

SYNTHESE UND PAARUNGSEIGENSCHAFTEN VON PDNA UND DEREN ANWENDUNG BEI DER ENTWICKLUNG FUNKTIONALISierter RIBOZYME

THÈSE N° 2920 (2004)

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ SCIENCES DE BASE

Institut de chimie moléculaire et biologique

SECTION DE CHIMIE ET GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Damian ACKERMANN

chimiste diplômé EPF
de nationalité suisse et originaire de Fehren (SO)

acceptée sur proposition du jury:

Prof. S. Pitsch, directeur de thèse
Prof. R. Häner, rapporteur
Prof. K. Johnsson, rapporteur
Prof. T. Ward, rapporteur

Lausanne, EPFL
2004

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur Herstellung der unnatürlichen Nucleinsäuren 3'-O-Methyl-pRNA sowie pDNA (3'-Desoxy-pRNA) entwickelt. Von den beiden Systemen wurden die Paarungseigenschaften untersucht und mit jenen der pRNA verglichen. Die drei Systeme paaren alle nach den gleichen Regeln. Es wurde ausschliesslich eine Paarung auf der *Watson-Crick*-Seite unter Ausbildung antiparalleler Duplexe beobachtet. Bei allen drei Systemen handelt es sich um autonome Paarungssysteme, welche nicht mit RNA oder DNA interagieren. Die pRNA bildet in dieser Reihe die stabilsten Duplexe aus, gefolgt von pDNA und 3'-O-Methyl-pRNA. Um die Duplexstabilität der pDNA zu erhöhen, wurden die Nucleobasen 9H-Purin-2,6-diamin anstelle von Adenin und 5-Methylcytosin anstelle von Cytosin eingeführt.

Mittles NMR wurde von der selbstkomplementären pDNA-Sequenz [MGAATTMG]₂ eine Lösungsstruktur bestimmt. Diese zeigt einen, gegen die *major groove* gekrümmten, *anti*-parallelen Duplex mit leichter linksgängiger Helizität. Analog zur pRNA überwiegt bei einem Inklinationwinkel von *ca.* 45° das *interstrand stacking*. Ausgehend von der NMR-Struktur wurde eine MD-Simulation durchgeführt, bei der sich der Duplex nach einer Regenerationsphase von 1.5 ns sehr stark krümmte; diese Krümmung blieb während der restlichen Simulationszeit von 4.0 ns erhalten.

Über die automatisierte Festphasensynthese wurden pDNA/RNA-Hybridsequenzen hergestellt. Bei der Untersuchung der Paarungsstärke wurde festgestellt, dass der RNA/pDNA-Übergang mit einer RNA-2'→4'-pDNA-Verknüpfung zu stabileren Duplexen führt, als eine RNA-3'→4'-pDNA-Verknüpfung. Diese Art von pDNA/RNA-Hybridstrukturen wurde benutzt, um in komplexen RNA-Architekturen strukturdefinierende Elemente wie Hairpins oder Stammsequenzen durch pDNA-Duplexe zu ersetzen. Analog zum FMN-bindenden RNA-Aptamer wurde ein pDNA/RNA-Konstrukt hergestellt, welches aus zwei Hybridsequenzen aufgebaut wurde. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie konnte

die Bindung des FMN im *pDNA*/*RNA*-Konstrukt nachgewiesen und die Dissoziationskonstante $K_D = 2.6 \cdot 10^{-7}$ M berechnet werden.

Nach dem gleichen Prinzip wurde ein *pDNA*/*RNA*-Konstrukt des Hammerhead-Ribozyms hergestellt, welches analog zum natürlichen Ribozym eine Substrat-Spaltungsaktivität zeigte. Das Spaltungsverhalten des *pDNA*/*RNA*-Konstruktes, bei verschiedenen Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Konzentrationen sowie bei verschiedenen Temperaturen, war analog zu jenem des natürlichen Ribozyms. Unter allen gemessenen Bedingungen war das natürliche Ribozym ungefähr um einen Faktor 1.5 mal aktiver als das *pDNA*/*RNA*-Konstrukt.

An verschiedenen Positionen der *pDNA*/*RNA*-Hybridsequenzen konnte über einen vorfunktionalisierten 6'-Bromopentylallofuranosyl-Baustein, bei welchem nach der Festphasensynthese das Bromid mit $MeNH_2$ resp. EtSH substituiert wurde, eine zusätzliche funktionelle Gruppe eingeführt werden. 25 verschiedene *pDNA*/*RNA*-Ribozymkonstrukte konnten auf kombinatorische Weise aufgebaut werden. Von 17 Konstrukten wurde die Spaltungsgeschwindigkeit gemessen und evaluiert. Das Substitutionsmuster des aktivsten *pDNA*/*RNA*-Ribozymanalogen wurde auf die Hammerhead-RNA-Sequenz übertragen und ein zweifach Methylamino-substituiertes Konstrukt hergestellt. Die Spaltungsgeschwindigkeiten dieses Konstruktes waren unter allen gemessenen Bedingungen um einen Faktor 2.0 - 3.3 mal schneller als beim natürlichen Hammerhead-Ribozym.

Abstract

Within this project methods for the preparation of the unnatural nucleic acids 3'-*O*-Methyl-*p*RNA and *p*DNA (3'-Desoxy-*p*RNA) were developed. The pairing properties of these two systems have been examined and compared with that of *p*RNA. All of the three systems do follow the same pairing rules. Pairing has been observed only on the *Watson-Crick* side forming duplexes in antiparallel direction. All three systems are autonomous pairing systems that do not interact with RNA or DNA. In this series *p*RNA forms the most stable duplexes. Nucleobase 9*H*-purin-2,6-diamin instead of adenin and 5-methyl-cytosine instead of cytosine were introduced to increase the stability of *p*DNA duplexes.

A solution structure of the self-complementary *p*DNA sequence [MGAATTMG]₂ was elucidated by NMR. It shows an antiparallel duplex twisted against the major groove with a slightly lefthanded helicity. In analogy to *p*RNA the interstrand stacking predominates with a inclination angel of approximately 45°. Proceeding from the NMR structure a MD simulation was performed, in wich the duplex has strongly bent after a regeneration time of 1.5 ns; this bent shape was conserved during the remaining simulation time of 4.0 ns.

Using automated solid phase synthesis *p*DNA/RNA hybrid sequences were prepared. Examining the pairing strength, the RNA-2'→4'-*p*DNA linkage at the *p*DNA/RNA interface was observed to lead to more stable duplexes than the RNA-3'→4'-*p*DNA linkage did. This kind of *p*DNA/RNA structures have been used to replace structure defining elements like hairpins or stem motifs by *p*DNA-duplexes in complex RNA structures. From the FMN binding RNA aptamer an analogous *p*DNA/RNA construct has been prepared, that was built of two hybrid sequences. The binding of FMN in the *p*DNA/RNA construct was shown by fluorescence spectroscopy and the dissociation constant $K_D = 2.6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ was calculated.

Using the same strategy a *p*DNA/RNA construct of the hammerhead ribozyme was prepared, having substrate cleavage activity in analogy to the natural ribozyme. Cleavage properties of the *p*DNA/RNA construct at different Mg^{2+} and Mn^{2+} concentrations and at different reaction temperatures showed the same trend as those from the natural ribozyme

did. Under all measured conditions, the natural ribozyme was about 1.5 times as active as the *pDNA*/*RNA* construct.

Additional functional groups were introduced at different positions of the *pDNA*/*RNA* hybrid sequences using a pre-functionalized 6'-bromopentyl allofuranosyl building block on which the bromide was substituted with MeNH₂ resp. EtSH after solid phase synthesis. 25 different functionalized *pDNA*/*RNA* ribozyme constructs could be built up in a combinatorial way. From 17 out of the 25 constructs, the cleavage kinetics was measured and the cleavage rate evaluated. The substitution pattern of the most active *pDNA*/*RNA* ribozyme analogue was applied on the hammerhead RNA sequence and the doubly methylamino-substituted construct prepared. Compared to the natural hammerhead ribozyme, the cleavage rates of this construct were higher with a factor of 2.0 - 3.3 under all measured conditions.

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	Grundlegende Aspekte der Nucleinsäuren	1
1.1.1	Struktur von DNA und RNA	1
1.2	Chemische Synthese von Nucleinsäuren	8
1.2.1	Chemische DNA-Synthese	8
1.2.2	Chemische RNA-Synthese	10
1.2.3	Automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden	13
1.2.4	Reinigung von Oligonucleotiden	16
1.2.5	Charakterisierung von Oligonucleotiden	16
1.2.6	Enzymatische Oligonucleotid-Synthese	18
1.3	Biologische Bedeutung der Nucleinsäuren	21
1.3.1	Funktionen der Nucleinsäuren	22
1.4	Aptamere	26
1.4.1	AMP bindendes RNA-Aptamer	26
1.4.2	FMN bindendes RNA-Aptamer	28
1.5	Ribozyme	30
1.5.1	Einleitung	30
1.5.2	Hammerhead-Ribozym	32
1.5.3	Spaltungsreaktion	33
1.5.4	Struktur des Hammerhead-Ribozyms	35
1.6	Modifizierte Nucleinsäuren	39
1.6.1	Alternative Paarungssysteme	43
2	DARSTELLUNG DES PROJEKTES	45
2.1.1	Einführung	45
2.1.2	Konzept und Fragestellung	46
2.1.3	Vorgehen	49

3 RESULTATE

51

3.1	Synthese und Paarungseigenschaften der 3'-O-Methyl-pRNA	51
3.1.1	Einführung	51
3.1.2	Synthese von 3'-O-Methyl-pRNA-Phosphoramiditen	53
3.1.3	Selektive Methylierung der 2-OH-Gruppe von Ribose	54
3.1.4	Synthese des vorfunktionalisierten Zuckerbausteines 2	61
3.1.5	Synthese der vier 3'-O-Methyl-Nukleoside	63
3.1.6	Phosphitylierung und Immobilisierung der Nukleoside auf der Festphase	65
3.1.7	Synthese von 3'-O-Methyl-pRNA-Sequenzen	68
3.1.8	Paarungseigenschaften der 3'-O-Methyl-pRNA	71
3.1.9	Paarungsverhalten der 3'-O-Methyl-pRNA in organischem Lösungsmittel	75
3.2	Synthese und Paarungseigenschaften der pDNA (3'-Desoxy-pRNA)	78
3.2.1	Einleitung	78
3.2.2	Synthese eines vorfunktionalisierten Zuckerbausteines 57 aus Diacetonglucose	81
3.2.3	Synthese eines vorfunktionalisierten Zuckerbausteines 98 aus D-Xylose	90
3.2.4	Synthese der pDNA-Phosphoramidite	95
3.2.5	Phosphitylierung und Immobilisierung auf der Festphase	104
3.2.6	Synthese von pDNA-Sequenzen	106
3.2.7	Paarungseigenschaften der pDNA	110
3.2.8	CD-Spektroskopie von pDNA-Duplexen	117
3.2.9	Paarungsverhalten der pDNA in organischen Lösungsmitteln	119
3.3	NMR-Lösungsstruktur der pDNA	121
3.3.1	Einleitung	121
3.3.2	Resultate	121
3.4	Synthese und Anwendungen von pDNA/DNA-Hybriden	133
3.5	Synthese von pDNA/RNA-Hybridsequenzen	142
3.5.1	Verwendete DNA- und RNA-Phosphoramidite	143
3.5.2	Synthese der pDNA/RNA Hybridsequenzen	145

3.6	<i>p</i>DNA/RNA-Konstrukt des FMN-bindenden Aptamers	153
3.6.1	Einleitung	153
3.6.2	Synthese der <i>p</i> DNA/RNA-Hybridsequenzen FA, FB und FC	154
3.6.3	Bindungsstudien des Aptamers FC und des <i>p</i> DNA/RNA-Analogen FA-FB	155
3.7	<i>p</i>DNA/RNA-Analogue des Hammerhead-Ribozymes	161
3.7.1	Einleitung	161
3.7.2	Synthese und Charakterisierung des <i>p</i> DNA/RNA-analogen Hammerhead-Ribozymes	163
3.7.3	Spaltungsexperimente mit dem Konstrukt RH-RT	165
3.8	Funktionalisierte <i>p</i>DNA/RNA-Ribozymanalogue	175
3.8.1	Einleitung	175
3.8.2	Methode zur Einführung von funktionellen Gruppen an der 5'-O-Position	176
3.8.3	Konzept	177
3.8.4	Synthese, Funktionalisierung und Bezeichnung der Sequenzen	178
3.8.5	Kombinatorisches Zusammenfügen der Ribozymkonstrukte	180
3.8.6	Spaltungsexperimente mit den funktionalisierten <i>p</i> DNA/RNA-Ribozym-Analogen	182
3.8.7	Modell zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten <i>pseudo</i> -erster Ordnung	182
3.8.8	Auswertung der Kinetik-Experimente	186
3.8.9	Anwendung des Substitutionsmusters auf das Hammerhead-Ribozym	190
4	AUSBLICK	194

5	EXPERIMENTELLER TEIL	196
5.1.1	Allgemein	196
5.1.2	Herstellung der Träger	197
5.1.3	Oligonukleotid-Synthese	199
5.1.4	Entschützung der Oligonukleotide	201
5.1.5	Reinigung der Oligonukleotide über HPLC	201
5.1.6	Entsalzen der Oligonukleotide	203
5.1.7	Quantifizierung der Oligonukleotide	203
5.1.8	Temperaturabhängige UV-Spektroskopie	204
5.1.9	CD-Spektroskopie	204
5.1.10	Fluoreszenz-Spektroskopie mit dem FMN-bindenden Aptamer/Konstrukt	205
5.1.11	Ribozymspaltungsexperimente	206
5.1.12	Substitutionsreaktionen	207
5.2	Oligonukleotide	208
5.3	Verbindungen	211
6	ANHANG	244
6.1	Abkürzungen	244
6.2	Literatur	246

1 Einführung

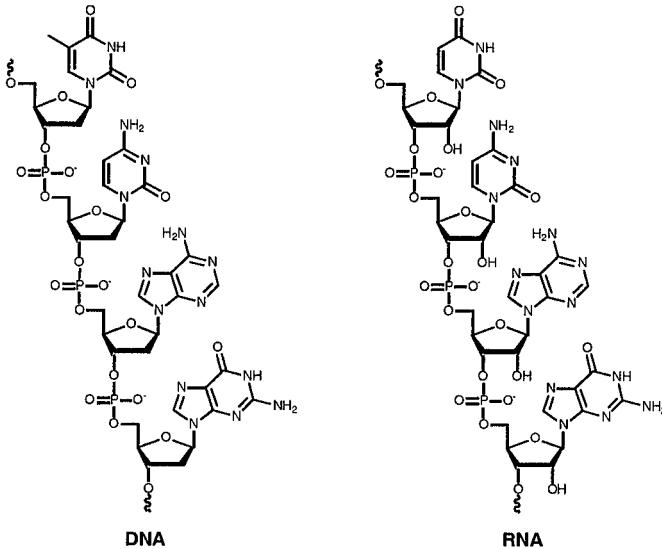
1.1 Grundlegende Aspekte der Nucleinsäuren

Seit der Entdeckung der DNA-Struktur durch *Watson & Crick* [1] im Jahr 1953 werden die zahlreichen Aspekte der Nucleinsäuren in den verschiedenen Disziplinen der Naturwissenschaften auch auf molekularer Ebene untersucht.

Als Träger der genetischen Information sind die Nucleinsäuren der Schlüssel zum Verständnis des Lebens auf molekularer Ebene. Mit der Fähigkeit der Nucleinsäuren zur Selbstreplikation und zur Mutation konnte ein Leben, so vielfältig wie wir ihm heute begegnen, entstehen. Die Nucleinsäuren übernehmen neben diesen beiden noch viele weitere Aufgaben bei den Stoffumwandlungen in der Zelle, wie z. B. die spezifische Erkennung von Molekülen, die Expression der genetischen Information oder die Katalyse von organischen Reaktionen.

1.1.1 Struktur von DNA und RNA

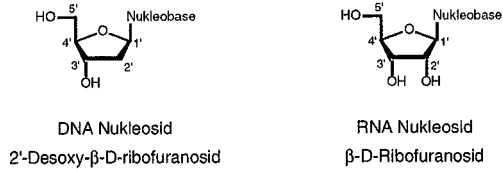
Wie die Proteine sind auch Nucleinsäuren lange, oligomere Moleküle (Schema 1). Sie sind aus vier Nucleosiden aufgebaut, welche über eine Phosphodiesterbrücke linear miteinander verbunden sind [2, 3]. Die Nucleoside gehören zu der Stoffklasse der *N*-Glycoside. Die DNA- und RNA-Nucleoside unterscheiden sich im Zuckerteil: 2'-Desoxyribofuranose bei DNA und Ribofuranose bei RNA. Bei beiden sind die vier Nucleobasen aromatische Heterocyclen, welche β -glycosidisch mit dem jeweiligen Zucker verbunden sind (Schema 2).

Schema 1. Konstitution der Nucleinsäuren [2, 3]

Bei den vier Nucleobasen handelt es sich um Purin- und Pyrimidin-Abkömmlinge, nämlich Adenin (A) und Guanin (G) bzw. Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U), wobei das Uracil in der RNA und Thymin in der DNA vorkommt (Schema 3). A und T (resp. U bei RNA) können zusammen über zwei Wasserstoffbrücken das Basenpaar A·T ausbilden; G und C bilden über drei Wasserstoffbrücken das Paar G·C (Schema 4).

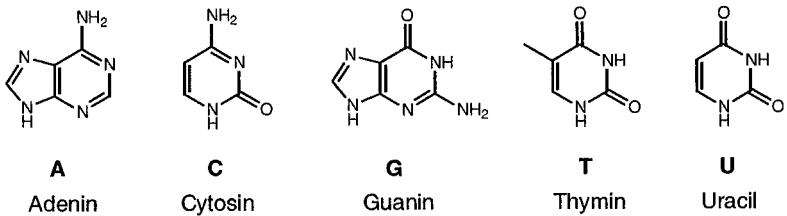
DNA und RNA haben ein konstitutionell analoges Rückgrat, bei dem die Nucleoside über die 3'-OH und 5'-OH Gruppe mit Phosphorsäure verestert und so miteinander verbunden sind. Durch diese Art der Verknüpfung existiert bei den Nucleinsäuren eine wohldefinierte Richtung, bzw. eine gerichtete Sequenz, welche üblicherweise vom 5'- zum 3'-Ende angegeben wird.

Schema 2. Nucleoside der DNA und RNA

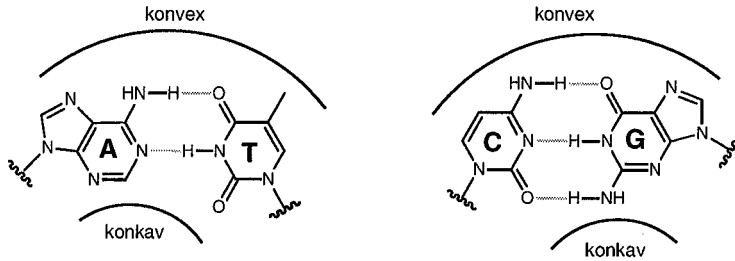


Durch die Komplementarität können zwei zueinander passende DNA- oder RNA-Einzelstränge einen Doppelstrang (Duplex) ausbilden (Figur 1). Diese Doppelstränge haben eine rechtsdrehende helikale Struktur, in der die beiden Einzelstränge antiparallel angeordnet sind. Die Basenpaare sind nach innen, hin zur Helixachse, gerichtet und infolge eines stabilisierenden π -Stackings ungefähr parallel übereinander angeordnet.

Schema 3. Nucleobasen

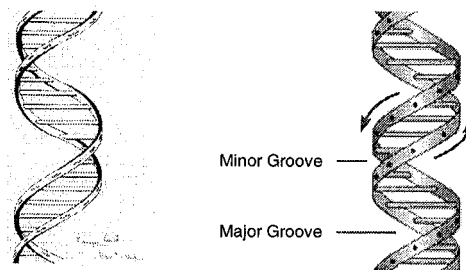


Schema 4. Basenpaarung



Die negativ geladenen Phosphatgruppen bilden das Rückgrat der Helix und sind nach aussen gerichtet, was die *Coulomb*-Abstossung minimiert. Zwischen den Nucleobasen und dem Phosphatrückgrat befindet sich der Zuckerteil, durch dessen Konformation die helikale Struktur ermöglicht und definiert wird. Basenpaare verfügen über eine konkave und eine konvexe Seite (Schema 4), die in entsprechenden Oligomeren (Nucleinsäuren) die kleine resp. grosse Furche bilden (Figur 1).

Figur 1. Doppelhelix, schematisch

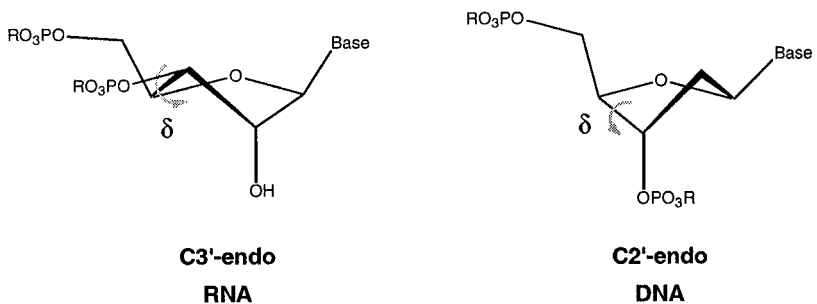


Doppelhelix

Im Wesentlichen liegen Nukleinsäureduplexe in zwei verschiedenen Formen vor, der A- oder der B-Form (Figur 3). RNA-Duplexe liegen fast ausschliesslich in der A-Form vor, DNA-Duplexe vorwiegend in der B-Form.

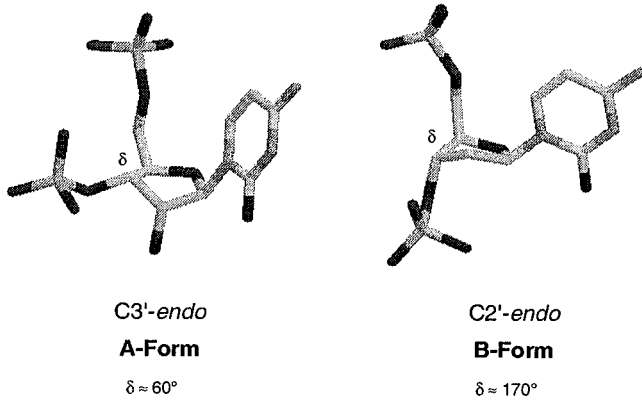
Der Grund für diese beiden unterschiedlichen Strukturen ist eine andere Konformation des Zuckerteils. Bei der A-Form liegt der Zucker in einer C3'-endo Konformation vor; bei der B-Form hingegen in einer C2'-endo Konformation (Figur 2; Schema 5).

Schema 5. C3'-endo und C2'-endo Zuckerkonformationen



Die beiden Formen unterscheiden sich deutlich in ihrer Geometrie und in ihren Ausmassen. Bei der B-Form stehen die π -Ebenen der Basenpaare ungefähr orthogonal zur Helixachse (gedachte Achse) und verlaufen durch diese. Die *minor groove* ist schmal und flach, die *major groove* ist weit und tief (Figur 3). Die A-Form ist etwas kompakter. Die π -Ebenen der Basenpaare sind gegenüber der Helixachse um ca. 20° geneigt und winden sich um die Achse herum. Hier ist die *major groove* schmal und sehr tief, die *minor groove* ist weit und sehr flach.

In Tabelle 1 sind die Parameter, welche die Ausmasse der Doppelhelix definieren, zusammengestellt.

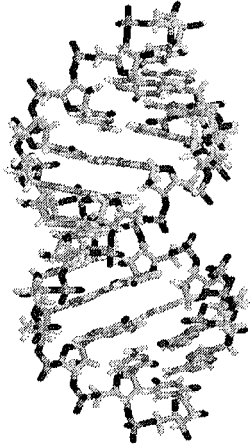
Figur 2. 3D-Darstellungen der A- und B-Form

In beiden Formen ist die glykosidische Bindung anti angeordnet.
 Der Torsionswinkel δ variiert stark.

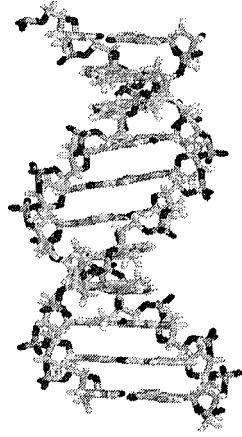
Tabelle 1. Zusammenstellung der Parameter der beiden Helixstrukturen [2]

Parameter	A-Form	B-Form
helikale Drehrichtung	rechtshändig	rechtshändig
Basen pro Turn	11	10
Steigung pro Turn	28 Å	34 Å
Steigung pro Base	2.6 Å	2.4 Å
Durchmesser	26 Å	20 Å
Inklination der Basenpaare senkrecht zur Helixachse	20°	-1°
Zuckerkonformation	C3'-endo	C2'-endo

Figur 3. Doppelhelix in der A- und der B-Form



A-Form
RNA



B-Form
DNA

1.2 Chemische Synthese von Nukleinsäuren

Die ersten Synthesen von Nukleinsäuren wurden in der Mitte der 50-er Jahre durchgeführt und haben sich seither laufend weiterentwickelt [2]. Die heutige Methode ist derart ausgereift, dass die Oligonukleotidsynthese der wahrscheinlich beste Prozess in der synthetischen Chemie darstellt. Im Laufe dieser Entwicklung wurden verschiedene Ansätze zur Verknüpfung von Nukleotiden, wie die Phosphodiester-, die Phosphotriester-, die H-Phosphonat- und die Phosphoramidit-Methode angewendet (Schema 6). Die Gemeinsamkeit aller Methoden besteht darin, dass die Verknüpfung der jeweiligen Nukleotidbausteine am Phosphorzentrum erfolgt.

Die Synthese von Oligonukleotiden basiert auf einem System von fein abgestimmten orthogonalen Schutzgruppen. Man unterscheidet zwischen permanenten und temporären Schutzgruppen. Die temporären Schutzgruppen werden im Verlaufe eines Kopplungszyklus unter sauren Bedingungen entfernt, die permanenten hingegen durch Ammonolyse erst ganz am Schluss der Synthese.

Ursprünglich wurde (auf konventionelle Weise) in Lösung gearbeitet, erst 1967 wurde von *Letsinger & Ogilvie* [4] eine Phosphotriester-Methode beschrieben, bei der ein Nukleosid auf eine polymere Festphase gebunden und daraus schrittweise die Di-, Tri- und Tetranukleotide aufgebaut wurden.

Heute hat sich die Phosphoramidit-Methode durchgesetzt, da damit sehr gute Kopplungsausbeuten (>99,5 %) erreicht werden und die entsprechenden Monomere ohne besondere Vorsichtsmassnahmen gehandhabt werden können [2].

1.2.1 Chemische DNA-Synthese

1955 wurde von *Michelson & Todd* [5] die erste - nicht sehr ergiebige - Synthese eines Dinukleotides nach der Phosphotriestermethode durchgeführt (Schema 6). Danach wurden

durch Weiterentwicklung von Katalysatoren, Aktivatoren und Schutzgruppen die Ausbeuten laufend erhöht, bis 1984 *Marugg et al.* [6] 50% bis 77% Ausbeute pro Phosphotriesterkopplung erzielte. 1966 wurde von *Letsinger & Mahadevan* [7] eine Festphasensynthese, basierend auf der Phosphotriestermethode, beschrieben. Dabei wurde zwar sehr viel Pionierarbeit zur Festphasensynthese von Oligonukleotiden geleistet, jedoch hat sich die Phosphotriestermethode nicht durchgesetzt und wurde im Wesentlichen ausschliesslich in Lösung durchgeführt.

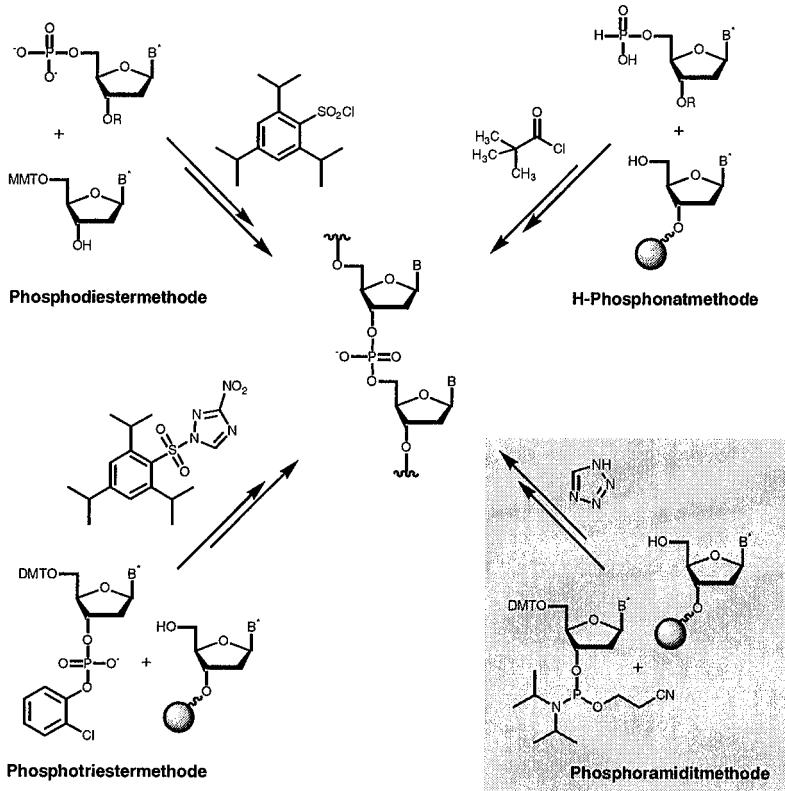
Bei der Phosphodiestermethode (Schema 6), welche von *Khorana et al.* 1968 [8] beschrieben wurde, wurden herkömmliche Aktivierungs- und Kondensationsmittel (Sulfonsäurechloride) verwendet. Damit konnten bereits 10- und 12-mer DNA-Sequenzen hergestellt werden.

Die H-Phosphonatmethode, bei welcher Phosphonsäuremonoester zu Phosphonsäurediester gekoppelt werden, geht auf *Hall et al.* zurück. Das bei der Kopplung gebildete H-Phosphonatdinukleotid wurde abschliessend mit $\text{Py}/\text{H}_2\text{O}/\text{N}$ -Chlorsuccinimid (NCS) zum Phosphosäurediester oxidiert [9]. Auch für diese Methode wurde 1971 von *Kabachnik et al.* [10] eine Festphasensynthese entwickelt, mit welcher Ausbeuten zwischen 46% und 80% für ein Dinukleotid erzielt wurden.

1975 wurde von *Letsinger et al.* [11] erstmals ein Dinukleotid über einen entsprechenden Phosphitriester hergestellt (Schema 6). Die nachfolgende Oxidation zum Phosphosäuretriester erfolgte mit $\text{I}_2/\text{Py}/\text{H}_2\text{O}$. Der durchschlagende Erfolg gelang 1981 *Matteucci & Caruthers* [12] durch die Entwicklung einer Festphasensynthese unter der Verwendung von Phosphoramiditbausteinen, welche stabil gegenüber Luftoxidation und Hydrolyse waren. Als Festphase wurde hier ein poröses Glass (long chain alkyl amino controlled pore glass, LCAA-CPG) verwendet.

Heute werden in der DNA-Synthese Acyl-Schutzgruppen zur Schützung der exocyclischen Aminogruppen der Nukleobasen verwendet. Die Phosphitriester resp. die Phosphotriester werden mit β -Cyanoethylgruppen und die 5'-OH-Gruppen mit der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT) geschützt (Schema 6).

Schema 6. Zusammenstellung der verschiedenen DNA-Synthesemethoden



1.2.2 Chemische RNA-Synthese

Weil sich die Phosphoramiditchemie in der DNA-Synthese so gut bewährt hat, lag es auf der Hand, auch RNA mit dieser Methode herzustellen [2]. Im Gegensatz zur DNA ist RNA im basischen Milieu nicht stabil, weil durch Deprotonierung der zusätzlichen 2'-OH-Gruppe eine in Strangbruch mündende Umesterung an der Phosphatgruppe ausgelöst wird. Für die


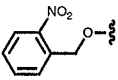
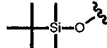
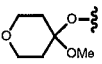
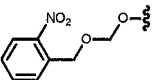
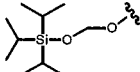
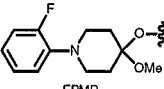
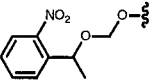
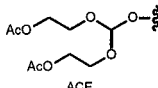
zusätzliche 2'-OH-Gruppe der RNA suchte man also nach einer weiteren, permanenten und orthogonalen Schutzgruppe, welche erst ganz am Schluss, d. h. nach Kettenaufbau und Ammonolyse, entfernt wird. Daraus ergaben sich folgende Anforderungen an die Schutzgruppe:

- Sie musste unter allen Synthesebedingungen stabil sein, d. h. gegenüber den sauren Bedingungen der Detritylierung, der Oxidation mit $I_2/Py/H_2O$ und den basischen Bedingungen der Ammonolyse.
- Sie musste vollständig entfernt werden können ohne begleitenden Abbau des Oligonukleotides.
- Sie sollte sterisch nicht zu anspruchsvoll sein, damit die Kopplungsreaktion nicht beeinträchtigt wird.
- Sie sollte selektiv in der 2'-O-Position eingeführt werden können und sollte anschließend nicht an die 3'-O-Position wandern.

Die wichtigsten 2'-O-Schutzgruppen, welche für die RNA entwickelt wurden, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Griffin & Reese [13] haben 1964 die säurelabile Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe beschrieben (THP), welche unter relativ schwach sauren Bedingungen (0.01 N HCl, 3-4 h bei RT) abgespalten werden konnte. Sie war aber unter den Detritylierungsbedingungen nicht vollständig stabil und so beschränkte sich ihre Verwendung auf relativ kurze Sequenzen (< 20-mer). Später wurde von *Lehmann et al.* die chirale THP-Gruppe durch die achirale 4-Methoxytetrahydropyranyl-Gruppe (MTHP) ersetzt und zusammen mit der orthogonalen Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) zur Schützung der 5'-OH-Gruppe in der Phosphoramidit-Festphasensynthese eingesetzt [14]. Dieses System erlaubte bei einer Kopplungszeit von 2 bis 10 min. Ausbeuten von durchschnittlich 96%. *Beijer et al.* beschrieb 1990 die 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl-Gruppe (FMPT) [15]. Dieses säurelabile Acetal war vollständig stabil unter den Detritylierungsbedingungen und konnte deshalb nach der herkömmlichen Phosphoramiditchemie in der Festphasensynthese verwendet werden.

Tabelle 2. 2'-O-Schutzgruppen in der Oligoribonukleotidsynthese

säurelabil	photolabil	fluoridlabil
 THP	 NBZ	 TBDMS
 MTHP	 NBM	 TOM
 FPMP	 NPEOM	
 ACE		

Die fluoridlabile *tert*-Butyl-dimethylsilyl-Gruppe (TBDMS), welche von *Ogilvie et al.* 1988 [16] eingeführt wurde, war relativ stabil unter sauren und basischen Bedingungen und konnte mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) relativ schnell abgespalten werden. Mit einer Kopplungsausbeute von durchschnittlich 98% in 15 min. konnten damit bis 50-mere Oligoribonukleotide hergestellt werden. Erst kürzlich entwickelte *Caruthers et al.* [17] ein neues orthogonales Schutzgruppensystem für die RNA-Synthese. Dabei kombinierte er die Bis-(2-acetoxy-ethoxy)methyl-Orthoesterschutzgruppe (ACE) an der 2'-O-Position mit einer sperrigen sehr fluoridlabilen Silylschutzgruppe an der 5'-O-Position. Im Vergleich mit dem herkömmlichen 5'-O-DMT / 2'-O-TBDMS-System wurde damit eine wesentlich höhere Gesamtausbeute für eine 36-mere Sequenz erreicht (71%).

Ein ganz anderer Ansatz wurde durch die Verwendung der photolabilen Nitrobenzyl-Schutzgruppe (NBZ) realisiert. Leider war diese schwierig einzuführen und die

Kopplungsausbeuten waren eher unbefriedigend. Deshalb wurde 1992 von *Gough et al.* [18] die sterisch weniger anspruchsvolle (2-Nitrobenzyl)oxymethyl-Gruppe (NBM) entwickelt, mit welcher erstmals Kopplungsausbeuten von > 98% erreicht wurden. *Pitsch* [19] optimierte später die Synthese der entsprechenden Phosphoramidite und führte in der Folge die (2-Nitrophenyl)-ethoxymethyl-Gruppe (NPEOM) als vollständig orthogonales System zu den fluoridlabilen Silyl-Schutzgruppen ein [20]. Als Durchbruch in der RNA-Synthese erwies sich die (Triisopropylsilyl)oxymethyl-Schutzgruppe (TOM), welche, im Gegensatz zur TBDMS-Gruppe, die Kopplungsreaktion sterisch nicht behindert und während der Synthese auch nicht wandern kann [21]. Mit dieser sehr säure- und basenstabilen Schutzgruppe wurden unter DNA-Synthesebedingungen Kopplungsausbeuten von durchschnittlich 99,5% erreicht, womit sich nun sehr lange Oligoribonukleotide (bis 140-mer) herstellen liessen.

1.2.3 Automatisierte Festphasensynthese von Oligonukleotiden

Zur Synthese von Oligonukleotiden hat sich die automatisierte Festphasensynthese weitgehend durchgesetzt. Die unterdessen hochoptimierten Reaktionsbedingungen erlauben eine sehr rasche Synthese von beliebigen Sequenzen bis zu einer Länge von ca. 150 Nukleotiden. Weltweit werden mehr als 10^7 DNA Sequenzen pro Jahr hergestellt, was einem Phosphoramiditbedarf in der Grössenordnung von 1000 kg entspricht.

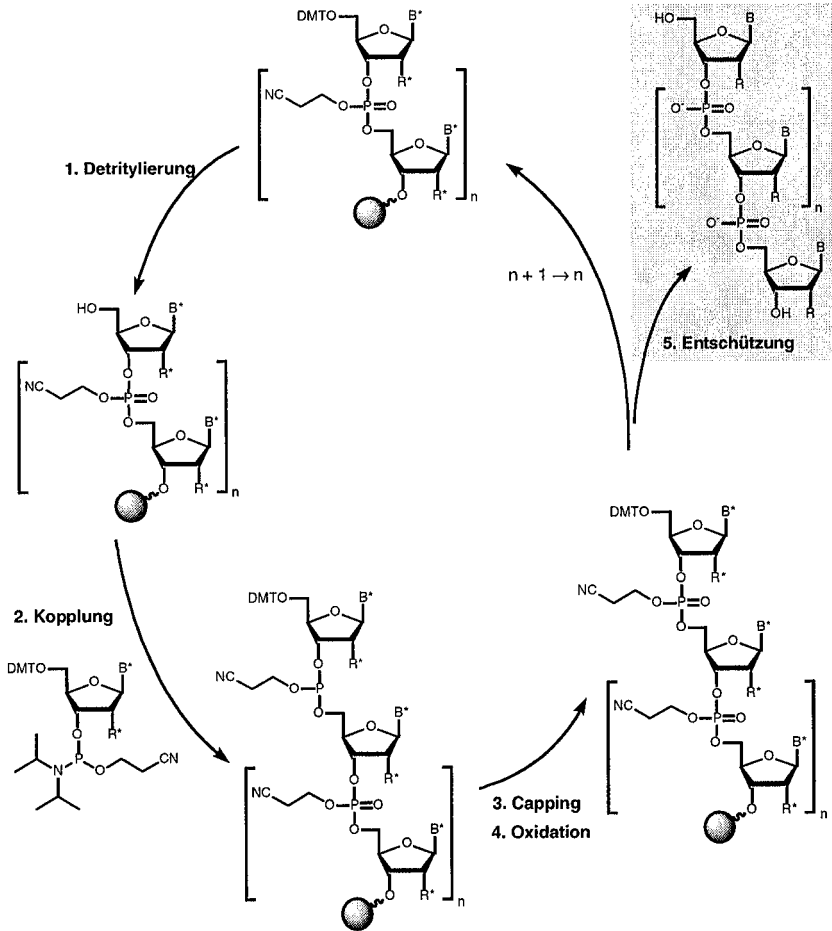
Die vollständige Automatisierung der Oligonukleotidsynthese wurde erst durch die Festphasenchemie möglich, weil mit der Immobilisierung der Sequenz auf einen Träger alle Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte nach jedem Kopplungszyklus wegfallen. Derzeit wird als Festphase *long chain alkyl amino controlled pore glass* (LCAA-CPG), ein poröses Glas verwendet, welches über einen geeigneten Linker mit dem 3'-terminalen Nucleosid verknüpft ist. Im ersten Schritt wird mit Cl_2CHCOOH die temporäre 5'-O-DMT-Gruppe entfernt. Es folgt die Kopplung mit dem Phosphoramidit-Baustein, welcher in der Anwesenheit eines 1*H*-Tetrazoles in das reaktive Tetrazolid überführt wird und mit der freien 5'-OH-Gruppe den entsprechenden Phosphitriester bildet (Schema 7). Bei der DNA-Synthese und der RNA-Synthese mit TOM-Amiditen dauert die Kopplungszeit ca. 2 min.

Um die Bildung von (n-1)-Fehlsequenzen zu unterbinden, erfolgt ein Cappingschritt, bei dem noch freie 5'-OH-Gruppen acetyliert werden. Im letzten Schritt wird der Phosphitriester zum Phosphatetriester oxidiert, üblicherweise unter der Verwendung von $I_2/Py/H_2O$. Damit ist ein Kopplungszyklus abgeschlossen und der nächste Detritylierungsschritt kann eingeleitet werden (Schema 7).

Bei jedem Detritylierungsschritt wird die Menge der abgespaltenen DMT-Kationen mittels UV-Absorption bei 498 nm bestimmt und mit jener aus den vorangegangenen Detritylierungsschritten verglichen, wodurch sich die Kopplungsausbeuten bestimmen lassen.

Bei der anschließenden Ammonolyse wird die Sequenz vom Träger abgelöst und alle basenlabilen Schutzgruppen werden entfernt. Damit ist die DNA-Synthese abgeschlossen. Bei der RNA verbleiben noch die 2'-O-Schutzgruppen, welche durch Behandlung mit Säure, Licht oder Fluoridionen entfernt werden.

Schema 7. Automatisierte Festphasensynthese



Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der automatisierten Festphasensynthese. Der Kopplungszyklus beginnt mit der Detritylierung, danach folgt die Kopplung, das Capping und dann die Oxidation.

R = H bei DNA; R = OH bei RNA; * deutet auf eine Schutzgruppe hin.

1.2.4 Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide können entweder durch HPLC oder durch Gelelektrophorese gereinigt werden. Damit eine zuverlässige Trennleistung erreicht werden kann, sollten die Oligonukleotide während dem Trennprozess denaturiert vorliegen. Je länger eine Sequenz ist, umso mehr Möglichkeiten bestehen, stabile Sekundärstrukturen auszubilden, welche oft nur schwer aufzubrechen sind, ohne die Sequenz zu zerstören.

Die Art der Reinigungsmethode hängt von der Länge der Sequenz ab. Prinzipiell können mit HPLC grössere Mengen gereinigt werden, hingegen können nur Sequenzen beschränkter Länge unter HPLC-Bedingungen denaturiert werden. Kurze Sequenzen (bis ca. 10-mere) können mit Ionenpaar-RP-HPLC gut gereinigt werden. Etwas längere Oligonukleotide (bis 25-mere) können mit Ionentauscher-HPLC bei pH 11.5¹ chromatographiert werden. Bei thermischer Denaturierung der Sequenzen, d. h. beim Erwärmen der HPLC-Säule auf ca. 85°, können noch etwas länger Sequenzen (bis ca. 50-mere) ebenfalls über Ionentauscher-HPLC gereinigt werden. Für längere Sequenzen (> 50-mere) sind die HPLC-Reinigungsmethoden oft ungenügend; diese werden deshalb über Polyacrylamid-Gele gereinigt. Die Kapazität der präparativen Gelreinigung ist nicht so gross wie jene der HPLC-Methoden, aber die Reinigung von sehr langen Sequenzen macht die Gelelektrophorese zu einem wichtigen Werkzeug in den biologischen Forschungen.

1.2.5 Charakterisierung von Oligonukleotiden

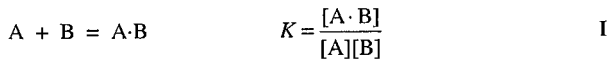
Ein wichtiges und schnelles Analyseverfahren für die synthetisch hergestellten Nucleinsäuren ist die Massenspektrometrie. Sämtliche, im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Oligonukleotide wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometern charakterisiert.

Informationen über das Paarungsverhalten von Nucleinsäuren erhält man aus UV-Übergangskurven (Schmelzkurven). Diese Methode beruht darauf, dass ungepaarte

¹ Bei hohen pH-Werten (pH 11.5) können kurze RNA-Sequenzen (< 25-mere) denaturiert werden, ohne dass innerhalb 60 min ein Strangbruch beobachtet wird.

Sequenzen einen höheren Extinktionskoeffizienten haben als gepaarte. Dieser Effekt wird als Hyperchromizität bezeichnet [2]. Wird also die UV-Absorption bei 260 nm als Funktion der Temperatur gemessen, so erhält man eine sigmoide Kurve, die sogenannte Uebergangs- oder Schmelzkurve. Die Temperatur am Wendepunkt ist als Schmelztemperatur (Schmelzpunkt, T_m) definiert. Bei dieser Temperatur liegen die Hälfte der Oligonukleotide ungepaart vor. Die Schmelztemperatur ist unter definierten Bedingungen eine charakteristische Grösse für einen bestimmten Duplex und ist abhängig von der Konzentration der Einzelstränge, vom Lösungsmittel, vom pH-Wert der Lösung und von der Art und der Konzentration zugegebener Salze.

Zudem können aus der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelzpunkte die thermodynamischen Funktionen ΔH° , ΔS° und ΔG° für die Duplexbildung berechnet werden [22]. Man geht dabei von der Gleichgewichtsreaktion der Hybridisierung von Nukleinsäuren aus mit der dazugehörigen Gleichgewichtskonstanten K .



Es gelten folgende Gleichungen:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad K = e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}} \quad \text{II, III}$$

daraus ergibt sich

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad \text{van't Hoff-Beziehung} \quad \text{IV}$$

IV aufgelöst nach $1/T$ führt zu

$$\frac{1}{T} = \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ} - \frac{R}{\Delta H^\circ} \cdot \ln K \quad \text{V}$$

Unter den Gleichgewichtsbedingungen gilt

$$K = \frac{4}{c} \quad c = \text{Einzelstrangkonzentration} \quad \text{VI}$$

VI eingefügt in V ergibt

$$\frac{1}{T} = \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ} - \frac{R}{\Delta H^\circ} \cdot (\ln 4 - \ln c) \quad \text{VII}$$

oder ausgedrückt als lineare Gleichung

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{\Delta H^\circ} (\Delta S^\circ - R \cdot \ln 4) + \frac{R}{\Delta H^\circ} \cdot \ln c \quad \text{VIII}$$

In analoger Weise gilt die Gleichungen für selbstkomplementäre Sequenzen, bei denen der Term $R \cdot \ln 4$ wegfällt.

$$\frac{1}{T} = \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ} + \frac{R}{\Delta H^\circ} \cdot \ln c \quad \text{IX}$$

Werden nun bei verschiedenen Einzelstrangkonzentrationen (c) die Schmelztemperaturen (T_m) gemessen, können die Daten in den linearisierten Formen VIII resp. IX dargestellt werden. Durch Anpassung der Geraden können aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt die thermodynamischen Funktionen ΔH° , ΔS° und ΔG° berechnet werden. Im Uebrigen wird auch CD-Spektroskopie (*Circular Dichroism*) zur Charakterisierung von Nukleinsäuren verwendet. Trotz der schwierig zu interpretierenden Spektren, lassen auch diese gewisse Schlüsse über die Struktur, insbesondere bei hybridisierten Verbindungen, zu.

1.2.6 Enzymatische Oligonukleotid-Synthese

Nukleinsäuren werden in der Natur durch DNA- resp. RNA-Polymerasen synthetisiert. Polymerasen benötigen ein Templat, d. h. einen vorgegebenen Nukleinsäurestrang, auf Grund dessen die komplementäre Sequenz im *Watson-Crick-Modus* aufgebaut werden kann. Sie verwenden Nukleotidtriphosphate für den Aufbau des entstehenden Stranges unter Abspaltung eines Pyrophosphates. Die Synthese erfolgt vom 5'- zum 3'-Ende, also in umgekehrter Richtung zum chemischen Aufbau [3].

Bei der Transkription wird mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase die DNA-Sequenz in eine komplementäre RNA umgeschrieben. Die RNA-Polymerase von *E.coli* kann ca. 40 Nukleotide pro Sekunde anfügen. Bei der Selbstreplikation wird mit Hilfe von

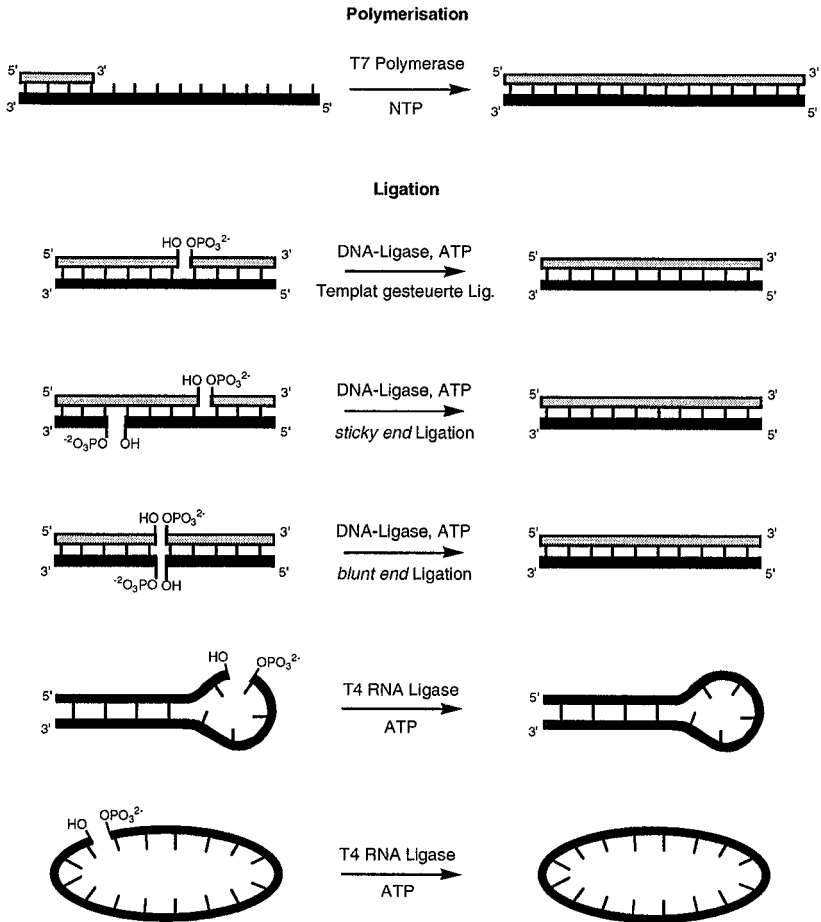
DNA-Polymerasen eine Kopie der chromosomalen DNA erstellt. Die DNA-Polymerasen brauchen als Initiator einen sogenannten Primer, d. h. eine kurze Anfangssequenz, welche mit dem Templat hybridisiert und eine freie 3'-OH-Gruppe aufweist (Figur 4). Interessanterweise sind diese Primer RNA-Sequenzen, welche anschliessend an die Replikation wieder abgespalten werden. In Retroviren gibt es die RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptasen), welche bei der umgekehrten Transkription RNA- in DNA-Sequenzen umschreiben können.

DNA-Ligasen verbinden kürzere Fragmente von Nukleinsäuren miteinander (Figur 4). Bei der Templat-gesteuerten Ligation sind beide Fragmente mit dem komplementären Gegenstrang, dem Templat, hybridisiert. Die Ligasen verbinden die 3'-OH-Gruppe des einen Fragmentes mit der phosphorylierten 5'-O-Position des anderen Fragmentes; die Aktivierung erfolgt dabei durch die Hydrolyse von ATP (Figur 4).

Doppelstränge können über *sticky ends* (klebend) oder *blunt ends* (stumpf) miteinander ligiert werden, wobei die *blunt end* Ligation wesentlich langsamer ist.

Als Gegenstück zu den Ligasen gibt es die Restriktionsenzyme, welche die DNA an sequenzspezifischen Stellen schneiden. Je nach Restriktionsenzym werden *sticky* oder *blunt ends* gebildet. Polymerasen, Ligasen und Restriktionsenzyme sind zusammen sehr wichtige Werkzeuge in der Molekularbiologie geworden.

Figur 4. Polymerase und Ligase schematisch

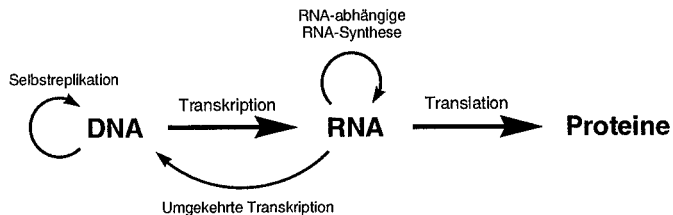


1.3 Biologische Bedeutung der Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren haben ein sehr breites Aufgabefeld und sind an vielen Prozessen und Stoffumwandlungen der Zelle direkt oder indirekt beteiligt. Aufgrund ihrer Funktion lassen sie sich in verschiedene Kategorien einteilen.

Die DNA ist im Zellkern lokalisiert und dient der Speicherung der genetischen Information. Mit der Strukturaufklärung der DNA konnte dem Gen, dessen Begriff man vorher schon lange verwendet hat, eine molekulare Grundlage zugewiesen werden. Das Gen war nun nicht mehr ein diffuser, funktioneller Begriff, sondern konnte als organisches Oligomer konkret erfasst werden.

Figur 5. Zentrales Dogma der Molekularbiologie [2]



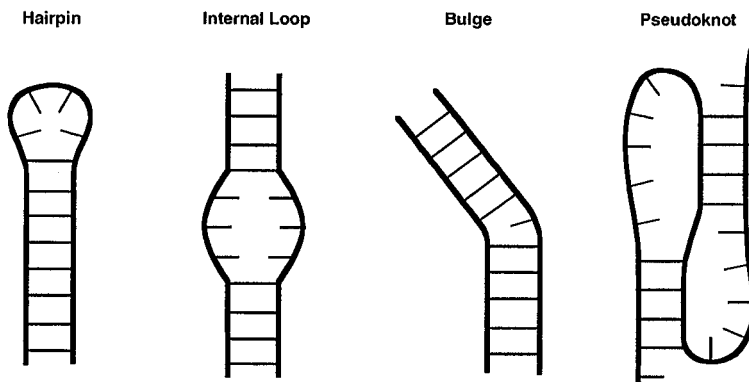
Die genetische Information der DNA liegt in der Abfolge der Nukleobasen entlang der Doppelhelix vor. Diese Sequenz-Information wird in eine entsprechende RNA-Sequenz überschrieben (Transkription), welche den Zellkern verlässt und die Information ins Endoplasmatische Retikulum zu den Ribosomen transportiert. An den Ribosomen wird die Information umgesetzt, d. h. die Nukleotidsequenz der RNA wird eine Aminosäuresequenz übersetzt (Translation), welche dann als Protein resp. Enzym eine bestimmte Aufgabe übernimmt. Die Ribosomen sind folglich die Schnittstelle zwischen Genotyp (RNA) und Phenotyp (Protein). Dieser Informationsfluss ist das zentrale Dogma der Molekularbiologie,

welches ursprünglich von *Francis Crick* vorgeschlagen [23] und mittlerweile durch weitere Erkenntnisse etwas korrigiert wurde (Figur 5) [2].

1.3.1 Funktionen der Nukleinsäuren

Die Abwesenheit der 2'-OH-Gruppe im Zuckerteil der DNA macht diese wesentlich stabiler als die RNA. Zudem ist die Nukleobase Thymin (bei DNA) im Vergleich zu Uracil (bei RNA) reaktionsträger gegenüber Nukleophilen. Vermutlich wurde die DNA als Informationsträger ausgewählt, weil sie einerseits chemisch viel stabiler und andererseits strukturell einheitlicher ist als die RNA. Die DNA liegt als helikaler Doppelstrang im Zellkern vor, während die RNA in biologischen Systemen niemals als doppelsträngige Helix vorliegt, sondern in einer Vielzahl einzigartiger Strukturelemente, welche als *Hairpins*, *Loops*, *Bulges* oder *Pseudoknots* charakterisiert werden (Figur 6). Durch diese Strukturvielfalt erreicht die RNA eine Funktionsvielfalt, welche viel komplexer ist als jene der DNA [2].

Figur 6. einige Strukturelemente der RNA

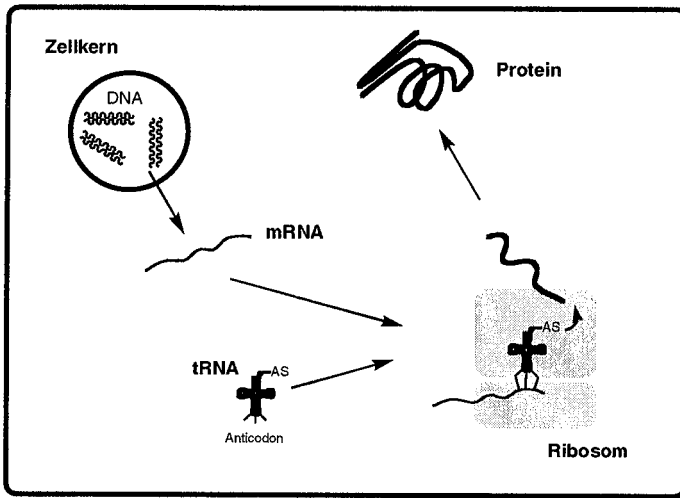


Im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese kommen drei Arten von RNA vor: die Messenger RNA (mRNA), die Transfer RNA (tRNA) und die ribosomale RNA (rRNA). Als mRNA wird die Kopie eines Genes bezeichnet, dessen Information aus dem Zellkern zu den Ribosomen gelangt. Die mRNA liegt vermutlich mehrheitlich ungepaart vor. Nachdem sie von den Ribosomen mehrfach abgelesen worden ist, wird sie von Ribonukleasen wieder abgebaut.

Die Ribosomen sind in der Lage, anhand der Basenabfolge der mRNA ein wohldefiniertes Protein zu synthetisieren. Sie bestehen einerseits aus wenigen langen RNAs (ribosomale RNA, rRNA) und andererseits aus zahlreichen, kleinen Proteinen. Die *E.coli* Ribosomen haben eine Masse von 2.5×10^6 D, davon besteht zwei Drittel aus RNA und ein Drittel aus Proteinen. Die Peptide sind rund um die rRNA als strukturstabilisierendes Gerüst angeordnet. Die Gesamtstruktur setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, welche selbst wieder ein sehr komplexes Gefüge verschiedenster Strukturelemente darstellen. Interessanterweise ist beim katalytischen Zentrum der Ribosomen, also dort, wo die Peptidbindungen gebildet werden, ausschliesslich RNA und kein Protein vorhanden, was bedeutet, dass die Bildung der Peptidbindungen durch die RNA selbst katalysiert wird [24]. Jeweils drei Nucleobasen der mRNA bilden ein Codon, welches eine spezifische Aminosäure des entstehenden Peptides definiert. Das Codon wird von einer tRNA erkannt, welches mit der entsprechenden Aminosäure beladen ist. Die Aminosäure wird über die tRNA zum Ribosom transportiert und kann dort an das wachsende Peptid angeknüpft werden (Figur 7).

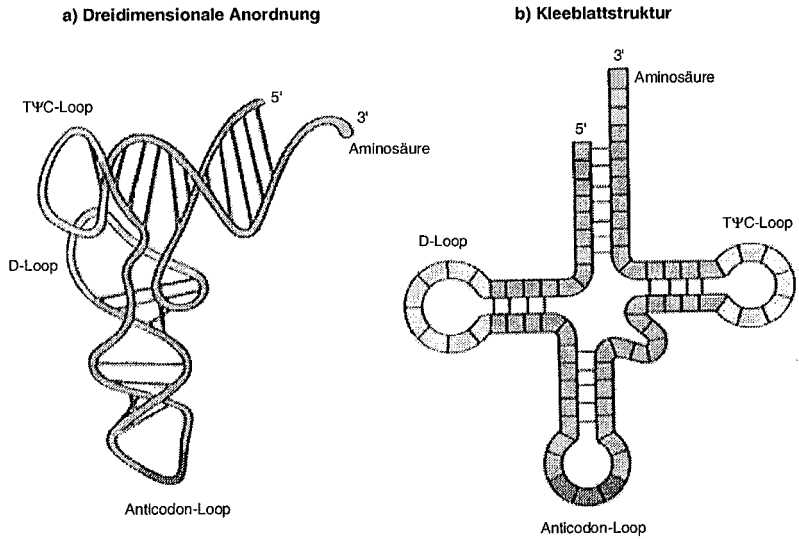
tRNAs sind kompakte, gefaltete Einzelstränge mit einer Länge von 60 - 95 Nucleotiden. Ihre Strukturen sind sehr detailliert untersucht worden. Die Sekundärstruktur wird aufgrund ihrer drei *Stem-Loop*-Motive als Kleeblattstruktur bezeichnet (Figur 8). Durch weitere Faltung entsteht eine stabile, dreidimensionale L-förmige Struktur (Tertiärstruktur), die allen tRNAs gemeinsam ist. Obwohl die Sequenzen der tRNAs stark variieren, gibt es konservierte Regionen, an denen immer die gleichen Nucleotide vorhanden sind.

Figur 7. Schematischer Ablauf der Genexpression einer Zelle



Der Anticodon-Loop hybridisiert bei der Translation mit dem Codon der mRNA. Die Aminosäure ist mit der 3'-OH-Gruppe am Akzeptorstamm verestert.

Bei der Genexpression kommen den Nukleinsäuren also drei zentrale Funktionen zu: Informationsspeicherung, Informationsübertragung und die definierte Bildung von Peptidbindungen.

Figur 8. Tertiär- und Sekundärstruktur der tRNA

1.4 Aptamere

Dank den vielfältigen Strukturen, welche RNA ausbilden kann, sind die Ribonukleinsäuren in der Lage, kleine organische Moleküle zu erkennen und zu binden.

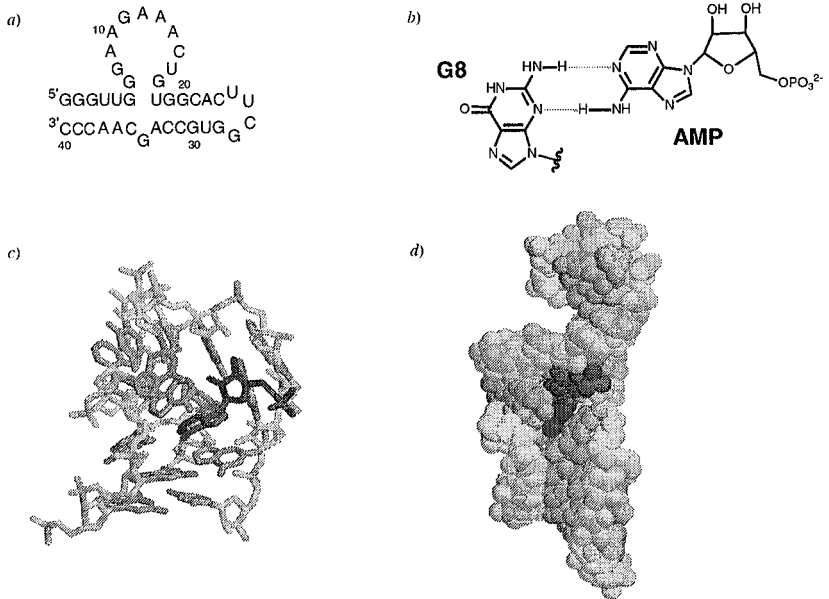
Solche Ligand-bindenden RNA-Sequenzen werden als RNA-Aptamere bezeichnet. In den letzten zwölf Jahren sind viele Aptamere beschrieben worden, deren Strukturen zum Teil aufgeklärt worden sind [25] [26]. In neuerer Zeit wurden auch DNA-Aptamere gefunden; ihre Zahl ist geringer und ihre Strukturen sind kaum bekannt.

Die Art der Liganden ist vielfältig. Gewisse Aptamere binden Nukleosid-Derivate wie Adenosinmonophosphat (AMP) oder Kofaktoren wie Flavinmononukleotid (FMN); es sind Aptamere bekannt, die Aminosäuren komplexieren, oder solche, die Antibiotika wie Tobramycin oder andere organische Moleküle wie Theophyllin binden [25] [26].

Aptamere können durch das SELEX-Verfahren (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) gefunden und isoliert werden [27] [28]. Dieses Selektionsverfahren erlaubt ein simultanes *Screening* von 10^{15} verschiedenen RNA-Sequenzen. Aus diesem zufälligen Pool können z. B. mittels Affinitätschromatographie jene RNA-Sequenzen selektioniert werden, welche mit dem Liganden interagieren. Die selektionierten Sequenzen werden durch Reverse Transkriptasen in komplementäre DNA umgeschrieben, mittels PCR vervielfältigt und dann durch *in vitro* Transkription in RNA zurückgeschrieben. Dieser Zyklus wird 6 bis 10 mal wiederholt, bis ca. ein Drittel aller noch vorhandenen RNA-Sequenzen mit dem Liganden binden. Der verbleibende Pool wird kloniert und sequenziert. Aus den verschiedenen Sequenzen werden die konstanten Regionen herausgelesen und daraus die Konsensus-Aptamersequenz bestimmt.

1.4.1 AMP bindendes RNA-Aptamer

Szostak & Sazanfar [29] beschrieben 1993 das AMP bindende RNA-Aptamer, welches eine 40-mere RNA-Sequenz darstellt, die AMP mit einer Bindungskonstanten im μM -Bereich bei RT und $\text{pH} = 6.7$ bindet.

Figur 9. AMP bindendes Aptamer

- a) Sekundärstruktur.
 b) H-Brücken-Bindungsmuster.
 c) 3D-Anordnung der Bindungstasche.
 d) Spacefilling Modell der Gesamtstruktur.

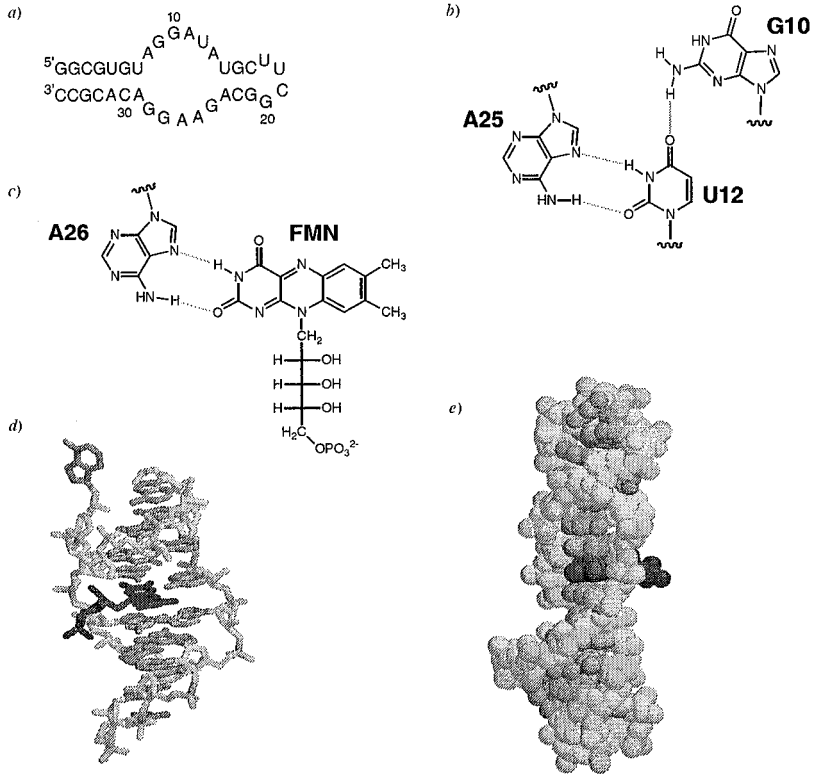
Die Sekundärstruktur der RNA-Sequenz ist ein Hairpin, mit einem zusätzlichen, asymmetrischen *Internal Loop* im Stamm. Der *Internal Loop* des Aptamers bildet eine Bindungstasche aus, in welcher das AMP gebunden werden kann. Die Nukleobase des AMP ist zwischen die Basen A10 und G11 hineingeschoben und bildet auf der *Watson-Crick*-Seite zwei H-Brücken mit der *minor groove*-Seite des G8. Die Bindung des Aptamers mit AMP ist also auf hydrophobe Interaktionen (*Stacking*) und Wasserstoffbrücken mit den

Nukleobasen zurückzuführen (Figur 9). Eine NMR-Struktur dieses AMP-Aptamers wurde von *Patel et al.* bestimmt [26, 30].

1.4.2 FMN bindendes RNA-Aptamer

Famulok & Burgstaller beschrieben 1994 das FMN-bindende RNA-Aptamer [27]. Bei diesem wird eine für RNA-Aptamere sehr starke Bindung auf mit einer Affinitätskonstanten von $0.5\mu\text{M}$ (bei 150mM NaCl , 4mM Mg^{2+} und $\text{pH} = 6.5$) gefunden. Auch von diesem Aptamer ist eine NMR-Struktur von *Patel et al.* vorgeschlagen worden [26, 30]. Die 35-Nukleotid lange RNA-Sequenz bildet einen *Internal Loop* aus, analog zum AMP-Aptamer (Figur 10). Der fast symmetrische *Loop* weist keine präorganisierte Bindungstasche auf, diese wird erst durch Komplexieren des Substrates ausgebildet. Durch das Interkalieren des FMN wird die Helix verdrillt und aufgeweitet. Dabei werden neue, nicht kanonische Paarungen, unter diesen ein Triplet (G10-U12-A25) ausgebildet (Figur 10). Das FMN selber ist durch zwei H-Brücken an die *Hoogsteen*-Seite des A26 gebunden. Letztendlich wird über den ganzen Komplex ein durchgehendes π -*Stacking* ausgebildet, was ihn thermodynamisch stabilisiert.

Figur 10. FMN bindenes RNA-Aptamer



- a) Sekundärstruktur.
- b) Basentriplel.
- c) H-Brücken-Bindungsmuster.
- d) 3D-Anordnung der Bindungstasche.
- e) Spacefilling Modell der Gesamtstruktur.

1.5 Ribozyme

1.5.1 Einleitung

RNA kann, neben den Funktionen wie Informationsspeicherung (Retroviren), Informationsübertragung (mRNA) oder Erkennung von kleinen Molekülen (Aptameren), analog zu Enzymen, chemische Reaktionen katalysieren, was vor rund 20 Jahren erstmals entdeckt wurde [31]. Solche katalytisch aktiven RNA-Strukturen werden als Ribozyme bezeichnet.

Cech et al. haben gezeigt, dass in viroiden Zellen während der *rolling circle*-Replikation der pathogenen RNA die replizierte, einzelsträngige RNA (*single strand* RNA, ssRNA) an hoch spezifischen Stellen geschnitten und wieder zusammengeführt wird (*splicing*) [32]. Dieses *splicing* erfolgt ohne die Anwesenheit von Enzymen. Es handelt sich um eine intramolekulare Reaktion, welche durch die RNA selbst katalysiert wird [33, 34]. Dabei findet nur eine Spaltung und eine Ligation pro katalytische Einheit statt (*cis acting*). Später wurde diese funktionelle RNA-Einheit in einen wirklichen Katalysator mit einem mehrfachen Umsatz umgewandelt (*trans acting, turnover* Reaktion).

Mittlerweile sind einige natürlich auftretende RNA-Motive bekannt, wie das Hammerhead-Ribozym [35], das Hairpin-Ribozym [36], das Hepatitis Delta Virus-Ribozym [37] oder das Group I Intron- und das Group II Intron-Ribozym [33]. Prinzipiell sind auch die Ribosomen Ribozyme, denn obwohl sie z. T. aus Proteinen bestehen, ist in der Kernregion nur RNA vorzufinden, was bedeutet, dass der zentrale Schritt der Proteinsynthese durch RNA katalysiert wird.

Neben den natürlich vorkommenden Ribozymen wurde mittels SELEX-Verfahren eine grosse Anzahl artifizieller Ribozyme entdeckt, welche eine Vielzahl anderer Reaktionen katalysieren [27] [38] [39]. *Szostak & Chapman* beschreiben Ribozyme, welche 5'-5'-Ligationen katalysieren [40]. Andere Ribozyme können RNA phosphorylieren, Peptide spalten oder die Bildung neuer Peptidbindungen katalysieren [41] [42]. Bei diesen Ribozymen wird die Substratspezifität jeweils durch Basenpaarung kontrolliert. Es sind

Ribozyme gefunden worden, welche kleine organische Moleküle binden und dann eine Reaktion katalysieren, wie die Isomerisierungsreaktion eines überbrückten Biphenyls [43]. Zu erwähnen ist auch das Iso6-G Ribozym, welches zwei GTPs als Substrate erkennt und zu einem symmetrischen Phosphodiester verknüpfen kann [44]. Die Reaktionstypen, welche von artifiziellen Ribozymen katalysiert werden, beschränken sich aber nicht nur auf Reaktionen die in der Biologie ablaufen, sondern auch auf solche, welche typischerweise dem Chemiker vorbehalten sind. Zu diesen gehören Alkylierungsreaktionen unter Substitution eines Halogenides [45] oder eine *Diels-Alder* Reaktion [46]. *Schultz et al.* beschreiben ein 35-meres Ribozym, welches ein Cu(II) in ein Mesoporphyrin insertiert [47]. Die RNA bleibt wegen der Diversität in ihren Eigenschaften und Funktionen deshalb einzigartig unter den biologischen Makromolekülen und ist in ihrer Vielfältigkeit nicht zu übertreffen.

Die Entdeckung der Ribozyme liess die Theorie der "RNA Welt" entstehen. Die "RNA-Welt"-Theorie versucht das Leben zu beschreiben, wie es möglicherweise war, bevor die Proteine resp. Enzyme die biochemischen Reaktionen katalysierten [48] [49]. Damals könnten alle Reaktionen durch RNA katalysiert worden sein. Als Verbindungsklasse, welche gleichzeitig die Möglichkeit zur Selbstreplikation und zur Katalyse aufweist, gilt RNA deshalb als das zentrale Molekül in der Entwicklungsgeschichte, durch welches ein Leben erst möglich wurde. Man geht beispielsweise davon aus, dass die Ribosomen ursprünglich ausschliesslich aus RNA aufgebaut waren und dass die ribosomalen Proteine im Lauf der Evolution hinzugekommen waren.

Heute werden die meisten biologischen Stoffumwandlungen durch Enzyme katalysiert. Enzyme sind viel effizientere Katalysatoren als Ribozyme. Sie haben eine sehr hohe Substratspezifität und können viel komplexere Reaktionen katalysieren als RNA. Der Grund für die überlegenen katalytischen Eigenschaften liegt in der Vielfalt der funktionellen Gruppen der Aminosäuren. So sind in der katalytisch aktiven Stelle der Enzyme oft Aminosäuren wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Lysin, Arginin oder Cystein anzutreffen, welche das ganze pK-Spektrum um den physiologischen pH-Bereich abdecken. Es gibt geladene, hydrophile aber auch sehr hydrophobe Aminosäuren wie Phenylalanin

oder Leucin. Dieses breite Spektrum an unterschiedlichen funktionellen Gruppen macht die Proteine zu wesentlich effizienteren Katalysatoren als die Nukleinsäuren [50].

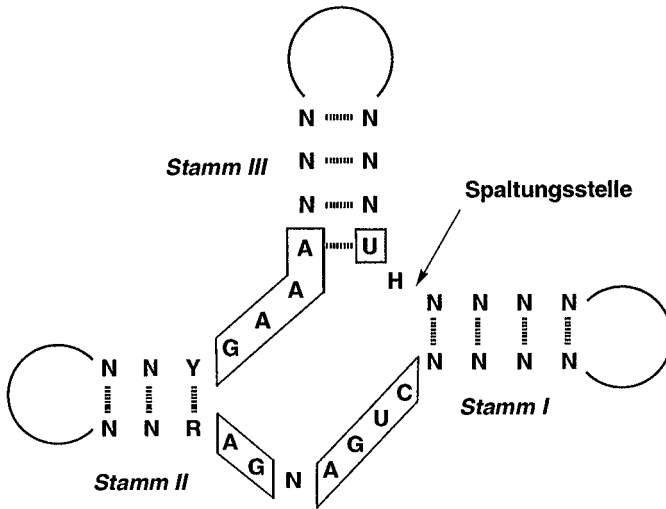
1.5.2 Hammerhead-Ribozym

Das Hammerhead-Ribozym wurde ursprünglich als *cis*-spaltende zirkuläre RNA in pathogen befallenen Zellen gefunden (*rolling circle replication*) [33]. Das Ribozym spaltet eine Phosphoresterbindung unter Ausbildung eines 2',3'-Cyklophosphates und einer freien 5'-OH-Gruppe. Die Reaktion benötigt zweifach geladene Metallionen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktoren [51].

Seine Struktur besteht aus drei Stammregionen und weist im Kern eine hochkonservierte Region auf. Stämme I und II sind zwei kurze Hairpins von ungefähr 20 Nukleotiden. Die für das Virus kodierende RNA ist über den Stamm III als Makrocyklus verbunden [52].

Das Hammerhead-Ribozym wurde in ein minimales Konstrukt transformiert, welches als *trans*-spaltendes Ribozym die Eigenschaften eines wirklichen Katalysators hat [35] [52]. Das Hammerhead-Konstrukt ist mit ca. 35 Nukleotiden das kleinste bekannte Ribozym und kann über die Festphasensynthese mit allen gewünschten Basenmodifikationen hergestellt werden (Figur 11). Als Substrate dienen Sequenzen, welche komplementär zu den Stämmen I und III sind. Die Länge der Stammsequenzen wurde so optimiert, dass die Bindung des Substrates und die anschließende Ablösung der Produktsequenzen den Anforderungen einer katalytischen Reaktionsführung gerecht werden.

Figur 11. Allgemeine zweidimensionale Darstellung des Hammerhead-Ribozyms [52]

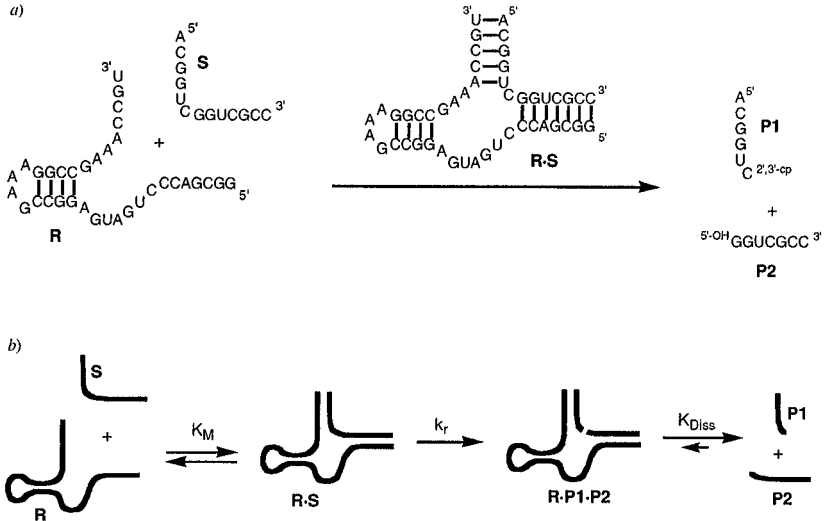


N = Nichtkonserviertes Nucleosid; R = Purin; Y = Pyrimidin; H = Adenin, Cytosin oder Uracil.

1.5.3 Spaltungsreaktion

Die Spaltungsreaktion weist eine *Michaelis-Menten* Kinetik auf. Das Substrat bildet vorerst zusammen mit dem Ribozym einen R-S-Komplex, was durch die Gleichgewichtskonstante K_m beschrieben wird [53]. Im zweiten Schritt wird das Substrat gespalten, unter Ausbildung eines 2',3'-Cyclophosphates auf der einen und einer 5'-OH-Gruppe auf der anderen Seite der gespaltenen Bindung. Anschliessend werden die beiden kurzen Produktsequenzen vom Ribozym abgelöst und dadurch der Katalysator für den nächsten Zyklus freigesetzt.

Figur 12. Spaltungsreaktion eines Hammerhead-Ribozyms



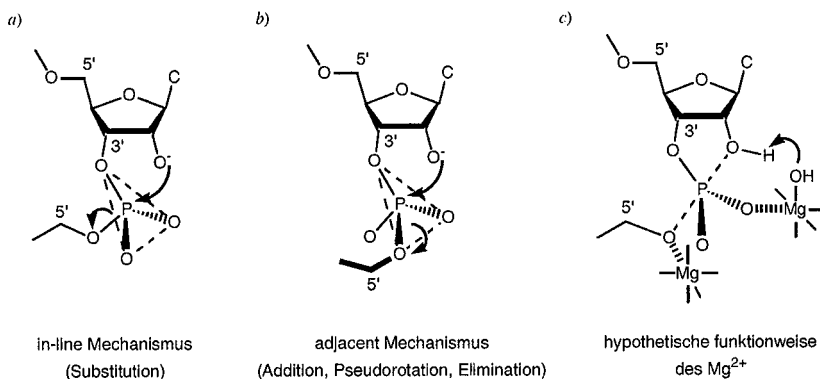
- a) Reaktionsdarstellung in der Sekundärstruktur-Form. **R** ist das Ribozym, **R-S** der Ribozym-Substrat-Komplex, **P1** und **P2** sind die Produkte.
- b) Darstellung eines einfachen kinetischen Modelles der Ribozymspaltung.

Als Kofaktor benötigt die Spaltungsreaktion zweiwertige Metallionen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} etc.) [51], welche teilweise in der katalytischen Kernregion gebunden sind. Ihre Rolle ist aber nicht bis ins Detail bekannt [54]. Auch der Reaktionsmechanismus konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden [37] [55]. Bekannt ist, dass ein nukleophiler Angriff auf das Phosphat erfolgt, welcher mit der Deprotonierung der 2'-OH-Gruppe einhergeht. Einige Experimente deuten darauf hin, dass es sich um einen *in-line* Mechanismus handelt (S_{N2} -artig), der über einen trigonalen bipyramidalen Phosphor als Uebergangszustand verläuft. Es

gibt auch andere Hinweise für einen *adjacent* Mechanismus, welcher eine *pseudo*-Rotation an pentakoordinierten Phosphor verlangt (Schema 8) [56].

Das Mg^{2+} koordiniert möglicherweise an die Phosphatgruppe und wirkt in der Form von $[Mg^{2+}(OH)^-]$ als Base, bei der die 2'-OH-Gruppe deprotoniert wird [57] [55]. Ebenfalls kann es als *Lewis*-Säure an die 5'-O-Position koordinieren und so die P-O-Bindung polarisieren, wodurch die Elektrophilie am Phosphor erhöht wird [37]. Zudem haben zweiwertige Metallionen einen stabilisierenden Effekt auf die Gesamtstruktur, da sie die negativen Ladungen am Rückgrat gut kompensieren können.

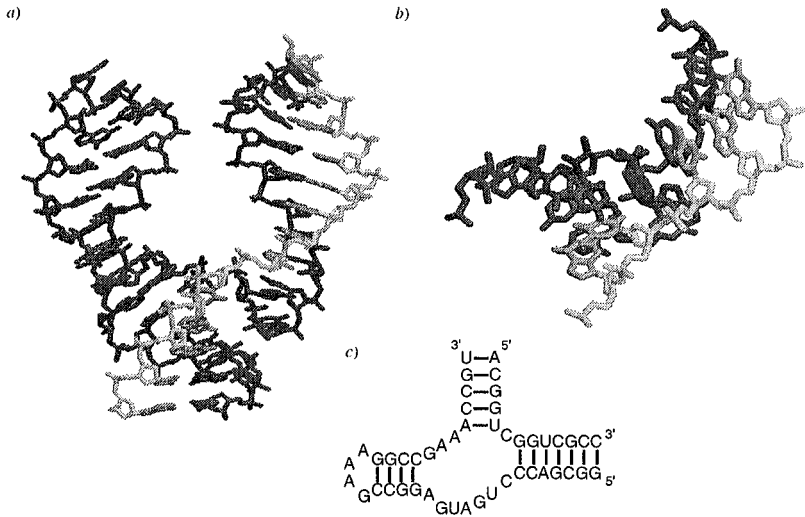
Schema 8. Mögliche Mechanismen der Spaltung



1.5.4 Struktur des Hammerhead-Ribozyms

Zwei Konstrukte des Hammerhead-Ribozymes sind kristallisiert [58] und ihre Röntgenstrukturen bestimmt worden (Figur 13) [59]. Als Substrat wurde eine entsprechende nicht spaltbare DNA-Sequenz kokristallisiert. Die Gesamtstruktur hat die Form eines Gabelbeines (*wishbone shape*). Das Rückgrat der Substrat-Sequenz ist an der Spaltungsstelle weit auseinander gedreht, so dass die zu spaltende Bindung in einer präorganisierten Lage angeordnet ist (*transition state minimization*).

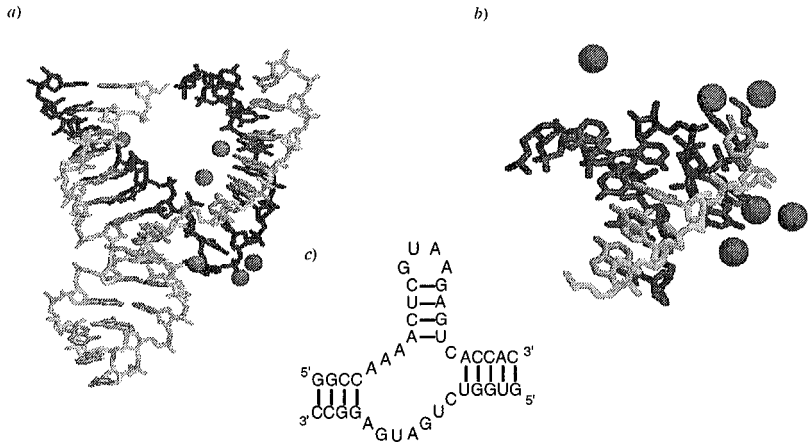
Figur 13. Kristallstruktur des Hammerhead-Konstruktes von *McKay* [59]



- a) Kristallstruktur von *McKay*.
 b) Ausschnitt aus dem Kern der Struktur.
 c) Sekundärstruktur des Hammerhead-Ribozymes

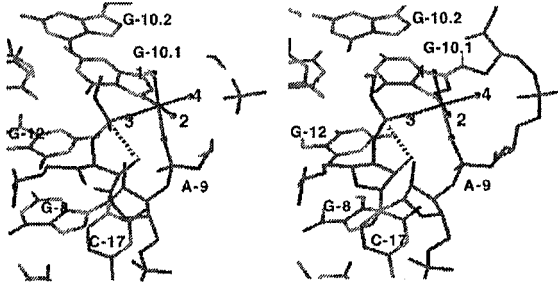
Scott et al. haben die Struktur eines anderen Hammerhead-Konstruktes aufgeklärt (Figur 14) [60] [56]. Dieses setzt sich aus einem 25-meren Substrat und einer 16-meren Ribozymsequenz zusammen. Bei beiden handelt es sich um RNA-Sequenzen. Mit Hilfe von Modellrechnungen wurden sechs Metallbindungsstellen gefunden [61]. Vier davon befinden sich relativ nahe am katalytischen Zentrum. Trotz diesen Metallbindungsstellen lassen sich noch keine definitiven Schlüsse über den Reaktionsmechanismus ziehen, aber die Beteiligung von mehreren Metallionen während der Bindungsspaltung ist nicht ausgeschlossen.

Figur 14. Kristallstruktur des Hammerhead-Konstruktes von *Scott* [60] [56]



Es wird angenommen, dass die Kristallstruktur nicht die effektive Struktur der reaktiven Form darstellt, sondern in einer Grundzustands-Konformation vorliegt, die sich während der Reaktion ändert. *Murray & Scott* haben kürzlich anhand von Berechnungen eine Metallbindungsstelle im katalytischen Zentrum vorgeschlagen, bei der das Metallion direkt mit der zu spaltenden Phosphatgruppe im Uebergangszustand koordiniert ist [61].

Figur 15. Stereodarstellung einer Metallbindungsstelle

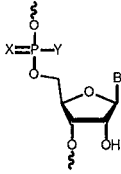


1.6 Modifizierte Nucleinsäuren

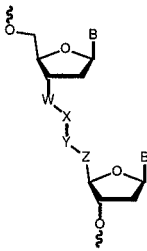
Sowohl in der Forschung als auch für therapeutische Zwecke in der Medizin sind neben den natürlichen auch unnatürliche und modifizierte Nucleinsäuren von grossem Interesse. Beim Antisense-Konzept, bei welchem durch Hybridisierung einer mRNA mit einer kurzen Sequenz eines komplementären Gegenstranges die Expression eines unerwünschten Gens ausgeschaltet werden soll, werden beispielsweise Nucleinsäuren untersucht, welche über ein modifiziertes Rückgrat verfügen, damit sie von Nucleasen nicht verdaut werden können. Gut bekannt sind die Phosphothioat- resp. die Phosphodithioat-Analogen oder die Methylphosphonat-Oligonucleotide, welche von Nucleasen nicht hydrolysiert werden [2]. Eine vielfältige Palette von 2'-O-substituierten RNA-Analogen sind bekannt. Diese reichen von Alkyl-, Allyl- über Alkyloxyethyl- bis zu 2'-desoxygenierten, 2'-Fluoro- oder 2'-Aminoderivaten [62] [63] [64].

Weiter bekannt sind Modifikationen, bei denen das Phosphatrückgrat vollständig durch eine andere Gruppen ersetzt ist (Schema 9). *Rozners & Strömberg* beschreiben Amid-verbrückte Nucleotide [65], welche eine gute Hybridisierung mit einer komplementären RNA aufweisen. Ebenso können die vinylphosphonat-verbrückten Analogen von *Soultanas et al.* stabile Duplexe ausbilden [66]. Eine Palette von Rückgratmodifikation wie Amide, Thiocarbamate, Carbamate, Harnstoffe oder Ketone wurde von *De Mesmaeker et al.* beschrieben [67]. *Imbach et al.* untersuchte die Paarungseigenschaften von α -anomeren Nucleinsäuren [68] [69].

Schema 9. Rückgratmodifikationen



X	Y	
O	O	RNA
O	S	Phosphorthioat
S	S	Phosphordithioat
O	CH ₃	Methylphosphonat



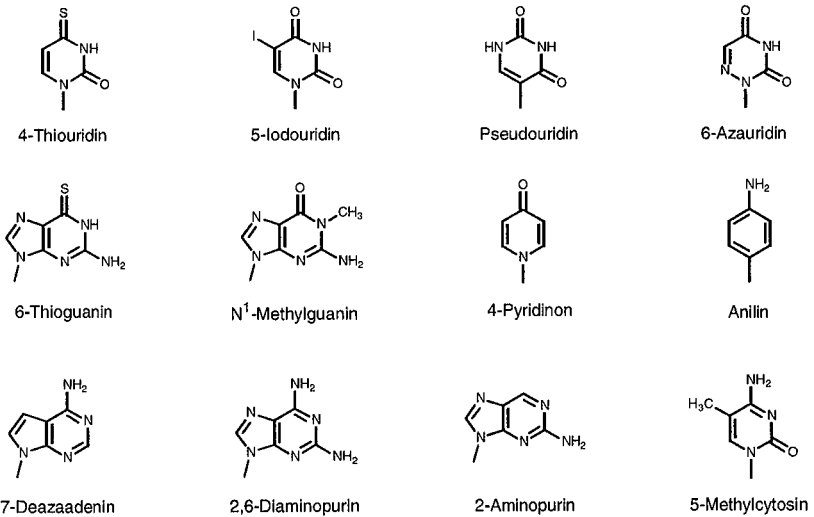
W	X	Y	Z	
CH ₂	CO	NR	CH ₂	Amid
CH ₂	CH ₂	NR	CO	Amid
S	CO	NR	CH ₂	Thiocarbamat
NR	CO	O	CH ₂	Carbamat
NR	CO	NR	CH ₂	Harnstoff
CH ₂	CH ₂	CO	CH ₂	Keton
O	PO ₂	CH	CH	Vinylphosphonat

Vielfältige Modifikationen gibt es auch bei den Nucleobasen. Es wurden Nucleobasen eingebaut, die strukturell nur geringfügige Änderungen gegenüber den natürlichen aufweisen, wie z. B. die Substitution von Sauerstoff durch Schwefel. Entscheidend für die Duplexbildung ist, dass die *Watson-Crick*-Basenpaare weiterhin ausgebildet werden können, was die Funktionalisierung auf der *Watson-Crick*-Seite einschränkt. Hingegen konnte durch die Einführung von 2,6-Diaminopurin (D) anstelle von Adenin (A) eine erhöhte Duplexstabilität festgestellt werden, da das Basenpaar D·T nun drei Wasserstoffbrücken ausbilden kann [70].

Beigelmann et al. versuchten durch Basenmodifikation in der Kernregion die katalytische Aktivität des Hammerhead-Ribozymes zu beeinflussen [71]. Dabei zeigte das 6-Aza-uridin anstelle eines Uridins ein k_{rel} von 0.06, was also die Spaltungsreaktion vollständig hemmte. Ein wesentlich aktiveres Ribozym hat er mit dem Pyridin-4-on gefunden, welches ein k_{rel} von 10.5 besitzt (Schema 10).

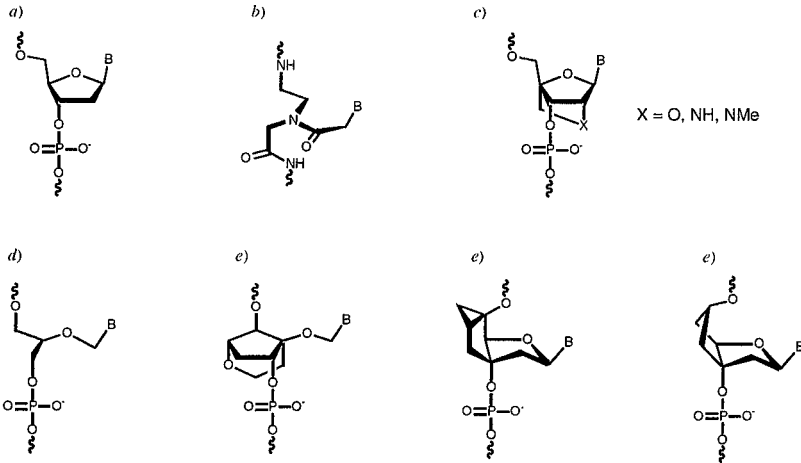
Pfleiderer & Maurinsh verwendeten Lumazine als Nukleobasen, welche zum Uracil analoge H-Brücken Donoren und Akzeptoren aufweisen [72]. Das gegenüber Uracil erweiterte π -System des Lumazins hat fluoreszierende Eigenschaften.

Schema 10. Basenmodifikationen



Komiyama et al. haben eine Methode entwickelt, mit welcher beliebige funktionelle Gruppen in einen Einzelstrang eingebaut werden können [73]. Dabei wird ein nichtnukleosidischer, vorfunktionalisierter Phosphoramiditbaustein in die DNA-Sequenz eingefügt, der eine nichtbasische Stelle erzeugt und über einen Benzylester verfügt, der nach der Festphasensynthese mit primären Aminen zu den entsprechenden Amiden umgesetzt werden kann. Auf diese Art konnten verschiedene kleine organische Moleküle wie z. B. Fluoresceine in eine DNA-Sequenz eingebaut werden.

Schema 11. Spezielle Rückgrate



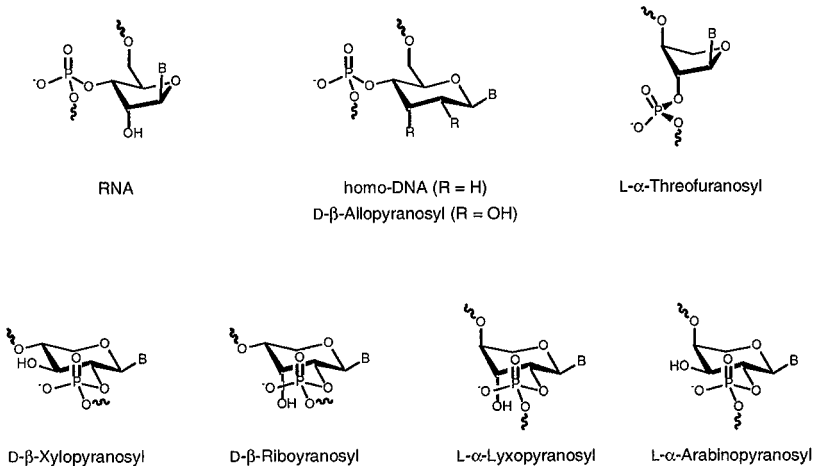
- a) RNA.
- b) PNA (Peptide Nucleic Acids).
- c) INA (Locked Nucleic Acids).
- d) Glycerol-Rückgrat.
- e) Bi- und Tricyclorückgrat.

Benner & Schneider untersuchten das acyclische Zuckersystem der Glycerol-DNA [74]. Dieses Paarungssystem paarte nicht mehr zuverlässig. In der Folge stellten *Leumann & Keller* Bi- resp. Tricyklooligonukleotide her (Schema 11 d, e) [75]. Diese haben ein starres, präorganisiertes Rückgrat, welches stabile Duplexe ausbilden kann. Die von *Wengel & Koshkin* beschriebenen LNAs (*locked nucleic acids*), haben ebenso ein sehr starres bicyclisches Zuckergestüt (Schema 11 c) [76]. Sie hybridisieren gut sowohl mit DNA als auch RNA und sind äusserst stabil gegenüber Nukleasen. Im Weiteren wurde mit der Entdeckung der PNA (*peptid nucleic acid*) herausgefunden, dass unter Umständen auch das ganze Zucker-Phosphat-Gerüst durch etwas anderes ersetzt werden kann (Schema 11 b) [77].

1.6.1 Alternative Paarungssysteme

Die Arbeitsgruppe von *Eschenmoser* befasst sich mit der Ethologie der Nukleinsäuren und untersuchte deshalb systematisch ein breites Spektrum an Oligonukleotiden mit unterschiedlichen Zuckergerüsten [78] [79] [80]. Dabei sind viele alternative Paarungssysteme gefunden worden, die z. T. stärkere Duplexe ausbilden als RNA. *Eschenmoser et al.* hatten bei den Pentopyranosyl-Oligonukleotiden, im Gegensatz zu RNA, ausschliesslich antiparallele Paarung gefunden [81]. Zudem wurde festgestellt, dass der Inklinationwinkel zwischen dem Rückgrat und den Nucleobasen mit dem *Interstrand Stacking* korreliert und damit als weiterer nützlicher Parameter zur Beschreibung der Paarungseigenschaften von Oligonukleotiden dient [82].

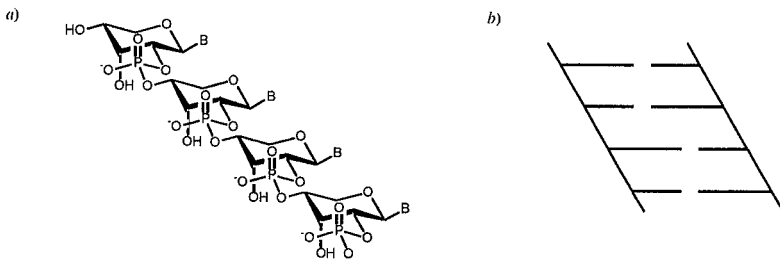
Schema 12. alternative Paarungssysteme von *Eschenmoser et al.* [78] [79] [80]



Kreuzungsexperimente haben gezeigt, dass die pyranosyl-RNA (*pRNA*) nicht mit der natürlichen RNA paart. Damit haben *Eschenmoser et al.* ein autonomes Paarungssystem

gefunden, das einerseits wesentlich stärkere Duplexe ausbildet als RNA und andererseits nicht mit ihr interagiert. Die idealisierte Konformation der *p*RNA weist eine quasi-lineare Struktur auf. Aus der NMR-Lösungsstruktur ergab sich eine geringe Abweichung von der idealisierten Form, bei welcher der Duplex etwas verdreht ist und mit 18 bis 19 Basen pro Umdrehung eine sehr langgezogene Helix ausbildet [83].

Schema 13. Darstellung der *p*RNA



a) idealisierte Darstellung der *p*RNA.

b) Inklination zwischen den Basenpaaren und dem Rückgrat.

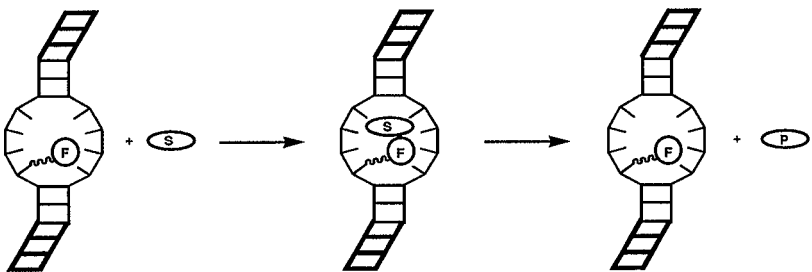
Neulich haben *Eschenmoser et al.* auch TNA (*threonyl nucleic acid*) hergestellt und ihr Hybridisierungsverhalten untersucht [80] [84]. Diese Klasse von Nucleinsäuren hat soweit das strukturell einfachste Zuckergerüst und kommt deshalb als alternativer Informationsträger bei der präbiotischen Chemie in Frage. TNA bildet starke Duplexe aus, welche ähnlich stabil sind wie jene der RNA. Im Weiteren kann die TNA, in einem *intersystem-crosspairing*, auch Duplexe mit DNA ausbilden, jedoch mit etwas geringerer Stabilität als DNA/DNA.

2 Darstellung des Projektes

2.1.1 Einführung

Mit den verschiedenen Strukturelementen der Nukleinsäuren lassen sich die vielfältigsten dreidimensionalen Architekturen aufbauen, die z. B. als Aptamere Verwendung finden. Aptamere bieten kleinen organischen Molekülen Raum, in welchem sie in einer wohldefinierten Anordnung erkannt und gebunden werden können. Die Komplexbildung beruht auf schwachen Wechselwirkungen, wie z. B. H-Brücken, π -Stacking oder Salzbrücken. Das Substrat wird spezifisch erkannt und in der hochchiralen RNA-Struktur aufgrund gerichteter funktioneller Gruppen gebunden. Diese Art der molekularen Erkennung wollten wir nutzen, um über RNA-Substrat-Komplexe chemische Reaktionen am Substrat in einer stereospezifischen Weise zu katalysieren.

Figur 16.



Schematische Darstellung der Funktionsweise katalytisch aktiver Oligonukleotid-Strukturen. F ist eine katalytisch aktive Gruppe. Das Substrat S wird von der hochchiralen Oligonukleotidstruktur gebunden und zum Produkt P umgesetzt.

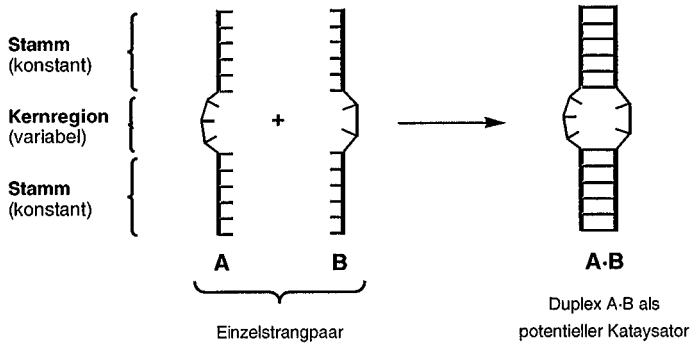
Wir wollten RNA-Strukturen aufbauen, die für die Katalyse einen geeigneten Reaktionsraum ausbilden können, indem sie das Substrat derart umschliessen, dass dieses nur noch aus einer wohldefinierten Richtung seinen Reaktionspartnern zugänglich gemacht wird. Die für die Reaktivität notwendigen funktionellen Gruppen wollten wir zusätzlich an den RNA-Substrat-Komplex anfügen, entweder durch kovalente Bindung an die RNA-Struktur oder als Kofaktor, welcher über nicht kovalente Bindungen vom Katalysator gebunden wird (Figur 16).

Die Art der chemischen Reaktion hatten wir soweit nicht festgelegt. Wichtig war, dass es sich um eine Reaktion handelte, die in wässrigem Milieu durchgeführt werden kann und bei der die RNA unverändert bleibt. Auch beim Substrat hatten wir uns noch für kein konkretes Molekül entschieden. Die laufend neu gewonnen Erkenntnisse über Aptamere und ihre Wechselwirkungen zu Substraten haben uns aber bei der Wahl von geeigneten Substraten weitergeholfen.

2.1.2 Konzept und Fragestellung

Wir beabsichtigten, solche potentiell katalytisch aktiven RNA-Strukturen kombinatorisch herzustellen. Um schnell eine grosse Vielfalt unterschiedlicher RNA-Strukturen zu erhalten, wollten wir sie aus zwei Einzelsträngen A und B aufbauen (Figur 17). Diese paaren miteinander und bilden so als Duplex A·B den entsprechenden Reaktionsraum aus. Die Enden aller Einzelstrang-Paare wollten wir mit den gleichen komplementären Stammsequenzen herstellen und nur die Sequenz der Kernregion variieren. So können beliebige Einzelstränge miteinander kombiniert und rasch eine Vielzahl unterschiedlicher Konstrukte aufgebaut und getestet werden. Die Anzahl möglicher Strukturen geht dabei quadratisch mit der Anzahl an Einzelstrang-Paaren einher.

Figur 17.

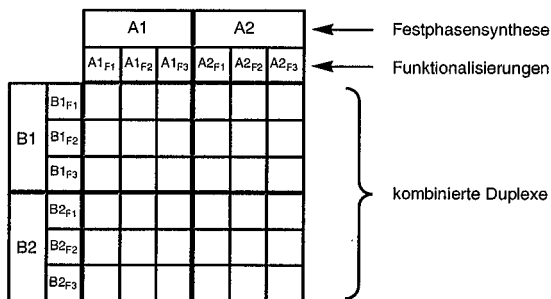


Bei der Wahl der Stammsequenzen war unbedingt darauf zu achten, dass Interaktionen zwischen ihnen und der Kernregion vermieden werden. Wir suchten deshalb für die Stammsequenz nach einem alternativen Paarungssystem, welches orthogonal zu dem der RNA war. Die *p*RNA, welche sehr stabile antiparallele Duplexe ausbildet und zudem nicht mit RNA oder DNA paart, hätte sich bestens als System für die Stammsequenz geeignet. Da jedoch bei der Entschützung die *p*RNA-Sequenzen sehr harschen Bedingungen ausgesetzt werden, ist ihre Synthese nicht kompatibel mit jener der RNA. Das Problem liegt bei der Entfernung der 3'-*O*-Benzoyl-Schutzgruppen, welche in der Synthese der *p*RNA verwendet werden. Diese werden entweder durch Behandlung mit 10% Hydrazin in H₂O oder, für Uracil-haltige Sequenzen, mit *O*-Methylhydroxylamin/NH₃ in H₂O/EtOH entfernt [81]. In Rahmen dieses Projektes konnte aber nicht mit Hydrazin entschützt werden, da Uracil-haltige Oligonukleotide hergestellt wurden. Auch die Entschützungsmethode mit *O*-Methylhydroxylamin konnte nicht verwendet werden, weil diese Bedingungen zu partiellem Strangbruch führen, bevor die *p*RNA-Sequenz vollständig entschützt ist [81].

Durch Einführung von geeigneten Substituenten resp. funktionellen Gruppen in die RNA-Kernregion wollten wir die Strukturen mit einer wohldefinierten Reaktivität ausstatten. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, über einen C-5'-

Bromoalkyloxy-Substituenten nach der Oligonukleotidsynthese eine fast beliebige funktionelle Gruppe einzuführen [85] [86] [62]. Zusammen mit der analogen Methode zur Funktionalisierung an der 2'-O-Position, welche auch in unserem Labor ausgearbeitet wurde, hatten wir ein breites Band an Möglichkeiten zur Verfügung, beliebige funktionelle Gruppen an beliebigen Nukleotiden einzuführen. Um möglichst rasch eine aktive Struktur zu finden, wollten wir zwei verschiedene Parameter bei der Synthese der Einzelstränge variieren. Erstens wollten wir die vorfunktionalisierten Bromopentylbausteine an unterschiedlichen Orten einführen und gleichzeitig die RNA-Sequenz in der Kernregion variieren. Zweitens wollten wir die Art der Substituenten variieren, was nach der Synthese auf der Festphase erfolgen kann. So würden wir relativ rasch eine Vielzahl unterschiedlicher Einzelstränge erhalten, die dann beliebig zu Duplexen kombiniert werden könnten.

Figur 18.



Darstellung der 36 möglichen Kombinationen von Duplexen, ausgehend von den vier Sequenzen A1, A2, B1 und B2.

Als Beispiel für unser Konzept soll folgendes Gedankenexperiment dienen: Durch die Synthese der vier Sequenzen (resp. zwei Sequenzpaare) A1, A2, B1, B2, erhalten wir durch Funktionalisierung mit drei verschiedenen Gruppen die zwölf funktionalisierten Sequenzen (resp. 6 Sequenzpaare, A1_{F1}, A1_{F2}, A1_{F3}, A2_{F1} ... B2_{F3}). Damit können insgesamt $6^2 = 36$ verschiedene Duplexe zusammengesetzt werden. Anders bedeutet dies, dass durch die Synthese von nur vier verschiedenen Sequenzen und anschließender Reinigung von zwölf Sequenzen in kürzester Zeit 36 verschiedene Duplexe aufgebaut und auf ihre katalytische Aktivität getestet werden können.

2.1.3 Vorgehen

Das Projekt liess sich in drei Teile gliedern:

Teil 1

Es wurden Synthesen zur Herstellung der 3'-*O*-Methyl-*p*RNA und der 3'-Desoxy-*p*RNA (*p*DNA) entwickelt, welche kompatibel sind mit jener der RNA. Die Paarungseigenschaften einiger Sequenzen wurden untersucht. Beide Systeme paaren nach den selben Regeln wie die *p*RNA.

Teil 2

Erste *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen wurden hergestellt und ihre Paarungseigenschaften untersucht. Durch eine RNA-2'→4'-*p*DNA-Verknüpfung konnte der Uebergang zwischen den beiden Paarungssystemen optimiert werden. Zur Ueberprüfung des Konzeptes, wie es in Figur 16 dargestellt ist, wurde ein *p*DNA-analogenes, FMN-bindendes Aptamer hergestellt, bei welchem mittels Fluoreszenzspektroskopie die Bindung von FMN nachgewiesen werden konnte.

Teil 3

In einem weiteren Schritt wurden die *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen über 5'-Bromoalkyloxy-Substituenten zusätzlich funktionalisiert. Auf kombinatorische Art und Weise wurden damit verschiedene Hammerhead-Ribozymanalogue aufgebaut und ihre Spaltungskinetik untersucht.

3 Resultate

3.1 Synthese und Paarungseigenschaften der 3'-O-Methyl-*p*RNA

3.1.1 Einführung

Vorerst wollten wir ein geeignetes, zur RNA orthogonales Paarungssystem finden, welches bezüglich der Synthese mit der RNA vollständig kompatibel ist. Ausgehend vom Paarungssystem der *p*RNA [81] [87] wollten wir ein analoges System herstellen, dessen 3'-OH-Position keine Schutzgruppe mehr verlangte. Wir beabsichtigten, die 3'-OH-Gruppe durch Methylierung permanent zu schützen und die 3'-O-Methyl-*p*RNA herzustellen. Diese konnte im Unterschied zur *p*RNA unter denselben Bedingungen entschützt werden wie die RNA (siehe Kapitel 2.1.2). Ausserdem haben Untersuchungen gezeigt, dass die 2'-O-Me-RNA stabilere Doppelstränge ausbildet als die natürliche RNA resp. die DNA [62] (siehe Tabelle 3). In Analogie zur Erhöhung der Duplexstabilität bei der 2'-O-Me-RNA erhofften wir uns auch eine höhere Stabilität bei der 3'-O-Me-*p*RNA gegenüber der *p*RNA.

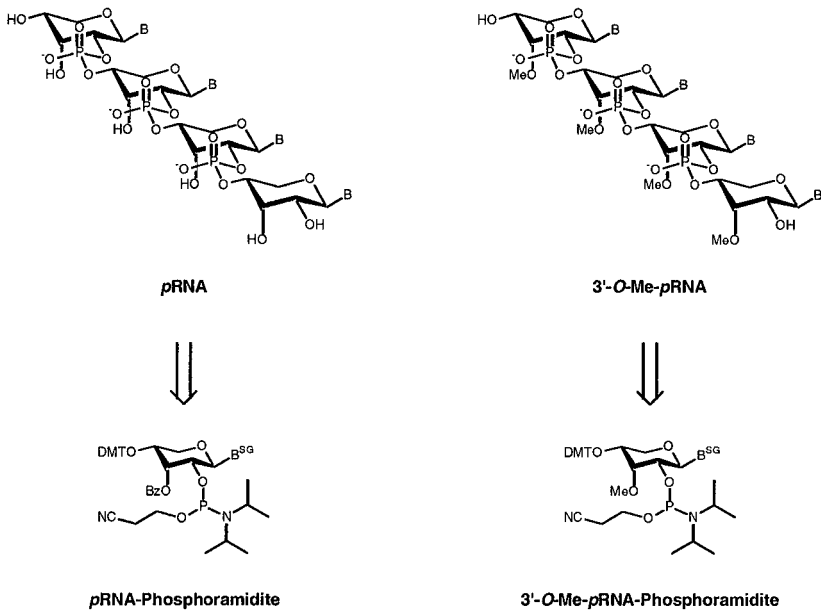
Tabelle 3. Vergleich der Paarungseigenschaften von DNA, RNA und 2'-O-Me-RNA [62]

Sequenz	Paarungssystem	T_m ^{a)}	ΔH° ^{b)}	$T\Delta S^\circ_{(298\text{ K})}$	$\Delta G^\circ_{(298\text{ K})}$
		°C		kcal/mol	
5'-(ACGGUCGGUCGCC)-3' 3'-(UGCCAGCCAGCGG)-5'	DNA	66.6	-119.0	-95.7	-23.3
	RNA	79.3	-128.5	-100.0	-28.5
	2'-O-Me-RNA	89.6	-165.8	-127.5	-38.3

^{a)} Bedingungen für die Messung der Schmelzpunkte: 1.5µM + 1.5µM Oligonukleotid, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4). ^{b)} Die thermodynamischen Daten wurden aus der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelzpunkte berechnet.

Später wurde als weiteres, *p*RNA analoges Paarungssystem die 3'-Desoxy-*p*RNA (*p*DNA) hergestellt, bei welchem die 3'-OH-Gruppen vollständig entfernt wurden. Somit konnte die *p*DNA ebenfalls unter Bedingungen geschützt werden, welche in der Synthese mit RNA kompatibel waren.

Schema 14. Darstellung der *p*RNA, der 3'-*O*-Me-*p*RNA und der entsprechenden Phosphoramidite



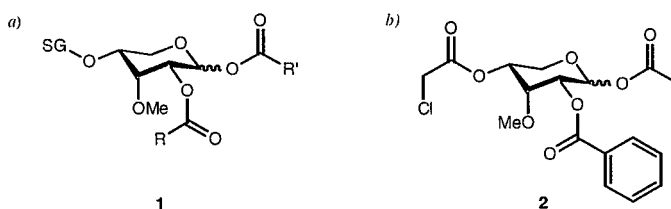
Die *p*RNA, dargestellt in der idealisierten, linearen Form, wurde von *Eschenmoser et al.* [81] [87] synthetisiert. Wegen der schwierig zu entschützenden 3'-*O*-Bz-Gruppe ist ihre Synthese nicht kompatibel mit jener der RNA. Deshalb wollten wir das analoge Paarungssystem der 3'-*O*-Me-*p*RNA, mit einer permanent geschützten 3'-OH-Gruppe, synthetisieren.

In einem ersten Schritt entwickelten wir einen Syntheseweg für die Herstellung von 3'-*O*-Methyl-*p*RNA-Phosphoramiditbausteinen. Diese haben wir anschliessend mit Hilfe der Festphasensynthese zu kurzen Oligonukleotiden zusammengefügt und deren Paarungseigenschaften untersucht.

3.1.2 Synthese von 3'-*O*-Methyl-*p*RNA-Phosphoramiditen

Wir beabsichtigten die 3'-*O*-Methyl-*p*RNA-Phosphoramidite über einen vorfunktionalisierten Zuckerbaustein **1** herzustellen, bei welchem die drei OH-Gruppen unterschiedlich geschützt waren (Schema 15). Diese Strategie sollte uns eine rasche und einfache Ueberführung der Nucleoside in die entsprechenden Phosphoramidite erlauben. Die 2-OH-Gruppe musste als Ester geschützt werden, um bei der Nucleosidierung ausschliesslich β -konfigurierte Nucleoside zu erhalten. Zur Schützung der 4-OH-Gruppe musste eine Schutzgruppe verwendet werden, welche unter den *Lewis*-sauen Bedingungen der Nucleosidierung nicht entfernt wurde, aber anschliessend unter relativ milden Bedingungen selektiv entschützt werden konnte.

Schema 15. vorfunktionalisierter Zuckerbaustein



a) Konzept des vorfunktionalisierten Zuckerbausteines.

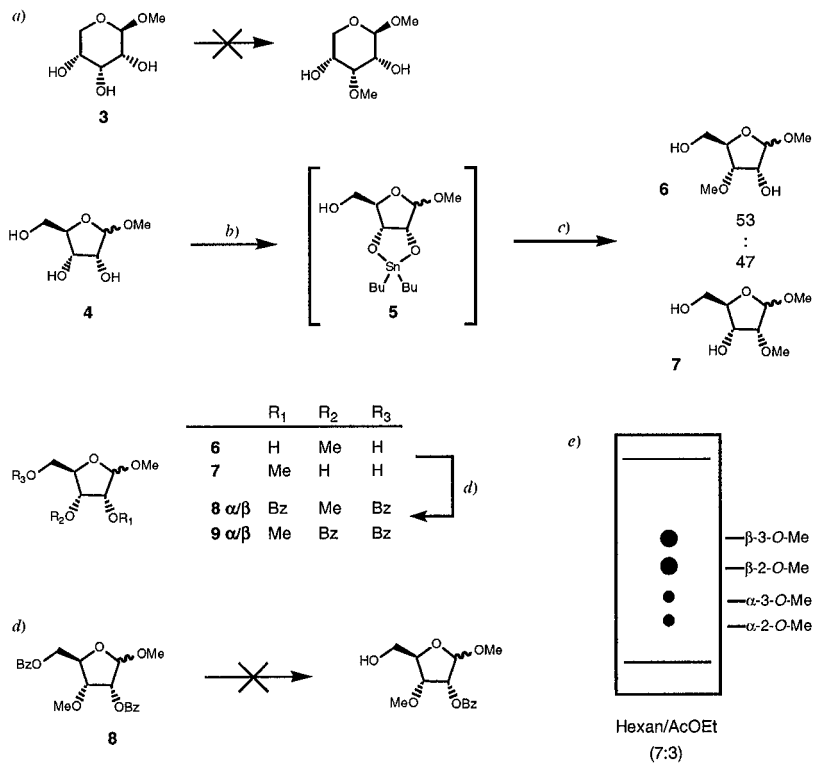
b) Der für die Herstellung von 3'-*O*-Me-*p*RNA-Sequenzen verwendete Zuckerbaustein.

In Schema 15 a) ist der vorfunktionalisierte Zuckerbaustein **1** konzeptionell dargestellt; Schema 15 b) zeigt eine mögliche Realisierung des vorfunktionalisierten Zuckerbausteines. Dieser ist an der 2-*O*-Position als Benzoat geschützt und weist an der 4-OH-Gruppe eine Chloracetylgruppe auf, welche unter sehr milden Bedingungen entfernt werden kann. Der Acetoxysubstituent an der Position 1 des Zuckerbausteines **2** eignet sich gut als Abgangsgruppe in Nukleosidierungsreaktionen.

3.1.3 Selektive Methylierung der 2-OH-Gruppe von Ribose

Zur Herstellung von geeigneten Zuckerbausteinen wollten wir ausgehend von D-Riboglycosiden die drei freien OH-Gruppen unterschiedlich funktionalisieren. Die ersten Methylierungsversuche, bei welchen wir unter verschiedenen Bedingungen Methyl- β -D-ribofuranosid² (**3**) mit Methyljodid umsetzten, zeigten, dass die Differenzierung der drei Positionen nicht trivial war (Schema 16). Es gab nie ein einheitliches Produkt, auch nicht in Analogie zu [89] durch die Aktivierung der *cis*-Dirole mit $\text{Bu}_2\text{SnCl}_2/\text{Et}_3\text{N}$. Deshalb entschieden wir uns als Ausgangsverbindung ein Anomerengemisch der beiden D-Methylribofuranoside **4** einzusetzen. Bei diesen konnte zumindest die primäre 5-OH-Gruppe von den beiden sekundären 2- und 3-OH-Gruppen unterschieden werden. Die erfolgreiche Methylierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde Ribosid **4** mit Bu_2SnO in Toluol in die cyclischen 2,3-*O*-Dibutylzinnderivate **5** überführt und anschliessend ohne Aufreinigung mit $\text{MeI}/\text{Et}_4\text{NF}$ in Acetonitril bei 80° methyliert (eine analoge, aber unter basischen Bedingungen ablaufende Methode zur Einführung von 2'-*O*-Schutzgruppen der RNA Nukleoside wird in unserem Labor routinemässig durchgeführt [19] [21]). Die Fluoridionen wirken als *Lewis*-Base und binden an das Sn-Zentrum, wodurch die 2- und 3-*O*-Atome aktiviert werden [90].

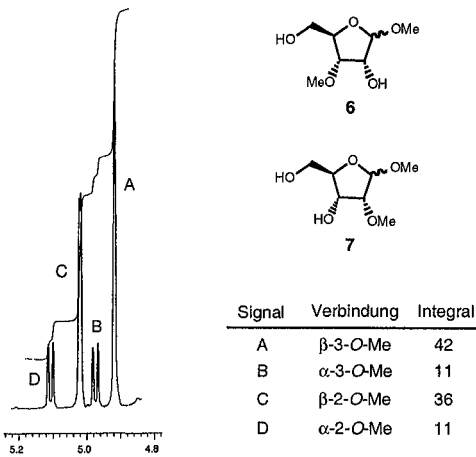
² Zur Herstellung und Kristallisation von β -D-Methylribofuranose siehe [88]

Schema 16. selektive Methylierung der Ribose


- a) Die Methyl- β -D-ribofuranose konnte nicht direkt methyliert werden.
- b) Bu_2SnO , Toluol, \uparrow , 90 min.
- c) $\text{Et}_4\text{NF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MeI, CH_3CN , \uparrow , 1 h, **6** : **7** = 53 : 47, 91%.
- d) BzCl , Pyridin/ CH_2Cl_2 , RT, 2 h, 76%.
- e) DC der vier Produkte **8** und **9**, welche gut voneinander getrennt werden konnten.
- f) Das Dibenzoat **8** konnte nicht selektiv an der 5-O-Position entschützt werden.

Daraus resultierten vier verschiedene Produkte, jeweils ein 2-*O*-Me-/3-*O*-Me-Isomerenpaar **6** und **7** der beiden α - und β -Methylribofuranoside (Schema 16). Das Verhältnis der vier Produkte wurde mittels Rohprodukt-NMR auf 42 : 11 : 36 : 11 3-*O*-Me- β / 3-*O*-Me- α / 2-*O*-Me- β / 2-*O*-Me- α -Methylribose bestimmt (siehe Figur 19, die Zuordnung der Anomerprotonensignale erfolgte nach [91] [92]; durch Einstrahlungsexperimente auf die H-C(1)- und die H-C(2)-Kerne konnten die Verbindungen eindeutig zugeordnet werden).

Figur 19.

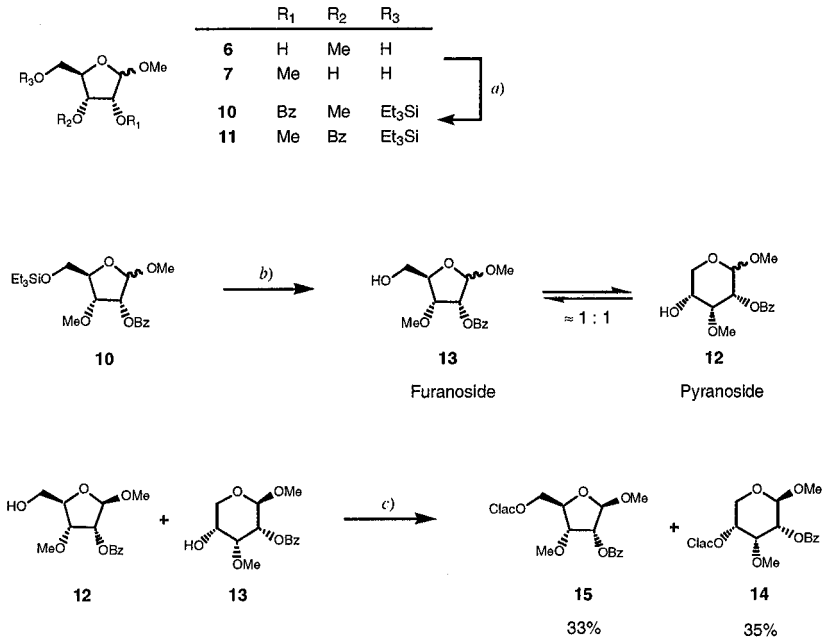


Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Rohproduktes von **6/7**. Dargestellt sind die H-C(1)-Signale. Die Zuordnung der Anomerprotonensignale erfolgte nach [91] [92]; durch Einstrahlungsexperimente auf die H-C(1)- und die H-C(2)-Kerne konnten die Verbindungen eindeutig zugeordnet werden.

Die vier Konstitutionsisomere konnten über Säulenchromatographie auf dieser Stufe nicht voneinander getrennt werden. Nach der Dibenzoylierung aller vier Produkte konnte ein typisches Chromatographieverhalten der vier Dibenzoate **8** und **9** beobachtet werden. Zuerst eluierte das β -3-*O*-Methylderivat, gefolgt vom β -2-*O*-Me-Regioisomeren, dann

folgten das α -3-*O*-Me- und zum Schluss das α -2-*O*-Me-Derivat, welche alle gut voneinander getrennt werden konnten.

Schema 17.



a) 1. 1 eq. Et₃SiCl, Pyridin/CH₂Cl₂, -78° → 4°, 1 h; 2. BzCl, Pyridin/CH₂Cl₂, 4° → RT, 1 h, 65%.

b) HCl in MeOH, ↓↑, 20 h, 67% (12 + 13, die Isomeren konnten nicht getrennt werden).

c) (Clac)₂O, Collidin, CH₂Cl₂, RT, 30 min, 68%.

Alle Versuche, die 5-*O*-Benzoylgruppe von **8** selektiv zu entfernen schlugen fehl³. So wurden die Verbindungen **6** und **7** mit Et₃SiCl/Py bei -5° an der 5-OH-Gruppe silyliert und *in situ* die 2-OH- resp. 3-OH-Gruppe benzoylet.

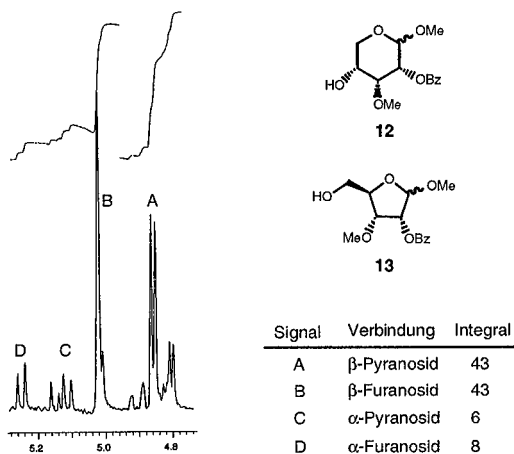
Die daraus erhaltenen vier verschiedenen Produkte konnten chromatographisch aufgetrennt werden. Das Laufverhalten war analog zu den perbenzoyleten Verbindungen **8** und **9**. Die Produkte konnten in 37% (β -3-*O*-Me-Derivat), 16% (β -2-*O*-Me-) und 12% (α -2-*O*-Me und α -3-*O*-Me) Ausbeute isoliert werden. Anschliessend wurden das β -3-*O*-Methylderivat **10** mit HCl/MeOH umgesetzt. Dabei stellte sich das Gleichgewicht zwischen Pyranosiden **12** und Furanosiden **13** (jeweils α - und β -Isomere) ein, welches entgegen unserer Erwartungen bei einem 1:1 Verhältnis lag (Figur 20)⁴.

Die beiden β -Riboside wurden in 46% Ausbeute von den α -Ribosiden (7%) chromatographisch getrennt, hingegen konnte keine Trennung zwischen den Furanosen und den Pyranosen erzielt werden. Erst nach der Schützung der 5-OH-Gruppe mit Chloressigsäureanhydrid/*sym.* Collidin wurde das reine β -Ribopyranosid **14** in 35% Ausbeute isoliert.

³ Folgende drei Bedingungen führten alle zu den Diolen **6** und **7**: a) 0.1M NaOH in THF/H₂O 1:1, 4° C; b) 0.25M NaOH in ¹PrOH, 4° C; c) 0.01M NaH in ¹PrOH, RT.

⁴ Bei der *Fischer*-Glycosidierung von β -D-Ribose in MeOH/HCl bei 35° C [93] wird folgende Gleichgewichtszusammensetzung der Methylriboside erhalten: α -Furanosid 5.2%, β -Furanosid 17.4%, α -Pyranosid 11.6%, β -Pyranosid 65.8%.

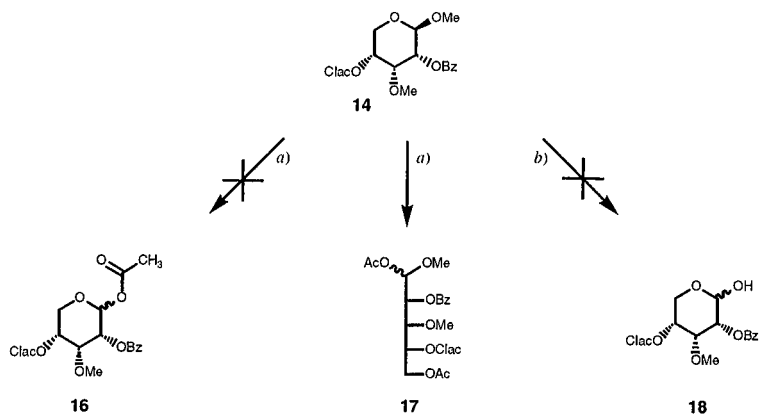
Figur 20.



Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes von **12/13**. Dargestellt sind die H-C(1)-Signale. Die Zuordnung der Anomerprotonensignale erfolgte nach [91] [92]; durch Einstrahlungsexperimente auf die H-C(1)- und die H-C(2)-Kerne konnten die Verbindungen eindeutig zugeordnet werden.

Alle Versuche zur Ueberföhrung des Methylribopyranosides **14** in das entsprechende Acetat **16**, wie beschrieben in [94] [95], sind gescheitert, da sich immer ausschliesslich das offenkettige Diacetat **17** gebildet hat. Auch die Hydrolyse von **14** zur Pyranose **18** in Analogie zu [96] war nicht erfolgreich, da gleichzeitig die Chloracetyl-Schutzgruppen entfernt wurden und sich damit wieder ein Furanose/Pyranose-Gleichgewicht einstellte (Schema 18).

Schema 18.



a) Ac_2O , H_2SO_4 , RT, 30 min.

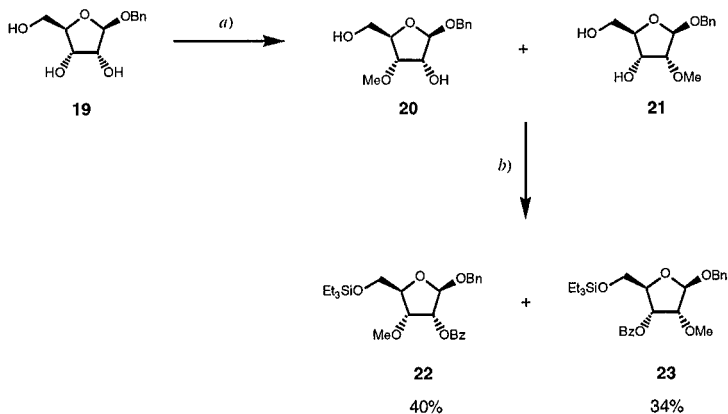
b) *conc.* HCl , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ 3 : 1, 80° , 14 h.

Um dieses letztgenannte Problem zu umgehen, verfolgten wir einen anderen Weg, bei dem wir von Benzyl-β-D-ribofuranosid (**19**) ausgingen. Dieses ist leicht zugänglich aus Ribose und Benzylalkohol und kristallisiert gut [97].

Analog zum Methylribofuranosid **4** setzten wir das Benzylribofuranosid **19** zuerst mit Bu_2SnO in Toluol und anschliessend mit $\text{MeI}/\text{Et}_3\text{NF}$ in CH_3CN um (Schema 19). Die beiden Regioisomeren **20** und **21** entstanden dabei im Verhältnis 1:1 in einer Gesamtausbeute von 70%. Um eine genügende Selektivität zu erhalten, wurde bei der anschliessenden Silylierung die Reaktionslösung vor der Zugabe von 1.2 eq. Et_3SiCl auf -78° abgekühlt. Die Reaktion setzte im Verlaufe des Erwärms auf RT ein, und nach vollständiger Silylierung der 5-O-Position wurden die freibleibenden OH-Gruppen durch Zugabe von 1.3 eq. BzCl benzyliert. Auf dieser Stufe konnten wiederum die beiden Regioisomeren **22** und **23**

mittels Säulenchromatographie getrennt werden, wobei das 3-*O*-Methylderivat **22** in 40% und das 2-*O*-Methylderivat **23** in 34% Ausbeute isoliert wurde.

Schema 19.



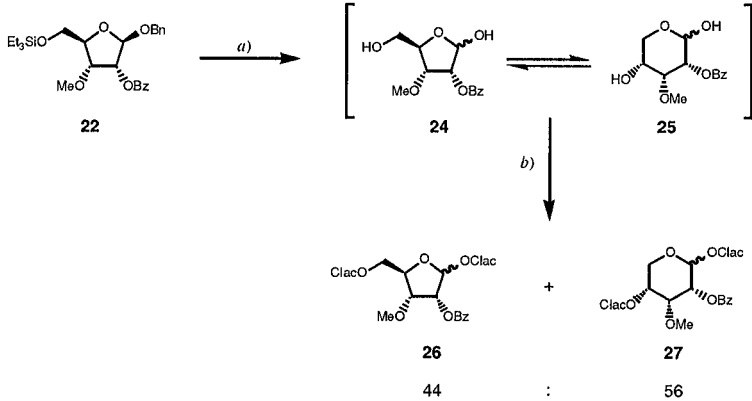
a) 1. Bu_2SnO , Toluol, $\uparrow\downarrow$, 1.5 h; 2. MeI, $\text{TEAF}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CH_3CN , $\uparrow\downarrow$, 1.5 h, 70%.

b) 1. 1.0 eq. Et_3SiCl , Pyridin/ CH_2Cl_2 1:9, $-78^\circ \rightarrow \text{RT}$, 1 h; 2. 1.25 eq. BzCl , RT, 2 h.

3.1.4 Synthese des vorfunktionalisierten Zuckerbausteines 2

2-*O*-Benzoyl-1-*O*-benzyl-3-*O*-methyl-5-*O*-triethylsilyl- β -D-ribofuranose (**22**) wurde mit H_2/Pd unter sauren Bedingungen (HCOOH , THF) hydrogenolysiert, wie beschrieben in [98] [99]. Gleichzeitig mit der Entfernung der Benzylgruppe wurde auch die Et_3Si -Gruppe abgespalten und der Zucker **24** konnte in die Pyranoseform **25** equilibrieren (Schema 28).

Schema 20.



a) H_2 Pd/C, HCOOH/THF 1:1, RT, 4 h, quant.

b) $(\text{Clac})_2\text{O}$, Collidin, THF, dann eine Lösung aus **24/25** in THF langsam zugeben, RT, 2,5 h, quant.

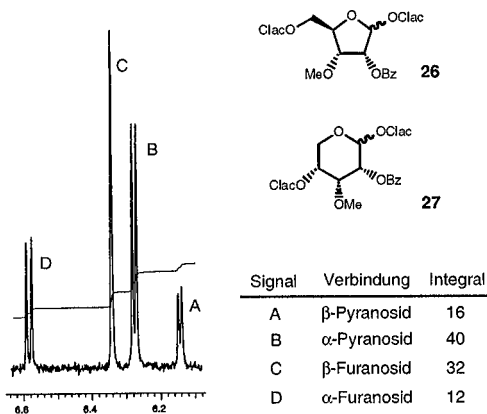
Die Zuckerderivate **24/25** wurden anschliessend an den 1-*O*- und 5-*O*-Positionen chloroacetyliert. Die Reaktion wurde unter verschiedenen Bedingungen⁵ durchgeführt, jedoch wurde in allen Fällen das gleiche Verhältnis zwischen Furanosen **26** und Pyranosen **27** von 44 : 56 mittels $^1\text{H-NMR}$ gemessen. Wie wir schon bei ähnlichen Zuckern beobachtet haben, war keine Bevorzugung der Pyranoside festzustellen, was sich auch auf die Ausbeute resp. den Syntheseweg auswirkte. Das Verhältnis der vier Produkte wurde mit $^1\text{H-NMR}$ zu $\alpha\text{-Fu} : \beta\text{-Fu} : \alpha\text{-Py} : \beta\text{-Py} = 12 : 32 : 40 : 16$ bestimmt (siehe Figur 21, die Zuordnung der Signale

⁵ Bedingungen zur zweifachen Chloroacetylierung der Ribosen **24/25**:

- $(\text{Clac})_2\text{O}$ und *s.* Collidin in THF vorlegen, langsam **24/25** in THF zutropfen, 2,5 h, RT.
- $(\text{Clac})_2\text{O}$ und *s.* Collidin in $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ vorlegen, langsam **24/25** in $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ zutropfen, 2,5 h, 50°C.
- $(\text{Clac})_2\text{O}$ in Pyridin vorlegen, langsam **24/25** in Pyridin zutropfen, 1,5 h, RT.

erfolgte nach [91] [92]). Bei der anschliessenden Reinigung über Silicagel konnte nur die β -Furanose von den Pyranosen **27** abgetrennt werden, jedoch nicht die α -Furanose; dabei wurde ausgehend von **22** die β -Furanose in 26% Ausbeute und die Pyranosen zusammen mit der α -Furanose in 36% Ausbeute isoliert. Für die nachfolgenden Nukleosidierungsreaktionen wurde ein Gemisch aus Furanosen und Pyranosen (21 : 79) eingesetzt.

Figur 21.



Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes von **12/13**. Dargestellt sind die H-C(1)-Signale. Die Zuordnung der Anomerprotonensignale erfolgte nach [91] [92].

3.1.5 Synthese der vier 3'-O-Methyl-Nukleoside

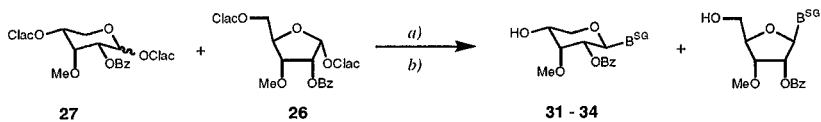
Die Nukleosidierungsreaktionen wurden unter *Vorbrüggen*-Bedingungen [100] [101] durchgeführt. Die Nukleobasen A^{Bz} (**28**), C^{Ac} (**29**) und T (**30**), wurden zuerst mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) in CH_3CN bei 60° silyliert und anschliessend mit SnCl_4 bei 60° in 20 min. mit dem Zuckergemisch umgesetzt (Schema 21). Nach der wässrigen

Aufarbeitung wurden die Nukleoside direkt mit $\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}$ 1:19 (v/v) zur Entfernung der Chloracetylgruppe behandelt. Diese sehr milden Entschützungsbedingungen wurden in unserem Labor von *Pitsch* entwickelt, sind bisher aber noch nicht publiziert worden. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Entfernung von Chloracetylgruppen werden üblicherweise unter Verwendung von Thioharnstoff in EtOH bei Rückflusstemperatur durchgeführt [102].

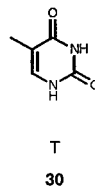
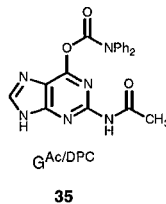
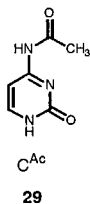
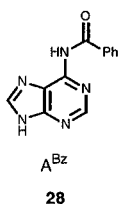
Bei der anschliessenden Reinigung konnten beim A- und beim C-Nukleosid **31** und **32** die Furanoside von den Pyranosiden getrennt werden, nicht aber beim T-Nukleosid **33**. Die Reaktionen verliefen mit Ausbeuten zwischen 67% und 82% über beide Stufen bezogen auf **27**.

Die Nukleosidierung zum G-Nukleosid **34** erfolgte mit der O^6 -(*N,N*-Diphenylcarbamoyl)-geschützten Base **35**, mit welcher die Bildung des N^7 -verknüpften Produktes verhindert wurde [103]. Die Nukleobase wurde vorerst mit BSA in $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ silyliert und anschliessend bei 55° in Toluol während 2 h mit TMSOTf behandelt. Nach Filtration an Kieselgel wurde mit $\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}$ 1:19 (v/v) die Chloracetylgruppe entfernt. Auch beim G-Nukleosid **34** konnten die Furanoside nicht vollständig von den Pyranosiden getrennt werden und es wurde ein Isomerengemisch von 1:8 (Fu/Py) in 30% Ausbeute über zwei Stufen isoliert (Schema 21).

Schema 21. Nukleosidierungsreaktionen



	B ^{SG}	Ausbeute [%]
31	A ^{Bz}	53
32	C ^{Ac}	55
34	G ^{Ac/DPC}	30
33	T	65



- a) 1. B^{SG}, BSA, CH₃CN, 60°, 20 min; 2. SnCl₄, 60°, 20 min. (für A, C und T).
 1. B^{SG}, BSA, (CH₂Cl)₂, 60°, 20 min; 2. TMSOTf, Toluol, 55°, 2 h (für G).
- b) 5% Et₃N in MeOH (v/v), RT, 15 min.

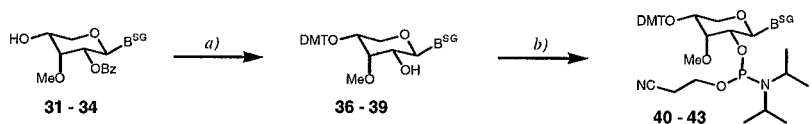
3.1.6 Phosphitylierung und Immobilisierung der Nucleoside auf der Festphase

Die Nucleoside **31 - 34** wurden mit 4,4'-Dimethoxy-triphenylchlormethan (DMTCl) in Anwesenheit von AgNO₃/Collidin an der 4'-OH-Gruppe trityliert [86] und anschließend durch Behandlung mit 2M NaOH/MeOH/THF 1 : 4 : 5 bei 4° in die Nucleoside **36 - 39** überführt (Schema 22). Die N¹-Acetylgruppe des C-Nucleosides, welche während der

NaOMe-Entschützung entfernt wurde, wurde durch Behandlung mit Ac_2O in DMF wieder selektiv eingeführt [104]. Diese Reaktionsschritte erfolgten in guten Ausbeuten für **36**, **37** und **39** (77% - 92%), und in einer bescheidenen Ausbeute für **38** (52%), was auf grosse Verluste bei der Chromatographie zurückzuführen war. Auf dieser Stufe konnten auch beim Thymin-Nukleosid **39** und beim Guanin-Nukleosid **38** die Furanosid-Isomeren vollständig abgetrennt werden.

Die Verbindungen **36** - **39** wurden mit 2-Cyanoethyl-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidochloridit / $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$ gemäss DC quantitativ in die entsprechenden Phosphoramidite **40** - **43** überführt (Schema 22) [19] [21].

Schema 22. Phosphitylierung



	B^{SG}	Ausbeute [%]		B^{SG}	Ausbeute [%]
36	A ^{Bz}	92	40	A ^{Bz}	62
37	C ^{Ac}	77	41	C ^{Ac}	83
38	G ^{Ac/DPC}	52	42	G ^{Ac/DPC}	60
39	T	87	43	T	82

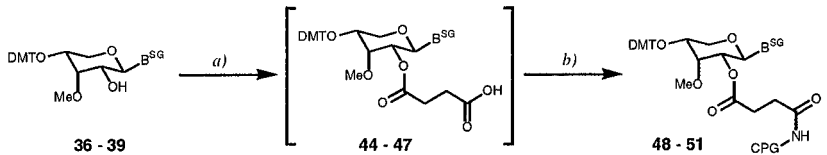
a) 1. DMTCI, AgNO_3 , Collidin, CH_2Cl_2 , RT, 30 min; 2. 2M NaOH/MeOH/THF 1:4:5, 4°, 20 min.

b) $\text{ClP}(\text{N}^i\text{Pr}_2)(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})$, $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$, CH_2Cl_2 , RT, 14 h.

Zur Immobilisierung der Nukleoside **36** - **39** auf der Festphase wurden diese zuerst mit Bernsteinsäureanhydrid/DMAP in die Derivate **44** - **47** überführt, welche anschliessend durch Aktivierung mit (Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) und *N*-Methylimidazol auf den LCAA-CPG-Träger gebunden wurden (Schema 23) [105]. Die Beladungsdichten der Träger **48** - **51** wurden mittels UV-

Absorption des Tritylkations bei 498 nm bestimmt. Die entsprechenden Werte variierten zwischen 34 und 48 $\mu\text{mol/g}$.

Schema 23. Immobilisierung auf der Festphase



	B ^{SG}	Beladung [$\mu\text{mol/g}$]
48	A ^{Bz}	35
49	C ^{Ac}	34
50	G ^{Ac/DPC}	39
51	T	47

a) Bemsteinsäureanhydrid, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 3 h.

b) BOP, *N*-Methylimidazol, CH₃CN, RT, 14 h.

3.1.7 Synthese von 3'-O-Methyl-pRNA-Sequenzen

Die Phosphoramidite **40** - **43** wurden nun mit Hilfe eines *Pharmacia Gene Assembler* zu den Oligonukleotiden **A** - **E** zusammengesetzt (Tabelle 4). Im Wesentlichen wurden dabei die gleichen Bedingungen und die gleichen Reagenzien verwendet, wie für die RNA-Synthese mit 2'-O-TOM-Bausteinen [21]. Gekoppelt wurde mit ca. 8 eq. Phosphoramiditen in Anwesenheit von 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol als Aktivator (Schema 24). Die Kopplungszeit von 5 min. wurde beibehalten, hingegen wurde die Detritylierungszeit auf 3 min. verlängert. Alle Synthesen wurden im 1.5 µmol-Massstab durchgeführt.

Die Kopplungsausbeuten wurden über den Trityl assay bestimmt und betrugen bei allen Sequenzen zwischen 93% und 98%. Des öfters wurde bei der Synthese von RNA-Sequenzen die Beobachtung gemacht, dass zu hohe Beladungsdichten (> 30 µmol/g) der Festphase zu schlechteren Kopplungsausbeuten am Anfang der Sequenz, also bei den ersten 5 bis 10 Kopplungen führten. Die geringen Kopplungsausbeuten von 93% bis 98% könnten unter Anderem auf dieselbe Ursache zurückzuführen sein.

Tabelle 4. 3'-O-Methyl-pRNA-Sequenzen.

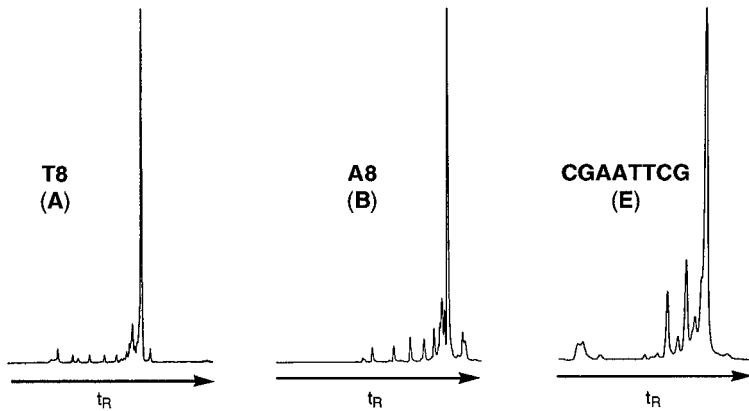
	3'-O-Methyl-pRNA-Sequenz		Ausbeute		MS ^{a)} [m/z]	
			a.u. ^{b)}	µmol	berechnet ^{c)}	gefunden
A	4'-TTTTTTT-2'	T8	56	0.78	2612.6	2611.8
B	4'-AAAAAAA-2'	A8	39	0.32	2684.5	2683.9
C	4'-CCCCCC-2'	C6	50	1.1	1853.7	1853.3
D	4'-GGGGG-2'	G6	22	0.31	2094.5	2093.4
E	4'-CGAATTCG-2'	Dickerson	42 ^{d)}	0.97	2649.9	2649.3

^{a)} MALDI-TOF-MS. ^{b)} Absorption bei 260 nm. ^{c)} Berechnung für das Fragment [M - H]. ^{d)} gemessen bei 80°.

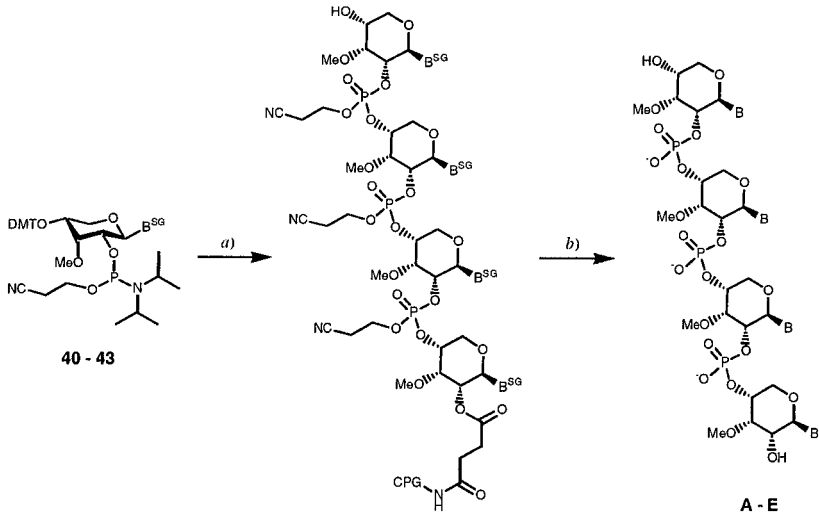
Die Sequenzen wurden anschliessend 2.5 h mit 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O 1:1 behandelt, wie beschrieben in [21], wobei die Sequenzen vom Support abgelöst und gleichzeitig die Cyanoethyl- und die Basenschutzgruppen abgespalten wurden.

Die Reinigung der Sequenzen **A**, **B** und **C** erfolgte mit RP-HPLC über eine C18-Säule. **D** und **E** wurden unter denaturierenden Bedingungen über eine SAX-Ionenauschersäule bei pH 11.5 gereinigt. Die Chromatogramme einiger der Rohprodukte sind in Figur 22 wiedergegeben. Die Sequenzen wurden nach der Reinigung über RP-HPLC entsalzt und als wässrige Stammlösung aufbewahrt. Die Gesamtausbeuten der Sequenzen wurden mittels UV-Absorption bei 260 nm bestimmt.

Figur 22. Rohprodukt-Chromatogramme



HPLC Chromatogramme der Rohprodukte der Sequenzen **A**, **B** (Reversed-Phase Säule) und **E** (Ionentauscher Säule).

Schema 24. 3'-O-Methyl-*p*RNA-Sequenzen


- a) Festphasensynthese von 3'-O-Me-*p*RNA Sequenzen auf dem DNA Synthesizer: Detritylierung mit 4% Dichloressigsäure in Dichlorethan während 2 min; Kopplung mit 0.1M Phosphoramiditlösung in CH₃CN, katalysiert mit 0.25M 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol in CH₃CN, Kopplungszeit 6 min; Capping mit einer 1:1 Mischung aus Essigsäureanhydrid/2,6-Lutidin/THF 1 : 1 : 8 und 16% *N*-Methylimidazol/THF (v/v), 1 min; Oxidation mit I₂/H₂O/Pyridin/THF 3:2:20:75, 1 min.
- b) Entschützung der 3'-O-Me-*p*RNA Sequenzen mit 10M MeNH₂ in H₂O/EtOH 1:1, 25°, 3 h.

3.1.8 Paarungseigenschaften der 3'-O-Methyl-pRNA

Mittels temperaturabhängiger UV-Spektroskopie wurde das Paarungsverhalten der 3'-O-Methyl-pRNA-Sequenzen untersucht und mit jenem analoger pRNA-Sequenzen [87] verglichen. Die Schmelzkurven (*transitions curves*) wurden bei 10 μM Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl und 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen. Um eine eventuelle Selbstpaarung ausschliessen zu können, wurden jeweils die Schmelzkurven der Einzelstränge unter den gleichen Bedingungen gemessen.

Aus den erhaltenen Schmelzkurven wurden die Uebergangstemperaturen (T_m , Schmelzpunkte) bestimmt. Die thermodynamischen Funktionen ΔG° , ΔH° , $T \cdot \Delta S^\circ$ wurden berechnet, indem die Schmelzpunkte der Duplexe bei fünf verschiedenen Konzentrationen im Bereich zwischen 1 μM und 40 μM gemessen und über die Beziehung von *van't Hoff* ausgewertet wurden (siehe Kapitel 1.2.5, Gleichung VIII resp. IX).

Tabelle 5. Paarungseigenschaften der 3'-O-Methyl-pRNA

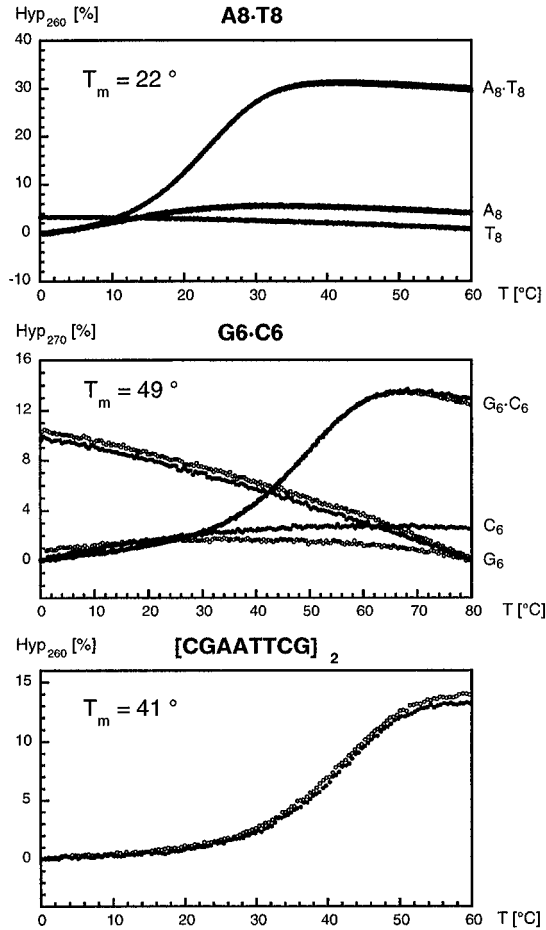
Paarungssystem		T_m ^{a)}	ΔH°	$T\Delta S^\circ_{(298\text{ K})}$	$\Delta G^\circ_{(298\text{ K})}$
		°C		kcal/mol	
A8-T8	3'-O-Me-pRNA	22	-45.0	-37.5	-7.5
	pRNA ^{b)}	40	-62.2	-51.7	-10.5
G6-C6	3'-O-Me-pRNA	49	-44.3	-33.4	-10.9
	pRNA ^{b)}	61	-54.3	-40.8	-11.3
[CGAATTCG] ₂	3'-O-Me-pRNA	41	-61.5	-51.4	-10.1
	pRNA ^{b)}	59	-54.9	-42.3	-12.6

^{a)} Bedingungen für die Messung der Schmelzpunkte: 10 μM Einzelstrangkonzentration, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, (pH 7.4). ^{b)} *Eschenmoser et al.* [87].

Die UV-Schmelzkurven sind in Figur 23 abgebildet. Bei allen drei Duplexen A·B, C·D, E·E ist ein kooperatives Verhalten zu erkennen. Die entsprechenden Schmelzpunkte (T_m -Werte) sind in Tabelle 5 angegeben. Die Hyperchromizität des Duplexes A·B beträgt 30% (260

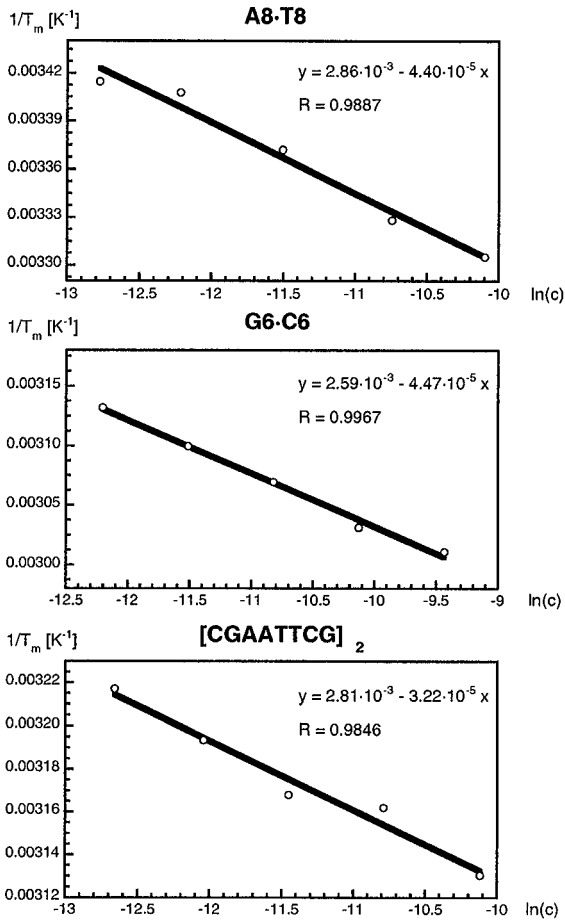
nm), resp. 13% bei den Duplexen **C·D** (270 nm) und **E·E** (260 nm). Im Weiteren weisen die Schmelzkurven der Einzelstränge **B** und **D** keinen Schmelzpunkt auf, was bedeutet, dass die 3'-*O*-Methyl-*p*RNA keine *reverse Hoogsteen*-Basenpaarung ausbildet, wie sie in der homo-DNA für Purin-haltige Sequenzen beobachtet wurden [106].

Aufgrund des Paarungsverhaltens der untersuchten Stränge paart die *p*RNA stärker als die 3'-*O*-Methyl-*p*RNA; die entsprechenden Schmelzpunkte der *p*RNA sind ca. 12° bis 18° höher als jene der 3'-*O*-Methyl-*p*RNA. Analog zur *p*RNA zeigt auch die 3'-*O*-Me-*p*RNA ein sehr selektives Paarungsverhalten, das nur *Watson-Crick*-Paarung eingeht.

Figur 23. Schmelzkurven der 3'-O-Methyl-pRNA

Die Schmelzkurven wurden bei 10 μ M Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl und 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen. Die Punkte der Aufheizkurven sind als schwarze Punkte dargestellt, die Abkühlkurven als Kreise. Die nicht sigmoiden Kurven entsprechen den Hyperchromizitäten der 3'-O-Me-pRNA-Einzelstränge A_8 , T_8 , G_6 und C_6 .

Figur 24. Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelzpunkte nach *van't Hoff*



Die Konzentrationsabhängigkeit der Schmelzpunkte wurde in einer linearisierten Form dargestellt. Aus den Parametern der angepassten Geradengleichung lassen sich nach *van't Hoff* die thermodynamischen Funktionen ΔH° , ΔS° und ΔG° der Duplexbildung berechnen.

3.1.9 Paarungsverhalten der 3'-O-Methyl-pRNA in organischem Lösungsmittel

Die Paarung von einzelsträngigen Oligonukleotiden zu einem Duplex basiert auf schwachen, nicht kovalenten Wechselwirkungen. Wasserstoffbrücken, π -Stacking, Hydratisierung und elektrostatische Abstossung sind die Hauptfaktoren, welche die Thermodynamik der Duplexbildung bestimmen. Abhängig von der Wahl des Mediums ändern die Beiträge der einzelnen Wechselwirkungen zur Duplexstabilität. Untersuchungen haben gezeigt [62], dass RNA und DNA die stabilsten Duplexe in Wasser in Gegenwart von Salzen ausbilden. Beim Uebergang von Wasser in ein organisches Lösungsmittel wie Dimethoxyethan (DME) resp. Methoxyethanol (ME) nimmt die Duplexstabilität von DNA laufend ab, so dass die Oligonukleotide nur noch ungepaart vorliegen (Tabelle 6). Bei RNA zeigt sich eine bessere Verträglichkeit der Duplexstabilität im organischen Lösungsmittel; die Duplexe sind etwas weniger stabil als in Wasser, aber im Vergleich zur DNA sind die Stabilitätsunterschiede viel geringer. Ganz anders verhält sich die 2'-O-Methyl-RNA, welche beim Uebergang von Wasser in ein organisches Lösungsmittel laufend stabilere Duplexe ausbildet [62].

Im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Paarungsverhalten der drei Paarungssysteme DNA, RNA und 2'-O-Methyl-RNA in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, interessierte uns das Verhalten der 3'-O-Methyl-pRNA im Vergleich mit der pRNA. Auch bei der 3'-O-Methyl-pRNA, mit der hydrophoben Methoxygruppe, war eine bessere Verträglichkeit der Duplexe in organischen Lösungsmitteln im Gegensatz zur pRNA mit der hydrophilen 3'-OH-Gruppe zu erwarten.

Es wurden die Schmelzkurven der selbstkomplementären Sequenz 5'-CGAATTCG-3' von pRNA und 3'-O-Methyl-pRNA in verschiedenen Lösungsmittelgemischen gemessen. Als Lösungsmittel wurde Ethylenglykol, Dimethoxyethan und Methoxyethanol verwendet und mit Wasser in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Gemessen wurde unter den Standardbedingungen bei 10 μ M Einzelstrang, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl und pH 7.4.

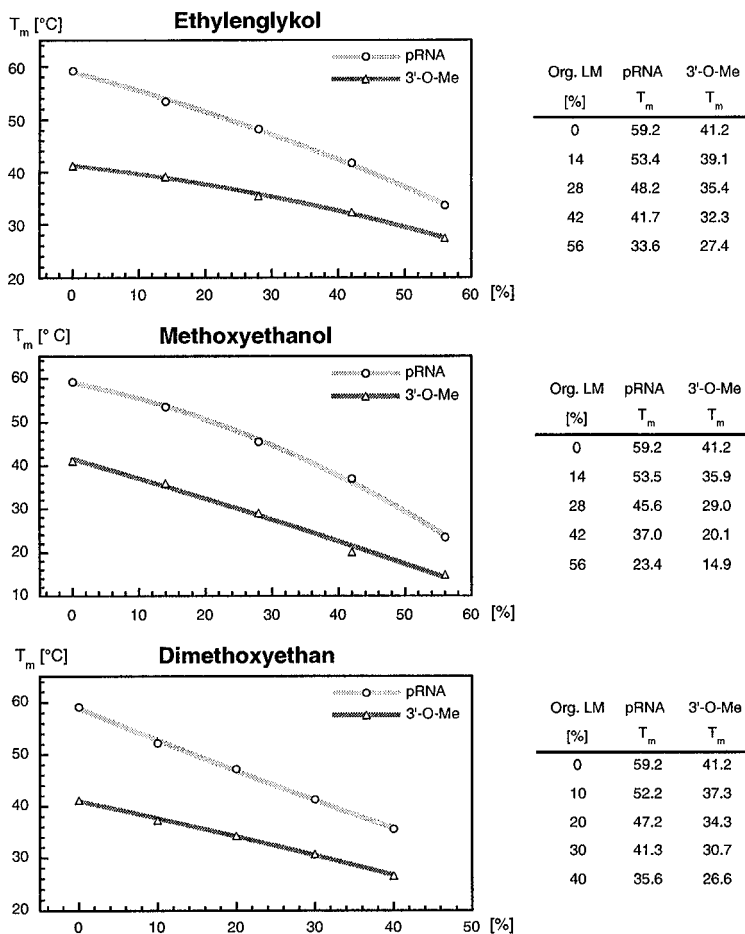
Tabelle 6. Schmelzpunkte von DNA, RNA und 2'-*O*-Me-RNA in Anwesenheit von Dimethoxyethan (DME) und Methoxyethanol (ME) [62]

Paarungssystem ^{a)}	H ₂ O	DME			
		10%	20%	30%	40%
DNA	66.6	62.9	59.6	56.6	53.4
RNA	79.3	77.0	76.6	76.6	77.5
2'- <i>O</i> -Me-RNA	89.6	89.9	90.5	93.4	97.0
	H ₂ O	ME			
		10%	30%	50%	70%
DNA	66.6	61.1	52.7	39.1	7.9
RNA	79.3	76.0	70.3	65.3	56.2
2'- <i>O</i> -Me-RNA	89.6	88.2	87.2	90.3	93.6

^{a)} Duplex: [CGAATTCG]₂; Bedingungen für die Messung der Schmelzpunkte: 1.5 + 1.5µM Einzelstrangkonzentration, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.4.

Bei allen drei Messserien ist zu erkennen, dass die T_m -Werte der *p*RNA mit steigendem organischem Lösungsmittelanteil stärker abnehmen als jenes der 3'-*O*-Methyl-*p*RNA (Figur 25). Je höher also der Anteil an organischem Lösungsmittel wird, um so kleiner wird der Unterschied zwischen dem Schmelzpunkt der *p*RNA und jenem der 3'-*O*-Methyl-*p*RNA. In wässriger Lösung beträgt das ΔT_m 18°, während in einer Lösung aus 56% Ethylenglykol ein ΔT_m von 6.2° bestimmt wurde. Ähnliche Werte wurden bei 40% DME mit einem ΔT_m von 9.0° oder bei 56% Methoxyethanol mit einem ΔT_m von 8.5° gemessen. Die Stabilität der Duplexe nimmt also in beiden Systemen durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln ab, jedoch reagiert die 3'-*O*-Methyl-*p*RNA etwas weniger empfindlich auf die hydrophobere Umgebung als die *p*RNA.

Figur 25. Paarungsverhalten der 3'-O-Methyl-pRNA in organischem Lösungsmittel



Darstellung der Duplexstabilität der Dickerson-Sequenz [CGAATTCG]₂ in Abhängigkeit des Lösungsmittels. Das organische Lösungsmittel wurde jeweils im angegebenen Volumenverhältnis mit Wasser gemischt. Die Schmelzpunkte wurden bei 10 μ M Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl und 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen.

3.2 Synthese und Paarungseigenschaften der *pDNA* (3'-Desoxy-*pRNA*)

3.2.1 Einleitung

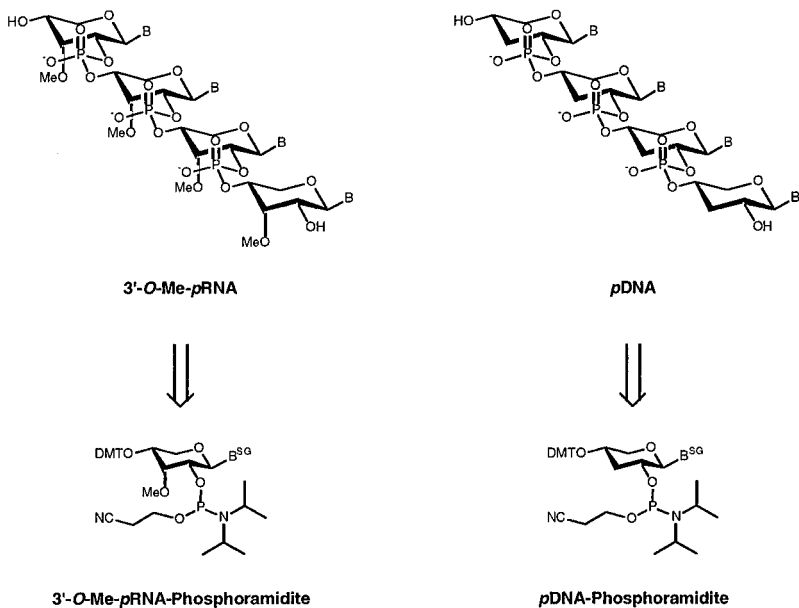
Die Synthese der 3'-*O*-Methyl-*pRNA* war nicht effizient und zudem gab es neben intrinsischen Problemen, wie das ungünstige Furanose/Pyranose Gleichgewicht, auch Probleme bei der Reinigung. Die Furanoside konnten z. T. gar nicht oder nur schlecht von den Pyranosiden abgetrennt werden und so mussten für die Nukleosidierungsreaktionen ein Gemisch aus Furanosiden und Pyranosiden eingesetzt werden, wodurch ein grosser und eigentlich unnötiger Reinigungsaufwand entstanden ist. Zudem waren die 3'-*O*-Methyl-*pRNA*-Duplexe wesentlich weniger stabil als jene der *pRNA*, so dass sie sich für unsere Zwecke nicht eigneten.

Wir haben uns deshalb entschlossen, ein anderes *pRNA*-analoges Paarungssystem zu synthetisieren. Wie schon in Kapitel 3.1.1 angemerkt wurde, ist die 3'-Desoxy-*pRNA* ein alternatives Paarungssystem, dessen Synthese vollständig kompatibel ist mit jener der RNA, da sich eine 3'-OH-Schutzgruppe erübrigt (Schema 25).

Um gleichzeitig die Paarungsstärke zu erhöhen, wollten wir anstelle von Adenin (A, **52**) das 2,6-Diaminopurin (D, **53**) einführen, welches analog zu A·T das Basenpaar D·T ausbildet. Dieses verfügt über drei Wasserstoffbrücken und leistet deshalb einen grösseren Beitrag zur Duplexstabilität als das A·T Paar (Schema 26) [70].

Weil auch das 5-Methylcytosin (M, **54**) mit Guanin (G) etwas stärker paart als das natürliche Cytosin (C, **55**) beabsichtigten wir neben dem 2,6-Diaminopurin (D) auch das 5-Methylcytosin (M) einzubauen, um so stabilere *pDNA*-Duplexe zu erhalten (Schema 26) [107].

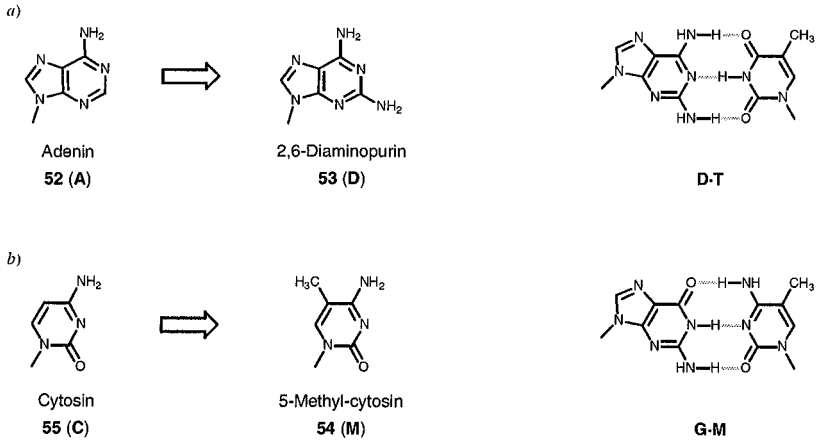
Schema 25.



Dargestellt sind die 3'-O-Methyl-pRNA und die pDNA in den idealisierten Formen. Nachdem die Synthese der 3'-O-Methyl-pRNA nicht sehr ergiebig war, wollten wir die pDNA über einen eleganteren Weg herstellen.

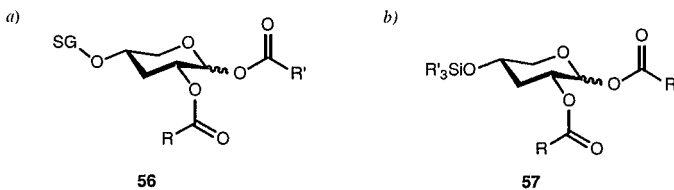
Wie bei der Synthese der 3'-O-Methyl-pRNA verfolgten wir die Strategie, zunächst einen vorfunktionalisierten Zuckerbaustein **56** herzustellen. Die Anforderungen an den Zuckerbaustein waren identisch zu denjenigen der 3'-O-Methyl-pRNA-Synthese. Als konkretes Synthesziel wollten wir ein 1,2-diacyliertes-4-silyliertes 3-Desoxyriboypyranosid **57** herstellen (Schema 27).

Schema 26.



- a) Adenin (A) wurde ersetzt durch 2,6-Diaminopurin (D). Dieses kann mit Thymin (T) das Basenpaar D-T über drei Wasserstoffbrücken ausbilden, was die Stabilität der Duplexe erhöht.
- b) Cytosin (C) wurde ersetzt durch 5-Methyl-cytosin (M), welches analog zum Cytosin (C) mit Guanin (G) das Basenpaar G-M ausbilden kann, aber zu stabileren Duplexen führt.

Schema 27.

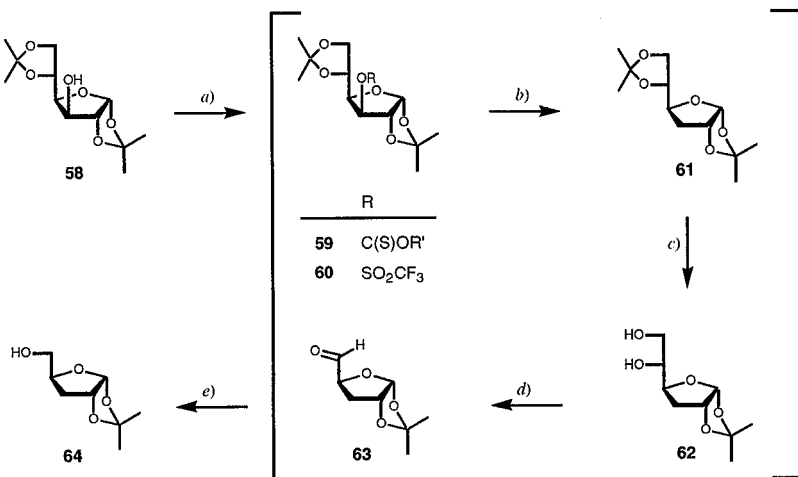


- a) Konzept zur Herstellung eines vorfunktionalisierten Zuckerbausteines für die *p*DNA-Phosphoramidite.
- b) Die 4-*O*-Silyl-Gruppe kann nach der Nucleosidierung mit TBAF oder mit Säure selektiv entfernt werden.

3.2.2 Synthese eines vorfunktionalisierten Zuckerbausteines 57 aus Diacetonglucose

Ein bekannte Methode zur Deoxygenierung von Diacetonglucose **58** verläuft über einen Radikalkettenmechanismus [108] [109]. Dabei wird die Diacetonglucose **58** zuerst in ein Thionocarbonat **59** überführt, welches anschliessend mit Bu_3SnH reduziert wird (Schema 28). Eine andere, sehr effiziente Methode wurde von *Sato et al.* [110] beschrieben. Bei dieser wird Diacetonglucose **58** zuerst in das entsprechende Triflat **60** überführt.

Schema 28.



- PhOC(S)Cl, DMAP, Pyridin/ CH_2Cl_2 resp. $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, Pyridin/ CH_2Cl_2 .
- Bu_3SnH , AIBN, Toluol resp. Bu_4NBH_4 , Toluol, 100°C .
- $\text{AcOH}/\text{HCOOC}/\text{H}_2\text{O}$ 70 : 5 : 25, RT, 2.5 h.
- NaIO_4 , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1 : 1, 4° , 1.5 h.
- NaBH_4 , $^t\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ 9 : 1, 4° , 15 min (62% Rohausbeute ausgehend von **58**, NMR-rein).

Anschliessend wird die Trifluormethansulfonyloxy-Gruppe durch den, in organischen Lösungsmitteln gut löslichen, Hydriddonor Bu_4NBH_4 substituiert, wobei keine Bildung eines Eliminationsproduktes beobachtet wird.

Beide Methoden wurden im 10 g Massstab durchgeführt, wobei die Methode von *Sato* mit Bu_4NBH_4 etwas optimiert wurde. Das dafür notwendige Triflat **60** wurde nach dem Protokoll von *Liu et al.* [111] resp. *Hall & Miller* [112] hergestellt. Bei der Aufarbeitung wurde mit Hexan gegen eine wässrige Lösung aus 10% Zitronensäure selektiv das Triflat **60** aus der Reaktionslösung extrahiert. Dieses war derart rein, dass es direkt mit Bu_4NBH_4 umgesetzt werden konnte. Im Gegensatz zu *Liu et al.* [111] wurde anstelle von Benzol Toluol als Lösungsmittel verwendet, wodurch die Reaktionstemperatur auf 100°C erhöht werden konnte. Unter diesen optimierten Bedingungen wurde keine Bildung von Eliminationsprodukten oder eine O-S-Spaltung wie beschrieben von *Barette & Goodman* [113], welche andere Hydridreagenzien verwendeten, beobachtet. Die 3-Desoxyglucose **61** wurde in einer Ausbeute von 80% ausgehend von der Diacetonglucose **58** erhalten, was deutlich besser war im Vergleich zu der radikalischen Reduktion, bei welcher die Reaktion in 65% Ausbeute verlief.

Die zweifach Diisopropyliden-geschützte 2'-Desoxyglucose **61** konnte selektiv an der 5,6-Position entschützt werden, wobei anstelle von $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 70 : 30 [114] eine Lösung aus $\text{AcOH}/\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ 70 : 5 : 25 verwendet wurde (Schema 28). Das Diol **62** wurde mit NaIO_4 gespalten und der erhaltene Aldehyd **63** mit NaBH_4 zum 3-Desoxyribosederivat **64** reduziert. All diese Reaktionen verliefen quantitativ, so dass die Verbindung **64** ohne weiteres für alle nachfolgenden Reaktionen direkt eingesetzt werden konnte.

Für die Ueberführung von 1,2-Isopropyliden-3-desoxyribofuranose (**64**) in ein Pyranosederivat wurden verschiedene Zugänge untersucht (Schema 29, 30). Leider führten diese Wege stets zu Gemischen aus Pyranosiden und Furanosiden, was die Isolierung der verschiedenen Produkte erschwerte und ihre Ausbeuten verminderte.

Die Behandlung des Acetonides **64** mit HCl/MeOH unter Gleichgewichtsbedingungen führte zu einem Furanosid/Pyranosid-Gemisch im Verhältniss 8 : 33 : 39 : 20 α -Fu/ β -Fu/ α -Py/ β -Py, bei welchem chromatographisch nur das α -Pyranosid **65** von den drei anderen

Isomeren abgetrennt werden konnte (siehe Figur 26, die Zuordnung der Signale erfolgte nach [91] [92]).

Bei der Benzoylierung des α -Methylpyranosides **65** bei -78° wurde ein Gemisch aus 2- und 4-*O*-benzoylierten Verbindungen im Verhältnis 4 : 6 erhalten, welche zudem chromatographisch nicht getrennt werden konnten. In der Folge wurde gleich zweifach benzoyliert und das erhaltene Dibenzoat **66** mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ umgesetzt. Dabei wurden die Benzoylgruppen z. T. abgespalten, was unter anderem wieder zur Bildung von Furanosiden führte; 1-*O*-Acetyl-2,4-di-*O*-benzoylribopyranose (**67**) wurde nicht gebildet, hingegen das offenkettige Produkt **68** (Schema 29). Die Bildung analoger acyclischer Derivate ausgehend von verschiedenen Pentofuranosiden ist beschrieben in [94] [95] [115], wobei in [95] je nach Wahl der Reaktionsbedingungen entweder das cyclische oder das acyclische Derivat bevorzugt gebildet wird. Bei der Umsetzung des Dibenzoates **66** mit HBr/AcOH nach dem Protokoll von [116] entstanden in analoger Weise die offenkettigen Derivate **69** und **70**, nicht aber das gewünschte Bromoribosid **71**.

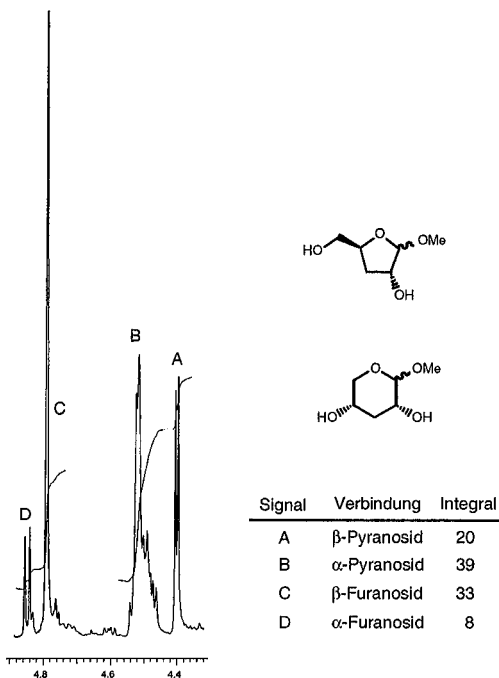
In der Folge wurde das Acetonid **64** durch Behandlung mit einem sauren Ionentauscher zur 3-Desoxyribose **72** hydrolysiert (Schema 30). Gegen unsere Erwartungen lag die 3-Desoxyribose wiederum in hohem Anteil in der Furanoseform vor. Während bei der Ribose das Verhältnis Pyranose/Furanose bei RT 81:19 ist [117], so ist es bei der 3-Desoxyribose nur gerade 57:43 (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7. $^1\text{H-NMR}$ -Signale der Anomerprotonen von Ribose und 3-Desoxyribose^{a)}

	Ribose ^{b)}			3-Desoxyribose		
	δ [ppm] ^{c)}	J [Hz] ^{d)}	Anteil [%] ^{e)}	δ [ppm] ^{c)}	J [Hz] ^{d)}	Anteil [%] ^{e)}
α -Pyranose	4.86	1.8	19	5.03	3.2	19
β -Pyranose	4.92	6.6	62	4.59	7.1	38
α -Furanose	5.38	ca. 3	7	5.34	4.1	12
β -Furanose	5.25	1.8	12	5.28	-	31

^{a)} aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (300 MHz, D_2O , RT); ^{b)} Die Werte der Ribose stammen aus [117]; ^{c)} Verschiebung der Anomerprotonensignale; ^{d)} Kopplungskonstante der Anomerprotonen; ^{e)} der prozentuale Anteil unter Gleichgewichtsbedingungen wurde aufgrund der Signalintensität (Integral) berechnet.

Figur 26.



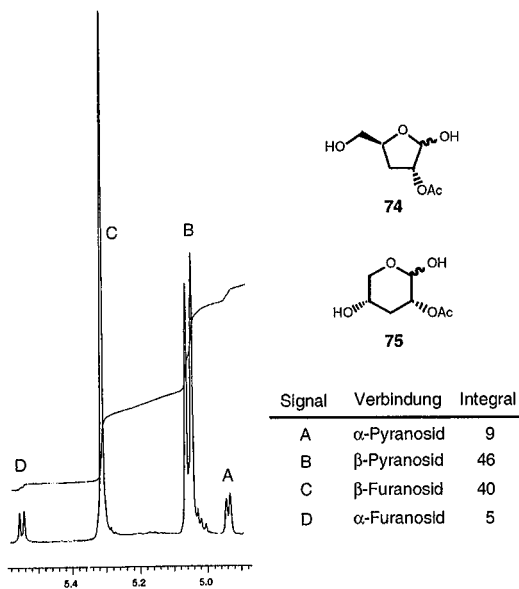
Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes von 3-Desoxymethylriboside, gemessen in CDCl_3 bei RT. Dargestellt sind die H-C(1)-Signale; die Zuordnung erfolgte nach [91] [92].

Um die ungünstige Gleichgewichtslage zwischen Furanosen und Pyranosen der 3-Desoxyribose **72** in Richtung der Pyranosen zu verschieben, wollten wir die 3-Desoxyribosepyranosen durch Einführung einer geeigneten Schutzgruppe dem Gleichgewicht entziehen. Üblicherweise wird zur selektiven Schützung von vicinalen diequatorialen Hydroxygruppen 2,2,3,3-Tetramethoxybutan (TMB) oder 1,1,2,2-Tetramethoxycyclohexan (TMC) eingesetzt [118] [119] [120]. Die Umsetzung der 3-Desoxyribose **72** mit TMB in

Analogie zu [120] verlief nicht einheitlich und das gewünschte bicyclische Diacetal **73** konnte nicht isoliert werden (Schema 30).

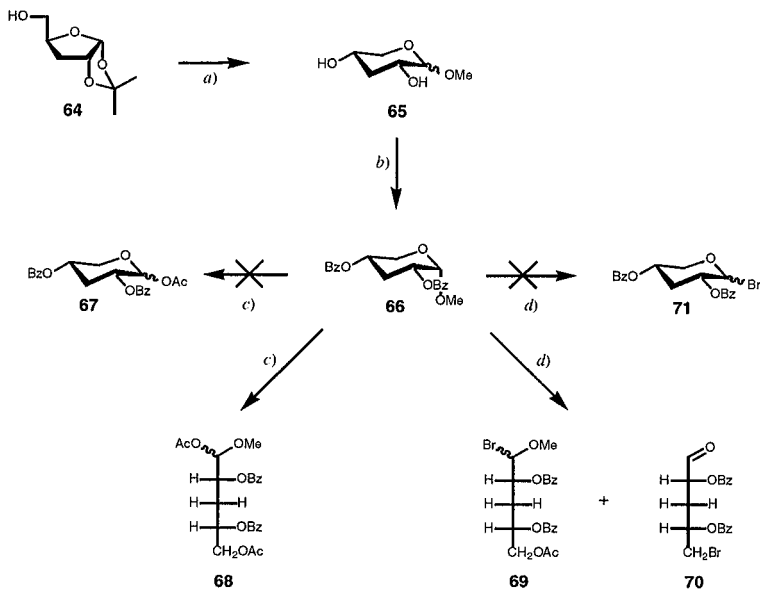
Das Acetonid **64** wurde mit Chloressigsäureanhydrid an der 5-*O*-Position acyliert und danach das erhaltene Derivat **74** mit AcOH/Ac₂O/H₂SO₄ umgesetzt [95]. So konnten die Furanoside **75** in guter Ausbeute erhalten werden. Bei Behandlung mit 5% Et₃N in MeOH (v/v) wurden die 5-Chloracetyl- und die 1-Acetyl-Gruppe abgespalten; nach Equilibrierung lag das Gleichgewicht mit 45 : 55 nur gering auf der Seite der Pyranosen **77** (Figur 27).

Figur 27.



Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes von **74/75**, gemessen in H₂O bei RT. Dargestellt sind die H-C(1)-Signale; die Zuordnung erfolgte nach [91] [92].

Schema 29.



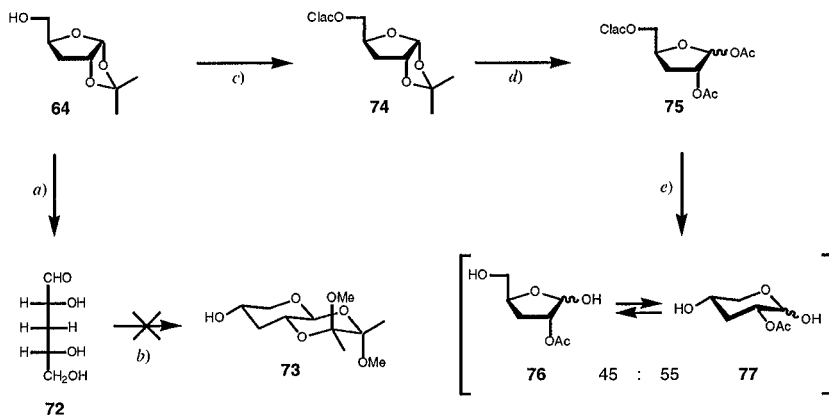
- a) HCl, MeOH, $\uparrow\downarrow$, 20 h, 71% (total).
 b) BzCl, Pyridin/CH₂Cl₂, 4°, 3 h, 85%.
 c) H₂SO₄, Ac₂O, 60°, 2 h.
 d) HBr in AcOH/CH₂Cl₂, 4°, 2 h.

Um die bisher aufgetretenen Probleme bei der Ueberführung von Methylribosiden in die gewünschten 1-O-Acylderivate zu umgehen, wollten wir das 1,2-Isopropylidenribose **64** in die entsprechenden Benzylriboside **78** überführen (Schema 39). Die Benzylgruppen können in einem späteren Schritt hydrogenolytisch entfernt werden und die entsprechenden Ribosederivate in 1-O-Acylderivate überführt werden. Deshalb wurde das 1,2-Isopropyliden-ribose **64** unter sauren Bedingungen mit Benzylalkohol umgesetzt. Erstmals wurden die entsprechenden Pyranoside **78** als Hauptprodukt gebildet

(Pyranoside/Furanoside 2 : 1), jedoch konnten die Pyranoside nicht vollständig von den Furanosiden getrennt werden.

Die Silylierung der Benzylpyranoside **78** mit Et_3SiCl , ${}^i\text{Pr}_2\text{NEt}$ in CH_2Cl_2 bei -78°C ergab ein Gemisch aus den 2- und 4-*O*-silylierten Verbindungen **79** und **80** im Verhältnis 1 : 3. Die beiden Regioisomeren konnten chromatographisch voneinander getrennt und zudem von den verbleibenden Furanosiden abgetrennt werden (Schema 31).

Schema 30.



- a*) DOWEX H⁺, THF, H₂O, 80°, 16 h.
b) TMB, Trimethylorthoformiat, *p*-TosOH, DMF, 80°, 4h.
c) (Clac)₂O, Pyridin/CH₂Cl₂, RT, 30 min, 93%.
d) Ac₂O/AcOH, H₂SO₄, RT, 20 min, 95%.
e) Et₃N, MeOH, RT, 1 h.

Das 4-*O*-silylierte Ribopyranosid **80** wurde mit H₂ und Pd(OH)₂/C (*Pearlman's* Katalysator) [121] [122] in Anwesenheit von Ammoniumformiat [123] hydrogenolytisch entschützt und die gebildete Pyranose anschliessend mit BzCl in Pyridin/CH₂Cl₂ zum vorfunktionalisierten Zuckerbaustein **81** umgesetzt.

Die 2-*O*-silylierten Benzylriboside **79** wurden an der 4-OH-Gruppe chloracetyliert (\rightarrow **82**) und mit H_2 unter Verwendung von Pd/C in HCOOH/THF (1:1) hydrogenolysiert, wobei gleichzeitig die Et_3Si -Gruppe entfernt wurde. Durch zweifache Benzoylierung der 3-Desoxy-4-chloracetylribose wurde der vorfunktionalisierte Zuckerbaustein **83** in 60% Ausbeute ausgehend von **79** erhalten. Auf diese Weise haben wir zwei vorfunktionalisierte Zuckerbausteine **81** und **83** erhalten, die für erste Nukleosidierungsreaktionen erfolgreich eingesetzt wurden. Jedoch war ihre Synthese ab der Stufe des Acetonides **64** nicht mehr sehr ergiebig, was vorallem auf die ungünstige Furanose/Pyranose Gleichgewichtslage zurückzuführen war.

Deshalb wurde in der Folge eine neue Synthese für den vorfunktionalisierten Zuckerbaustein **98** entwickelt, bei dem von Beginn an ein Pyranosid vorlag.

3.2.3 Synthese eines vorfunktionalisierten Zuckerbausteines **98** aus D-Xylose

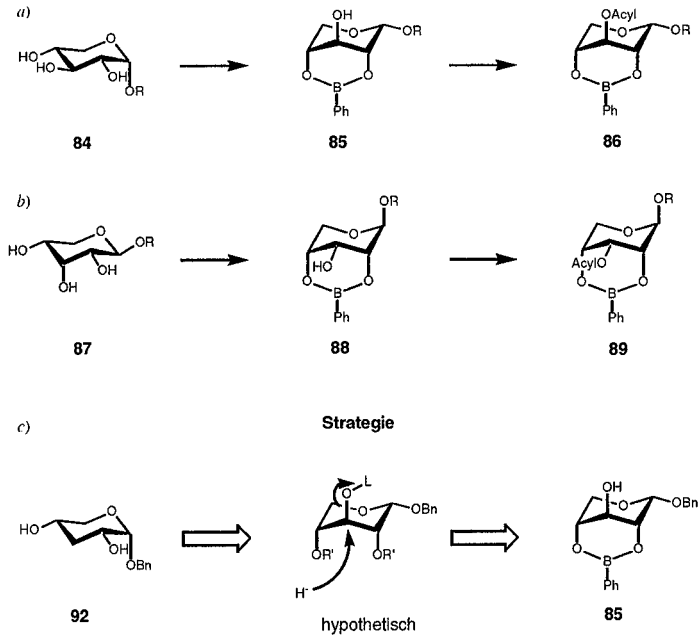
Als einzige, in der Literatur bekannte Methode zur Auszeichnung der 3-OH-Position von Ribosiden- und Xylosiden, ist ihre Ueberführung in cyclische 2,4-Boronsäurediester [124, 125]. Dabei wird der Zucker **84** bei Behandlung mit Phenylboronsäure in einen cyclischen 2,4-Boronsäurediester **85** überführt, so dass die 3-OH-Gruppe als einzige freie Hydroxygruppe weiter funktionalisiert werden kann (Schema 32). Im Falle von ribokonfigurierten Zuckern **87** steht die OH-Gruppe des Boronsäureesters **88** equatorial und ist etwas weniger nucleophil als im Falle der Xylose **85**, wo sie axial steht [124, 125]. Es ist weiter bekannt, dass bei der Glycosidierung von D-Xylose mit BnOH das α -D-Benzylxylopyranosid **84** direkt kristallisiert und so sehr einfach von den anderen Isomeren abgetrennt werden kann [126] [127].

Wir versuchten deshalb einen Syntheseweg zu finden, bei welchem die 3-OH-Gruppe des α -D-Xylopyranosides **84** so aktiviert wird, dass sie analog zur Desoxygenierung der Diacetonglucose **58** durch einen Hydridonor substituiert werden kann und so zum gewünschten 3-Desoxyribopyranosid **92** führt (Schema 32).

α -D-Benzylxylopyranosid **84** wurde mit Phenylboronsäure in Toluol am Wasserabscheider zum 2,4-Phenylboronsäureester **85** umgesetzt [125], welcher anschliessend in das 3-O-Mesylat **91** überführt wurde. Dieses wurde nach der Aufarbeitung mit fünf eq. LiAlH_4 umgesetzt, wobei das gewünschte 3-Desoxyribopyranosid **92** nur in ca. 25% Ausbeute isoliert werden konnte (Schema 33). Auch die Behandlung des 3-O-Triflats **93**, welches ebenfalls aus dem Boronsäureester **85** hergestellt wurde, mit Bu_4NBH_4 in Toluol oder mit LiAlH_4 in THF führte nicht zum desoxygenierten Ribopyranosid **92**.

Jedoch sahen wir das 3-O-Mesylat **91** als Vorläufer für die Epoxide **94** und **95**. Bei der Behandlung des Xyloederivates **91** mit Natriummethylat in Methanol wurde die Phenylboronylgruppe entfernt und gleichzeitig wurden die beiden regioisomeren Epoxide **94** und **95** unter Substitution der Mesyloxygruppe quantitativ gebildet (Schema 33).

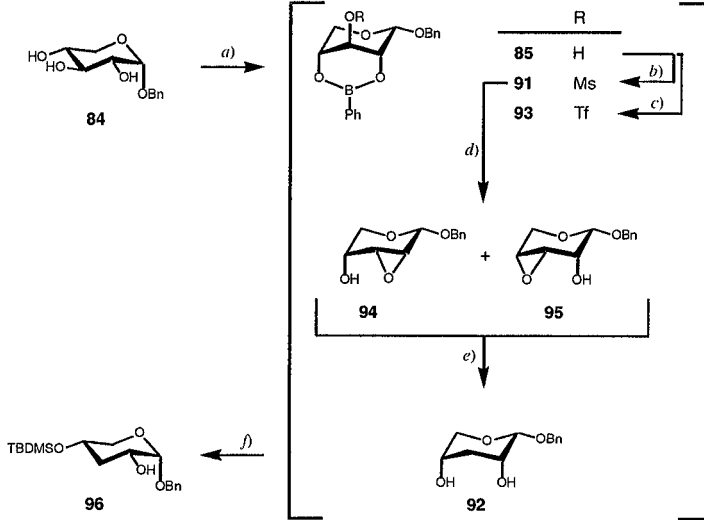
Schema 32.



- a) Selektive 3-*O*-Acylierung von Xylopyranosiden über Phenylboronsäureester nach *Ferrier et al.* [125].
 b) Analog die 3-*O*-Acylierung von Ribopyranosiden beschrieben von *Ferrier & Prasad* [124].
 c) Synthesestrategie zur Desoxygenierung von α -D-Benzylxylopyranosid, siehe *Pitsch* [117].

Die beiden Epoxide konnten anschliessend durch Behandlung mit LiAlH_4 quantitativ zum gewünschten 3-Desoxyribopyranosid **92** geöffnet werden; d. h. bei der Ringöffnung wurde aus beiden Epoxiden **94** und **95** das gleiche Derivat **92** gebildet. Der Angriff des Hydrides erfolgte also in beiden Fällen nach der Regel von *Fürst-Plattner*, welche das trans-diaxiale Produkt bevorzugt [128] (Schema 34).

Schema 33.



- a) PhB(OH)₂, Toluol, Wasserabscheider, ↓↑, 2 h.
 b) Et₃N, MeSO₂Cl, Toluol, 4° → RT, 1.5 h.
 c) Et₃N, Tf₂O, Toluol, 4°, 1.5 h.
 d) NaOMe, MeOH, 4° → RT, 1 h.
 e) LiAlH₄, THF, 4° → RT, 1 h.
 f) TBDMSCl, ^tPr₂NEt, AgNO₃, CH₂Cl₂, -78° → RT, 5 h, 65% über alle Stufen.

Bei den ersten Nucleosidierungsexperimenten unter *Vorbrücken* Bedingungen[100] [101] wurde der 4-*O*-Et₃Si-geschützte Zuckerbaustein **81** mit Thymin **30** in CH₃CN in Gegenwart von SnCl₄ als Katalysator umgesetzt. Interessanterweise wurde dabei quantitativ das 3'-Desoxyribofuranosyl-Nucleosid **99** erhalten (Schema 35). Dies war vermutlich auf den Verlust der Et₃Si-Gruppe unter den scharfen Nucleosidierungsbedingungen zurückzuführen. Die freigewordene 5'-OH-Gruppe, als Glycosid-Donor, bildete möglicherweise als Intermediat ein Diribosid, bei welchem die Ribopyranose des Glycosid-Akzeptors zur

Furanose isomerisieren konnte. Diese rasche und quantitative Isomerisierung zu Furanosiden steht auch im Einklang mit der Beobachtung, dass das Gleichgewicht bei 2-*O*-acylierten Ribosederivaten wie z. B. **76** und **77** sehr stark auf der Seite der Furanosen liegt. Aus diesem Grund wurde die säurestabile TBDMS-Gruppe ([*tert.*-Butyl]dimethylsilyl) zur Schützung der 4-*O*-Position verwendet. Bei der Behandlung von **92** mit TBDMS-Cl, Pr_2NEt , AgNO_3 in CH_2Cl_2 bei -78° und anschließendem, langsamen Erwärmen auf RT wurde hoch selektiv die 4-*O*-TBDMS-geschützte α -Benzylribopyranose **96** gebildet (Schema 33); die Bildung des regioisomeren 2-*O*-TBDMS- oder des zweifach geschützten Produktes wurde nicht beobachtet. Der Grund für die gute Selektivität ist wahrscheinlich die Bildung des thermodynamisch stabileren Produktes.

Schema 34.

Oeffnung der Epoxide



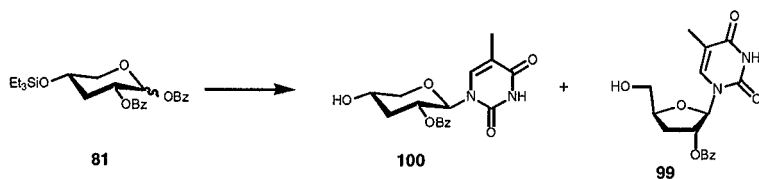
Die Oeffnung der Epoxide verläuft bei beiden Verbindungen nach der Regel von *First-Platmer*. In beiden Fällen entsteht das 3-Desoxybenzylribopyranosid.

Das Desoxyribosid **96** war das erste Produkt, welches in dieser Reaktionssequenz mittels Säulenchromatographie gereinigt wurde. Die Ausbeute über alle Stufen ausgehend vom Benzylxylosid **84** betrug 65% bei einem 20 g Synthesemasstab.

Der Zuckerbaustein **96** konnte unter Atmosphärendruck mit H_2 und $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ [121] als Katalysator in ca. 3 h zum Ribosederivat **97** hydrogenolysiert werden (Schema 36). Bei der Verwendung von Pd/C anstelle des *Pearlman's* Katalysators musste ein H_2 -Druck von 6 bar

aufgebaut werden, damit die Reaktion überhaupt eintrat [98] [123]. Zudem kam die Reaktion nach 24 h zum Erliegen und der Katalysator musste ersetzt werden [99]. Nach weiteren 12 h war das Edukt vollständig umgesetzt.

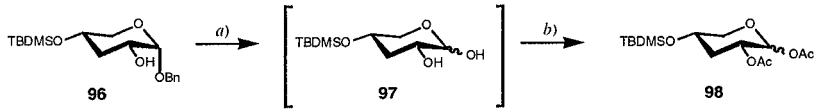
Schema 35.



	<u>100</u>	:	<u>99</u>
a)	-	:	100
b)	20	:	80

Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde direkt mit Ac_2O in Pyridin acetyliert. Nach der Reinigung konnte das Diacetat **98** in einer Ausbeute von 70% über beide Stufen isoliert werden. Damit hatten wir eine sehr elegante und ergiebige Synthese für die Herstellung des vorfunktionalisierten Zuckerbausteines **98** gefunden, bei welcher ausgehend von α -D-Benzylxylopyranose (**84**) über sieben Stufen und zwei Reinigungsschritten in 45% Ausbeute das gewünschte 4-O-[(tert.-Butyl)dimethylsilyl]-3-desoxy- α/β -D-ribose-1,2-Diacetat (**98**) erhalten wurde.

Schema 36.



- a) H_2 Pd(OH)₂/C, 3 h oder H_2 (6 bar) Pd/C, 36 h.
 b) Ac_2O , Pyridin, RT, 14 h, 70%.

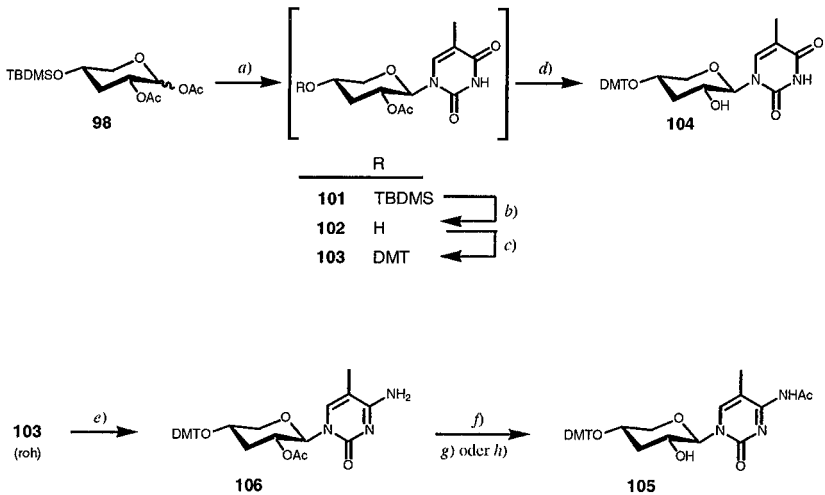
3.2.4 Synthese der *p*DNA-Phosphoramidite

Pyrimidin-Nukleoside

Der vorfunktionalisierte Zuckerbaustein **98**, mit der säurestabilen 4-*O*-TBDMS-Gruppe, war besser für die Herstellung von *p*DNA-Nukleosiden geeignet, als der 4-*O*-TES-geschützte Baustein **81** (Kapitel 3.2.2), bei welchem in der Nucleosidierungsreaktion unter *Vorbrüggen* Bedingungen [100] [101] bei der Verwendung von SnCl_4 als *Lewis*-Säure ausschliesslich, und bei der Verwendung von Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat (TMSOTf) zu 80%, Furanosylnucleoside **99**, aber nur 20% des gewünschten Pyranosylnucleoside **100** gebildet wurden (Kapitel 3.2.3, Schema 35). Um eine Desilylierung vollständig zu verhindern, wurde bei der Nucleosidierung des Diacetates **98** mit Thymin TMSOTf als *Lewis*-Säure verwendet. Diese Kombination führte erfreulicherweise ausschliesslich zur Bildung von Pyranosyl-Nucleosiden (Schema 37).

Ohne weitere Reinigung konnte die TBDMS-Gruppe des Thymin-Nucleosides **101** mit 5% *conc.* HCl in CH_3CN (v/v) bei RT in 10 min. abgespalten werden (Schema 37). Der erhaltene Alkohol **102** wurden direkt mit DMTCl/Collidin/ AgNO_3 [86] trityliert (\rightarrow **103**) und anschliessend mit 2M NaOH/MeOH/THF 1 : 4 : 5 deacetyliert. Das Thymin-Nucleosid **104** wurde in einer Ausbeute von 91% (über vier Stufen) isoliert.

Schema 37.



- a) Thymin, BSA, CH_3CN , 60° , dann TMSOTf, 40° , 15 min.
 b) conc. $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{CN}$ 1 : 20 (v/v), RT, 10 min.
 c) DMTCl , Collidin, AgNO_3 , RT, 20 min.
 d) $2\text{M NaOH}/\text{MeOH}/\text{THF}$ 1 : 4 : 5 (v/v), 4° , 20 min, 91%.
 e) 1. 4-Chlorphenyldichlorphosphat, 1,2,4-Triazol, Et_3N , Pyridin, $4^\circ \rightarrow \text{RT}$, 14 h; 2. $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{Dioxan}$, RT, 1 h, 78%.
 f) $2\text{M NaOH}/\text{MeOH}/\text{THF}$ 1 : 4 : 5 (v/v), 4° , 10 min.
 g) Ac_2O , DMF, RT, 14 h, 76%.
 h) Pyridin, TMSCl , RT, 5 min, dann Ac_2O , RT, 15 min; $0.5\text{M Et}_4\text{NF}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in THF, RT, 5 min, 71%.

Das 5-Methylcytosin-Nukleosid **105** wollten wir durch Basentransformation aus dem tritylierten Thymin **103** herstellen. Methoden für diese Transformation sind in der Literatur beschrieben [129, 130]. Die meisten dieser Methoden sind mit der Anwesenheit der DMT-Gruppe verträglich, weshalb die Basentransformation nach der Dimethoxytritylierung durchgeführt werden konnte.

Das Thyminnukleosid **103** wurde mit Chlorphenyldichlorphosphat aktiviert und in das entsprechende 4-Triazolidderivat überführt. Durch Behandlung mit NH_3 in Dioxan konnte

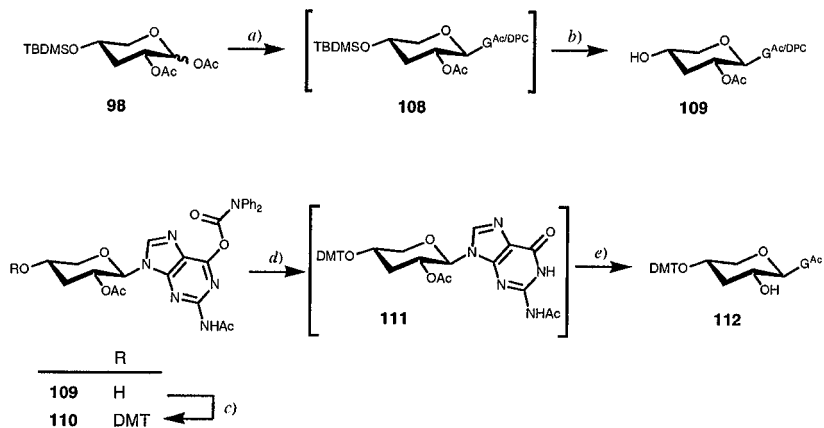
das 5-Methylcytosin-Nukleosid **106** in 78% Ausbeute isoliert werden [130] [131]. Als nächstes wurde die 2'-*O*-Acetylgruppe von **106** unter Standardbedingungen entfernt und daraufhin die Base an der *N*⁴-Position in DMF/Ac₂O acetyliert [130] [104]. Es wurde beobachtet, dass das M-Nukleosid **106** nicht selektiv an der Base geschützt werden konnte, wenn die dazu verwendete Vorstufe verunreinigt war. Jedoch konnte dieses Problem durch eine *in situ* Silylierung mit TMSCl umgangen werden. Das M-Nukleosid **105** wurde in 71% Ausbeute ausgehend von **106** isoliert.

Purin-Nukleoside

Wie bei der Herstellung der beiden Pyrimidin-Nukleoside **104** und **105** beabsichtigten wir auch für die beiden Purin-Nukleoside des Guanins und des Diaminopurins nur eine Nukleosidierungsreaktion durchzuführen. Verschiedene Methoden zur Ueberführung von Guanin-Nukleosiden in entsprechende 2,6-Diaminopurin-Nukleoside sind in der Literatur beschrieben [132] [133] [134]. Deswegen entschieden wir uns, die Nukleosidierung mit dem *N*²-acetylierten *O*⁶-Diphenylcarbamoyl-(DPC-)geschützten Guanin **35** durchzuführen, bei welchem selektiv das *N*⁹-verknüpfte Nukleosid **110** gebildet wird [103], welches durch Basentransformation in das 2,6-Diaminopurin-Nukleosid **107** überführt werden kann.

Bei der Nukleosidierungsreaktion des Diacetates **98** mit dem *O*⁶-Diphenylcarbamoyl-geschützten Guanin (DPC-Schutzgruppe) **35** unter denselben Bedingungen wie bei den 3'-*O*-Methyl-*p*-RNA-Bausteinen (Kapitel 3.1.5) oder wie beschrieben für Ribofuranosyl-Derivate in [103] wurde ein komplexes Gemisch verschiedener Produkte erhalten. Nach zahlreichen Vorversuchen wurde einerseits das Lösungsmittel Toluol durch Benzol und andererseits der Katalysator TMSOTf durch TESOTf ersetzt. Durch Herabsetzen der Temperatur von 60° auf 45° fand eine relativ einheitliche Produktbildung bei einer Reaktionszeit von 90 min statt. Nach anschließender Behandlung des gebildeten Nukleosides **108** (Rohprodukt) mit TBAF·3H₂O in AcOH/CH₃CN wurde das G-Nukleosid **109** in 55% Ausbeute erhalten.

Schema 38.

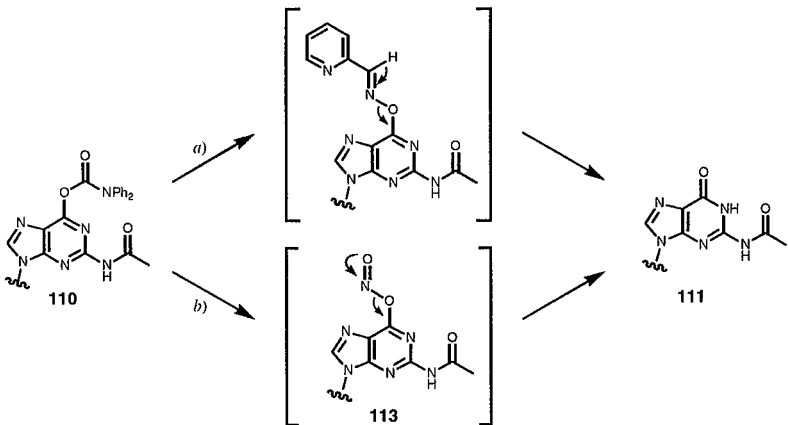


- a) G^{Ac}/DPC, BSA, (CH₂Cl)₂, 60°, dann TESOTf, Benzol, 45°, 90 min.
 b) 1M TEAF·H₂O, 0.25M AcOH, CH₃CN, RT, 20 min, 55%.
 c) DMTCl, Collidin, AgNO₃, RT, 30 min.
 d) 1M NaNO₂, DMSO, 75°, 6 h, 53% (über zwei Stufen).
 e) 2M NaOH/MeOH/THF 1 : 4 : 5 (v/v), 4°, 8 min, 48% (über drei Stufen).

Während der Entschützung der ersten *p*DNA-Sequenzen, bei welchen *O*⁶-DPC-geschützte Guaninphosphoramidite eingesetzt wurden, wurde festgestellt, dass sich teilweise ein 6-Methylaminopurinderivat bildete, höchstwahrscheinlich als Folge einer nukleophilen Substitution der DPC-Gruppe durch Methylamin. Deshalb wollten wir die DPC-Gruppe noch auf Stufe der Nucleoside unmittelbar nach der Dimethoxytrytylierung entfernen. Bei der Entschützung von **110** unter den beschriebenen Bedingungen [135] (mit *N*¹,*N*¹,*N*³,*N*³-Tetramethylguanidinium 2-pyridin-*syn*-carbaldoximat in Dioxan/Wasser) wurde jedoch ein komplexes Reaktionsgemisch erhalten. Hingegen konnte bei Behandlung des Derivates **110** mit 1M NaNO₂ in DMSO die DPC-Gruppe in 6 h bei 75° einheitlich entfernt und das Nucleosid **111** in einer Ausbeute von 53% über beide Stufen erhalten werden. Die

Entschützungsreaktion mit NaNO_2 verläuft höchstwahrscheinlich über einen Additions-Eliminations-Mechanismus am Aromaten und erfolgt analog zur Entschützung mit 2-Pyridin-*syn*-carbaldoximat; das dabei gebildete Intermediat **113** kann anschliessend zum gewünschten Guanin-Nukleosid **111** fragmentieren (Schema 39).

Schema 39.



Mögliche Reaktionsmechanismen bei der Entfernung der DPC-Gruppe, vermittelt durch:
 a) Pyridin-2-carbaldoximat [135]; b) NaNO_2 .

Bei der anschliessenden Entschützung der 2'-*O*-Acetylgruppe mit $\text{NaOH}/\text{MeOH}/\text{THF}$ konnte **111** als Rohprodukt eingesetzt werden und das Guanin-Nukleoside **112** in 48% Ausbeute isoliert werden (über drei Stufen, Schema 38).

Die Basentransformation vom Guanin- zum 2,6-Diaminopurin-Nukleosid wollten wir auf der Stufe des dimethoxytritylierten Nukleosides **111** vornehmen. Bei den in der Literatur beschriebenen Methoden [132] [133] [134] [136] wird jeweils das O-C(6) durch Triflierung oder Mesitylierung in eine Abgangsgruppe überführt, welche danach durch Behandlung mit NH_3 in $\text{H}_2\text{O}/\text{Dioxan}$ substituiert werden kann. In unserem Fall haben alle diese Methoden

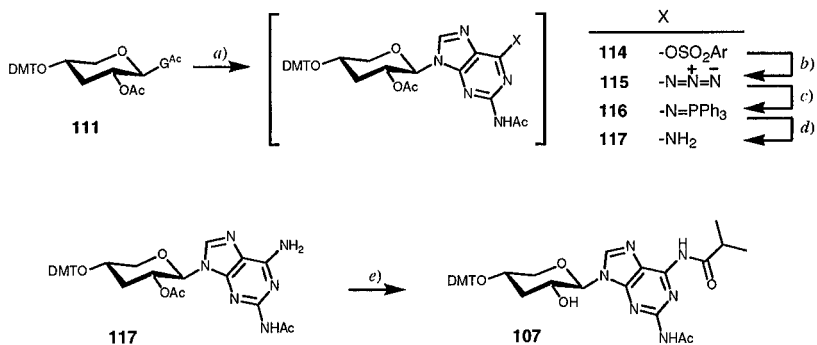
versagt; es wurde immer ein komplexes Reaktionsgemisch erhalten. Hingegen wurde bei der Behandlung der Sulfonatzwischenstufe **114** mit NaN_3 in Pyridin bei 65° ein sauberes, einheitliches Produkt **115** erhalten, welches direkt unter *Staudinger* Bedingungen [85] mit PPh_3 reduziert werden konnte (Schema 40). Das gebildete Phosphinimid **116** konnte in gepufferter Lösung (pH 7) bei 60° in 7 h zum 2,6-Diaminopurin-Nukleosid **117** hydrolysiert werden, welches in 61% Ausbeute ausgehend vom Guanin **111** (über vier Stufen) erhalten wurde. Auch für das Diaminopurin **117** folgte ein Austausch der Schutzgruppen. Weil eine N^6 -Acetylgruppe zu basenlabil war, wurde die verbleibende, exocyclische Aminogruppe als stabileres Isobutyryl-Derivat (ibu) geschützt. Anschliessend wurde die 2'-O-Acetylgruppe mit NaOH/MeOH/THF selektiv entfernt und man erhielt das Diaminopurin-Nukleosid **107** in 75% Ausbeute (Schema 40).

Die Gesamtausbeute von 13% für das Diaminopurin-Nukleosid **107** (ausgehend von **98**) war eher gering. Deshalb entwickelten wir einen kürzeren Syntheseweg ausgehend von der geschützten Nukleobase 2-Amino-6-chlorpurin **118** (Schema 41). Es ist bekannt, dass bei der Nukleosidierung mit 6-Chlorpurinen unter *Vorbrüggen* Bedingungen quantitativ das N^9 -verknüpfte Nukleosid als thermodynamisch stabilstes Produkt gebildet wird [137] [138].

Im Rahmen der ersten orientierenden Versuche wurde festgestellt, dass die N^2 -Acetylgruppe sehr stabil ist und bei der Behandlung mit 10M MeNH_2 in $\text{EtOH/H}_2\text{O}$ zu langsam entschützt wird ($t_{1/2} \approx 2$ h). Deshalb haben wir uns für die labilere Methoxyacetylenschutzgruppe (Mac) entschieden.

Methoxyessigsäureanhydrid (Mac_2O , **120**) wurde unter Verwendung von 1 eq. Methoxyessigsäurechlorid, 1 eq. Methoxyessigsäure und 1 eq. Pyridin hergestellt [139]. Die Nukleobase **119** wurde in Analogie zu [137] mit Mac_2O in Dimethylacetamid (DMA) an der N^6 -Aminogruppe geschützt und **118** wurde in kristalliner Form erhalten (Schema 41).

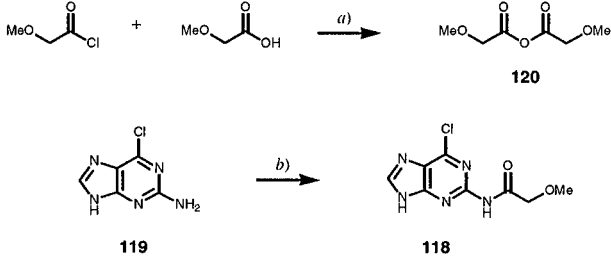
Schema 40.



- a) Mesitylsulfochlorid, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 30 min.
 b) NaN₃, Pyridin, 65°, 3 h.
 c) PPh₃, Pyridin, RT, 30 min.
 d) 0.3M Et₃NHOAc in H₂O/MeOH/THF 1 : 1 : 1, 60°, 7 h, 61% (über vier Stufen).
 e) 1. Isobuttersäureanhydrid, DMAP, Pyridin, 60°, 4h; 2. 0.5M NaOH/MeOH/THF 1 : 4 : 5 (v/v), 4°, 10 min, 75%.

Die Bedingungen für die Nucleosidierungsreaktion mit **98** wurden nochmals optimiert. Das ideale Lösungsmittel war CH₃CN und der beste Katalysator TESOTf. Die Reaktion wurde bei 45° während 60 min durchgeführt. Nach der Nucleosidierung wurde das Nucleosid **121** direkt mit TEAF·2H₂O umgesetzt und das Nucleosid **122** in 66% Ausbeute erhalten (Schema 42). Im ¹³C-NMR-Spektrum wurde anhand der chemischen Verschiebung der aromatischen ¹³C-Kerne durch Vergleich mit bekannten, analogen Nucleosiden das *N*⁹-Isomere Produkt eindeutig nachgewiesen.

Schema 41.



a) Pyridin, 4° → RT, 1 h, Destillation, 50%.

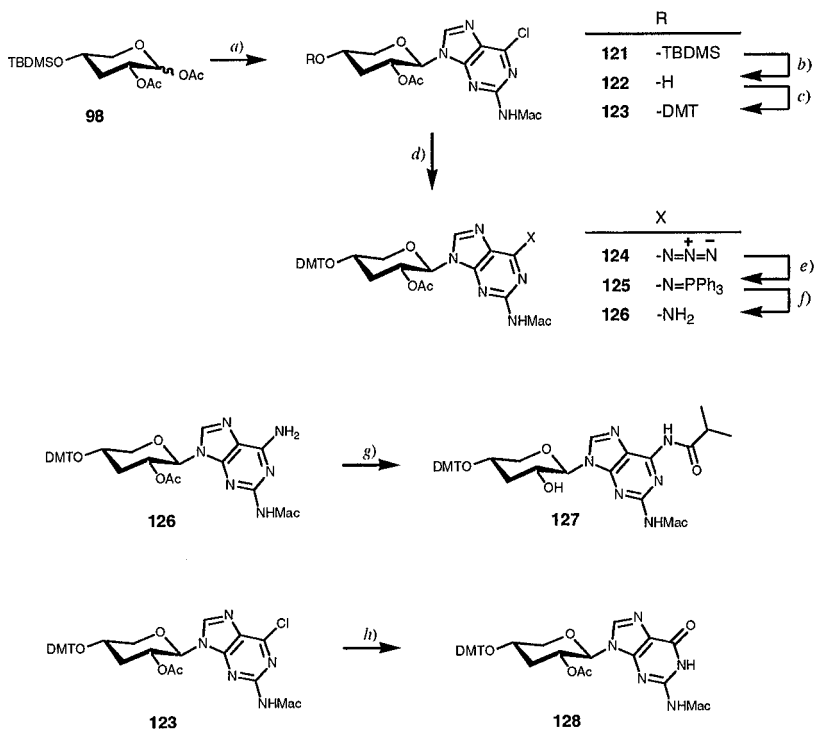
b) 1. Mac_2O , DMA, 120°, 20 min; 2. EtOH, 80°, 5 min, 57%.

Nach der Tritylierung unter Standardbedingungen wurde das Chlorid **123** analog zum Sulfonat **114** mit NaN_3 umgesetzt (→ **124**), mit PPh_3 zum Phosphinimid **125** reduziert und in gepufferter Lösung zum Diaminopurin-Nukleosid **126** hydrolysiert; dieses wurde in guter Ausbeute von 77% ausgehend von **122** (über vier Stufen) erhalten (Schema 42). Die abschliessenden Schritte wurden in Analogie zur Herstellung des N^2 -Acetyl-geschützten Derivates **107** (Schema 40) aus **117** durchgeführt; das N^6 -Isobutyryl- N^2 -methoxyacetyl-geschützte Diaminopurin-Nukleosid **127** wurde in 79% Ausbeute erhalten.

Ein Stabilitätstest der Basenschutzgruppen unter den Entschützungsbedingungen für Oligonukleotide (10M MeNH_2 in EtOH/ H_2O) hat für die Mac- und die ibu-Gruppe von **127** Halbwertszeiten von $t_{1/2} \approx 2.5$ min bzw. $t_{1/2} \approx 4$ min ergeben.

In einem orientierenden, nicht weiter optimierten Vorversuch wurde ausserdem festgestellt, dass das Chloraminopurin-Nukleosid **123** bei der Behandlung mit NaNO_2 in DMSO in das Guanosin-Nukleosid **128** überführt werden konnte (Schema 42). Die Reaktion verlief aber nicht einheitlich, z. T. wurde dabei die labile Mac-Gruppe abgespalten.

Schema 42.



- a)* 118, BSA, CH₃CN, 60°, 20 min, dann TESOTf, 45°, 60 min.
b) 1M TEAF·2H₂O, 0.25M AcOH, CH₃CN, RT, 20 min, 66% (über zwei Stufen).
c) DMTCl, Collidin, AgNO₃, RT, 30 min.
d) NaN₃, Pyridin, 65°, 3 h.
e) PPh₃, Pyridin, RT, 45 min.
f) 1M Et₃NHOAc/MeOH/THF 2 : 5 : 4, 65°, 14 h, 77% (über vier Stufen).
g) 1. Isobuttersäurechlorid, DMAP, Pyridin/CH₂Cl₂ 1 : 5 (v/v), RT, 1 h;
 2. 2M NaOH/MeOH/THF 1 : 4 : 5 (v/v), 4°, 5 min, 79%.
h) 1M NaNO₂, DMSO, 70°, 1 h.

3.2.5 Phosphitylierung und Immobilisierung auf der Festphase

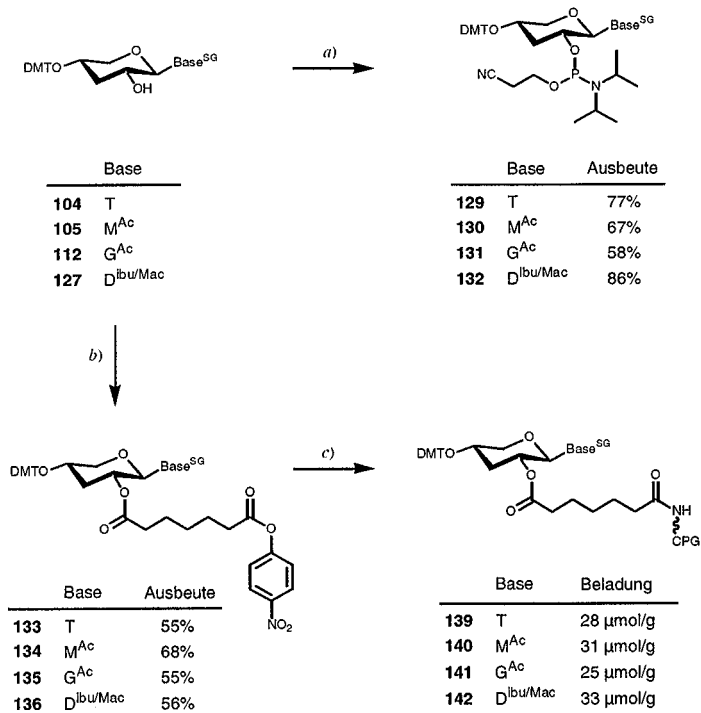
Die *p*DNA-Nukleoside **104**, **105**, **112** und **127** wurden nach den üblichen Bedingungen mit 2-Cyanoethyl-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidochloridit und ¹Pr₂NEt in CH₂Cl₂ über Nacht in die Phosphoramidite **129** - **132** überführt (Schema 43). Alle Reaktionen verliefen nach DC quantitativ und die Phosphoramidite wurden in Ausbeuten zwischen 58% und 86% isoliert. Die geringe Ausbeute von 58% beim Guanin-Phosphoramidit **131** waren vor allem auf grosse Verluste bei der Reinigung mittels Säulenchromatographie zurückzuführen.

Die Immobilisierung der notwendigen Startnukleoside auf der Festphase erfolgte über die Nitrophenylester **133** - **136** als Zwischenstufen. Das dazu notwendige Bis-(4-nitrophenyl)heptandioat (**137**) wurde aus Pimelinsäure (**138**), Thionylchlorid, *p*-Nitrophenol hergestellt und aus THF/Hexan 1 : 2 kristallisiert (Schema 44).

Die Aktivester **133** - **136** wurden aus den Nukleosiden **104**, **105**, **112** und **127** durch Verwendung von 8 eq. **137** und ¹Pr₂NEt in Pyridin hergestellt und in Ausbeuten zwischen 55% und 68% erhalten. Bei der anschliessenden Kopplung auf die CPG-Festphase unter Standardbedingungen mit ¹Pr₂NEt in DMF wurden für alle vier Produkte **139** - **142** gute Beladungsdichten zwischen 25 und 33 μmol/g erreicht.

Interessanterweise wurde festgestellt, dass die Beladungsdichte der Träger von der Qualität des Bis-(4-nitrophenyl)heptandioates (**137**) abhing und es deshalb ausgesprochen wichtig war, dieses vorher zu kristallisieren. Die Verwendung eines verunreinigten Pimelinsäureesters zur Herstellung der Aktivester **133** – **136** konnte bei deren Reinigung nicht kompensiert werden; in solchen Fällen wurden Beladungsdichten von maximal 15 μmol/g erreicht.

Schema 43.

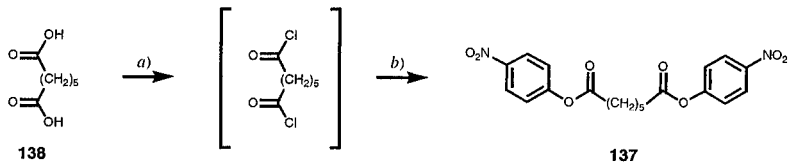


a) CIP(NⁱPr₂)(OCH₂CH₂CN), ⁱPr₂NEt, CH₂Cl₂, RT, 14 h.

b) Bis-(4-nitrophenyl)-heptandioat, ⁱPr₂NEt, Pyridin, RT, 14 h.

c) 1. LCAA-CPG, ⁱPr₂NEt, DMF, RT, 14 h;

2. Ac₂O, Pyridin, RT, 2 h für **139** - **141**; (MeOCH₂CO)₂O, Pyridin, RT, 2 h für **142**.

Schema 44.

- a) 2 eq. SOCl₂, Toluol/THF 1 : 1, ↓↑, 2 h.
 b) 1. *p*-Nitrophenol, Toluol/THF 1 : 1, Et₃N (langsam zugeben), 4° → RT, 40 min;
 2. Kristallisation aus THF/Hexan 1 : 2, 38%.

3.2.6 Synthese von *p*DNA-Sequenzen

Die automatisierte Synthese der *p*DNA-Sequenzen **F – M** (Tabelle 8) erfolgte auf einem *Pharmacia Gene Assembler* (Schema 45). Es wurden die selben Protokolle wie bei der RNA-Synthese mit 2'-*O*-TOM-geschützten Phosphoramiditen verwendet [21]. Die Detritylierung erfolgte mit 4% Dichloressigsäure in (CH₂Cl)₂ während 2 min. (1.5 μmol Ansatz) resp. 4 min (10 μmol Ansatz). Gekoppelt wurde mit einer 0.07M Phosphoramidit Lösungen in CH₃CN für **129**, **130** und **131**, resp. THF/(CH₂Cl)₂ 1 : 1 für **132**. Als Katalysator wurde 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol als 0.25M Lösung in CH₃CN verwendet. Die Kopplungszeit für 1.5 μmol Ansätze betrug 5 min, bei 10 μmol Ansätzen wurde sie auf 9 min. verlängert. Ein Capping erfolgte sowohl vor als auch nach der Oxidation. Um eine Acetylierung der *N*²-Aminogruppe des Diaminopurin-Nukleosides zu verhindern (in Analogie zum Verhalten von *N*²-PAC-geschützten DNA-Nukleosiden [140]), wurde Mac₂O anstelle von Ac₂O als Cappingreagens verwendet. Oxidiert wurde mit I₂/H₂O/Pyridin/THF 3 : 2 : 20 : 75, während 1 min. für 1.5 μmol Ansätze resp. 1.5 min. für 10 μmol Ansätze.

Tabelle 8. pDNA-Sequenzen

	pDNA-Sequenz	Massstab		Ausbeute		MS ^{a)} [m/z]	
		μmol	a.u. ^{b)}	μmol	berechnet ^{c)}	gefunden	
F	4'-TTTTTTTT-2'	1.5	48	0.78	2371.6	2371.1	
G	4'-DDDDDDDD-2' ^{d)}	1.5	24	0.31	2563.8	2563.8	
H	4'-MMMMMM-2' ^{e)}	1.5	30	0.67	1757.3	1757.2	
I	4'-GGGGGG-2'	1.5	23	0.33	1913.3	1913.0	
J	4'-MGDDTTMG-2' ^{d,e)}	10	385 ^{f)}	5.2	2467.7	2468.1	
K	4'-MGAATTMG-2'	10	555 ^{f)}	6.4	2437.7	2437.2	
L	4'-DMDMDM-2'	1.5	12	0.25	1832.4	1832.4	
M	4'-GTGTGT-2'	1.5	49	0.79	1838.3	1838.4	

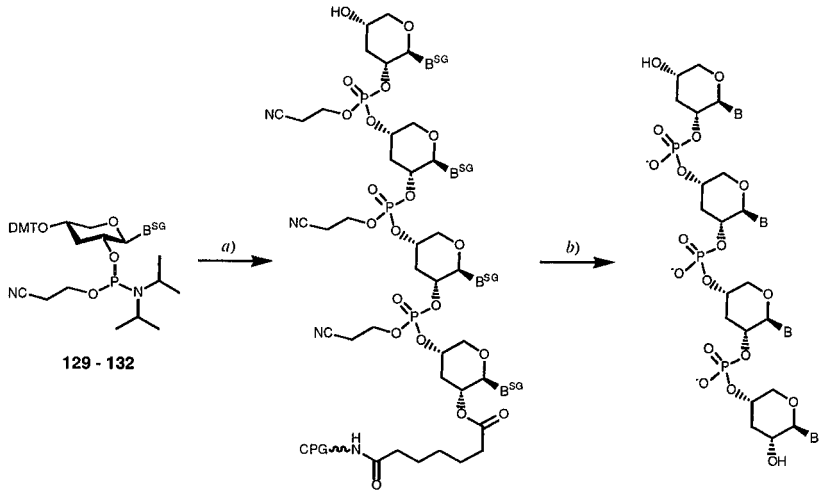
^{a)} MALDI-TOF-MS. ^{b)} Absorption bei 260 nm. ^{c)} Berechnung für das Fragment $[M - H]^+$.

^{d)} D = 2,6-Diaminopurin. ^{e)} M = 5-Methylcytosin. ^{f)} gemessen bei 80°.

Unter diesen Bedingungen waren die Kopplungsausbeuten gemäss dem Trityl assay im Durchschnitt höher als 98%.

Die Entschützung der Sequenzen und die Ablösung von der Festphase erfolgte durch Behandlung mit 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O 1 : 1 während 3 h bei RT. Der Ueberstand wurde am HV eingedampft und die Oligonukleotide anschliessend über Anionentauscher-HPLC gereinigt.

Schema 45.

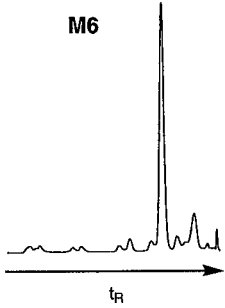


a) Festphasensynthese von *p*DNA-Sequenzen auf dem DNA-Synthesizer:

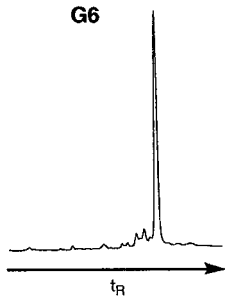
Lösung	Reagens	Menge/Zeit	
Synthesemasstab		1.5 μ mol	10 μ mol
Detritylierung	4% Dichloressigsäure in (CH ₂ Cl) ₂	2 min	4 min
Amiditlösungen	129, 130, 131 in CH ₃ CN; 132 in THF/(CH ₂ Cl) ₂ 1 : 1	0.07M, 180 μ l	0.12M, 360 μ l
Aktivatorlösung	0.25M 5-(Benzylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol in CH ₃ CN	300 μ l	600 μ l
Kopplungszeit		5 min	9 min
Capping A	Mac ₂ O/2,6-Lutidin/THF 1 : 1 : 8	A/B 1 : 1	(2.8 + 1.2) min
Capping B	16% <i>N</i> -Methylimidazol/THF (v/v)		
Oxidation	I ₂ /H ₂ O/Pyridin/THF 3 : 2 : 20 : 75	1.0 min	1.5 min

b) Entschützung der *p*DNA-Sequenzen mit 10M MeNH₂ in H₂O/EtOH 1:1, 25°, 3 h.

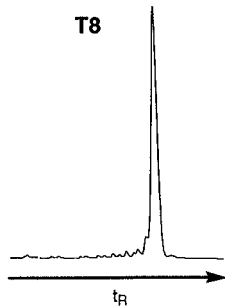
Figur 28.



Pos	Base	Duration mins	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
6	M	0.96	433	-	-
5	M	1.31	485	-	-
4	M	1.40	503	103.7	100.0
3	M	1.33	506	100.6	100.0
2	M	1.32	509	100.7	100.0
1	M	1.28	512	100.5	100.0



Pos	Base	Duration mins	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
6	G	0.95	370	-	-
5	G	1.27	435	-	-
4	G	1.21	439	100.9	100.0
3	G	1.22	441	100.4	100.0
2	G	1.16	439	99.6	100.0
1	G	1.20	442	100.5	100.0



Pos	Base	Duration mins	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
8	T	0.87	375	-	-
7	T	1.25	445	-	-
6	T	1.32	469	105.4	100.0
5	T	1.29	475	101.2	100.0
4	T	1.33	489	103.1	100.0
3	T	1.31	490	100.2	100.0
2	T	1.27	494	100.7	100.0
1	T	1.36	495	100.3	100.0

HPLC Chromatogramme der Rohprodukte der Sequenzen **F**, **H**, und **I**. Daneben sind die Werte des Tritylassays der entsprechenden Sequenzen aufgelistet.

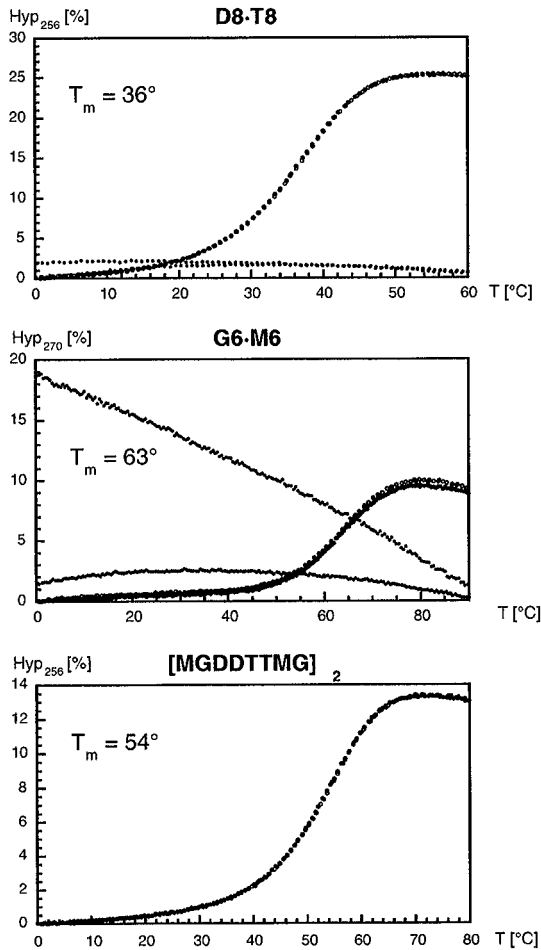
3.2.7 Paarungseigenschaften der *pDNA*

Mit den Sequenzen **F**, **G**, **H**, **I** und **J** wurde das Paarungsverhalten der *pDNA* untersucht. Zur Bestimmung der Duplexstabilität wurden zunächst die UV-Schmelzkurven bei 10 μM Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl bei pH 7.4 gemessen. Die Werte der thermodynamischen Funktionen ΔG° , ΔH° und $T \cdot \Delta S^\circ$ wurden über die *van't Hoff* Beziehung, wie beschrieben in [22], berechnet (Kapitel 1.2.5, Gleichungen IV, VIII, IX). Die dazu notwendigen Daten wurden durch Messung der UV-Schmelzkurven im Bereich von 1 μM - 40 μM Einzelstrangkonzentration erhalten.

Die bei den UV-Schmelzkurven gefundenen Hyperchromizitäten lagen im Bereich zwischen 12% und 25%. Die sigmoiden Kurven deuten auf eine kooperative Interaktion der, im *Watson-Crick*-Sinn, komplementären Einzelstränge hin (Figur 29). Hingegen zeigten die Einzelstränge in keiner Weise ein kooperatives Schmelzverhalten, woraus sich schliessen liess, dass die *pDNA* nach den gleichen Regeln paart wie die *pRNA* [87] oder die 3'-*O*-Methyl-*pRNA*. *pDNA* bildet ausschliesslich *Watson-Crick*-Doppelstränge aus. *Reverse Hoogsteen*-Basenpaarungen, wie sie für homologe Purin-Sequenzen bei der Homo-DNA oder unter Ausbildung eines Tetraplexes für $d(G_n)$ -Sequenzen der natürlichen DNA vorkommen [106], wurden nicht beobachtet.

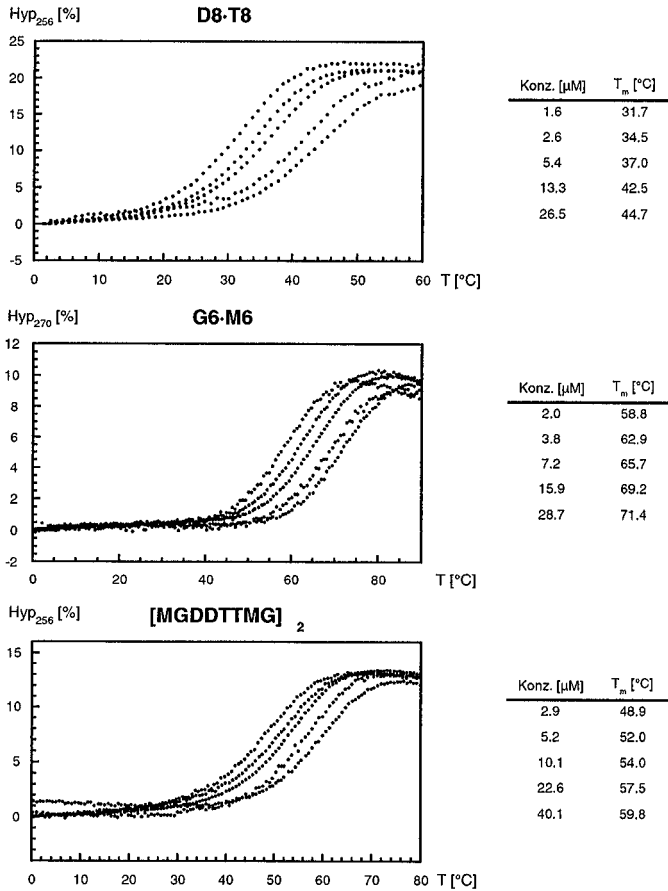
Die Schmelzpunkte T_m und die thermodynamischen Funktionen, welche aus den konzentrationsabhängigen Schmelzkurven berechnet wurden (Figuren 30, 31), sind in Tabelle 9 zusammengestellt und stehen den entsprechenden Werten der DNA, der *pRNA* und der 3'-*O*-Methyl-*pRNA* gegenüber.

Figur 29.



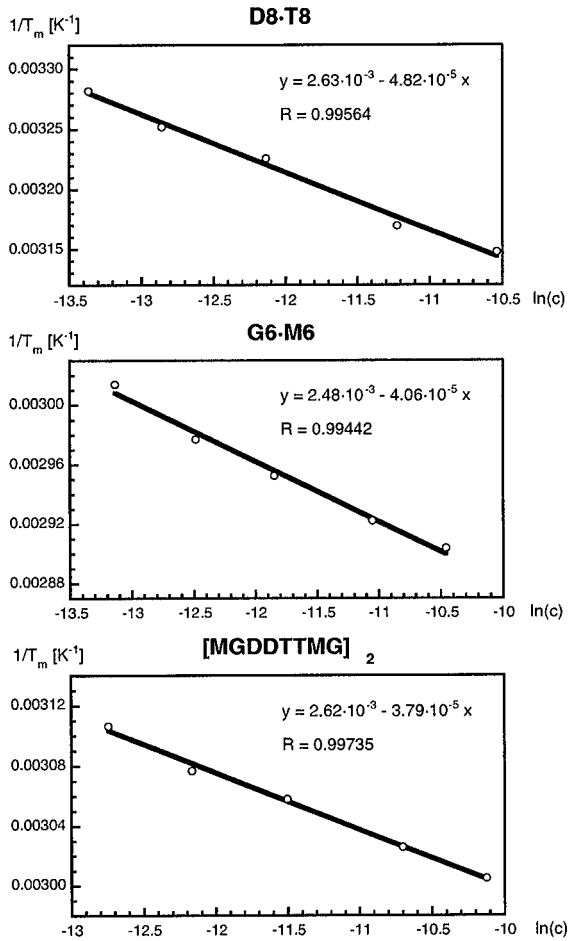
Die Schmelzkurven wurden gemessen bei $10\mu\text{M}$ Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4). Die Punkte der Aufheizkurven sind als schwarze Punkte dargestellt, die Abkühlkurven als Kreise. Die nicht sigmoiden Kurven entsprechen den Hyperchromizitäten der Einzelstränge D8, T8, G6 und M6.

Figur 30.



Darstellung der Hyperchromizitäten der UV-Schmelzkurven. Die Schmelzkurven wurden bei verschiedenen Einzelstrangkonzentrationen zwischen $1\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$ in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen.

Figur 31.



Die Konzentrationsabhängigkeit der Schmelzpunkte wurde in einer linearisierten Form dargestellt. Aus den Parametern der angepassten Geradengleichung lassen sich nach *van't Hoff* die thermodynamischen Funktionen ΔH° , ΔS° und ΔG° der Duplexbildung berechnen.

Tabelle 9. Paarungseigenschaften der *p*DNA

	Paarungssystem	$T_m^a)$	ΔH°	$T\Delta S^\circ_{(298\text{ K})}$	$\Delta G^\circ_{(298\text{ K})}$
		°C		kcal/mol	
D D D D D D D D T T T T T T T T	<i>p</i> DNA	36	-41.0	-31.4	-9.6
	<i>p</i> RNA ^{b)}	50			
A A A A A A A A T T T T T T T T	<i>p</i> DNA	26	-39.7	-32.3	-7.4
	3'- <i>O</i> -Me- <i>p</i> RNA	22	-45.0	-37.5	-7.5
	<i>p</i> RNA ^{c)}	40	-62.2	-51.7	-10.5
	DNA	<10			
G G G G G G M M M M M M	<i>p</i> DNA	63	-48.8	-35.2	-13.6
	3'- <i>O</i> -Me- <i>p</i> RNA	49	-44.3	-33.4	-10.9
	<i>p</i> RNA ^{b)}	61	-54.3	-40.8	-11.3
	DNA ^{b)}	22	-61.3	-54.2	7.1
M G R R T T M G G M T T R R G M	<i>p</i> DNA (R = D)	54	-52.1	-40.7	-11.4
	<i>p</i> DNA (R = A)	46	-47.7	-37.9	-9.8
C G A A T T C G G C T T A A G C	3'- <i>O</i> -Me- <i>p</i> RNA	41	-61.5	-51.4	-10.1
	<i>p</i> RNA ^{b)}	59	-54.9	-42.3	-12.6
	DNA ^{b)}	32	-54.4	-46.2	-8.2
D M D M D M T G T G T G	<i>p</i> DNA (0.15M NaCl)	35	-42.3	-33.3	-9.0
	<i>p</i> DNA (1.0M NaCl)	36			
	<i>p</i> DNA (1.0M MgCl ₂)	36			

^{a)} Bedingungen für die Messung der Schmelzpunkte: 10µM Einzelstrangkonzentration, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4). ^{b)} Eschenmoser et al. [87]. ^{c)} Eschenmoser et al. [79]

Die *p*DNA-Duplexe mit der Base Diaminopurin (D) sind wesentlich stabiler als solche mit der herkömmlichen Base Adenin (A). Zu erkennen ist dieser Stabilitätsgewinn z. B. am Duplex D8·T8 mit einem T_m von 36°, der 10° höher ist als das T_m des Duplexes A8·T8 mit 26°. Das Cytosin-*p*DNA-Phosphoramidit wurde nicht hergestellt, weshalb der Stabilitätsunterschied zwischen Cytosin und 5-Methylcytosin nicht untersucht werden konnte.

Die Schmelzpunkte der *p*DNA-Duplexe (mit D und M) sind im Bereich jener der *p*RNA-Duplexe (mit A und C). Beispielsweise liegt der Schmelzpunkt T_m der selbstkomplementären Sequenz **J** mit 54° nur 5° tiefer als der Schmelzpunkt der entsprechenden *p*RNA-Sequenz (59°), ist aber einiges stabiler als die 3'-*O*-Methyl-*p*RNA (41°). Die analoge *p*DNA-Sequenz **K**, bei welcher Adenin anstelle von Diaminopurin eingebaut wurde, ist mit einem Schmelzpunkt von 46° deutlich weniger stabil als die entsprechende Diaminopurin-haltige Sequenz **J**.

Vom Doppelstrang **L·M** (DM)₃·(GT)₃ wurde die Duplexstabilität in Abhängigkeit der Salzkonzentration gemessen. Neben der physiologischen Salzkonzentration von 150mM NaCl, wurden die UV-Schmelzkurven bei 1.0M NaCl und 1.0M MgCl₂ gemessen. Die Schmelzpunkte änderten sich nur gering von 35° für 150mM NaCl auf 36° für die höheren Salzkonzentrationen.

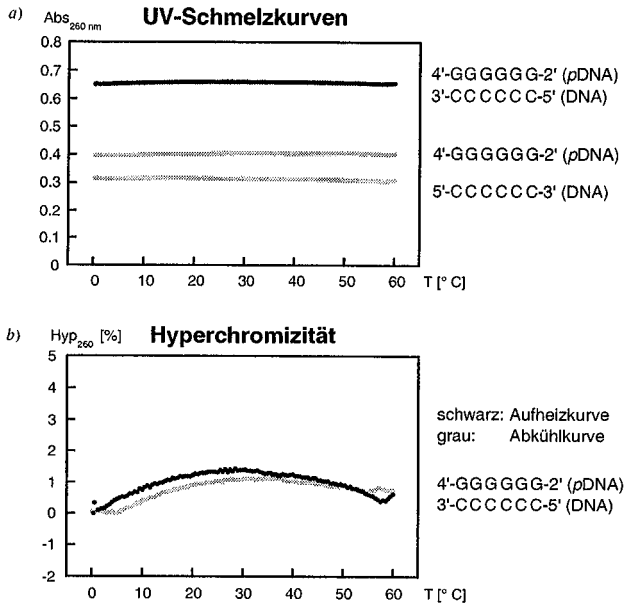
In einem Kreuzpaarungsexperiment wurde überprüft, ob *p*DNA mit DNA interagiert. Dazu wurden unter den üblichen Bedingungen die UV-Schmelzkurven bei 260 nm der *p*DNA-Sequenz **I** (4'-GGGGGG-2', 5μM) mit der DNA-Sequenz 5'-CCCCCC-3' (5μM) in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), sowie die der beiden Einzelstränge gemessen.

In den erhaltenen UV-Schmelzkurven (Figur 32 a) sind keine Interaktionen zwischen den beiden Paarungssystemen zu erkennen. Auch die daraus abgeleiteten Hyperchromizitäten der Aufheiz- sowie der Abkühlkurve zeigen kein kooperatives Verhalten (Figur 32 b).

Mit der *p*DNA haben wir ein Paarungssystem gefunden, welches nicht mit jenem der RNA interagiert, aber mit der Synthese der RNA kompatibel ist (Kapitel 2.1.2). Durch die Verwendung der Nucleobasen 2,6-Diaminopurin und 5-Methylcytosin anstelle von Adenin und Cytosin kann die *p*DNA schon bei kurzen Sequenzen sehr stabile Duplexe ausbilden. Zudem war die Synthese der Oligonucleotide ergiebig und ihre Entschützung vollständig.

Die *p*DNA eignete sich also bestens als autonomes Paarungssystem für die Stammsequenzen in den Hybridstrukturen, wie sie schematisch in den Figuren 16/17 (Kapitel 2.1.1 und 2.1.2) dargestellt sind.

Figur 32.

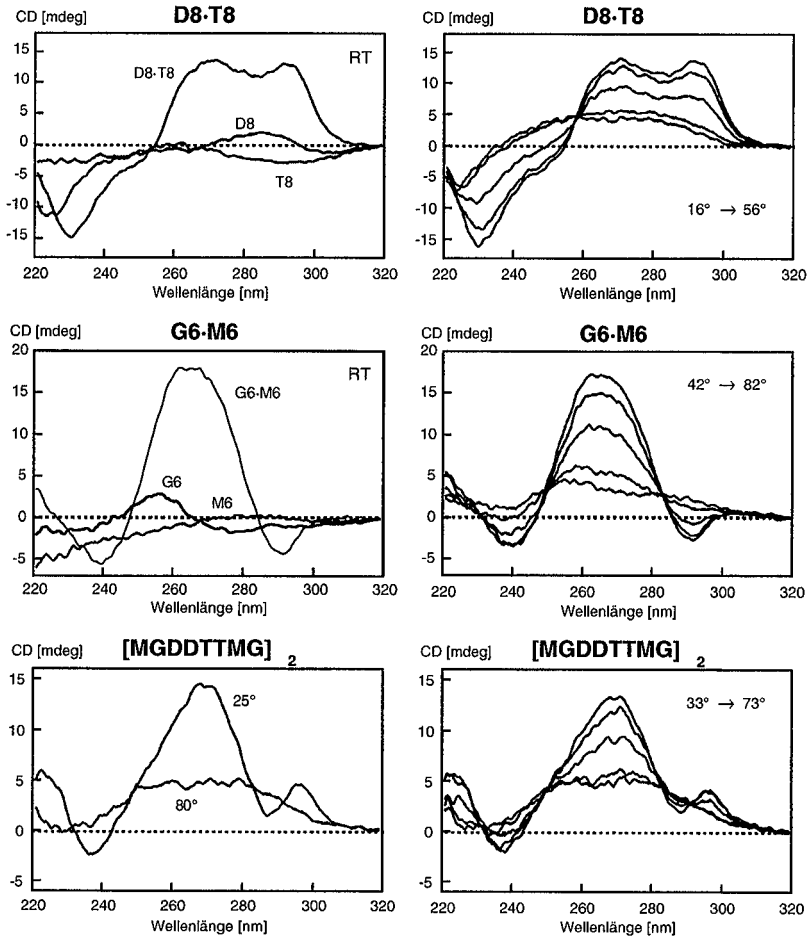


- a) UV-Schmelzkurven des pDNA/DNA-Kreuzpaarungsexperimentes. Die Kurven wurden bei $5\mu\text{M}$ + $5\mu\text{M}$ Einzelstrangkonzentration, 150mM NaCl und 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen; schwarz: Doppelstrang, grau: Einzelstränge.
- b) Hyperchromizität der Aufheizkurve (schwarz) sowie der Abkühlkurve (grau) des Doppelstranges.

3.2.8 CD-Spektroskopie von *p*DNA-Duplexen

Die CD-Spektren von den Duplexen D8·T8, G6·M6 und [MGDDTTMG]₂ sowie der Einzelstränge wurden unter den gleichen Bedingungen gemessen wie die UV-Schmelzkurven. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen, wo die Sequenzen als Duplexe vorlagen (Figur 33). Daneben wurden temperaturabhängige CD-Spektren in 10°-Intervallen im Uebergangsbereich gemessen. Die Spektren zeigten ein ähnliches Muster wie die der *p*RNA, was ein weiteres Indiz für die Analogie des Paarungssystem war [81] [87].

Figur 33.



CD-Spektren aufgenommen bei 10µM Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4). Links sind die Spektren der Einzelstränge und der Duplexe bei RT dargestellt (Das Einzelstrangspektrum der selbstkomplementären Sequenz 5'-MGDDTTMG-3' wurde bei 80° gemessen). Rechts sind die temperaturabhängigen CD-Spektren in 10°-Intervallen im Ubergangsbereich abgebildet.

3.2.9 Paarungsverhalten der *pDNA* in organischen Lösungsmitteln

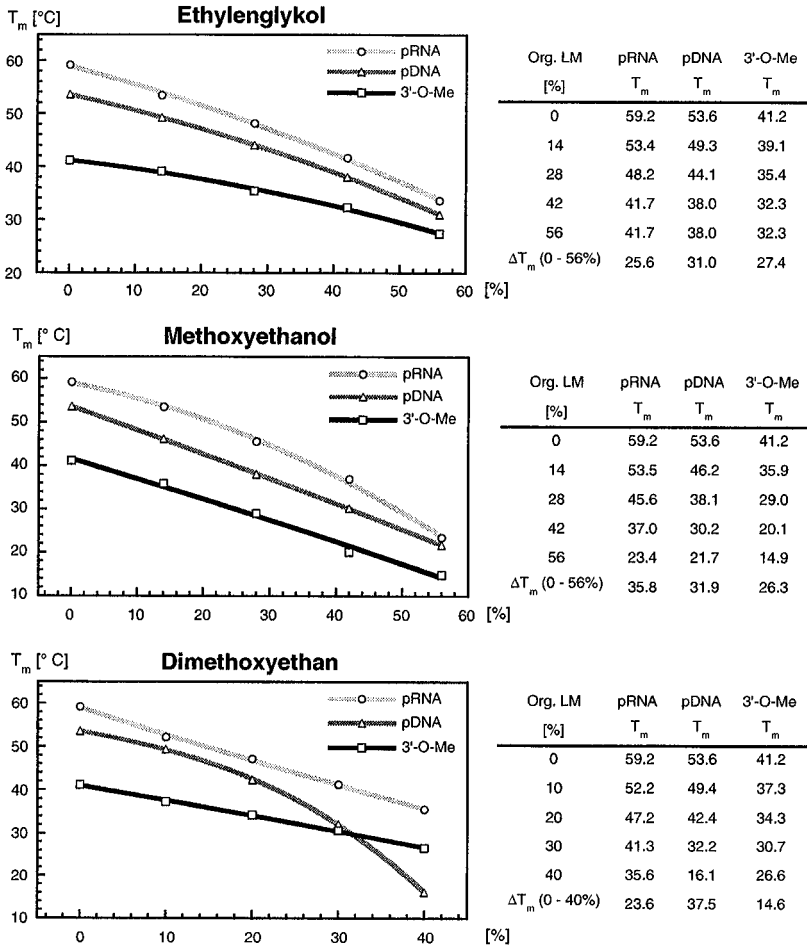
Analog zu den Experimenten über das Paarungsverhalten der 3'-*O*-Methyl-*pRNA* in organischem Lösungsmittel, wurden auch von der *pDNA* die UV-Schmelzkurven in Gegenwart verschiedener Kosolventien gemessen.

Es wurden die UV-Schmelzkurven der selbstkomplementären Sequenz [MGDDTTMD]₂ bei den üblichen Salz- und pH-Bedingungen gemessen. Die Lösungsmittel Ethylenglykol, Methoxyethanol und 1,2-Dimethoxyethan wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit Wasser gemischt. Die erhaltenen Uebergangstemperaturen wurden gegen den Anteil organischen Lösungsmittels aufgetragen und mit den Werten der *pRNA*- und der 3'-*O*-Methyl-*pRNA*-Duplexe verglichen (Figur 34).

In Ethylenglykol wurde für alle Paarungssysteme ein stetiger Abfall der Duplexstabilität mit steigendem Lösungsmittelanteil beobachtet. Das Verhalten in Gegenwart von Methoxyethanol war deutlich anders; die Duplexstabilität der *pDNA*- und der 3'-*O*-Methyl-*pRNA*-Sequenz verringerte sich etwa im gleichen Ausmass, aber die Stabilität der *pRNA*-Sequenz nahm ab 50% Methoxyethanolanteil sehr stark ab.

In Gegenwart von Dimethoxyethan zeigte der 3'-*O*-Methyl-*pRNA*-Duplex die kleinste Verringerung der Duplexstabilität. Ganz anders verhielten sich die Duplexe in Dimethoxyethan. Der geringste Einfluss des Lösungsmittels auf die Duplexstabilität war bei der 3'-*O*-Methyl-*pRNA* zu beobachten. Ab 30% DME brach die Stabilität des *pDNA*-Duplexes im Gegensatz zu den anderen sehr schnell zusammen, so dass bei 40% DME der Duplex bei RT ungepaart vorlag.

Figur 34.



Darstellung der Duplexstabilität der selbstkomplementären Sequenz [MGDDTTMG]₂ in Abhängigkeit des Lösungsmittels. Das organische Lösungsmittel wurde jeweils im angegebenen Volumenverhältnis mit Wasser gemischt. Die Schmelzpunkte wurden bei 10 μ M Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl und 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen.

3.3 NMR-Lösungsstruktur der *p*DNA

3.3.1 Einleitung

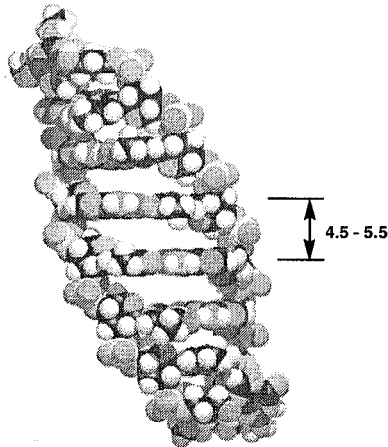
In Kapitel 3.2.7 wurden die Paarungseigenschaften der *p*DNA untersucht und mit jenen der strukturell eng verwandten *p*RNA verglichen. Die deutlich geringere Duplexstabilität der *p*DNA ist wahrscheinlich auf strukturelle Unterschiede der beiden Paarungssysteme zurückzuführen. Um diesen auf den Grund zu gehen, wurde in Zusammenarbeit mit *Jaun* und *Ebert* eine NMR-Lösungsstruktur der selbstkomplementären *p*DNA-Sequenz 4'-MGDDTTMG-2' (J) bestimmt [141]; die entsprechende Synthese ist in Kapitel 3.2.6 beschrieben.

3.3.2 Resultate

Die Zuordnung der nicht austauschbaren Protonen stützte sich auf eine Kombination von COSY, H,P-COSY und NOESY-Experimenten. Die Zuordnung der Imino-Protonen gelang durch NOE-Experimente mit den benachbarten H-C(2)-Protonen. Die daraus erhaltene Struktur [142] ist in Figur 35 abgebildet. Im Vergleich mit *p*RNA [83] ist eine deutlich kleinere Inklination des Rückgrates sowie ein ungewöhnlich grosser Stackingabstand zu erkennen. Die Basenebenen der innersten vier Basenpaare liegen so weit auseinander, dass einzelne Wassermoleküle zwischen ihnen Platz finden würden. Da bei der Duplexbildung die Stackingwechselwirkungen einen grossen Beitrag zur Bildungsenthalpie leisten, ist anzunehmen, dass die in Figur 35 dargestellte Struktur in Lösung nicht stabil wäre und es sich somit um ein Artefakt der Strukturbestimmung handelt.

In diesem speziellen Duplex ist durch die Verwendung der Nukleobase 2,6-Diaminopurin anstelle von Adenin die Inklination der Basenpaare mit dem Rückgrat durch das Fehlen der H-C(2)-Protonen nur schlecht definiert. Zusammen mit kleinen Fehlern in den übrigen NOE-Distanzen kann diese einen grossen Einfluss auf die globale Struktur haben.

Figur 35.



Abgebildet ist eine energieminierte Struktur des Duplexes [MGDDTTMG]₂, berechnet aus den NMR-Daten mittels *torsion angle simulated annealing*. Klar sichtbar ist der unrealistisch hohe π - π -Stackingabstand sowie die im Vergleich mit *p*RNA niedrigere Inklination.

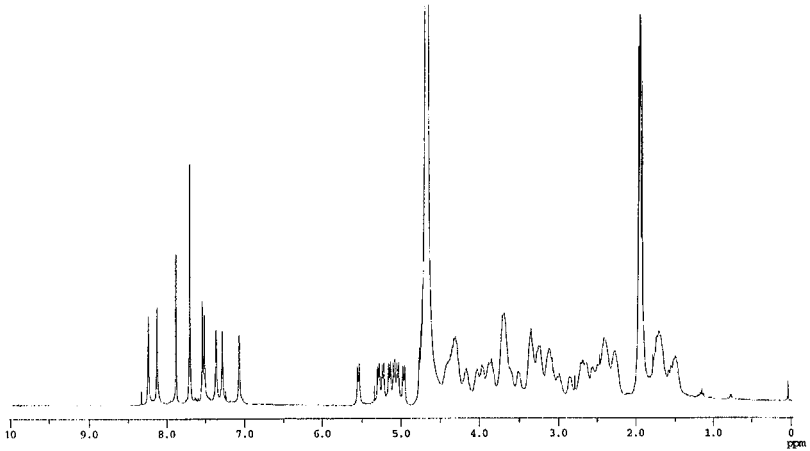
Deshalb wurde die entsprechende *p*DNA-Sequenz 4'-MGAATTMG-2' hergestellt, bei welcher nun die 2,6-Diaminopurinbasen durch Adenin ersetzt worden sind und somit die Inklination besser definiert war.

Als Qualitätskontrolle wurde ein ¹H-NMR-Spektrum dieser Sequenz 4'-MGAATTMG-2' gemessen, welches in Figur 36 abgebildet ist. Die nichtaustauschbaren Basenprotonen befinden sich im Bereich von 7.0 – 8.3 ppm; die acht Duplette im Bereich von 4.7 - 5.6 ppm entsprechen den Anomerprotonen; die vier Singulette bei 1.8 –1.9 ppm entsprechen den Methylgruppen der 5-Methylcytosin-Nukleobasen.

Für die Zuordnung der Protonen und die Strukturbestimmung wurden die selben Experimente (COSY, H,P-COSY, NOESY) wie für die Sequenz 4'-MGDDTTMG-2' durchgeführt. Aus diesen Messungen ergab sich für die Sequenz 4'-MGAATTMG-2' nun eine Inklination der Basenpaare mit dem Rückgrat von ca. 45°, was ungefähr der Inklination

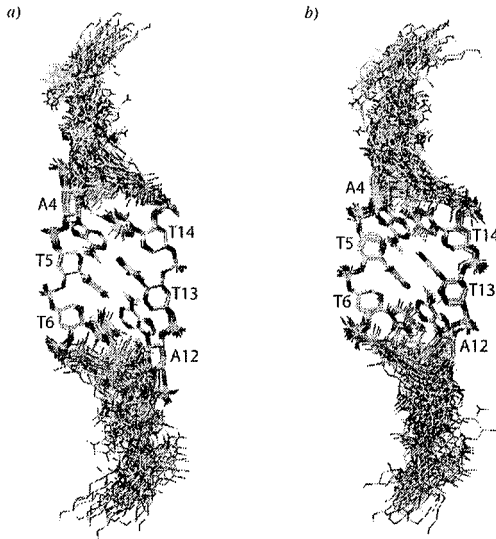
bei der *p*RNA entspricht. Auch der Stackingabstand von ca. 3.4 Å lag nun in der Nähe des idealen Wertes.

Figur 36.



300-MHz ^1H -NMR-Spektrum des Duplexes $[\text{MGAATTMG}]_2$ in D_2O (1.5 mg in 0.4 ml D_2O , 25° C).

Die entsprechenden, energieoptimierten Strukturen sind in Figur 37 abgebildet, wobei einmal die Struktur *a*) ohne und *b*) mit Berücksichtigung des Stacking-Restraints berechnet wurden. Der daraus resultierende Unterschied in der Packungsdichte ist in der raumfüllenden Darstellung deutlich erkennbar (Figur 38).

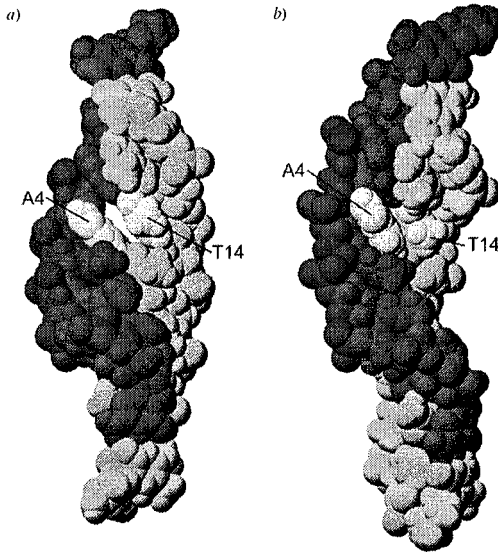
Figur 37.

- a) Superposition der 15 Strukturen mit niedrigster Energie aus den Berechnungen ohne Berücksichtigung des Stacking-Restraints.
- b) Superposition der 15 energieärmsten Strukturen unter Berücksichtigung des Stacking-Restraints.

Die drei Strukturen in Figur 39 *a, b, c*) zeigen die Seitenansicht des Duplexes und stammen aus dem selben Bündel der 15 Strukturen aus Figur 37 *a*), bei denen kein Stacking-Restraint berücksichtigt wurde. In der obersten Darstellung (Figur 39 *a*) wurde die Unter- und Oberseite des Duplexes schattiert; darin ist deutlich die Form einer "gekrümmten Dachrinne" mit leicht linksgängiger Helizität zu erkennen. Da auch die äussersten Basenpaare durch Wasserstoffbrücken-Restraints fixiert wurden, stammt das Auffransen des Bündels an den Enden der Helix fast ausschliesslich von der durch die NMR-Restraints

schlecht definierten Krümmung. Die in Figur 39 *d, e*) dargestellten Strukturen sind zwei Extremfälle von schwacher und starker Krümmung.

Figur 38.

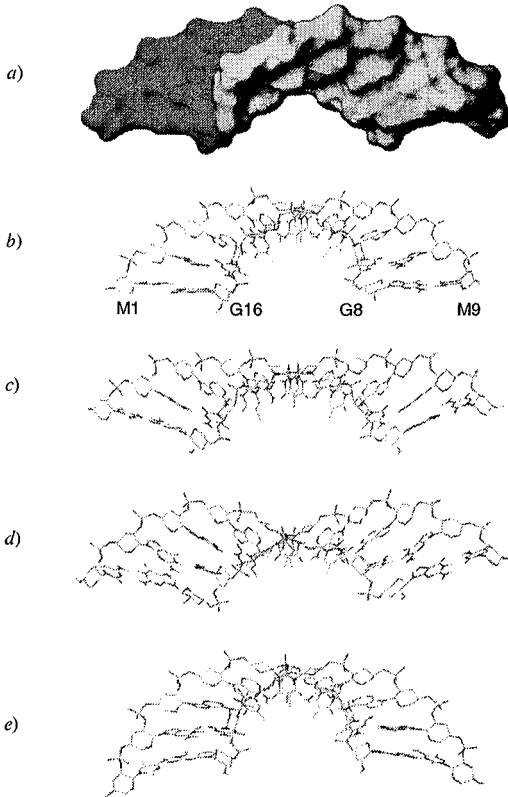


- a) Darstellung des Duplexes [MGAATTMG]₂ als Kugelmodell, bei welchem die Struktur ohne Berücksichtigung des Stacking-Restraints berechnet wurde.
- b) Die Struktur wurde unter Einbezug des Stacking-Restraints berechnet.

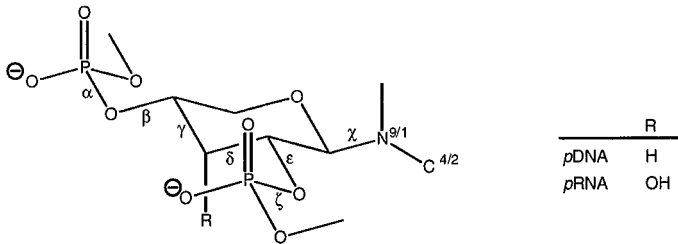
Die Winkelverteilungen der Rückgrat-Diederwinkel (Definition der Diederwinkel siehe Figur 40), welche unter Berücksichtigung des Stacking-Restraints berechnet wurden, sind in Figur 41 abgebildet. Diese Winkel unterscheiden sich nur geringfügig von denen, welche ohne Berücksichtigung des Stacking-Restraints berechnet wurden. Die Werte für β befinden sich nahe 180° (β von T5 ist mit ca. 150° am weitesten von der *anti*-Konformation entfernt)

während ϵ sich in einem Sektor von $-85 \pm 30^\circ$ befindet. Einzige Ausnahme ist ϵ von G2, der mit ca. -20° deutlich weniger negativ ist.

Figur 39.



a, b, c) Seitenansicht einzelner berechneter Strukturen ohne Berücksichtigung des Stacking-Restraints.
d, e) Strukturen mit grösster resp. kleinster Krümmung unter Verwendung des Stacking-Restraints.

Figur 40.

Definition der Rückgrat-Diederwinkel in *pDNA* resp. *pRNA*; die Richtung der Diederwinkel entspricht der Richtung der Nucleinsäuresequenz (4' → 2').

Ein Vergleich mit der für *pRNA* bestimmten Struktur [83] zeigt die Unterschiede der beiden Paarungssysteme. Der Winkel β der *pDNA* von ca. 160° befindet sich deutlicher näher bei der idealisierten Konformation als jener der *pRNA* mit ca. 145° (Tabelle 10). Die Abwesenheit der axialen OH-C(3')-Gruppe und folglich das Wegfallen einer potentiellen konformationellen Einschränkung durch sterische Wechselwirkung mit der Phosphatgruppe an C2' scheint somit keinen grossen Einfluss auf diesen Diederwinkel zu haben. Im Allgemeinen sind für die Rückgratwinkel aber keine signifikanten Unterschiede feststellbar, welche die geringere Paarungsstärke von *pDNA* erklären würden.

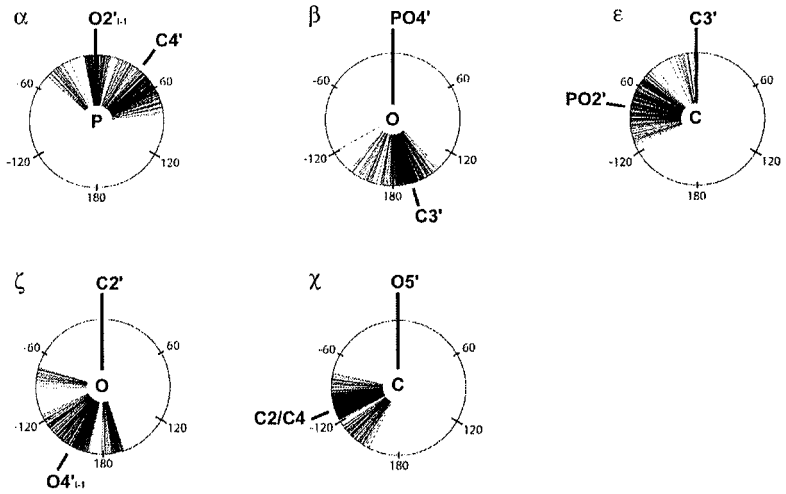
Tabelle 10. Vergleich der Rückgrat-Torsionswinkel von *pDNA* mit *pRNA*

Torsionswinkel ^{a)}	Paarungssystem			
	ideale Struktur	<i>pDNA</i> ^{b)}		<i>pRNA</i> ^{c)}
α	60	5 bis 58	(± 14 bis 24)	72 bis 77 (± 12 bis 20)
β	180	155 bis 178	(± 3 bis 13)	156 bis 169 (± 14 bis 23)
ϵ	-60	-61 bis -79	(± 4 bis 29)	-80 bis -83 (± 13 bis 15)
χ	180	-105 bis -140	(± 2 bis 9)	123 bis 133 (± 10 bis 13)
ζ	180	-106 bis -172	(± 9 bis 24)	-174 bis -177 (± 11 bis 13)

^{a)} Die Torsionswinkel sind entlang der Richtung des Rückgrates definiert und in ° angegeben. ^{b)} Die Werte beziehen sich auf die inneren vier Basenpaare für den Duplex [MGAATTMG]₂ ohne Berücksichtigung des *Stacking-Restrains*. ^{c)} Die Werte stammen aus [83].

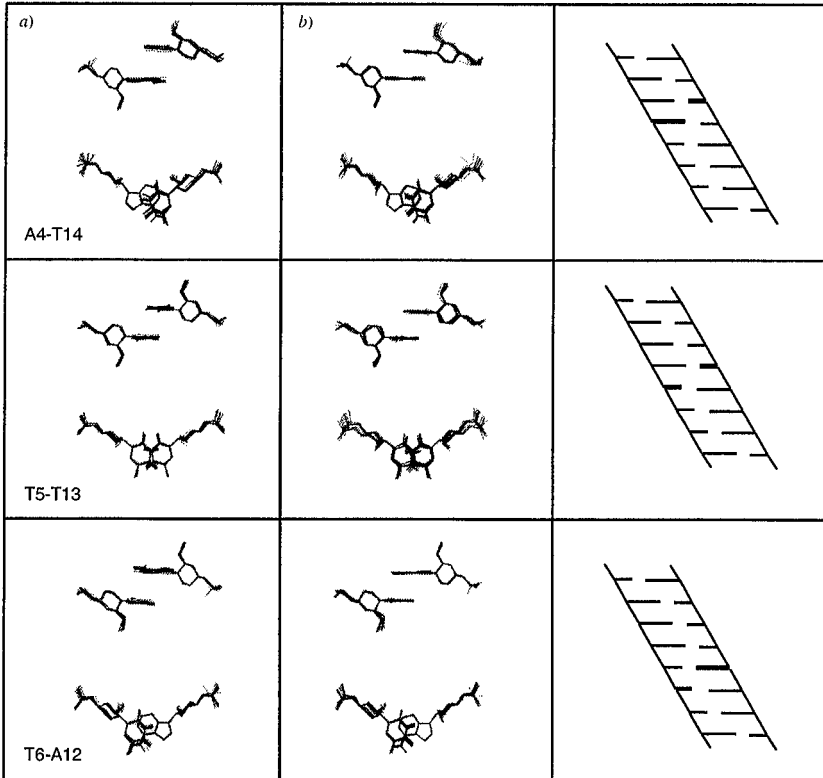
Die für die selbstkomplementäre Sequenz [MGAATTMG]₂ bestimmte Lösungsstruktur zeigt einen, gegen die *major groove* gekrümmten, *anti*-parallelen Duplex mit leichter linksgängiger Helizität. Die Inklination der Basenpaare ist ähnlich wie bei *pRNA* und beträgt *ca.* 45°. Als Folge davon ist auch bei diesem Pentopyranosyl-Duplex das *interstrand*-Stacking vorherrschend (Figur 42). Wahrscheinlich ist aber die Überlappung der stackenden Basen im untersuchten *pDNA*-Duplex deutlich kleiner als in der für *pRNA* bestimmten Struktur. Es ist jedoch weiter zu untersuchen, ob diese Tatsache zur Erklärung der bei *pDNA* im Gegensatz zu *pRNA* gefundenen schwächeren Paarung beitragen könnte.

Figur 41.



Verteilung der Rückgrat-Diederwinkel aus der Strukturberechnung unter Verwendung von Stacking-Restraints. Die abgebildeten Werte beziehen sich auf die Nucleotide 3-7 für α und β , die Nucleotide 2-6 für ϵ und ζ , sowie auf die Nucleotide 2-7 für χ .

Figur 42.



Stackingdiagramme der inneren Basenpaare des Duplexes [MDAATTMG]₂.

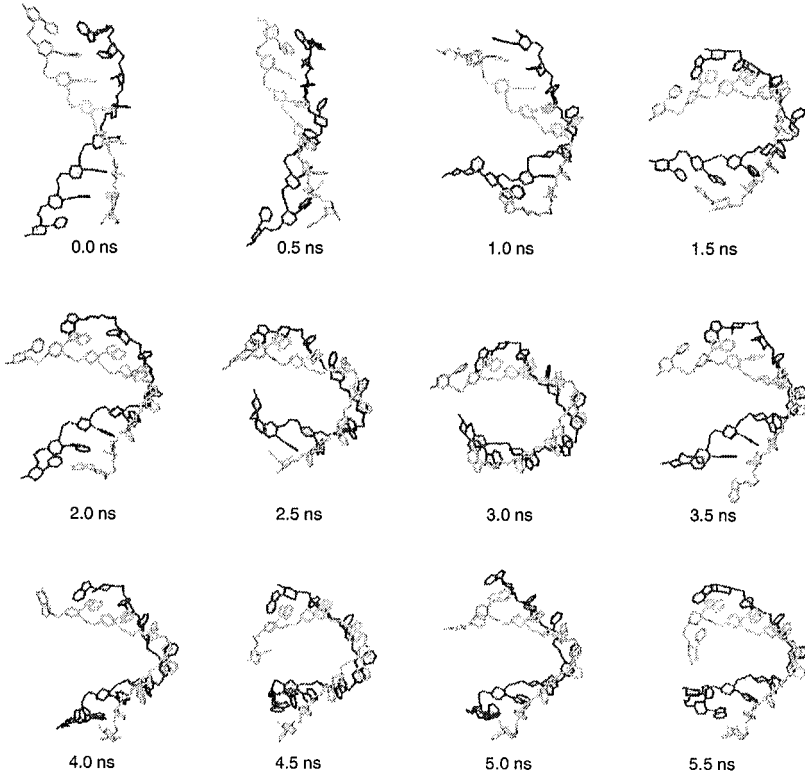
a) Berechnung ohne Stacking-Restraints. b) Berechnung mit Stacking-Restraints.

Die Krümmung des *p*DNA-Duplexes [MGAATTMG]₂ und somit seine globale Struktur ist durch die NMR-Daten nur schlecht definiert. Deshalb wurde mit einer MD-Simulation, welche mit dem Programm GROMOS96 [143] in explizitem Lösungsmittel durchgeführt

wurde, das Verhalten des Diaminopurin-enthaltenden Duplexes untersucht. Als Ausgangsstruktur und zur Berechnung der Trajektorie diente die in Figur 35 dargestellte NMR-Lösungsstruktur.

Während der Simulationszeit von 5.6 ns blieben die Wasserstoffbrücken der inneren Basenpaare 2 – 7 die meiste Zeit erhalten. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die Anwesenheit von drei Wasserstoffbrücken bei allen Basenpaaren. Am Anfang der Simulation waren die innersten Basenpaare D4·T13 und vor allem D5·T12 stark gestört. Im Laufe der Reorganisationsphase, die ca. 1.5 ns dauerte, wurde der durchschnittliche Stackingabstand zwischen allen Basen kleiner und der Duplex bildete langsam eine starke Krümmung oder Superhelizität aus (Figur 43). Diese Krümmung blieb während der restlichen Simulationszeit von 4.0 ns erhalten. Die Stabilität der Trajektorie ist für einen Duplex dieser Länge bemerkenswert hoch und wahrscheinlich wiederum auf die, bei allen Basenpaaren vorhandenen, drei Wasserstoffbrücken zurückzuführen.

Durch eine längere Simulation ist jedoch sicherzustellen, ob die beobachtete Krümmung nicht eine Zwischenstruktur in einer längeren Reorganisationsbewegung in Richtung eines linearen Duplexes darstellt. Im weiteren ist zu untersuchen in wie fern das in GROMOS96 [143] verwendete Kraftfeld auf diese Klasse von Nukleinsäuren übertragbar ist und somit als Hilfsmittel zur Strukturbestimmung dienen kann.

Figur 43.

Ausschnitte aus der MD-Simulation, welche mit dem Duplex [MGDDTTMG]₂ in explizitem H₂O durchgeführt wurde; als Anfangstruktur diente die in Figur 35 abgebildete NMR-Lösungsstruktur.

3.4 Synthese und Anwendungen von *p*DNA/DNA-Hybriden

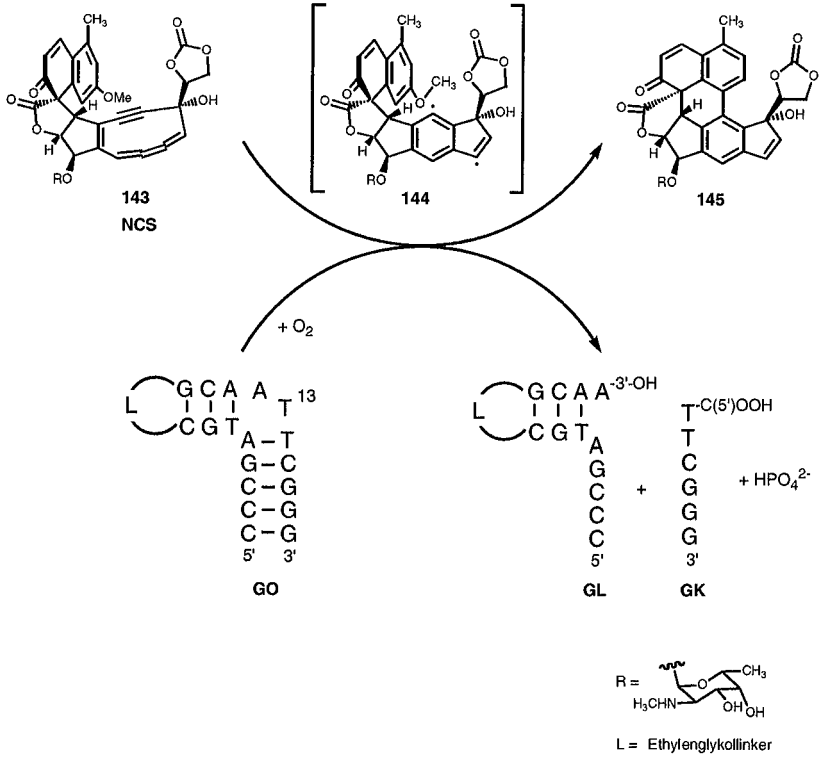
Goldberg et al. beschrieb ein DNA-Aptamer mit einem Zweibasenbulge, welches den Neocarzinostatin-Chromophor (NCS, **143**) binden kann. Die Bindung des Chromophores **143** im DNA-Bulge löst eine Kaskade von Reaktionen aus, die letztendlich unter Bildung des Produktes **145** zu einem DNA-Strangbruch führen [144] [145] [146] (Schema 46).

Von diesem DNA-Bulge wurde zusammen mit dem NCS-Analogen NCSi ($K_D = 3.9 \mu\text{M}$) eine NMR-Lösungsstruktur abgeleitet [147] (Figur 44). Daraus ist zu erkennen, dass der Komplex in der *Bulge*-Region abgewinkelt ist und die beiden gepaarten Stammregionen stark gegeneinander geneigt sind. Die dreidimensionale Struktur des *Bulges* enthält eine prismaförmige Bindungstasche, in welcher das NCS gebunden wird. Das NCSi-Molekül **146** beinhaltet zwei aromatische Systeme, welche über ein Spirozentrum miteinander verknüpft sind und deshalb auch in einem wohldefinierten Winkel zueinander stehen. Bei der Bindung des NCSi im *Bulge* wird dieser so ausgerichtet, dass seine aromatischen Systeme in beide Richtungen zu einem π -Stacking der DNA-Struktur führen.

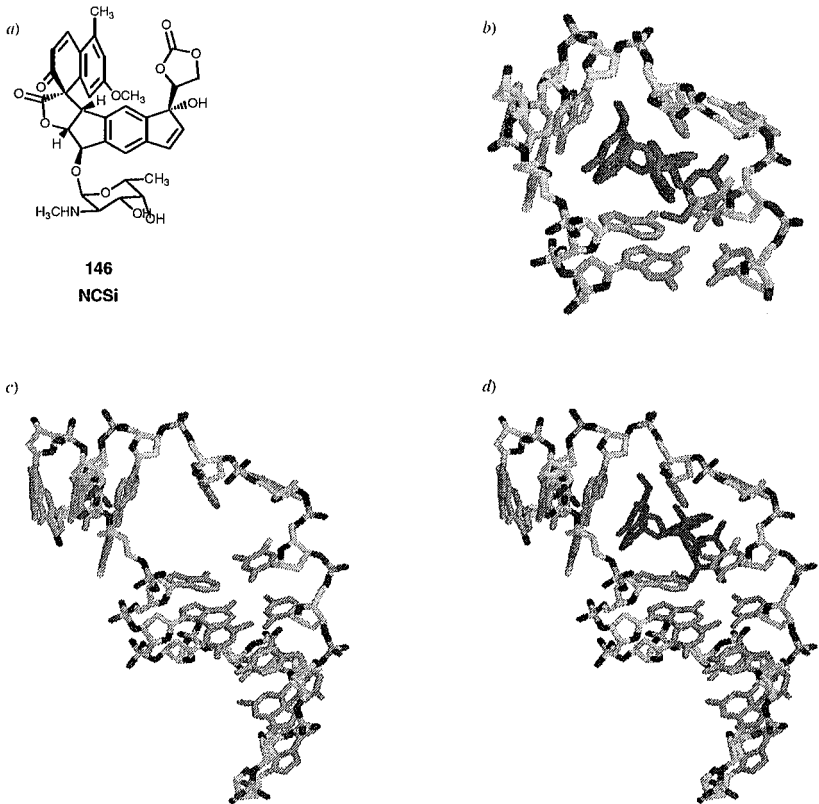
In einem ersten Versuch zur Synthese von Hybridsequenzen nach dem Konzept in Figur 16 (Kapitel 2.1.1) wollten wir diesen Zweibasenbulge von *Goldberg* nachahmen. Dazu haben wir die DNA-Sequenz der *Bulge*-Region beibehalten und die beiden Stammregionen durch eine *p*DNA-Stammsequenz ersetzt (Figur 45).

Für die Synthese dieser *p*DNA/DNA-Hybridsequenzen **N** und **O** (Tabelle 10) wurden die DNA-Amidite **147** - **150** und die *p*DNA-Amidite **129** - **132** verwendet. Die Synthese wurde nach dem, in Kapitel 3.2.6, beschriebenen Protokoll durchgeführt. Gemäss dem Tritylassay wurden hervorragende Kopplungsausbeuten $\geq 98.5\%$ für die Sequenzen **O** und **N** erreicht. Da es sich um *p*DNA/DNA-Sequenzen handelte, genügte ein Entschützungs-schritt mit 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O. Die Sequenzen wurden mittels Ionentauscher-HPLC gereinigt, über SEP-PAK-Kartuschen entsalzt und mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert.

Schema 46.

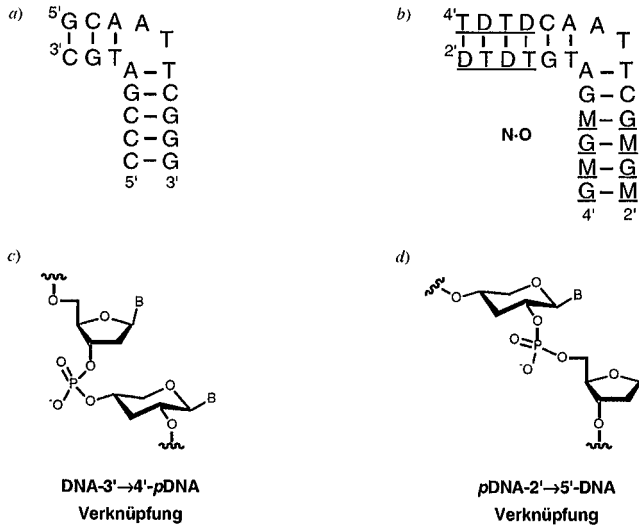


Der NCS-Chromophor **143** lagert bei der Bindung im DNA-Bulge **GO** zum Biradikal **144** um. Dieses löst durch eine H-Abstraktion am C(5') des T13 eine Radikalkettenreaktion aus, was in der Anwesenheit von O₂ zum Strangbruch der DNA, unter Bildung der Fragmente **GL** und **GK**, sowie Verbindung **145**, führt [144] [145] [146].

Figur 44.

- a) Die zum Biradikal **144** isostrukturelle Verbindung **146** (NCSi) wird von der DNA-Sequenz **GO** gebunden ($K_D = 3.9 \mu\text{M}$).
- b) Ausschnitt aus der NMR-Struktur der prismaförmigen Bindungstasche [144].
- c) NMR-Struktur der Sequenz **GO** ohne **146** (NCSi). Das Bindungsdreieck ist deutlich zu sehen.
- d) Die gleiche Struktur wie in c) aber mit dem Substrat **146**.

Figur 45.



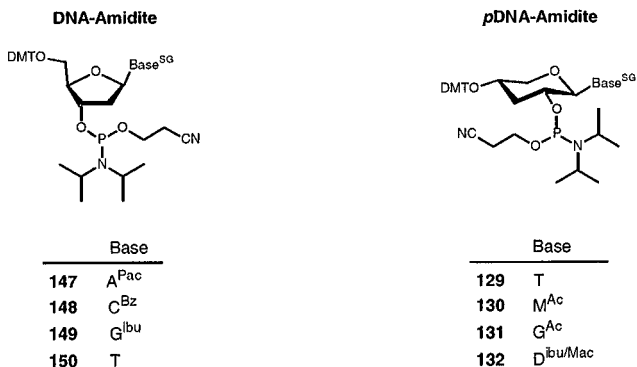
- a) Sekundärstruktur des Goldberg-Zweibasenbulges.
 b) Goldberg-Konstrukt N-O mit pDNA-Stammsequenzen (pDNA-Nukleotide sind unterstrichen dargestellt).
 c) Der DNA/pDNA Uebergang erfolgte 3'→4'.
 d) Der pDNA/DNA Uebergang erfolgte 2'→5'.

Tabelle 10. Goldberg-Sequenzen

	pDNA/DNA-Sequenz	Massstab		MS ^{a)} [m/z]		
		μmol	Ausbeute a.u. ^{b)}	μmol	berechnet ^{c)}	gefunden
N	4'- <u>TDTDCA</u> ATTCGMGM-2' ^{d)}	1.5	22	0.16	4280.9	4281.5
O	4'-GMGMGATG <u>TDTD</u> -2' ^{d)}	1.5	35	0.29	3743.6	3743.9

^{a)} MALDI-TOF-MS, ^{b)} Absorption bei 260 nm, ^{c)} Berechnung für das Fragment [M - H]⁺, ^{d)} D: 2,6-Diaminopurin, M: 5-Methylcytosin, pDNA-Nukleotide sind unterstrichen, DNA-Nukleotide in Standardschrift.

Schema 47.



Amidite, welche für die Synthese von *p*DNA/DNA Hybridsequenzen verwendet wurden (DNA-Amidite sind kommerziell erhältlich).

Vom *p*DNA/DNA-Hybridduplex **N•O** wurde die UV-Schmelzkurve gemessen. Sie zeigte ein eindeutig sigmoides Verhalten mit einer Uebergangstemperatur T_m von 23,0° (Figur 47). Mittels CD-Spektroskopie wollten wir die Bindung eines hydrophoben Substrates im Duplex **N•O** untersuchen. Als Substrat wurde der Farbstoff Acriflavin (AF) gewählt, der im Bereich von 400 - 500 nm absorbiert ($\epsilon_{\text{max } 446} = 36'800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Im Falle einer Bindung des CD-inaktiven Farbstoffes AF im Duplex **N•O**, befindet er sich in einer chiralen Umgebung und wird dadurch CD-aktiv.

Die CD-Spektren wurden bei 5 μM **N•O** in der Anwesenheit von 5 eq. AF (25 μM) in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) bei 5°C resp. 30°C im Bereich von 220 - 530 nm gemessen. Als Referenz wurden die CD-Spektren der gleichen Lösung, jedoch ohne den Farbstoff AF, gemessen. Die CD-Spektren sind in Figur 46 abgebildet. Bei den Spektren, welche in Anwesenheit von 5 eq. AF gemessen wurden, ist ein starker CD-Effekt im Bereich von 420 - 490 nm zu erkennen. Ebenso zeigten diese Spektren im Bereich von 220 - 320 nm einen stärkeren CD-Effekt als die Referenzspektren.

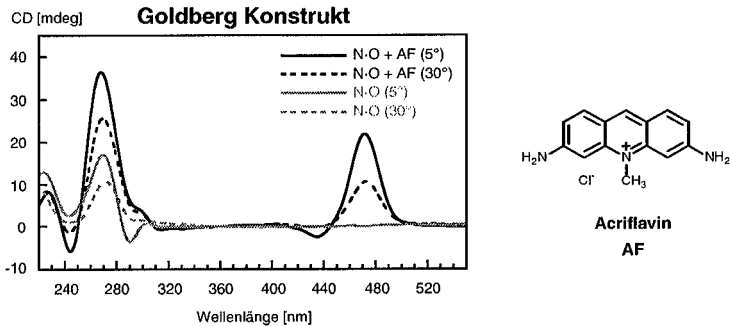
Aus diesem Experiment liess sich eindeutig die Bindung des Farbstoffes AF im Duplex N•O nachweisen. Interessanterweise wurde auch eine Bindung des Farbstoffes im Duplex N•O bei 30° festgestellt. Dies ist auf eine Stabilisierung der Gesamtstruktur bei der Bildung des Komplexes N•O•AF zurückzuführen.

Dieser stabilisierende Effekt wurde durch Messung der UV-Schmelzkurven quantifiziert. Die Schmelzkurven wurden unter den gleichen Bedingungen wie die CD-Spektren aufgenommen. Zudem wurden unter analogen Bedingungen UV-Schmelzkurven der DNA-Sequenz d(UA)₈ und der pDNA-Sequenz [MGDDTTMG]₂ in Anwesenheit von 5 eq. AF sowie ohne den Farbstoff gemessen und miteinander verglichen (Figur 47).

Im Falle des *Goldberg*-Konstruktes N•O konnte durch die Zugabe von 5 eq. AF eine Erhöhung des Schmelzpunktes um 14° gemessen werden. Auch beim DNA-Duplex wurde eine Stabilisierung um 8° in Anwesenheit des Acriflavins gemessen, dieser war aber deutlich weniger ausgeprägt im Vergleich zum *Goldberg*-Konstrukt. Hingegen wurde beim pDNA-Duplex [MGDDTTMG]₂ keine nennenswerte Erhöhung der Duplexstabilität festgestellt.

Wahrscheinlich rührt die enorme Stabilisierung beim *Goldberg*-Konstrukt daher, dass bei der Bindung des Acriflavins die flexible *Bulge*-Struktur starr wird und daraus aus den beiden separierten pDNA-Paarungssystemen ein einziges kooperatives Paarungssystem über das ganze Konstrukt resultiert. Die Stabilisierung des DNA-Duplexes [d(UA)₈]₂ ist auf Interkalation des Farbstoffes zurückzuführen. Bei der pDNA ist diese Interkalation aus geometrischen Gründen nicht möglich, weshalb dort keine Stabilisierung beobachtet wurde.

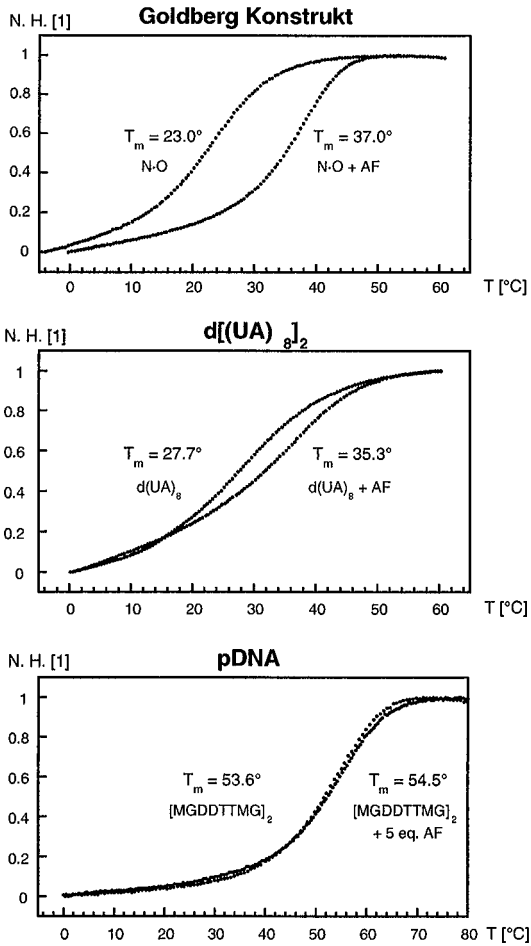
Figur 46.



CD-Spektren des Goldbergkonstruktes N•O mit 5 eq. Acriflavin (schwarz), resp. nur des Konstruktes N•O (grau). Von beiden wurde das Spektrum sowohl bei 5° als auch bei 30° gemessen. Der CD-Effekt der Oligonukleotidstruktur nimmt bei der Bindung von Acriflavin enorm zu. Die Spektren wurden gemessen bei (5+5) μ M Einzelstrangkonzentration, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4).

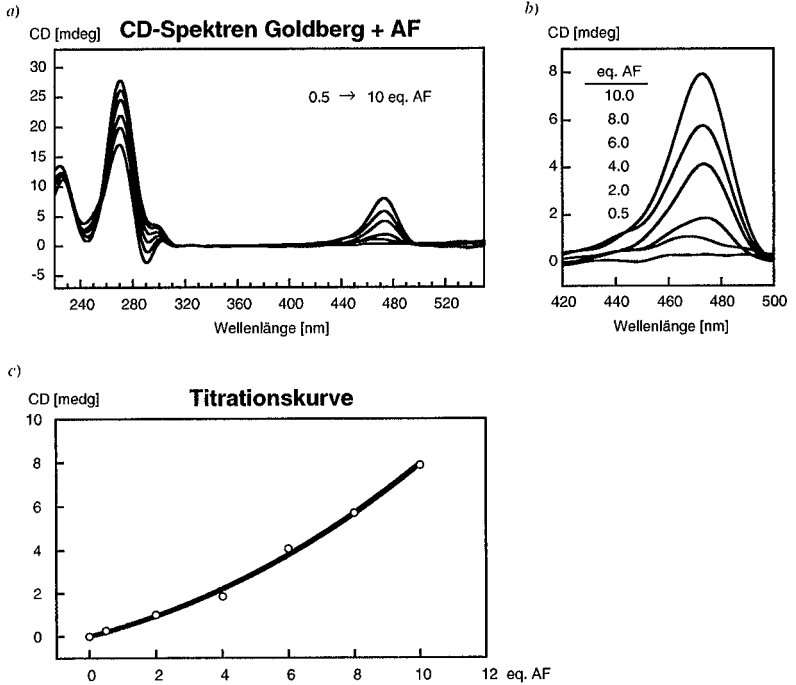
In einem weiteren Versuch wurde eine Lösung von 5 μ M N•O in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) bei 5° langsam mit 0.5 – 10 eq. Acriflavin titriert und mittels CD-Spektroskopie verfolgt. Dabei wurde eine stetige Zunahme des CD-Effektes sowohl im Absorptionsbereich der Nukleobasen als auch im Wellenlängenbereich des Farbstoffes gemessen (Figur 48). Wegen dieser stetigen Zunahme des CD-Effektes konnte die Anzahl gebundener Substratmoleküle AF pro Doppelstrang N•O nicht bestimmt werden.

Figur 47.



Dargestellt sind die UV-Schmelzkurven (umgerechnet auf normierte Hyperchromizitäten, N. H.) verschiedener Oligonukleotide, gemessen bei $10\mu\text{M}$ Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), sowohl ohne als auch in Anwesenheit von $25\mu\text{M}$ Acriflavin (5 eq. AF).

Figur 48.



a) CD-Spektren des *Goldberg*-Konstruktes in Anwesenheit von 0 - 10 eq. Acriflavin. Die CD-Spektren wurden gemessen bei $(5 + 5)\mu\text{M}$ Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl und 10mM Tris-HCl (pH 7.4) bei 5°. Es wurde schrittweise 0.5 - 10 eq. AF zugegeben.

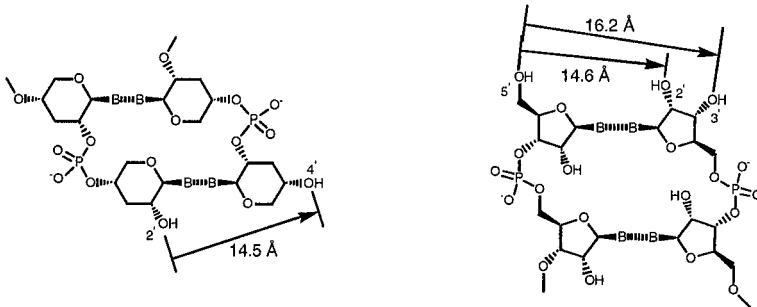
b) Der Ausschnitt der Acriflavin-Absorption (420 - 500 nm) ist vergrössert dargestellt.

c) Der CD-Effekt bei 475 nm wurde in Abhängigkeit der AF-Äquivalente dargestellt.

3.5 Synthese von *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen

Die natürlichen Paarungssysteme DNA/RNA unterscheiden sich von *p*DNA sehr stark bezüglich ihrer Struktur und damit auch in den Dimensionen ihrer Duplexe.

Schema 48.



Abgebildet ist ein *p*DNA- und ein RNA-Doppelstrang. Die angegebenen Distanzen zeigen, dass sich möglicherweise eine *p*DNA-4' → 2'-RNA Verknüpfung für Hybridsequenzen besser eignet als eine *p*DNA-4' → 3'-RNA Verknüpfung.

Studien an Modellen zeigten, dass beim *p*DNA-Doppelstrang der Abstand zwischen gegenüberliegenden Rückgratpositionen (2'-O / 4'-O) 14,5 Å beträgt (Schema 48). Der entsprechende 5'-O / 3'-O-Abstand der RNA-Doppelhelix in der A-Form beträgt hingegen 16,2 Å und ist damit deutlich grösser. Bedingt durch diesen Unterschied erwarteten wir bei *p*DNA/RNA-Hybridduplexen eine lokale Verzerrung der idealen Doppelstrangstruktur der beiden einzelnen Paarungssysteme und damit eine Reduktion der T_m -Werte.

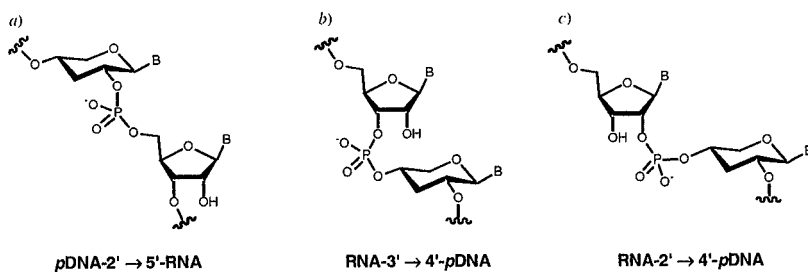
Erfreulicherweise wurde festgestellt, dass der 5'-O / 2'-O-Rückgratabstand der RNA von 14,6 Å ungefähr jenem der *p*DNA von 14,5 Å entspricht. Prinzipiell gab es also zwei verschiedene Möglichkeiten die beiden Paarungssysteme RNA und *p*DNA miteinander zu

verknüpfen. Im einen Fall handelte es sich dabei um eine RNA-3'→4'-*p*DNA-Verknüpfung, im anderen Fall um eine RNA-2'→4'-*p*DNA-Verknüpfung (Schema 49).

Durch Messen der Schmelzkurven wollten wir empirisch feststellen, welcher *p*DNA/RNA-Uebergang zu einem stabileren Duplex mit kooperativem Paarungsverhalten führt.

Es wurden einige homologe Hybridsequenzen **P, Q, R, S, T, U, V** synthetisiert (Tabelle 11), aus welchen zwei Serien analoger Hybridduplexe, einmal über RNA-2'→4'-*p*DNA- und einmal über RNA-3'→4'-*p*DNA-Verknüpfungen, aufgebaut wurden. Von diesen Duplexen wurden die Schmelzkurven gemessen und daraus die Uebergangstemperaturen T_m berechnet.

Schema 49.



- a) Der Uebergang *p*DNA/RNA ist als *p*DNA-2' → 5'-RNA Verknüpfung vorgegeben.
- b) Die RNA-3' → 4'-*p*DNA Verknüpfung entspricht dem "natürlichen" Uebergang.
- c) Als Alternative zum RNA-3' → 4'-*p*DNA Uebergang resultiert aus dem RNA-2' → 4'-*p*DNA Uebergang der ideale Rückgratabstand in der RNA.

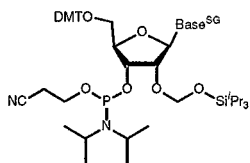
3.5.1 Verwendete DNA- und RNA-Phosphoramidite

Für die Synthese von *p*DNA/DNA- resp. *p*DNA/RNA-Hybriden wurden die entsprechenden Phosphoramidite verwendet. Die DNA-Phosphoramidite **147 - 150** sind kommerziell

erhältlich. Die 2'-*O*-TOM-geschützten RNA-Phosphoramidite **151** - **154** wurden von der Firma *Xeragon AG* zur Verfügung gestellt. Die für die RNA-2'→4'-*p*DNA-Verknüpfung verwendeten, isomeren 3'-*O*-TOM-geschützten RNA-Phosphoramidite **156** - **159** konnten in guten Ausbeuten aus den Nucleosiden **155** hergestellt werden [21].

Schema 50.

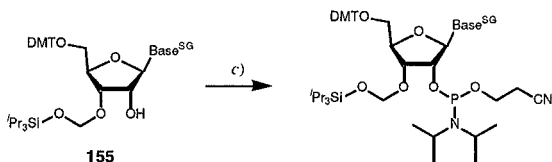
a)



RNA-Amidite

	Base
151	A ^{Ac}
152	C ^{Ac}
153	G ^{Ac}
154	U

b)



155

2/5'-RNA-Amidite

	Base	Ausbeute
156	A ^{Bz}	92%
157	C ^{Ac}	90%
158	G ^{Ac}	85%
159	U	90%

- a) 2'-*O*-(Triisopropylsilyloxy)methyl-geschützte RNA-Amidite (TOM-Amidite).
 b) 3'-*O*-(Triisopropylsilyloxy)methyl-geschützte RNA-Amidite wurden aus den Vorstufen **155** hergestellt.
 c) CIP(NⁱPr₂)(OCH₂CH₂CN), ^tPr₃NEt, CH₂Cl₂, RT, 14 h.

Tabelle 11. *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen

	<i>p</i> DNA/RNA-Sequenz ^{a)}	Massstab		MS ^{b)} [m/z]		
		μmol	a. u. ^{c)}	μmol	berechnet ^{d)}	gefunden
P	5'-AGUACGUCGU-3'	1.5	43	0.42	3161.0	3160.2
Q	5'-ACGACGUACU-3'	1.5	36	0.34	3144.0	3144.3
R	4'- <u>GT</u> -2'→5'-AGUACGUCGU-3'	1.5	58	0.47	3794.4	3794.6
S	4'- <u>GTGT</u> -2'→5'-AGUACGUCGU-3'	1.5	45	0.31	4427.8	4427.5
T	4'- <u>GTGTGT</u> -2'→5'-AGUACGUCGU-3'	1.5	72	0.43	5061.2	5061.5
U	5'-ACGACGUACU-3'→4'- <u>DMDMDM</u> -2'	1.5	18	0.12	5038.3	5038.1
V	5'-ACGACGUACU-2'→4'- <u>DMDMDM</u> -2'	1.5	21	0.14	5038.3	5038.2

^{a)} D: 2,6-Diaminopurin; M: 5-Methylcytosin, *p*DNA-Nukleoside sind unterstrichen, RNA-Nukleoside in Standardschrift. ^{b)} MALDI-TOF-MS. ^{c)} Absorption bei 260 nm. ^{d)} Berechnung für das Fragment [M - H]⁺.

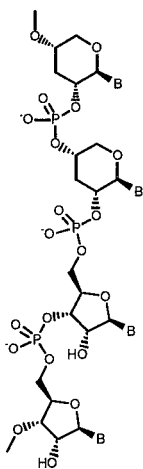
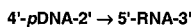
3.5.2 Synthese der *p*DNA/RNA Hybridsequenzen

Das Protokoll für die Synthese des *p*DNA-Teils der *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen **P - V** ist in Schema 45 in Kapitel 3.2.6 aufgeführt. Für die Synthese des RNA-Teils wurden 2'-*O*-TOM-Phosphoramidite **151 - 154** eingesetzt, resp. an den RNA-2'→4'-*p*DNA-Uebergängen die isomeren 3'-*O*-TOM-Phosphoramidite **156 - 159**. Die Festphasensynthese für die RNA-Teilsequenzen erfolgte nach dem Standardprotokoll für TOM-geschützte Amidite [21], wobei Methoxyessigsäureanhydrid anstelle von Essigsäureanhydrid als Capping-Reagens verwendet wurde, um eine *N*²-Acetylierung des 2,6-Diaminopurins zu vermeiden [140]. Der Unterschied zwischen dem *p*DNA- und dem RNA-Protokoll lag einerseits beim Kopplungsschritt und andererseits beim Capping: bei der *p*DNA wurde während 4 min gekoppelt, bei der RNA nur während 2,5 min. Das Capping erfolgte bei der *p*DNA sowohl vor als auch nach der Oxidation und dauerte insgesamt 4 min, wogegen beim RNA-Protokoll nach der Kopplung während 1 min mit Cappinglösung behandelt wurde.

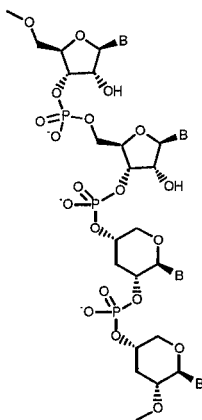
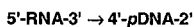
Die Oligonukleotide wurden in zwei Schritten entschützt. Zuerst wurden sie mit 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O 1 : 1 während 3 h bei RT behandelt. Der Rückstand wurde

abpipettiert und am HV vollständig eingedampft. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung aus 1M TBAF-3H₂O in THF/NMP (*N*-Methylpyrrolidon) 1 : 1 aufgenommen; nach 16 h Schütteln bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 1M Tris-HCl-Puffer gestoppt.

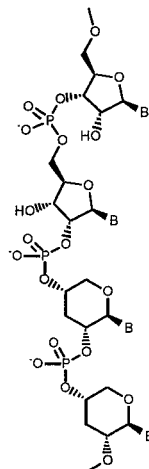
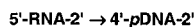
Schema 51.



R, S, T



U

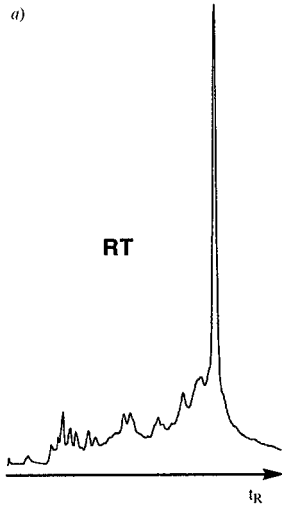


V

Aus den *p*DNA Amiditen **129 - 132**, den TOM-Phosphoramiditen **151 - 154** und den 3'-*O*-TOM-Amiditen **156 - 159** wurden die Sequenzen **R, S, T, U** und **V** hergestellt. Die Synthese der *p*DNA-Teilsequenzen erfolgte nach dem Protokoll beschrieben in Kapitel 3.2.6. Die RNA-Teilsequenzen wurden nach den üblichen RNA-Synthesbedingungen durchgeführt, mit dem Unterschied, dass Mac₂O anstelle von Ac₂O als Cappingreagens verwendet wurde.

Entschützung: 1. 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O 1 : 1, RT, 3 h; 2. 1M TBAF in THF/NMP 1 : 1, RT, 16 h.

Figur 49.

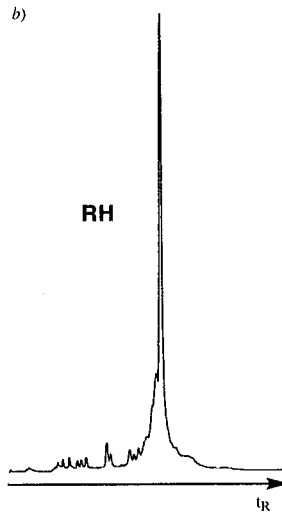


Reten. mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last off %	Ave off %	Base
0.46	0.78	2927	367.55	-	-	G
0.47	1.35	3002	452.11	-	-	G
0.46	1.39	3002	462.58	-	-	I
0.46	1.32	3002	462.30	99.9	99.9	I
0.50	1.25	3002	465.17	-	-	M
0.50	1.20	3002	453.07	97.4	98.7	M
0.50	1.14	3002	439.99	-	-	D
0.51	1.17	3002	441.49	100.3	99.2	D

Total synthesis yield from start = 94.0 %

0.55	1.12	2874	433.04	-	-	C
0.46	0.73	2981	374.35	-	-	G
0.46	0.76	2969	375.08	100.2	100.0	G
0.52	1.17	2929	422.29	-	-	A
0.47	0.81	2979	381.49	100.9	100.0	U
0.53	1.15	2922	426.83	-	-	U
0.53	1.18	2919	431.55	100.7	100.0	A
0.47	0.99	3000	384.96	100.3	100.0	G
0.53	1.12	2924	430.96	100.3	100.0	U
0.55	1.21	2778	445.71	-	-	C
0.56	1.23	2730	445.70	100.0	100.0	C
0.57	1.23	2711	444.21	99.7	100.0	C
0.54	1.21	2871	433.00	100.4	100.0	A
0.48	0.95	2967	392.71	100.3	100.0	G
0.56	1.18	2820	439.12	99.6	100.0	C
0.48	0.97	2958	391.40	99.8	100.0	G
0.49	1.03	2947	393.26	100.5	100.0	G

Total synthesis yield from start = 100.0 %



Reten. mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last off %	Ave off %	Base
0.49	1.25	3001	500.39	-	-	U
0.41	1.18	3002	446.26	-	-	G
0.47	1.61	3002	548.42	-	-	C
0.48	1.64	3002	570.75	104.1	100.0	C
0.46	1.43	3001	519.70	-	-	A
0.47	1.57	3002	524.90	101.0	100.0	A
0.47	1.58	3002	528.96	100.4	100.0	A
0.43	1.17	3002	443.60	99.9	100.0	G
0.48	1.52	3002	535.55	98.7	100.0	C
0.51	1.55	3002	562.03	104.9	100.0	C

Total synthesis yield from start = 100.0 %

0.44	1.19	3002	438.52	-	-	G
0.52	1.60	3002	553.67	-	-	I
0.51	1.51	3002	528.50	95.5	95.5	I
0.51	1.36	3002	515.49	-	-	G
0.51	1.33	3002	498.54	96.7	96.1	G
0.53	1.22	3002	494.33	-	-	D
0.54	1.22	2996	496.62	100.5	97.5	D
0.55	1.27	2976	495.25	-	-	M
0.55	1.25	2970	486.67	98.3	97.7	M

Total synthesis yield from start = 83.2 %

a) HPLC-Chromatogramm der 25-meren Hybridsequenz **RT** (siehe Kapitel 3.4) mit den Werten des Tritylassays.

b) HPLC-Chromatogramm der 19-meren Hybridsequenz **RH** (siehe Kapitel 3.4) mit den Werten des Tritylassays.

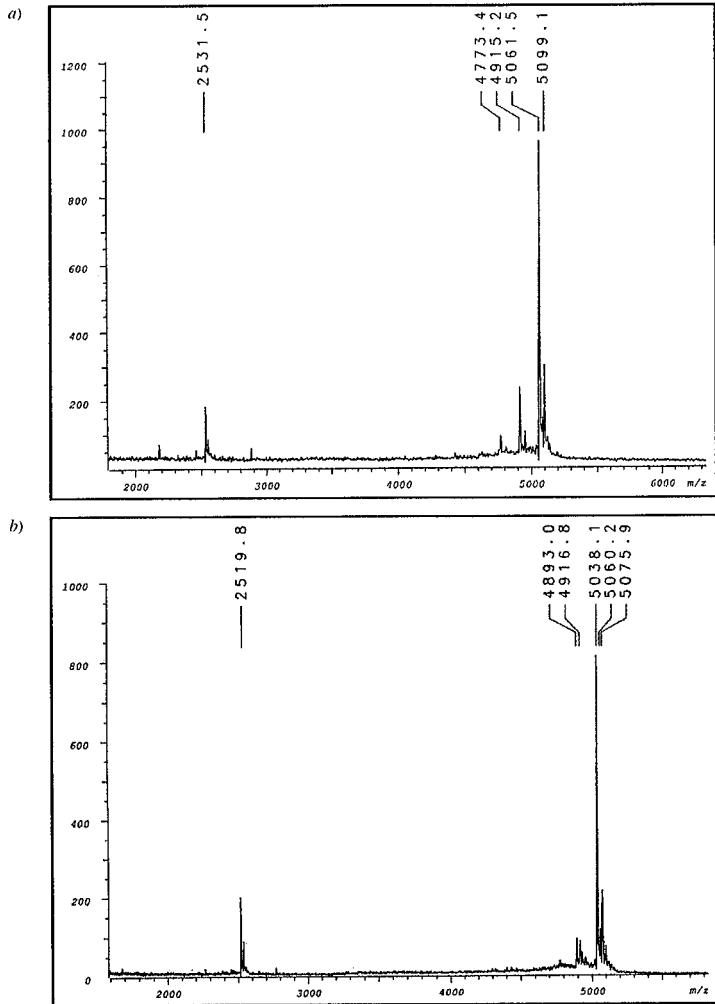
Nach der Entfernung des THF am *Speedvac* wurden die Sequenzen über eine *Sephadex*-Säule (Grössenausschluss-Chromatographie) entsalzt und über Anionentauscher-HPLC gereinigt. Zwei typische Rohprodukt-Chromatogramme von *pDNA*/RNA-Hybridsequenzen sind in Figur 50 abgebildet (die Synthese und die Verwendung der beiden Sequenzen **RH** und **RT** ist in Kapitel 3.7 beschrieben). Die gereinigten Produkte wurden über SEP-PAK-Kartuschen entsalzt, als wässrige Lösung aufbewahrt und mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert (Figur 50).

Aus den Sequenzen **P**, **Q**, **R**, **S**, **T**, **U**, **V** (Tabelle 11) wurden die verschiedenen möglichen *pDNA*/RNA-Duplexe, wie in Figur 51 dargestellt, aufgebaut. Dabei setzten sich alle Duplexe aus einem konstanten RNA-Teil von zehn Basenpaaren zusammen, was gleichzeitig dem Referenzduplex **P·Q** entsprach. Daran wurden in abgestufter Länge zwei analoge Serien von *pDNA*-Duplexen angeknüpft, wobei die beiden Paarungssysteme entweder durch einen RNA-2'→4'-*pDNA*-Uebergang (→ **P·V**, **R·V**, **S·V**, **T·V**) oder durch einen RNA-3'→4'-*pDNA*-Uebergang (→ **P·U**, **R·U**, **S·U**, **T·U**) miteinander verknüpft waren.

Von diesen neun Duplexen wurden die Schmelzpunkte unter den folgenden Bedingungen gemessen: (5 + 5) μ M Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl und 10mM Tris-HCl (pH 7.4). Als Referenzwert wurde der Schmelzpunkt des RNA-Duplexes **P·Q** mit 54.7° herangezogen (Figur 51). Ersetzte man den **Q**-Strang durch die Hybridsequenzen **U** resp. **V**, so wurde im Falle des Duplexes **P·U** kaum eine Stabilisierung festgestellt ($\Delta T_m = 0.1^\circ$), hingegen zeigte der Duplex **P·V**, mit einer RNA-2'→4'-*pDNA* Verknüpfung, eine Stabilisierung von 1.3° gegenüber der Referenz **P·Q**. Diese Stabilisierung beruht vermutlich darauf, dass die erste nicht paarende Nucleobase ein π -Stacking mit dem ersten Basenpaar der *pDNA* eingeht (*dangling end*).

Bei der Erweiterung des Paarungssystems um zwei *pDNA*-Basenpaare wurde beim 3'→4' verknüpften Duplex **R·U** nur eine geringe Stabilisierung von 1.7° gegenüber der Referenz gemessen. Hingegen wurde im 2'→4'-verknüpften Duplex **R·V** eine Stabilisierung um 7° auf 61.7° festgestellt, was darauf hindeutete, dass die beiden *pDNA*-Nucleobasen im Duplex **R·V** miteinander paarten, nicht aber beim 3'→4' verknüpften Duplex **R·U**.

Figur 50.



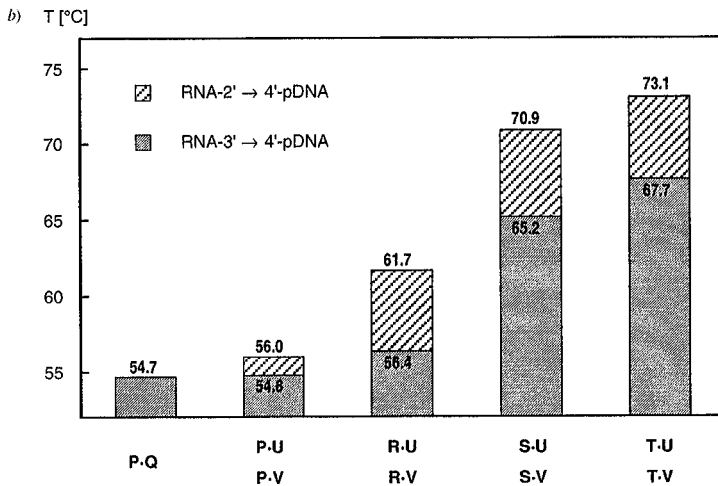
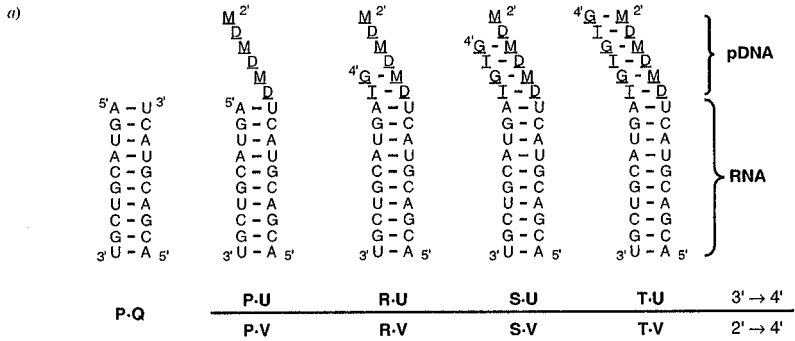
- a) Massenspektrum der pDNA/RNA Hybridsequenz S, mit der Molmasse 5061.2 g/mol.
 b) Massenspektrum der pDNA/RNA Hybridsequenz T, mit der Molmasse 5038.3 g/mol.

Erst durch Anfügen von zwei weiteren *p*DNA-Nukleosiden wurde beim 2'→4'-verbrückten Duplex **S•U** eine deutliche Erhöhung des Schmelzpunktes auf 65,2° festgestellt. Bei einer noch weiteren Ausdehnung des paarenden *p*DNA-Bereiches auf die Duplexe **T•U** und **T•V** wurde für beide ungefähr die gleiche Stabilitäts-erhöhung gegenüber den Duplexen **S•U** und **S•V** beobachtet, wobei im Vergleich mit der Referenz **P•Q** die 2'→4'-verknüpften Duplexe stets deutlich stabiler waren als die 3'→4'-verknüpften Analogen.

Die Stabilisierung der 2'→4'-verknüpften Duplexe gegenüber den 3'→4'-verknüpften deutete darauf hin, dass es sich im Fall einer RNA-2'→4'-*p*DNA-Verbindung von Anfang um ein kooperatives Paarungssystem handelt, mit einem einzigen π -Stacking, welches sich über den gesamten Duplex erstreckt. Dies ist hingegen bei den RNA-2'→4'-*p*DNA-verknüpften Hybriden geometrisch nicht möglich und ihre Duplexe weisen deshalb zwei isolierte π -Stacking-Regionen auf (Figur 52). Mit diesem Modell kann auch die Beobachtung der Stabilisierung von 1,3° beim Duplex **P•V** gegenüber der Referenzduplex **P•Q** erklärt werden, bei welchem die erste *p*DNA-Base mit dem letzten RNA-Basenpaar interagieren kann (*dangling end*), was beim analogen 3'→4'-verknüpften Duplex **P•U** nicht möglich ist.

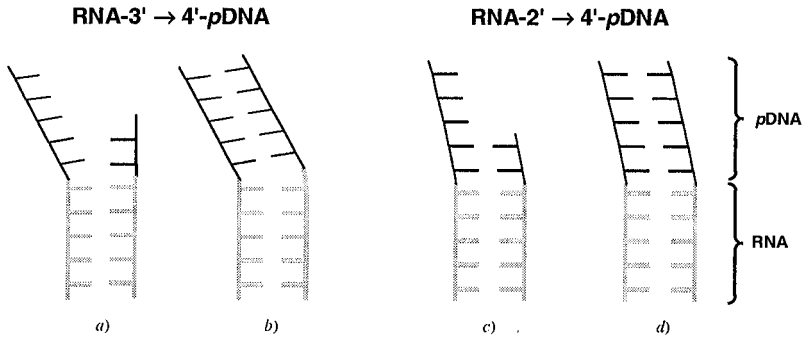
Diese Experimente zeigten, dass der Uebergang von der RNA zur *p*DNA über eine RNA-2' → 4'-*p*DNA-Verknüpfung deutlich stabileren Duplexen führt als bei einer RNA-3'→4'-*p*DNA-Verknüpfung und deshalb für unsere Zwecke nur noch RNA-2'→4'-*p*DNA-verknüpfte Sequenzen hergestellt wurden.

Figur 51.



- a) Dargestellt sind die verschiedenen pDNA/RNA-Hybride und die entsprechenden Duplexe. pDNA-Nukleotide wurden unterstrichen, RNA-Nukleotide sind in Standardschrift geschrieben.
- b) Die Schmelzpunkte der entsprechenden 3' → 4'- resp. 2' → 4'-verknüpften Duplexe wurden unter Standardbedingungen gemessen und sind gegeneinander graphisch dargestellt.

Figur 52.



- a) Beim RNA-3' → 4'-pDNA-Uebergang gibt es eine Verzerrung im Duplex, so dass der kurze pDNA-Teil nicht paaren kann.
- b) Erst bei einem längeren pDNA-Duplex kann diese Verzerrung durch die Paarungsenergie kompensiert werden. Vermutlich handelt es sich um zwei getrennte Paarungssysteme.
- c) Beim RNA-2' → 4'-pDNA-Uebergang gibt es keine Verzerrung, weshalb der Duplex schon bei einer kurzen pDNA-Teilsequenz vollständig paaren kann.
- d) Es entsteht ein einziges, kooperatives Paarungssystem über die Gesamtstruktur.

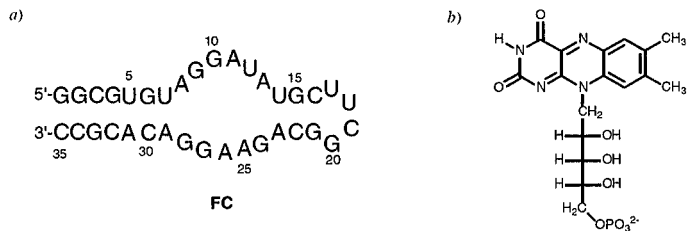
3.6 *p*DNA/RNA-Konstrukt des FMN-bindenden Aptamers

3.6.1 Einleitung

In einem ersten Schritt wollten wir überprüfen, ob sich *p*DNA/RNA-Hybridduplexe, in Analogie zu RNA-Aptamern (Kapitel 1.4), zur Bindung kleiner, organischer Moleküle eignen. Für erste Versuche wurde deshalb ein *p*DNA/RNA-analoges Konstrukt, des in Kapitel 1.4.2 beschriebenen, FMN-bindenden RNA-Aptamers, hergestellt, welches daraufhin bezüglich der Bindung von FMN untersucht wurde.

Famulok & Burgstaller entdeckten das FMN-bindende RNA-Aptamer und untersuchte dessen Bindungsverhältnisse [27]. Eine NMR Lösungsstruktur wurde von *Patel et al.* [30] vorgeschlagen. Es handelt sich dabei um eine 35-mere RNA-Sequenz, welche in der Anwesenheit von Mg^{2+} FMN bindet (Figur 53). Mittels Affinitätschromatographie wurde die Dissoziationskonstante K_D auf ca. $0.5\mu M$ bestimmt [27].

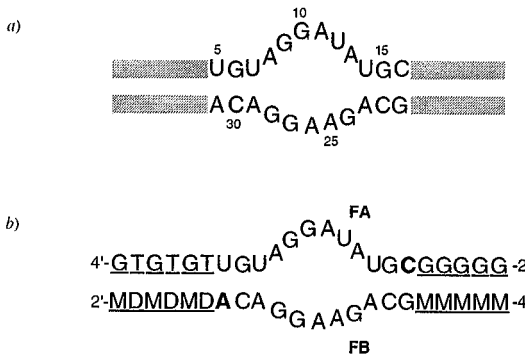
Figur 53.



- a) Sekundärstruktur des FMN-bindenden RNA-Aptamers.
 b) Strukturformel des FMN (Flavin-mononucleotid).

Wir wollten ein Analoges des 35-meren RNA-Aptameren konstruieren, bei welchem der Stamm und der Hairpin durch *p*DNA-Doppelstränge ersetzt sind. Die bindende Region wollten wir beibehalten, wie es in Kapitel 2.1 beschrieben wurde. Die Gesamtstruktur sollte also aus zwei kurzen *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen aufgebaut werden, wobei die für die Funktion notwendige Kernstruktur weiterhin als RNA beibehalten wurde (Figur 54).

Figur 54.



- a) Die 35-meren Aptamersequenz wird an den Enden und in der Mitte beim Hairpin geschnitten und durch zwei *p*DNA-Stämme ersetzt.
- b) Die Aptamersequenzen mit *p*DNA-Stämmen. *p*DNA-Nukleoside sind unterstrichen, RNA Nukleoside in Standardschrift, Nukleoside in fetter Schrift deuten auf eine *p*DNA-4' → 2'-RNA-Verknüpfung hin.

3.6.2 Synthese der *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen FA, FB und FC

Die in Figur 54 b) aufgeführten 23- und 22-meren Sequenzen **FA** und **FB** wurden, unter Einführung einer RNA-2'→4'-*p*DNA-Verknüpfung an den entsprechenden Stellen, hergestellt; für Kontrollexperimente wurde die natürliche RNA-Aptamersequenz **FC** hergestellt. Die Synthese und die Entschützung der drei Oligonukleotide **FA**, **FB** und **FC** wurde nach gegebenem Protokoll (Kapitel 3.2.6 resp. 3.5.2) durchgeführt.

Die beiden kürzeren Sequenzen **FA** und **FB** konnten gut über Anionentauscher-HPLC gereinigt werden. Hingegen konnte die 35-mere RNA-Sequenz **FC** unter den HPLC-Bedingungen nicht mehr denaturiert werden und musste deshalb mittels Gelelektrophorese gereinigt werden. Die drei Oligonukleotide **FA**, **FB** und **FC** wurden mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert.

Tabelle 12. *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen

	<i>p</i> DNA/RNA-Sequenz ^{a)}	Massstab		Ausbeute		MS ^{b)} [m/z]	
		μmol	a.u. ^{c)}	μmol	berechnet ^{d)}	gefunden	
FA	4'- <u>GTGTGT</u> -2'→5'-UGUAGG- -AUAUGC-2'→4'- <u>GGGGG</u> -2'	1.5	42	0.17	7382.6	7382.1	
FB	4'- <u>MMMM</u> -2'→5'-GCAGAA- -GGACA-2'→4'- <u>DMDMDM</u> -2'	1.5	10	0.05	6985.7	6985.0	
FC	5'-GGCGUGUAGGAUAUGCU- -UCGGCAGAAGGACAGCC-3'	1.5	26	0.07	11337.9	11381.6 ^{e)}	

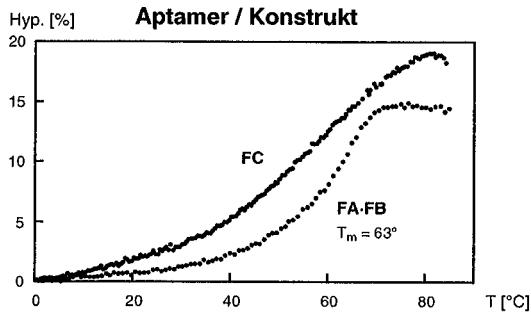
^{a)} *p*DNA-Nukleoside sind unterstrichen, RNA-Nukleoside in Standardschrift. ^{b)} MALDI-TOF-MS. ^{c)} Absorption bei 260 nm. ^{d)} Berechnung für das Fragment [M – H]⁺. ^{e)} breites Signal.

3.6.3 Bindungsstudien des Aptamers **FC** und des *p*DNA/RNA-Analogen **FA**·**FB**

Von den beiden Oligonukleotidstrukturen **FA**·**FB** und **FC** wurden die UV-Schmelzkurven bei 5 μM Aptamerkonzentration (**FA**·**FB** 5 μM + 5 μM) in 150mM NaCl, 4mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen. Beim *p*DNA/RNA-Konstrukt **FA**·**FB** war der Kurvenverlauf nicht eindeutig sigmoid, jedoch zeichnete sich ein klarer Schmelzpunkt bei $T_m = 63^\circ$ ab, was auf ein kooperatives Paarungsverhalten der beiden *p*DNA-Stammsequenzen schliessen liess. Hingegen war beim RNA-Aptamer **FC** kein Schmelzpunkt, sondern ein Schmelzbereich zu erkennen; die Hyperchromizität stieg beinahe linear zur Temperatur an (Figur 55).

In einem orientierenden Versuch wurde durch Zugabe von 5eq. FMN bei beiden Aptameren kein Stabilitätsunterschied festgestellt. Vermutlich deshalb nicht, weil der FMN-Komplex im dem Bereich, wo man einen Unterschieden erwarten würde, wahrscheinlich nicht mehr stabil ist.

Figur 55.

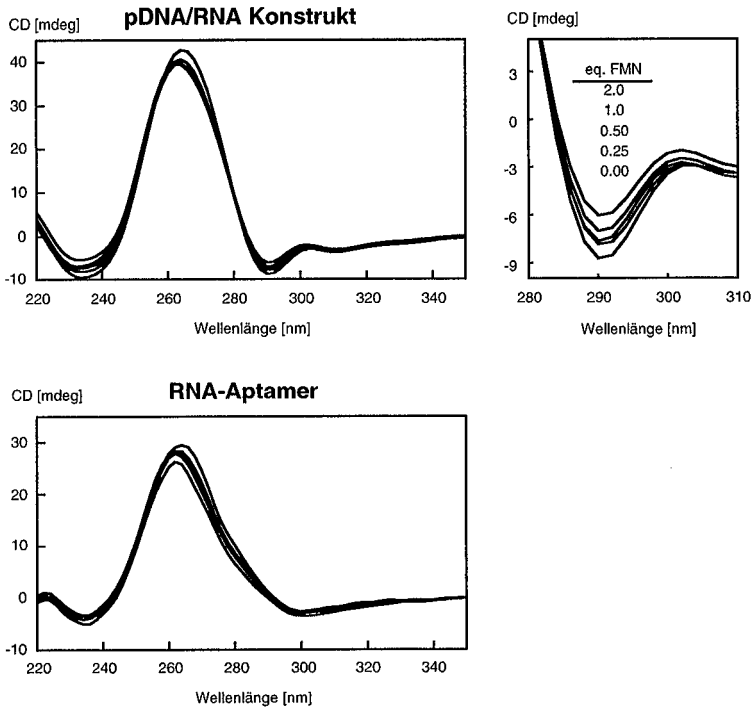


UV-Schmelzkurve des RNA-Aptamers **FC** und des analogen *p*DNA/RNA-Konstruktes **FA•FB**, aufgenommen bei 5µM Aptamerkonzentration in 150mM NaCl, 4mM MgCl₂ und 10mM Tris-HCl (pH 7.4).

In einem zweiten Versuch wollten wir deshalb die Bindung des FMN mittels CD-Spektroskopie nachweisen. Die CD-Spektren wurden bei 5° C unter den gleichen Bedingungen wie die UV-Schmelzkurven gemessen. Dazu wurden **FC** bzw. **FA•FB** als 5µM-Lösungen vorgelegt und mit 0 → 2 eq. FMN titriert. Die Spektren wurden im Bereich zwischen 350 und 220 nm aufgenommen. Durch die Zugabe von FMN konnte bei beiden Aptameren eine geringfügige Änderung im CD-Spektrum gemessen werden, was ein klares, qualitatives Indiz für die Bindung des FMN war. Der induzierte CD-Effekt war aber nicht signifikant genug, um daraus die Dissoziationskonstante K_D zu bestimmen (Figur 56). Im Falle des *p*DNA/RNA-Konstruktes **FA•FB** war der CD-Effekte deutlicher zu erkennen als beim RNA-Aptamer **FC**. Zur Illustration wurde der Ausschnitt zwischen 280 und 310 nm deshalb vergrößert dargestellt.

Bei der Anregung des FMN bei 420 nm kann eine Fluoreszenz im Bereich zwischen 450 und 650 nm, mit dem Maximum bei 535 nm beobachtet werden. Diese Eigenschaft eignet sich bestens, um die Komplexbildung nachzuweisen, da bei der Bindung des FMN durch das Aptamer eine Löschung der Fluoreszenz eintritt.

Figur 56.



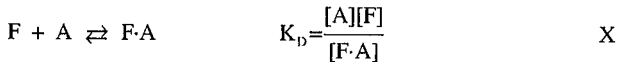
Dargestellt sind die CD-Spektren des RNA-Aptamers und des analogen pDNA/RNA-Konstruktes.

Beide Aptamere wurden mit 0 → 2.0 eq. FMN titriert. Im vergrößerten Ausschnitt des pDNA-Analogen ist ein deutlicher CD-Effekt bei der Bindung des FMN zu erkennen. Die Spektren wurden aufgenommen bei 5µM Aptamer, in 150mM NaCl, 4mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) und 5° C.

Eine 1 μM FMN-Lösung in 150mM NaCl, 4mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) wurde bei RT bei 420 nm angeregt und die Fluoreszenzemission zwischen 450 und 650 nm gemessen. Danach wurde schrittweise Aptamer (FC resp. FA•FB) zugegeben und erneut die Fluoreszenzemission gemessen. Dabei nahm die Fluoreszenz stetig ab, bis sie nach der Zugabe von ca. 4 eq. des Aptamers vollständig gelöscht war (Figur 57). Aus den Werten beim Emissionsmaximum der Fluoreszenzspektren (535 nm) wurde der Anteil an gebundenem FMN berechnet.

Anschliessend wurde die Komplexkonzentration (resp. gebundenes FMN) vs. die Konzentration an zugegebenem Aptamer aufgetragen (Figur 57). Die Punkte beschreiben eine Gleichgewichtskurve, aus deren Parametern nach Berücksichtigung der Verdünnung die Dissoziationskonstante K_D nach folgendem mathematischen Ansatz berechnet wurde:

Aus der Gleichgewichtsreaktion zwischen dem FMN und dem Aptamer



und den Definitionen:

A = totale Aptamerkonzentration

F = totale FMN-Konzentration

y = Gleichgewichtskonz. des Komplexes

ergibt sich für K_D

$$K_D = \frac{[\text{A} - y][\text{F} - y]}{[y]} \quad \text{XI}$$

XI beschreibt eine quadratische Gleichung der Form

$$0 = \text{F}\cdot\text{A} - y (\text{A} + \text{F} + K_D) + y^2 \quad \text{XII}$$

mit der reellen Lösung

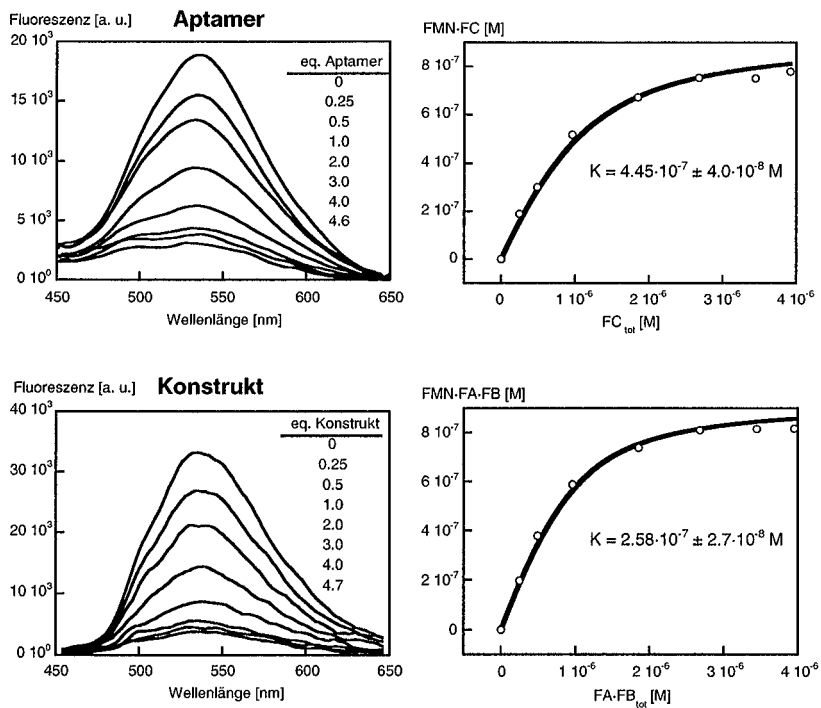
$$y = \frac{A + F + K_D - \sqrt{(A + F + K_D)^2 - 4AF}}{2} \quad \text{XIII}$$

In Gleichung XIII entspricht A der x-Koordinate der Bindungskurve. Einzige unbekannte Variable ist K_D , welche durch Iteration der Punkte an die Funktion XIII berechnet werden konnte.

Aus der Kurvenanpassung erhielt man also direkt die Dissoziationskonstante K_D . Der Wert für das RNA-Aptamer **FC** mit $K_D = 4.5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ entspricht ziemlich genau jenem, der aus der Literatur bekannt war ($5 \cdot 10^{-7} \text{M}$, bestimmt durch Affinitätschromatographie [27]).

Interessanterweise wurde für das pDNA/RNA-Analoge **FA·FB** eine signifikant kleinere Dissoziationskonstante von $K_D = 2.6 \cdot 10^{-7} \text{M}$ gefunden, was bedeutet, dass der FMN-Komplex des Konstruktes **FA·FB** etwas stabiler ist als jener des RNA-Aptamers **FC**.

Figur 57.



Links sind die Fluoreszenzspektren des FMN während der Titration mit dem Aptamer FC resp. dem Konstrukt FA-FB dargestellt. Rechts sind die Bindungskurven der Komplexbildung abgebildet, in denen die Komplexkonzentration als Funktion der totalen Oligonukleotidkonzentration aufgetragen ist. Die angepasste Kurve entspricht der Bindungskurve, aus deren Parameter die Dissoziationskonstante K_D berechnet wurde (siehe Text).

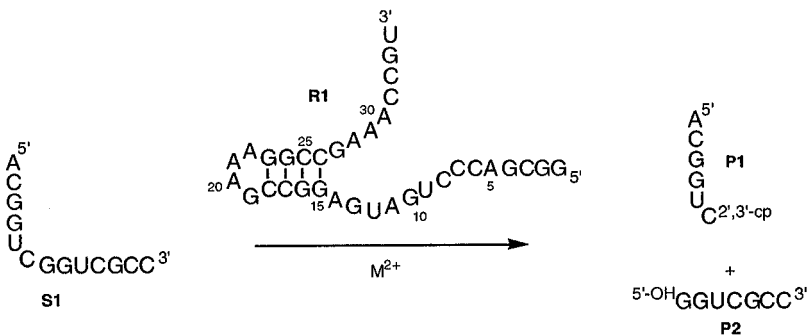
3.7 *p*DNA/RNA-Analoges des Hammerhead-Ribozymes

3.7.1 Einleitung

Die Struktur und die Funktion des Hammerhead-Ribozymes wurde in der Einleitung (Kapitel 1.5) besprochen. Für die folgenden Untersuchungen wurde das Ribozym von *McKay et al.* [59] verwendet.

Das Ribozym **R1** bildet zusammen mit dem Substrat **S1** den Komplex **R1·S1** aus. In Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} wird das Substrat **S1** zu den Produkten **P1** und **P2** gespalten, unter Ausbildung eines 2',3'-Cyclophosphates und einer freien 5'-OH-Gruppe an der Spaltungsstelle (Figur 58).

Figur 58.



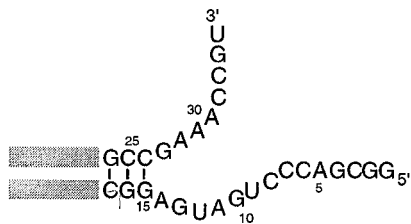
Darstellung der Spaltungsreaktion des Hammerhead-Ribozymes in der Sekundärstruktur.

Die 34-Nucleotide lange Sequenz **R1** bildet einen Hairpin aus, welcher die Bindung des Substrates an die beiden endständigen Bindungsdomänen ermöglicht. Wir wollten diesen

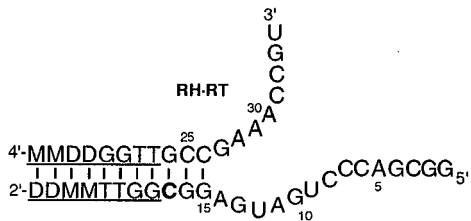
Hairpin durch einen p DNA-Duplex ersetzen, wodurch wir ein Ribozym-Analoges **RH·RT** erhielten, welches sich aus zwei kurzen Sequenzen **RH** und **RT** aufbauen liess. Von diesem neuen Ribozym **RH·RT** erhofften wir uns, dass es in Analogie zum natürlichen Ribozym **R1** das Substrat **S1** spaltet, weshalb wir es bezüglich seiner Spaltungsaktivität untersuchen wollten (Figuren 58, 61).

Figur 59.

a)



b)



- a) Der Hairpin des Hammerhead-Ribozymes **R1** wird durch einen p DNA-Duplex ersetzt.
- b) Das Konstrukt **RH·RT** setzt sich aus zwei p DNA/RNA-Hybridsequenzen zusammen. p DNA-Nukleoside sind unterstrichen, RNA-Nukleoside sind in Standardschrift geschrieben. Das fettgedruckte Nukleosid C17 deutet auf einen p DNA-4' \rightarrow 2'-RNA-Uebergang hin.

3.7.2 Synthese und Charakterisierung des *p*DNA/RNA-analogen

Hammerhead-Ribozymes

Die Synthese der beiden Sequenzen **RH** und **RT** wurde im 1.5 μ mol Massstab durchgeführt. Am *p*DNA/RNA-Uebergang der Sequenz **RT** wurde das 3'-*O*-TOM geschützte C-Phosphoramidit **157** eingebaut.

Es wurden die üblichen Syntheseprotokolle für den Kettenaufbau der Oligonukleotide verwendet (siehe Kapitel 3.2.6). Zur Entschützung wurden die Träger zuerst 3 h mit 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O und anschliessend mit 1M TBAF·3H₂O in THF/NMP 1 : 1 während 16 h behandelt. Nach einem Entsalzungsschritt über *Sephadex* konnten die Oligonukleotide mittels Anionentauscher-HPLC über eine *SAX*-Säule gereinigt werden. Die Chromatogramme der Rohprodukte sowie die Werte des dazugehörigen Trityl assays sind in Figur 49 (Kapitel 3.5.2) dargestellt.

Neben den beiden Hybridsequenzen **RH** und **RT** wurde auch das 13-mere RNA-Substrat **S1** (10 μ mol-Synthese) und für Kontrollexperimente das natürliche Hammerhead-Ribozym **R1** (1.5 μ mol-Synthese) hergestellt.

Tabelle 13. Ribozym-Hybridsequenzen

	<i>p</i> DNA/RNA-Sequenz ^{a)}	Massstab		MS ^{b)} [m/z]		
		μ mol	a.u. ^{c)}	μ mol	berechnet ^{d)}	gefunden
RT	4'- <u>MMDDGGTT</u> -2'→5'-GC- -CGAACCGU-2'	1.5	38	0.20	6017.9	6018.5
RH	5'-GGCGACCCUGAUGA- -GGC*-2'→4'-DDMMTTGG-2'	1.5	28	0.11	8010.1	8008.7
R1	5'-GGCGACCCUGAUGAGGC- -CGAAAGGCCGAAACCGU-3'	1.5	22	0.06	11013.8	11012.9
S1	5'-ACGGUCGGUCGCC-3'	10	208	1.6	4131.6	4131.0

^{a)} *p*DNA-Nukleoside sind unterstrichen, RNA-Nukleoside in Standardschrift, * bedeutet 2',5'-verknüpftes Nukleosid.

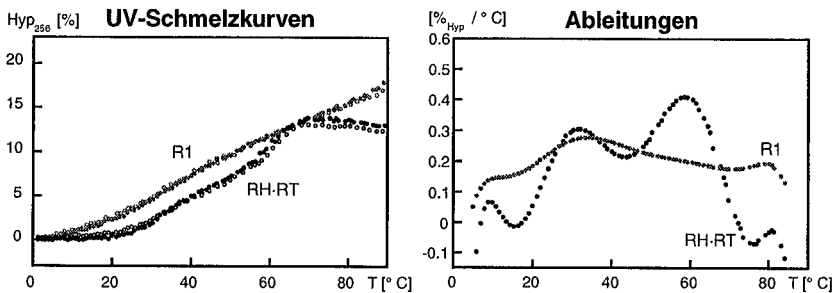
^{b)} MALDI-TOF-MS. ^{c)} Absorption bei 260 nm. ^{d)} Berechnung für das Fragment [M - H]⁺.

Paarungseigenschaften

Sowohl vom natürlichen Ribozym **R1**, als auch vom Konstrukt **RH-RT** wurden die UV-Übergangskurven bei $1\mu\text{M}$ Einzelstrangkonzentration in 150mM NaCl, 4mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl (pH 7.4) gemessen.

Beim natürlichen Ribozym ist kein sigmoides Verhalten erkennbar. Die Hyperchromizität steigt fast linear mit der Temperatur an und es konnte kein Schmelzpunkt herausgelesen werden. Dagegen sind beim Konstrukt **RH-RT** zwei überlagerte Schmelzpunkte zu sehen. Der tiefere Schmelzpunkt (T_m) von ca. 38° entspricht vermutlich dem Schmelzen des gepaarten RNA-Teils. Der zweite Schmelzpunkt bei ca. 58° entspricht wahrscheinlich dem $p\text{DNA}$ -Duplex und liegt ungefähr in der Größenordnung der Übergangstemperatur des selbstkomplementären Duplexes **J** ($[4'\text{-MGDDTTMG-2}']_2$, $T_m = 54^\circ$, Tabelle 9, Kapitel 3.2.7), welcher die gleiche Basenzusammensetzung aufweist.

Figur 60.



Die UV-Schmelzkurven und deren Ableitungen des natürlichen Ribozyms **R1** und des $p\text{DNA}/\text{RNA}$ -Konstruktes **RH-RT** sind abgebildet. Die ausgemalten Punkte entsprechen der Aufheizkurve, die Kreise der Abkühlkurve. Die Spektren wurden aufgenommen bei $1\mu\text{M}$ Oligonukleotid in 150mM NaCl, 4mM MgCl_2 und 10mM Tris-HCl (pH 7.4).

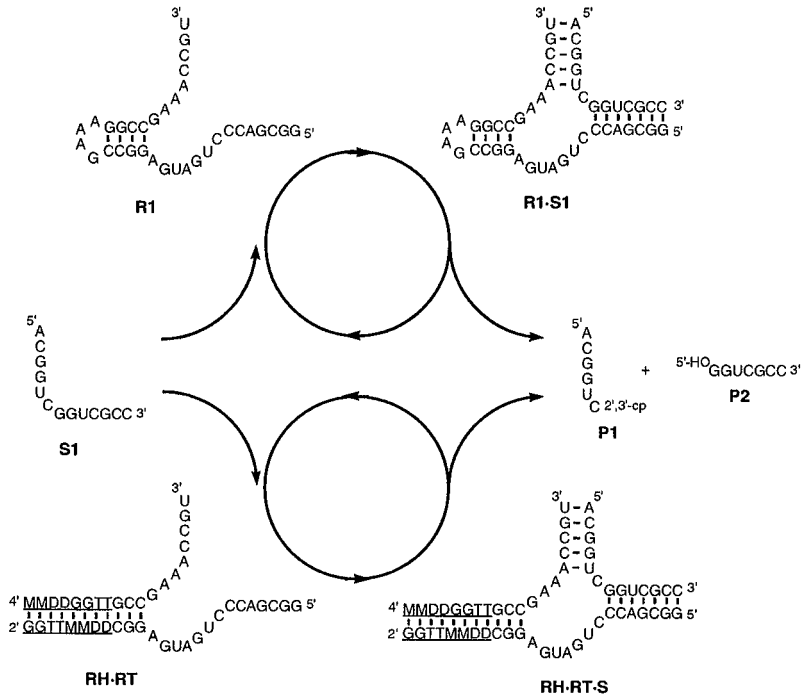
3.7.3 Spaltungsexperimente mit dem Konstrukt RH-RT

Wir haben die Spaltungskinetik des Ribozymkonstruktes **RH-RT** unter verschiedenen Bedingungen untersucht und mit den kinetischen Daten des natürlichen Ribozymes **R1** verglichen. Das Reaktionsschema ist in Figur 61 dargestellt. Alle Experimente wurden bei $20\mu\text{M}$ Substrat **S1** und $1\mu\text{M}$ Ribozym (**RH-RT** resp. **R1**) in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) durchgeführt, analog wie beschrieben in [62]. Variiert wurde die Konzentration (0.5 und 2.0mM), die Art des zweiwertigen Metallions M^{2+} (Mg^{2+} und Mn^{2+}) sowie die Reaktionstemperatur (26° bis 52°).

Die Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotid-Lösungen erfolgte über die optische Dichte (OD), welche bei 260 nm und 85°C gemessen wurde. Die 1:1-Verhältnisse der beiden Sequenzen **RH**, **RT** wurden mittels HPLC überprüft.

Zur Durchführung der Experimente wurden zwei Lösungen à $100\ \mu\text{l}$ vorbereitet. Die eine enthielt das Substrat, die andere das Ribozym, jeweils im Reaktionspuffer. Diese wurden 1 min. auf 90° erwärmt und nach dem Abkühlen auf RT (ca. 5 min.) mit je $25\ \mu\text{l}$ M^{2+} -Lösung versetzt. Dieses Vorheizen wurde deshalb durchgeführt, weil andernfalls ungewöhnliche Reaktionskinetiken gemessen wurden [148]. Dann wurden die beiden Proben während 10 min. bei der Reaktionstemperatur inkubiert. Durch das Zusammenmischen der beiden Lösungen wurde die Spaltungsreaktion gestartet. In periodischen Zeitintervallen wurden insgesamt 5 Proben à $50\ \mu\text{l}$ entnommen, die durch Zugabe von $20\ \mu\text{l}$ 0.2M NaH_2PO_4 -Lösung (durch Erniedrigung des pH-Wertes) gestoppt wurden. Die verschiedenen Verbindungen (Edukte, Produkte und Katalysator) wurden über Anionentauscher-HPLC unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Edukt- und Produktsignale, welche bei 260nm detektiert wurden.

Figur 61.



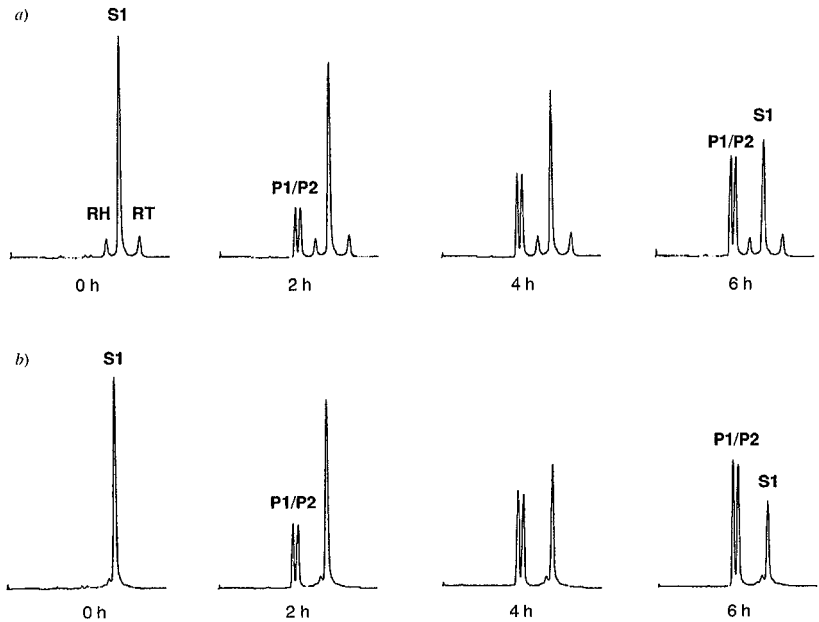
Katalytischer Zyklus des Hammerhead-Ribozymes **R1** und des *pDNA*-analogen Konstruktes **RH-RT**. Das Substrat **S1** bildet mit dem Ribozym über *Watson-Crick*-Basenpaare einen Ribozym-Substrat-Komplex **R1-S1** resp.

RH-RT-S1 aus. **S1** wird gespalten unter Bildung zweier Produkte **P1** und **P2**, welche dann vom Ribozym abgelöst werden. **P1** liegt dabei als 2',3'-Cyclophosphat vor, **P2** mit der freien OH-Gruppe am 5'-Ende.

Die ersten Spaltungsexperimente zeigten, dass das *pDNA*/RNA-Analoge **RH-RT** das Substrat **S1** auf die gleiche Weise spaltet, wie das natürliche RNA-Ribozym **R1**. Der funktionelle RNA-Teil des Ribozymanalogen blieb also durch den Ersatz des Hairpin-Elementes mit einem *pDNA*-Gerüst vollständig erhalten. Die Geschwindigkeit der Spaltung

war beim *p*DNA/RNA-Analogen zwar ungefähr um einen Faktor 1.5 langsamer als das natürliche RNA-Ribozym, aber qualitativ war unser *p*DNA/RNA-Analogen ebenbürtig. Die entsprechenden HPLC-Chromatogramme sind in Figur 62 abgebildet.

Figur 62.



- a) Zeitlicher Verlauf der Spaltungsreaktion des *p*DNA/RNA-Konstruktes **RH-RT**. Abgebildet sind Anionentauscher HPLC-Chromatogramme von Proben, welche nach der angegebenen Zeit vom Reaktionsgemisch entnommen wurden. Unter den denaturierenden HPLC-Bedingungen konnten die Proben in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden. Detektiert wurde bei 260 nm. Der Umsatz der Reaktion wurde durch Integration der Signale berechnet. **RH** und **RT** bilden zusammen das künstliche Konstrukt **RH-RT**, **S1** ist das Substrat, **P1** und **P2** sind die beiden Produkte. Die Reaktion wurde bei $1\mu\text{M}$ Ribozym und $20\mu\text{M}$ Substrat in 150mM NaCl, 2mM MgCl_2 und 10mM Tris-HCl (pH 7.5) bei 42°C durchgeführt.
- b) Analoge Messreihe des natürlichen Ribozymes **RI**. Das Signal des Ribozymes ist unter diesen HPLC-Bedingungen nicht zu sehen.

Nach dem kinetischen Modell, welches in Kapitel 1.5.3 beschrieben ist (Figur 12), verläuft die Reaktion *pseudo*-erster-Ordnung. Es gelten also die folgenden Gesetze:

Definition:	S°	Anfangskonzentration des Substrates
	S	Substratkonzentration zur Zeit t
	k	Geschwindigkeitskonst. <i>pseudo</i> 1. Ordnung
	$t_{1/2}$	Halbwertszeit

$$\ln \frac{[S]}{[S^{\circ}]} = -kt \quad \text{XIV}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{XV}$$

Mit Gleichung XIV konnte durch Linearisierung der kinetischen Daten relativ einfach die Reaktionskonstante k_{obs} berechnet werden. Jedoch wurde bei Messreihen unterhalb 37° , sowohl für das natürliche als auch für das *p*DNA/RNA-Analoge eine Abflachung der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt, d. h. beim Auftragen von $\ln(S/S^{\circ})$ vs. t war eine Abweichung von der Linearität zu sehen. Verantwortlich dafür ist vermutlich die bekannte Verminderung der effektiven Ribozymkonzentration im Verlaufe der Reaktion, welche durch die Ausbildung inaktiver Strukturen zustande kommt [149].

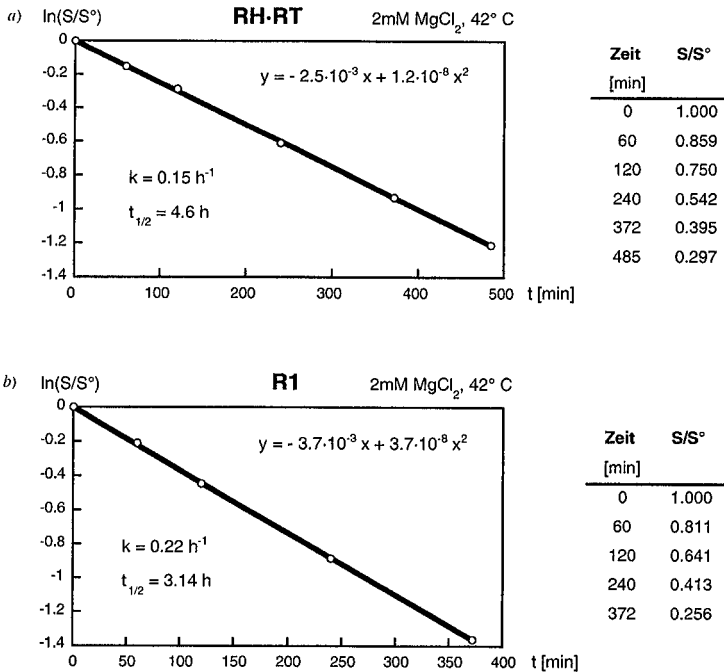
Rechnerisch wurde an die logarithmierten Daten ein Polynom zweiten Grades approximiert, wobei der lineare Term die Spaltungsreaktion beschreibt und der quadratische Term ein Mass für die Inaktivierung der Ribozymstrukturen ist [149].

$$\ln \frac{[S]}{[S^{\circ}]} = kt + mt^2 \quad \text{XVI}$$

m Geschwindigkeitskonst. der Inaktivierung

Die kinetischen Daten wurden durch Anpassung der Funktion XVI ausgewertet. Dieses Modell führte in diesen Fällen zu guten, mathematischen Anpassungen, ist aber willkürlich. Deshalb wurde von uns später eine neue Methode zur Berechnung der Reaktionskonstanten ausgearbeitet, bei welchem die Inaktivierung der Ribozymes auf einem reaktionskinetischen Modell beruht (Kapitel 3.8.7).

Figur 63.



- a) Auswertung der HPLC-Plots. Rechts daneben sind die Werte der verbleibenden Menge des Substrates als Funktion der Zeit angegeben, welche aus den HPLC-Peakflächen berechnet wurden. An die Messpunkte wurde ein Polynom zweiten Grades gefittet. Aus dem linearen Term ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante k der Spaltungsreaktion. Dargestellt ist die Kinetik des *p*DNA/RNA-Konstruktes **RH-RT**.
- b) Kinetischer Verlauf des natürlichen Ribozymes **R1**. Die Reaktion wurde bei 1 μ M Ribozym und 20 μ M Substrat in 150mM NaCl, 2mM MgCl₂ und 10mM Tris-HCl (pH 7.5) bei 42° C durchgeführt.

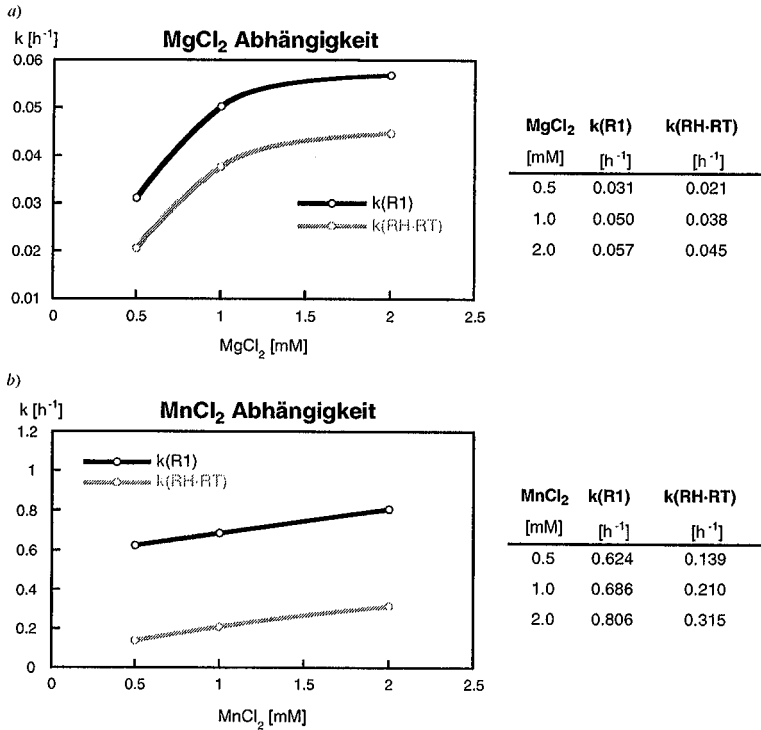
Metallionenabhängigkeit der Ribozym-vermittelten Spaltungsreaktion

Die Spaltungsreaktion wurde auf die Abhängigkeit des Metallions hin untersucht. Es wurden sowohl die Konzentrationen von M^{2+} , als auch die Art (Mn^{2+} und Mg^{2+}) variiert. Die Experimente wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: $20\mu M$ Substrat **S1** und $1\mu M$ Ribozym (**RH·RT** resp. **R1**) in $150mM$ NaCl, $10mM$ Tris-HCl (pH 7.5) bei 37° und bei Metallionenkonzentrationen von $0.5mM$, $1mM$ und $2mM$, für Mn^{2+} resp. Mg^{2+} .

Wiederum wurde ein absolut analoges Verhalten zwischen den beiden Ribozymen beobachtet. Sowohl bei **R1** als auch beim Konstrukt **RH·RT** stieg die Geschwindigkeitskonstante k linear mit der Konzentration an Mn^{2+} an (Figur 64). Im Falle von Mg^{2+} war bei beiden Ribozymen ein Knick der Geschwindigkeitskonstanten bei einer Konzentration von ca. $1mM$ zu beobachten.

Bei allen Messbedingungen waren die absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten mit Mg^{2+} als Kofaktor deutlich langsamer als mit Mn^{2+} , sowohl für das natürliche Ribozym als auch für das *pDNA/RNA*-Konstrukt.

Figur 64.



- a) Dargestellt ist die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k von der Metallkonzentration. Das Verhalten des pDNA/RNA-Konstruktes ist in beiden Fällen analog zum natürlichen Ribozym. Bei MgCl₂-Konzentrationen unter 1 mM fiel die Reaktionsgeschwindigkeit stark zusammen.
- b) In der Anwesenheit von MnCl₂ verhielt sich k für beide Ribozyme linear im angegebenen Konzentrationsbereich. Alle Reaktionen wurden bei 1 μ M Ribozym und 20 μ M Substrat in 150 mM NaCl, (0.5 - 2.0) mM MnCl₂ resp. MgCl₂ und 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) bei 37 °C durchgeführt.

Temperaturabhängigkeit der Ribozym-vermittelten Spaltungsreaktion

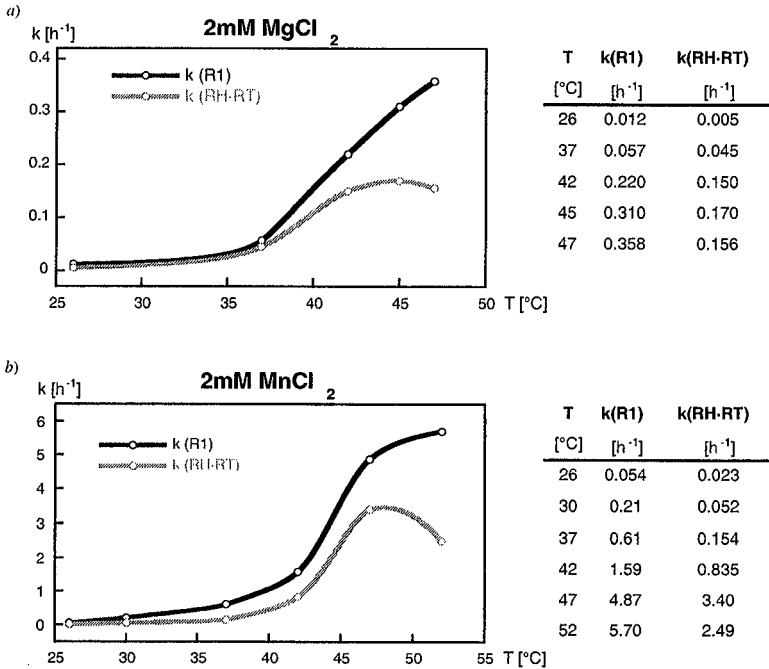
In einer weiteren Messreihe wurde die Temperaturabhängigkeit des Spaltungsreaktion untersucht. Alle Messungen wurden unter den Standardbedingungen durchgeführt: 20 μM Substrat und 1 μM Ribozym (**RH·RT** resp. **R1**) in 150mM NaCl, 2mM Mg^{2+} (resp. Mn^{2+}), 10mM Tris-HCl (pH 7.5), zwischen 26° und 52° für **R1** resp. 26° und 47° für **RH·RT**.

In der Anwesenheit von 2mM Mg^{2+} waren die Spaltungsgeschwindigkeiten bei Temperaturen unter 37° sehr klein. Zwischen 35° und 47° wurde beim natürlichen Ribozym für k ein linearer Anstieg beobachtet. Für das Analoge **RH·RT** wurde ebenfalls ein schneller Anstieg der Spaltungsrate beobachtet, jedoch erreichte in diesem Fall die Reaktionsgeschwindigkeit ein Maximum bei ca. 45°.

In Anwesenheit von 2mM Mn^{2+} wurde ein ähnlicher Trend beobachtet, jedoch wurden bereits bei tieferen Temperaturen zwar geringe aber doch signifikante Spaltungsraten festgestellt. Typischerweise war das Verhältnis $k_{\text{rel}} = k_{\text{R}}/k_{\text{RH·RT}}$ von **R1** zu **RH·RT** für $T < 47^\circ$ ungefähr konstant beim Wert von $k_{\text{rel}} \approx 1.5$. Wie in Anwesenheit von Mg^{2+} verlief die Spaltungsrate k des *p*DNA/RNA-Analogen bei ca. 47° durch ein Maximum.

Das beobachtete Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit für das Konstrukt **RH·RT** steht im Einklang mit dem Schmelzverhalten des *p*DNA-Duplexes, wie es aus der UV-Schmelzkurve zu entnehmen war. Bei Temperaturen über 45° fiel der Komplex **RH·RT** langsam auseinander; weshalb die Spaltgeschwindigkeit wieder abnahm. Diese Verminderung der effektiven Ribozymkonzentration führte dann zu einer Reduktion der Spaltgeschwindigkeit. Bei noch höheren Reaktionstemperaturen durchläuft auch die Geschwindigkeitskonstante für das natürliche Ribozym ein Maximum, wie im Kurvenverlauf von Mn^{2+} bereits zu sehen ist.

Figur 65.



- a) Temperaturabhängigkeit der Ribozymspaltung bei 20 μM Substrat und 1 μM Ribozym in 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.5). Rechts daneben sind die entsprechenden Werte tabelliert.
- b) Analog zu a) die Temperaturabhängigkeit bei 2mM MnCl₂. In beiden Fällen durchläuft das Konstrukt **RH-RT** ein Maximum bei 47° resp. 45°.

3.8 Funktionalisierte *p*DNA/RNA-Ribozymanaloge

3.8.1 Einleitung

In Kapitel 3.7.3 wurde gezeigt, dass das *p*DNA/RNA-Konstrukt **RH-RT** eine Substratspaltung analog zum Ribozym **R1** ausführen kann, und damit ein *p*DNA-Duplex erfolgreich als Ersatz für eine Hairpinstruktur dienen kann. Die 34-meren Ribozymsequenz **R1** konnte mit dieser Methode in zwei kürzere *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen **RH** und **RT** aufgeteilt werden, welche bezüglich Synthese und Handhabung wesentlich angenehmer waren, da sie gut mittels Anionentauscher HPLC gereinigt werden konnten.

Die Verwendung von RNA-Strukturen als Katalysatoren (Ribozyme) wird eingeschränkt durch die Tatsache, dass RNA nur wenige unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweist und damit eine geringe Diversität an chemischen Reaktionen katalysieren kann [50] [53]. Aus diesem Grund kann sich die RNA im Vergleich zu Proteinen nicht an einem derart breiten Spektrum unterschiedlicher Umwandlungen beteiligen und katalysiert nur eher "einfache" Reaktionen.

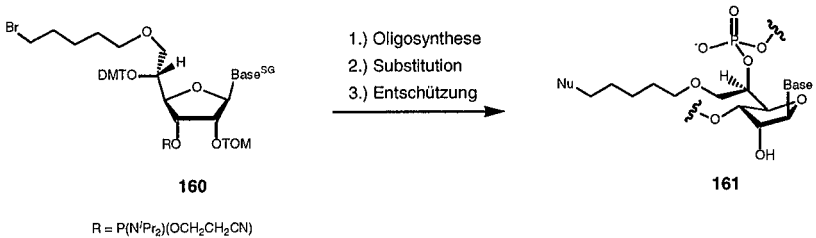
Im Weiteren wurde gefunden, dass die Wirkungsweise einiger Ribozyme durch die Bindung von Aminoglycosid-Antibiotika beeinflusst wird [150]. In den meisten Fällen wird eine Inhibierung der Ribozymaktivität beobachtet [151], so auch beim Hammerhead-Ribozym [152]. Dabei ist die Wirkungsweise vor allem auf elektrostatische Interaktionen zwischen dem positiv geladenen Aminoglycosid und dem RNA-Rückgrat des Ribozymes zurückzuführen. Die für die dreidimensionale Struktur der RNA wichtigen, zweiwertigen Metallionen werden oft durch die positiv geladenen Aminoglycoside ersetzt. Beispielsweise inhibiert Neomycin B die Spaltungsreaktion des Hammerhead-Ribozymes [153] [154]. Das Neomycin steht bei der Bindung mit dem Ribozym in Konkurrenz mit fünf Mg^{2+} -Ionen [155] [156].

Es sind aber auch Beispiele von Polyaminen oder Aminoglycosiden bekannt, die eine spezifische RNA-Spaltung katalysieren, beispielsweise beim Hairpin-Ribozym [154] aber auch beim Hammerhead-Ribozym [157].

Wir beabsichtigten die Reaktivität des Hammerhead-Ribozymes zu verändern, indem wir weitere funktionelle Gruppen im Ribozym einführten. Dabei wollten wir z. B. zusätzliche Metallbindungsstellen einführen, welche die Bindung von zweiwertigen Metallionen begünstigen, oder durch positiv geladene Ammoniumionen gewisse Metallionen ersetzen. Orientierende Arbeiten dazu wurden von *Wu* [62] mit dem natürlichen Ribozym gemacht. Durch die spezifische Einführung einer Methylaminogruppe am RNA-Substrat wurde je nach Reaktionsbedingungen die Spaltungsrate des Hammerhead-Ribozymes verdreifacht. Einen ähnlichen Ansatz haben *Beigelmann et al.* [71] gewählt (siehe Kapitel 1.6), der durch Einführung von modifizierten Nucleobasen in der katalytischen Kernregion neue Ribozyme erhalten hat, welche ganz andere Spaltungsgeschwindigkeiten aufwiesen.

3.8.2 Methode zur Einführung von funktionellen Gruppen an der 5'-O-Position

In unserer Arbeitsgruppe sind Methoden entwickelt worden, die die Einführung verschiedener Substituenten an der 5'-O-Position erlauben [86] [85] [62]. Prinzipiell wird bei dieser Methode ein 6'-O-Bromopentylallofuranosyl-Phosphoramidit **160** während der Festphasensynthese eingebaut. Das Brom kann vor der Entschützung des Oligonucleotides auf der Festphase durch zahlreiche Nucleophile weiter substituiert werden, wodurch eine vielfältige Palette von funktionellen Gruppen an spezifischen Positionen eingeführt werden kann.

Schema 52.

Druch den Einbau des Allofuranosylphosphoramidites **160** in ein Oligonucleotid kann auf der Festphase das Brom durch zahlreiche Nucleophile substituiert werden. Nach der Entschützung erhält man ein 5'-substituiertes Oligonucleotid **161** [62] [85] [86].

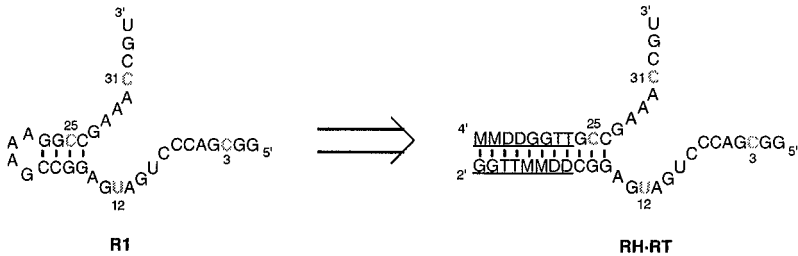
3.8.3 Konzept

Um möglichst rasch eine grosse Zahl funktionalisierter Ribozymanalogue zu untersuchen, wollten wir diese auf kombinatorische Art und Weise als Komplex aus zwei *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen aufbauen. Wie in Kapitel 2.1.2 dargestellt, lassen sich durch eine geringe Anzahl unterschiedlicher funktionalisierter *p*DNA/RNA-Einzelstränge schnell und einfach eine breite Palette von verschiedenen Derivaten synthetisieren und evaluieren.

Ausgehend von der Röntgenstruktur von *McKay et al.* [59] wurden verschiedene, potentiell günstige Nucleotide ausgewählt, bei welchen die 5'-Substituenten ins Zentrum zeigten. Dies ergab in der Ribozymsequenz **R1** ein Muster mit den vier Position C3, U12, C25 und C31 (Figur 66), bei denen durch den zusätzlichen Substituenten die Spaltgeschwindigkeit potentiell erhöht werden könnte.

Dieses Funktionalisierungsmuster wurde dann auf das *p*DNA/RNA-analogue Konstrukt übertragen, was zu den vier Hybridsequenzen **C3H**, **U12H**, **C25T** und **C31T** führte (Tabelle 14).

Figur 66.



Die Nukleoside C3, U12, C25 und C31 eignen sich gut für die Einführung von zusätzlichen funktionellen Gruppen. Dieses Muster wurde auf das *pDNA*-analoge Konstrukt **RH-RT** übertragen (die Nummerierung der RNA-Nukleoside wurde beibehalten).

3.8.4 Synthese, Funktionalisierung und Bezeichnung der Sequenzen

Im Rahmen des oben erwähnten Projektes wurden vorerst die Sequenzen **C3H**, **U12H**, **C25T** und **C31T**, bei denen jeweils ein funktionalisierbares Bromopentylallofuranosyl-Amidit **160** eingebaut wurde, über die automatisierte Festphasensynthese hergestellt (Tabelle 14). Die Synthese wurde nach den üblichen Bedingungen für *pDNA*/RNA-Hybride (siehe Kapitel 3.2.6 und 3.5) durchgeführt.

Aus den Sequenzen **C3H**, **U12H**, **C25T** und **C31T** wurden, durch Substitution des Broms mit MeNH₂ resp. EtSH, die in Tabelle 15 angegebenen, unterschiedlich funktionalisierten Sequenzen hergestellt.

Die Substitution mit Methylamin erfolgte direkt bei der Behandlung der Festphase mit 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O unter den Entschützungsbedingungen. Nach der Entschätzung mit 1M TBAF·3H₂O in THF/NMP wurden die Methylamino-funktionalisierten Sequenzen nach den üblichen Bedingungen über Anionentauscher-HPLC (*Dionex*) gereinigt.

Tabelle 14. funktionalisierte Ribozym-Hybridsequenzen

	<i>p</i> DNA/RNA-Sequenz ^{a)}	Masstab
		μmol
C3H	5'-GGCGACCCUGAUGAGGC [*] -2'→4'- <u>DDMMTTGG</u> -2'	1.5
U12H	5'-GGCGACCCUGAUGAGGC [*] -2'→4'- <u>DDMMTTGG</u> -2'	1.5
C25T	4'- <u>MMDDGGTT</u> -2'→5'-GCCGAACCGU-2'	1.5
C31T	4'- <u>MMDDGGTT</u> -2'→5'-GCCGAACCGU-2'	1.5
2NMeR	5'-GGCGACCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGGAAACCGU-3'	10

^{a)} *p*DNA-Nukleoside sind unterstrichen, RNA-Nukleoside in Standardschrift, * bedeutet 2',5'-verknüpftes Nucleosid, ausgezeichnete Nucleoside bedeutet der Einbau des funktionalisierbaren Amidites **160**.

Vor der Entschützung wurde jeweils ein Teil der vier Sequenzen **C3H**, **U12H**, **C25T** und **C31T** mit EtSH substituiert. Bei der Behandlung der Bromide mit EtSH, ⁱPr₂NEt in DMF nach den Bedingungen von *Pitsch & Wu* [85] [86] [62] wurde kein Substitutionsprodukt erhalten. Hingegen wurde bei der Verwendung von EtSH und ⁱPr₂NEt in EtOH das Bromid quantitativ zum entsprechenden Ethylthio-Derivat umgesetzt. Nach der Methylamin- und der TBAF-Entschützung wurden die EtSH-substituierten Oligonukleotide über *Sephadex* entsalzt. Die Sequenzen wurden über Anionentauscher HPLC (*Dionex*) gereinigt, wobei als Eluent NaCl eingesetzt werden musste, da bei der Verwendung des üblichen Salzes NaClO₄ das Sulfid oxidiert wurde.

Eine Bemerkung zur Bezeichnung der hier verwendeten *p*DNA/RNA-Oligonukleotide: die geschützten Oligonukleotide **C3H**, **U12H**, **C25T** und **C31T** wurden nach dem Nucleotid bezeichnet, welches die Bromoalkylgruppe trägt. Die Nummerierung richtet sich nach der Abfolge der Nucleotide vom 5'- zum 3'-Ende im natürlichen Ribozym. Zusätzlich wurde der Buchstabe H oder T angefügt, wobei H für "Head" und T für "Tail" steht. Die H-Sequenz ist die lange 25-mere *p*DNA/RNA-Hybridsequenz und die T-Sequenz die kürzere 19-mere. Die Methyamino-funktionalisierten Sequenzen wurden mit einem zusätzlichen N gekennzeichnet, die Ethylthio-funktionalisierten mit einem S, was zu den acht Verbindungen **N3H**, **N12H**, **N25T**, **N31T**, **S3H**, **S12H**, **S25T** und **S31T** aus Tabelle 15 führte.

Tabelle 15. funktionalisierte Oligonukleotide

	<i>p</i> DNA/RNA-Hybridsequenzen ^{a)}	MS ^{b)} [m/z]	
		berechnet ^{d)}	gefunden
N3H	5'-GGC ^N GACCCUGAUGAGGC* <u>DDMMTTGG</u> -2'	8139.3	8139.4
N12H	5'-GGCGACCCUGAU ^N GAGGC* <u>DDMMTTGG</u> -2'	8139.3	8141.4
N25T	4'- <u>MMDDGGTTGC</u> ^N CGAAACCGU-3'	6147.8	6144.6
N31T	4'- <u>MMDDGGTTGCCGAAAC</u> ^N CGU-3'	6147.8	6144.8
S3H	5'-GGC ^S GACCCUGAUGAGGC* <u>DDMMTTGG</u> -2'	8170.4	8170.1
S12H	5'-GGCGACCCUGAU ^S GAGGC* <u>DDMMTTGG</u> -2'	8170.4	8180.5
S25T	4'- <u>MMDDGGTTGC</u> ^S CGAAACCGU-3'	6178.2	6176.7
S31T	4'- <u>MMDDGGTTGCCGAAAC</u> ^S CGU-3'	6178.2	6176.5
2NMeR	5'-GGC ^N GACCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAAC ^N CGU-3'	11272.2	11271.7

^{a)} *p*DNA-Nukleoside sind unterstrichen, RNA-Nukleoside in Standardschrift; bei Nukleosiden mit einem * wurde ein 2',5'-verknüpfendes Phosphoramidit und an den ausgezeichneten Positionen ein funktionalisierbares Phosphoramidit **160** eingebaut.

Die Oligonukleotide wurden über SEP-PAK-Kartuschen entsalzt und als Stammlösungen aufbewahrt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte für alle Sequenzen in 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) bei 85°C.

3.8.5 Kombinatorisches Zusammenfügen der Ribozymkonstrukte

Aus den 8 verschiedenen Hybrid-Oligonukleotiden **N3H**, **N12H**, **N25T**, **N31T**, **S3H**, **S12H**, **S25T**, **S31T** (Tabelle 15) und den früher hergestellten Sequenzen **RH** und **RT** konnten nun durch Zusammenpipettieren einer H- mit einer T-Sequenz sehr schnell die 25 (= 5²) unterschiedlich funktionalisierten Ribozymkonstrukte erhalten werden (Tabelle 16). Da wir nach der Evaluierung der verschiedenen *p*DNA/RNA-Ribozymanalogen das Funktionalisierungsmuster wieder auf die natürliche RNA-Hammerheadsequenz **R1** übertragen wollten, wurden die 8 gemischt-funktionalisierten Analogen (Tabelle 16),

welche gleichzeitig eine Methylamino- und eine Ethylthiogruppe aufwiesen, nicht weiter betrachtet, denn die gleichzeitige Einführung unterschiedlicher funktioneller Gruppen in einer einzigen Sequenz war über diesen Syntheseweg nicht möglich.

Tabelle 16. Mögliche *p*DNA/RNA-Ribozym Konstrukte

		H-Sequenzen				
		RH	N3H	N12H	S3H	S12H
T-Sequenzen	RT	00-00	N3-00	N12-00	S3-00	S12-00
	N25T	00-N25	N3-N25	N12-N25	S3-N25	S12-N25
	N31T	00-N31	N3-N31	N12-N31	S3-N31	S12-N31
	S25T	00-S25	N3-S25	N12-S25	S3-S25	S12-S25
	S31T	00-S31	N3-S31	N12-S31	S3-S31	S12-S31

von den 25 angegebenen Duplexen wurden die 8 grau markierten Duplexe, welche zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweisen, nicht mehr weiter betrachtet.

Es soll nochmals der synthetische Aufwand für den potentiellen Aufbau dieser 25 verschiedenen Konstrukte betrachtet werden: am DNA-Synthesizer wurden 6 verschiedene *p*DNA/RNA-Sequenzen (RH, RT, C3H, U12H, C25T, C31T) synthetisiert. 4 davon wurden durch eine Festphasenreaktion in die entsprechenden Ethylthioderivate überführt. Auf diese Weise wurden nach der Entschützung 10 verschiedene, relativ kurze Oligonukleotide mittels HPLC gereinigt. Durch geeignetes Mischen liessen sich damit innert kürzester Zeit die 17 verschiedenen Ribozym-Konstrukte aufbauen; die 8 weiteren, gemischt-funktionalisierten Duplexe wurden aus dem oben genannten Grund nicht untersucht.

Bezeichnung der *p*DNA/RNA-Ribozym-Analogen

In Tabelle 16 ist dargestellt, aus welchen Oligonukleotiden die *p*DNA/RNA-Ribozym-Analogen jeweils zusammengesetzt wurden. Zum Beispiel wurde der Duplex N3-N25 aus den Hybriden N3H und N25T aufgebaut. Der erste Ausdruck entspricht der H-Sequenz und

der zweite der T-Sequenz. N bezeichnet eine Methylaminogruppe, S eine Ethylthiogruppe. Die dazugehörige Zahl steht für die Position, an welcher sich die zusätzliche funktionelle Gruppe befindet. Bei 00 handelt es sich um die unfunktionalisierte H- resp. T-Sequenz.

3.8.6 Spaltungsexperimente mit den funktionalisierten *p*DNA/RNA-Ribozym-Analogen

Nun wurden die, in Tabelle 16 erwähnten, 16 neuen Ribozym-Analogen, durch Mischen einer H- und einer T-Sequenz aufgebaut. Die 1 : 1 Verhältnisse der beiden Komponenten wurden mittels HPLC überprüft.

Für die Spaltungsexperimente wurde HEPES-Puffer (pH 7.5) verwendet, der, im Gegensatz zum Tris-Puffer, die M^{2+} -Ionen nicht komplexiert. Gemessen wurde unter Standardbedingungen bei: $1\mu\text{M}$ Ribozym, $20\mu\text{M}$ Substrat in 2mM M^{2+} (Mg^{2+} und Mn^{2+}) 150mM NaCl und 10mM HEPES (pH 7.5) bei 37° .

Je $100\mu\text{l}$ Substrat- und Ribozym-Lösungen wurden separat vorbereitet. Diese wurden 1 min auf 90° erwärmt, abgekühlt und je mit $25\mu\text{l}$ M^{2+} -Lösung versetzt. Die Proben wurden 10 min bei 37° aufbewahrt und dann zusammengegeben; das Gesamtvolumen betrug somit $250\mu\text{l}$. Alle 20 min wurde eine Probe von $50\mu\text{l}$ entnommen und die Reaktion durch Zugabe von $20\mu\text{l}$ 0.2M NaH_2PO_4 unterbrochen. Die Proben wurden mittels *Dionex*-HPLC analysiert, wobei die Detektion bei 260nm erfolgte. Die Peakflächen wurden integriert und daraus der Umsatz berechnet. So wurde für jede Messreihe der zeitliche Verlauf der Reaktion erhalten, woraus die kinetischen Parameter berechnet wurden.

3.8.7 Modell zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten *pseudo*-erster Ordnung

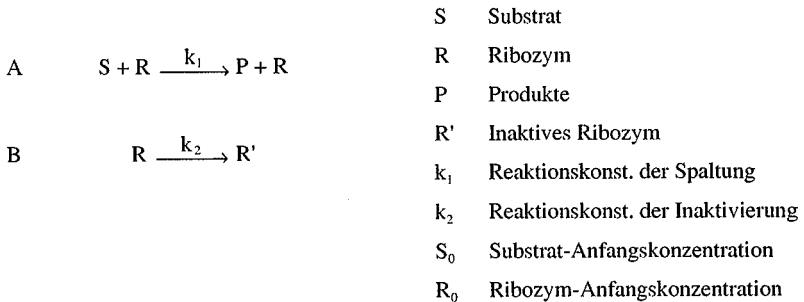
In Kapitel 3.7.3 wurde beschrieben, dass während der Spaltungsreaktion eine teilweise Inaktivierung des Katalysators eintrat, was zu einer komplexeren Kinetik als eine Reaktion *pseudo*-erster Ordnung führte. Deshalb wurden in unseren Kinetikexperimenten die erhaltenen Messpunkte im Reaktionsdiagramm $\ln(S/S^\circ)$ vs. t nicht durch eine

Regressionsgerade sondern, wie beschrieben in [149] durch ein Polynom zweiten Grades (Gleichung XVI) approximiert (Kapitel 3.7.3).

In weiteren Experimenten zeigten die angeglichenen Polynome keinen wirklich befriedigenden Verlauf der Reaktion. Was sich insbesondere darin äusserte, dass die erhaltenen Werte stark variierten, wenn die Reaktion in einem anderen Zeitfenster gemessen wurde (z. B. in 40 min Intervallen statt in 20 min).

Wir haben deshalb ein neues Modell für die Spaltungsreaktion aufgestellt, bei dem die zusätzliche Reaktion, d. h. die Inaktivierung des Ribozymes als irreversible Reaktion einbezogen wurde.

Betrachte dazu die Reaktionen A und B:



Aus den Reaktionen A und B können die Bewegungsgleichungen abgeleitet werden

$$\frac{dS}{dt} = -k_1[S][R] \quad \text{XVII}$$

$$\frac{dR}{dt} = -k_2[R] \quad \text{XVIII}$$

Die Integration von XVIII im Intervall R bis R_0 ergibt

$$[R] = [R_0] \exp \{-k_2 t\} \quad \text{XIX}$$

XIX wird eingesetzt in XVII und integriert von S bis S_0

$$\ln \frac{[S]}{[S_0]} = \frac{k_1}{k_2} [R_0] (\exp\{-k_2 t\} - 1) \quad \text{XX}$$

Mit den beiden Definitionen

$$m_1 = k_1 [R_0] = k_{\text{obs}} \quad \text{XXI}$$

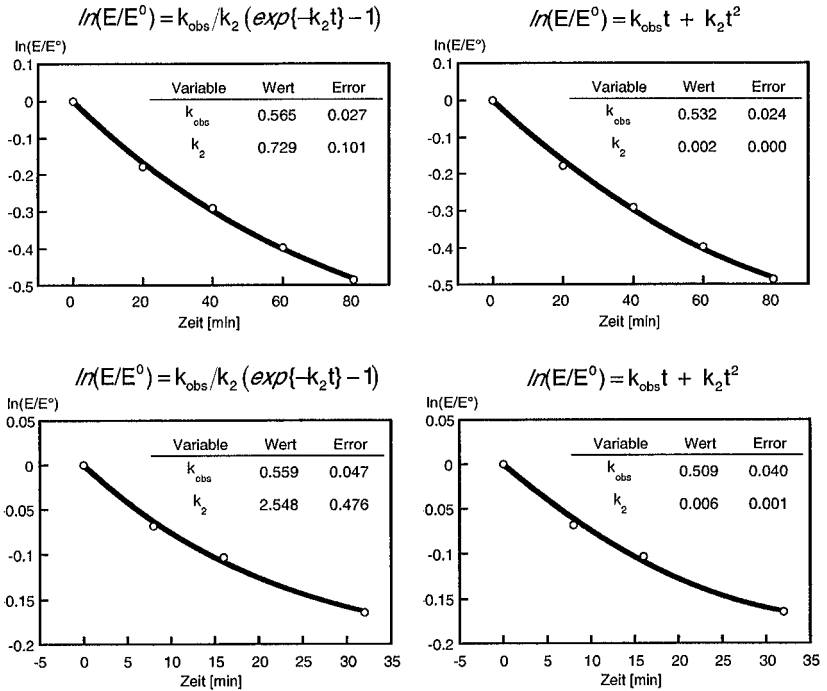
$$m_2 = k_2 \quad \text{XXII}$$

eingesetzt in XX gilt

$$\ln \frac{[S]}{[S_0]} = \frac{m_1}{m_2} (\exp\{-m_2 t\} - 1) \quad \text{XXIII}$$

Gleichung XX ist die integrierte Form der beiden Bewegungsgleichungen XVII und XVIII. In den Reaktionsverlaufdiagrammen (Kapitel 3.7.3 Figur 63), in welchen $\ln(S/S^\circ)$ vs. t aufgetragen ist, kann die Gleichung XXIII mit den Parametern m_1 und m_2 angepasst werden. Der Parameter m_1 entspricht dabei direkt der gesuchten Geschwindigkeitskonstanten *pseudo*-erster Ordnung k_{obs} ; m_2 ist ein Mass für die Inaktivierung des Katalysators.

Figur 67.



Die Auswertung der Reaktionsdiagramme sowohl nach der quadratischen Gleichung (XVI) als auch nach dem beschriebenen Modell mit Gleichung (XX). Die Reaktion wurde zweimal unter folgenden Bedingungen durchgeführt: $1\mu\text{M}$ Ribozym und $20\mu\text{M}$ Substrat in 150mM NaCl, 2mM MnCl_2 und 10mM Tris-HCl (pH 7.4) bei 37°C ; dabei wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen Proben entnommen. Die Werte für k_{obs} waren beim neuen Modell stabiler als nach Anpassung der quadratischen Gleichung.

Mit diesem kinetischen Modell wurden in allen Fällen eine deutlich bessere Anpassung an die Datenpunkte erhalten, als bei der artifiziellen Approximation eines Polynoms zweiten Grades. Ebenso ist das Modell stabiler gegenüber dem betrachteten Zeitfenster und die

Reaktionskonstante k_2 liefert zusätzlich eine Information über die Inaktivierung des betrachteten Ribozymes.

3.8.8 Auswertung der Kinetik-Experimente

Jedes Spaltungsexperiment wurde zweimal durchgeführt und beide wurden unabhängig voneinander ausgewertet. Aus den beiden Geschwindigkeitskonstanten wurde der Mittelwert von k_{obs} bestimmt, welcher im Folgenden tabelliert ist. Die Geschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Ribozyme wurden verglichen mit dem unfunktionalisierten Ribozym **00-00**.

Für die beiden Messreihen mit 2mM Mg^{2+} und Mn^{2+} konnte der gleiche Trend über die 17 verschiedenen Ribozymanalogen festgestellt werden (Figur 68). Prinzipiell liessen sie sich in drei Kategorien einordnen (Tabelle 17):

1. Die "Neutralen", bei welchen kein nennenswerter Unterschied gegenüber dem unfunktionalisierten Konstrukt **00-00** beobachtet werden konnte.
2. Die "Schnellen", welche eine deutlich höhere Spaltungsrate aufwiesen als die Referenz **00-00**.
3. Die "Langsamen", also jene, welche eine deutlich langsamere Spaltungsrate gegenüber der Referenz aufwiesen.

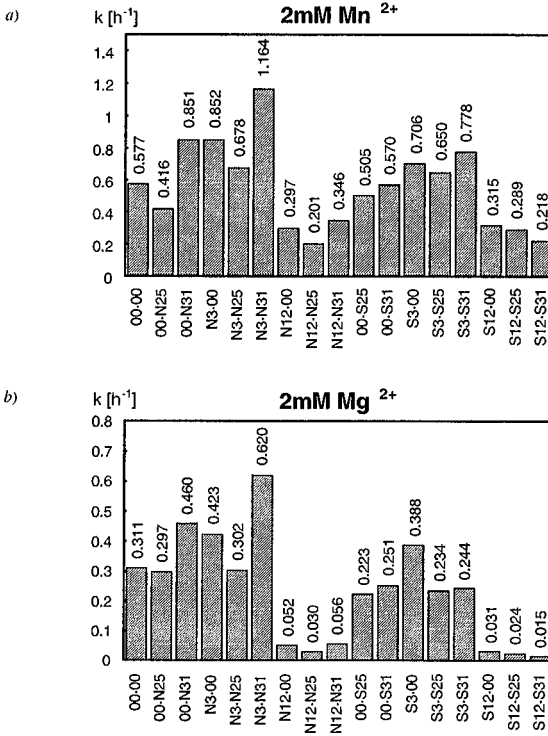
Tabelle 17. Einordnung der Ribozym-Analogen

	Effekt	Mn²⁺	Mg²⁺
Methylamino funkt.	neutral	00-N25, N3-N25	00-N25, N3-N25
	schneller	00-N31, N3-00, N3-N31	00-N31, N3-00, N3-N31
	langsamer	N12-00, N12-N25, N12-31	N12-00, N12-N25, N12-N31
Ethylthio funkt.	neutral	00-S25, 00-S31, S3-S25	00-S25, 00-S31, S3-S25, S3-S31
	schneller	S3-00, S3-S31	S3-00
	langsamer	S12-00, S12-S25, S12-S31	S12-00, S12-S25, S12-S31

Einteilung der 16 verschiedenen Konstrukte in drei Kategorien. Bis auf wenige Ausnahmen stimmt die Einteilung der Ethylthioreihe mit jener der Methylaminreihe überein.

Qualitativ verhielten sich die Ethylthio- und die Methylamino-funktionalisierten Ribozyme in der Anwesenheit sowohl von Mg²⁺ als auch von Mn²⁺ analog (Figur 68); absolut gesehen war jedoch der Effekt bei den Methylamino-funktionalisierten grösser als bei den Ethylthio-funktionalisierten; die exakten Werte für k_{obs} und k_2 sind in Tabelle 18 aufgeführt. Der Einfluss der zusätzlichen Substituenten war additiv. Zum Beispiel wurde bei beiden Konstrukten **00-N31** ($k_{\text{obs}} = 0.851$, $\Delta k_{\text{obs}} = 0.28$) und **N3-00** ($k_{\text{obs}} = 0.852$, $\Delta k_{\text{obs}} = 0.28$) jeweils eine Erhöhung der Spaltungsrate gemessen; durch Kombination der beiden Substituenten im Konstrukt **N3-N31** ($k_{\text{obs}} = 1.164$, $\Delta k_{\text{obs}} = 0.59$) wurde dieser gegenüber den einfach Substituierten weiter erhöht.

Figur 68.



Dargestellt sind die Geschwindigkeitskonstanten k *pseudo*-erster Ordnung verschiedener *pDNA*/*RNA*-Konstrukte; a) bei 2mM Mn²⁺; b) bei 2mM Mg²⁺. Die Reaktionen wurden durchgeführt bei 1 μ M Ribozym und 20 μ M Substrat in 150mM NaCl und 10mM HEPES (pH 7.5) bei 37°C. Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt, gegeben sind die Mittelwerte.

Tabelle 18. Geschwindigkeitskonstanten der *p*DNA/RNA-Konstrukte

Konstrukt	$k_{\text{obs}} (\text{Mn}^{2+})$	$k_{\text{obs}} (\text{Mg}^{2+})$	$k_2 (\text{Mn}^{2+})$	$k_2 (\text{Mg}^{2+})$	$k_{\text{rel}} (\text{Mn}^{2+})$	$k_{\text{rel}} (\text{Mg}^{2+})$
	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]		
00-00	0.577	0.311	0.729	1.021	1.00	1.00
00-N25	0.416	0.297	1.103	1.220	0.72	0.95
00-N31	0.851	0.460	0.947	0.800	1.48	1.48
N3-00	0.852	0.423	0.901	1.032	1.48	1.36
N3-N25	0.678	0.302	1.212	0.940	1.18	0.97
N3-N31	1.164	0.620	0.963	0.823	2.02	1.99
N12-00	0.297	0.052	0.947	0.143	0.51	0.17
N12-N25	0.201	0.030	0.877	0.093	0.35	0.10
N12-N31	0.346	0.056	0.846	0.171	0.60	0.18
00-S25	0.505	0.223	1.014	1.018	0.88	0.72
00-S31	0.570	0.251	1.029	1.030	0.99	0.81
S3-00	0.706	0.388	0.662	1.083	1.22	1.25
S3-S25	0.650	0.234	0.868	0.873	1.13	0.75
S3-S31	0.778	0.244	0.870	0.507	1.35	0.79
S12-00	0.315	0.031	0.958	-0.069	0.55	0.10
S12-S25	0.289	0.024	1.203	0.050	0.50	0.08
S12-S31	0.218	0.015	0.840	-0.173	0.38	0.05

Geschwindigkeitskonstanten *pseudo*-erster Ordnung der Spaltungsreaktion, gemessen unter den folgenden Bedingungen: 2mM Mg^{2+} , 1 μM Ribozym, 20 μM Substrat, 150mM NaCl, 10mM HEPES (pH 7.5) bei 37°C. Die Werte für k_{rel} beziehen sich auf das unfunktionalisierte Konstrukt **00-00**.

3.8.9 Anwendung des Substitutionsmusters auf das Hammerhead-Ribozym

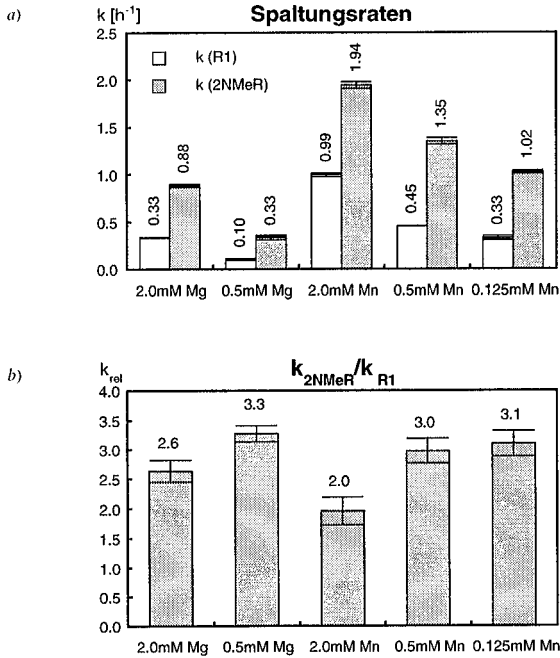
Aus Figur 68 ist ersichtlich, dass in Gegenwart beider Metallionen Mg^{2+}/Mn^{2+} das Analoge **N3•N31** die höchste Spaltungsrate, mit einem k_{rel} bezogen auf **00•00** von ca. 2.0, besitzt. Deshalb wurden diese zusätzlichen funktionellen Gruppen in das RNA-Hammerhead-Ribozym eingeführt.

Das entsprechende 34-mer Oligonukleotid **2NMeR** wurde an den Positionen C3 und C31 mit einer zusätzlichen Methylaminogruppe funktionalisiert (Kapitel 3.8.4, Tabelle 15). Die Synthese und die Reinigung wurden durchgeführt wie beschrieben für die *p*DNA/RNA-Konstrukte (Kapitel 3.2.6 und 3.5).

Die Spaltungsexperimente des **2NMeR** wurden unter den Standardbedingungen $1\mu M$ Ribozym, $20\mu M$ Substrat in $150mM$ NaCl und $10mM$ HEPES (pH 7.5) bei 37° gemessen, mit Variation der Metallionenkonzentration von 2.0 und $0.5mM$ für Mg^{2+} und 2.0, 0.5 und $0.125mM$ für Mn^{2+} . Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt und daraus die Mittelwerte für die Spaltungsraten k_{obs} berechnet. Die Werte wurden verglichen mit jenen des natürlichen Hammerhead-Ribozymes **R1** (Figur 69).

Dabei ist zu Erkennen, dass die Spaltungsgeschwindigkeit des zweifach funktionalisierten Ribozymes **2NMeR** unter allen gemessenen Bedingungen deutlich schneller war als diejenige des natürlichen Ribozymes **R1**. Die Werte $k_{rel} = k_{2NMeR}/k_{R1}$ variierten zwischen 2.0 und 3.3. Typischerweise waren bei geringeren Metallionenkonzentrationen sowohl für Mg^{2+} als auch für Mn^{2+} ein grösseres k_{rel} zu beobachten; die exakten Werte von k_{obs} und k_2 sind in den Tabellen 19 und 20 aufgeführt.

Figur 69.



- a) Geschwindigkeitskonstanten *pseudo*-erster Ordnung bei verschiedenen M²⁺-Bedingungen. Die Reaktionen wurden durchgeführt bei [1 μ M Ribozym und 20 μ M Substrat in 150mM NaCl, 10mM HEPES (pH 7.5) bei 37°C.
- b) Relative Spaltungsraten $k_{rel} = k(2NMeR)/k(R1)$.

Tabelle 19. Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} *pseudo*-erster Ordnung der Ribozymspaltung

M^{2+}	Konz.	$k_{\text{obs}}(\text{HH})^{a)}$	$k_{\text{obs}}(2\text{NMeR})^{a)}$	k_{rel}
	[mM]	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]	
Mg^{2+}	2.0	0.344 ± 0.017	0.881 ± 0.044	2.64 ± 0.19
	0.5	0.102 ± 0.005	0.334 ± 0.017	3.28 ± 0.23
Mn^{2+}	2.0	0.993 ± 0.050	1.943 ± 0.097	1.96 ± 0.14
	0.5	0.454 ± 0.023	1.351 ± 0.068	2.97 ± 0.21
	0.125	0.329 ± 0.016	1.020 ± 0.051	3.10 ± 0.22

^{a)} Geschwindigkeitskonstante k_{obs} *pseudo*-erster Ordnung, der Ribozymspaltung, gemessen unter der angegebenen M^{2+} -Bedingung, 1 μ M Ribozym, 20 μ M Substrat, 150mM NaCl, 10mM HEPES (pH 7.5) bei 37°C.

Tabelle 20. Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Ribozymdeaktivierung

M^{2+}	Konz.	$k_2(\text{HH})^{a)}$	$k_2(2\text{NMeR})^{a)}$
	[mM]	[h ⁻¹]	[h ⁻¹]
Mg^{2+}	2.0	0.907 ± 0.073	0.753 ± 0.060
	0.5	0.305 ± 0.024	0.606 ± 0.048
Mn^{2+}	2.0	0.620 ± 0.050	0.382 ± 0.031
	0.5	1.086 ± 0.087	0.933 ± 0.075
	0.125	0.810 ± 0.065	0.937 ± 0.075

^{a)} Geschwindigkeitskonstante k_2 der Ribozymdeaktivierung, gemessen unter der angegebenen M^{2+} -Bedingung, 1 μ M Ribozym, 20 μ M Substrat, 150mM NaCl, 10mM HEPES (pH 7.5) bei 37°C.

In diesen Spaltungsexperimenten war das Verhalten zwischen dem funktionalisierten *p*DNA/RNA-Ribozymanalogen **N3•N31** und dem funktionalisierten RNA-Ribozym **2NMeR** identisch.

Die beiden zusätzlichen Methylaminogruppen an den Positionen C3 und C31 beim Ribozymanalogen **2NMeR** beschleunigen die Spaltungsreaktion. Jedoch ist die Wirkungsweise der beiden Methylaminogruppen unklar. In Analogie zu den Interaktionen

zwischen Aminoglycosid-Antibiotika [156] oder Spermin [157] mit dem Hammerhead-Ribozym ist davon auszugehen, dass die beiden zusätzlichen Methylaminogruppen protoniert vorliegen und als positiv geladene Gruppe die Mg^{2+} - resp. Mn^{2+} -Gegenionen verdrängen. Dabei kann die Methylaminogruppe einen Einfluss auf den Reaktionsmechanismus haben, indem sie eventuell direkt an der Spaltungsreaktion beteiligt ist. Andererseits ist denkbar, dass die Verdrängung der M^{2+} -Ionen eine Konformationsänderung im Ribozym und damit eine andere Dynamik hervorruft, welche sich positiv auf die Spaltungsgeschwindigkeit auswirken kann.

Um der Wirkungsweise der Methylaminogruppe auf den Grund zu gehen, sind weitere Spaltungsexperimente notwendig, bei denen beispielsweise die pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion untersucht würde. Ebenso sollte die Ribozymspaltungsreaktion bei noch geringeren Metallkonzentrationen durchgeführt werden, resp. als Kontrollexperiment auch ohne die Anwesenheit von M^{2+} -Ionen.

4 Ausblick

Um weitere Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus der Ribozymsspaltung sowie über die Wirkungsweise der beiden Methylaminogruppen zu erhalten, sollte das zweifach substituierte Analoge **2NMeR** kristallisiert und seine Röntgenstruktur bestimmt werden.

Neben den substituierten *p*DNA/RNA-Ribozymanalogen sollte das Projekt nun auch auf ganz andere Reaktionen ausgeweitet werden, bei denen die RNA selber nur noch die Funktion einer Substratbindung übernimmt, hingegen die gewünschte chemische Reaktion vollständig durch die zusätzliche funktionelle Gruppe katalysiert wird.

Es sind auch Systeme denkbar, bei denen der funktionalisierte *p*DNA/RNA-Duplex allein noch keine Reaktion katalysieren kann, sondern erst durch die Bindung eines weiteren Kofaktors. Beispielsweise könnte ein Katalysator zur enantioselektiven Hydrierung von Carbonylgruppen entwickelt werden, bei dem durch Einführung von Chelatliganden im *p*DNA/RNA-Duplex eine Bindungsstelle für geeignete Uebergangsmetalle erzeugt wird. Der effektive Katalysator wird erst durch die Bindung eines geeigneten Uebergangsmetallions im *p*DNA/RNA-Duplex gebildet. In einem solchen Fall würde das Uebergangsmetallion dem Kofaktor entsprechen; der *p*DNA/RNA-Duplex wäre prinzipiell ein grosser, chiraler Ligand.

Eine weitere, interessante Möglichkeit zur Herstellung von potentiell katalytisch aktiven *p*DNA/RNA-Duplexen besteht darin, geeignete, funktionalisierte, nicht-nukleosidische Phosphoramiditbausteine in die Sequenz einzubauen. Dazu kann von einem beliebigen Diol ausgegangen werden, welches an der einen OH-Gruppe trityliert und an der anderen phosphityliert ist. Auf diese Weise könnten auch ganz spezifische funktionelle Gruppen in *p*DNA/RNA-Duplexe eingebaut werden, welche dann bezüglich ihrer katalytischen Aktivität getestet werden könnten.

Durch das Ersetzen von *stem-loop*-Strukturelementen durch *p*DNA-Duplexe kann sehr rasch eine Vielzahl verschiedener, funktionalisierter Oligonukleotidstrukturen, mit einer

relativ hohen Molekülmasse aus *p*DNA/RNA-Hybridsequenzen aufgebaut werden. Dieses Vorgehen zum Auffinden neuer katalytisch aktiver Strukturen ist deshalb für die kombinatorische Chemie besonders interessant und führt dort bestimmt rasch zu erfolgsversprechenden Resultaten.

5 Experimenteller Teil

5.1.1 Allgemein

Alle verwendeten Verbindungen und Lösungsmittel wurden bei *Fluka*, *Acros* oder *Aldrich* bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. DMTCl, $\text{CIP}(\text{N}^i\text{Pr}_2)(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})$, 1*H*-Benzylthiotetrazol, TOM-geschützte Nukleoside und Amidite wurden bei *Xeragon AG* bezogen. Wasser für Oligonukleotide stammte von *B. Braun Medical AG*.

Aufarbeiten chemischer Reaktionen

Methode A: das Reaktionsgemisch wurde aufgetrennt zwischen CH_2Cl_2 und einer ges. aq. NaHCO_3 -Lösung. Danach wurde die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel eingedampft.

Methode B: das Reaktionsgemisch wurde aufgetrennt zwischen AcOEt und einer ges. aq. NaHCO_3 -Lösung. Danach wurde die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel eingedampft.

Methode C: das Reaktionsgemisch wurde aufgetrennt zwischen CH_2Cl_2 und einer ges. aq. NaHCO_3 -Lösung. Nach der Extraktion wurde die organische Phase mit einer wässrigen Lsg. aus 10% Citronensäure gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel eingedampft.

Säulenchromatographie (CC)

Silikagel 60 von *Fluka* (Korngrösse 0.040 - 0.063 mm), Al_2O_3 , Akt. III von *ICN Adsorbentien*.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Kieselgel beschichtete Glasplatten von *Merck* 60F-254. Zur Färbung wurden die Platten mit einer Lösung aus Anisaldehyd (10 ml), *conc.* H₂SO₄ (10 ml) und AcOH (2 ml) in EtOH (180 ml) behandelt und anschliessend kurz mit einem Föhn aufgeheizt.

Optischer Drehwert

$[\alpha]_D^{25}$ gemessen bei 25°, 598 nm, 10 cm Zelle.

NMR-Spektroskopie

Varian-Gemini 300 (1H: 300 MHz, 13C: 75 MHz, 31P: 125 MHz). Die chemische Verschiebung δ in ppm bezieht sich auf (Me₄Si) für ¹H- und ¹³C-Spektren, bei ³¹P-Spektren ist die chemische Verschiebung gegen 85% H₃PO₄ als externer Standard angegeben. Kopplungskonstanten *J* in Hz.

Massenspektroskopie

FAB-MS *VG-ZAB2-SEQ*, positiv Modus; 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix

HR-MALDI-MS *IonSpec ULTIMA FTMS*, positiv Modus; 2,5 Dihydroxybenzoesäure als Matrix

MALDI-TOF-MS *Bruker REFLEX*, positiv oder negativ Modus; 2,4,6 - Trihydroxyacetophenon und Diammoniumhydrogencitrat als Matrix.
 Probenvorbereitung: 0.2 O.D. in 20 μ l H₂O lösen, davon 2 μ l.

Alle Signale sind in der Einheit *m/z* (als relative Intensitäten in %) angegeben.

5.1.2 Herstellung der Träger

3'-O-Methyl-pRNA

Zu einer Lösung aus den Nukleosiden **36** - **39** (0.05 mmol) in 250 μ l CH₂Cl₂ wurden 0.05 mmol Bernsteinsäureanhydrid und 0.075 mmol DMAP zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit CH₂Cl₂ gegen eine wässrige Lösung aus 10%

Zitronensäure extrahiert. Anschliessend wurde die org. Phase mit einer ges. aq. NaCl gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel vollständig eingedampft.

Zu einer Lösung aus den Bernsteinsäureestern **44** - **47** (15 μmol) in CH_3CN (2.0 ml) wurden LCAA-CPG (*Sigma*, 500Å, 300 mg), BOP (30 μmol) und *N*-Methylimidazol (60 μmol) zugegeben und über Nacht geschüttelt. Der Träger wurde filtriert, mit CH_2Cl_2 gewaschen in einer Lösung aus Pyridin/ Ac_2O 3:1 (2.5 ml) und DMAP (30 mg) suspendiert, 2 h bei RT geschüttelt, filtriert und gewaschen.

pDNA

In einer Lösung aus den Aktivestern **133** - **136** (0.06 mmol) und Pr_2NEt in DMF wurde LCAA-CPG (*Sigma*, 500Å, 500 mg) suspendiert und über Nacht bei RT geschüttelt. Der Träger wurde filtriert, mit DMF und CH_2Cl_2 gewaschen und in einer Lösung aus Pyridin/ Ac_2O 2:1 (2 ml) für **133**, **134**, **135** resp. Pyridin/ Mac_2O 2:1 (2 ml) für **136** suspendiert. Nach 2 h schütteln bei RT wurde der Träger filtriert, mit DMF und CH_2Cl_2 gewaschen und am HV getrocknet.

Bestimmung der Beladung

Eine Probe von ca. 3.0 mg Träger wurde mit einer Lösung aus 4% Dichloressigsäure in $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ (10 ml) behandelt und die Absorption bei 498 nm gemessen. Zur Berechnung der Beladungsdichte wurde der Extinktionskoeffizient $\epsilon = 70'000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für die DMT-Kationen verwendet.

Beladungsdichten der verschiedenen Träger

3'- <i>O</i> -Methyl-pRNA	Base	Beladung	pDNA	Base	Beladung
		[$\mu\text{mol/g}$]			[$\mu\text{mol/g}$]
48	A ^{Bz}	35	135	T	28
49	C ^{Ac}	34	136	M ^{Ac}	31
50	G ^{Ac/DPC}	39	137	G ^{Ac}	25
51	T	47	138	D ^{Ibu/Mac}	33

5.1.3 Oligonukleotid-Synthese

DNA-Synthesizer: *Pharmacia Gene Assembler Plus*.

CH₃CN wurde über CaH₂ destilliert und während 16 h über 4 Å Molsieb gelagert.

Reagenzien

Detritylierung	4% Dichloressigsäure in (CH ₂ Cl) ₂
Aktivatorlösung	0.25M 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol in CH ₃ CN
Amiditlösung	129, 130, 131 in CH ₃ CN; 132 in THF/(CH ₂ Cl) ₂ 1:1; TOM-Amidite in CH ₃ CN
Capping A	Mac ₂ O/2,6-Lutidin/THF 1:1:8
Capping B	16% <i>N</i> -Methylimidazol/THF (v/v)
Oxidation	I ₂ /H ₂ O/Pyridin/THF 3:2:20:75

Synthesebedingungen

	pDNA	pDNA	RNA
Synthese-Massstab	1.5 µmol	10 µmol	1.5 µmol
Detritylierung	2 min	4 min	1.5 min
Amiditlösung	0.07M, 180 µl	0.12M, 360 µl	0.07M, 180 µl
Aktivatorlösung	300 µl	600 µl	300 µl
Kopplungszeit	5 min	9 min	3 min
Capping (A/B = 1:1)	2.8 + 1.2 min	3.5 + 1.5 min	0.8 + 0.4 min
Oxidation	1.0 min	1.5 min	1.0 min

Synthesemethode der 1.5 μ mol pDNA-Synthese

Zeile	Zeit	Funktion	Wert	Zeile	Zeit	Funktion	Wert
1	0.00	CALL METHOD	DETRIT	27	10.35	ML/MIN	0.00
2	1.50	VALVE POS	2.1	28	10.40	VALVE POS	2.5
3	2.50	VALVE POS	2.3	29	10.45	ML/MIN	1.00
4	2.70	INTEGRATE	0	30	10.45	LOOP TIMES	7
5	4.00	ML/MIN	0.00	31	10.45	VALVE POS	2.5
6	4.00	LOOP TIMES	2	32	10.65	VALVE POS	2.6
7	4.00	VALVE POS	1.8	33	10.85	END OF LOOP	
8	4.05	ML/MIN	0.75	34	10.85	ML/MIN	0.00
9	4.15	ML/MIN	0.00	35	10.90	VALVE POS	2.3
10	4.15	VALVE POS	1.2	36	10.90	ML/MIN	2.00
11	4.20	ML/MIN	0.90	37	11.20	VALVE POS	2.4
12	4.30	ML/MIN	0.00	38	12.20	VALVE POS	2.3
13	4.30	VALVE POS	1.8	39	13.70	ML/MIN	0.00
14	4.35	ML/MIN	0.75	40	13.75	VALVE POS	2.5
15	4.45	ML/MIN	0.00	41	13.80	ML/MIN	1.00
16	4.45	END OF LOOP		42	13.80	LOOP TIMES	3
17	4.45	VALVE POS	1.1	43	13.80	VALVE POS	2.5
18	4.50	ML/MIN	1.00	44	14.00	VALVE POS	2.6
19	4.60	ML/MIN	0.00	45	14.20	END OF LOOP	
20	4.60	LOOP TIMES	7	46	14.20	ML/MIN	0.00
21	4.60	STEP VALVE	3	47	14.25	VALVE POS	2.3
22	4.60	END OF LOOP		48	14.30	ML/MIN	2.50
23	4.65	ML/MIN	2.50	49	14.80	ML/MIN	0.00
24	10.00	ML/MIN	0.00	50	14.80	LOOP TIMES	7
25	10.00	STEP VALVE	3	51	14.80	STEP VALVE	3
26	10.05	ML/MIN	2.50	52	14.80	END OF LOOP	

5.1.4 Entschützung der Oligonukleotide

Das nach der Oligosynthese erhaltene Trägermaterial wurde in 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O 1:1 (1 ml) suspendiert und bei RT 3 h geschüttelt. Die Lösungen wurden zentrifugiert der Ueberstand vorsichtig abpipettiert und die Festphase zweimal mit EtOH/H₂O 1:1 gewaschen. Die Lösungen wurden vereinigt und am *Speedvac* vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in TBAF·3H₂O in THF/NMP 1:1 (1.5 ml) gelöst und nach 14 h bei RT mit 1M Tris-HCl (1.5 ml, pH 7.4) gestoppt. Anschliessend wurde das THF am *Speedvac* eingedampft und der Rückstand mit Wasser auf 2 ml verdünnt. Die Lösung wurde in zwei Injektionen über eine *Sephadex G-10*-Säule (1.5 × 25 cm) entsalzt. Eluiert wurde mit Wasser (1 ml/min) und detektiert bei 260 nm. Die wässrigen Lösungen wurden auf 2 - 3 ml eingeeengt.

5.1.5 Reinigung der Oligonukleotide über HPLC

- Gerät 1: Entgaser: *Knauer* Degasser; Pumpe: *Merck-Hitachi* L-6200A Intelligent Pump; UV-Detektor: *Merck-Hitachi* L-4000A; Integrator *Merck-Hitachi* D-2500.
- Gerät 2: Entgaser: *Merck-Hitachi* Solvent Degasser L-7612; Pumpe: *Merck-Hitachi* Pumpe L-7100; Ofen: *Merck-Hitachi* Column Ofen L-7359; UV-Detektor: *Pharmacia Biosystems* 783.
- Gerät 3: Pumpe: *Dionex* Gynkotek Pumpe P 580 A LPG; Ofen: *Dionex* Säulenthermostat STH 585 10 CM; UV-Vis Detektor: *Dionex* Gynkotek UV-Vis Detector UVD 170; Software: *Dionex* Chromeleon CM PCS-2.

Reversed Phase HPLC: Die kurzen 3'-O-Methyl-pRNA-Sequenzen **A**, **B** und **C** wurden über RP-HPLC gereinigt. RP-Säule: *Marchery-Nagel* Nucleosil 5C18 (10×220). Puffer A: 0.1 M Et₃NHOAc in H₂O; Puffer B: CH₃CN. Fluss 1 ml/min, Gradient ca. A/B 90:10 → A/B 70:30 in 30 min. Die Säule wurde zusammen mit HPLC-Gerät 1 verwendet.

SAX-Anionentauscher HCPLC: Die meisten Sequenzen wurden mittels SAX-Anionentauscher-HPLC gereinigt. Säule: *Marchery-Nagel* Nucleogel-SAX 1000-8/46.

Puffer A: 20mM Na₂HPO₄, pH 11.5; Puffer B: 2M NaCl, 20mM Na₂HPO₄, pH 11.5. Fluss 1 ml/min, Gradient ca. A/B 80:20 → A/B 40:60 in 30 min. Beim Sammeln wurde die wässrige Lösung mit 1M AcOH (30 µl pro 1.5 ml Eluent) neutralisiert. Die SAX-Säule wurde zusammen mit Gerät 1 verwendet.

Dionex Anionentauscher HPLC

Preparativ: Einige lange Sequenzen wurden über *Dionex*-HPLC bei 85° C gereinigt. Säule DNAPac PA. Fluss: 1.5 ml/min. Puffer A: 12mM Tris-HCl (pH 7.4), 5M Harnstoff; Puffer B: 0.5 M NaClO₄, 12mM Tris-HCl (pH 7.4), 5M Harnstoff. Gradient ca. A/B 80:20 → A/B 40:60 in 30 min. gearbeitet wurde mit dem HPLC-Gerät 2.

Analytisch: Säule DNAPac PA100. Fluss: 0.75 ml/min. Puffer A: 12mM Tris-HCl (pH 7.4), 5M Harnstoff; Puffer B: 0.5 M NaClO₄, 12mM Tris-HCl (pH 7.4), 5M Harnstoff. Gradient ca. A/B 80:20 → A/B 40:60 in 30 min. gearbeitet wurde mit dem HPLC-Gerät 3.

Bei allen Verfahren wurde zur Detektion der Produkte die UV-Absorbtion bei 260 nm gemessen.

Reinigung über Gel-Elektrophorese

Die 35-mere RNA-Sequenz FC wurde mittel Gel-Elektrophorese gereinigt. 38 OD Rohprodukt wurden über zwei Polyacrylamid-Gelplatten (0.75 mm) gereinigt.

Gerät: *Biorad* Mini-Protean 3 Cell.

Acrylamid-Stammlsg (30%): 30 g Acrylamid, 1.5 g *N,N'*-Methylenbisacrylamid in 100 g H₂O.

10×TBE-Puffer: 0.5 mol Tris, 10 mmol EDTA in 900 ml H₂O, mit H₃BO₃ auf pH 8.3 einstellen, dann auf 1000 ml auffüllen.

Lade-Puffer: 8M Harnstoff, TBE (1×)

APS-Stammlsg: 10% APS in H₂O

Spannung: 120V

Giessen der Gelplatten (15% Gel, 10 ml): 4,5 g Harnstoff wurden gelöst in 1 ml TBE (10×) und 5 ml Acrylamid-Lsg (30%) und mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde entgast und mit 45 µl APS-Stammlsg. und 10 µl TEMED versetzt. Nach kurzem Mischen wurde das Gel sofort gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 1 h wurde das Oligonukleotid im Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120V durchgeführt. Anschliessend wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und vom Gelmaterial elektroeluiert.

5.1.6 Entsalzen der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden nach der Reinigung über SEP-PAK Classic C18 (*Waters*) Kartuschen entsalzt. Puffer A: 0.1M Et₃NHOAc; Puffer B: H₂O/CH₃CN 1:1. Das Oligonukleotid wurde in ca. 0.3M Et₃NHOAc auf die Kartusche aufgetragen, mit A (5 ml) dann mit H₂O (10 ml) gewaschen und anschliessend mit B (3 ml) eluiert. Das Lösungsmittel wurde am *Speedvac* vollständig eingedampft. Anschliessend wurden die entsalzten Produkte in ca. 3 ml H₂O als Stammlösungen aufbewahrt.

5.1.7 Quantifizierung der Oligonukleotide

Zur Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotid-Lösungen wurde die UV-Absorption bei 260 nm gemessen (optische Dichte O.D.). Die UV-Absorptionen der Oligonukleotide wurde bei 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl bei pH 7.4 und 85° C gemessen. Der Extinktionskoeffizient ϵ der Oligonukleotide berechnete sich aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nucleoside.

Gerät: UV-Vis-Spektrophotometer: *Kontron-Instruments Uvikon 860*.

Extinktionskoeffizienten der Nukleoside

Nukleosid	Extinktionskoeffizient ϵ	Nukleosid	Extinktionskoeffizient ϵ
	[l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]		[l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
RNA A	15'300	pDNA D	8'900
RNA C	7'400	pDNA M	7'300
RNA G	11'700	pDNA G	11'700
RNA U	9'900	pDNA T	9'000

ϵ in [l·mol⁻¹·cm⁻¹], bei 260 nm, pH 7.0.

5.1.8 Temperaturabhängige UV-Spektroskopie

Gerät: Cary Bio-1 Spectrophotometer, ausgerüstet mit einem *Peltier* Heizelement. Die UV-Absorption wurde als Funktion der Temperatur im Intervall 0 - 90° aufgezeichnet (Heizrate: 0.5° pro min.). Messbedingungen: 1-10 μ M Oligonukleotid, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl bei pH 7.4. Die Lösungen wurden mit 3 Tropfen Dimethylpolysiloxan überschichtet und vor der Messung kurz auf 85° aufgeheizt. Die erhaltenen Kurven wurden mit *KaleidaGraph* rechnerisch analysiert. Durch Anpassung eines Polynom 9. Grades und Berechnung der Ableitung konnte die Uebergangstemperatur T_m im Maximum der Ableitungskurve abgelesen werden.

5.1.9 CD-Spektroskopie

Gerät: JASCO J-170 Spectropolarimeter, Messbedingungen für Oligonukleotide: 320 - 220 nm, 0.1 nm Schritte, Spaltbreite 2.0 nm. Es wurden jeweils 5 Spektren aufgenommen, überlagert und anschliessend geglättet. Standardbedingungen: 10 μ M Einzelstrangkonzentration, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl bei pH 7.4, bei verschiedenen Temperaturen (im Falle anderer Bedingungen sind diese an der entsprechenden Stelle angegeben).

5.1.10 Fluoreszenz-Spektroskopie mit dem FMN-bindenden

Aptamer/Konstrukt

Gerät: *ISS-K2 multifrequency phase fluorometer*. Anregungsfrequenz 420 nm, 4 nm Spaltbreite. Detektion 650 nm - 450 nm, 1 nm Schritte, 4 nm Spaltbreite, jeweils zwei Spektren wurden überlagert und geglättet, die Auswertung erfolgte bei 535 nm. Messbedingungen: 1 μM FMN, 0,0 μM - 5,0 μM Oligonukleotid, 150mM NaCl, 4mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl, pH 7,4, RT.

Rohdaten des pDNA/RNA-Konstruktes FA-FB

[FA-FB] _{theor} ^{a)}	Verdünnung	[FA-FB] _{kor} ^{b)}	Fluoreszenz	korr. Max. ^{c)}	{FMN-FA-FB}	
[μM]		[μM]	[a. u.]	[a. u.]	[%] ^{d)}	[μM]
0.00	1.00	0.000	32442	32442	0.000	0.000
0.25	1.01	0.248	26337	32121	0.199	0.197
0.50	1.02	0.490	20714	31806	0.385	0.378
1.00	1.04	0.962	13958	31194	0.611	0.588
2.00	1.08	1.852	8512	30039	0.796	0.737
3.00	1.12	2.679	5415	28966	0.907	0.810
4.00	1.16	3.448	4369	27967	0.945	0.815
4.70	1.19	3.952	3737	27277	0.970	0.815

^{a)} Konzentration des Aptamers ohne Berücksichtigung der Verdünnung, ^{b)} Konzentration des Aptamers unter Berücksichtigung der Verdünnung, ^{c)} theor. Fluoreszenzmaximum nach Verdünnung, ^{d)} Berechneter Anteil an FMN-Komplex nach Berücksichtigung einer Hintergrundfluoreszenz von 3000 a. u.

Rohdaten des RNA-Aptamer FC

[FC] _{theor} ^{a)}	Verdünnung	[FC] _{kor} ^{b)}	Fluoreszenz	kor. Max. ^{c)}	[FMN·FC]	
[μM]		[μM]	[a. u.]	[a. u.]	[%] ^{d)}	[μM]
0.00	1.00	0.000	18874	18874	0.000	0.000
0.25	1.01	0.248	15491	18687	0.192	0.190
0.50	1.02	0.490	13417	18504	0.308	0.302
1.00	1.04	0.962	9455	18148	0.538	0.518
2.00	1.08	1.852	6257	17476	0.725	0.671
3.00	1.12	2.679	4334	16852	0.843	0.753
4.00	1.16	3.448	3842	16271	0.871	0.751
4.66	1.19	3.918	3033	15870	0.926	0.778

^{a)} Konzentration des Aptamers ohne Berücksichtigung der Verdünnung, ^{b)} Konzentration des Aptamers unter Berücksichtigung der Verdünnung, ^{c)} theor. Fluoreszenzmaximum nach Verdünnung, ^{d)} Berechneter Anteil an FMN-Komplex nach Berücksichtigung einer Hintergrundfluoreszenz von 2000 a. u.

5.1.11 Ribozymspaltungsexperimente

Für die *pDNA*-Analogen Ribozymkonstrukte wurden vorerst die beiden Hybrid-Sequenzen im Verhältnis 1:1 gemischt und über HPLC verifiziert. Es wurden von den Metallionen, dem Substrat und den Ribozymen Stammlösungen hergestellt mit 150mM NaCl und 10mM HEPES Puffer (pH 7.5). Die Ribozym Lösungen wurden als ca. 3 μM -Stammlösungen vorbereitet und die exakte Oligokonzentration bei 85° bestimmt. Analog wurde vom Substrat eine ca. 60 μM Stammlösung vorbereitet. Die M^{2+} -Stammlösungen wurden genau 5 \times konzentrierter als für die Reaktion notwendig vorbereitet.

Pro Spaltungsexperiment wurden zwei Proben vorbereitet. Die Ribozym-Probe, welche als 2.5 \times Lösung (\rightarrow 2.5 μM , 2.5 $\cdot 10^{-4}$ μmol) mit HEPES/NaCl auf 100 μl aufgefüllt wurde. Die Substrat-Probe wurde analog als 2.5 \times Lösung (\rightarrow 50 μM , 5 $\cdot 10^{-3}$ μmol) mit HEPES/NaCl auf 100 μl aufgefüllt. Die beiden Proben wurden während 1 min auf 90° erwärmt, dann auf RT abgekühlt, je 25 μl der M^{2+} -Lösungen zugegeben und während 10 min. auf der gewünschten

Reaktionstemperatur konditioniert. Die Substratlösung wurde zur Ribozymlösung gegeben und gut gemischt. In Intervallen von 20 min. wurden Proben à 50 µl gezogen, mit 0.2M NaH_2PO_4 (20 µl) gequench und eingefroren.

Die Proben wurden über *Dionex*-HPLC, nach den beschriebenen Bedingungen in ihre Komponenten aufgetrennt. DNAPac PA100-Säule, Fluss 0.75 ml/min, Gradient A/B 80:20 → A/B 40:60 in 20 min., 85° C. Die Detektion von Substrat, Spaltprodukten, Ribozymsequenzen erfolgte bei 260 nm. Die Quantifizierung der Peakflächen wurde mit der integrierten Software *Chromeleon* vorgenommen. Die Darstellung des Reaktionsverlaufes und die Auswertung der kinetischen Daten erfolgte mit *KaleidaGraph*.

5.1.12 Substitutionsreaktionen

MeNH₂-Substitutionen: Diese erfolgten direkt bei der Entschützung des Oligonukleotides mit 10M MeNH₂ in EtOH/H₂O 1:1.

EtSH-Substitutionen: Das geschützte Oligonukleotid (gebunden auf der Festphase) wurde in einer Lösung aus 2M EtSH, 1M ¹Pr₂NEt in EtOH (1.5 ml) suspendiert und über Nacht geschüttelt. Die Proben wurden zentrifugiert, die Lösung abpipettiert und der Rückstand zweimal mit EtOH gewaschen.

5.2 Oligonukleotide

		Ausbeute		MS ^{a)} [m/z]	
		a.u. ^{b)}	µmol	berechnet ^{c)}	gefunden
3'-O-Methyl-pRNA-Sequenzen					
A	4'-TTTTTTTT-2'	56	0.78	2612.6	2611.8
B	4'-AAAAAAAA-2'	39	0.32	2684.5	2683.9
C	4'-CCCCCC-2'	50	1.1	1853.7	1853.3
D	4'-GGGGGG-2'	22	0.31	2094.5	2093.4
E	4'-CGAATTCG-2'	42 ^{d)}	0.97	2649.9	2649.3
3'-Desoxy-pDNA-Sequenzen					
F	4'-TTTTTTTT-2'	48	0.78	2371.6	2371.1
G	4'-DDDDDDDD-2' ^{c)}	24	0.31	2563.8	2563.8
H	4'-MMMMMM-2' ^{c)}	30	0.67	1757.3	1757.2
I	4'-GGGGGG-2'	23	0.33	1913.3	1913.0
J	4'-MGDDTTMG-2' ^{c)}	385 ^{d)}	5.2	2467.7	2468.1
K	4'-MGAATTMG-2' ^{c)}	555 ^{d)}	6.4	2437.7	2437.2
L	4'-DMDMDM-2' ^{c)}	12	0.25	1832.4	1832.4
M	4'-GTGTGT-2'	49	0.79	1838.3	1838.4
pDNA/DNA-Hybridsequenzen ^{f)}					
N	4'- <u>TD</u> <u>TD</u> CAATTCGMGM-2' ^{c)}	22	0.16	4280.9	4281.5
O	4'-GMGMGATG <u>TD</u> <u>TD</u> -2' ^{c)}	35	0.29	3743.6	3743.9

^{a)} MALDI-TOF-MS. ^{b)} Absorption bei 260 nm. ^{c)} Berechnung für das Fragment [M - H]. ^{d)} gemessen bei 80°.

^{e)} D = 2.6-Diaminopurin; M = 5-Methylcytosin. ^{f)} pDNA-Nukleoside sind unterstrichen dargestellt.

		Ausbeute		MS ^{a)} [m/z]	
		a.u. ^{b)}	µmol	berechnet ^{c)}	gefunden
<i>p</i> DNA/RNA-Sequenzen ^{d)}					
P	5'-AGUACGUCGU-3'	43	0.42	3161.0	3160.2
Q	5'-ACGACGUACU-3'	36	0.34	3144.0	3144.3
R	4'- <u>GT</u> -2'→5'-AGUACGUCGU-3'	58	0.47	3794.4	3794.6
S	4'- <u>GTGT</u> -2'→5'-AGUACGUCGU-3'	45	0.31	4427.8	4427.5
T	4'- <u>GTGTGT</u> -2'→5'-AGUACGUCGU-3'	72	0.43	5061.2	5061.5
U	5'-ACGACGUACU-3'→4'- <u>DMDMDM</u> -2'	18	0.12	5038.3	5038.1
V	5'-ACGACGUACU [*] -2'→4'- <u>DMDMDM</u> -2'	21	0.14	5038.3	5038.2
FA	4'- <u>GTGTGT</u> -2'→5'-UGUAGGA- -UAUGC [*] -2'→4'- <u>GGGGG</u> -2'	42	0.17	7382.6	7382.1
FB	4'- <u>MMMMM</u> -2'→5'-GCAGAA- -GGACA [*] -2'→4'- <u>DMDMDM</u> -2'	10	0.05	6985.7	6985.0
FC	5'-GGCGUGUAGGAUAUGCU- -UCGGCAGAAGGACACGCC-3'	26	0.07	11337.9	11381.6
RT	4'- <u>MMDDDGGTT</u> -2'→5'-GCCGAACCGU-2'	38	0.20	6017.9	6018.5
RH	5'-GGCGACCCUGAUGAGGC [*] -2'→4'- <u>DDMMTTGG</u> -2'	28	0.11	8010.1	8008.7
R1	5'-GGCGACCCUGAUGAGGC- -CGAAAGGCCGAAACCGU-3'	22	0.06	11013.8	11012.9
S1	5'-ACGGUCGGUCGCC-3'	208	1.6	4131.6	4131.0

^{a)} MALDI-TOF-MS. ^{b)} Absorption bei 260 nm. ^{c)} Berechnung für das Fragment [M - H]⁻. ^{d)} *p*DNA-Nukleoside sind unterstrichen dargestellt; D = 2,6-Diaminopurin; M = 5-Methylcytosin; N^{*} bedeutet 2',5'-verknüpftes Nukleosid.

		Ausbeute		MS ^{a)} [m/z]	
		a.u. ^{b)}	μmol	berechnet ^{c)}	gefunden
funktionalisierte pDNA/RNA-Sequenzen ^{d)}					
N3H	5'-GGC ^N GACCCUGAUGAGGC [#] <u>DDMMTTGG</u> -2'	15	0.06	8139.3	8139.4
N12H	5'-GGCGACCCUGAU ^N GAGGC [#] <u>DDMMTTGG</u> -2'	5	0.02	8139.3	8141.4
N25T	4'- <u>MMDDGGTTGC</u> ^N CGAAACCGU-3'	22	0.11	6147.8	6144.6
N31T	4'- <u>MMDDGGTTGCCGAAAC</u> ^N CGU-3'	27	0.14	6147.8	6144.8
S3H	5'-GGC ^S GACCCUGAUGAGGC [#] <u>DDMMTTGG</u> -2'	17	0.07	8170.4	8170.1
S12H	5'-GGCGACCCUGAU ^S GAGGC [#] <u>DDMMTTGG</u> -2'	4	0.02	8170.4	8180.5
S25T	4'- <u>MMDDGGTTGC</u> ^S CGAAACCGU-3'	16	0.04	6178.2	6176.7
S31T	4'- <u>MMDDGGTTGCCGAAAC</u> ^S CGU-3'	13	0.03	6178.2	6176.5
2NMeR	5'-GGC ^N GACCCUGAUGAGGC- -CGAAAGGCCGAAAC ^N CGU-3'	53	0.14	11272.2	11271.7

^{a)} MALDI-TOF-MS. ^{b)} Absorption bei 260 nm. ^{c)} Berechnung für das Fragment [M - H]. ^{d)} pDNA-Nucleoside sind unterstrichen dargestellt; D = 2,6-Diaminopurin; M = 5-Methylcytosin; N[#] bedeutet 2',5'-verknüpftes Nucleosid; N^N bedeutet HNMe funktionalisiertes Nucleosid, N^S bedeutet EtSH funktionalisiertes Nucleosid.

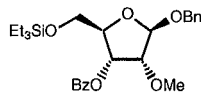
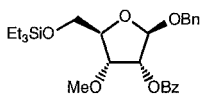
5.3 Verbindungen



Benzyl 3-O-methyl- β -D-ribofuranosid (20) und Benzyl 2-O-methyl- β -D-ribofuranosid (21).

Eine Suspension aus Benzyl- β -D-ribofuranosid (30 g, 125 mmol) und Bu_2SnO (37.3 g, 150 mmol) in Toluol (450 ml) wurde während 1.5 h bis alle Edukte gelöst waren am Wasserabscheider rückflusiert. Das Toluol wurde eingeeengt und der Rückstand unter Rückfluss in CH_3CN (450 ml) gelöst. Es wurden MeI (53.2 g, 375 mmol) und anschliessend TEAF-2 H_2O (27.8 g, 150 mmol) zugegeben und 1.5 h rückflusiert. Nach Abkühlen auf RT wurde das CH_3CN eingedampft und das Gemisch gemäss Workup A aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde auf SiO_2 (100 g) aufgezogen und über CC (Silicagel (250g), Hexan/AcOEt 4:6 \rightarrow AcOEt) gereinigt. 26.5 g (70%, beide Isomere zusammen).

DC (AcOEt): R_f 0.45, 0.50. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): 2.02 - 2.10 (*m*, 1H, H-O(5')); 2.63 (*d*, *J* = 8.1, 0.5 H, H-O(2')); 2.73 (*d*, *J* = 3.1, 0.5 H, H-O(3')); 3.44, 3.47 (2*s*, 6 H, CH_3O); 3.60 - 3.68 (1 H, H-C(5')); 3.74 - 3.84 (*m*, 1.5 H, H'-C(5'), H-C(4')); 4.03 - 4.08, 4.11 - 4.15, 4.19 - 4.21 (3*m*, 2 H, H-C(3'), H-C(4'), H-C(2')); 4.32 - 4.57 (*m*, 0.5 H, H-C(2')); 4.57, 4.58, 4.76, 4.77 (3*d*, *J* = 11.9, OCH_2Ph); 5.10 (*s*, 0.5 H, H-C(1)); 5.12 (*d*, *J* = 1.3, 0.5 H, H-C(1)); 7.30 - 7.40 (*m*, 5 arom. H).

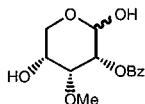
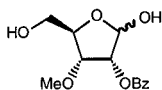


Benzyl 2-O-benzoyl-3-O-methyl-5-O-(triethylsilyl)-β-D-ribofuranosid (22) und *Benzyl 3-O-benzoyl-2-O-methyl-5-O-(triethylsilyl)-β-D-ribofuranosid (23)*.

Eine Lösung aus **20** und **21** (23.8 g, 94 mmol) in CH₂Cl₂/Pyridin 10:1 (620 ml) wurde auf -78°C abgekühlt und mit Et₃SiCl (14.1 g, 94 mmol) versetzt. Man liess das Reaktionsgemisch langsam auf 0°C erwärmen und fügte nach vollständigem Umsatz BzCl (16.5 g, 117 mmol) zu. Nach dem Erwärmen lassen auf RT wurde das Gemisch 2 h gerührt und anschliessend nach Methode A aufgearbeitet. Restliches Pyridin wurde durch Koevaporation mit Toluol entfernt, das Rohprodukt auf SiO₂ (100 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (350g), Hexan → Hexan/AcOEt 7:3) gereinigt. Man erhielt **22** (18.9 g, 40%) und **23** (16.1 g, 34%).

Daten von **22**: DC (Hexan/AcOEt 8:2); R_f 0.85. ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 0.60 - 0.69 (*m*, 6 H, CH₃CH₂); 0.92 - 1.02 (*m*, 9 H, CH₃CH₂); 3.38 (*s*, CH₃O); 3.77 (*dd*, *J* = 5.3, 10.9, H-C(5')); 3.86 (*dd*, *J* = 3.8, 10.9, H'-C(5')); 4.11 (*dd*, *J* = 4.3, 7.5, H-C(3')); 4.17 - 4.21 (*m*, H-C(4')); 4.54, 4.81 (*2d*, *J* = 11.5, OCH₂Ph); 5.20 (*s*, H-C(1')); 5.53 (*d*, *J* = 4.3, H-C(2')); 7.28 - 7.60 (*m*, 8 arom. H); 8.05 - 8.10 (*m*, 2 arom. H). Einstrahlungsexperimente: 5.33 → 4.11 (*d*); 4.11 → 5.33 (*s*), 4.19 (*dd*).

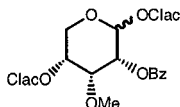
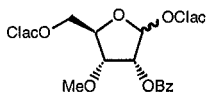
Daten von **23**: DC (Hexan/AcOEt 8:2); R_f 0.75. ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 0.56 - 0.67 (*m*, 6 H, CH₃CH₂); 0.90 - 1.02 (*m*, 9 H, CH₃CH₂); 3.39 (*s*, CH₃O); 3.81 (*sym. m*, 2H, H-C(5')); 4.08 (*dd*, *J* = 2.1, 5.3, H-C(2')); 4.37 (*q*, *J* = 5.3, H-C(4')); 4.56, 4.83 (*2d*, *J* = 11.8, OCH₂Ph); 5.18 (*d*, *J* = 2.2, H-C(1')); 5.44 (*t*, *J* = 5.3, H-C(3')); 7.29 - 7.61 (*m*, 8 arom. H); 8.06 - 8.10 (*m*, 2 arom. H). Einstrahlungsexperimente: 5.18 → 4.08 (*d*); 4.08 → 5.18 (*s*), 5.44 (*d*).



2-O-Benzoyl-3-O-methyl- α/β -D-ribofuranose (**24**) und 2-O-Benzoyl-3-O-methyl- α/β -D-ribofuranose (**25**).

22 (18.3 g, 39 mmol) wurde in einer Lösung aus THF/HCOOC 1:1 (180 ml) aufgenommen und unter Argon mit 10% Pd/C (18 g) versetzt. Das Argon wurde gegen H_2 (1 bar) ausgetauscht und danach das Gemisch während 2,5 h stark gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde mit MeOH (200 ml) verdünnt und der Katalysator unter Argon vorsichtig über Celite filtriert. Die Lösungsmittel wurden eingedampft, der Rückstand auf SiO_2 (30 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (180 g), Hexan/AcOEt 6:4 \rightarrow Hexan/AcOEt 1:9) gereinigt. Man erhielt **24** und **25** (6.36 g, 61%).

DC (Hexan/AcOEt 4:); R_f 0.20.



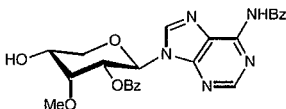
2-O-Benzoyl-3-O-methyl- α/β -D-ribofuranose 1,5-Di(chloracetat) (**26**) und 2-O-Benzoyl-3-O-methyl- α/β -D-ribofuranose 1,4-bis(chloracetat) (**27**).

Zu einer Lösung aus $(Clac)_2O$ (11.9 g, 70 mmol) und Collodin (5.33 g, 44 mmol) in THF (66 ml) wurde während 80 min. eine Lösung aus **24/25** in THF (33 ml) zugegeben und weiter 90 min. bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit CH_2Cl_2 (500 ml) verdünnt und gegen ges. aq. KH_2PO_4 extrahiert. Das Rohprodukt wurde auf SiO_2 (15 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (70 g), Hexan/AcOEt 9:1 \rightarrow Hexan/AcOEt 5:5) gereinigt. Man erhielt **26** und **27** (7.42 g, 92%), wobei die β -Fu (2.31 g) abgetrennt werden konnten.

Daten von β -Py, α -Py, α -Fu: DC (Hexan/AcOEt 5:5); R_f 0.70. 1H -NMR (300MHz, $CDCl_3$): 3.41, 3.45, 3.52 (3s, 3 H, CH_3O); 3.77 - 4.23, 4.30 - 4.52 (2m, 7H, H-C(3'), H-C(5'), H'-

C(5'), 2*ClCH₂); 5.19 - 5.25, 5.36 - 5.46 (*dd*, 2H, H-C(2'), H-C(4')); 6.13, 6.27, 6.58 (*3d*, *J* = 2.8, 3.8, 4.7, H-C(1')); 7.44 - 7.50 (*m*, 2 arom. H); 7.58 - 7.64 (*m*, 1 arom. H); 8.03 - 8.14 (*m*, 2 arom. H).

Daten von β-Fu: DC (Hexan/AcOEt 5:5): R_f 0.80. ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 3.42 (*s*, 3 H, CH₃O); 4.07 (*dd*, *J* = 4.3, 7.8, H-C(3')); 4.11, 4.13 (*2s*, 4H, 2*ClCH₂); 4.31 - 4.41 (*m*, 2H, H-C(5'), H-C(4')); 4.51 (*dd*, *J* = 2.5, 11.8, H'-C(5')); 5.60 (*d*, *J* = 4.4, H-C(2')); 6.34 (*s*, H-C(1')); 7.45 - 7.51 (*m*, 2 arom. H); 7.58 - 7.64 (*m*, 1 arom. H); 8.05 - 8.09 (*m*, 2 arom. H).

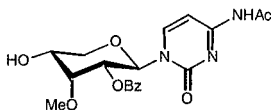


*N*⁶-Benzoyl-9-[3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]-adenin 2'-Benzoat (**31**).

Eine Suspension aus **28** (294 mg, 1.23 mmol) und **27** (471 mg, 1.12 mmol) in CH₃CN (4 ml) wurde auf 60° erwärmt, mit BSA (750 mg, 370 mmol) versetzt und während 20 min gerührt. Die klare Lösung wurde während 35 min bei 60° mit SnCl₄ (1020 mg, 3.91 mmol) behandelt und danach auf ein Gemisch aus ges. aq. NaHCO₃/AcOEt 1:1 (70 ml) gegossen. Nach der Aufarbeitung nach Methode B wurde das Rohprodukt in MeOH (6 ml) gelöst und 15 min. bei RT mit Et₃N (300 μl) behandelt. MeOH und Et₃N wurden vollständig eingedampft und das Rohprodukt über CC (Silicagel (10 g), CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/MeOH 97:3) gereinigt. Man erhielt **31** (290 mg, 53%) als weissen Schaum.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): R_f 0.80; (R_f 0.85 = Furanosyl-Nukleosid). ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 2.47 (*br. s*, OH); 3.68 (*s*, CH₃O); 3.87 (*d*, *J* = 10.9, H-C(5')); 4.06 (*dd*, *J* = 5.3, 10.9, H'-C(5')); 4.14 - 4.19 (*m*, 2H, H-C(4'), H-C(3')); 5.64 (*dd*, *J* = 2.4, 9.3, H-C(2')); 6.28 (*d*, *J* = 9.3, H-C(1')); 7.32 - 7.37 (*m*, 2 arom. H); 7.44 - 7.62 (*m*, 4 arom. H); 7.80 - 7.84 (*m*, 2 arom. H); 7.96 - 8.03 (*m*, 2 arom. H); 8.20 (*s*, H-C(2)); 8.82 (*s*, H-C(8)); 8.97 (*s*, NH).

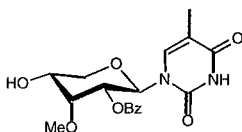
FAB-MS (NOBA, pos. mode): 490.3 (100, [M + H]⁺, C₂₅H₂₄N₅O₆⁺; calc. 490.5).



*N*⁴-Acetyl-1-[3'-O-methyl- β -D-ribofuranosyl]-cytosin 2'-Benzoat (**32**).

Eine Suspension aus **29** (688 mg, 4.50 mmol) und **27** (1720 mg, 4.09 mmol) in CH₃CN (15 ml) wurde auf 60° erwärmt, mit BSA (1830 mg, 9.00 mmol) versetzt und während 20 min gerührt. Die klare Lösung wurde während 30 min bei 60° mit SnCl₄ (2130 mg, 8.20 mmol) behandelt und danach mit CH₂Cl₂ gegen 1M Na₂S₂O₅ extrahiert. Nach anschließender Aufarbeitung nach Methode A wurde das Rohprodukt in MeOH (30 ml) gelöst und 15 min bei RT mit Et₃N (1500 μ l) behandelt. MeOH und Et₃N wurden vollständig eingedampft und das Rohprodukt über CC (Silicagel (25 g), CH₂Cl₂ \rightarrow CH₂Cl₂/MeOH 94:6) gereinigt. Man erhielt **32** (956 mg, 58%) als gelben Schaum.

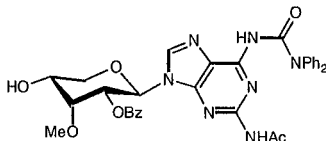
DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): R_f 0.75; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 2.12 (s, C(O)CH₃); 2.44 (d, J = 10.3, OH); 3.64 (s, CH₃O); 3.70 - 3.80 (m, 1H, H-C(5')); 3.94 - 4.08 (m, 3H, H-C(3'), H-C(4'), H'-C(5')); 5.13 (dd, J = 2.5, 9.6, H-C(2')); 6.41 (d, J = 9.6, H-C(1')); 7.37 - 7.48 (m, 2H, 2 arom. H, H-C(3)); 7.72 (d, J = 7.5, H-C(6)); 7.97 - 8.05 (m, 2 arom. H); 8.04 (s, NH). FAB-MS (NOBA, pos. mode): 404.3 (100, [M + H]⁺, C₁₉H₂₂N₅O₇⁺; calc. 404.4).



9-[3'-O-Methyl- β -D-ribofuranosyl]-thymine 2'-Benzoat (**33**).

Eine Suspension aus **30** (190 mg, 1.50 mmol) und **27** (576 mg, 1.40 mmol) in CH_3CN (5 ml) wurde auf 60° erwärmt, mit BSA (610 mg, 3.00 mmol) versetzt und während 20 min gerührt. Die klare Lösung wurde während 30 min bei 60° mit SnCl_4 (1070 mg, 4.10 mmol) behandelt und danach auf ein Gemisch aus ges. aq. $\text{NaHCO}_3/\text{AcOEt}$ 1:1 (70 ml) gegossen. Nach der Aufarbeitung nach Methode B wurde das Rohprodukt in MeOH (6 ml) gelöst und 15 min. bei RT mit Et_3N (300 μl) behandelt. MeOH und Et_3N wurden vollständig eingedampft und das Rohprodukt über CC (Silicagel (12 g), Hexan/AcOEt 5:5 \rightarrow Hexan/AcOEt 1:9) gereinigt. Man erhielt **33** (342 mg, 65%) als weissen Schaum.

DC (Hexan/AcOEt 3:7): R_f 0.60; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): 1.89 (*d*, $J = 1.2$, $\text{CH}_3\text{-C}(5)$); 2.36 (*d*, $J = 10.6$, OH); 3.63 (*s*, CH_3O); 3.69 - 3.78 (*m*, 1H, H-C(5')); 3.91 - 4.00 (*m*, 2H, H-C(4'), H'-C(5')); 4.09 (*br. s.*, H-C(3')); 5.13 (*dd*, $J = 2.5, 9.5$, H-C(2')); 6.19 (*d*, $J = 9.5$, H-C(1')); 7.14 (*d*, $J = 1.2$, H-C(6)); 7.42 - 7.48 (*m*, 2 arom. H); 7.56 - 7.62 (*m*, 2 arom. H); 7.98 - 8.02 (*m*, 1 arom. H); 8.35 (*br. s.*, NH).



N^2 -Acetyl- O^6 -(*N,N*-diphenylcarbamoyl)-9-[3'-O-methyl- β -D-ribofuranosyl]-cytosine 2'-Benzoat (**34**).

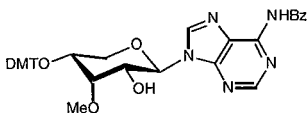
Eine Suspension aus **35** (435 mg, 1.17 mmol) in $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ (10 ml) wurde auf 70° erwärmt, mit BSA (475 mg, 2.34 mmol) versetzt und während 20 min gerührt. Das Lösungsmittel

wurde eingedampft und der Rückstand in Toluol (7 ml) bei 50° gelöst. Es wurde TMSTf (520 mg, 2.34 mmol) zugegeben und 2.5 h bei 55° gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf ein Gemisch aus ges. aq. NaHCO₃/AcOEt 1:1 (100 ml) gegossen und nach Methode B aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde über CC (Silicagel (7 g), Hexan/AcOEt 8:2 → Hexan/AcOEt 4:6) gereinigt zur Entfernung der Furanoside. Man erhielt das 5'-O-chloracetylierte G-Nukleosid (340 mg, 45%) als violetten Schaum.

DC (Hexan/AcOEt 3:7); R_f 0.65, (R_f 0.70 = Furanoside). ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 2.60 (s, C(O)CH₃); 3.61 (s, CH₃O); 4.00 - 4.19 (m, 4H, ClCH₂, H-C(5'), H'-C(5')); 5.23 (sym. m, 1H, H-C(4')); 5.67 (dd, J = 2.6, 9.4, H-C(2')); 6.14 (d, J = 9.4, H-C(1')); 7.19 - 7.60 (m, 13 arom. H); 7.82 - 7.85 (m, 2 arom. H); 7.95 (s, NH); 8.07 (s, H-C(6)). FAB-MS (NOBA, pos. mode): 737.2 (100, [M + Na]⁺, C₃₅H₃₁ClNaN₆O₉⁺; calc. 738.1).

Das Produkt (804 mg, 1.12 mmol) wurde in MeOH (15 ml) gelöst und 15 min. bei RT mit Et₃N (750 µl) behandelt. MeOH und Et₃N wurden vollständig eingedampft und das Rohprodukt über CC (Silicagel (15 g), Hexan/AcOEt 6:4 → Hexan/AcOEt 1:9) gereinigt. Man erhielt **34** (480 mg, 67%) als rosa Schaum.

DC (Hexan/AcOEt 1:9); R_f 0.30; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 2.39 (br. s, OH); 2.59 (s, C(O)CH₃); 3.67 (s, CH₃O); 3.76 - 3.83 (m, 1H, H-C(5')); 3.98 - 4.14 (m, 2H, H-C(4'), H'-C(5')); 4.18 (br. t, J = 2.6, H-C(3')); 5.64 (dd, J = 2.5, 9.4, H-C(2')); 6.07 (d, J = 9.5, H-C(1')); 7.19 - 7.59 (m, 8 arom. H); 7.81 - 7.85 (m, 2 arom. H); 7.99 (br. s, NH); 8.07 (s, H-C(8)).

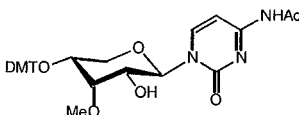


N⁶-Benzoyl-9-[4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]-adenin (**36**).

Zu einer Lösung aus **31** (270 mg, 0.55 mmol) in CH₂Cl₂ (3 ml) wurden DMTCl (224 mg, 0.66 mmol), *syn*. Collidin (135 mg, 1.10 mmol) und AgNO₃ (94 mg, 0.55 mmol) zugegeben und während 2 h bei RT gerührt. Das Gemisch über Celite filtriert und anschliessend

MeOH (8 ml) und THF (10 ml) verdünnt. Die Lösung wurde auf 4° abgekühlt, mit 2M NaOH (2 ml) versetzt und nach 10 min. mit AcOH (240 mg, 4 mmol) neutralisiert. Die Lösung wurde bis zum Ausölen des Produktes aufkonzentriert und dann nach Methode A aufgearbeitet. Die Reinigung über CC (Silicagel (7 g), CH₂Cl₂ (+2% Et₃N) → CH₂Cl₂/MeOH 97:3 (+2% Et₃N)) ergab **36** (348 mg, 92 %).

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): R_f 0.85; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 3.09 (br, s, OH); 3.23 - 3.33 (m, 2H, H-C(5'), H'-C(5')); 3.72 (s, CH₃OC(3)); 3.80, 3.81 (2s, ArOCH₃); 3.77 - 3.94 (m, 3H, H-C(2'), H-C(3'), H'-C(4')); 5.65 (d, J = 9.1, H-C(1')); 6.84 - 6.85 (m, 4 arom. H); 7.22 - 7.62 (m, 12 arom. H); 7.98 - 8.00 (m, 2 arom. H); 8.02 (s, H-C(2)); 8.75 (s, H-C(8)); 9.00 (br. s, NH).

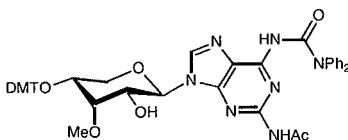


*N*⁴-Acetyl-1-[4'-O-(4,4'-dimethoxyxytrityl)-3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]-cytosin (**37**).

Eine Lösung aus **32** (1420 mg, 3.5 mmol) in CH₂Cl₂ (15 ml) wurde mit DMTCI (1313 mg, 3.9 mmol), *sym.* Collidin (854 mg, 7.0 mmol) und AgNO₃ (600 mg, 3.5 mmol) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Nach der Filtration über Celite wurde nach Methode A aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde in 10M MeNH₂ in EtOH gelöst und 1 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde das Gemisch vollständig eingedampft und das Rohprodukt über CC (Silicagel (20 g), CH₂Cl₂ (+2% Et₃N) → CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (+2% Et₃N)) gereinigt. Das erhaltene Zwischenprodukt (1.51 g, 2.70 mmol, 77%) wurde während 16 h mit einer Lösung aus Ac₂O (289 mg, 2.83 mmol) in DMF (27 ml) behandelt und anschliessend nach Methode A aufgearbeitet. Restliches DMF wurde am Kugelrohr eingedampft und das Reaktionsgemisch über CC (Silicagel (20 g), CH₂Cl₂ (+2% Et₃N) → CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (+2% Et₃N)) gereinigt. Man erhielt **37** (1300 mg, 80%) als weissen Schaum.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): R_f 0.50; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 2.20 (s, CH₃-C(O)); 3.12 - 3.23 (m, 4H, H-C(3'), H-C(5'), H'-C(5'), OH); 3.67 (s, CH₃OC(3')); 3.70 - 3.76 (m, 2H, H-

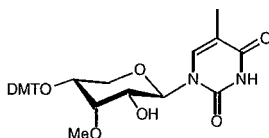
C(2'), H¹-C(4'')); 3.80 (*s*, ArOCH₃); 5.83 (*d*, *J* = 8.4, H-C(1'')); 6.82 - 6.88 (*m*, 4 arom. H); 7.21 - 7.57 (*m*, 11H, H-C(5), H-C(6), 9 arom. H); 9.74 (*br. s*, NH).



*N*²-Acetyl-9-[4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]-O⁶-(N,N-diphenylcarbamoyl)-cytosin (**38**).

Wie beschrieben für **36** mit **34** (460 mg, 0.72 mmol), CH₂Cl₂ (3.5 ml), DMTCl (293 mg, 1.2 mmol), *syn*. Collidin (174 mg, 2.0 mmol), AgNO₃ (122 mg, 0.72 mmol), MeOH (16 ml), THF (20 ml), 2M NaOH (4 ml), AcOH (480 mg, 8 mmol). Nach der Aufarbeitung mit Methode A wurde das Rohprodukt über CC (Silicagel (6 g), Hexan/AcOEt 6:4 (+2% Et₃N)) → Hexan/AcOEt 1:9 (+2% Et₃N)) gereinigt. Man erhielt **38** (310 mg, 52%) als rosafarbenen Schaum.

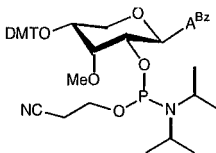
DC (Hexan/AcOEt 1:9): R_f 0.70; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 2.43 (*s*, CH₃-C(O)); 3.09 - 3.11, 3.40 - 3.53 (*2m*, 3H, H-C(5'), H¹-C(5'), OH); 3.77 (*s*, CH₃OC(3')); 3.80, 3.81 (*2s*, ArOCH₃); 3.72 - 3.84 (*m*, 2H, H-C(3'), H¹-C(4'')); 3.92 - 3.91 (*m*, H-C(2'')); 5.48 (*d*, *J* = 9.0, H-C(1'')); 6.83 - 6.88 (*m*, 4 arom. H); 7.20 - 7.52 (*m*, 19 arom. H); 7.92, 8.00 (*2s*, H-C(5), H-C(8)).



1-[4'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]-thymine (39).

Wie beschrieben für **36** mit **33** (582 mg, 1.55 mmol), CH₂Cl₂ (6 ml), DMTCl (576 mg, 1.70 mmol), *sym.* Collidin (375 mg, 3.10 mmol), AgNO₃ (263 mg, 1.55 mmol), MeOH (20 ml), THF (25 ml), 2M NaOH (5 ml), AcOH (600 mg, 10 mmol). Nach der Aufarbeitung mit Methode A wurde das Rohprodukt auf SiO₂ (3 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (20 g), CH₂Cl₂ (+2% Et₃N) → CH₂Cl₂/MeOH 97:3 (+2% Et₃N)) gereinigt. Man erhielt **39** (776 mg, 87%) als weissen Schaum.

DC (Hexan/AcOEt 3:7): R_f 0.20; ¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): 1.82 (*d*, *J* = 1.2, CH₃-C(5)); 3.18 - 3.32 (*m*, 3H, H-C(5'), H'-C(5'), OH); 3.75 (*s*, CH₃OC(3')); 3.81, 3.83 (2*s*, ArOCH₃); 3.72 - 3.83 (*m*, 3H, H-C(2'), H-C(3'), H'-C(4')); 5.61 (*d*, *J* = 9.4, H-C(1')); 6.82 - 6.92 (*m*, 4 arom. H); 6.95 (*d*, *J* = 1.2, H-C(6)); 7.23 - 7.54 (*m*, 9 arom. H); 10.2 (*br. s.*, NH).

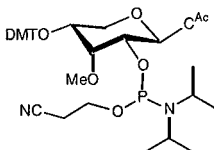


N⁶-Benzoyl-9-[4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]adenine 2'-(2-Cyanoethyl diisopropylphosphoramidit) (40).

Eine Lösung aus **36** (300 mg, 0.44 mmol) in CH₂Cl₂ (2 ml) wurde mit ¹Pr₂NEt (150 mg, 1.15 mmol) und CIP(NⁱPr₂)OCH₂CH₂CN (135 mg, 0.58 mmol) versetzt. Nach 16 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch direkt über CC (Silicagel (8 g), Hexan/AcOEt 8:2 (+2% Et₃N) → AcOEt (+2% Et₃N)) gereinigt und ergab **40** (240 mg, 62 %) als weissen Schaum.

DC (Hexan/AcOEt 2:8): R_f 0.65;

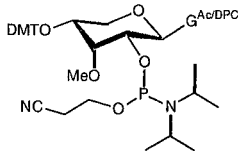
$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): 0.58, 0.94, 0.95, 0.96 (4d, $J = 6.5$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2.37, 2.39, 2.53 (3t, $J = 6.5$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 3.09 - 4.22 (m, 8H, H-C(2'), H-C(3'), H-C(4'), H-C(5'), H'-C(5'), $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, CHMe_2); 3.60, 3.71(2s, $\text{CH}_3\text{OC}(3')$); 3.797, 3.803, 3.811 (3s, ArOCH_3); 5.85, 5.94 (2d, $J = 9.0$, H-C(1')); 6.86 - 6.90 (m, 4 arom. H); 7.16 - 7.60 (m, 12 arom. H); 7.98 - 8.03 (m, 2 arom. H); 8.09 (s, H-C(2)); 8.80 (s, H-C(8)); 8.94 (br. s, NH). $^{31}\text{P-NMR}$: 147.9; 151.1. FAB-MS (NOBA, pos. mode): 889.0 (3, $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{48}\text{H}_{55}\text{O}_8\text{N}_7\text{P}^+$; calc. 889.0), 303.2 (100).



*N*⁴-Acetyl-9-[4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-methyl- β -D-ribofuranosyl]cytosin 2'-(2-Cyanoethyl diisopropylphosphoramidit) (**41**).

Wie beschrieben für **36** mit **37** (298 mg, 0.50 mmol), CH_2Cl_2 (2 ml), $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (160 mg, 1.24 mmol) und $\text{CIP}(\text{N}^i\text{Pr}_2)\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (140 mg, 0.60 mmol). CC (Silicagel (8 g), Hexan/AcOEt 5:5 (+2% Et_3N) \rightarrow Hexan/AcOEt 1:9 (+2% Et_3N)) ergab **41** (239 mg, 60 %) als weissen Schaum.

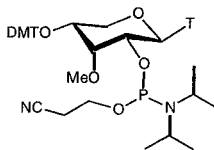
DC (AcOEt 2:8): R_f 0.30, 0.40; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): 0.96, 1.03, 1.06, 1.07 (4d, $J = 6.6$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2.20, 2.21 (2s, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.44 - 2.62 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 3.07, 3.24 (2br. s) und 3.36 - 3.91 (m, 8H, H-C(2'), H-C(3'), H-C(4'), H-C(5'), H'-C(5'), $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, CHMe_2); 3.59, 3.68 (2s, $\text{CH}_3\text{OC}(3')$); 3.797, 3.799, 3.804 (3s, ArOCH_3); 6.10 (br. s, H-C(1')); 6.83 - 6.88 (m, 4 arom. H); 7.20 - 7.54 (m, 11H, H-C(5), H-C(6), 9 arom. H); 8.79 (br. s, NH). $^{31}\text{P-NMR}$: 148.1; 150.4. FAB-MS (NOBA, pos. mode): 802.6 (11, $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{O}_9\text{N}_5\text{P}^+$; calc. 802.9), 303.2 (100).



*N*²-Acetyl-9-[4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]-O⁶-(N,N-diphenylcarbamoyl-cytosin 2'-(2 Cyanoethyl diisopropylphosphoramidit) (**42**).

Wie beschrieben für **36** mit **38** (285 mg, 0.34 mmol), CH₂Cl₂ (1.5 ml), ¹Pr₂NEt (114 mg, 0.88 mmol) und CIP(NⁱPr₂)OCH₂CH₂CN (105 mg, 0.44 mmol). CC (Silicagel (5 g), Hexan/AcOEt 8:2 (+2% Et₃N) → AcOEt (+2% Et₃N)) ergab **42** (207 mg, 60 %) als weissen Schaum.

DC (AcOEt 3:7): R_f 0.75; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 0.57, 0.94, 0.95, 0.97 (4d, J = 6.8, CH(CH₃)₂); 2.19 - 2.51 (m, 2H, OCH₂CH₂CN); 2.54, 2.55 (2s, CH₃C(O)); 3.04 - 3.33 (m, 4H, H-C(5'), H'-C(5'), OCH₂CH₂CN, CHMe₂); 3.36 - 4.02 (m, 4H, H-C(2'), H-C(3'), H-C(4'), CHMe₂); 3.57, 3.71 (2s, CH₃OC(3')); 3.804, 3.810 (3s, ArOCH₃); 5.67, 5.75 (2d, J = 9.0, H-C(1')); 6.82 - 6.90 (m, 4 arom. H); 7.22 - 7.53 (m, 21 arom. H); 7.90, 7.91, 7.93, 7.99 (4s, H-C(5), H-C(6)). ³¹P-NMR: 147.9; 151.2.

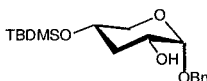


9-[4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-methyl-β-D-ribofuranosyl]thymin 2'-(2 Cyanoethyl diisopropylphosphoramidit) (**43**).

Wie beschrieben für **36** mit **39** (621 mg, 1.08 mmol), CH₂Cl₂ (4 ml), ¹Pr₂NEt (350 mg, 2.7 mmol) und CIP(NⁱPr₂)OCH₂CH₂CN (307 mg, 1.30 mmol). CC (Silicagel (15 g),

Hexan/AcOEt 6:4 (+2% Et₃N) → Hexan/AcOEt 3:7 (+2% Et₃N)) ergab **43** (687 mg, 82 %) als weissen Schaum.

DC (Hexan/AcOEt 3:7): R_f 0.60; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 1.02, 1.05, 1.08, 1.09 (4d, J = 6.5, CH(CH₃)₂); 1.86, 1.89 (2d, J = 1.0, 1.2, CH₃C(6)); 2.41 - 2.61 (m, 2H, OCH₂CH₂CN); 3.01 (br. s) und 3.24 - 3.92 (m, 8H, H-C(2'), H-C(3'), H-C(4'), H-C(5'), H'-C(5'), OCH₂CH₂CN, CHMe₂); 3.58, 3.68 (2s, CH₃OC(3')); 3.804, 3.810 (2s, ArOCH₃); 5.30 (br. s, H-C(1')); 6.84 - 6.88 (m, 4 arom. H); 6.96, 7.00 (2d, J = 1.0, 1.2, H-C(5)); 7.21 - 7.53 (m, 9 arom. H); 7.98, 8.06 (2 br. s, NH). ³¹P-NMR: 147.2; 150.7. FAB-MS (NOBA, pos. mode): 775.8 (4, [M+H]⁺, C₄₁H₅₂O₉N₄P⁺; calc. 775.8), 303.2 (100).



Benzyl 4-O-[(tert-butyl)dimethylsilyl]-3-desoxy-α-D-ribofuranosid (96).

Eine Lösung aus Benzyl α-D-xylopyranosid (**84**, 10.0 g, 41.5 mmol) und PhB(OH)₂ (5.3 g, 43.75 mmol) in Toluol (160 ml) wurde 2 h rückflussiert, dann auf 0° abgekühlt und mit Et₃N (7.5 ml, 54 mmol) und MeSO₂Cl (4.2 ml, 54 mmol) versetzt. Nach dem Erwärmen auf RT und Rühren während 1 h, wurde der Feststoff (Et₃N·HCl) abfiltriert und das Filtrat vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in MeOH (160 ml) gelöst und die Lösung auf 4° abgekühlt. Nach langsamer Zugabe von NaOMe (6.72 g, 124.5 mmol) wurde das Gemisch auf RT erwärmt und 1 h gerührt. Das Rohprodukt wurde nach Aufarbeitung in THF (160 ml) gelöst und bei 4° mit LiAlH₄ (3.15 g, 83.0 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT erwärmt, 30 min. bei RT gerührt, auf 0° abgekühlt und vorsichtig zuerst mit AcOEt (300 ml) und dann mit 2M NaOH (500 ml) versetzt. Trennung der Phasen und Extraktion ergab das Rohprodukt (8.5 g) als Feststoff, der in CH₂Cl₂ (200 ml) und ¹Pr₂NEt (13.5 ml, 79 mmol), gelöst und auf -78° abgekühlt wurde. Zur Lösung wurden TBDMSCl (6.25 g, 41.5 mmol) und AgNO₃ (8.0 g, 47.4 mmol) zugegeben und man liess über Nacht auf RT erwärmen. Das Gemisch wurde filtriert, nach Methode A

aufgearbeitet und über CC (Silicagel (100 g), Hexan/AcOEt 98:2 → Hexan/AcOEt 90:10) gereinigt. **96** (9.5 g, 68%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

DC (Hexan/AcOEt 1:1): R_f 0.90. $[\alpha]_D^{25} = +108$ ($c = 0.89$, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 0.077, 0.085 (2s, 6H, SiMe_2^tBu); 0.85 - 0.92 (m, 9H, SiMe_2^tBu); 1.73 (dd, $J = 10.6$, 11.5, H-C(3)); 2.07 - 2.14 (m, 2H, H'-C(3), OH); 3.44 - 3.53 (m, 2H, H-C(4), H-C(5)); 3.63 - 3.70 (m, 1H, H-C(2)); 3.72 - 3.82 (m, 1H, H'-C(5)); 4.53, 4.81 (2d, $J = 11.6$, OCH_2Ph); 4.75 (d, $J = 3.7$, H-C(1)); 7.26 - 7.40 (m, 5 arom. H). Einstrahlungsexperimente: 4.75 → 3.64 (dt). D_2O -Austausch: 2.11 (1H, dt); 3.64 (dt). Einstrahlungsexperimente (mit D_2O -Austausch): 3.64 → 4.75 (s), 2.11 (d). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 17.3 (s, $\text{Si}(\text{Me}_2)\text{CMe}_3$); 25.0 (q, Me); 37.1 (t, C(3)); 63.5 (t, OCH_2Ph); 68.6 (t, C(5)); 65.2, 66.6 (2d, C(2), C(4)); 95.8 (d, C(1)); 127.3, 127.4, 127.7 (3d, arom. C); 136.8 (s, $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$). ESI⁺-MS: 339.4 (14, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 361 (18, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 356 (100).

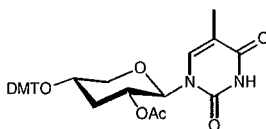


4-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-3-desoxy- α/β -D-ribofuranose 1,2-Diacetat (98**).**

Eine Lösung aus **96** (24.0 g, 71 mmol) in EtOH (200 ml) wurde unter Argon vorsichtig mit $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (4.4 g, 20% WT, Aldrich) versetzt und anschliessend unter 6 bar H_2 während 48 h bei RT gerührt. Nach Filtration über Celite, Eindampfen und Co-Evaporation mit Benzol wurde der Rückstand in Pyridin (250 ml) gelöst, mit Ac_2O (16.7 ml, 178 mmol) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit MeOH (10 ml) gequenchet, mit Toluol co-evaporiert und anschliessend auf SiO_2 (20 g) aufgetragen. Die Reinigung über CC (Silicagel (60 g), Hexan → Hexan/AcOEt 8:2) ergab **98** (16.0 g, 70 %) als farblose viskose Flüssigkeit.

DC (Hexane/AcOEt 4:1): R_f 0.65. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 0.06 - 0.08 (m, 6H, SiMe_2^tBu); 0.86 - 0.92 (m, 9H, SiMe_2^tBu); 1.62 - 1.72 (m, 0.8H, H-C(3)(α)); 1.86 (dd, 0.2H, $J = 0.2$, 11.7, H-C(3)(β)); 2.03, 2.06, 2.10, 2.16 (4s, 12H, C(O)Me); 2.28 - 2.38 (m, 1H, H'-

C(3); 3.37 - 3.92 (*m*, 3H, H-C(4), H-C(5), H'-C(5)); 4.78 (*ddd*, 0.8H, $J = 5.0, 6.9, 9.7$, H-C(2)(α)); 4.91 (*ddd*, 0.2H, $J = 3.4, 5.0, 12.4$, H-C(2)(β)); 5.65 (*d*, 0.8H, $J = 6.9$, H-C(1)(α)); 6.10 (*d*, 0.2H, $J = 3.1$, H-C(1)(β)). Einstrahlungsexperimente: 5.65 \rightarrow 4.78 (*dd*); 6.10 \rightarrow 4.91 (*dd*). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 18.0 (*s*, $\text{Si}(\text{Me}_2)\text{CMe}_3$); 20.9, 21.0 (*2q*, $\text{Si}(\text{Me}_2)^t\text{Bu}$); 25.7 (*q*, $\text{Si}(\text{Me}_2)\text{CMe}_3$); 33.6, 35.9 (*2q*, C(O)*Me*); 64.7, 65.2, 67.3, 67.9 (*4d*, C(2), C(4)); 65.3, 69.8 (*2t*, C(3), C(5)); 88.3, 93.2 (*2d*, C(1)); 169.6, 169.6, 170.2, 170.4 (*4s*, C(O)*Me*). ESI-MS: 350.4 (100, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), 682 (5, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$).

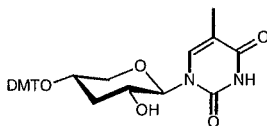


1-[3'-desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]thymine 2'-Acetat (103).

Eine Suspension aus **98** (5.60 g, 17.3 mmol) und Thymin (2.40 g, 19.1 mmol) in CH_3CN (65 ml) wurde auf 60° erwärmt, mit BSA (9.3 ml, 38.6 mmol) behandelt und 45 min bei 60° gerührt. Nachdem die klare Lösung auf 40° temperiert wurde, wurde das Reaktionsgemisch mit TMSTf (9.4 ml, 52.0 mmol) versetzt, 15 min at 40° gerührt und auf ein Gemisch aus ges. aq. $\text{NaHCO}_3/\text{AcOEt}$ 1:1 (500 ml) gegossen. Nach der Aufarbeitung nach Methode B wurde der Rückstand in CH_3CN (100 ml) gelöst, mit *conc.* HCl (5 ml) versetzt und 10 min bei RT gerührt. Das Gemisch wurde nach Methode A aufgearbeitet, mit Benzol co-evaporiert und am HV getrocknet. Anschliessend wurde das Rohprodukt in CH_2Cl_2 (70 ml) gelöst, mit DMTCl (6.5 g, 19.1 mmol), *sym.* Collidin (4.6 ml, 34.7 mmol) und AgNO_3 (3.24 g, 19.1 mmol) versetzt und 20 min bei RT gerührt. Nach Filtration über Celite, Eindampfen der Lösungsmittel und Entfernung des *sym.* Collidin durch HV-Destillation, konnte der Rückstand **103** ohne Reinigung weiterverwendet werden. Eine kleine Menge wurde zur Charakterisierung über CC gereinigt.

DC (AcOEt): $R_f = 0.50$. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 1.83 (*q*, $J = 11.5$, H-C(3')); 1.85 (*d*, $J = 0.9$, *Me*-C(5)); 1.97 (*s*, C(O)*Me*); 2.14 - 2.18 (*m*, H'-C(3')); 3.00 (*ddd*, $J = 1.9, 4.7, 10.6$, H-

C(5')); 3.21 (*t*, $J = 10.6$, H'-C(5')); 3.69 - 3.77 (*sept.*, $J = 4.8$, H-C(4')); 3.796, 3.800 (2*s*, MeO); 4.66 - 4.75 (*m*, H-C(2')); 5.48 (*d*, $J = 9.4$, H-C(1')); 6.82 - 6.86 (*m*, 4 arom. H); 6.95 (*d*, $J = 1.1$, H-C(6)); 7.25 - 7.48 (*m*, 9 arom. H); 8.30 (*s*, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 12.4 (*q*, *Me-C*(5)); 20.8 (*q*, C(O)*Me*); 36.6 (*t*, C(3')); 55.3 (*q*, MeO); 66.3, 67.1 (2*d*, C(2'), C(4')); 71.1 (*t*, C(5')); 82.1 (*d*, C(1')); 86.8 (*s*, Ar_2CPh); 111.4 (*d*, C(5)); 113.3, 127.1, 128.0, 128.3, 130.0, 130.4, 130.1 (7*d*, arom. C); 135.1 (*d*, C(6)); 136.2, 136.4, 145.2 (3*s*, arom. C); 150.4 (*s*, C(2)); 158.8 (*s*, arom. C); 163.1 (*s*, C(4)); 169.7 (*s*, C(O)*Me*). HR-MALDI-MS: 609.224 (22, $[M+\text{Na}]^+$), $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_8^+$; calc. 609.222), 303.138 (100).

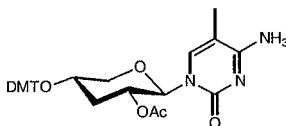


1-[3'-Desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]thymine (104).

Eine Lösung aus Rohprodukt **103** (17.3 mmol) in THF/MeOH 5:4 (450 ml) wurde auf 4° abgekühlt, 5 min mit 2M NaOH (50 ml, 100 mmol) behandelt und anschliessend mit AcOH (6 g, 100 mmol) neutralisiert. Nach Aufarbeitung nach Methode A wurde der Rückstand auf SiO_2 (20 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (30 g), $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2 + 8\% \text{ MeOH}$) gereinigt. **104** (8.6 g, 91% ausgehend von **98**) wurde als weisser Schaum erhalten.

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): R_f 0.60. $[\alpha]_D^{25} = +34$ ($c = 0.83$, CHCl_3). UV (MeOH): 265 (11100), 255 (10200), 235 (20600). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.76 (*d*, $J = 1.1$, *Me-C*(5)); 1.86 (*q*, $J = 11.6$, H-C(3')); 2.32 - 2.35 (*m*, H'-C(3')); 2.92 (*m*, H-C(5')); 3.20 (*t*, $J = 10.4$, H'-C(5')); 3.38 - 3.45 (br. *m*, H-C(2')); 3.66 - 3.73 (*m*, H-C(4')); 3.758, 3.766 (2*s*, MeO); 4.30 (br. *s*, OH); 5.36 (*d*, $J = 9.0$, H-C(1')); 6.80 - 6.84 (*m*, 4 arom. H); 6.95 (*d*, $J = 1.1$, H-C(6)); 7.18-7.51 (*m*, 9 arom. H); 10.2 (br. *s*, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 12.3 (*q*, *Me-C*(5)); 39.7 (*t*, C(3')); 55.2 (*q*, MeO); 66.9, 67.6 (2*d*, C(2'), C(4')); 70.9 (*t*, C(5')); 85.0 (*d*, C(1')); 86.6 (*s*, Ar_2CPh); 113.2, 127.0, 127.9, 128.1, 130.1, 130.2 (6*d*, arom. C); 135.6 (*d*, C(6)); 136.5,

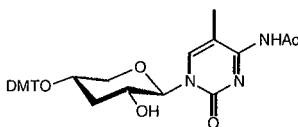
136.7, 145.5 (3s, arom. C); 151.5 (s, C(2)); 158.6, 158.7 (2s, C(O)Me); 164.0 (s, C(4)). HR-MALDI-MS: 567.209 (4, $[M+Na]^+$, $C_{31}H_{32}N_2NaO_7^+$; calc. 567.211), 303.138 (100).



1-[3'-Desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-5-methylcytosin 2'-Acetat (106).

Eine Lösung aus Rohprodukt **103** (4.2 g, 7.0 mmol) in Pyridin (20 ml) und Et_3N (13.6 ml, 98 mmol) wurde auf 4° abgekühlt, mit 1,2,4-Triazol (5.8g, 83.7 mmol) und 4-Chlorophenyl dichlorophosphat (2.3 ml, 14.1 mmol) versetzt, langsam auf RT erwärmt und 48 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit Dioxan (30 ml) verdünnt und 1 h bei RT mit aq. NH_3 (25% Lsg., 20 ml) behandelt. Nach der Entfernung des Dioxan wurde das Reaktionsgemisch nach Methode A aufgearbeitet und der Rückstand auf SiO_2 (6 g) aufgetragen. Die der Reinigung über CC (Silicagel (12 g), $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2 + 8\% MeOH$) ergab **106** (3.2 g, 78%) als gelben Schaum.

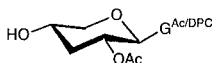
DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1): R_f 0.30. 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 1.88, 1.91 (2s, C(O)Me, Me-C(5)); 1.86 - 1.94 (m, H-C(3')); 2.14 - 2.18 (m, H'-C(3')); 2.98 (dd, $J = 3.4, 10.8$, H-C(5')); 3.23 (t, $J = 10.8$, H'-C(5')); 3.69 - 3.76 (sept., $J = 5.3$, H-C(4')); 3.786, 3.789 (2s, MeO); 4.66 - 4.75 (m, H-C(2')); 5.70 (d, $J = 9.3$, H-C(1')); 6.82 - 6.86 (m, 4 arom. H); 7.02 (s, H-C(6)); 7.20 - 7.48 (m, 9 arom. H); 8.17 (s, NH_2). ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) 13.2 (q, Me-C(5)); 20.8 (q, C(O)Me); 36.7 (t, C(3')); 55.3 (q, MeO); 66.5, 67.2 (2d, C(2'), C(4')); 71.7 (t, C(5')); 82.1 (d, C(1')); 86.7 (s, Ar_2CPh); 102.9 (d, C(5)); 113.2, 126.7, 127.1, 127.9, 128.0, 128.4, 130.4, 130.1 (8d, arom. C); 136.3, 136.5 (2s, arom. C); 137.9 (d, C(6)); 145.3 (s, arom. C); 156.3 (s, C(2)); 158.7 (s, arom. C); 165.5 (s, C(4)); 170.0 (s, C(O)Me). HR-MALDI-MS: 608.235 (25, $[M+Na]^+$, $C_{33}H_{35}N_3NaO_7^+$; calc. 608.238), 303.133 (100).



*N*⁴-Acetyl-1-[3'-desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-*D*-ribofuranosyl]- 5-methylcytosine (**105**).

Eine Lösung aus **106** (2.65 g, 4.5 mmol) in THF/MeOH 5:4 (90 ml) wurde auf 4° abgekühlt, mit 2M NaOH (10 ml, 20 mmol) versetzt, 10 min bei 4° gerührt, mit AcOH (1.2 g, 20 mmol) neutralisiert, eingengt auf 20 ml und nach Methode A aufgearbeitet. Der Rückstand wurde in DMF (20 ml) gelöst, mit Ac₂O (425 µl, 4.5 mmol) versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Nach der Aufarbeitung nach Methode A wurde das DMF durch Destillation am HV entfernt. Der Rückstand wurde auf SiO₂ (5 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (12 g), CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂ + 6% MeOH) gereinigt. Man erhielt **105** (1.88 g, 71%) als gelblichen Schaum.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); *R*_f 0.20. [α]_D²⁵ = + 71 (c = 0.80, CHCl₃). UV (MeOH): 305 (6600), 290 (5500), 282 (6300) 269 (5800), 236 (26000). ¹H-NMR (400 MHz, (D₆)DMSO): 1.55 (*q*, *J* = 11.5, H-C(3')); 1.84 - 1.89 (*m*, 4H, Me-C(5), H'-C(3')); 2.22 (*br. s*, 3H, C(O)Me); 2.96 (*dd*, *J* = 2.9, 9.8, H-C(5')); 3.10 (*t*, *J* = 10.6, H'-C(5')); 3.51 - 3.59 (*m*, H-C(2')); 3.60 - 3.68 (*m*, H-C(4')); 3.743, 3.747 (2*s*, MeO); 5.17 (*d*, *J* = 6.1, H-C(1')); 5.27 (*br. d*, *J* = 8.2, OH); 6.91 - 6.94 (*m*, 4 arom. H); 7.22 - 7.45 (*m*, 9 arom. H); 7.75 (*s*, H-C(6)); 9.75 (*br. s*, NH). ¹³C-NMR (100 MHz, (D₆)DMSO): 13.2 (*q*, Me-C(5)); 24.8 (*q*, C(O)Me); 55.0 (*q*, MeO); 64.9, 66.4 (2*d*, C(2'), C(4')); 69.9 (*t*, C(5')); 85.5 (*d*, C(1')); 85.8 (*s*, Ar₂CPh); 105.7 (*d*, C(5)); 113.2, 126.7, 127.6, 127.8, 128.2, 129.6, 129.7 (7*d*, arom. C); 136.1, 136.3 (2*s*, arom. C); 143.3 (*d*, C(6)); 145.5 (*s*, arom. C); 154.6 (*s*, C(2)); 158.2 (*s*, arom. C); 162.3 (*s*, C(4)); 170.5 (*s*, C(O)Me). HR-MALDI-MS: 608.236 (1, [M+Na]⁺, C₃₃H₃₅N₃NaO₇⁺; calc. 608.238), 303.137 (100).



*N*²-Acetyl-9-[-3'-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-O⁶-(diphenylcarbamoyl)guanine 2'-O-Acetat (**109**).

Eine Lösung aus **98** (9.8 g, 30.4 mmol) und *N*²-Acetyl-O⁶-diphenylcarbamoylguanin (14.7 g, 39.5 mmol) in (CH₂Cl)₂ (105 ml) wurde auf 60° erwärmt, mit BSA (19.3 ml, 79 mmol) versetzt und 45 min bei 60° gerührt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel eingedampft und der Rückstand in Benzol (105 ml) gelöst. Die Mischung wurde auf 45° erwärmt, mit TESTf (11.7 ml, 51.6 mmol) versetzt, 90 min bei 45° gerührt und auf ein Gemisch aus ges. aq. NaHCO₃ /AcOEt (1:1) (500 ml) gegossen und nach Methode B aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde in einer Lösung aus TEAF·2H₂O (27.8 g, 150 mmol) und AcOH (2.0 ml, 35 mmol) in CH₃CN (150 ml) gelöst und 20 min RT gerührt. Nach der Aufarbeitung nach Methode A wurde das Rohprodukt auf SiO₂ (30 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (75 g), CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂ + 8% MeOH), gereinigt. Man erhielt als **109** (9.13 g, 55%) orangen Schaum.

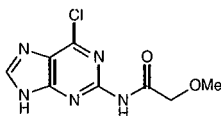
DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): *R*_f 0.65. [α]_D²⁵ = + 9 (c = 0.71, CHCl₃). UV (MeOH): 277 (12400), 267 (11500), 254 (sh, 16400), 225 (31800). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.77 (*q*, *J* = 10.9, H-C(3')); 1.86 (*s*, O(C)OMe); 2.35 (*br. s*, OH); 2.57 (*s*, NHC(O)Me); 2.66 - 2.71 (*m*, H'-C(3')); 3.47 (*t*, *J* = 9.7, H-C(5')); 4.06 - 4.14 (*m*, 2H, H-C(4'), H'-C(5')); 5.43 (*ddd*, *J* = 4.7, 9.0, 10.9, H-C(2')); 5.55 (*d*, *J* = 9.0, H-C(1')); 7.23 - 7.44 (*m*, 10 arom. H); 8.03 (*s*, H-C(8)); 8.09 (*s*, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 20.7, 25.2 (2*q*, OC(O)Me, NHC(O)Me); 37.8 (*t*, C(3')); 64.1, 67.8 (2*d*, C(2'), C(4')); 72.1 (*t*, C(5')); 83.0 (*d*, C(1')); 120.9 (*s*, C(5)); 128.5, 129.5 (2*d*, arom. C); 141.9 (*s*, arom. C); 142.3 (*d*, C(8)); 150.6 (*s*, OC(O)NPh₂); 152.6 (*s*, C(2)); 155.3 (*s*, C(4)); 156.5 (*s*, C(6)); 169.7, 171.3 (2*s*, NHC(O)Me, OC(O)Me). HR-MALDI-MS: 569.173 (100, [M+Na]⁺, C₂₇H₂₆N₆NaO₇⁺; calc. 569.176).



*N*²-Acetyl-9-[3'-desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]guanine (**112**).

Zu einer Lösung aus **109** (4.05 g, 7.4 mmol) in CH₂Cl₂ (30 ml) wurde *sym.* Collidin (2.0 ml, 15 mmol), AgNO₃ (1.39 g, 8.2 mmol) und DMTCI (2.77 g, 8.2 mmol) zugegeben, 30 min bei RT gerührt, über Celite filtriert und nach Methode A aufgearbeitet. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus NaNO₂ (4.14 g, 60 mmol) in DMSO (60 ml) aufgenommen und 4 h bei 75° gerührt. Nach der Aufarbeitung nach Methode A konnten das *sym.* Collidin und das DMSO durch Hochvakuumdestillation entfernt werden. Das Rohprodukt wurde in THF/MeOH 5:4 (135 ml) gelöst, auf 4° abgekühlt, mit 2M NaOH (15 ml) versetzt und nach 8 min mit AcOH (1.7 ml, 30 mmol) neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 40 ml eingeeengt, aufgearbeitet nach Methode A und auf SiO₂ (12 g) aufgetragen. Reinigung über CC (Silicagel(24 g), CH₂Cl₂ (+ 2% Et₃N) → CH₂Cl₂ + 7% MeOH (+ 2% Et₃N)) und nachfolgende Extraktion (ges. aq. NaHCO₃/CH₂Cl₂) ergab **112** (2.17 g, 48 %) als gelben Schaum.

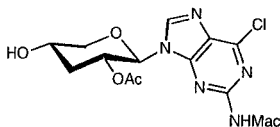
DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): *R*_f 0.50. [α]_D^{25°} = - 4 (c = 0.83, CHCl₃). UV (MeOH): 280 (sh, 12700), 274 (13100), 270 (12900), 256 (sh, 17200), 236 (25900). ¹H-NMR (400 MHz, (D₆)DMSO): 1.56 (*q*, *J* = 11.2, H-C(3')); 1.94 - 1.99 (*m*, H'-C(3')); 2.17 (*s*, C(O)*Me*); 2.98 (*dd*, *J* = 2.6, 10.8, H-C(5')); 3.11 (*t*, *J* = 10.7, H'-C(5')); 3.68 (*sept.*, *J* = 4.8, H-C(4')); 3.745, 3.750 (*2s*, ArOMe); 3.96 (*br. s*, H-C(2')); 5.00 (*d*, *J* = 9.1, H-C(1')); 5.32 (*br. s*, OH); 6.92 - 6.95 (*m*, 4 arom. H); 7.21 - 7.47 (*m*, 9 arom. H); 8.05 (*s*, H-C(8)); 11.9 (*br. s*, 2H, 2 NH). ¹³C-NMR (100 MHz, (D₆)DMSO): 23.7 (*q*, C(O)*Me*); 45.6 (*t*, C(3')); 55.0 (*q*, MeOAr); 65.0, 66.4 (*2d*, C(2'), C(4')); 69.82 (*t*, C(5')); 84.9 (*d*, C(1')); 85.9 (*s*, Ar₂CPh); 113.3 (*d*, arom. C); 119.9 (*s*, C(5)); 126.77, 127.57, 127.88, 129.66, 129.70 (*5d*, arom. C); 136.10, 136.29 (*2s*, arom. C); 138.1 (*d*, C(8)); 145.5 (*s*, arom. C); 147.7, 148.9, 154.8 (*3s*, C(2), C(4), C(6)); 158.2 (*s*, arom. C); 173.4 (*s*, C(O)*Me*). HR-MALDI-MS: 634.230 (1, [M+Na]⁺, C₃₃H₃₃N₅NaO₇⁺; calc. 569.176), 303.138 (100).



N-(6-Chloro-9H-purin-2-yl)-2-methoxyacetamid (**118**).

Eine Suspension aus 6-Chloro-9H-purin-2-amin (**119**, 15 g, 88 mmol) und (MeOCH₂C(O))₂O (28.7 g, 177 mmol) in *N,N*-Dimethylacetamide (120 ml) wurde während 20 min bei 120° gerührt, auf RT abgekühlt und dann mit H₂O (50 ml) versetzt. Nachdem das Gemisch 10 min. gerührt wurde, wurde das Wasser eingedampft, filtriert und der Rückstand mit Toluol (30 ml) gewaschen. Der Feststoff wurde in EtOH (120 ml) suspendiert, 5 min rückflusiert und kristallisierte beim langsamen Abkühlen auf RT. Filtration und Waschen mit EtOH (15 ml) ergab **118** (12.2 g, 57%) als feine farblose Kristalle.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); R_f 0.40. ¹H-NMR (300MHz, (D₆)DMSO): 4.19 (s, CH₂); 8.48 (s, H-C(8)); 9.52 (s, H-N(9)); 13.7 (br. s, NH-C(2)); (MeO-Signal verdeckt durch H₂O).

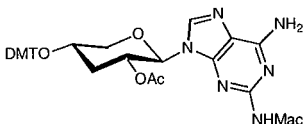


6-Chloro-9-[3'-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-N²-(methoxyacetyl)-9H-purin-2-amin 2'-Acetat (**122**).

Eine Lösung aus **98** (7.7g, 23.5 mmol) und **118** (6.34 g, 26.2 mmol) in CH₃CN (100 ml) wurde auf 60° erwärmt, mit BSA (12.8 ml, 52.5 mmol) versetzt und 20 min bei 60° gerührt. Die klare Lösung wurde auf 45° temperiert, mit TESTf (9.2 ml, 40.7 mmol) versetzt, 50 min bei 45° gerührt und auf ein Gemisch aus ges. aq. NaHCO₃/AcOEt 1:1 (500 ml) gegossen. Nach der Aufarbeitung nach Methode B wurde der erhaltene Rückstand in einer Lösung aus TEAF·2H₂O (33.3 g, 180 mmol) und AcOH (5.1 ml, 90 mmol) in CH₃CN (180 ml) gelöst und 3.5 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde nach Methode A aufgearbeitet, der Rückstand auf SiO₂ (25 g) aufgetragen und über CC (Silicagel 110 g, CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂ + 5% MeOH) gereinigt. Man erhielt **122** (6.33 g, 66%) als gelben Schaum.

DC (AcOEt): *R_f* 0.10. $[\alpha]_D^{25} = +21$ (*c* = 0.88, CHCl₃). UV (MeOH): 285 (7200), 268 (5100), 256 (7400), 240 (5500), 227 (17400). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.83 (*s*, C(O)Me); 1.88 (*q*, *J* = 11.5, H-C(3')); 2.68 - 2.73 (*m*, H'-C(3')); 3.40 (*br. s*); 3.54 (*s*, OMe); 3.58 (*q*, *J* = 10.5, H-C(5')); 4.14 (*s*, CH₂OMe); 4.11 - 4.20 (*m*, 2H, H-C(4'), H'-C(5')); 5.39 (*ddd*, *J* = 4.8, 9.1, 11.5, H-C(2')); 5.80 (*d*, *J* = 9.1, H-C(1')); 8.19 (*s*, H-C(8)); 9.16 (*s*, NH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 20.6 (*q*, OMe); 37.8 (*t*, C(3')); 59.4 (*q*, C(O)Me); 64.1, 68.1 (*2d*, C(2'), C(4')); 72.05, 72.21 (*2t*, C(5'), CH₂OMe); 82.5 (*d*, C(1')); 128.5 (*s*, C(5)); 142.9 (*d*, C(8)); 151.4, 152.8 (*2s*, C(2), C(4)); 167.6 (*s*, C(O)CH₂OMe); 169.5 (*s*, C(6)).

HR-MALDI-MS: 422.084 (100, [M+Na]⁺, C₁₅H₁₈ClN₅NaO₆⁺; calc. 422.085).

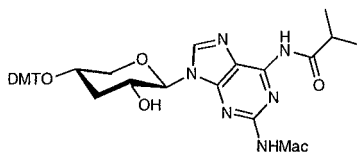


9-[3'-Desoxy-4'-O-dimethoxytrityl- β -D-ribofuranosyl]-N²-(methoxyacetyl)-9H-purin-2,6-diamin 2'-Acetat (**126**).

Eine Lösung aus **122** (6.27 g, 15.7 mmol), DMTCI (5.84 g, 17.2 mmol), *sym.* Collidin (4.2 ml, 31.4 mmol) und AgNO₃ (2.66 g, 15.7 mmol) in CH₂Cl₂ (55 ml) wurde 30 min. bei RT gerührt. Nach Filtration über *Celite*, Eindampfen und Co-evaporation mit Toluol wurde der Rückstand in Pyridine (70 ml) gelöst. Nach der Zugabe von NaN₃ (2.04 g, 31.4 mmol) wurde das Gemisch 3 h bei 65° gerührt, auf RT abgekühlt, mit PPh₃ (6.2 g, 23.5 mmol) versetzt und 45 min bei RT gerührt. Nach Aufarbeitung nach Methode C wurde der Rückstand in einer Lösung aus MeOH/THF/IM TEAAc 5:4:2 (220 ml) aufgenommen und bei 65° über Nacht gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf 60 ml eingeeengt wurde, wurde nach Methode A aufgearbeitet, das Rohprodukt auf SiO₂ (30 g) aufgetragen und über CC (Silicagel (100 g), CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂ + 5% MeOH) gereinigt. Man erhielt **126** (8.29 g, 77%) als gelben Schaum.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): *R_f* 0.80. $[\alpha]_D^{25} = +17$ (*c* = 1.06, CHCl₃). UV (MeOH): 271 (17600), 266 (sh, 17300), 251 (12700), 225 (42700). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.80 (*s*, C(O)Me); 1.89 (*q*, *J* = 11.8, H-C(3')); 2.30 - 2.33 (*m*, H'-C(3')); 3.02 (*ddd*, *J* = 1.8, 4.9, 11.3, H-C(5')); 3.27 (*t*, *J* = 11.1, H'-C(5')); 3.46 (*s*, CH₂OMe); 3.784, 3.789 (2*s*, ArOMe); 3.87 (*sept.*, *J* = 5.1, H-C(4')); 4.39 (*br. s*, 2H, C(O)CH₂OMe); 5.21 (*br. m*, H-C(2')); 5.37 (*br. d*, *J* = 7.9, H-C(1')); 6.10 (*br. s*, 2H, NH₂); 6.83 - 6.87 (*m*, 4 arom. H); 7.21 - 7.56 (*m*, 9 arom. H); 7.71 (*s*, H-C(8)); 9.1 (*br. s*, NH). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 20.6 (*q*, C(O)Me); 36.8 (*t*, C(3')); 55.185, 55.189 (2*q*, ArOMe); 59.2 (*q*, CH₂OMe); 66.2, 67.7 (2*d*, C(2'), C(4')); 71.0 (*t*, C(5')); 73.0 (*br. t*, C(O)CH₂OMe); 82.5 (*br. d*, C(1')); 86.8 (*s*, Ar₂CPh); 113.31, 113.36 (2*d*, arom. C); 116.5 (*s*, C(5)); 127.0, 128.40, 128.50, 132.01, 132.09 (5*d*, arom. C); 136.11, 136.36 (2*s*, arom. C); 137.9 (*d*, C(8)); 145.2 (*d*, arom. C); 150.2, 152.6, 156.4 (3*s*,

C(2), C(4), C(6)); 158.75, 158.77 (2s, arom. C); 169.2 (s, OCOMe). HR-MALDI-MS: 705.265 (1, $[M+Na]^+$, $C_{36}H_{38}N_6NaO_9^+$; calc. 705.265), 303.138 (100).



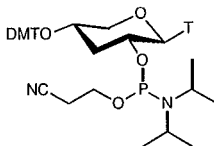
9-[3'-Desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-N⁶-isobutyryl-N²-(methoxyacetyl)-9H-purin-2,6-diamin (**127**).

Eine Lösung aus **126** (8.18 g, 12.0 mmol), DMAP (73 mg, 0.6 mmol) und Isobutyrylchloride (1.40 g, 13.2 mmol) in CH_2Cl_2 /Py 5:1 (50 ml) wurde 1 h bei RT gerührt und nach Methode C aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde in THF/EtOH 5:4 (144 ml) gelöst, auf 4° abgekühlt, mit 2M NaOH (16 ml) versetzt und nach 5 min mit AcOH (2 ml) neutralisiert. Das Gemisch wurde auf 30 ml eingengt, nach Methode A aufgearbeitet und der Rückstand auf SiO_2 (15 g) aufgetragen. Die Reinigung über CC (Silicagel (60 g), $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2 + 5\%$ MeOH) und Kristallisation MeOH/ CH_2Cl_2 2:3 (40 ml) ergab **127** (6.7g, 79 %) als weisses Pulver.

Für eine bessere Reinigung wurde zu einer Lösung aus **127** (1.95 g, 2.74 mmol) in CH_2Cl_2 (11 ml) *sym.* Collidin (1270 μl, 9.6 mmol) und Trimethylsilyl chloride (524 μl, 4.15 mmol) zugefügt, die Mischung 2 h bei RT gerührt, nach Methode C aufgearbeitet und über CC (Silicagel (25 g), Hexan/AcOEt 8:2 \rightarrow (5:5) gereinigt. Das TMS-Addukt wurde in einer Lösung aus TEAF·2H₂O (3.70 g, 20 mmol) und AcOH (600 mg, 10 mmol) in CH_3CN (20 ml) aufgenommen, 10 min. bei RT gerührt und nach Methode C aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde auf SiO_2 (5 g) aufgetragen, über CC (Silicagel (20 g), $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2 + 4\%$ MeOH) gereinigt und ergab **127** (1.22 g, 65%) als weissen Schaum.

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 19:1): R_f 0.35. $[\alpha]_D^{25} = +54$ (c = 0.85, $CHCl_3$).

UV (MeOH): 284 (13900), 270 (11000), 233 (47900). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.21, 1.25 (*dd*, *J* = 6.8, CHMe₂); 2.06 (*q*, *J* = 12.0, H-C(3')); 2.53 - 2.56 (*m*, H'-C(3')); 2.66 (*sept.*, *J* = 6.9, CHMe₂); 2.87 (*dd*, *J* = 3.2, 11.3, H-C(5')); 3.23 (*t*, *J* = 10.7, H'-C(5')); 3.58 (*s*, CH₂OMe); 3.783, 3.791 (*2s*, ArOMe); 3.81 - 3.88 (*m*, H-C(4')); 3.92 - 3.98 (*m*, H-C(2')); 4.02, 4.22 (*2d*, *J* = 15.5, C(O)CH₂OMe); 5.38 (*d*, *J* = 8.8, H-C(1')); 6.16 (*d*, *J* = 5.5, OH); 6.84 - 6.87 (*m*, 4 arom. H); 7.21 - 7.54 (*m*, 9 arom. H); 7.76 (*s*, H-C(8)); 8.91, 9.58 (*2s*, 2 NH). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 18.92, 19.44 (*2q*, CMe₂); 36.6 (*d*, C(O)CHMe₂); 39.1 (*t*, C(3')); 55.2 (*q*, MeOAr); 59.7 (*q*, CH₂OMe); 66.9, 68.5 (*2d*, C(2'), C(4')); 70.5 (*t*, C(5')); 72.7 (*t*, CH₂OMe); 85.8 (*d*, C(1')); 86.6 (*s*, Ar₂CPh); 113.27, 113.31 (*2d*, arom. C); 117.6 (*s*, C(5)); 127.0, 127.94, 128.18, 130.11, 130.22, 136.59, 136.86 (*5d*, arom. C); 136.59, 136.86 (*2s*, arom. C); 140.5 (*d*, C(8)); 145.6 (*s*, arom. C); 148.3, 151.70, 151.91 (*3s*, C(2), C(4), C(6)); 158.69, 158.71 (*2s*, arom. C); 168.6 (*br. s*, C(O)CH₂OMe); 175.4 (*s*, C(O)CHMe₂). HR-MALDI-MS: 733.295 (2, [M+Na]⁺, C₃₈H₄₂N₆NaO₈⁺; calc. 733.296), 303.139 (100).

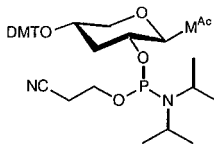


1-[3'-Desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]thymine 2'-(2-Cyanoethyl diisopropylphosphoramidit) (**129**).

Zu einer Lösung aus **104** (2.0 g, 3.65 mmol) in CH₂Cl₂ (15 ml) wurden nacheinander ⁱPr₂NEt (1.56 ml, 9.11 mmol) und CIP(NⁱPr₂)OCH₂CH₂CN (1.14g, 4.8 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde 4 h bei RT gerührt und anschliessend direkt über CC (Silicagel (35 g), Hexan/AcOEt 4:1 (+ 2% Et₃N) → 2:3 (+ 2% Et₃N)) gereinigt. **129** (2.09 g, 77%) wurde als weisser Schaum (1:1 Diastereoisomerengemisch) erhalten.

DC (Hexan/AcOEt 1:4): *R_f* 0.80, 0.75. UV (MeCN): 263 (12400), 257 (12200), 236 (23200). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.01, 1.08, 1.10, 1.11 (*4d*, 12H, *J* = 6.8, CHMe₂);

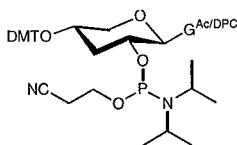
1.820, 1.832 (2q, 1H, $J = 11.4$, H-C(3')); 1.86, 1.88 (2d, 3H, $J = 1.2$, Me-C(5)); 2.16 - 2.19, 2.24 - 2.26 (2m, 1H, H-C(5')); 2.43 - 2.58 (m, 2H, OCH₂CH₂CN); 2.97, 3.00 (2ddd, 1H, $J = 2.1, 5.0, 11.0$, H-C(5')); 3.20 (t, $J = 10.7$, H'-C(5')); 3.43 - 3.75 (m, 6H, OCH₂CH₂CN, H-C(2'), H-C(4')); 3.788, 3.789, 3.793, 3.796 (3s, 6H, MeO); 5.41 (d, $J = 8.9$, H-C(1')); 6.82, 6.87 (m, 4 arom. H); 6.97, 6.98 (2d, 1H, $J = 1.2$, H-C(6)); 7.20 - 7.50 (m, 9 arom. H); 8.59 (br. s, NH). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 12.33, 12.38 (2q, Me-C(5)); 22.33, 22.39 (2t, OCH₂CH₂CN); 24.27, 24.34, 24.42, 24.47, 24.51, 24.55, 24.61 (7q, CHMe₂); 39.17, 39.39 (2t, C(3')); 55.22, 55.25 (2q, MeO); 57.5, 58.1 (2t, $J(\text{C,P}) = 18$, OCH₂CH₂CN); 66.44, 66.51 (2d, C(4')); 68.2, 69.1 (2d, $J(\text{C,P}) = 12, 15$, C(2')); 70.97, 71.04 (2t, C(5')); 83.9 (s, C(1')); 86.51, 86.61 (2s, Ar₂CPh); 110.85, 110.97 (2s, C(5)); 113.3 (d, arom. C); 117.58, 117.67 (2s, CN); 126.97, 127.02, 127.93, 128.02, 128.07, 130.07, 130.15, 130.21 (8d, arom. C); 135.4, 135.7 (2d, C(6)); 136.39, 136.47, 136.55, 136.61, 145.40, 145.49 (6s, arom. C); 150.46, 150.60 (2s, C(2)); 162.6 (s, arom. C); 163.30, 163.43 (2s, C(4)). ³¹P-NMR: 149.62, 148.08. HR-MALDI-MS: 767.318 (1, [M+Na]⁺, C₄₀H₄₉N₄NaO₈P⁺; calc. 767.319), 303.139 (100).



*N*⁴-Acetyl-1-[3'-desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-5-methylcytosine 2'-
(2-Cyanoethyl)diisopropylphosphoramidite (**130**).

Wie beschrieben für **129**, mit **105** (1.85 g, 3.16 mmol), CH₂Cl₂ (12 ml), ⁱPr₂N⁺Et (1.08 ml, 6.33 mmol) und CIP(NⁱPr₂)(OCH₂CH₂CN) (900 mg, 3.8 mmol). CC (Silicagel (40 g), Hexan/AcOEt 4:1 (+ 2% Et₃N) → 3:7 (+ 2% Et₃N)) ergab **130** (1.65 g, 67%) als gelben Schaum (1:1 Diastereoisomerengemisch).

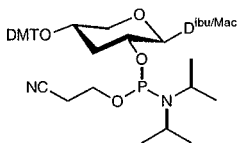
DC (Hexan/AcOEt 3:7): R_f 0.30, 0.50. UV (MeCN): 309 (10400), 268 (5300), 236 (25800). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, (D_6) DMSO): 0.84, 1.018, 1.027, 1.050 (*4d*, $J = 6.7$, CHMe_2); 1.687, 1.698 (*2q*, $J = 11.5$, $\text{H-C}(3')$); 1.868, 1.962 (2 br. *s*, $\text{Me-C}(5)$); 1.95 - 2.02 (*m*, $\text{H}^1\text{-C}(3')$); 2.60, 2.745, 2.754 (*3t*, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 2.94, 2.99 (2 br. *d*, $J = 8.0$, $\text{H-C}(5')$); 3.20, 3.24 (*2t*, $J = 10.5$, $\text{H}^1\text{-C}(5')$); 3.34 - 3.62 (*m*, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, CHMe_2); 3.70 - 3.75 (*m*, $\text{H-C}(4')$); 3.742, 3.747, 3.749 (*3s*, OMe); 3.80 - 3.90, 3.91 - 4.00 (*2m*, 1H, $\text{H-C}(2')$); 5.48 (br. *s*, $\text{H-C}(1')$); 6.89 - 6.94 (*m*, 4 arom. H); 7.22 - 7.46 (*m*, 9 arom. H); 7.83 (br. *s*, $\text{H-C}(6)$); 9.80 (br. *s*, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, (D_6) DMSO): 13.2 (*q*, $\text{Me-C}(5)$); 19.52, 19.69 (*2t*, $J(\text{C},\text{P}) = 7$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 23.80, 23.96, 24.04, 24.26 (*4t*, $J(\text{C},\text{P}) = 7$, CHMe_2); 39.0 (*t*, $\text{C}(3')$); 42.36, 42.42 (*2d*, $J(\text{C},\text{P}) = 12$, NCHMe_2); 54.96, 54.99 (*2q*, MeO); 57.77, 58.27 (*2t*, $J(\text{C},\text{P}) = 18$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 66.06, 66.15 (*2d*, $\text{C}(4')$); 67.7, 68.5 (*2t*, $\text{C}(2')$); 69.73, 69.82 (*2t*, $\text{C}(5')$); 84.1 (*d*, $\text{C}(1')$); 85.68, 85.88 (*2s*, Ar_2CPh); 105.8 (*s*, $\text{C}(5)$); 113.23, 113.25 (*2d*, arom. C); 118.60, 118.83 (*2s*, CN); 127.51, 127.56, 127.82, 127.85, 126.74 (*5d*, arom. C); 136.03, 136.09, 136.13, 136.20 (*4s*, arom. C); 142.9, 143.2 (*2d*, $\text{C}(6)$); 145.42, 145.44 (*2s*, arom. C); 154.3 (*s*, $\text{C}(2)$); 158.2 (*s*, arom. C); 162.3 (*s*, $\text{C}(4)$); 170.6 (*s*, $\text{C}(\text{O})\text{Me}$). $^{31}\text{P-NMR}$: 149.66, 148.20. FAB-MS (NOBA, pos. mode): 786.4 (5, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 303.1 (100).



N^2 -Acetyl-9-[3'-desoxy -4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) - β -D-ribofuranosyl]guanine 2'-(2-Cyanoethyl)diisopropylphosphoramidit (**131**).

Wie beschrieben für **129**, mit **112** (2.30 g, 3.75 mmol), CH_2Cl_2 (15 ml), $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (1.6 ml, 9.4 mmol) und $\text{CIP}(\text{N}^i\text{Pr}_2)(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})$ (1160 mg, 4.9 mmol). CC (Al_2O_3 (100 g, act. III), Hexan/AcOEt 4:1 \rightarrow AcOEt, dann $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10) ergab **131** (1.77 g, 58%), als weissen Schaum (1:1 Diastereoisomerengemisch).

DC (AcOEt); R_f 0.30, 0.35. UV (MeCN): 280 (sh, 10400), 275 (10600), 268 (9800), 259 (sh, 14000), 237 (22200). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 0.76, 0.98, 1.02, 1.03 (4*d*, 12H, $J = 6.8$, CHMe_2); 1.77, 1.79 (2*q*, $J = 11.4$, H-C(3')); 2.19 - 2.24 (*m*, 1H, H'-C(3')); 2.24 - 2.26 (2*s*, 3H, C(O)Me); 2.31 - 2.45, 2.57 - 2.60 (2*m*, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 3.12 - 3.37 (*m*, 5H, H-C(4'), H-C(5'), H'-C(5'), CHMe); 3.51 - 3.76, 3.81 - 3.88 (2*m*, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 3.781, 3.784, 3.786, 3.790 (4*s*, MeO); 4.02 - 4.06, 4.22 - 4.56 (2*m*, 1H, H-C(2')); 5.06, 5.13 (2*d*, 1H, $J = 8.9$, H-C(1')); 6.82 - 6.87 (*m*, 4 arom. H); 7.20 - 7.51 (*m*, 9 arom. H); 7.67, 7.71 (2*s*, 1H, H-C(8)); 8.89, 9.05 (2 br. *s*, 1H, H-N(2)); 11.95 (br. *s*, 1H, H-N(1)). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): 20.05, 20.47 (2*t*, $J(\text{C,P}) = 7$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 24.03, 24.10, 24.21, 24.37, 24.41, 24.46, 24.54 (7*q*, CHMe_2); 39.51, 39.57 (2*t*, C(3')); 42.91, 43.01 (2*d*, $J(\text{C,P}) = 2.4$, CHMe_2); 55.22, 55.26 (2*q*, MeO); 57.2, 57.8 (2*t*, $J(\text{C,P}) = 20, 18$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 66.38 (*d*, $J(\text{C,P}) = 11$, C(4')); 69.10, 69.16 (2*d*, $J(\text{C,P}) = 15$, C(2')); 71.08 (*t*, $J(\text{C,P}) = 5$, C(5')); 84.71, 86.67 (2*d*, $J(\text{C,P}) = 5$, C(1')); 113.3 (*s*, Ar_2CPh); 117.82, 118.01 (2*s*, CN); 121.1, 121.5 (2*s*, C(5)); 126.69, 127.05, 127.94, 127.96, 128.00, 128.04, 130.09, 130.16, 130.18, 130.22 (10*d*, arom. C); 136.34, 136.47, 136.48, 136.55 (4*s*, arom. C); 137.6, 138.0 (2*d*, C(8)); 145.44, 145.54 (2*s*, arom. C); 146.98, 147.26, 148.43, 148.59, 155.59 (5*s*, C(2), C(4), C(6)); 158.72, 158.76 (2*s*, arom. C); 171.80, 171.85 (2*s*, C(O)Me). $^{31}\text{P-NMR}$: 148.90, 148.63. HR-MALDI-MS: 834.335 (3, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{NaO}_8\text{P}^+$; calc. 834.336), 303.139 (100).



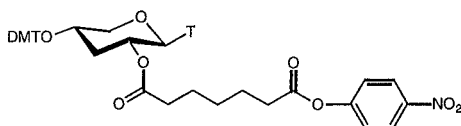
9-[3'-Desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-N⁶-isobutryl-N²-

(methoxyacetyl)-9H-purin-2,6-diamin 2'-(2-Cyanoethyl-diisopropylphosphoramidite) (**132**).

Wie beschrieben für **129**, mit **127** (1.30 g, 1.83 mmol), CH₂Cl₂ (7.5 ml), ⁱPr₂NEt (630 μ l, 3.66 mmol) and ClP(NⁱPr₂)(OCH₂CH₂CN) (520 mg, 2.2 mmol). CC (Silicagel (30 g), Hexan/AcOEt 4:1 (+ 2% Et₃N) \rightarrow 3:7 (+ 2% Et₃N)) ergab **132** (1.42 g, 86%) als weissen Schaum (1:1 Diastereoisomerengemisch).

DC (Hexan/AcOEt 1:4); *R*_f 0.20, 0.25. UV (MeCN): 284 (16300), 270 (12900), 234 (49700). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.63, 0.96, 1.01, 1.02 (4d, *J* = 6.8, 11H, CHMe₂); 1.25 - 1.28 (m, CHMe₂); 1.88, 1.90 (2q, *J* = 9.7, H-C(3')); 2.23 - 2.28 (m, 0.5H, H'-C(3')); 2.309, 2.315 (2t, 1H, *J* = 6.2, OCH₂CH₂CN); 2.40 (br. s, 0.5H, H'-C(3')); 2.549, 2.553, 2.746, 2.752 (4t, 1H, *J* = 6.0, OCH₂CH₂CN); 3.08 - 3.35 (m, 6H, H-C(5'), H'-C(5'), OCH₂CH₂CN, NCHMe₂); 3.500, 3.503 (2s, 3H, C(O)CH₂OMe); 3.51 - 3.58, 3.63 - 3.69 (2m, 1H, C(O)CHMe₂); 3.758, 3.789, 3.791, 3.797 (4s, 6H, ArOMe); 3.85, 3.88 (2 sept., *J* = 5.3, H-C(4')); 4.03 - 4.15 (m, 1H, H-C(2')); 4.17 - 4.23 (m, 2H, C(O)CH₂OMe); 5.37, 5.39 (2d, *J* = 8.9, H-C(1')); 6.83 - 6.87 (m, 4 arom. H); 7.05 - 7.52 (m, 9 arom. H); 7.95, 8.00 (2s, H-C(8)); 8.10, 8.69 (2 br. s, NH); 8.94, 9.00 (2s, NH). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 19.14, 19.16, 19.20 (3q, C(O)CHMe₂); 19.95, 20.10, 20.30 (3t, *J*(C,P) = 7, OCH₂CH₂CN); 23.83, 23.90, 24.32, 24.34, 24.37, 24.40, 24.43, 24.49 (8q, NCHMe₂); 35.67, 35.85 (2d, C(O)CHMe₂); 39.48, 39.51 (2t, C(3')); 42.95, 43.05 (2d, *J*(C,P) = 12, NCHMe₂); 55.209, 55.245, 55.252 (3q, ArOMe); 57.6, 57.8, 58.1 (3t, *J*(C,P) = 5, 18, 19, OCH₂CH₂CN); 59.4, (q, CH₂OMe); 66.37, 66.42 (d, C(4')); 69.4, 70.3 (2t, *J*(C,P) = 15, C(2')); 71.09, 71.41 (2t, C(5')); 72.5 (t, CH₂OMe); 84.13, 84.37 (2d, C(1')); 86.16, 86.64 (2s, Ar₂CPh); 113.3 (d, arom. C); 117.5 (s, CN); 118.6, 118.8 (2s, C(5)); 126.99, 127.03, 127.95, 128.03, 128.08, 130.09, 130.17, 130.2 (8d, arom. C); 136.37, 136.45, 136.53, 136.60 (4s, arom. C); 140.42,

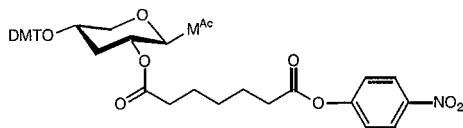
140.68 (*d*, C(8)); 145.43, 145.52 (2*s*, arom. C); 149.49, 149.58, 151.72, 151.75, 152.56, 152.93 (6*s*, C(2), C(4), C(6)); 158.7 (br. *s*, C(O)CH₂OMe); 176.35, 176.64 (2*s*, C(O)CHMe₂). ³¹P-NMR: 149.45, 148.63. FAB-MS (NOBA, pos. mode): 911.5 (15, [M+H]⁺), 303.1 (100).



1-[3'-Desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]thymine 2'-(4-Nitrophenylheptandioat) (133).

Zu einer Lösung aus **104** (200 mg, 0.37 mmol) und ¹Pr₂NEt (63 μl, 0.37 mmol) in Pyridin (5.5 ml) wurden Bis(4-nitrophenyl) pimelat (1180 mg, 2.94 mmol) und DMAP (45 mg, 0.37mmol) zugegeben. Nach 14 h rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch nach Methode C aufgearbeitet und über CC (Silicagel (5 g), Hexan/AcOEt 8:2 → 2:8) gereinigt. Man erhielt **133** (165 mg, 55%) als gelblichen Schaum.

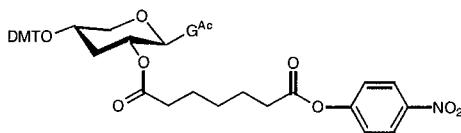
DC (Hexan/AcOEt 3:7): *R_f* 0.70. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.28 - 1.36 (*m*, CH₂); 1.44 - 1.65 (*m*, CH₂); 1.67 - 1.81 (*m*, H-C(3'), CH₂); 1.91 (*d*, *J* = 2.0, Me-C(5)); 2.10 - 2.18 (*m*, H'-C(3')); 2.25, 2.24 (2*t*, *J* = 7.3, 2 CH₂); 3.03 (ddd, *J* = 2.1, 5.0, 11.1, H-C(5')); 3.21 (*t*, *J* = 10.7, H'-C(5')); 3.75 (*sept.*, *J* = 4.7, H-C(4')); 3.793, 3.795 (2*s*, MeO); 4.71 (ddd, *J* = 4.9, 9.3, 11.6, H-C(2')); 5.49 (*d*, *J* = 9.3, H-C(1')); 6.65 - 6.87 (*m*, 4 arom. H); 6.99 (*d*, *J* = 1.2, H-C(6)); 7.20 - 7.44 (*m*, 9 arom. H); 7.45 - 7.47 (*m*, 2 arom. H); 8.23 - 8.25 (*m*, 2 arom. H). 9.08 (br. *s*, NH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 12.4 (*q*, Me-C(5)); 24.2, 24.32, 28.22, 33.75, 33.94 (5*t*, CH₂); 36.6 (*t*, C(3')); 55.3 (*q*, MeO); 66.25, 67.1, (2*d*, C(2'), C(4')); 71.1 (*t*, C(5')); 82.2 (*d*, C(1')); 86.8 (*s*, Ar₂CPh); 111.3 (*s*, C(5)); 113.35, 113.38, 115.7, 122.5, 125.2, 127.1, 128.0, 130.0 (8*d*, arom. C); 135.4 (*d*, C(6)); 136.2, 145.22, 145.28 (3*s*, arom. C); 150.5 (*s*, C(2)); 155.5 (*s*, arom. C); 163.7 (*s*, C(4)); 171.1, 171.2, (2*s*, C(O)). HR-MALDI-MS: 830.297 (85, [M+Na]⁺, C₄₄H₄₅N₃NaO₁₂⁺; calc. 830.290), 814.300 (100).



*N*⁴-Acetyl-1-[3'-desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]- 5-methylcytosine 2'-(4-Nitrophenylheptandioat) (**134**).

Wie beschrieben für **133**, mit **105** (179 mg, 0.31 mmol), ¹Pr₂NEt (157 μl, 0.92 mmol), Pyridin (4.5 ml), Bis(4-nitrophenyl) pimelat (860 mg, 2.14 mmol) und DMAP (37 mg, 0.31 mmol). CC (Silicagel (4 g), Hexan/AcOEt 8:2 → 1:9) ergab **134** (180 mg, 68%) als gelblichen Schaum.

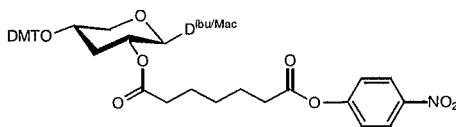
DC (AcOEt): *R*_f 0.80. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.28 - 1.34 (*m*, CH₂); 1.51 - 1.58 (*m*, CH₂); 1.67 - 1.76 (*m*, CH₂); 1.82 - 1.90 (*m*, H-C(3')); 1.91 (*d*, *J* = 1.0, Me-C(5)); 2.09 - 2.18 (*m*, H-C(3')); 2.24 (*t*, *J* = 7.4, CH₂); 2.38 (*br. s.*, C(O)Me); 2.56 (*t*, *J* = 7.5, CH₂); 3.03 (*ddd*, *J* = 2.1, 5.0, 11.3, H-C(5')); 3.23 (*t*, *J* = 10.7, H'-C(5')); 3.76 (*sept.*, *J* = 5.2, H-C(4')); 3.796, 3.797 (*2s*, MeO); 4.69 (*ddd*, *J* = 4.9, 9.2, 11.5, H-C(2')); 5.60 (*d*, *J* = 9.2, H-C(1')); 6.83 - 6.86 (*m*, 4 arom. H); 7.16 (*s*, H-C(6)); 7.23 - 7.38 (*m*, 9 arom. H); 7.45 - 7.47 (*m*, 2 arom. H); 8.24 - 8.28 (*m*, 2 arom. H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 13.5 (*q*, Me-C(5)); 24.2, 24.3, 28.2, 33.79, 33.91 (*5t*, CH₂); 36.6 (*t*, C(3')); 55.2 (*q*, MeO); 66.3, 67.8 (*2d*, C(2'), C(4')); 71.1 (*t*, C(5')); 82.7 (*d*, C(1')); 86.8 (*s*, Ar₂CPh); 102.0 (*s*, C(5)); 113.34, 113.37, 115.7, 122.44, 122.47, 125.19, 125.20, 127.1, 128.0, 130.02, 130.08 (*11d*, arom. C); 136.18, 136.38 (*2s*, arom. C); 138 (*br. s.*, C(6)); 145.22, 145.28 (*2s*, arom. C); 151.1, 159.4 (*2 br. s.*, C(2), C(4)); 155.5, 158.80, 158.81 (*3s*, arom. C); 171.05, 171.16, 172.5 (*3s*, C(O)). FAB-MS (NOBA, pos. mode): 849.4 (4, [M+H]⁺), 303.1 (100).



*N*²-Acetyl-9-[3'-desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-guanine 2'-(4-Nitrophenyl)heptanedioate (**135**).

Wie beschrieben für **133**, mit **112** (210 mg, 0.34 mmol), ⁱPr₂NEt (236 μl, 1.40 mmol), Pyridin (5.5 ml), Bis(4-nitrophenyl) pimelat (1100 mg, 2.75 mmol) und DMAP (42 mg, 0.34 mmol). CC (Silicagel (4 g), Hexan/AcOEt 8:2 → AcOEt) ergab **135** (165 mg, 55%) als gelben Schaum.

DC (AcOEt): *R*_f 0.75. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.10 - 1.08 (*m*, CH₂); 1.34 - 1.46 (*m*, CH₂); 1.66 - 1.83 (*m*, 3H, H-C(3'), CH₂); 2.02 - 2.18 (*m*, CH₂); 2.20 - 2.27 (*m*, H'-C(3')); 2.24 (*s*, C(O)Me); 2.52 (*t*, *J* = 7.4, CH₂); 3.06 (*ddd*, *J* = 1.8, 5.0, 11.4, H-C(5')); 3.23 (*t*, *J* = 10.7, H'-C(5')); 3.78, 3.79 (2*s*, OMe); 3.87 (*sept.*, *J* = 5.1, H-C(4')); 5.14 - 5.22 (*m*, H-C(2')); 5.20 (*s*, H-C(1')); 6.83 - 6.86 (*m*, 4 arom. H); 7.20 - 7.40 (*m*, 9 arom. H); 7.46 - 7.48 (*m*, 2 arom. H); 7.66 (*s*, H-C(8)); 8.22 - 8.27 (*m*, 2 arom. H); 9.17 (*br. s*, NH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 24.07 (*t*, CH₂); 24.29 (C(O)Me); 24.35, 27.7, 33.59, 33.77 (4*t*, CH₂); 36.9 (*t*, C(3')); 55.3 (*q*, OMe); 66.1, 67.5 (2*d*, C(2'), C(4')); 71.1 (*t*, C(5')); 82.9 (*t*, C(1')); 86.9 (*s*, Ar₂CPh); 113.40, 113.43 (2*d*, arom. C); 121.3 (*s*, C(5)); 122.4, 122.5, 125.2, 127.1, 127.9, 128.0, 130.0 (7*d*, arom. C); 136.1, 136.3 (2*s*, arom. C); 137.3 (*d*, C(8)); 145.3 (*s*, arom. C); 147.6, 148.0 (2*s*, C(2), C(4)); 158.9 (*s*, arom. C); 171.1, 171.6, 171.7 (3*s*, C(O)). HR-MALDI-MS: 897.305 (77, [M+Na]⁺, C₄₆H₄₆N₆NaO₁₂⁺; calc. 897.307), 881.311 (100).



9-[3'-Desoxy-4'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-N⁶-isobutryryl-N²-(methoxyacetyl)-9H-purine-2,6-diamin 2'-(4-nitrophenylheptanedioate) (**136**).

Wie beschrieben für **133**, mit **127** (148 mg, 0.22 mmol), ¹Pr₂NEt (150 μ l, 0.88 mmol), Pyridin (3.2 ml), Bis(4-nitrophenyl)pimelat (700 mg, 1.74 mmol) und DMAP (26 mg, 0.22 mmol), CC (Silicagel (3.5 g), Hexan/AcOEt 8:2 \rightarrow 1:9) ergab **136** (120 mg, 56%) als gelben Schaum.

DC (Hexan/AcOEt 3:7); *R_f* 0.60. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.05 - 1.13 (*m*, CH₂); 1.24 (*d*, *J* = 6.8, CHMe₂); 1.34 (*sept.*, *J* = 7.1, CH₂); 1.51 - 1.59 (*m*, CH₂); 1.92 (*q*, *J* = 11.5, H-C(3')); 1.99 - 2.13 (*m*, CH₂); 2.22 - 2.25 (*m*, H'-C(3')); 2.47 (*t*, *J* = 7.5, CH₂); 3.08 (*ddd*, *J* = 2.0, 5.0, 11.3, H-C(5')); 3.22 (*br. s.*, CHMe₂); 3.32 (*t*, *J* = 10.1, H'-C(3')); 3.499 (*s.*, C(O)CH₂OMe); 3.791, 3.795 (*2s.*, MeOAr); 3.88 (*sept.*, *J* = 5.0, H-C(4')); 4.13 (*s.*, C(O)CH₂OMe); 5.13 (*ddd*, *J* = 4.8, 9.4, 11.5, H-C(2')); 5.53 (*d*, *J* = 9.4, H-C(1')); 6.84 - 6.87 (*m*, 4 arom. H); 7.22 - 7.32 (*m*, 5 arom. H); 7.36 - 7.40 (*m*, 2 arom. H); 7.46 - 7.49 (*m*, 2 arom. H); 7.91 (*s.*, H-C(8)); 8.23 - 8.26 (*m*, 2 arom. H); 8.60, 8.94 (2 *br. s.*, NH). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): 19.13, 19.17 (2*q.*, CHMe₂); 24.14, 24.39, 27.97, 33.56, 33.84 (5*t.*, CH₂); 36.0 (*d.*, CHMe₂); 36.8 (*t.*, C(3')); 55.2 (*q.*, MeOAr); 59.4 (*q.*, MeOCH₂); 66.2, 68.0 (2*d.*, C(2'), C(4')); 71.1, 72.5 (2*t.*, C(5'), C(O)CH₂OMe); 82.1 (*d.*, C(1')); 86.9 (*s.*, Ar₂CPh); 113.38, 113.41 (2*d.*, arom. C); 118.6 (*s.*, C(5)); 122.47, 125.18, 127.1, 128.0, 130.1 (5*d.*, arom. C); 136.2, 136.4 (2*s.*, arom. C); 140.0 (*d.*, C(8)); 145.3 (*s.*, arom. C); 149.6, 151.9, 152.6 (3*s.*, C(2), C(4), C(6)); 155.4, 158.8 (2*s.*, arom. C); 167.7 (*br. s.*, C(O)CH₂OMe); 170.9, 171.8 (2*s.*, C(O)); 176.1 (*s.*, C(O)CHMe₂). FAB-MS (NOBA, pos. mode): 974.6 (5, [M+H]⁺), 303.1 (100).

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

Ac	Acetyl
AF	Acriflavin
AIBN	α,α' -Azo-isobutyronitril
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bn	Benzyl
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
BSA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
Bz	Benzoyl
CC	Column Chromatography (Säulenchromatographie)
CD	Circular Dichroism
Clac	Chloracetyl
DC	Dünnschichtchromatographie
DMA	Dimethylacetamid
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DME	Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DPC	<i>N,N</i> -Diphenylcarbamoyl
FMN	Flavin-mononukleotid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HV	Hochvakuum

ibu	Isobutyryl
ⁱ Pr	Isopropyl
LCAA-CPG	Long-chain-alkylamino controlled pore glass
Mac	Methoxyacetyl
MD-Simulation	Molecular Dynamics Simulation
Ms	Mesyl
NCS	Neocarzinostatin
NCSi	Uebergangszustandsanalogoes des NCS-Diradikals im DNA-Bulge
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
PAC	Phenoxyacetyl
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Phenyl
RT	Raumtemperatur
SG	Schutzgruppe
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	^t Butyl-dimethylsilyl
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEAF	Tetraethylammoniumfluorid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TESOTf	Triethylsilyl-trifluormethansulfonat
TfO	Triflat
TMB	2,2,3,3-Tetramethoxybutan
TMC	1,1,2,2-Tetramethoxycyclohexan
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat
TOM	[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl

6.2 Literatur

- [1] J. Watson, F. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [2] W. Saenger, 'Principles of Nucleic Acid Structure', Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1988.
- [3] D. Voet, J. Voet, 'Biochemistry', John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1995.
- [4] R. Letsinger, K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4801.
- [5] A. Michelson, A. Todd, *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632.
- [6] J. Marugg, N. Piel, L. McLaughlin, M. Tromp, G. Veeneman, G. v. d. Marcl, J. v. Boom, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 8639.
- [7] R. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5319.
- [8] H. Khorana, *Pure Appl. Chem.* **1968**, *17*, 349.
- [9] R. Hall, A. Todd, R. Webb, *J. Chem. Soc.* **1957**, 5291.
- [10] M. Kabachnik, V. Potapov, A. Shabarova, M. Prokov'ef, *Doklady Akademii Nauk SSSR* **1971**, *201*, 858.
- [11] R. Letsinger, J. Finnan, G. Heavner, W. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278.
- [12] M. Matteucci, M. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *130*, 3185.
- [13] B. Griffin, C. Reese, *Tetrahedron Lett.* **1964**, *5*, 2925.
- [14] C. Lehmann, Y.-Z. Xu, C. Christoduoluo, Z. Tan, M. Gait, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 2379.
- [15] B. Beijer, I. Sulston, B. Sproat, P. Rider, A. Lamond, P. Neuner, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 5143.
- [16] K. Ogilvie, N. Usman, K. Nicoghosian, R. Cedergren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5746.
- [17] S. Scaringe, F. Wincott, M. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11820.

- [18] M. Schwartz, R. Breaker, G. Asteriadis, J. DeBear, G. Gough, *Bioorg. Med. Chem.* **1992**, *2*, 1019.
- [19] S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2286.
- [20] A. Stutz, C. Höbartner, S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2477.
- [21] S. Pitsch, P. Weiss, L. Jenny, A. Stutz, X. Wu, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3773.
- [22] L. Marky, J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601.
- [23] F. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561.
- [24] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. Moore, T. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 905; D. Lilley, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 31.
- [25] M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 324.
- [26] D. Patel, A. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, A. Kumar, S. Nonin, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 645.
- [27] P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1084.
- [28] A. Ellington, J. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [29] M. Sassanfar, J. Szostak, *Nature* **1993**, *364*, 550.
- [30] P. Fan, A. Suri, R. Fiala, D. Live, D. Patel, *J. Mol. Biol.* **1996**, *258*, 480.
- [31] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849.
- [32] K. Kruger, P. Grabowski, A. Zaug, J. Sands, D. Gottsching, T. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147.
- [33] R. Symons, *Ann. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 641.
- [34] T. Cech, A. Zaug, P. Grabowski, *Cell* **1981**, *27*, 487.
- [35] O. Uhlenbeck, *Nature* **1987**, *328*, 596.
- [36] A. Hampel, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **1998**, *58*, 1.
- [37] C. Wilson, J. Szostak, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 749.
- [38] C. Frauendorf, A. Jäschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1378.
- [39] J. Lorsch, J. Szostak, *Chem. Res.* **1996**, *29*, 103.
- [40] K. Chapman, J. Szostak, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 325.
- [41] X. Dai, A. D. Mesmaeker, G. Joyce, *Science* **1995**, *267*, 237.
- [42] P. Lohse, J. Szostak, *Nature* **1996**, *381*, 442.

- [43] J. Prudent, T. Uno, P. Schultz, *Science* **1994**, 264, 1924.
- [44] F. Huang, Z. Yang, M. Yarus, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 669.
- [45] C. Wilson, J. Szostak, *Nature* **1995**, 374, 777.
- [46] T. Tarasow, S. Tarasow, B. Eaton, *Nature* **1997**, 389, 54.
- [47] M. Conn, J. Prudent, P. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7012.
- [48] W. Gilbert, *Nature* **1986**, 319, 618.
- [49] S. Benner, A. Ellington, A. Tauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 7054.
- [50] G. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 5845.
- [51] S. Dahm, O. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1991**, 30, 9464.
- [52] M. Amarzguioui, H. Prydz, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 1175.
- [53] A. Burgin, C. Gonzalez, J. Matulic-Adamic, A. Karpeisky, N. Usman, J. McSwiggen, L. Beigelmann, *Biochemistry* **1996**, 35, 14090.
- [54] V. DeRose, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 961.
- [55] Y. Takagi, M. Warashina, W. Stec, K. Yoshinari, K. Taira, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1815.
- [56] W. Scott, A. Klug, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 220.
- [57] W. Lott, B. Pontius, P. v. Hippel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 542.
- [58] H. Pley, D. Lindes, C. DeLuca-Flaherty, D. McKay, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 19656.
- [59] H. Pley, K. Flaherty, C. McKay, *Nature* **1994**, 372, 68.
- [60] W. Scott, J. Finch, A. Klug, *Cell* **1995**, 81, 991.
- [61] J. Murray, W. Scott, *J. Biol. Chem.* **2000**, 296, 33.
- [62] X. Wu, 'Synthesis of 5'-C- and 2'-O-Substituted Oligoribonucleotide Analogues and Evaluation of their Pairing Properties', Diss No. 13567, ETH Zürich, 2000.
- [63] E. Lesnik, C. Guinosso, A. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. Cummins, D. Ecker, P. Cook, S. Freier, *Biochemistry* **1993**, 32, 7832.
- [64] T. Keller, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 884.
- [65] E. Rozners, R. Strömberg, *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16, 967.
- [66] R. Bertram, C. Hayes, P. Soutanas, *Biochemistry* **2002**, 41, 7725.

- [67] A. D. Mesmaeker, A. Waldner, S. Wendeborn, R. Wolf, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 437.
- [68] J.-L. Imbach, B. Rayner, F. Morvan, *Nucleosides & Nucleotides* **1989**, *8*, 627.
- [69] F. Debart, B. Rayner, J.-L. Imbach, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3537.
- [70] C. Cheong, I. Tinoco, A. Chollet, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*,
- [71] A. Karpeisky, C. Gonzalez, A. Burgin, L. Beigelmann, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1131.
- [72] Y. Maurinsh, W. Pfeleiderer, *Nucleosides & Nucleotides* **1996**, *15*, 431.
- [73] M. Endo, Y. Saga, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5879.
- [74] C. Schneider, S. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 453.
- [75] B. Keller, C. Leumann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2278.
- [76] A. Koshkin, J. Wengel, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2778.
- [77] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchhardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.
- [78] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *284*, 2118.
- [79] M. Beier, F. Reck, T. Wagner, R. Krishnamurty, A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *283*, 699.
- [80] X. Wu, G. Delgado, R. Krishnamurty, A. Eschenmoser, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1283.
- [81] S. Pitsch, S. Wendeborn, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2161.
- [82] R. Micura, R. Kudick, S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 680.
- [83] I. Schlönvogt, S. Pitsch, C. Lesueur, A. Eschenmoser, B. Jaun, R. Wolf, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2316.
- [84] X. Wu, S. Guntha, M. Ferencic, R. Krishnamurty, A. Eschenmoser, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1279.
- [85] X. Wu, S. Pitsch, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 921.
- [86] X. Wu, S. Pitsch, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4315.
- [87] S. Pitsch, R. Krishnamurty, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesueur, I. Schlönvogt, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1621.

- [88] J. Minsaas, *Ann.* **1934**, 512, 286.
- [89] M. Haque, T. Kikuchi, K. Yoshimoto, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 2243.
- [90] G. Gough, T. Miller, N. Mantick, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 981.
- [91] S. Angyal, V. Pickles, *Aust. J. Chem.* **1972**, 25, 1695.
- [92] G. Kotowycz, R. Lemieux, *Chem. Rev.* **1973**, 73, 669.
- [93] C. Bishop, F. Cooper, *Can. J. Chem.* **1963**, 41, 2743.
- [94] D. Ward, S. Jeffs, P. Coe, R. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6779.
- [95] K. Bischofberger, R. Hall, *Carbohydr. Res.* **1975**, 42, 175.
- [96] K. Takeo, Y. Murata, S. Kitamura, *Carbohydr. Res.* **1992**, 224, 311.
- [97] H. Fletcher, R. Ness, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 760.
- [98] P. Rylander, 'Best Synthetic Methods', Academic Press, 1985, p. 157.
- [99] C. McCloskey, 'Advances in Carbohydrate Chemistry', Academic Press, 1957, p. 148.
- [100] H. Vorbrüggen, B. Bennau, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1279.
- [101] H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, 14, 421.
- [102] R. Jain, R. Vig, R. Rampal, E. Chandrasekaran, K. Matta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 12123; S. Cai, S. Hakomori, T. Toyokuni, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3431.
- [103] R. Zou, M. Robins, *Can. J. Chem.* **1987**, 1436.
- [104] P. Nahar, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7253.
- [105] A. Stutz, S. Pitsch, *Synlett* **1999**, S1, 930.
- [106] J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 259.
- [107] V. Butkus, S. Klimasauskas, L. Petrauskiene, Z. Maneliene, A. Janulaitis, L. Minchenkova, A. Schyolkina, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 8467.
- [108] S. Iacono, J. Rasmussen, in 'Org. Synth. Coll.' 1990, 7, p. 139
- [109] S. Iacono, J. Rasmussen, *Org. Synth.* **1986**, 64, 57.
- [110] K. Sato, T. Hoshi, Y. Kajihara, *Chem. Lett.* **1992**, 1469.
- [111] R. Russell, T. Weigel, O. Han, H. Liu, *Carbohydr. Res.* **1990**, 201, 95.

- [112] L. Hall, D. Miller, *Carbohydr. Res.* **1976**, *47*, 299.
- [113] E. Barrette, L. Goodman, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 176.
- [114] B. Rondot, T. Durand, J. Girard, J. Rossi, L. Schio, S. Khanapure, J. Rokach, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8245.
- [115] A. Cimpoia, P. Hunter, C. Evans, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 1115.
- [116] J. Utille, P. Vottero, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 241.
- [117] S. Pitsch, 'Zur Chemie von Glykolaldehydphosphat: seine Bildung aus Oxirancarbonitril und seine Aldolisierung zu den (racemischen) Pentose-2,4-diphosphaten und Hexose-2,4,6-triphosphaten', Diss No. 10055, ETH Zürich, 1993.
- [118] J. Montchamp, F. Tian, M. Hart, J. Frost, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3897.
- [119] S. Ley, H. Priepe, S. Warriner, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2410.
- [120] P. Grice, S. Ley, J. Pietruszka, H. Priepe, S. Warriner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 351.
- [121] S. Hanessian, T. Liak, B. Vanasse, *Synthesis* **1981**, 369.
- [122] W. Pearlman, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 1663.
- [123] M. Anwer, A. Spatola, *Synthesis* **1980**, 929.
- [124] R. Ferrier, D. Prasad, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 7425.
- [125] R. Ferrier, D. Prasad, A. Rudowski, I. Sangster, *J. Chem. Soc.* **1964**, 3330.
- [126] S. Deng, B. Yu, Y. Lou, Y. Hui, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 202.
- [127] C. Ballou, S. Roseman, K. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1140.
- [128] A. Fürst, P. Plattner, in 'XIIIth Int. Congr. of Pure & Appl. Chem.' New York, 1951.
- [129] J. Zhang, M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8375; B. Cuenoud, F. Casset, D. Hüskén, F. Natt, R. Wolf, K. Altmann, P. Martin, H. Moser, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1350; W. Sung, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3623.
- [130] E. Swayze, Y. Sanghui, *Synlett* **1997**, *7*, 859.
- [131] M. Reddy, N. Hanna, F. Farooqui, *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, *16*, 1589.
- [132] R. Fathi, B. Goswami, P. Kung, B. Gaffney, R. Jones, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 319.
- [133] P. Herdewijn, A. V. Aerschot, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 855.

- [134] S. Gryaznov, R. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2489.
- [135] T. Kamimura, M. Tsuchiya, K. Urakami, K. Koura, M. Sekine, K. Shinozaki, K. Miura, T. Hata, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4552.
- [136] M. Hagen, S. Chladek, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3189.
- [137] J. Sutherland, N. Whitfield, *Tetrahedron* **1997**, 53, 11595.
- [138] P. Garner, J. Yoo, R. Sarabu, *Tetrahedron* **1992**, 48, 4259.
- [139] B. Gillis, *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 1027.
- [140] C. Chaix, D. Molko, R. Téoule, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 71.
- [141] M.-O. Ebert, 'Strukturbestimmung nicht-natürlicher Nukleinsäuren mit Hilfe der NMR-Spektroskopie', Diss No. 15123, ETH Zürich, 2003.
- [142] M.-O. Ebert, D. Ackermann, S. Pitsch, B. Jaun, *Chimia* **2001**, 55, 852.
- [143] W. Scott, P. Hünenberger, I. Tironi, A. Mark, S. Billeter, J. Fennen, A. Torda, T. Huber, P. Krüger, W. v. Gunsteren, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 3596.
- [144] L. Kappen, I. Goldberg, *Biochemistry* **1999**, 38, 235.
- [145] Z. Xi, Q. Mao, I. Goldberg, *Biochemistry* **1999**, 38, 4342.
- [146] Z. Xi, G. Jones, G. Qabaja, J. Wright, F. Johnson, I. Goldberg, *Org. Lett.* **1999**, 1, 1375.
- [147] A. Stassinopoulos, J. Ji, X. Gao, I. Goldberg, *Science* **1996**, 272, 1943.
- [148] M. Fedor, O. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1668.
- [149] M. Warashina, D.-M. Zhou, T. Kuwabara, K. Taira, in 'Comprehensive Natural Products Chemistry', Eds. D. Barton and K. Nakashini, Pergamon, 1998, 6, p. 235.
- [150] R. Schroeder, C. Waldsich, H. Wank, *EMBO J.* **2000**, 19, 1.
- [151] F. Walter, Q. Vicens, E. Westhof, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 694.
- [152] H. Wang, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8734.
- [153] H. Wang, Y. Tor, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 117.
- [154] D. Earnshaw, M. Gait, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 5551.
- [155] B. Clouet-d'Orval, T. Stage, O. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1995**, 34, 11186.
- [156] T. Hermann, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1998**, 276, 903.
- [157] R. Kuimelis, L. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11019.

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei *Prof. Dr. Stefan Pitsch* für die interessante Aufgabenstellung und die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an meinen langjährigen Arbeitskollegen *Alfred Stutz* für das äusserst angenehme Arbeitsklima sowie die vielen anregenden Gespräche während und ausserhalb der Arbeitszeit.

Ein weiterer Dank geht an *Thomas Honegger, Dr. Xiaolin Wu, Philipp Wenter, Sebastien Porcher, Cyrille Denaire* und *Dr. Meyyappan Muthuppalaniapan* für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei *Patrick Weiss (Xeragon AG)* für seine Unterstützung und für die interessante und lehrreiche Zeit in Amerika.

Bedanken möchte ich mich bei *Prof. Dr. Bernhard Jaun (ETH Zürich)* und *Dr. Marc-Oliver Ebert (ETH Zürich)* für die gute Zusammenarbeit und die interessanten Resultate zur Strukturaufklärung der *pDNA*.

Dem *Schweizerischen Nationalfonds (SNF)* bin ich für die finanzielle Unterstützung zu grossem Dank verpflichtet (Projekt-Nr. 20-61741.00).

Lebenslauf

- 1972 Geboren am 31. März in Breitenbach SO als zweites von vier Kindern der Heidi und des Myron Ackermann
- 1979 - 1984 Primarschule in Fehren (SO)
- 1984 - 1988 Progymnasium in Laufen (BL)
- 1988 - 1993 Gymnasium in Laufen (BL)
- 1993 Matura Typus C
- 1993 - 1998 Studium in Chemie an der ETH Zürich
- 1998 Diplomabschluss als Dipl. Chem. ETH
- 1998 - 2003 Dissertation unter der Leitung von *Prof. Dr. S. Pitsch* am Institut für Organische Chemie der ETH-Zürich (1998 - 2001) und am Institut de Chimie Moléculaire et Biologique der EPF Lausanne (2001 - 2003)
- 2003 Post-Doktorat am Institut für Organische Chemie in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. R. Häner* an der Universität Bern

Publikationen

"Synthesis and Pairing Properties of 3'-Deoxyribofuranose (4'→2')-Oligonucleotides ('p-DNA')", D. Ackermann, S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 1443.

"3'-Deoxyribofuranose (4'→2')-Oligonucleotide Duplexes (=p-DNA Duplexes) as Substitutes of RNA Hairpin Structures", D. Ackermann, X. Wu, S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 1463.

"NMR Study of the p-DNA Duplex [(4'→2')-3'-Desoxyribofuranosyl-(^{m5}CGDDTT^{m5}CG)₂] and Comparison with its p-RNA Analogue", M.-O. Ebert, D. Ackermann, S. Pitsch, B. Jaun, *Chimia* **2001**, *55*, 852 - 855.

"Fast and Reliable Automated Synthesis of RNA and Partially 2'-O-Protected Precursors ('Caged RNA') Based on Two Novel, Orthogonal 2'-O-Protecting Groups", S. Pitsch, P. Weiss, X. Wu, D. Ackermann, T. Honegger, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1753.

Vorträge

"Synthesis and Pairing Properties of p-RNA Analogues", Vortrag an der Herbstversammlung 2000 der *Neuen Schweizerischen Chemischen Gesellschaft* vom 12. Oktober 2000 in Lausanne.

