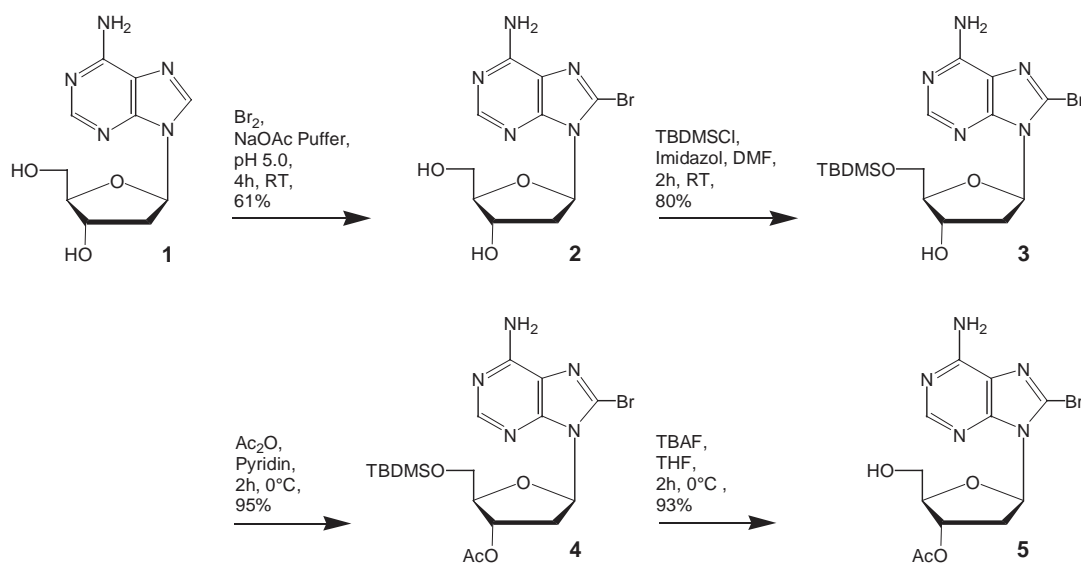


**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der beiden modernsten Methoden zur Synthese von Nukleosidtriphosphaten. Die Methode nach KOVÁCS und ÖTVÖS liefert eine regioselektive Phosphorylierung, während die Methode nach LUDWIG und ECKSTEIN eine 3'-OH-Schutzgruppe voraussetzt.

### 3.1.2 Synthese 8-modifizierter 2'-Desoxyadenosine

Da erste Vorexperimente mit dem Verfahren nach KOVÁCS und ÖTVÖS unter Verwendung ungeschützter 2'-Desoxyadenosinderivate nur sehr unbefriedigende Ergebnisse lieferten,

wurde zur Herstellung der 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosinanaloga die Methode nach LUDWIG und ECKSTEIN gewählt, wodurch entsprechend geschützte Derivate hergestellt werden mussten. Hierzu wurde kommerziell erhältliches 2'-Desoxyadenosin (**1**) mit elementarem Brom regioselektiv an Position C-8 bromiert. Dies konnte in wässriger Lösung durchgeführt werden, wichtig war jedoch die Einstellung des richtigen pH-Wertes. Während die Durchführung bei pH 4.0, wie in der älteren Literatur<sup>[76,77]</sup> angegeben, fast ausschließlich zu Depurinierung führte, lieferte die Verwendung eines Acetatpuffers mit pH 5.0<sup>[78]</sup> das gewünschte Produkt in akzeptabler Ausbeute. Die 5'-OH-Gruppe konnte selektiv mit der sperrigen *tert*-Butyldimethylsilylgruppe als Silylether geschützt werden, indem das Nucleosid mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) und Imidazol als zu Verbindung **3** umgesetzt wurde.<sup>[79]</sup> Eine weitgehende Monosilylierung wurde erreicht, indem das Verhältnis und die Mengen der eingesetzten Reagenzien optimiert wurden. Die anschließende Acetylierung der 3'-OH-Gruppe erfolgte problemlos mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, und das Abspalten der Silylschutzgruppe gelang mit Fluorid (Tetrabutylammoniumfluorid, TBAF) und lieferte die Zwischenstufe **5** (siehe Abbildung 9).

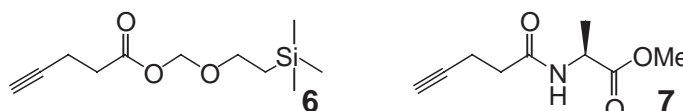


**Abbildung 9:** Synthese des 3'-Acetyl geschützten 8-Bromo-2'-desoxyadenosins (**5**) aus 2'-Desoxyadenosin (**1**).

Als nächstes stand die Auswahl und Synthese geeigneter Seitenarme an. Da bei der Synthese der analogen Pyrimidinderivate die Propargylamingruppe als idealer Kupplungspartner identifiziert wurde,<sup>[80]</sup> sollten die Adenosinderivate mit Carbonsäuren funktionalisiert werden, um eine größere Bandbreite der in der fdNA verfügbaren chemischen Funktionalitäten zu erhalten. Die Carboxygruppe an sich übernimmt, genau wie die Aminogruppe, in Proteinen wichtige Funktionen, z. B. in der Säure-Base-Katalyse. Außerdem können die Carbonsäuren wie

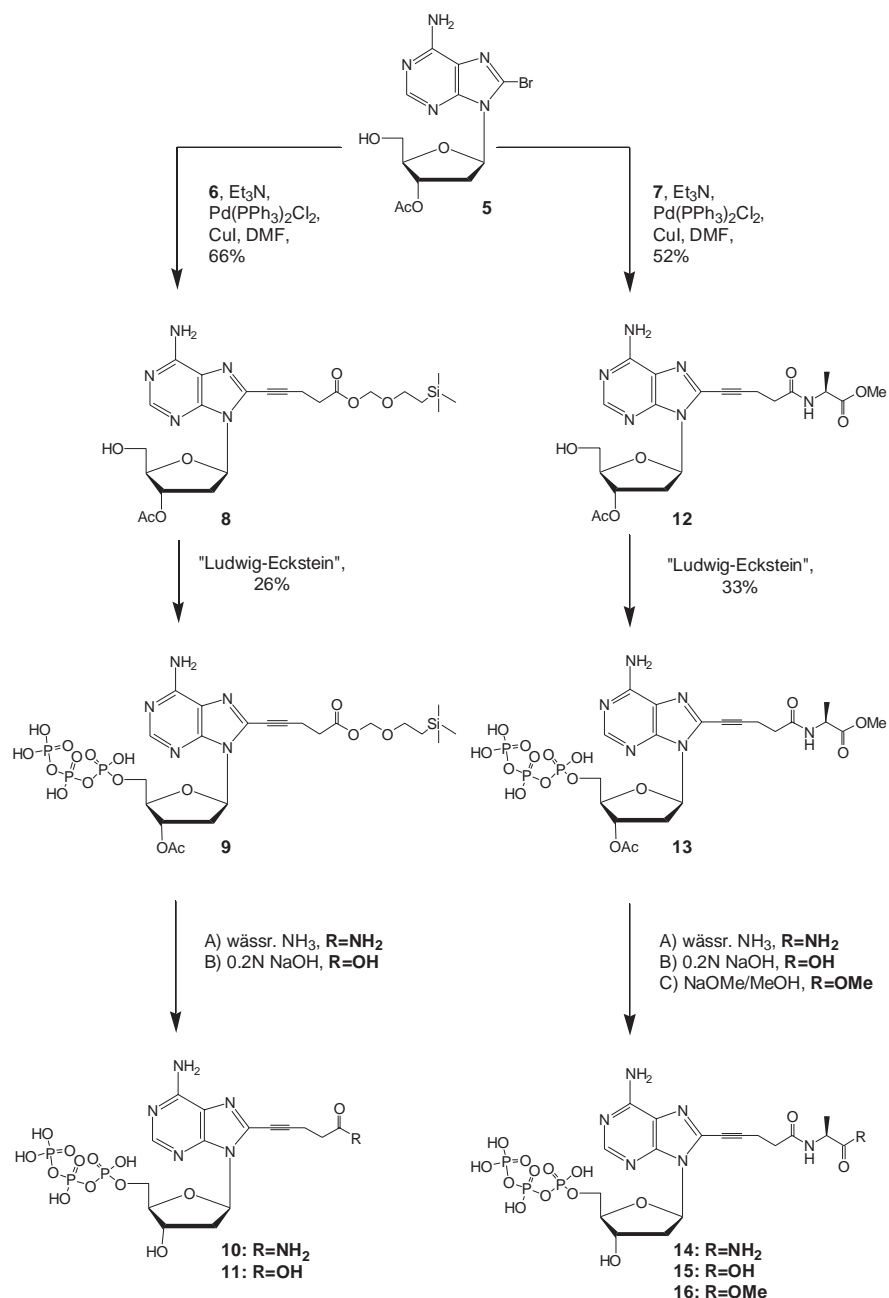
terminale Amine als Anker für weitere Funktionalisierungen dienen, so dass mit geringem präparativen Aufwand eine breite Palette an Modifikationen erhalten werden kann.

Nachdem Reaktionsversuche mit Propinsäureestern erfolglos verliefen, bot sich kommerziell erhältliche Pent-1-insäure als Basis für die Seitenketten an. Die Säurefunktion musste sowohl für die Palladiumkupplung als auch für die nachfolgende Triphosphorylierung geschützt werden. Dabei fiel die Wahl auf die Trimethylsilylethoxymethoxy-Gruppe (SEM), da diese leicht durch Reaktion der freien Säure mit dem entsprechenden Chlorid eingeführt werden kann. Komplikationen (z. B. Polymerisationen), wie sie häufig bei terminalen Alkinen auftreten, werden so vermieden. Im späteren Verlauf sollte sich diese Schutzgruppe wieder unter sehr milden Bedingungen abspalten lassen. Um das Potenzial der Säuregruppe als Basis für weitere Funktionalisierungen zu demonstrieren, wurde neben der SEM-geschützten Säure **6** auch das Alaninderivat **7** hergestellt. Dies geschah durch Kupplung von Pent-1-insäure mit dem als Methylester geschützten L-Alanin unter Verwendung des aus der Peptidsynthese bekannten Chlorameisensäure<sup>iso</sup>butylester (IBCF).



**Abbildung 10:** Übersicht über die für die SONOGASHIRA-Kupplung mit 8-Bromo-2'-desoxyadenosin (**5**) verwendeten geschützten terminalen Alkine.

Die Kupplung des geschützten Nucleosids **5** mit den entsprechenden Alkinen **6** bzw. **7** erfolgte in DMF, das sorgfältig entgast wurde, da die Reaktion sehr luftempfindlich ist. Der benötigte Pd(0)-Katalysator wurde *in situ* aus Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durch reduktive Kupplung zweier Alkine hergestellt und lieferte nach Transmetallierung des Alkins von Kupfer auf Palladium die modifizierten Nucleoside **8** und **12** in zufriedenstellenden bis guten Ausbeuten. Nach der Aufarbeitung und chromatographischen Aufreinigung konnten sie weiter zu den entsprechenden Triphosphaten **9** und **13** umgesetzt werden. Dies geschah nach der Methode von LUDWIG und ECKSTEIN und lieferte nach der umfangreichen Aufreinigung Ausbeuten von 26 % bzw. 33 %. Durch die Wahl der Entschützungsbedingungen konnten verschiedene Nucleotide erhalten werden: Wurden die Verbindungen mit wässrigem Ammoniak entschützt, konnten die Amide **10** bzw. **14** isoliert werden, wurde dagegen die Entschützung in wässriger Natronlauge durchgeführt, bildeten sich die Säuren **11** und **15**. Schließlich lieferte die Umsetzung des Methylesters **13** mit Natriummethylat in absolutem Methanol den Methylester **16**.



**Abbildung 11:** Synthese der 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosintriphosphate durch SONOGASHIRA-Kupplung terminaler Alkine an 8-Bromo-2'-desoxyadenosin (**5**) und nachfolgender Triphosphorylierung nach LUDWIG und ECKSTEIN sowie Entschützung unter verschiedenen Bedingungen.

Zur Reinigung der gewonnenen Triphosphate **10**, **11** und **14-16** wurden die Rohprodukte zunächst durch Ionenaustauschchromatographie an Sephadex DEAE-25 vorgereinigt und in eine einheitliche Ionenform (Triethylammonium-Salz) gebracht und schließlich chromatographisch an Umkehrphasenmaterial durch semi-präparative HPLC oder MPLC gereinigt. Eine spätere Reinheitsanalyse dieser Verbindungen per HPLC zeigte jedoch nur für die Verbindungen **11** und **15** eine Reinheit von > 98 %, bei den drei weiteren Verbindungen **10**, **14** und **16** waren Verunreinigungen bis zu 10 % detektierbar, die sich präparativ nicht abtrennen

ließen. Daher wurden diese Verbindungen nicht für die Primer-Verlängerungsexperimente (siehe Kapitel 3.2.2) verwendet.

### 3.1.3 Synthese 7-modifizierter *N*-7-Deaza-2'-desoxypurine

Da keines der bisher synthetisierten Analoga erfolgreich als Substrat für die PCR eingesetzt werden konnte (siehe Kapitel 3.2.1), wurde die Synthese weiterer 8-modifizierter Purine aufgegeben, und die Darstellung der entsprechenden *N*-7-Deazaderivate begonnen. Die Synthesen der dafür nötigen Schlüsselverbindungen **25** und **35** erfolgte nach bekannten Methoden (siehe Lit.<sup>[81,82]</sup> und die dort zitierte Literatur).

Im Falle der Adenosinderivate wurde zunächst der erste Heterozyklus durch doppelte CLAISEN-Kondensation der beiden Aminogruppen von Thioharnstoff mit der Ester- und Nitrilgruppe des  $\alpha$ -Cyano-4,4-diethoxybutansäureethylesters (**17**) aufgebaut. Das heterozyklische Grundgerüst wurde vollendet, indem der Schwefel mit Raney-Nickel reaktiv entfernt und das Acetal säurekatalysiert gespalten wurde, woraufhin sich aus der Aminogruppe und dem entstandenen Aldehyd spontan ein zyklisches Imin (**20**) bildete.

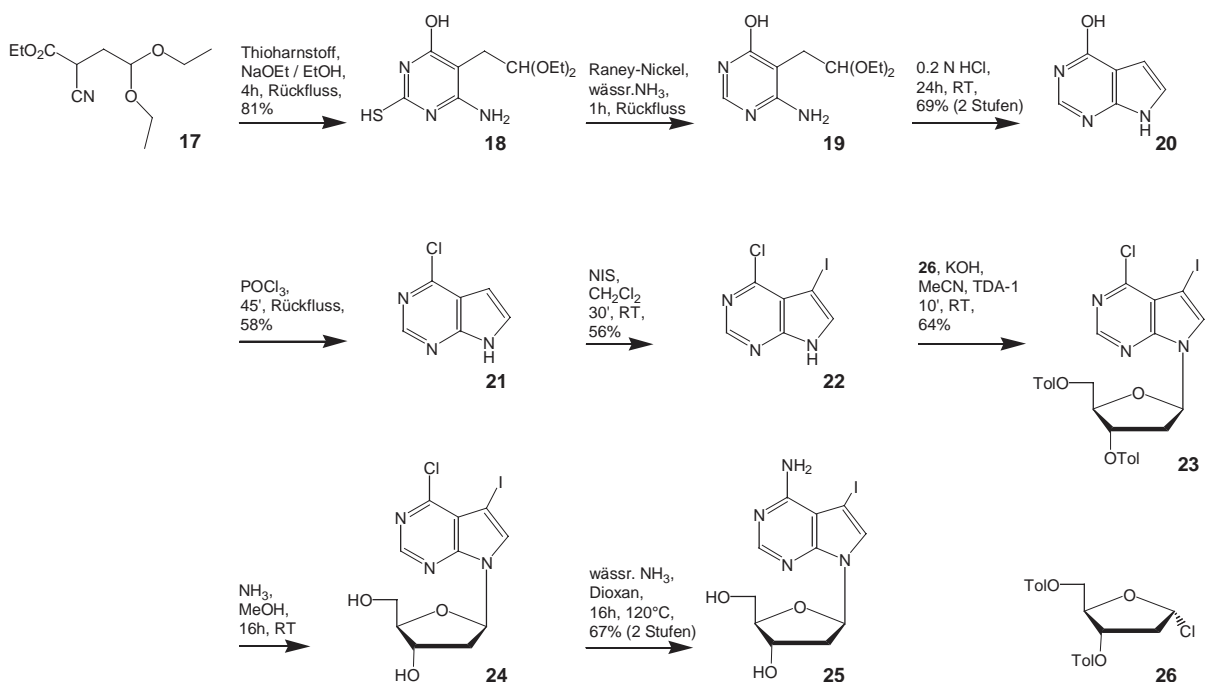


Abbildung 12: Totalsynthese des 7-Iodo-*N*-7-deaza-2'-desoxyadenosins (**25**).

Als nächstes galt es, die Regioselektivität der im weiteren Verlauf ausstehenden Iodierung an Position *C*-7 zu gewährleisten. Durch Reaktion mit Phosphorylchlorid wurde die Hydroxylgruppe durch Chlor ersetzt, einem Substituenten, der durch seinen induktiven Effekt eine

elektrophile Addition in die gewünschte Position dirigiert. Die Halogenierung erfolgte mit *N*-Iodsuccinimid in Dichlormethan in lediglich zufriedenstellenden Ausbeuten, die auf sehr langsame und nur unvollständige Kristallisation zurückzuführen sind. Als Zuckerbaustein für die diastereoselektive Glykosilierung hat sich der geschützte Chlorozucker **26** bewährt, der in drei Stufen aus 2-Desoxyribose hergestellt werden kann<sup>[83]</sup>. Die Reaktion wurde in Acetonitril durchgeführt, wobei fein zerriebenes Kaliumhydroxid als Base und Tris[2-(2-methoxyethoxy)-ethyl]amin (TDA-1) als Lösungsvermittler eingesetzt wurde. Da sich das Kaliumhydroxid in Acetonitril nur schlecht löst, ist die Vergrößerung der Oberfläche durch Zerkleinern absolute Voraussetzung zum Erzielen befriedigender Ausbeuten.

Damit war der Grundkörper **23** fertiggestellt und konnte durch Rühren in mit Ammoniak gesättigtem Methanol entschützt werden. Zwar ließ sich das Produkt nicht vollständig säulenchromatographisch von dem entstehenden Toluylamid reinigen, es konnte aber problemlos für die nächste Reaktion verwendet werden. Hier wurde in einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus der Chlorsubstituent durch eine Aminogruppe ersetzt. Der Iodsubstituent blieb hiervon unberührt, da nur Position *C*-4 formal ein Carbonsäurederivat ist, während es sich bei *C*-7 um ein Vinylhalogenid handelt. Die Reaktion wurde mit einer Mischung aus Dioxan und wässrigem Ammoniak bei 120 °C und unter Druck durchgeführt. Im Gegensatz zu der Literatur<sup>[81]</sup> konnten durchaus befriedigende Ausbeuten erhalten werden.

Für die Guanosinderivate lieferte eine analoge Reaktionsführung, nach der Guanidin als Ausgangsmaterial anstelle des Thioharnstoffes eingesetzt wird, zunächst Verbindung **28**. Um auch hier die nötige Regioselektivität für die Iodierung zu gewährleisten, musste die Hydroxylgruppe wiederum in einen passenden Substituenten umgewandelt werden. Um die später nötige Retransformation in eine Hydroxylgruppe zu gewährleisten, bot sich die Methoxygruppe an. Dazu wurde, analog zu der Darstellung der *N*-7-Deazaadenosine, zunächst mit Phosphorylchlorid chloriert. Die nun erfolgte Glykosilierung mit dem Chlorozucker **26** in Acetonitril unter Verwendung von Natriumhydrid als Base lieferte das Nukleosid **30** in guter Ausbeute. Bei der anschließenden Entschätzung durch Natriummethanolat in Methanol konnte der zuvor eingeführte Chlorsubstituent gleichzeitig wie gewünscht durch eine Methoxygruppe ersetzt werden.

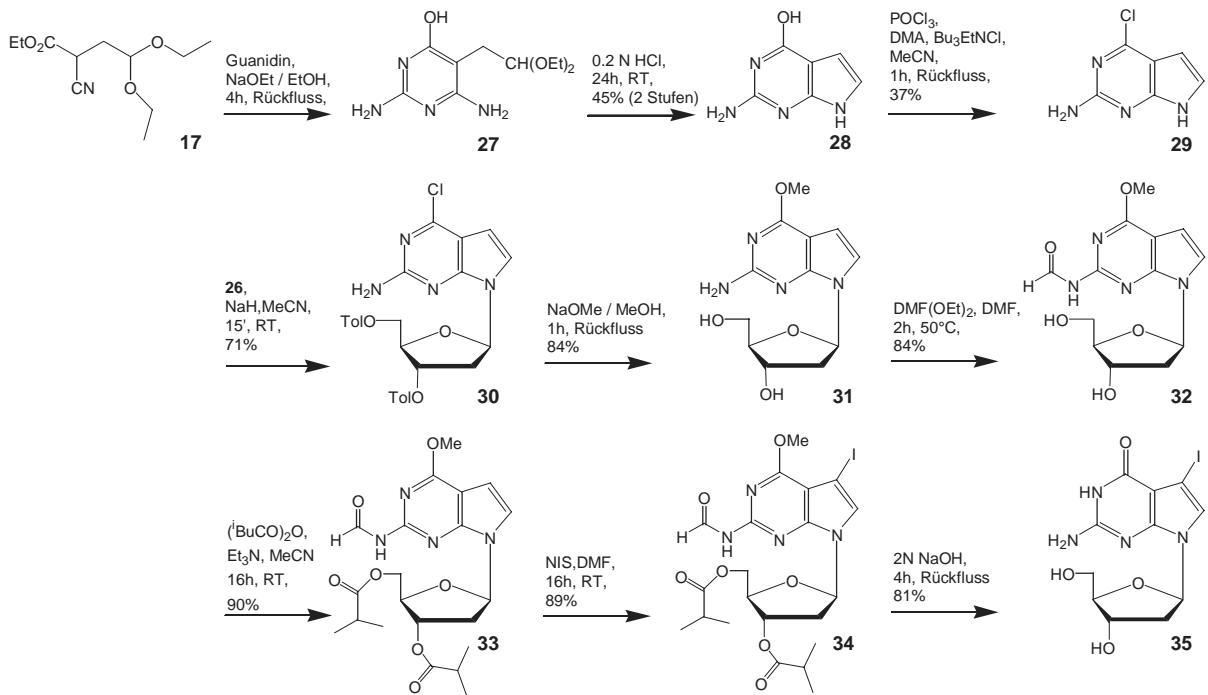


Abbildung 13: Totalsynthese des 7-Iodo-*N*-7-deaza-2'-desoxyguanosins (35).

Die nun anstehende Iodierung machte das erneute Schützen sowohl der Amino- als auch der Hydroxylfunktionen notwendig. Erstere wurde durch Reaktion mit *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal mit einer Formamidgruppe versehen und die Hydroxylgruppen mit *iso*-Buttersäureanhydrid verestert. Nach Halogenierung mit *N*-Iodsuccinimid in DMF und vollständiger Entschützung durch Erhitzen mit wässriger Natronlauge wurde Verbindung 35 im Grammmaßstab erhalten.

Für die Derivatisierung des *N*-7-Deazaadenosins 25 wurden die gleichen Überlegungen angestellt wie für die 8-modifizierten Adenosine zuvor. Auch hier sollten vor allem Alkine verwendet werden, die Säuregruppen tragen. Da sich die SEM-Schutzgruppe bei den vorhergehenden Experimenten als sehr labil erwiesen hatte, wurde stattdessen der Methylester 36 verwendet; zusätzlich wurde auch das als Trifluoressigsäure geschützte Propargylamin 37 verwendet.

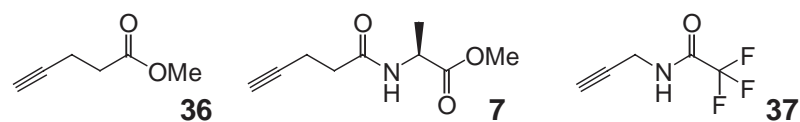
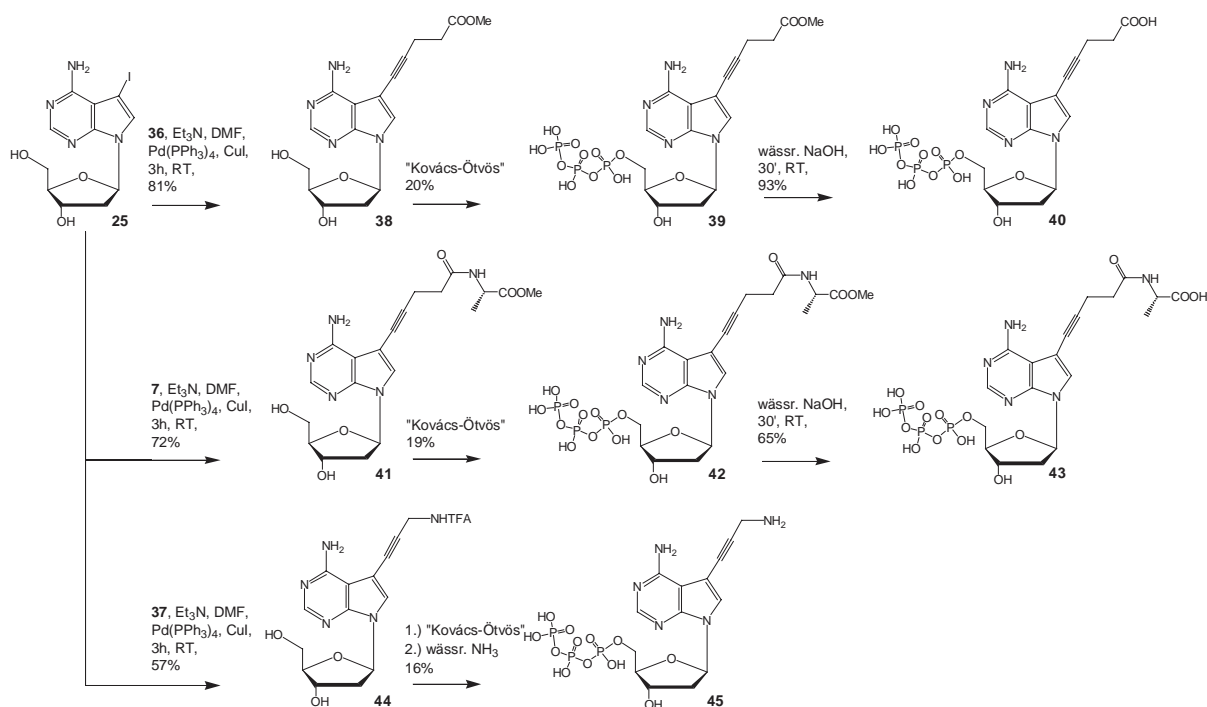


Abbildung 14: Übersicht über die für die SONOGASHIRA-Kupplung mit 7-Iodo-*N*-7-Deaza-2'-desoxyadenosin (25) verwendeten geschützten terminalen Alkine.

Die Synthese der Verbindungen 38, 41 und 44 unter Verwendung von Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> als Katalysator lieferte die Produkte durchweg in zufriedenstellenden bis guten Ausbeuten. Die

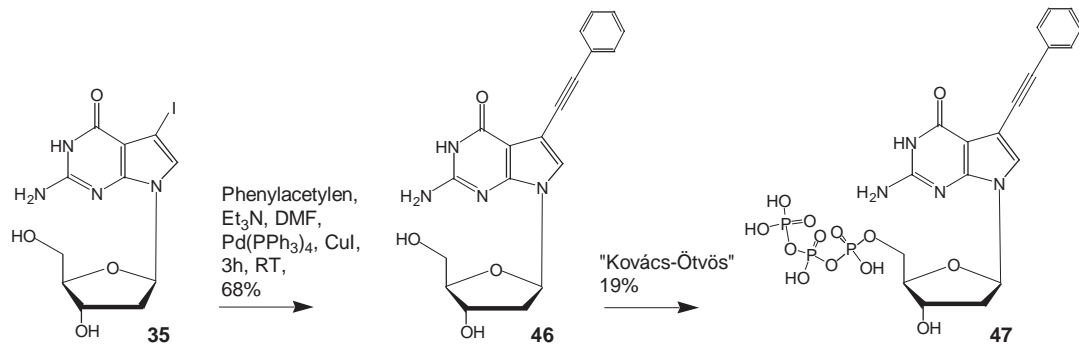
Triphosphorylierung dieser Nucleoside erfolgte nach der Methode von KOVÁCS und ÖTVÖS und lieferte die korrespondierenden Nucleotide **39**, **42** und **45** in Ausbeuten von etwa 20 %, ein für Purinderivate durchaus zufriedenstellender Wert. Eine weitere Diversifizierung der funktionellen Gruppen erfolgte, wie bei der analogen Darstellung der 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosine, durch Hydrolyse der Methylester mit wässriger Natronlauge zu den freien Säuren **40** und **43**.



**Abbildung 15:** Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten 7-modifizierten *N*-7-Deaza-2'-desoxyadenosintriphosphate durch SONOGASHIRA-Kupplung terminaler Alkine an 7-Iodo-*N*-7-deaza-2'-desoxyadenosin (**25**), nachfolgender Triphosphorylierung nach KOVÁCS und ÖTVÖS sowie Entschützung unter verschiedenen Bedingungen.

Für die 2'-Desoxyadenosine war somit ein System etabliert, das die Derivatisierung mit verschiedenen funktionellen Gruppen erlaubte. Zur Ergänzung des Funktionsrepertoires bot es sich an, 2'-Desoxyguanosin als Basis für die Einbringung unpolarer Gruppen zu verwenden. Da die Guanostammverbindung **35** deutlich aufwändiger zu synthetisieren ist als das vergleichbare Adenosinderivat **25**, wurde sie zunächst mit nur einem Alkin umgesetzt. Die Reaktion mit dem kommerziell erhältlichen Phenylacetylen lieferte Verbindung **46**, welches in das Triphosphat **47** überführt wurde (siehe Abbildung 16).

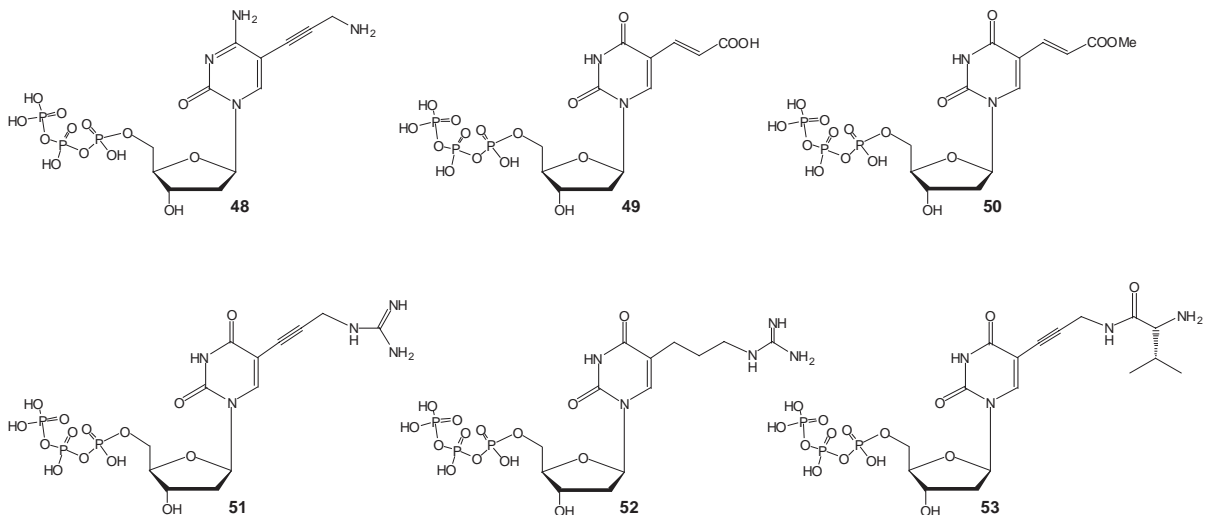




**Abbildung 16:** Darstellung des analog zu den 7-modifizierten *N*-7-Deaza-2'-desoxyadenosintriphosphaten hergestellten 7-Phenylethynyl-*N*-7-deaza-2'-desoxyguanosintriphosphat (**47**).

Damit standen nun 2'-Desoxyadenosinderivate mit einer Auswahl an polaren funktionellen Gruppen, meist auf Basis von Carbonsäuren zur Verfügung, die man als Nukleotidanaloga der Aminosäuren Glutamat bzw. Aspartat auffassen kann. Weiterhin war ein 2'-Desoxyguanosinderivat mit einer unpolaren, aromatischen Funktionalität vorhanden, wie sie z. B. in Phenylalanin vorkommt.

Die für eine vollständige Modifikation nötigen Pyrimidinderivate wurden von Dipl.-Chem. Stefan JÄGER nach ähnlichen Verfahren hergestellt und für die molekularbiologischen Experimente verwendet. Abbildung 17 fasst die verwendeten Pyrimidin-Triphosphate zusammen:



**Abbildung 17:** Übersicht über die von Stefan JÄGER bereitgestellten 5-modifizierten 2'-Desoxycytidin- und 2'-Desoxyuridintriphosphate.

### 3.1.4 Analytik und Charakterisierung der modifizierten Triphosphate

Neben der Synthese war auch eine sorgfältige Analytik und Charakterisierung der hergestellten Verbindungen, vor allem der Endprodukte, nötig.  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchungen reichten für gewöhnlich nicht aus, um die Verbindungen zu charakterisieren, vor allem da oft durch Li-

nienverbreiterungen nicht alle Signale restlos ausgewertet werden konnten. Um nachzuweisen, dass es sich wirklich um Triphosphate handelt, bietet sich die Massenspektrometrie an. Die Natur dieser hochpolaren Verbindungen verlangt aber sehr schonende Ionisierungsmethoden, so dass nur die Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisation (MALDI) oder die Elektrospray-Ionisation (ESI) im Negativionenmodus in Frage kamen. Da letztere bequem aus wässrigen Lösungen ohne weitere Probenpräparation durchgeführt werden kann, wurde diese Methode gewählt. Sie lieferte durchweg gut auswertbare Spektren, die neben den charakteristischen ein- und zweifach geladenen Molpeaks keine, oder nur solche Signale zeigten, die dem Verlust der terminalen Phosphatgruppe im Massenspektrometer entsprachen.

Ein Hauptproblem bei der Aufreinigung der Triphosphate stellt die vollständige Abtrennung der Phosphorreagenzien und der phosphatbasierenden Nebenprodukte dar. Um dies nachzuweisen ist die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie gut geeignet. Diese Methode ist ähnlich empfindlich wie die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, kann also auch bei kleinen Substanzmengen mit kurzer Messzeit durchgeführt werden. Im protonenentkoppelten  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigen Nukleosidtriphosphate dabei ein charakteristisches Bild, bestehend aus drei Signalen (siehe Kapitel 8.1). Die Atome  $\text{P}_\alpha$  und  $\text{P}_\gamma$  erzeugen dabei durch  $^2J_{\text{PP}}$ -Kopplungen Dubletts im Bereich von -10 ppm, das  $\text{P}_\beta$ -Atom liefert ein Pseudotriplett bei etwa -21 ppm. Die beiden Dubletts können durch Anfertigung eines protonengekoppelten Spektrums genau zugeordnet werden, da für  $\text{P}_\alpha$  die zusätzlichen  $^3J_{\text{PH}}$ -Kopplungen mit den 5'-Protonen sichtbar werden. Da die Triphosphatgruppe durch Rotation um die P-O Bindungen sehr flexibel ist, können die Signale manchmal nicht oder nur eingeschränkt aufgelöst werden. Dabei liefert  $\text{P}_\alpha$  fast immer das zu erwartende Dublett, für die anderen P-Atome sind aber oft nur breite Singulett messbar.

Der Nachweis der Abwesenheit organischer Verunreinigungen erfolgte über  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie sowie durch HPLC an Umkehrphasenmaterial. Eine gut aufgelöste Trennung der hochgeladenen und -polaren Triphosphate an regulärem RP-18 Material wird allerdings nur durch Wahl entsprechender Laufmittel gewährleistet. Um eine annehmbare Signalschärfe zu erhalten, war es nötig, anstelle von Wasser einen Puffer zu verwenden, um einen pH-Wert einzustellen, bei dem die Verbindungen in einer möglichst einheitlichen Ionenform vorliegen. Im Falle der Nukleotide bietet sich ein pH-Wert von 7.0-7.5 an, da dort die Triphosphatgruppe fast vollständig deprotoniert ist. Weiterhin mussten die polaren Phosphatgruppen durch geeignete Gegenionen komplexiert werden, um überhaupt eine Retention zu beobachten. Hierzu boten sich Alkylammoniumsalze an. Als Standardpuffer hat sich 0.1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) oder 0.1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat (TEAB)

bewährt. Diese Puffer liefern mit dem Triethylammonium ein geeignetes unpolares Kation, so dass die Elution der Triphosphate mit 5-30 % Acetonitril erfolgen kann, wobei polare oder unpolare Modifikationen der Nukleotide die Retentionszeit deutlich verändern. Dies beweist, dass die Phosphatgruppen durch Triethylammonium quasi „neutralisiert“ werden und keinen nennenswerten Einfluss mehr auf die Trennung haben. Die Verwendung von Acetat oder Hydrogencarbonat als Anion bringt den Vorteil, dass sich der Puffer im Vakuum zersetzen lässt, so dass dieses Laufmittel auch für präparative Zwecke geeignet ist. Durch die Verwendung von Tetrabutylammonium statt Triethylammonium erreicht man eine Überkompensation der Polarität, so dass die Nukleotide ausschließlich nach ihrer Ladung aufgetrennt werden. Niedrig geladene Komponenten, wie z. B. Monophosphate, eluieren dabei schneller als hochgeladene, wie z. B. Triphosphate. Da hier die Trennung ausschließlich auf der Existenz von Ionenpaaren beruht, spricht man auch von Ionenpaarchromatographie.<sup>[84]</sup> Dieses Verfahren liefert sehr scharfe Signale und erlaubt daher eine sehr gute Analyse auch komplexer Mischungen. Für präparative Zwecke ist es ungeeignet, da Tetrabutylammoniumionen nicht durch Evaporation zu entfernen sind, sondern aufwendig abgetrennt werden müssen.

Daher wurde bei den hier besprochenen Chromatographien TEAA-Puffer zusammen mit Acetonitril verwendet. Der TEAA-Puffer hat gegenüber dem TEAB-Puffer den Vorteil, dass er sich entgasen lässt, ohne die Konzentration der Anionen und damit den pH-Wert zu beeinflussen.

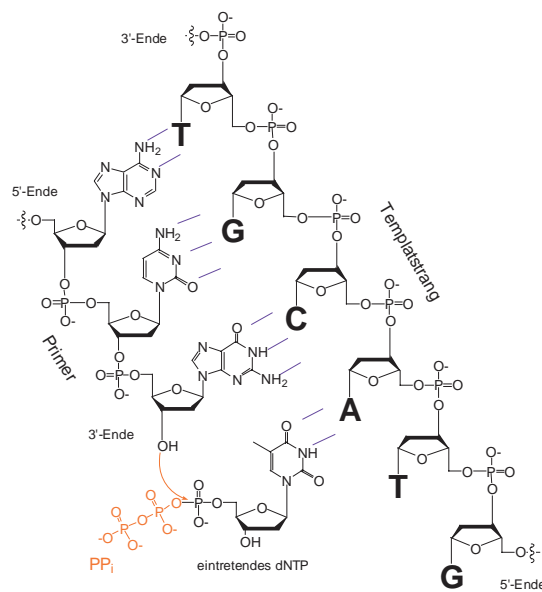
Die Charakterisierung der Substanzen wurde durch die Aufnahme von UV- und Fluoreszenzspektren abgeschlossen. Während alle Nukleoside eine intensive und charakteristische UV-Absorption zeigten, lieferten nur die 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosine und die 7-modifizierten 2'-Desoxy-*N*-7-deazaadenosine eine starke Fluoreszenz.

In Kapitel 8.1 sind beispielhaft für die Adenosinverbindung **39** und das Guanosinderivat **47** alle zu ihrer Charakterisierung aufgenommenen und ausgewerteten Spektren abgebildet.

## 3.2 Molekularbiologische Experimente

### 3.2.1 Einbauversuche *via* PCR

Die einfachste Methode, modifizierte Nukleotide in DNA zu inkorporieren stellt sicherlich die Polymerasekettenreaktion (PCR) dar. Dieses von MULLIS<sup>[85]</sup> entwickelte Verfahren überträgt einen der wichtigsten biologischen Prozesse, nämlich die DNA-Replikation, in das molekularbiologische Labor. Alle pro- und eukaryotischen Systeme verfügen über einen leistungsfähigen Enzymkomplex, dem Replisom, der die sequenzgetreue Verdopplung der vorhandenen Erbinformation gewährleistet und dessen Hauptbestandteile mehrere DNA-Polymerasen sind.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der templatgesteuerten enzymatischen Inkorporation von dNTPs bei der DNA-Replikation.

Abbildung 18 fasst die Chemie der DNA-Replikation zusammen: Grundlage ist das Vorliegen eines zu kopierenden DNA-Einzelstranges (Templat- oder *sense*-Strang), an dem bereits eine kurze Sequenz eines passenden Gegenstranges (*antisense*-Strang) hybridisiert sein muss, der sogenannte Primer. Die Polymerase erkennt die nächste Base des *sense*-Stranges gemäß der Watson-Crick Sequenz und bindet aus der Lösung das komplementäre 2'-Desoxynucleosidtriphosphat. Im aktiven Zentrum wird dies nun so ausgerichtet, dass die freie 3'-OH Gruppe des Primers bzw. des neu synthetisierten Stranges, das P<sub>α</sub>-Atom des Triphosphats nukleophil angreifen kann. Unter Abspaltung von Pyrophosphat entsteht so eine neue Phosphordiesterbindung, die nachfolgende Hydrolyse des Pyrophosphats liefert die nötige Energie und macht die Reaktion irreversibel. Nun wird die nächste Base abgelesen und das entsprechende Nucleotid kovalent verknüpft. Auf diese Weise katalysiert das Replisom die templatgesteuerte Po-

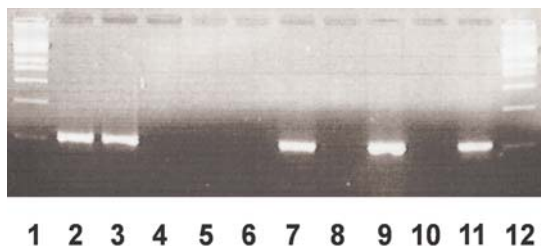
lymerisation von Nukleotiden zu DNA. In Prokaryoten erfolgt die Replikation mit einer Geschwindigkeit von etwa 500 Nukleotiden pro Sekunde, in Eukaryoten werden in dieser Zeit etwa 50 Nukleotide eingebaut. Neben der eigentlichen Bindungsknüpfung gibt es weitere Prozesse, wie z. B. das Korrekturlesen oder die Ligation einzelner DNA-Abschnitte, für die andere Domänen bzw. andere Enzyme verantwortlich sind.<sup>[3]</sup>

Bei der *in vitro*-Variante dieses Prozesses wird nicht der gesamte Enzymkomplex, sondern nur eine prozessive Teileinheit verwendet, weshalb einige Schritte, die *in vivo* von anderen Enzymen vollbracht werden, manuell durchgeführt werden müssen. So sind zum Beispiel in Organismen Helikasen dafür verantwortlich, dass doppelsträngige DNA aufgewunden und die einzelsträngige Templat-DNA zur Replikation bereitgestellt wird. Bei der PCR erfolgt dies durch thermische Denaturierung. Dazu wird die DNA auf etwa 94 °C erhitzt und in ihre einzelsträngige Form überführt. Nach schnellem Abkühlen können sich nun an beiden Strängen die passenden Primer anlagern, deren Sequenz vorher bekannt sein muss und die synthetisch hergestellt werden. Durch Verwendung eines großen Überschusses an Primern wird die Konkurrenzreaktion, nämlich die Rückbildung des DNA-Doppelstranges, unterdrückt. Nun wird die Reaktion auf die für das Enzym optimale Arbeitstemperatur gebracht und alle in Lösung vorliegenden Primer/DNA-Komplexe werden elongiert, so dass die DNA-Menge verdoppelt wird. Durch erneutes Erhitzen und Abkühlen kann dieser Zyklus beliebig oft wiederholt werden, bis entweder alle Nukleotide oder alle Primer aufgebraucht und komplett zu der gewünschten DNA umgesetzt sind. Der Durchbruch dieser Methode wurde erreicht, nachdem DNA-Polymerasen aus hitzestabilen Organismen isoliert wurden, welche die erneute Zugabe von Enzym nach jeder Denaturierung überflüssig machten. Heute ist dieses Verfahren routinemäßig in mikroprozessorgesteuerten Thermoblöcken durchführbar.<sup>[3]</sup>

Die Generierung funktionalisierter DNA kann erreicht werden, indem ein natürliches dNTP durch ein entsprechend modifiziertes Derivat ersetzt und die PCR ansonsten vorschriftsmäßig durchgeführt wird. Auf diese Weise wurden bereits erste erfolgreiche Versuche unternommen, ein bis zwei unnatürliche Triphosphate in DNA zu inkorporieren.<sup>[47,58,65]</sup> Allerdings stellt diese Strategie zur Gewinnung von fDNA die höchsten Anforderungen an das enzymatische System bezüglich seiner Toleranz gegenüber den unnatürlichen Nukleotiden. Ein einziges Enzym muss nämlich sowohl die modifizierten dNTPs einbauen, als auch die entsprechenden Nukleotide im Templatstrang korrekt erkennen. Dabei dürfen eventuell auftretende Störungen in der räumlichen Struktur der DNA, ausgelöst durch die strukturellen oder elektronischen Veränderungen an den Nukleobasen, die Replikation nicht wesentlich beeinflussen.

Für die entsprechenden Einbaustudien mit den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Nukleotiden wurde ein 109 bp langes DNA-Templat (zur Verfügung gestellt von Dr. Günter MAYER) mit zwei komplementären 30 NT und 39 NT langen Primern verwendet. Die Reaktionsbedingungen entsprachen jeweils den Standardvorschriften, allerdings wurden modifizierte dNTPs in Konzentrationen von 400  $\mu\text{M}$  statt 200  $\mu\text{M}$  verwendet. Es wurden 25-30 PCR-Zyklen (Details siehe Kapitel 6.3.4.1) durchgeführt und Aliquots durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

Zunächst wurde versucht, die 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosintriphosphate zu verwenden. Getestet wurden die folgenden Enzyme: DAp Polymerase, *Tth* DNA-Polymerase und *Taq* DNA-Polymerase. Keines der verwendeten Enzyme war in der Lage, mit einem der modifizierten Nukleotide **10**, **11**, **12**, **15** oder **16** (siehe Abbildung 11) DNA-Volllängenprodukt zu produzieren. Ein typisches Agarosegel dieser Versuche zeigt Abbildung 19. Wie zu erwarten, zeigt die Positivkontrolle (Bahn 2) eine intensive Bande bei etwa 100 bp, ebenso die Reaktion, der Triethylammonium zugesetzt wurde (Bahn 3), um einen negativen Einfluss der Triethylammonium-Gegenionen der Triphosphate auszuschließen. Die beiden durchgeführten Negativkontrollen (einmal ohne Templat, einmal ganz ohne Adenosinderivat, Bahn 4 und 5) zeigten keinerlei PCR-Produkte. Aber auch in den drei Reaktionen, denen die Verbindungen **16**, **11** oder **12** anstatt des natürlichen dATPs zugesetzt wurden (Bahn 6, 8 bzw. 10) waren keine entsprechenden Banden detektierbar. Im Gegensatz dazu lieferte aber der gleichzeitige Einsatz von 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosinen und von dATP das gewünschte Produkt (Bahn 7, 9 bzw. 11), was eine nennenswerte inhibitorische Wirkung der verwendeten Substanzen oder vorliegender Verunreinigungen ausschloss.

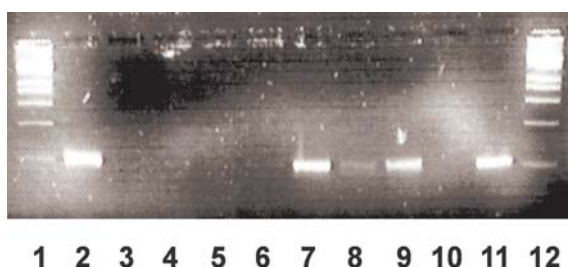


**Abbildung 19:** PCR unter Verwendung von 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosinen: In Bahn 1 und 12 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR (*Tth* DNA-Polymerase, 25 Zyklen); Bahn 2: Positivkontrolle 200  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3: wie Bahn 2 + 1 mM  $\text{Et}_3\text{N}$ ; Bahn 4: Negativkontrolle 1, wie Bahn 2 aber ohne Templat; Bahn 5: Negativkontrolle 2: 200  $\mu\text{M}$  dCTP, dGTP und TTP; Bahn 6: wie Bahn 5 + 400  $\mu\text{M}$  **16**; Bahn 7: wie Bahn 2 + 400  $\mu\text{M}$  **16**; Bahn 8: wie Bahn 5 + 400  $\mu\text{M}$  **11**; Bahn 9: wie Bahn 2 + 400  $\mu\text{M}$  **11**; Bahn 10: wie Bahn 5 + 400  $\mu\text{M}$  **12**; Bahn 11: wie Bahn 2 + 400  $\mu\text{M}$  **12**.

Da keines der verwendeten 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosine eingebaut wurde, schien diese Substanzklasse ungeeignet für die geplanten Experimente, und so wurde das entsprechende

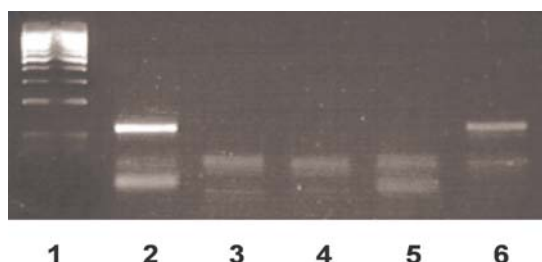


*N*-7-Deaza-2'-desoxyadenosinderivat **40** getestet. Weiterhin standen zu diesem Zeitpunkt die Substanzen **49** und **50** zur Verfügung, so dass auch der Einbau dieser Verbindungen untersucht werden konnte (vgl. Abbildung 20). Während der Einbau des Methylesters **50** auf Anhieb gelang (Bahn 11), konnten die beiden anderen Nukleotide unter den Standard-PCR-Bedingungen nicht inkorporiert werden (Bahn 6 bzw. 10). Eine Erhöhung der  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentration von 1.5 mM auf 3 mM lieferte aber im Falle von **40** unter Verwendung von *Tth* DNA-Polymerase eine sichtbare Produktbande (Bahn 8), was erstmals die Möglichkeit eines Einbaus dieses modifizierten Adenosins nachwies.



**Abbildung 20:** PCR unter Verwendung des 7-modifizierten Adenosinderivats **40** oder der Uridinanaloga **49** bzw. **50**: In Bahn 1 und 12 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR (*Tth* DNA-Polymerase, 1.5 mM  $Mg^{2+}$ , 15 Zyklen); Bahn 2: Positivkontrolle 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3: Negativkontrolle 1: wie Bahn 2 aber ohne Templat; Bahn 4: Negativkontrolle 2, 200  $\mu$ M dCTP, dGTP und TTP, Bahn 5: Negativkontrolle 3: 200  $\mu$ M dATP, dCTP und dGTP; Bahn 6: wie Bahn 4 + 400  $\mu$ M **40**; Bahn 7: wie Bahn 2 + 400  $\mu$ M **40**; Bahn 8: wie Bahn 4 + 400  $\mu$ M **40**, 3 mM  $Mg^{2+}$ ; Bahn 9: wie Bahn 2 + 400  $\mu$ M **40**, 3 mM  $Mg^{2+}$ ; Bahn 10: wie Bahn 5 + 400  $\mu$ M **49**; Bahn 11: wie Bahn 5 + 400  $\mu$ M **50**.

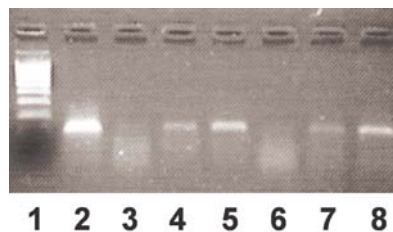
Die weitere Optimierung der  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentration und der Zyklenzahl ermöglichte schließlich den simultanen Einbau von **40** und **50**, wie er in Abbildung 21, Bahn 6 zu sehen ist. Allerdings ist festzustellen, dass die Ausbeute in diesem Falle signifikant geringer war als in der Reaktion, die ausschließlich natürliche dNTPs verwendete (Bahn 2). Zur Detektion des Doppeleinbaus waren 30 Zyklen, für die der Positivkontrolle nur 15 Zyklen nötig.



**Abbildung 21:** PCR unter gleichzeitiger Verwendung des Adenosinderivats **40** und des Uridinanalogs **50**: Bahn 1 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR (*Tth* DNA-Polymerase, 6 mM  $Mg^{2+}$ , Bahn 2: 15 Zyklen, sonst 30 Zyklen). Bahn 2: Positivkontrolle 200  $\mu$ M dATP dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3: Negativkontrolle 1, wie Bahn 2 aber ohne Templat; Bahn 4: Negativkontrolle 2, 200  $\mu$ M dCTP und dGTP, 400  $\mu$ M **40**; Bahn 5: Negativkontrolle 3: 200  $\mu$ M dCTP und dGTP, 400  $\mu$ M **50**; Bahn 6: 200  $\mu$ M dCTP und dGTP, 400  $\mu$ M **40** und **50**.

Da nachgewiesen werden konnte, dass sich die *N*-7-Deazaadenosine im Gegensatz zu ihren 8-modifizierten Analoga *via* PCR in DNA inkorporieren lassen, wurde auch das entsprechende *N*-7-Deaza-2'-desoxyguanosintriphosphat **47** verwendet. In diesem Fall führten die PCR-Experimente aber erst nach intensiver Optimierung zu mäßigen Erfolgen. Unter Standardbedingungen ließ sich kein PCR-Produkt nachweisen, dabei wurden folgende Enzyme getestet: *Tth* DNA-Polymerase, *Taq* DNA-Polymerase, *Pwo* DNA-Polymerase, Fast Start *Taq* PCR-System, Expand PCR-System, GC-Rich PCR-System (alle von Roche, Mannheim).

Abbildung 22 zeigt die maximal erreichte Ausbeute an **47**-modifizierter fDNA. Man sieht, dass nach 30 Zyklen eine Produktbande sichtbar wird (Bahn 4 und 5), die aber selbst nach 50 Zyklen (Bahn 7 und 8) nur noch gering zunimmt. Bei einem exponentiellen Verlauf der PCR müssten sich die Ausbeuten dieser beiden Reaktionen um den Faktor 1 Million unterscheiden. Um überhaupt eine Produktbande detektieren zu können, war es nötig, große Templatmengen zu verwenden, die vor der Amplifikation gerade nicht mehr auf einem Agarosegel nachweisbar waren.



**Abbildung 22:** PCR unter Verwendung des 7-modifizierten Guanosinderivats **47**. In Bahn 1 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR (*Tth* DNA-Polymerase, 1.5 mM Mg<sup>2+</sup>, Bahn 2-5: 30 Zyklen, sonst 50 Zyklen). Bahn 2: Positivkontrolle 200 µM dATP, dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3 und 6: Negativkontrollen 200 µM dATP, dCTP und TTP sowie „GC-Rich solution“; Bahn 4 und 7: wie Bahn 3/6 + 400 µM **47**; Bahn 5 und 8: wie Bahn 4/7 + „GC-Rich solution“.

Die geringen Ausbeuten liegen wahrscheinlich in der Tatsache begründet, dass dsDNA, die in beiden Strängen die Modifikation trägt, durch eine signifikant erhöhten Schmelztemperatur nicht mehr denaturiert werden kann. Für diese These sprechen einige der folgenden experimentellen Indizien. Die Ausbeute an Produkt steigt :

- mit der Anzahl der Zyklen, aber eindeutig nicht exponentiell, wie für eine PCR zu erwarten, sondern eher linear. Ein solcher linearer Verlauf entspricht genau einer „asymmetrischen“ PCR, bei der in jedem Zyklus nur ein DNA-Strang generiert wird.
- nicht durch Verlängerung der Elongationszeit. Dies schließt aus, dass es sich um einen kinetischen Effekt, also den verlangsamten Einbau der modifizierten dNTPs handelt.



- durch Verlängerung der Denaturierungszeit. Dies spricht eindeutig für ein verändertes Denaturierungsverhalten.
- durch Zugabe von „GC-Rich solution“, einem Additiv, das die Schmelztemperatur von dsDNA senkt.

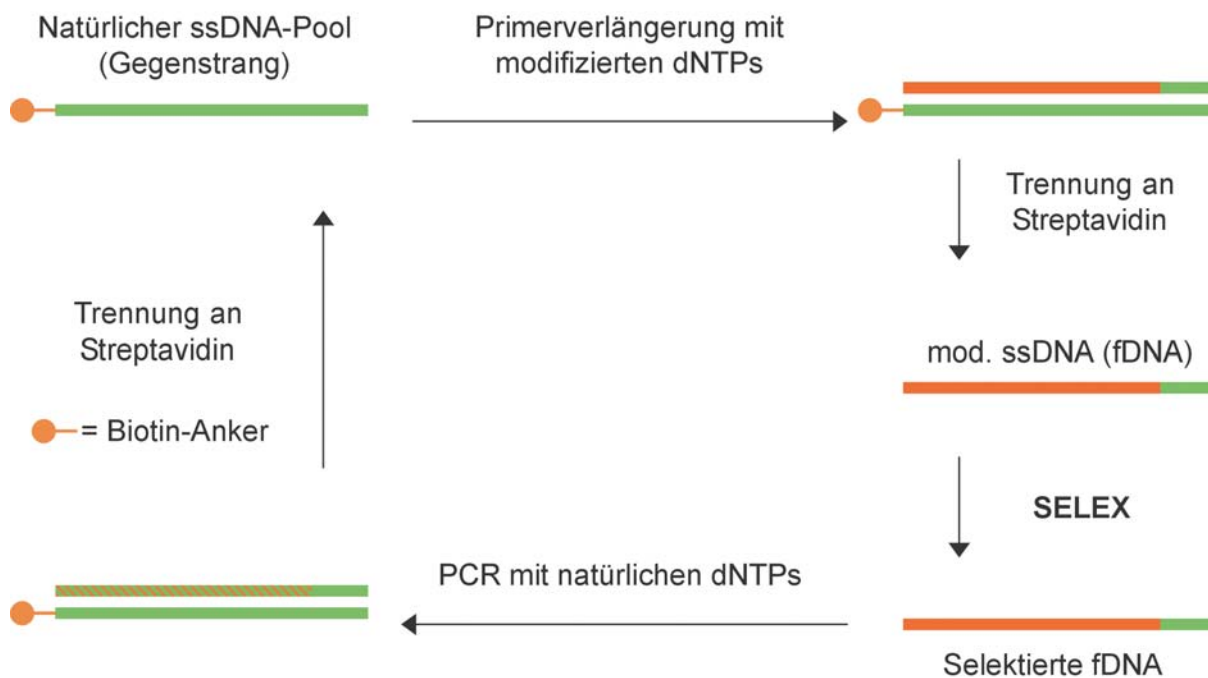
Da es nicht zufriedenstellend möglich war, das modifizierte Guanosinderivat **47** *via* PCR in DNA einzubauen, wurde eine andere Strategie (siehe Kapitel 3.2.2) zur Generierung der fDNA angewendet.

### 3.2.2 Einbauversuche *via* Primer-Verlängerung

Nachdem die Versuche, hochgradig funktionalisierte DNA durch Einsatz der entsprechenden Nukleotide als Ersatz für ihre natürlichen Analoga in der PCR zu erzeugen, nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde versucht, die Generierung und die Amplifikation der fDNA voneinander zu trennen. Ein fundamentaler Nachteil der PCR ist nämlich, dass sie aus vielen Einzelschritten mit entsprechend vielen Parametern besteht, aber nur die Summe aller Reaktionen im Experiment sichtbar wird. Daher ist es sehr schwierig, bei negativ verlaufenden Experimenten Rückschlüsse auf die Ursachen hierfür zu ziehen. Analysiert man jedoch die einzelnen Schritte der PCR getrennt, ist es viel einfacher, die Probleme zu identifizieren und durch Variation der Versuchsbedingungen zu beheben. Außerdem kann, wie bereits in Kapitel 3.2.1 angedeutet, der Versuch, hochmodifizierte DNA *via* PCR zu erzeugen, die Leistungsfähigkeit dieses enzymatischen Verfahrens überfordern. Neben der korrekten Erkennung der modifizierten dNTPs muss auch das korrekte Ablesen der Modifikationen im DNA-Strang gewährleistet werden, d. h. es müssen WATSON-CRICK Paare aus zwei modifizierten Nukleobasen gebildet werden. Darüber hinaus muss die DNA-Polymerase alle eventuellen Änderungen der biophysikalischen Eigenschaften der DNA, z. B. das Schmelzverhalten oder die Art der helikalen Struktur, tolerieren.

In einer alternativen Strategie generiert man zunächst einen Hybridstrang aus DNA und fDNA in einer templatgesteuerten Primer-Verlängerungsreaktion (siehe Abbildung 23). Ganz ähnlich zu der PCR wird in der Primer-Verlängerungsreaktion durch eine DNA-Polymerase doppelsträngige DNA (dsDNA) aus einem einzelsträngigen Templat durch Polymerisation von Nukleosidtriphosphaten erzeugt. Hierbei wird allerdings nur ein Primer verwendet und es wird auch nur ein Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Elongation durchlaufen. Somit wird im Idealfall aus jedem DNA-Einzelstrang ein doppelsträngiges DNA-Molekül generiert.

In der Praxis verwendet man allerdings einen Überschuss an Templat in Vergleich zu der eingesetzten Menge an Primer, um eine quantitative Hybridisierung desselben zu ermöglichen. Die Primer-Verlängerung kann nun mit hoher Aussagekraft verfolgt werden, indem ein radioaktiv markierter Primer verwendet wird und die Reaktionsprodukte durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert werden. Durch Wahl der geeigneten Versuchsbedingungen und Kontrollexperimente lassen sich nicht nur Aussagen über erfolgreiche oder nicht erfolgreiche Inkorporation der modifizierten Nukleotide gewinnen, sondern auch Reaktionskinetiken bestimmen und Nebenreaktionen detektieren.



**Abbildung 23:** Alternatives Selektionsschema, bei der die fDNA durch Primer-Verlängerung generiert und nach der Selektion mittels PCR unter Verwendung natürlicher dNTPs amplifiziert wird. Natürliche DNA ist dabei grün, der modifizierte Anteil rot dargestellt.

Nach einer erfolgreichen Generierung der fDNA können zur Übertragung auf präparative Maßstäbe biotinylierte Primer bzw. biotinylierte Template verwendet werden. Auf diese Weise lässt sich der gebildete fDNA/DNA-Hybridstrang an Streptavidinagarose immobilisieren und die beiden Stränge können durch chemische Denaturierung (üblicherweise mit 0.1 N Natriumhydroxid-Lösung) voneinander getrennt werden. Die so erhaltene einzelsträngige fDNA kann direkt für die *in vitro*-Selektion eingesetzt werden.

Im Falle des Einsatzes modifizierter Nukleotide in Selektionsexperimenten wie in Kapitel 1.2 beschrieben, muss die einzelsträngige fDNA nach der SELEX wiederum als Template für eine PCR dienen können. Im Unterschied zu den unter Kapitel 3.2.1 beschriebenen Experimenten

können hier allerdings natürliche dNTPs eingesetzt werden. Dies hat zum einen den praktischen Vorteil, dass die Menge der benötigten modifizierten dNTPs drastisch reduziert werden kann - sie werden im gesamten Selektionszyklus nur noch für die Primer-Verlängerung benötigt - zum anderen vermeidet man die Bildung von fDNA-Duplexen. Wie in Kapitel 3.2.1 bereits ausgeführt wurde, ist vermutlich die Bildung solcher Duplexe verantwortlich dafür, dass bislang maximal zwei modifizierte dNTPs gleichzeitig *via* PCR inkorporiert werden konnten. Der Grund liegt wahrscheinlich in deutlich geänderten biophysikalischen Eigenschaften dieser Duplexe, z. B. erhöhte Schmelztemperaturen oder andere Sekundär- bzw. Quartärstrukturen.

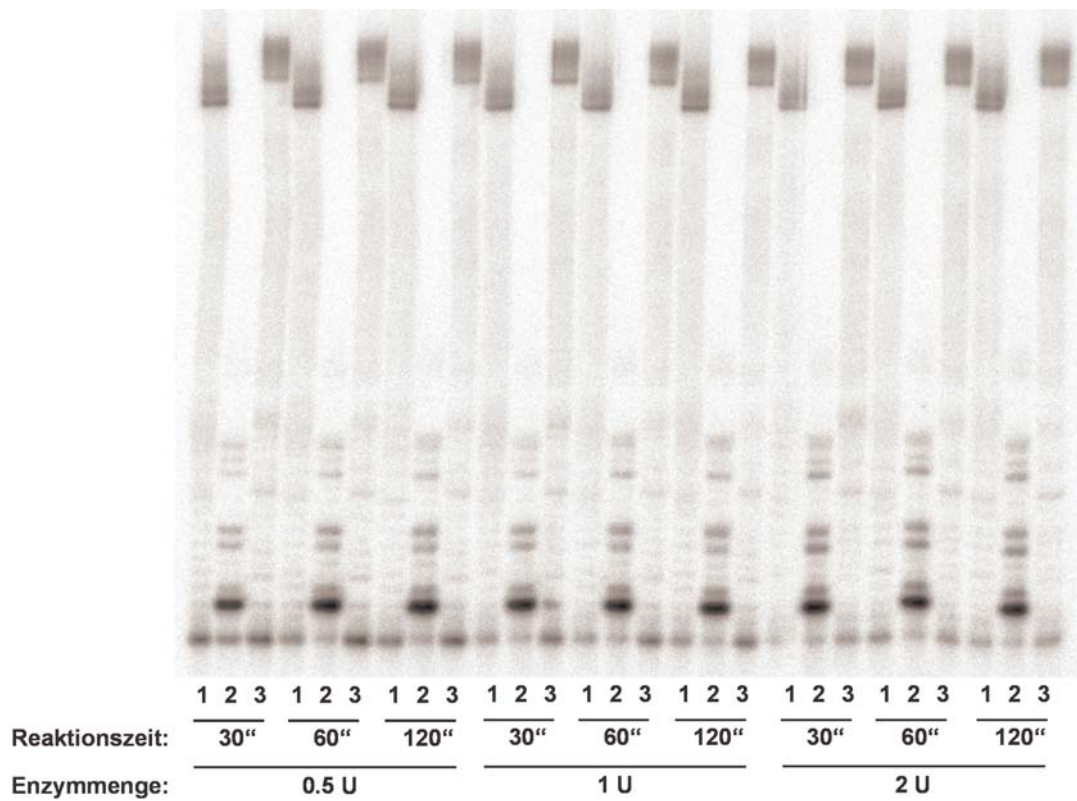
Wird auch in der PCR ein biotinylierter Primer verwendet, lässt sich der gewünschte DNA-Einzelstrang separieren und kann wiederum als Templat für eine Primer-Verlängerung den nächsten Selektionszyklus eröffnen. Abbildung 23 fasst dieses Selektionsschema zusammen, dass in ähnlicher Form auch zur Selektion von DNA-Aptameren oder Desoxyribozymen<sup>[39,40]</sup> verwendet werden kann.

### 3.2.2.1 Einbaustudien unter Verwendung eines Modelltemplats

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten modifizierten Nukleotide tatsächlich mit allen für die *in vitro*-Selektion notwendigen Schritten kompatibel sind, wurde zunächst ein 79 bp langes Modelltemplat konstruiert. Hierzu wurde die Sequenz so gewählt, dass außerhalb der 19 bp bzw. 20 bp langen Primerregionen möglichst keine Basen zweimal oder öfter hintereinander vorkamen. Außerdem wurde auf eine annähernd gleichmäßige Basenverteilung geachtet und überprüft, dass keine besonders stabilen Sekundärstrukturen gebildet werden können. Dazu wurde die DNA-Sequenz mit dem Programm *DNA mfold*<sup>[86]</sup> analysiert.

Dieses Templat wurde nun mit einem 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten 3'-Primer hybridisiert und der enzymatischen Primer-Verlängerung unterworfen. Um eine quantitative Verlängerung des Primers zu gewährleisten, wurde ein Templat/Primerverhältnis von 3:1 gewählt. Spätere Versuche, das Verhältnis auf 2:1 zu senken, führten zu signifikant schlechteren Ausbeuten (Daten hier nicht gezeigt). Da sich die DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* (*Tth*) in den vorausgegangenen PCR-Experimenten als geeignet herausgestellt hatte, modifizierte dNTPs als Substrat zu akzeptieren, wurde mit diesem Enzym begonnen. Zunächst wurde dGTP durch

das Analogon **47** (siehe Abbildung 16, Seite 27) ersetzt und die Reaktion unter Verwendung unterschiedlicher Enzymmengen und Elongationszeiten durchgeführt.

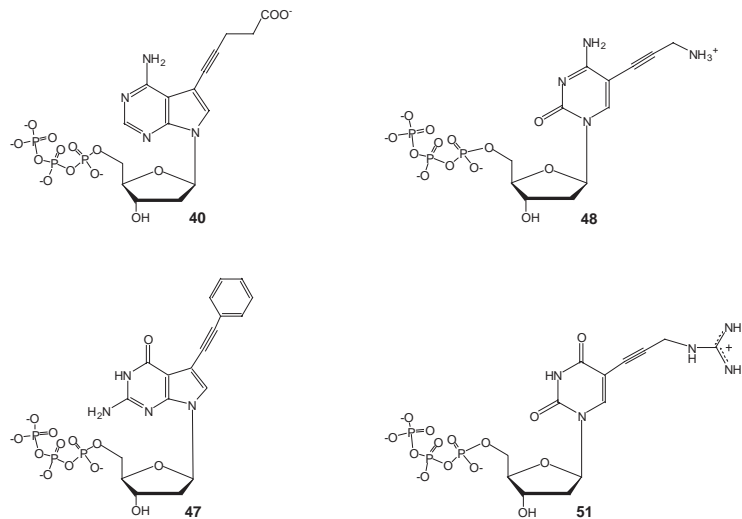


**Abbildung 24:** Primerverlängerung unter Verwendung des 7-modifizierten Guanosinderivats **47**, variiert wurden die Reaktionszeit und die Menge an *Tth* DNA-Polymerase. Die jeweils erste Bahn (1) gehört zur Positivkontrolle (vier natürliche dNTPs, je 200  $\mu$ M), die zweite (2) zur Negativkontrolle (dATP, dCTP und TTP, je 200  $\mu$ M, kein dGTP); die Reaktionen der dritten Bahn (3) verwendeten das modifizierte Nukleotid **47** (400  $\mu$ M, außerdem dATP, dCTP und TTP, je 200  $\mu$ M).

Die PAGE-Analyse (siehe Abbildung 24) zeigte unter den gewählten Versuchsbedingungen die Bildung von Vollängenprodukt in Mengen vergleichbar der Positivkontrolle. Zeitgleich wurden in den Kontrollexperimenten, in denen weder dGTP noch **47** verwendet wurde, keine entsprechenden Banden beobachtet. Weiterhin zeigten sich sowohl für die Reaktion mit natürlichen als auch mit dem modifizierten Substrat zwei Produktbanden, da die *Tth* DNA-Polymerase bei einem Teil der Produkte ein zusätzliches A am 3'-Ende der DNA einführt (A-Überhang). Schließlich lieferte die DNA, die modifizierte Nukleotide enthielt, eine etwas unschärfere Produktbande, was möglicherweise auf stabile Sekundärstrukturen oder Aggregate zurückzuführen ist, die unter den Bedingungen der denaturierenden PAGE nicht, oder nicht vollständig aufgelöst wurden.<sup>[87]</sup> Die Tatsache, dass bei den Experimenten, bei denen dGTP ganz weggelassen wurde, kein Vollängenprodukt und nur sehr geringe Mengen DNA mit

einen einmaligen Fehleinbau detektiert wurden, weist darauf hin, dass die *Tth* DNA-Polymerase Verbindung **47** als Ersatz für dGTP sequenzgetreu einbaut.

Nachdem der Einbau des 2'-Desoxyguanosinderivats gezeigt werden konnte, wurden sukzessiv alle weiteren dNTPs durch ihre modifizierten Analoga ersetzt. Um dabei eine größtmögliche Bandbreite an Funktionalitäten zur Verfügung zu haben, wurden zunächst nur die Verbindungen **40**, **48**, **47** und **51** (vergleiche Abbildung 25) verwendet.

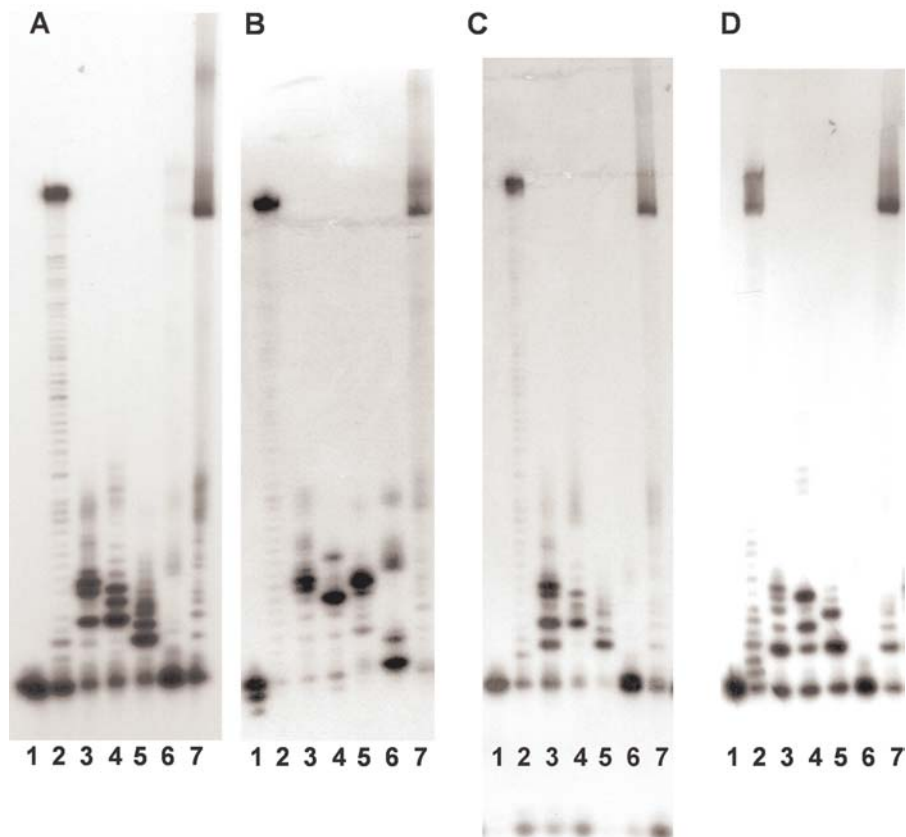


**Abbildung 25:** Der in Kapitel 3.2.2.1 bis 3.2.2.3 verwendete Satz von Nucleotiden, dargestellt in den Ionenformen, wie sie hauptsächlich in den enzymatischen Reaktionen vorliegen.

Gleichzeitig wurde die Konzentration der verwendeten Nucleotide gesenkt, um die aufwändig zu synthetisierenden Substanzen möglichst ökonomisch einzusetzen. Im Laufe der Experimente zeigte sich, dass die Zugabe von thermostabiler anorganischer Pyrophosphatase die Reaktion positiv beeinflusst. Vor allem konnte dadurch eine Produktbande geringer Intensität unterdrückt werden, die in Experimenten entstand, denen keinerlei Cytidinderivat zugegeben war. Diese Produkte hatten wahrscheinlich ihren Ursprung darin, dass das Enzym in Ermangelung geeigneter Substrate für die Polymerisation die Rückreaktion katalysiert, was Cytidinmonophosphat freisetzt, welches mit freiem Pyrophosphat in das Triphosphat überführt wurde. Dieses Cytidin stammt vom 3'-Ende des verwendeten Primers, was erklärt, warum nur in den Kontrollexperimenten, die kein dCTP verwendeten, Produkt detektierbar war. Die Zugabe der Pyrophosphatase führt nun zur irreversiblen Hydrolyse von Pyrophosphat, und inhibiert so die Synthese von dCTP aus dCMP.

Es konnte gezeigt werden, dass die *Tth* DNA-Polymerase in der Lage ist, an dem Modelltemplat eine fDNA zu generieren, in der alle eingebauten Nucleotide aus modifizierten Derivaten bestehen, wobei alle durchgeführten Kontrollexperimente kein entsprechendes Produkt

lieferten. Um 2 pmol Primer nahezu quantitativ in die entsprechende fDNA zu überführen waren 0.5 U Enzym und 40  $\mu\text{M}$  modifizierter dNTPs (Reaktionsvolumen 20  $\mu\text{L}$ ) ausreichend. Damit war erstmals der Nachweis erbracht, dass sich mit diesem Verfahren tatsächlich die gewünschte fDNA erzeugen lässt (siehe Abbildung 26, A).



**Abbildung 26:** Primerverlängerung mit vier verschiedenen modifizierten dNTPs. Aufgetragen sind die Reaktionsprodukte unter Verwendung von *Tth*- (A), Klenow Fragment (exo-) (B), *Taq*- (C) bzw. *Vent<sub>R</sub>*<sup>®</sup> (exo-) (D) DNA-Polymerase. Bahn 1 zeigt den unverlängerten Primer, Bahn 2 die Positivkontrolle (50  $\mu\text{M}$  jedes natürlichen dNTPs). Die Bahnen 3-6 zeigen die Negativkontrollen (50  $\mu\text{M}$  dreier modifizierter dNTPs: Bahn 3: 48, 47, 51; Bahn 4: 40, 47, 51, Bahn 5: 40, 48, 51, Bahn 6: 40, 48, 47). Bahn 7 zeigt die Generierung von Vollängen-fDNA (50  $\mu\text{M}$  jedes modifizierten dNTPs 40, 48, 47 und 51). *Taq* DNA-Polymerase zeigt eine signifikante 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche die zusätzlichen Banden am unteren Ende des Gels in C erklärt (siehe Text).

Nun galt es, die Methode weiter zu optimieren, wozu zunächst weitere DNA-Polymerasen getestet wurden. Dabei wurden ausschließlich Enzyme verwendet, die über keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, dem sogenannten *Proofreading*, verfügen. Da diese Exonukleaseaktivität konzentrationsabhängig in Bezug auf die verwendeten dNTPs ist, müssen bei Experimenten mit diesen Enzymen deutlich höhere Nukleotidkonzentrationen (etwa 200  $\mu\text{M}$ ) verwendet werden, um eine Degradation der Templat-DNA zu vermeiden. Daher wurden fünf weitere Enzyme ausgewählt und für entsprechende Experimente verwendet: *Bst* DNA-Polymerase, Sequenase<sup>®</sup> v. 2.0, Klenow Fragment (exo-), *Taq* DNA-Polymerase und *Vent<sub>R</sub>*<sup>®</sup> (exo-) DNA-



Polymerase. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse dieser Experimente (vgl. auch Abbildung 26) zusammen:

	<i>Bst</i>	Sequenase <sup>®</sup>	<i>Tth</i>	KF (exo-)	<i>Taq</i>	Vent <sub>R</sub> <sup>®</sup> (exo-)
<b>4 nat. dNTPs</b>	++	+	++	++	++	++
<b>ohne dATP</b>	-	-	-	-	-	-
<b>ohne dCTP</b>	-	-	-	-	-	-
<b>ohne dGTP</b>	-	-	-	-	-	-
<b>ohne TTP</b>	-	-	-	-	-	-
<b>4 mod. dNTPs</b>	+	-	++	++	++	++

**Tabelle 2:** Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Generierung von vollständig modifizierter fDNA durch Primer-Verlängerung am Modelltemplat. In allen Reaktionen wurden 2 pmol Templat unter Verwendung von 1 U Enzym und 50 µM jedes dNTPs bei einer Reaktionszeit von 30 Minuten verlängert. ++ = Viel Produkt, + = wenig Produkt, - = kein Produkt detektierbar.

Wie aus den Ergebnissen leicht ersichtlich ist, lieferten alle verwendeten Enzyme Vollständigprodukt, wenn die natürlichen Nukleotide eingesetzt wurden, allerdings war bei Sequenase<sup>®</sup> eine signifikant geringere Ausbeute zu beobachten. Die DNA-Polymerase aus *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) war nur in der Lage, geringe Mengen von fDNA der gewünschten Länge zu produzieren. Da das Bandenmuster der Reaktion mit vier modifizierten dNTPs auffallende Ähnlichkeit mit dem der Negativkontrolle ohne Thymidin hat, ist zu vermuten, dass dieses Enzym das verwendete Thymidinderivat nur sehr schlecht einbauen kann. Die vier anderen Polymerasen zeigten allesamt gute Ausbeuten an fDNA der gewünschten Länge (Abbildung 26, **A-D**). Allerdings war im Falle der *Taq* DNA-Polymerase (Abbildung 26, **C**) eine signifikante 5'-3'-Exonukleaseaktivität zu beobachten. Während eine eventuell vorhandene 3'-5'-Exonukleaserestaktivität, wie sie bei der Verwendung von Klenow Fragment (exo-) (Abbildung 26, **B**) zu beobachten ist, die Bildung der fDNA nicht beeinflusst, ist eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität unerwünscht, da hierbei 5'-Modifikationen, wie z. B. eine Radiomarkierung oder ein Biotin verloren gehen. Daher schied auch die *Taq* Polymerase für weitere Untersuchungen aus und es wurden neben der *Tth* DNA-Polymerase auch Klenow Fragment (exo-) und Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase für weitergehende Studien verwendet.

### 3.2.2.2 Untersuchungen an weiteren Templaten

Während die bisherigen Ergebnisse nur an einem einfachen Modelltemplat gewonnen wurden, galt es nun zu zeigen, dass die Generierung der fDNA auch an anderen Templaten möglich ist, die „anspruchsvolle“ Sequenzen tragen. Dies sind z. B. repetitive Abfolgen gleicher Basen, was in der fDNA zur Akkumulation gleicher Funktionalitäten und ggf. Ladungen führt. Daher wurden vier weitere Template konstruiert, die wie das Modelltemplat 79 NT umfassen und die bei gleichen Primersequenzen in der mittleren, 40 Basen umfassenden Region veränderte Sequenzen tragen. Um den Einfluss der unterschiedlichen eingebrachten funktionellen Gruppen zu untersuchen, wurde jeweils ein A-reiches (**AT**), ein C-reiches (**CT**), ein G-reiches (**GT**) und ein T-reiches (**TT**) Templat synthetisiert.

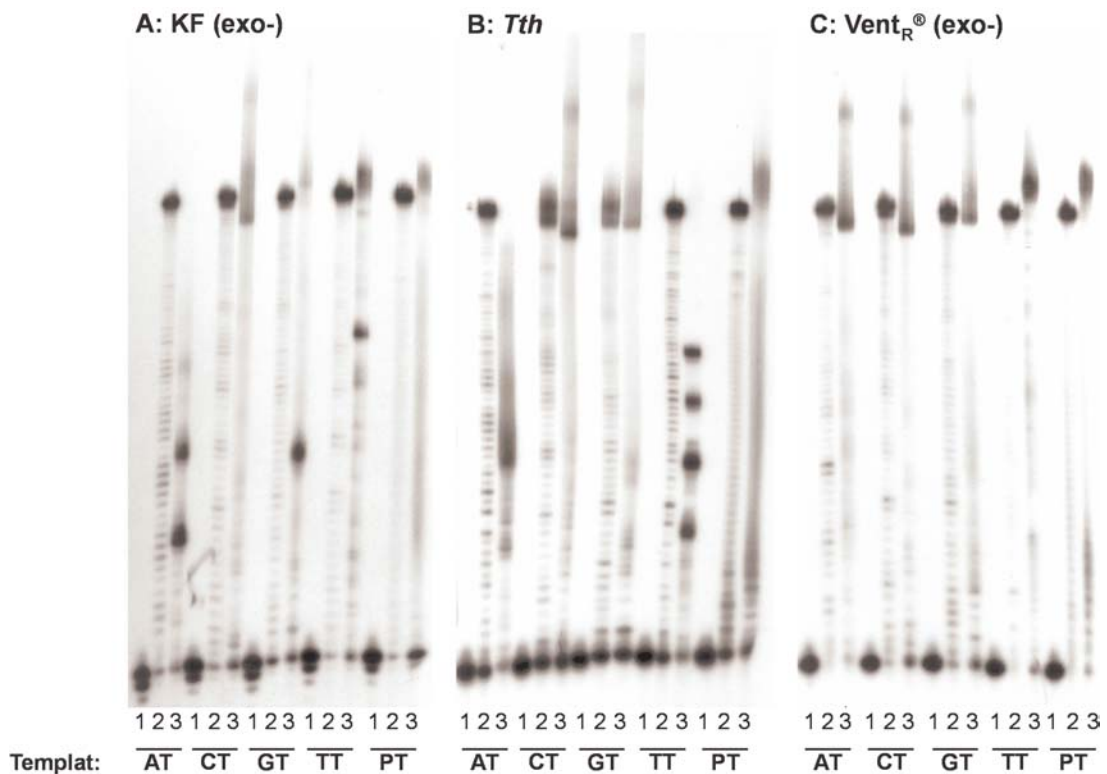
```
AT: A CGT AAT GCA AAG CTA AAA TCG AAA ACT GAA AGT CAA CGT  
CT: C AGT CCT GAC CCG ATC CCC TAG CCC CAT GCC CGT ACC AGT  
GT: G ACT GGT CAG GGC ATG GGG TAC GGG GAT CGG GCT AGG ACT  
TT: T ACG TTG CAT TTC AGT TTT GAC TTT TAG CTT TCG ATT ACG  
PT: N NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN
```

**Abbildung 27:** Sequenzen des mittleren Bereiches der fünf weiteren Template **AT**, **CT**, **GT**, **TT** und **PT**.

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich ist, bestehen 19 dieser 40 Positionen jeweils aus der gleichen Base, wobei zweimal eine Wiederholung von drei und vier gleichen Basen vorkommt. Ferner wurde in einem fünften Templat (**PT**) eine vollkommen randomisierte Sequenz verwendet. Diese sollte die Anwendbarkeit des Verfahrens für *in vitro* Selektionen belegen, bei denen ebensolche *Pools* eingesetzt werden.

Da für die drei verbliebenen DNA-Polymerasen - *Tth*, Klenow Fragment (exo-) und Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) - der sequenzgetreue Einbau bereits am Modelltemplat hinreichend nachgewiesen wurde, waren für die folgenden Untersuchungen entsprechende Kontrollexperimente nicht mehr nötig. Daher wurde für jedes Enzym die Primer-Verlängerung aller fünf Template versucht, einmal unter Verwendung der vier natürlichen dNTPs und einmal unter Verwendung der vier modifizierten Nukleotide **40**, **48**, **47** und **51** (siehe Abbildung 25, Seite 39). Hierbei wurden die Enzym- und Nukleotidkonzentrationen sowie die Elongationszeiten variiert. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen (für jedes Enzym sind nur die Ergebnisse unter optimierten Parametern dargestellt).





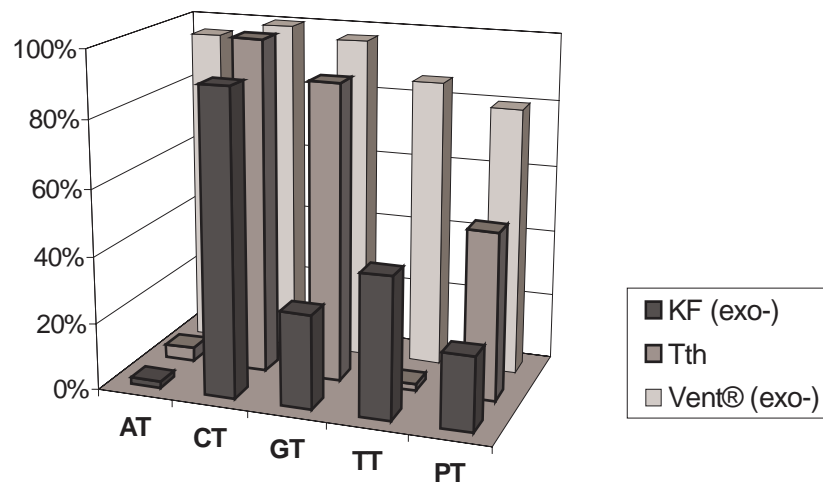
**Abbildung 28:** Primerverlängerung an unterschiedlichen Templaten: Aufgetragen sind die Reaktionsprodukte unter Verwendung von jeweils 1 U Klenow Fragment (exo-) (A), *Tth*- (B) bzw. Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) (C) DNA-Polymerase (Reaktionszeit 30 Minuten). Verlängert wurden jeweils 2 pmol Primer unter Verwendung von 50 µM natürlicher dNTPs (2) bzw. je 50 µM der modifizierten dNTPs **40**, **48**, **47** und **51** (3). Als Negativkontrollen (1) dienen Reaktionen ohne dNTPs.

Das Klenow Fragment (exo-) lieferte Volllängenprodukt für alle Templates, wenn natürliche dNTPs verwendet wurden, fDNA der gewünschten Länge allerdings nur für die Template **CT**, **TT** und **PT** (Abbildung 28, A). Im Falle der Template **AT** und **GT** sind deutliche Abbruchbanden an den Stellen zu sehen, wo erstmals drei (**AT**) oder vier (**AT** und **GT**) gleiche Basen im Templat auftreten. Offensichtlich hat dieses Enzym Probleme, mehrere modifizierte Cytidine oder Guanosine hintereinander einzubauen. Ein ähnliches Bild war für die *Tth* DNA-Polymerase zu beobachten (Abbildung 28, B). Auch hier lieferten die natürlichen Nukleotide durchweg gute Ausbeuten mit allen Templaten, aber nur für **CT**, **GT** und **PT** wurde entsprechende fDNA generiert. Die Muster der Abbruchbanden im Falle der Template **AT** und **TT** korrespondieren wiederum mit dem repetitiven Auftreten der entsprechenden Basen, besonders gut ist dies für das Templat **TT** zu sehen.

Im Gegensatz dazu lieferte Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase nicht nur Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs, sondern auch die entsprechenden fDNA-Produkte ausgehend von allen Templaten (Abbildung 28, C). In allen Fällen ist eine vollständige Verlängerung der Primer zu beobachten. Die Ausbeuten an fDNA gewünschter Länge entsprechen durchweg denen, die

in den Positivkontrollen erhalten wurden. Allerdings ist bei der fDNA, vor allem in den C- bzw. G-reichen Varianten, eine deutliche Verbreiterung der Banden auf den Gelen zu beobachten, was wiederum für stabile Aggregate oder Sekundärstrukturen spricht.

Diese Experimente zeigen, dass die Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase in der Lage ist, an verschiedenen Templaten, inklusive solchen mit randomisierten Sequenzen, durch Primer-Verlängerungsreaktionen fDNA in guten Ausbeuten zu generieren. Abbildung 29 fasst diese Ergebnisse quantitativ zusammen.



**Abbildung 29:** Quantifizierung der durchgeführten Primer-Verlängerungen (siehe Abbildung 28) an den umfangreiche Repetitionen aufweisenden Templaten **AT**, **CT**, **GT** und **TT**, sowie an randomisierter DNA (**PT**). Die Zahlenangaben stellen die prozentuale Ausbeute an Vollängenprodukt relativ zu der Ausbeute unter Verwendung natürlicher dNTPs dar. Die Quantifizierung erfolgte am Phosphorimager.

### 3.2.2.3 Übertragung auf größere Ansätze

Da in den analytischen Primer-Verlängerungen relativ geringe Primer-Mengen eingesetzt wurden, war es nötig, weitere Untersuchungen durchzuführen, um diese Reaktionen auf größere Maßstäbe zu übertragen. *In vitro*-Selektionen starten für gewöhnlich mit Oligonukleotidmengen in der Größenordnung von 1-2 nmol, so dass eine Maximierung der DNA-Konzentrationen angestrebt wird, um das benötigte Reaktionsvolumen nicht unnötig zu vergrößern.

Hierzu wurden Primer-Verlängerungsreaktionen unter Verwendung von Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase durchgeführt. Dabei wurde versucht, die einsetzbare Primermenge durch Variation der Polymerasekonzentration zu maximieren. Die Nukleotidkonzentrationen wurden nicht weiter erhöht. Dies hat zum einen ökonomische Gründe, zum anderen gewährt auch die verwendete Konzentration von 50 μM je dNTP einen hinreichenden Überschuss und sinkt im

Laufe der Reaktionen nur marginal. Die maximal einsetzbare Primer-Menge wurde schließlich auf 10 pmol in einem Reaktionsvolumen von 40  $\mu\text{L}$  bestimmt. Unter Verwendung von 2 U Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase konnten binnen zwei Stunden gute Ausbeuten erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Primerkonzentration führte zu einer signifikanten Verschlechterung der Ausbeuten, auch wenn die Reaktionszeit auf 12 Stunden verlängert oder noch größere Enzymmengen verwendet wurden.

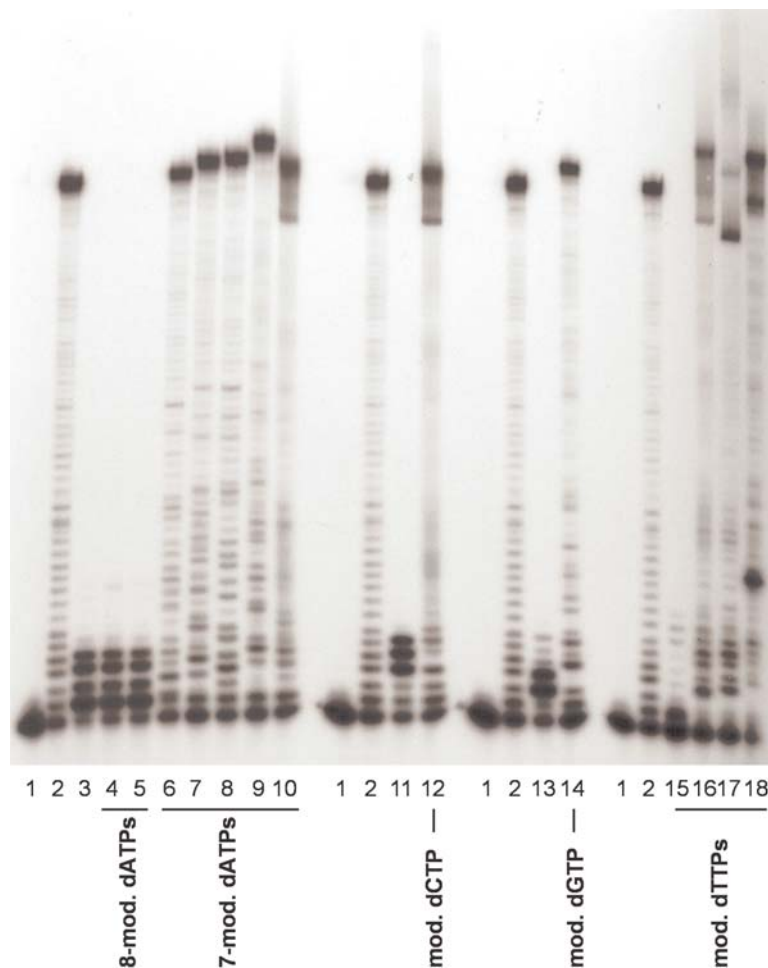
Die hier erreichte Konzentration ist durchaus auch für Ansätze in großen Maßstäben durchführbar. In der ersten Runde einer typischen *in vitro*-Selektion könnte die Verlängerung von 1 nmol Primer in 4 mL Reaktionsvolumen durchgeführt werden, hierzu wären dann 0.2  $\mu\text{mol}$  jedes modifizierten Nukleotids notwendig, so dass die im Rahmen dieser Dissertation hergestellten Mengen dieser Verbindungen für mehrere Selektionen ausreichen sollten.

#### 3.2.2.4 Untersuchungen unter Verwendung unterschiedlicher Nukleotide

Während bisher nur vier der modifizierten Nukleotide für die Primer-Verlängerungsstudien verwendet wurden, stand die Untersuchung aus, inwiefern sich die anderen synthetisierten Analoga (siehe Kapitel 8.3) inkorporieren lassen. Da die Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase als ideales Enzym für diese Reaktionen identifiziert wurde, konnte in einer Versuchsreihe der Einzeleinbau aller vorhandenen modifizierten *N*-7-Deazanukleotide (**39**, **40**, **42**, **43**, **44** und **47**, siehe Abbildung 15, Seite 26) sowie aller modifizierten Pyrimidinderivate (**48**, **51**, **52**, **53**, siehe Abbildung 17, Seite 27) getestet werden. Außerdem wurden zwei 8-modifizierte 2'-Desoxyadenosintriphosphate (**11**, **16**, siehe Abbildung 11, Seite 22) verwendet, um zu untersuchen, ob sich diese dNTPs trotz erfolgloser Einbauversuche *via* PCR durch Primer-Verlängerung inkorporieren lassen. Dabei wurde in jedem Experiment ein natürliches dNTP durch eine Modifikation ersetzt und mit den entsprechenden Kontrollen durch denaturierende PAGE untersucht.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 30 zu sehen. Der Einbau der in den vorherigen Experimenten verwendeten Nukleotide **40**, **48**, **47** und **51** wurde zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit erneut durchgeführt. Bei der Analyse der Resultate fällt auf, dass die 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosine nicht inkorporiert werden. Das Bandenmuster der Reaktionen, denen diese Derivate zugesetzt wurden (Bahn 4 und 5) ist exakt identisch mit dem der Negativkontrolle, in der nur dCTP, dGTP und TTP zugegen waren. Offensichtlich werden diese Derivate entweder von der Polymerase nicht als dATP-Analogon erkannt, oder sie werden trotz Erkennung nicht inkorporiert. Im Gegensatz dazu werden alle 7-modifizierten *N*-7-

Deaza-2'-desoxyadenosine eingebaut (Bahn 6-10), sowohl die Ausbeute als auch das Muster der – in geringem Maße vorhandenen – Abbruchbanden entsprechen denen der Vergleichsreaktionen mit vier natürlichen dNTPs.



**Abbildung 30:** Primer-Verlängerungsreaktionen unter Verwendung von Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase (Reaktionszeit 30 Minuten, 2 pmol Primer, alle dNTPs 50 µM). Bahn 1 zeigt nicht verlängerten Primer, Bahn 2 die Positivkontrolle (alle vier natürlichen dNTPs). Weitere Bahnen: Bahn 3: dCTP, dGTP und TTP; Bahn 4: wie Bahn 3 + **16**; Bahn 5: wie Bahn 3 + **11**; Bahn 6: wie Bahn 3 + **40**; Bahn 7: wie Bahn 3 + **39**; Bahn 8: wie Bahn 3 + **43**; Bahn 9: wie Bahn 3 + **42**; Bahn 10: wie Bahn 3 + **44**; Bahn 11: dATP, dGTP und TTP; Bahn 12: wie Bahn 11 + **48**; Bahn 13: dATP, dCTP, und TTP; Bahn 14: wie Bahn 13 + **47**; Bahn 15: dATP, dCTP und, dGTP; Bahn 16: wie Bahn 15 + **52**; Bahn 17: wie Bahn 15 + **51**; Bahn 18: wie Bahn 15 + **53**.

Bei den Thymidinderivaten konnte neben **51** (Bahn 17) auch das Aminosäurekonjugat **53** (Bahn 16) eingebaut werden. Interessanterweise liefert aber auch das vollkommen gesättigte Derivat **52** (Bahn 18) große Mengen an Vollängenprodukt und nur eine größere Abbruchbande. Dieses Ergebnis ist zunächst etwas überraschend, da LEE et al. alkenyl- und alkinyl-modifizierte Thymidine erfolgreich einbauen konnten, nicht jedoch ihre entsprechenden Alkanderivate.<sup>[55]</sup> Allerdings verwendeten die Autoren zum einen *Taq* DNA-Polymerase, zum anderen erfolgte der Einbau durch PCR, bei der die modifizierten Derivate in beide Stränge

der dsDNA inkorporiert werden müssen. Ein entsprechend positives Resultat kann also durchaus an den geänderten Reaktionsbedingungen liegen, zumal auch BATTERSBY et al.<sup>[48]</sup> Ergebnisse präsentieren, die zu denen von LEE et al. konträr sind: Während letztere nämlich erfolgreich ein propargylamin-modifiziertes Thymidin verwenden, berichten BATTERSBY et al., dass in ihren Experimenten *Taq* DNA-Polymerase das gleiche Derivat zwar im Templatstrang toleriert, es aber nicht inkorporieren kann, weshalb sie Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase verwendeten. Ähnliche Abhängigkeiten beobachteten auch SAKTHIVEL et al.<sup>[47]</sup>: ihr allylamin-modifiziertes Thymidin ließ sich nicht mit *Taq* DNA-Polymerase, wohl aber mit anderen Enzymen, wie z. B. *rTh* DNA-Polymerase, in der PCR einsetzen. Diese Ergebnisse zeigen, dass zur erfolgreichen Inkorporation von modifizierten dNTPs ein sorgfältige Optimierung der Reaktionsparameter nötig ist und dass mit den hier verwendeten Methoden (Primer-Verlängerung, Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase, etc.) sehr gute Bedingungen für die Generierung von fDNA etabliert wurden.

### 3.2.3 fDNA als Templat für molekularbiologische Reaktionen

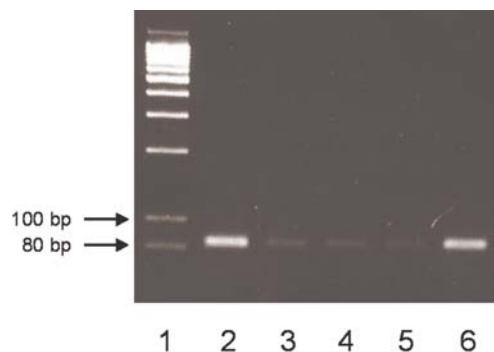
#### 3.2.3.1 PCR-Amplifikation von fDNA

Für einen erfolgreichen Einsatz von fDNA in *in vitro*-Selektionen, muss diese enzymatisch generierbar und amplifizierbar sein, also auch als Templat für eine PCR dienen können. Um dies zu zeigen, musste einzelsträngige fDNA ohne Isotopenmarkierung hergestellt werden. Ausgehend von dem nicht-markierten Primer (10 pmol, Reaktionsvolumen 40 µL) wurde die fDNA an dem entsprechenden 5'-biotinylierten Modelltemplat generiert. Anschließend wurde das entstandene fDNA/DNA-Hybrid auf Streptavidinagarose immobilisiert, nach sorgfältigem Waschen der fDNA-Strang mit 0.1 N NaOH eluiert und das Eluat durch Filtration an G-25 Ionenaustauschersäulen entsalzt. Zum Vergleich diente unter analogen Bedingungen hergestellte ssDNA, d. h. das Primer-Verlängerungsprodukt aus natürlichen Nukleotiden wurde ebenfalls immobilisiert und der korrespondierende Einzelstrang isoliert.

Weiterhin war die Durchführung einer entsprechenden Kontrollreaktion nötig, um nachzuweisen, dass auftretende PCR-Produkte nicht auf die Amplifikation von Verunreinigungen durch eluierte Templatstränge zurückzuführen sind (welche exakt die gleichen PCR-Produkte liefern): Bei diesem Verfahren ist nicht auszuschließen, dass auch geringe Mengen des biotinylierten Stranges durch die Behandlung mit NaOH von der Matrix abgetrennt und durch die PCR amplifiziert werden. Daher wurde eine analoge Primer-Verlängerung durchgeführt, der

keine dNTPs zugesetzt waren. Dies ermöglichte die Durchführung einer Negativkontrolle unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen. Das entsprechende Hybrid aus Templat-DNA und unverlängertem Primer wurde ebenfalls auf Streptavidinagarose immobilisiert, wie für die anderen Experimente beschrieben gewaschen und mit 0.1 N NaOH behandelt.

Versuche, die fDNA unter Standard PCR-Bedingungen zu amplifizieren, schlugen zunächst fehl. Die bereits in Kapitel 3.2.1 ausgeführten Überlegungen zur erhöhten Schmelztemperatur der fDNA/DNA-Duplexe im Vergleich zu natürlicher dsDNA führten zu entsprechenden Variationen der PCR-Bedingungen: Um auch DNA mit hohen Schmelztemperaturen erfolgreich in der PCR zu verwenden, können zum einen Additive zugesetzt werden, welche die Schmelztemperatur von dsDNA senken (z. B. Betain, Formamid, DMSO, etc.), zum anderen kann die Denaturierungstemperatur erhöht werden. Daher wurde zunächst die DNA-Polymerase aus dem extrem thermophilen Bakterium *Pyrococcus woesei* (*Pwo*) verwendet, die auch *in vitro* über eine gesteigerte Thermostabilität verfügt und die Temperatur im Denaturierungsschritt auf 100 °C erhöht. Da auch diese keine PCR-Produkte ausgehend von fDNA produzierte, wurde zusätzlich „GC-Rich solution“ zugegeben, ein Additiv der Fa. Roche, das aus verschiedenen Substanzen besteht, die, wie oben beschrieben, die Schmelztemperatur von dsDNA senken. Erst die Kombination von erhöhter Denaturierungstemperatur und zusätzlichen Additiven lieferte die gewünschten PCR-Produkte (siehe Abbildung 31)



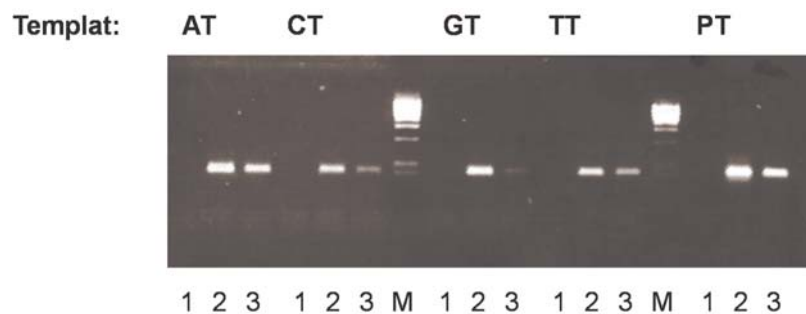
**Abbildung 31:** PCR-Amplifikation von fDNA. In Bahn 1 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die PCR-Produkte (Denaturierung bei 100 °C, *Pwo* DNA-Polymerase) von folgenden Templaten: Bahn 2: natürliche ssDNA (Positivkontrolle); Bahn 3: Negativkontrolle (siehe Text), ohne „GC-Rich solution“; Bahn 4 fDNA ohne „GC-Rich solution“; Bahn 5 Negativkontrolle (siehe Text) mit „GC-Rich solution“; Bahn 6: fDNA mit „GC-Rich solution“.

Deutlich zu erkennen ist, dass bei Zugabe von „GC-Rich solution“ auch im Falle der fDNA Amplifikate in Mengen generiert werden, die der Verwendung von DNA-Templaten entsprechen. In den anderen Experimenten, d. h. sowohl in den Negativkontrollen als auch in dem Versuch der fDNA-Amplifikation ohne Additive, wurden deutlich geringere Mengen ge-



wünschter DNA generiert, die, wie oben bereits erläutert, auf Spuren von eluierter biotinylierter DNA zurückzuführen sind.

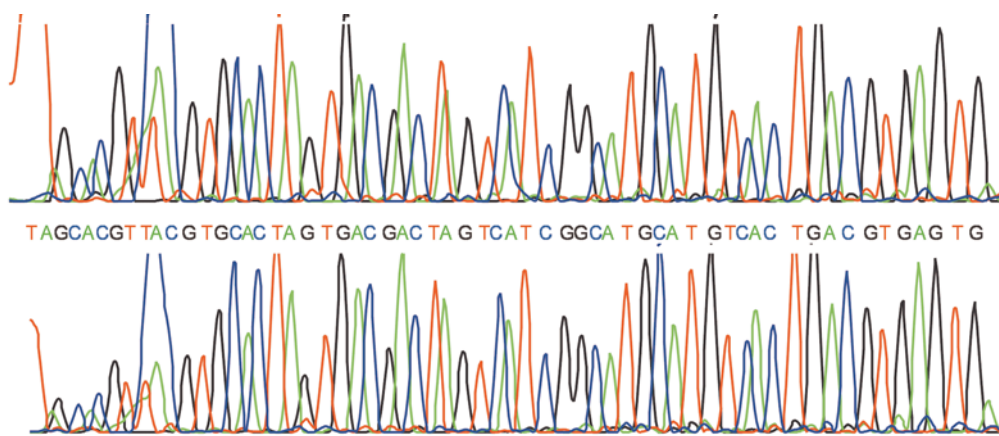
Nachdem Bedingungen gefunden wurden, unter denen die aus dem Modelltemplat gewonnene fDNA durch PCR amplifiziert werden kann, galt es, auch die fDNAs zu verwenden, die aus den fünf weiteren Templaten hervorgehen. Dazu wurden diese an den entsprechenden biotinylierten Templaten (**AT**, **CT**, **GT**, **TT** und **PT**) generiert und mittels Streptavidin getrennt. Ebenso wurden die gleichen Kontrollexperimente durchgeführt und die entsalzten Eluate als Templat für die PCR unter den o. a. Bedingungen verwendet.



**Abbildung 32:** PCR-Amplifikation der aus den Templaten **AT**, **CT**, **GT**, **TT** und **PT** generierten fDNA. Bahn 1 repräsentiert jeweils die Negativkontrolle (siehe Text), Bahn 2 die Positivkontrolle (ssDNA als Templat) und Bahn 3 die Amplifikation der fDNA. Unter M ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen.

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich ist, konnten alle fünf fDNA-Templates amplifiziert werden, wohingegen in keiner der Negativkontrollen ein PCR-Produkt detektierbar ist. Allerdings fällt auf, dass in manchen Experimenten ausgehend von fDNA signifikant weniger dsDNA generiert wird als in der Positivkontrolle. Dies betrifft im Besonderen die fDNA, die aus den Templaten **CT** und **GT** hervorgegangen ist, was aber im Einklang mit den Überlegungen steht, die den Einfluss der modifizierten Nukleotide auf die Schmelztemperatur der DNA betreffen: Wenn die Probleme bei der Amplifikation tatsächlich auf unvollständige Denaturierung der fDNA/DNA-Duplexe zurückzuführen sind, tritt dieser Effekt natürlich bei GC-reichen Sequenzen, die an sich schon eine höhere Schmelztemperatur haben, noch deutlicher zu Tage. Da aber in den entsprechenden Negativkontrollen keinerlei DNA gewünschter Länge detektierbar ist, kann dieses Problem einfach durch eine Erhöhung der PCR-Zykluszahl umgangen werden. Die auf dem Gel sichtbaren Amplifikate bestehen, abgesehen von der vergleichbar geringen Menge an Templat-fDNA, aus natürlicher dsDNA, können also problemlos weiter amplifiziert werden. In den hier beschriebenen Experimenten wurde dies aber nicht gemacht, um die erhaltenen Ergebnisse kritisch vergleichen zu können.

Schließlich musste gezeigt werden, dass auch die Retransformation von fDNA in DNA sequenzspezifisch erfolgt. Die Methode der Wahl, um dies und gleichzeitig auch die vorhergehende sequenzgetreue Generierung der fDNA nachzuweisen, stellt eine Sequenzierung der PCR-Produkte dar. Durch Vergleich der aus der fDNA-Amplifikation gewonnenen Sequenz mit derjenigen, die aus der natürlichen DNA stammt, lassen sich qualitative Aussagen über die Genauigkeit der enzymatischen Reaktionen machen. Deshalb wurden die PCR-Produkte des fDNA-Modelltemplats und seines Analogons aus natürlicher DNA Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt, durch Agarosegelelektrophorese gereinigt, erneut präzipitiert und zur Sequenzierung mittels Cycle-Sequencing<sup>[88]</sup> verwendet.



**Abbildung 33:** Chromatogramme und daraus gewonnene DNA-Sequenz der PCR-Produkte, ausgehend von natürlicher DNA (oben) bzw. fDNA (unten). Aus diesen Ergebnissen ist kein signifikanter Unterschied in der Sequenzspezifität ersichtlich.

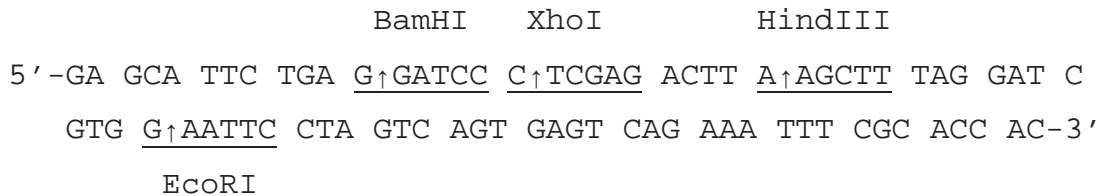
Wie Abbildung 33 zeigt, lieferten beide Amplifikate dieselbe DNA-Sequenz. Auch eine sorgfältige Analyse der gewonnenen Sequenzierungsdaten ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden PCR-Produkten hinsichtlich des Anteils an Fehlsequenzen erkennen. Dies war der Nachweis, dass die hier vorgestellten Nukleotidanaloga und die daraus gewonnene fDNA mit allen zur Durchführung von *in vitro*-Selektionen benötigten Methoden kompatibel sind.

### 3.2.3.2 Restriktionsverdau von fDNA

Abschließend wurde untersucht, inwieweit fDNA bzw. ihre Duplexe mit natürlicher DNA Substrate für Restriktionsendonukleasen sind. Wie bereits unter Kapitel 1.2 angeführt, schützen sich bestimmte Organismen, wie z. B. der Phage  $\phi$ W-14 durch Basenmodifikation vor Restriktionsverdau.<sup>[41,42]</sup> Auch konnten andere Arbeitsgruppen bereits zeigen, dass synthe-



tisch hergestellte basenmodifizierte DNA über eine erhöhte Stabilität gegenüber Exo-[58] und Endonukleaseverdau[47,55,65,89] verfügt. Es war daher interessant, zu untersuchen, ob auch die vollständig modifizierte DNA resistent gegen Restriktionsverdau ist. Dazu wurde das Templat **RT** konstruiert, das analog zu den vorhergehenden die gleiche Sequenz für den 3'-Primer trägt, in dessen weiteren Verlauf aber die Schnittstellen für die vier Restriktionsendonukleasen BamHI, XhoI, HindIII und EcoRI eingebaut wurden.



**Abbildung 34:** Sequenz des Restriktionstemplats **RT**, die Schnittstellen der Enzyme sind gekennzeichnet.

Zunächst wurden, wie oben beschrieben, in einer Primer-Verlängerungsreaktion fDNA/DNA Duplexe unter Verwendung eines 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Primers generiert. Aliquots, die 2 pmol verlängerten Primer enthielten wurden dann für eine Stunde mit 20 U eines der Restriktionsenzyme in dem entsprechenden Puffer bei 37 °C inkubiert und durch denaturierende PAGE analysiert.

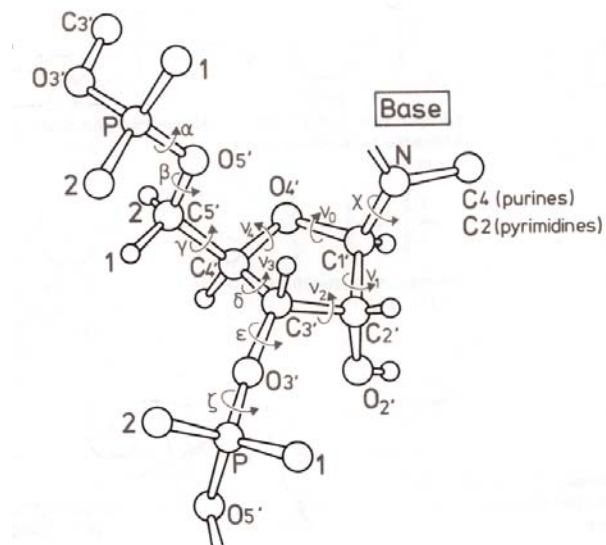


**Abbildung 35:** Restriktionsverdau von dsDNA (1) bzw. fDNA/DNA-Duplexen (2), die durch Primer-Verlängerung des Templats **RT** erhalten wurden, mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, XhoI, HindIII bzw. EcoRI.

Wie aus Abbildung 35 ersichtlich ist, wurde der Duplex aus natürlicher DNA von allen vier Enzymen in der gegebenen Reaktionszeit fast vollständig verdaut, während für die fDNA/DNA Duplexe keine Unterschiede zu dem unverdauten Ansatz festzustellen sind. Wie vermutet, lässt sich die fDNA nicht von Restriktionsendonukleasen schneiden.

### 3.3 Theoretische Untersuchungen

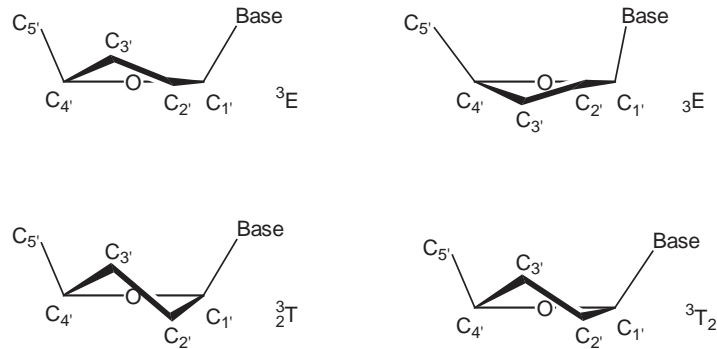
Nachdem die Generierung der fDNA erfolgreich durchgeführt werden konnte, lag es nahe, nach Erklärungen zu suchen, warum die 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosine im Gegensatz zu ihren 7-modifizierten *N*-7-Deazaanaloga nicht inkorporiert werden konnten. Um dies untersuchen zu können, mussten zunächst einmal die Konformationen der eingesetzten Nukleotide aufgeklärt werden. Nukleoside (und damit auch die entsprechenden Nukleotide) verfügen mit ihrem Zuckeranteil über einen hochflexiblen Baustein, der viele unterschiedliche Konformationen annehmen kann.



**Abbildung 36:** Definition der Torsionswinkel in Nukleotiden (entnommen aus Lit.<sup>[90]</sup>)

Um die Konformationen der Nukleoside zu analysieren, ist es nötig, alle Strukturparameter zu definieren. Seit vielen Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Charakterisierung von Nucleinsäuren und haben eine Nomenklatur eingeführt, auf die auch hier im Wesentlichen zurückgegriffen wird (siehe Abbildung 36). Grundlage dieser Nomenklatur ist die Definition von endo- und exozyklischen Torsionswinkeln. Diese reichen für die Beschreibung der Konformationen aus, da die Bindungslängen im Wesentlichen konstant sind und sich alle Bindungswinkel aus den Torsionswinkeln ableiten lassen. Für die Struktur der Nucleo-

sidtriphosphate sind drei Torsionen besonders wichtig: Zum einen die Torsionswinkel zwischen den fünf Ringatomen ( $\nu_0$ - $\nu_4$ ), welche die eigentliche Konformation des Rings, das sogenannte *Puckering* beschreiben, zweitens der Torsionswinkel  $\chi$  der glykosidischen Bindung, der die Stellung der Base relativ zu dem Zucker angibt, sowie der Torsionswinkel  $\gamma$ , der die Ausrichtung des 5'-O-Atoms definiert.



**Abbildung 37:** Darstellung der Riboseeinheit eines Nucleosids in zwei verschiedenen *envelope* (E) und *twist* (T) Konformationen nach Lit.<sup>[90]</sup>

Wie für Ringsysteme üblich, gibt es unendlich viele Konformationen der Ribose, von denen einige lokale Energieminima darstellen, die auf der *twist* (T) oder *envelope* (E) Form beruhen. Hierauf baut die klassische Nomenklatur dieser Konformationen auf: Man geht zunächst von einer vollkommen planaren Konformation aus und legt eine Bezugsebene durch die Ringatome. In der tatsächlich eingenommen Konformation werden die Atome, die oberhalb dieser Ebene liegen, also auf der gleichen Seite wie C<sub>5'</sub>, mit dem Suffix *-endo*, Atome unterhalb mit *-exo* versehen. In einer abgekürzten Schreibweise wird nun der Buchstabe E bzw. T, der die Grundform beschreibt, mit den Ziffern versehen, welche diese Atome charakterisieren. Hochgestellt werden dabei die Nummern der *endo*-ständigen Atome, die der *exo*-ständigen werden tiefgestellt. Zur weiteren Spezifizierung wird nun bei T-Konformationen das Ausmaß der Abweichung von der Ebene dadurch beschrieben, dass man die Zahlen vor (größere Abweichung) oder hinter (kleinere Abweichung) den Buchstaben T schreibt. Zwei links von dem T stehende Ziffern weisen dementsprechend auf ein symmetrisches *Puckering*, eine Ziffer links und eine rechts auf ein unsymmetrisches *Puckering* hin. Vier dieser Konformationen sind in Abbildung 37 schematisch zusammen mit ihrer Kurzschreibweise dargestellt. Auf diese Weise lassen sich 40 verschiedene Konformationen beschreiben, allerdings nur mit eingeschränkter Genauigkeit.

Um das *Puckering* noch genauer zu beschreiben, ohne alle fünf entsprechenden Torsionswinkel angeben zu müssen, greift man auf die elegante Definition der Pseudorotation zurück, die

zunächst für Cyclopentane eingeführt<sup>[91]</sup> und später auch auf 5-Ringzucker übertragen wurde.<sup>[92]</sup> Hierbei wird die Beschreibung der Konformation auf zwei Parameter reduziert, den Pseudorotationsphasenwinkel  $P$  und den maximalen Phasenwinkel  $v_{\max}$ . In Nukleosiden und Nukleotiden wird der Phasenwinkel  $P$  aus den endozyklischen Torsionswinkeln nach folgender Formel berechnet:

$$\tan P = \frac{(v_4 + v_1) - (v_3 + v_0)}{2 \cdot v_2 \cdot (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \quad (1)$$

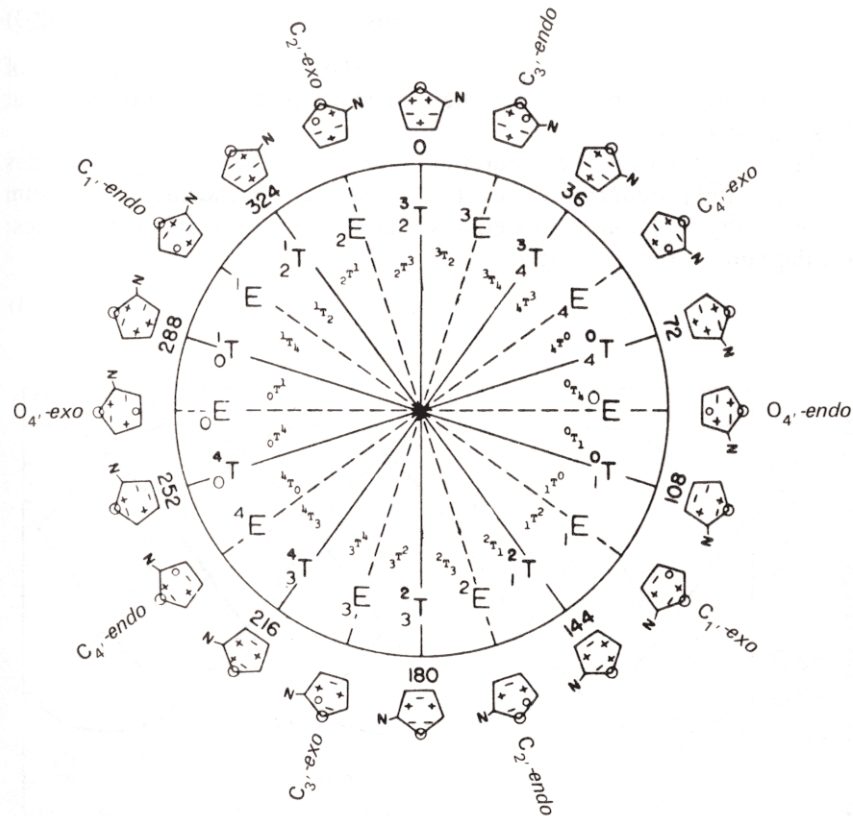
Dabei entspricht ein Phasenwinkel von  $P = 0^\circ$  der symmetrischen  $C_2$ -*exo*- $C_3$ -*endo* Form ( ${}^3_2T$ ) und  $P = 180^\circ$  der  $C_2$ -*endo*- $C_3$ -*exo* Form ( ${}^2_3T$ ). Aus dem Phasenwinkel lassen sich die endozyklischen Torsionswinkel gemäß Gleichung 2 ableiten:

$$v_j = v_{\max} \cdot \cos(P + (j - 2) \cdot \varphi) \text{ es gilt } j = 0 \text{ bis } 4 \text{ und } \varphi = 144^\circ \quad (2)$$

$v_{\max}$  lässt sich daraus leicht berechnen, indem man  $j = 2$  setzt:

$$v_{\max} = \frac{v_2}{\cos P} \quad (3)$$

Somit ist  $v_{\max}$  ein Maß für die maximale Auslenkung der Atome  $C_2'$  und  $C_3'$  von der Riboseebene. Durch die Reduzierung auf die beiden Parameter  $P$  und  $v_{\max}$  hat man ein leistungsfähiges Instrument zur exakten Beschreibung des *Puckerings*, welches zusammenfassend in dem Pseudorotationszyklus (Abbildung 38) dargestellt werden kann. Geraden Vielfachen von  $P = 18^\circ$  entsprechen dabei die *twist* (T) Konformationen, den ungeraden Vielfachen die *envelope* (E) Konformationen. Die am häufigsten vorkommenden Konformationen liegen im Bereich von  $0^\circ \leq P \leq 36^\circ$  ( $C_3'$ -*endo*) bzw. bei  $144^\circ \leq P \leq 190^\circ$  ( $C_2'$ -*endo*). Aufgrund ihrer Lage im Pseudorotationszyklus nennt man diese Konformationen auch „north“ (N) bzw. „south“ (S).



**Abbildung 38:** Graphische Darstellung der Pseudorotationswinkel  $P$  im Pseudorotationszyklus nach Lit.<sup>[92]</sup>

Zur Bestimmung der Konformation der synthetisierten Nucleoside und Nucleotide existieren zwei experimentelle Methoden: Die Verbindungen können kristallisiert und röntgenkristallographisch untersucht werden, oder man kann versuchen, konformative Parameter aus Lösung durch NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Der erste Ansatz scheint auf zunächst geeigneter, doch sind Kristallstrukturdaten sehr vorsichtig zu interpretieren: Zwar gewinnt man durchaus aussagekräftige Strukturen, doch stellen diese jeweils nur eine Konformation dar, die im Festkörper einem Energieminimum entspricht. Außer Acht gelassen werden dabei sowohl Lösungsmittelleffekte als auch konformative Flexibilitäten. Als Beispiel dient hierzu das *N*-1-Deaza-2'-desoxyadenosin. Dieses Nucleosid wurde aus der gleichen Lösung in zwei verschiedenen Konformeren kristallisiert, die beide nicht der aus NMR-Daten ermittelten Struktur in Lösung entsprechen.<sup>[93]</sup> Aussagekräftiger in Bezug auf das Verhalten in Reaktionen sind daher Strukturdaten, die aus Lösungen gewonnen werden, da sie oft neben der eigentlichen Struktur auch Aussagen über die Flexibilität des Systems, z. B. Rotationsbarrieren, ermöglichen.

Die in Lösung vorliegenden Konformationen können durch Bestimmung der vicinalen  $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungen in einfachen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren berechnet werden. Grundlage hierzu bietet die KARPLUS-Gleichung in der Form:

$$^3J_{\text{vic}} = A \cos^2\theta - B \cos\theta + C \quad (4)$$

Zur Lösung der Gleichung müssen die Konstanten A, B und C in Abhängigkeit der an der Bindung beteiligten Atomsorten gewählt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vicinalen Kopplungskonstanten ausgewählter Nucleoside und Nucleotide durch sorgfältige Multiplettanalyse bestimmt (siehe Experimenteller Teil) und mit dem Programm PSEUROT 6.3<sup>[94]</sup> die Pseudorotationswinkel  $P$  sowie  $v_{\text{max}}$  ermittelt. Dieses Programm berechnet aus den gemessenen Kopplungskonstanten durch iterative Verfahren die konformativen Parameter für zwei im Gleichgewicht vorliegende Konformationen, indem die KARPLUS-Gleichung (siehe Gleichung 4) für alle endozyklischen Bindungen gelöst wird. Aus diesen Werten wurden dann gemäß Gleichung 2 unter Verwendung optimierter DIEZ-Parameter<sup>[95-97]</sup> die einzelnen Torsionswinkel berechnet. 2'-Desoxyadenosin, sowie 2'-Desoxyadenosintriphosphat wurden als Referenzverbindungen ebenfalls diesem Verfahren unterzogen.

Probe	Lösungsmittel	% S	P	$v_{\text{max}}$	$v_0$	$v_1$	$v_2$	$v_3$	$v_4$
dA	DMSO	76	165,8	34,7	-17,74	32,45	-34,07	21,61	-1,87
dATP	D <sub>2</sub> O	63	163,9	31,9	-17,21	30,22	-31,04	19,03	-0,68
<b>11</b>	MeOD	70	157,3	26,4	-16,69	25,91	-24,65	13,21	2,40
<b>38</b>	DMSO	76	162,0	35,3	-20,01	33,84	-33,99	20,11	0,38
<b>39</b>	MeOD	72	156,9	34,7	-22,12	34,12	-32,30	17,15	3,39
<b>40</b>	MeOD	73	159,2	33,8	-20,49	32,89	-31,98	17,87	1,98
<b>41</b>	DMSO	76	166,6	36,1	-18,03	33,56	-35,57	22,88	-2,43
<b>42</b>	MeOD	71	197,8	31,7	0,63	18,71	-30,66	29,89	-17,82
<b>43</b>	MeOD	72	154,6	33,9	-22,64	33,62	-30,98	15,56	4,63

**Tabelle 3:** Übersicht der aus den NMR-Daten und PSEUROT-Analyse ermittelten Konformationsparameter. Angegeben sind der prozentuale Anteil von Verbindungen mit S-Konformation im Gleichgewicht, sowie die zu dieser Konformation gehörenden Werte für  $P$  und  $v_{\text{max}}$ . Außerdem sind die aus diesen Werten bestimmten endozyklischen Torsionswinkel angegeben.

Bei der Betrachtung der erhaltenen Daten fällt auf, dass mit Ausnahme von **42** alle Verbindungen ähnliche Werte liefern wie die Referenzen 2'-Desoxyadenosin (dA) bzw. 2'-Desoxyadenosintriphosphat (dATP). Alle bevorzugen eine S-Konformation mit einem relativen An-

teil von etwa 70 %,  $P$  liegt bei etwa  $160^\circ$ . Verbindung **42** weicht mit dem ungewöhnlich hohen Wert von  $P = 197.8^\circ$  ab. Dies ist dementsprechend auch die einzige Verbindung mit leicht veränderten Torsionswinkeln.

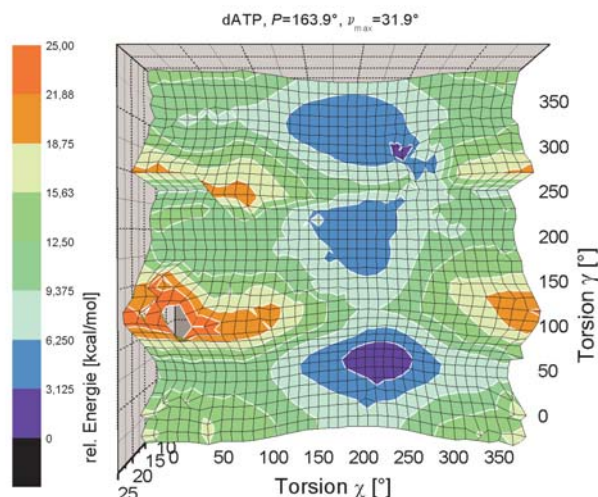
Interessanterweise zeigt das verwendete 8-modifizierte Derivat **11** keine Unterschiede zu den anderen Verbindungen bzw. zu dem natürlichen Analogon dATP. Hierin kann also nicht der Unterschied liegen, der die 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosine im Gegensatz zu den 7-modifizierten Deazavarianten als Substrat für DNA-Polymerasen (vgl. Kapitel 3.2.2.4) ungeeignet macht.

Als nächstes galt es, die Konformationen der exozyklischen Bindung zu untersuchen, d. h. Aussagen über die Torsionswinkel  $\gamma$  und  $\chi$  zu erhalten. Für die Rotation um die Bindung C<sub>4</sub>'-C<sub>5</sub>' gibt es drei Energieminima, die den drei gestaffelten Konformationen entsprechen. Diese sind im Falle der Nucleoside annähernd energiegleich, während bei Ribonucleotiden eine der synclinalen Konformationen ( $\gamma \approx 60^\circ$ ) um etwa 2 kcal/mol begünstigt ist.<sup>[98,99]</sup> Bei der glykosidischen Bindung unterscheidet man zwei Konformere, *syn* und *anti*. Bei ersterem liegt der Torsionswinkel  $\chi$  zwischen  $270^\circ$  und  $90^\circ$ , bei letzterem folglich zwischen  $90^\circ$  und  $270^\circ$ . Auch hier liegen die verschiedenen Energieminima energetisch sehr ähnlich, quantenchemisch wurden für  $\chi \approx 60^\circ$  und  $\chi \approx 250^\circ$  lokale Minima berechnet,<sup>[100]</sup> die sich der *syn*- bzw. *anti*-Konformation zuordnen lassen. Schließlich bleibt festzustellen, dass alle konformativen Parameter voneinander abhängig zu sein scheinen. So ist die Lage der glykosidischen Bindung eng mit dem *Puckering* der Ribose verknüpft, wobei diese Effekte bei 2'-Desoxynucleotiden nicht ganz so ausgeprägt sind wie bei ihren entsprechenden Ribonucleotidanaloga.

Die Untersuchung dieser exozyklischen konformativen Parameter ist nicht aus konventionellen <sup>1</sup>H-NMR-Daten möglich, hierzu müssen quantitative NOE-Untersuchungen angestellt werden. Diese konnten im Rahmen dieser Dissertation von der zentralanalytischen Abteilung nicht durchgeführt werden. Daher wurde versucht, durch theoretische Untersuchungen unter Verwendung von Kraftfeldrechnungen wenigstens qualitative Aussagen über  $\gamma$  und  $\chi$  zu erhalten. Die endozyklischen Bindungen wurden mit den Torsionswinkeln fixiert, wie sie aus der PSEUROT-Analyse (siehe Tabelle 3) gewonnen werden konnten. Um der Ungenauigkeit der Messwerte und daraus gewonnenen Phasenwinkel  $P$  Rechnung zu tragen, wurden diese Constraints mit sehr geringen Kraftkonstanten versehen, die eine Flexibilität der Torsionen um  $\pm 2^\circ$  zuließen. Anschließend wurde eine zweidimensionale Konformationsanalyse der beiden interessierenden Bindungen durchgeführt. Dazu wurden beide Bindungen in  $10^\circ$ -



Schritten von  $0^\circ$  bis  $350^\circ$  gedreht und anschließend mit Kraftfeldrechnungen (Tripos-Kraftfeld unter Verwendung von GASTEIGER-HÜCKEL-Ladungen) minimiert. Bei den Nukleotiden wurden drei negative Ladungen an den Phosphatgruppen eingeführt, weiterhin wurden auch Carboxyfunktionen anionisch dargestellt. Als erster Test diente 2'-Desoxyadenosintriphosphat, um die Methode auf ihre Anwendbarkeit hin zu überprüfen.

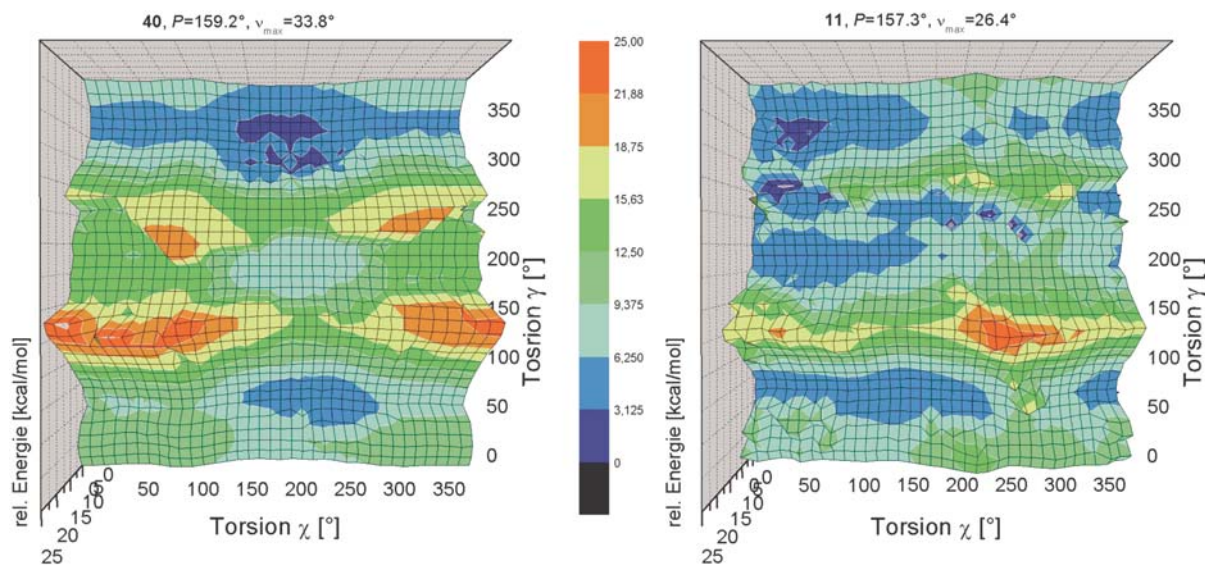


**Abbildung 39:** Konformationsanalyse von 2'-Desoxyadenosintriphosphat. Die Ribose wurde mit den aus der PSEUROT-Analyse gewonnenen Torsionswinkeln fixiert, die glykosidische Bindung sowie die Bindung zwischen  $C_4'$  und  $C_5'$  wurden in  $10^\circ$  Schritten gedreht und die Strukturen minimiert (Tripos-Kraftfeld, GASTEIGER-HÜCKEL-Ladungen)

Das in Abbildung 39 gezeigte Ergebnis dieser Rechnungen demonstriert sehr gut die Übereinstimmung mit den literaturbekannten Daten: Zu sehen sind sowohl die drei Minima der Torsion  $\gamma$  (Energiedifferenz  $\leq 3$  kcal/mol, absolutes Minimum bei  $\gamma \approx 60^\circ$ ) als auch das Minimum der glykosidischen Bindung in *anti*-Konformation. Ebenfalls deutlich sichtbar sind die geringen Energiebarrieren, welche die freie Rotation um die exozyklischen Bindungen erlauben.

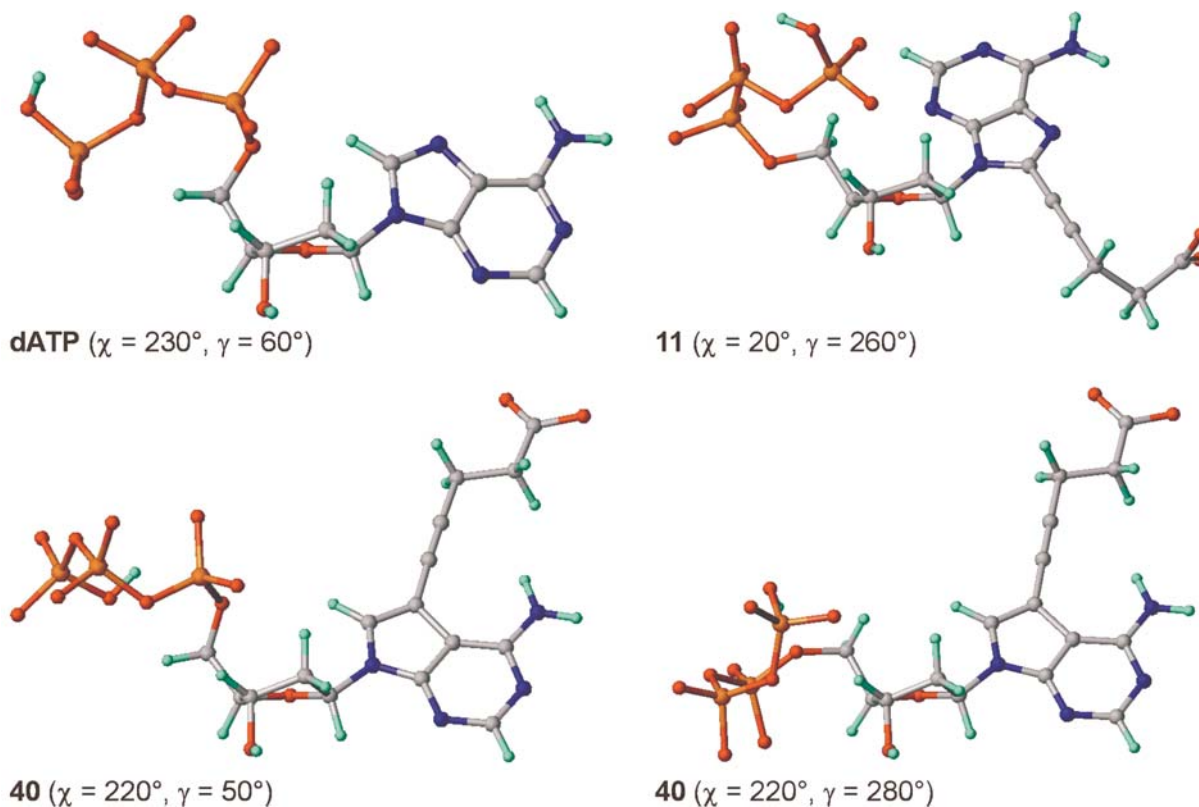
Die Qualität der für dATP gewonnenen Ergebnisse ließ es zu, auch mit den modifizierten Nukleotiden diese Rechnungen durchzuführen. Hierzu wurden mit den Verbindungen **40** und **11** sowohl ein 7-modifiziertes *N*-7-Deazaderivat als auch ein 8-modifiziertes 2'-Desoxyadenosin verwendet, die zur besseren Vergleichbarkeit die gleichen Substituenten tragen.





**Abbildung 40:** Konformationsanalyse des *N*-7-Deazaderivats **40** und des 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosins **11**. Während sich die Energiefläche von **40** nur geringfügig von der des dATP unterscheidet, sieht man bei Verbindung **11** eine eindeutige Verschiebung der Energieminima. Während dATP und **40** bevorzugt eine *anti*-Konformation ( $\chi \approx 200^\circ$ ) einnehmen, liegt **11** hauptsächlich in *syn*-Konformation ( $\chi \approx 40^\circ$ ) vor.

Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse dieser Konformationsanalysen: Bereits auf den ersten Blick ist sichtbar, dass die Energieprofile der Verbindungen dATP und **40** in der Lage der Energieminima und –maxima sehr ähnlich sind. Es zeigt sich eine eindeutige Präferenz für die *anti*-Konformation ( $\chi \approx 200^\circ$ ) mit fast uneingeschränkter Drehbarkeit um die glykosidische Bindung für  $\gamma \approx 50^\circ$  und  $\gamma \approx 310^\circ$ . Als einziger Unterschied ist das absolute Minimum von  $\gamma \approx 60^\circ$  auf  $\gamma \approx 310^\circ$  verschoben, wobei die Energieunterschiede so gering sind, dass sie an die Grenze dessen heranreichen, was mit den einfachen Kraftfeldmethoden und der vorgegebenen Parametrisierung quantifizierbar ist. Außerdem ist festzustellen, dass zwischen diesen Minima nur eine minimale Rotationsbarriere liegt. Im Gegensatz dazu liefert die Verbindung **11** ein signifikant anderes Energieprofil, vor allem sind die Energieminima zur *syn*-Konformation ( $\chi \approx 50^\circ$ ) verschoben, weiterhin sind leicht erhöhte Rotationsbarrieren erkennbar.



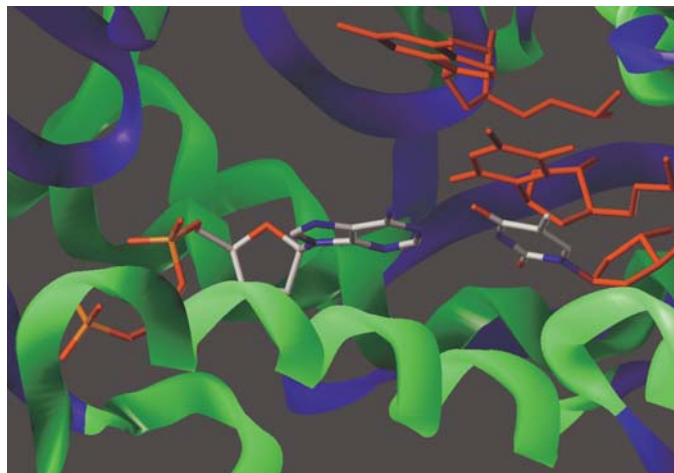
**Abbildung 41:** Vergleichende Darstellung einiger erhaltener Konformationen mit lokalem Energieminimum.

Da jeder Punkt der Energiefläche genau einer berechneten Struktur entspricht, zeigt Abbildung 41 zur besseren Veranschaulichung einige ausgewählte Strukturen, die lokalen Energieminima der Kraftfeldrechnungen entsprechen. Alle Verbindungen zeigen das  $C_2'$ -*endo*- $C_3'$ -*exo*-Puckering, wie es aus den NMR-Daten erhalten und in den Rechnungen vorgegeben wurde. Die Referenzverbindung dATP (links oben) zeigt eindeutig die *anti*-Konformation. Im Vergleich dazu erkennt man bei Verbindung **11** (rechts oben) deutlich die *syn*-Konformation der glykosidischen Bindung. Die untere Reihe zeigt zwei Konformationen der Verbindung **40**, die beide in *anti*-Konformation vorliegen und sich nur in der Torsion  $\gamma$  unterscheiden.

Aus den Energieflächen wird aber auch deutlich, dass alle untersuchten Verbindungen große Flexibilitäten in ihren Konformationen zeigen. Zwar unterscheidet sich die Lage der absoluten Energieminima deutlich, es sollte aber auch für **11** prinzipiell möglich sein, die Konformation einzunehmen, die für dATP beobachtet wird. Also sollte im Gleichgewicht auch diese Struktur in einem Anteil vorliegen, der eine geringe, aber messbare enzymatische Inkorporation zulässt. Die entsprechenden Einbaustudien (siehe Abbildung 30) zeigten aber überhaupt keinen Unterschied zu den Negativkontrollen, in denen kein Adenosinderivat verwendet wurde. Die Verschiebung der absoluten Energieminima im Falle der 8-modifizierten 2'-

Desoxyadenosine liefert also keine befriedigende Erklärung für die ausbleibende Inkorporation. Dies wird durch die Ergebnisse von TIERNEY und GRINSTAFF weiter unterstützt:[57] Die von ihnen hergestellte dsDNA, die ein 8-alkinmodifiziertes 2'-Desoxyadenosin enthielt, formte in wässriger Lösung B-DNA. Zu deren Ausbildung ist aber sowohl die Einnahme des  $C_2'$ -*endo*- $C_3'$ -*exo*-*Puckerings* als auch der *anti*-Konformation der glykosidischen Bindung zwingend nötig. Daher ist es also nicht unwahrscheinlich, dass auch die freien Nukleotide in dieser Konformationen vorliegen, bzw. diese einnehmen können.

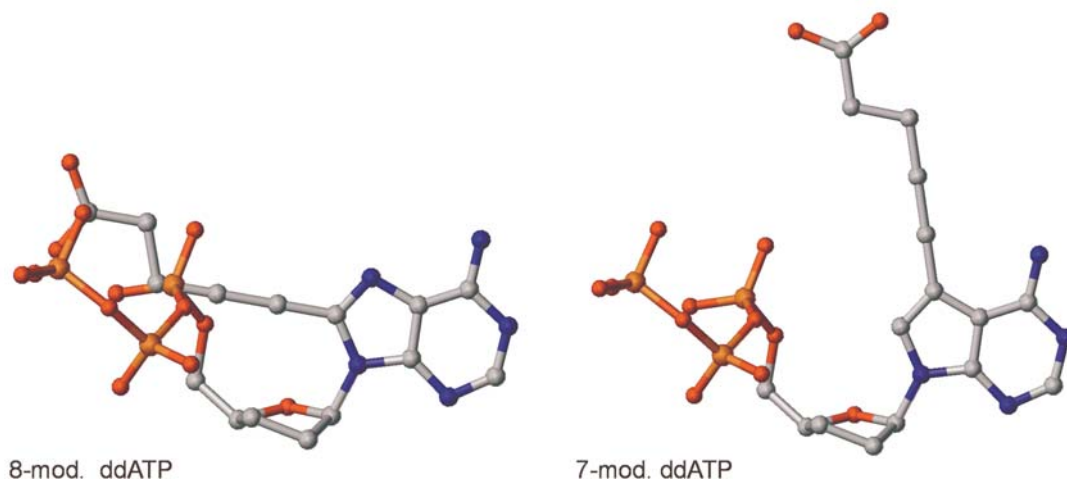
Daher wurde abschließend die Konformation des Nukleotids im aktiven Zentrum der Polymerase untersucht, also diejenige, welche eingenommen werden muss, um erfolgreich eingebaut zu werden. Abbildung 42 zeigt den Ausschnitt aus der Kristallstruktur der *Taq* DNA-Polymerase im Komplex mit der Templat-DNA und ddATP.[101] Deutlich zu erkennen ist, wie das Nukleotid in der Bindungstasche fixiert und konformativ eingeschränkt ist. Dabei zeigt es ein  $C_2'$ -*exo*- $C_3'$ -*endo*-*Puckering* ( $P \approx 0^\circ$ ) und die glykosidische Bindung liegt in *anti*-Konformation ( $\chi \approx 220^\circ$ ) vor. Weiter fällt auf, dass eine größere Rotation um diese Bindung zu dem Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Templatstrang und damit der Watson-Crick Erkennung führen würde.



**Abbildung 42:** Ausschnitt aus der Kristallstruktur<sup>[101]</sup> des Komplexes aus *Taq* DNA-Polymerase (schematisch durch grüne und blaue Bänder dargestellt), DNA (der Templatstrang ist rot dargestellt, der Primerstrang wurde zu Übersichtlichkeit weggelassen) und ddATP.

Modelliert man nun die verwendeten funktionellen Gruppen an Position 8 bzw. Position 7 des Nukleotids unter Beibehaltung der konformativen Parameter aus der Kristallstruktur (siehe Abbildung 43), so ist zu erkennen, dass die alkinbasierten Seitengruppen in Position 8 mit der Triphosphatgruppe interferieren. Diese repulsiven Wechselwirkungen können bei der in Lösung vorliegenden *S*-Konformation dadurch minimiert werden, dass dort die glykosidische

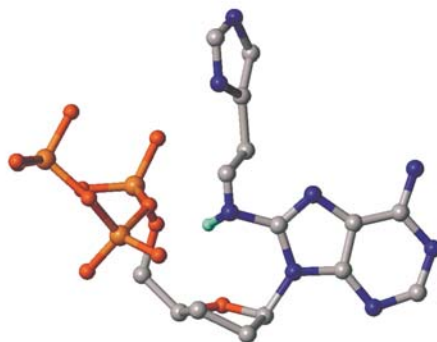
Bindung stärker abgewinkelt ist (siehe Abbildung 37), und daher der an Position C-8 angebrachte Seitenarm „nach oben“ ausweichen kann. Im Gegensatz dazu ist er an Position N-7 keinen störenden Einflüssen ausgesetzt, sondern zeigt in die große Furche, wo hinreichender Freiraum vorhanden ist und die auch sonst relativ frei, z. B. für Lösungsmittel, zugänglich ist.



**Abbildung 43:** Strukturen des ddATP, dem unter Erhalt der Konformation aus der Kristallstruktur der Pent-1-insäurerest an Position 8 (links) bzw. Position 7 (rechts) der analogen N-7-Deazaverbindung hinzugefügt wurde.

Diese einfachen Betrachtungen legen den Schluss nahe, dass das unterschiedliche Einbauverhalten seinen Ursprung in der Inkompatibilität der an C-8 positionierten Alkinkette mit der Bindungstasche des aktiven Zentrums der DNA-Polymerase hat.

Weiterhin liefert dies eine Erklärung, warum sich im Gegensatz zu den 8-alkinmodifizierten 2'-Desoxyadenosintriphosphaten das entsprechende 8-(2-(4-Imidazolyl)ethylamino)-Derivat von PERRIN et al.<sup>[49]</sup> als Substrat in der PCR verwenden lässt. Durch die Verwendung eines flexibleren Aminoalkyl-Linkers (siehe Abbildung 44) kann die funktionelle Gruppe den vorhandenen Freiraum in der großen Furche ausnutzen. Daher kann diese Verbindung trotz Derivatisierung an C-8 enzymatisch inkorporiert werden.



**Abbildung 44:** Analog zu Abbildung 43 wurde die von PERRIN et al. verwendete Modifikation an Position C-8 des ddATPs angefügt.

## 4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Nucleosidtriphosphate synthetisiert, die mit zusätzlichen funktionellen Gruppen versehen sind. Diese wurden als Ersatz für natürliche dNTPs enzymatisch in DNA eingebaut, um so eine hochgradig funktionalisierte DNA (fDNA) zu generieren. Weiterhin wurden alle notwendigen Methoden etabliert, um auf Basis von fDNA *in vitro*-Selektionen funktionaler Nucleinsäuren durchführen zu können.

Nachdem der Versuch scheiterte, verschiedene 8-modifizierte dATP-Derivate als Substrat für die PCR zu verwenden, wurden fünf 7-modifizierte *N*-7-Deaza-2'-desoxyadenosintriphosphate sowie ein 7-modifiziertes *N*-7-Deaza-2'-desoxyguanosintriphosphat hergestellt. Während das Adenosinderivat **40** von der DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* (*Tth*) gut eingebaut und sogar der gleichzeitige Austausch von TTP mit Verbindung **50** realisiert werden konnte, war das Guanosinderivat **47** nur mit mäßigem Erfolg zu verwenden.

In einem alternativen Ansatz wurde die fDNA durch templatgesteuerte Primer-Verlängerung 7-modifizierter *N*-7-Deazapurine und *C*-5-modifizierter Pyrimidine generiert. Dazu wurden einige kommerziell erhältliche DNA-Polymerasen getestet, zunächst an einem einfachen Modelltemplat, später an ausgesuchten Templaten mit anspruchsvollen Sequenzmotiven und an einem teilweise randomisierten Templat. Mit der Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase wurde ein Enzym identifiziert, das nicht nur alle Nucleotide, sondern auch an allen Templaten mit guter Ausbeute die entsprechende fDNA generieren kann.

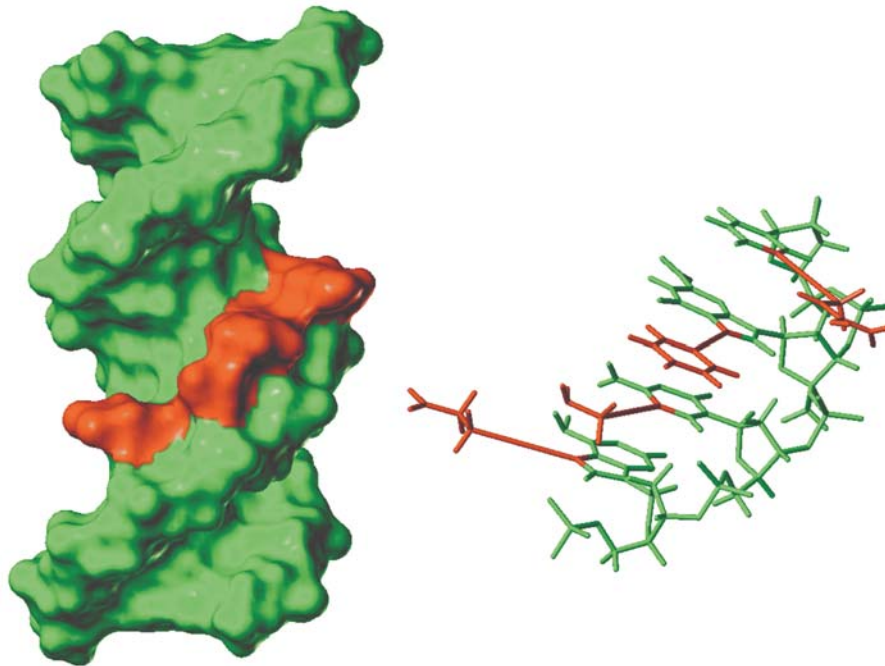
Anschließend wurden DNA-Polymerasen auf ihre Fähigkeit getestet, fDNA als Templat für eine PCR mit natürlichen dNTPs zu verwenden. Die DNA-Polymerase aus dem hyperthermophilen Organismus *Pyrococcus woesei* (*Pwo*) war schließlich nach Optimierung der Reaktions-Parameter in der Lage, fDNA in DNA zu retransformieren und zu amplifizieren. Der gesamte Prozess aus Generierung und Amplifikation lief sequenzspezifisch, wie durch Sequenzierung der PCR-Produkte nachgewiesen werden konnte.

Abschließend wurde versucht, mit Hilfe von Kraftfeldrechnungen das unterschiedliche Einbauverhalten der 8- und 7-modifizierten Adenosinderivate zu erklären. Es ließen sich konformative Unterschiede der Nucleotide nachweisen, doch konnte dies die dramatischen Unterschiede bezüglich des enzymatischen Einbaus nur bedingt erklären. Weitere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass der Hauptgrund für dieses Verhalten in der Verwendung des Alkinlinkers an Position *C*-8 liegt, da das entsprechend modifizierte Nucleotid in dem aktiven Zentrum des Enzyms nicht mehr die für den Einbau notwendige Konformation einnehmen kann.



## 5 Ausblick

Abbildung 45 zeigt eine modellhafte Darstellung eines fDNA/DNA-Duplexes. Grundlage bildet eine natürliche, in B-Form vorliegende, 12 bp lange dsDNA. An die vier mittleren Basen eines Stranges (Sequenz: ACGT) wurden die Seitenketten hinzugefügt, wie sie in den verwendeten Nukleotidanaloga **40**, **48**, **47** und **51** realisiert wurden.



**Abbildung 45:** Modellhafte Darstellung eines fDNA/DNA-Duplexes. Die linke Abbildung zeigt die Oberfläche einer aus 12 bp bestehenden dsDNA der Sequenz ACGT-ACGT-ACGT. Die vier mittleren Nukleotide eines Stranges wurden durch die Verbindungen **40**, **48**, **47** und **51** ersetzt, wobei die natürliche B-DNA Struktur beibehalten wurde. Die zusätzlichen funktionellen Gruppen sind rot, die natürlichen Anteile grün dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt die molekulare Struktur des betreffenden Ausschnitts des fDNA-Stranges.

Ob die fDNA/DNA-Duplexe tatsächlich diese Struktur annehmen, müssen weiterführende biophysikalische Charakterisierungen zeigen. Dazu ist es nötig, Phosphoramidite der modifizierten Nukleoside herzustellen, an der Festphase größere Mengen kurzer Oligonukleotide zu synthetisieren und ihr Verhalten in Lösung durch die Untersuchung von Schmelztemperaturen und dem Circular dichroismus zu charakterisieren. Eventuell lassen sich weitergehende Strukturinformationen aus NMR- oder röntgenkristallographischen Experimenten erhalten.

Der nächste Schritt sollte die Durchführung einer *in vitro*-Selektion sein. In dieser Arbeit wurde die formale Eignung von fDNA hierzu nachgewiesen; ob sich wirklich Aptamere oder Ribozyme finden lassen, muss das Experiment zeigen. Dazu ist es sinnvoll, parallel fDNA und natürliche DNA zu verwenden, um die erhaltenen Ergebnisse vergleichen und beurteilen zu können. Wenn sich funktionale fDNA-Moleküle selektieren lassen, ist es sicherlich inte-

ressant zu sehen, inwieweit das Einbringen der zusätzlichen Funktionalitäten die Eigenschaften selektierter Oligonukleotide beeinflusst.

Durch eine erfolgreiche Selektion würden sich direkt weitere Fragestellungen und Anwendungen ergeben: Zunächst einmal könnte versucht werden, fDNA-Aptamere für Substanzklassen zu selektieren, für die bisher keine oder nur wenige Aptamere auf Basis von DNA oder RNA isoliert wurden, z. B. Zucker oder Steroide. Außerdem bietet sich der Versuch an, anspruchsvollere chemische Reaktionen zu katalysieren, vor allem solche, die den Aufbau von Stereozentren beinhalten und für die keine adäquaten chemischen Methoden zur Verfügung stehen.

Durch die hier nachgewiesene erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischer Degradation durch Restriktionsendonukleasen liegt es nahe, die Eignung von fDNA für therapeutische Zwecke zu untersuchen. Schließlich gibt es heute schon Ansätze, funktionale RNA oder DNA als Basis für Therapeutika einzusetzen. Dabei wird man allerdings mit dem Problem der Instabilität unter physiologischen Bedingungen konfrontiert, was durch die Verwendung nicht-natürlicher Analoga, wie z. B. Spiegelmeren oder 2'-modifizierter RNA zu umgehen versucht wird. Eine entsprechende gesteigerte Stabilität in lebenden eukaryotischen Systemen vorausgesetzt, könnten sich hierzu fDNA-Moleküle als Alternative anbieten.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Verwendete Materialien und Geräte

**Präparative Säulenchromatographie:** *Kieselgel G60*, Körnung: 63-200  $\mu\text{m}$  (Merck, Darmstadt).

**Dünnschichtchromatographie:** „*DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F<sub>254</sub>*“ (Merck, Darmstadt), beschichtet mit Fluoreszenzindikator. Visualisierung erfolgte mittels UV-Licht oder durch Anfärben mit Färbereagenz 1 (10 mL *para*-Anisaldehyd, 2 mL Eisessig, 180 mL Ethanol, 10 mL konz. Schwefelsäure) oder Färbereagenz 2 (nach SEEBACH: 2.5 g Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat, 6.25 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, 225 mL Wasser, 25 mL konz. Schwefelsäure) und nachfolgendem Erwärmen.

**NMR-Spektroskopie:** NMR-Spektren wurden auf den folgenden Geräten der Fa. Bruker, Rheinstetten, gemessen: *AC 200*, *DPX 300*, *DPX 400*, *AMX 500* oder *DRX 500*. Die angegebenen Verschiebungen  $\delta$  sind im ppm relativ zu den Standards Tetramethylsilan ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) bzw.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $^{31}\text{P}$ ) angegeben. In den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden sie durch Kalibrierung der Lösungsmittelsignale auf Literaturwerte erhalten. Kopplungen wurden mit *1D-WinNMR* ausgewertet und zur Bestätigung der korrekten Zuordnung mit *WinDAISY* iteriert (beide Programme von Bruker Daltonic, Bremen).

**Massenspektrometrie:** ESI- und EI-MS wurden auf einem *Finnigan MAT 95XL* (Thermo Finnigan, Bremen) gemessen, FAB-MS Spektren auf einem *Concept 1H* (Kratos, Hofheim), unter Verwendung von *meta*-Nitrobenzoesäure (mNBA) als Matrix.

**UV- und Fluoreszenz(FL)-Spektren** wurden auf einem *Agilent 1100* Diodenarray- bzw. *Agilent 1100* Fluoreszenz-Detektor gemessen. (Agilent Technologies, Böblingen).

**MPLC:** Pumpe Modell 687 und Gradientenformer Modell 688 von Büchi, Flawil, Schweiz; *Lobar*<sup>®</sup> RP-18 Fertigsäulen von Merck, Darmstadt.

**HPLC-Analyse der Nukleosidtriphosphate:** Quaternäres Gradientensystem (Agilent Technologies, Böblingen, Modell 1100), 150 x 4.6 mm Säulen (*Alltima C18*, 3  $\mu\text{m}$ , Alltech, Deerfield, Ill., USA), 7.5 x 4.6 mm Vorsäule (*Alltima C18*, 5  $\mu\text{m}$ , Alltech, Deerfield, Ill., USA), UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 254 nm. Mobile Phase A: 100 mM TEAA-Puffer, Mobile Phase B: Acetonitril (LiChrosolv<sup>®</sup> gradient grade, Merck, Darmstadt). Flussrate: 1 mL/min. Gradient: 2 % B für 2 min, von 2 % auf 40 % B in 13 min, von 40 % auf 100 % B in 5 min.



**Lösungsmittel** wurden, wenn nötig, absolutiert bezogen (Fluka, Buchs, Schweiz) oder nach Standardverfahren getrocknet. Bei Lösungsmittelgemischen beziehen sich die angegebenen Mischungsverhältnisse auf die eingesetzten Volumina (v/v).

**Reaktionen** wurden in der Regel unter Argon als Schutzgas durchgeführt.

**Thermocycler:** *T3* (Biometra, Göttingen) und *Eppendorf personal* (Eppendorf, Hamburg).

**Denaturierende PAGE:** *SequiGen GT* (Bio-Rad, München).

## 6.2 Synthesen

### Allgemeine Vorschriften zur Darstellung von Nukleosidtriphosphaten aus Nukleosiden.

**Methode A:**<sup>[73]</sup> Das Nukleosid (etwa 0.250 mmol) und 1,8-Bis-*N,N*-dimethylamino-naphthalin (Protonenschwamm<sup>®</sup>, 1.5 eq) werden über Nacht im HV unter Lichtausschluss getrocknet, in Phosphorsäuretrimethylester (2 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Frisch destilliertes Phosphorylchlorid (1.2 eq) wird tropfenweise zugegeben und 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Bis-(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphat (0.5 M in DMF, 5 eq.) und Tri-*n*-butylamin (10 eq.) werden gleichzeitig zugegeben und die Lösung weitere 20 Minuten bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 mL TEAB-Puffer (1 M, pH = 7.5) beendet und mit Essigsäureethylester (2 x 15 mL) extrahiert. Die wässrigen Phase wird direkt zur Reinigung verwendet.

**Methode B:**<sup>[75]</sup> Das Nukleosid (etwa 0.200 mmol) wird in einer Mischung aus Dioxan (0.6 mL) und Pyridin (0.2 mL) gelöst, es wird 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (Fluka, Buchs, Schweiz; frisch hergestellte Lösung, 1 M in trockenem Dioxan, 1.1 eq.) und nach einer Stunde Bis-(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphat (0.5 M in DMF, 1.5 eq.) und Tri-*n*-butylamin (2.5 eq.) gleichzeitig zugegeben. Nach 15 Minuten wird eine Lösung von Iod (1%ig, 4 mL) in Pyridin/Wasser (98:2) zugegeben, und nach weiteren 15 Minuten wird der Iod-Überschuss mit einigen Tropfen NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (5%ig) zerstört. Die Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und nach einer Stunde erneut vom Lösungsmittel befreit.

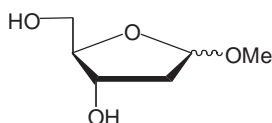
### Reinigung der Nukleosid-Triphosphate:

Die erhaltenen Reaktionsprodukte werden durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gereinigt, unter Verwendung eines linearen

Gradienten von TEAB-Puffer (0.1–1 M, pH = 7.5, 0.5 L von jedem Puffer). Gesammelte Fraktionen (20 mL) werden UV-spektroskopisch analysiert und nukleotidhaltige Fraktionen vereinigt und lyophilisiert. Die weitere Reinigung der Nukleotide erfolgt durch Umkehrphasen-MPLC (RP-MPLC) unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0 % auf 40 % Acetonitril in 0.1 M TEAA-Puffer.

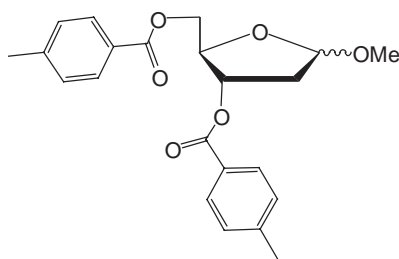
### 6.2.1 Synthese allgemein benötigter Vorstufen

#### Methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid<sup>[83]</sup>

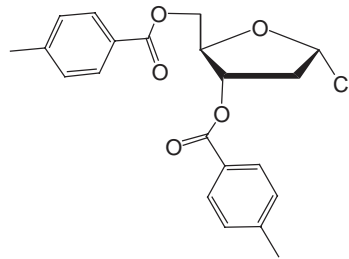


2-Desoxyribose (13.6 g, 100 mmol) wird in Methanol (200 mL) gelöst und 15 Minuten mit 30 mL einer Lösung von HCl in MeOH (1 %) gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Silbercarbonat (4 g, 23.8 mmol) beendet. Die Silbersalze werden abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und verbleibende Methanolreste durch Koevaporation mit Pyridin entfernt.

#### 3,5-Di-O-*para*-toluyl-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid<sup>[83]</sup>



Das Methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid wird in Pyridin (80 mL) gelöst und *para*-Toluensäurechlorid (34 g, 220 mmol) wird bei 0 °C zugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei RT gerührt, die Reaktion durch Zugabe von Wasser (200 mL) beendet und die Mischung mit Diethylether (200 mL) extrahiert. Die organische Phase wird einmal mit Wasser und so oft mit verdünnter Schwefelsäure (bei 0 °C!) gewaschen, bis alles Pyridin entfernt ist. Anschließend wird noch einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält das Produkt als farbloses Öl.

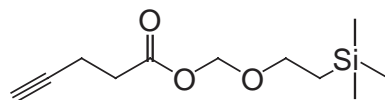
**3,5-Di-*O*-*para*-toluyl-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (26)**<sup>[83]</sup>

Das 3,5-Di-*O*-*para*-toluyl-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid wird 36 Stunden im HV getrocknet und in Essigsäure (50 mL) gelöst. Hierzu werden 80 mL Essigsäure gegeben, die mit HCl gesättigt sind. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und für 15 Minuten HCl-Gas durch die Lösung geleitet. Der entstehende weiße Feststoff wird abfiltriert, mit trockenem Diethylether gewaschen und im HV getrocknet.

Ausbeute: 22 g (56.6 mmol), weißer Feststoff, 56.6 % der Theorie über drei Stufen, Lit.: 70 %.

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.85-8.05 (m, 4H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.22 (m, 4H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.27 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 5.2 Hz, 1H, H-1'), 5.55 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H4'</sub> = 2.9 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 1.2 Hz, 1H, H-3'), 4.85 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H5''</sub> = 4.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H5'</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H3'</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-4'), 4.67 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H5''</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H4'</sub> = 3.2 Hz, 1H, H-5'), 4.59 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H5'</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H4'</sub> = 4.3 Hz, 1H, H-5''), 2.86 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 15.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H3'</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H1'</sub> = 5.2 Hz, 1H, H-2'), 2.74 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 15.2 Hz, *J*<sub>H3'</sub> = 1.2 Hz, 1H, H-2''), 2.40 (m, 6H, Ar-*Me*).

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz; CDCl<sub>3</sub>):** δ = 166.4, 166.0, 144.3, 144.1, 129.9, 129.7, 129.3, 129.2, 128.8, 126.7, 95.4, 84.7, 73.6, 63.5, 44.6, 21.7, 21.7.

**Pent-1-insäure-trimethylsilylethoxymethylester (6)**

Pent-1-insäure (1 g, 10.2 mmol) wird in 10 mL THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Triethylamin (1.24 g, 12.2 mmol) und Trimethylsilylethoxymethylchlorid (SEMCl, 1.87 g, 11.2 mmol) werden nacheinander zugegeben und zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wird Wasser (20 mL) zugegeben und dreimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Kochsalzlösung (20 mL) extrahiert, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und

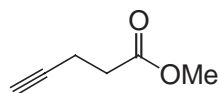
am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Cyclohexan/TBME; 10:1 bis 4:1) an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 2.06 g (9.04 mmol), farbloses Öl, 89 % der Theorie.

**DC** (Cyclohexan/EE; 4:1):  $R_f = 0.65$ .

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 5.24$  (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ -O), 3.65 (t,  $^3J_{\text{CH}_2\text{Si}} = 8.4$  Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ -), 2.45-2.5m (m, 4H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -COO-), 1.93 (s, 1H, Alkin- $H$ ), 0.90 (t,  $^3J_{\text{O-CH}_2} = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), -0.04 (s, 9H,  $\text{SiMe}_3$ ).

### **Pent-1-insäuremethylester (36)**<sup>[102]</sup>



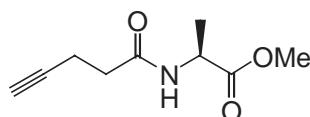
Pent-1-insäure (2 g, 20.4 mmol) wird in 8 mL Methanol und 17 mL Dichlormethan gelöst. *para*-Toluensulfonsäure (58.0 mg, 0.337 mmol) wird hinzugegeben und die Lösung wird über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (je 15 mL) extrahiert. Die wässrigen Phasen werden mit Dichlormethan (10 mL) reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 1.996 g (17.8 mmol), farblose Flüssigkeit, 87 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 3.67$  (s, 3H, -OMe), 2.51 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -COOMe), 1.95 (s, 1H, Alkin- $H$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 172.2, 82.4, 69.0, 51.8, 33.1, 14.3$ .

### **(*S*)-2-Pent-4-inoylamino-propionsäuremethylester (7)**<sup>[103]</sup>



Pent-1-insäure (1 g, 10.2 mmol) wird in 50 mL THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Triethylamin (3.1 g, 4.25 mL, 30.6 mmol) und Chlorameisensäure<sup>iso</sup>butylester (IBCF, 1.47 mL, 1.54 g, 11.3 mmol) werden tropfenweise zugegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Die Lösung wird auf -78 °C gekühlt und (*S*)-Alaninmethylesterhydrochlorid (1.1 g, 11 mmol) wird zuge-

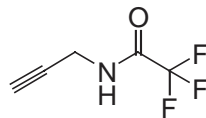
geben. Man lässt die Lösung auf RT erwärmen und rührt über Nacht. Anschließend werden 50 mL Wasser und Essigsäureethylester addiert, die organische Phase abgetrennt und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/TBME; 1:2) an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 1.30 g (7.10 mmol), weißer Feststoff, 70 % der Theorie.

**DC** (Cyclohexan/TBME; 1:2):  $R_f = 0.25$ .

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 6.12$  (s, br, 1H, NH), 4.55 (dq,  $^3J_{\text{NH}} = 7.1$  Hz,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.1$  Hz, 1H, CHMe), 3.69 (s, 3H, -OMe), 2.35-2.50 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOMe}$ ), 1.94 (t,  $^4J_{\text{CH}_2} = 2.6$  Hz, 1H, Alkin-H), 1.35 (d,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.1$  Hz, 3H, CHMe).

### Trifluoressigsäure-*N*-propargylamid (37)<sup>[104]</sup>



Zu einer Lösung von Propargylamin (15 g, 18.75 mL, 270 mmol) in Dichlormethan (200 mL) wird eine Lösung von Trifluoressigsäureanhydrid (74 g, 50 mL, 350 mmol) getropft und 90 Minuten bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser (100 mL) beendet und weitere 45 Minuten gerührt. Die Phasen werden getrennt, die organische Phase wird mit 1 N HCl (100 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (100 mL) gewaschen. Die Lösungsmittel werden im Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt destillativ gereinigt.

Ausbeute: 33.1 g (219 mmol), farblose Flüssigkeit, 81 % der Theorie, Lit.: 79 %.

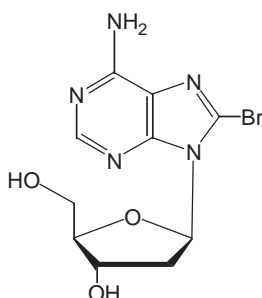
**Kp.:** 63 °C [5 mbar]

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7.12$  (s, br, NH), 4.05 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 157.2$  (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 37.6$  Hz), 115.6 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 287.4$  Hz), 77.0 (überlagert durch Lösungsmittel), 72.9, 29.6.

## 6.2.2 Synthese 8-modifizierter 2'-Desoxyadenosine

### 8-Bromo-2'-desoxyadenosin (2)<sup>[78]</sup>



2'-Desoxyadenosin-Hydrat (8 g, 29.7 mmol) wird in 250 mL Natriumacetatpuffer (0.5 M, pH=5) gelöst, 250 mL Bromwasser (ca. 3.5 g Brom in 100 mL Wasser) werden zugetropft und die Lösung 4h bei RT gerührt. Überschüssiges Brom wird mit 5N Natriumhydrogensulfid-lösung zerstört, anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit 5N NaOH auf pH=7 eingestellt. Der entstehende weisse Niederschlag wird abfiltriert und mehrmals mit Methanol erhitzt und heiß filtriert. Die vereinigten Filtrate werden am Rotationsverdampfer von Lösungsmitteln befreit und zum Trocknen mit Toluol koevaporiert.

Ausbeute: 6 g (18.2 mmol), leicht brauner Feststoff, 61 % der Theorie, Lit.: 88 %.

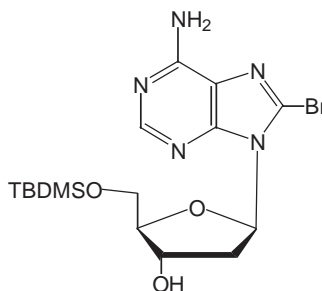
**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 9:1): R<sub>f</sub> = 0.40.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 8.11 (s, 1H, H-2), 7.53 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 7.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-1'), 5.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 4.2 Hz, 1H, 3'-OH), 5.30 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 7.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 4.4 Hz, 1H, 5'-OH), 4.48 (m, 1H, H-3'), 3.88 (m, H, H-4'), 3.65 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5''</sub> = 11.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'OH</sub> = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.4 Hz, 1H, H-5'), 3.48 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5'</sub> = 11.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'OH</sub> = 7.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.7 Hz, 1H, H-5''), 3.25 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 7.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 5.8 Hz, 1H, H-2'), 2.18 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-2'').

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 155.0, 152.3, 149.8, 126.6, 119.6, 88.2, 86.3, 71.1, 62.0, 36.9.

**MS (EI):** 329/331 ([M]<sup>+</sup>, 0.3 %); 213/215 ([M-Zucker]<sup>+</sup>, 100 %).

**5'-O-<sup>tert</sup>Butyldimethylsilyl-8-bromo-2'-desoxyadenosin (3)**<sup>[79]</sup>



8-Bromo-2'-desoxyadenosin (**2**) (4 g, 12.1 mmol), wird zusammen mit TBDMSCl (2.47 g, 14.5 mmol) und Imidazol (2.47 g, 26.3 mmol) in DMF (10 mL) bei 0 °C gelöst, über einen Zeitraum von einer Stunde auf RT erwärmt und weitere zwei Stunden unter DC-Kontrolle (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) gerührt. Die Lösung wird in gesättigte wässrige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (30 mL) gegossen und mit Dichlormethan extrahiert (3 x 30 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), am Rotationsverdampfer von Lösungsmitteln befreit und der Rückstand säulenchromatographisch (Essigsäureethylester:Cyclohexan 2:1) gereinigt.

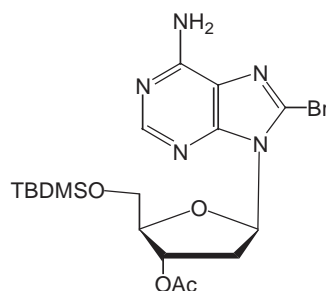
Ausbeute: 4.31 g (9.7 mmol), gelbes Öl, 80 % der Theorie.

DC (EtOAc/Cyclohexan; 2:1): R<sub>f</sub> = 0.25.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8.24 (s, 1H, H-2), 6.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-1'), 5.86 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 4.93 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.1 Hz, 1H, H-3'), 3.99 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 7.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 4.1 Hz, 1H, H-4'), 3.88 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5''</sub> = 10.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 7.7 Hz, 1H, H-5'), 3.77 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5'</sub> = 10.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 5.3 Hz, 1H, H-5''), 3.59 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 13.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-2'), 2.37 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 13.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 4.4 Hz, 1H, H-2''), 0.85 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), 0.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 154.2, 152.6, 150.9, 127.9, 120.5, 86.9, 86.1, 72.9, 63.5, 36.5, 25.9, 18.4, -5.4.



**5'-O-<sup>tert</sup>Butyldimethylsilyl-3'-O-acetyl-8-bromo-2'-desoxyadenosin (4)**<sup>[105]</sup>

Zu einer Lösung von **3** (4.31 g, 9.7 mmol) in Pyridin (100 mL) wird Essigsäureanhydrid (116.4 mL, 116.47 mmol) bei 0 °C zugetropft. Nach zwei Stunden wird die Reaktion durch Zugabe von Ethanol (100 mL) beendet und eine weitere Stunde gerührt. Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand wird in Diethylether (100 mL) aufgenommen und mit wässriger KHSO<sub>4</sub>-Lösung (5%ig, 3 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer entfernt und säulenchromatographisch (TBME/Cyclohexan 10:1) gereinigt.

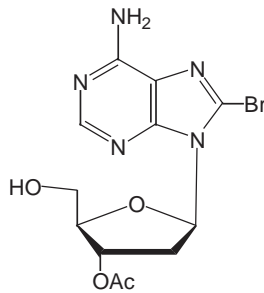
Ausbeute: 4.48 g (9.2 mmol), weißer Schaum, 95 % der Theorie.

**DC** (EtOAc/Cyclohexan; 2:1): R<sub>f</sub> = 0.60.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8.24 (s, 1H, H-2), 6.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 6.06 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 5.62 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-3'), 4.15 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 6.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 5.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-4'), 3.96 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5''</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 6.4 Hz, 1H, H-5'), 3.90 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 6.6 Hz, 1H, H-2'), 3.78 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5'</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 5.9 Hz, 1H, H-5''), 2.35 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 6.8 Hz, J<sub>H3'</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-2''), 2.12 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 0.85 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 170.3, 154.3, 152.3, 151.0, 127.8, 120.4, 86.3, 85.4, 74.9, 63.0, 34.1, 25.9, 21.1, 18.4, -5.4.

**MS (EI):** 487 ([M]<sup>+</sup>, 0.4 %), 472 ([M-Me]<sup>+</sup>, 2 %), 430 ([M-<sup>t</sup>Bu]<sup>+</sup>, 100 %).

**3'-O-Acetyl-8-bromo-2'-desoxyadenosin (5)**

Das Nukleosid **4** (750 mg, 1.54 mmol) wird in 3 mL THF gelöst und TBAF (1M in THF, 1.8 mL) bei 0 °C zugegeben. Nach zwei Stunden wird das Lösungsmittel bei 0 °C abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch (Essigsäureethylester) gereinigt.

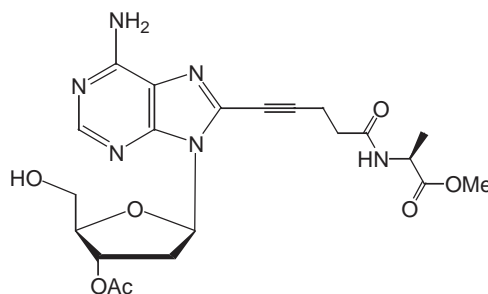
Ausbeute: 530 mg (1.42 mmol), weißer Schaum, 93 % der Theorie.

DC (EtOAc):  $R_f = 0.30$ .

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 8.20$  (s, 1H, H-2), 6.33 (dd,  $^3J_{\text{H}2'} = 10.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 5.5$  Hz, 1H, H-1'), 6.13 (s, br, 2H,  $-\text{NH}_2$ ), 5.51 (d,  $^3J_{\text{H}2'} = 5.9$  Hz, 1H, H-3'), 4.19 (dd,  $^3J_{\text{H}5'} = 1.9$  Hz,  $^3J_{\text{H}5''} = 1.9$  Hz, 1H, H-4'), 3.89 (dd,  $^2J_{\text{H}5''} = 12.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 1.9$  Hz, 1H, H-5'), 3.83 (dd,  $^2J_{\text{H}5'} = 12.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 1.9$  Hz, 1H, H-5''), 3.11 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.9$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 10.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 5.9$  Hz, 1H, H-2'), 2.33 (dd,  $^2J_{\text{H}2'} = 13.9$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 5.5$  Hz, 1H, H-2''), 2.10 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 170.4, 154.8, 152.3, 159.8, 126.7, 120.8, 88.3, 87.7, 76.3, 63.2, 36.9, 21.1$ .

**MS (FAB):** 374 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 10 %), 307 ( $[\text{2mNBA}+\text{H}]^+$ , 100 %).

**3'-O-Acetyl-8-((S)-2-pent-4-inoylamino-propinsäuremethylester)-2'-desoxyadenosin (12)<sup>[106]</sup>**

Eine Lösung von **5** (250 mg, 0.67 mmol) und Triethylamin (0.500 mL, 4.94 mmol) in trockenem DMF (2 mL) wird entgast durch repetitive Ultraschallung im HV, gefolgt von Spülen

der Reaktionsapparatur mit Argon. Nach der Zugabe jedes Reagens' wird diese Prozedur kurz wiederholt, um absoluten Luftausschluss zu gewährleisten. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mg, 0.1 mmol), CuI (76 mg, 0.2 mmol) und (*S*)-2-Pent-4-inoylamino-propionsäuremethylester (**7**) (0.55 g, 3 mmol) werden zugegeben und die Lösung wird bei RT unter Schutzgas gerührt. Nach zwei Stunden werden 30 mL Dichlormethan zugegeben und die Lösung mit wässriger EDTA-Lösung (0.5 M, 2 x 20 mL) extrahiert. Die Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 30 mL einer Mischung von Dichlormethan und Methanol (1:1) gelöst. Anionenaustauscher (1 g, Amberlite IRA-400, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form) wird zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert, gut mit Dichlormethan und Methanol (1:1) gewaschen und die Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (1. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH 10:1).

Ausbeute: 210 mg (0.661 mmol), hellgelber Schaum, 66 % der Theorie.

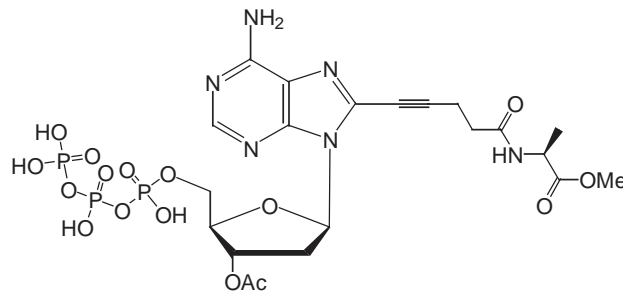
**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH; 10:1): R<sub>f</sub> = 0.33.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8.20 (s, 1H, H-2), 7.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>CHMe</sub> = 7.3 Hz, 1H, CONH) 6.95 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.42 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 5.6 Hz, 1H, H-1'), 5.50 (d, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 5.8 Hz, 1H, H-3'), 4.59 (dd, <sup>3</sup>J<sub>CHMe</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>NH</sub> = 7.3 Hz, 1H, CHMe), 4.19 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 1.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-4'), 3.88 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5''</sub> = 12.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-5'), 3.83 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5'</sub> = 12.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 1.9 Hz, 1H, H-5''), 3.65 (s, 3H, COOMe), 3.08 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 5.8 Hz, 1H, H-2'), 2.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH2b</sub> = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2a</sub>), 2.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH2a</sub> = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2b</sub>), 2.35 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 5.6 Hz, 1H, H-2''), 2.10 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>CHMe</sub> = 7.3 Hz, 3H, CHMe), 0.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 173.7, 170.6, 170.1, 155.9, 152.8, 148.1, 134.3, 120.0, 97.6, 87.4, 87.1, 76.3, 89.7, 63.0, 52.5, 48.2, 37.1, 33.9, 21.1, 18.1, 15.6.

**MS (FAB):** 475 ([M+H]<sup>+</sup>, 10 %), 460 ([M-Me+H]<sup>+</sup>, 12 %), 307 ([2mNBA+H]<sup>+</sup>, 100 %).

**3'-O-Acetyl-8-((S)-2-pent-4-inoylamino-propionsäuremethylester)-2'-desoxyadenosin-5'-O-triphosphat (13)**



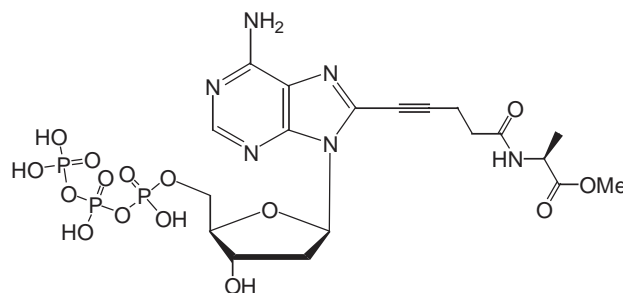
Das Nukleosid **12** (100 mg, 0.211 mmol) wird nach Methode **B** in sein Triphosphat **13** überführt.

Ausbeute: 70 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.069 mmol), weißer Feststoff, 33 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = 8.27 (s, 1H, H-2), 6.55 (dd,  $^3J_{\text{H}2''} = 7.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.0$  Hz, 1H, H-1'), 5.65 (ddd,  $^3J_{\text{H}2'} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 3.3$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 3.3$  Hz, 1H, H-3'), 4.47 (q,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.3$  Hz, 1H,  $\text{CHMe}$ ), 4.45 (m, 2H, H-4' & H-5'), 4.24 (ddd,  $^2J_{\text{H}5'} = 12.5$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 9.0$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 6.8$  Hz, 1H, H-5''), 3.68 (s, 3H,  $\text{COOMe}$ ), 3.67 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 14.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.0$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 6.7$  Hz, 1H, H-2'), 3.33 (q,  $^3J_{\text{CH}_3} = 7.3$  Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.95-2.65 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOMe}$ ), 2.50 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'} = 14.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.1$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 3.3$  Hz, 1H, H-2''), 2.16 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.44 (d,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHMe}$ ), 1.31 (t,  $^3J_{\text{CH}_2} = 7.3$  Hz, 27H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = -10.0 (s, br, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ), -11.3 (s, br, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ), -22.7 (s, br, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

**8-((S)-2-Pent-4-inoylamino-propionsäuremethylester)-2'-desoxyadenosin-5'-O-triphosphat (16)**



Das Nukleotid **13** ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 40 mg, 0.040 mmol) wird in trockenem Methanol (5 mL) gelöst und eine Lösung von Natriummethylat in Methanol (0.5 M, 1.6 mL) wird zugegeben.

Nach 40 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von TEAA-Puffer (1 M, 3 mL) beendet und über RP-MPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 29 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.030 mmol), weißer Feststoff, 74 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta = 8.24$  (s, 1H, H-2), 6.55 (dd,  $^3J_{\text{H}2''} = 7.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.81 (m, überlagert durch HOD, 1H, H-3'), 4.41 (q,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.3$  Hz, 1H, CHMe), 4.35 (m, 1H, H-5'), 4.21 (m, 1H, H-4'), 4.16 (m, 1H, H-5''), 3.68 (s, 3H, COOMe), 3.41 (m, 1H, H-2'), 3.33 (q,  $^3J_{\text{CH}_3} = 7.3$  Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.90 (t,  $^3J_{\text{CH}_2\text{b}} = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{2\text{a}}$ ), 2.64 (t,  $^3J_{\text{CH}_2\text{a}} = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{2\text{b}}$ ), 2.30 (m, 1H, H-2''), 1.39 (d,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.3$  Hz, 1H, CHMe), 1.31 (t,  $^3J_{\text{CH}_2} = 7.3$  Hz, 27H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

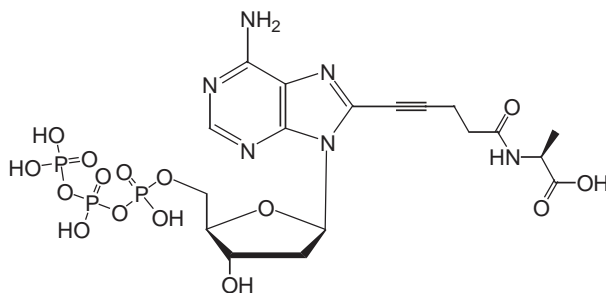
**$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta = -7.3$  (s, br, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-8.1$  (s, br, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ),  $-20.4$  (s, br, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

**MS (neg.-ESI):** 670 ( $[\text{M-H}]^-$ , 18 %), 334.5 ( $[\text{M-2H}]^{2-}$ , 100 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 10.5 min.

**UV:**  $\lambda_{\text{max}} = 230, 292$  nm;  $\lambda_{\text{min}} = 247$  nm. **FL:**  $\lambda_{\text{Em}} = 358$  nm.

### 8-((S)-2-Pent-4-inoylamino-propionsäure)-2'-desoxyadenosine-5'-O-triphosphat (11)



Das Nukleotid **16** ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 30 mg, 0.030 mmol) wird in 5 mL Wasser gelöst und eine wässrige Lösung von Natriumhydroxid (1 M, 1 mL) wird zugegeben. Die Lösung wird zwei Stunden gerührt und anschließend mit TEAB-Puffer (1 M, 2 mL) versetzt. Die weitere Aufreinigung erfolgte über RP-MPLC.

Ausbeute: 24 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.023 mmol), weißer Feststoff, 75 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta = 8.24$  (s, 1H, H-2), 6.58 (dd,  $^3J_{\text{H}2''} = 7.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.81 (ddd,  $^3J_{\text{H}2'} = 6.8$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 3.6$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 3.4$  Hz, 1H, H-3'), 4.40 (ddd,  $^2J_{\text{H}5''} = 10.6$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 8.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 6.1$  Hz, 1H, H-5'), 4.26 (q,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.3$  Hz, 1H,

*CHMe*), 4.24 (ddd,  $^3J_{H5''} = 7.0$  Hz,  $^3J_{H5'} = 6.2$  Hz,  $^3J_{H3'} = 3.4$  Hz, 1H, H-4'), 4.16 (ddd,  $^2J_{H5'} = 10.6$  Hz,  $^3J_{H4'} = 7.0$  Hz,  $^3J_{P\alpha} = 7.0$  Hz, 1H, H-5''), 3.49 (ddd,  $^2J_{H2''} = 13.6$  Hz,  $^3J_{H1'} = 7.0$  Hz,  $^3J_{H3'} = 6.8$  Hz, 1H, H-2'), 3.33 (q,  $^3J_{CH3} = 7.3$  Hz, 24H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.92 (t,  $^3J_{CH2b} = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2a</sub>), 2.67 (t,  $^3J_{CH2a} = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2b</sub>), 2.34 (ddd,  $^2J_{H2'} = 13.6$  Hz,  $^3J_{H1'} = 7.1$  Hz,  $J_{H3'} = 3.6$  Hz, 1H, H-2''), 1.38 (d,  $^3J_{CHMe} = 7.3$  Hz, 1H, CHMe), 1.31 (t,  $^3J_{CH2} = 7.3$  Hz, 36H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

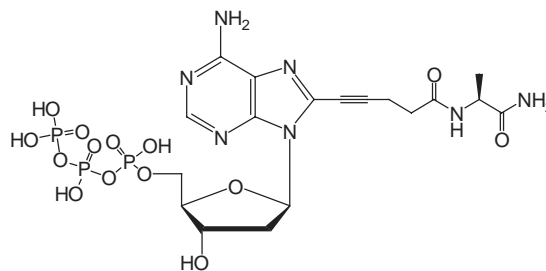
**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):**  $\delta = -10.2$  (s, br, 1P, P <sub>$\gamma$</sub> ),  $-11.7$  (d,  $^2J_{P\beta} = 20.9$  Hz, 1P, P <sub>$\alpha$</sub> ),  $-23.1$  (s, br, 1P, P <sub>$\beta$</sub> ).

**MS (neg.-ESI):** 657 ([M-H]<sup>-</sup>, 20 %), 328 ([M-2H]<sup>2-</sup>, 100 %), 218.3 ([M-3H]<sup>3-</sup>, 70 %).

**HPLC:** t<sub>r</sub>: 8.9 min.

**UV:**  $\lambda_{\max} = 230, 292$  nm;  $\lambda_{\min} = 247$  nm. **FL:**  $\lambda_{\text{Em}} = 356$  nm.

#### 8-((*S*)-2-Pent-4-inoylamino-propionsäureamid)-2'-desoxyadenosine-5'-*O*-triphosphat (**14**)



Zunächst wird das Nukleotid **13** wie oben beschrieben aus **12** (75 mg, 0.158 mmol) hergestellt. Nach der Oxidation wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Wasser (80 mL) und konzentriertem Ammoniak (20 mL) gelöst. Die Mischung wird für eine Stunde gerührt, das Lösungsmittel erneut entfernt und der Rückstand wie üblich gereinigt.

Ausbeute: 15 mg (Na<sup>+</sup>-Salz, 0.023 mmol), weißer Feststoff, 14.6 % der Theorie.

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Salz):**  $\delta = 8.24$  (s, 1H, H-2), 6.58 (dd,  $^3J_{H2''} = 7.1$  Hz,  $^3J_{H2'} = 7.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.81 (m, 1H, H-3'), 4.40 (ddd,  $^2J_{H5''} = 10.6$  Hz,  $^3J_{P\alpha} = 8.1$  Hz,  $^3J_{H4'} = 6.1$  Hz, 1H, H-5'), 4.25-4.00 (m, 3H, H-4' & H-5'), 4.12 (q,  $^3J_{Me} = 7.2$  Hz, 1H, CHMe), 3.38 (m, 1H (überlagert durch Lösungsmittel, H-2')), 3.18 (q,  $^3J_{CH3} = 7.3$  Hz, 24H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.94 (t,  $^3J_{CH2b} = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2a</sub>), 2.69 (t,  $^3J_{CH2a} = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2b</sub>), 2.34 (ddd,

$^2J_{H2'} = 13.5$  Hz,  $^3J_{H1'} = 7.0$  Hz,  $J_{H3'} = 3.9$  Hz, 1H, H-2''), 1.41 (d,  $^3J_{CHMe} = 7.3$  Hz, 1H, CHMe), 1.31 (t,  $^3J_{CH2} = 7.3$  Hz, 36H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR (121 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Salz):**  $\delta = -10.8$  (d,  $^2J_{P\beta} = 21.3$  Hz, 1P, P <sub>$\gamma$</sub> ),  $-11.4$  (d,  $^2J_{P\beta} = 24.0$  Hz, 1P, P <sub>$\alpha$</sub> ),  $-23.1$  (dd,  $^2J_{P\gamma} = 21.3$  Hz,  $^2J_{P\alpha} = 20.9$  Hz, 1P, P <sub>$\beta$</sub> ).

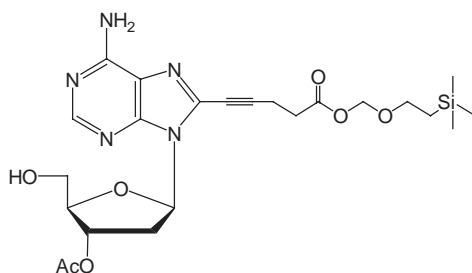
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O, Na<sup>+</sup>-Salz):**  $\delta = 180.8$ , 176.8, 157.7, 156.1, 151.3, 137.3, 121.1, 101.0, 87.9 (d,  $^3J_{C4'-P\alpha} = 8.3$  Hz, C-4'), 86.8, 73.5, 72.5, 68.0 (d,  $^2J_{C5'-P\alpha} = 5.4$  Hz, C-5'), 52.4, 38.9, 35.9, 19.5, 18.1.

**MS (neg.-ESI):** 656 ([M-H]<sup>-</sup>, 2 %), 327.5 ([M-2H]<sup>2-</sup>, 100 %), 338.5 ([M-3H+Na]<sup>2-</sup>), 40 %.

**HPLC:**  $t_r$ : 9.3 min.

**UV:**  $\lambda_{max} = 230, 291$  nm;  $\lambda_{min} = 210, 245$  nm. **FL:**  $\lambda_{Em} = 356$  nm.

### 3'-*O*-Acetyl-8-(pent-1-insäuretrimethylsilylethoxymethylester)-2'-desoxyadenosin (8)



Wie für Verbindung **12** beschrieben, wird **5** (250 mg, 0.67 mmol) mit Pent-1-insäure-trimethylsilylethoxymethylester (0.62 g, 2.72 mmol) umgesetzt (Reaktionszeit eine Stunde) und aufgearbeitet.

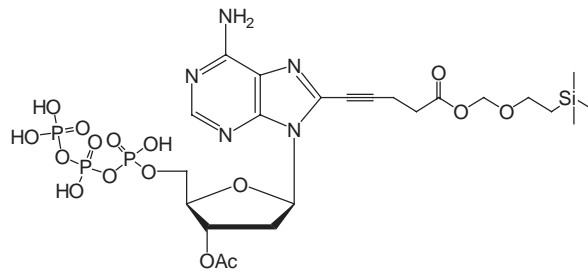
Ausbeute: 180 mg (0.347 mmol), hellgelber Schaum, 52 % der Theorie.

**DC** (EtOAc):  $R_f = 0.25$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 8.23$  (s, 1H, H-2), 6.85 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.46 (dd,  $^3J_{H2'} = 9.8$  Hz,  $^3J_{H2''} = 5.5$  Hz, 1H, H-1'), 5.53 (d,  $^3J_{H2'} = 5.7$  Hz, 1H, H-3'), 5.31 (d,  $^2J_{OCH2''O} = 6.1$  Hz, 1H, OCH<sub>2''</sub>O), 5.30 (d,  $^2J_{OCH2'O} = 6.1$  Hz, 1H, OCH<sub>2'O</sub>), 4.22 (s, Hz, 1H, H-4'), 3.91 (d,  $^2J_{H5''} = 12.7$  Hz, 1H, H-5''), 3.85 (d,  $^2J_{H5'} = 12.7$  Hz, 1H, H-5'), 3.68 (t,  $^3J_{CH2Si} = 8.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.11 (ddd,  $^2J_{H2''} = 14.0$  Hz,  $^3J_{H1'} = 9.8$  Hz,  $^3J_{H3'} = 5.7$  Hz, 1H, H-2'), 2.84 (t,  $^3J_{CH2b} = 7.1$  Hz, 2H, CH<sub>2a</sub>), 2.72 (t,  $^3J_{CH2a} = 7.1$  Hz, 2H, CH<sub>2b</sub>), 2.36 (dd,  $^2J_{H2'} = 14.0$  Hz,  $^3J_{H1'} = 5.6$  Hz, 1H, H-2''), 2.10 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 0.90 (t,  $^3J_{CH2O} = 8.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Si), 0.00 (s, 9H, CH<sub>3</sub>Si).



### 3'-*O*-Acetyl-8-(pent-1-inylsäuretrimethylsilylethoxymethylester)-2'-desoxyadenosin 5'-*O*-triphosphat (**9**)



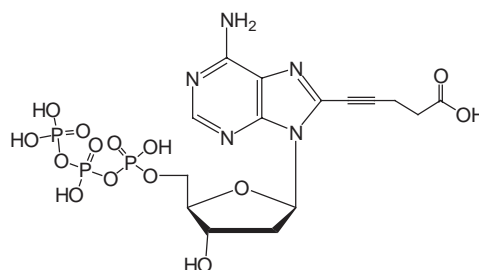
Das Nucleosid **8** (80 mg, 0.154 mmol) wird nach Methode **B** in sein Triphosphat **9** überführt.

Ausbeute: 40 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.039 mmol), weißer Feststoff, 26 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = 8.27 (s, 1H, H-2), 6.55 (dd,  $^3J_{\text{H}2'}$  = 7.3 Hz,  $^3J_{\text{H}2'}$  = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 5.63 (m, 1H, H-3'), 5.39 (d,  $^2J_{\text{OCH}2'\text{O}}$  = 6.1 Hz, 1H,  $\text{OCH}_2'\text{O}$ ), 5.32 (d,  $^2J_{\text{OCH}2'\text{O}}$  = 6.1 Hz, 1H,  $\text{OCH}_2'\text{O}$ ), 4.15-4.45 (m, 3H, H-4' & H-5'), 3.76 (t,  $^3J_{\text{CH}_2\text{Si}}$  = 8.1 Hz, 2H,  $\text{O-CH}_2$ ), 3.69 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'}$  = 14.0 Hz,  $^3J_{\text{H}1'}$  = 7.3 Hz,  $^3J_{\text{H}3'}$  = 7.1 Hz, 1H, H-2'), 3.10 (q,  $^3J_{\text{CH}_3}$  = 7.3 Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.95-2.65 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}$ ), 2.48 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'}$  = 14.0 Hz,  $^3J_{\text{H}1'}$  = 7.1 Hz,  $J_{\text{H}3'}$  = 3.3 Hz, 1H, H-2'), 2.16 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.44 (d,  $^3J_{\text{CHMe}}$  = 7.2 Hz, 1H,  $\text{CHMe}$ ), 1.31 (t,  $^3J_{\text{CH}_2}$  = 7.3 Hz, 27H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ), 0.90 (t,  $^3J_{\text{CH}_2\text{O}}$  = 8.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 0.00 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = -9.7 (s, br, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ), -11.5 (d,  $^2J_{\text{P}\beta}$  = 19.0 Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ), -22.3 (s, br, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

### 8-(Pent-1-inylsäure)-2'-desoxyadenosin 5'-*O*-triphosphat (**15**)



Das Nucleotid **16** ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 30 mg, 0.030 mmol) wird in 5 mL Wasser gelöst und eine wässrige Lösung von Natriumhydroxid (1 M, 0.1 mL) wird zugegeben. Die Lösung wird zwei Stunden gerührt und anschließend mit TEAA-Puffer (1 M, 2 mL) versetzt. Die weitere Aufreinigung erfolgte über RP-MPLC.

Ausbeute: 11 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.011 mmol), weißer Feststoff, 38 % der Theorie.

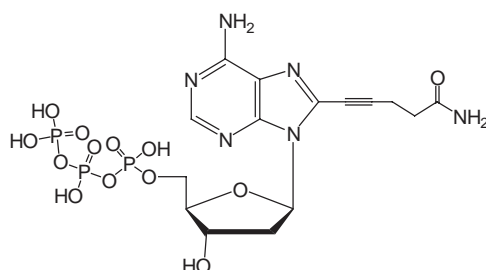
$^{31}\text{P}$ -NMR (131 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}^+$ -Salz):  $\delta = -10.6$  (s, br, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-11.6$  (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 18$  Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ),  $-22.5$  (s, br, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

MS (neg.-ESI): 604 ( $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ , 5 %), 524 ( $[\text{M}-\text{PO}_3\text{H}_2+\text{Na}]^-$ , 10 %), 301.5 ( $[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^{2-}$ , 30 %), 292.5 ( $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ , 8 %).

HPLC:  $t_r$ : 8.5 min.

UV:  $\lambda_{\text{max}} = 230, 292$  nm;  $\lambda_{\text{min}} = 247$  nm. FL:  $\lambda_{\text{Em}} = 356$  nm.

### 8-(Pent-1-insäureamid)-2'-desoxyadenosin 5'-O-triphosphat (10)



Zunächst wird das Nukleotid **9** wie oben beschrieben aus **5** (80 mg, 0.154 mmol) hergestellt. Nach der Oxidation wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Wasser (10 mL) und konzentriertem Ammoniak (20 mL) gelöst. Die Mischung wird für eine Stunde gerührt, das Lösungsmittel erneut entfernt und der Rückstand wie üblich gereinigt.

Ausbeute: 28.1 mg ( $\text{Na}^+$ -Salz, 0.039 mmol), weißer Feststoff, 25 % der Theorie.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{MeOH}-d_4$ ,  $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz):  $\delta = 8.24$  (s, 1H, H-2), 6.59 (dd,  $^3J_{\text{H}2''} = 7.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.1$  Hz, 1H, H-1'), 4.80 (m, 1H, H-3'), 4.37 (m, 1H, H-5'), 4.20 (m, 2H, H-4' & H-5''), 3.43 (m, 1H, H-2'), 3.20 (q,  $^3J_{\text{CH}3} = 7.3$  Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N}-\text{CH}_2$ ), 2.91 (t,  $^3J_{\text{CH}2b} = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{2a}$ ), 2.68 (t,  $^3J_{\text{CH}2a} = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{2b}$ ), 2.33 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.1$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 3.8$  Hz, 1H, H-2''), 1.31 (t,  $^3J_{\text{CH}2} = 7.3$  Hz, 27H,  $\text{Et}_3\text{N}-\text{CH}_3$ ).

$^{31}\text{P}$ -NMR (131 MHz,  $\text{MeOH}-d_4$ ,  $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz):  $\delta = -10.3$  (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 20.3$  Hz, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-11.3$  (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 20.3$  Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ),  $-23.1$  (dd,  $^2J_{\text{P}\gamma} = 20.3$  Hz,  $^2J_{\text{P}\alpha} = 20.3$  Hz, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

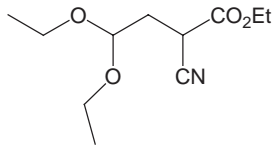
MS (neg.-ESI): 607 ( $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ , 7 %), 585 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 4 %), 555 ( $[\text{M}-\text{PO}_3\text{H}]^-$ , 15 %), 303 ( $[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^{2-}$ , 30 %), 292 ( $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ , 100 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 9.2 min.

**UV:**  $\lambda_{\max}$  = 230, 292 nm;  $\lambda_{\min}$  = 247 nm. **FL:**  $\lambda_{Em}$  = 356 nm.

### 6.2.3 Synthese 7-modifizierter *N*-7-Deaza-2'-desoxyadenosine

**$\alpha$ -Cyano-4,4-diethoxybutansäureethylester (17)**<sup>[107]</sup>



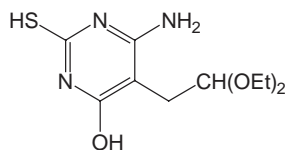
Bromacetaldehyddiethylacetat (160 g, 812 mmol) und Cyanessigsäureethylester (456 g, 4.04 mol) werden zusammen mit Kaliumcarbonat (112 g, 812 mmol) und Natriumiodid (8 g, 53.3 mmol) unter Rückfluß auf 150 °C erhitzt, bis keine CO<sub>2</sub>-Entwicklung mehr zu beobachten ist, anschließend wird noch 4 h bei 145 °C weitergerührt. Nach Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit Diethylether (800 mL) und Wasser (800 mL) versetzt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wird mit Wasser (200 mL), die wässrige Phase mit Diethylether (200 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Destillation unter vermindertem Druck gereinigt.

Ausbeute: 78.5 g (343 mmol), farblose Flüssigkeit, 42 % der Theorie, Lit.: 42 %.

**Kp.:** 90 °C [9 mbar]

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 4.64 (m, 1H, O-CH-O), 4.20 (q,  $^3J_{CH_3}$  = 7.1 Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 3.64 (q,  $^3J_{CH_3}$  = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.63 (q,  $^3J_{CH_3}$  = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.48 (m, 1H, CH- C≡N), 2.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.27 (t,  $^3J_{CH_2}$  = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.16 (t,  $^3J_{CH_2}$  = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.15 (t,  $^3J_{CH_2}$  = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz; CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 166.0, 116.4, 99.9, 62.8, 62.1, 33.5, 23.5, 15.1, 14.0, 13.8.

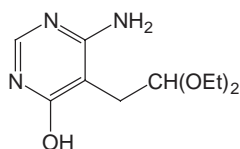
**6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)-2-mercaptopyrimidin-4-ol (18)**<sup>[107]</sup>

$\alpha$ -Cyano-4,4-diethoxybutansäureethylester (**18**) (36.36 g, 158.8 mmol) und Thioharnstoff (12.12 g, 158.8 mmol) werden in wasserfreiem Ethanol (110 mL) gelöst und mit 59.8 mL (159 mmol) einer Natriumethanolat-Lösung (21%ig in EtOH) versetzt. Anschließend wird 4 h unter Rückfluss und unter Argonatmosphäre erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird im Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Diethylether gewaschen und die wässrige Phase mit Essigsäure (9.10 mL) angesäuert. Es fällt ein bräunlicher Feststoff aus, der abfiltriert wird. Das Filtrat wird verworfen und der Feststoff ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 33.15 g (128 mmol), bräunlicher Feststoff, 81 % der Theorie, Lit.: 82 %.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 11.72 (s, br, 1H, OH), 11.50 (s, br, 1H, SH), 6.07 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH2</sub> = 5.5 Hz, 1H, O-CH-O), 3.59 (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 1H, Acetal-CH<sub>2</sub>-a), 3.58 (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 1H, Acetal-CH<sub>2</sub>-b), 3.42, (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 1H, Acetal-CH<sub>2</sub>-c), 3.39 (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 1H, Acetal-CH<sub>2</sub>-d), 2.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>O-CH-O</sub> = 5.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.06 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>CH2</sub> = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-Acetal).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 172.7, 161.7, 151.8, 101.6, 85.5, 61.6, 27.8, 15.2 (2C, CH<sub>3</sub>).

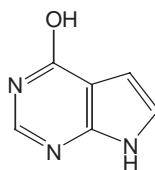
**6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidin-4-ol (19)**<sup>[107]</sup>

6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)-2-mercaptopyrimidin-4-ol (**19**) (32.65 g, 126.1 mmol) wird mit 400 mL Wasser und 80 mL wässriger Ammoniak-Lösung (25%ig) versetzt und anschließend 600 mL Raney-Nickel Suspension (100 g/L) hinzugegeben. Es wird 1 h unter Rückfluss erhitzt und das Reaktionsgemisch im Anschluss heiß filtriert. Der Filtrückstand wird verworfen und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Wasser befreit. Der flockige weiße Feststoff wird sofort, ohne Trocknung, für die anschließende Reaktion verwendet.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz; DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 11.72$  (s, br, 1H, OH), 7.70 (s, 1H, H-2), 6.10 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.56 (t,  $^3J_{\text{CH}_2} = 5.5$  Hz, 1H, O-CH-O), 3.30-3.60 (m, überlagert durch HOD, Acetal- $\text{CH}_2$ ), 2.52 (m, überlagert durch Lösungsmittel,  $\text{CH}_2$ ), 1.06 (t, 6H,  $^3J_{\text{CH}_2} = 7.1$  Hz, Acetal- $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz; DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 161.6, 161.3, 146.9, 101.7, 93.1, 61.3$  (2C), 28.6, 15.2 (2C).

#### 7H-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-ol (20)<sup>[107]</sup>



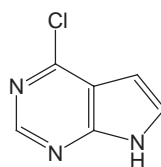
6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidin-4-ol (max. 28.49 g, 126.1 mmol) wird über Nacht in 0.2 N Salzsäurelösung (900 mL) bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird filtriert, das Filtrat verworfen und der Feststoff im HV getrocknet.

Ausbeute: 11.71 g (86.7 mmol); weißer Feststoff, 69 % der Theorie über 2 Stufen, Lit.<sup>[107]</sup>: 71 %.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz; DMSO- $d_6$ ):** 11.86 (s, br, 1H, OH), 11.78 (s, br, 1H, NH), 7.83 (s, 1H, H-2), 7.03 (m, 1H, H-8), 6.43 (m, 1H, H-7).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz; DMSO- $d_6$ ):** 158.4, 148.0, 143.1, 120.3, 107.6, 101.9.

#### 4-Chloro-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (21)<sup>[107]</sup>



7H-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-ol (20) (11.68 g, 86.51 mmol) wird in Phosphorylchlorid (110 mL) für 45 min. unter Rückfluss erhitzt und anschließend das überschüssige Phosphorylchlorid unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird auf Eis (200 mL) gegossen, mit Diethylether (4 x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

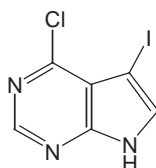
Ausbeute: 7.681 g (50.04 mmol); weißer Feststoff, 58 % der Theorie, Lit.: 75 %.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 12.56$  (s, br, 1H, *NH*), 8.57 (s, 1H, H-2), 7.66 (m, 1H, H-8), 6.56 (m, 1H, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 151.7, 150.3, 150.1, 128.2, 116.4, 98.7$ .

**MS (EI)**: 153.0 ( $[\text{M}]^+$ , 100 %); 118.1 ( $[\text{M-Cl}]^+$ , 80 %).

#### 4-Chloro-5-iodo-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**22**)<sup>[108]</sup>

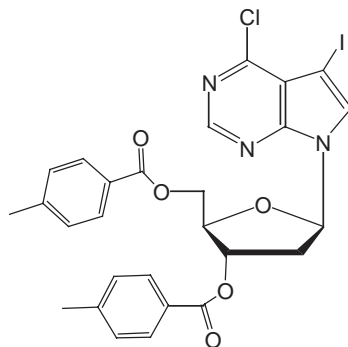


Eine Suspension aus 4-Chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**21**) (7.68 g, 50.03 mmol) und *N*-Iodsuccinimid (12.44 g, 55.3 mmol) in Dichlormethan (400 mL) wird bei Raumtemperatur und Lichtausschluss für 30 min. gerührt. Anschließend wird der ausgefallene weiße Feststoff durch eine Glasfritte filtriert, das Filtrat verworfen und der Feststoff aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 9.24 g (33.2 mmol); weißer Feststoff, 56 % der Theorie, Lit.: 80 %.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ): 12.95 (s, br, 1H, *NH*), 8.58 (s, 1H, H-2), 7.93 (s, 1H, H-8).

#### 4-Chloro-7-[2'-desoxy-3',5'-di-*O*-(4-toluoyl)- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]-5-iodo-7*H*-pyrrolo-[2,3-*d*]pyrimidin (**23**)<sup>[81]</sup>



4-Chloro-5-iodo-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**22**) (6.648 g, 27.1 mmol) wird unter Argonatmosphäre in Acetonitril (400 mL) gelöst und mit fein zerkleinertem KOH (3.32 g,

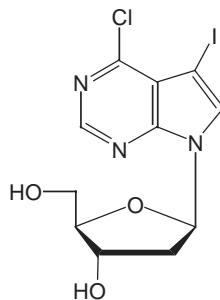
59.1 mmol) und Tris[2-(2-methoxyethoxy)-ethyl]amin (TDA-1, 0.5 mL) versetzt und 10 min bei RT gerührt. Anschließend wird 2-Desoxy-3,5-di-*O*-(4-toluoyl)- $\alpha$ -D-erythro-pentofuranosylchlorid (**26**) (11.3g, 29.2 mmol) hinzugegeben und weitere 10 min. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und der Filtrerrückstand mehrmals mit heißem Aceton gewaschen (gesamt ca. 300 mL). Anschließend wird das Lösungsmittel aus den vereinigten Filtraten am Rotationsverdampfer entfernt und das braun-gelbe Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/TBME; 4:1).

Ausbeute: 11.24 g (17.88 mmol); weißer Feststoff, 64 % der Theorie, Lit.: 65 %.

DC (Cyclohexan/TBME; 4:1):  $R_f = 0.40$ .

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8.62$  (s, 1H, H-2), 8.16 (s, 1H, H-8), 7.80-7.48 (m, 4H,  $H_{Ar}$ ), 7.25-7.35 (m, 4H,  $H_{Ar}$ ), 6.76 (dd,  $^3J_{H2'} = 7.4$  Hz,  $^3J_{H2''} = 6.2$  Hz, 1H, H-1'), 5.75 (m, 1H, H-3'), 4.64 (m, 1H, H-4'), 4.56 (m, 2H, H-5'), 3.10 (ddd,  $^2J_{H2''} = 14.6$  Hz,  $^3J_{H1'} = 7.4$  Hz,  $^3J_{H3'} = 7.2$  Hz, 1H, H-2'), 2.16 (ddd,  $^2J_{H2'} = 14.6$  Hz,  $^3J_{H1'} = 6.2$  Hz,  $J_{H3'} = 2.5$  Hz, 1H, H-2''), 2.37 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.34 (s, 3H,  $CH_3$ ).

#### 4-Chloro-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-5-iodo-7H-pyrrolo-[2,3-*d*]pyrimidin (**24**)<sup>[81]</sup>

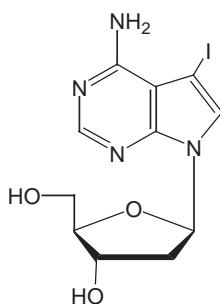


4-Chloro-7-[2'-desoxy-3',5'-di-*O*-(4-toluoyl)- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]-5-iodo-7H-pyrrolo-[2,3-*d*]pyrimidin (**23**) (8.55 g, 13.5 mmol) wird in bei 0 °C mit Ammoniak gesättigtem Methanol (500 mL) über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $CH_2Cl_2$ :MeOH 9:1). Da sich ein Teil des entstehenden Toluylamids nicht abtrennen lässt, wird das teilgereinigte Produkt für die nächste Reaktion verwendet und keine Ausbeute berechnet.

DC ( $CH_2Cl_2$ /MeOH; 9:1):  $R_f = 0.25$ .



**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-5-iodo-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin (25)[81]**



Das teilgereinigte 4-Chloro-7-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-5-iodo-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin (**24**) wird in 150 mL eines 1:1 Gemisches aus Dioxan und wässrigem Ammoniak über Nacht bei 120 °C in einem Autoklaven gerührt. Anschließend werden die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1).

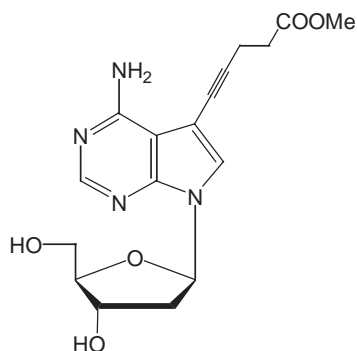
Ausbeute: 3.4 g (9.04 mmol); weißer Feststoff, 67 % der Theorie über 2 Stufen, Lit.: 43 %.

**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 9:1): R<sub>f</sub> = 0.20.

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 8.10 (s, 1H, H-2), 7.65 (s, 1H, H-8), 6.65 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 5.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 3.6 Hz, 1H, 3'-OH), 5.01 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 5.6 Hz, 1H, 5'-OH), 4.33 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 5.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3'OH</sub> = 3.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 2.4 Hz, 1H, H-3'), 3.82 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.4 Hz, 1H, H-4'), 3.58 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5''</sub> = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'OH</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.4 Hz, 1H, H-5'), 3.51 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5'</sub> = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'OH</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.4 Hz, 1H, H-5''), 2.46 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 5.8 Hz, 1H, H-2'), 2.16 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-2'').

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 157.5, 152.3, 150.1, 127.1, 103.5, 87.8, 83.3, 71.3, 62.2, 52.1, 40.2.

**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-(pent-1-ensäuremethylester)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin(38)**



Eine Lösung von **25** (300 mg, 0.795 mmol) und CuI (30.3 mg, 0.159 mmol) in trockenem DMF (2.5 mL) wird entgast durch repetitive Ultrabeschallung im HV, gefolgt von Spülen der Reaktionsapparatur mit Argon. Nach der Zugabe jedes Reagens' wird diese Prozedur wiederholt, um absoluten Luftausschluss zu gewährleisten. Pent-1-ensäuremethylester (**36**) (0.89 g, 10 eq.), Triethylamin (frisch destilliert über CaH<sub>2</sub>, 324 mg, 4 eq.) und Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (93 mg, 0.079 mmol) werden zugegeben und die Lösung wird bei RT unter Schutzgas gerührt. Der Reaktionsverlauf wird per DC kontrolliert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 85:15) bis alles Startmaterial umgesetzt ist (etwa 3 h). 30 mL einer Mischung von Dichlormethan und Methanol (1:1) und Anionenaustauscher (1 g, Amberlite IRA-400, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form) werden zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert, gut mit Dichlormethan und Methanol (1:1) gewaschen und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird chromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1).

Ausbeute: 233 mg (0.647 mmol), hellgelber Schaum, 81 % der Theorie.

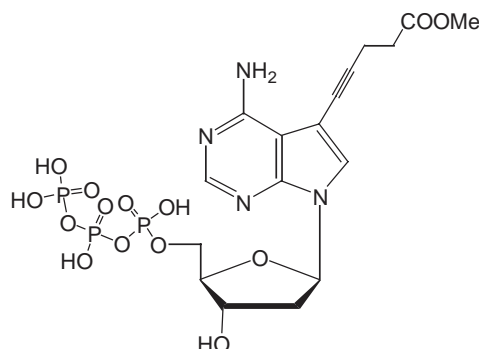
DC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 9:1): R<sub>f</sub> = 0.45.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.09 (s, 1H, H-2), 7.63 (s, 1H, H-8), 6.66 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.46 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 5.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 3.9 Hz, 1H, 3'-OH), 5.05 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 5.3 Hz, 1H, 5'-OH), 4.33 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3'-OH</sub> = 3.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-3'), 3.81 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 4.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-4'), 3.64 (s, 3H, -COOMe), 3.57 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5''</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'-OH</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.4 Hz, 1H, H-5'), 3.50 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5'</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'-OH</sub> = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.3 Hz, 1H, H-5''), 2.73-2.49 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOMe), 2.45 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 5.7 Hz, 1H, H-2'), 2.16 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-2'').

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 172.8, 157.9, 153.0, 149.5, 126.0, 102.7, 95.6, 91.4, 87.9, 83.6, 74.3, 71.4, 62.3, 52.0, 40.3, 33.0, 15.4$ .

**MS (FAB):** 361 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100 %), 245 ( $[\text{Base}+\text{H}]^+$ , 96 %).

**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-(pent-1-insäuremethylester)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5'O-triphosphat (39)**



Das Nukleosid **38** (100 mg, 0.277 mmol) wird nach Methode **A** in sein Triphosphat **39** überführt.

Ausbeute: 50 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.056 mmol), weißer Feststoff, 20 % der Theorie.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta = 8.13$  (s, 1H, H-2), 7.63 (s, 1H, H-8), 6.60 (dd,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 6.1$  Hz, 1H, H-1'), 4.33 (ddd,  $^3J_{\text{H}2'} = 6.0$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 3.2$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 3.2$  Hz, 1H, H-3'), 4.23 (ddd,  $^2J_{\text{H}5''} = 11.0$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 4.2$  Hz, 1H, H-5'), 4.17 (ddd,  $^2J_{\text{H}5'} = 11.0$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 6.0$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 4.5$  Hz, 1H, H-5''), 4.09 (dddd,  $^3J_{\text{H}5''} = 4.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}5'} = 4.2$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 3.2$  Hz,  $^4J_{\text{P}\alpha} = 0.9$  Hz, 1H, H-4'), 3.71 (s, 3H, -COOMe), 3.15 (q,  $^3J_{\text{CH}3} = 7.2$  Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.76-2.52 (m, 4H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOMe}$ ), 2.57 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 6.0$  Hz, 1H, H-2'), 2.32 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 6.1$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 3.2$  Hz, 1H, H-2''), 1.28 (t,  $^3J_{\text{CH}2} = 7.2$  Hz, 27H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (124 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta = 173.5, 156.7, 150.8, 148.9, 126.0, 102.9, 97.5, 91.5, 86.3$  (d,  $^3J_{\text{C}4'-\text{P}\alpha} = 9.8$  Hz), 83.5, 73.2, 71.6, 66.5 (d,  $^2J_{\text{C}5'-\text{P}\alpha} = 6.0$  Hz), 51.4, 46.2, 40.0, 32.8, 15.2, 8.1.

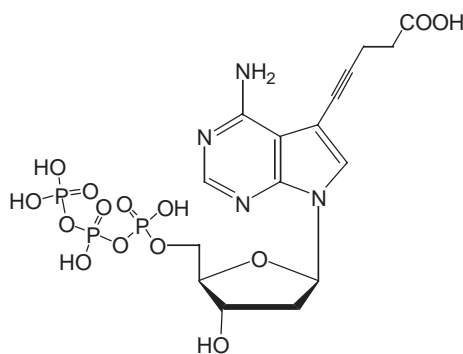
$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta = -7.4$  (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 21.1$  Hz, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ),  $-8.2$  (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 21.1$  Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ),  $-20.6$  (dd,  $^2J_{\text{P}\alpha} = 21.1$  Hz,  $^2J_{\text{P}\gamma} = 21.1$  Hz, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

**MS (neg.-ESI):** 599 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 31 %), 299 ( $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ , 100 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 11.8 min.

**UV:**  $\lambda_{\max}$  = 238, 279 nm;  $\lambda_{\min}$  = 257 nm. **FL:**  $\lambda_{\text{Em}}$  = 386 nm.

**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-(pent-1-insäure)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5'O-triphosphat (40)**



Das Nukleotid **39** ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 42 mg, 0.046 mmol) wird in 1 mL Wasser gelöst und eine wässrige Lösung von Natriumhydroxid (0.5 M, 0.5 mL) zugegeben. Die Lösung wird 30 min gerührt und anschließend mit TEAB-Puffer (1 M, 0.8 mL) versetzt. Die weitere Aufreinigung erfolgt über RP-MPLC.

Ausbeute: 42 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.043 mmol), weißer Feststoff, 92 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz):**  $\delta$  = 8.11 (s, 1H, H-2), 7.60 (s, 1H, H-8), 6.59 (dd,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.6$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 6.2$  Hz, 1H, H-1'), 4.64 (ddd,  $^3J_{\text{H}2'} = 6.0$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 3.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 3.1$  Hz, 1H, H-3'), 4.19 (m, 2H, H-5'/H-5''), 4.08 (m, 1H, H-4'), 3.15 (q,  $^3J_{\text{CH}3} = 7.2$  Hz, 24H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.76-2.52 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOMe}$ ), 2.56 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.6$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 6.1$  Hz, 1H, H-2'), 2.31 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 6.2$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 3.1$  Hz, 1H, H-2''), 1.28 (t,  $^3J_{\text{CH}2} = 7.2$  Hz, 36H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (124 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}^+$ -Salz):**  $\delta$  = 179.9, 152.9, 146.9, 146.3, 127.2, 102.4, 98.8, 94.5, 85.7 (d,  $^3J_{\text{C}4'-\text{P}\alpha} = 7.6$  Hz), 83.8, 71.7, 71.4, 66.0 (d,  $^2J_{\text{C}5'-\text{P}\alpha} = 3.0$  Hz), 46.8, 39.6, 34.9, 16.1, 8.6.

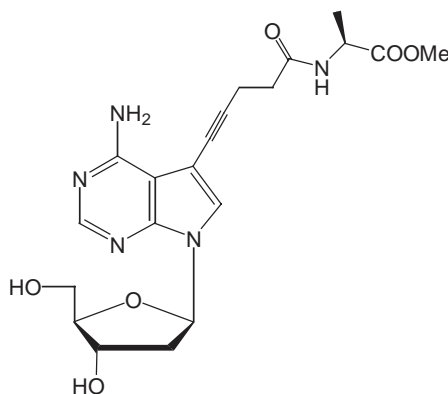
**$^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz):**  $\delta$  = -9.1 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 20.3$  Hz, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ), -9.9 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 20.9$  Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ), -22.3 (dd,  $^2J_{\text{P}\alpha} = 20.9$  Hz,  $^2J_{\text{P}\gamma} = 20.3$  Hz, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

**MS (neg.-ESI):** 595 ( $[\text{M-H}]^-$ , 28 %), 292 ( $[\text{M-2H}]^{2-}$ , 100 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 9.1 min.

**UV:**  $\lambda_{\max} = 237, 279 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\min} = 256 \text{ nm}$ . **FL:**  $\lambda_{\text{Em}} = 395 \text{ nm}$ .

**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-((S)-2-pent-4-inoylamino-propionsäuremethylester)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin(41)**



Wie für Verbindung **38** beschrieben, wird **25** (459 mg, 1.22 mmol) in DMF (2 mL) gelöst, mit (S)-2-Pent-4-inoylamino-propionsäuremethylester (**7**) (2.24 g, 12.2 mmol) gekuppelt (Reaktionszeit drei Stunden) und säulenchromatographisch ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 9:1) gereinigt.

Ausbeute: 380 mg (0.822 mmol), weißer Schaum, 72 % der Theorie.

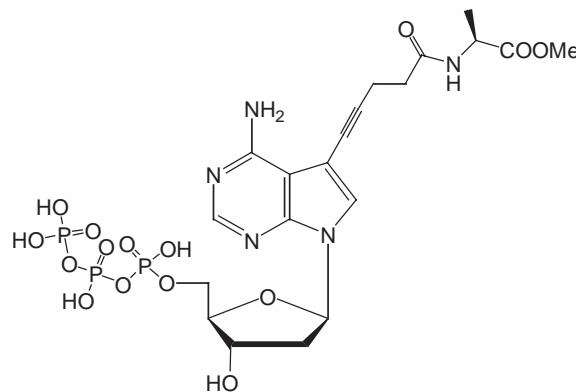
**DC** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH; 9:1):  $R_f = 0.15$ .

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta = 8.29$  (d,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.3 \text{ Hz}$ , 1H, -NH), 8.00 (s, 1H, H-2), 7.53 (s, 1H, H-8), 6.60 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.39 (dd,  $^3J_{\text{H2}'} = 8.0 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H2}''} = 6.0 \text{ Hz}$ , 1H, H-1'), 5.15 (d,  $^3J_{\text{H3}'} = 4.1 \text{ Hz}$ , 1H, 3'-OH), 4.95 (dd,  $^3J_{\text{H5}''} = 5.6 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H5}'} = 5.1 \text{ Hz}$ , 1H, 5'-OH), 4.29 (dq,  $^3J_{\text{NH}} = 7.3 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{CHMe}} = 6.0 \text{ Hz}$ , 1H, CHMe), 4.25 (m, 1H, H-3'), 3.74 (ddd,  $^3J_{\text{H5}''} = 4.5 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H5}'} = 4.3 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H3}'} = 2.6 \text{ Hz}$ , 1H, H-4'), 3.52 (s, 3H, -COOMe), 3.49 (ddd,  $^2J_{\text{H5}''} = 11.5 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{5'\text{OH}} = 5.1 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H4}'} = 4.4 \text{ Hz}$ , 1H, H-5'), 3.42 (ddd,  $^2J_{\text{H5}'} = 11.5 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{5'\text{OH}} = 5.7 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H4}'} = 4.3 \text{ Hz}$ , 1H, H-5''), 2.65-2.40 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CNR), 2.37 (ddd,  $^2J_{\text{H2}''} = 13.2 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H1}'} = 8.0 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H3}'} = 5.5 \text{ Hz}$ , 1H, H-2'), 2.09 (ddd,  $^2J_{\text{H2}'} = 13.2 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H1}'} = 6.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{H2}''\text{H3}'} = 2.8 \text{ Hz}$ , 1H, H-2''), 1.19 (d,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.3 \text{ Hz}$ , 3H, CHMe).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta = 173.8, 171.1, 158.0, 153.0, 149.5, 125.7, 102.7, 95.9, 91.9, 87.9, 83.6, 74.1, 71.4, 62.3, 52.0, 47.8, 40.3, 34.1, 17.6, 15.7$ .

**MS (FAB):** 432 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100 %), 316 ( $[\text{Base}+\text{H}]^+$ , 44 %).

**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-((S)-2-pent-4-inoylamino-propin-säuremethylester)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5'O-triphosphat (42)**



Das Nukleosid **41** (100 mg, 0.232 mmol) wird nach Methode **A** in sein Triphosphat **42** überführt.

Ausbeute: 42.5 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.044 mmol), weißer Feststoff, 19 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  = 8.11 (s, 1H, H-2), 7.63 (s, 1H, H-8), 6.60 (dd,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.6$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 6.1$  Hz, 1H, H-1'), 4.66 (ddd,  $^3J_{\text{H}2'} = 6.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 3.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 3.2$  Hz, 1H, H-3'), 4.45 (q,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.3$  Hz, 1H, CHMe), 4.24 (ddd,  $^2J_{\text{H}5''} = 11.0$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 4.2$  Hz, 1H, H-5'), 4.16 (ddd,  $^2J_{\text{H}5'} = 11.0$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 5.8$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 5.0$  Hz, 1H, H-5''), 4.08 (m, 1H, H-4'), 3.15 (q,  $^3J_{\text{CH}_3} = 7.2$  Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.76-2.52 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 2.55 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.6$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 6.1$  Hz, 1H, H-2'), 2.32 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 6.1$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 3.2$  Hz, 1H, H-2''), 1.36 (d,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.2$  Hz, 1H, CHMe), 1.28 (t,  $^3J_{\text{CH}_2} = 7.2$  Hz, 27H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  = 173.4, 172.7, 156.8, 151.0, 148.7, 125.5, 102.6, 97.2, 91.1, 85.9 (d,  $^3J_{\text{C}4'-\text{P}\alpha} = 8.9$  Hz), 83.1, 73.2, 71.2, 65.6 (d,  $^2J_{\text{C}5'-\text{P}\alpha} = 5.9$  Hz), 51.4, 48.5, 45.9, 39.6, 33.9, 16.1, 15.3, 7.7.

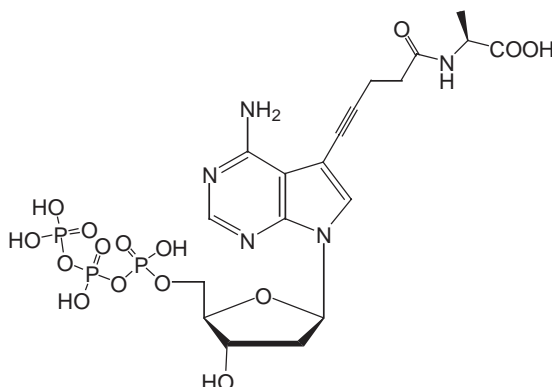
**$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  = -7.4 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 20.6$  Hz, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ), -8.2 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 20.9$  Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ), -20.6 (dd,  $^2J_{\text{P}\alpha} = 20.9$  Hz,  $^2J_{\text{P}\gamma} = 20.6$  Hz, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

**MS (neg.-ESI):** 670 ( $[\text{M-H}]^-$ , 18 %), 334.5 ( $[\text{M-2H}]^{2-}$ , 100 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 11.1 min.

**UV:**  $\lambda_{\text{max}} = 238, 280$  nm;  $\lambda_{\text{min}} = 257$  nm. **FL:**  $\lambda_{\text{Em}} = 390$  nm.

**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-((S)-2-pent-4-inoylamino-propin-säure)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5'O-triphosphat (43)**



Das Nukleotid **42** ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 50 mg, 0.052 mmol) wird in 1 mL Wasser gelöst und eine wässrige Lösung von Natriumhydroxid (0.5 M, 0.5 mL) zugegeben. Die Lösung wird 30 min gerührt und anschließend mit TEAB-Puffer (1 M, 0.8 mL) versetzt. Die weitere Aufreinigung erfolgt über RP-MPLC.

Ausbeute: 38 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.037 mmol), weißer Feststoff, 65 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = 8.11 (s, 1H, H-2), 7.62 (s, 1H, H-8), 6.61 (dd,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 6.1$  Hz, 1H, H-1'), 4.67 (ddd,  $^3J_{\text{H}2'} = 6.2$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 3.2$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 3.1$  Hz, 1H, H-3'), 4.31 (q,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHMe}$ ), 4.24 (ddd,  $^2J_{\text{H}5''} = 11.1$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 6.8$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 4.5$  Hz, 1H, H-5'), 4.18 (ddd,  $^2J_{\text{H}5''} = 11.1$  Hz,  $^3J_{\text{P}\alpha} = 6.2$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 4.8$  Hz, 1H, H-5''), 4.12 (m, 1H, H-4'), 3.15 (q,  $^3J_{\text{CH}_3} = 7.2$  Hz, 24H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.76-2.52 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 2.60 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 6.2$  Hz, 1H, H-2'), 2.34 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 6.1$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 3.2$  Hz, 1H, H-2''), 1.38 (d,  $^3J_{\text{CHMe}} = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHMe}$ ), 1.31 (t,  $^3J_{\text{CH}_2} = 7.2$  Hz, 36H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = 179.2, 173.2, 156.8, 153.1, 150.4, 126.5, 104.2, 98.5, 92.7, 87.2 (d,  $^3J_{\text{C}4'-\text{P}\alpha} = 8.4$  Hz), 84.4, 74.7, 72.6, 67.1 (d,  $^2J_{\text{C}5'-\text{P}\alpha} = 5.4$  Hz), 51.4, 47.3, 40.7, 35.6, 19.1, 16.7, 9.1.

**$^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = -9.1 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 21.2$  Hz, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ), -10.0 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 21.2$  Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ), -22.4 (dd,  $^2J_{\text{P}\alpha} = 21.2$  Hz,  $^2J_{\text{P}\gamma} = 21.2$  Hz, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

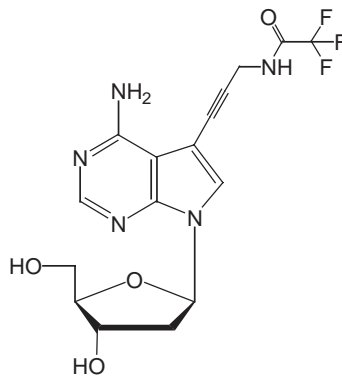
**MS (neg.-ESI):** 656 ( $[\text{M-H}]^-$ , 4 %), 327.5 ( $[\text{M-2H}]^{2-}$ , 40 %), 218 ( $[\text{M-3H}]^{3-}$ , 100 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 9.5 min.

**UV:**  $\lambda_{\text{max}} = 234, 279$  nm;  $\lambda_{\text{min}} = 257$  nm. **FL:**  $\lambda_{\text{Em}} = 387$  nm.



**4-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-(3-trifluoracetamido-prop-1-ynyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-(44)**



Wie für Verbindung **38** beschrieben, wird **25** (100 mg, 0.266 mmol) in DMF (1.5 mL) gelöst, mit Trifluoressigsäure-*N*-propargylamid (**37**) (401.7 mg, 2.66 mmol) gekuppelt (Reaktionszeit drei Stunden) und säulenchromatographisch (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) gereinigt.

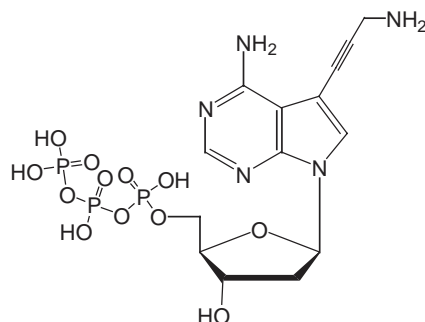
Ausbeute: 60 mg (0.150 mmol), gelbes Öl, 57 % der Theorie.

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 9.11 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 8.07 (s, 1H, H-2), 7.60 (s, 1H, H-8), 6.420 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 5.7 Hz, 1H, H-1'), 4.55 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 5.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 2.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H4'</sub> = 1.9 Hz, 1H, H-3'), 4.37 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>NH</sub> = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 3.98 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H5''</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H5'</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H3'</sub> = 1.9 Hz, 1H, H-4'), 3.74 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H5''</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H4'</sub> = 3.1 Hz, 1H, H-5'), 3.64 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H5'</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H4'</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-5''), 2.68 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 13.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H1'</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H3'</sub> = 5.5 Hz, 1H, H-2'), 2.24 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 13.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H1'</sub> = 5.7 Hz, *J*<sub>H3'</sub> = 2.0 Hz, 1H, H-2'').

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 158.1, 157.3 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 37.6 Hz), 153.4, 150.0, 128.5, 116.9 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 287.4 Hz), 104.4, 95.1, 89.5, 87.2, 87.1, 77.3, 73.0, 63.6, 51.4, 41.4, 30.9.

**MS (FAB):** 432 ([M+H]<sup>+</sup>, 100 %), 316 ([Base+H]<sup>+</sup>, 44 %).

**4-Amino-5-(3-amino-prop-1-ynyl)-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5'O-triphosphat (45)**



Das Nukleosid **44** (45 mg, 0.112 mmol) wird nach Methode **A** in sein Triphosphat überführt, durch einstündiges Rühren in wässrigem Ammoniak entschützt und wie üblich aufgereinigt.

Ausbeute: 17 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.018 mmol), weißer Feststoff, 16 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = 8.04 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 6.62 (m, 1H, H-1'), 4.70 (m, 1H, H-3'), 4.25 (m, 2H), 4.08 (m, 3H), 3.18 (m, 18H, überlagert durch Lösungsmittelsignale,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.52 (m, 1H, H-2'), 2.36 (m, 1H, H-2''), 1.29 (m, 27H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = -7.0 (d,  $^2J_{\text{P}\beta}$  = 20.4 Hz, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ), -7.9 (d,  $^2J_{\text{P}\beta}$  = 20.4 Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ), -20.0 (dd,  $^2J_{\text{P}\alpha}$  = 20.4 Hz,  $^2J_{\text{P}\gamma}$  = 20.4 Hz, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

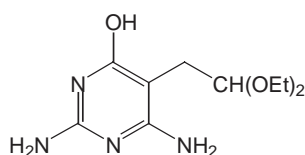
**MS (neg.-ESI):** 542 ( $[\text{M-H}]^-$ , 100 %), 270.5 ( $[\text{M-2H}]^{2-}$ , 10 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 8.1 min.

**UV:**  $\lambda_{\text{max}}$  = 236, 279 nm;  $\lambda_{\text{min}}$  = 257 nm. **FL:**  $\lambda_{\text{Em}}$  = 386 nm.

### 6.2.4 Synthese 7-modifizierter *N*-7-Deaza-2'-desoxyguanosine

#### 2,6-Diamino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidin-4-ol (**27**)<sup>[109]</sup>

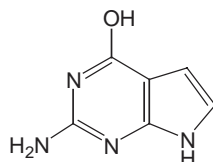


Guanidinhydrochlorid (9.56 g, 100.0 mmol) wird in 200 mL absol. Ethanol suspendiert und unter Argonatmosphäre mit ethanolischer Natriumethylat-Lösung (1M, 100 mL) versetzt. Der farblose Niederschlag wird abzentrifugiert (2500 U/min.; 3min), der klare Überstand erneut mit Natriumethylat-Lösung (1M, 100 mL) versetzt und in die Lösung  $\alpha$ -Cyano-4,4-diethoxybutansäureethylester (**17**) (23.0 g, 100.0 mmol) eingetragen. Die Lösung wird 4h unter Rückfluß erhitzt, das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und der schaumige Rückstand in 160 mL Wasser gelöst. Nach Versetzen mit Eisessig (6.0 g, 100 mmol) kristallisiert das Reaktionsprodukt in der Kälte aus und wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 10.09 (s, br, 1H, OH), 6.13 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.63 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH2</sub> = 5.5 Hz, 1H, CH), 3.60 (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 2H, Acetal-CH<sub>2</sub>-a), 3.57 (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 2H, Acetal-CH<sub>2</sub>-b), 3.40 (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 2H, Acetal-CH<sub>2</sub>-c), 3.38 (q, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.1 Hz, 2H, Acetal-CH<sub>2</sub>-d), 2.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 5.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.07 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>CH2</sub> = 7.1 Hz, Acetal-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 162.8, 153.3, 102.8, 83.3, 61.7 (2C), 61.3, 28.6, 15.3 (2C).

#### 2-Amino-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-ol (**28**)<sup>[109]</sup>



2,6-Diamino-5-(2,2-diethoxyethyl)pyrimidin-4-ol (**27**) (max. 24.23 g; 100.0 mmol) wird in HCl-Lösung (0.2 N, 150 mL) gelöst und 3h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird durch Zentrifugieren (3 min.; 2500 U/min.) von unlöslichen Rückständen befreit und der klare Überstand mit Ammoniak-Lösung versetzt bis sich ein pH-Wert von 7.5 einge-

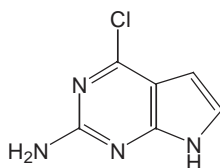
stellt hat. Das Reaktionsprodukt kristallisiert in farblosen Nadeln aus der Mutterlauge in der Kälte aus.

Ausbeute: 7.47 g (49.7 mmol), farblose Kristalle, 45 % der Theorie über 2 Stufen, Lit.: 49 %.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 10.99$  (s, br, 1H, NH), 10.26 (s, br, 1H, OH), 6.60 (m, 1H, H-6), 6.17 (m, 1H, H-5), 6.08 (s, br, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 159.1, 152.4, 151.3, 116.9, 101.8, 100.0$ .

### 2-Amino-4-chloro-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (29)<sup>[110]</sup>



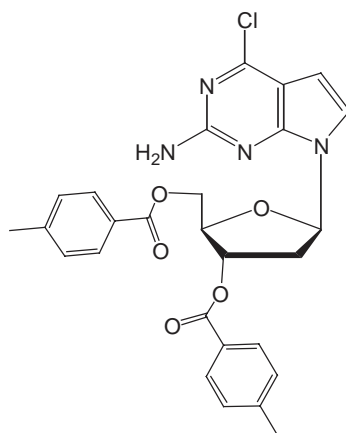
2-Amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol (**28**) (7.47 g; 49.7 mmol) wird in Acetonitril (80 mL) gelöst, mit Tri-*n*-butylethylammoniumchlorid (6.96 g, 32.9 mmol), Dimethylanilin (30.59 mL, 28.3 g, 238 mmol) und Phosphorylchlorid (52.22 mL, 497 mmol) versetzt und eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt und auf 800 mL Eis gegossen, eine weitere Stunde gerührt und mit wässrigem Ammoniak vorsichtig auf pH = 4 gebracht. Der entstandene Niederschlag wird in Toluol (600 mL) zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Der Rückstand wird erneut in Toluol (500 mL) zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Die Filtrate werden vereinigt und auf 4 °C gekühlt, nach einigen Stunden fällt das Produkt als weißer Niederschlag aus. Dieser wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 3.1 g (18.4 mmol), weißer Feststoff, 37 % der Theorie, Lit.: 76 %.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 11.50$  (s, br, 1H, NH), 7.10 (m, 1H, H-6), 6.50 (s, br, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.24 (m, 1H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 159.5, 154.8, 151.1, 123.4, 108.8, 98.9$ .

**2-Amino-4-chloro-7-(2'-desoxy-3',5'-di-*O*-toluyl- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (30)**<sup>[111]</sup>



2-Amino-4-chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**29**) (1 g; 5.96 mmol) wird in Acetonitril (80 mL) gelöst, mit Natriumhydrid (0.26 g, 60%ige Dispersion in Öl, ca. 6.5 mmol) versetzt und für 15 min bei RT gerührt. Nach Zugabe des Glykosids **26** (2.55 g, 6.5 mmol) wird über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan (100 mL) aufgenommen, zweimal mit Wasser gewaschen (je 50 mL) und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan (40 mL) reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), das Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc 95:5) an Kieselgel gereinigt.

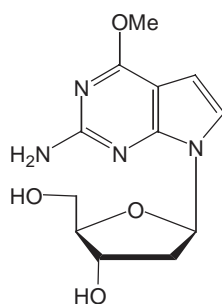
Ausbeute: 2.2 g (4.21 mmol), weißer Feststoff, 71 % der Theorie, Lit.: 75 %.

DC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc; 95:5): R<sub>f</sub> = 0.30.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.93 (m, 4H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.25 (m, 4H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.99 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H7</sub> = 3.8 Hz, 1H, H-8), 6.57 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 6.37 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H8</sub> = 3.8 Hz, 1H, H-7), 5.73 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 2.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H4'</sub> = 2.0 Hz, 1H, H-3'), 5.10 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 4.50-4.80 (m, 3H, *H*-4', *H*-5', *H*-5''), 2.89 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H2''</sub> = 14.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H1'</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H3'</sub> = 6.2 Hz, 1H, H-2'), 2.64 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H2'</sub> = 14.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H1'</sub> = 5.9 Hz, *J*<sub>H3'</sub> = 2.2 Hz, 1H, H-2''), 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 166.4, 166.1, 158.6, 153.7, 152.9, 144.6, 144.2, 129.9, 129.8, 129.4, 126.9, 126.6, 122.6, 111.4, 101.4, 84.2, 82.1, 75.3, 64.3, 37.2, 21.9, 21.8.

**2-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-4-methoxy-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (31)**<sup>[111]</sup>



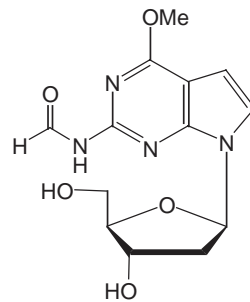
2-Amino-4-chloro-7-(2'-desoxy-3',5'-di-*O*-toluyl- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**30**), (2.1 g; 4.02 mmol) wird in methanolischem Natriummethanolat (0.5 M, 100 mL) gelöst und eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen werden 2 mL Essigsäure zugegeben und die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand wird in Wasser (100 mL) aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester (je 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), das Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 9:1) gereinigt.

Ausbeute: 950 mg (3.38 mmol), farbloser Schaum, 84 % der Theorie, Lit.: 92 %.

**DC** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH; 9:1):  $R_f = 0.30$ .

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta = 7.10$  (d,  $^3J_{\text{H}7} = 3.7$  Hz, 1H, H-8), 6.41 (dd,  $^3J_{\text{H}2'} = 8.4$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 5.7$  Hz, 1H, H-1'), 6.26 (d,  $^3J_{\text{H}8} = 3.7$  Hz, 1H, H-7), 6.20 (s, br, 2H,  $-\text{NH}_2$ ), 5.23 (d,  $^3J_{\text{H}3'} = 3.7$  Hz, 1H, 3'-OH), 4.95 (dd,  $^3J_{\text{H}5''} = 5.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}5'} = 5.5$  Hz, 1H, 5'-OH), 4.30 (m, 1H, H-3'), 3.91 (s, 3H, *OMe*), 3.78 (m, 1H, H-4'), 3.49 (m, 2H, H-5' & H-5''), 2.38 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.2$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 8.4$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 5.6$  Hz, 1H, H-2'), 2.08 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'} = 13.2$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 5.7$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 2.3$  Hz, 1H, H-2'').

7-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-*erythro*-pentafuranosyl)-2-formamidyl-4-methoxy-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**32**)<sup>[112]</sup>



2-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-*erythro*-pentafuranosyl)-4-methoxy-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**31**) (1.1 g; 3.91 mmol) wird in DMF (10 mL) gelöst, mit *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal (10 mL) versetzt und 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt, anschließend werden Lösungsmittelreste zuerst mit Toluol (20 mL) und dann mit Aceton (20 mL) koevaporiert. Der Rückstand wird in Wasser (40 mL) aufgenommen, für 20 Minuten unter Rückfluss erhitzt und über Nacht bei RT stehen gelassen. Das Produkt fällt nach einigen Stunden als weißer Niederschlag aus, dieser wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 960 mg (3.11 mmol), farbloser Schaum, 80 % der Theorie, Lit.: 90 %.

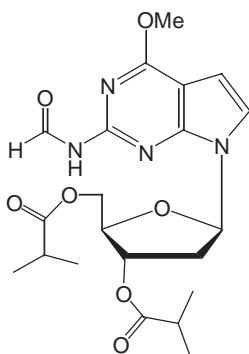
DC (CH<sub>3</sub>Cl/MeOH; 9:1): R<sub>f</sub> = 0.25.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 10.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH</sub> = 9.0 Hz, 1H, CHO), 9.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>CHO</sub> = 9.0 Hz, 1H, NH), 7.45 (m, 1H, H-8), 6.50 (m, 1H, H-7), 6.50 (m, 1H, H-1'), 5.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 3.8 Hz, 1H, 3'-OH), 4.92 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 5.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 5.4 Hz, 1H, 5'-OH), 4.34 (m, 1H, H-3'), 4.00 (s, 3H, -OMe), 3.80 (m, 1H, H-4'), 3.50 (m, 2H, H-5' & H-5''), 2.50 (überlagert durch Lösungsmittel, 1H, H-2'), 2.18 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-2'').

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 163.7, 162.8, 152.5, 152.1, 123.0, 101.6, 99.6, 87.4, 82.7, 71.2, 62.1, 53.9, ~40.0 (überlagert durch Lösungsmittel).



(2'-Desoxy-3',5'-di-*O*-*iso*butyroxyl-β-D-*erythro*-pentafuranosyl)-2-formamidyl-4-methoxy-7-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (33)<sup>[82]</sup>



7-(2'-Desoxy-β-D-*erythro*-pentafuranosyl)-2-formamidyl-4-methoxy-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (32) (1.336 g; 4.34 mmol) wird in Acetonitril (30 mL) gelöst, mit Triethylamin (3 mL) und *iso*Buttersäureanhydrid (7 mL) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Aceton 95:5) an Kieselgel gereinigt.

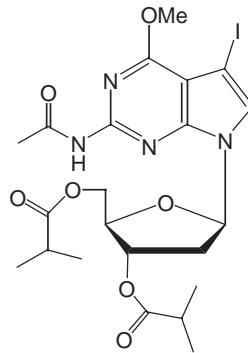
Ausbeute: 1.75 g (3.90 mmol), farbloser Schaum, 90 % der Theorie, Lit.: 81 %.

DC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Aceton; 95:5): R<sub>f</sub> = 0.25.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 10.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH</sub> = 9.9 Hz, 1H, CHO), 9.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>CHO</sub> = 9.9 Hz, 1H, NH), 7.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>H7</sub> = 3.7 Hz, 1H, H-8), 6.54 (d, <sup>3</sup>J<sub>H8</sub> = 3.7 Hz, 1H, H-7), 6.48 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 5.35 (m, 1H, H-3'), 4.20 (m, 3H, H-4', H-5' & H-5''), 4.03 (s, 3H, -OMe), 2.93 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 14.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 2.61 („sept“, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.0 Hz, 1H, COCH), 2.56 („sept“, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.0 Hz, 1H, COCH), 2.44 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 14.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 1.9 Hz, 1H, H-2''), 1.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 176.1, 175.9, 163.7, 163.0, 152.6, 152.3, 123.0, 101.9, 100.0, 83.3, 81.3, 74.4, 63.8, 53.9, ~40.0 (überlagert durch Lösungsmittel), 35.8, 33.3, 19.1 (2C), 18.9, 18.8.

**7-(2'-Desoxy-3',5'-di-*O*-<sup>iso</sup>butyroxyl-β-D-erythro-pentafuranosyl)-2-formamidyl-5-iodo-4-methoxy-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (34)**<sup>[82]</sup>



(2'-Desoxy-3',5'-di-*O*-<sup>iso</sup>butyroxyl-β-D-erythro-pentafuranosyl)-2-formamidyl-4-methoxy-7-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**33**) (1.84 g, 4.10 mmol) wird in DMF (20 mL) gelöst, mit *N*-Iodsuccinimid (0.97 g, 4.51 mmol) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 200 mL einer Mischung aus Dichlormethan und halbgesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (9:1) gegossen und die Phasen getrennt. Die organische Phase wird mit Wasser (50 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Aceton 95:5) an Kieselgel gereinigt.

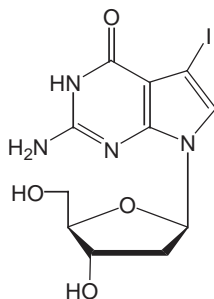
Ausbeute: 2.10 g (3.66 mmol), leicht rosafarbener Schaum, 89 % der Theorie, Lit.: 92 %.

**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Aceton; 95:5): R<sub>f</sub> = 0.30.

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ = 9.50 (m, 2H, CHO & NH), 7.47 (s, 1H, H-8), 6.51 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 5.39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 6.42 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 2.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 4.27 (m, 3H, H-4', H-5' & H-5''), 4.04 (s, 3H, -OMe), 2.87 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 14.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 6.4 Hz, 1H, H-2'), 2.59 („sept“, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.0 Hz, 1H, COCH), 2.57 („sept“, <sup>3</sup>J<sub>CH3</sub> = 7.0 Hz, 1H, COCH), 2.52 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 14.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.4 Hz, 1H, H-2''), 1.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ = 176.8, 176.6, 164.2, 163.4, 153.4, 153.4, 128.2, 123.8, 84.6, 82.9, 75.2, 64.6, 54.4, 37.7, 34.4, 34.4, 19.3 (2C), 19.1 (2C).

**2-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-iodo-3,7-dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (35)**<sup>[82]</sup>



7-(2'-Desoxy-3',5'-di-*O*-<sup>iso</sup>butyroyloxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-2-formamidyl-5-iodo-4-methoxy-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**34**) (1.8 g; 3.13 mmol) wird in 2 N Natronlauge (50 mL) gelöst und 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird mit Essigsäure (5 mL) neutralisiert, für 20 Minuten auf 0 °C abgekühlt und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Dieser wird gewaschen, indem er dreimal mit je 20 mL Wasser aufgenommen und erneut abzentrifugiert wird. Nach Koevaporation mit Methanol wird der Niederschlag im HV getrocknet.

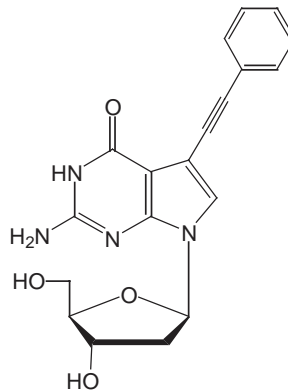
Ausbeute: 990 mg (2.52 mmol), weißer Feststoff, 81 % der Theorie, Lit.: 92 %.

**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 85:15): R<sub>f</sub> = 0.60.

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 10.60 (s, br, 1H, -NH), 7.11 (s, 1H, H-8), 6.40 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 8.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 5.8 Hz, 1H, H-1'), 5.22 (m, 1H, 3'-OH), 4.93 (m, 1H, 5'-OH), 4.26 (m, 1H, H-3'), 3.75 (m, 1H, H-4'), 3.48 (m, 2H, H-5' & H-5''), 2.317 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 13.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 8.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 5.4 Hz, 1H, H-2'), 2.04 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 13.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 5.8 Hz, J<sub>H3'</sub> = 2.2 Hz, 1H, H-2'').

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 158.5, 153.0, 150.8, 121.8, 100.0, 87.3, 82.3, 71.1, 62.1, 55.3, ~40.0 (überlagert durch Lösungsmittel).

**2-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-(phenylethynyl)-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (46).**



Wie für Verbindung **38** beschrieben, wird **35** (300 mg, 0.765 mmol) in DMF (2 mL) gelöst, mit Phenylacetylen (788 mg, 7.62 mmol) gekuppelt (Reaktionszeit sechs Stunden) und säulenchromatographisch (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 180 mg (0.565 mmol), weißer Schaum, 68 % der Theorie.

**DC** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 85:15): R<sub>f</sub> = 0.50.

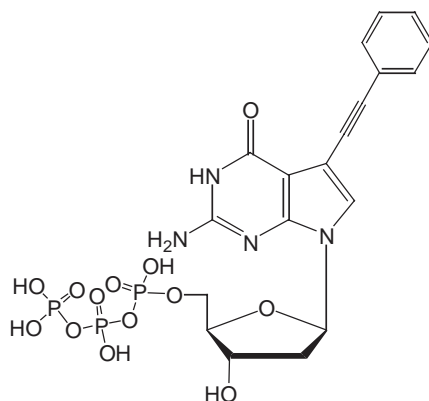
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 10.50 (s, 1H, -NH), 7.49-7.35 (m, 5H, Ph-H), 7.37 (s, 1H, H-8), 6.36 (s, br, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 8.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 5.8 Hz, 1H, H-1'), 5.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 3.6 Hz, 1H, 3'-OH), 4.91 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 5.3 Hz, 1H, 5'-OH), 4.31 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>H2'</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3'OH</sub> = 3.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2''</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-3'), 3.79 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H5'</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5''</sub> = 4.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-4'), 3.56 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5''</sub> = 11.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'OH</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.7 Hz, 1H, H-5'), 3.51 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H5'</sub> = 11.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5'OH</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4'</sub> = 4.6 Hz, 1H, H-5''), 2.36 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2''</sub> = 13.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 5.6 Hz, 1H, H-2'), 2.12 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H2'</sub> = 13.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1'</sub> = 5.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-2'').

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 158.2, 153.7, 150.9, 131.2, 129.0, 128.3, 123.9, 122.4, 99.8, 98.8, 91.4, 89.6, 87.6, 84.9, 82.7, 71.3, 62.3, 40.1.

**MS (FAB):** 367 ([M+H]<sup>+</sup>, 4 %), 307 ([2mNBA+H]<sup>+</sup>, 100 %).

**UV:**  $\lambda_{\text{max}}$  = 257, 308 nm;  $\lambda_{\text{min}}$  = 291 nm.

**2-Amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentafuranosyl)-5-(phenylethynyl)-3,7-dihydropyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on-5'-O-triphosphat (47)**



Das Nukleosid **46** (100 mg, 0.211 mmol) wird nach Methode **A** in sein Triphosphat **47** überführt.

Ausbeute: 43 mg ( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ -Salz, 0.048 mmol), weißer Feststoff, 19 % der Theorie.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = 7.55-7.25 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7.32 (s, 1H, H-2), 6.41 (dd,  $^3J_{\text{H}2'} = 7.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 6.2$  Hz, 1H, H-1'), 4.66 (ddd,  $^3J_{\text{H}2'} = 6.0$  Hz,  $^3J_{\text{H}2''} = 3.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}4'} = 3.0$  Hz, 1H, H-3'), 4.22 (m, 2H, H-5'), 4.07 (m, 1H, H-4'), 3.15 (q,  $^3J_{\text{CH}3} = 7.2$  Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 2.60 (ddd,  $^2J_{\text{H}2''} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 7.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'} = 6.0$  Hz, 1H, H-2'), 2.26 (ddd,  $^2J_{\text{H}2'} = 13.5$  Hz,  $^3J_{\text{H}1'} = 6.2$  Hz,  $J_{\text{H}3'} = 3.1$  Hz, 1H, H-2''), 1.31 (t,  $^3J_{\text{CH}2} = 7.2$  Hz, 27H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = 161.3, 153.7, 152.7, 132.3, 129.4, 128.8, 125.5, 124.1, 101.2, 101.1, 91.2, 87.1 (d,  $^3J_{\text{C}4'-\text{P}\alpha} = 8.7$  Hz), 84.8, 84.4, 72.7, 67.2 (d,  $^2J_{\text{C}5'-\text{P}\alpha} = 5.6$  Hz), 47.2, 40.3, 9.1.

**$^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  = -9.1 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 21.1$  Hz, 1P,  $\text{P}_\gamma$ ), -9.9 (d,  $^2J_{\text{P}\beta} = 21.1$  Hz, 1P,  $\text{P}_\alpha$ ), -20.6 (dd,  $^2J_{\text{P}\alpha} = 21.1$  Hz,  $^2J_{\text{P}\gamma} = 21.1$  Hz, 1P,  $\text{P}_\beta$ ).

**MS (neg.-ESI):** 605 ( $[\text{M-H}]^-$ , 100 %), 302 ( $[\text{M-2H}]^{2-}$ , 83 %).

**HPLC:**  $t_r$ : 12.9 min.

**UV:**  $\lambda_{\text{max}} = 259, 308$  nm;  $\lambda_{\text{min}} = 240, 292$  nm.

## 6.3 Molekularbiologische Methoden

### 6.3.1 5'-Markierung von DNA mit $^{[32]}\text{P}$

Zur 5'-Markierung von DNA mit  $^{[32]}\text{P}$  wird der zu markierende Primer (2  $\mu\text{L}$ , 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) in Wasser (36  $\mu\text{L}$ ) und Puffer (10x-Ligasepuffer des Enzymlieferanten, 5  $\mu\text{L}$ ) gelöst. Anschließend wird  $\gamma\text{-}^{[32]}\text{P}\text{-ATP}$  (5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ , Perkin Elmer Life Sciences, Zaventem, Belgien) und T4-Polynukleotidkinase (2  $\mu\text{L}$ , 10 U/ $\mu\text{L}$ , Stratagene, Heidelberg) zugegeben und eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird durch zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C beendet und die Lösung über eine MicroSpin Sephadex G-25 Säule (3000 rpm, 1 min, Amersham Biosciences, Freiburg) entsalzt. Abschließend wird nichtmarkierter Primer (20  $\mu\text{L}$ , 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) zugegeben, so dass die Endkonzentration an Primer bei etwa 3 pmol/ $\mu\text{L}$  liegt.

### 6.3.2 Elektrophoretische Methoden

#### 6.3.2.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Analyse der Reaktionen mit  $^{[32]}\text{P}$ -markierten Oligonukleotiden erfolgt standardmäßig durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Hierzu werden Harnstoff (48 g, 0.8 mol) und 20 mL „AccuGel 19:1“ Polyacrylamid-Lösung (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA, USA) in Wasser (35 mL) und 10x-TBE-Puffer (10 mL) gegeben. Diese Mischung liefert ca. 100 mL eines 8%igen Polyacrylamidgels, 8M Harnstoff enthaltend. Nach Auflösen des Harnstoffs im Wasserbad bei 50 °C wird Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS, 10%ig in Wasser, 720  $\mu\text{L}$ ) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED, 36 $\mu\text{L}$ ) zugegeben und die Lösung zügig in eine gut mit Dichlordimethylsilan (5%ig in Dichlormethan) silanisierte Sequenziergelkammer (Bio-Rad, München) gegossen. Nach vollständiger Polymerisation (nach ca. 1.5 Stunden) wird die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt und das Gel ca. eine Stunde bei 2400V vorelektrophoretisiert. Zur Durchführung der Elektrophorese werden die Proben und ein Farbstoffgemisch (Bromphenolblau/Xylencyanol, Merck, Darmstadt) aufgetragen und das Gel für ca. 1.5 Stunden bei 2100 V elektrophoretisiert.

Anschließend wird die Kammer vorsichtig geöffnet und das Gel auf Filterpapier übertragen, die dem Papier abgewandte Seite wird mit Frischhaltefolie abgedeckt und das Gel für eine Stunde in einem Geltrockner (Bio-Rad, München) bei 80 °C getrocknet. Die Analyse erfolgt durch Belichtung und anschließendes Auslesen von Phosphorimagerplatten (*FUJIFILM FLA-3000*, Raytest, Straubenherdt) oder durch Belichtung von Röntgenfilmen (*Kodak BioMax*,

Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) und anschließender maschineller Entwicklung (*Optimax TR*; MS Laborgeräte, Wiesloch).

### 6.3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse nicht-radioaktiver DNA-Reaktionen dient die Agarosegelelektrophorese. Hierzu werden 2.5 g Agarose (Life Technologies, Paisly, Schottland) in 0.5x TBE-Puffer (100 mL) suspendiert und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Zum Entfernen von Luftblasen wird die Lösung einige Stunden bei 65 °C aufbewahrt. Zum Gießen der Gele wird Ethidiumbromid-Lösung (10 µL, 10 mg/mL, Roth, Karlsruhe) zugegeben, sorgfältig gerührt und in Gelkammern (*Mupid-21*, Eurogentec, Serain, Belgien) gegossen.

Zum Beladen werden 10 µL Probe mit 5 µL Beladungspuffer (50 % Glycerin, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0) vermischt und hiervon 10 µL aufgetragen, als Referenz werden 10 µL eines Größenstandards (peqGOLD 100 bp DNA Leiter, Peqlab, Erlangen) aufgetragen. Das Gel wird für etwa 20 Minuten bei 100V in 0.5x TBE-Puffer elektrophoretisiert und in einem UV-Transilluminator (Raytest, Straubenherdt) photographiert.

### 6.3.3 Primer-Verlängerungsreaktionen

Sequenzen der für die Primer-Verlängerungen verwendeten Oligonukleotide (synthetisiert von Metabion, Martinsried oder IBA, Göttingen):

Modell Templat (**MT**): 5' -CAG TAC TGT CGA GTA CTA GCA TCG CGA TGA  
CTA GTC GTC ACT AGT GCA CGT AAC GTG CTA GTC AGA AAT TTC GCA  
CCA C-3'

A-Reiches Templat (**AT**): 5' -CAC TCA CGT CAG TGA CAT GCA CGT AAT GCA  
AAG CTA AAA TCG AAA ACT GAA AGT CAA CGT GTC AGA AAT TTC GCA  
CCA C-3'

C-Reiches Templat (**CT**): 5' -CAC TCA CGT CAG TGA CAT GCC AGT CCT GAC  
CCG ATC CCC TAG CCC CAT GCC CGT ACC AGT GTC AGA AAT TTC GCA  
CCA C-3'

G-Reiches Templat (**GT**): 5' -CAC TCA CGT CAG TGA CAT GCG ACT GGT CAG  
GGC ATG GGG TAC GGG GAT CGG GCT AGG ACT GTC AGA AAT TTC GCA  
CCA C-3'



**T-Reiches Templat (TT):** 5' -CAC TCA CGT CAG TGA CAT GCT ACG TTG CAT  
TTC AGT TTT GAC TTT TAG CTT TCG ATT ACG GTC AGA AAT TTC GCA  
CCA C-3'

**Pool Templat (PT):** 5' -CAC TCA CGT CAG TGA CAT GCN NNN NNN NNN  
NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN GTC AGA AAT TTC GCA  
CCA C-3'

**Restriktions-Templat (RT):** 5' -GAG CAT TCT GAG GAT CCC TCG AGA CTT AAG  
CTT TAG GAT CGT GGA ATT CCT AGT CAG TGA GTC AGA AAT TTC GCA  
CCA C-3'

**3'-Primer (19mer):** 5' -GTG GTG CGA AAT TTC TGA C-3'

### 6.3.3.1 Analytische Primer-Verlängerung mit 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Primern

Zunächst wird ein „Annealing Mix“ (**AM**) vorbereitet, der den 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Primer sowie das entsprechende Templat in einem Verhältnis von 1:3 enthält. Dazu werden die Oligonukleotide in Puffer gelöst (10x-Puffer der Enzymhersteller, entsprechend verdünnt). In den hier beschriebenen Experimenten wurde standardmäßig eine Konzentration von 2 pmol Primer in 10 µL **AM** gewählt, bei entsprechender Verlängerung der Reaktionszeit (s. u.) können aber auch bis zu 5 pmol Primer in 10 µL **AM** eingesetzt werden. Der Mix wird für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und über einen Zeitraum von einer Stunde durch entsprechende Programmierung eines Thermocyclers auf 25 °C abgekühlt. Nun werden die Enzyme zugegeben: Thermostabile Anorganische Pyrophosphatase (New England Biolabs, Frankfurt, 1 U auf 5 U DNA-Polymerase) und eine der folgenden DNA-Polymerasen (0.5 – 2 U).

*Bst* DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)

Klenow Fragment (exo-) (New England Biolabs, Frankfurt)

Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)

Sequenase<sup>®</sup> V. 2.0 (Amersham Biosciences, Freiburg)

*Taq* DNA-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA)

*Tth* DNA-Polymerase (Roche, Mannheim)

Anschließend wird das gleiche Volumen eines Nukleotidmixes zugegeben, der die nötigen dNTPs in dem gleichen Puffer enthält. Die Reaktionen werden in 200 µL Mikroreaktionsge-

fäßen (Reaktionsvolumen: 20 µL) in einem Thermocycler durchgeführt, indem die Ansätze für 30 bis 120 Minuten auf die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms erhitzt werden. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 3 Volumina Stopplösung (80%ige Formamidlösung, 20 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) enthaltend) beendet und durch zehnminütiges Erhitzen auf 99 °C denaturiert.

Aliquots von 5 µL werden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

### **6.3.3.2 Präparative Primer-Verlängerung mit biotinylierten Templaten**

Analog zur analytischen Primer-Verlängerung wird für die präparative Variante ein „Annealing Mix“ (**AM**) vorbereitet, der unmarkierten Primer (10 pmol) und das entsprechende 5'-biotinylierte Templat (30 pmol, Endvolumen: 20 µL **AM**) enthält. Nach der Zugabe der Enzyme (0.4 U Thermostabile Anorganische Pyrophosphatase, 2 U Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase) und des entsprechenden Nukleotidmixes (20 µL, 100µM jedes natürlichen oder modifizierten dNTPs) erfolgt die Verlängerung analog zu der obigen Vorgehensweise (2 Stunden Extension bei 72 °C). In der Negativkontrolle werden 20 µL **AM** mit 20 µL Puffer verdünnt und analog zu den anderen Ansätzen behandelt. Anschließend werden 10 µL 5x-Immobilisierungspuffer (750 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 250 mM HEPES, pH=7.0) zugegeben und die Lösung 45 Minuten bei 4 °C auf 50 µL Streptavidin-Agarose (Ultra-Link Plus<sup>®</sup>, Pierce, Rockford, Ill., USA) immobilisiert, die 5 mal mit 100 µL Wasch-Puffer (150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH=7.0) äquilibriert wurde. Die Säule wird 15 mal mit jeweils 100 µL Wasch-Puffer bei RT gewaschen. Die fdNA bzw. die ssDNA wird mit zweimal 50 µL Elutionspuffer (0.1 M NaOH, 150 mM NaCl) eluiert und mit 7 µL Essigsäure (5%ig) neutralisiert.

### **6.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

#### **6.3.4.1 PCR mit modifizierten dNTPs**

Als Templat für die PCR dient die folgende ssDNA (M5) von Dr. Günther Mayer:

```
5' -TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AGA CAA GCT TGG GTC-GGG TTC  
GCT AAG TTG GTC TAC CCC TCT CGA ATA TCC GTT AAG AAG AGA AAG  
AGA AGT TAA TTA AGG ATC CTC AG-3'
```

sowie die Primer

5' -TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AGA CAA GCT TGG GTC-3' und  
5' -CTG AGG ATC CTT AAT TAA CTT CTC TTT CTC-3'.

Die Reaktionen werden nach Standardbedingungen durchgeführt (50 µL Reaktionsvolumen, 50 pmol jedes Primers, 2 U DNA-Polymerase (*Taq* DNA-Polymerase von Promega, Madison, WI, USA; Fast Start *Taq* PCR System, Expand PCR System, GC-Rich PCR System, *Pwo* oder *Tth* DNA-Polymerase von Roche, Mannheim; DAp Polymerase von Eurogentec, Seraing, Belgien)). Natürliche dNTPs werden 200 µM, modifizierte dNTPs 400 µM eingesetzt, die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration wird zwischen 1.5 und 6 mM variiert. Das folgende Temperaturprogramm wird verwendet:

Initialdenaturierung: 2 min bei 94 °C  
Denaturierung: 1 min bei 94 °C  
Primeranlagerung: 1 min bei 50 °C  
Verlängerung: 2 min bei 72 °C, 15-30 Zyklen

Als Kontrollreaktionen dient eine Reaktion ohne Templat, sowie Reaktionen ohne das entsprechenden Nukleotid (weder natürliches noch modifiziertes dNTP). Aliquots von 10 µL werden auf einem 2.5% ige Agarosegel analysiert, das mit Ethidiumbromid gefärbt ist.

#### 6.3.4.2 PCR mit fDNA-Templaten

Die Eluate der Primer-Verlängerungen (jeweils 5 µL) werden als Templat für eine PCR verwendet. Diese wird in 200 µL Mikroreaktionsgefäßen (Reaktionsvolumen: 50 µL) unter Verwendung folgendes Temperaturprogramms durchgeführt:

Initialdenaturierung: 2 min bei 100 °C  
Denaturierung: 1 min bei 100 °C  
Primeranlagerung: 1 min bei 50 °C  
Verlängerung: 5 min bei 72 °C, 2 Zyklen  
Denaturierung: 1 min bei 100 °C  
Primeranlagerung: 1 min bei 50 °C  
Verlängerung: 2 min bei 72 °C, 6 Zyklen  
Abschließende Verlängerung: 5 min bei 72 °C

Weitere Bedingungen: 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 25 pmol der Primer 5'-GTG GTG CGA AAT TTC TGA C-3' und 5'-Biotin-CAC TCA CGT CAG TGA CAT GC-3', 0.5  $\mu\text{l}$  *Pwo* DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ , Roche, Mannheim), 10  $\mu\text{L}$  „GC-Rich solution“ (Roche, Mannheim), Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.85, 25 mM KCl, 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ . Aliquots von 10  $\mu\text{L}$  werden auf einem 2.5%igen Agarosegel analysiert, das mit Ethidiumbromid gefärbt ist.

### 6.3.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

Zur Sequenzierung werden 10  $\mu\text{L}$  der fDNA bzw. ssDNA enthaltenden Eluate mit Hilfe der PCR amplifiziert (Reaktionsvolumen: 100  $\mu\text{L}$ , 100 pmol jedes Primers, 10 Zyklen, andere Angaben: siehe oben). Jeder Ansatz wird mit 100  $\mu\text{L}$  Wasser verdünnt und 30 Sekunden mit 200  $\mu\text{L}$  Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Nach Zentrifugation (3 Minuten, 14.000 rpm) wird die wässrige Phase abgetrennt, mit 400  $\mu\text{L}$  Chloroform gewaschen, und erneut zentrifugiert (3 Minuten, 14.000 rpm). Zu der wässrigen Phase wird Glykogen (1  $\mu\text{L}$ , 20 mg/mL, Roche, Mannheim), Natriumacetat (20  $\mu\text{L}$ , 3M) und Ethanol (600  $\mu\text{L}$ , -20 °C) gegeben. Die Mischung wird für 30 Minuten auf -87 °C gekühlt und die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (10 Minuten, 14.000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Das erhaltene Pellet wird mit 70%igem Ethanol (50  $\mu\text{L}$ ) gewaschen, erneut zentrifugiert (3 Minuten, 14.000 rpm, 4 °C) und in 10  $\mu\text{L}$  Wasser gelöst.

Zum Abtrennen überschüssiger dNTPs und Primer wird die DNA auf ein 2.5%iges Agarosegel (low-melting Agarose, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) aufgetragen, das mit Ethidiumbromid gefärbt ist. Nach der Elektrophorese werden die Produktbanden unter UV-Licht ausgeschnitten, die Agarose durch Zentrifugation kollabiert (15 Minuten, 14.000 rpm) und die zurückbleibende Lösung über G-25 Ionenaustauschersäulen (Amersham Biosciences, Freiburg) entsalzt. Nach erneuter Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation wird die DNA von PHAMISS<sup>[88]</sup>, dem DNA-Sequenzierservice der Universität Bonn, durch Cycle-Sequencing sequenziert.

### 6.3.6 Restriktionsverdau

Wie unter Kapitel 6.3.3.1 beschrieben, wird 5'-markierter Primer an dem Templat **RT** enzymatisch verlängert. Anschließend werden 2 pmol der dsDNA bzw. des fDNA/DNA-Duplexes in Reaktionspuffer (hergestellt aus den vom Enzymlieferanten bereitgestellten 5x- oder 10x-

Puffern; wenn nötig wird BSA hinzugegeben) gelöst (Endvolumen: 20  $\mu\text{L}$ ) und mit 20 U einer der Restriktionsendonukleasen BamHI, XhoI, HindIII oder EcoRI (alle von New England Biolabs, Frankfurt) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 3 Volumina Stopplösung (80%ige Formamidlösung, 20 mM EDTA enthaltend) beendet und durch zehnmütiges Erhitzen auf 99 °C denaturiert.

Aliquots von 5  $\mu\text{L}$  werden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

## 6.4 Quantenchemische Methoden

Die Konformationsanalysen wurden auf einer Silicon Graphics *Octane* Workstation (400 MHz R12k CPU, 1 GB RAM) unter SGI Irix 6.5 mit dem Programmpaket *Sybyl 6.8* (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) durchgeführt. Die aus der PSEUROT-Analyse (vergleiche Tabelle 3) gewonnenen Torsionswinkel wurden als Constraints eingefügt, um den Zucker zum einen in der spektroskopisch bestimmten Struktur zu fixieren, gleichzeitig aber auch eine gewisse Flexibilität zu ermöglichen, die der Genauigkeit dieser Werte Rechnung trägt. Die beiden interessierenden Torsionswinkel wurden in 10°-Schritten von 0° bis 350° gedreht und die erhaltenen 1296 Strukturen durch Kraftfeldrechnungen minimiert. Hierzu wurde das Tripos-Kraftfeld benutzt (Gradient: 0.05 kcal/mol\*Å, max. 2000 Iterationen) und die Ladungen mit der GASTEIGER-HÜCKEL-Methode berechnet, für die Triphosphatgruppe wurden dabei drei, für die Carboxyfunktion eine negative Formalladung eingefügt. Die durchschnittliche benötigte Rechenzeit betrug ca. 8 Stunden, anschließend wurden die Ergebnisse in das ASCII-Format exportiert, das Energieminimum auf 0 kcal/mol skaliert und die Werte mit Origin<sup>®</sup> 6.1G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) als Flächendiagramm dargestellt.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Darwin, C. *Die Entstehung der Arten*; Bertelsmann GmbH: Gütersloh.
- [2] Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., McPherson, A. *Biochem.* **1997**, *36*, 1581-1597.
- [3] Voet, D., Voet, J. G. *Biochemie*; VCH: Weinheim, **1992**.
- [4] Walsh, C. T., Fisher, S. L., Park, I. S., Prahalad, M., Wu, Z. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21-28.
- [5] Romesberg, F. E., Spiller, B., Schultz, P. G., Stevens, R. C. *Science* **1998**, *279*, 1929-1933.
- [6] Stevenson, J. D., Thomas, N. R. *Natural Product Reports* **2000**, *17*, 535-577.
- [7] Hilvert, D. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 751-793.
- [8] Scott, J., Smith, G. P. *Science* **1990**, *249*, 386-390.
- [9] Johnson, K., Ge, L. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **1999**, *243*, 87-105.
- [10] Katz, B. A. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 401-426.
- [11] Xia, G., Chen, L., Fa, M., Schultz, P. G., Romesberg, F. E. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2002**, *99*, 6597-6602.
- [12] Hanes, J., Plückthun, A. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **1999**, *243*, 107-122.
- [13] Hanes, J., Jermutus, L., Plückthun, A. *Methods in Enzymology* **2000**, *328*, 404-430.
- [14] Keefe, A. D., Szostak, J. W. *Nature* **2001**, *410*, 715-718.
- [15] Liu, R. H., Barrick, J. E., Szostak, J. W., Roberts, R. W. *Methods in Enzymology* **2000**, *318*, 268-293.
- [16] Sooter, L. J., Riedel, T., Davidson, E. A., Levy, M., Cox, J. C., Ellington, A. D. *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1327-34.
- [17] Cech, T. R. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 745-755.
- [18] Altman, S. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 735-744.
- [19] Scott, W. G., Murray, J. B., Arnold, J. R. P., Stoddard, B. L., Klug, A. *Science* **1996**, *274*, 2065-2069.
- [20] Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., Steitz, T. A. *Science* **2000**, *289*, 920-930.
- [21] Lilley, D. M. J. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 31-35.
- [22] Jenne, A., Hartig, J. S., Piganeau, N., Tauer, A., Samarsky, D. A., Green, M. R., Davies, J., Famulok, M. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 56-61.
- [23] Narlikar, G. J., Herschlag, D. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 19-59.
- [24] Ellington, A. D., Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
- [25] Tuerk, C., Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505-510.

- [26] Mayer, G. *Funktionelle Charakterisierung von Cytohesin-1 in T-Lymphozyten durch RNA Intramere*, Dissertation, Universität Bonn, **2000**.
- [27] Famulok, M., Jenne, A. in: *Topics in Current Chemistry* Springer-Verlag: Berlin, **1999**; Vol. 202, pp 101-131.
- [28] Jäschke, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 321-326.
- [29] Famulok, M., Mayer, G., Blind, M. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 591-599.
- [30] Famulok, M., Mayer, G. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **1999**, *243*, 123-136.
- [31] Famulok, M., Blind, M., Mayer, G. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 931-939.
- [32] Kubik, M. F., Stephens, A. W., Schneider, D., Marlar, R. A., Tasset, D. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2619-26.
- [33] Burgstaller, P., Famulok, M. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1994**, *33*, 1084-1087.
- [34] Hicke, B. J., Marion, C., Chang, Y.-F., Gould, T., Lynott, C. K., Parma, D., Schmidt, P. G., Warren, S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48644-48654.
- [35] Huizenga, D. E., Szostak, J. W. *Biochem.* **1995**, *34*, 656-665.
- [36] Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Bohm, T., Knorr, T., Jackson, C. L., Kolanus, W., Famulok, M. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2001**, *98*, 4961-4965.
- [37] Sengle, G., Eisenführ, A., Arora, P. S., Nowick, J. S., Famulok, M. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 459-473.
- [38] Seelig, B., Jäschke, A. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167-176.
- [39] Santoro, S. W., Joyce, G. F. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1997**, *94*, 4262-4266.
- [40] Santoro, S. W., Joyce, G. F., Sakthivel, K., Gramatikova, S., Barbas III, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2433-2439.
- [41] Kropinski, A. M. B., Bose, R. J., Warren, R. A. J. *Biochem.* **1973**, *12*, 151-157.
- [42] Miller, P. B., Wakarchuk, W. W., Warren, R. A. J. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 2559-2568.
- [43] Dewey, T. M., Mundt, A. A., Crouch, G. J., Zyzniewski, M. C., Eaton, B. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8474-8475.
- [44] Tarasow, T. M., Tarasow, S. L., Eaton, B. E. *Nature* **1997**, *389*, 54-7.
- [45] Wiegand, T. W., Janssen, R. C., Eaton, B. E. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 675-83.
- [46] Latham, J. A., Johnson, R., Toole, J. J. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2817-2822.
- [47] Sakthivel, K., Barbas III, C. F. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2998-3001.
- [48] Battersby, T. R., Ang, D. N., Burgstaller, P., Jurczyk, S. C., Bowser, M. T., Buchanan, D. D., Kennedy, R. T., Benner, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9781-9789.
- [49] Perrin, D. M., Garestier, T., Helene, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1556-1563.
- [50] Brakmann, S., Löbermann, S. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1473-1476.



- [51] Augustin, M. A., Ankenbauer, W., Angerer, B. *J. Biotechnol.* **2001**, *86*, 289-301.
- [52] Summerer, D., Marx, A. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, *40*, 3693.
- [53] Summerer, D., Marx, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 910-911.
- [54] Sági, J., Szemzo, A., Ebinger, K., Szabolcs, A., Sági, G., Ruff, E., Ötvös, L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2191-2194.
- [55] Lee, S. E., Sidorov, A., Gourlain, T., Mignet, N., Thorpe, S. J., Brazier, J. A., Dickman, M. J., Hornby, D. P., Grasby, J. A., Williams, D. M. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1565-1573.
- [56] Rao, S. N., Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3048-3053.
- [57] Tierney, M. T., Grinstaff, M. W. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3413-3416.
- [58] Perrin, D. M., Garestier, T., Helene, C. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 377-391.
- [59] Nishimura, H., Katagiri, K., Sato, K., Mayama, M., Shimaoka, N. *J. Antibiot., Ser. A* **1956**, *9*, 60.
- [60] Mizusawa, S., Nishimura, S., Seela, F. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 1319-1324.
- [61] Seela, F., Zulauf, M. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1781-1790.
- [62] Seela, F., Zulauf, M. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1878-1898.
- [63] Ramzaeva, N., Mittelbach, C., Seela, F. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1439-1440.
- [64] Kazlauskas, R., Murphy, P. T., Wells, R. J., Baird-Lambert, J. A., Jamieson, D. D. *Aust. J. Chem.* **1983**, *36*, 165-170.
- [65] Gourlain, T., Sidorov, A., Mignet, N., Thorpe, S. J., Lee, S. E., Grasby, J. A., Williams, D. M. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1898-1905.
- [66] Sonogashira, K., Tohda, Y., Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *50*, 4467-4470.
- [67] Hobbs Jr., F. W. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3420-2322.
- [68] Koyama, S., Kumazawa, Z., Kashimura, N. *Nucl. Acids Res., Symp. Ser.* **1982**, *11*, 41-44.
- [69] Crisp, G. T., Gore, J. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1523-1544.
- [70] Lang, P., Magnin, G., Mathis, G., Burger, A., Biellmann, J. F. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7825-7832.
- [71] Heck, R. F. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 146-151.
- [72] Burgess, K., Cook, D. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047-2059.
- [73] Kovács, T., Ötvös, L. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525-4528.
- [74] Knoblauch, B. H. A., Muller, C. E., Jarlebark, L., Lawoko, G., Kottke, T., Wikstrom, M. A., Heilbronn, E. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 809-824.
- [75] Ludwig, J., Eckstein, F. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635.

- [76] Ikehara, M., Kaneko, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18*, 2441-2446.
- [77] Ikehara, M., Kaneko, M. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4251-4259.
- [78] Guy, A., Duplaa, A.-M., Harel, P., Téoule, R. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1566-1571.
- [79] Ogilvie, K. K. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3799-3807.
- [80] Jäger, S. *Synthese von basenmodifizierten 2'-Deoxycytidinen zur Gewinnung von DNA-Aptameren und Deoxyribozymen mit erweiterter Funktionalität*, Diplomarbeit, Universität Bonn, **2000**.
- [81] Seela, F., Zulauf, M. *Synthesis* **1996**, 726-730.
- [82] Ramzaeva, N., Seela, F. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1083-1090.
- [83] Hoffer, M. *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2777-2781.
- [84] Ryll, T., Wagner, R. *J. Chromat.* **1991**, *570*, 77-88.
- [85] Mullis, K. P. *Spektrum d. Wiss.* **6/1990**, 60-67.
- [86] <http://bioinfo.math.rpi.edu/~zukerm/>
- [87] McDougall, M. G., Hosta, L. P., Kumar, S., Fuller, C. W. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1009-1011.
- [88] <http://www.uni-bonn.de/mibi/phamiss.htm>
- [89] Ötvös, L., Sági, J., Sági, G., Szemzo, A. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1929-1933.
- [90] Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer-Verlag: New York, **1984**.
- [91] Kilpatrick, J. E., Pitzer, K. S., Spitzer, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 2483-2488.
- [92] Altona, C., Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205-8212.
- [93] Seela, F., Debelak, H., Reuter, H., Kastner, G., Mikhailopulo, I. A. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1295-1308.
- [94] van Wijk, J., Haasnot, C. A. G., de Leeuw, F. A. A. M., Huckriede, B. D., Westra Hoekzema, A., Altona, C. *PSEUROT 6.3* Leiden Institute of Chemistry, Leiden University, Niederlande **1999**.
- [95] Diez, E., Esteban, A. L., Guilleme, J., Bermejo, F. L. *J. Mol. Struct.* **1981**, *70*, 61.
- [96] Diez, E., Esteban, A. L., Bermejo, F. L., Altona, C., de Leeuw, F. A. A. M. *J. Mol. Struct.* **1984**, *125*, 49.
- [97] de Leeuw, F. A. A. M., van Kampen, P. N., Altona, C., Diez, E., Esteban, A. L. *J. Mol. Struct.* **1984**, *125*, 64.
- [98] Saran, A., Pullman, B., Perahia, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *287*, 211-231.
- [99] Saran, A., Pullman, B., Perahia, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *299*, 497-499.
- [100] Saran, A., Pullman, B., Perahia, D. *Theor. Chim. Acta* **1973**, *30*, 31-44.
- [101] Li, Y., Mitaxov, V., Waksman, G. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1999**, *96*, 9491-9496.

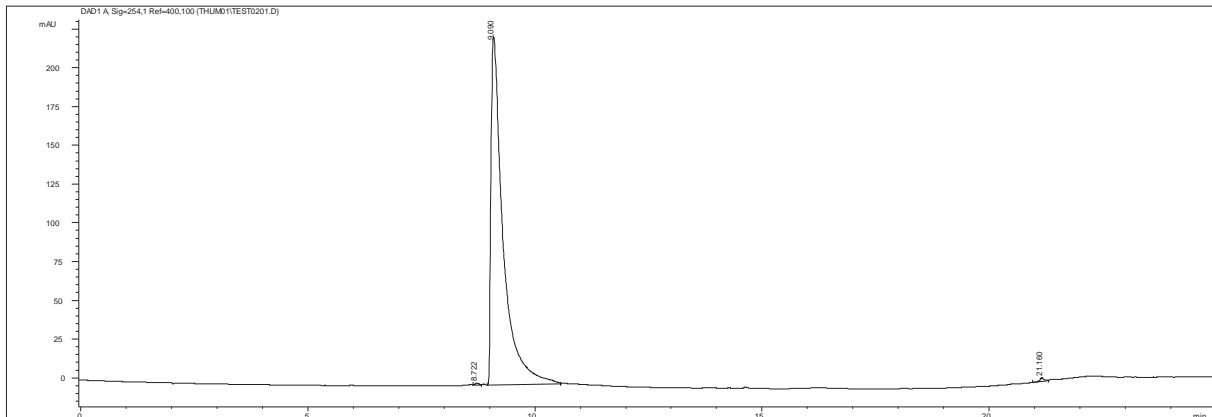
- [102] Dasse, O., Mahadevan, A., Han, L. N., Martin, B. R., Di Marzo, V., Razdan, R. K. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9195-9202.
- [103] Jacobi, P. A., Brielmann, H. L., Hauck, S. I. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5013-5023.
- [104] Trybulski, E. J., Zhang, J., Kramss, R. H., Mangano, R. M. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3533-3541.
- [105] Nair, V., Chamberlain, S. D. *Synthesis* **1984**, 401-403.
- [106] Sági, G., Ötvös, L., Ikeda, S., Andrei, G., Snoeck, R., de Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1307-1311.
- [107] Davoll, J. *J. Chem. Soc.* **1960**, 131-138.
- [108] Pudlo, J. S., Nassiri, M. R., Kern, E. R., Wotring, L. L., Drach, J. C., Townsend, L. B. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1984-1992.
- [109] Seela, F., Lüpke, U. *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 1462-1469.
- [110] Seela, F., Kehne, A., Winkeler, H.-D. *Liebigs. Ann. Chem.* **1983**, 137-146.
- [111] Ramasamy, K., Imamura, N., Robins, R. K., Revankar, G. R. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5107-5110.
- [112] Seela, F., Driller, H. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, *8*, 1-21.

## 8 Anhang

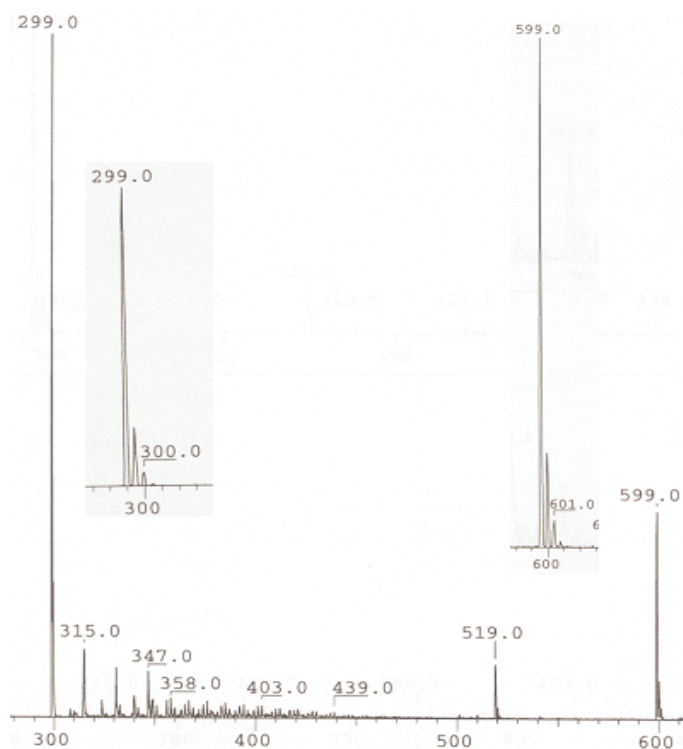
### 8.1 Ausgewählte Spektren

Anhand der analytischen Daten der Verbindungen **39** und **47** werden im Folgenden alle charakteristischen Spektren der Nucleotide vorgestellt.

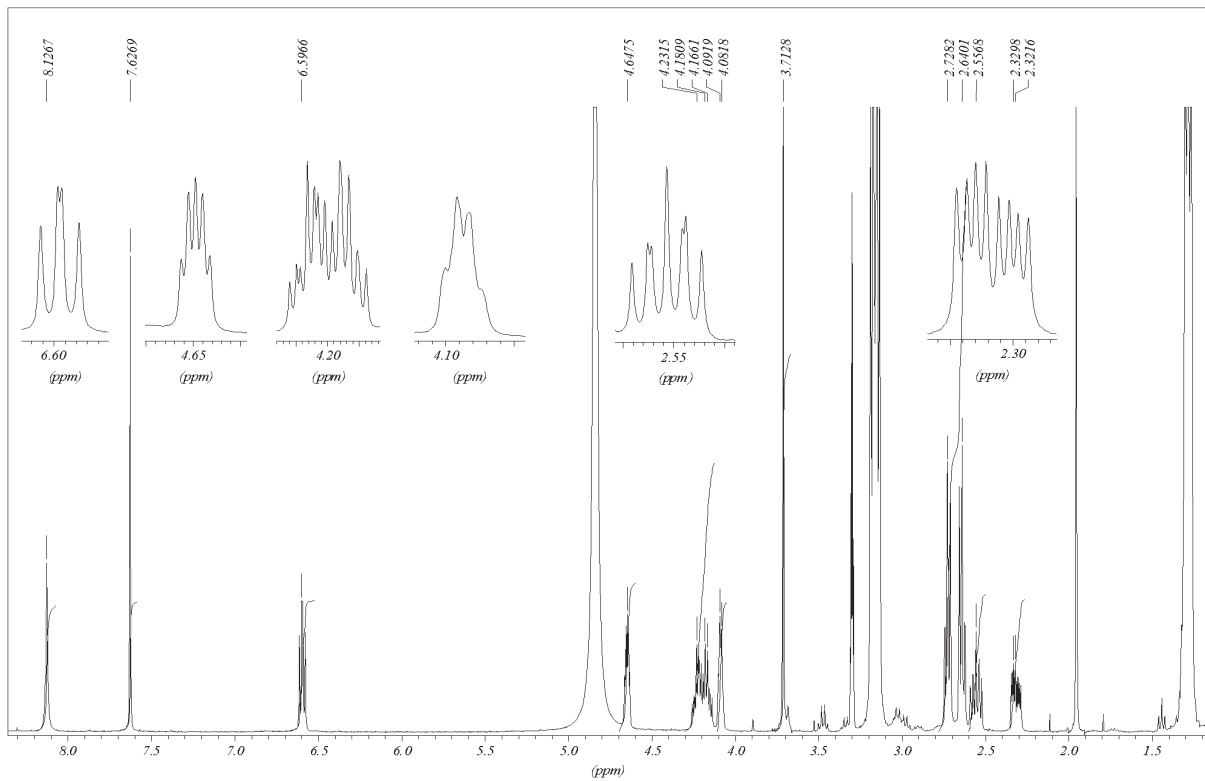
#### 8.1.1 Charakterisierung von Verbindung 39



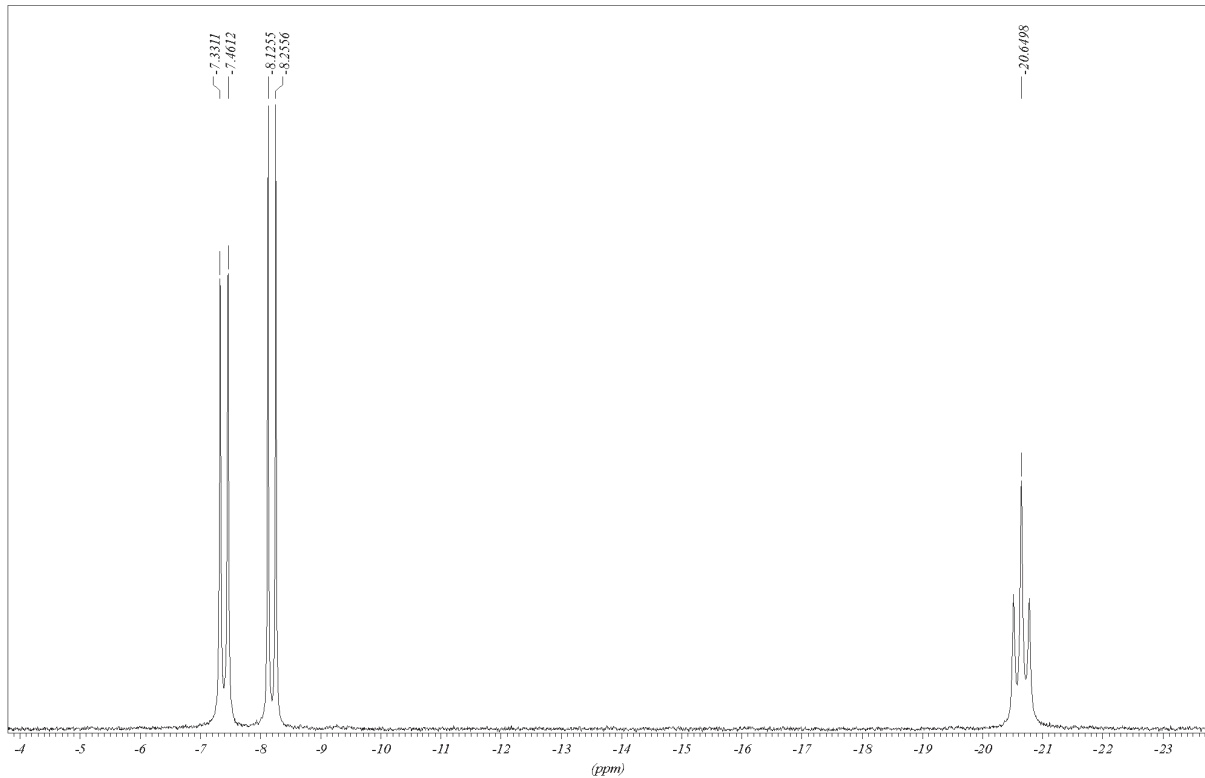
**HPLC-Chromatogramm**, UV-Detektion bei 254 nm, chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 6.2



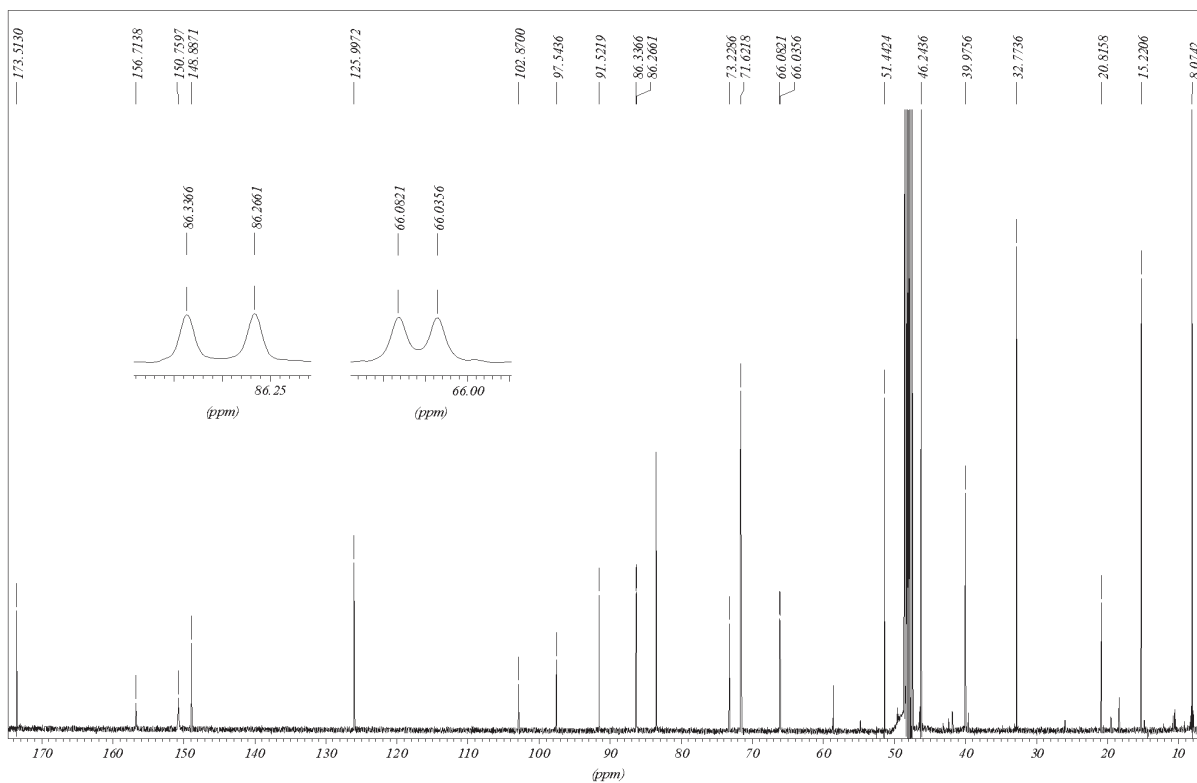
**Massenspektrum** im negativ-ESI Modus. Erkennbar sind die  $[M-H]^-$ - und  $[M-2H]^{2-}$ -Molpeaks, die sich durch ihr Isotopenmuster als einfach bzw. zweifach geladene Spezies identifizieren lassen, sowie das Signal für  $[M-PO_3H_2]^-$ , das durch die Abspaltung der terminalen Phosphatgruppe im Massenspektrometer auftritt.



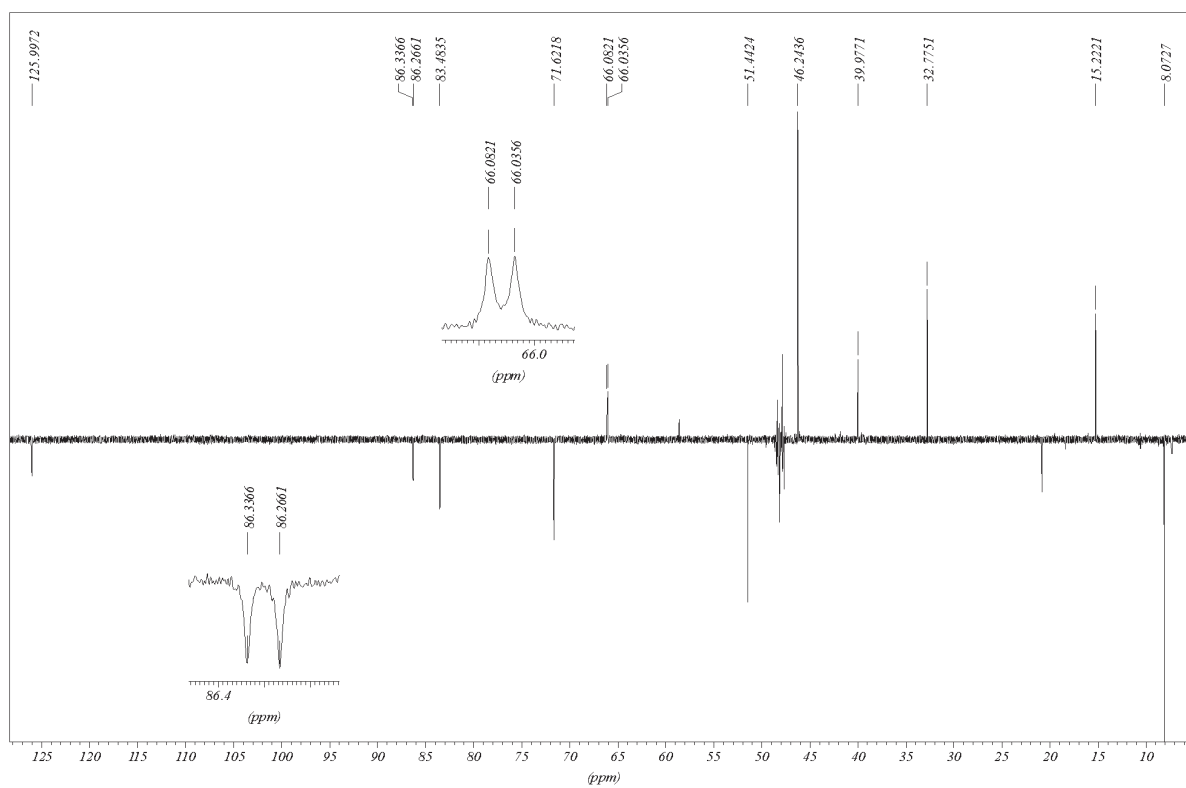
**$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum.** Dargestellt sind die Vergrößerungen der einzelnen Multipletts. Zur genauen Analyse kann die Signalschärfe durch Gaußmultiplikation des FIDs gesteigert, d. h. die Linienbreite gesenkt werden.



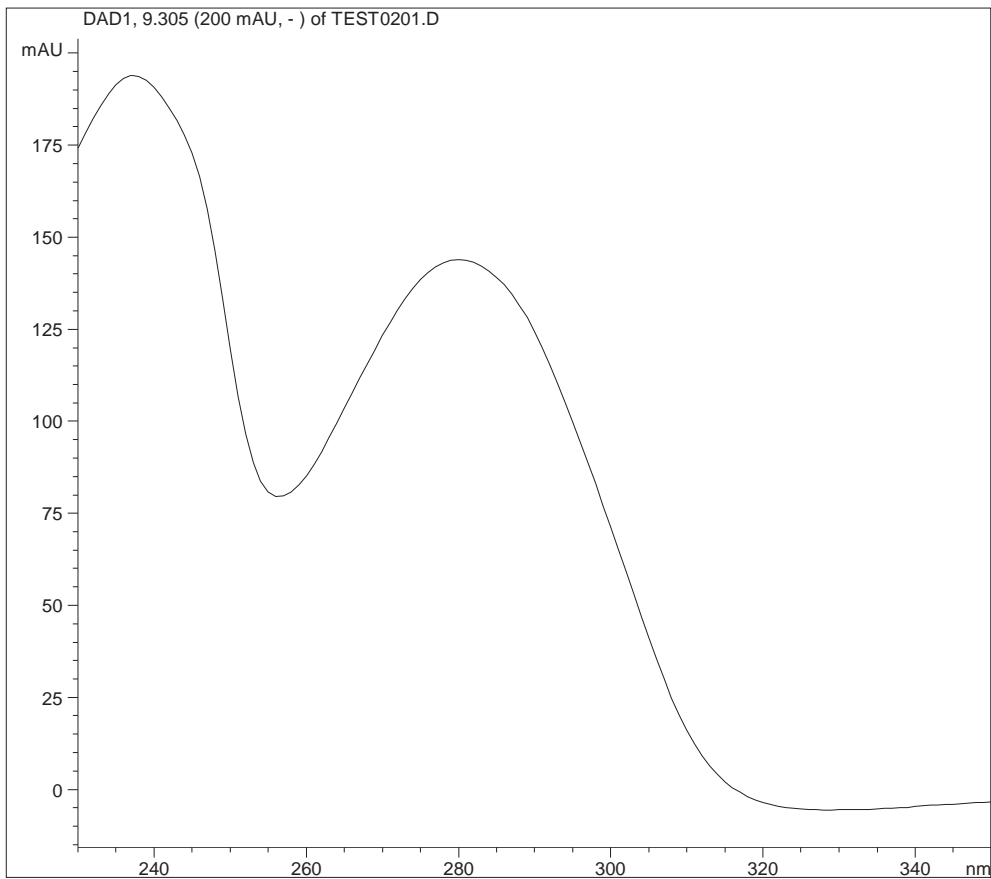
**$^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum** ( $^1\text{H}$ -entkoppelt). Erkennbar sind die charakteristischen Dubletts für  $\text{P}_\alpha$  und  $\text{P}_\gamma$ , sowie das Pseudotriplett für  $\text{P}_\beta$ .



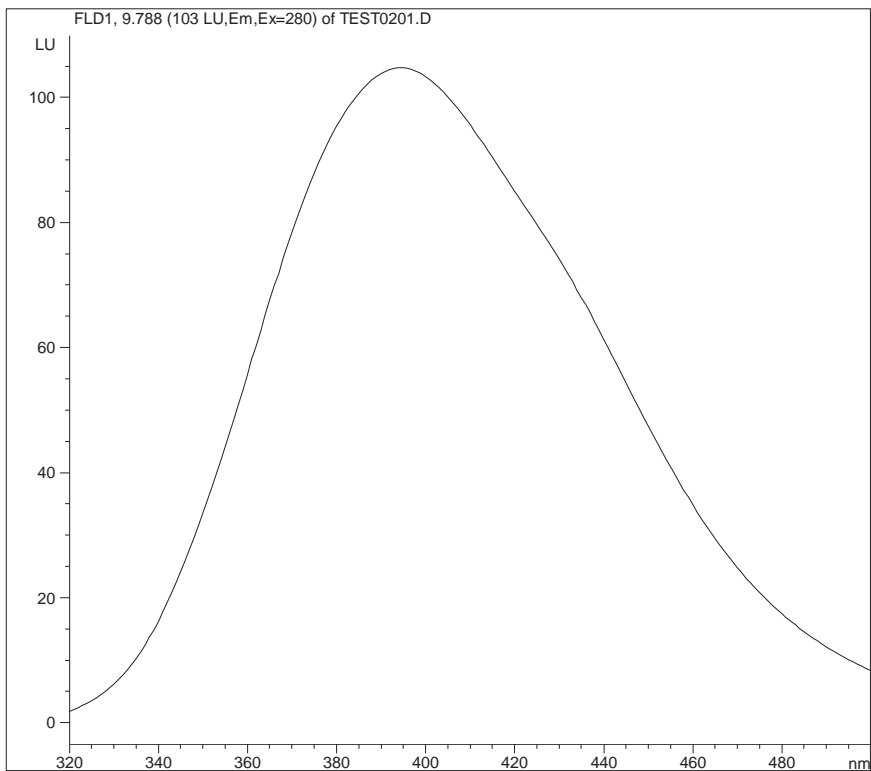
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum. Erkennbar sind die charakteristischen Dubletts für C<sub>4</sub>' und C<sub>5</sub>'.



DEPT135-Spektrum. Die beiden Dubletts lassen sich so bequem C<sub>4</sub>' und C<sub>5</sub>' zuordnen.



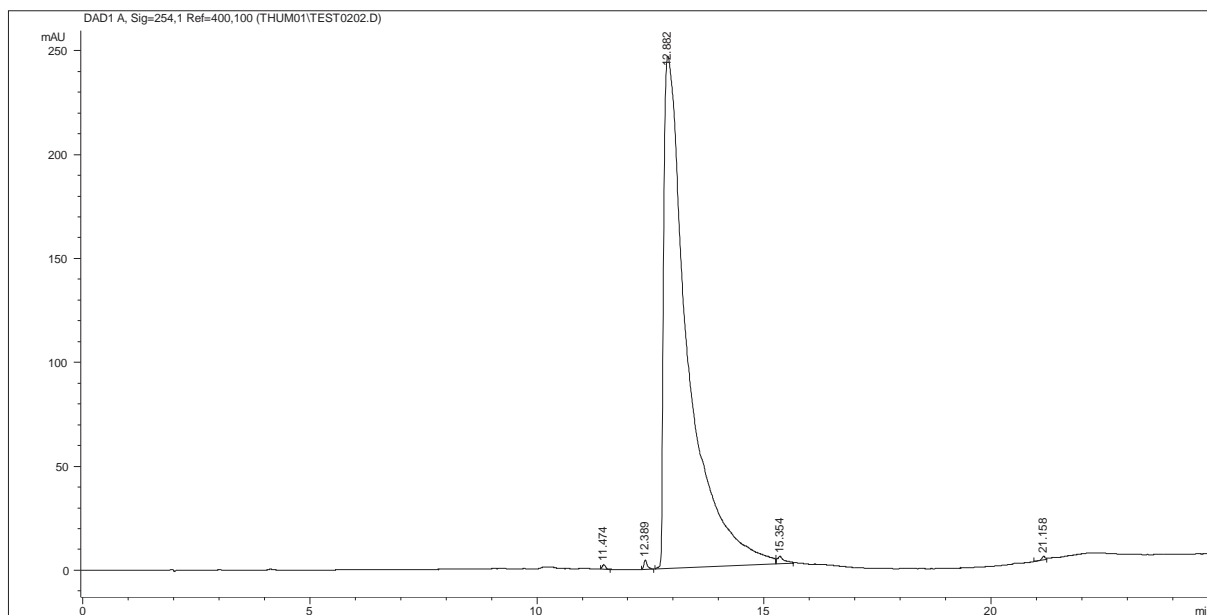
**UV-Spektrum**, aufgenommen ist der Bereich von 230 bis 350 nm in 100 mM TEAA-Puffer.



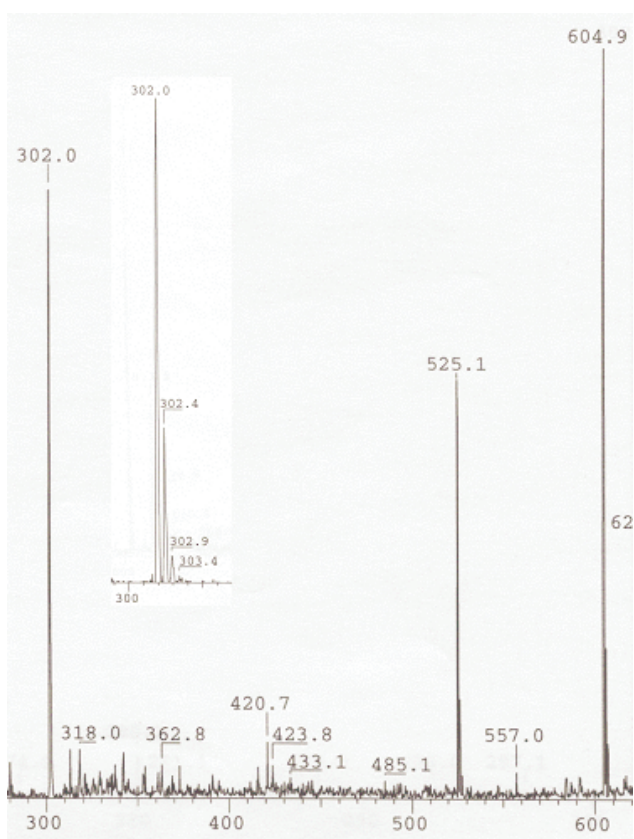
**Fluoreszenz(FL)-Spektrum**. Aufgenommen ist das Emissionsspektrum nach einer Anregung bei  $\lambda = 280$  nm.



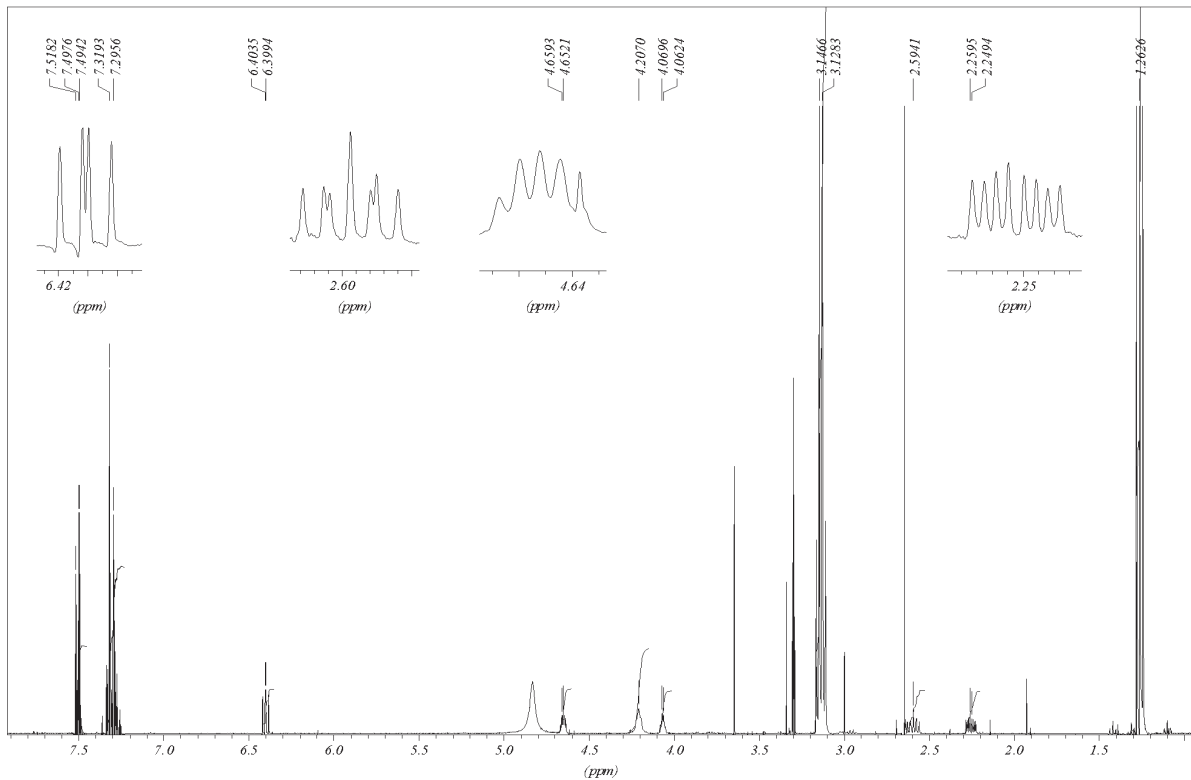
### 8.1.2 Charakterisierung von Verbindung 47



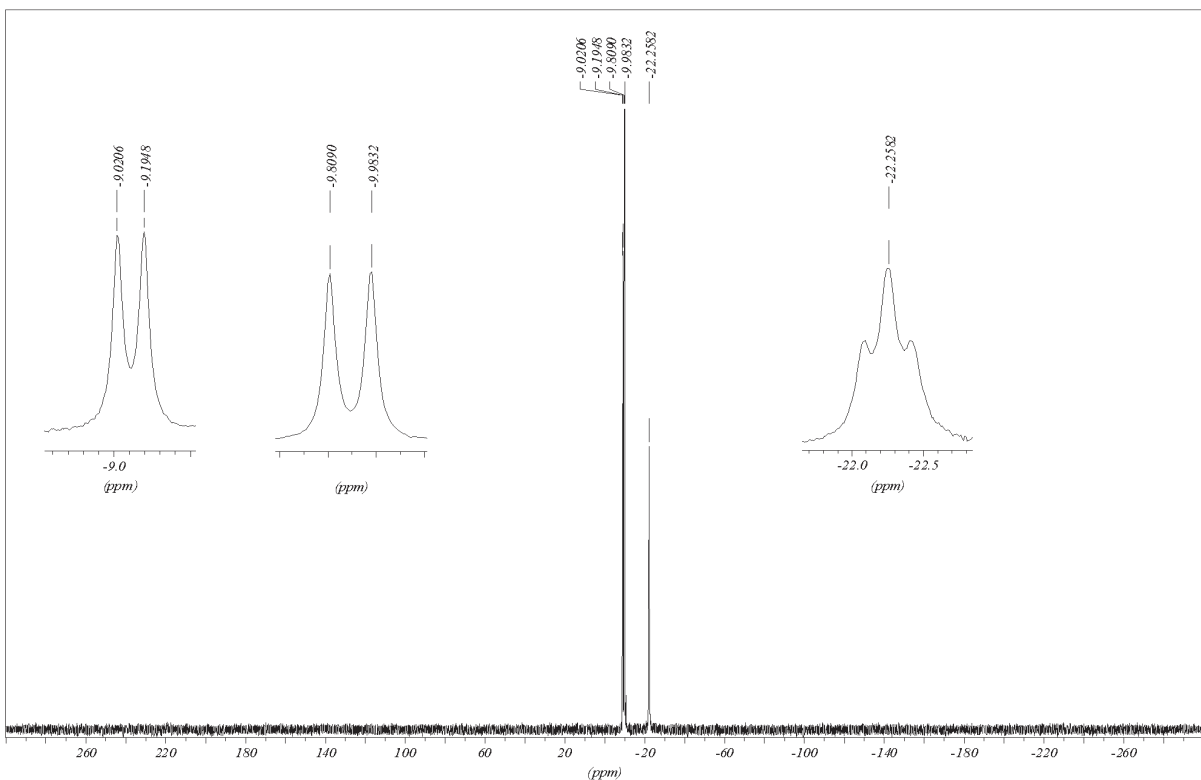
HPLC-Chromatogramm, UV-Detektion bei 254 nm, chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 6.2



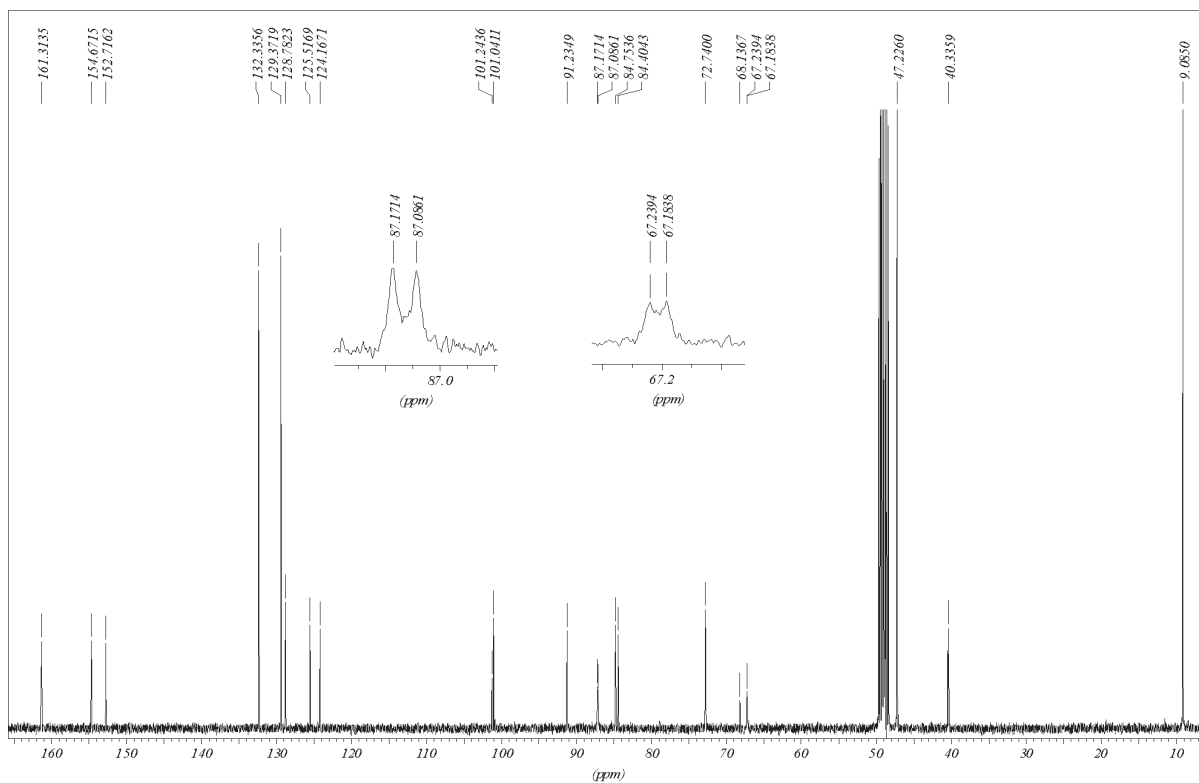
Massenspektrum im negativ-ESI Modus. Erkennbar sind die  $[M-H]^-$ - und  $[M-2H]^{2-}$ -Molpeaks, die sich durch ihr Isotopenmuster als einfach bzw. zweifach geladene Spezies identifizieren lassen, sowie das Signal für  $[M-PO_3H_2]^-$ , das durch die Abspaltung der terminalen Phosphatgruppe im Massenspektrometer auftritt.



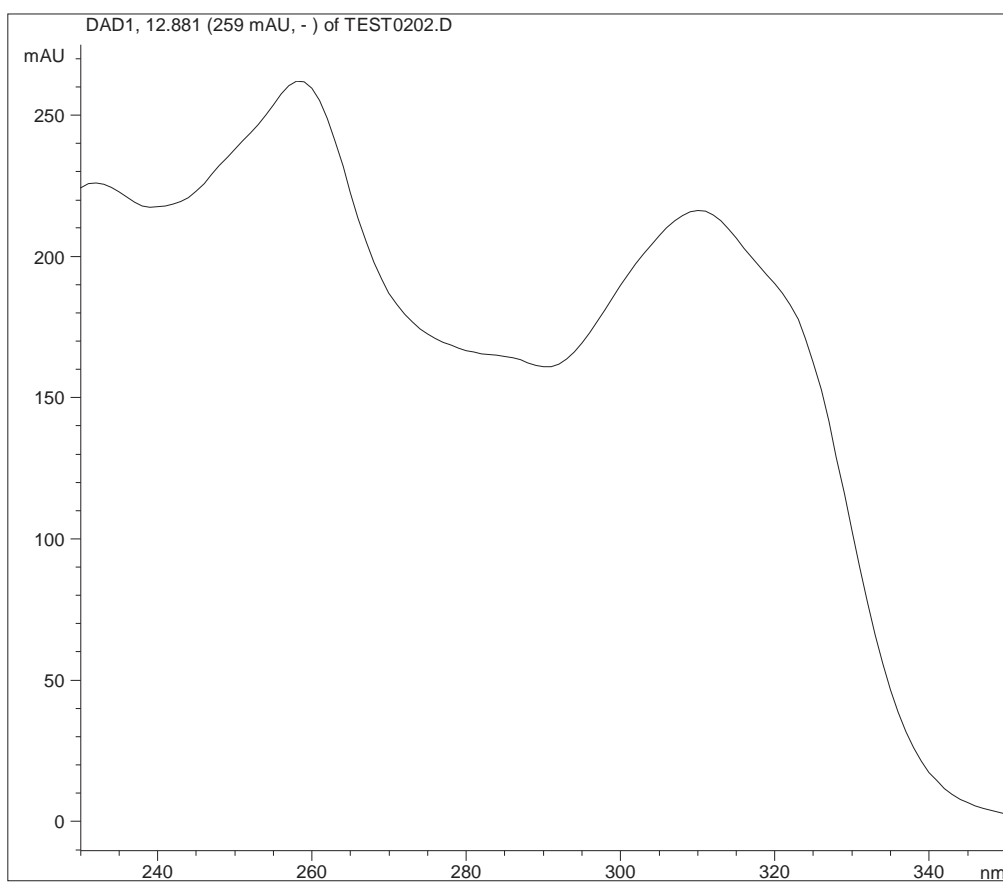
**$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum.** Dargestellt sind die Vergrößerungen der einzelnen Multipletts. Zur genauen Analyse kann die Signalschärfe durch Gaußmultiplikation des FIDs gesteigert, d. h. die Linienbreite gesenkt werden.



**$^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum ( $^1\text{H}$ -entkoppelt).** Übersichtsspektrum von 300 bis  $-300$  ppm. Die charakteristischen Dubletts für  $\text{P}_\alpha$  und  $\text{P}_\gamma$ , sowie das Pseudotriplett für  $\text{P}_\beta$  sind in den Vergrößerungen dargestellt.



**$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum.** Erkennbar sind die charakteristischen Dubletts für  $\text{C}_{4'}$  und  $\text{C}_{5'}$ .



**UV-Spektrum,** aufgenommen ist der Bereich von 230 bis 350 nm in 100 mM TEAA-Puffer.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

bp:	Basenpaare
BSA:	Rinderserumalbumin
dATP:	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DC:	Dünnschichtchromatographie
dCTP:	2'-Desoxycytidintriphosphat
ddATP:	2',3'-Dideoxyadenosintriphosphat
dGTP:	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DMA:	<i>N,N</i> -Dimethylanilin
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA:	doppelsträngige DNA
dUTP:	2'-Desoxyuridintriphosphat
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EI:	<i>Electron Impact</i>
ESI:	Elektrosprayionisation
FAB:	<i>Fast Atom Bombardement</i>
fDNA:	funktionalisierte DNA
FL:	Fluoreszenz(spektrum)
HEPES:	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HV:	Hochvakuum
IBCF:	Chlorameisensäure <sup>iso</sup> butylester
Kp.:	Kochpunkt (Siedepunkt)

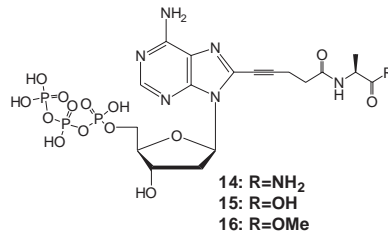
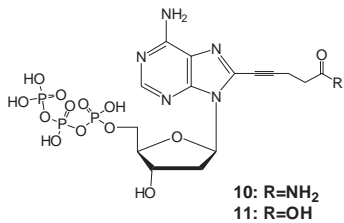
---

MALDI:	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MPLC:	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie
MS:	Massenspektrometrie
NMR:	Kernspinresonanz
NT:	Nukleotide
PCR:	Polymerasekettenreaktion
RNA:	Ribonukleinsäure
RP:	Umkehrphase ( <i>reversed-phase</i> )
rpm:	Umdrehungen pro Minute
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion
SELEX:	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SEM:	Trimethylsilylethoxymethyl
ssDNA:	einzelsträngige DNA
TBDMS:	<i>tert</i> Butyldimethylsilyl
TBME:	<i>tert</i> Butylmethylether
TEAA:	Triethylammoniumacetat
TEAB:	Triethylammoniumhydrogencarbonat
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
THF:	Tetrahydrofuran
TTP:	Thymidintriphosphat
UV:	Ultraviolett(spektrum)

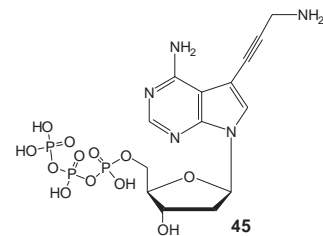
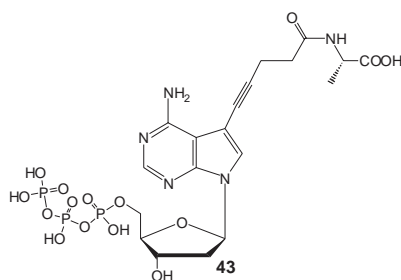
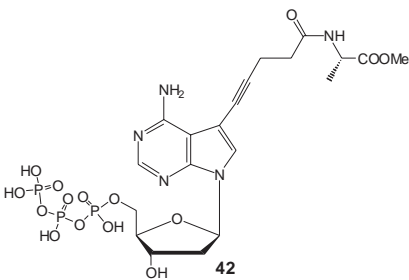
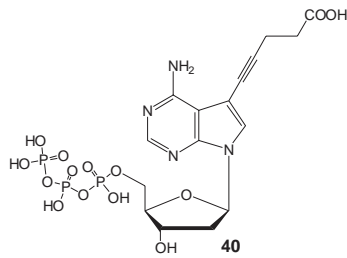
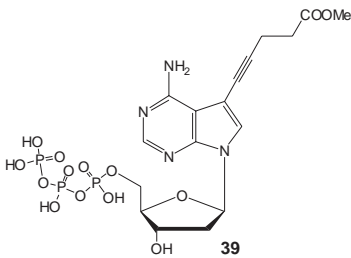
## 8.3 Übersicht über die verwendeten Nukleosidtriphosphate

### 8.3.1 Purinderivate

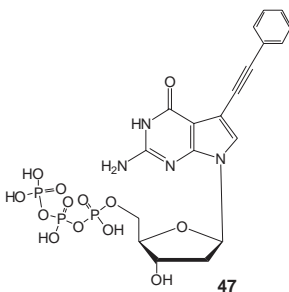
#### 8-modifizierte 2'-Desoxyadenosine



#### 7-modifizierte N-7-Deaza-2'-desoxyadenosine

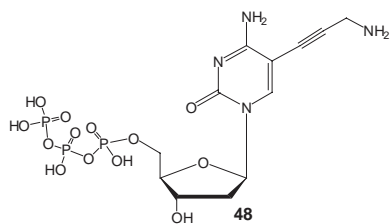


#### 7-modifizierte N-7-Deaza-2'-desoxyguanosine

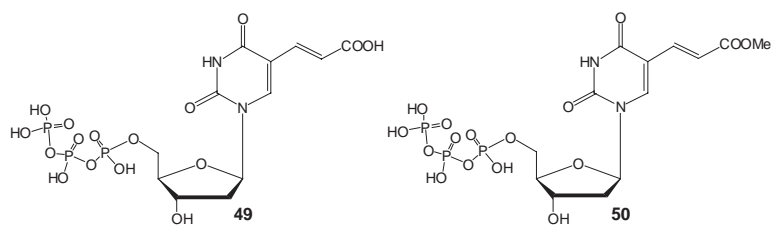


### 8.3.2 Pyrimidinderivate

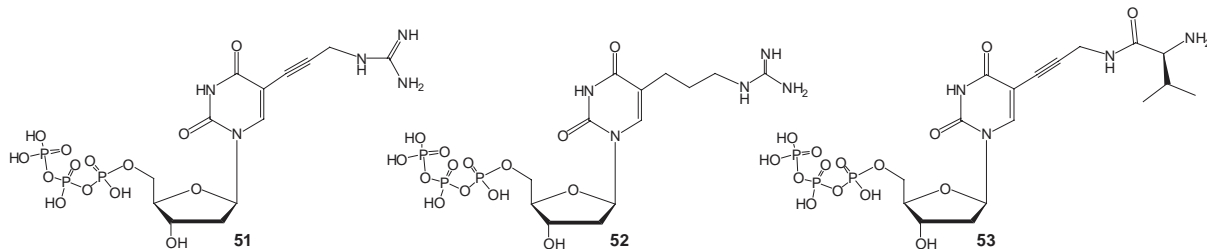
#### 5-substituierte 2'-Desoxycytidine



#### 5-alkensubstituierte 2'-Desoxyuridine



#### 5-alkinsubstituierte 2'-Desoxyuridine



## 8.4 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Kristallstruktur eines Antikörpers<sup>[2]</sup>, die variablen Regionen sind rot, die konstanten Regionen gelb dargestellt. Der Aufbau als Heterodimer, sowie die charakteristische Y-förmige Struktur sind gut zu erkennen.....1
- Abbildung 2:** Kristallstruktur<sup>[19]</sup> des Hammerhead-Ribozyms, einem der ersten und bekanntesten natürlich vorkommenden Ribozyme, welches die sequenzspezifische Spaltung von RNA katalysiert. In dieser Struktur ist katalytisch aktive Region rot, und der zu spaltende Strang blau eingefärbt. ....6
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung einer Aptamerselektion auf RNA-Basis, hier gegen ein Protein, entnommen aus Lit.<sup>[26]</sup> Die verwendete Nukleinsäurebibliothek enthielt neben den konstanten 3'- und 5'-Primer-Regionen die Sequenz für den T7-Promoter und einen 40 NT umfassenden randomisierten Bereich (N40).....8
- Abbildung 4:** Darstellung der von LATHAM et al. (links) und SANTORO et al. (rechts) verwendeten 5'-modifizierten 2'-Desoxyuridintriphosphate.....10
- Abbildung 5:** Schematisches Beispiel der zu generierenden fDNA. In diesem DNA-Strang sind vier mögliche Verknüpfungsmöglichkeiten für die einzuführenden Funktionalitäten dargestellt (von oben links nach unten rechts): Ein 8-alkinmodifiziertes 2'-Desoxyadenosin, ein 5-alkinmodifiziertes 2'-Desoxycytidin, ein 7-alkinmodifiziertes *N*-7-Deaza-2'-desoxyguanosin sowie ein 5-alkenmodifiziertes 2'-Desoxyuridin. ....13
- Abbildung 6:** Übersicht über die Struktur und Nummerierung der Triphosphate vom Pyrimidin- und Purintyp (oben), sowie über die WATSON-CRICK Basenpaarung in dsDNA. ....15
- Abbildung 7:** Der Katalysezyklus der SONOGASHIRA-Reaktion am Beispiel der Reaktion von *N*-7-Deaza-2'-desoxyadenosin mit einem terminalen Alkin.....18
- Abbildung 8:** Schematische Darstellung der beiden modernsten Methoden zur Synthese von Nucleosidtriphosphaten. Die Methode nach KOVÁCS und ÖTVÖS liefert eine regioselektive Phosphorylierung, während die Methode nach LUDWIG und ECKSTEIN eine 3'-OH-Schutzgruppe voraussetzt.....19
- Abbildung 9:** Synthese des 3'-Acetyl geschützten 8-Bromo-2'-desoxyadenosins (**5**) aus 2'-Desoxyadenosin (**1**). ....20



<b>Abbildung 10:</b> Übersicht über die für die SONOGASHIRA-Kupplung mit 8-Bromo-2'-desoxyadenosin ( <b>5</b> ) verwendeten geschützten terminalen Alkine.....	21
<b>Abbildung 11:</b> Synthese der 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosintriphosphate durch SONOGASHIRA-Kupplung terminaler Alkine an 8-Bromo-2'-desoxyadenosin ( <b>5</b> ) und nachfolgender Triphosphorylierung nach LUDWIG und ECKSTEIN sowie Entschützung unter verschiedenen Bedingungen.....	22
<b>Abbildung 12:</b> Totalsynthese des 7-Iodo- <i>N</i> -7-deaza-2'-desoxyadenosins ( <b>25</b> ). .....	23
<b>Abbildung 13:</b> Totalsynthese des 7-Iodo- <i>N</i> -7-deaza-2'-desoxyguanosins ( <b>35</b> ). .....	25
<b>Abbildung 14:</b> Übersicht über die für die SONOGASHIRA-Kupplung mit 7-Iodo- <i>N</i> -7-Deaza-2'-desoxyadenosin ( <b>25</b> ) verwendeten geschützten terminalen Alkine.....	25
<b>Abbildung 15:</b> Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten 7-modifizierten <i>N</i> -7-Deaza-2'-desoxyadenosintriphosphate durch SONOGASHIRA-Kupplung terminaler Alkine an 7-Iodo- <i>N</i> -7-deaza-2'-desoxyadenosin ( <b>25</b> ), nachfolgender Triphosphorylierung nach KOVÁCS und ÖTVÖS sowie Entschützung unter verschiedenen Bedingungen.....	26
<b>Abbildung 16:</b> Darstellung des analog zu den 7-modifizierten <i>N</i> -7-Deaza-2'-desoxyadenosintriphosphaten hergestellten 7-Phenylethynyl- <i>N</i> -7-deaza-2'-desoxyguanosintriphosphat ( <b>47</b> ).....	27
<b>Abbildung 17:</b> Übersicht über die von Stefan JÄGER bereitgestellten 5-modifizierten 2'-Desoxycytidin- und 2'-Desoxyuridintriphosphate. ....	27
<b>Abbildung 18:</b> Schematische Darstellung der templatgesteuerten enzymatischen Inkorporation von dNTPs bei der DNA-Replikation.....	30
<b>Abbildung 19:</b> PCR unter Verwendung von 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosinen: In Bahn 1 und 12 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR ( <i>Tth</i> DNA-Polymerase, 25 Zyklen); Bahn 2: Positivkontrolle 200 µM dATP, dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3: wie Bahn 2 + 1 mM Et <sub>3</sub> N; Bahn 4: Negativkontrolle 1, wie Bahn 2 aber ohne Templat; Bahn 5: Negativkontrolle 2: 200 µM dCTP, dGTP und TTP; Bahn 6: wie Bahn 5 + 400 µM <b>16</b> ; Bahn 7: wie Bahn 2 + 400 µM <b>16</b> ; Bahn 8: wie Bahn 5 + 400 µM <b>11</b> ; Bahn 9: wie Bahn 2 + 400 µM <b>11</b> ; Bahn 10: wie Bahn 5 + 400 µM <b>12</b> ; Bahn 11: wie Bahn 2 + 400 µM <b>12</b> . .....	32

**Abbildung 20:** PCR unter Verwendung des 7-modifizierten Adenosinderivats **40** oder der Uridinanaloga **49** bzw. **50**: In Bahn 1 und 12 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR (*Tth* DNA-Polymerase, 1.5 mM  $Mg^{2+}$ , 15 Zyklen); Bahn 2: Positivkontrolle 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3: Negativkontrolle 1: wie Bahn 2 aber ohne Templat; Bahn 4: Negativkontrolle 2, 200  $\mu$ M dCTP, dGTP und TTP, Bahn 5: Negativkontrolle 3: 200  $\mu$ M dATP, dCTP und dGTP; Bahn 6: wie Bahn 4 + 400  $\mu$ M **40**; Bahn 7: wie Bahn 2 + 400  $\mu$ M **40**; Bahn 8: wie Bahn 4 + 400  $\mu$ M **40**, 3 mM  $Mg^{2+}$ ; Bahn 9: wie Bahn 2 + 400  $\mu$ M **40**, 3 mM  $Mg^{2+}$ ; Bahn 10: wie Bahn 5 + 400  $\mu$ M **49**; Bahn 11: wie Bahn 5 + 400  $\mu$ M **50**.....33

**Abbildung 21:** PCR unter gleichzeitiger Verwendung des Adenosinderivats **40** und des Uridinanalogs **50**: Bahn 1 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR (*Tth* DNA-Polymerase, 6 mM  $Mg^{2+}$ , Bahn 2: 15 Zyklen, sonst 30 Zyklen). Bahn 2: Positivkontrolle 200  $\mu$ M dATP dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3: Negativkontrolle 1, wie Bahn 2 aber ohne Templat; Bahn 4: Negativkontrolle 2, 200  $\mu$ M dCTP und dGTP, 400  $\mu$ M **40**; Bahn 5: Negativkontrolle 3: 200  $\mu$ M dCTP und dGTP, 400  $\mu$ M **50**; Bahn 6: 200  $\mu$ M dCTP und dGTP, 400  $\mu$ M **40** und **50**.....33

**Abbildung 22:** PCR unter Verwendung des 7-modifizierten Guanosinderivats **47**. In Bahn 1 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die Produkte der PCR (*Tth* DNA-Polymerase, 1.5 mM  $Mg^{2+}$ , Bahn 2-5: 30 Zyklen, sonst 50 Zyklen). Bahn 2: Positivkontrolle 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und TTP. Bahn 3 und 6: Negativkontrollen 200  $\mu$ M dATP, dCTP und TTP sowie „GC-Rich solution“; Bahn 4 und 7: wie Bahn 3/6 + 400  $\mu$ M **47**; Bahn 5 und 8: wie Bahn 4/7 + „GC-Rich solution“.34

**Abbildung 23:** Alternatives Selektionsschema, bei der die fDNA durch Primer-Verlängerung generiert und nach der Selektion mittels PCR unter Verwendung natürlicher dNTPs amplifiziert wird. Natürliche DNA ist dabei grün, der modifizierte Anteil rot dargestellt. ....36

**Abbildung 24:** Primerverlängerung unter Verwendung des 7-modifizierten Guanosinderivats **47**, variiert wurden die Reaktionszeit und die Menge an *Tth* DNA-Polymerase. Die jeweils erste Bahn (**1**) gehört zur Positivkontrolle (vier natürliche dNTPs, je 200  $\mu$ M), die zweite (**2**) zur Negativkontrolle (dATP, dCTP und TTP, je 200  $\mu$ M, kein dGTP); die

- Reaktionen der dritten Bahn (**3**) verwendeten das modifizierte Nukleotid **47** (400  $\mu\text{M}$ , außerdem dATP, dCTP und TTP, je 200  $\mu\text{M}$ ). .....38
- Abbildung 25:** Der in Kapitel 3.2.2.1 bis 3.2.2.3 verwendete Satz von Nukleotiden, dargestellt in den Ionenformen, wie sie hauptsächlich in den enzymatischen Reaktionen vorliegen.....39
- Abbildung 26:** Primerverlängerung mit vier verschiedenen modifizierten dNTPs. Aufgetragen sind die Reaktionsprodukte unter Verwendung von *Tth*- (**A**), Klenow Fragment (exo-) (**B**), *Taq*- (**C**) bzw. Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) (**D**) DNA-Polymerase. Bahn 1 zeigt den unverlängerten Primer, Bahn 2 die Positivkontrolle (50  $\mu\text{M}$  jedes natürlichen dNTPs). Die Bahnen 3-6 zeigen die Negativkontrollen (50  $\mu\text{M}$  dreier modifizierter dNTPs: Bahn 3: **48, 47, 51**; Bahn 4: **40, 47, 51**, Bahn 5: **40, 48, 51**, Bahn 6: **40, 48, 47**). Bahn 7 zeigt die Generierung von Vollängen-fDNA (50  $\mu\text{M}$  jedes modifizierten dNTPs **40, 48, 47** und **51**). *Taq* DNA-Polymerase zeigt eine signifikante 5'-3'-Exonukleaseaktivität, welche die zusätzlichen Banden am unteren Ende des Gels in **C** erklärt (siehe Text).....40
- Abbildung 27:** Sequenzen des mittleren Bereiches der fünf weiteren Template **AT, CT, GT, TT** und **PT**. .....42
- Abbildung 28:** Primerverlängerung an unterschiedlichen Templaten: Aufgetragen sind die Reaktionsprodukte unter Verwendung von jeweils 1 U Klenow Fragment (exo-) (**A**), *Tth*- (**B**) bzw. Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) (**C**) DNA-Polymerase (Reaktionszeit 30 Minuten). Verlängert wurden jeweils 2 pmol Primer unter Verwendung von 50  $\mu\text{M}$  natürlicher dNTPs (**2**) bzw. je 50  $\mu\text{M}$  der modifizierten dNTPs **40, 48, 47** und **51** (**3**). Als Negativkontrollen (**1**) dienten Reaktionen ohne dNTPs.....43
- Abbildung 29:** Quantifizierung der durchgeführten Primer-Verlängerungen (siehe Abbildung 28) an den umfangreiche Repetitionen aufweisenden Templaten **AT, CT, GT** und **TT**, sowie an randomisierter DNA (**PT**). Die Zahlenangaben stellen die prozentuale Ausbeute an Vollängenprodukt relativ zu der Ausbeute unter Verwendung natürlicher dNTPs dar. Die Quantifizierung erfolgte am Phosphorimager.....44
- Abbildung 30:** Primer-Verlängerungsreaktionen unter Verwendung von Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase (Reaktionszeit 30 Minuten, 2 pmol Primer, alle dNTPs 50  $\mu\text{M}$ ). Bahn 1 zeigt nicht verlängerten Primer, Bahn 2 die Positivkontrolle (alle vier natürlichen dNTPs). Weitere Bahnen: Bahn 3: dCTP, dGTP und TTP; Bahn 4: wie Bahn 3 + **16**; Bahn 5: wie

Bahn 3 + **11**; Bahn 6: wie Bahn 3 + **40**; Bahn 7: wie Bahn 3 + **39**; Bahn 8: wie Bahn 3 + **43**; Bahn 9: wie Bahn 3 + **42**; Bahn 10: wie Bahn 3 + **44**; Bahn 11: dATP, dGTP und TTP; Bahn 12: wie Bahn 11 + **48**; Bahn 13: dATP, dCTP, und TTP; Bahn 14: wie Bahn 13 + **47**; Bahn 15: dATP, dCTP und, dGTP; Bahn 16: wie Bahn 15 + **52**; Bahn 17: wie Bahn 15 + **51**; Bahn 18: wie Bahn 15 + **53**.....46

**Abbildung 31:** PCR-Amplifikation von fDNA. In Bahn 1 ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die restlichen Bahnen zeigen die PCR-Produkte (Denaturierung bei 100 °C, *Pwo* DNA-Polymerase) von folgenden Templaten: Bahn 2: natürliche ssDNA (Positivkontrolle); Bahn 3: Negativkontrolle (siehe Text), ohne „GC-Rich solution“; Bahn 4 fDNA ohne „GC-Rich solution“; Bahn 5 Negativkontrolle (siehe Text) mit „GC-Rich solution“; Bahn 6: fDNA mit „GC-Rich solution“.....48

**Abbildung 32:** PCR-Amplifikation der aus den Templaten **AT**, **CT**, **GT**, **TT** und **PT** generierten fDNA. Bahn 1 repräsentiert jeweils die Negativkontrolle (siehe Text), Bahn 2 die Positivkontrolle (ssDNA als Templat) und Bahn 3 die Amplifikation der fDNA. Unter M ist ein DNA-Größenmarker aufgetragen.....49

**Abbildung 33:** Chromatogramme und daraus gewonnene DNA-Sequenz der PCR-Produkte, ausgehend von natürlicher DNA (oben) bzw. fDNA (unten). Aus diesen Ergebnissen ist kein signifikanter Unterschied in der Sequenzspezifität ersichtlich.....50

**Abbildung 34:** Sequenz des Restriktionstemplats **RT**, die Schnittstellen der Enzyme sind gekennzeichnet.....51

**Abbildung 35:** Restriktionsverdau von dsDNA (**1**) bzw. fDNA/DNA-Duplexen (**2**), die durch Primer-Verlängerung des Templats **RT** erhalten wurden, mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, XhoI, HindIII bzw. EcoRI.....51

**Abbildung 36:** Definition der Torsionswinkel in Nukleotiden (entnommen aus Lit.<sup>[90]</sup>).....52

**Abbildung 37:** Darstellung der Riboseeinheit eines Nukleosids in zwei verschiedenen *envelope* (E) und *twist* (T) Konformationen nach Lit.<sup>[90]</sup>.....53

**Abbildung 38:** Graphische Darstellung der Pseudorotationswinkel *P* im Pseudorotationszyklus nach Lit.<sup>[92]</sup>.....55

**Abbildung 39:** Konformationsanalyse von 2'-Desoxyadenosintriphosphat. Die Ribose wurde mit den aus der PSEUROT-Analyse gewonnenen Torsionswinkeln fixiert, die glykosidische Bindung sowie die Bindung zwischen C<sub>4'</sub> und C<sub>5'</sub> wurden in 10° Schritten

gedreht und die Strukturen minimiert (Tripos-Kraftfeld, GASTEIGER-HÜCKEL-Ladungen) .....	58
<b>Abbildung 40:</b> Konformationsanalyse des <i>N</i> -7-Deazaderivats <b>40</b> und des 8-modifizierten 2'-Desoxyadenosins <b>11</b> . Während sich die Energiefläche von <b>40</b> nur geringfügig von der des dATP unterscheidet, sieht man bei Verbindung <b>11</b> eine eindeutige Verschiebung der Energieminima. Während dATP und <b>40</b> bevorzugt eine <i>anti</i> -Konformation ( $\chi \approx 200^\circ$ ) einnehmen, liegt <b>11</b> hauptsächlich in <i>syn</i> -Konformation ( $\chi \approx 40^\circ$ ) vor. ....	59
<b>Abbildung 41:</b> Vergleichende Darstellung einiger erhaltener Konformationen mit lokalem Energieminimum. ....	60
<b>Abbildung 42:</b> Ausschnitt aus der Kristallstruktur <sup>[101]</sup> des Komplexes aus <i>Taq</i> DNA-Polymerase (schematisch durch grüne und blaue Bänder dargestellt), DNA (der Templatstrang ist rot dargestellt, der Primerstrang wurde zu Übersichtlichkeit weggelassen) und ddATP.....	61
<b>Abbildung 43:</b> Strukturen des ddATP, dem unter Erhalt der Konformation aus der Kristallstruktur der Pent-1-insäurerest an Position 8 (links) bzw. Position 7 (rechts) der analogen <i>N</i> -7-Deazaverbindung hinzugefügt wurde. ....	62
<b>Abbildung 44:</b> Analog zu Abbildung 43 wurde die von PERRIN et al. verwendete Modifikation an Position C-8 des ddATPs angefügt. ....	62
<b>Abbildung 45:</b> Modellhafte Darstellung eines fDNA/DNA-Duplexes. Die linke Abbildung zeigt die Oberfläche einer aus 12 bp bestehenden dsDNA der Sequenz ACGT-ACGT-ACGT. Die vier mittleren Nukleotide eines Stranges wurden durch die Verbindungen <b>40</b> , <b>48</b> , <b>47</b> und <b>51</b> ersetzt, wobei die natürliche B-DNA Struktur beibehalten wurde. Die zusätzlichen funktionellen Gruppen sind rot, die natürlichen Anteile grün dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt die molekulare Struktur des betreffenden Ausschnitts des fDNA-Stranges. ....	64



## 8.5 Danksagungen

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Michael Famulok, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die Betreuung dieser Dissertation und seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Heinrich Wamhoff, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die Übernahme des Koreferates.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentralanalytik für die Aufnahme von Spektren.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises Famulok, vor allem für die umfangreichen Hilfestellungen bei den molekularbiologischen Techniken. Ganz besonders meinen direkten Laborkollegen, Alexander Eisenführ und Stefan Jäger, für das hervorragende Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Andreas Marx für die großartigen Hilfen bei der Einarbeitung in den Umgang mit und die Analyse von DNA.

Den drei Letztgenannten für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Praktikanten, ohne die vieles in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht hätte verwirklicht werden können: Thomas Ahlscheid, Matthias Christlieb, Ilka Detmer, Imke Grüne, Markus Hafner, Christian Hausen, Oliver Joistgen, Thorsten Klawonn, Axel Pelka, Goran Rasched und Henrike Tauern.

Meiner Familie, die durch ihre ideelle und finanzielle Förderung mein Chemiestudium und damit diese Arbeit ermöglicht haben.

Schließlich meiner Frau Susanne, die jederzeit für meine Arbeit und den damit verbundenen Aufwand Verständnis hatte.





## 9 Lebenslauf

Name: Oliver Joachim Thum  
Geburtsdatum: 06. Juli 1974  
Geburtsort: Koblenz  
Verheiratet mit: Susanne Thum geb. Thies

### Schulbildung

1980-1984 Schenkendorf-Grundschule Koblenz  
1984-1993 Max-von-Laue-Gymnasium Koblenz  
14.06.1993: Abitur

### Studium

10/1993 – 03/1999: Chemie-Studium an der Universität Bonn  
21.11.1995: Vordiplom  
04/1996 – 07/1996: „Visiting scholar“ an der State University of New York at Stony Brook, Department of Chemistry, Arbeitskreis Prof. Dr. G. D. Prestwich  
07/1998 – 03/1999: Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. W. Boland, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena. Thema: „Synthese deuterierter Fettsäureanaloge - ein Beitrag zur Aufklärung der Stereochemie von  $\Delta^6$ -Desaturasen“  
25.03.1999: Diplom in Chemie, Nebenfach: Biochemie  
04/1999 – 07/2002: Dissertation bei Prof. Dr. M. Famulok, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn.  
Hauptfach: Organische Chemie, Nebenfach: Pharmakologie



