

**Synthese und Optimierung von Nitroxyl Spin-
Labeln zur Analyse von Nukleinsäuren
mittels EPR und NMR**



**Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt dem Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Olga Romainczyk (geb. Frolow)
geboren in Alma-Ata (Kasachstan)

Frankfurt (Juni 2010)

vom Fachbereich 14: Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim W. Engels

2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

3. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Micura

Datum der Disputation: 12. November 2010

*Ich danke meinem Ehemann Bo Romainczyk,
meinen Eltern Katharina und Anatoli
und meiner Schwester Tatjana*

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

Hermann Hesse

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2006 bis November 2009 unter der Anleitung von Prof. Dr. J.W.Engels im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. J.W.Engels für die sehr interessante Themenstellung, für die guten Arbeitsbedingungen, die gute Betreuung und die fachlichen Anregungen bei der Durchführung dieser Aufgabe.

Dr. N.Piton gilt ein großer Dank für die Vorarbeiten, die Einführung in das Thema und die hilfreiche Unterstützung am Anfang der Doktorarbeit.

Herrn Dr. B.Endeward, I.Krstic, Prof. Dr. O.Schiemann und Prof. Dr. T.F.Prisner danke ich für den theoretischen Unterstützung bei den EPR-Auswertungen und für alle EPR-Messungen, welche in der Gruppe von Prof. Dr. T.F.Prisner unter Zusammenarbeit von Prof. Dr. O.Schiemann gemessen wurden.

Ich danke Frau Dr. J.Weigand für die wissenschaftliche Diskussion und die Unterstützung bei biochemischen Arbeiten.

Für die Durchführung der kinetischen Experimente im Diels-Alderase-Projekt danke ich A.Nierth und Prof. Dr. A.Jäschke aus Heidelberg.

Für die NMR-Messungen der Spin markierter Proben gilt mein Dank dem Prof. Dr. J.Wöhnert und Prof. Dr. H. Schwalbe und insbesondere den Mitarbeitern Dr. E.Duchard, S.Nozinovic und P.Wurm.

Für das Erstellen der MD-Simulation gilt ein großer Dank der Gruppe von Prof. Dr. G.Stock und insbesondere L.Riccardi.

Ein großer Dank gilt Frau I.Prieß und Frau H.Brill für die Anfertigung der Massenspektren. Im Rahmen der Oligonukleotiden-Massenspektren danke ich Frau Dr. U.Bahr und Herrn M.Held für die schnelle und gute Zusammenarbeit.

Für die Messung von Kristallstrukturen danke ich Dr. J.W.Bats und Frau M.Christof für das Anfertigen der Elementaranalysen.

Herrn S. Bernhard danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit an der HPLC und dem Synthesizer. Herrn Dr. G.Dürner danke ich für die HPLC-Trennungen meiner Produkte.

Frau Dr. U.Scheffer im Arbeitskreis Prof. Dr. M.Göbel danke ich für die Unterstützung bei RNA-Aufreinigung durch eine Gelelektrophorese.

Außerdem gilt ein großer Dank an Lena Wicke für die kritische Korrektur und die sinnvollen Ratschläge bei der Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Dipl. chem. Ch.Grünewald, Frau Dipl. chem. L.Wicke, Frau Dr. Dipl. chem. J.Brzezinska, Frau Dr. Dipl. chem. J.D'Onofrio, Herrn Dr. Dipl. chem. J.Haas, Frau Dr. Dipl. chem. A.Keller, Frau Dipl. ing. D.Knapp, Frau Dipl. chem. N.Nikolaus, Herrn Dr. Dipl. chem. D.Odadzic, Frau E.Rheinberger, Frau Dipl. chem. A.Sokocevic, Herrn Dr. Dipl. chem. R.Smicius, Frau Dr. Dipl. chem. G.Wittel und Frau Dipl. chem. N.Seethaler danke ich für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei dem Sonderforschungsbereich 579, der Gesellschaft Deutscher Chemiker und der Willkommstiftung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1 Oligonukleotide	3
2.2 Festphasensynthese von Oligonukleotiden.....	6
2.2.1 TBDMS-Strategie	9
2.2.2 2'-ACE [®] -Strategie.....	11
2.3 Spin-Labeln von RNA- und DNA-Basen	14
2.3.1 Chronologische Entwicklung	14
2.3.2 Synthese von iodierten RNA- und DNA-Basen	16
2.3.3 Sonogashira-Kupplung	18
2.4 Messmethoden	20
2.4.1 Elektronen-Paramagnetische-Resonanz	20
2.4.2 Kern-Magnetische-Resonanz	31
2.4.3 Optische Methoden.....	33
3 Aufgabenstellung	38
4 Eigene synthetische Arbeiten.....	41
4.1 Isotopen-markierte Spin-Label	41
4.2 Lineare biradikale Systeme	44
4.2.1 Synthese.....	45
4.2.2 Distanzbestimmungen mittels PELDOR	50
4.2.3 Zusammenfassung und Diskussion	56
4.3 Iod modifizierte Nukleotide.....	59
4.3.1 Verkürzte Synthese von 5-Iodo-Cytidin.....	59
4.3.2 Synthese von 2-Iodo-desoxy-Adenosin.....	61
4.4 Synthetisierte Oligonukleotide	65
4.4.1 Modell-RNAs	65
4.4.2 DNA/RNA-Hybride.....	76
4.4.3 HCV-IRES Domain II	90
4.4.4 UUCG-Tetra-Loop	95
4.4.5 Diels-Alderase	109
4.4.6 Neomycin-B bindendes Aptamer	116
4.4.7 Nep1-Komplex	129

5 Zusammenfassung und Ausblick	131
6 Experimenteller Teil	137
6.1 Allgemeines.....	137
6.1.1 Messmethoden/ Analysemethoden.....	137
6.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel.....	138
6.2 Lineare Systeme	140
6.3 Verkürzte Synthese von 5-Iodo-Cytidin	165
6.4 Synthese von 2-Iodo-desoxy-Adenosin	175
6.5 Oligonukleotide	194
6.5.1 Unmodifizierte Referenz-Stränge	194
6.5.2 DNA	194
6.5.3 RNA	196
6.5.4 Analytik.....	200
6.5.5 Charakterisierung der Oligonukleotide	201
7 Literatur	204
8 Anhang	211
8.1 Abkürzungen	211
8.2 Spektren.....	214
8.3 Lebenslauf	217
8.4 Publikationen.....	220
8.5 Tagungen und Vorträge.....	220
8.6 Eidesstattliche Erklärung.....	222

1 Einleitung

Nach der Identifizierung des Erbgutträgers DNA 1944^[1] wurden dessen Bestandteile und Struktur rasant aufgeklärt. Diese nachfolgende Forschung fand 1962 mit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin an Watson, Crick und Wilkins ihren Höhepunkt^[2]. Lange galt die DNA als der einzige Erbgutträger, dies änderte sich mit der vollständigen Aufklärung der Proteinsynthese. Hierbei wurde eine weitere Oligonukleotid-Klasse als Informationsträger identifiziert, die RNA.

Die Strukturelle Aufklärung der RNA verlief nicht so rasant wie im Falle der DNA und noch heute stellt diese die Forscher vor einige Schwierigkeiten. Erste strukturelle Charakterisierungen brachten die RNA-Viskositätsuntersuchungen. Diese zeigten keine einheitliche sondern eine teilweise einzelsträngige Form. Crick kam darauf hin zu der Annahme, dass die RNA zwar mit sich selbst doppelsträngige Bereiche ausbilden kann, diese aber von flexiblen einzelsträngigen Regionen unterbrochen werden^[3].

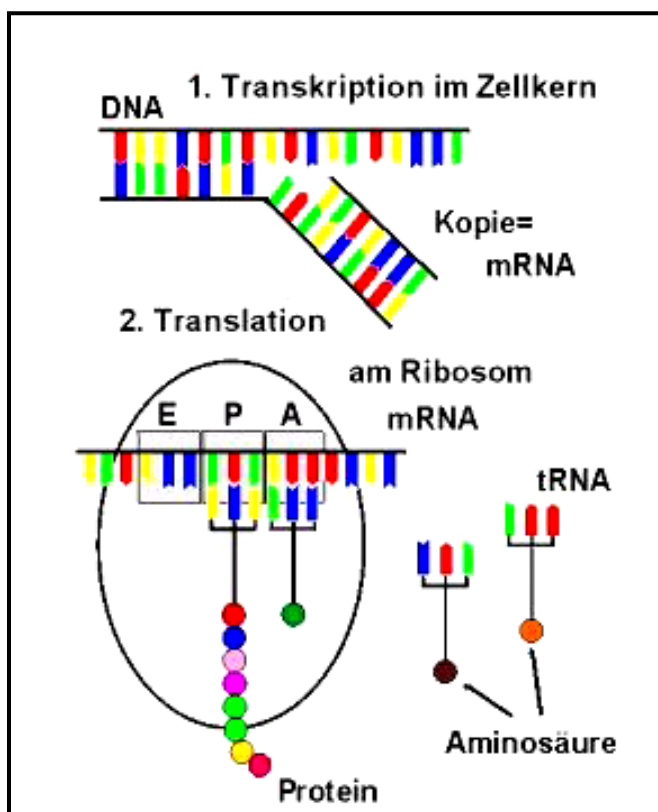


Abbildung 1: Biosynthese von Proteinen ausgehend von DNA^[5]

Im Gegensatz zur DNA ist die RNA nicht direkt ein Erbinformationsträger, doch obliegt ihr eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des Lebens^[4]. Während der Transkription entsteht die *messenger RNA (mRNA)*, welche einen komplementären Einzelstrang zum Matrix-Strang der DNA darstellt. Beruhend auf dem Bauplan der mRNA werden im Zytoplasma bei dem Vorgang der Translation die Proteine synthetisiert, welche für die Lebenserhaltung erforderlich sind.

Außer der erwähnten *messenger RNA* sind an diesem Prozess noch weitere RNA-Klassen beteiligt, wie *transfer-, ribosomale- und small nuclear RNA* (Abbildung 1)^[4].

Die Funktionalität und die Aufgabe der RNA sind noch umfangreicher als es oben beschrieben wurde, was nur vereinzelt eine Übertragung der strukturellen und biologischen Ergebnisse von einer Art auf die andere ermöglicht. Demzufolge müssen diese unterschiedlichen Klassen einzeln bezüglich ihrer Struktur und Funktion untersucht werden. Dabei ist die Struktur entscheidend, denn basierend auf dieser sind Rückschlüsse auf die Funktion möglich.

Wie oben angedeutet liegt die Funktionalität der meisten RNAs im katalytischen Bereich, was diese zu potentiellen Angriffsstellen für Therapeutika macht. Um nach einem Schloss-Schlüssel-Prinzip^[6] Pharmazeutika entwickeln zu können, bedarf es einer genaueren Darstellung des Targetmoleküls (hier RNA). Hierbei stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Durch die Anwendung der Röntgenstrukturanalyse (*X-Ray*) können je nach Auflösung Rückschlüsse auf die gesamte Struktur und Wechselwirkungen innerhalb von Target-Pharmazeutika-Komplexen gemacht werden. Mit Hilfe verschiedener Methoden der Kern-Magnetischen-Resonanz (NMR) kann die unmittelbare Umgebung einzelner Atome in der RNA und ihre Dynamik untersucht werden. Eine bewährte Methode zur Messung von Bindungsaktivitäten ist die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analyse, welche aber nur begrenzt Angaben über den strukturellen Aufbau des Oligomers zur Verfügung stellt. Zur Klasse der spektroskopischen Methoden gehört außer den erwähnten die Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR). Hierbei können sowohl Dynamiken wie auch Abstandsmessungen (Strukturbestimmungen) durchgeführt werden.

EPR wurde in den letzten 10 Jahren bevorzugt für Abstandsmessungen verwendet. Dabei werden zwei paramagnetische Moleküle, in den meisten Fällen das Pyrrolidin-Nitroxid-Radikal, so an das zu untersuchende System gebunden, dass keine Strukturveränderung erfolgt. Anschließend kann der Abstand zwischen diesen gemessen werden. Auf diese Weise wurden verschiedene Proteine (W.Hubbell, 2000^[47]) und RNA-Sorten gelabelt (W.Hubbell, 2003^[51]) und vermessen (O.Schiemann, 2003^[47]; O.Schiemann, 2004^[31]).

Aber auch die Anwendung der *continuous wave*-EPR ermöglicht die Ermittlung von strukturellen Veränderungen. So konnten Qin und Mitarbeiter die Bindungsstellen von einem GAAA-Tetra-Loop an ein Rezeptormotiv^[29] mittels Signalunterschiede ermitteln. Eine Arbeit von S.Sigurdsson *et al.*^[49] untersucht die Affinität von verschiedenen RNA-Bindern zum Fragment der TAR (*Trans-Activation Responsive*) RNA und charakterisiert ihre Bindungsstelle und –art.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Oligonukleotide

Im Jahre 1953 beschrieben James Watson und Francis Crick die Struktur der DNA (*Desoxyribonucleic acid*)^[7]. Die DNA gehört wie die RNA (*Ribonucleic acid*) zu der Klasse der Oligonukleotide. Diese bestehen aus Nucleosiden, welche als Phosphodiester miteinander verknüpft sind. Die DNA besitzt in den meisten Fällen eine Doppelstrang-Tertiärstruktur und stellt eine rechtsgängige B-Helix (Abbildung 4) dar. Durch die helikale Form und die verschiedenen Zuckerkonformationen bilden sich zwei Furchen aus, die große (*major-groove*) und die kleine Furche (*minor-groove*).

Durch ihr Vorkommen als Einzelstrang kann die RNA abgesehen von einer Doppelstrang-Struktur auch eine Vielfalt weiterer Tertiärstrukturen ausbilden. Dabei liegt der Stamm als A-Helix vor^[4].

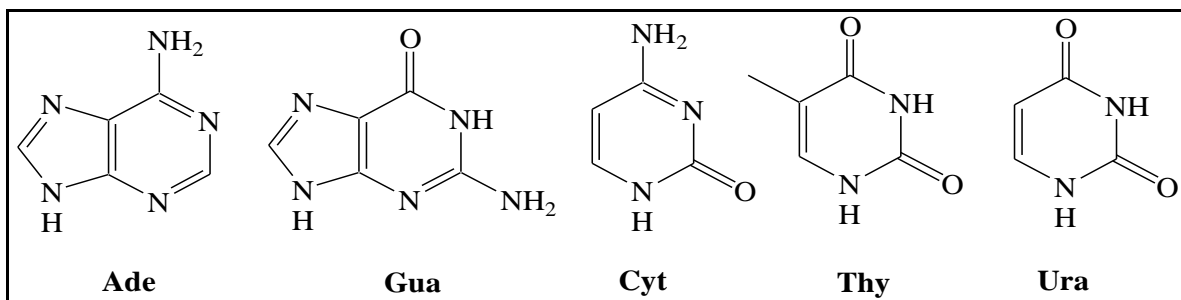


Abbildung 2: Nucleo-Basen: Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin und Uracil

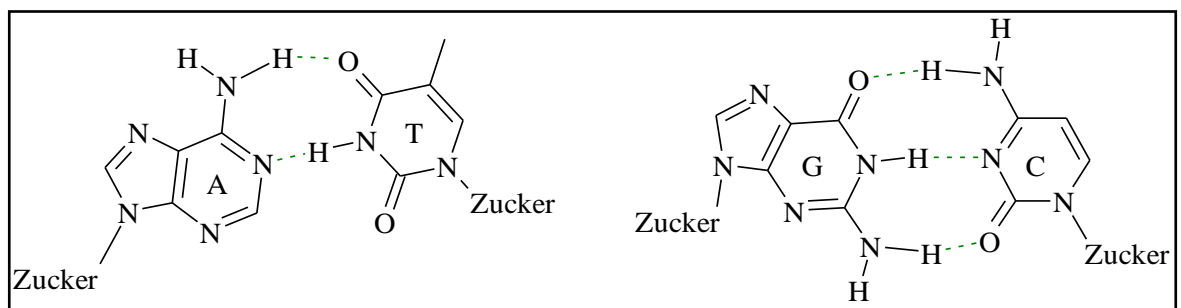


Abbildung 3: Die Watson- Crick- Basenpaarungen A-T und G-C^[4]

Die Nucleoside befinden sich in den beiden Helices innerhalb dieser und das Rückgrat wird aus den Phosphat-Resten gebildet (Abbildung 4). Die Nucleoside selbst bestehen aus der jeweiligen Furanose und binden β -glykosidisch an die entsprechende heterozyklische Base (Purin und Pyrimidin)^[7]. Dabei ist die DNA aus den Basen Adenin (**Ade**), Guanin (**Gua**), Cytosin (**Cyt**) und Thymin (**Thy**) aufgebaut, während bei der RNA sich außer den drei Basen (**Ade**, **Cyt** und **Gua**) Uracil (**Ura**) statt Thymin findet^[4] (Abbildung 2). Die native

Doppelstrang-Helix entsteht durch Watson-Crick-Basenpaarbildung, bei der DNA sind dies A-T und G-C und bei der RNA A-U und G-C-Basenpaare (siehe Abbildung 3).

Tabelle 1: Vergleich zwischen A- und B-Helixtyp (Stryer, 2003, Seite 824)

	A-Helix	B-Helix
Höhe der Basenpaare	0.23nm	0.34nm
Helixdurchmesser	2.55nm	2.37nm
Konformation der glykosidischen Bindung	<i>anti</i>	<i>anti</i>
Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung	11	10.4
Neigung der Basenpaare pro Helixachse	19°	1°
Ganghöhe	2.53nm	3.54nm
große Furche	eng und tief	breit und sehr tief
kleine Furche	sehr breit und flach	eng und sehr tief

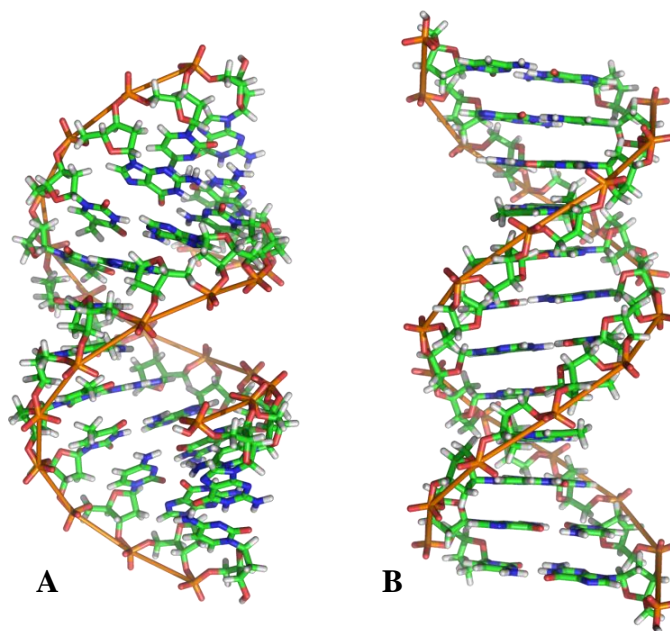


Abbildung 4: Die A- und die B-Helix-Form im Vergleich^[8]

Außer den erwähnten Basenpaarungen finden sich in Zellen noch weitere (Hoogsteen- und Wobble-Paarung). Zum Beispiel ist für die katalytische Wirkung einer RNA teilweise die Bildung einer Triple-Helix notwendig. Der dritte Strang wird dabei von der Hoogsteen-Seite gebunden (Abbildung 5), es entstehen die Hoogsteen-Basenpaarungen T-A-T oder C-G-C. Letztere werden nur mit einem protonierten Cytosin ausgebildet. Des Weiteren gibt es noch eine dritte Möglichkeit einer Basenpaarung: die Wobble-Paarung (G-U)^[4], gezeigt in der unteren Abbildung 5.

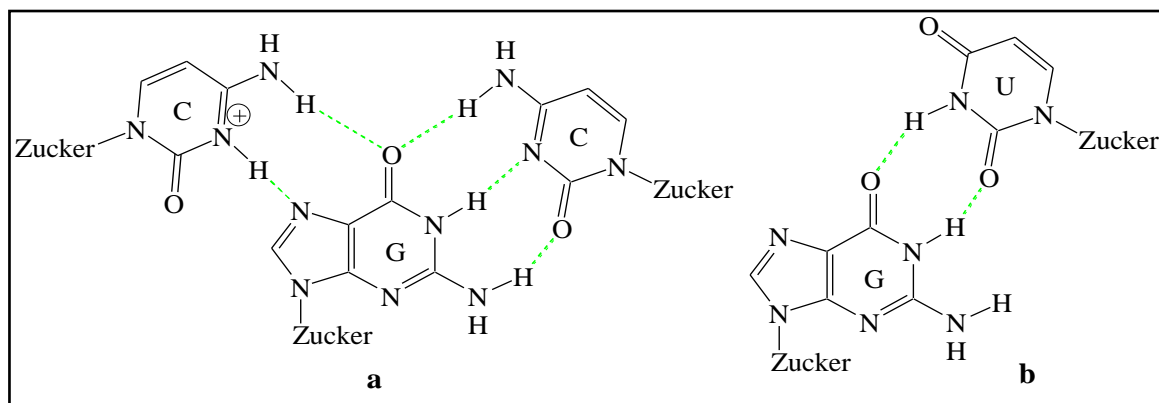


Abbildung 5: a) Hoogsteen- C-G-C- Basenpaarung; b) Wobble- G-U- Basenpaarung

In der menschlichen Zelle findet sich eine große Vielfalt verschiedener RNAs. Die *mRNA* (*messenger RNA*) bildet die Matrix für die Proteinsynthese, wobei diese aus Codons, d.h. Basen-Triplets, besteht. Jede Aminosäure wird dabei durch eine unterschiedliche Anzahl von Codons mit unterschiedlichen Abfolgen der Nukleotide kodiert. Eine weitere Klasse der RNA-Familie ist die *transfer RNA* (*tRNA*). Diese ist für den Transport der Aminosäuren zur *mRNA* zuständig. Entscheidend für die richtige Übersetzung der *mRNA* in ein Peptid (Translation) ist das an der *tRNA* befindliche Anticodon. Die Struktur der *tRNA* wird als Kleeblatt dargestellt. Bei der Translation ist außer der *tRNA* auch eine weitere Form der RNA beteiligt, die *rRNA*. Die *ribosomale RNA* macht den Hauptbestandteil des Ribosoms aus. Diese ist für strukturelle und katalytische Aufgaben bei der Translation zuständig^[4]. Außer den erwähnten Vertretern der RNA-Familie sind noch viele weitere kleine RNA-Gruppen für die Vorgänge in der Zelle notwendig. Dies sind zum Beispiel *snRNA*^[7] (*small nuclear RNA*) und *siRNA* (*small interfering RNA*). Die *small nuclear RNAs* sind kleine RNA-Stränge, die bei der RNA-Synthese am Spleißen der prä-*mRNA* beteiligt sind. Als Spleißen bezeichnet man das Herausschneiden von nicht kodierenden Fragmenten aus der prä-*mRNA*. Bei der

small interfering RNA handelt es sich um Oligonukleotidstränge der Größenordnung von 21 bis 25 Nukleotiden. Diese sind für den induzierten RNA-Abbau notwendig.

Die RNA liegt meistens als Einzelstrang vor und ist durch komplementäre Abschnitte in der Lage Sekundärstrukturen auszubilden. Als Strukturelemente sind *doppelsträngige Helix*, *hairpin*, *loop*, *bulge*, *stem* und *Pseudoknoten* zu nennen, wie in der unteren Abbildung 6 gezeigt^[3].

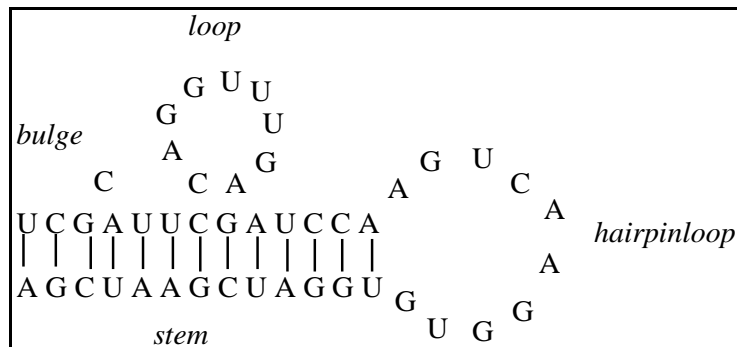


Abbildung 6: Beispiel für einige Sekundärstrukturen der RNA^[3]

Der Stamm (*stem*) entsteht durch Basenpaarbildung und besitzt im Vergleich zur DNA die A-Helix-Form. Unter einem *loop* versteht man eine Schleife aus einzelsträngiger RNA und *bulge* stellt im Vergleich dazu nur eine Ausbuchtung von einer Base im Stamm dar. Unter den Strukturelementen der RNA stellt der *loop* als einziger einen Oberbegriff für verschiedene Variationen dar, auf welche hier nicht weiter eingegangen wird. Als einen *hairpinloop* bezeichnet man einen Stamm, welcher mit einem *loop* abgeschlossen ist. Ein Pseudoknoten entsteht durch die Basenpaarbildung eines *loops* mit einer Sequenz außerhalb dieses *loops*.

2.2 Festphasensynthese von Oligonukleotiden

Die chemische Synthese der Oligonukleotide kann auf zwei Arten erfolgen, in Lösung oder an der Festphase. Dabei unterscheidet sich der Aufbau nur in den benötigten Reinigungsschritten. Die Verknüpfung erfolgt generell durch Kondensation von Phosphordiestern mit der 5'- und 3'-Hydroxylgruppe, bis die gewünschte Sequenz erreicht wird^[9]. Bei der Festphasensynthese erfolgt die Synthese von 3' in 5'-Richtung und bietet im Vergleich zur Synthese in Lösung viele Vorteile. Der größte Vorteil liegt sicherlich in der Automatisierung der Abläufe und der Möglichkeit mehrere Synthesen gleichzeitig durchführen zu können. Dabei ist die Synthesezeit viel kürzer, weil die Reinigung der Oligonukleotide und die Abspaltung der Baseneinheiten- und der Phosphorschutzgruppen erst am Ende der vollständigen Synthese erfolgt. Des Weiteren ist die Oligonukleotid-Synthese an

der Festphase besser reproduzierbar als die Synthese in Lösung und durch das Arbeiten mit Überschuss an Reagenzien wird die Ausbeute gesteigert, was in Verbindung mit der Weiterentwicklung der Synthesizer die Herstellung im mg-Maßstab ermöglicht.

Die Idee der Festphasensynthese wird auf R. Bruce Merrifield^[10] zurückgeführt. Merrifield entwickelte das Konzept einer festphasengebundenen Peptidsynthese, welche er als „A New Approach to the Continuous, Stepwise Synthesis of Peptides“ bezeichnete^[10b]. Die automatische Festphasensynthese wurde von Merrifield 1963 das erste Mal an Hand der Synthese eines Tetrapeptids erfolgreich durchgeführt^[10a]. Erst in den siebziger Jahren gelang R. Letsinger *et al.*^[11] der Durchbruch bei der Übertragung der Festphasensynthese von Peptiden auf Oligonukleotide. Seitdem wurden verschiedene Methoden zur Kupplung, Schützung und Abspaltung entwickelt und verbessert.

In der Festphasensynthese von Oligonukleotiden und auch anderen Biomakromolekülen ist die Schutzgruppenstrategie von großer Bedeutung. Die Basen und der Phosphor werden meistens mit basenlabilen Schutzgruppen versehen, während für die 5'- und die 2'-Positionen des Zuckers die Schutzgruppen variieren. Der Träger ist über ein Succinyl-System an die 3'-Hydroxylgruppe gebunden und wird ebenfalls im Basischen entschützt^[9].

Um Nebenreaktionen bei der Festphasensynthese von Oligonukleotiden zu vermeiden, müssen sowohl die Funktionalitäten der Basen wie auch der Zucker geschützt werden. Alle hierfür entwickelten Schutzgruppenstrategien beruhen auf dem Prinzip der orthogonalen Schützung^[12]. Dabei unterscheiden sich die Schutzgruppenstrategien für die Festphase und in Lösung nur in einem Punkt: während des Arbeitens in Lösung muss die 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers geschützt sein, weil sonst die Selektivität der Kupplung nicht gewährleistet ist. Dies ist auf der Festphase nicht notwendig, weil an dieser Position das Festphasen-System (meistens Succinyl-Baustein^[12]) seine Bindungsstelle hat. Als gute Träger haben sich CPG (*Controlled Pore Glass*) und Polystyrol erwiesen^[9].

Eine effiziente Schutzgruppenstrategie sollte die gewünschte funktionelle Gruppe zum gewünschten Zeitpunkt der Synthese zugänglich machen und außerdem Nebenreaktionen vermeiden. Diese Anforderungen werden von einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie durch das Verwenden von temporären und permanenten (dauerhaften) Schutzgruppen erfüllt. Die permanenten Schutzgruppen findet man an den Basen, an der 2'-Hydroxylgruppe der RNA und an der Phosphateinheit. Als temporär bezeichnet man zum Beispiel die DMTr- (Dimethoxytrityl) Schutzgruppe der 5'-Hydroxylgruppe, weil diese während der Synthese der Oligonukleotid-Kette abgespalten werden muss^[12]. Außer der erwähnten Dimethoxytrityl-Schutzgruppe gehören auch die Trityl-, die Monomethoxytrityl- und die Trimethoxytrityl-

Gruppe zu den Khorana-5'-Hydroxyl- Schutzgruppen^[13]. Während der Entwicklung der Oligonukleotid-Synthese wurden alle diese Gruppen getestet. Die Trimethoxytrityl-Gruppe zeigte die geringste Stabilität bei den Reaktionsbedingungen, gefolgt von der DMTr- und der MMTr-Gruppe. Die Trityl-Gruppe ist zwar am stabilsten, kann deshalb aber auch nur sehr schwer abgespalten werden. Durch die gute Stabilität und die leichte Abspaltbarkeit hat sich der Gebrauch der DMTr-Schutzgruppe durchgesetzt. Als ein weiterer Vorteil ist das orange farbige Dimethoxytrityl-Kation zu nennen, welches die Messung der Abspaltungsrate durch einen UV/Vis-Detektor ermöglicht.

Eine trägerbasierte Oligonukleotid-Synthese kann nicht ohne Schützung am Phosphor erfolgen, da sonst mit der Bildung von verzweigten Oligonukleotiden zu rechnen ist^[9]. Hierfür wurden verschiedene Schutzgruppenstrategien entwickelt. Die ersten Versuche auf dem Gebiet der Dinukleotid-Synthese wurden von Khorana *et al.* (**I**)^[13] in den sechziger und siebziger Jahren vorgenommen. Sie entwickelten die Phosphordiester-Methode. Der Nachteil dieser Methode ist die Entstehung eines Phosphordiesters mit einem reaktiven Sauerstoff, an dem ein weiteres Monomer angreifen kann und zu verzweigten Ketten führt.

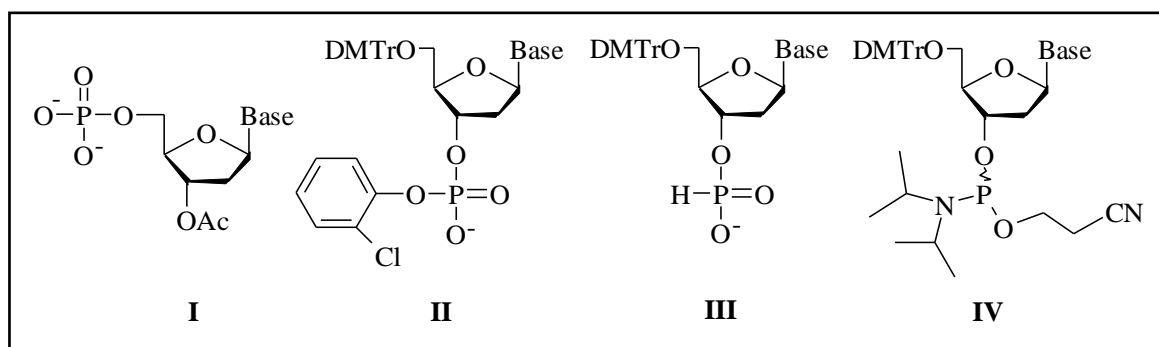


Abbildung 7: Verschiedene Phosphor-Nukleotide^[9]

Als Weiterentwicklung der Phosphoramidit-Methode wurde Anfang der achtziger Jahre von S.Narang *et al.*^[15] die Phosphortriester-Methode auf die Festphase angewandt. Dabei wird ein mit einer Chlorphenyl-Schutzgruppe (**II**) geschützter Phosphordiester als Reagenz eingesetzt. Nach der Kupplung eines Nukleotids entsteht ein Phosphortriester, welcher keine weiteren reaktiven Stellen besitzt und somit Nebenreaktionen verhindert. Eine weitere Möglichkeit Nebenreaktionen zu vermeiden, bietet die *H*-Phosphonat-Methode (**III**) nach P.Garegg^[16]. Dabei ist die dritte reaktive Stelle am Phosphor durch einen Wasserstoff geschützt und verhindert so die Bildung von Verzweigungen. Bei der Anwendung dieser Methode auf die Festphase kann die Oxidation des Phosphors zu P(V) erst am Ende der Synthese für alle Phosphorzentren gleichzeitig erfolgen.

Die automatisierte Festphasensynthese wird heutzutage bevorzugt mit der Phosphoramidit-Methode^[12,14] durchgeführt. Dabei wird ein geschütztes Phosphoramidit (**IV**) mit der ungeschützten 5'-Hydroxylgruppe des trägergebundenen Monomers umgesetzt. Zur Aktivierung befindet sich am Phosphor eine Di-(iso-Propyl)amin-Gruppe, welche durch die Zugabe von 1H-Tetrazol aktiviert wird.

Durch die besondere Schützung entstehen bei dieser Methode keine Nebenprodukte und die Phosphor-Entschützung kann erst am Ende der Oligonukleotid-Synthese gleichzeitig mit der Entschützung der Basen erfolgen. Nachteilig hierbei ist die nach jedem Schritt durchzuführende Oxidation des Phosphors.

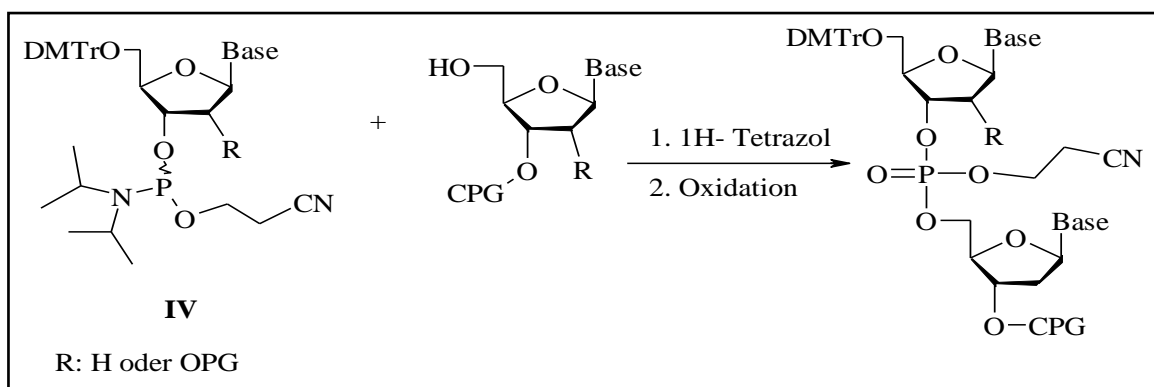


Abbildung 8: Phosphoramidit-Methode

Für die RNA-Synthese haben sich in den letzten Jahren zwei Schutzgruppenstrategien durchgesetzt. Hierbei handelt es sich um die TBDMS- (*tert*-Butyl-dimethylsilyl)-Strategie^[17] und die 2'-ACE[®]-((2-Acetoxyethoxy)methyl-orthoester)-Strategie^[18,19].

Bei der DNA erfolgt die Synthese mittels Phosphoramidit-Methode nach einem abgewandelten TBDMS-Zyklus.

2.2.1 TBDMS-Strategie

Die TBDMS-Strategie verwendet eine säurelabile 5'-Hydroxyl-Schutzgruppe und eine Silylether-Schutzgruppe für die 2'-Hydroxylgruppe. Der *tert*-Butyl-dimethylsilylether wird dabei mit einer fluoridhaltigen Lösung abgespalten. Dieser Ether ist verglichen mit anderen Vertretern dieser Klasse stabiler gegenüber Säuren und wird somit nicht bei der Detritylierung entschützt^[17].

Die Basen Adenin, Guanin und Cytosin werden nur an der Amino-Funktion geschützt, am häufigsten mit Benzoyl- bei **A**, Acetyl- bei **C** und *iso*-Butyryl-Gruppe bei **G**^[12].

Außer der beschriebenen Möglichkeit der Orthogonalität der 5'- und 2'-Schutzgruppe können diese genauso untereinander ausgetauscht werden ohne die Synthese zu gefährden. Ein Beispiel für diese Vorgehensweise ist in Kapitel 2.2.2 zu sehen.

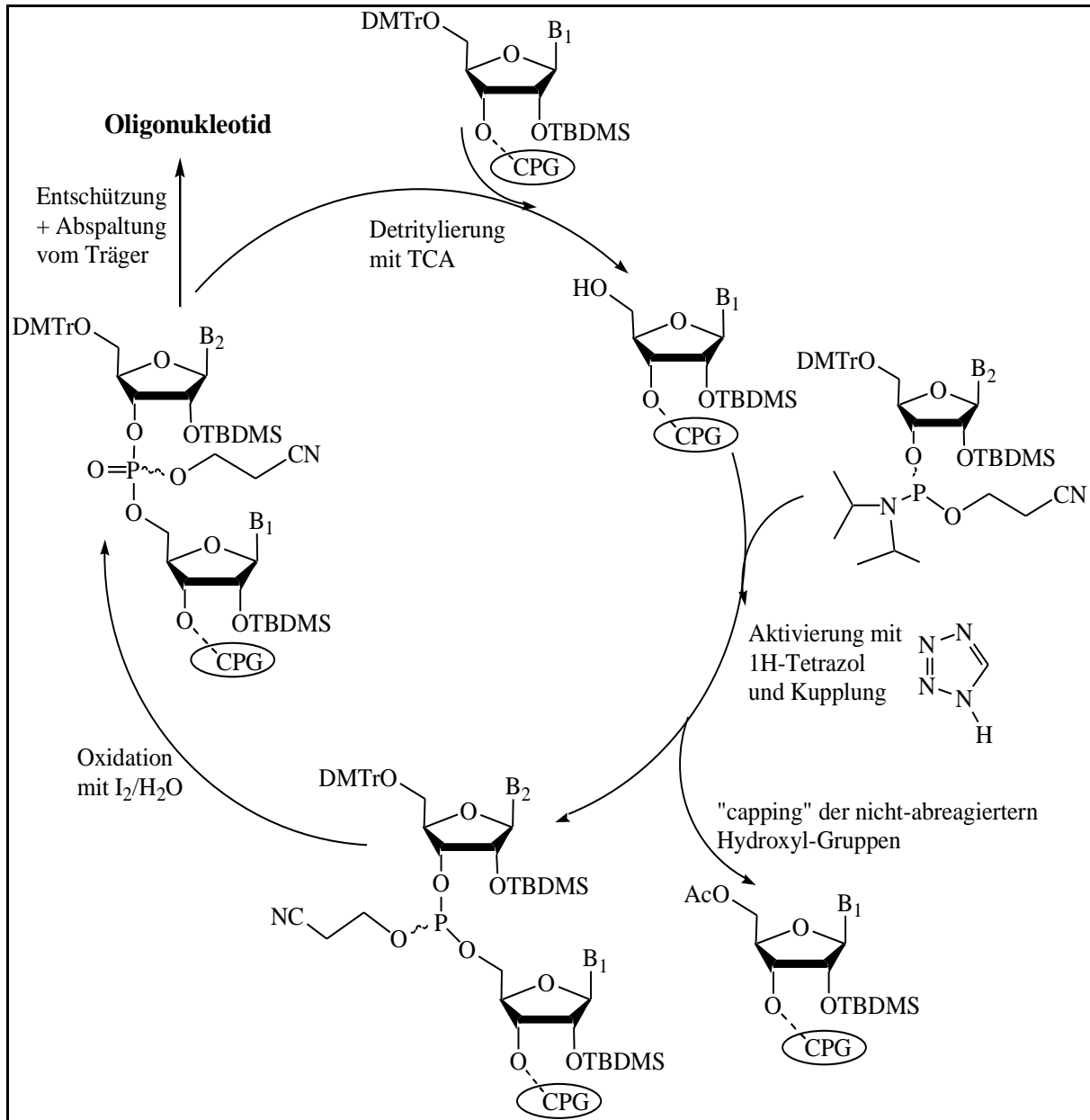


Abbildung 9: Der Syntheszyklus der Phosphoramidit-Methode unter Verwendung der TBDMS-Schutzgruppe^[9]

In Abbildung 9 ist die TBDMS-Strategie anhand eines RNA-Syntheszyklus dargestellt.

Der Zyklus besteht aus fünf Schritten:

1. Detritylierung mit Trichloressigsäure
2. Aktivierung mit 1H-Tetrazol in Acetonitril
3. Kupplung mit dem zweiten Nucleotid

4. Blockieren von nicht abreagierten 5'-Hydroxyl-Gruppen mit Acetyl-Resten mit Essigsäureanhydrid in 2,6-Lutidin und THF und dadurch das resultierende „Entziehen“ dieser Nukleotide aus der Synthese: *Capping*
5. Oxidation des Phosphors mit einem Jod-Wasser-Gemisch in Pyridin

Die ersten vier Schritte werden solange durchlaufen bis die gewünschte Kettenlänge erreicht ist. Erst dann erfolgen an allen Nukleotiden gleichzeitig die Entschützung und die parallele Abspaltung vom Träger. Die Entschützung der Basen, des Phosphors und die gleichzeitige Abspaltung vom Träger erfolgt mit konzentriertem Ammoniak.

2.2.2 2'-ACE[®]-Strategie

Die RNA-Synthese mit der 2'-ACE[®]-Strategie unterscheidet sich von der oben beschriebenen nur in der Verwendung der Schutzgruppen und nicht in der Abfolge der Reaktionsschritte.

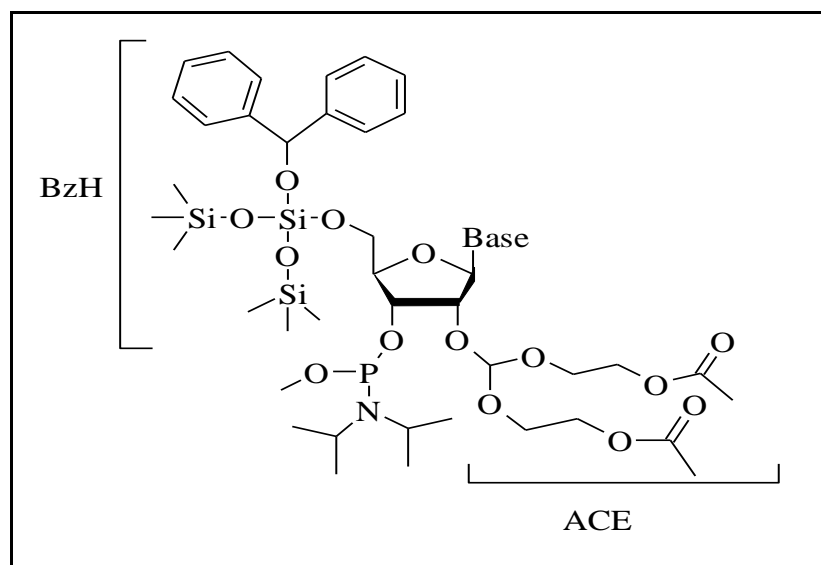


Abbildung 10: Beispiel eines Phosphoramidits für die 2'-ACE[®]-Strategie^[19b]

Die Nukleotide sind von denen der TBDMS-Strategie nur in drei Punkten unterscheidbar: die Schutzgruppen an der 2'- und 5'-Hydroxylgruppe und der des Phosphors. Zur Schützung der 5'-Hydroxylgruppe wird die 5'-BzH-Gruppe (Benzhydryloxy-bis(trimethylsilyloxy)-silyl) verwendet, welche eine neue Klasse der Silylether-Schutzgruppen darstellt^[19b]. Diese lässt sich wie die übrigen Silyl-Schutzgruppen mit Fluorid-Ionen abspalten. Betrachtet man den Phosphor, so findet man statt der β -Cyanethyl-Schutzgruppe einen Methylester (Abbildung 10). Bei der 2'-Hydroxyl-Schutzgruppe handelt es sich um einen säurelabilen Orthoester,

welcher mit Methylamin unter gleichzeitiger Abspaltung vom Träger partiell entschützt wird (Abbildung 12)^[18].

Die erste Base ist im Vergleich zur TBDMS-Strategie nicht an einen CPG-Träger sondern an Polystyrol gebunden^[18]. Dies beruht auf der Reaktivität von CPG gegenüber fluoridhaltigen Reagenzien. Vor Beginn des Synthesesyklus (Abbildung 11) erfolgt die Abspaltung der 5'-Schutzgruppe. Dabei ist das Startnucleosid wie bei der TBDMS-Strategie mit der DMTr-Gruppe geschützt. Die Abspaltung erfolgt mit einer 3%-igen Dichloressigsäure-Lösung.

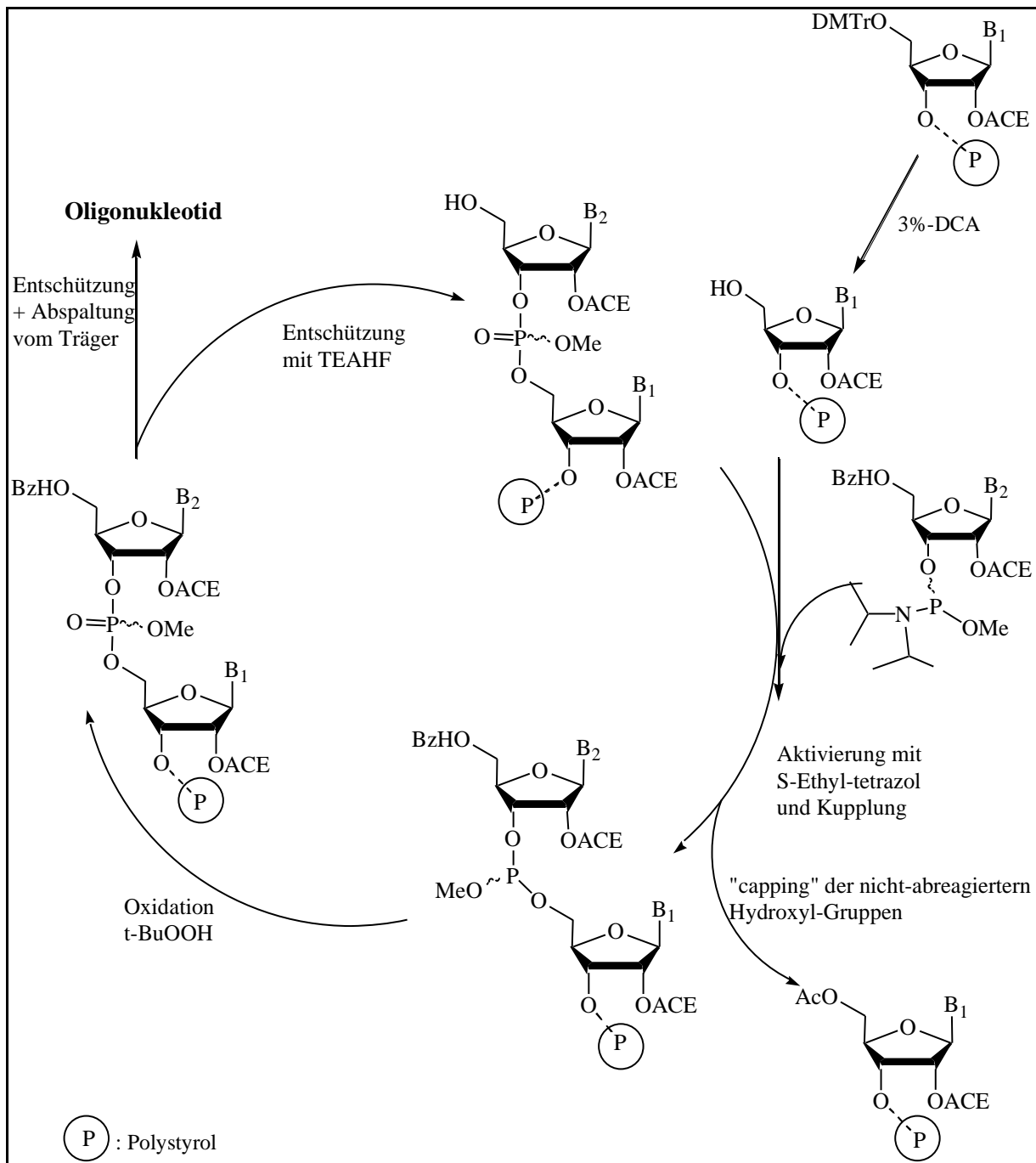


Abbildung 11: Zyklus der 2'-ACE®-RNA Synthese^[18]

Der eigentliche Zyklus besteht nur aus vier Schritten^[18]:

1. Aktivierung mit S-Ethyl-tetrazol und Kupplung der beiden ersten Nukleotide
2. Blockierung der nicht-abreagierten 5'-Hydroxyl-Gruppen mit Essigsäureanhydrid unter Aktivierung mit N-Methylimidazol: *Capping*
3. Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung in Toluol
4. Abspaltung der BzH-5'-Hydroxyl-Schutzgruppe mit Triethylammonium-fluorid-Lösung in Dimethylformamid

Diese vier Schritte werden bis zum gewünschten Oligomer durchlaufen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Phosphor-Schutzgruppe durch die Verwendung einer Lösung aus Dinatrium-2-carbamoyl-2-cyanothylen-1,1-dithiolat-trihydrat in Dimethylformamid und Wasser. Für die Entschützung der Basen und die Abspaltung vom Polystyrol-Träger wird das Säulenmaterial mit einer 40%-igen Methylamin-Lösung behandelt. Dieser Vorgang dauert bei einem gelabelten Oligonukleotid 12 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur. Bei einem ungelabelten kann die Reaktion auf 10 Minuten bei 55°C verkürzt werden. Gleichzeitig erfolgt eine Modifikation der ACE-Schutzgruppe. Diese Modifikation betrifft die Abspaltung der Esterfunktion und erleichtert somit die Entschützung der 2'-Hydroxyl-Gruppe unter sauren Bedingungen (Abbildung 12)^[18].

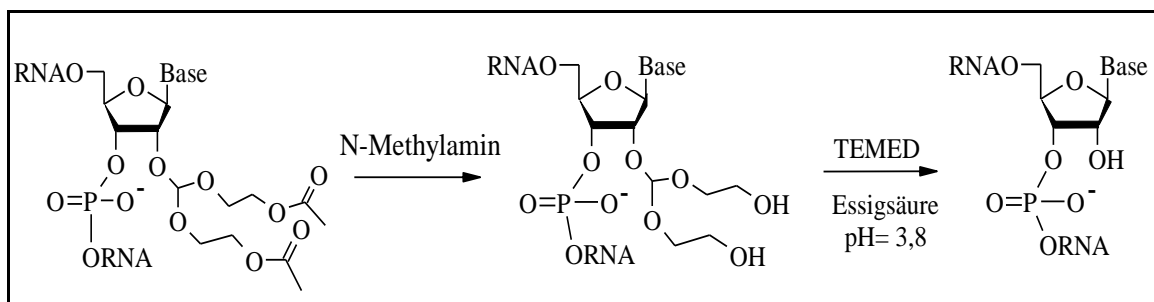


Abbildung 12: Modifikation und Abspaltung der ACE-Schutzgruppe^[18]

Die verbleibende Gruppe beeinträchtigt nicht die Aufreinigung mittels HPLC und auch nicht die Analytik mittels Massenspektrometrie. Für die Durchführung von weiteren analytischen Messungen, wie T_m -Wertmessungen und CD-Spektroskopie, muss diese aber abgespalten werden. Dies erfolgt mit einer Lösung aus TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethyl-ethylendiamin) und Essigsäure bei pH-Wert von 3.8 bei 60°C und einer Dauer von 30 Minuten. Dabei wird der 2'-Orthoester zu Ethylenglykol und Ameisensäure hydrolysiert^[18,19].

Die 2'-ACE[®]-Strategie besitzt gegenüber der TBDMS-Strategie viele Vorteile. Das sterile Arbeiten ist bei dieser Methode nicht notwendig und die Ausbeuten im Synthese-Zyklus sind höher. Außerdem sind die Reaktionszeiten kürzer, so benötigt die Kupplung bei der TBDMS-

Strategie pro Base 15 Minuten, während die 2'-ACE[®]-Strategie nur 6 Minuten benötigt^[19]. Im Übrigen ist die Entschützung weniger zeitaufwendig.

2.3 Spin-Labeln von RNA- und DNA-Basen

2.3.1 Chronologische Entwicklung

Die Benutzung von organischen Nitroxid-Radikalen als eine paramagnetische Sonde für biologisch relevante Oligomere begann Ende der achtziger Jahre mit den Arbeiten von A.Spaltenstein^[20] an der DNA-Base Thymin(I). Die Voraussetzungen für eine paramagnetische Sonde bezüglich der Stabilität und der kovalenten Bindung konnten von dem Pyrrolidin-Nitroxid erfüllt werden. Zur Erreichung der Stabilität besitzt die Nitroxyl-Einheit von beiden Seiten jeweils zwei Methyl-Gruppen, welche das Radikal sterisch vor der Reduktion abschirmen.

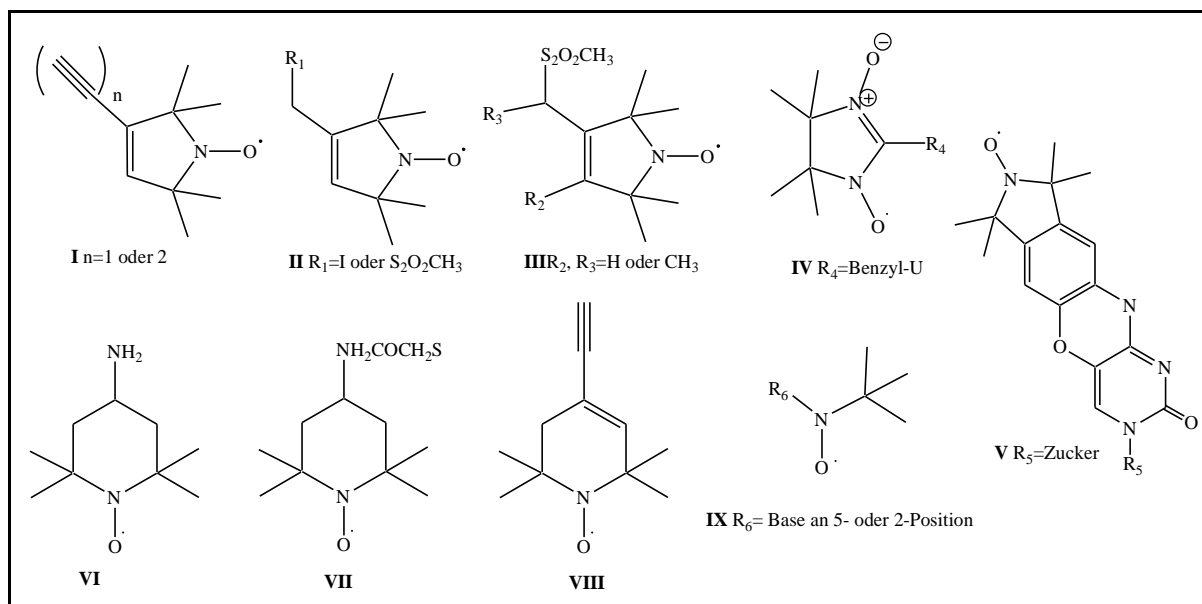


Abbildung 13: Auswahl in der Literatur verwendeter Nitroxide

Der Vorreiter auf dem Gebiet der Dynamik- und Strukturaufklärung mittels EPR war die Gruppe von P.Hopkins^[21]. Sie untersuchten verschiedene Nitroxide (I, VII) basierend auf dem Pyrrolidin- oder dem Piperidon-Gerüst auf die Verwendung für cw-EPR. Dabei erfolgt die Einführung des Spin-Labels mittels Sonogashira-Kreuz-Kupplung an einem 5-Iodo-Uridin-Monomer. Basierend auf den erhaltenen Spektren konnten die unterschiedlichen Einflusscharakteristika der einzelnen Sonden bewiesen werden.

Nach der erfolgreichen Anwendung in der DNA-Dynamikaufklärung, erhielt ein auf Pyrrol basierendes Nitroxid (**II**) Einzug in der Proteinanalyse. Die Gruppe von W.Hubbell^[22] führte mittels einer Cystein-Substitutionsmutagenese ein mit Methan-thiosulfonate aktiviertes Nitroxid an allen Cystein-Schwefeleinheiten ein. Mit so markierten Proteinen konnten Veränderungen in der Mobilität und die Zugänglichkeit von verschiedenen Proteinen in Lösung gezeigt werden. Um die selektive Kupplung des Nitroxids zu gewährleisten, wurden im gesamten Protein die natürlichen Cysteine durch Alanine ersetzt (I.Tinoco und Y.Shin)^[23].

Das Markieren von Nukleotiden wurde bis dahin nur an der Uracil-Baseneinheit (als Thyminanaloga) in der 5-Position durchgeführt. Um eine größere Einsatzbreite zu erhalten, untersuchten verschiedene Gruppen die Einführung des Spin-Labels am Zucker^[24] (**VI**), am Phosphatrückgrat^[25] (**II**) und an allen verfügbaren Baseneinheiten^[26] (**III**, **IX**). Dabei erfuhren nicht nur die Markierungspositionen sondern auch die Spin-Label selbst eine Modifizierung. Auch der Zeitpunkt der Einführung wechselte von dem Monomer-Stadium zu vollständig synthetisierten Oligonukleotiden^[27]. Basierend auf den unterschiedlichen Strukturen der Nitroxide veränderten sich auch die Kupplungsmethoden, von Palladium katalysierter Kupplung zur Peptid-Kupplung oder zu einer enzymatischen Modifizierung des Nukleotidgerüsts. Eine Besonderheit des Spin-Labels (**IX**) etabliert von H.Suemune *et al.*^[26] ist die direkte Bindung an die Base, verbunden mit der Möglichkeit den paramagnetischen Charakter auf die ganze Baseneinheit zu delokalisieren. Dies führt im Zustand des modifizierten Nukleosids in den *cw*-Spektren zur Aufspaltung der üblichen drei Spektrallinien in basenspezifischer Art. Die Linienanzahl ist abhängig von der Bindungsposition an der Base und den chemischen Modifikationen an dieser.

Zwei Markierungspositionen sind wegen ihrer vergleichsweise geringen Duplex-Destabilisierung sehr beliebt. Dabei handelt es sich erstens um die Modifizierung der 2'-Position bei RNA-Fragmenten und zweites um das Phosphatrückgrat. Die Publikation von V.DeRose *et al.* kann als Beispiel für die Verwendung der 2'-Position als Kupplungsstelle herangezogen werden^[28]. Dabei erfolgt bei Einführung des Spin-Labels eine Schmelzpunktniedrigung um 10°C. Diese Veränderung ist aber nur lokaler Natur und basiert auf der Destabilisierung der Basenpaarung. Die globale Struktur nimmt aber keine Veränderung an, was die guten Übereinstimmungen von gemodelten und gemessenen Daten zeigen.

P.Qin *et al.* (2005) haben die Markierung des Phosphatrückgrats^[29] etabliert. Hierbei erfolgt während der Festphasen-Synthese die Modifizierung der Phosphat-Einheit zum Thioat,

welche die spätere Kupplung unter Ausbildung einer Disulfid-Brücke ermöglicht. Diese Methode ist in guter Übereinstimmung mit der Modifikation von Proteinen und erleichtert durch die Benutzung derselben paramagnetischen Komponente die Analyse von RNA-Protein-Komplexen.

Die von S.Sigurdsson *et al.* publizierte Base Ç (V) stellt eine Abwandlung der eigentlichen Baseneinheit Cytosin dar. Als Besonderheit dieser Einheit ist die potentielle Verwendung für zwei Methoden zu erwähnen. Die Probe kann sowohl für die EPR- und nach der Reduktion auch für Fluoreszenz-Messungen eingesetzt werden. Nach den Aufnahmen des paramagnetischen Spektrums wird mit 0.1M Na₂S-Lösung, bei 45°C und 14Stunden das Nitroxid-Radikal zum Hydroxylamin reduziert^[30].

Als eine weitere Informationsquelle wurde die Methode der *Puls-Electron-Double-Resonance* (PELDOR) auch unter *Double-Electron-Electron-Resonance* (DEEP) bekannt, eingeführt. Wie der Name schon sagt, benötigt man zwei paramagnetische Zentren in einem System oder in zwei hybridisierenden Konstrukten. Diese Methode wurde in der Gruppe von T.Prisner verfeinert und weiter vorangeführt.

Unter Verwendung des von A.Spaltenstein etablierten und von Engels *et al.* verbesserten Spin-Labels TPA (2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-N-oxyl (I)) wurde an unterschiedlichen Systemen, sowohl DNA^[31] wie auch RNA^[32], Distanz-Messungen durchgeführt. Die erhaltenen Abstände wurden zur Überprüfung der Richtigkeit mit denen von der Gruppe G.Stock simulierten Abständen verglichen. Durch diese Vorgehensweise konnte die Gültigkeit der Methode bewiesen werden.

Um die Vielfalt der zugänglichen Nitroxide (VIII) zu erhöhen wurde 2001 von P.Gannett *et al.* ein Analogon zu dem Fünfring-Spin-Label TPA synthetisiert^[33]. Basierend auf dieser Publikation konnte die Synthese des TEMPA-Spin-Labels bereits in meiner Diplomarbeit^[34] verbessert und ein ¹⁵N-markiertes Nitroxid hergestellt werden.

2.3.2 Synthese von iodierten RNA- und DNA-Basen

Neben der erfolgreichen synthetischen Zugänglichkeit der Nitroxide ist für die Anwendung der Modifikation mittels Sonogashira-Kreuz-Kupplung auch die Verfügbarkeit der iodierten Basen zu erfüllen. Die synthetisch am einfachsten zugängliche Base Uracil kann kommerziell erworben werden. Dies galt bis 2007 auch für das 5-Iodo-Uridin-Phosphoramidit für die Dharmacon-Chemie. In unserer Gruppe wurden bedingt durch die Nichtverfügbarkeit bzw. die hohen Kosten die beiden RNA- (TBDMS- und ACE[®]-Chemie) und ein Thymin-Analogon synthetisiert. Zur Erweiterung der verfügbaren Kupplungspartner wurden von Nelly Piton die

beiden RNA-Phosphoramidite 5-Iodo-Cytidin und 2-Iodo-Adenosin hergestellt^[35] und erfolgreich eingebaut.

Um die Vielfalt der Spin-Label Platzierung vollständig auszunutzen, ergeben sich bei den Purin-Basen noch weitere Markierungskandidaten. So kann die 8-Position zwischen den beiden Stickstoffen in den Purin-Basen modifiziert werden. Hierfür ist nicht unbedingt die Iodierung die Methode der Wahl, sondern wegen der leichteren Zugänglichkeit und einer höheren Stabilität die Bromierung^[36]. Die Anwendung der Sonogashira-Kreuz-Kupplung, Mechanismus siehe Kap.2.3.3, ist am dabei erhaltenen Halogenprodukt zwar theoretisch möglich, benötigt aber Reaktionstemperaturen oberhalb von 100°C. Diese Bedingungen machen diese Modifikationsvariante für die post-synthetische Nutzung an der Festphase nicht geeignet.

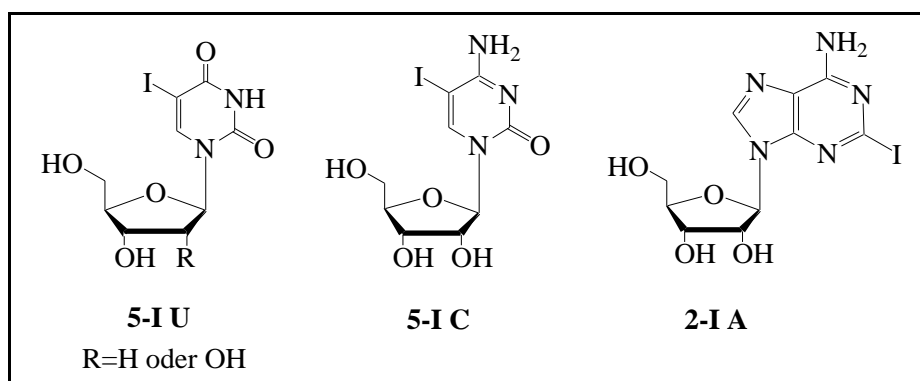


Abbildung 14: verfügbare Jodo-Basen für RNA- und DNA-Synthese

Eine weitere Möglichkeit bieten die von F.Seela *et al.* publizierte Deaza-Basen^[37]. Dabei wird der Stickstoff in der Position 7 durch einen Kohlenstoff ersetzt. Diese Veränderung führt zu keinen strukturellen oder chemischen Abweichungen der Purin-Basen, ermöglicht aber eine Halogenierung in dieser Position. Die synthetische Zugänglichkeit dieser Verbindungen ist aber sehr schlecht und bedarf eines vollständigen Aufbaus der Baseneinheit^[38]. Eine weitere Problematik bietet sich bei der Synthese der RNA-Nukleoside. Die Anwendung der Glykosilierung nach Vorbrüggen mit Acetyl-Schutzgruppen ist für diese Bausteine nicht gegeben. Bei der Verwendung von Benzoyl-Gruppen werden geringere Ausbeuten beobachtet. Für die erfolgreiche Glykosilierung wird die durch Natriumhydrid aktivierte Baseneinheit verwendet, wobei die Zucker-Hydroxy-Gruppen mit einer basenstabilen Schutzgruppe geschützt werden müssen^[39].

2.3.3 Sonogashira-Kupplung

Die Sonogashira-Kupplung wurde das erste Mal im Jahre 1975 von K.Sonogashira *et al.* beschrieben. Diese zählt zu den Kreuz-Kupplungsreaktionen, wie auch Suzuki-, Heck- und Stille-Kupplung^[40]. Diese vier Kupplungen arbeiten zwar alle mit einem Palladium-Katalysator, sind aber für unterschiedliche Reaktionen spezifisch.

Die Sonogashira-Kupplung verläuft zwischen einem terminalen Alkin und einem Aryl- oder Vinylhalogenid^[40]. Die Besonderheit dieser Reaktion gegenüber der Suzuki-Kupplung liegt in der Erhaltung der Dreifachbindung. Bei dieser Reaktion kann sowohl ein Palladium(0) wie auch ein Palladium(II)^[41] als Katalysator verwendet werden, wobei die niedriger oxidierte Spezies die reaktivere Verbindung darstellt. Das Palladium(II) wird *in situ* durch eine Homokupplungsreaktion der Alkin-Spezies zu Palladium(0) reduziert und dieses injiziert dann die eigentliche Sonogashira-Kreuz-Kupplungsreaktion.

Das Palladium(0) insertiert unter Oxidation in die Arylhalogenid-Bindung und es entsteht ein Palladium(II)-Intermediat. Dieses ist aber alleine nicht in der Lage mit dem Alkin zu reagieren, weil es nicht reaktiv genug ist. Zur Aktivierung des Alkins wird Kupferiodid verwendet. Dieses reagiert unter Zugabe einer Base mit dem Alkin, wobei ein Kupferorganyl entsteht, welches reaktiv genug ist um die Reaktion mit dem Palladium(II)-Intermediat einzugehen. Es erfolgt die Übertragung des Alkinrestes auf das Palladium, wobei sich gleichzeitig ein Kupferhalogenid bildet. Anschließend erfolgt durch den Schritt der reduktiven Eliminierung die Produktbildung^[40].

Die Ausbeute einer Sonogashira-Kupplung ist von der Struktur der Reagenzien, vom Lösungsmittel und von der Oxidation des Palladiumkatalysators abhängig. Die Problematik des geeigneten Lösungsmittels wird von S.Thorand und N.Krause beschrieben^[41]. Sie testeten einige Reaktionen von Arylbromid-Derivaten mit einem Alkin unter Verwendung eines Di(triphenylphosphin)dichloro-Palladium und Kupferiodid als Katalysatoren und Triethylamin als Base. Der Gebrauch von Tetrahydrofuran als Lösungsmittel im Gegensatz zur reinen Base brachte nicht nur Ausbeuteverbesserungen sondern auch mildere Reaktionsbedingungen mit sich. Nach dieser Erkenntnis wurden weitere Lösungsmittel getestet, unter anderem Dimethylformamid^[41,42] und Dichlormethan^[43]. Diese beiden Lösungsmittel fanden besonders bei der Kupplung eines Nukleotids mit einem Alkinderivat ihre Anwendung^[42,43]. Bei der Verwendung einer Palladium(II)-Verbindung wird der Katalysator *in situ* hergestellt (Abbildung 16)^[9]. Dabei erfolgt eine zweifache oxidative Insertion des Palladiums in die Kupfer-Kohlenstoff-Bindung zweier Organyle. Diese Organyle entstehen erst durch die Reaktion von 1eq. Kupferiodid mit 2eq. Spin-Label unter

Anwesenheit von Triethylamin. Im nächsten Schritt erfolgt unter einer reduktiven Eliminierung die Bildung des Katalysators, Palladium(0). Die Methode der Sonogashira-Kupplung ist ebenfalls geeignet für die Anwendung auf der Festphase^[42,44]. Hierbei ist die Verwendung von Ido-Nukleotiden verbreitet. Die meisten Kupplungen werden mit Ido-Uridin durchgeführt, weil dieses Nukleotid synthetisch am einfachsten zugänglich ist. Des Weiteren finden auch Ido-Cytidin und Ido-Adenosin Anwendung^[43].

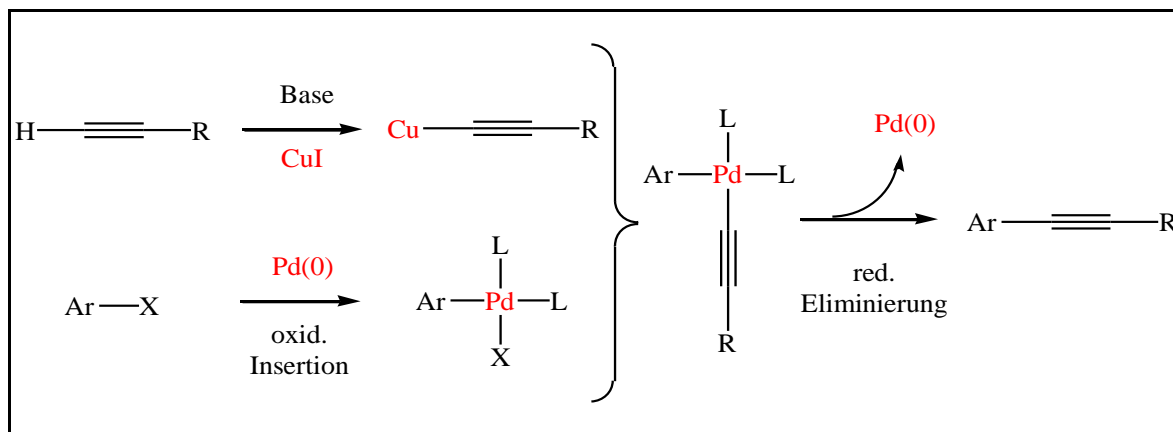


Abbildung 15: Mechanismus der Sonogashira-Kupplung^[40]

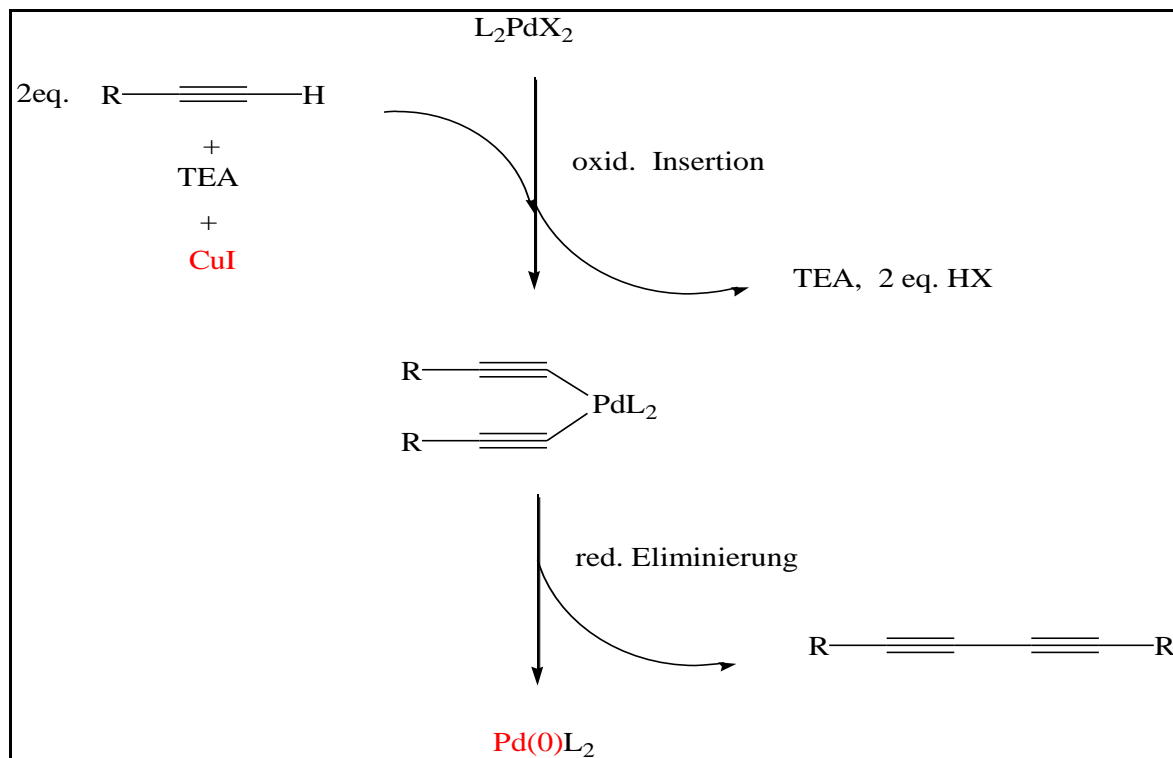


Abbildung 16: Herstellung des Palladium(0)-Katalysators^[9]

2.4 Messmethoden

2.4.1 Elektronen-Paramagnetische-Resonanz

Die EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) oder auch Elektronen-Spin-Resonanz genannt, gehört zur Klasse der spektroskopischen Methoden^[45]. Hierbei wird im Gegensatz zur NMR (*Kern-Magnetische-Resonanz*) das magnetische Moment des Elektrons, der Elektronenspin, betrachtet. Die Methode bietet einen Zugang zu Informationen über die Natur, die Struktur, die Molekül- und Gitterdynamik und die lokale Umgebung von paramagnetischen Kernen. Die Analyse kann in flüssiger oder gefrorener Lösung oder im festen Zustand (z.B. Pulver oder Kristalle) vorgenommen werden. Mit einer Konzentration im μM Bereich und einer Empfindlichkeit im nM Bereich zählt die EPR zu einer der sensibelsten analytischen Methoden^[45]. Die Vielfalt an vorkommenden paramagnetischen Systemen eröffnet ein breites Anwendungsgebiet für die EPR. Als paramagnetische Zentren mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen dienen Übergangsmetalle oder organische Radikale. Selbst in der Natur sind Übergangsmetalle in biologischen Makromolekülen wie Hämoglobin und Vitamin B₁₂ (z.B. Cu(II), Fe(III)) oder in Metallclustern (z.B. Eisenschwefel- oder Mangancluster als Katalysatoren in biologischen Systemen) vorzufinden^[45]. Allgemein können Radikale durch Strahlung in organischen Makromolekülen induziert werden oder als Zwischenprodukte bei Elektronentransferreaktionen von Proteinen entstehen^[46].

Stabile organische Radikale sind sehr selten anzutreffen. Eine wichtige Klasse solcher Verbindungen sind die sterisch gehinderten Nitroxide^[46]. Diese werden vor allem als Sonden (siehe Kap.2.3) in organischen, biologischen und nicht paramagnetischen Systemen eingesetzt. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten, entweder durch das Beimischen (engl. *spin probe*) oder durch chemische Bindung (engl. *spin label*) des Radikals. Diese Techniken sind anfänglich nur für Untersuchungen an Proteinmembranen entwickelt und später auch auf andere Proteine und Nukleinsäuren ausgeweitet worden^[46].

Bei bioorganischen Makromolekülen wie DNA, RNA und Proteinen^[47a] können bei Vorhandensein von mehreren paramagnetischen Zentren Abstände zwischen diesen gemessen werden (siehe Kap.2.4.1.3.1) und aufgrund dieser Rückschlüsse auf die Anordnung von Untereinheiten getroffen werden^[47b].

Im Vergleich zu den anderen strukturaufklärenden Methoden hat die EPR mehrere Vorteile. Diese ist für lichtempfindliche Verbindungen geeignet, die Präparation ist leichter und

schneller als bei der Kristallisation und die Auswertung erfolgt zeitgünstig im Vergleich zur X-Ray und NMR. Die Menge der einzusetzenden Substanz ist um das 5fache kleiner als bei der NMR. Des Weiteren benötigt man bei der EPR-Methode nur einen Marker im Gegensatz zu FRET^[28]. Der größte Nachteil bei der Abstandsmessung mit dieser Methode liegt in der sehr niedrigen Messtemperatur, welche einerseits nicht mit den nativen Bedingungen in Einklang zu bringen ist und andererseits eine Mittelung über die im gefrorenen Zustand vorliegende statistische Abstandsverteilung darstellt^[48].

In der EPR stehen genauso wie in der NMR verschiedene Methoden zur Verfügung. Der generelle Unterschied zur NMR ist die verwendete Wellenlänge. Bei EPR wird im Mikrowellen- bei der NMR im Radiowellenbereich gearbeitet.

2.4.1.1 Grundlagen

Die erste Entdeckung einer Aufspaltung der Elektronenniveaus in einem Magnetfeld erfolgte schon im Jahre 1896 durch Zeeman^[46]. Dieser Effekt wird im Gedenken an den Entdecker als der *normale Zeeman-Effekt* bezeichnet und konnte im Rahmen des Bahndrehmomentes eines Elektrons erklärt werden. Die später ebenfalls beobachteten komplizierteren Aufspaltungsmuster aufgrund des so genannten *anormalen Zeeman-Effekts* konnten in diesem Rahmen aber nicht interpretiert werden. Erst im Jahre 1920 zeigten Stern und Gerlach in einem grundlegenden Experiment der frühen Quantenmechanik, dass das magnetische Moment von Elektronen im Magnetfeld nur zwei diskrete Orientierungen annehmen kann. Aufgrund dieser Erkenntnis und des *anormalen Zeeman-Effekts* haben Goudsmit und Uhlenbeck^[46] 1925 eine neue Quantenzahl eingeführt, den *Eigendrehimpuls* des Elektrons, den Elektronenspin. Der Elektronenspin \vec{s} ist definiert als

$$|\vec{s}| = \sqrt{s(s+1)}\hbar \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei ist $s = \frac{1}{2}$ eine neue Quantenzahl, die *Spinquantenzahl* und \hbar das Plancksche Wirkungsquantum dividiert durch 2π .

$$\vec{\mu}_{spin} = -g_e \vec{s} \left(\frac{e}{2m_e} \right) \quad \text{Gleichung 2}$$

Dieser Drehimpuls ist wie jeder andere mit einem magnetischen Moment ($\vec{\mu}$) verknüpft.

Hier steht e für die Elementarladung, m_e für die Ruhemasse des Elektrons und g_e für den g -Wert des freien Elektrons, welcher experimentell ermittelt den Wert 2.0023 besitzt. Bezogen auf die Aufspaltung der *Magnetquantenzahl* m_s eines Elektrons in einem Magnetfeld B_0 (typischer Wert zwischen 0.1 und 0.5T (T= Tesla)), erhält man die Gleichung:

$$E = m_s g_e \mu_B B_0 \quad \text{Gleichung 3}$$

Die magnetische Quantenzahl m_s nimmt für $s = 1/2$ die Werte $+1/2$ und $-1/2$ an. Das Bohr'sche Magneton μ_B ist gleich $9.274 \text{ e}^{-24} \text{ JT}^{-1}$. Die Energiedifferenz ΔE zwischen den beiden im Magnetfeld aufgespaltenen Energieniveaus ist proportional zur Größe des angelegten Magnetfelds B_0 .

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0 \quad \text{Gleichung 4}$$

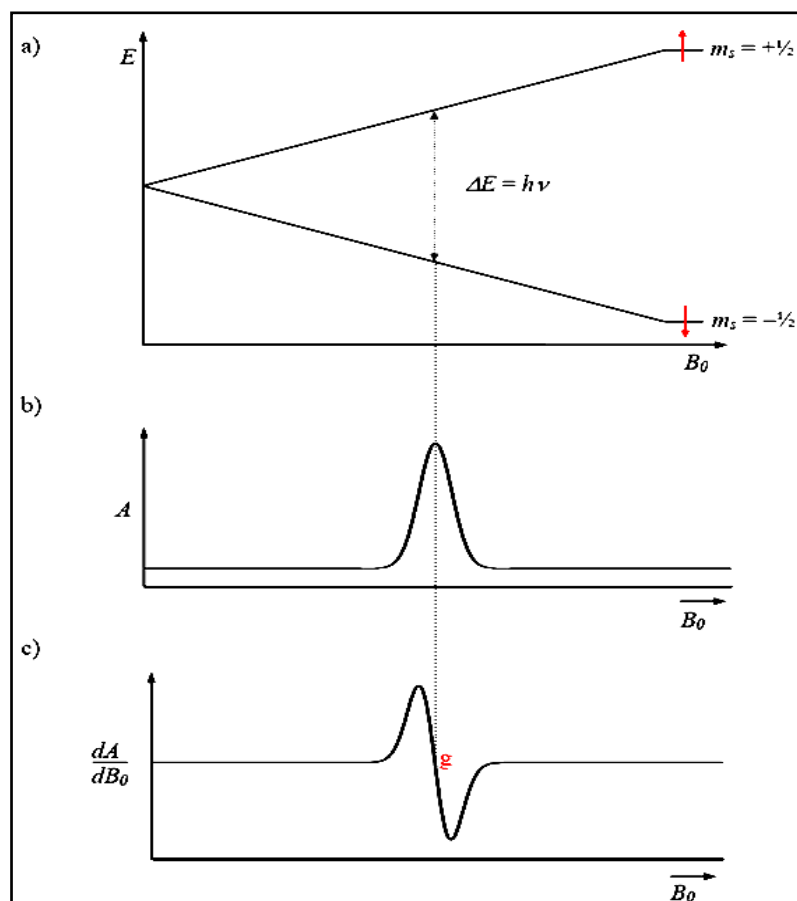


Abbildung 17: a) Zeeman- Aufspaltung für einen Elektronenspin im Magnetfeld B_0 ;
 b) Die resultierende Absorptionslinie beim Erfüllen der Resonanzbedingung;
 c) Die durch die Feldmodulation erhaltene erste Ableitung der Absorptionslinie

Diese Aufspaltung ist in Abbildung 17 a) schematisch dargestellt^[45]. Die Abbildung zeigt des Weiteren den Zusammenhang zwischen den aufgespaltenen Energieniveaus und dem gemessenen graphischen Verlauf der Absorptionslinie. Zur Darstellung der Absorption in Form ihrer ersten Ableitung kommt es durch Verwendung einer Feldmodulation. Diese wird durch Anlegen eines weiteren magnetischen Feldes erreicht und dient zur Erhöhung der Empfindlichkeit.

Damit die Anregung eines Spins vom $m_s = -1/2$ -Niveau ins $m_s = +1/2$ -Niveau erfolgt, muss die Resonanzbedingung erfüllt werden:

$$h\nu = \Delta E = g_e \mu_B B_0 \quad \text{Gleichung 5}$$

Die beobachtete Resonanzfrequenz ist abhängig von der Umgebung des Elektrons, den Bindungspartnern und der räumlichen Anordnung. Somit wird eine Abweichung vom g -Wert des freien Elektrons gemessen, welche durch Kopplung zwischen dem Spin- und Bahndrehmoment entsteht^[45]. Außerdem kann die Resonanzlinie durch Wechselwirkungen des Elektronenspins mit anderen Kernspins aufgespalten werden (Hyperfein-Wechselwirkungen A_{iso}).

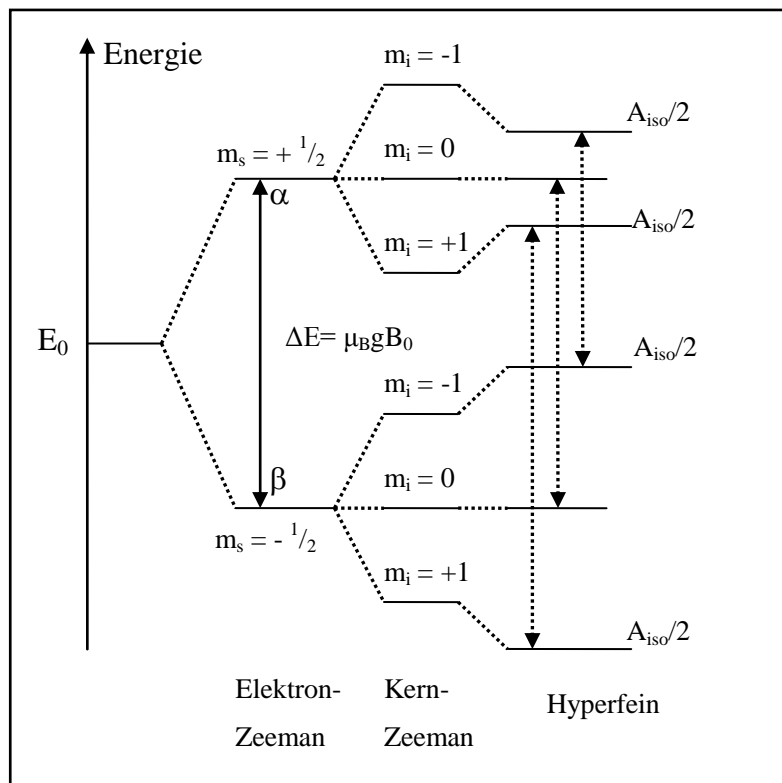


Abbildung 18: Energieniveauschema für das Spin-System $S = 1/2$, $I = 1$ ^[46]

Eine mögliche Aufspaltung ist in Abbildung 18 zu sehen. Hierbei ist zwischen der Elektron- und der Kern-Zeeman-Aufspaltung zu unterscheiden.

Die normale Zeeman-Aufspaltung bezieht sich auf die Aufspaltung des Elektronenniveaus in den α - und β -Elektronenzustand. Von der Kern-Zeeman-Aufspaltung spricht man bei der Kopplung des Kernspins mit dem Bahndrehmoment, wodurch sich die Niveaus für $I=1$ mit $m_i = +1, 0$ und -1 ergeben. Durch die Wechselwirkung des Elektrons mit dem Kern beobachtet man eine weitere Aufspaltung, die Elektronenspin-Kernspin-Kopplung, welche auch als die Hyperfeinkopplung bezeichnet wird.

2.4.1.2 Messmethoden

In der EPR muss grundsätzlich zwischen zwei Messmethoden unterschieden werden, der *continuous wave*-EPR und der *gepulste* EPR. Die *continuous wave* (*cw*)-EPR-Experimente wurden zuerst 1944 von E.Zavoisky^[45] beschrieben. Die *gepulste* EPR konnte erst im Jahre 1961 von W.Mims^[45] publiziert werden. Die beiden Methoden unterscheiden sich in der Art der Anwendung und der damit detektierbaren Information. Bei der *cw*-EPR wird die Frequenz der eingestrahlten Mikrowellen konstant und kontinuierlich gehalten. Hingegen wird bei der gepulsten EPR nur ein Impuls von kurzer Dauer induziert. Bei der Betrachtung der näheren Umgebung und der Charakterisierung des Elektrons benutzt man die *cw*-EPR. Die gepulste EPR erlaubt darüber hinaus weit schwächere Kopplungen zu entfernten Kernen zu messen. Die eigentliche Anwendung findet die gepulste EPR aber bei der Detektion von Kopplungen zwischen paramagnetischen Zentren^[49].

Wie bei der NMR bietet auch die EPR viele Methoden zur Analyse. Unter anderem stehen die ENDOR (*electron-nuclear-double-resonance*), die ESEEM (*electron-spin-echo-envelope-modulation*) und die HYSCORE (*hyperfine-sublevel-correlation-experiment*) als zwei dimensionale Methoden zur Verfügung.

2.4.1.3 *continuous wave* EPR

Das *cw*-EPR-Experiment wird, wie oben erwähnt, unter konstanter Frequenz im Mikrowellenbereich betrieben. Dabei wird das äußere Magnetfeld so lange variiert, bis die Resonanzbedingungen durchlaufen sind. Die Absorption ist in den meisten Proben aufgrund der Verdünnung und aufgrund einer niedrigen Konzentration der paramagnetischen Spezies gering. Um die Intensität der Absorptionssignale zu erhöhen, wird unter Einwirkung eines weiteren kleineren Magnetfeldes gearbeitet.

Viele Anwendungen der *cw*-EPR sind in der Literatur bekannt. Dabei handelt es sich nicht nur um Dynamik- sondern auch um Abstandsmessungen. Eine der fundiertesten Veröffentlichungen für die mathematische Grundlage der Abstandsbestimmung lieferten M.Rabenstein und Y.Shin 1995^[48]. Sie erklären die Ursachen der Linienverbreiterung in einem EPR-Spektrum und beschreiben eine Methode zur Eliminierung dieser Wechselwirkungen durch die Fourier-Transformation. Die Abstandsbestimmung ist mittels dieses Verfahrens im Bereich von 8 bis 25Å möglich.

Bei der Wahl des Spin-Labels und der Markierungsmethode haben sich verschiedene Systeme etabliert. Auch bei der Auswertung der Spektren entwickelten verschiedene Personen ihre eigene Herangehensweise. Als Übereinstimmung für alle Auswertungen ist die Kohärenz zwischen der Linienverbreiterung und der Herabsetzung der Mobilität zu erwähnen. So verwenden I.Tinoco und Y.Shin^[23] ein über Schwefelbrücken gekoppeltes 5'-ständiges Nitroxid und interpretieren die erhaltenen EPR-Absorptionsspektren auf die vorliegende Abstandsverteilung. Hierbei dient ein RNA-Protein-Komplex als Templat.

Die Arbeiten von S.Sigurðsson *et al.* begründen sich auf die Spektralbreite als Charakteristikum für die unterschiedliche Systemdynamik. Dabei erfolgt eine mathematische Auswertung als ein Plot der Linienveränderung im Vergleich zum freien Nitroxid gegen die markierte Base. Auch hier gilt, eine Verbreiterung entspricht einer Mobilitätsverringering^[24].

2.4.1.3.1 gepulste EPR

Die gepulste EPR bietet im Vergleich zur *cw*-EPR die Möglichkeit einzelne Kopplungen zu selektieren, indem man bestimmte Wechselwirkungen hervorhebt. Die Funktionsweise eines gepulsten EPR- Experiments ist mit der des gepulsten NMR vergleichbar. Durch die Wahl der Pulssequenz werden einzelne Wechselwirkungen separiert, wie z.B. die Hyperfeinkopplung, die dipolare Spin-Spin-Kopplung und die Quadrupol Kopplung^[50].

Es kann über die lokale Umgebung eines paramagnetischen Zentrums (mit ESEEM und Puls-ENDOR) bis zu einem Radius von 10Å eine Aussage getroffen werden. Betrachtet man die globale Umgebung (mit PELDOR, *pulsed-electron-double-resonance*), so sind Abstände bis zu 80Å zwischen zwei Radikalen messbar^[45,50].

Als Puls bezeichnet man ein kurzes Einschalten und nach einer Laufzeit im Nanosekundenbereich wieder Ausschalten des Mikrowellenstrahls, dieser wird in der Puls-

Sequenz als Rechteck dargestellt. Die Anregung erfolgt dabei nicht nur in einer Frequenz wie bei der *cw*-EPR sondern in einem Frequenzbereich. Die verwendeten Pulse werden entlang der *x*-Achse eingestrahlt und besitzen den Drehwinkel von 90° oder 180° . In der Puls-Sequenz sind diese durch ihre unterschiedliche Höhe zu unterscheiden. Den 180° -Puls bezeichnet man als π und dieser wird in der Puls-Sequenz als das Doppelte des 90° -Pulses dargestellt^[45].

Grundlagen:

Genauso wie bei einem NMR-Experiment wird bei der gepulsten EPR ein ungepaartes Elektron in einem Magnetfeld B_0 abgelenkt. Betrachtet man die magnetischen Momente der Elektronen, so liegen diese nicht parallel zum Feld. Das magnetische Feld versucht aber die magnetischen Momente parallel auszurichten, wodurch es zum Kreisen dieser auf einer Kugelbahn um das Feld B_0 kommt. Die feldabhängige Frequenz dieser *Präzessionsbewegung* wird als *Larmor-Frequenz* bezeichnet^[45].

Nach der Strahlung eines 90° -Pulses erfolgt eine Gleichverteilung der Spins auf die beiden Energieniveaus. Danach sind die Spins nicht mehr auf der ganzen Kugeloberfläche mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zu finden, sondern schließen sich zu Spinpaketen zusammen. Dieser Vorgang wird als *Phasenkohärenz* bezeichnet und ist auch in der NMR vertreten. Dabei sind die Spins nicht örtlich fixiert, diese präzidieren mit der Larmor-Frequenz um die *z*-Achse, wie oben erwähnt. Mit der Zeit verlieren die Spins durch Spin-Spin-Wechselwirkungen ihre Phasenkohärenz und verteilen sich wieder gleichmäßig auf der Kugeloberfläche^[45]. Dieser Verlust wird als *T₂-Relaxation* bezeichnet und liegt bei Elektronen im Bereich von Nanosekunden. Gleichzeitig erfolgt auch die Rückkehr der Spins von dem angeregten Zustand in den Zustand der Boltzmann-Gleichgewichtsverteilung, welche die *T₁-Relaxation* genannt wird^[45]. Diese Relaxation liegt im Bereich von Mikro- bis Millisekunden. Außer den 90° -Pulsen werden auch 180° -Pulse, auch als π -Pulse bezeichnet, verwendet. Dabei erfolgt eine vollständige Umkehrung des Spins.

PELDOR-Experiment:

Zur Detektion von dipolaren Kopplungen zwischen zwei paramagnetischen Zentren wird die *pulsed-electron-double-resonance* (PELDOR)-Methode verwendet. Dabei stehen zwei Messmethoden zur Auswahl, die 3-Puls und die 4-Puls-ELDOR^[50].

Bei einer Puls-ELDOR-Sequenz wird mit zwei Mikrowellenfrequenzen gearbeitet: ν_A für das Elektron A und ν_B als Pumpfrequenz für Elektron B. Der Unterschied zwischen den beiden Frequenzen liegt im Bereich von 40 MHz.

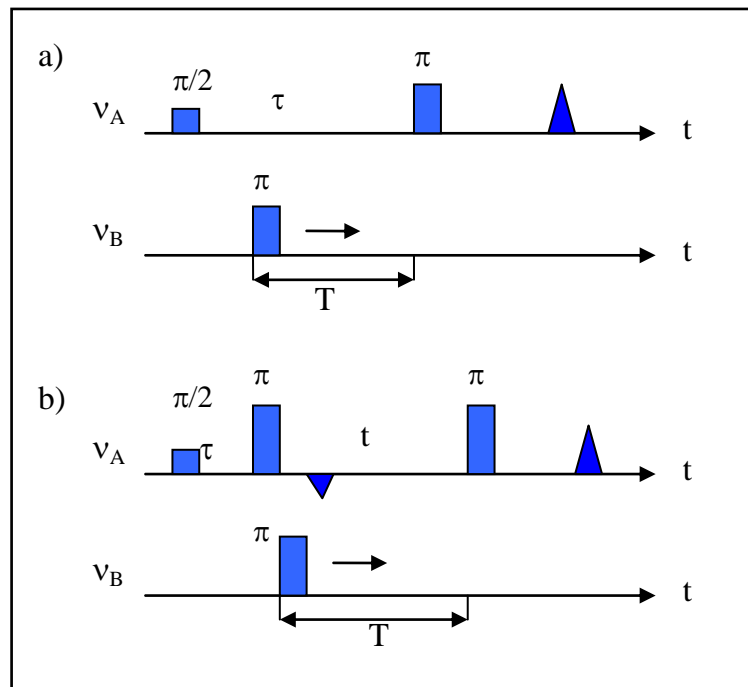


Abbildung 19: Puls-Sequenz für a) 3-Puls-ELDOR und b) 4-Puls-ELDOR^[51]

Durch das Einstrahlen der Detektionssequenz $\pi/2$ (90°)- τ - π (180°)- t - π (siehe Abbildung 19 a) auf das Elektron A wird nach einem Zeitintervall ein Spin-Echo (*Hahn-Echo*, als Dreiecke dargestellt) erzeugt, welches gemessen wird. Wird in dem Zeitbereich T ein zweiter Puls (*Pumppuls*) mit der Wellenfrequenz ν_B eingestrahlt, invertiert dadurch der Spin des Elektrons b. Bei einer Kopplung der beiden Elektronen A und B ruft diese eine Beeinflussung des Spins am Elektron A hervor. Dies führt wiederum zu einer neuen Amplitude des Spin-Echos am Ende der Detektionssequenz. Die Daten auf der Zeitskala aus der PELDOR-Messung werden Fourier-transformiert. Aus dem erhaltenen Kurvenverlauf wird die Frequenz der Oszillation ν_{AB} abgelesen. Der Abstand zwischen den zwei paramagnetischen Zentren A und B wird aufgrund der Oszillationsfrequenz mit Hilfe der beiden unteren Gleichungen berechnet^[32].

$$\nu_{AB} = \nu_{Dip} (1 - 3 \cos^2 \theta) + J \quad \text{Gleichung 6}$$

$$\nu_{Dip} = \frac{\mu_B^2 \cdot g_A \cdot g_B \cdot \mu_0}{4 \cdot \pi \cdot h} \cdot \frac{1}{r_{AB}^3} \quad \text{Gleichung 7}$$

Die verwendete Konstante J ist die Austausch-Konstante und kann für einen Abstand oberhalb von 20\AA vernachlässigt werden. Die Frequenz ν_{AB} ist dann nur noch von dem dipolaren Teil (ν_{Dip}) und dem Orientierungsterm ($1-3\cos^2\theta$) abhängig.

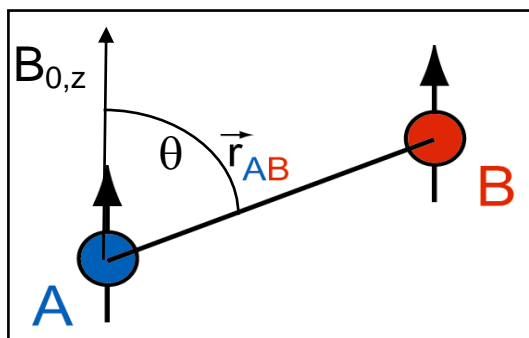


Abbildung 20: Winkel θ

θ ist der Winkel zwischen der Richtung des Magnetfeldes B_0 und dem Vektor \vec{r} , μ_B ist das Bohr'sche Magneton, h das Plancksche Wirkungsquantum, g_A und g_B sind die g -Werte der einzelnen Elektronen A und B und μ_0 die Konstante des magnetischen Feldes.

Die Biomakromoleküle, wie DNA, RNA und Proteine, können durch einen gezielten Einbau von Labels (paramagnetische Sonden, siehe Kapitel 2.3.3) EPR-aktiv gemacht werden. Die Bestimmung des Abstandes zwischen zwei solchen Sonden geben Aufschluss über die Struktur der Biomoleküle^[45, 52]. Nach dieser Methode können selbst die Strukturen von RNA-Protein-Komplexen untersucht werden.

2.4.1.4 Parameter

2.4.1.4.1 g -Wert

Der g -Wert bezieht sich auf das ungepaarte Elektron und erlaubt keine Rückschlüsse auf dessen Umgebung. Durch das Vergleichen zweier verschiedener g -Werte ist es aber möglich die Natur der einzelnen Radikale zu ermitteln^[45]. Als solches kann der g -Wert als Analogon zur chemischen Verschiebung in der NMR gesehen werden. Für ein freies Elektron ergibt sich ein g -Faktor von 2.0023 ^[46], welcher je nach räumlicher Umgebung variieren kann. Diese Unterschiede beruhen auf elektrostatischen und magnetischen Wechselwirkungen mit den benachbarten Kernen. Die Größe der Abweichung ist dabei charakteristisch für die Geometrie, den elektronischen Zustand und die Bindungssituation des jeweiligen Moleküls. Für organische Radikale und generell für Elemente der 1. und 2. Periode bewegen sich die Abweichungen im Bereich von 10^{-4} - 10^{-3} (z.B. 2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-N-oxyl (TPA) $g= 2.006$)^[45], während diese sich für Übergangsmetalle in der Größenordnung von 2 bewegen.

Die oben beschriebenen Eigenschaften des g -Wertes sind bezogen auf Radikale in Lösung. Diese rotieren im Vergleich zur EPR-Zeitskala so schnell, dass keine Vorzugsorientierung detektiert werden kann. Solche Proben bezeichnet man als *isotrop*. Betrachtet man

eingefrorene Proben, Pulver oder Einkristalle, so besitzen die Moleküle im Magnetfeld eine festgelegte Orientierung. Die dadurch entstehenden *anisotropen* Beiträge erschweren das Spektrum, können aber zur präziseren Analyse von Art und Struktur des paramagnetischen Systems herangezogen werden. Ein weiterer Grund für die Messungen im festen Zustand ist die Erhöhung der Empfindlichkeit und der Lebensdauer des Radikals^[45].

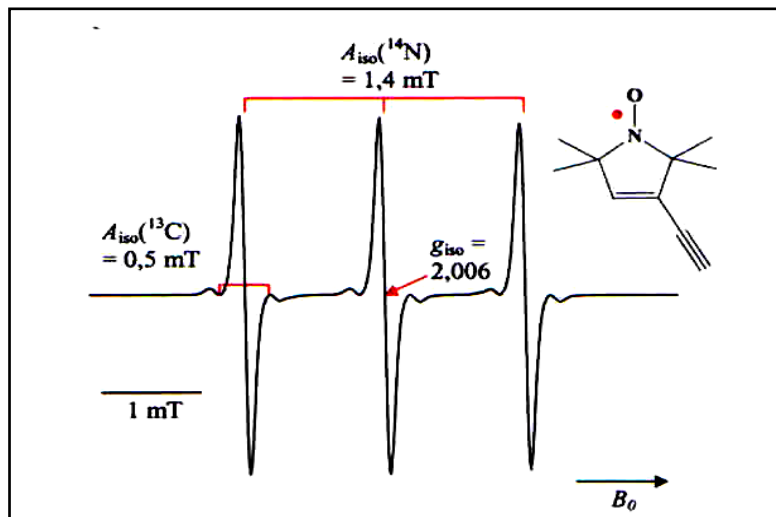


Abbildung 21: Hyperfeinkopplung am Beispiel von 2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethynyl-3-pyrrolin-N-oxyl^[45] (TPA)

Auch in Lösung können anisotrope Beiträge gemessen werden. Diese werden hervorgerufen durch nicht kugelsymmetrische Orbitale, in denen sich das ungepaarte Elektron aufhält.

2.4.1.4.2 Hyperfeinkopplung

Ein weiterer wichtiger Parameter in der EPR ist die zwischen dem magnetischen Moment des Elektrons und dem des Kerns wirkende Hyperfeinkopplung. Um eine Kopplung zu erzeugen, muss der Kernspin I größer als Null sein (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O , ^{31}P , ^{33}S , ^{51}V , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{95}Mo). Die dabei auftretende Aufspaltung lässt sich mit der *Multiplizitätsregel* ableiten^[45].

$$M = 2N \cdot I + 1$$

Gleichung 8

Ein Beispiel für eine solche Aufspaltung ist in der Abbildung 18 für $I = 1$ gezeigt. Die Größe der Aufspaltung ist dabei von dem magnetischen Moment ($\vec{\mu}_I$, siehe Kapitel 0, Tabelle 2) des koppelnden Kernes abhängig.

2.4.1.5 Organische Radikale

In der Sondentechnologie finden viele verschiedene organische Radikale Verwendung. Für eine eindeutige Abstandsbestimmung sind aber nur starre Ringsysteme mit hoher sterischer Abschirmung sinnvoll einsetzbar. Diese Kriterien werden von Nitroxid-Radikalen, die auf Heterozyklen wie Piperidin, Pyrrolidin oder Oxazolidin (Abbildung 22) basieren, erfüllt^[46]. Am einfachsten synthetisch zugänglich sind aus diesen drei Gruppen die Piperidin-Derivate, weshalb diese auch eine breite Anwendung finden.

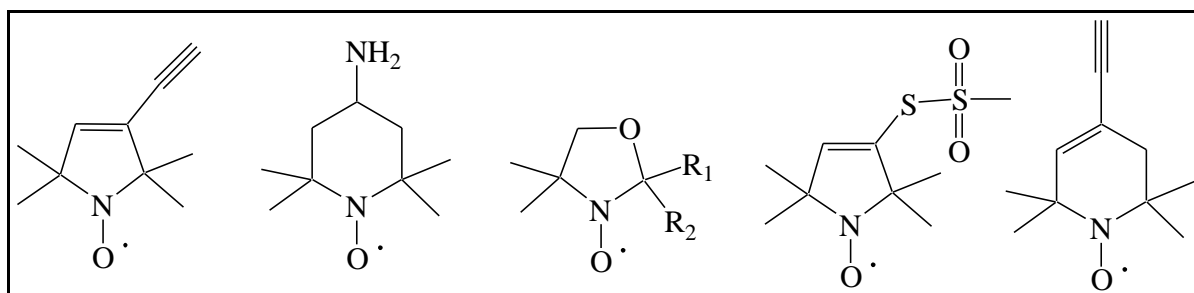


Abbildung 22: häufig verwendete Nitroxide^[46]

Bei den Spin-Labels ist der radikalische Charakter in der Bindung zwischen Stickstoff und Sauerstoff lokalisiert, wenn die Reste am Stickstoff aliphatischer Natur sind^[50].

Die wichtigsten EPR-Parameter für die häufigsten Elemente organischer Radikale sind in unterer Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: EPR- Daten für häufige Elemente in den organischen Radikalen^[46]

Isotop	natürliche Häufigkeit (%)	Spin	g_n	μ_I/MHz (3500G)	a_0/MHz	b_0/MHz
¹ H	99.9850	1/2	5.585695	14.90218	1419.18	-
² D	0.0148	1	0.8574388	2.287575	217.85	-
¹³ C	1.11	1/2	1.40483	3.74795	3773.6	107.30
¹⁴ N	99.63	1	0.4037637	1.077201	1809.4	55.47
¹⁵ N	0.366	1/2	-0.5663826	1.511052	-2538.2	-77.81
¹⁷ O	0.038	5/2	-0.757522	2.02099	5258.4	-168.25

g_n : g- Wert

μ_I : magnetisches Moment

a_0 : Hyperfeinkopplung

b_0 : Fermi-Kopplung

2.4.2 Kern-Magnetische-Resonanz

NMR (*nuclear magnetic resonance*) ist im theoretischen Hintergrund vergleichbar mit EPR, nur werden hierbei die Kerne und nicht die Elektronen betrachtet. Als Limitierung für die Messung gilt die Verfügbarkeit der messbaren Isotope. Die meist verwendeten Kerne in biologisch relevanten Komplexen sind ^1H , ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P . Nicht alle diese Isotope besitzen eine hohe natürliche Häufigkeit (^{13}C 1.1% und ^{15}N 0.37%). So muss der Anteil der aktiven Isotope mittels chemischer Modifikation erhöht werden. Durch die kommerzielle Erhältlichkeit von ^{13}C - und ^{15}N -markierten Aminosäuren und Nucleosiden erfuhr die NMR-Spektroskopie einen Aufschwung und konnte erfolgreich bei Strukturaufklärungen von Proteinen und Oligonukleotiden bestehen^[53].

Eine weitere Limitation betrifft die Größe des zu untersuchenden Makromoleküls. Bei Biomolekülen von bis zu 40kDa^[27] ist die Strukturaufklärung mittels NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) erfolgreich angewandt worden und liefert ein Ensemble an möglichen Strukturen. Für Komplexe oberhalb dieser Größengrenze und bei Komplexen mit nur schwacher Wechselwirkung wurde von G.Varani *et al.*^[27] die Anwendung der Spin-Markierung in der NMR etabliert. Hierbei fungiert das Nitroxid als ein inverser Marker. Als inversen Marker bezeichnet man die paramagnetischen Sonden, weil diese die Anzahl der messbaren Signale reduzieren und somit Rückschlüsse auf die räumliche Anordnung von Komplexen liefern.

Der paramagnetische Charakter des induzierten Nitroxids führt zu Verbreiterung oder Verschiebung der Signale räumlich nahe liegender und gebundener Kerne. Dabei ist dieser Effekt proportional zu r^{-6} ^[54] und nur bis zu einem Umkreis von 12Å beobachtbar^[27]. Die Messungen erfolgen in einem zwei dimensional System entweder nach der TROSY- (*Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*) oder HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)-Methode.

Zur Überprüfung der Strukturunveränderlichkeit nach dem Einbau von Nitroxiden wird nach der Messung der markierten Probe eine Reduktion des Radikals gefolgt von einer weiteren Messung derselben Probe durchgeführt. Dabei sollten die im Vorfeld reduzierten Signale ihre normale Intensität wiedererlangen. Als Reduktionsmittels können neben natürlichen Substraten wie Ubichinon^[55], Natriumsulfid^[27] oder Ascorbinsäure^[56] verwendet werden.

2.4.2.1 Grundlagen^[54]

Die Linienverbreiterung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. In erster Linie ist das die Temperatur, aber auch solche Größen wie die Rotationskorrelationszeit des Proteins/RNA,

das magnetische Moment des Elektrons und die Art der Bindung wirken sich entscheidend auf die Messbarkeit der einzelnen Kernsignale aus. So hängt die Rotationsgeschwindigkeit nicht nur vom paramagnetischen Zentrum sondern auch von der Flexibilität der Bindung an das Makromolekül ab. Handelt es sich um ein freies Zentrum, so nimmt die Rotationskorrelationszeit einen Wert von etwa 10^{-7} s (kann für das Spin-Label TPA nicht angegeben werden, da dieses nicht in Wasser löslich ist) ein. Bei einer kovalenten Bindung wird die Rotationsfreiheit des Radikals stärker eingeschränkt als dies bei einem koordinativen System der Fall wäre. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Korrelationszeiten wirken sich erheblich auf die Linienverbreiterung aus. Ein unbeweglicheres Spin-Label bewirkt eine größere Verbreiterung der Linienbreite der umliegenden Kerne als ein frei rotierendes.

Ein freies Elektron wird nicht als punktuell und lokal sondern als delokalisierte Spin-Dichte angesehen. Das durch die Elektronen-Relaxation erzeugte fluktuierende magnetische Feld beeinflusst die Relaxation der umliegenden Kerne. Diese Interaktion wird als *dipolare Kopplung* bezeichnet. Dabei ist das magnetische Moment des Elektrons um das 658-fache größer als das des Protons.

Die dipolare Kopplung basiert auf dem Elektron-Kern-Abstand und beinhaltet somit eine strukturelle Information. Die Kern-Relaxationsrate kann in Abhängigkeit von der Korrelationszeit und weiteren von Elektron abhängigen Konstanten abgebildet werden. Die einzige Variable in dieser Gleichung wird durch den Abstand dargestellt:

$$R_M = \frac{4}{3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \tau_c \quad \text{Gleichung 9}$$

$\gamma_I^2 = 7.16 \times 10^{16} \text{ rad}^2 \text{ s}^{-2} \text{ T}^{-2}$ (für den Proton-Kern)

$g_e = g$ -Werte des Elektrons

$S =$ Spin des Elektrons

$\mu_0 =$ Konstante des magnetischen Feldes

$\tau_c =$ Korrelationszeit

$\mu_B =$ Bohr'sches Magneton

Eine weitere Interaktion basiert auf der Veränderung des fluktuierenden magnetischen Feldes durch das induzierte magnetische Moment des Elektrons. Dieses wiederum wirkt sich auf die Kern-Relaxation aus: *Curie Spin Relaxation*. In den meisten Messsystemen, wenn die Elektron-Relaxationszeit größer ist als die Rotations-Korrelationszeit, kann diese vernachlässigt werden.

2.4.3 Optische Methoden

Bei der Charakterisierung von Oligonukleotiden gibt es zwei optische Verfahren: die Bestimmung des Schmelzpunktes und die strukturelle Untersuchung mittels Circular dichroismus Spektroskopie. Außer diesen optischen Methoden bedient sich die Biochemie einer weiteren Analytik, der Gelelektrophorese (native – oder denaturierte Abbildung). Die Funktionalität dieser wird im Rahmen dieser Arbeit nur als Ergänzung gehandhabt und auf Grund dessen nicht weiter definiert.

2.4.3.1 Schmelzpunktbestimmung mittels UV-Spektroskopie^[57]

Die Schmelzpunktbestimmung ist definiert als Funktion von UV-Absorption und Temperatur. Diese Messmethode ist sehr empfindlich, es können sehr niedrige Konzentrationen von 0.5µM detektiert werden. Beim Schmelzvorgang bei Oligonukleotiden erfolgt der Übergang von der geordneten Doppelhelix-Struktur in eine ungeordnete *random-coil*-Konformation, die dabei erhaltene Kurve hat einen sigmoiden Verlauf. Der geordnete Zustand befindet sich, basierend auf der Verminderung der Absorption durch die Wechselwirkung der π -Systeme der Nukleobasen unter einander, auf einem niedrigen Absorptionsniveau. Während des Schmelzvorgangs werden die Basen-Stacking-Wechselwirkungen zerstört, was zu einer Steigerung der Absorptionsintensität, auch Hyperchromizität genannt, führt. Der ungeordnete Zustand resultiert dann aus der Summe der Absorptionen der einzelnen Nukleobasen. Als Schmelzpunkt (T_m) ist dabei der Wendepunkt der Kurve definiert und kann zeichnerisch oder rechnerisch bestimmt werden.

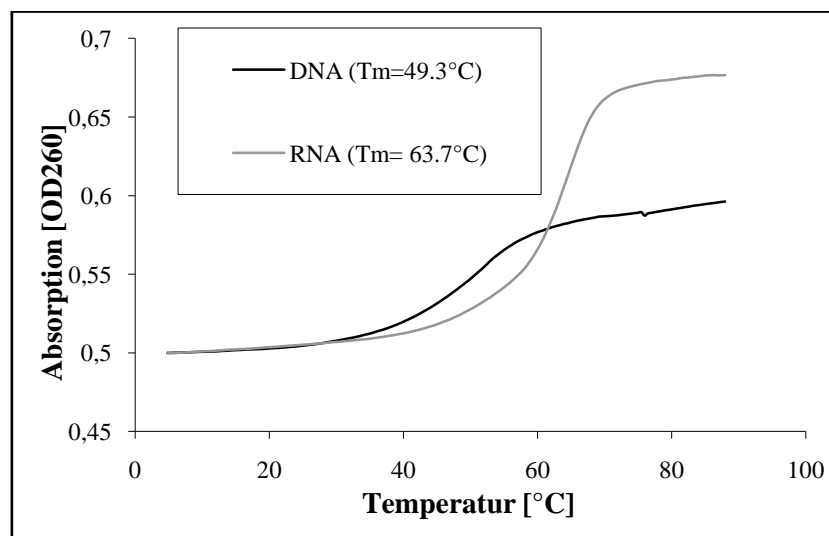


Abbildung 23: Vergleich der Schmelzkurven von DNA und RNA

Außer dem Schmelzpunkt kann die Intensität des Hyperchromizitätseffektes ein Maß für die Art und Anzahl der Basenpaarungen und die Basenstapelung in der Sekundärstruktur sein. Der Kurvenverlauf und die Steigung sind ebenfalls abhängig von der Sekundärstruktur. Bei einer einfachen Doppelhelix ist die Steigung der beiden Basislinien gleich Null und die Kurve ist im Wendepunkt symmetrisch. Bei einer Loop-Struktur dagegen beobachtet man eine kontinuierliche Steigung der Basislinien und nur eine geringe Steigung im Schmelzpunkt. Die erhaltenen Daten können des Weiteren für die Berechnung von thermodynamischen Daten wie Enthalpie, Entropie und freie Enthalpie, herangezogen werden.

Bei der Präparation der Oligonukleotid-Probe muss diese über den Schmelzpunkt hinaus erhitzt werden, anschließend bei dieser Temperatur einige Minuten inkubiert werden und dann langsam abgekühlt werden. Beim Abkühlen erfolgt die Wasserstoff-Brücken-Bildung zwischen den Basenpaaren. Das Gleichgewicht bei Oligomeren mit Regionen von ungepaarten Basen stellt sich langsamer ein als bei Doppelhelix-Regionen, so dass die Inkubationszeit und die Abkühlungsrate entsprechend angepasst werden müssen.

Eine Einschränkung dieser Methode ist die Vergleichbarkeit. Diese ist nur bei gleicher Oligonukleotid-Konzentration und Puffer gegeben. Dabei ist nicht nur die Zusammensetzung des Puffers von großer Bedeutung sondern auch der pH-Wert und die Salzkonzentration. Die Salzkonzentration beeinflusst die Abstoßung bzw. die Anziehung zwischen den einzelnen Strängen. In Abhängigkeit zum System kann durch die Salzkonzentration die Triple-Helix-Bildung begünstigt werden. Die Basis des Puffers darf keine Temperaturabhängigkeit aufweisen (nicht wie bei Tris- oder HEPES-Puffer der Fall). Deshalb ist die Benutzung von Phosphat- oder Cacodylat-Puffer sehr verbreitert. Doch der gleiche Puffer ist nicht für jedes Konstrukt geeignet, da die Schmelzpunkttemperatur eines Systems durch die hohe Salzkonzentration noch weiter erhöht wird und nicht mehr im wässrigen Medium messbar ist. Die Messung der Absorption erfolgt bei 260nm, weil hier für die meisten Oligonukleotide das Absorptionsmaximum liegt. Doch ist diese sehr von dem Verhältnis zwischen den Basenpaaren abhängig. Stränge mit hohem Gehalt an G-C-Basenpaarungen absorbieren bei höheren Wellenlängen als die mit hohem A-T-Gehalt.

2.4.3.2 Circulardichroismus Spektroskopie (CD)

Die Methode ermöglicht es die Struktur, die Stabilität und die Ligandenanbindung von optisch aktiven asymmetrischen Biopolymeren in Lösung unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen^[58]. Dabei dient die Konformationsänderung/Chiralität von Substanzen als

Charakterisierungseigenschaft. Die Messungen sind einfach aufzunehmen, aussagekräftig und spezifisch für die jeweilige Konformation der Biopolymere.

Der Circular dichroismus beruht auf der Wechselwirkung von zirkular polarisiertem Licht mit Materie. Der verwendete Lichtstrahl ist zusammengesetzt aus zwei kohärenten, zirkular polarisierten Strahlen entgegengesetzten Drehsinns. Beim Durchlaufen des Lichts durch die optisch aktive Probe werden die beiden Komponenten des polarisierten Lichts unterschiedlich stark absorbiert, was sich in einer unterschiedlichen Intensität der Probe zeigt. Gemessen wird die Überlagerung der beiden Lichtkomponenten mit einem Spektralphotometer. Das nach der Probe gemessene Licht wird in molare Elliptizität Θ [mdeg] oder der Differenz zwischen den molaren Extinktionskoeffizienten von links und rechts angegeben. Trägt man das Θ in Abhängigkeit zur Wellenlänge auf, so ergibt sich das charakteristische CD-Spektrum.

Nach der Methodenentwicklung von M.Grosjean 1960^[59] und Weiterentwicklung von G.Holzwarth 1965^[60] fand diese Technik ihre erste Anwendung bei der Identifizierung der sekundären Komponenten von Proteinen. CD-Untersuchungen im Fern-UV und im Nah-UV können Informationen zur Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen liefern. Im fernen UV-Teil des Spektrums (190-240nm) kann die Peptidbindung detektiert und im nahen UV-Teil (240-300nm) die Umgebung von aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Trp und Tyr untersucht werden. Daher kann Fern-UV verwendet werden, um die Protein-Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt, *random coil*, Abbildung 24) und Nah-UV, um die Tertiärstruktur von Proteinen zu untersuchen. Dabei ist es auch möglich, eine Mischung von verschiedenen Konformationen zu detektieren^[61].

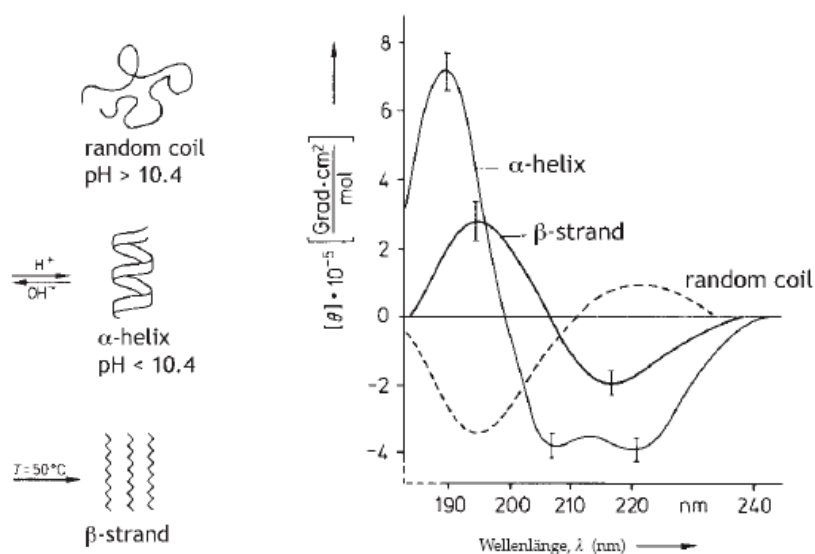


Abbildung 24: CD-Spektren von den verschiedenen Protein Sekundärstrukturen am Beispiel von Poly-L-Lysin^[62]

Die erstmalige Anwendung der Circular Dichroismus Spektroskopie auf die Strukturbestimmung von DNA und RNA erfolgte im Jahre 1964 von J.Brahms und F.Mommaerts^[63]. In ihrer Arbeit zeigten sie die Unterschiede zwischen den beiden dominierenden Helix-Formen A und B bei RNA und DNA. Jedes Nukleotid ergibt ein charakteristisches Signalspektrum^[64] unter der Einwirkung des zirkular polarisierten Lichts. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und Basenstapelung (Orientierung des gesamten Systems; Ordnung) kommt es zur Verstärkung der Elliptizität und zu einem für jede Konformation spezifischen Spektrum. Des Weiteren konnten V.Ivanov *et al.*^[65] den Einfluss von Alkohol auf die Strukturveränderung beweisen. Eine DNA vorliegend in der B-Form kann durch die Zugabe von Ethanol in die A-Form überführt werden. Die Zugabe von Alkoholen oder auch Formaldehyd bei RNA dagegen führt zur Erniedrigung der Elliptizität, welche nicht wieder zunimmt bei der Erhöhung der Konzentration am Zusatz^[63]. Dies bedeutet, dass die RNA keine alkoholabhängige Konformationsänderung durchläuft. Dieses Phänomen konnte von R.Hannoush und M.Damha beobachtet werden, da die beiden CD-Spektren der beiden Helix-Formen sich stark unterscheiden und auch die Mischform (A- und B-Abschnitte in einem Oligomer) quantitativ analysiert werden kann^[66]. Des Weiteren können auch DNA-RNA-Hybride untersucht werden^[59, 67].

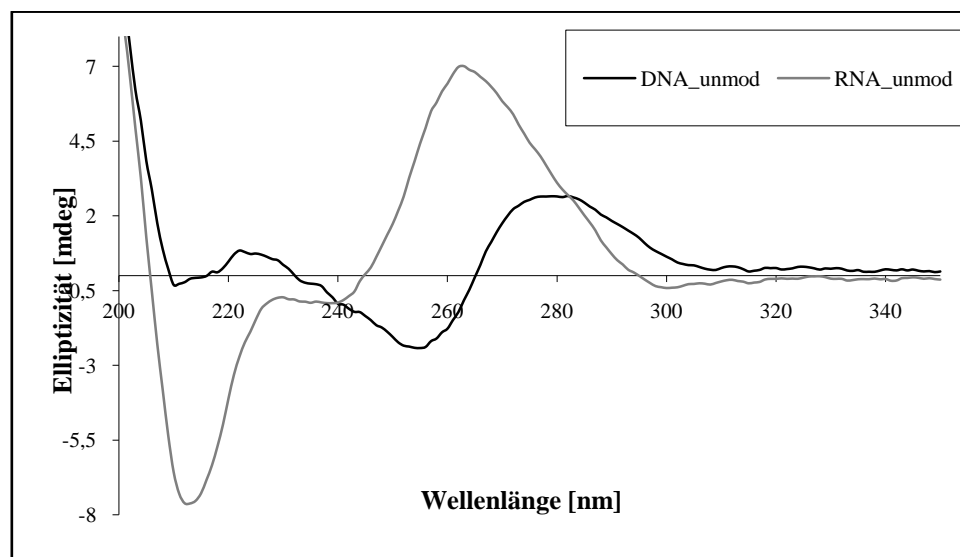


Abbildung 25: Vergleich zwischen den zwei häufigsten Helix-Formen

Schon im Jahre 1972 untersuchten D.Moore und T.Wagner die Entstehung der unterschiedlichen CD-Spektren bei den A- und B-Formen^[68]. Ihre Arbeit stellt eine Ergänzung von zwei Methoden dar, die experimentelle Testung der verschiedenen Konstrukte und die mathematische Simulation der dazu gehörigen Spektren. Dabei konnte der

Unterschied der CD-Spektren von DNA und RNA auf eine konformationsbezogene Komponente reduziert werden. Die Orientierung der Basenpaarungen zu der Helix-Achse ist entscheidend für die verschiedenen Kurvenverläufe.

Bei der Detektion des Spektrums muss berücksichtigt werden, dass diese nicht nur von der Konformation des zu untersuchenden Konstrukts abhängig ist sondern auch durch den Puffer und die Messtemperatur beeinflusst werden. Dabei ist die Salzkonstruktion des Puffers^[69, 70] entscheidend, da diese auch die Struktur beeinflussen kann (Kap.2.4.3.1), das Gleiche trifft auch auf die Temperatur zu. Hierbei sollte die Messtemperatur in dem Bereich des geordneten Zustandes gewählt werden und vor allem nicht in der Umgebung des Schmelzpunktes. Diese Abhängigkeit der CD-Spektroskopie von der Temperatur findet andererseits ihre Anwendung bei der Bestimmung des Schmelzpunktes vor allem bei Proteinen.

Die CD-Spektroskopie ist nicht für die Modifizierung des Phosphatrückgrats empfindlich. Die Veränderung zu Thioaten ergibt nahezu identische Kurvenverläufe wie bei den unmodifizierten Strängen.

3 Aufgabenstellung

Um die Strukturaufklärung von biologisch relevanten Komplexen betreiben zu können, ist die Etablierung der Messmethode und die vollständige Charakterisierung der Marker unumgänglich. Bei neuen Sonden ist die Vorgehensweise von dem ungekoppelten, freien Marker über mehrere Zwischensysteme bis zum biologischen Oligomer zu wählen (Abbildung 26).

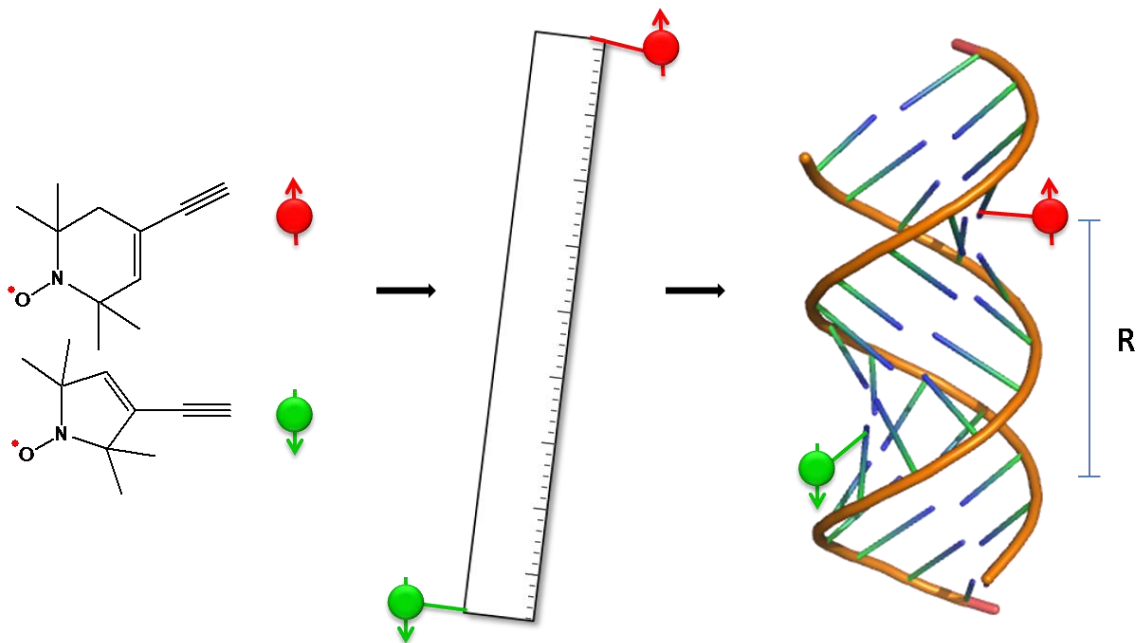


Abbildung 26: Charakterisierungsstrategie

Die globale Aufgabenstellung der Strukturaufklärung durch Benutzung von Spin-Sonden lässt sich im Rahmen dieser Arbeit in drei Unterbereiche unterteilen. Das Repertoire am zugänglichen Nitroxyl-Spin-Label sollte im Rahmen dieser Arbeit vergrößert werden. Dies stellt den ersten Schritt zu einer 3D-Abstandsbestimmung mittels unterscheidbarer Nitroxide dar. Dabei sollte in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Prof. T.F. Prisner nachgewiesen werden, wie sich der Austausch von Protonen gegen Deuterium und von ^{14}N - gegen ^{15}N -Isotop auf die *continuous wave*-EPR-Messungen auswirkt. Nach der erfolgreichen Synthese der neuen Nitroxid-Spin-Label sollte die Charakterisierung dieser im Vergleich zum bekannten Label TPA (2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-N-oxyl) erfolgen, siehe Abbildung 27.

Ein Vergleich der ungekoppelten Nitroxide mittels *cw*-EPR gibt zwar die ersten Anhaltspunkte über die EPR relevanten Eigenschaften der Spin-Label, ermöglicht aber nicht die vollständige Etablierung in den benutzten EPR-Methoden. Für die Testung der PELDOR

(*pulsed-electron-double-resonance*)-Messmethode sind Systeme mit zwei paramagnetischen Markern notwendig. Um diese Messungen an einem einfachen System durchführen zu können, sollten fünf unterschiedliche lineare Systeme (Abbildung 28) synthetisiert und vermessen werden.

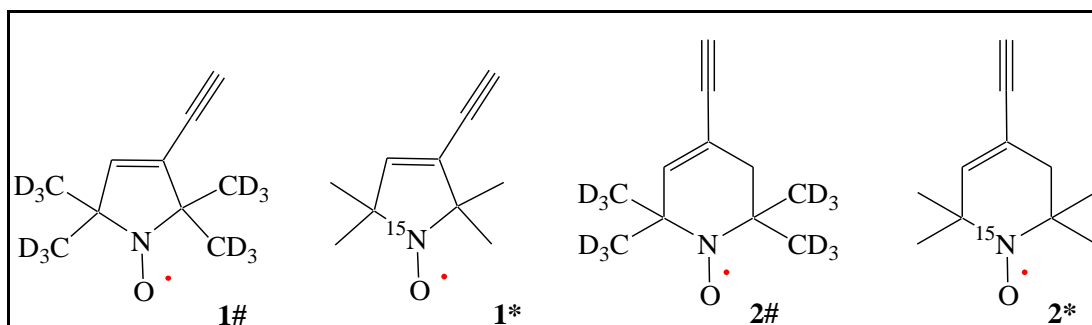


Abbildung 27: Die synthetisierten Nitroxyl-Spin-Label

1#: TPA= 2,2,5,5-Tetramethyl-**d**₁₂-3-pyrrolin-N-oxyl-acetylen

1*: TPA= 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-¹⁵N-oxyl-acetylen

2#: TEMPA= 2,2,6,6-Tetramethyl-**d**₁₂-3,4-dehydro-piperidin-N-oxyl-4-acetylen

2*: TEMPA= 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-¹⁵N-oxyl-4-acetylen

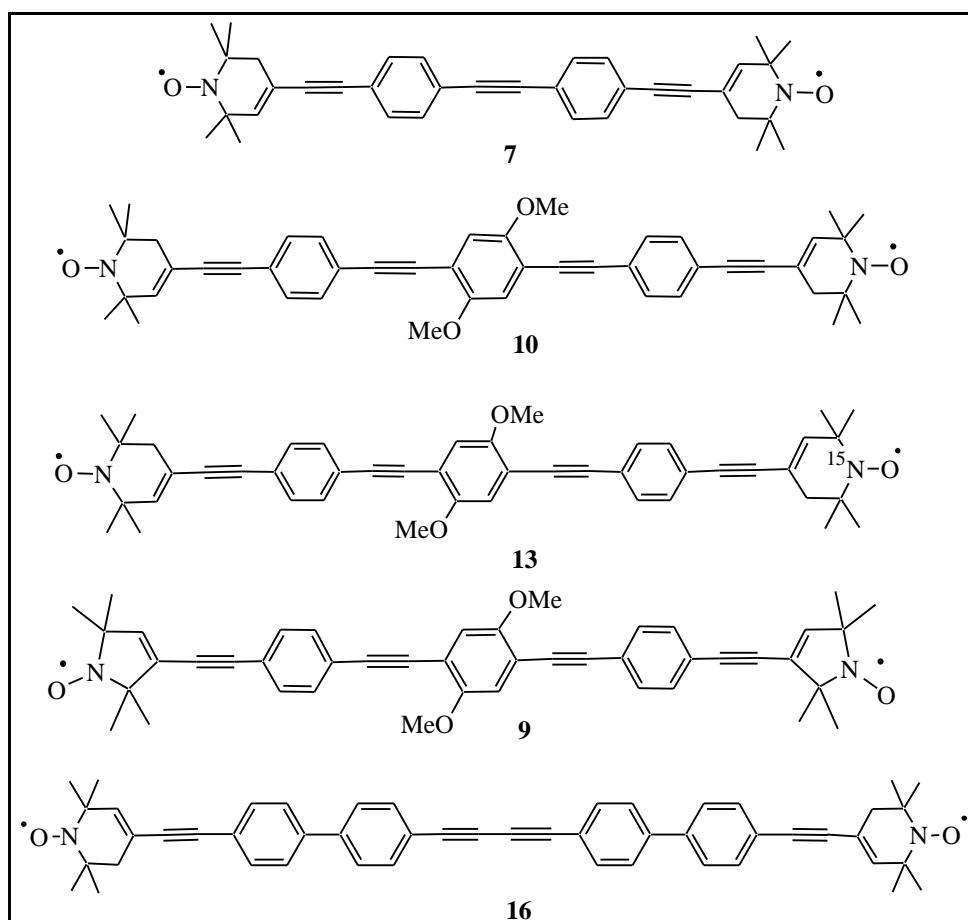


Abbildung 28: Synthetisierte lineare Systeme

Nach der Charakterisierung der linearen Systeme sollte die Übertragung dieser Ergebnisse auf die biologischen Komplexe stattfinden. Die neuen Nitroxid-Spin-Label (**2** und **2***; 4-Ethynyl-2,2,6,6-tetramethyl-piperid-3,4-en-1-oxyl) sollten in Modell-RNAs eingebaut und deren Einfluss auf die Oligomere untersucht werden. Die Einführung erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie in der Arbeit von N.Piton um die strukturelle Vergleichbarkeit der Sonden zu testen. Im Rahmen dieser Arbeit dienen die bereits bekannten TPA markierten RNAs^[44] als Vergleich.

Mit den drei zuvor etablierten Spin-Labeln (**1**, **2** und **2***) sollte die Markierung von biologisch relevanten Konstrukten erfolgen. Hierbei mussten zusätzlich verschiedene Iodo-Basen, sowohl für die RNA- wie auch für die DNA-Synthese, synthetisiert werden.

Als biologische Komplexe wurden DNA-RNA-Hybride, ein L-Shape, ein Tetra-Loop, eine Diels-Alderase und ein Aptamer gewählt. Diese sollten synthetisiert und an verschiedenen Stellen mit paramagnetischen Sonden markiert werden. Das Ziel ist die Etablierung der EPR-Methode auch auf strukturell komplexe und biologisch relevante Systeme.

Außer der EPR-Methode sollte im Rahmen dieser Arbeit die Benutzung der synthetisierten Marker für andere strukturaufklärende Messmethoden getestet werden.

4 Eigene synthetische Arbeiten

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den einzelnen Thematiken dieser Arbeit. Dabei erfolgt vor jedem Syntheseteil eine kurze Einführung in die Hintergründe und Fragestellungen. Es wurde diese Form der Darstellung gewählt, da die einzelnen Themen zwar eine gemeinsame Fragestellung „Strukturaufklärung mittels Spin-gelabelter Moleküle“ aufweisen, doch die Konstrukte und die Ziele der einzelnen Projekte unterschiedlich sind.

4.1 Isotopen-markierte Spin-Label

Um die Palette der synthetisch verfügbaren Nitroxide zu erhöhen wurden weitere Spin-Label durch Isotopen-Markierung hergestellt^[71]. Dabei wurden jeweils ein Analogon vom Fünf- und eines vom Sechs-Ring mit deuterierten Methyl-Gruppen synthetisiert. Außerdem wurde das ¹⁵N-markierte TPA zugänglich gemacht.

Die Syntheseherausforderung beginnt bei allen drei Molekülen mit der Synthese des markierten 2,2,6,6-Tetramethyl-piperidons (TEMPO). Für die Herstellung dieser Verbindung sind zwei Wege publiziert. Der erste stellt eine Ein-Pot-Reaktion von Aceton und Ammonium-Donor dar und ist sowohl mit Gas^[72a] als auch mit Ammonium-Salzen möglich^[72b]. Bei der zweiten Syntheseroute ist zuerst die Zugänglichkeit von Phoron (2,6-Dimethyl-3,5-dien-hepta-4-on) erforderlich^[72c]. Diese Verbindung mit Deuterium ist nicht käuflich zu erwerben und muss im Vorfeld synthetisiert werden. Hierbei erfolgt ausgehend von Aceton eine säure- oder basenkatalysierte zweifache Aldol-Reaktion gefolgt jeweils von einer Kondensation. Alle Versuche das Produkt zu isolieren scheiterten, woraufhin die erste Methode favorisiert wurde.

Bei der Ein-Pot-Reaktion wurden zwei Ammonium-Donoren getestet. Diese wurden aber nicht für dieselbe Verbindung verwendet und können somit nicht vorbehaltlos verglichen werden.

Für die Synthese von D₁₂-TEMPO wurde in eine Aceton-Kalziumchlorid-Suspension Ammoniakgas bis zur Sättigung eingeleitet. Dabei fungiert der Ammoniak nicht nur als Reaktionspartner bei der Ringbildung, sondern im Vorfeld schon als Base bei der Aldol-Reaktion. Das vorliegende Kalziumchlorid ist als Wasser-Binder zur Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts auf die Seite des Produktes notwendig. Zur Isolierung des Produktes muss das als Salz vorliegende Piperidon deprotoniert werden. Die Ausbeuten bei dieser Reaktion liegen bezogen auf das gesamte Aceton-Volumen bei 5-10%.

Für die Herstellung des ^{15}N -markierten Piperidons wurde die Methode mit Ammoniumchlorid getestet. Dabei wird das erforderliche Ammonium-Nukleophil durch Erwärmen generiert. Um Verluste durch Gasbildung zu vermeiden, wurde diese Reaktion im Autoklaven durchgeführt. Die erzielten Ausbeuten lagen hierbei bei 20%

Alle drei Verbindungen wurden nach bereits bekannten Synthesewegen synthetisiert. Die cw-EPR-Spektren der Verbindungen, erstellt und ausgewertet von I.Krstic aus der Gruppe von Prof. T.F.Prisner, wurden bei einer Konzentration von 0.1mM in 100 μL Toluol aufgenommen. Die Lösung wurde im Vorfeld entgast, um die Konzentration am störenden Sauerstoff zu reduzieren.

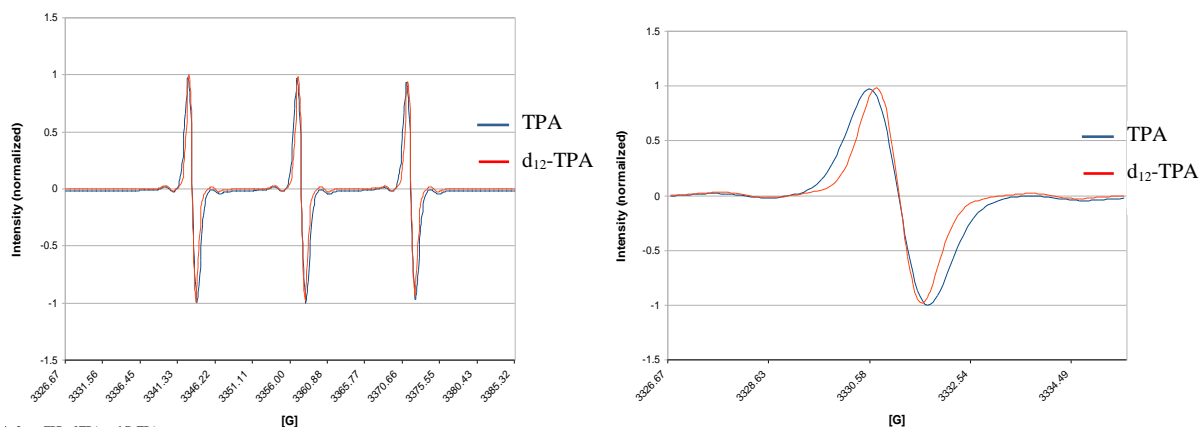


Abbildung 29: cw-EPR-Spektrum von TPA und D_{12} -TPA gesamt und als Ausschnitt^[71] (I.Krstic)

In der Abbildung 29 ist der direkte Vergleich zwischen Deuterium-Wasserstoff gezeigt. Hierbei ist deutlich eine Verschmälerung der Signalbreite zu erkennen.

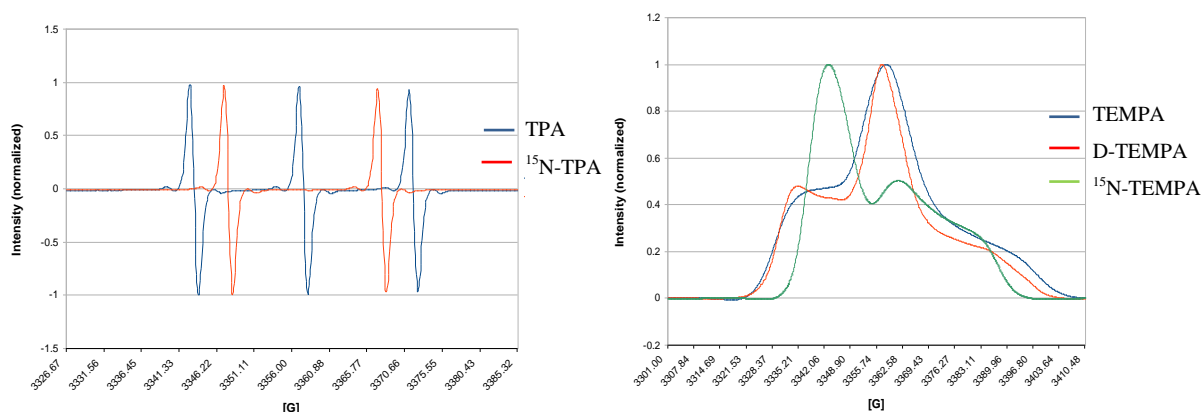


Abbildung 30: a) cw-Spektrum von TPA und ^{15}N -TPA und b) Frequenz-Scan der verschiedenen TEMPA Derivate^[71] (I.Krstic)

Beim Vergleich der beiden Stickstoffisotope in der Abbildung 30 ergibt sich die erwartete Aufspaltung in zwei statt drei Signallinien. Entscheidend ist hierbei der Spin des Stickstoffatoms, welcher bei ^{14}N 1 und bei ^{15}N $\frac{1}{2}$ beträgt. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Isotopen wird bei der Betrachtung des Frequenz-Scans deutlich. Der Kurvenverlauf verändert sich, so dass eine gezielte Detektion und Anregung der einzelnen Spin-Label möglich erscheint. So kann das ^{15}N -TEMPA bei 3343G angeregt und bei 3382G detektiert werden ohne das Echo des ^{14}N -Spin-Labels zu sehen. In einer Mischung der beiden Isotopen kann nach einer Anregung der ^{15}N -markierten Verbindung das Echo vom ^{14}N -TEMPA-Nitroxid bei 3335G detektiert werden (Abbildung 30b).

Fazit: Die freien Spin-Label zeigen die basierend auf der Theorie erwarteten *cw*-EPR-Spektren. Im nächsten Schritt muss deren Verhalten gebunden an ein Nukleosid und anschließend am Oligomer untersucht werden.

Im Falle der beiden Stickstoff-Isotope sollte kein Unterschied im Verhalten, sowohl am Nukleosid wie auch am Oligomer, beobachtet werden. Somit können die Ergebnisse von ^{14}N -markiertem Nitroxid auf das ^{15}N -markierte übertragen werden.

Die Signalbreiten-Verkleinerung bei deuteriertem TPA kann zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses in Oligomeren führen.

4.2 Lineare biradikale Systeme

Die RNA ist im Gegensatz zu einem linearen und starren System viel schwieriger zu analysieren. Auf Grund dessen werden im Vorfeld des RNA- und DNA-Labelings verschiedene Systeme synthetisiert und untersucht. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der genaueren Abstandsbestimmung und der Möglichkeit die verschiedenen Nitroxid-Radikale **1**, **2** und **2*** in der EPR zu unterscheiden.

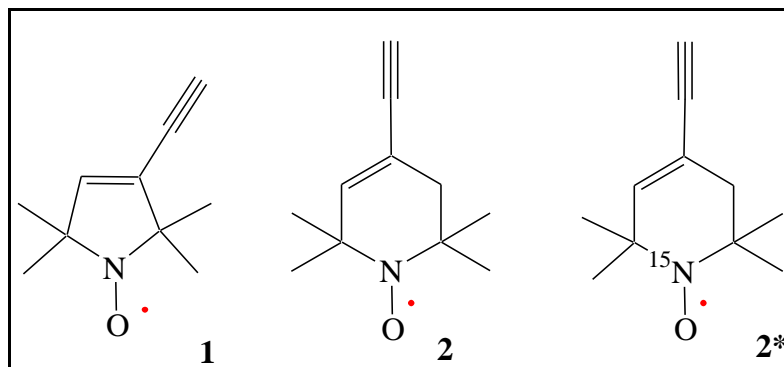


Abbildung 31: Die verwendeten Nitroxide

1: TPA = 2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl

2: TEMPA = 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1*N*-oxyl-4-acetylen

2*: TEMPA-¹⁵N = 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1¹⁵*N*-oxyl-4-acetylen

Um die Abstände exakt bestimmen zu können, benötigt man lange (mindestens 20Å) und unflexible Kohlenstoffketten. Als besonders geeignet haben sich die Acetylen-Benzol-Gerüste erwiesen. Diese sind einfach zugänglich und die Systeme sind aufbauend auf der Sonogashira-Kreuz-Kupplung einfach zu synthetisieren.

Die Systeme werden bei der Beantwortung von drei Aufgabenstellungen eingesetzt:

- Optimierung der EPR-Parameter für die neuen Spin-Label
- Eichung des Systems für neue Nitroxid-Radikale
- Gewährleistung der Unterscheidbarkeit der einzelnen Abstände in einem System mit drei verschiedenen Radikalen

Das einfachste System, welches die Bedingung, über 20Å lang zu sein, erfüllt, besteht aus zwei Benzolen verbunden durch ein Acetylen.

4.2.1 Synthese

4.2.1.1 System 1

Die Synthese eines Abstandshalters zwischen zwei Spin-Label kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Die retrosynthetische Betrachtung des Zielmoleküls ergibt unterschiedliche Syntheseansätze. Zwei sind in diesem Fall von besonderem Interesse (siehe Abbildung 32). Betrachtet man die Schnittstelle 1, so ergeben sich zwei unterschiedliche Bausteine. Bei der anderen Möglichkeit, Schnittstelle 2, sind es eigentlich drei Fragmente, wobei es sich bei zwei Fragmenten um identische, das Nitroxid TEMPA, handelt. Dies führt im Endeffekt zu nur zwei unterschiedlichen Synthesefragmenten.

Nach dem abwägen der Vor- und Nachteile der beiden Möglichkeiten entschied ich mich für den ersten Syntheseweg. Das Hauptmerk lag dabei auf der möglichen Austauschbarkeit der einzelnen Gerüstbausteine im Hinblick auf unterschiedliche Nitroxide.

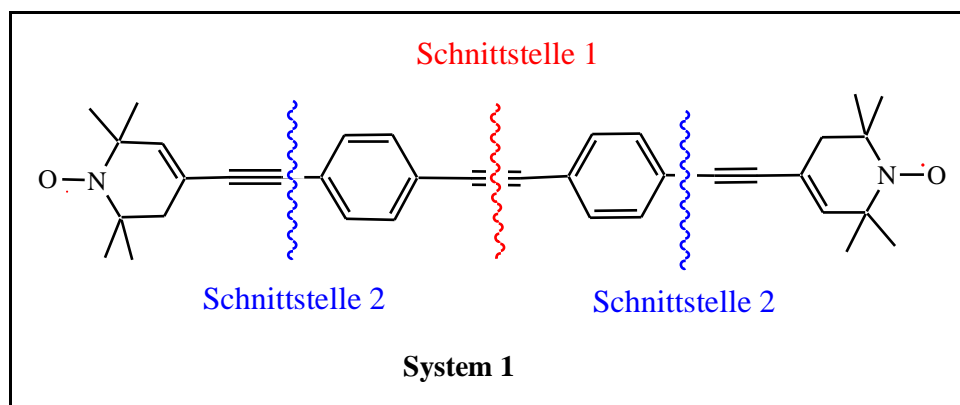


Abbildung 32: Retrosynthetische Zerlegung des Systems 1

Die Synthese wurde mit Di-iodo-benzol begonnen^[73a], wobei im ersten Schritt eine selektive Sonogashira-Kreuz-Kupplung nur an einem Iod durchzuführen war. Dieser Syntheseschritt lässt sich durch das Äquivalentenverhältnis steuern. Die Reaktion erfolgt mit 60% Ausbeute.

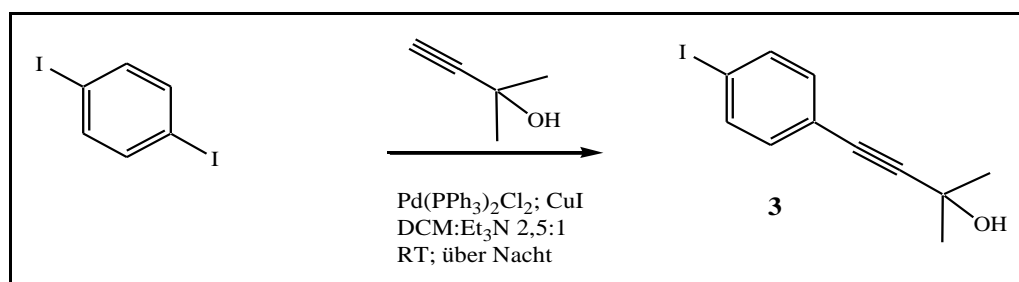


Abbildung 33: selektive Sonogashira-Kreuz-Kupplung

Die anschließende Kupplung des Nitroxids und die Entschützung des Acetylen-Bausteins ergeben das erste Synthesefragment (**5.2**).

Für die Herstellung der zweiten Komponente muss ausschließlich das Nitroxid an das Diiodo-benzol mittels Sonogashira-Kreuz-Kupplung gekoppelt werden. Die vollständige Synthese des Systems 1 ist in Abbildung 34 dargestellt. Die Ausbeute beträgt hierbei 80%, da als Konkurrenzreaktion noch die Homo-Kupplung des Acetylen-Bausteins (5.2) zu beobachten ist.

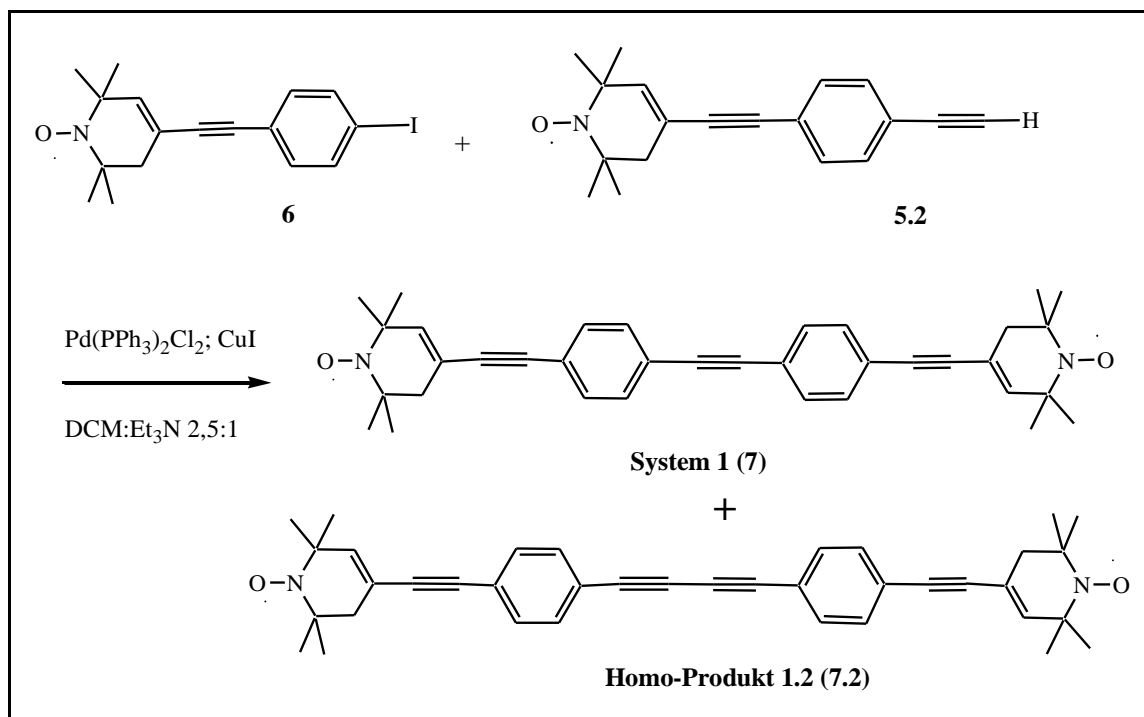


Abbildung 34: Vollständige Synthese des Systems 1

4.2.1.2 System 2

Bei der Abstandsbestimmung (Kap. 4.2.2.1) von Systems 1 sind unerwartete Schwierigkeiten aufgetreten. Die Entfernung zwischen den beiden TEMPA-Radikalen ist nicht ausreichend genug um die J -Kopplung im EPR-Experiment vernachlässigen zu können. Dies erzwang die Verlängerung des Abstandshalters. Der einfache Einbau von weiteren Benzol-Acetylen-Einheiten ist aber nicht empfehlenswert, weil damit die Löslichkeit des Systems herabgesetzt wird. Das synthetisierte System muss sich aber in Toluol lösen können, weil dies das meist verwendete Lösungsmittel für das PELDOR-Experiment darstellt. Als eine Alternative bietet sich der Methoxy-substituierte Benzolring an. Dieser ist kommerziell erhältlich und bedarf nur einer Funktionalisierung durch Halogene.

Die symmetrische Iodierung des Aromaten ist durch die vorhandenen Methoxy-Gruppen (+M-Effekt) gewährleistet und kann nach einer in der Literatur bekannten Reaktion durchgeführt werden.

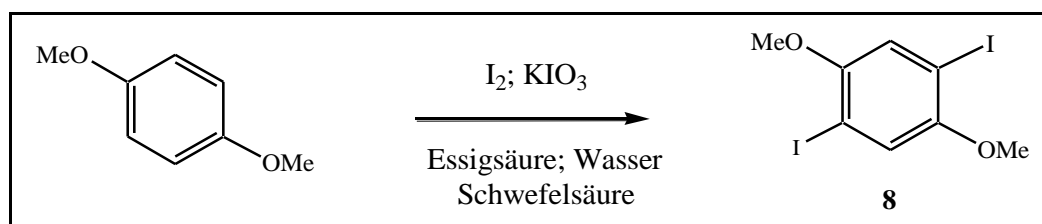


Abbildung 35: Synthese von Di-Methoxy-di-iodo-benzol

Die Synthese des für die Sonogashira-Kreuz-Kupplung erforderlichen Di-iodo-di-methoxybenzols erfolgt durch eine elektrophile Substitution am Aromaten. Als Katalysator wird hierbei Kaliumiodat verwendet^[73b].

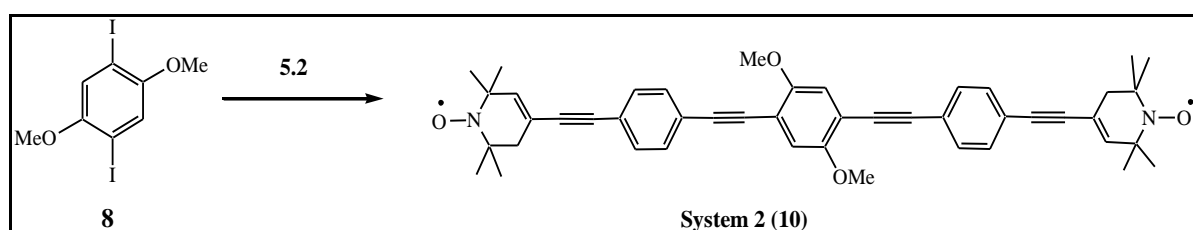


Abbildung 36: Synthese des Systems 2

Die so erhaltene Verbindung **8** kann in einer Reaktion mit zwei Äquivalenten des Acetylen-Bausteins umgesetzt werden (Abbildung 36). Das erhaltene Produkt (System 2, in einer Ausbeute von 55%) ist ein gelber Feststoff, der sich nur in stark unpolaren Lösungsmitteln lösen lässt.

4.2.1.3 System 3

Für die Synthese des Hetero-Systems musste zuerst das zur Verbindung **5.2** entsprechende Konstrukt mit dem ¹⁵N-gelabelten TEMPA-Nitroxid synthetisiert werden.

Der erste Schritt der Kupplung an das (4-(4-Iodo-phenyl)-2-methyl-but-3-in-2-ol) (**3**) erfolgt in vergleichbaren Ausbeuten wie bei dem ¹⁴N-Isotop. Bei der nachfolgenden Entschützung der Acetyleneinheit in Toluol bei 100°C konnte nur eine Reinausbeute von 56% (anstatt 86% wie bei der ¹⁴N-Isotopen Verbindung) erzielt werden.

Versuche das Di-iodo-di-methoxy-benzol mit einem Äquivalent 4-(4-Ethynyl-phenyl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1¹⁵N-oxyl (**5.2***) zum mono-substituierten Benzol-Konstrukt umzusetzen, führten immer (sowohl kinetisch als auch stöchiometrisch kontrolliert) zum Erhalt der di-substituierten Komponente.

Dieser unerwartete Syntheseabbruch forderte ein Umdenken in der Synthesestrategie. Hierbei sind zwei denkbare Möglichkeiten möglich:

1. Funktionalisierung des Di-methoxy-benzols mit unterschiedlichen Halogeniden, um die Selektivität der nachfolgenden Sonogashira-Kreuz-Kupplung zu gewährleisten
2. Vertauschen der Acetylen- und der Halogen-Komponenten bei den jeweiligen Synthesebausteinen

Durch das Vorhandensein der Acetylen-Nitroxid-Komponenten wurde die unterschiedliche Funktionalisierung des Benzols als die kostengünstigere Variante in Angriff genommen. Basierend auf dem literaturbekannten Syntheseweg^[74] wurde 1-Bromo-4-iodo-2,5-dimethoxybenzol (**11**) hergestellt.

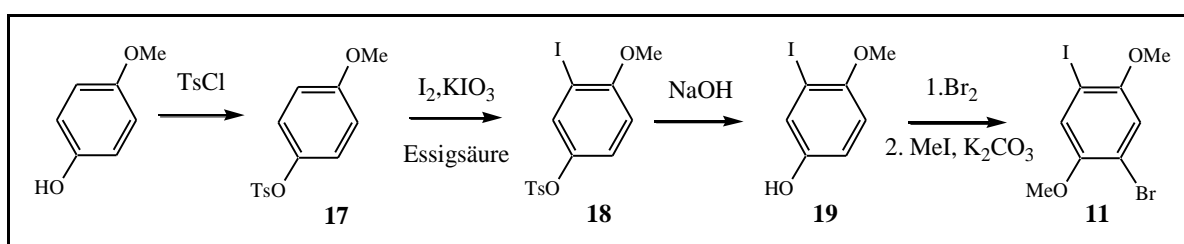


Abbildung 37: Synthese von 1-Bromo-4-iodo-2,5-dimethoxybenzol

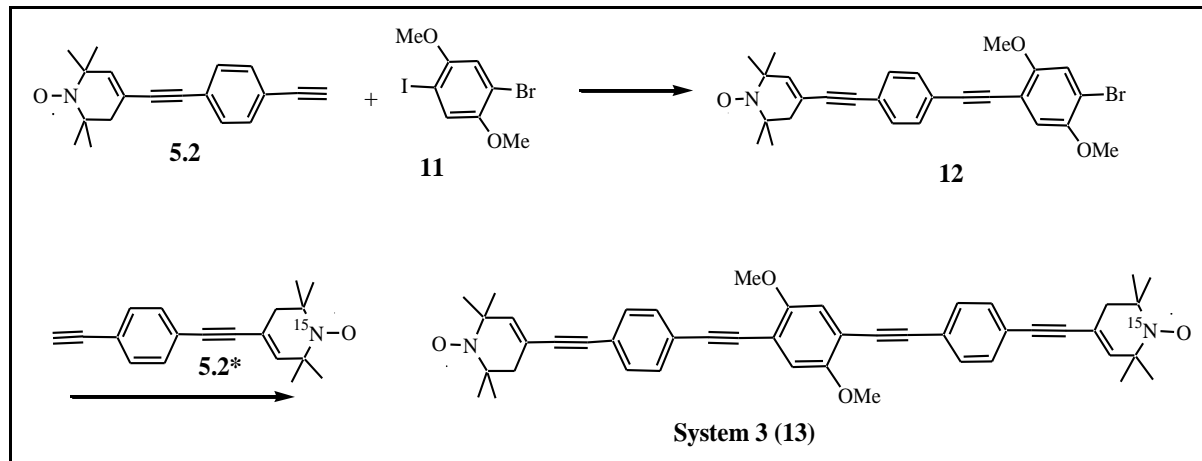


Abbildung 38: Synthese von System 3

Die so erhaltene Verbindung konnte durch die Selektivität der Sonogashira Kupplung bezüglich der Reaktivität am Iod- oder Bromaryl einfach substituiert werden. Dabei sind die Temperatur und die Wahl des Katalysators entscheidend. Die Reaktion an der Iodo-Position konnte unter Verwendung von Pd(II)-Katalysator mit einer Ausbeute von 83% und ohne das Auftreten der di-substituierten Komponente synthetisiert werden. Zur Aktivierung der Brom-Kohlenstoff-Bindung wurde mit dem Palladium(0)-Katalysator gearbeitet. Die Kupplung zum System 3 mit der ¹⁵N-TEMPA-Benzol-Acetylen-Verbindung (**5.2***) erfolgte bei 55°C und 5.5

Stunden. Die Reduzierung der Nitroxide und die Bildung des Homo-Produktes konnten bei diesen Bedingungen nicht beobachtet werden.

4.2.1.4 System 4

Um den Einfluss des Abstandhaltersystems auf die EPR-Messungen bestimmen zu können, wurde außer den vorhandenen Systemen noch ein weiteres nur mit TPA (Fünfring-Nitroxid) versehenes Molekül synthetisiert. Hierbei handelt es sich aufbauend auf dem System 2 um ein Homo-di-Radikal-System. Als Nitroxid-Label wird TPA (2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl) verwendet.

Basierend auf der vollständigen Charakterisierung dieses Spin-Labels sowohl durch die EPR- wie auch durch die MD-Methode^[75], dient diese Komponente als Standard, an dem die Charakterisierung des TEMPA (Sechsring)-Nitroxids vorgenommen werden soll.

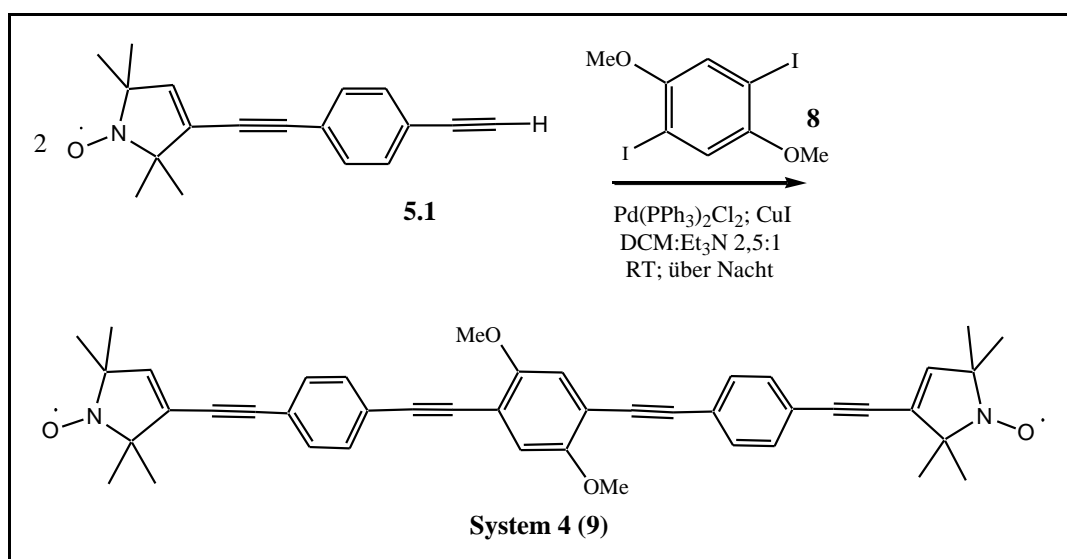


Abbildung 39: Synthese von System 4

Die Synthesestrategie unterscheidet sich nicht von der des Systems 2, womit zuerst die TPA-Benzol-Acetylen-Komponente (5.1) synthetisiert werden musste. Die zweistufige Reaktion konnte mit einer Gesamtausbeute von 68% vollzogen werden. Die anschließende Sonogashira-Kreuz-Kupplungs-Reaktion erfolgte mit dem Di-iodo-di-methoxy-benzol in einer zum System 2 vergleichbaren Ausbeute von 51%.

4.2.1.5 System 5

Bei der Messung der einzelnen Systeme konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Verschlechterung der Spektren bezüglich der Oszillationsdauer und des Signal-Rausch-Verhältnisses am Abstandhalter liegt. Um dies untersuchen zu können, wurde ein weiteres

System synthetisiert. Hierbei wurde die vollständig beschriebene Biphenyl-dialkin-Verbindung^[76] als Abstandhalter verwendet.

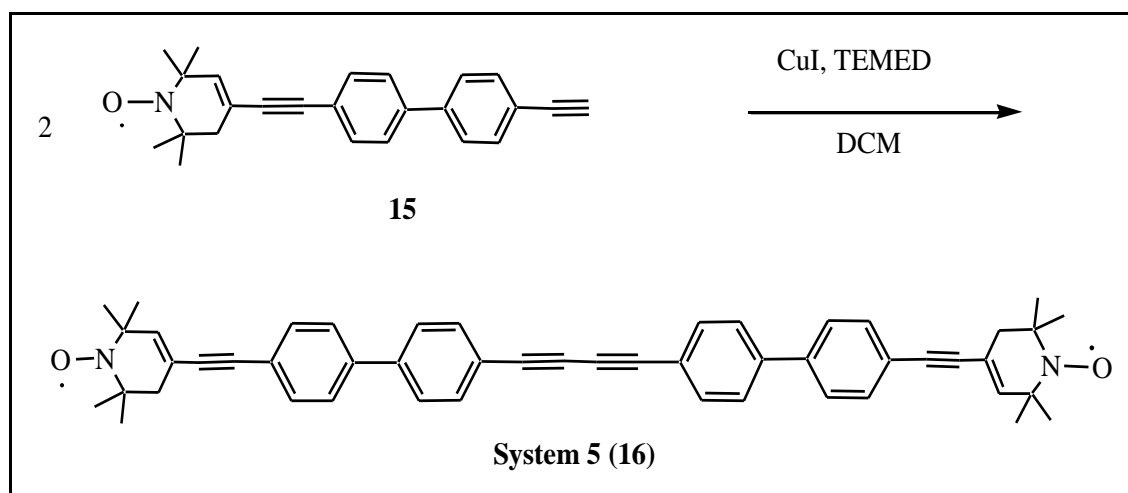


Abbildung 40: Synthese von System 5

Die Synthese besteht aus insgesamt vier Schritten, wobei durch die Zurverfügungstellung einer Zwischenstufe von D.Markgraf^[76] der erste Syntheseschritt ausgespart werden konnte. Für die letzten drei Reaktionsschritte konnte eine Gesamtausbeute von 59% erzielt werden.

4.2.2 Distanzbestimmungen mittels PELDOR

Die Vergleichsdistanzen für die experimentellen Daten wurden mittels zwei verschiedener Programme ermittelt. Dabei handelt es sich einmal um *Chem3D Ultra 6.0* und um *PyMol*.

Die experimentelle Bestimmung der Abstände zwischen zwei Kernen kann mit zwei verschiedenen analytischen Methoden erfolgen. Beim Vorhandensein von Kristallen kann eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden. Diese Methode ermöglicht gleichzeitig mit der Abstandsbestimmung auch die Bestimmung der ausgebildeten Kristall-Packung. Ist die Kristallisation der Verbindung nicht möglich, kann die Distanz (wenn das System paramagnetisch markiert ist) mittels EPR (Elektronen-Paramagnetische-Resonanz) ermittelt werden.

Der experimentell bestimmte Abstand bezieht sich bei einem mit Nitroxid gelabelten System auf die Entfernung zwischen den beiden Nitroxid-Stickstoffen. Dies begründet sich auf der hohen Aufenthaltswahrscheinlichkeit des freien Elektrons in den Stickstoff-Orbitalen. Diese Lokalisierung wird durch das Vorhandensein von vier Methyl-Einheiten durch Abschirmung stabilisiert.

Die EPR- Messungen wurden in einer Kooperation mit der Gruppe von Prof. T.F.Prisner von B.Endeward durchgeführt und analysiert.

Ein PELDOR-Experiment erfolgt bei 20K (Kelvin) und einem jeweiligen, auf das zu untersuchende System abgestimmten, Lösungsmittel. Bei den Messungen der Systeme wurde Toluol als Lösungsmittel gewählt, beruhend auf dem sehr niedrigen Schmelzpunkt von -95°C . Die synthetisierten Verbindungen sind alle in Toluol löslich, was eine Voraussetzung für die gewählte Strategie darstellt.

Zur Schmälerung der Linienbreite und zur Minimierung des Hintergrundrauschens wurden die Messungen nicht nur in Toluol, sondern auch in deuteriertem Toluol durchgeführt. Der gewünschte Effekt konnte aber nicht beobachtet werden. Eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses konnte aber durch die Benutzung des ortho-Phenylesters erzielt werden.

4.2.2.1 System 1

Die PELDOR-Messungen am System 1 lieferten keine eindeutigen Abstandsbestimmungen. Die Schwierigkeiten liegen dabei in der zu kurzen Entfernung zwischen den beiden Nitroxid-Radikalen. Dies führt zu einer großen J -Kopplung, welche die genaueren Distanz-Bestimmungen verhindert.

Auch die Versuche die Kopplung durch die Messungen bei verschiedenen Frequenzen, in verschiedenen Lösungsmitteln und bei verschiedenen Temperaturen zu verringern, scheiterten.

In Abbildung 41 zeigt die Oszillationskurve einen schon nach etwa $1\mu\text{s}$ vollständig abklingenden Verlauf und auch die Phasentiefe, hier bei 0.75, entspricht nicht dem Erwartungswert, der bei zwei Spin-Labeln bei 0.5 liegt.

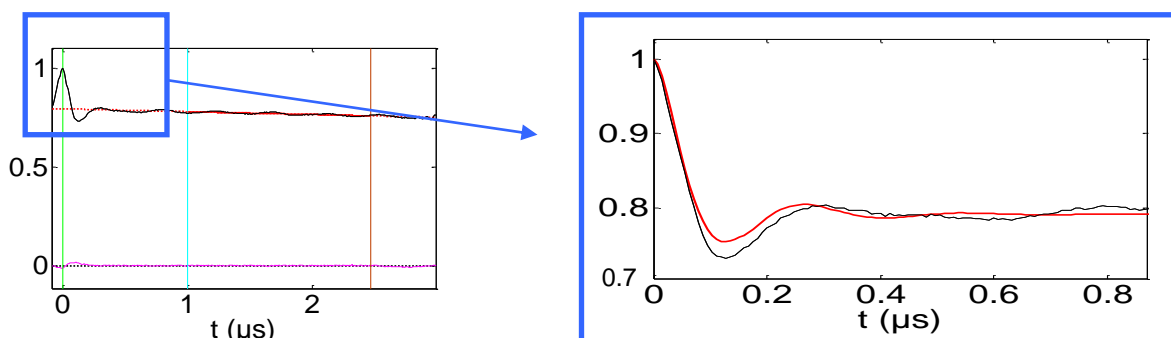


Abbildung 41: Oszillation des Systems 1 in Toluol- d_8 (Tikhonov reg) (B.Endeward)

Die geringe Oszillationslänge erlaubt nur eine ungenauere Bestimmung des Abstandes, da der Fehler umso größer wird je kürzer die Oszillationsdauer ist.

4.2.2.2 System 2

Aufbauend auf den Schwierigkeiten mit System 1 wurden weitere Variationen von Abstandshaltern synthetisiert. Dabei waren drei Problemstellungen zu beachten:

1. die J -Kopplung muss verringert werden
2. die Löslichkeit sollte erhöht werden
3. die Verlängerung der Oszillationsdauer sollte erreicht werden

Als Lösungsansatz für die beiden ersten Punkte wurde das System 2 synthetisiert. Dabei wird die J -Kopplung durch die Vergrößerung des Abstandes verringert und die Methoxy-Gruppen am zentralen Benzol erhöhen gleichzeitig die Löslichkeit der Verbindung.

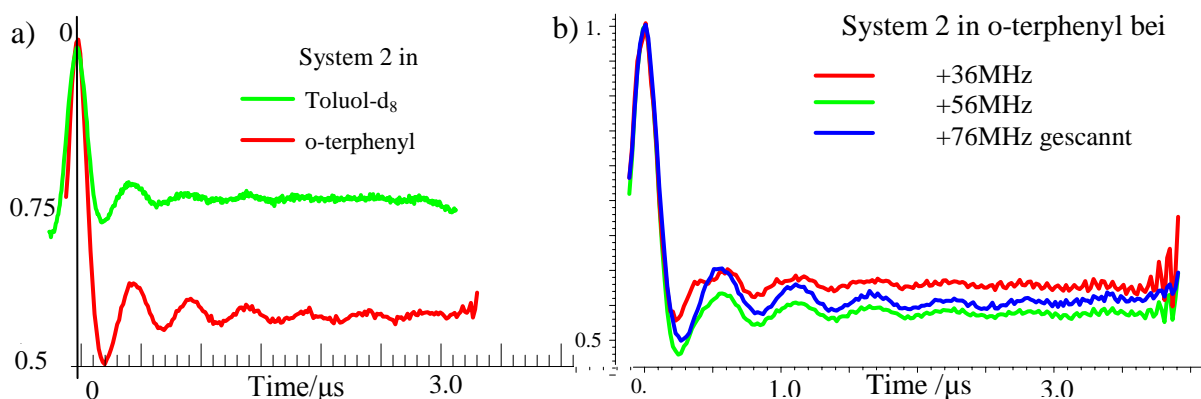


Abbildung 42: Oszillationsverlauf für System 2, a) in verschiedenen Lösungsmitteln und b) bei verschiedenen Megahertz (B.Endeward)

Um die Oszillationsdauer verlängern zu können, wurde basierend auf den Erfahrungen mit anderen Systemen (D.Markgraf^[76]) das o-Terphenyl als „Lösungsmittel“ gewählt. Diese Verbindung stellt einen Feststoff dar, welche nach dem Erstarren ein glasartiges Aussehen annimmt und somit keine Lösungsmittel-Abhängigkeiten in der Messung aufweist.

In Abbildung 42 ist der Unterschied zwischen zwei verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. Man kann sehr deutlich die Verlängerung der Oszillationsdauer erkennen und auch die Phasentiefe ist von den ursprünglichen 0,7 auf den Erwartungswert 0,5 abgesunken. Der zweite Teil der Abbildung beweist die Abhängigkeit der Oszillationskurve von der beim

Scannen benutzten Frequenz. Dabei wird das Verhältnis von Signal zu Rauschen bei höheren Frequenzen verbessert.

Die ausgewählten Frequenzen entsprechen dabei keinen fiktiven Werten, sondern können bei einem im Vorfeld durchgeführten Echo-Scan ermittelt werden. In der untenstehenden Abbildung 43 ist die Echo-Detektion zur Abbildung 42b dargestellt.

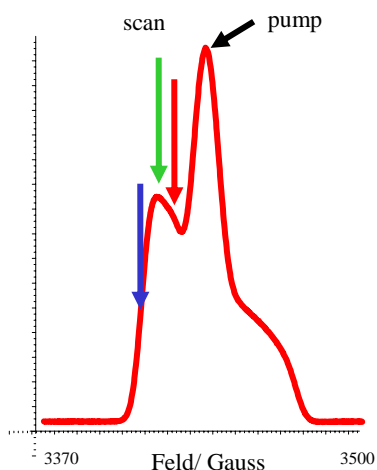


Abbildung 43: Echo-Detektion (B.Endeward)

Die Pumpfrequenz wird dabei konstant bei 9.657GHz und die Messtemperatur bei 40K gehalten und nur die Scan Frequenz wird entlang der gemessenen Echo-Kurve verschoben. Auf Grund des so erhaltenen Oszillationsspektrums werden die geeigneten Parameter für die nachfolgende Messung bestimmt. Abbildung 44 zeigt die aus der gemessenen Oszillationskurve berechneten Spektren.

Die erhaltene Abstandverteilung zeigt nur einen Haupt-Abstand, welcher zwar scharf aber mit einer „Schulter“ zur kleineren Distanzen ist. Der ermittelte Haupt-Abstand liegt bei 3.0nm.

Die Korrektur im Oszillationskurvenverlauf bezieht sich auf das Herausrechnen von intermolekularen Wechselwirkungen aus dem gemessenen Spektrum.

Beim ersten durchgeführten PELDOR-Experiment konnte neben dem System 2 noch eine weitere Verbindung nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um das, bei der Aktivierung des Palladium(II)-Katalysators entstehende Homo-Produkt **1.2** (Abbildung 34, Glaser-Kupplungsprodukt **7.2**).

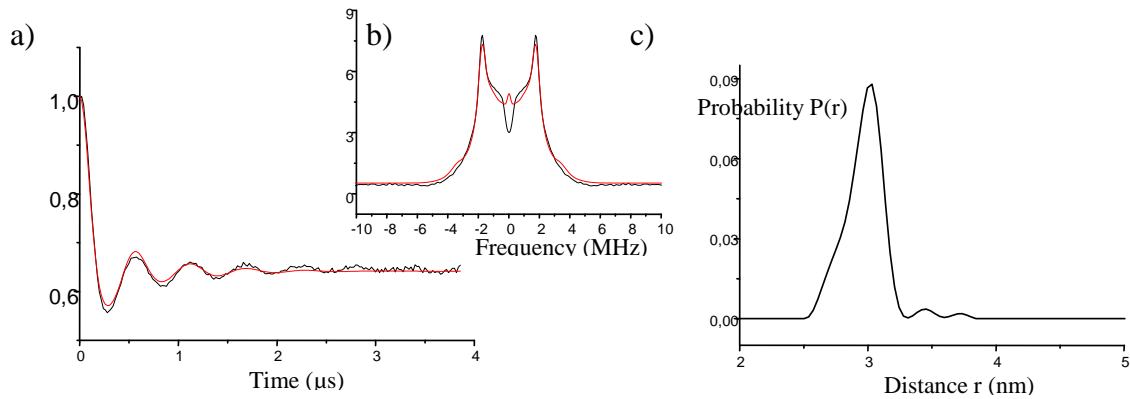


Abbildung 44: a) korrigierte Oszillationskurve; b) Fourier Transformation vom PELDOR Spektrum; c) Abstandsverteilung des Tikhonov Fits (B. Endeward)

4.2.2.3 System 3

Basierend auf den Erkenntnissen mit System 2 konnte das ^{15}N - ^{14}N -markierte System 3 ohne Komplikationen vermessen werden. Auch hier konnte der Abstand von 3.0nm bestimmt werden.

Vergleicht man die Echo-Diagramme der beiden Systeme 2 und 3, so erkennt man den Einfluss des ^{15}N -Isotopes auf den Verlauf. Beim Übereinanderlegen der beiden Kurven zeigt sich deutlich die Veränderung der Maxima und Minima basierend nicht nur auf einer Verschiebung im Feld. Das erhaltene Spektrum weist viel mehr die Extrempunkte der beiden im System 3 vorhandenen Isotope auf und die in blau dargestellte Kurve ist als eine Überlagerung der einzelnen ^{14}N - und ^{15}N -Diagramme zu verstehen.

Beim Vergleich der Echo-Diagramme der beiden Systeme 2 und 3 sieht man sofort die Unterschiede, welche bei den Auswertungen des PELDOR-Experimentes nicht festzustellen sind. Eine genauere Betrachtung der Oszillationskurve zeigt aber eine für beide Systeme unterschiedliche Phasentiefe und auch die Oszillationsdauer ist unterschiedlich. Die Phasentiefe beim ^{14}N -gelabelten Modell liegt bei 0.6, die des Hetero-Systems bei 0.7. Des Weiteren zeigen sich im Distanzdiagramm bei System 3 keine weiteren (höheren) Distanzen, wie dies bei System 2 der Fall ist. Doch darf auf Grund dessen nicht darauf geschlossen werden, dass dieses System besser für Abstandsbestimmungen geeignet ist, denn die Breite der Abstandsverteilung deutet auf einen großen Fehler hin. Dies wird auch von der kürzeren Oszillationsdauer und der im Vergleich zum System 2 unterschiedlichen Phasentiefe bestätigt.

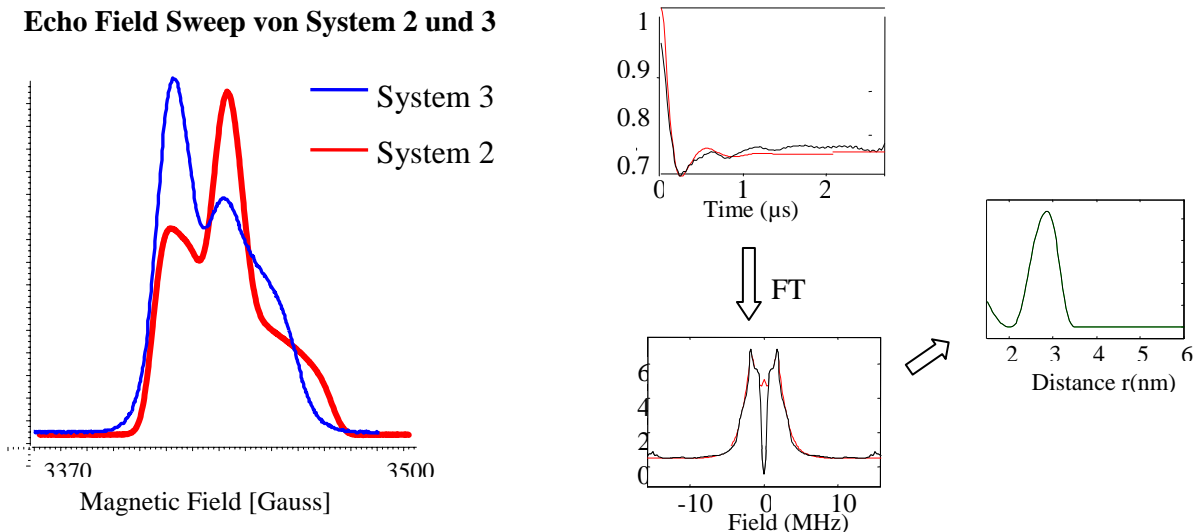


Abbildung 45: Vergleich der Echo-Diagramme von System 2 und 3 und die Auswertung des PELDOR-Experiments (B.Endeward)

Abschließend kann aber die Vergleichbarkeit der für beide Systeme gefundenen Abstände als gewährleistet bezeichnet werden. Dies beweist die geometrische Gleichheit der beiden ^{14}N - und ^{15}N -markierten TEMPA-Nitroxide.

4.2.2.4 System 4

Im Vergleich zu den Systemen 2 und 3 unterscheiden sich die EPR-Spektren des Systems 4 nur in den Feinheiten. So ist die Oszillationstiefe bei dem TPA-gelabelten System etwa um 0.1 tiefer, wobei sich die Oszillationsdauer nicht unterscheidet. Begründet auf der Oszillationstiefe ist auch die schmalere Verteilung der berechneten Distanz zu erklären.

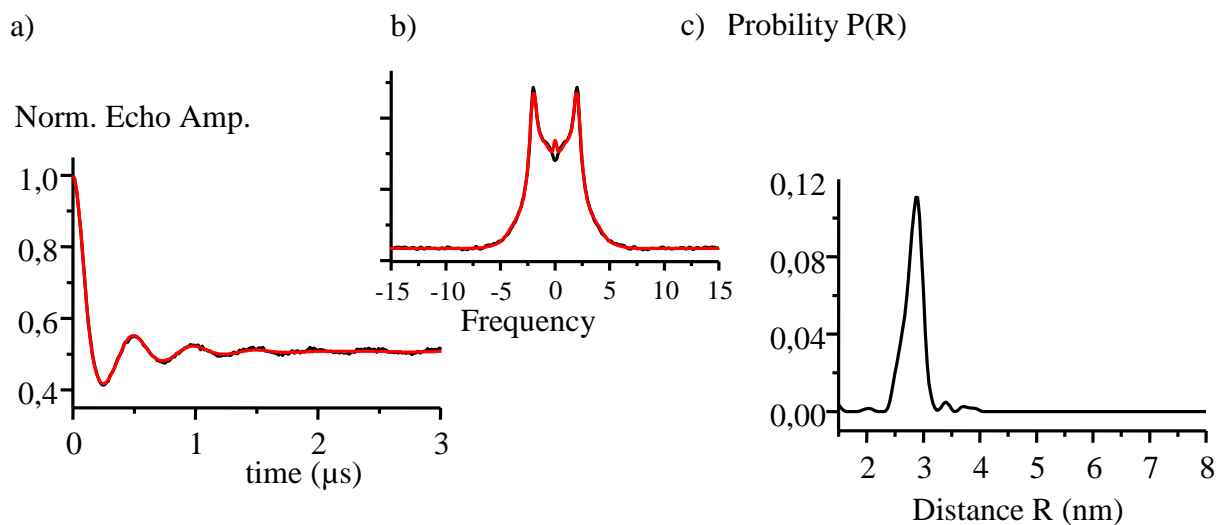


Abbildung 46: a) korrigierte Oszillationskurve; b) Fourier Transformation vom PELDOR Spektrum; c) Abstandsverteilung des Tikhonov Fits (B.Endeward)

4.2.2.5 System 5

Um den endgültigen Beweis der Vergleichbarkeit der beiden Spin-Label TPA und TEMPA zu erbringen, müssen die hier erzielten Ergebnisse mit der Publikation von D.Markgraf *et al.* verglichen werden.

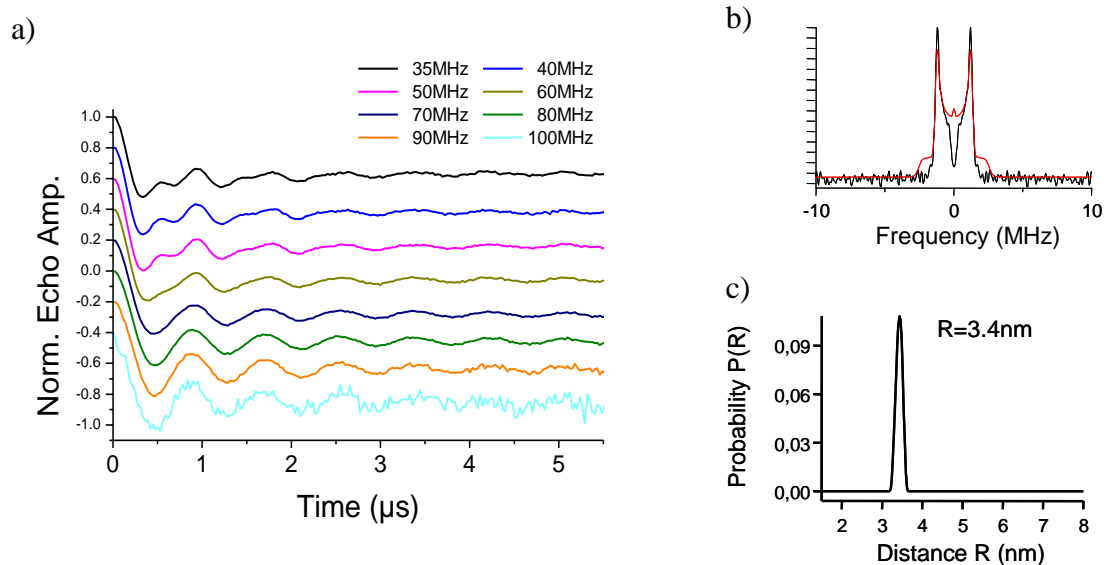


Abbildung 47: a) Oszillation bei verschiedenen Offsets in Toluol- d_8 b) Pake-Pattern; c) Abstandverteilung des Tikhonov Fits (B.Endeward)

Die Gegenüberstellung der jeweiligen Oszillationsdauer zeigt, dass durch die Variierung des Offsets mit dem TEMPA-markierten System auch eine vergleichbare Dauer erzielt werden kann. Das aus der Messung resultierende Pake-Pattern weist bei dem Sechsring-Konstrukt fast kein Signal beim Winkel $\theta = 0^\circ$ auf. Dies beruht auf der Ausrichtung des Labels im Vergleich zur Feldrichtung. Die unterschiedliche Lage der Nitroxide TPA und TEMPA in Bezug zur Molekülachse zeigt auch die Abweichung des ermittelten Abstandes an. Der Winkel zwischen dem Fünfring-Konstrukt und der Alkin-Bindung beträgt mehr als 120° , was auch den Winkel zur Molekülachse darstellt. Bei TPA konnte ein Abstand von 3.3nm und für TEMPA ein Abstand von 3.4nm berechnet werden. In beiden Fällen ist der Fehler sehr klein.

4.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Der bei fast allen Systemen beobachtete Oszillationsunterschied kann beim Sechsring-Nitroxid von der höheren Beweglichkeit des Ringes her rühren. Dabei ist nicht die freie Drehbarkeit um die Alkin-Bindung sondern die Beweglichkeit im Ring selbst gemeint. Beim

TEMPA ragt eine Ringecke aus der Molekülebene heraus^[77, 78], während der Fünfring in sich planar ist.

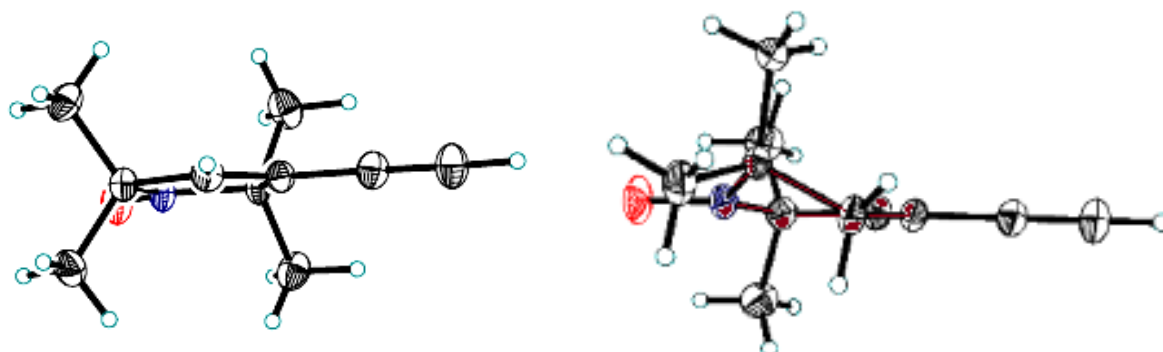


Abbildung 48: Vergleich der beiden geometrischen Strukturen von TPA und TEMPA^[75]
(Ring-Atome sind dunkelrot hervorgehoben)

In weiteren Messungen konnte aber gezeigt werden, dass die beiden Spin-Label-Systeme sich in der Gesamtheit gleich verhalten und die möglichen Verluste an Oszillationsdauer oder -tiefe nur auf das System-Konstrukt und das verwendete Lösungsmittels zurückzuführen sind.

Auch der Vergleich der gemessenen und gemodelten Abstände zeigt große Übereinstimmungen. So gibt es keine Verbindung die eine Abstandsdifferenz zeigt, welche außerhalb des für PELDOR bestimmten Fehlers liegt.

Tabelle 3: Distanzen im Überblick

System	Chem3D Ultra [Å]		PyMol [Å]	PELDOR [Å]
	<i>ohne</i>	<i>Energie min.</i>	<i>ohne</i>	<i>gemessen</i>
System 1	23.4	23.5	23.6	22.3±2.5
System 2	30.3	30.4	30.7	30.0±1
Homo- System 2	26.0	26.2	26.0	25.7±1
System 3	30.3	30.4	30.7	30.0±1
System 4	29.3	29.3	28.2	30.0±0.5
System 5	34.5	34.9	34.3	34.0±0.5

Des Weiteren ist die Fehlerveränderung bei den verschiedenen Systemen zu erkennen. Dabei wird der Fehler proportional zur Systemgröße kleiner. Diese kommt durch die geringe J -Kopplung und die zu vernachlässigende dipolare Kopplung zustande.

Der einzige Vergleich zwischen den beiden Spin-Label-Konstrukten, der direkt gezogen werden kann (zwischen System 2 und 4), zeigt einen geringeren Fehler für den Fünfring. Dieser Unterschied kann durch die geometrische Differenz der beiden erklärt werden.

Fazit: Beide Spin-Label können für lineare Systeme als gleichwertig und genau bezeichnet werden.

4.3 Iod modifizierte Nukleotide

In diesem Abschnitt wird die Synthese zweier mit Iod modifizierter Nukleotide diskutiert. Dabei handelt es sich um einen DNA- (2-Iodo-desoxy-Adenosin) und einen RNA-Baustein (5-Iodo-Cytidin).

Im Rahmen der Doktorarbeit von Nelly Piton^[44] wurden verschiedene DNA- und RNA-Fragmente synthetisiert, um die Unterscheidbarkeit in einem EPR-Experiment zu beweisen. Der Unterschied beruht dabei auf den unterschiedlichen Helix-Strukturen; der B-Form im Fall der DNA und der A-Form bei der RNA. Bei diesen Oligonukleotiden handelte es sich zum größten Teil um selbstkomplementäre Sequenzen.

Um die Möglichkeit zu haben die Struktur eines gemischten DNA-RNA-Hybrides zu untersuchen, ist es erforderlich, dass mindestens zwei iodierter Bausteine vorliegen. Im Falle der RNA stehen nach den Arbeiten von N.Piton^[44] und Ch.Grünewald^[79] das 5-Iodo-Uridin, 5-Iodo-Cytidin und das 2-Iodo-Adenosin als solche Bausteine zu Verfügung. Bezogen auf die DNA fehlte die zweite iodierter Base. Da das 5-Iodo-desoxy-Uridin als Pendant zu Thymin aus früheren Arbeiten bekannt war, musste noch eine weitere Base modifiziert werden. Die Entscheidung fiel auf das Desoxy-Adenosin, um einen zur RNA vergleichbaren Baustein für die Synthese zu besitzen.

Die synthetisierten DNA-RNA-Hybride sollen die „Lücke“ zwischen reiner DNA und RNA füllen und somit den für die Translation entscheidenden Komplex der EPR zugänglich machen. Durch den Vergleich der gemessenen Schmelzpunkte, CD-Spektren und der EPR-Abstände von der reinen DNA und RNA mit dem hergestellten Hybrid können Rückschlüsse auf die Struktur des Hybrids gezogen werden. Dies kann im weitesten Sinne bei größeren, biologisch aktiven Oligonukleotiden auch als Indiz für die vorliegende Struktur herangezogen werden.

Für den Fall des Cytidins erfolgt nur eine Verkürzung der von Nelly Piton^[44] etablierten Synthese.

4.3.1 Verkürzte Synthese von 5-Iodo-Cytidin

Das 5-Iodo-cytidin-Phosphoramidit für ACE-Chemie wurde von N.Piton im Rahmen ihrer Doktorarbeit^[44] erstmals synthetisiert. Basierend auf dieser bestand die Aufgabe in der Verkürzung der Gesamtsynthese mit dem weiteren Ziel der Ausbeutenerhöhung. Die

veröffentlichte Synthese beinhaltet neun Stufen und erreicht eine Gesamtausbeute von 16%. Die Synthese konnte um zwei Stufen verkürzt werden.

Als Strategie wurde auf die anfängliche Schützung mit Acetyl-Gruppen verzichtet. So konnte sowohl der Schützungs- wie auch der Entschützungsschritt erspart werden.

Da die Synthese nur einmal durchgeführt wurde, birgt diese noch weitere Optimierungsmöglichkeiten.

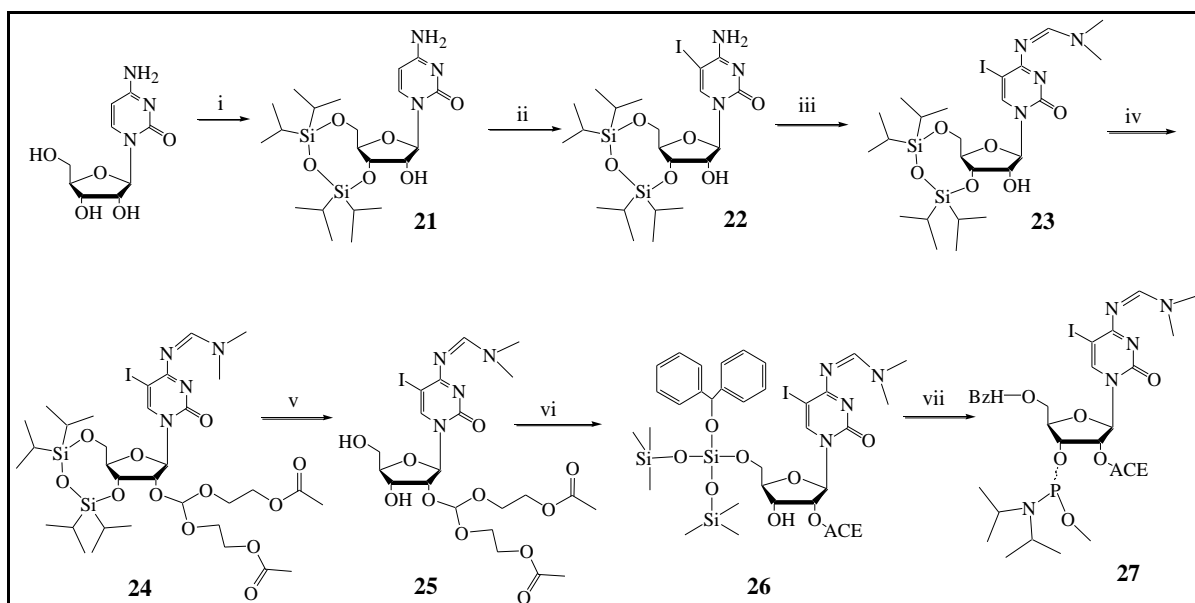


Abbildung 49: verkürzte Synthese von 5-Iodo-cytidin: (i) Pyr., Tetrakispropylsilylchlorid, 0°C; 99% ii) NIS, DMF, 50°C, 73%; iii) DMF, DMF-DMA, 50°C, 58%; iv) DCM; ACE-Ester, Pyr-*p*-toluolsulfonsäure, 75%; v) AcCN, TEMED-HF, 99%; vi) DCM, BzH-Cl, Diisopropylamin, 83%; vii) DCM, 3-(Bis(diisopropylamin)methoxy)phosphin, Tetrazol, 55%)

Einer der Schritte mit der geringsten Ausbeute ist die Schützung der freien azyklischen Amino-Gruppe. Die hierbei verwendete Schutzgruppe ist basenlabil und hat den Vorteil, keine aciden Protonen frei zu lassen. Ist dieser Punkt der Selektivität für die Synthese nicht von Bedeutung, so kann auch auf die Benzoyl-Gruppe zurückgegriffen werden.

Die Iodierung stellt eine weitere Herausforderung dar. Diese bezieht sich auf die Aufreinigung des Produktes und die Lichtempfindlichkeit der Reaktion. Es wurden zwei Methoden der Herstellung getestet. Die säureinduzierte Substitution führt nur zu einer Ausbeute von 45%, die Iodierung mit *N*-Iodsuccinamid aber zu 73%. Das Produkt aus der ersten Reaktion kann nur schwer gereinigt werden und selbst die Säulenchromatographie gelingt nur in Chloroform/*iso*-Propanol 25:1.

Fazit: Im Rahmen dieser Synthese konnte die Gesamtausbeute nicht erhöht werden. Diese liegt hier bei 14%. Die erzielten Einzelausbeuten befinden sich aber unterhalb der veröffentlichten und könnten deshalb noch verbessert werden.

4.3.2 Synthese von 2-Iodo-desoxy-Adenosin

Der erste Versuch, die für 2-Iodo-Adenosin bekannte Synthesestrategie auf den DNA-Baustein zu übertragen, war nicht erfolgreich. Hierbei wurde deutlich, dass die fehlende Hydroxy-Gruppe eine reaktivitätsbeeinflussende Wirkung aufweist.

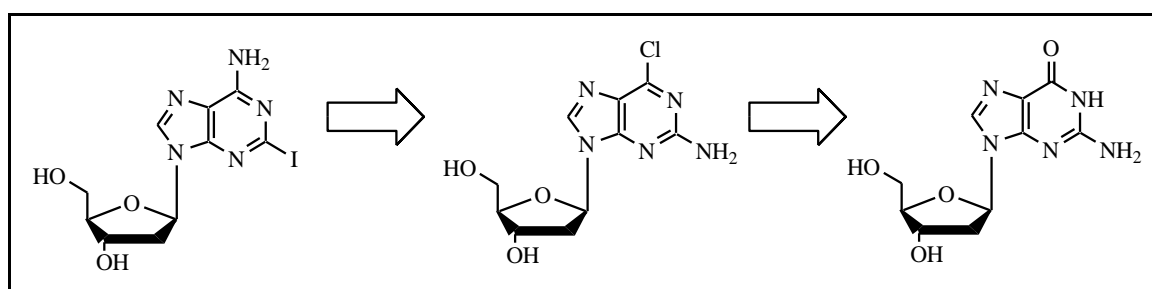


Abbildung 50: Retrosynthese von 2-Iodo-desoxy-Adenosin

In der Literatur ist bekannt, dass ein substituierter Adenosin-Baustein aus dem entsprechenden Guanosin synthetisiert werden kann. Dies erfolgt über die Chlorierung der Carbonyl-Gruppe mit Phosphoroxychlorid. Dieser Syntheseschritt unterliegt einer zeitlichen Begrenzung, weil sonst die Spaltung des Nucleosids möglich ist. Bei der Übertragung der verschiedenen RNA-Methoden auf die gewünschte DNA-Verbindung konnten nur geringe Ausbeuten um 40% erzielt werden. Zum Überdenken der Synthesestrategie kam es aber auf Grund der beobachteten Spaltung des Nucleosids bei der späteren Aminolyse. Die Aminolyse wurde mit verschiedenen Reagenzien, bei verschiedenen Temperaturen und bei unterschiedlicher Reaktionszeit vorgenommen und führte immer zur Spaltung des Nucleosids.

Das beobachtete Produkt der Aminolyse setzte ein Umdenken in der Synthesestrategie voraus. Eine weitere Möglichkeit den Carbonyl-Sauerstoff in eine Amino-Gruppe zu überführen, wurde in der Publikation von Z.Janeba^[80] gezeigt. Dabei wird statt der Chlor-Funktion am C6 mit einer guten Abgangsgruppe am O6 (2,4,6-Triisopropyl-benzyl-sulfonylchlorid) gearbeitet. Das besondere an dieser Gruppe ist die gute Abschirmung des Schwefels, wodurch die nukleophilen Reaktionen an diesem verhindert werden und der nukleophile Angriff am Kohlenstoff bevorzugt wird.

Die Verwendung dieser Abgangsgruppe birgt aber auch Risiken mit sich, denn die Substitution kann schon mit einem schwachen Nukleophil erfolgen. Deswegen müssen die folgenden Reaktionen an diese zusätzliche Bedingung angepasst werden. Bei dem geplanten Syntheseweg mussten keine weiteren Veränderungen vorgenommen werden.

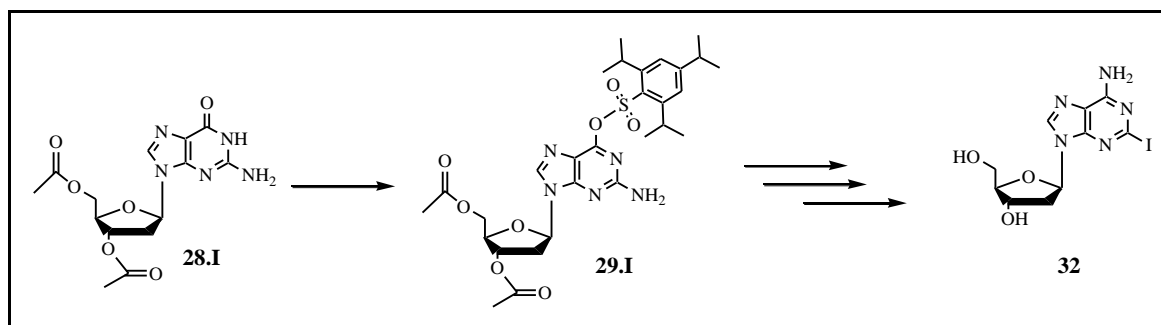


Abbildung 51: Neuer Syntheseweg

Bei der Synthese der Desoxyribose-Bausteine ist die erste Schwierigkeit mit der man sich auseinandersetzen muss, die schlechte Löslichkeit der Verbindungen in gängigen Lösungsmitteln. In den meisten Fällen wird somit mit einer Suspension gearbeitet. Diese Schwierigkeit wurde bei dem durchgeführten Syntheseplan auch beobachtet, konnte aber schon mit der Einführung der Triisopropyl-benzyl-sulfonyl-Gruppe und der damit verbundenen Herstellung des aromatischen Systems vermieden werden.

Der erste nicht Literatur bekannte Syntheseschritt besteht in der Substitution der 2-Amino-Gruppe gegen Iod. Eine Reaktion basierend auf einem RNA-Baustein wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. J.W.Engels^[35] etabliert, konnte aber nicht auf das gewünschte Molekül übertragen werden. Die Reaktion zeigte unter den bekannten Bedingungen nur eine maximale Ausbeute von 10%, was durch die Verlängerung der Reaktion gesteigert werden könnte. In unserer Arbeitsgruppe besteht die Möglichkeit lange Reaktionszeiten bei hohen Temperaturen durch die Benutzung einer Reaktionsmikrowelle zu ersetzen, deshalb wurde diese Möglichkeit genutzt. Dabei wurde als Temperatur 70°C (weil oberhalb der Siedetemperatur von Tetrahydrofuran) und eine Wattleistung von 100W gewählt. Die Optimierung der Reaktionszeit wurde durch Dünnschichtchromatographie nach Ablauf jeder Stunde gestützt. Die besten Ergebnisse (über 80%) wurden nach Ablauf von 2.5 Stunden erzielt.

Bei der Aminolyse wurden verschiedene literaturbekannte Methoden getestet. Die Unterschiede liegen bei den einzelnen Methoden nicht nur in der Wahl der Reaktionsmischung sondern auch in der benötigten Temperatur.

Die verwendeten Reaktionsmischungen bestanden aus wässrigem Ammoniak und mit Ammoniak gesättigtem Methanol. Arbeitet man mit beiden Mischungen bei Raumtemperatur, so muss für die Löslichkeit des Eduktes eine Zugabe einiger Milliliter Dichlormethan erfolgen.

Bei den Reaktionen bei Raumtemperatur konnte die Substitution zwar vollständig durchgeführt werden, aber die gleichzeitige Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen konnte nicht zur Zufriedenheit beobachtet werden. Die Möglichkeit, die Schutzgruppen mit Natriummethanolat zu entfernen, führte in den meisten Fällen zur Spaltung des Nucleosids. Auf Grund dessen wurde die Erhöhung der Temperatur präferiert. Von der Benutzung der methanolischen Ammoniak-Lösung wurde dabei abgesehen, da die Möglichkeit des nukleophilen Angriffs von Seiten des Methanols kommen könnte.

Die Aminolyse wurde schlussendlich in einem Autoklaven mit wässrigem Ammoniak, bei einer Temperatur von 110°C und einem Druck von 5bar durchgeführt. Das Produkt konnte bei dieser Durchführung nicht isoliert werden. Um die Isolierung aus dem wässrigen Medium zu erhöhen, ist eine orthogonale Schutzgruppenstrategie herangezogen worden. Die beiden Hydroxy-Gruppen werden dabei mit einer Silyl-Schutzgruppe maskiert. In der durchgeführten Synthese werden die *tert*-Butyl-dimethyl-silyl-Gruppen verwendet.

Diese Strategie erfordert einen weiteren Entschützungs-schritt, bietet aber die Möglichkeit das Aminolyse-Produkt isolieren zu können. Das Produkt der Fluorid-Behandlung (entspricht **32** in Abbildung 52) wird nicht isoliert sondern nach einer kurzen Aufreinigung weiter umgesetzt zu **33**. Die Schützungen der anderen funktionellen Gruppen erfolgt wie in Abbildung 52 dargestellt.

Der erhaltene DNA-Baustein wird mittels einer Festphasensynthese in einen nicht-selbstkomplementären 15mer-Strang eingebaut.

4.3.2.1 Zusammenfassung und Diskussion

Bei der Synthese des Bausteins wurden verschiedene Schutzgruppenstrategien an verschiedenen Stufen der Schützungs- und Entschützungs-schritte durchgeführt und die dabei erzielten Ausbeuten verglichen. Die anfängliche Acetyl-Strategie wurde mangels Produktgewinnung zu Gunsten der *tert*-Butyl-di-methyl-silyl-Schutzgruppe (TBDMS) verworfen.

Der Schritt der Abspaltung dieser Hydroxy-Schutzgruppen hatte sich als essenziell für die Gesamtausbeute erwiesen.

Erfolgt die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen vor der Schützung der entstandenen Amino-Gruppe, so kann nur eine Maximalausbeute von 16%^[44] über alle sieben Stufen erzielt werden. Wird andererseits die Schützung mit der Formamidin-Gruppe vor der Entschützung der Hydroxy-Gruppen vollzogen, dann ergibt sich eine Gesamtausbeute von 22%. Bei dieser Syntheseroute musste auf Grund der Basenlabilität der Formamidin-Schutzgruppe die Entschützung mittels einer TEMED-HF-Lösung und nicht mit TBAF-Lösung erfolgen.

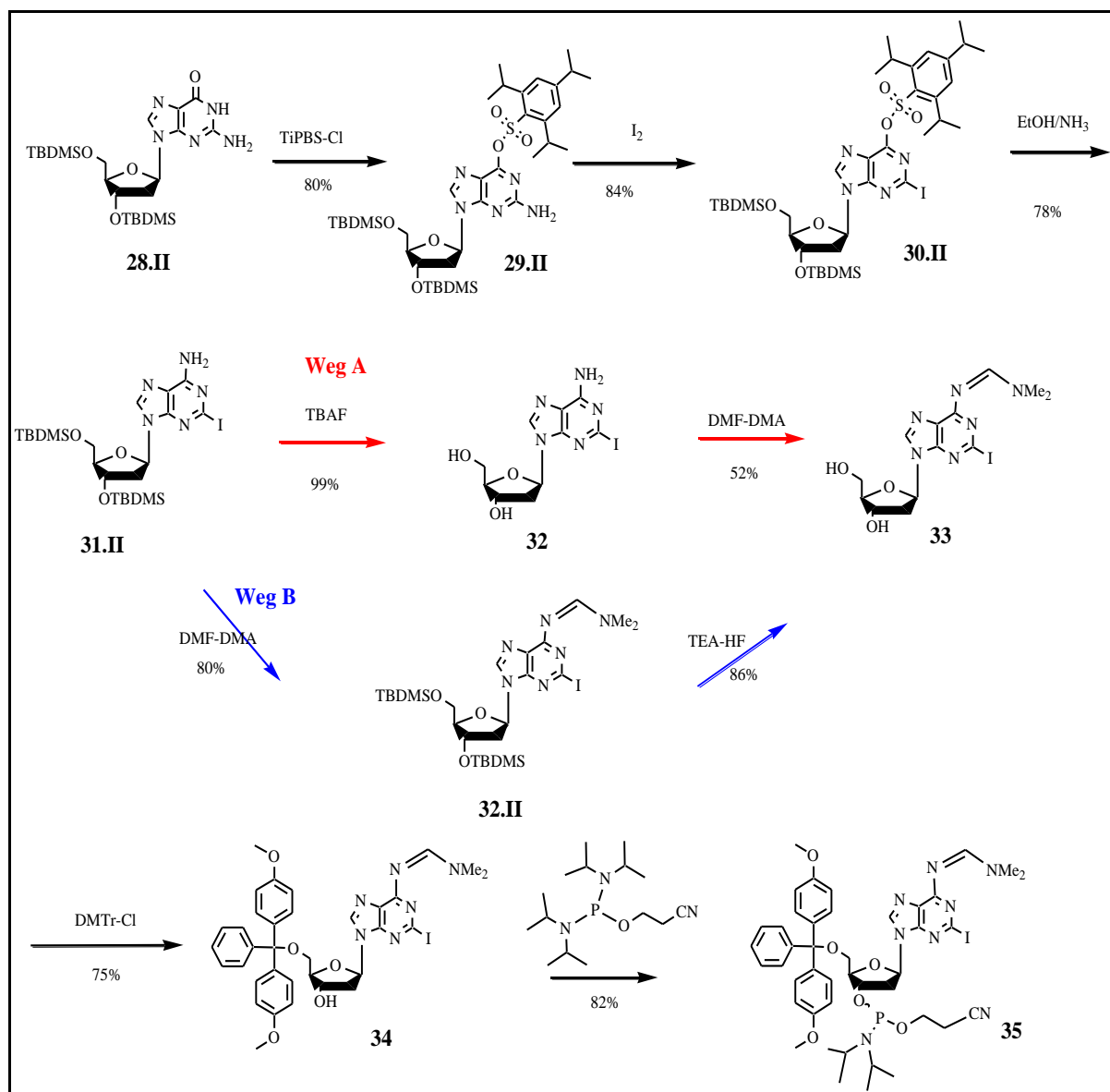


Abbildung 52: Gesamtsynthese im Überblick^[82]

Fazit: Das Phosphoramidit von 2-Iodo-desoxy-Adenosin konnte erfolgreich synthetisiert werden. Die Gesamtausbeute kann durch die Optimierung der einzelnen Schritte noch weiter verbessert werden.

4.4 Synthetisierte Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden nicht nur Modell-RNA und -DNA sondern auch biologisch aktive RNAs synthetisiert, gelabelt und analysiert.

Aufbauend auf den Vorarbeiten von Nelly Piton mit dem TPA- Nitroxid (**1**) (2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-N-oxy-3-acetylen) wurden Modell-RNAs mit derselben Sequenz aber mit anderen Spin-Label (TEMPA **2** und **2***; 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-N-oxy-4-acetylen, siehe Abbildung 31) synthetisiert. Dies erfolgte vor dem Hintergrund die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Nitroxide in biologischen Systemen zu untersuchen.

Um strukturelle Unterschiede zwischen DNA, RNA und DNA/RNA-Hybriden zu untersuchen, wurden in einem weiteren Teil dieser Arbeit nicht komplementäre DNA-Sequenzen synthetisiert und mit dem Spin-Label TPA (**1**) markiert. Für die Synthese der nicht komplementären Stränge war die Synthese eines weiteren iodierten desoxy-Nukleotids notwendig, siehe Kap.4.3.2. Als Vergleich und auch als der komplementäre Part zu der synthetisierten DNA wurden die in der Doktorarbeit von N.Piton synthetisierten RNA-Oligonukleotide verwendet.

Zur Übertragung der mit Modell-Oligonukleotiden gemachten synthetischen und analytischen Erfahrungen auf biologisch aktive RNAs wurden verschiedene biologisch aktive RNAs synthetisiert, mit TPA gelabelt und mittels PELDOR, CD- und UV-Spektroskopie untersucht.

4.4.1 Modell-RNAs

4.4.1.1 Synthese

Alle in dieser Arbeit synthetisierten markierten-RNAs wurden mittels 2'-ACE[®]-Strategie synthetisiert. Die synthetisierten Oligonukleotide besitzen die in Tabelle 4 dargestellten Basensequenzen. Wegen besserer Vergleichbarkeit dient die Arbeit von N.Piton^[44] als Grundlage für die Nummerierung der Oligonukleotide.

Die mit einem „*“ markierten Uridine und Adenosine sind mit Spin-Label markiert. Bei den ersten Oligomeren handelt es sich um vier selbstkomplementäre Stränge und bei der RNA 6 um eine nicht-selbstkomplementäre Sequenz. Die einzelnen Basen sind entweder mit dem ¹⁴N- (**2**) oder dem ¹⁵N-gelabelten (**2***) TEMPA-Nitroxid markiert worden.

Die für die Synthese benötigten Amidite wurden bei der Firma Dharmacon gekauft und entsprechen der in Kapitel 2.2.2 Abbildung 10 dargestellten Form. Das Iodo-Uridin-

Phosphoramidit war ebenfalls bei Dharmacon käuflich zu erwerben, musste im späteren Verlauf der Arbeit aber selbst synthetisiert werden. Das 2-Iodo-Adenosin-Phosphoramidit wurde von Ch.Grünwald im Rahmen seiner Diplomarbeit^[79] synthetisiert.

Tabelle 4: Synthetisierte RNAs

RNA	Sequenz	Masse ber.	Masse gefund.
1 mit 2	5'-GCU-GAU-AU*C-AGC-3'	3972.7	3992.0
3 mit 2	5'-CGA-CUG-AUA-UCA-GU*C-G-3'	5259.4	5277.6
3 mit 2*	5'-CGA-CUG-AUA-UCA-GU*C-G-3'	5260.4	5280.9
4 mit 2 am A	5'-GCU-GUA-UA*C-AGC-3'	3972.7	3972.6
4 mit 2 am U	5'-GCU-GU*A-UAC-AGC-3'	3972.7	3994.86
6.1 mit 2	5'-CGC-UAC-AUA-GU*G-AGC-3'	4952.2	4957.5
6.2 mit 2*	3'-GCG-A*UG-UAU-CAC-UCG-5'	4930.1	4950.5

2= TEMPA; 2*= ¹⁵N-TEMPA; U* und A*: markiert mit Spin-Label

Die Synthese erfolgt mit einem modifizierten Applied Biosystems 392 DNA/RNA Synthesizer unter Verwendung von Polystyrol-Säulen. Die Festphasensynthese erfolgt von 3'- nach 5'- Richtung und die erste Base ist am Träger gebunden. Die vollständige Synthese erfolgt in einem 0.2µmol Maßstab.

Die Durchführung der Sonogashira-Kreuz-Kupplung ist im Experimentellen Teil (6.5.3.2.2) dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

Die berechneten und die gemessenen Massen (siehe Tabelle 4) sind in guter Näherung zueinander. Die Abweichung in manchen Fällen kommt durch zu hohe Salzkonzentration in der Probe zustande.

4.4.1.2 Analytik

Die mit TEMPA spingelabelten Oligomere wurden mit den unmodifizierten und mit den TPA-gelabelten (siehe Doktorarbeit N.Piton^[44]) verglichen. Dabei wurden nur die strukturabhängigen Messmethoden herangezogen, wie Schmelzpunktbestimmung, CD-Spektroskopie und Abstandbestimmung mittels PELDOR.

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Konzentration von 0.5OD₂₆₀ (optische Dichte) an komplementären und zweimal 0.25OD₂₆₀ an nicht-komplementären RNA-Strängen in einem

Phosphat-Puffer (140mmol NaCl, 10mmol Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄, pH= 7) bestimmt. Bei dieser Untersuchungsreihe wurde dieselbe RNA-Lösung für die Messungen am CD-Spektrometer verwendet.

Wie aus Tabelle 5 deutlich zu erkennen ist, ist die Einführung des Sechsring-Spin-Labels in ein Oligonukleotid mit der Destabilisierung des Systems verbunden. Diese Beobachtung wird von den gemessenen CD-Spektren (siehe für jede RNA in Abbildung 56) bestätigt.

Tabelle 5: Vergleich der Schmelzpunkte der einzelnen RNAs

RNA	Sequenz	T _m -Wert [°C]	Differenz [°C] mod-unmod
1 unmod 1 mit 1 2	5'-GCU-GAU-AUC-AGC-3'	60.9±0.2	±0
	5'-GCU-GAU-AU*C-AGC-3'	58.8±0.1	-2.1
	5'-GCU-GAU-AU*C-AGC-3'	57.1±0.1	-3.8
3 unmod 3 mit 1 2 2*	5'-CGA-CUG-AUA-UCA-GUC-G-3'	67.8±0.1	±0
	5'-CGA-CUG-AUA-UCA-GU*C-G-3'	67.8±0.1	±0
	5'-CGA-CUG-AUA-UCA-GU*C-G-3'	57.5±0.3	-10.3
	5'-CGA-CUG-AUA-UCA-GU*C-G-3'	57.5±0.4	-10.3
4 unmod 4 mit 1 2 am A 2 am U	5'-GCU-GUA-UAC-AGC-3'	58.5±0.1	±0
	5'-GCU-GUA-UA*C-AGC-3'	54.70±0.01	-3.8
	5'-GCU-GUA-UA*C-AGC-3'	54.0±0.1	-4.5
	5'-GCU-GU*A-UAC-AGC-3'	59.1±0.1	+0.6
6 unmod 6 mit 1 6.1 mit 2* 6.2 mit 2	5'-GCU-CAC-UAU-GUA-GCG-3' 3'-CGA-GUG-AUA-CAU-CGC-5'	67.5±0.2	±0
	5'-GCU-CAC-UAU-GUA*-GCG-3' 3'-CGA-GU*G-AUA-CAU-CGC-5'	65.0±0.1	-2.5
	5'-GCU-CAC-UAU-GUA*-GCG-3'	68.3±0.7	+0.8
	3'-CGA-GU*G-AUA-CAU-CGC-5'		

1= TPA; 2= TEMPA; 2*= ¹⁵N-TEMPA; U* und A*: gelabelt mit Spin-Label

Betrachtet man die einzelnen RNAs, so ergibt sich folgendes Bild:

Die RNA1, markiert mit ^{14}N -Nitroxid, konnte mit einer Ausbeute von 72nmol (nach der HPLC) isoliert werden. Das Anionen Exchange HPLC-Spektrum (Abbildung 53) zeigt nur ein Hauptsignal zwischen 21 und 22 Minuten und das dazugehörige Massenspektrum weist ebenfalls nur ein Signal auf (bei 3992.04g/mol; was der Masse des Oligonukleotids plus Natrium entspricht). Der Unterschied zwischen den verschiedenen Schmelzpunkten zeigt eine stärkere Destabilisierung des Duplexes durch die Einführung des Sechsring-Spin-Labels als bei der Benutzung des TPA-Nitroxids.

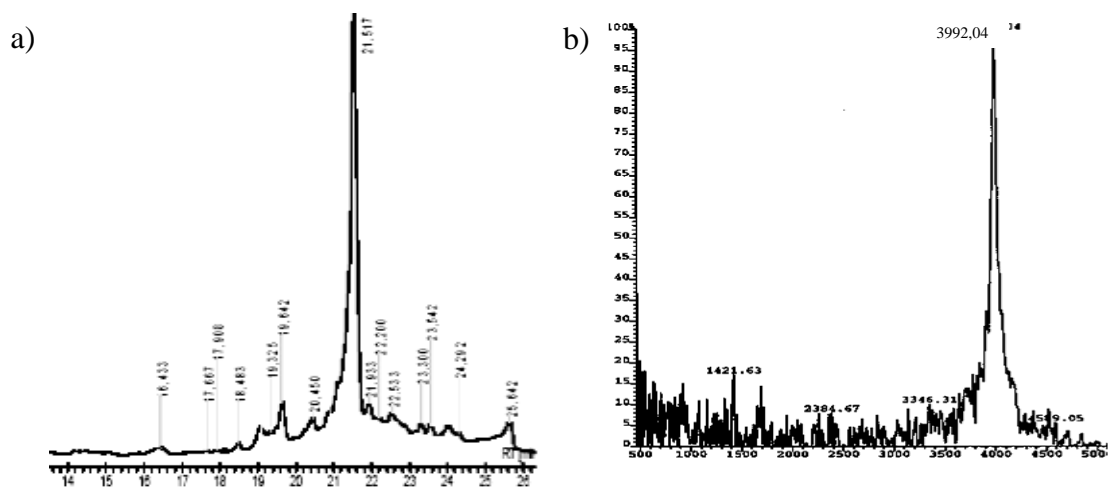


Abbildung 53: a) Anionen Exchange HPLC-Spektrum von RNA1 gelabelt mit Nitroxid 2; b) das MALDI-Massenspektrum dieser RNA

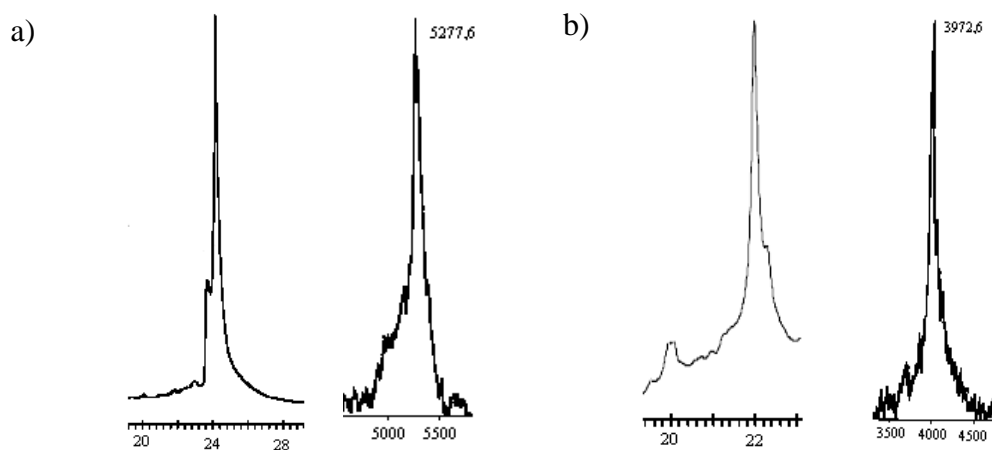


Abbildung 54 a) Anionen Exchange HPLC-Spektrum und das MALDI-Massenspektrum von RNA3 mit 2; b) Anionen Exchange HPLC-Spektrum und das MALDI-Massenspektrum von RNA4 mit 2

Der oben genannte Effekt wird bei der Analyse der RNA3 noch deutlicher, hierbei wird eine Schmelzpunktniedrigung von 10°C beobachtet. Dabei gibt es keinen Unterschied zwischen den beiden verschiedenen isotopenmarkierten RNAs. Bei den erzielten Ausbeuten, für RNA3 mit **2** waren es 68nmol und mit **2*** 40nmol, kann auch nicht von einem Isotopeneffekt gesprochen werden, da diese Schwankungen im Rahmen der verwendeten Reinigungsmethoden liegen.

Bei den beiden letzten RNAs wurde eine weitere Base als Markierungsstelle verwendet, wobei es sich bei der RNA6 um ein nicht-selbstkomplementäres Konstrukt handelt. Die Ausbeute an markierter RNA 6.1 beträgt 51nmol und an RNA6.2 37nmol. Vergleicht man die beiden modifizierten Doppelstränge, so zeigt sich bei der Verwendung der beiden Sechsring-Einheiten sogar eine geringe Stabilisierung im Vergleich zum Fünfring. Dies deutet auf den Modifizierungsunterschied zwischen den Purin- und Pyrimidin-Einheiten hin. Bei Adenosin ist die Kupplungsstelle an der 2-Position der Base, hierbei befindet sich das Radikal in der kleinen Furche. Diese ist breiter aber auch flacher als die große und bietet somit den Freiraum für das TEMPA-Nitroxid sich frei zu bewegen.

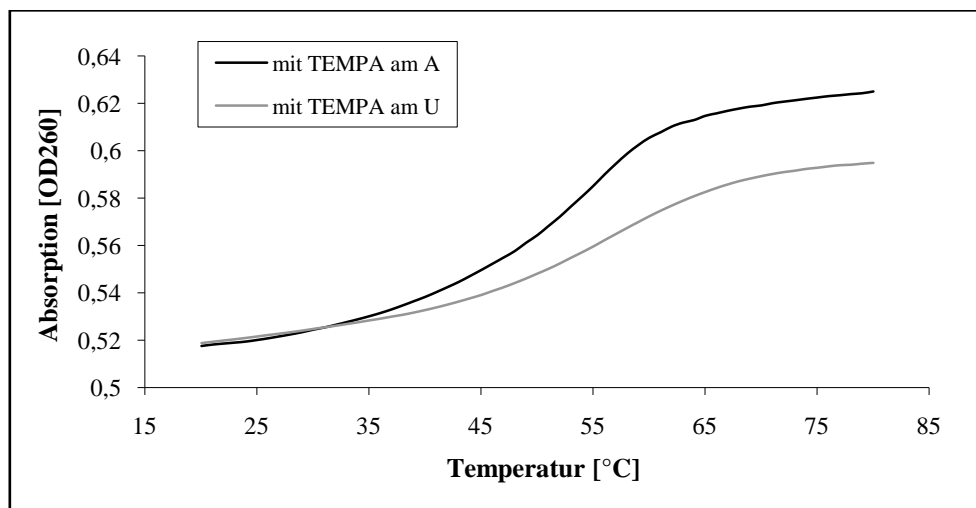


Abbildung 55: Schmelzkurven von RNA4 mit TEMPA am A und am U

Die Betrachtung der RNA4 (Ausbeute: RNA4(A*) 62nmol, RNA4(U*) 72nmol) weist unter Berücksichtigung des oben beschriebenen Hintergrundes einige Fragen auf. Erstens ist die Benutzung des TEMPA-Radikals am Adenosin nicht mit einer Stabilisierung verbunden, wie bei RNA6, und zweitens ist die ungewöhnliche Erhöhung des Schmelzpunktes bei der Modifizierung am Uridin nicht erklärbar. Doch zeigt sich, dass der Hyperchromizitätsfaktor bei den beiden TEMPA-modifizierten RNAs unterschiedlich ist. Bei der Markierung am

Uridin ist dieser deutlich kleiner, was sich in einem niedrigeren zweiten Plateau in Abbildung 55 (vollständige Denaturierung) widerspiegelt. Der gesamte Verlauf deutet auf eine nicht vollständige Hybridisierung beim ersten Plateau hin, während diese im Falle der Modifikation von Adenosin zutrifft. Bei der Verwendung des Sechsrings als Marker sollte dieser somit in der großen Furche am Purin platziert werden.

Eine mögliche Erklärung bietet das in Abbildung 56 dargestellte CD-Spektrum. Es ist klar zu erkennen, dass die lila-farbene Linie (Vergleich RNA4: mit TEMPA am U) sich in der Wellenlänge des Maximums (bei ca. 260nm) unterscheidet. Dieses wurde zur höheren Wellenlängen verschoben, was auf eine Umorientierung in der Helix deutet. Auch der gesamte Verlauf dieser Kurve zeigt eher einen B-Helix- als einen A-Helix-Charakter^[67]. Diese Erkenntnis birgt den Schluss, dass die Einführung des TEMPA-Radikals in die RNA eine erhebliche Destabilisierung des A-Helix-Systems mit sich bringt und nur für den Einsatz an der DNA zu empfehlen ist.

CD-Spektren

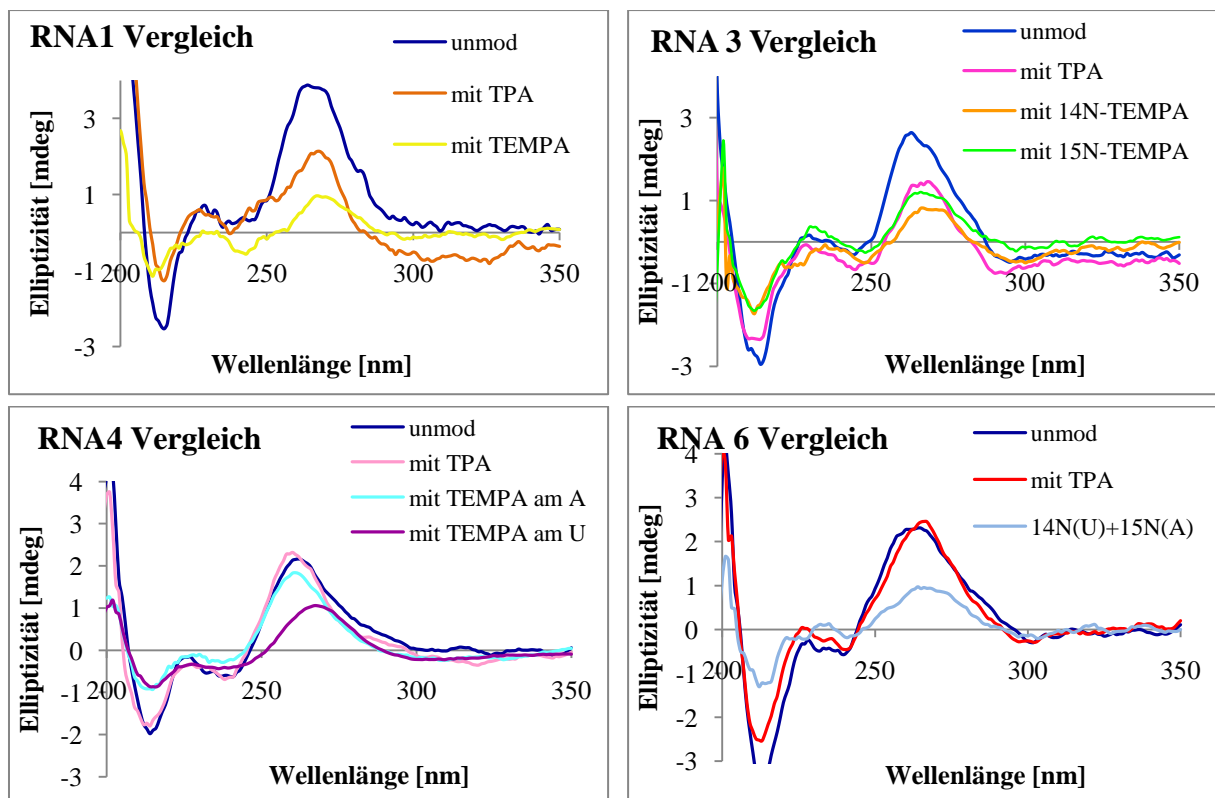


Abbildung 56: CD-Spektren der verschiedenen Modell-RNAs

Die CD-Spektren zeigen fast ausschließlich den Destabilisierungscharakter des Sechsrings, wobei dieser im Vergleich zum Fünfring nicht immer stark ausfällt.

4.4.1.3 PELDOR

Die EPR-Messungen wurden von B.Endeward in der Gruppe von Prof. T.F.Prisner durchgeführt und analysiert. Für die PELDOR-Messungen werden je 2.0OD₂₆₀ der jeweiligen RNA (im Falle von nicht komplementären Strängen ist eine Umrechnung notwendig) in 100µL Phosphat-Puffer hybridisiert. Dies erfolgt durch langsames Abkühlen dieser Lösung von 95°C auf 0°C mit einer Abkühlungsgeschwindigkeit von 5°C/Minute. Nach der Hybridisierung wird die RNA-Lösung in ein steriles Eppendorf-Tube überführt, die Küvette zweimal mit je 100µL sterilem Wasser gespült und in der SpeedVac lyophilisiert. Das erhaltene Pellet wird in 100µL einer 20%-igen Ethylenglykol-Lösung aufgenommen und in ein im Vorfeld sterilisiertes EPR-Röhrchen überführt. Sofortiges Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff gewährleistet die Stabilität und Funktionalität der markierten-RNA.

Das 4-Puls-PELDOR-Experiment erfolgt am Bruker Elexsys E580 X-Band Spektrometer. Eine typische Pulslänge für den Detektionspuls beträgt 32ns und für den Pumpimpuls 12ns. Die Frequenz des Pumpimpulses ist fixiert auf das Maximum des Nitroxid-Echo-Kurvenverlaufs (9,657GHz) für das effiziente Pumpen. Die Detektion erfolgt etwa 70 bis 90MHz davon entfernt. Die Messtemperatur beträgt 40K und die Messungen erfolgen über eine Zeitdauer von über 12 Stunden.

• RNA1:

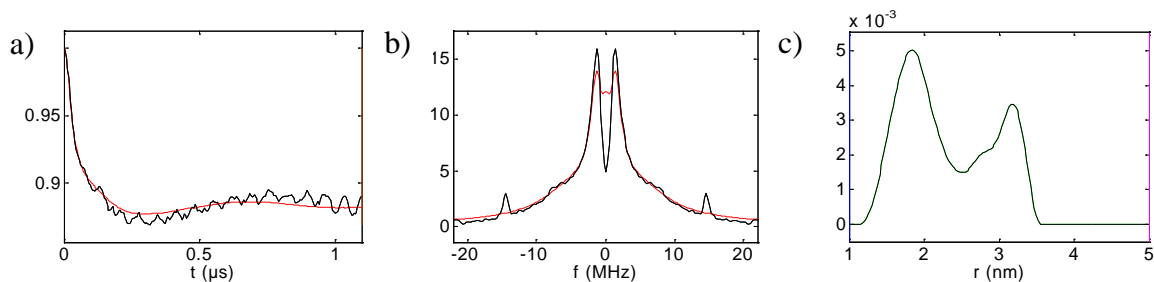


Abbildung 57: Ergebnisse der PELDOR-Messungen von RNA1: a) korrigierte Oszillationskurve; b) Fourier Transformation vom PELDOR Spektrum; c) Abstandsverteilung des Tikhonov Fits (B.Endeward)

Hierbei ist zwar eine Oszillation zu erkennen, diese ist aber sehr kurz und die Tiefe für das zu untersuchende System zu gering. Basierend darauf ergibt sich auch eine sehr breite Abstandsverteilung mit zwei Abständen. Die beiden erhaltenen Abstände von 1.9 und 3.2nm werden auch bei den Messungen der TPA-markierten RNA beobachtet.

- RNA3 ^{14}N und ^{15}N im Vergleich: schwarz: ^{14}N -TEMPA und blau: ^{15}N -TEMPA

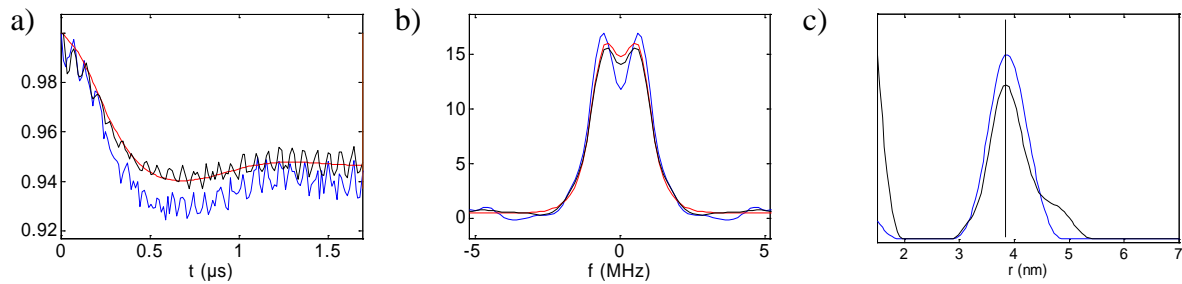


Abbildung 58: Ergebnisse der PELDOR-Messungen von RNA3: a) korrigierte Oszillationskurve; b) Fourier Transformation vom PELDOR Spektrum; c) Abstandsverteilung des Tikhonov Fits (B.Endeward)

Die Benutzung verschiedener TEMPA-Spin-Labels führt zum selben Ergebnis. Somit ist für die PELDOR-Auswertung das verwendete Isotop nicht von Bedeutung sondern nur das verwendete Nitroxid-Konstrukt. Der berechnete Abstand ist in beiden Fällen der gleiche, 3.9nm, und entspricht dem bei der RNA4 mit Nitroxid **1** (TPA).

Eine größere Oszillationstiefe scheint einen Einfluss auf das erhaltene Pake-Pattern und die Intensität der Abstandsverteilung zu haben. Die Breite der Verteilung wird davon nicht beeinflusst.

- RNA4:

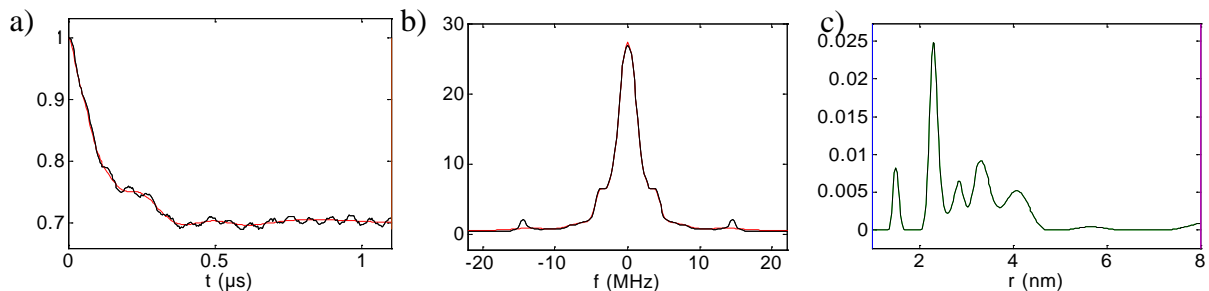


Abbildung 59: Ergebnisse der PELDOR-Messungen von RNA4 markiert am **A**: a) korrigierte Oszillationskurve; b) Fourier Transformation vom PELDOR Spektrum; c) Abstandsverteilung des Tikhonov Fits (B.Endeward)

Im Vergleich zu den vorherigen RNAs ist die Oszillationstiefe von 0.7 (Abbildung 60) sehr gut und auch die Oszillationsperioden sind gut zu beobachten. Das erhaltene Pake-Pattern entspricht dem für TPA-markierte RNA und der Hauptabstand korreliert mit dem für TPA publizierten. Außer dem kleineren Abstand sind die restlichen ebenfalls im Spektrum der TPA-RNA zu finden.

Betrachtet man dieselbe RNA nur mit dem Nitroxid an der Uracil-Base, so ergibt sich ein anderes Bild. Die Oszillationstiefe nimmt ab, eine Oszillationsausprägung ist kaum zu erkennen und das Pake-Pattern verliert die $\theta = 90^\circ$ -Komponente. Die daraus resultierende Abstandsverteilung weist eindeutig zu hohe Abstände auf im Vergleich zur A-Mutante. Unter Zuhilfenahme der CD-Spektren erkennt man die Destabilisierung durch das Nitroxids in der großen Furche der RNA und damit eine Tendenz zur B-Helix. Dies erklärt auch den größeren Abstand als bei der A-Mutante. Der berechnete Abstand von 3.6nm taucht aber als Nebenabstand sowohl bei der TPA als auch bei der TEMPA-A-RNA auf.

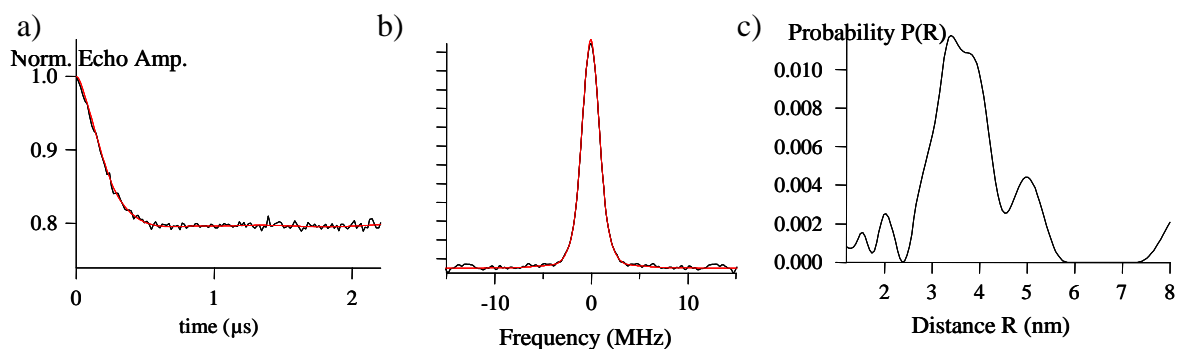


Abbildung 60: Ergebnisse der PELDOR-Messungen von RNA4 markiert am U: a) korrigierte Oszillations-Kurve; b) Fourier Transformation vom PELDOR Spektrum; c) Abstandsverteilung des Tikhonov Fits (B.Endeward)

- RNA6:

Beim nicht-selbstkomplementären Konstrukt zeigt sich dasselbe Bild. Oszillationstiefe und –dauer sind nicht ausreichend und somit ergibt sich eine Verteilung mit vielen Abständen. Der Hauptabstand entspricht auch in diesem Fall dem Abstand aus der TPA-gelabelten RNA, 2.7nm.

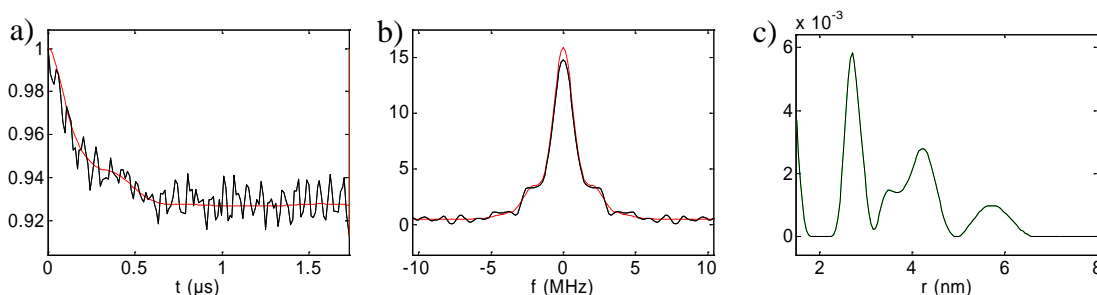


Abbildung 61: Ergebnisse der PELDOR-Messungen von RNA6: a) korrigierte Oszillations-Kurve; b) Fourier Transformation vom PELDOR Spektrum; c) Abstandsverteilung des Tikhonov Fits (B.Endeward)

Interessant bei dieser RNA im Vergleich zu den beiden RNAs 3 ist der Verlauf der Echo-Detektion (siehe Abbildung 62). Hierbei kann man deutlich die unterschiedlichen Profile der

detektierten Felder beobachten. Die Maxima der ^{14}N - und ^{15}N -TEMPA-RNAs haben sich umgekehrt und das Feld der RNA 6 zeigt genau die Mischung der beiden separaten Verläufe. Dies macht das gezielte Pumpen und Detektieren der unterschiedlichen Spin-Labels möglich.

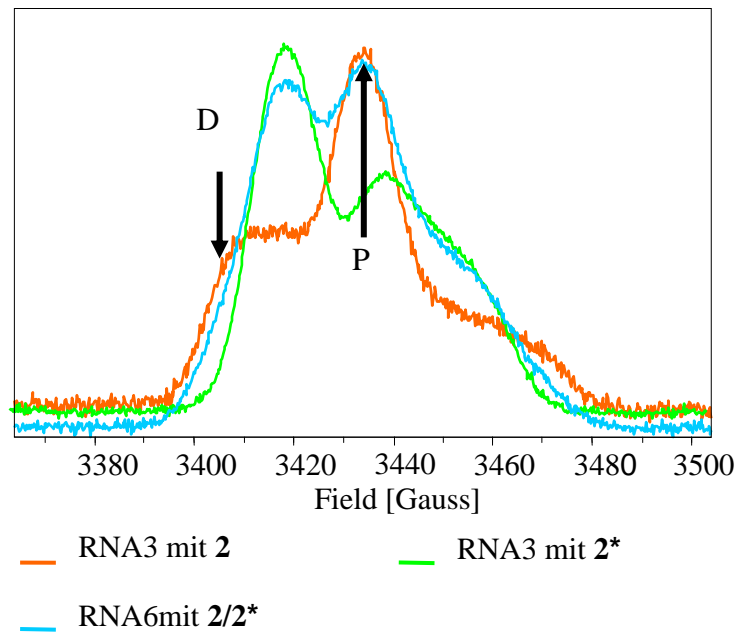


Abbildung 62: Echo-Detektion von RNA3 und 6 (Unterschied zwischen ^{14}N und ^{15}N)
(B.Endeward)

D: Detektionsfrequenz; P: Pulsfrequenz

4.4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die erhaltenen Daten zeigen deutlich nicht nur einen Unterschied bei der Benutzung der verschiedenen paramagnetischen Sonden sondern noch zwei weitere Effekte. Als erstes ist die Lage des Nitroxids im Doppelstrang von Bedeutung. So zeigt sich eine höhere Destabilisierung bei der Markierung an den letzten drei Basen am 3'-Ende. Der zweite Einfluss kommt von der markierten Base selbst und somit der Platzierung des Labels in der großen oder kleinen Furche. Hierbei ist der Effekt des TEMPA-Spin-Labels an Adenosin (kleine Furche) geringer als am Uridin (große Furche). Die kleine Furche der A-Helix ist breit und besitzt nur eine sehr geringe Tiefe, wodurch das räumlich sterische TEMPA-Nitroxid nicht mit dem RNA-Rückgrat in Kontakt kommt und somit diesen nur gering beeinflusst.

Ein weiterer Erklärungsansatz beschäftigt sich mit dem einzigen gemeinsamen Nenner: den beiden Nitroxiden. Der entscheidende Unterschied zwischen diesen liegt nicht in der Dynamik und der Flexibilität des Ringsystems sondern im Raumbedarf^[77]. Im TPA-Fünfring-

Nitroxid befinden sich alle Ringatome in einer Ebene, dies trifft auch für die Alkin-Einheit zu. Beim TEMPA-Radikal liegt eine „Pseudo-enveloped“-Konformation vor, wobei eines der tertiären Kohlenstoffatome aus der Molekülebene herausragt. Dieser strukturelle Unterschied ist beim Einbau des Sechsrings (am Uridin) in der großen Furche, da diese lang und schmal ist, für die Destabilisierung verantwortlich.

Des Weiteren muss auch die Geometrie des gesamten Spin-Labels für die Erklärung herangezogen werden. Das TPA-Radikal weist einen Winkel von mehr als 120° zwischen der N-O-Bindung und der Alkin-Einheit auf. Dieser „Knick“ ermöglicht es dem Nitroxid bei der Hybridisierung sich so im System auszurichten, dass die Beeinflussung des gesamten Systems am geringsten ist. Für das TEMPA-System ergibt sich ein Winkel von nahezu 180° .

Fazit: Die Verwendung der einzelnen Nitroxide ist abhängig von der Helixform und der zu markierenden Base. Bei der Markierung von RNA kann das TPA-Spin-Label **1** sowohl an eine Purin- wie auch an eine Pyrimidin-Base gekoppelt werden

Die Markierung mit dem Sechsring-Spin-Label (TEMPA **2** und **2***) sollte, um eine Destabilisierung der Helix zu vermeiden, nur an Purinbasen (in 2-Position) bei der A-Helix und an Pyrimidinbasen (in 5-Position) bei der B-Helix erfolgen.

4.4.2 DNA/RNA-Hybride

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die in der Gruppe von Prof. J.W.Engels etablierte Methode^[31] der Markierung von DNA auf den neu synthetisierten 2-Iodo-Adenosin Baustein transferiert werden. Nach den vielen Vorarbeiten von N.Piton und Prof. J.W.Engels in Kooperation mit Prof. T.F.Prisner und Prof O.Schiemann auf dem Gebiet der Strukturaufklärung von DNA^[31a] und RNA^[31b] mittels TPA-Nitroxid markierter Systeme sollten in diesem Projekt DNA/RNA-Hybride synthetisiert werden. Hierbei ist es entscheidend die dreidimensionale Struktur dieser Mischhybride zu bestimmen.

Die Vorarbeiten haben gezeigt, dass die Unterscheidung der beiden Helixarten A und B mittels gepulster-EPR (PELDOR)^[31a, 35] möglich ist. Weiterhin konnte die Gültigkeit der Methode durch den Vergleich mit den gemodelten Abständen (MD-Simulation im Arbeitskreis Prof. G.Stock) bewiesen werden.

Eine mögliche Anwendung dieser strukturellen Untersuchung ist in der Antisense-Technologie^[81] zu sehen. Dieser therapeutische Ansatz befasst sich mit der Inhibierung der Proteinexpression durch Hybridisierung der einzelsträngigen mRNA. Bei den Antisense-Oligonukleotiden handelt es sich um kurze (15-20mere) DNA-Stränge, welche an die komplementären Basen der vorliegenden mRNA binden. Bei der Bildung eines DNA/RNA-Hybrids wird dieses durch das intrazelluläre Enzym RNase H erkannt und die RNA-Komponente abgebaut^[32].

Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen sollte diese Frage geklärt werden:

- Handelt es sich bei den DNA/RNA-Hybriden eher um Systeme des B-Helix- oder des A-Helixtyps oder entsteht eine die Helixbreite und Ganghöhe betreffende Mischform?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden jeweils zwei komplementäre DNA- und RNA-Stränge synthetisiert und die verschiedenen Hybrid-Konstellationen untersucht.

Für diesen Zweck und vor allem um die Zugänglichkeit zu nicht-selbstkomplementären Oligomeren zu erhalten, wurde im Vorfeld das 2-Iodo-desoxy-Adenosin (Kapitel 4.3.2) synthetisiert.

Als Analysemethoden für die Unterscheidung der verschiedenen Helixformen stehen mehrere zur Auswahl, wobei in dieser Arbeit drei davon Anwendung finden: Schmelzpunktbestimmung, CD-Spektroskopie und PELDOR. Die erhaltenen Abstände bei der gepulsten-EPR weisen für die B-Form einen höheren Abstand auf als für vergleichbare RNA in A-Form. Dies folgt aus den Parametern dargestellt in Tabelle 1 in Kapitel 2. Die

Schmelzpunktbestimmung selbst, aber auch die aus der Schmelzkurve ablesbare Hyperchromizität, können als Beweise für die eine oder die andere Helixform herangezogen werden. Dabei sollte der Schmelzpunkt einer in A-Form vorliegenden RNA höher sein als bei der DNA derselben Sequenz. Auch die Absorption bei 260nm sollte bei der RNA im denaturierten Zustand höher sein als bei der DNA. Bei der CD-Spektroskopie sind die Kurvenverläufe der beiden Formen (A- und B-Helix) in allen Extrempunkten unterschiedlich.

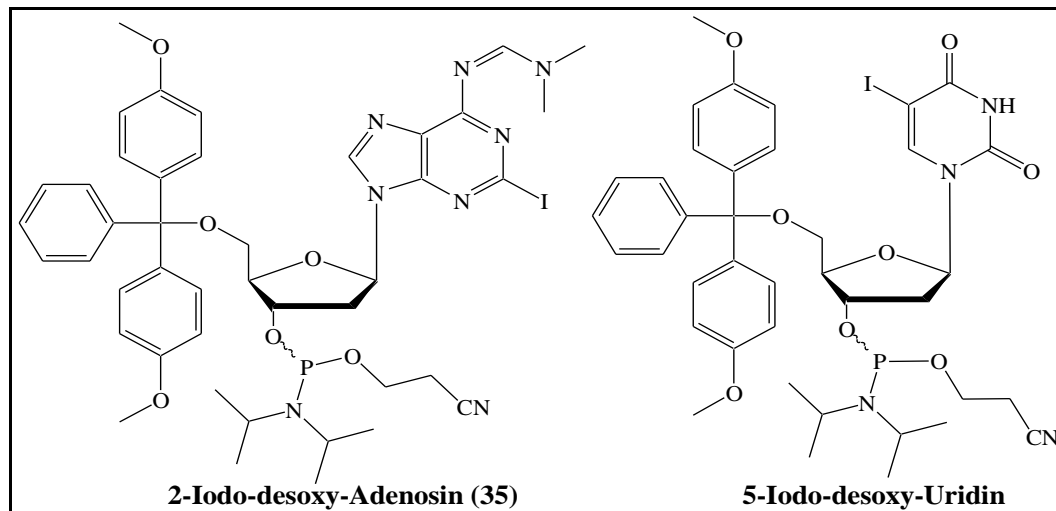


Abbildung 63: Verwendete Phosphoramidite

Für diese Aufgabenstellung wurden die benötigten DNA- und RNA-Stränge synthetisiert, wobei ein Strang das TPA-Spin-Label am Thymidin bzw. am Uridin und der andere am Adenosin trägt. Als RNA-Gegenkonstrukt wird die TPA-markierte RNA6 (Abschnitt 4.4.1) verwendet.

4.4.2.1 Unmodifizierte Oligomere

Zur Ermittlung der ersten Tendenz wurden die verschiedenen Kombinationen aus DNA- und RNA-Strängen mit unmodifizierten Oligonukleotiden verwendet. Hierbei erfolgte die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur mittels Schmelzpunktbestimmung (Abbildung 64 a) und CD-Spektroskopie (Abbildung 64 b).

Bei beiden Messmethoden zeigt sich bei den Mischhybriden die Einstellung der B-Helixform. Dies ist in den CD-Spektren am deutlichsten zu beobachten. Hier verringert sich die Elliptizitätsintensität der Misch-Hybride im Vergleich zur RNA um etwa das 1,5fache und es erfolgt eine Verschiebung des Maximums in den Bereich von 280nm. Außerdem geht die Ausprägung des Minimums λ_4 fast vollständig verloren. Auch die gemessenen Schmelzpunkte

zeigen deutliche Differenzen, dabei kann eine Erniedrigung der Schmelztemperatur von reiner RNA zur reinen DNA beobachtet werden.

Tabelle 6: Synthetisierte DNA- und RNA-Stränge

Oligomer	Sequenz	Masse ber.	Masse gefund.
DNA(T)-unmod	5'-CGC-TAC-ATA-GTG-AGC-3'	4577.0	4577.7
DNA(A)-unmod	5'-GCT-CAC-TAT-GTA-GCG-3'	4568.0	4569.1
DNA(T*)-mod	5'-CGC-TAC-ATA-GT*G-AGC-3'	4725.2	4724.9
DNA(A*)-mod	5'-GCT-CAC-TAT-GTA*-GCG-3'	4730.2	4730.1
RNA(U)-unmod	5'-CGC-UAC-AUA-GUG-AGC-3'	4775.0	4779.0
RNA(A)-unmod	5'-GCU-CAC-UAU-GUA-GCG-3'	4751.9	4751.0
RNA(U*)-mod	5'-CGC-UAC-AUA-GU*G-AGC-3'	4937.1	4931.6
RNA(A*)-mod	5'-GCU-CAC-UAU-GUA*-GCG-3'	4914.2	4914.5

T*, U* und A*: gelabelt mit Spin-Label TPA

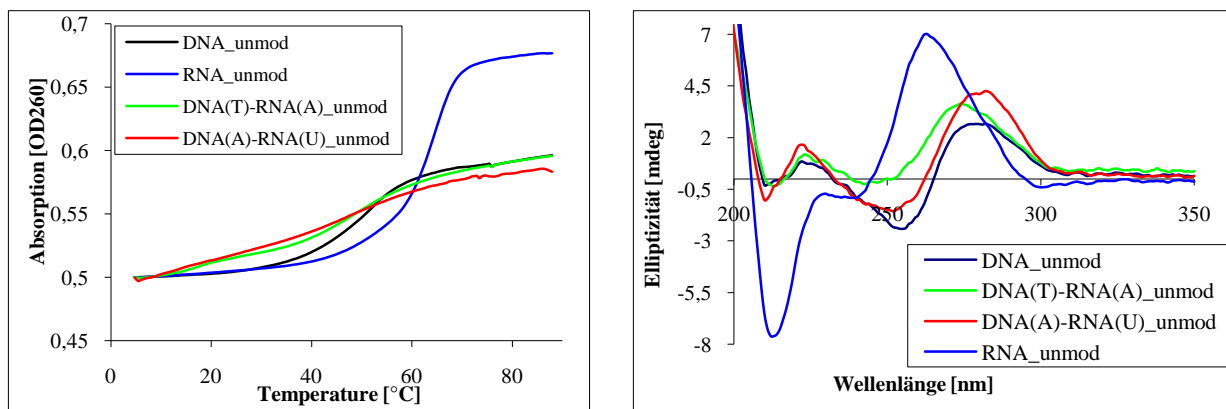


Abbildung 64: a) Schmelzkurven-Vergleich der unmodifizierten Oligomere; b) CD-Spektren: DNA-RNA-Hybride im Vergleich zu reinen Doppelhelices

Die erhaltenen Schmelzkurven zeigen die erwarteten Merkmale bezüglich der Hyperchromizität und des Schmelzpunktes. So besitzt die RNA-Probe im geschmolzenen Zustand eine doppelt so hohe Absorption wie die DNA-Probe und die Differenz der beiden Schmelzpunkte beträgt 14,8°C. Diese beiden Effekte und die gemessenen CD-Spektren zeigen für die RNA eine viel dichtere strukturelle Ausprägung basierend auf Basenpaarung und -stapelung als bei der DNA.

Auch die Analyse der gemischten Hybride ist eindeutig. Alle Analysemethoden zeigen für die Hetero-Hybride die B-Helixform typischen spektroskopischen Merkmale: geringer Anstieg der Hyperchromizität beim Schmelzvorgang, zur DNA vergleichbare Schmelzpunkte und der Kurvenverlauf bei der CD-Spektroskopie. Eine genauere Einordnung der Helixform kann aus Tabelle 7 abgeleitet werden. Dabei sind die Extrempunkte λ_1 und λ_4 von großer Aussagekraft. Vergleicht man die Werte, so ergibt sich, dass das DNA(T)-RNA(A)-Hybrid eine Mischform mit Präferenz zu B-Helix aufweist und das DNA(A)-RNA(U)-Hybrid eine DNA-Ähnlichkeit besitzt. Als mögliche Reihenfolge für die Ganghöhe der Helix und somit für die zu messenden Abstände ergibt sich:

$$\text{DNA} > \text{DNA(A)-RNA(U)} > \text{DNA(T)-RNA(A)} > \text{RNA.}$$

Tabelle 7: Charakterisierung der gemessenen CD-Spektren der unmodifizierter Hybride

Duplex	λ_1		λ_2		λ_4	
	$x[\text{nm}]$	$y[\text{mdeg}]$	$x[\text{nm}]$	$y[\text{mdeg}]$	$x[\text{nm}]$	$y[\text{mdeg}]$
DNA-unmod	276	2.62	253	-2.37	208	-0.01
DNA(T)-RNA(A)-unmod	273	3.38	243	-0.59	213	-0.36
DNA(A)-RNA(U)-unmod	277	3.99	249	-1.46	210	-1.03
RNA-unmod	261	6.74	238	-0.92	211	-7.29

4.4.2.2 Mit TPA-modifizierte Oligomere^[82]

Für die Synthese der modifizierten, gemischten Hybride wurden die geeigneten Phosphoramidite (Abbildung 63) in die DNA-Stränge eingebaut und mit dem TPA Spin-Label versehen. Als RNA-Stränge wurden die im Abschnitt 4.4.1 (RNA6) gezeigten verwendet.

4.4.2.2.1 Synthese

Im Gegensatz zur publizierten DNA-Synthese wurde das RNA-Protokoll angewendet. Die Vorteile dieser Vorgehensweise liegen in der Vereinfachung der Synthese und in Ausbeutemaximierung. Der entscheidende Unterschied liegt in der Nicht-Unterbrechung der automatischen Synthese nach dem Einbau der Iodo-Modifikation. Die Markierung mit dem Nitroxid erfolgte nach der vollständigen Oligomer-Festphasensynthese.

Im Falle der DNA(A*) ergab sich das in Abbildung 65 dargestellte Anionen Exchange HPLC-Diagramm. Durch die massenspektroskopische Untersuchung der einzelnen Signale konnte das Produkt bei der Retentionszeit von 22 Minuten ermittelt werden.

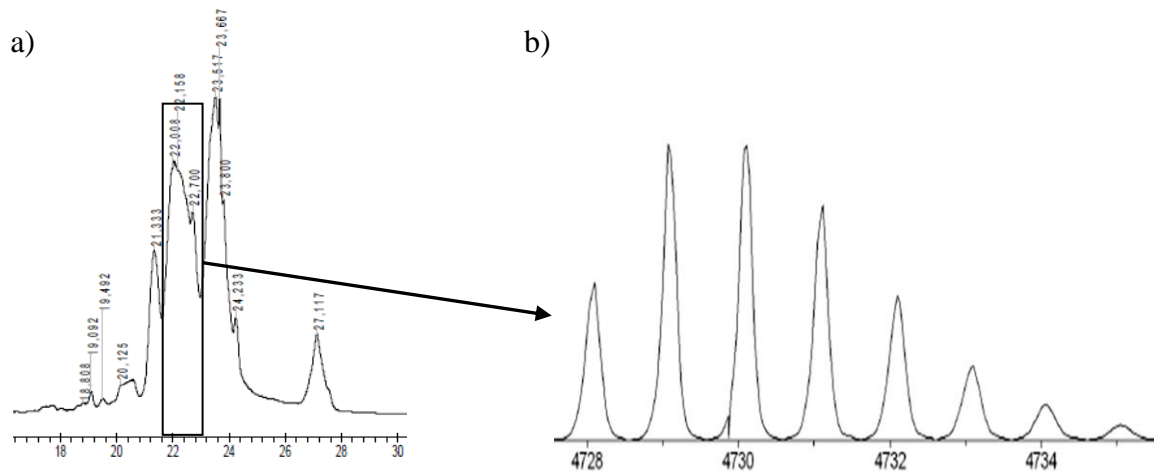


Abbildung 65: a) Anionen Exchange HPLC; b) Masse der DNA(A*)

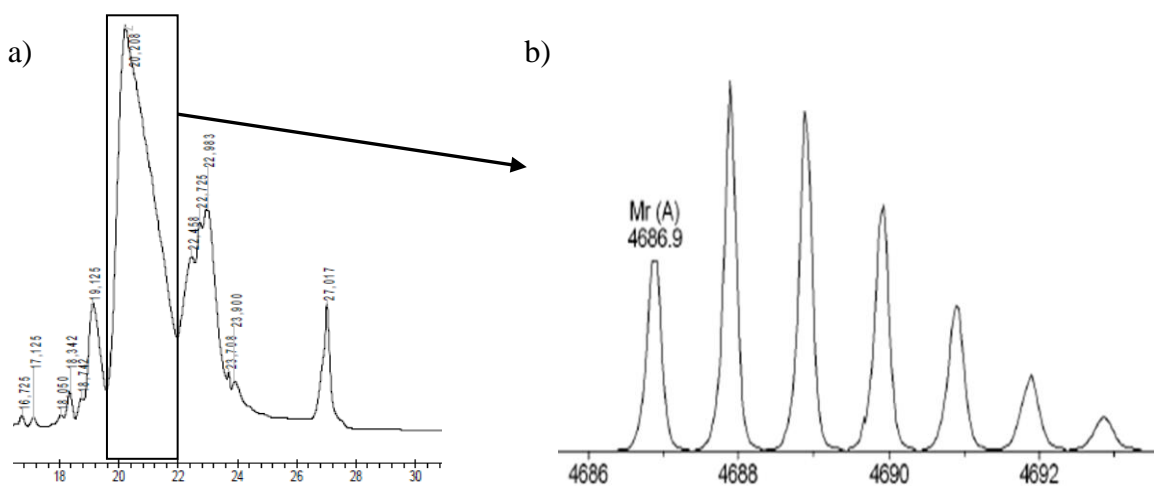


Abbildung 66: a) Anionen Exchange HPLC; b) Masse der Hauptfraktion bei 20min. von DNA(T*)

Die Übertragung der RNA-Synthese-Strategie auf den DNA(T*)-Strang scheiterte. Das nach der ersten Synthese erhaltene Anionen Exchange HPLC-Diagramm wies kein Produkt auf. Als Hauptprodukt dieser Synthese wurde die Iodierte-DNA isoliert. Die Konsequenz aus diesem Ergebnis war die Modifizierung der Sonogashira-Kreuz-Kupplungsreaktion. Dabei wurden das Lösungsmittel und der Palladium-Katalysator gemäß der Publikation von A.Marx^[83] verändert. Die Reaktion erfolgte in Dimethylformamid statt Dichlormethan und mit Pd(0) statt Pd(II). Auch diese Veränderungen führten zum selben Ergebnis, das Kupplungsprodukt konnte nicht isoliert werden.

Der dritte Versuch wurde nach den von N.Piton etablierten Bedingungen durchgeführt. Dabei wird die Festphasensynthese nach dem Einbau der iodierten Base und ohne die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe unterbrochen, die Sonogashira-Kupplung 2mal durchgeführt und anschließend die Synthese fortgesetzt. Die Kupplung erfolgte hierbei mit Pd(II) und in Dichlormethan als Lösungsmittel. Das Anionen Exchange Chromatogramm dieser Synthese zeigte viele verschiedene Signale, worauf diese separiert, entsalzen und über eine Reversed Phase-Säule weiter aufgereinigt wurden. Laut der erhaltenen Masse konnte das gewünschte Produkt im Retentionszeitbereich von 18 bis 22 Minuten gewonnen werden.

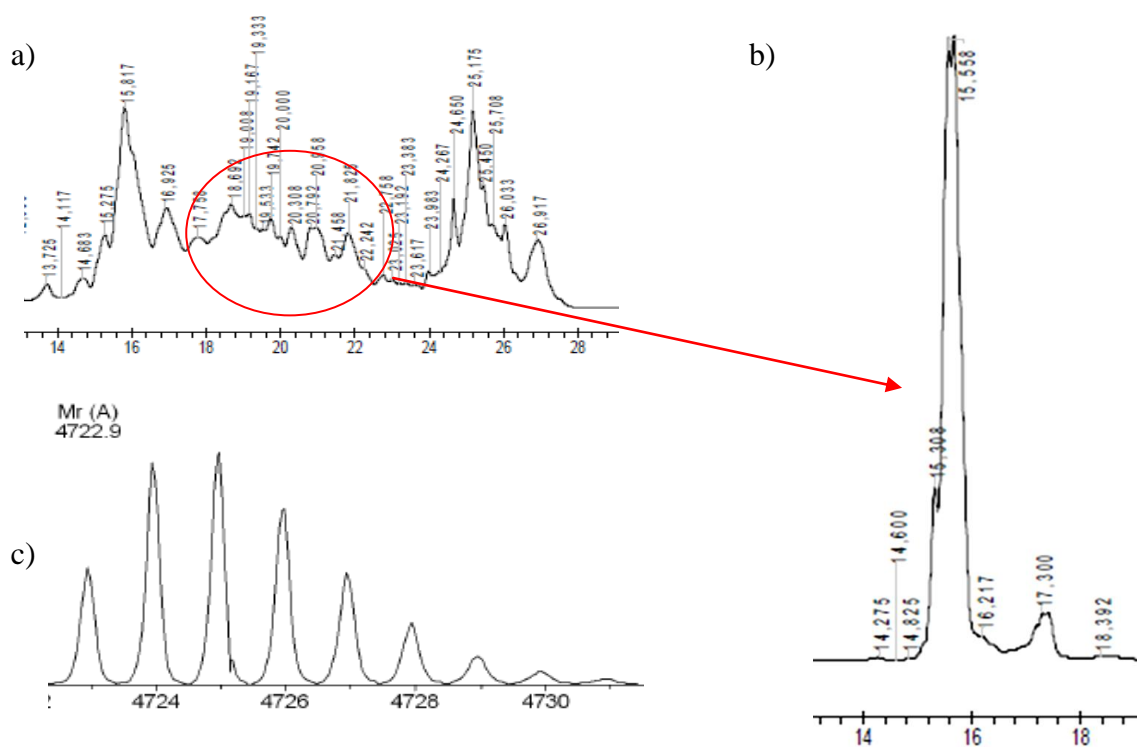


Abbildung 67: a) Anionen Exchange HPLC; b) Reversed HPLC: Retentionszeit 18-22min.; c) Masse der DNA(T*)

Dieses Ergebnis zeigt, dass in den ersten beiden Synthesen das Produkt möglicherweise vorlag, aber nicht isoliert werden konnte. Für die weitere Synthese von modifizierter DNA empfiehlt es sich das RNA-Protokoll erneut zu versuchen.

4.4.2.2.2 Analytik

Alle Hybride wurden im Phosphat-Puffer (140mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄ und 10mM Na₂HPO₄, pH= 7) präpariert und untersucht.

Für die PELDOR-Messungen wurden jeweils 1.0OD₂₆₀ eines Stranges (siehe Tabelle 8) mit 1.0OD₂₆₀ des Gegenstrangs in 100µL Phosphat-Puffer hybridisiert und eingengt. Nach dem

Auflösen des Pellets in 100 μ L 20%-iger Ethylenglykol-Lösung wurde die Probe in ein RNase-freies EPR-Röhrchen überführt und eingefroren.

Als RNA-Referenz wurde die Messung der RNA6 aus der Doktorarbeit von N.Piton^[44] verwendet.

Tabelle 8: Gemessene Schmelzpunkte (Phosphat-Puffer, pH =7)

Oligomer	Sequenz	T _m [°C]	Δ T _m [°C]
DNA-unmod	5'-CGC-TAC-ATA-GTG-AGC-3' 5'-GCT-CAC-TAT-GTA-GCG-3'	48.9 \pm 0.1	0
DNA-mod	5'-CGC-TAC-ATA-GT*G-AGC-3' 5'-GCT-CAC-TAT-GTA*-GCG-3'	48.6 \pm 0.1	-0.3
DNA(T)-RNA(A)-unmod	5'-CGC-TAC-ATA-GTG-AGC-3' 5'-GCU-CAC-UAU-GUA-GCG-3'	50.9 \pm 0.2	0
DNA(A)-RNA(U)-unmod	5'-GCT-CAC-TAT-GTA-GCG-3' 5'-CGC-UAC-AUA-GUG-AGC-3'	49.4 \pm 0.4	0
DNA(T*)-RNA(A*)-mod	5'-CGC-TAC-ATA-GT*G-AGC-3' 5'-GCU-CAC-UAU-GUA*-GCG-3'	47.8 \pm 0.2	-3.1
DNA(A*)-RNA(U*)-mod	5'-GCT-CAC-TAT-GTA*-GCG-3' 5'-CGC-UAC-AUA-GU*G-AGC-3'	45.7 \pm 0.2	-3.7
RNA-unmod	5'-CGC-UAC-AUA-GUG-AGC-3' 5'-GCU-CAC-UAU-GUA-GCG-3'	63.7 \pm 0.2	0
RNA-mod	5'-CGC-UAC-AUA-GU*G-AGC-3' 5'-GCU-CAC-UAU-GUA*-GCG-3'	63.5 \pm 0.4	-0.2

T*, U* und A*: gelabelt mit Spin-Label TPA

Tabelle 9: Charakterisierung der modifizierten Hybride

Oligonukleotid	λ_1		λ_2		λ_4		PELDOR r [Å]
	x[nm]	y[mdeg]	x[nm]	y[mdeg]	x[nm]	y[mdeg]	
DNA-mod	276	1.09	254	-1.83	213	-1.85	30 \pm 0.4
DNA(T*)-RNA(A*)-mod	270	2.41	241	-0.41	213	-0.64	28 \pm 1
DNA(A*)-RNA(U*)-mod	282	1.94	254	-1.13	213	-0.73	30 \pm 0.5
RNA-mod	266	2.46	241	-0.45	213	-2.54	27 \pm 1

Durch die Einführung des Spin-Labels erfolgt beim DNA(T*)-RNA(A*)-Hybrid eine Veränderung der Helixform von B-ähnlicher beim unmodifizierten Strang zur A-Helix ähnlicher beim modifizierten. Eine Herabsetzung der Elliptizität durch das Markieren der Nukleotide mit TPA-Spin-Label zeigt sich nur im Fall der Modifizierung des RNA-Doppelstrangs im Vergleich zum unmodifizierten. Dies deutet auf eine Störung der optimalen Ausprägung der Basenpaare und Basenstapelung hin. Bei den anderen drei untersuchten Duplexen ist diese Elliptizitätsverringeringung weniger deutlich zu beobachten. Die Wellenlängen und die dazugehörigen Elliptizitäten sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Die gemessenen Schmelzpunkte sind vergleichbar mit denen der unmodifizierten Oligomere. Die CD-Spektren weisen eine ähnliche Tendenz wie die unmodifizierten Stränge auf.

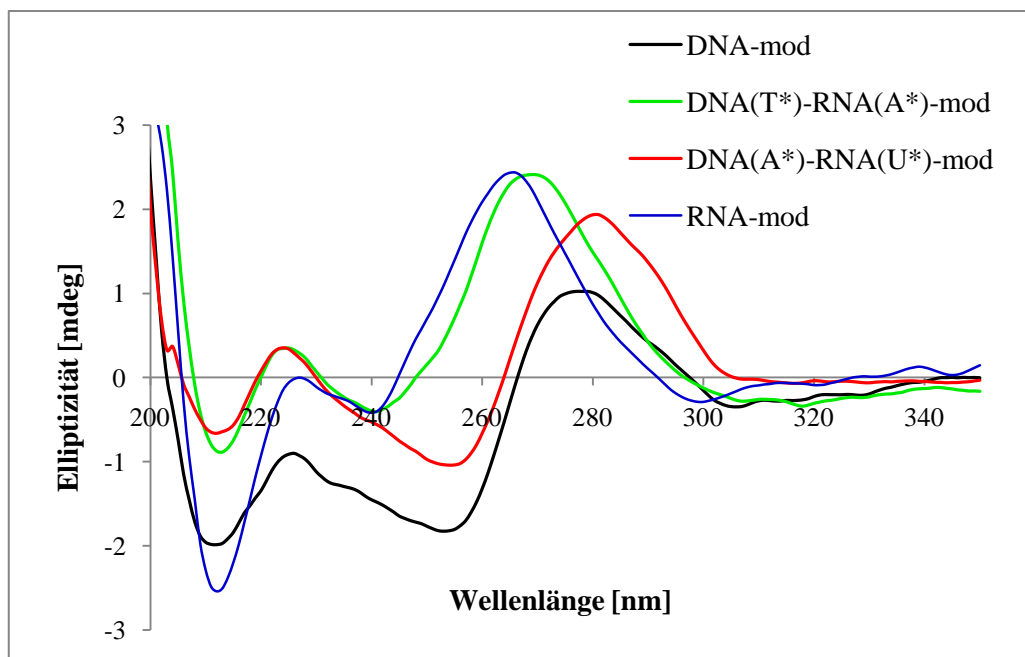


Abbildung 68: CD-Spektren der mit TPA modifizierten Hybride

Als Schlussfolgerung aller erhaltenen spektroskopischen Daten für die modifizierten Hybride ergibt sich für die Abstandsmessung folgende Reihenfolge:

$$\text{DNA-mod} \geq \text{DNA(A*)-RNA(U*)-mod} > \text{DNA(T*)-RNA(A*)-mod} > \text{RNA-mod}$$

Diese Tendenz wird durch die PELDOR-Messungen, gemessen und analysiert von B.Endeward in der Gruppe von Prof. T.F.Prisner, untermauert. Bei den Experimenten konnte jeweils eine eindeutige Abstandsverteilung nach dem Tikhonov-Algorithmus bestimmt werden.

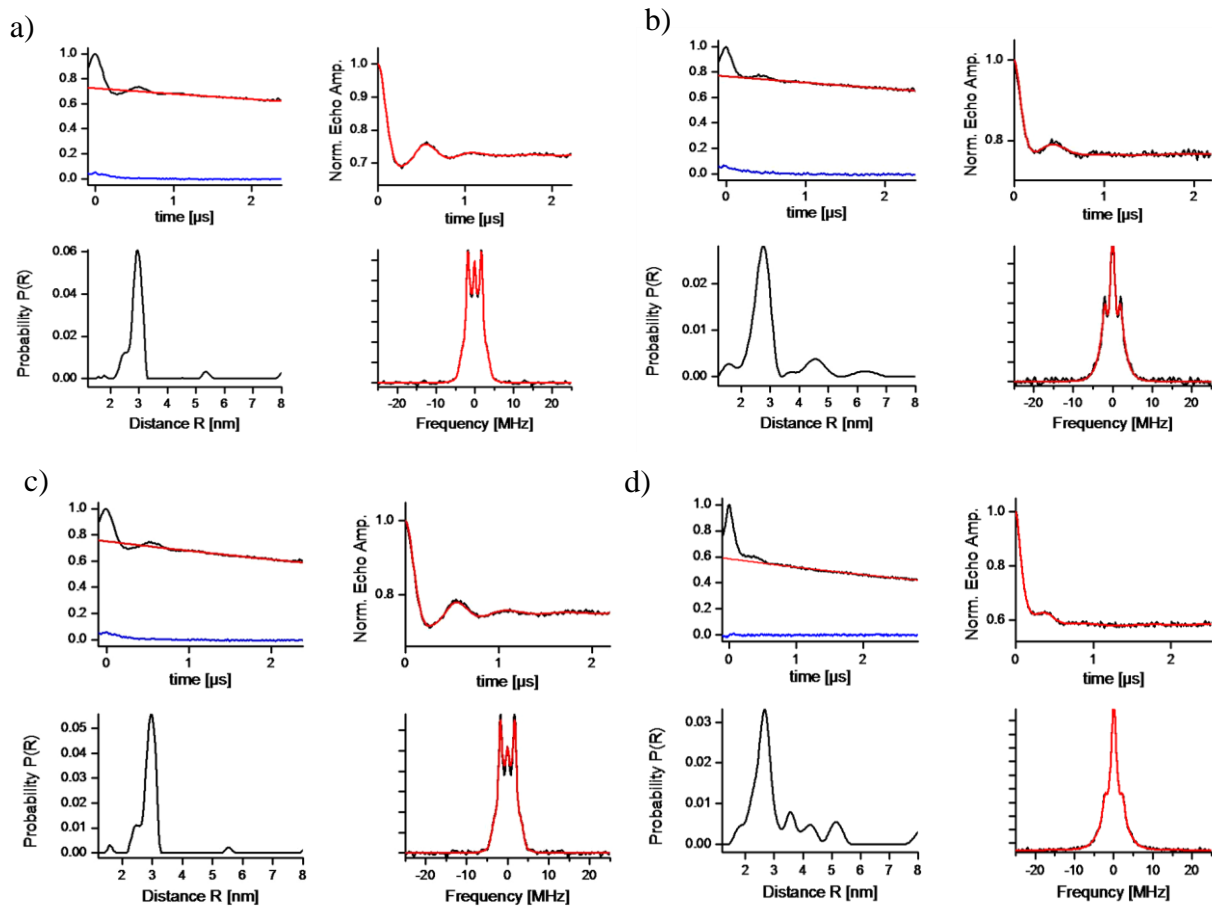


Abbildung 69: a) DNA-Hybrid; b) DNA(T*)-RNA(A*)-Hybrid; c) DNA(A*)-RNA(U*)-Hybrid; d) RNA- Hybrid (B.Endeward)

4.4.2.1 Kinetische Untersuchungen mit RNase H-Enzym

Das Enzym RNase H^[82] gehört zur den Abwehrmechanismen im lebenden Organismus und kontrolliert die Translation von Proteinen. Die Erkennungssequenz ist das Hetero-Hybrid bestehend aus einem DNA- und einem RNA-Strang. Die RNase H schneidet nach der Erkennung der Doppelhelix den RNA-Strang. Dabei ist das Enzym selektiv für A-Helixform ähnliche Hetero-Helices und nicht reine DNA- und reine RNA-Doppelstränge.

Die therapeutische Anwendung findet dieses Enzym in der Antisense-Oligonukleotid Methode. Hierbei werden 15-20 Nukleotide^[81] lange DNA als Antisense-Stränge zur vorliegenden mRNA verwendet. Nach der Erkennung der Zusammensetzung und der Konformation wird die mRNA geschnitten und so die Produktion des kodierenden Proteins unterbunden.

Für die in diesem Teilprojekt untersuchte Fragestellung sollte das Enzym als Indikator für die vorliegende Helixform fungieren. Dafür wurden jeweils 1.0 OD₂₆₀ (genaue Pipettiervorschrift ist in der Tabelle 10 dargestellt) in 43 μL sterilem Wasser hybridisiert und anschließend mit

Puffer und Enzym versetzt. Die Hybridisierung erfolgte durch ein langsames Abkühlen einer 2 Minuten auf 95°C gehaltenen Oligomer-Lösung. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung auf 0°C wurde der RNase H-Puffer (1x; 50mM Tris-Cl, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, pH= 8.3) zugegeben und auf die Inkubationstemperatur von 37°C gebracht. An diesem Zeitpunkt erfolgt die Entnahme des Null-Wertes (4µL).

Tabelle 10: Zusammensetzung der kinetischen Untersuchung von unmodifizierten Hybriden

Probe Bestandteile	DNA- unmod	DNA(T)- RNA(A)-unmod	DNA(A)- RNA(U)-unmod	RNA- unmod
DNA(T)	6.8nmol	6.8nmol	-	-
DNA(A)	7.0nmol	-	7.0nmol	-
RNA(U)	-	-	6.5nmol	6.5nmol
RNA(A)	-	6.6nmol	-	6.6nmol
H₂O	43µL	43µL	43µL	43µL
Puffer (10x)	5µL	5µL	5µL	5µL
RNase H (5T Units/mL)	2µL	2µL	2µL	2µL
Gesamt	50µL	50µL	50µL	50µL

Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Doppelhelices zu gewährleisten, wurden bei den modifizierten Strängen dieselben Mengen und dieselben Bedingungen verwendet.

Bei der Kinetik aller Doppelstränge erfolgte die zeitliche Kontrolle bei 20min, 1h, 3.5h, 24h und 48h. Zur Deaktivierung des Enzyms, wurde die entnommene Probe (je 5µL) in 10µL steriles Wasser gegeben und auf -20°C abgekühlt.

Als Nachweis für das Fortlaufen des RNA-Abbaus wurden analytische Anionen Exchange HPLC-Chromatogramme aufgenommen. Die Trennung erfolgt mit 1M LiCl-Lösung und einem Gradienten von 0 bis 56% in 34 Minuten.

Sowohl bei der unmodifizierten wie auch bei der modifizierten reinen DNA- und RNA-Doppelhelix ist kein Abbau nach der verwendeten zeitlichen Dauer beobachtet worden.

Zur Vergleichbarkeit wurden die erhaltenen Flächen unter den Integralen auf 1.0 normiert. Die Auftragung der Inkubationszeit gegen die normierte Signalfläche ist in der Abbildung 70 dargestellt. Hierbei zeigen sich drei unterschiedliche Gruppen. Die RNA in den beiden unmodifizierten Hetero-Hybriden wird nur sehr langsam abgebaut und erreicht selbst nach fünf Tagen nicht den Null-Wert. Das Hetero-Hybrid DNA(A*)-RNA(U*)-modifiziert gehört der zweiten Gruppe an. Hier wird die RNA schneller abgebaut als in der vorherigen Gruppe, dieser Abbau ist aber nach der Inkubationszeit von fünf Tagen nicht vollständig beendet. In der vierten Gruppe befindet sich das Hybrid DNA(T*)-RNA(A*)-modifiziert. Bei diesem Hybrid wird die RNA schon nach 24 Stunden vollständig geschnitten.

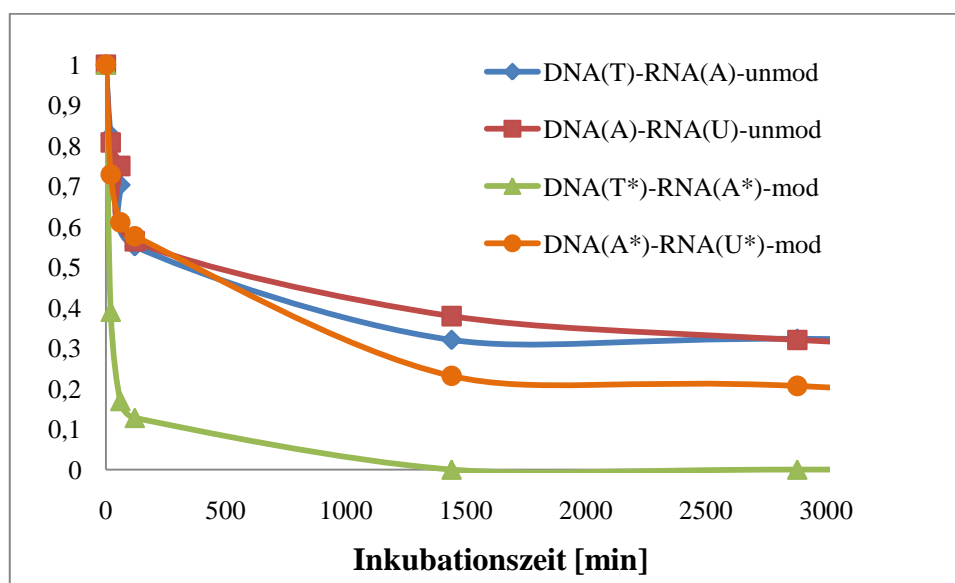


Abbildung 70: Abbau der RNA in Abhängigkeit zur Inkubationszeit

Betrachtet man die einzelnen HPLC-Chromatogramme in der zeitlichen Abfolge und für jedes Hybrid einzeln, so erkennt man unterschiedliche Schnittmuster. Die unmodifizierten Duplexe werden ohne eine favorisierte Schnittstelle abgebaut. Anders die modifizierten Hybride, diese werden bevorzugt an einer bestimmten Stelle in der RNA-Sequenz geschnitten. Bei dem Hybrid DNA(T*)-RNA(A*)-mod. entstehen zwei kleinere RNA-Stücke im HPLC; eins bei 8.5 und eins bei 21 Minuten. Das letztere wird nach einem Tag ebenfalls in kleinere Fragmente zerschnitten. Im Falle des zweiten modifizierten Duplexes ist erstmals nur ein Fragment bei 11.5 Minuten zu beobachten. Etwa nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden ist die Bildung von weiteren RNA-Stücken zu beobachten.

Die durchgeführten kinetischen Experimente mit der RNase H zeigen deutliche unterschiedliche Abbauraten für die verschiedenen Hybride (modifiziert und unmodifiziert).

Der Abbau des einzigen in der A-Helixform vorliegenden Hetero-Hybrids DNA(T*)-RNA(A*)-mod. erfolgt am schnellsten. Generell kann gesagt werden, dass der Abbau von modifizierten Misch-Duplexen nur an bevorzugter Position in der RNA-Sequenz erfolgt. Als ein möglicher Grund dafür kann die Lage des Spin-Labels genannt werden. Dieses scheint den weiteren Abbau durch mögliche sterische Hinderung zu verlangsamen.

Diese Möglichkeit lässt die Vergleichbarkeit der ermittelten Abbauraten nur unter den modifizierten bzw. unmodifizierten Hybriden zu, jedoch nicht zwischen modifizierten und unmodifizierten.

4.4.2.2 Zusammenfassung und Diskussion

Es konnten alle notwendigen Hybride synthetisiert, isoliert und charakterisiert werden. Die dabei erhaltenen Daten zeigen eine Beeinflussung der Helixform durch das Einführen des Radikals.

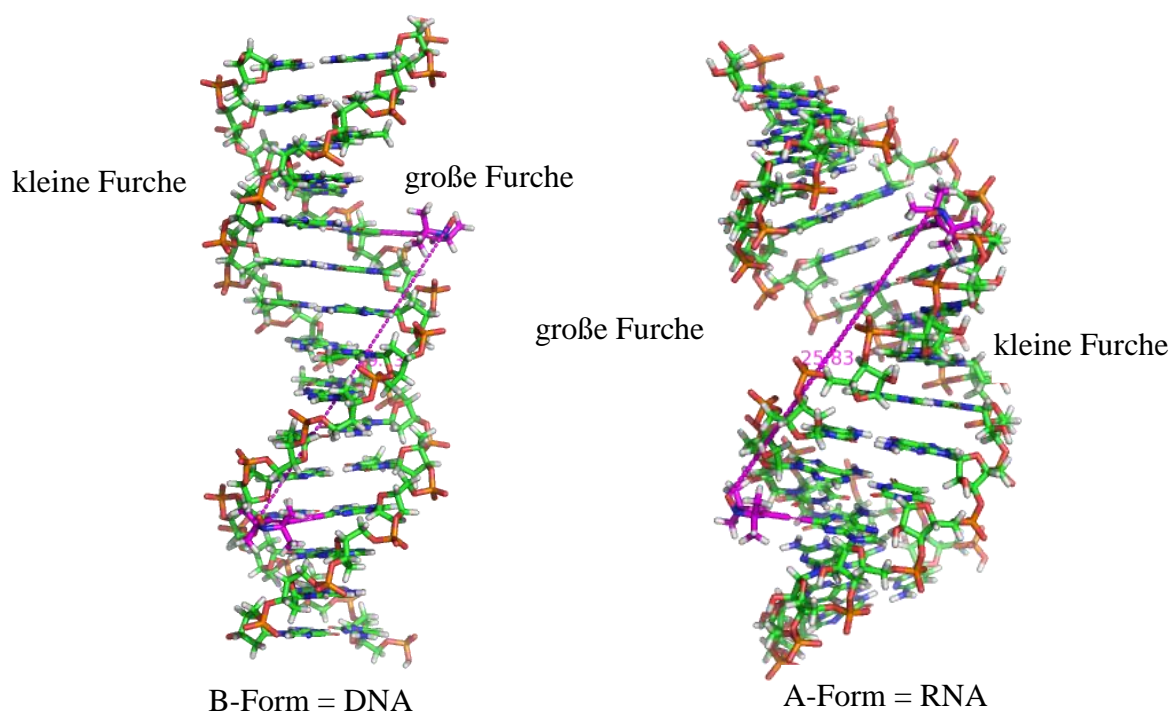


Abbildung 71: B- und A-Helixform (erstellt in PyMol)

Um die erhaltenen Daten zu erklären, muss die geometrische Architektur der möglichen Doppelstränge herangezogen werden. Im Vergleich sind die beide Furchen der DNA-Helix breiter als die große Furche der A-Form. Beim Vergleich der Größe der Furchen stellt man fest, dass die große Furche in der B-Helix und die kleine Furche in der A-Helix die breitesten

sind und somit den notwendigen Raum bieten um eine Modifikation zu platzieren (siehe Abbildung 71).

Betrachtet man die verwendeten Sequenzen so ergibt sich folgendes Bild: Die DNA(**T***) trägt das Spin-Label am Pseudo-Thymin, das Nitroxid ist hierbei in der großen Furche platziert und wirkt leicht destabilisierend auf die A-Helix aber stabilisierend auf die B-Helix. Beim Gegenstrang DNA(**A***) befindet sich die Modifikation in der kleinen Furche, was sehr destabilisierend für die B-Helix ist.

Überträgt man diese grundlegenden Überlegungen auf die RNA, so kommt man zum Ergebnis, dass die Modifikation in der kleinen Furche stabilisierend auf die A-Form und die Modifikation in der großen Furche destabilisierend auf die selbige wirkt.

In den Mischhybriden scheint der RNA-Strang die ausschlagende Kraft für die Formbildung zu sein. Befindet sich das Nitroxid in der kleinen RNA-Furche, so wird die B-Form bevorzugt. Bei der Platzierung in der großen RNA-Furche, erfolgt die Stabilisierung der A-Form. Diese Flexibilität ist auf die Fähigkeit der DNA verschiedene Konformationen anzunehmen zurück zu führen.

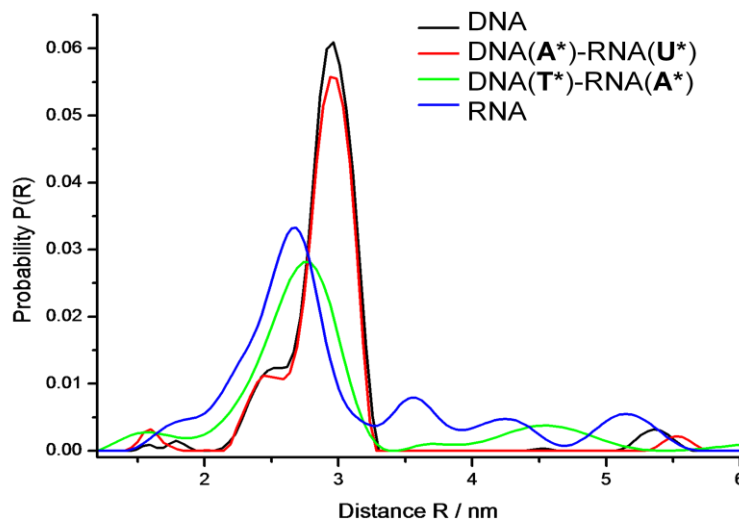


Abbildung 72: Vergleich der gemessenen Abstände (B.Endeward)

Fazit: Durch eine gezielte Modifikationsstrategie kann die Helixart des resultierenden Hybrids beeinflusst werden.

Des Weiteren ist die räumliche Ausdehnung des zu verwendenden Nitroxids bzw. Markers abhängig von der Oligomerart und Position (große oder kleine Furche). Das bereits charakterisierte Spin-Label TEMPA kann eine Anwendung in der Markierung der DNA finden, weil durch die Größe und Ausdehnung der großen Furchen hierbei genügend Raum vorhanden ist. Außer der Verwendung in der DNA-Markierung kann aber auch die Markierung von Adenosin in Betracht gezogen werden. Eine nur geringere Destabilisierung bei einer Einführung des Sechsrings an dieser Position konnte bereits bei RNA4 (Kapitel 4.4.1) gezeigt werden.

4.4.3 HCV-IRES Domain II

Die HCV-IRES (*internal ribosome entry site*) Domain ist lokalisiert am 5'-Ende des Hepatitis C Virus Genoms und stellt eines der attraktivsten Target-Moleküle für den therapeutischen Ansatz dar. Diese Domain bindet an die 40S ribosomale Untereinheit der Wirtszelle und leitet die Protein-Translation in der Abwesenheit von den meisten Regulationsfaktoren ein. Für die Untersuchungen mittels PELDOR wurde das durch NMR (P.Lukavsky *et al*, 2003)^[84a] und Röntgenstruktur-Analyse (T.Hermann *et al*, 2007)^[84b] definierte Fragment IIa gewählt. Domäne II ist eine 25kDa große Subdomäne, strukturell besonders bei der Regulierung der HCV-RNA Translation und Replikation entscheidend und besitzt eine charakteristische L-Konformation.

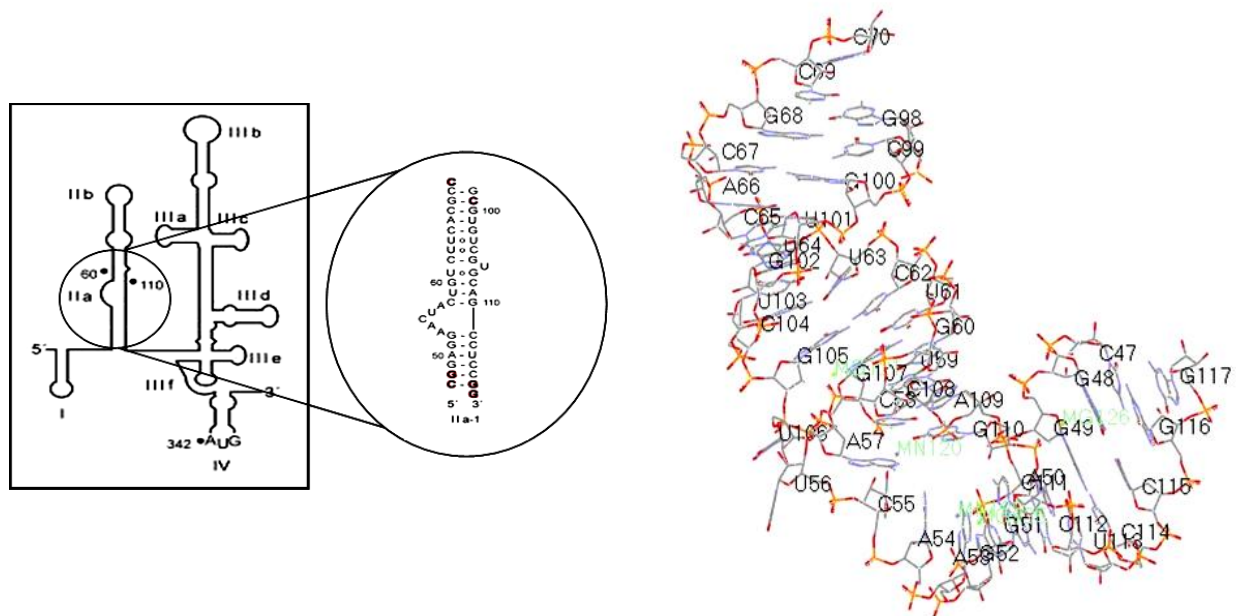


Abbildung 73: Sekundär- und Tertiärstruktur der HCV-IRES Domain IIa^[84b]

Die Kristallstrukturuntersuchungen haben gezeigt, dass die biologisch aktive Konformation durch mehrere anorganische Kationen stabilisiert werden kann. Hierbei handelt es sich um Mangan(2+), welches ähnliche chemische Eigenschaften aufweist wie Magnesium(2+). T.Hermann^[84b] und seine Mitarbeiter beschreiben die Notwendigkeit von zwei Mangan-Ionen, welche die Loop- und somit auch die L-Shape-Konformation stabilisieren.

Das Projekt wurde in einer Kooperation mit Prof. O.Schiemann und Prof. T.F.Prisner durchgeführt^[85].

4.4.3.1 Synthese

Als Test-RNA und als Referenz für die modifizierten Oligonukleotide wurden die beiden Duplex-Stränge zuerst unmodifiziert synthetisiert.

4.4.3.2 unmodifiziert

Die unmodifizierten RNA-Stränge wurden mittels TBDMS-Chemie (Kapitel 2.2.1) im Maßstab von 0.075mol synthetisiert (siehe Abbildung 74).

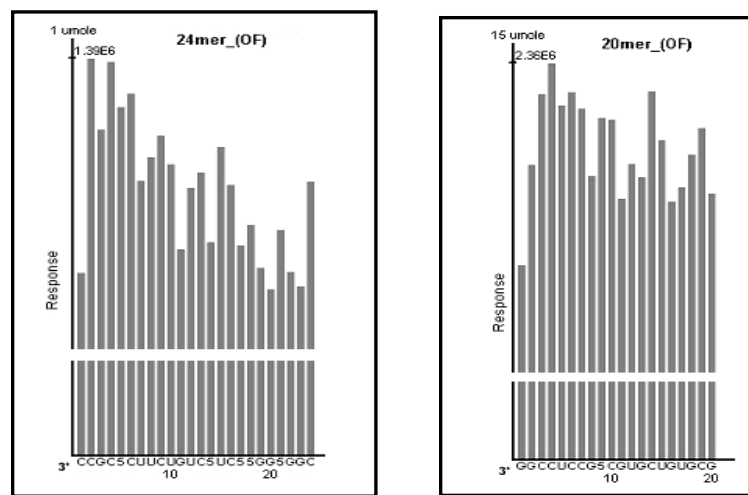


Abbildung 74: Trityl-Protokoll der beiden synthetisierten RNA-Stränge

In der Publikation von P.Lukavsky^[84] wurden drei verschiedene Magnesium-Puffer beschrieben. Aufbauend darauf wurden im Vorfeld der PELDOR-Experimente die Unterscheidbarkeit der verschiedenen Puffer und dessen Einfluss auf die Struktur und Hybridisierung der RNAs getestet. Als Vergleich wurde außerdem noch der Natrium-Phosphat-Puffer (140mmol NaCl, 10mmol Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄; pH= 7) verwendet.

4.4.3.3 modifiziert

Für die PELDOR-Experimente wurden fünf verschiedene Mutanten mittels Dharmacon-Chemie synthetisiert und charakterisiert. Dabei wurden die Label bevorzugt in der Doppelhelix-Region eingebaut. Bei der Mutante 3 wurde einer der beiden Nitroxide im Loop (an der Base A(54)) eingeführt, weil diese laut Kristallstruktur von den im Puffer befindlichen Kationen stabilisiert werden soll. Außer der Markierung an den gegenüber liegenden Strängen wurden auch zwei Spin-Label im selben RNA-Strang eingeführt. Dies wurde zu diesem Zeitpunkt das erste Mal erfolgreich durchgeführt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Unterbrechen der Festphasensynthese nach der Einführung des Iodo-Nukleotids nicht notwendig für die erfolgreiche Modifizierung ist. Alle RNAs wurden erst nach der

vollständigen RNA-Synthese durch die Sonogashira-Kreuz-Kupplung mit dem TPA (1)-Spin-Label markiert. Die für die Kupplung benötigten Reagenzien-Äquivalente wurden um den Faktor 1.5 vergrößert. Die Reaktion erfolgte abermals zweimal 2.5 Stunden.

Tabelle 11: Synthetisierte Stränge für HCV-IRES Domain II

RNA	Sequenz	Masse ber.	Masse gefund.	T _m [°C]
unmod	5'-GCG-UGU-CGU-GCA-GCC-UCC-GG-3'	6389.9	6394.2	65.4±0.3
	5'-CGG-AGG-AAC-UAC-UGU-CUU-CAC-GCC-3'	7627.7	7626.4	
A.1 A.2	5'-GCG-U(101)*GU-CGU-GCA-GCC-UCC-GG-3'	6553.1	6553.0	63.9±0.4
	5'-CGG-AGG-AAC-UAC-U(59)*GU-CUU-CAC-GCC-3'	7790.9	7790.4	
B.1 B.2	5'-GCG-U(101)*GU-CGU-GCA-GCC-U(113)*CC-GG-3'	6553.1	6553.0	60.7±0.3
	5'-CGG-AGG-AAC-UAC-UGU-CUU-CAC-GCC-3'	7790.9	7791.4	
C.1 C.2	5'-GCG-U(101)*GU-CGU-GCA-GCC-UCC-GG-3'	6716.3	6717.3	60.1±0.1
	5'-CGG-AGG-AA(54)*C-UAC-UGU-CUU-CAC-GCC-3'	7627.7	7626.4	
D.1 D.2	5'-GCG-UGU-CGU-GCA-GCC-U(113)*CC-GG-3'	6553.1	6555.3	62.0±0.2
	5'-CGG-AGG-AAC-UAC-UGU-CUU-CA(66)*C-GCC-3'	7790.9	7787.2	
E.1 E.2	5'-GCG-U(101)*GU-CGU-GCA-GCC-UCC-GG-3'	6553.1	6553.0	59.1±0.1
	5'-CGG-A(50)*GG-AAC-UAC-UGU-CUU-CAC-GCC-3'	7790.9	7791.1	

*: mit TPA-Spin-Label modifiziert

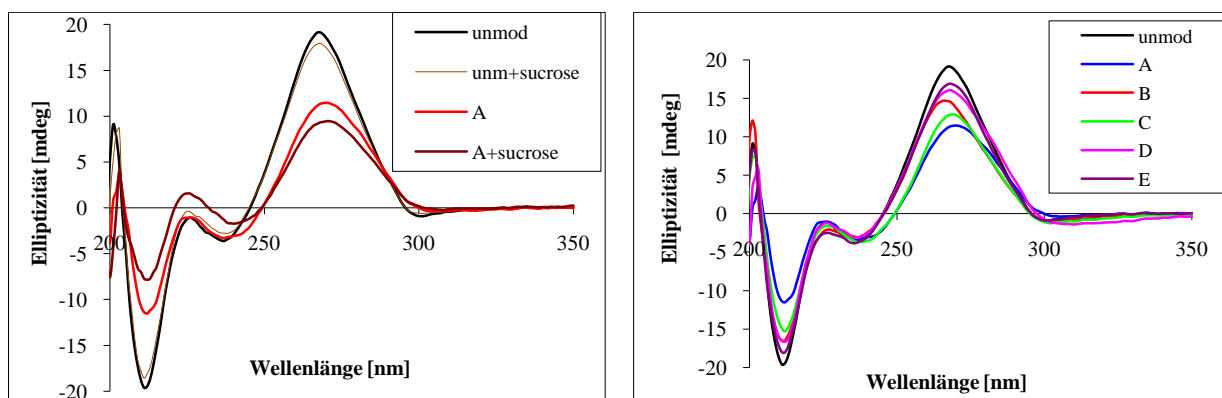


Abbildung 75: a) Betrachtung des Einflusses von EPR-Zusatz (20%-ige Sucrose-Lösung) auf die Struktur am Beispiel einer unmodifizierten RNA und der Mutante A; b) CD-Spektren aller HCV-IRES Mutanten

Beruhend auf den gemessenen Schmelzpunkten und den Verläufen in den CD-Spektren wurde bezüglich des Puffers für das kommende PELDOR-Experiment entschieden mit dem Puffer-3 (hier nicht gezeigt) zu arbeiten.

4.4.3.4 Analytik

Für die Untersuchung des Einflusses des EPR-Zusatzes (Sucrose) auf die Struktur wurden CD-Spektren mit und ohne Zusatz angefertigt (Abbildung 75a). Es konnte keine signifikante Beeinflussung der Struktur durch den Zusatz Sucrose beobachtet werden.

Abbildung 75b stellt eine Gegenüberstellung aller Mutanten bezüglich ihrer Elliptizität dar. Hierbei wird bei den Mutanten A und C eine geringere Elliptizität im Bereich von 260nm (λ_1) beobachtet als bei den restlichen Oligomeren.

4.4.3.5 PELDOR

Die erhaltenen Spektren, gemessen und analysiert von Prof. O.Schiemann in der Gruppe von Prof. T.F.Prisner, zeigen alle außer der Mutante C eine deutliche Oszillation im Bereich von 2 μ s. Nach der Fourier Transformation und Berechnung nach Tikhonov ergeben sich eine sehr breiter und drei schmale Abstände. Die Mutante C beinhaltet eine Modifikation im Loop an der Position 54 an Adenosin. Bei der genauen Betrachtung der vorliegenden Kristallstruktur ragt das Spin-Label hierbei in die Helix und weitet somit die Struktur. Als Folge kann in der Abstandsverteilung keine definierte Distanz bestimmt werden. Dieser destabilisierende Effekt konnte schon beim Schmelzpunkt und beim CD-Spektrum beobachtet werden.

Tabelle 12: Gegenüberstellung der gemodelten und gemessenen Abstände

Mutante		Abstand [Å]	
		PyMol	PELDOR
A	U(101)-U(59)	14.8	18 \pm 3
B	U(101)-U(113)	26.3	29 \pm 5
C	U(101)-A(54)	15.6	-
D	A(66)-U(113)	38.2	39 \pm 5
E	U(101)-A(50)	36.2	/

/: konnte nicht gemessen werden, Probe zerstört; -: kein definierter Abstand

Mittels PELDOR bestimmte Abstände stehen in einer guten Übereinstimmung mit denen, die mittels *PyMol* modelliert wurden. Eine Mutante (U(101)-U(50)) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vermessen werden. Aber die vorherigen strukturcharakterisierenden Methoden deuten auch in diesem Fall auf eine hohe Destabilisierung hin.

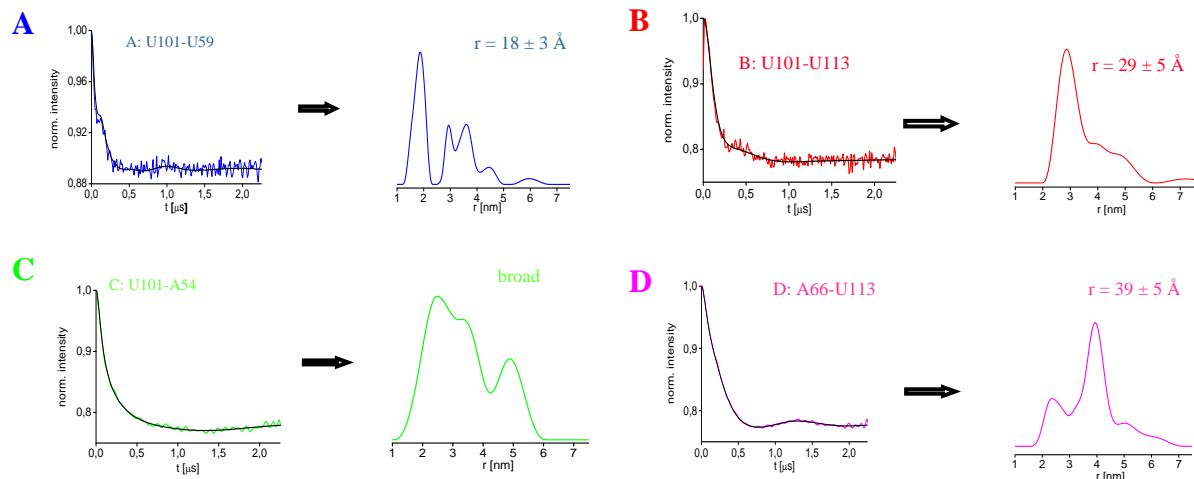


Abbildung 76: Oszillation und der resultierende Abstand für alle Mutanten (O.Schiemann)

4.4.3.6 Zusammenfassung und Diskussion

Zum ersten Mal ist es gelungen ein Fragment einer biologisch relevanten RNA zu synthetisieren und mit Nitroxid-Spin-Label zu markieren und somit ein strukturell anspruchsvolles Konstrukt einem PELDOR-Experiment zugänglich zu machen.

Durch das Nicht-Unterbrechen der RNA-Synthese konnte die Gesamtausbeute der RNA verbessert werden und gleichzeitig die Zugänglichkeit von zweifach markierten Oligomeren gezeigt werden.

Die erhaltenen Oszillationen, CD-Spektren und die Schmelzpunktmessungen zeigen die erfolgreiche Hybridisierung des strukturell anspruchsvollen Konstrukts. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den errechneten Abständen, die auf der Kristallstruktur basieren.

Eine weitere Tendenz kann aus den Abstandsverteilungen herausgelesen werden. So ergibt ein Nukleotid in der flexiblen Region der RNA eine breite Verteilung ohne klare Präferenzen, wobei zwei Modifikationen in einem Strang keine signifikanten Unterschiede zu den monogelabelten aufweisen.

Fazit: Das verwendete Verfahren und die Spin-Label sind gut geeignet um auch strukturell komplexe RNA-Stränge einer Größe bis 50 Basen zu synthetisieren und zu markieren.

4.4.4 UUCG-Tetra-Loop

Die Abstandsbestimmung mittels EPR wurde in der Zusammenarbeit mit Prof. T.F.Prisner für die Doppel-Helix-Strukturen entwickelt und optimiert und bis dahin nur an einer komplexeren Struktur getestet. Die nicht durch Hybridisierung stabilisierten RNA-Bereiche wie ein *loop* und *bulge* werden oft als eine Anordnung von freien Basen betrachtet. Bezogen auf ein EPR-Experiment muss für diese Fragmente die Beweglichkeit in Bezug auf die Experiment-Zeit-Skala untersucht werden.

Um jetzt den Einsatz an biologisch relevanten RNAs zu ermöglichen, wird an einem in der Gruppe Prof H.Schwalbe gut beschriebenen Tetra-Loop^[86, 87, 88] das Markieren einer Base im Loop untersucht.

Das gewählte 14mer Tetra-Loop gehört zur Familie der UNCG-Loops (N=U, C, G, A) und stellt ein Hairpin mit 4 Basen (UUCG) im Loopbereich dar^[89]. Diese Klasse macht einen großen Teil der *rRNAs* aus und wird als sehr stabil^[90] bezeichnet. Die ungewöhnliche Stabilität beruht hierbei auf einer zusätzlichen loopinternen Basenpaarung.

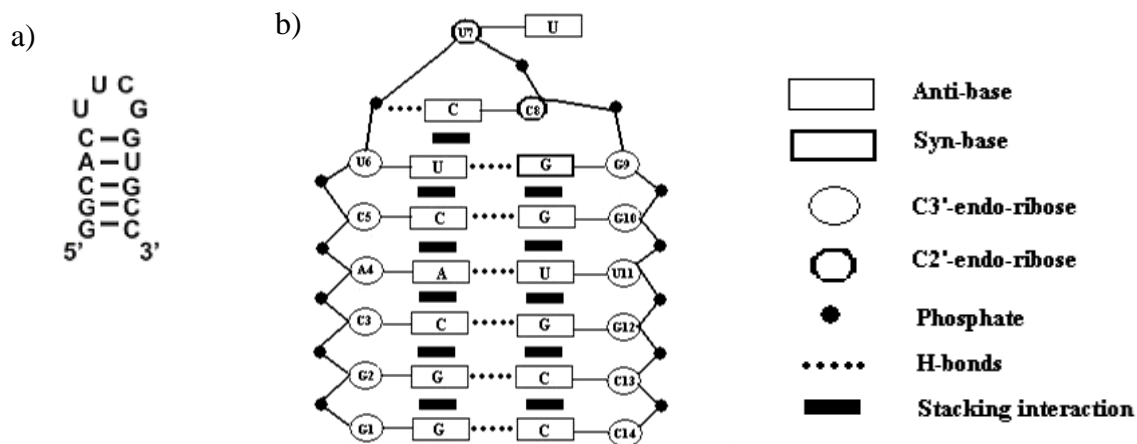


Abbildung 77: a) Sekundärstruktur; b) Wechselwirkungen im Tetra-Loop

So konnte mittels NMR^[86] gezeigt werden, dass die erste Uracil-Base des Loops U6 eine Basenpaarung mit dem Guanosin G9 ausbildet und zusätzlich noch eine Zucker-Basen-Wechselwirkung zwischen diesen Nukleotiden vorherrscht. Des Weiteren werden die beiden Basen durch *Stacking* mit der A-Helix stabilisiert. Das Guanosin G9^[87a] liegt, um diese Interaktionen ausbilden zu können, in der *syn*-Konformation vor. Die zweite Uracil-Base U7 wird stattdessen aus dem Loop nach „außen“ gedreht und kann sich auf der NMR-Zeit-Skala frei bewegen^[87a]. Diese Ergebnisse konnten auch mittels MD-Simulationen^[88] bestätigt werden. Außerdem werden intensive Basen-Stapelwechselwirkungen und eine zusätzliche

Base-Phosphatrückgrat-Wasserstoffbrücke zwischen dem Cytosin C8 im Loop und dem Phosphatrückgrat der ersten Uridins beobachtet. Die exozyklische Amino-Gruppe des Cytosins wechselwirkt hierbei noch mit einem Phosphat-Sauerstoff. Dieselben strukturellen Wechselwirkungen wurden von E. Ennifar *et al.* mittels Röntgenkristallstruktur^[91] gezeigt.

Weitere Untersuchungen an diesem Tetra-Loop zeigen die Wichtigkeit des schließenden CG-Basenpaares^[92, 93]. Beim Vertauschen der Basen erfolgt eine Destabilisierung von $\Delta T=10^{\circ}\text{C}$ ^[93]. Auch die Veränderung der Loop-Sequenz von UUCG zu UUUU führt zu einer drastischen Verringerung der Schmelztemperatur von über 15°C ^[94]. Bereits 1990 haben T.Sanaka und Mitarbeiter^[95] die Notwendigkeit der 2'-Hydroxy-Gruppe für die Stabilität des UUCG-Tetra-Loops bewiesen. Dabei wurde zwischen dem Desoxy-UUCG-Loop und Ribo-Tetra-Loop verglichen, wobei der Stamm immer als RNA-Fragment unverändert bleibt.

Basierend auf den Vorkenntnissen ist das gewählte UUCG-14mer als sehr stabil zu bezeichnen, was die Dynamik der RNA selbst beschränkt. Dies sollte bei der EPR-Messung, da diese bei -78°C erfolgt, zu keiner breiten Verteilung der Stamm-Bewegung führen.

Für das Gelingen einer EPR-Messung ist es von großer Bedeutung, dass sowohl die Base wie auch das daran befestigte Label nicht flexibel auf der Experiment-Zeit-Skala sind. Diese Bedingung ist theoretisch nicht bei jeder sekundären RNA-Struktur erfüllt und soll hier für einen Loop untersucht werden.

Mit dem Tetra-Loop Konstrukt können im Rahmen dieser Testung vier Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie abhängig ist die Struktur von Puffer und Konzentration?
2. Wie sieht ein PELDOR-Experiment bei einem Label an einer „flexiblen“ Base aus?
3. Wie unterscheiden sich die beiden Spin-Label **1** (TPA) und **2** (TEMPA) in Bezug auf die Destabilisierung des Tetra-Loops?
4. Wie beeinflussen die einzelnen Spin-Label in Abhängigkeit ihrer Position die Struktur?

Für die Beantwortung der ersten Frage ist das Markieren der RNA mit einem Spin-Label nicht notwendig, da die generelle äußere Beeinflussbarkeit überprüft werden soll. Dafür wird ein unmodifizierter Strang in verschiedenen Puffern und bei verschiedenen RNA- und Kationenkonzentrationen detektiert. Als Analysemöglichkeiten stehen hierbei die

Schmelzpunktmessung und die Strukturbestimmung mittels CD-Spektroskopie zur Verfügung.

Die zweite Frage soll mit Hilfe von vier Mutanten beantwortet werden, wobei der Unterschied mittels PELDOR-Messungen geklärt werden sollte.

Die dritte Fragestellung bezieht sich auf die destabilisierende Eigenschaft des Sechsrings. Hierbei soll die Abhängigkeit in Bezug auf die Position des Nitroxids (Doppelhelix gegen Loop) in der RNA überprüft werden.

Bei der letzten Fragestellung ist die Synthese von einfach markierten Loops notwendig. Hierbei werden die drei zur Verfügung stehenden Uridin-Basen jeweils mit einem TPA- oder TEMPA-Spin-Label versehen. Die Flexibilität kann an Hand von *cw*-Spektroskopie untersucht werden.

4.4.4.1 Synthese

Für die Unterscheidung und die Charakterisierung der Flexibilität der beiden Uracil-Basen im Loop mittels EPR wurden zehn modifizierte und ein unmodifizierter Strang synthetisiert.

1. Wildtyp: um die Sensibilisierung der Struktur gegenüber äußeren Bedingungen zu testen
2. U(6)-(11) Mutante mit Spin-Label **1**: um die fixierte Paarung im Loop zu beweisen
3. U(7)-U(11) Mutante mit Spin-Label **1**: um die Flexibilität der Uracil (7)-Base in einem PELDOR-Experiment zu beweisen
4. U(6) mit Spin-Label **2**- U(11) mit Spin-Label **1**
5. U(7) mit Spin-Label **2**- U(11) mit Spin-Label **1**
6. U(6)-Mutante mit Nitroxid **1**: für die Flexibilitätsmessungen mittels *cw*-EPR
7. U(7)-Mutante mit Nitroxid **1**: für die Flexibilitätsmessungen mittels *cw*-EPR
8. U(11)-Mutante mit Nitroxid **1**: für die Flexibilitätsmessungen mittels *cw*-EPR
9. U(6)-Mutante mit Spin-Label **2**: Flexibilitätsmessungen; Vergleichbarkeit mit **1**
10. U(7)-Mutante mit Spin-Label **2**: Flexibilitätsmessungen; Vergleichbarkeit mit **1**
11. U(11)-Mutante mit Spin-Label **2**: Flexibilitätsmessungen; Vergleichbarkeit mit **1**

Alle Sequenzen wurden mittels der ACE[®]-Chemie und ohne Unterbrechung (außer für die Mutanten 4 und 5) synthetisiert. Die bei den modifizierten RNAs notwendige Sonogashira-Kreuz-Kupplung wurde wie im Kapitel 6.5.3.2.2 dargestellt, durchgeführt. Bei der Doppelmutanten wurden die Mengen der benötigten Reagenzien auf das 1.5fache

hochgerechnet (3.0mg TPA-Spin-Label und 3.2mg Palladium(II)-Katalysator) und die Kupplung wurde statt zweimal dreimal durchgeführt. Diese Methode funktioniert nur bei Verwendung von einem Spin-Label und wurde bei Strang 2 und 3 eingesetzt. Bei der Synthese des Stranges für die Fragestellung 3 musste die Synthese nach der Einführung der ersten iodierten Base (von 3'-Position ausgehend) unterbrochen werden. Anschließend erfolgt die Sonogashira-Kreuz-Kupplung mit dem Nitroxid **1** (wie in Kapitel 6.5.3.2.2 beschrieben). Nach der Fortsetzung der unterbrochenen Synthese wurde die Kupplung mit dem zweiten Nitroxid (**2**) vorgenommen.

Tabelle 13: Synthetisierte Loop-RNAs

RNA	Sequenz	Masse ber.	Masse gefund.
Loop unmod	5'-GGC-ACU-UCG-GUG-CC-3'	4437.72	4439.99
U(6)-U(11) mit 1	5'-GGC-ACU [*] -UCG-GU [*] G-CC-3'	4790.43	4797.14
U(7)-U(11) mit 1	5'-GGC-ACU-U [*] CG-GU [*] G-CC-3'	4790.43	4791.77
U(6) mit 2-U(11) mit 1	5'-GGC-ACU [#] -UCG-GU [*] G-CC-3'	4804.44	4839.36
U(7) mit 2-U(11) mit 1	5'-GGC-ACU-U [#] CG-GU [*] G-CC-3'	4804.44	4796.49
U(6) mit 1	5'-GGC-ACU [*] -UCG-GUG-CC-3'	4599.92	4604.21
U(7) mit 1	5'-GGC-ACU-U [*] CG-GUG-CC-3'	4599.92	4604.77
U(11) mit 1	5'-GGC-ACU-UCG-GU [*] G-CC-3'	4599.92	4619.39
U(6) mit 2	5'-GGC-ACU [#] -UCG-GUG-CC-3'	4613.92	4645.56
U(7) mit 2	5'-GGC-ACU-U [#] CG-GUG-CC-3'	4613.92	4644.51
U(11) mit 2	5'-GGC-ACU-UCG-GU [#] G-CC-3'	4613.92	4627.99

1=TPA =*; **2= TEMPA =#**

Wie in der oberen Tabelle dargestellt, konnten alle Mutanten mittels MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

4.4.4.2 Analytik

Alle Spektren wurden im KCl-Puffer (50mmol KCl und 10mmol Phosphat bei pH= 6.2) aufgenommen. Um das Vorliegen von Doppel-Hybriden zu vermeiden, wurden die Proben im

Vorfeld fünf Minuten auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis gegeben. Dieses Vorgehen begünstigt die intramolekulare Hybridisierung des Konstrukts.

Die Schmelzkurven wurden im Bereich von 20 bis 95°C mit einer Heizgeschwindigkeit von 0.5°C/min und einer Detektion jedes halben Grades aufgenommen. Die RNA-Konzentration beträgt hierbei 4.0µM. Die CD-Spektren sind in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 350nm bei 7.5µM Loop-Konzentration aufgenommen worden, wobei jedes Nanometer gemessen wurde.

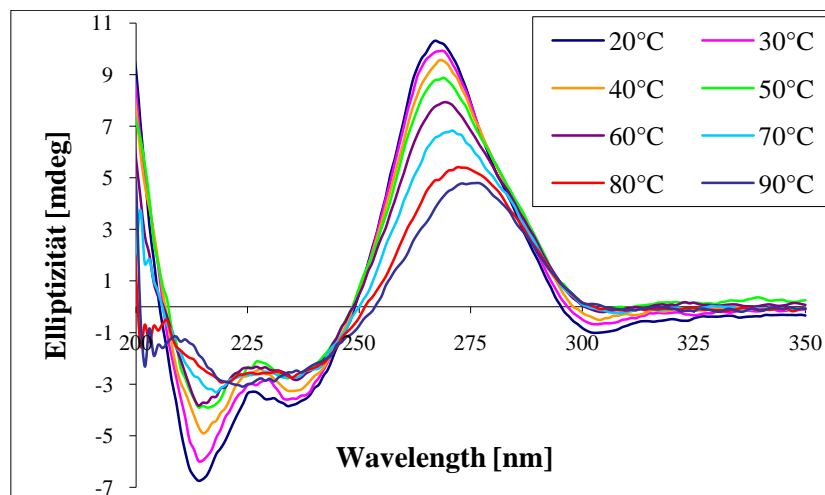


Abbildung 78: CD-Spektrum des Schmelzens des Tetra-Loops

Der Versuch den Schmelzpunkt mittels CD-Spektroskopie zu bestimmen, ist in Abbildung 78 dargestellt. Hier ist deutlich die Veränderung im Kurvenverlauf vom gefalteten bis zum geschmolzenen Zustand zu beobachten. Bei der Betrachtung des Maximums λ_1 stellt man eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen und eine Abnahme in der Intensität fest. Die beiden Faktoren können als Indikatoren für das Ausmaß an Strukturausbildung herangezogen werden oder auch für die rechnerische Ermittlung des Schmelzpunktes. Am eindeutigsten ist der Schmelzvorgang im Bereich von 200 bis 250nm zu beobachten. Hier verliert sich die Kurvenfeinstruktur vollständig.

4.4.4.2.1 Wie abhängig ist die Struktur von Puffer und Konzentration?

Bezug nehmend auf die Konditionen der NMR-Messungen (H.Schwalbe *et al.* ^[87a]) wird für die Konformationsmessungen der gleiche Puffer (50mmol KCl und 10mmol Phosphat bei pH 6.2) im Vergleich zum Standard-Puffer (140mmol NaCl und 10mmol Phosphat bei pH= 7) für RNA verwendet. Um die Strukturabhängigkeit des Loops feststellen zu können, wird die unmodifizierte Sequenz in unterschiedlich konzentrierten Puffern und bei verschiedenen

RNA-Konzentrationen analysiert. Die erhaltenen Schmelzpunkte und die CD-Spektren geben Aufschluss über die Strukturveränderlichkeit. Die ermittelten Schmelzpunkte sind hier nicht dargestellt.

Durch das Fehlen des zweiten Plateaus war die genaue Berechnung der Schmelzpunkte nicht möglich. Dies begründet sich auf dem oberhalb von 70°C liegenden Schmelzpunkt, wodurch kein richtiger sigmoiden Kurvenverlauf im technisch möglichen Messbereich (20 bis 95°C) zu beobachten war. So wurden die Schmelzpunkte mittels eines Annäherungsverfahrens berechnet. In Abbildung 79 ist exemplarisch jeweils eine Kurve aus den verwendeten Puffer-Systemen dargestellt.

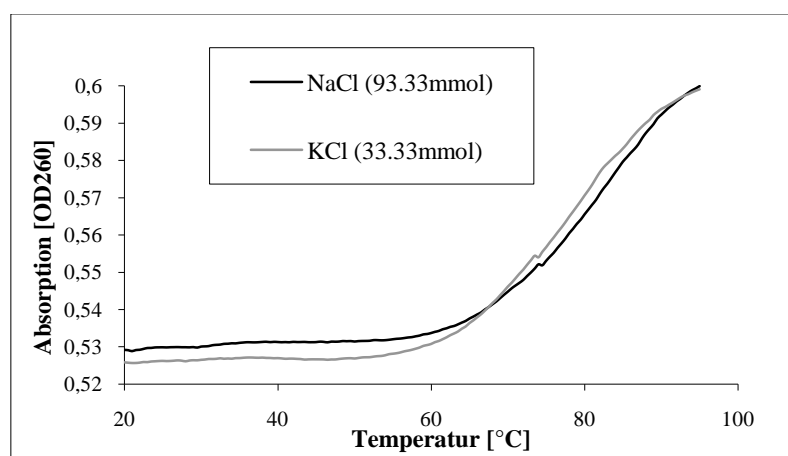


Abbildung 79: Schmelzkurven bei Konzentration von KCl (33.33mmol) und NaCl (93.33mmol), T_m (NaCl) \approx 76°C und T_m (KCl) \approx 80°C

Bei der Betrachtung der CD-Spektren zeigt sich für die „vollständige“ Ausbildung der Loop-Struktur die Notwendigkeit einer Mindestkonzentration an Kationen (Abbildung 80 a) und RNA (Abbildung 80 b). Dieses lässt sich besonders gut im Bereich von 200 bis 250nm sehen.

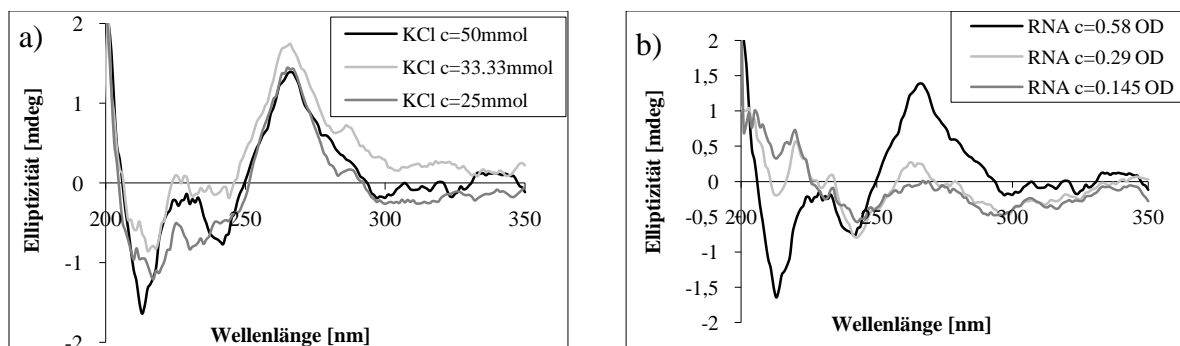


Abbildung 80: CD-Spektren des unmodifizierten Tetra-Loops bei verschiedenen a) Kalium-Konzentrationen; b) RNA-Konzentrationen

In diesem Wellenlängen-Bereich kann bei einer Verdünnung um $\frac{1}{3}$ keine richtige Struktur mehr definiert werden.

Bei der vollständigen Ausbildung einer Loop-Struktur kann mittels CD-Spektroskopie nur die A-Helix beobachtet werden. Diese wird durch drei Extrempunkte im Spektrum charakterisiert, die beiden Maxima bei $\lambda = 260$ und 230nm und das Minimum bei $\lambda = 220\text{nm}$. Betrachtet man die Abbildung 80 a), so zeigt sich nur eine minimale Höhen-Veränderung an dem Maximum bei 260nm , die beiden anderen Extrempunkte dagegen verschwinden fast vollständig.

Da die CD-Spektren auch keiner anderen Helix-Form zugeordnet werden können, muss man hierbei von einer Destabilisierung der Struktur ausgehen. Diese Beobachtungen werden auch von den gemessenen Schmelzkurven (Erniedrigung des Schmelzpunktes von über 10°C , hier nicht gezeigt) bestätigt.

Die RNA-Konzentrationsabhängigkeits-Studie in Abbildung 80 b) zeigt die Empfindlichkeitsgrenze der Methode an. Bei dem Versuch mit kleineren Konzentrationen als 0.5OD_{260} zu arbeiten, sinken die gemessenen Intensitäten um das Vierfache bezogen auf das Maximum bei 260nm und auch die beiden anderen Extrema sind nicht mehr mit der A-Helix in Einklang zu bringen.

Begründet durch diese Beobachtungen wurden die weiteren Messungen mit modifizierten Loops in einem KCl-Puffer (50mmol) und die CD-Spektren bei einer höheren RNA-Konzentration als 0.5OD_{260} durchgeführt.

4.4.4.2.2 Wie unterscheiden sich die beiden Spin-Label 1 und 2 in Bezug auf die Destabilisierung des Tetra-Loops?

Diese Frage kann schon durch die Betrachtung der Hyperchromizität in den Schmelzkurven und des Verlaufs der CD-Spektren beantwortet werden. Dabei muss der Spin-Label-Einfluss bezogen auf die Position im untersuchten Konstrukt betrachtet werden. Vergleicht man die Daten der Doppelmutanten für die Doppelhelix-Region, so erfolgt durch die generelle Verwendung eines Nitroxid-Radikals eine Destabilisierung des Systems. Dies erkennt man an der geringen Intensität bei Maximum λ_1 . Für die Monomutanten trifft diese Aussage nicht zu. Hier zeigt sich beim TEMPA-gelabelten Konstrukt eine Stabilisierung.

Die genaue Betrachtung der dargestellten CD-Kurven zeigt das Auftreten eines neuen Extremums oberhalb von 280nm. Diese „Schulter“ ist aber abhängig von der markierten Position, was den Einfluss der verwendeten Nitroxide in der Loop-Region andeutet.

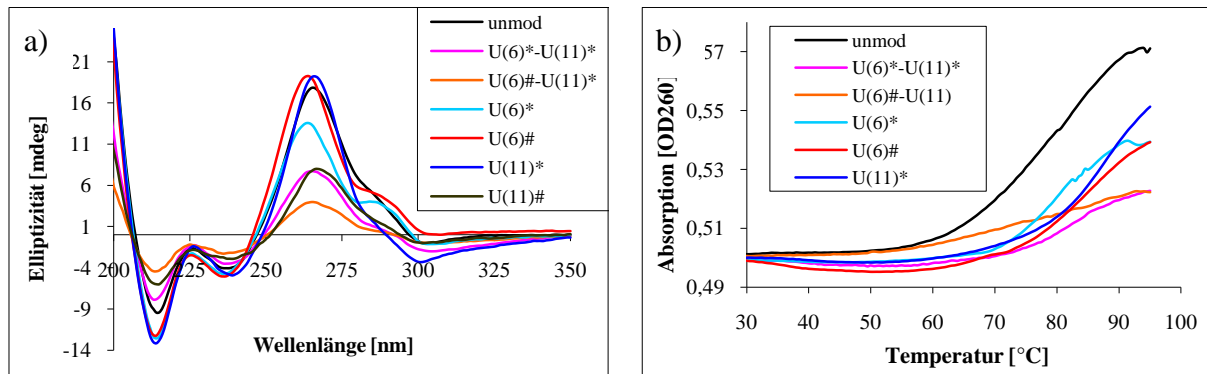


Abbildung 81: Vergleich a) der CD-Spektren; b) Schmelzkurven im Bereich der Doppelhelix

Die Betrachtung der Schmelzkurven weist eine noch höhere Destabilisierung auf als es von den CD-Spektren zu vermuten war. Die Hyperchromizität aller modifizierten Stränge sinkt im Vergleich zum Wildtyp drastisch. Bei den doppelt markierten Tetra-Loops ist der Unterschied zwischen dem ersten Plateau und dem zweiten, angedeuteten nur gering, was eine nicht vollständige Ausbildung der stabilisierenden Wechselwirkungen zeigt. Dies wird von den oben gezeigten CD-Spektren bestätigt. Eine global gültige Unterscheidung zwischen den Effekten der beiden unterschiedlichen Ringsysteme ist aber nicht möglich.

4.4.4.2.3 Wie beeinflussen die einzelnen Spin-Label in Abhängigkeit ihrer Position die Struktur?

Hierbei ist eine genauere Betrachtung der CD- und EPR-Spektren notwendig. Die ersteren werden zuerst diskutiert und später mit den EPR-Daten, gemessen von B.Endeward, nochmals verglichen.

Wie schon oben erwähnt, ist eine allgemeine Tendenz unter den verwendeten Nitroxiden und auch den markierten Positionen nicht möglich. Somit müssen die Ergebnisse in Abhängigkeit von der sekundären RNA-Struktur betrachtet werden. Abgesehen von den vier Extrempunkten einer CD-Kurve kommt hierbei noch die oben erwähnte „Schulter“ als Strukturmerkmal hinzu. Eine vergleichbare Veränderung in dem gemessenen CD-Spektrum wurde schon bei dem untersuchten UUCG-Tetra-Loop beobachtet. R.Hannoush *et al.*^[66] untersuchen die strukturelle Veränderung bedingt durch die 2'-5'-Nukleotid-Verknüpfung in der Loop- und auch in der Doppelhelix-Region. Dabei beobachten sie eine Ausprägung eines neuen Extrempunktes im Bereich oberhalb von 280nm. Der Vergleich der dazugehörigen Spektren

mit den in dieser Arbeit gemessenen zeigt größtenteils eine gute Übereinstimmung. Diese „Schulter“ wird der Entstehung einer B-Helix im Loop-System zugewiesen.

Bei den gemessenen Spektren ist die Ausprägung dieser Schulter unterschiedlich, je nach Position und Grad der Markierung. Die einfach gelabelten Stränge, wobei hier nur die mit der Modifizierung in dem Loop-Bereich gemeint sind, zeigen alle die Ausbildung eines neuen Extrempunktes.

Bedenkt man die Interpretation von R.Hannoush *et al.*^[66], so bewirkt die Einführung eines Spin-Labels in der Loop-Region eine Umorientierung der Baseneinheiten und führt somit zur Veränderung der bestehenden Wechselwirkungen. Laut Publikation von D.Moore und T.Wagner^[68] beruht der einzige Unterschied in den CD-Spektren zwischen DNA (B-Form) und RNA (A-Form) in dem Winkel zwischen den gebildeten Basenpaarungen und der Helix-Achse. Somit müssen sich die Ebenen, in denen die Loop-Basen liegen, gegenüber der Helix-Achse verschoben haben. Dies sollte nur auf die vier Loop-Basen beschränkt sein, da sonst der Charakter der A-Helix ganz verloren gehen würde. Dies ist nicht der Fall, weil die Intensität des Maximums λ_1 bei den Monomutanten fast durchgehend oberhalb des Wildtyps liegt. Die einzige Ausnahme stellt die U(11)-TEMPA Mutante dar. Hier ist die A-Helixform durch die Einführung des Spin-Labels 2 destabilisiert worden. Diese Beobachtung stimmt mit der im Kap.4.4.1 gemachten überein.

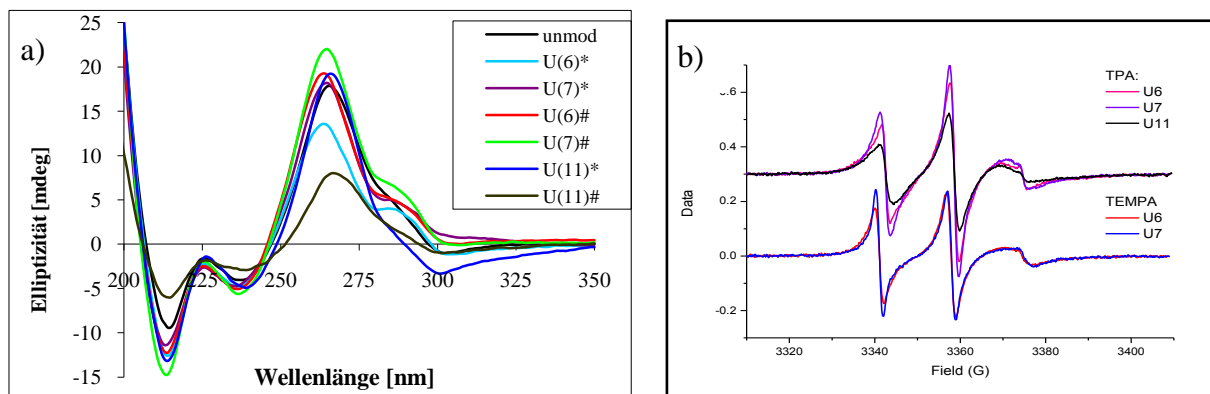


Abbildung 82: Vergleich der a) CD-Spektren; b) cw-EPR Spektren von allen Monomutanten (B. Endeward)

Außer der Bildung einer Schulter kann auch eine Verschiebung des Maximums beobachtet werden. Drei Modifikationen begrenzen hierbei das Spektrum: die Mutanten U(7)*-U(11)* und U(11)# mit einer Wellenlänge von 267nm und die Mutante U(7)#-U(11)* mit 261nm (Tabelle 14). Diese Verschiebung folgt keiner erkennbaren Gesetzmäßigkeit und wird nicht weiter diskutiert.

Interessant ist hierbei auch die Elliptizitätsintensität der einzelnen Mutanten. So weisen die nur mit einem Nitroxid modifizierten Stränge eine höhere Elliptizität als der Wildtyp auf. Dabei erfolgt keine Unterscheidung nach Spin-Label oder nach Position. Dagegen sinkt die Intensität des Maximums beim Einbau von zwei paramagnetischen Zentren. Vergleicht man die Stränge unter dem Aspekt des gewählten Nitroxids und unter der Berücksichtigung des neu entstandenen Extrempunktes, so erfolgt durch die Markierung im Stamm die Verschiebung des Maximums λ_1 zu höheren Wellenlängen. Die Intensität nimmt dabei im Vergleich zu Markierungen im Loop ab. Diese Aussage trifft hauptsächlich für TEMPA-markierte RNAs zu.

Tabelle 14: Wellenlänge und Intensität des Maximums λ_1 und Minimums λ_4

RNA	λ_1		λ_4	
	x [nm]	y [mdeg]	x [nm]	y[mdeg]
Loop unmod	265.5	17.83	214	-9.43
U(6)-U(11) mit 1	265	4.79	213	-4.84
U(7)-U(11) mit 1	267	16.68	214.5	-11.57
U(6) mit 2-U(11) mit 1	266	3.94	214	-4.44
U(7) mit 2-U(11) mit 1	261	7.42	213.5	-14.6
U(6) mit 1	263.5	13.56	214	-12.59
U(7) mit 1	265	18.18	213.5	-11.4
U(11) mit 1	266	19.24	214	-13.17
U(6) mit 2	263	19.26	213.5	-12.24
U(7) mit 2	264.5	21.99	213.5	-4.7
U(11) mit 2	267	8.01	214	-5.98

1=TPA = *; b= TEMPA = #

Die von B. Endeward in der Gruppe von Prof. T.F. Prisner gemessenen cw -Spektren zeigen einen deutlichen Unterschied zu den freien Nitroxiden. Eine Kopplung des Spin-Labels an ein größeres System mit Einschränkung der freien Drehbarkeit erkennt man an der Verbreiterung und der Intensitätsabnahme der drei ^{14}N -Signallinien.

Bei den Spektren der unterschiedlichen Spin-Label ist deutlich ein Unterschied zu beobachten. Dieser deutet sich durch die unterschiedliche Höhe in den einzelnen Signalen an. Zwei Erklärungen kommen dabei in Frage: erstens kann die Flexibilität der markierten Base von der Sekundärstruktur abhängen oder zweitens die Geometrie der paramagnetischen Sonden könnte eine entscheidende Rolle spielen.

Zuerst analysiert man die Spektren der beiden Nitroxide separat. Dabei wird deutlich, dass die einzelnen Basen-Nitroxid-Einheiten sich unterschiedlich verhalten bezüglich ihrer Flexibilität. Die Beweglichkeit bei TPA-markierten Basen scheint von Uracil(11) über U(6) bis zu U(7) zuzunehmen. Zur selben Einschätzung gelangt man auch bei TEMPA Modifikationen, wobei hier die U(11)-Mutante nicht als Referenz dient.

Die Signalbreite beim Spin-Label **1** ist höher als beim Spin-Label **2**, dies deutet auf eine stärkere Fixierung des Nitroxids **1** in der RNA hin. Der Grund dafür ist in der unterschiedlichen Raumerfüllung zu sehen. So passt sich das TPA-Spin-Label durch eine gewinkelte Geometrie besser an das System an als das starre und gerade Gerüst des TEMPA-Nitroxids (Kap.4.2.3). Aus den *cw*-Spektren kann aber keine genauere Information über die strukturelle Beeinflussung durch die benutzten Nitroxide gemacht werden.

4.4.4.2.4 Wie sieht ein PELDOR-Experiment bei einem Label an einer „flexiblen“ Base aus?^[96]

Bei einem PELDOR-Experiment einer „flexiblen“ Einheit, in diesem Fall einer glykosidischen Bindung, würde man beim Einfrieren der Probe die der Wahrscheinlichkeit nach günstigsten Abstände nebeneinander vorliegen haben. Bezogen auf die Uracil(7)-Base erwartet man in diesem Fall eine breite Verteilung ohne einen bestimmten Abstand, da die Base laut den NMR-Daten^[87a] frei drehbar ist. Im Vergleich dazu würde die Uracil(6)-Base einen definierten Abstand liefern, weil diese Base durch mehrere Wechselwirkungen stabilisiert wird.

Die Betrachtung der erhaltenen Spektren, entstanden in einer Kooperation mit Prof. T.F.Prisner, für TPA-markierte Loops widerspricht den Erwartungen und wirft somit neue Fragen auf.

Bei den beiden Mutanten wird eine Oszillation gemessen, welche für die U(7)-U(11)-Mutante nicht erwartet wurde. Der weitere Vergleich zeigt sogar ein deutlich besseres Verhältnis von Signal zu Rausch bei dieser als bei der vermeintlich fixierten Base Uracil(6). Auch die Oszillationstiefe weist diese Tendenz auf. Nach dem Tikhonov-Verfahren berechnete Abstände zeigen einen schmalen Hauptabstand. Die anderen Distanzen sind nur mit einer sehr kleinen Wahrscheinlichkeit existent und können vernachlässigt werden.

Als Referenz wurden mittels *PyMol* die jeweiligen Positionen in der NMR-Struktur von H.Schwalbe *et al.*^[87a] mit Spin-Labeln versehen und die Abstände (N-N) vermessen. Dabei

stimmt der gemodelte Abstand ($r = 18.2 \text{ \AA}$) U(6)-U(11) mit dem aus der Messung berechneten ($r = 18 \text{ \AA}$) überein. Die erhaltene Distanz zwischen den beiden TPA-Labeln entspricht auch den mit *Molecular Dynamic Simulation* erzielten Abständen (siehe Abbildung 83b, berechnet von L.Riccardi, Prof. G.Stock).

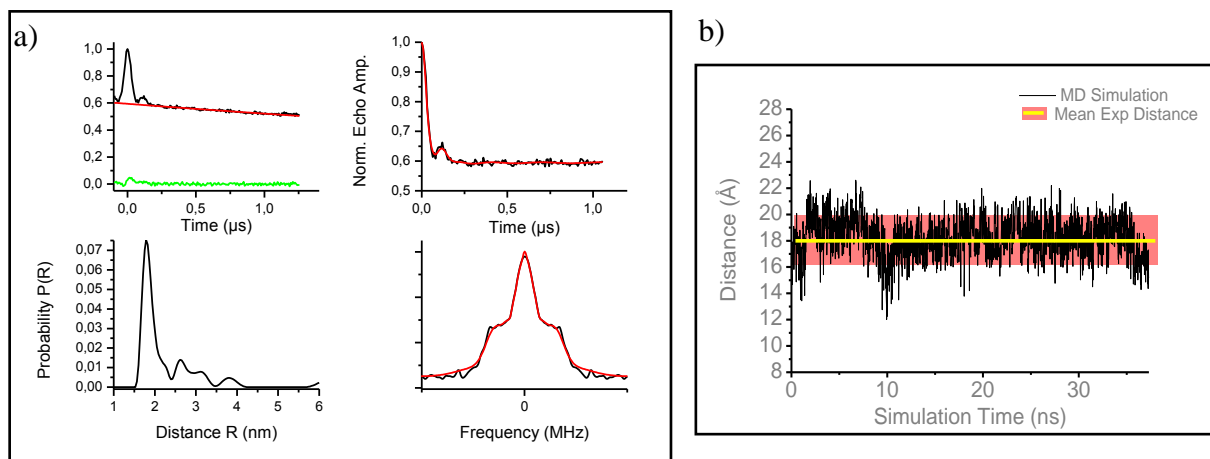


Abbildung 83: a) PELDOR-Messung von U(6)*-U(11)* (exp. time 18h Offset 53MHz Pump pulse 12ns) (B.Endeward); b) MD Simulation 20ps Schritten (Gruppe Prof. G.Stock)

Die Messung von U(7)-U(11) liefert einen Abstand von 20 \AA . Nach dem Modeling wurde ein Abstand von 14.6 \AA erwartet. Dieser liegt schon an der Grenze des mittels PELDOR-Experimentes messbaren, müsste aber im Vergleich dazu im *cw*-Experiment gesehen werden. Die gemessenen *cw*-EPR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen zeigen aber keinen kurzen Abstand an.

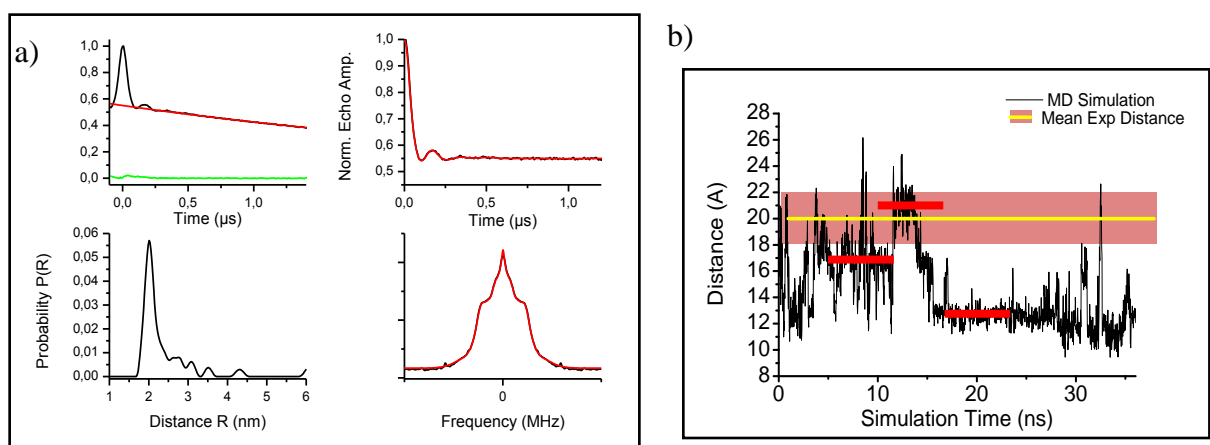


Abbildung 84: a) PELDOR-Messung von U(7)*-U(11)* (exp. time 14h Offset 60MHz Pump pulse 12ns) (B. Endeward); b) MD Simulation 20ps Schritten (Gruppe Prof. G.Stock)

In diesem Fall zeigt das erhaltene Spektrum von *Molecular Dynamic Simulation* ein sehr flexibles System, selbst auf der Zeitachse von 30ns. Des Weiteren lassen sich drei

verschiedene Abstände erkennen. Dabei handelt es sich um eine sehr kleine, dem Modelling mittels *PyMol* nahezu entsprechende, Distanz von 13Å. Ein Abstand von einem so kleinen Ausmaß führt zu einer großen Hyperfeinkopplung, welche die PELDOR-Messung stören würde, welche aber in der *continuous wave* EPR sichtbar gemacht werden kann. Das Vorliegen dieses Abstandes im gemessenen System konnte durch eine *cw*-Messung ausgeschlossen werden. Der zweite Abstand liegt außerhalb des Messbereiches von *cw*-EPR aber am Rand des PELDOR-Bereiches und kann somit nicht nachgewiesen aber auch nicht widerlegt werden. Als letztes bleibt die Distanz von 23Å, welche oberhalb der gemessenen liegt und auch die geringste Wahrscheinlichkeit aufweist. Auch die Platzierung des unpolaren Spin-Labels im polaren Medium spricht gegen diesen Abstand.

4.4.4.3 NMR-Messungen von U(7) TPA markiert

Um die räumliche Umgebung des Spin-Labels an der Position 7 bestimmen zu können, wurden verschiedene NMR-Experimente an der mit TPA markierten RNA durchgeführt, von S.Nozinovic aus der Gruppe von Prof. H.Schwalbe. Dabei konnte eindeutig bewiesen werden, dass das Nitroxid zwischen den beiden Phosphatrückgraten liegt. Dabei ist die räumliche Nähe zu den Basen C(6), C(5) und G(10) deutlich durch das Fehlen von Signalen erkennbar. Das Modell des Abstandes in die neueste literaturbekannte Struktur^[87b] ergibt eine vollständige Übereinstimmung mit dem gemessenen Abstand.

4.4.4.4 Zusammenfassung und Diskussion

Wir konnten mit diesem Konstrukt die ursprüngliche Frage nicht beantworten, haben aber gezeigt, dass durch die Einführung eines Nitroxids in die Loop-Region eine Charakterisierung des gesamten Systems möglich war. Als Quintessenz der durchgeführten Analytiken kann gesagt werden, dass eine Beeinflussung des Konstrukts durch die Einführung der paramagnetischen Sonden kaum hervorgerufen wird. Die in den CD-Spektren beobachtete Schulter und somit eine strukturelle Veränderung in der Loop-Region konnte nicht nachgewiesen werden.

Dabei ist kein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Nitroxiden in der Loop-Region auszumachen. Eine Modifikation im Stamm ist von der Geometrie des verwendeten Spin-Labels abhängig.

Zur Erklärung des für die U(7)-U(11)-markierte Mutante gemessenen Abstandes konnten die in der Gruppe von Prof. G.Stock gemachten MD-Simulationen nicht herangezogen werden,

da diese den kleinen Abstand als wahrscheinlichsten deklarieren. In der jüngsten Publikation von H.Schwalbe *et al.*^[87b] konnte eine weitere Verbesserung in der Auflösung der Loop-Struktur erzielt werden. Basierend auf dieser Struktur konnte der gemessene Abstand von 20Å gefunden werden. Diese beiden Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass das gemodelte System nicht mit dem gemessenen übereinstimmt.

Bei einer genaueren Betrachtung der gemodelten Struktur ergibt sich die Möglichkeit von verschiedenen Wechselwirkungen zwischen dem Phosphatrückgrat und dem Spin-Label. Diese räumliche Nähe des Nitroxids zu Phosphat-Resten gepaart mit den stabilisierenden Wechselwirkungen kann eine mögliche Erklärung für den exakten Abstand in der PELDOR-Messung sein.

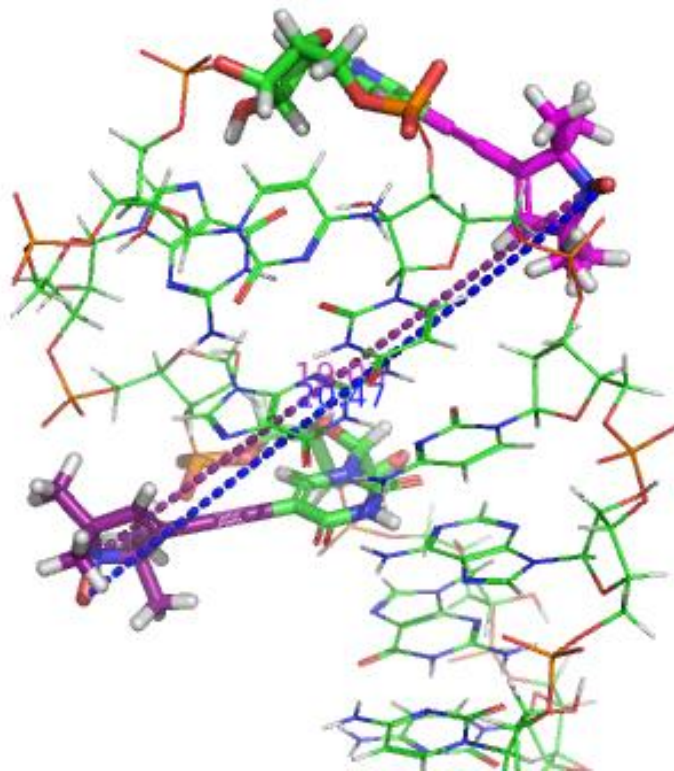


Abbildung 85: Mit *PyMol* gemodelte Abstände; lila N-N-Abstand und blau der O-O-Abstand^[87b]

Fazit: Mittels EPR-Messungen ist es gelungen die vorliegenden NMR-Strukturen auf ihre Gültigkeit zu untersuchen und zu beweisen.

Generell kann aber gesagt werden, dass die Einführung des TPA-Spin-Labels das gesamte System wenig beeinflusst. Somit ist für die Anwendung an biologischen Systemen die Benutzung des etablierten Fünfring-Radikals zu empfehlen.

4.4.5 Diels-Alderase

Die RNA fungiert in biologischen Systemen zuweilen auch als ein Katalysator (z.B. RNase P und Ribosom), wobei in allen Fällen die Abhängigkeit zwischen der gefalteten Struktur der RNA und ihrer Funktion von großer Bedeutung ist. Doch nicht nur biologische Vorgänge sondern auch chemische Reaktionen gehören zu den Anwendungsgebieten für katalytische RNAs. Das in einer Kooperation mit Prof. O.Schiemann und Prof. A.Jäschke untersuchte RNA Fragment wurde mittels einer *in vitro* Selektion von katalytisch aktiven RNAs aus einer Oligonukleotiden-Bibliothek isoliert^[97a]. Diese Diels-Alderase katalysiert die Diels-Alder-Reaktionen, eine Kohlenstoff-Kohlenstoff Verknüpfungsreaktion zweier nicht biologischer Konstrukte. Hierbei fungiert 9-Hydroxy-methyl-anthracen als Dien und *N*-pentyl-maleimid als Dienophil (siehe Abbildung 86). Die Stereospezifität der gebildeten Zentren wird hierbei von der 3-dimensionalen RNA-Struktur beeinflusst.

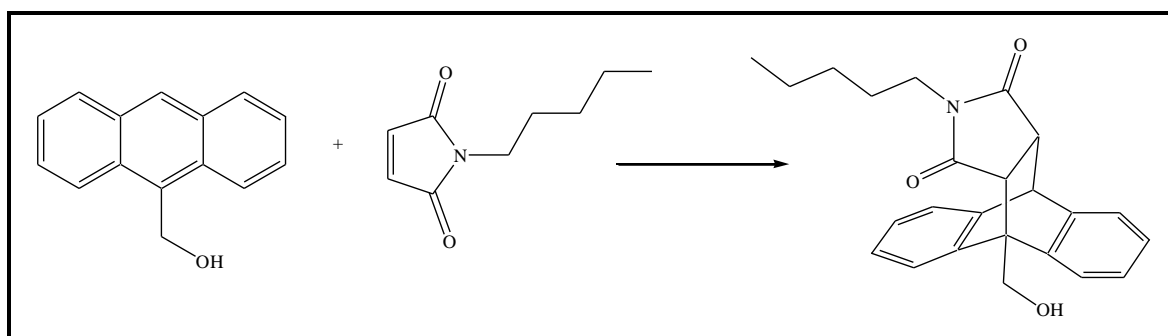


Abbildung 86: Die katalysierte Diels-Alder-Reaktion

Für die Katalyse dieser Reaktion ist schon ein Fragment von 49 Basen, welches nur einen Teil der biologisch aktiven RNase darstellt, ausreichend. Die Kristallstruktur dieses Fragmentes wurde von A.Serganov und seinen Mitarbeitern 2005^[98] vollständig aufgeklärt und publiziert. Hierbei zeigt sich eine Pseudoknoten-Architektur und ein λ -förmiger Aufbau.

Sowohl die Kristallstruktur von A.Serganov wie auch die Arbeiten von A.Jäschke und seinen Mitarbeitern zeigen eine Notwendigkeit von Magnesium für die Ausbildung der katalytisch aktiven 3-dimensionalen Struktur. Die Arbeit von A.Jäschke^[97b] bezog sich in erster Linie auf die katalytische Funktion der Diels-Alderase. Dabei ist es ihm und seiner Gruppe (2007) gelungen die verschiedenen Intermediate in Abhängigkeit zur Magnesiumkonzentration mittels FRET-Spektroskopie zu charakterisieren.

In einem weiteren Experiment gelang die Bestimmung der Bindungsstellen für Magnesium. Dieses Experiment wurde in einer Kooperation mit O.Schiemann (2007)^[99] und unter Benutzung der *cw*-EPR-Spektroskopie durchgeführt. Hierbei wurde statt des paramagnetisch

inaktiven Magnesiums sein paramagnetisches Analogon, Mangan(II), verwendet. Spektroskopisch konnte so nachgewiesen werden, dass ein RNA-Strang fünf Mangan-Ionen bzw. Magnesium-Ionen bis zur Ausbildung der katalytisch aktiven Struktur binden kann.

Das Ziel unseres Projektes war die strukturelle Veränderung eines Intermediats zum nächsten abhängig von der Magnesium(II)-Konzentration mittels einer zweifach gelabelten (mit TPA Spin-Label) RNA nachzuweisen. Die veränderte Struktur ist in Abbildung 87 b) zu sehen.

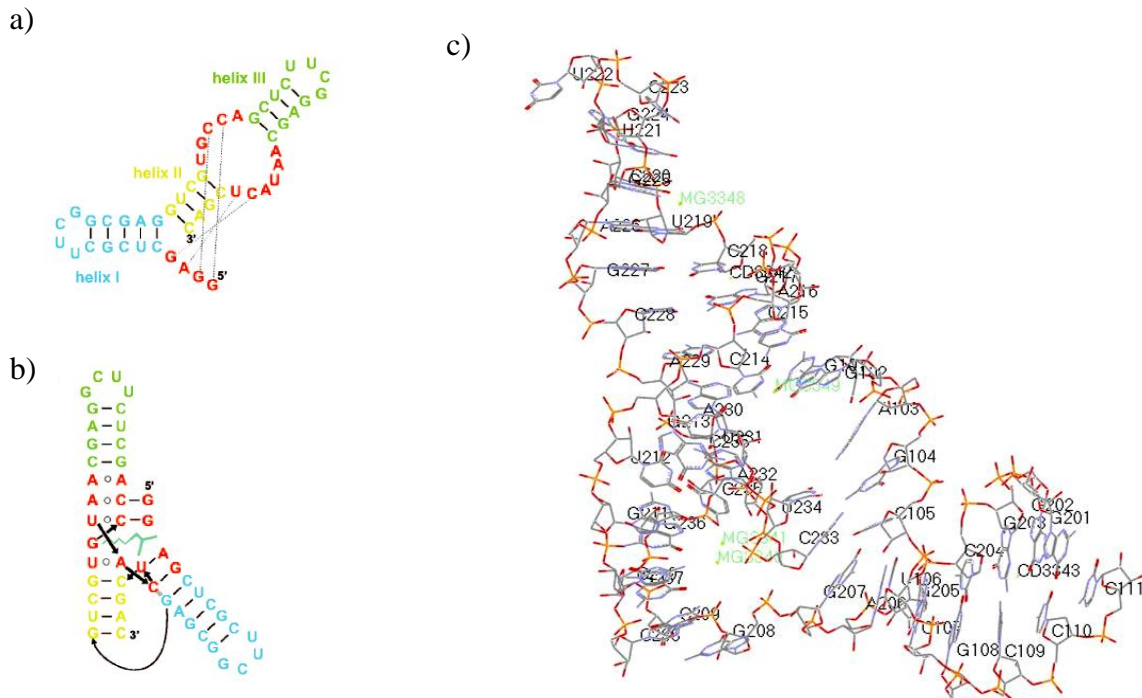


Abbildung 87: a) Sekundärstruktur des 49mer Diels-Alderase Ribozyms^[97b]; b) Tertiärstruktur erhalten aus der Kristallstruktur^[97b]; c) drei-dimensionale Struktur^[98]

4.4.5.1 Synthese

Es wurde auf Grund der Molekülgröße nur ein Strang synthetisiert, um die Zugänglichkeit des doppel-markierten Stranges, die biologische Verträglichkeit der Spin-Label und die Eignung des gewählten Systems für die Fragestellung zu testen. Die Synthese erfolgte dabei wie beschrieben in einem 0,2µmol-Maßstab. Der vollständig synthetisierte Strang wurde mittels einer dreimal wiederholten postsynthetischen Sonogashira-Kreuz-Kupplung auf der Festphase mit dem Spin-Label TPA 1 modifiziert. Das Spin-Label wurde an den Positionen C(20) und U(30) eingeführt.

Die Aufreinigung mittels Anionen Exchange HPLC konnte in diesem Fall auf Grund der stabilen dreidimensionalen Struktur des Konstrukts und einer zu hohen Schmelztemperatur nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die dabei erhaltenen Fraktionen A, B, B* und C

wurden mittels Gel-Elektrophorese analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Fraktionen B, B* und C jeweils eine 49mere RNA enthalten. Daraufhin wurde eine Gel-basierte Aufreinigung dieser Proben durchgeführt. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass die Trennung von markierter, nicht markierter (iodierter) und reduzierter RNA nicht möglich ist. Mit einem Gel konnten erfolgreich die 49mere von den kürzeren RNA-Fragmenten isoliert werden. Die Ausbeute sank bei dieser Methode von anfänglichen 84.0OD₂₆₀ auf 5.0OD₂₆₀ nach der Gelelektrophorese.

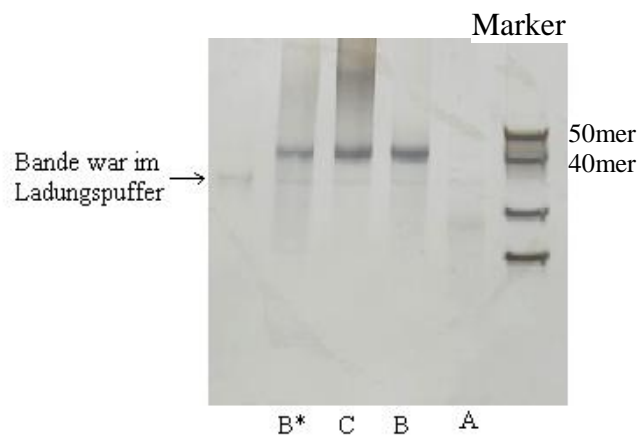


Abbildung 88: Analytisches Gel

4.4.5.2 Analytik

Auf Grund der Oligomerlänge und der hohen Affinität zu Kationen konnte keine Masse detektiert werden. Als Nachweis wurde ein Gel angefertigt. Die katalytische Aktivität der hergestellten Mutante wurde getestet und quantifiziert von A.Nierth aus der Gruppe von Prof. Dr. A.Jäschke in Heidelberg.

Vor der Aktivitätstestung wurde in der Gruppe von Prof. A.Jäschke eine kleine Menge (100pmol) markierter RNA mittels HPLC charakterisiert. Dabei wurde eine RP-18ec Phenomenex-Säule, eine Temperatur von 25°C und die folgende Gradient-Zusammensetzung verwendet: 10-60% Puffer B (0.1M Et₃NHOAc, pH= 7.4) gegen Acetonitril in 50min. Die erhaltenen Spektren zeigen einen sehr breiten Peak zwischen 20 und 30 Minuten. Das Absorptionsspektrum dieser Fraktion liefert zwei Maxima, eines bei 230nm und eines bei ca. 280nm. Das erste Signal entspringt dem UV-Signal eines TPA-Spin-Labels und das zweite konnte mittels Vergleich mit dem Wildtyp der gewünschten RNA zugeordnet werden.

Um die Temperaturabhängigkeit der analysierten Probe zu testen, wurde die HPLC-Messung bei 50 °C Säulentemperatur wiederholt, führte aber zum gleichen Chromatogramm.

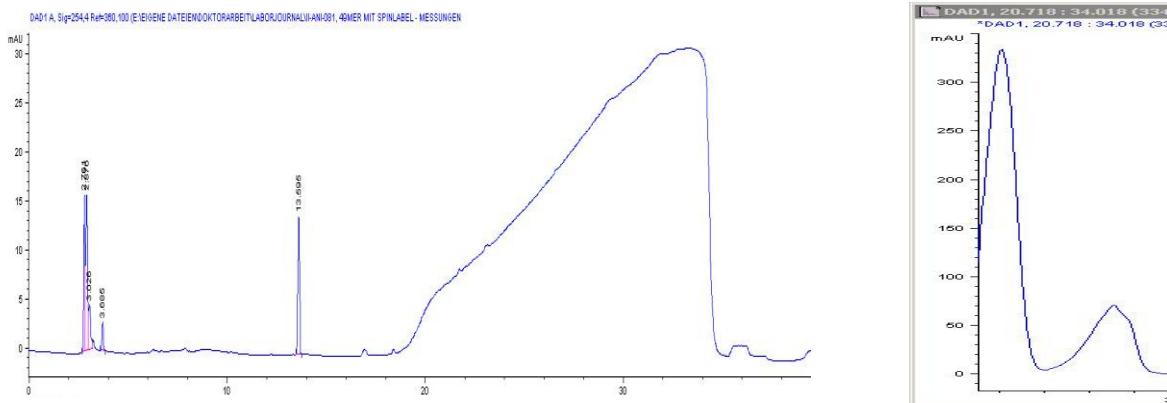


Abbildung 89: HPLC-Spektrum und das Absorptionsspektrum der Fraktion von 20-30min. (A.Nierth)

Zur Messung der katalytischen Aktivität der DIELS-ALDERase mit zwei Spin-Markierungen C₂₀-U₃₀ wurde ein in der Gruppe von Prof. A.Jäschke entwickelter UV-Assay verwendet.

Alle Lösungen wurden frisch angesetzt. Die Konzentration von Anthracen-hexa-ethylenglykol (AHEG) wurde durch Messung der UV-Absorption bei 365nm und im Vergleich mit einer Kalibriergeraden bestimmt.

$$\text{Konzentration } [\mu\text{M}] \equiv \frac{\text{Abs}_{365\text{nm}} + 0.0041}{0.00722} \quad \text{Gleichung 10}$$

Zum Ansetzen der RNA-katalysierten Diels-Alder-Reaktion wurde das Pipettier-Schema in Tabelle 15 angewendet. Zur korrekten Faltung wurde die RNA zuvor für 2min. auf 75°C erhitzt und anschließend im Thermoschüttler innerhalb von 20min. kontrolliert auf Raumtemperatur gebracht. Für jede Messung wurden 70pmol RNA verwendet.

Die Kinetiken wurden in 10µl Küvetten durchgeführt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von *N*-Pentylmaleimid (NPM).

In Abbildung 90 sind drei Kinetiken von Spin-markierter RNA (C₂₀-U₃₀) dargestellt. Dabei handelt es sich um drei unterschiedliche Reinheitsgrade derselben RNA. Zum Vergleich wurden die Hintergrundreaktion (ohne RNA) und eine Referenz (49mer Standardmotiv) gemessen. Alle Messkurven wurden auf eine Absorption von 1.0 normiert.

Tabelle 15: Pipettier-Schema für das UV-Assay

	Background [μL]	Referenz 49mer [μL]	Markierte RNA [μL]	Final
H ₂ O	4.66	3.89	-	-
Diels-Alder Puffer (5x)	2.0	2.0	2.0	1x
RNA	-	0.77	4.66	7 μM , 70pmol
AHEG (468 μM in H ₂ O)	2.14	2.14	2.14	0.1mM, 1nmol
EtOH	1.0	1.0	1.0	0.1
NPM (25mM in abs. DMSO)	0.2	0.2	0.2	0.5mM, 5nmol
Σ	10	10	10	

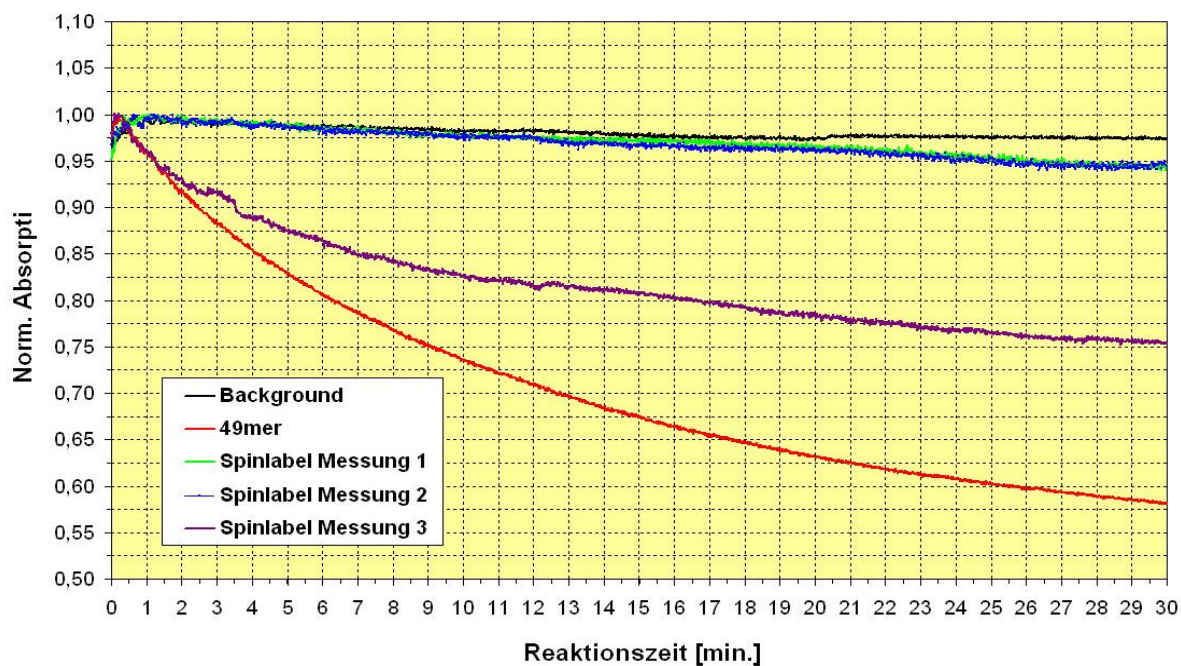


Abbildung 90: Aktivitätstest von Spin-markierter RNA durch die zeitabhängige Messung der UV-Absorption von Anthracen bei 365nm mit freien Reaktanden (Trans) (A.Nierth)

Verglichen werden die Hintergrundreaktion ohne RNA mit dem Standardmotiv (49mer) und drei Messungen mit Spin-markierter RNA C20-U30. Während zwei Messkurven keinen signifikanten Unterschied zur unkatalysierten Reaktion aufweisen, ist in der dritten Messung eine eindeutige Reaktionsbeschleunigung zu erkennen. Allerdings ist die Abnahme deutlich langsamer als mit unmarkierter RNA.

Die Aktivitätstests zeigen für die ersten zwei Spin-Label-markierten RNAs keine Aktivität. Dies lässt auf einen nur geringen Anteil an RNA in diesen Proben schließen, wodurch der Anteil an Verunreinigung jeglicher Art hoch sein muss.

Für die genauere Charakterisierung der Aktivität der dritten Probe müsste eine neue Synthese mit einer optimierten Aufreinigung erfolgen. Denn die Herabsetzung der Aktivität bei der durchgeführten Messung kann von den eingeführten Nitroxiden aber auch von den Verunreinigungen herrühren, welche in dem erzielten HPLC-Spektrum deutlich erkennbar sind.

4.4.5.3 PELDOR

In einer Kooperation mit Prof. O.Schiemann und Prof. T.F.Prisner erfolgten die PELDOR-Messung bei einer RNA-Konzentration von 100 μ M in 80 μ L Puffer (Tris-Cl (0.1M), NaCl (0.3M); pH =7.3). Nach jeder Messung wurde nach dem Auftauen der Probenlösung jeweils ein Äquivalent Magnesium(II)chlorid (gelöst) injiziert und die Probe erneut vermessen. Der an Hand der Kristallstruktur gemodelte Abstand für die vollständig gefaltete RNA mit fünf Magnesium-Ionen beträgt 3.1nm. Die Messungen stimmen vollständig damit überein.

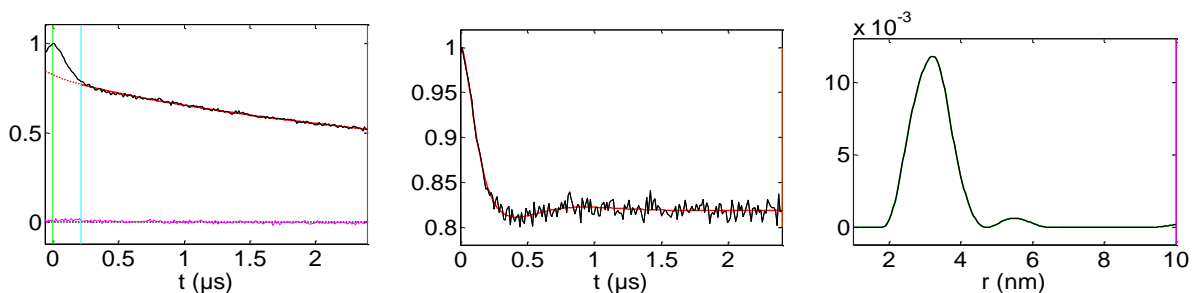


Abbildung 91: 0eq. Mg(II); repräsentativ für alle verschiedenen Mg(II)-Konzentrationen

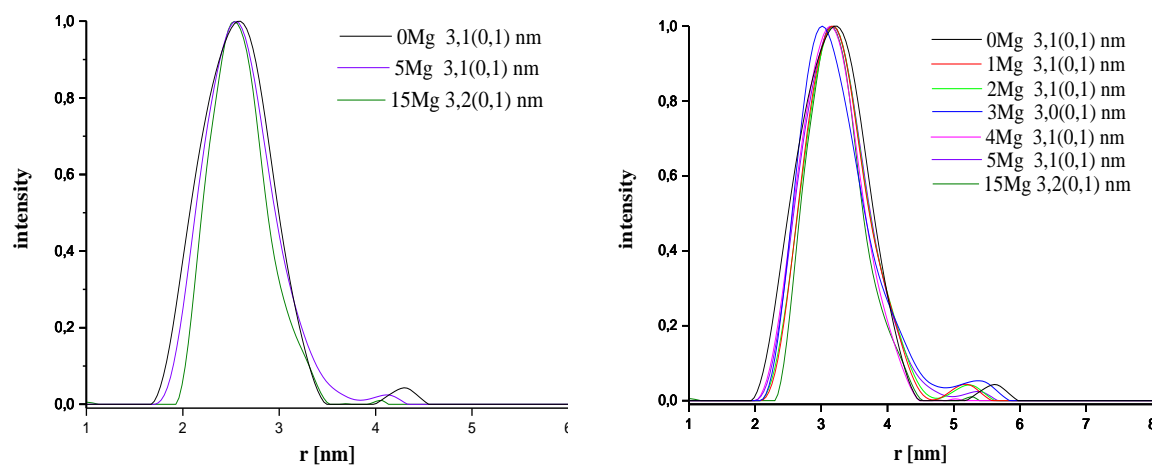


Abbildung 92: Messungen bei verschiedenen Magnesium(II)-Konzentrationen (O.Schiemann)

4.4.5.4 Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen dieses Projektes konnte eine biologisch aktive RNA synthetisiert, doppelt markiert und aufgereinigt werden. Das zu untersuchende Konstrukt scheint aber sehr stabil (hoher Schmelzpunkt) und die aktive Form schon bei Raumtemperatur vorgebildet zu sein. Dies erklärt die Problematik der Aufreinigung und die resultierenden PELDOR-Messungen. Die dabei beobachtete Verschmälerung der Abstandsverteilungskurve spricht gegebenenfalls für eine zusätzliche Stabilisierung der vorhandenen Struktur durch Zugabe von Magnesium(II) und nicht für eine strukturelle Veränderung.

Die Länge des Fragments stellt die Grenze der mittels Festphasen-Synthese synthetisierbaren RNAs dar, was die Notwendigkeit einer anderen Herangehensweise fordert. Hierbei ist die Möglichkeit der Ligation in Betracht zu ziehen. Die durch diese Methode synthetisierte RNA wird aus zwei kürzeren Fragmenten hergestellt. Diese werden unabhängig voneinander im Vorfeld mittels HPLC gereinigt, was die Abtrennung der nicht gekoppelten und der reduzierten RNA ermöglicht.

Fazit: Basierend auf diesen Daten und der Problematik in der Aufreinigung wurde dieses Projekt nicht weiter verfolgt.

4.4.6 Neomycin-B bindendes Aptamer

Das untersuchte Aptamerkonstrukt wurde 2008 von J.Weigand *et al.*^[100] mittels eines *in vitro* Selektion und *in vivo* Screenings gefunden und besitzt eine hohe Bindungsaffinität bezüglich Neomycin-B. Die Bindung eines Aminoglykosids ruft eine Konformationsänderung hervor. Aptamere sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, welche mit sehr hoher Affinität und Spezifität kleine Moleküle, Proteine und Viruspartikel binden. Das *in vivo* Analogon zu den Aptameren wird als Riboswitch bezeichnet. Die Riboswitches sind *cis*-aktive RNA-Regulationselemente, welche die Genexpression in Zellen mittels Erkennung und Bindung von kleinen Molekülen regulieren. Diese RNA-Konstrukte kommen hauptsächlich in der 5'-Region der nicht-translatierten mRNA vor und fungieren gleichzeitig als Erkennungs- wie auch Steuerungseinheit. Die Riboswitches weisen normalerweise nur entweder zu einer Verbindungsklasse oder zu den einzelnen Molekülen eine hohe Spezifität und Affinität auf. Des Weiteren werden Riboswitches in zwei Klassen unterteilt, die erste zeigt schon vor der Bindung eine Präorganisation der Bindungstasche. Der zweite Typ besitzt eine nicht gebundene Form und erst bei Erkennung des Regulatormoleküls erfolgt eine drastische konformative und räumliche Veränderung.

Neomycin-B, entdeckt von S.Waksman vor über 50 Jahren^[101], gehört der Klasse der Aminoglykoside an und besteht aus vier Ringen, wobei der Ring III eine Furanose darstellt^[100]. Es hat eine antibakterielle Wirkung bei gramnegativen Bakterien, bei pH =7 liegt Neomycin-B in kationischer Form vor. Neomycin-B ist ein wichtiges Antibiotikum^[97], welches die ribosomale Proteinsynthese durch Bindung an die RNA hemmt. Die medizinische Verabreichung erfolgt lokal. Als Regulatormolekül wird Neomycin-B von vielen RNA-Motiven selektiv erkannt, wie 16S rRNA, Rev Response-Element, Hammerhead Ribozym, Gruppe I Introns und TAR-RNA-Motiv. Dabei erfolgt die Wechselwirkung zwischen der Loop- und Stammstruktur.

Bei allen diesen RNA-Motiven besteht keine primäre Übereinstimmung in den bindenden Sequenzen^[102]. Die Ringe I und II sind essenziell für die Bindung. Dabei beruht die Bindung auf elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken, die Wasserstoffbrücken tragen den entscheidenden Teil zur Erkennung bei. Verschiedene Studien haben die Notwendigkeit der Aminogruppe am Ring I (Vergleich mit Paromomycin in Abbildung 94b, OH-Gruppe statt NH₂-Gruppe am Ring I: nur 1:100 der Aktivität)^[103] bewiesen. Die Wechselwirkung bildet sich vermutlich zwischen dem Phosphatrückgrat des Oligomers oder

Basen/Zucker-Heteroatomen und den Hydroxy- und den Aminogruppen des Aminoglykosids aus.

Im Rahmen dieses Projektes (Zusammenarbeit mit Gruppe Prof. B.Süß, Prof. T.F.Prisner und Prof. J.Wöhnert) sollte die strukturelle Veränderung bei der Zugabe von Neomycin-B in einem PELDOR-Experiment gezeigt werden. Dafür wurden verschiedene Doppelmutanten synthetisiert und charakterisiert. Zur Überprüfung der Basenflexibilität wurden des Weiteren auch Monomutanten für die Raumtemperatur-*cw*-EPR-Messungen hergestellt.

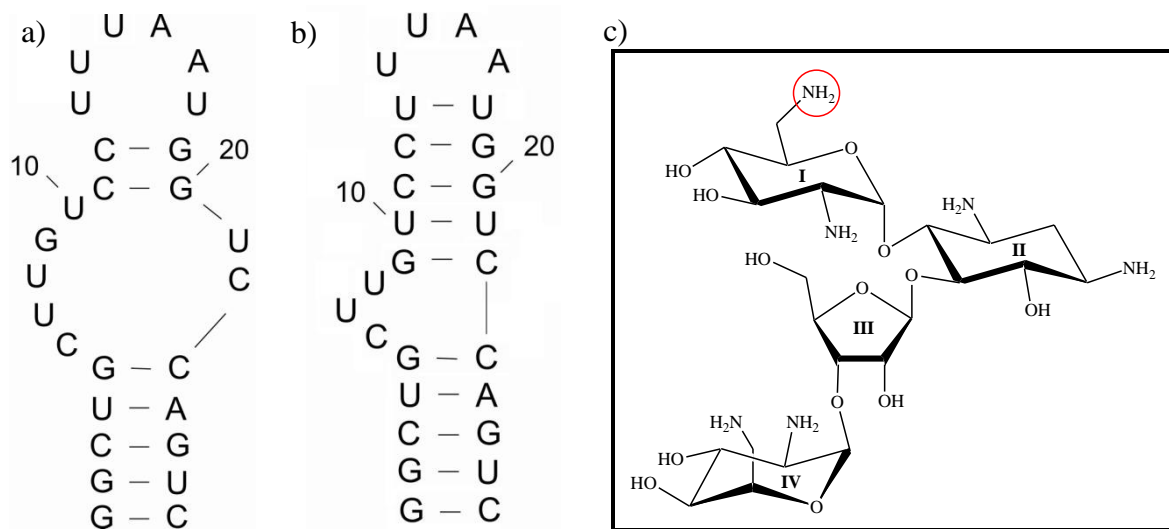


Abbildung 93: a) Freie; b) gebundene Sekundärstruktur des Aptamers; c) Neomycin-B^[100]

4.4.6.1 Synthese

Es wurden 27mere, die der Länge und Sequenz dem Wildtyp entsprechen und einige 31mere mit verlängertem Stamm synthetisiert (siehe Tabelle 16). Die 31mere stellen einen Versuch dar die Stabilität des U26 zu erhöhen, um nur die Beweglichkeit der Uracil-Basen unabhängig zur Helix-Öffnung beobachten zu können. Im Vergleich mit den 27meren konnte kein Unterschied gesehen werden. Alle Mutanten, sowohl die 27mere wie auch die 31mere, wurden am Stück synthetisiert und unter Verwendung der Sonogashira-Kreuz-Kupplung mit TPA (**1**) versehen.

Dabei erfolgte die Kupplung bei Monomarkierung wie in Kap.2.3.3 beschrieben. Bei der Markierung der Doppelmutanten wurden die Reagenzien um den Faktor 1.5 erhöht. Der Maßstab betrug bei den Mutanten für die EPR-Messungen 0.2µmol und für die NMR 1.0µmol.

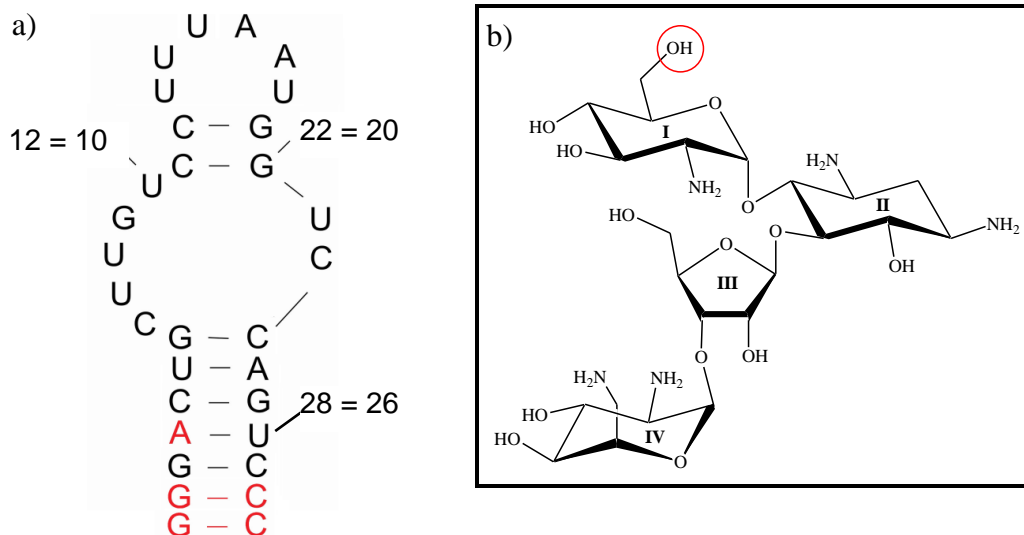


Abbildung 94: a) Sequenz des 31mers; b) Struktur von Paromomycin

4.4.6.1 Aufreinigung

Bei den 27mer-Mutanten konnte die Aufreinigung wie gewohnt mittels Anionen Exchange HPLC durchgeführt werden, da der Schmelzpunkt der RNAs unterhalb von 50°C liegt. Dabei erfolgte die HPLC-Trennung bei einer Temperatur von 65°C. Beim Arbeiten im 1.0µmol-Maßstab ist die Teilung der Probe notwendig, andernfalls erfolgt die Überladung der Säule, was eine Trennung unmöglich macht. In den meisten Fällen reichte ein Durchgang aus um die Mutante EPR-rein zu erhalten, bei Proben für die NMR erfolgte eine zweite Aufreinigung mit demselben Anionen Exchange HPLC-System.

4.4.6.2 Analytik

Vor der Durchführung der strukturellen Messungen wurden die Massen mittels hochauflösender Massenspektroskopie (ESI (-)) bestimmt. Die erhaltenen Massen sind in der Tabelle 16 aufgelistet. Dabei konnte für eine Mutante (U10-U21(k)) auf Grund der hohen Stabilität der Sekundärstruktur und daraus resultierender schlechter Entsalzung keine Masse bestimmt werden.

Zur Vermeidung der Zweifach-Komplexe und um die richtige Hybridisierung zu gewährleisten, wurden alle Stränge nach der vollständigen Entschützung in einem Milliliter sterilem Wasser gelöst und fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Verdünnung der erhitzten Probe in auf Eis gelagertem, sterilem Wasser. Das Volumen wird dabei auf 10mL erhöht. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wird die Lösung in einem VIVASPIN Konzentrador der Firma Sartorius Stedium Biotech (Deutschland) (von 11mL, bei 12°C und 6000rpm) auf ein Volumen von ca. 200µL aufkonzentriert. Für die EPR-Probenvorbereitung kann diese RNA-Lösung bereits zu diesem Zeitpunkt verwendet werden.

Bei NMR-Proben erfolgt anschließend noch eine Umpufferung in den NMR-Puffer (50mM KCl, 25mM K-Phosphat, pH= 6.4).

Alle folgenden Messungen erfolgten im NMR-Puffer, um die möglichen Effekte der Salze zu vermeiden.

Tabelle 16: Synthetisierte Neomycin-B-Aptamere

RNA	Sequenz	Masse ber.	Masse gefund.
unmod	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UUU-AAU-GGU-CCA-GUC-3'	8541.1	8540.0
U15-U26	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UUU*-AAU-GGU-CCA-GU*C-3'	8865.5	8864.8
U26	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UUU-AAU-GGU-CCA-GU*C-3'	8703.3	8702.2
U4-U15	5'-GGC-U*GC-UUG-UCC-UUU*-AAU-GGU-CCA-GUC-3'	8865.5	8865.0
U14	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UU*U-AAU-GGU-CCA-GUC-3'	8703.3	8702.9
U14-U26	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UU*U-AAU-GGU-CCA-GU*C-3'	8865.5	8854.1
U4	5'-GGC-U*GC-UUG-UCC-UUU-AAU-GGU-CCA-GUC-3'	8703.3	8701.8
U10-U21	5'-GGC-UGC-UUG-U*CC-UUU-AAU-GGU*-CCA-GUC-3'	8865.5	8865.0
U10-U21(k)	5'-GGC-UGG-U*CC-UUU-AAU-GGU*-CCA-GUC-3'	7947.0	-
U4-U14	5'-GGC-U*GC-UUG-UCC-UU*U-AAU-GGU-CCA-GUC-3'	8865.5	8864.5
U7-U14	5'-GGC-UGC-U*UG-UCC-UU*U-AAU-GGU-CCA-GUC-3'	8865.5	8865.0
unmod-31mer	5'-GGG-ACU-GCU-UGU-CCU-UUA-AUG-GUC-CAG-UCC-C-3'	9825.2	9824.4
U17 (=U15)	5'-GGG-ACU-GCU-UGU-CCU-UU*A-AUG-GUC-CAG-UCC-C-3'	9987.1	9987.0
U28 (=U26)	5'-GGG-ACU-GCU-UGU-CCU-UUA-AUG-GUC-CAG-U*CC-C-3'	9987.1	9987.0
U17-U28	5'-GGG-ACU-GCU-UGU-CCU-UU*A-AUG-GUC-CAG-U*CC-C-3'	10149.3	10150.7
U9 (=U7)	5'-GGG-ACU-GCU-U*GU-CCU-UUA-AUG-GUC-CAG-UCC-C-3'	9987.1	9987.0

U*: mit TPA markiertes Uracil

Die gemessenen CD-Spektren besitzen eine Konzentration von 4mM und zeigen alle eine A-Helix-Form und eine Verschiebung des Maximums λ_1 bei ca. 260nm. Bei den Mutanten U17, U28, U9 und U17-U28 handelt es sich um 31mere, alle anderen entsprechen dem Wildtyp und sind 27mere.

Bei den Monomeren (siehe Abbildung 95 a) besitzen alle Mutanten eine größere Elliptizitätsintensität als der Wildtyp. Dabei weisen die 31mere auf Grund ihrer höheren Anzahl an Basenpaarungen eine höhere Intensität als die 27mere auf. Des Weiteren zeichnet sich eine Tendenz in der Verschiebung in Abhängigkeit zur Position ab. Bei allen außer bei U9 (=U7) ist eine stärkere Verschiebung zu beobachten. Dabei gibt es keinen Unterschied zwischen den 27- und den 31-meren.

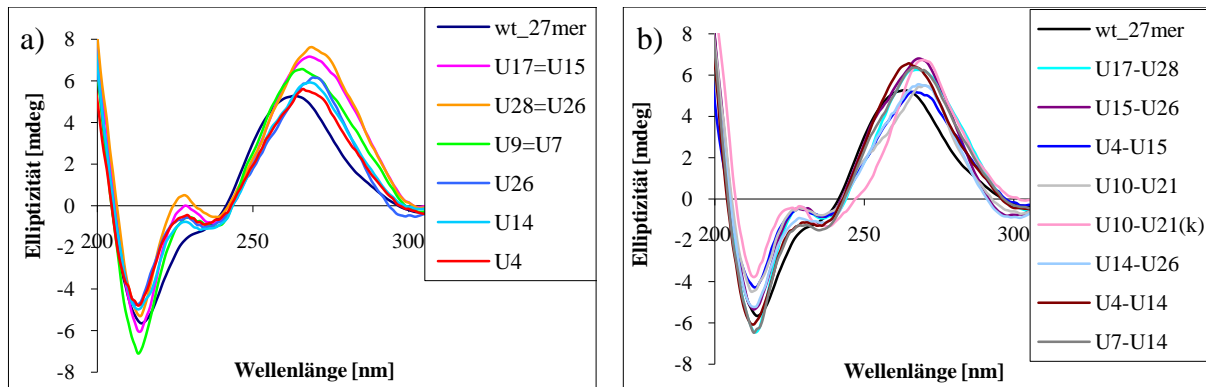


Abbildung 95: CD-Spektren a) der Monomutanten; b) der Doppelmutanten

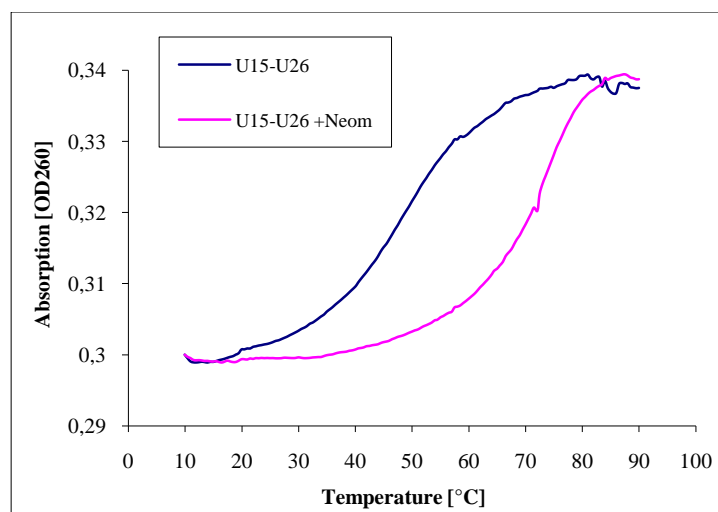


Abbildung 96: Schmelzpunktverschiebung durch Zugabe von 1eq Neomycin-B

Die Schmelzkurven wurden bei einer Konzentration von 1mM und im Bereich von 10 bis 95°C, bei einer Heizgeschwindigkeit von 0.5°C/min und alle 0.5°C gemessen. Dieselben Proben wurden nach Beendigung der zwei Heiz-Kühl-Zyklen mit einem Äquivalent Neomycin-B versetzt und anschließend nochmal gemessen. Bei allen 27mer-Mutanten konnte eine Verschiebung der Schmelzpunkte um mehr als 15°C beobachtet werden. In der Abbildung 96 sind die beiden Schmelzkurven der Doppelmutante U15-U26 mit und ohne

Neomycin-B dargestellt. Die genaueren Schmelzpunktunterschiede sind in der unteren Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Vergleich der gemessenen Schmelzpunkte

RNA	T_m [°C]	ΔT_{m1} [°C]	T_m mit Neom. [°C]	ΔT_{m2} [°C]
unmod	49.3±0.1	0	71.8±0.5	22.5
U15-U26	48.9±0.2	-0.4	70.0±0.3	21.1
U26	49.3±0.4	0	68.8±0.3	19.5
U4-U15	47.0±0.3	-2.3	64.0±0.6	17.0
U14	49.6±0.2	+0.3	65.3±0.4	15.7
U14-U26	48.0±0.1	-1.3	71.2±0.2	23.2
U4	47.2±0.6	-2.1	64.2±0.7	17.0
U10-U21	42.9±0.4	-6.4	58.8±0.6	15.9
U10-U21(k)	>70°C	-	-	-
U4-U14	48.1±0.1	-1.2	71.7±0.7	23.6
U7-U14	49.6±0.2	+0.3	74.6±0.9	25
unmod-31mer	68.0±0.4	0	87.6±0.4	19.6
U17(=U15)	70.6±0.4	+2.6	79.0	8.4
U28 (=U26)	70.6±0.5	+2.6	75.0	4.4
U17-U28	68.6±0.5	+0.6	82.5	13.9
U9 (=U7)	66.1±0.1	-1.9	85.5	19.4

$\Delta T_{m1} = T_m(\text{Mutante}) - T_m(\text{unmod})$; $\Delta T_{m2} = T_m(\text{mit Neomycin-B}) - T_m$;

kursiv: genauere Werte konnten auf Grund des fehlenden zweiten Hyperchromizität-Plateaus nicht ermittelt werden

Bei einer genaueren Analyse der verschiedenen Schmelzpunkte zeigen sich zwei Besonderheiten. Erstens bringt eine Modifikation in der Position 26 (das G-U-Basenpaar im Stamm) kaum bzw. keine Veränderung im Schmelzpunkt. Dies könnte darauf beruhen, dass dies kein Watson-Crick-Basenpaar sondern ein Wooble-Basenpaar ist. Eine Einführung an dieser Position beeinträchtigt die Struktur geringer als bei einer normalen Basenpaarung.

Des Weiteren ist die Markierung in der Position 14 auffällig. Hierbei erfolgt sogar eine geringere Stabilisierung im Vergleich zum Wildtyp. Die Uracil-Base 14 befindet sich im Loop und scheint keine stabilisierenden oder destabilisierenden Effekte auf die Struktur auszuüben. Dieser Effekt wird selbst in der Doppelmutante U7-U14 beibehalten. Der Einfluss der Markierung in Position 7 scheint ebenfalls keinen Effekt auf den Schmelzpunkt zu haben. Die zweite Doppelmutante U4-U14 zeigt bei der Einbeziehung der Monomutanten das gleiche Ergebnis für U14.

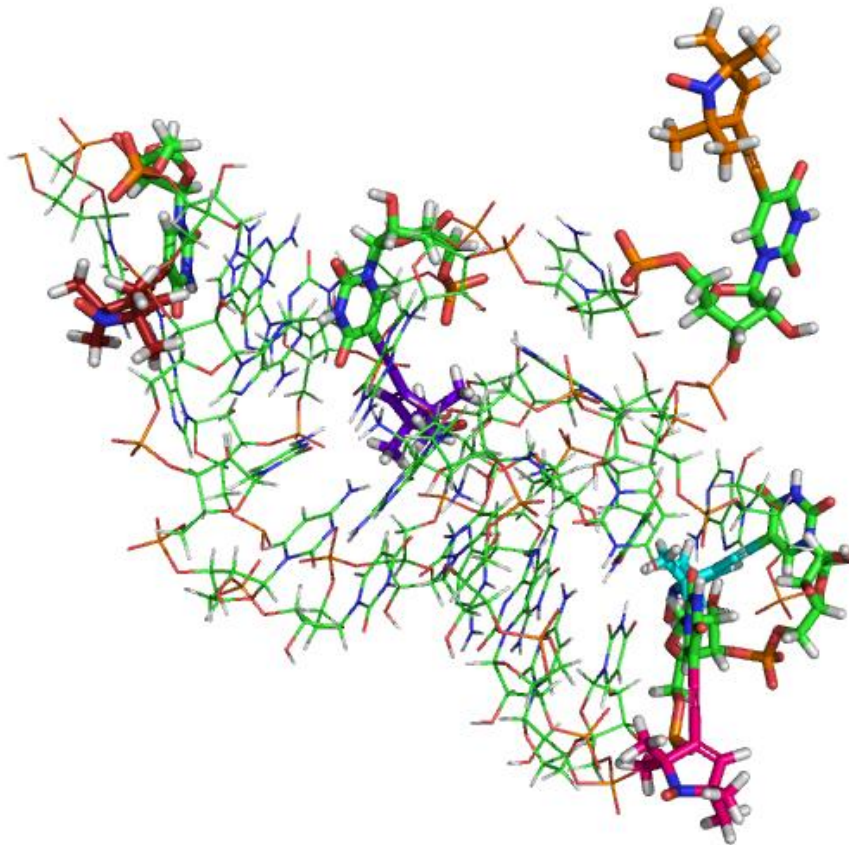


Abbildung 97: Darstellung der gelabelten Positionen in der gebundenen Konformation (erstellt mit PyMol)

Der Unterschied zwischen dem Schmelzpunkt ohne und mit Neomycin-B kann als ein Indiz für die hinderliche Wechselwirkung des eingebauten Spin-Labels bei der Bindung von Neomycin-B bzw. der Ausbildung der gebundenen Struktur gesehen werden. Hierbei fällt auf, dass die Doppelmodifikation der RNA zur stärkeren Erhöhung der Schmelztemperatur nach der Neomycin-B Zugabe führt. Die einzige Ausnahme bildet die Mutante U4-U15, was an der räumlichen Nähe der beiden Uracil-Basen (Spin-Label) zum gebundenen Aminoglykosid liegen kann. Bei Betrachtung der NMR-Daten von J.Wöhnert *et al.*^[104] wird die sterische Hinderung der beiden eingebauten Nitroxide im Bezug zum RNA-Rückgrat deutlich.

4.4.6.3 PELDOR- und *cw*-EPR-Messungen^[105]

Die Proben für PELDOR-Experimente enthielten 100 μ M RNA in 100 μ L NMR-Puffer (25mM Kaliumphosphat, 50mM Kaliumchlorid, pH= 6.4). Für die *cw*-Experimente wurde dieselbe Konzentration verwendet aber in einem Volumen von 20 μ L. Zur Bestimmung des geeigneten EPR-Zusatzes wurden im Vorfeld T_m - und CD-Messungen am Wildtyp durchgeführt. Dabei konnte bei der mit Sucrose präparierten Probe kein Schmelzpunkt bestimmt werden. Das danach erhaltene CD-Spektrum zeigt auch eine Beeinflussung des Aptamers. Im Gegensatz dazu erfolgt bei Zugabe von Ethylenglykol kaum eine Veränderung am Schmelzkurvenverlauf und auch an der CD-Kurve. Basierend auf diesen Ergebnissen enthalten die EPR-Messungen eine 20%-ige (v/v) Ethylenglykol-Konzentration.

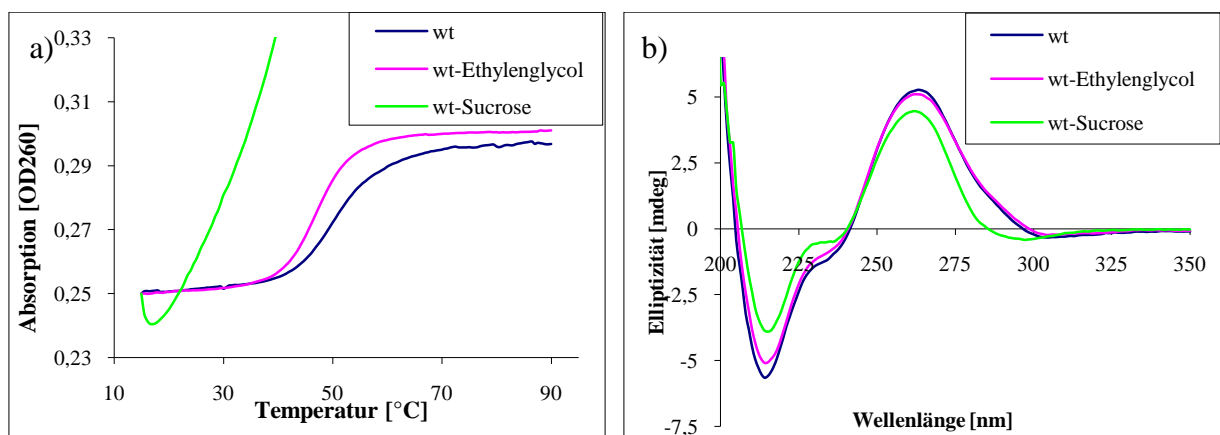


Abbildung 98: Vergleich Wildtyp ohne und mit den EPR-Zusätzen a) T_m -; b) CD-Spektren

4.4.6.3.1 PELDOR^[105]

Die PELDOR-Messungen, gemessen von I. Krstic, erfolgen bei 50K an einem Bruker Elexsys E580 gepulsten X-Band Spektrometer. Als zweite Mikrowellen-Quelle wurde das Bruker E580-400 verwendet. Die Pulse wurden generiert durch die Benutzung des 1kW TWT-Amplifiers. Bei der 4-Puls (Kap.2.4.1.3.1) Sequenz wurde ein Puls mit der Länge von 32ns für die Detektion und ein 12ns langer Puls für das Pumpen genutzt. Die Verzögerung zwischen den beiden Pulsen wurde variiert zwischen 132 und 196ns in 8ns-Schritten. Zur maximalen Modulationstiefe wurde die Pumpfrequenz auf die Mitte des Nitroxid-Spektrums platziert. Die Frequenz des Detektionspulses betrug 70MHz über dieser Pulsfrequenz. Der Resonator weist bei den Überlappungsbedingungen eine Resonanzfrequenz von 9.7GHz auf, was einen Qualitätsfaktor von annähernd 100 ergibt. Die Video-Bandbreite war dabei auf 50MHz gesetzt und erreichte 63dB. Während des Experiments betrug die Wiederholungszeit

4ms und die Anzahl der akkumulierten Scans 150 bis 250 mit 186-252 Zeitpunkten pro Scan und 20 Messungen pro Punkt. Die Auswertung erfolgte mittels der „DeerAnalysis 2008“ Software.

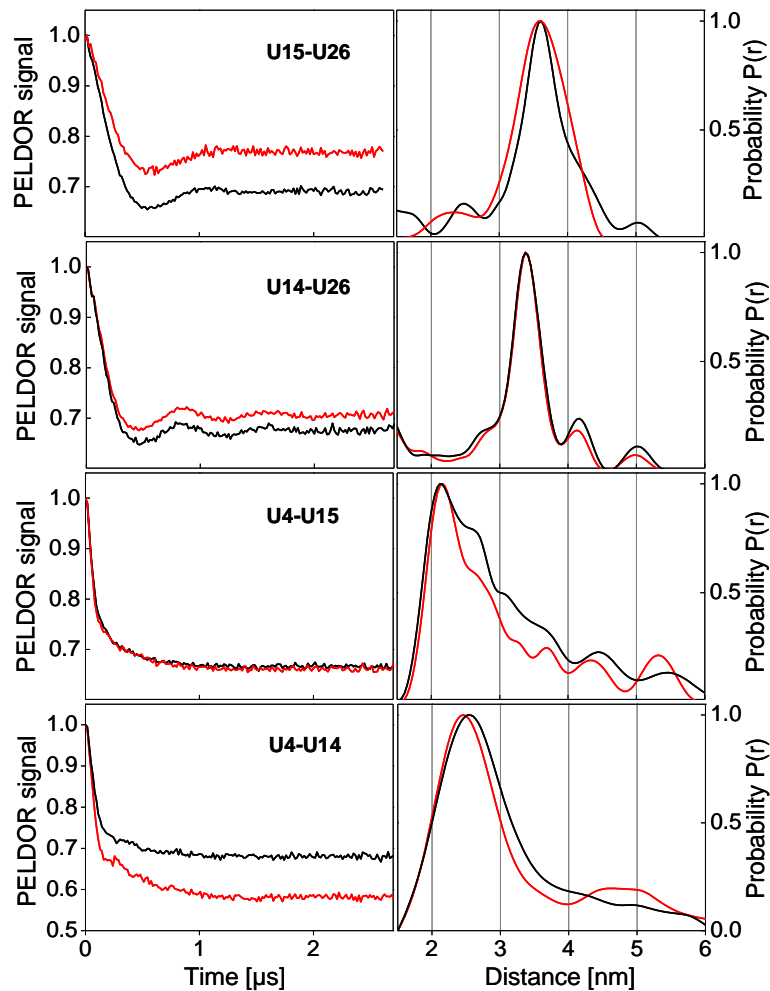


Abbildung 99: PELDOR-Daten von vier Doppelmutanten; schwarz ohne Neomycin-B und rot nach der Zugabe von 1eq Neomycin-B^[105] (I.Krstic)

Betrachtet man die erhaltenen Oszillationskurven genau, so kann nur bei den Mutanten U15-U26 und U14-U26 eine gut ausgeprägte Oszillation beobachtet werden. In diesen Fällen wird im Vergleich zu den anderen Mutanten ein gut definierter Abstand nach der Tikhonov-Umrechnung berechnet. Die anderen Mutanten (U4-U15, U4-U14 und U7-U14) zeigen eine für ein doppelmarkiertes System zu erwartende Oszillationstiefe aber eine kaum zu beobachtende Oszillationsdauer. Dies zeichnet sich in der breiten Abstandsverteilung und durch weitere Abstände ab. Bei der Zugabe von Neomycin-B und anderen Aminoglykosiden wie Ribostamycin und Paromomycin konnten in den PELDOR-Spektren und auch in den resultierenden Abständen keine Unterschiede beobachtet werden.

Die PELDOR-Messung der U7-U14 Mutante ergab zwei Abstände, wobei die Verteilung sich auch nach der Zugabe von Neomycin-B nicht verändert hat.

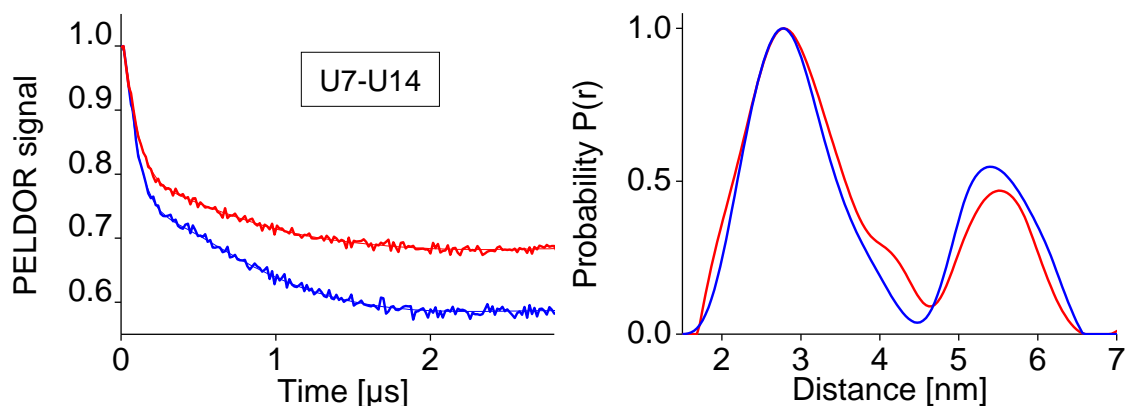


Abbildung 100: PELDOR-Messung an der U7-U14 Mutante (rot ohne und blau mit Neomycin-B)^[105] (I.Krstic)

Tabelle 18: Gemessene und mit PyMol berechnete Abstände

Doppelmutanten	R_{PELDOR} [nm]	Fehler in nm	R_{PyMol} [nm]
U15-U26	3.6	0.5	3.4
U14-U26	3.4	0.7	3.1
U4-U15	2.1	1.2	1.6
U4-U14	2.5	1.0	2.0
U7-U14	2.8 (5.4)	2.0 (1.0)	3.1

4.4.6.3.2 cw-EPR^[105]

Die X-Band (9.54GHz) EPR-Spektren wurden aufgenommen bei Raumtemperatur am Bruker E500 Spektrometer ausgerüstet mit einer TE102 Höhle. Als experimentelle Parameter wurden verwendet: 100kHz als Modulationsfrequenz, 1.0G als Modulationsamplitude, 1mW als Mikrowellenstärke, 40.96ms als Zeitkonstante und 40.96ms als Umbauzeit. Die Messung betrug 1024 Punkte, 140G Sweep-Breite und 150 bis 250 Scans.

Die Q-Band-Messungen erfolgten bei Raumtemperatur am Bruker Elexsys E580 Spektrometer aufgerüstet mit Elexsys SuperQ-FT System. Als experimentelle Parameter fungierten 100kHz Modulationsfrequenz, 1.0G Modulationsamplitude, 0.2mW (20dB)

Mikrowellenstärke 40.96ms Zeitkonstante und 40.96ms Umbauzeit. Die Messung betrug 1024 Punkte, 140G Sweep-Breite und 150 bis 250 Scans.

In Abbildung 101 dargestellte *cw*-Spektren der im Aptamer in unterschiedlichen sekundären Regionen platzierten Spin-Label weisen einen deutlichen Unterschied auf. Die Base Uracil 26 befindet sich in der Doppelhelix-Region und ist in einer Wobble-Basenpaarung fixiert. Das Spektrum dieser Mutante zeigt sowohl die parallele wie auch senkrechte Komponente des Hyperfeintensors. Ähnlich verhält es sich mit dem Spektrum für die Mutante U15. Hierbei wird die Uracil (U15) Base, welche in der Loop-Region platziert ist, durch Wasserstoffbindung zwischen dem Imino-Proton und dem Phosphatrückgrat der letzten Purin-Base (Adenosin) im Loop stabilisiert. Des Weiteren findet noch eine Wechselwirkung zwischen der 2'-Hydroxy-Gruppe vom Uracil und dem N7 am Adenosin statt^[99]. Diese Fixierung der U15-Einheit führt zur geringeren Ausbildung der Hyperfeintensor-Komponenten, was für eine im Vergleich zu U26 flexiblere Baseneinheit spricht.

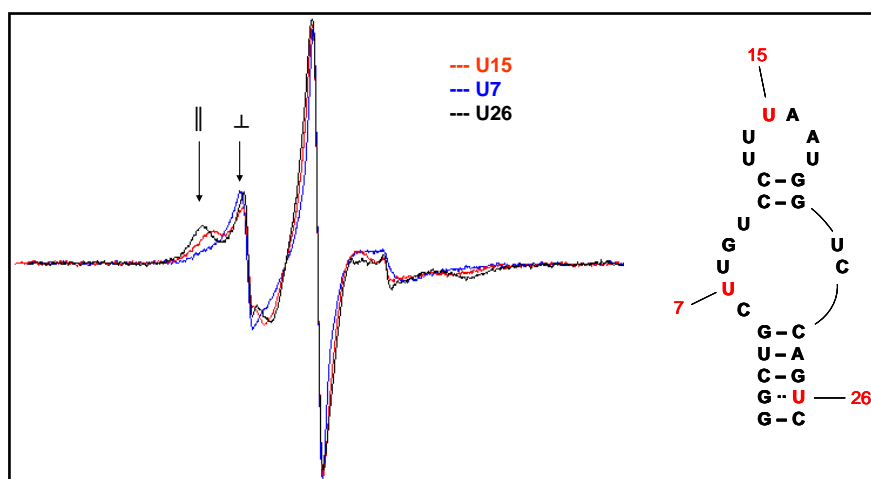


Abbildung 101: Vergleich der X-Band-Messung von drei Monomutanten^[105] (I.Krstic)

Bei der letzten dargestellten Monomutante handelt es sich um die selbst nach der Bindung von Neomycin-B freie Base U7. Das Spektrum zeigt in diesem Fall keine Aufspaltung mehr in die verschiedenen Komponenten.

Die Betrachtung der beiden im nicht-gebundenen Zustand beweglicheren Basen U15 und U7 zeigen sowohl im Q- wie auch im X-Band kaum einen Unterschied nach der Neomycin-B Bindung.

Bei den anderen Monomutanten konnte keine Veränderung durch die Zugabe von Neomycin-B beobachtet werden.

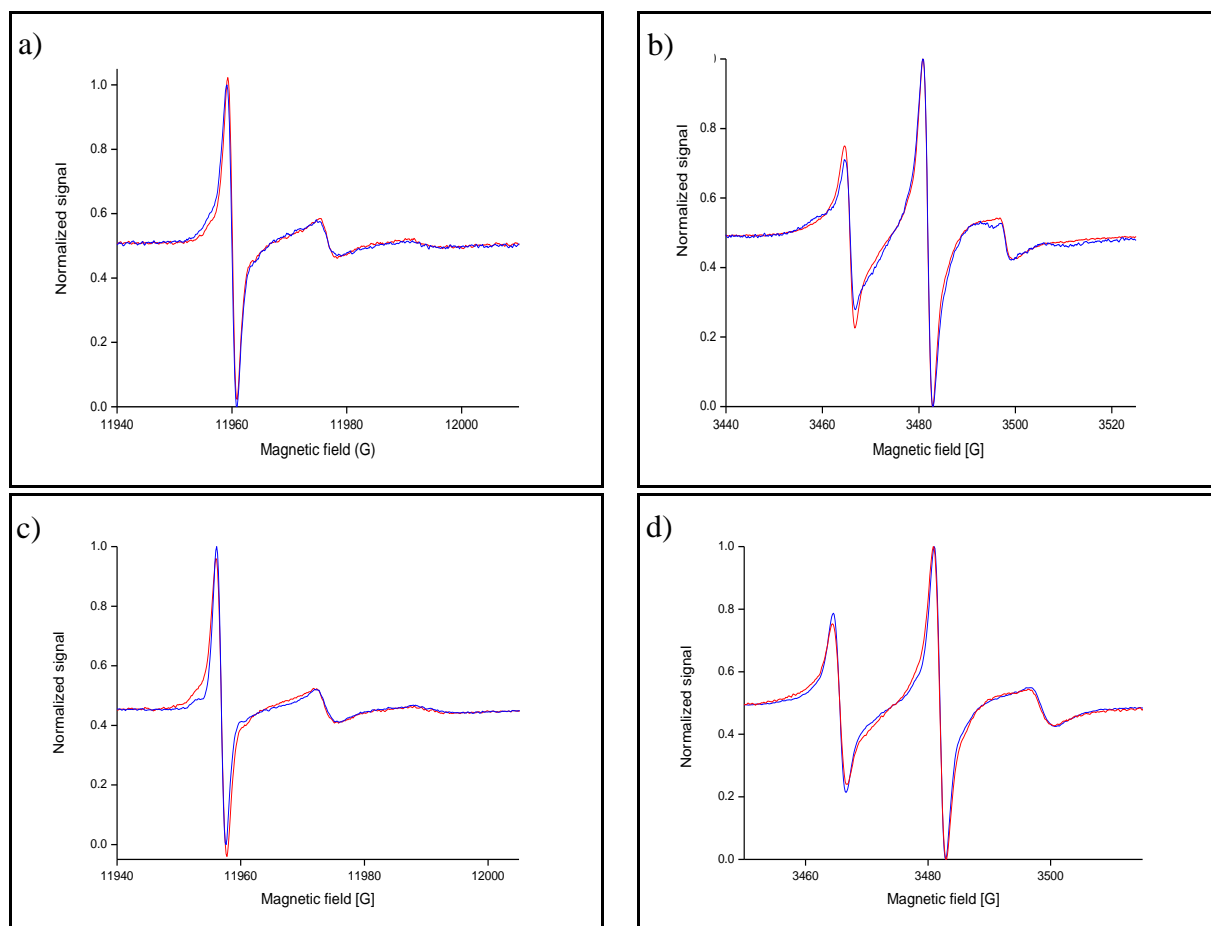


Abbildung 102: cw-EPR a) Q-Band und b) X-Band von U15 ; c) Q-Band und d) X-Band von U7 (rot mit Neomycin-B und blau ohne Neomycin-B)^[105] (I. Krstic)

4.4.6.4 NMR-Messungen

Um die Anwendung der Spin-markierten RNA für die NMR-Methode zu überprüfen, wurde die Mutante U26 in einem Maßstab von 1.0 μmol synthetisiert. In einem ^1H -NMR-Experiment ist die Reinheit der Probe von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurde die synthetisierte RNA portionsweise auf der Anionen Exchange-HPLC gereinigt, um die Säule nicht zu überladen und die Abtrennung der gewünschten Sequenz zu ermöglichen. Das Anionen Exchange HPLC-Chromatogramm zeigt zwei Hauptsignale im Bereich der erwarteten Retentionszeit.

Beide wurden separat aufgefangen, entsalzen und mittels Massenspektroskopie analysiert. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Signal 1 dem gewünschten Produkt entspricht. Der zweite Peak stellt eine Mischung aus dem Spin-markierten Konstrukt und der reduzierten RNA dar.

In Abbildung 103 ist klar erkennbar, dass die Einführung eines Spin-Labels (paramagnetisches Zentrum) zur Reduktion oder Verbreiterung der umliegenden Signale

führt. Die Modifikation wurde bei dieser Mutante an der U26-Position vorgenommen, so dass die Signale für die Protonen am U26 und am G25 ganz gelöscht wurden. Die umliegenden Basen G1, G2 und U4 weisen stark verbreiterte Signale auf.

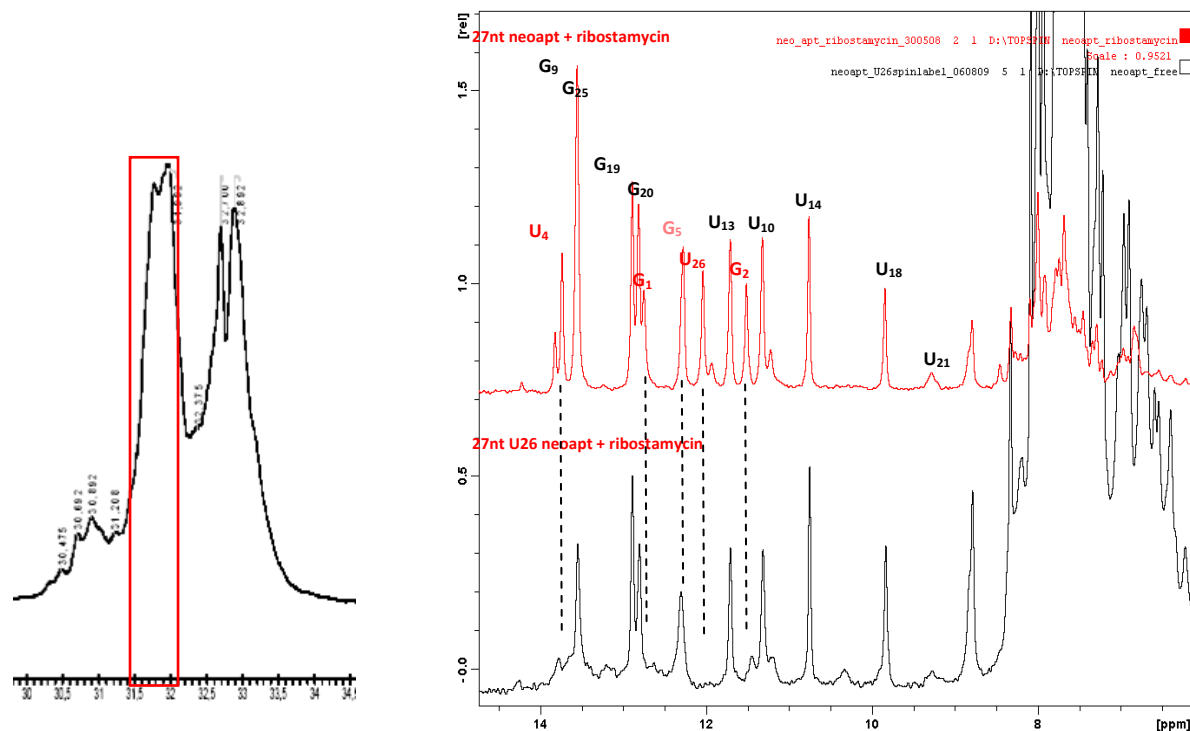


Abbildung 103: a) HPLC-Spektrum von U26-Mutante; b) $^1\text{H-NMR}$ oben: vom Wildtyp; unten von der U26-Mutante markiert mit TPA (Fraktion 1), (gemessen von Dr. E.Duchard)

4.4.6.5 Zusammenfassung und Diskussion

Die erhaltenen Daten von PELDOR unter Einbeziehung der *cw*-Messungen zeigen ein präorganisiertes System schon bei Raumtemperatur an. Diese vorgeformte Orientierung stimmt mit der gebundenen Form überein und wird thermisch noch stabilisiert.

Beim Vergleich der EPR-Daten mit den publizierten NMR- und biologischen Daten für dieses Aptamer muss die jeweilige Experiment-Zeitskala und der Experimentfehler berücksichtigt werden. Bei einer Messgenauigkeit von $2\text{-}3\text{\AA}$ ist es für die EPR nicht möglich die in der NMR gezeigte Beweglichkeit zu detektieren^[104].

Fazit: Im Rahmen dieses Projekts konnte nicht die Beweglichkeit des zu untersuchenden Aptamers bei Bindung von Neomycin-B gezeigt werden. Es konnte aber bezogen auf die EPR-Skala eine schon bei Raumtemperatur vorliegende Präorganisation der RNA bewiesen werden.

4.4.7 Nep1-Komplex

Der Nep1-Komplex ist ein stark konserviertes Nukleoprotein mit einer essenziellen Funktion bei der Ribosombiogenese. Eine Mutation im menschlichen Nep1 ist als die Bowen-Conradi Entwicklungskrankheit bekannt^[106].

Strukturelle Untersuchungen zeigen eine Ähnlichkeit in der Faltung des Nep1-Komplexes zu den dimeren SPOUT-Klasse RNA-Methyltransferasen. Dies legt den Schluss nahe, dass Nep1 ebenfalls als eine RNA-Methyltransferase während der ribosomalen Biogenese fungiert. Die Funktion konnte bis jetzt nicht genau definiert werden.

Ein zu den Nukleotiden 1188 bis 1198 von *M. jannaschii* 16S rRNA korrespondierendes Oligomer wird mit einer hohen Affinität von dem Nep1-Komplex in der Dimer-Spalte gebunden. Bei der *in vitro* Messung konnte gezeigt werden, dass die Methylierung nur dann erfolgt, wenn in Position 1191 ein Pseudouridin platziert ist. Mittels HPLC und NMR konnte der Transfer der Methyl-Gruppe an die N1-Position des Pseudouridins gezeigt werden^[106].

Im Rahmen dieser Kooperation mit der Gruppe von Prof. J.Wöhnert sollte die Charakterisierung und die Funktionalität des *M. jannaschii* Nep1 analysiert werden. Dabei wurde die spezifische RNA-Bindung mittels Fluoreszenz und NMR gezeigt.

4.4.7.1 Synthese und NMR-Experiment

Die Fragestellung beschäftigt sich mit der räumlichen Anordnung der RNA in dem Dimer-Spalt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden zwei 9mere synthetisiert. Jeweils ein Strang mit der Modifikation am 5'- und am 3'-Ende der RNA. Wobei die Markierung nicht exakt an der 3'-Base erfolgen konnte, da diese an die Festphase gekoppelt ist. Hierbei wurde die vorletzte Cytosin-Base modifiziert.

Tabelle 19: Synthetisierte 9mere

RNA	Sequenz	Masse ber.	Masse gefund.
U*	5'-U*UCAACGCC-3'	2937.00	2939.06
C*	5'-UUCAACGC*C-3'	2937.00	2937.54

Die Synthese erfolgte mittels der ACE[®]-Chemie in einem Maßstab von 0.2µmol unter Verwendung der selbst synthetisierten 5-Iodo-Uridin- und 5-Iodo-Cytidin-Phosphoramidite.

Nach der HPLC-Reinigung konnten Ausbeuten von 41.5nmol (U*) und 68.8nmol (C*) isoliert werden. Da es sich hierbei um nicht komplementäre Stränge handelt, wurden keine weiteren strukturellen Untersuchungen durchgeführt.

Die Komplex Gewinnung und die NMR-Messungen wurden von P.Wurm in der Gruppe von J.Wöhnert durchgeführt. Die erhaltenen RNAs wurden mit dem Protein-Dimer vermischt und die erhaltenen Komplexe im 2D-NMR vermessen. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden alle Lysine, da diese käuflich zu erwerben waren, durch eine ^{15}N -markierte Mutante ersetzt. Bei dem durchgeführten NMR-Experiment handelt es sich um das $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC. Hier sind nur die Ergebnisse für die 5'-markierte RNA dargestellt.

In Abbildung 104 ist das 2D-Spektrum abgebildet. Dabei stellen die schwarzen Kreuz-Peaks die Signale bei Verwendung von radikalischer RNA und die roten Signale die nach der Reduktion der selbigen dar. Die Reduktion erfolgt nach der Messung des Komplexes im NMR-Röhrchen unter Verwendung von Ascorbinsäure, 1 Stunde lang und bei Raumtemperatur. Nach der Reaktionszeit wird dieselbe Probe ohne eine Aufreinigung nochmals vermessen. In der rechten Abbildung sind die durch das paramagnetische Zentrum gelöschten oder verkleinerten Signale in der dreidimensionalen Komplex-Darstellung markiert. Die beeinträchtigten Lysine sind orange-farben hervorgehoben.

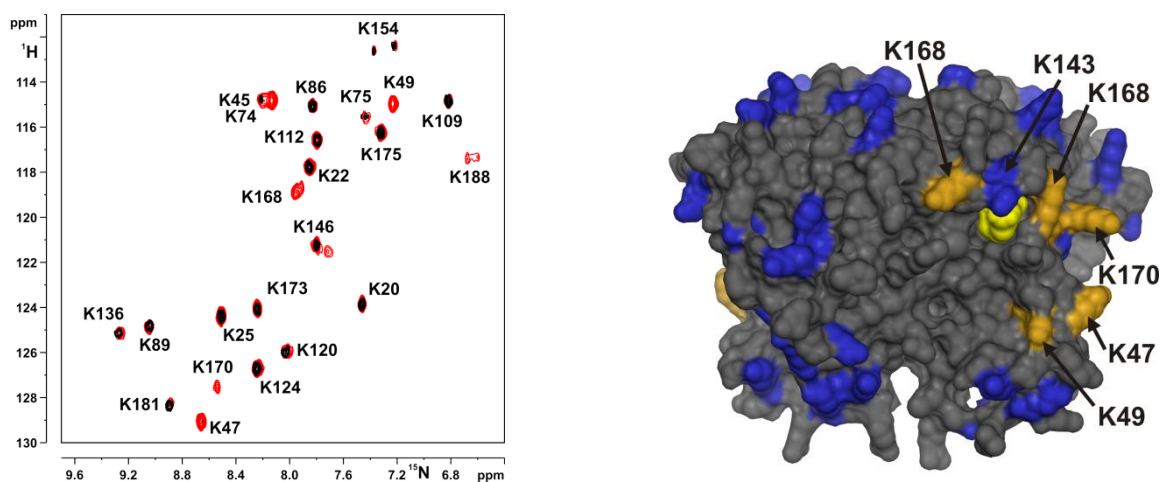


Abbildung 104: 2D-NMR Daten vor und nach der Reduktion (rot) des Spin-Labels^[106] (P.Wurm)

4.4.7.2 Zusammenfassung und Diskussion

Mit der markierten RNA ist es gelungen eindeutig die in der Nachbarschaft liegenden Lysine zu identifizieren und so Rückschlüsse auf das 5'-Ende der RNA zu ziehen. Auch die Reduktion direkt im Messgefäß erleichtert die Charakterisierung, ohne die Ergebnisse durch zusätzliche Handhabung zu verfälschen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Einsatz der Nitroxyl-Spin-Markierung für die Strukturaufklärung von Oligonukleotiden getestet. Dafür wurden im Vorfeld verschiedene Spin-Label synthetisiert und charakterisiert. Bei den Nitroxiden handelt es sich hierbei um das Spin-Label TPA (2,2,5,5-*Tetramethyl-pyrrolin-1-oxyl-3-acetylene*) (**1**) und TEMPA (2,2,6,6-*Tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-N-oxyl-4-acetylene*) (**2**). Um die Vielfalt der zugängigen Spin-Label zu erhöhen, wurden außerdem noch deuterierte (**1#**, **2#**) und mit ^{15}N -markierte (**1***, **2***) Moleküle synthetisiert.

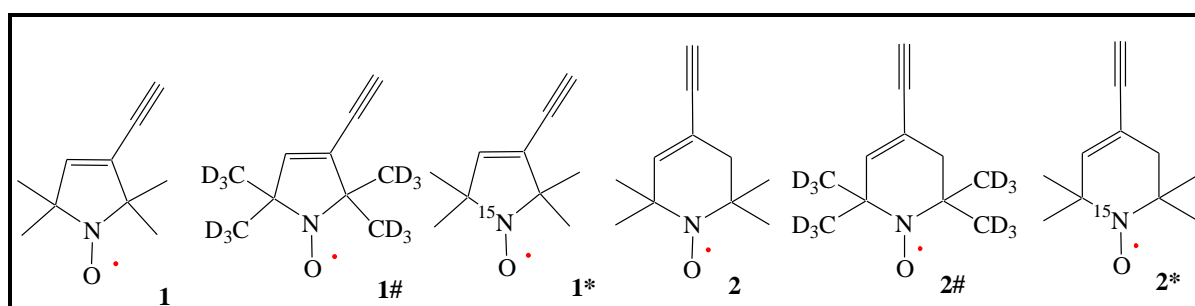


Abbildung 105: Synthetisierte Nitroxyl-Spin-Label

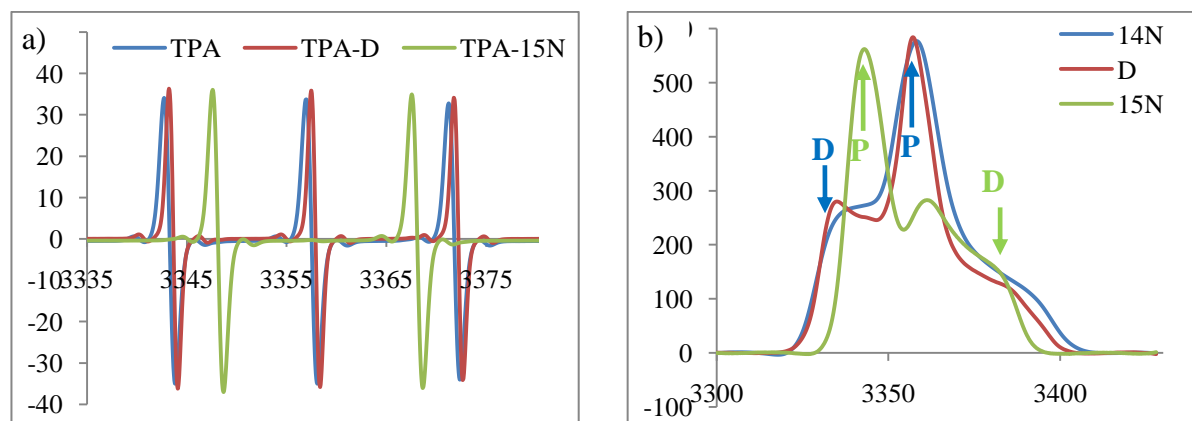


Abbildung 106: a) *cw*-EPR Spektren; b) Frequenz-Spektrum der verschiedenen Isotope

Die geometrische Differenzierbarkeit der beiden Spin-Label TPA und TEMPA konnte mittels Kristallstruktur gezeigt werden. Bei der *cw*-EPR, gemessen von I.Krstic in der Gruppe von Prof. Dr. T.F. Prisner, aller synthetisierten Nitroxide (auch der Isotopen-markierten) zeigten sich die erwarteten Ergebnisse. Die Hauptaussage der Messungen ist die Gleichheit der beiden geometrisch unterschiedlichen Nitroxide in den EPR-Messungen. Für die Deuterium-markierte Verbindungen wurde eine Verschmälerung der Signalbreite beobachtet. Eine weitaus gravierendere Veränderung des Spektrums bringt das ^{15}N -Isotop mit sich. Durch die Änderung des Spins von 1 (für ^{14}N) nach $\frac{1}{2}$ (für ^{15}N) ergibt sich eine Aufspaltung der Signale

nicht in drei sondern in nur zwei Linien. Dieser EPR-Parameter (Spin) beeinträchtigt auch das Echo-Frequenz-Spektrum. Hierbei zeigt sich eine drastische Veränderung im Kurvenverlauf, was das selektive Anregen (P) und Detektieren (D) der einzelnen Spin-Label ermöglicht.

Zur Charakterisierung des Verhaltens der einzelnen Nitroxide in größeren Systemen wurden fünf lineare, doppelmarkierte Systeme synthetisiert. Dabei wurden nur die Spin-Label **1**, **2** und **2*** verwendet. Bei vier der fünf Systeme wurde die Synthese basierend auf den gleichen Gerüstbausteinen durchgeführt (Abbildung 107). Das fünfte System musste grundlegend neu aufgebaut werden (Abbildung 110). Die resultierenden Systeme zeigten für alle Nitroxide keine Unterschiede in der PELDOR-Messung.

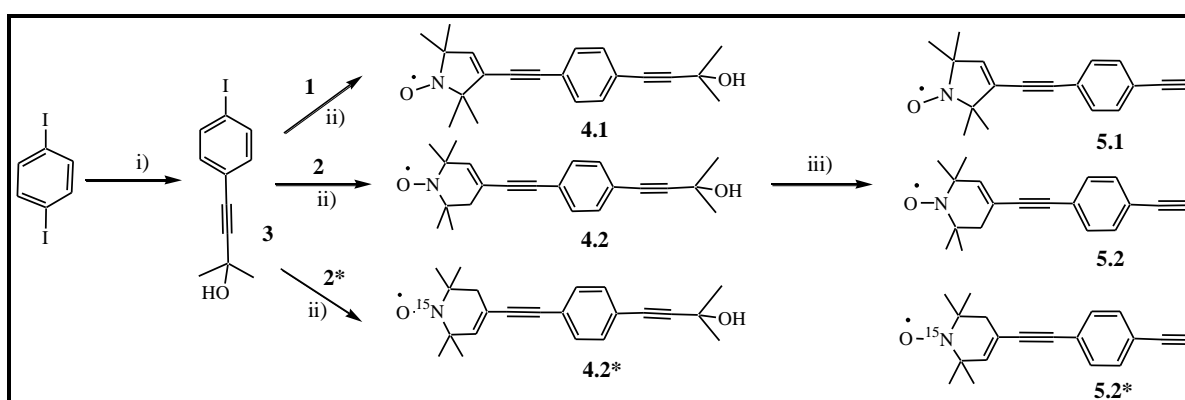


Abbildung 107: Synthese der einzelnen Komponenten für die linearen Systeme; i) und ii) 1 mol-% Pd(II)Cl₂(Ph₃P)₂, 4 mol-% CuI, CH₂Cl₂ und TEA; iii) Toluol, KOH, 2h, 110°C

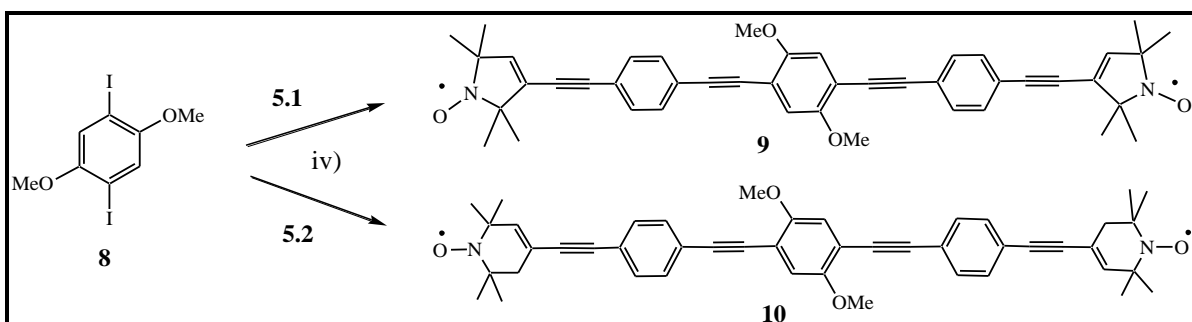


Abbildung 108: Synthese von System 2 (Verbindung 9) und 3 (Verbindung 10); iv) 1 mol-% Pd(II)Cl₂(Ph₃P)₂, 4 mol-% CuI, CH₂Cl₂ und TEA

Die beobachtete Gleichheit sowohl bei den *cw*- als auch bei der PELDOR-Messung, beides gemessen in der Gruppe von Prof. Dr. T.F. Prisner, veranlasste uns zur Einführung der Sechsring-Nitroxide (TEMPA **2** und **2***) in verschiedene Modell-RNAs, um deren Verhalten in Oligonukleotiden zu testen.

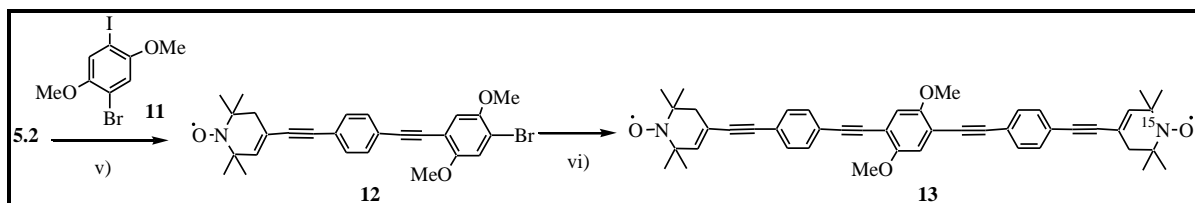


Abbildung 109: Synthese des Systems 4 (Verbindung 13); v) 2 mol-% CuI, 4 mol-% Pd(II)Cl₂(Ph₃P)₂, rt, 83%; vi) 2 mol-% CuI, 1 mol-% (Ph₃P)₄Pd(0), 55°C, 5.5h, 32%

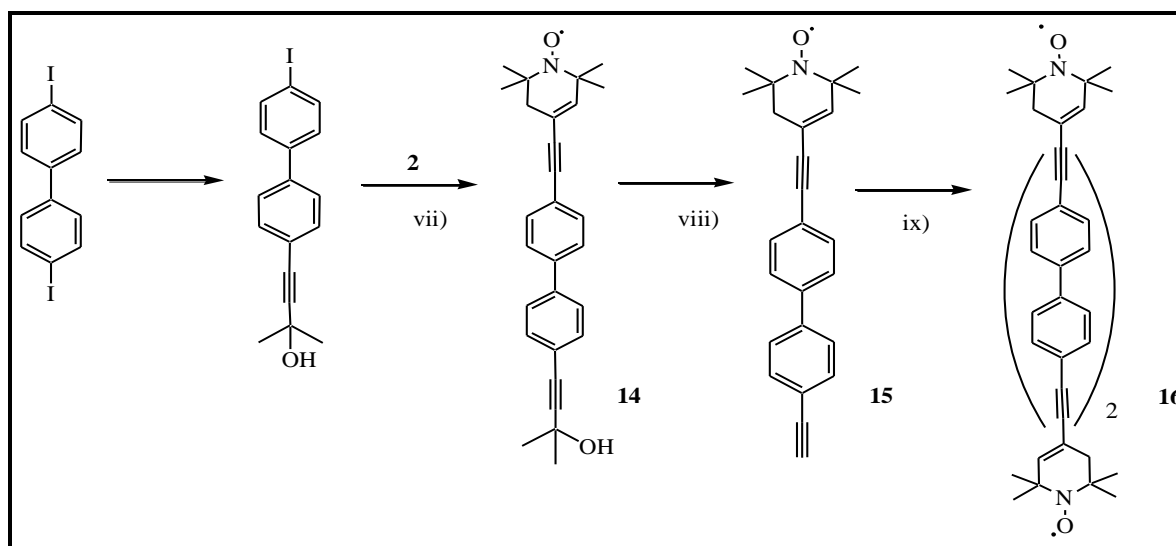


Abbildung 110: Synthese des Systems 5 (Verbindung 16); vii) 8 mol-% CuI, 4 mol-% (PhP₃)₄Pd(0), CH₂Cl₂ und TEA, 86%; viii) Toluol, KOH, 2h, 110°C, 82%; ix) CuI, TMEDA, DMF, 50°C, 5.5h, 84%

Die Einführung des Spin-Labels erfolgte nach der literaturbekannten Sonogashira-Kreuz-Kupplung. Hierfür wurden drei Iodo-modifizierte Nucleotide synthetisiert: 5-Iodo-Uridin(U), 5-Iodo-Cytidin (5-I C (27)) und 2-Iodo-Adenosin (2-I A, synthetisiert von Ch.Grünewald). Als Modell-RNAs fungieren die von N.Piton in ihrer Doktorarbeit untersuchten doppelsträngige RNAs.

Im Rahmen dieser Messungen (EPR- Messungen von B. Endeward) wurde festgestellt, dass in Vergleich zum Fünfring die Kupplung des Sechsring-TEMPA am Uridin eine erheblichere Destabilisierung des RNA-Duplex mit sich bringt. Dieser Effekt kann mit der nicht planaren Ringkonformation des TEMPA-Nitroxids erklärt werden. Einen Beweis für diese Erklärung lieferte die Markierung am 2-Iodo-Adenosin (synthetisiert von Ch.Grünewald). Hierbei platziert sich das Spin-Label in der kleinen Furche der A-Helix, welche mehr Raum bietet als die große Furche und verringert somit den Destabilisierungseffekt. Resultierend aus dieser Erkenntnis wurde für die weiteren Projekte die Verwendung von TPA als paramagnetische Sonde beschlossen.

Nach den Modell-RNAs wurde der Einsatz der *side-directed-spin-labeling*-Methode an biologisch interessanten und strukturell komplexeren Oligonukleotiden getestet. Das strukturell anspruchsvollere Fragment nach der Doppelhelix ist der interne Loop. Hierbei wurde in der Zusammenarbeit mit Prof. Prisner und Prof. Schiemann ein Fragment des Hepatitis C Virus (HCV) IRES Domain II als Target verwendet. Dieses bildet eine L-Shape Konformation aus zwei RNAs (20mer und 24mer). Die erhaltenen PELDOR-Ergebnisse, gemessen von Prof. O. Schiemann, stehen im Einklang mit den publizierten NMR-(P.Lukavsky) und Kristallographie-Daten (T.Herrmann)

Zum besseren Verständnis von „freien“, nicht in einer Basenpaarung fixierten Basen, wurde als Test-Loop der literaturbekannte und sehr stabile UUCG-Tetra-Loop synthetisiert und in einer Zusammenarbeit mit Prof. T.F.Prisner, Prof. G.Stock und Prof. H.Schwalbe charakterisiert. Das 14mere Oligonukleotid wurde je nach Fragestellung an drei verschiedenen Uracil-Basen markiert. Beide „freien“ Uracil-Basen im Loop zeigten einen sehr scharfen Abstand in den PELDOR-Messungen und kaum Dynamikunterschiede in den *cw*-EPR-Spektren, gemessen von B. Endeward in der Gruppe von Prof. Dr. T.F. Prisner.

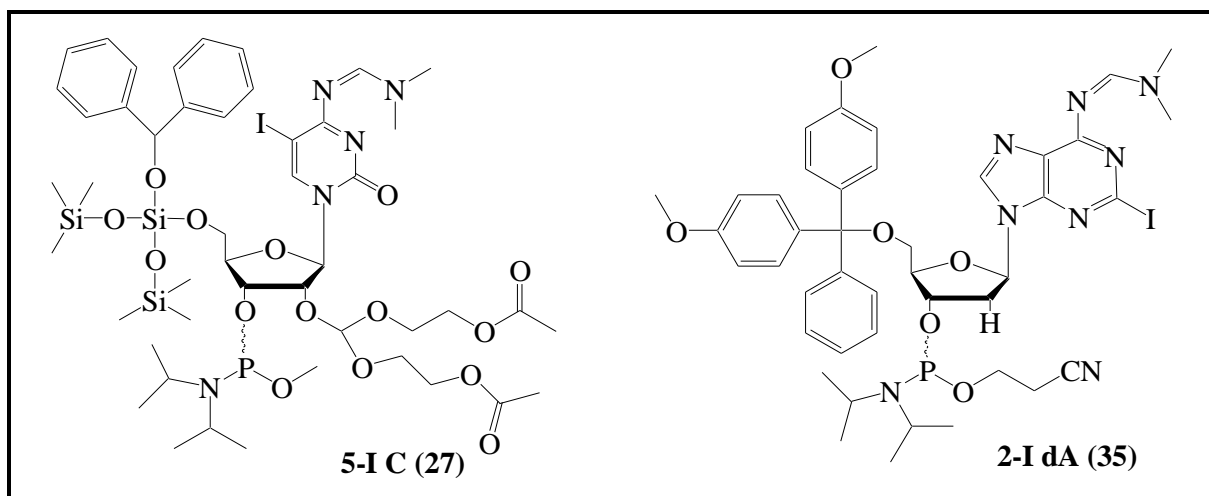


Abbildung 111: Synthetisierte Nukleotide

Basierend auf den Ergebnissen der kleineren RNA-Fragmente haben wir zwei „größere“ und strukturell flexible RNA-Stränge synthetisiert. Es handelt sich dabei um ein 27mer Neomycin-B Aptamer (Zusammenarbeit mit Prof. B.Süß, Prof. T.F.Prisner, Prof. J.Wöhnert) und ein 49mer Diels-Alderase (Zusammenarbeit mit Prof. A.Jäschke, Prof. T.F.Prisner und Prof. O.Schiemann) Ribozym. Beide Sequenzen wurden durch ein Screening gefunden und stammen nicht aus lebenden Organismen. Die PELDOR-Untersuchungen des Ribozyms, gemessen von Prof. O.Schiemann in der Gruppe von Prof. Dr. T.F.Prisner, welches die C-C-

Bindungsbildung katalysiert, zeigten keine gravierenden konformationellen Magnesium(+2)-Ionen-Abhängigkeiten gemessen. Im Falle des Aptamers konnten neue Erkenntnisse bezüglich der gebundenen und der freien Konformation mittels EPR gewonnen werden, gemessen und analysiert von I. Krstic in der Gruppe von Prof. Dr. T.F. Prisner. Das Ergebnis ist eine enthalpiegesteuerte Formierung des entropisch vorgeformten Riboswitches.

Während der verschiedenen RNA-Synthesen konnte die Ausbeute verbessert werden. Als Änderung wurde die Synthese nach der Einführung des iodierten Nukleotids nicht unterbrochen sondern das gesamte Oligonukleotid synthetisiert. Die Markierung erfolgte wie bekannt mittels einer postsynthetischen Sonogashira-Kreuz-Kupplung auf der Festphase.

Im Rahmen der Untersuchung bezüglich einer therapeutischen Fragestellung wurden nicht-selbst-komplementäre RNA-, DNA-Stränge und RNA/DNA-Hybride synthetisiert. Die konformationelle Charakterisierung der DNA/RNA-Hybride stellt für die therapeutische Anwendung der Antisense-Oligonukleotide eine Voraussetzung dar. Im Vorfeld der DNA-Synthese wurde ein 2-Iodo-desoxy-Adenosin (2-I dA(35)) als Analogon zur RNA-Base synthetisiert. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Hybride wurden vier mögliche Doppel-Helices, reine DNA, reine RNA und zwei Misch-Hybride geformt. Mit den vorliegenden spektroskopischen Methoden, der Schmelzpunktbestimmung, CD-Spektroskopie und EPR, gemessen von B. Endeward in der Gruppe von Prof. Dr. T.F. Prisner, ist es uns gelungen die Helixform der Misch-Hybride eindeutig zu identifizieren.

Schon bereits bei dem Neomycin-B Aptamer Projekt wurde die Verwendung der Spin-markierten RNA in der NMR-Spektroskopie (gemessen und analysiert von E. Duchard, Gruppe von Prof. J. Wöhnert) gezeigt. Diese Anwendung wurde in einer Kooperation mit Prof. J. Wöhnert beim RNA-Nep1-Komplex benutzt um die Orientierung der RNA in der Bindungstasche zu beweisen. Bei dem Nep1-Protein handelt es sich um *M. jannaschii* Nep1 (48kDa) Methyltransferase. Die am 5'-Ende markierte RNA wurde in einem Komplex mit der Methyltransferase mittels eines zwei-dimensionalen Experimentes (^1H - ^{15}N -HSQC) vermessen und analysiert, von P. Wurm in der Gruppe von Prof. J. Wöhnert. Dabei werden die Signale, welche sich im Umkreis von 15 Å am Nitroxid befinden, reduziert. Die Orientierung kann durch den Vergleich mit den vollständig zugeordneten Daten bestimmt werden. Nach der Reduktion des Spin-Labels mit Ascorbinsäure sind die Signale alle wieder sichtbar.

Diese Kombination von EPR und NMR kann eine Möglichkeit der Charakterisierung von spezifischen Wechselwirkungen in für beide Methoden separat gesehen zu großen und komplexen Molekülen sein.

Der Fokus der weiteren Arbeit muss auf der Charakterisierung von biologisch relevanter RNA und RNA-Komplexen liegen. Für die Synthese von längeren RNA-Strängen kann die Methode der Ligation auf die Spin-markierte RNA übertragen werden. Bei der Untersuchung von Komplexen muss die Markierung von Proteinen angewendet werden.

Eine weitere interessante Aufgabe ist die Entwicklung und Optimierung der EPR-Messungen *in vivo*. Dies ist für die strukturelle Aussage in lebenden Zellen von essentiellen Wert.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

6.1.1 Messmethoden/ Analysemethoden

HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie):

Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgt mit dem Gerät Jasco HPLC-System 900. Es wird eine semi-präparative Dionex DNAPac[®] PA-100 Säule (9x 250mm) verwendet und die Detektion erfolgt bei 254nm. Als Laufmittel wird Millipore-Wasser und eine 1M Lithiumchlorid-Lösung benutzt.

Die Kontrolle der kinetischen Experimente erfolgt mit dem gleichen Gerät und unter der Verwendung einer Dionex BioLC[®] DNAPac[®] PA-100 Säule (4x 250mm).

Für die Isolierung der markierten Oligomere wird das HPLC-Gerät Jasco UPLC-System 2000 verwendet. Die Auftrennung erfolgt im präparativen Maßstab auf der Reversed Phase Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90A (250x 15.00mm 4 miron).

Massenspektroskopie:

Die MALDI-MS-Messungen werden an einem MALDI-Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) der Firma Fisons durchgeführt. Die ESI-MS-Messungen erfolgen am Elektrospray-Gerät (VG Plattform II) der Firma Fisons.

Die MALDI-MS-Messungen der Oligonukleotide werden mit dem Gerät MALDI-TOF Voyager DE-PRO vom Applied Biosystems und dem microTOF QII der Firma Bruker vorgenommen.

NMR:

Die Standard-NMR-Spektren werden am Gerät AM 250 (250MHz) der Firma Bruker gemessen. Die ¹⁵N-NMR- und die meisten ¹³C- NMR- Spektren sind mit dem Gerät Avance 400 (400MHz) der Firma Bruker aufgenommen.

Elementaranalyse:

Die Elementaranalysen werden mit dem Gerät Heraeus CHN Rapid erstellt.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Für die Dünnschichtchromatographie wird mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554; 0.2mm Schichtdicke). Die Laufstrecke beträgt 3.5-4.5cm. Alle R_f -Werte werden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen werden mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda (Typ NU-6KL) bei Wellenlängen von 254nm detektiert.

Präparative Säulenchromatographie:

Die Säulenchromatographie erfolgt mit Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40 bis 63 μm der Firma Macherey-Nagel.

UV-Spektroskopie:

Die optische Dichte (OD_{260}) wird bei 260nm in einem Volumen von 1mL Wasser bei 20°C bestimmt.

Elektronen-Paramagnetische-Resonanz:

Die gepulsten EPR-Messungen werden mit dem Gerät Elexsys E580 X-Band und die cw-EPR-Messungen mit E500 X-Band der Firma Bruker durchgeführt.

 T_m -Wert-Bestimmung:

Die Messungen des Schmelzpunktes bei den synthetisierten RNA-Strängen erfolgen mittels V650 UV-Vis-Spektrophotometer der Firma Jasco. Diese werden in dem jeweiligen Puffer im Bereich von 5 bis 95°C gemessen.

CD-Spektroskopie:

Die CD-Messungen werden mit dem Gerät J-710 Spektropolarimeter der Firma Jasco bei einer Temperatur von 20°C im selben Puffer wie die T_m -Messungen aufgenommen. Der Messbereich liegt zwischen 190 und 350nm.

6.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien werden käuflich erworben (bei Firmen Sigma-Aldrich, Merck und Roth) und besitzen die höchst mögliche Reinheit und Qualität. Die absoluten Reaktionslösungsmittel werden bei Sigma-Aldrich erworben und sind über Molsieb gelagert.

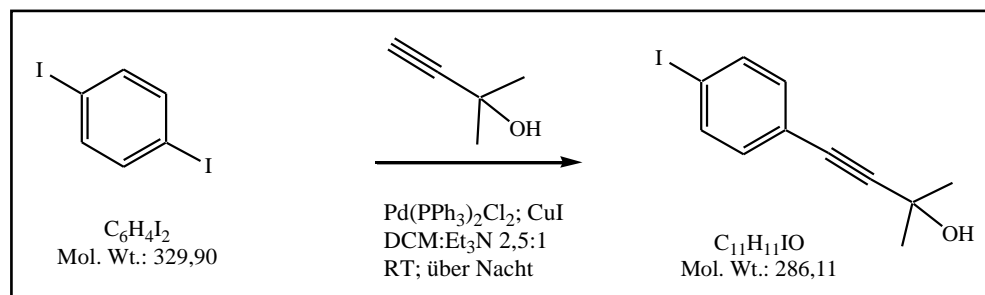
Für die präparative Säulen- und die Dünnschichtchromatographie werden folgende Lösungsmittel verwendet:

- Essigsäureethylester technische Qualität, über Calciumoxid getrocknet und destilliert
- *n*-Hexan technische Qualität, bei Normaldruck destilliert
- Isopropanol 99.5%, für analytische Zwecke, Grüssing
- Methanol technische Qualität, über Kaliumcarbonat getrocknet und destilliert
- Methylenchlorid technische Qualität, über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
- Aceton >99.5%, p.a.

Das Acetonitril für die HPLC und Synthesizer stammt von der Firma Prologo Reagens und besitzt die HPLC-Qualität.

6.2 Lineare Systeme

- Synthese von (4-(4-Iodo-phenyl)-2-methyl-but-3-in-2-ol) (**3**)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

In einem ausgeheizten Kolben werden 75mL abs. Dichlormethan und 30mL Triethylamin vorgelegt und entgast. Nachdem sich das 1,4-Di-iodo-benzol (5g/ 15.2mmol) gelöst hat, werden unter Argon-Atmosphäre 0.115g (4mol-%) Kupferiodid und 0.106g (1mol-%) des Palladium(II)-Katalysators zugegeben. Das 2-Methyl-butin-2-ol (0.9mL/ 1eq) wird langsam zutropft und der Ansatz unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird fünfmal mit 20mL einer wässrigen 5%-igen Di-natrium-ethylen-diamin-tetra-essigsäure-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie. Als Laufmittel wird reines Dichlormethan verwendet. Das Produkt ist ein farbloser bis beiger Feststoff.

Ausbeute: 2.6g (9.09mmol/ 60%)

DC: R_f (DCM)= 0.4

¹H-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃)

7.54-7.59 (d, 2H, Aromat, J= 13.6Hz); 7.04-7.06 (d, 2H, Aromat J= 13.6Hz);

2.12 (s, 1H, OH-Gruppe); 1.53 (s, 12H, CH₃-Gruppen)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃)

137.45 (C-Aromat); 133.13 (C-Aromat); 122.31 (C-Acetylen); 95.25 (C-I);

94.14 (Acetylen); 81.28 (Acetylen am Phenyl); 65.65 (C(CH₃)₂);

31.43 (CH₃-Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(46.16); H(3.88); O(5.59); I(44.37)

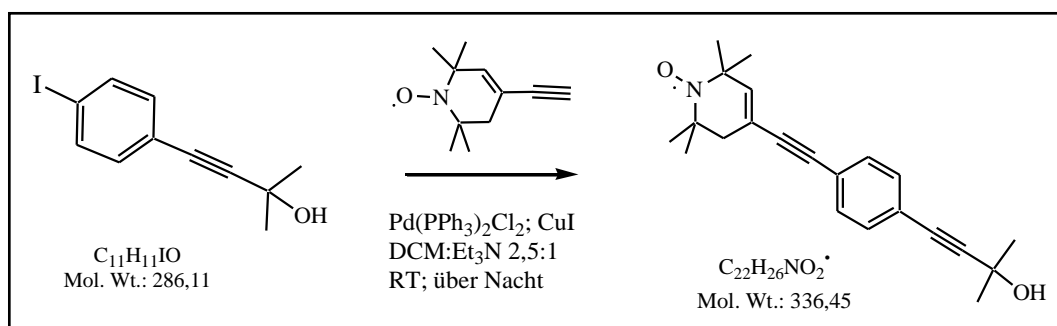
gemessen: C(46.13); H(3.92)

ESI(+/-): berechnet: 286.1

gemessen: 278.9; 280.0; 282.1 (Aufspaltung auf Grund der Iod-Isomere)

- Synthese von 4-[4-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-phenyl-ethynyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1-oxyl (**4.2**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

7.5mL abs. Dichlormethan und 3mL Triethylamin werden in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt und entgast. Unter einer Argon- Atmosphäre werden 0.25g (0.87mmol) (4-(4-Iodophenyl)-2-methyl-but-3-in-2-ol), 6.6mg (2mol-%) Kupferiodid, 12mg (1mol-%) des Palladium(II)-Katalysators und 0.156g (1eq) 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1-oxyl-4-acetylen hinzugegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur und Lichtausschluss über Nacht gerührt. Anschließend mit fünfmal 10mL einer wässrigen 5%-igen Di-natrium-ethylen-di-amin-tetra-essigsäure-Lösung extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Chromatographie. Als Laufmittel wird *n*-Hexan/ Essigester 5/1 verwendet. Das Produkt wird als orangefarbene Kristalle erhalten.

Ausbeute: 0.221g (0.66mmol/ 75%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 5/1)= 0.54

¹H-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃ mit Phenylhydrazin)

7.27- 7.29 (d, 4H; Aromat, J= 5.6Hz); 5.88 (s, 1H; C=CH); 2.27 (s, 2H; CH₂-

Gruppe); 1.55 (s, 6H, 2 CH₃-Gruppen); 1.25 (s, 6H, 2 CH₃-Gruppen); 1.18 (s, 6H; 2 CH₃-Gruppen)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃ mit Phenylhydrazin)

138.5 (sp²-C im Radikal); 131.68 (4 C des Aromaten); 128.4 (sp²-C am Acetylen); 122.57 (Phenyl-C am Acetylen); 95.68 und 97.92 (Acetylen-C); 81.93 und 88.03 (Acetylen-C am Phenyl); 65.80 (C(CH₃)₂); 58.88 und 61.44 (2 C(CH₃)₂); 43.08 (CH₂-Gruppe); 31.70 (2 CH₃-Gruppen); 22.85 (4 CH₃-Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(78.54); H(7.79); N(4.16); O(9.51)

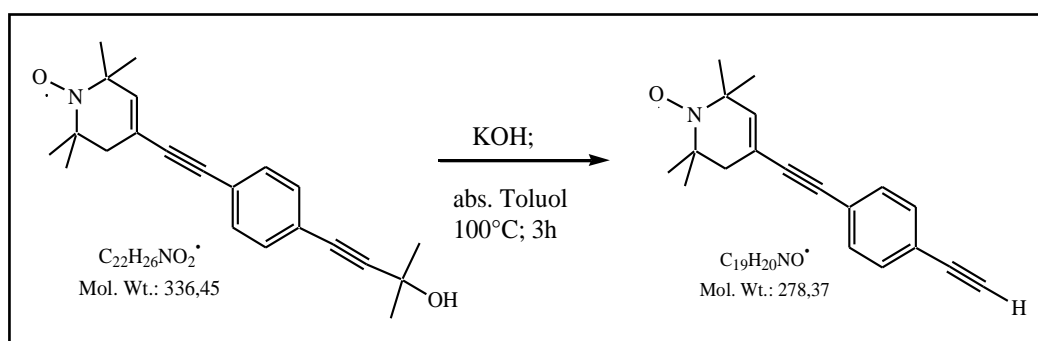
gemessen: C(77.44); H(7.86); N(3.68); O(11.02)

ESI(+/-): berechnet: 336.5

gemessen: 321.6; 322.2; 336.7

- Synthese von 4-(4-Ethynyl-phenyl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1-oxyl (**5.2**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

0.1g (0.29mmol) 4-[4-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-phenyl-ethynyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1-oxyl werden in 6mL abs. Toluol gelöst und mit 8eq (130mg) Kaliumhydroxid versetzt. Der Ansatz wird 1.5 Stunden bei 100°C gerührt. Nach dem Abkühlen versetzt man die Reaktionslösung mit 5mL Wasser und extrahiert die wässrige Phase mit Toluol/ Dichlormethan-Gemisch. Die organische Phase wird über Natriumsulfat

getrocknet und eingengt. Als Laufmittel für die Säulenchromatographie wird *n*-Hexan/Essigester 5/1 verwendet. Das Produkt wird als ein orangefarbener Feststoff isoliert.

Ausbeute: 0.074g (0.27mmol/ 89%)

DC: R_f (*n*-Hex: EE/ 5:1)= 0.48

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3 mit Phenylhydrazin)

7.28- 7.30 (m, 4H, Aromat); 5.89 (s, 1H, C=CH); 3.07 (s, 1H, Acetylen);

1.31 (s, 2H, CH_2 -Gruppe); 1.28 (s, 6H, CH_3 -Gruppen); 1.22 (s, 6H, CH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(81.98); H(7.24); N(5.03); O(5.75)

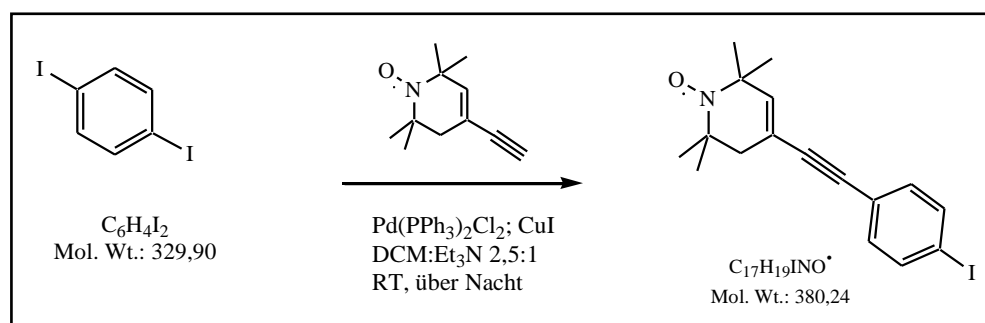
gemessen: C(81.96); H(7.25); N(4.77); O(6.02)

ESI(+/-): berechnet: 278.37

gemessen: 264.0; 265.3; 277.5

- Synthese von 4-(4-Iodo-phenyl-ethinyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydropiperidin-1-oxyl (**6**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem ausgeheizten Kolben werden 3.5mL abs. Dichlormethan und 1.5mL Triethylamin vorgelegt und entgast. Nachdem sich das 1,4-Di-iodo-benzol (5g/ 15.2mmol) gelöst hat, werden unter Argon- Atmosphäre 8mg (4mol-%) Kupferiodid und 5 mg (1mol-%) des Palladium(II)-Katalysators zugegeben. Die 50mg von 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-dehydropiperidin-1-oxyl-4-acetylen werden als Feststoff auf einmal hinzugegeben und der Ansatz unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird

fünfmal mit 5mL einer wässrigen 5%-igen Di-natrium-ethylen-di-amin-tetra-essigsäure-(EDTA)-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Die anschließende Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie. Als Laufmittel wird reines Dichlormethan verwendet. Das Produkt ist ein gelber Feststoff.

Ausbeute: 55mg (0.145mmol/ 52%)

DC: R_f (DCM)= 0.58

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3 mit Phenylhydrazin)

7.53-7.58 (d, 2H, Aromat, $J= 13.5\text{Hz}$); 5.89 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$); 1.31 (s, 2H, CH_2 -Gruppe); 1.28 (s, 6H, CH_3 -Gruppen); 1.22 (s, 6H, CH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(53.7); H(5.04); N(3.68); I(33.37); O(4,21)

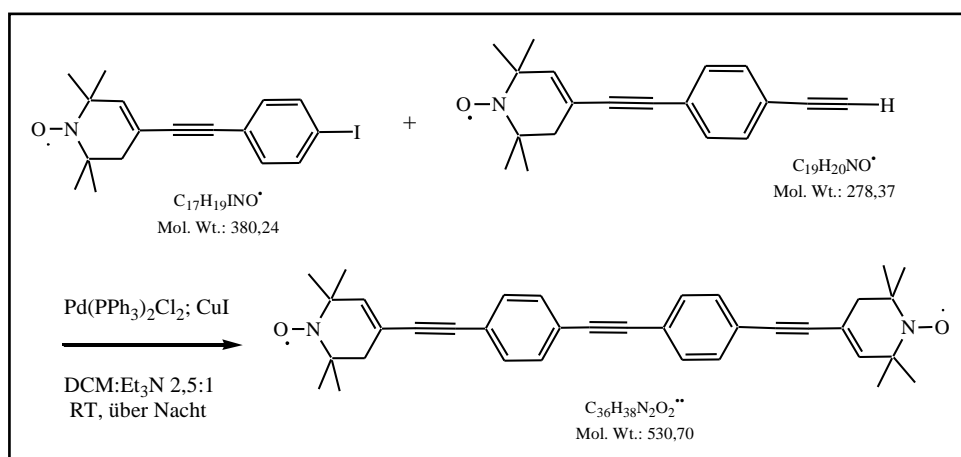
gemessen: C(53.57); H(4.99); N(3.50)

MALDI(+/-): berechnet: 380.24

gemessen: 380.91

- Synthese von System 1 (7)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem 25mL Schlenkkolben werden 2.5mL abs. Dichlormethan und 1.25mL Triethylamin vorgelegt und entgast. Anschließend werden im Argonstrom 37mg (0.097mmol) 4-(4-Iodophenyl-ethinyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1-oxyl, 27mg (0.097mmol) 4-(4-

Ethynyl-phenyl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1-oxyl, 10mg ($5.25 \cdot 10^{-5}$ mol) Kupferiodid und zuletzt 7 mg ($9.97 \cdot 10^{-6}$ mol) Palladium(II)-Katalysator zugegeben und unter Lichtausschuss über Nacht gerührt. Der Ansatz verfärbt sich nach einigen Minuten dunkelbraun. Die Reaktionslösung wird mit fünfmal mit 5mL einer wässrigen 5%-igen Dinatrium-ethylen-di-amin-tetra-essigsäure-(EDTA)-Lösung extrahiert und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Die Vorreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan). Nach der Kristallisation aus dem Ethanol/Chloroform- Gemisch erhält man einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 40mg (0.075mmol/ 80%)

DC: R_f (DCM)= 0.34

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3 mit Phenylhydrazin)

7.38 (s, 4H, Aromat); 7.34 (s, 4H, Aromat); 7.29 (s, 2H, Aromat); 5.89 (s, 2H, C=CH); 2.65 (s, 4H, CH_2 -Gruppe); 1.52 (s, 12H, CH_3 -Gruppen); 1.44 (s, 12H, CH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(81.47); H(7.22); N(5.28); O(6.03)

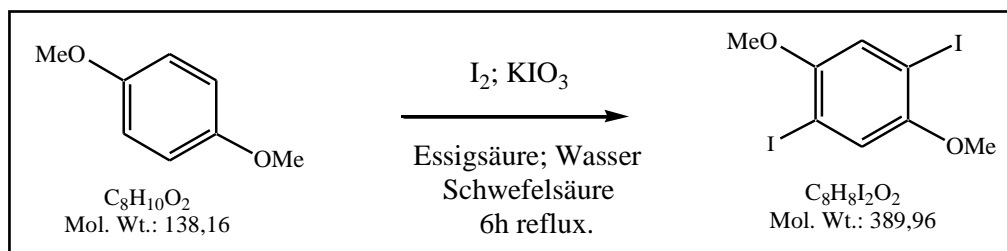
gemessen: C(79.10); H(7.41); N(4.46)

ESI(+/-): berechnet: 530.7

gemessen: 531.5; 532.5

- Synthese von 1,4-Di-iodo-2,5-di-methoxy-benzol (**8**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem 250mL Rundkolben werden 100mL Essigsäure (99.5%), 10mL dest. Wasser und 1mL konz. Schwefelsäure vorgelegt und mit 1g (7.24mmol) 1,4-Di-methoxy-benzol versetzt.

Nach Zugaben von 0.4eq (0.619g) Kaliumiodat und 1.1eq (2.02g) Iod wird der Ansatz sechs Stunden zum Sieden erhitzt. Die erhaltene Suspension wird so lange mit einer 20%-igen Natriumdithionit-Lösung versetzt bis die Iod-Färbung verschwindet. Anschließend filtriert man den Feststoff ab und wäscht mit kaltem Ethanol nach. Die Aufreinigung erfolgt mittels Umkristallisation aus Ethanol/ Chloroform-Gemisch. Das Produkt wird als farblose Kristalle erhalten.

Ausbeute: 1.55g (3.98mmol/ 55%)

DC: R_f (DCM)= 0.95

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

7.23 (s, 2H, Aromat); 3.87 (s, 6H; OCH_3 -Gruppen)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

153.39 (OCH_3 -Aromat); 121.69 (Aromat); 85.52 (I-Aromat);

57.24 (CH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(24.64); H(2.07); I(65.09); O(8.21)

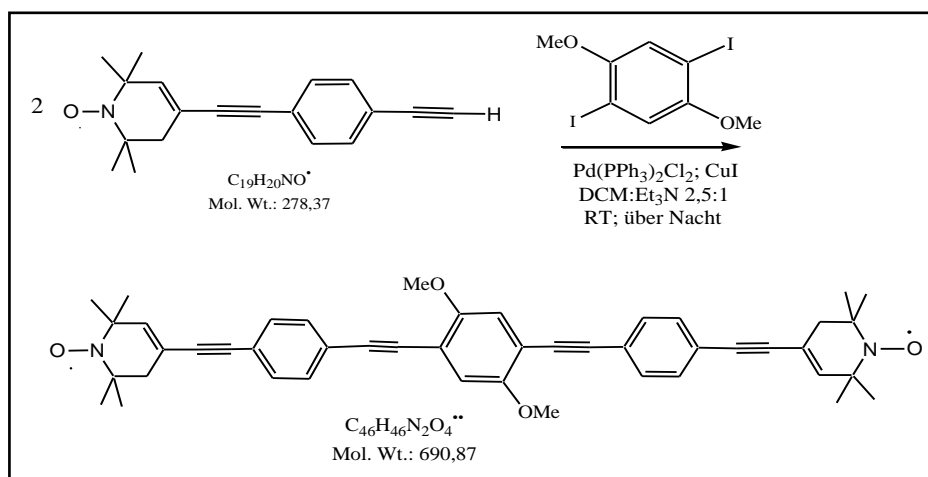
gemessen: C(24.72); H(2.15)

ESI(+/-): berechnet: 389.96

gemessen: 389.70

- Synthese von System 2 (**10**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem ausgeheizten Kolben werden unter Argon-Atmosphäre 2.5mL abs. Dichlormethan und 1.75mL Triethylamin vorgelegt und entgast. Anschließend werden 62mg (0.22mmol) 4-(4-Ethynyl-phenyl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1-oxyl, 43.3mg (0.5eq) 1,4-Di-iodo-2,5-di-methoxy-benzol, 0.8mg (2mol-%) Kupferiodid und 1.5mg (1mol-%) Bis(triphenylphosphin)-palladium(II)-di-chlorid zugegeben und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der Ansatz verfärbt sich von ursprünglich braun nach gelb. Der Niederschlag wird abfiltriert und chromatographisch gereinigt. Das Produkt ist ein gelbes Pulver.

Ausbeute: 42mg (0.06mmol/ 55%)

DC: R_f (DCM, Kieselgel)= 0.52

R_f (*n*-Hex/EE: 5/1; Aluminiumoxid)= 0.68

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

7.42- 7.44 (d, 4H, Aromat, $J= 8.4\text{Hz}$); 7.32- 7.34 (d, 4H, Aromat, $J= 8.4\text{Hz}$);

7.29 (s, 2H, Aromat); 5.89 (s, 2H, C=CH); 3.83 (s, 6H; OCH_3 -Gruppe);

2.33 (s, 4H, CH_2 -Gruppe); 1.29 (s, 12H, CH_3 -Gruppen); 1.22 (s, 12H,

CH_3 -Gruppen)

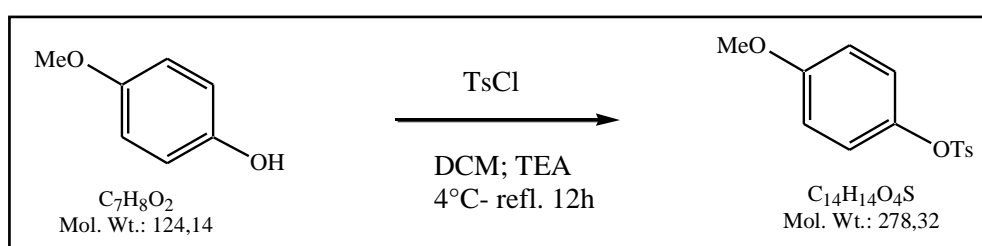
Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(79.97); H(6.71); N(4.05); O(9.26)

gemessen: C(79.92); H(7.14); N(2.77); O(10.17)

ESI(+/-): berechnet: 690.87

gemessen: 690.5; 691.5; 692.4

- Synthese von Toluol-4-sulfonylsäure-4-methoxy-phenylester (**17**)

Reaktionsgleichung:

Durchführung:

Die Reaktion wird unter trockenen Bedingungen durchgeführt. In einer Mischung von 60mL abs. Dichlormethan und 10mL Triethylamin werden 3g (0.024mol) Methoxy-phenol angelöst und auf 4°C abgekühlt. Anschließend werden portionsweise 5.57g (1.2eq/ 0.029mol) Tosylchlorid zugegeben. Der Ansatz wird 12h refluxiert. Die Lösung verfärbt sich rot-orange und ein Triethylammoniumsalz fällt aus. Dieses wird abfiltriert und das erhaltene Filtrat einrotiert. Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan aufgenommen, mit 50mL Wasser und 50mL gest. Natriumhydrogenkarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt kristallisiert aus wenig Methanol als farblose Nadeln aus.

Ausbeute: 7.311g (0.026mol/ 91%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 10/1)= 0.48

¹H-NMR: (δ[ppm], 250MHz, CDCl₃)

7.71-7.65 (dt, 2H, Toluol, $J_1 = 1.9\text{Hz}$, $J_2 = 8.5\text{Hz}$); 7.32-7.25 (d, 2H, Toluol, $J = 8.1\text{Hz}$); 6.91-6.72 (dd, 4H, Aromat, $J_1 = 3.4\text{Hz}$, $J_2 = 9.3\text{Hz}$); 3.76 (s, 3H, OCH₃-Gruppe); 2.44 (s, 3H, CH₃-Gruppe)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃)

158.09 (C-OCH₃); 145.22 (C-OTs); 142.96 (C-CH₃); 132.15 (C-S); 129.65 (Toluol); 128.50 (Toluol); 123.29 (Aromat); 114.37 (Aromat); 55.49 (OCH₃-Gruppe); 21.66 (CH₃-Gruppe)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(60.42); H(5.07); O(22.99); S(11.52)

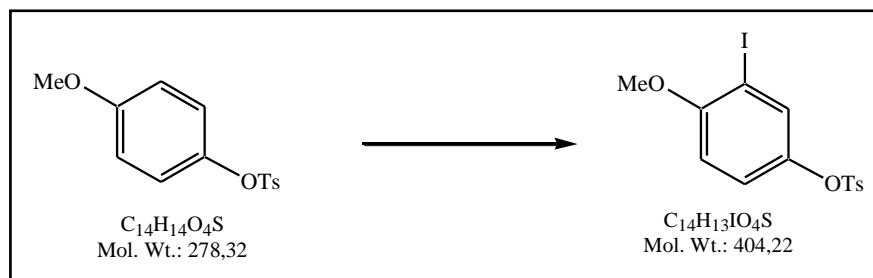
gemessen: C(60.37); H(5.17)

ESI(+/-): berechnet: 278.32

gemessen: 279.9; 295.9 [M+ Methyl]; 300.9 [M+ Na]

- Synthese von Toluol-4-sulfonylsäure-3-iodo-4-methoxy-phenylester (**18**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Eine Mischung aus 2.0g (7.186mmol) Methoxy-phenyl-tosylat, 0.4eq (0.614g) Kaliumiodat, 0.4eq (0.912g) Iod wird in 200mL Essigsäure, 20mL Wasser und 2mL konz. Schwefelsäure vorgelegt und 6 Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend mit Natronlauge neutralisiert und das ausgefallene Salz abfiltriert. Das Filtrat wird mit *n*-Hexan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gest. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: *n*-Hexan/Essigester 10/1). Das Produkt ist ein farbloser Feststoff.

Ausbeute: 1.654g (4.09mmol/ 57%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 10/1) = 0.59

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃)

7.72-7.67 (dt, 2H, Toluol, $J_1 = 1.9\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$); 7.35-7.30 (d, 2H, Toluol, $J = 8.0\text{Hz}$); 7.34-7.32 (d, 1H, in der Nähe des Halogens, $J = 2.7\text{Hz}$); 6.99-6.94 (dd, 1H, Aromat, $J_1 = 2.7\text{Hz}$, $J_2 = 8.9\text{Hz}$); 6.70-6.66 (d, 1H, Aromat, $J = 8.9\text{Hz}$); 3.84 (s, 3H, OCH₃-Gruppe); 2.46 (s, 3H, CH₃-Gruppe)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃)

157.01 (C-OCH₃); 145.54 (O-C(Aromat)); 143.01 (C-S); 133.18 (C-CH₃); 131.97 (2C, Toluol); 129.77 (2C, Toluol); 128.55 (C-C-I); 123.22 (C-C-OCH₃); 110.35 (C-C-Ts); 84.99 (C-I); 56.66 (OCH₃-Gruppe); 21.70 (CH₃-Gruppe)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(41.60); H(3.24); I(31.93); O(15.83); S(7.93)

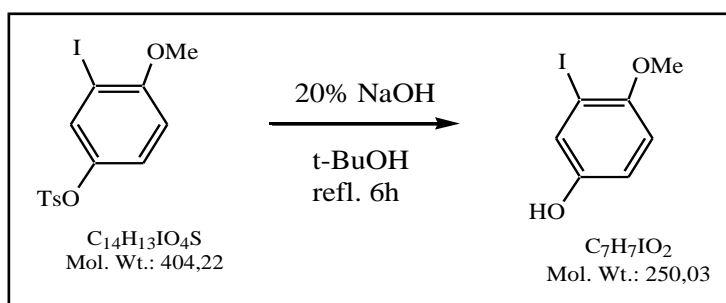
gemessen: C(41.43); H(3.34)

ESI(+/-): berechnet: 404.2

gemessen: 404.8

- Synthese von 3-Iodo-4-methoxy-phenol (**19**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem Rundkolben werden 1.004g (2.48mmol) Toluol-4-sulfonylsäure-3-iodo-4-methoxyphenylester in 5mL 20%-igen Natronlaube suspendiert und nach der Zugabe von 20eq (4.66mL) *t*-Butanol 6 Stunden zum Sieden erhitzt. Das Edukt löst sich in der Wärme und eine hell-gelbe Lösung wird beobachtet. Nach dem Abkühlen bringt man die Reaktionslösung mit 2N Salzsäure auf pH= 12, wobei Natriumchlorid ausfällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat mit Essigester und Dichlormethan extrahiert. Die organischen Fraktionen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: *n*-Hexan/ Essigester 20/1). Das Produkt ist ein farbloser, kristalliner Feststoff.

Ausbeute: 0.454g (1.82mmol/ 73%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 9/1)= 0.68

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

7.30-7.29 (d, 1H, neben dem Halogen, $J= 2.9\text{Hz}$); 6.82-6.79 (dd, 1H, Aromat, $J_1= 2.9\text{Hz}$, $J_2=8.8\text{Hz}$); 6.72-6.70 (d, 1H, Aromat, $J= 8.8\text{Hz}$); 4.75 (s, 1H, OH); 3.82 (s, 3H, OCH_3 -Gruppe)

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

152.71 (C-OCH₃); 149.94 (O-C(Aromat)); 126.23 (C-C-I); 115.94 (C-C-OCH₃);
111.68 (C-C-OH); 85.90 (C-I); 56.96 (OCH₃-Gruppe);

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(33.63); H(2.82); I(50.75); O(12.80)

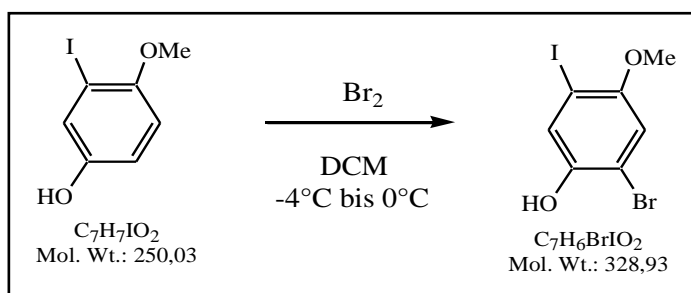
gemessen: C(33.84); H(2.89)

ESI(+/-): berechnet: 250.0

gemessen: 248.8

- Synthese von 2-Bromo-5-iodo-4-methoxy-phenol (**20**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem ausgeheizten Kolben werden unter Argon 0.4g (1.6mmol) 3-Iodo-4-methoxy-phenol in 10mL abs. Dichlormethan gelöst und die Lösung auf -4°C abgekühlt. Anschließend setzt man langsam 0.08mL (1eq) Brom gelöst in 2mL abs. Dichlormethan zu. Nach einer Reaktionszeit von 30min. bei 0°C wird der Ansatz mit 200mL Ether und 50mL dest. Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Ether extrahiert und die vereinigte organische Phase wird mit Wasser, zweimal mit 20%-iger Natriumthiosulfat-Lösung und Brine gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Die erhaltene braune Lösung in 50mL Heptan aufnehmen und bei -4°C auskristallisieren lassen. Das Produkt ist ein braun-kristalliner Feststoff.

Ausbeute: 0.463g (1.41mmol/ 88%)

DC: R_f (n-Hex/EE: 5/1) = 0.43

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3)

7.46 (s, 1H, neben Iodid-Ion); 6.89 (s, 1H, neben Bromid-Ion); 5.09 (s, 1H, OH);
3.82 (s, 3H, OCH_3 -Gruppe)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

153.04 (C- OCH_3); 147.37 (C-C-I); 126.40 (C-C-Br); 114.12 (C-C- OCH_3);
109.98 (C-Br); 85.57 (C-I); 57.41 (OCH_3 -Gruppe);

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(25.56); H(1.84); Br(24.29); I(38.58); O(9.73)

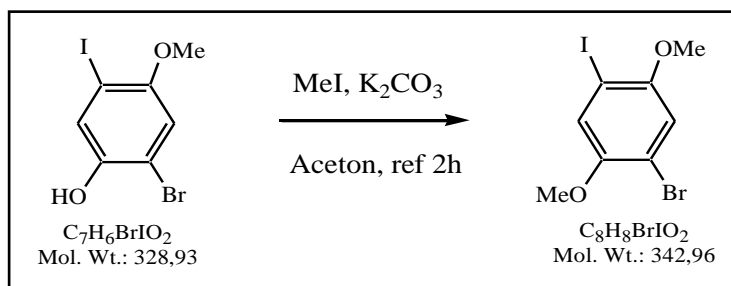
gemessen: C(25.03); H(1.84)

ESI(+/-): berechnet: 328.93

gemessen: 326.7; 328.7 [Isotope des Broms]; 313.7 [-Methyl]

- Synthese von 1-Bromo-4-iodo-2,5-dimethoxy-benzol (**11**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

0.2g (0.608mmol) Edukt und 1eq (92mg) Kaliumcarbonat werden mit 5mL trockenem Aceton versetzt und langsam mit in 1mL Aceton aufgenommenem Methyleniodin (1.1eq/ 0.042mL) versetzt. Der Ansatz wird zwei Stunden refluxiert und anschließend einrotiert. Der ölige Rückstand wird in 10mL Dichlormethan und 10mL Wasser aufgenommen und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Produkt kann ohne Reinigung weiter verwendet werden.

Ausbeute: 0.208g (0.61mmol/ quantitativ)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 5/1)= 0.60

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3)

7.29 (s, 1H, neben Iod); 7.01 (s, 1H, neben Brom); 3.85(s, 3H, OCH_3 -Gruppe);
3.83(s, 3H, OCH_3 -Gruppe)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

152.59 (C- OCH_3); 150.43 (C- OCH_3 neben Brom); 126.59 (C-C-I);
115.50 (C-C-Br); 111.41 (C-Br); 83.57 (C-I); 56.78 und 56.67 (OCH_3 -Gruppen);

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(28.02); H(2.35); Br(23.3); I(37.0); O(9.33)

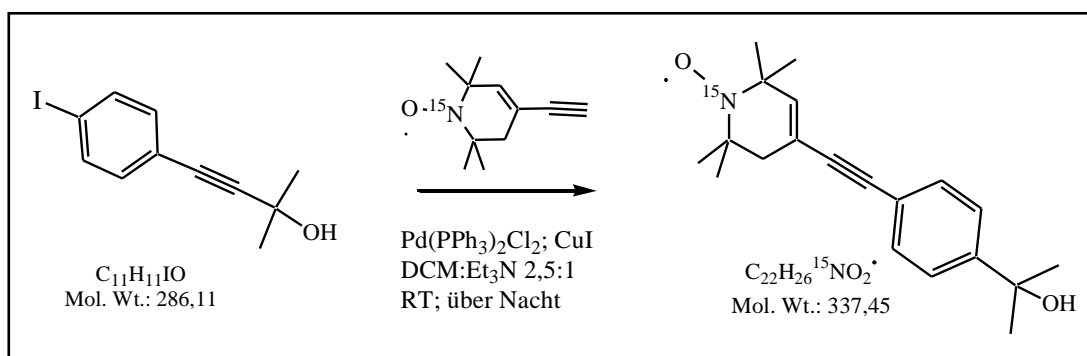
gemessen: C(29.95); H(2.80)

ESI(+/-): berechnet: 343.0

gemessen: 342.7; 328.6 [M-Methyl]

- Synthese von 4-[4-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-phenyl-ethinyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1 ^{15}N -oxyl (**4.2***)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

1.75mL abs. Dichlormethan und 0.75mL Triethylamin werden in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt und entgast. Unter einer Argon- Atmosphäre werden 0.088g (0.31mmol) (4-(4-Iodo-phenyl)-2-methyl-but-3-in-2-ol), 2.1mg (4mol-%) Kupferiodid, 6.4mg (2mol-%) des Palladium(0)-Katalysators und 0.05g (1eq) 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin- ^{15}N -oxyl-4-acetylen hinzugegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur und Lichtausschluss über Nacht gerührt. Anschließend mit fünfmal 5mL einer wässrigen 5%-igen Di-natrium-ethylen-di-amin-tetra-essigsäure-Lösung extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die

Aufreinigung erfolgt mittels Chromatographie. Als Laufmittel wird *n*-Hexan/ Essigester 10/1 verwendet. Das Produkt wird als orangefarbene Kristalle isoliert.

Ausbeute: 0.76mg (0.225mmol/ 81%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 10/1)= 0.44

¹H-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃ mit Phenylhydrazin)

7.27-7.29 (d, 4H; Aromat, J= 5.6Hz); 5.88 (s, 1H; C=CH); 2.27 (s, 2H; CH₂-Gruppe); 1.55 (s, 6H, 2 CH₃-Gruppen); 1.25 (s, 6H, 2 CH₃-Gruppen); 1.18 (s, 6H; 2 CH₃-Gruppen)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃ mit Phenylhydrazin)

138.5 (sp²-C im Radikal); 131.68 (4C des Aromaten); 128.4 (sp²-C am Acetylen); 122.57 (Phenyl-C am Acetylen); 95.68 und 97.92 (Acetylen-C); 81.93 und 88.03 (Acetylen-C am Phenyl); 65.80 (C(CH₃)₂); 58.88 und 61.44 (2 C(CH₃)₂); 43.08 (CH₂-Gruppe); 31.70 (2 CH₃-Gruppen); 22.85 (4 CH₃-Gruppen)

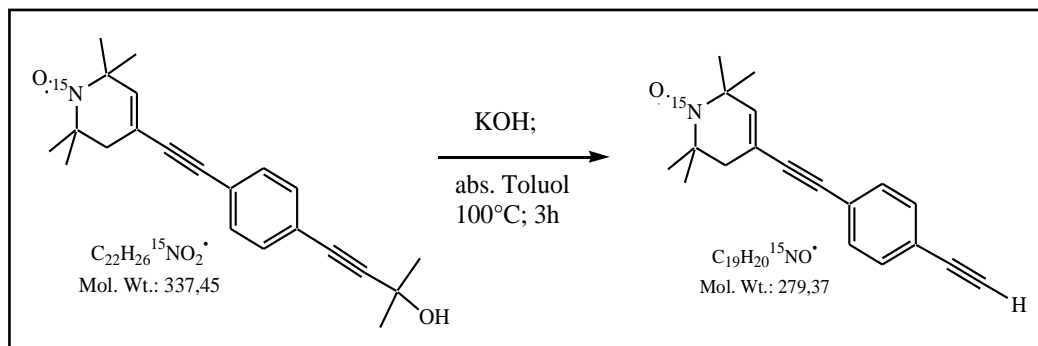
Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(78.31); H(7.77); N(4.45); O(9.48)

gemessen: C(74.81); H(7.43); N(3.50)

ESI(+/-): berechnet:337.45

gemessen: 337.4; 339.1 [M+2H⁺]

- Synthese von 4-(4-Ethynyl-phenyl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1¹⁵N-oxyl (**5.2***)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

0.076g (0.225mmol) 4-[4-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-phenyl-ethynyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-1¹⁵N-oxyl werden in 3mL abs. Toluol gelöst und mit 8eq (101mg) Kaliumhydroxid versetzt. Der Ansatz wird 2 Stunden bei 100°C gerührt. Nach dem Abkühlen versetzt man die Reaktionslösung mit 5mL Wasser und extrahiert die wässrige Phase mit Toluol/ Dichlormethan-Gemisch. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingeeignet. Als Laufmittel für die Säulenchromatographie wird *n*-Hexan/ Essigester 5:1 verwendet. Das Produkt liegt als ein orangefarbener Feststoff vor.

Ausbeute: 36mg (0.129mmol/ 58%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 5/1)= 0.47

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, CDCl₃ mit Phenylhydrazin)

7.28-7.30 (m, 4H, Aromat); 5.89 (s, 1H, C=CH); 3.07 (s, 1H, Acetylen);

1.31 (s, 2H, CH₂-Gruppe); 1.28 (s, 6H, CH₃-Gruppen);

1.22 (s, 6H, CH₃-Gruppen)

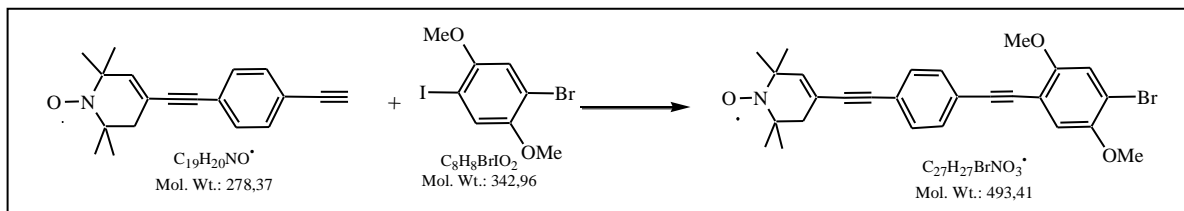
Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(81.69); H(7.22); N(5.37); O(5.73)

gemessen: C(81.47); H(7.25); N(5.08)

ESI(+/-): berechnet: 279.37

gemessen: 265.0; 279.4

- Synthese von 4-[4-(4-Bromo-2,5-dimethoxy-phenylethynyl)-phenylethynyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-N-oxyl (**12**)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

Das vorgelegte Gemisch aus 0.75mL Triethylamin in 1.75mL abs. Tetrahydrofuran wird durch das abwechselnde Anlegen von Vakuum und Argon entgast. Anschließend versetzt man die Lösung der Reihe nach mit 1.1eq (41mg) 1-Bromo-4-iodo-2,5-dimethoxy-benzol, 0.8mg (4mol-%) Kupferiodid, 1.5mg (2mol-%) Bis(triphenylphosphin)-palladium(II)-di-chlorid und 30mg (1eq/0.108mmol) 4-(4-Ethynyl-phenyl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydro-piperidin-N-oxyl. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss über eine Dauer von 20 Stunden. Nach Ablauf der Reaktion wird die Mischung mit einer 5%-igen EDTA-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und die organische Phase einrotiert. Das saubere Produkt erhält man nach der Säulenchromatographie mit *n*-Hex/EE 5/1.

Ausbeute: 44mg (0.089mmol/83%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 5/1)= 0.41

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃ mit Phenylhydrazin)

7.28-7.30 (m, 4H, Aromat); 5.89 (s, 1H, C=CH); 3.07 (s, 1H, Acetylen);

1.31 (s, 2H, CH₂-Gruppe); 1.28 (s, 6H, CH₃-Gruppen);

1.22 (s, 6H, CH₃-Gruppen);

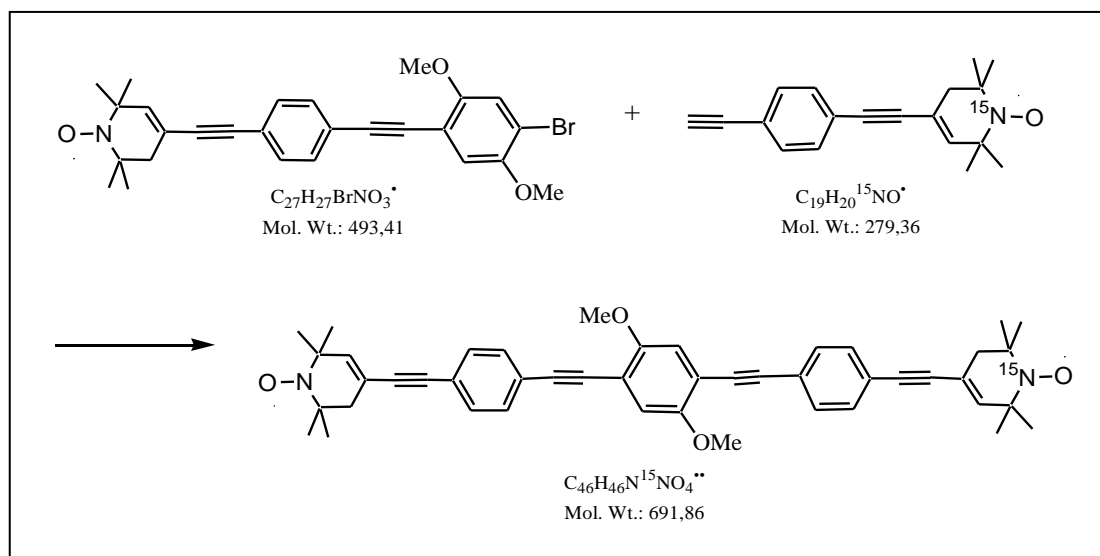
Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(65.72); H(5.52); N(2.84); O(9.73); Br(16.19)

gemessen: C(65.95); H(5.65); N(2.55)

ESI(+/-): berechnet: 493.4

gemessen: 493 [M]; 494; 495 und 496

- Synthese von System Modell 3 (13)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

In einem ausgeheizten Kolben werden unter Argon-Atmosphäre 2mL Triethylamin, 1mL abs. Dichlormethan, 11mg (1.1eq) 4-(4-Ethynyl-phenyl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydropiperidin-1-¹⁵N-oxyl und 20mg (1eq) 4-[4-(4-Bromo-2,5-dimethoxy-phenylethynyl)-phenylethynyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,4-dehydropiperidin-N-oxyl vorgelegt und entgast. Anschließend werden unter Argon-Gegenstrom 0.8mg (2mol-%) Kupferiodid und 1.5 mg (1mol-%) Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) zugegeben und unter Lichtausschluss bei 55°C 5.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Der Ansatz verfärbt sich von ursprünglich braun nach gelb. Die Reaktionslösung wird mit 5-%igen EDTA-Lösung gewaschen, einrotiert und chromatographisch gereinigt. Das Produkt wird als gelbes Pulver erhalten.

Ausbeute: 9mg (0.0013mmol/ 32%)

DC: R_f (DCM; Kieselgel)= 0.52 oder R_f (*n*-Hex/EE: 5/1; Aluminiumoxid)= 0.68

¹H-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃)

7.43-7.45 (d, 2H, Aromat, J= 8.5Hz); 7.39-7.41 (d, 2H, Aromat, J= 8.5Hz);

7.31-7.34 (d, 4H, Aromat, J= 8.5Hz); 7.29 (s, 2H, Aromat); 5.89 (s, 2H, C=CH);

3.81-8.35 (pd, 6H; OCH₃-Gruppe); 2.54 (s, 4H, CH₂-Gruppe); 1.44 (s, 12H, CH₃-

Gruppen); 1.37 (s, 12H, CH₃-Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(79.97); H(6.71); N(4.05); O(9.26)

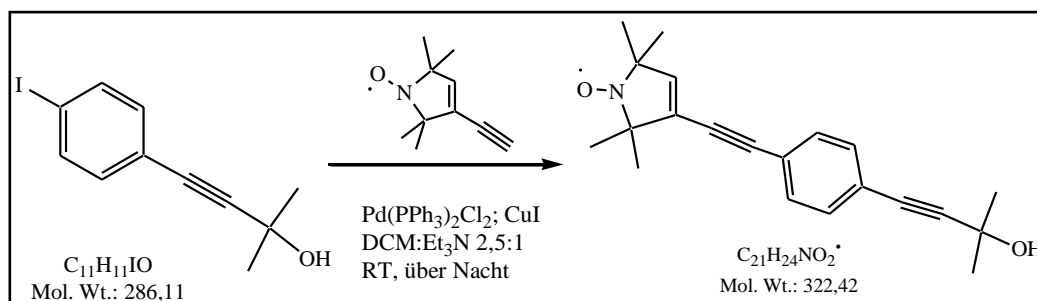
gemessen: C(76.71); H(7.07); N(3.41); O(12.81)

ESI(+/-): berechnet: 691.9

gemessen: 691.4 und 692.4 [M+H⁺]

- 3-[4-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-phenylethynyl]-2,2,5,5-tetramethyl-3,4-dihydro-pyrrol-1-oxyl (**4.1**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

7.5mL abs. Dichlormethan und 3mL Triethylamin werden in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt und entgast. Unter einer Argon- Atmosphäre werden 0.25g (0.87mmol) (4-(4-Iodophenyl)-2-methyl-but-3-in-2-ol), 6.6mg (2mol-%) Kupferiodid, 12mg (1mol-%) des Palladium(II)-Katalysators und 0.145g (1eq; 0.87mmol) 2,2,5,5-Tetramethyl-3pyrrolin-1-oxyl-acetylen hinzugegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur und Lichtausschluss über Nacht gerührt. Anschließend mit fünfmal 10mL einer wässrigen 5% -igen Di-natrium-ethylen-di-amin-tetra-essigsäure-Lösung extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Chromatographie. Als Laufmittel wird *n*-Hexan/ Essigester 5/1 verwendet. Das Produkt wird als gelber Feststoff isoliert.

Ausbeute: 0.222g (0.69mmol/ 79%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 5/1)= 0.24

¹H-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, CDCl₃)

7.28-7.31 (m, 4H; Aromat); 5.87 (s, 1H; C=CH); 1.57 (s, 6H, 2 CH₃- Gruppen);

1.30 (s, 6H, 2 CH₃-Gruppen); 1.26 (s, 6H; 2 CH₃-Gruppen)

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3 mit Phenylhydrazin)

139.81 (sp^2 -C im Radikal); 131.77 (4 C des Aromaten); 128.51 (sp^2 -C am Acetylen); 122.90 (Phenyl-C am Acetylen); 95.68 und 97.92 (Acetylen- C); 81.93 und 85.36 (Acetylen-C am Phenyl); 65.75 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 53.93 und 55.61 (2 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 31.90 (2 CH_3 -Gruppen); 25.12 und 25.62 (4 CH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(78.23); H(7.50); N(4.34); O(9.92)

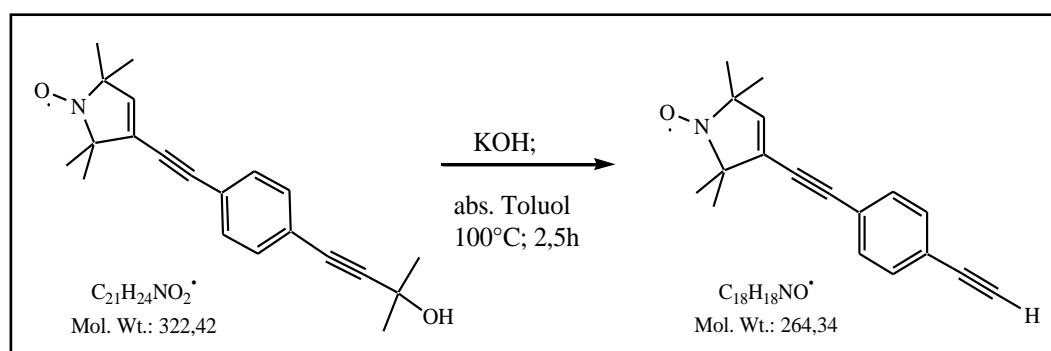
gemessen: C(77.97); H(7.51); N(3.93); O(10.59)

ESI(+/-): berechnet: 322.4

gemessen: 322.5; 323.7 $[\text{M}+\text{H}^+]$ und 324.2 $[\text{M}+2\text{H}^+]$

- 3-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-2,2,5,5-tetramethyl-3,4-dihydro-pyrrol-1-oxyl (**5.1**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

93.5mg (0.29mmol) 3- [4-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-phenylethynyl]-2,2,5,5-tetramethyl-3,4-dihydro-pyrrol-1-oxyl werden in 6mL abs. Toluol gelöst und mit 8eq (130mg) Kaliumhydroxid versetzt. Der Ansatz wird 2.5 Stunden bei 100°C gerührt. Nach dem Abkühlen versetzt man die Reaktionslösung mit 5mL Wasser und extrahiert die wässrige Phase mit Toluol/ Dichlormethan-Gemisch. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Als Laufmittel für die Säulenchromatographie wird *n*-Hexan/ Essigester 5/1 verwendet. Das Produkt ist ein gelber Feststoff.

Ausbeute: 66mg (0.25mmol/ 86%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 5/1)= 0.56

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3 mit Phenylhydrazin)

7.32-7.34 (m, 4H, Aromat); 5.90 (s, 1H, C=CH); 3.08 (s, 1H, Acetylen);

1.33 (s, 6H, CH_3 -Gruppen); 1.26 (s, 6H, CH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(81.79); H(6.86); N(5.30); O(6.05)

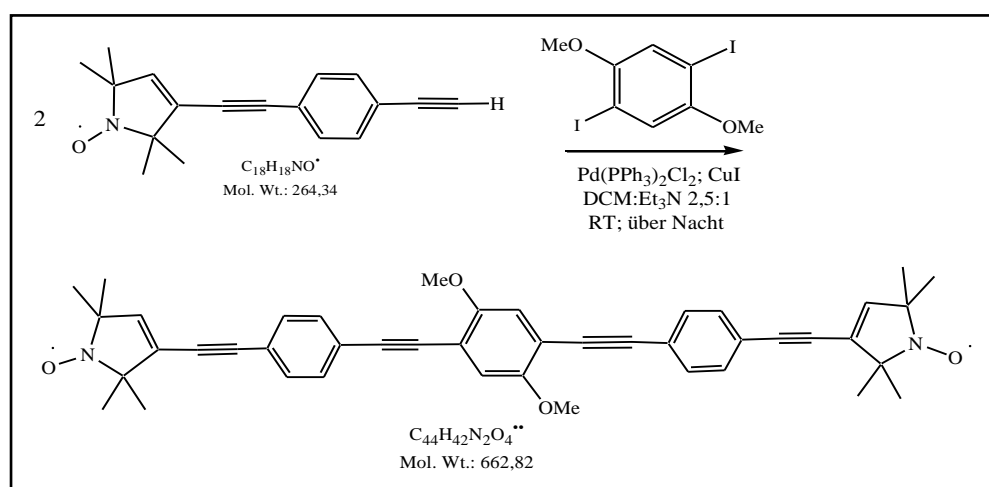
gemessen: C(81.85); H(6.82); N(4.85); O(6.48)

ESI(+/-): berechnet: 264.3

gemessen: 249.9; 251.0 und 266.0 $[\text{M}+\text{H}^+]$

- Synthese von System 4 (**9**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem ausgeheizten Kolben werden unter Argon-Atmosphäre 2.5mL abs. Dichlormethan und 1.75mL Triethylamin vorgelegt und entgast. Anschließend werden 40mg (0.15mmol) 3-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-2,2,5,5-tetramethyl-3,4-dihydro-pyrrol-1-oxyl, 30mg (0.5eq) 1,4-Di-iodo-2,5-di-methoxy-benzol, 0.2mg (2mol-%) Kupferiodid und 1.2mg (4mol-%) Bis(triphenylphosphin)-palladium(II)-di-chlorid zugegeben und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der Ansatz verfärbt sich von ursprünglich braun nach

gelb. Die Reaktionslösung wird eingengt. Anschließend wird der Niederschlag abfiltriert und chromatographisch gereinigt. Das Produkt wird als leicht gelbes Pulver erhalten.

Ausbeute: 26mg (0.039mmol/ 51%)

DC: R_f (DCM; Kieselgel)= 0.25

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

7.44-7.48 (pd, 4H, Aromat, $J= 8.3\text{Hz}$); 7.34-7.38 (d, 4H, Aromat, $J= 8.3\text{Hz}$);

7.29 (s, 2H, Aromat); 5.29 (s, 2H, $\text{C}=\text{CH}$); 3.84 (s, 6H; OCH_3 -Gruppe);

1.30-1.50 (m, 24H, CH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(79.73); H(6.39); N(4.23); O(9.66)

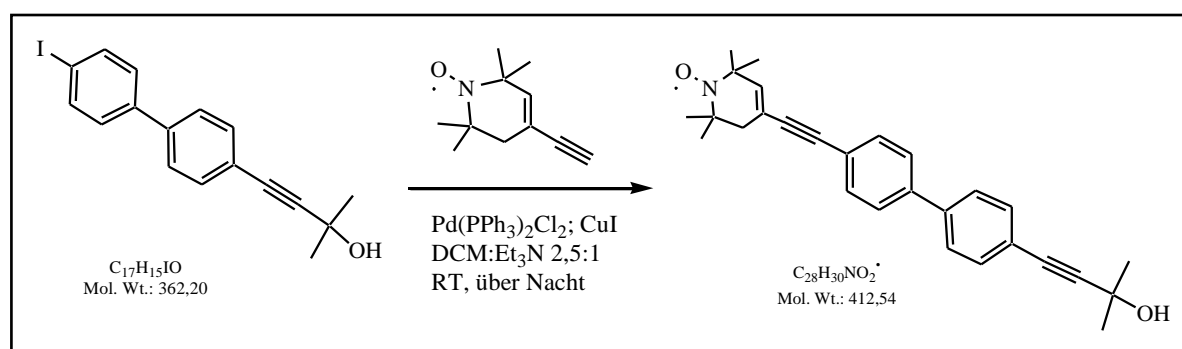
gemessen: C(75.83); H(6.57); N(3.99); O(13.61)

ESI(+/-): berechnet: 662.8

gemessen: 663.6 [$\text{M}+\text{H}^+$]; 665.2 [$\text{M}+2\text{H}^+$]

- Synthese von 4-[4'-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-biphenyl-4-yl-ethynyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-oxyl (**14**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

7.5mL abs. Dichlormethan und 5.25mL Triethylamin werden in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt und entgast. Unter einer Argon-Atmosphäre werden 104mg (0.288mmol/ 1.03eq) (4-(4-Iodo-biphenyl)-2-methyl-but-3-in-2-ol), 8.5mg (8mol-%) Kupferiodid, 13mg (4mol-%) des Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) und 50mg (1eq) 2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-

dehydro-piperidin-1-oxyl-4-acetylen hinzugegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur und Lichtausschluss über Nacht gerührt. Der Ansatz wird ohne weitere Schritte einrotiert und sofort mittels Chromatographie aufgereinigt. Als Laufmittel wird *n*-Hexan/ Essigester 5/1 verwendet. Das Produkt liegt in Form von farblosen Kristallen vor.

Ausbeute: 91mg (0.22mmol/ 78%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 5/1)= 0.13

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

7.48-7.72 (m, 8H), 6.03 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 2.21 (s, 2H), 1.48 (s, 6H),

1.18 (s, 6H), 1.10 (s, 6H)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(81.52); H(7.33); N(3.40); O(7.76)

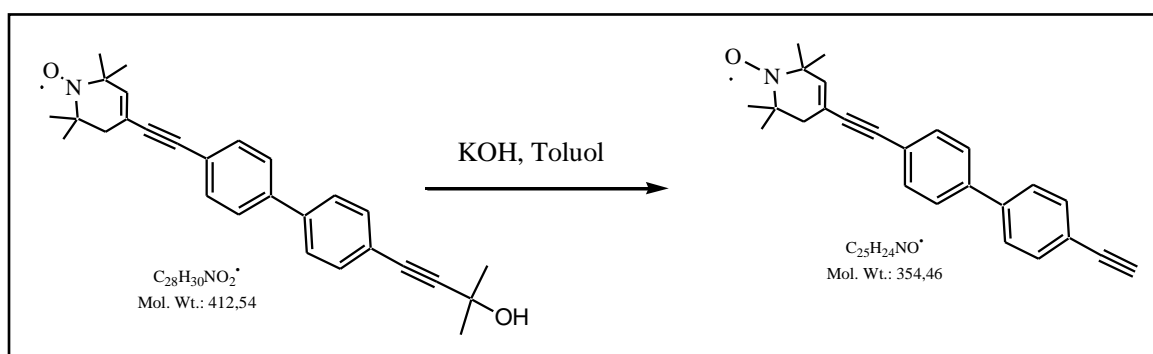
gemessen: C(81.27); H(7.34); N(3.12); O(8.27)

MALDI(+/-): berechnet: 412.5

gemessen: 414.5 [$\text{M}+2\text{H}^+$]; 399.6 [M-O-Radikal] und 384.3 [M-2x O]

- Synthese von 4-(4'-Ethynyl-biphenyl-4-yl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-oxyl (**15**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

50mg (0.121mmol) 4-[4'-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)-biphenyl-4-yl-ethynyl]-2,2,6,6-tetramethyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-oxyl (**14**) werden in abs. Toluol gelöst und nach der Zugabe von 54mg (8eq) Kaliumhydroxid zwei Stunden bei 110°C gerührt. Das nicht gelöste

Kaliumhydroxid wird abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie mit reinem Dichlormethan. Das Produkt wird als leicht gelbes Pulver gewonnen.

Ausbeute: 35mg (0.098mmol/ 82%)

DC: R_f (DCM)= 0.52

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3)

7.43-7.47 (m, 8H), 5.88 (s, 1H), 3.04 (s, 1H), 1.53 (s, 6H), 1.46 (s, 6H)

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(84.71); H(6.82); N(3.95); O(4.51)

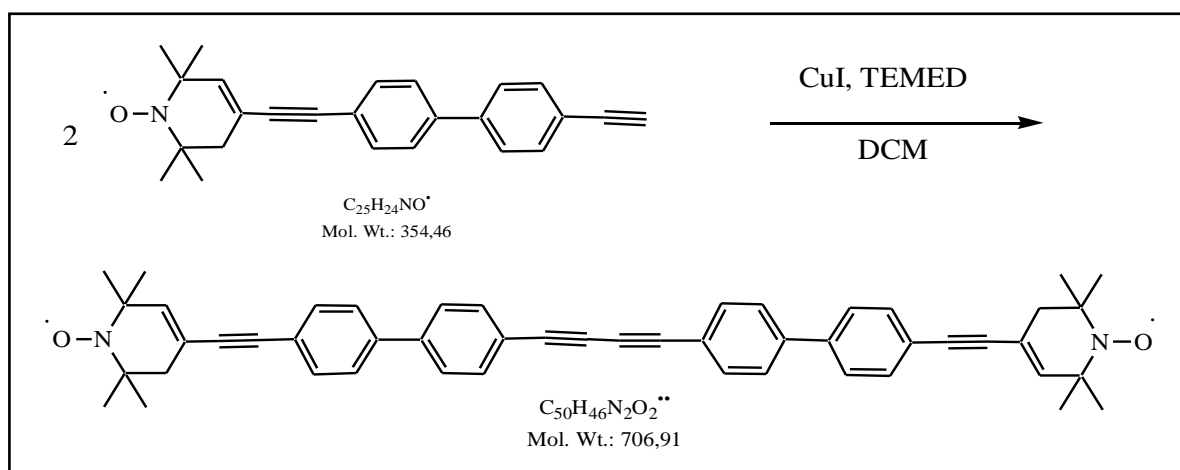
gemessen: C(84.26); H(7.22); N(3.22); O(5.30)

MALDI(+/-): berechnet: 354.5

gemessen: 352.6 [$\text{M}-2\text{H}^+$]

- Synthese von System 5 (**16**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Das Homo-Kupplungsprodukt aus 70mg (0.197mmol/ 2eq) 4-(4'-Ethynyl-biphenyl-4-yl-ethynyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-oxyl wird mit 75.6mg (2eq) Kupferiodid, 47.6mg (2eq) TMEDA in 5.6mL abs. Dimethylformamid gelöst. Die Reaktion läuft bei Normalatmosphäre bei 50°C 5.5 Stunden. Die gefärbte Lösung wird mit

Natriumthiosulfat gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Die Isolierung des orange-gelben Produktes erfolgt mittels Säulenchromatographie mit reinem Dichlormethan. Das Produkt ist nur in der Reaktionsmischung löslich und kann nach der Chromatographie sofort ausfallen.

Ausbeute: 59mg (0.083mmol/ 84%)

DC: R_f (DCM)= 0.22

Elementaranalyse (m/w): berechnet: C(84.95); H(6.56); N(3.96)

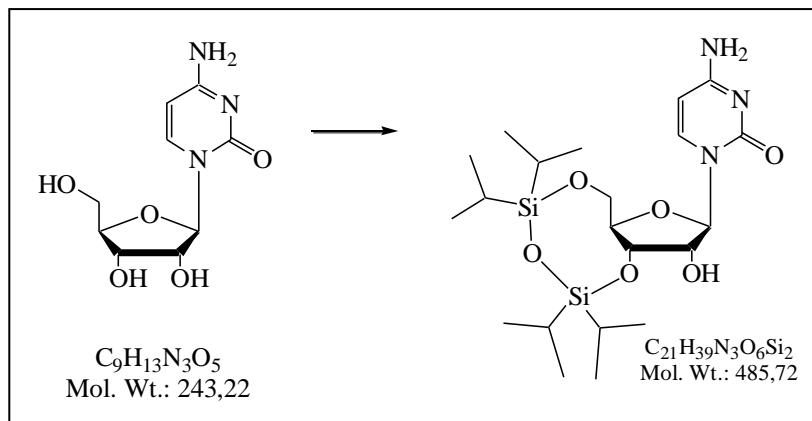
gemessen mit 1eq H₂O: C(83.71); H(6.51); N(3.14)

MALDI(+/-): berechnet: 707

gemessen: 722 [M-15H⁺] Reduktion der ungesättigten Bindungen

6.3 Verkürzte Synthese von 5-Iodo-Cytidin

- Synthese von 3',5'-*O*-tetraisopropyldisiloxan-Cytidin (**21**)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

2g (8.22mmol) Cytidin werden in 20mL abs. Pyridin gelöst und auf Eis mit der Schutzgruppe (2.8ml) versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel eingedampft. Der ölige Rückstand wird zweimal mit Toluol ko-evaporiert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (EE/MeOH: 97/3 und 0.5% TEMED). Das Produkt wird als farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 3.954g (8.14mmol/ 99%)

DC: R_f (EE/MeOH: 97/3) = 0.29

1H -NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

7.89 und 7.57 (2bs, 2H, NH₂-Gruppe); 7.78-7.76 (d, 1H, J = 7.6Hz, H(6));
 5.81-5.78 (d, 1H, J = 7.6Hz, H(5)); 5.65 (bs, 1H, OH(2')); 5.54 (s, 1H, H(1'));
 4.18-4.14 (d, 1H, J = 13.4Hz, H(5')); 4.09-4.05 (m, 1H, H(3')); 4.03-4.00
 (m, 2H, H(2' und 4')); 3.93-3.88 (dd, 1H, J₁ = 2.15Hz, J₂ = 13.4Hz, H(5'));
 1.06-0.97 (m, 28H, SiCH(CH₃)₂)

^{13}C -NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

163.94 (C-N); 152.60 (C=O); 140.71 (C(H6)); 93.23 (C(H5)); 90.82 (CH1'));
 80.63 C(H4')); 73.81 C(2')); 68.36 C(H3')); 59.95 C(H5')); 17.34, 17.23, 17.15,
 17.09, 16.88, 16.82, 16.76 und 16.72 (8C, SiCH(CH₃)₂); 12.72, 12.40, 12.32
 und 11.90 (4C, SiC)

Elementaranalyse: berechnet: C(51.93); H(8.09); N(8.65); O(19.76); Si(11.56)

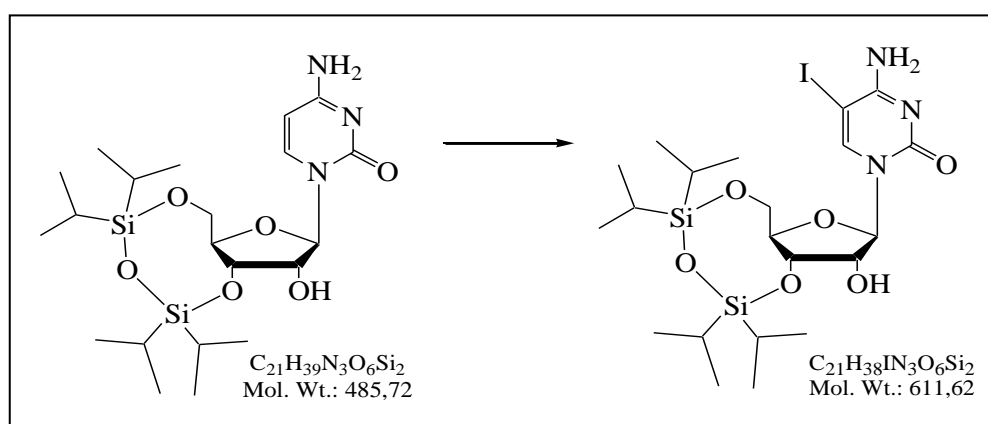
gefunden: C(51.93); H(8.07); N(8.48)

ESI(+/-): berechnet: 485.7

gefunden: 486.5 [M+H⁺] und 487.4 [M+2H⁺]

- Synthese 5-Iodo-3',5'-*O*-tetrakispropyldisiloxan-Cytidin (**22**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

5g (10.29mmol) Markievicz- geschütztes Cytidin werden in einer Mischung aus 40mL Tetrachlorkohlenstoff und 40mL 100%-igen Essigsäure gelöst und mit 0.6eq (1.568g) Iod versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf 40°C erwärmt. Nach der Zugabe von einer Iodsäure-Lösung (1.1eq/ 2g Iodsäure in 4mL Wasser) wird der Ansatz 20 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel einrotiert und das erhaltene Öl mehrfach mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wird in Dichlormethan gelöst und wenn notwendig filtriert. Das Filtrat wird mit Natriumthiosulfat- und Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (Chloroform/ *i*-Propanol: 25/1).

Ausbeute: 2.83g (4.6mmol/ 45%)

DC: R_f (Chloroform/*i*-Propanol: 25/1)= 0.23

- Weitere Synthesemöglichkeit von 5-Iodo-3',5'-*O*-tetraisopropyl-disiloxan-Cytidin

Durchführung:

Bei 50°C und unter Lichtausschluss werden 3.631g (7.476mmol) Markievicz- geschütztes Cytidin und 1.1eq (1.907g) *N*-Iodsuccinimid in 20mL abs. Dimethylformamid 4 Stunden gerührt. Nach der Evaporation des Lösungsmittels wird der Rückstand in wenig Dichlormethan aufgenommen und mit gest. Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (DCM /*i*-Pro: 99.5/0.5 bis 95 /5).

Ausbeute: 3.338g (5.457mmol/ 73%)

¹H-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

7.89 (s, 1H, H6); 7.83 und 6.4 (2s, 2H, NH₂-Gruppe); 5.56-5.54 (d, 1H, J= 4.4Hz, H1'); 5.49 (s, 1H, 2'-OH); 4.17-4.13 (bd, 1H, J= 12.6Hz, H5'); 4.11-4.07 (m, 1H, H3'); 4.03-3.98 (m, 2H, H2' und 4'); 3.91-3.87 (dd, 1H, J₁= 2.5Hz, J₂= 13.4Hz, H5'); 1.07, 1.04 und 1.03 (3s, 28H, SiCH(CH₃)₂-Gruppen)

¹³C-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

163.87 (C-NH₂); 153.63 (C=O); 145.98 (C(6)); 91.11 (C(H1')); 80.76 (C(H4')); 73.72 (C(H2')); 68.31 (C(H3')); 59.75 (C(H5')); 56.54 (C-I); 17.56, 17.48, 17.31, 17.27, 17.09, 16.89, 16.81 und 16.75 (8C, SiCH(CH₃)₂-Gruppe); 12.81, 12.39, 12.18 und 11.95 (4C, SiC)

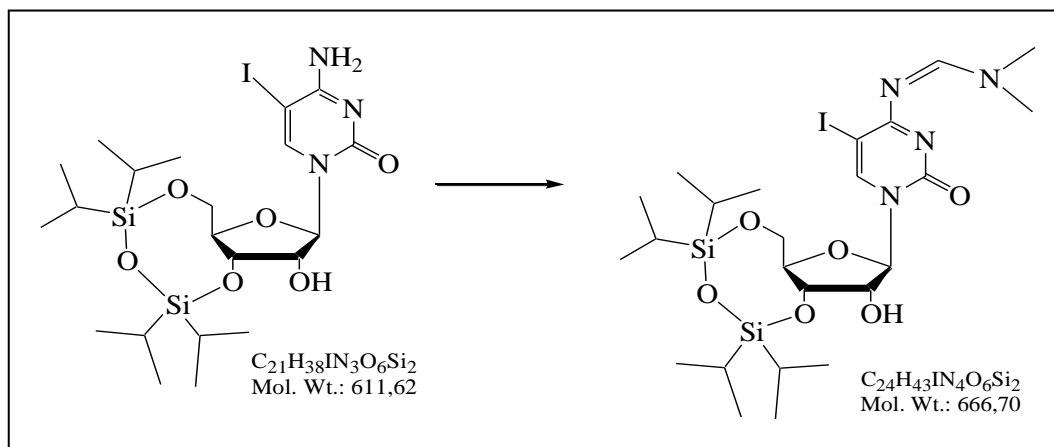
Elementaranalyse: berechnet: C(41.24); H(6.26); N(6.87); O(15.70); I(20.75); Si(9.18)

gefunden: C(43.18); H(6.82); N(6.11)

ESI(+/-): berechnet: 611.6

gefunden: 612.4 [M+H⁺]; 613.5; 614.4 und 615.3 durch Iod-Isotopen bedingt

- Synthese von 5-Iodo-3',5'-*O*-tetrakispropyldisiloxan-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-Cytidin (**23**)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

1.431g (2.34mmol) des iodierten Cytidins werden in 10mL abs. Dimethylformamid gelöst und mit 5eq (1.64mL) *N,N*-Dimethyl-formamid-dimethylacetal versetzt. Die Reaktion wird über Nacht bei 50°C gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Die Aufreinigung kann ohne Waschen mittels Säulenchromatographie erfolgen.

Ausbeute: 905mg (1.357mmol/ 58%)

DC: R_f (*n*-Hex/Aceton/TEMED: 65/35/5%)= 0.43

¹H-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

8.57 (s, 1H, N=CH); 8.07 (s, 1H, H6); 5.65-5.63 (d, 1H, J= 6.8Hz, OH(2'));
 5.51 (s, 1H, H(1')); 4.21-4.15 (d, 1H, J= 21.4, H(5')); 4.14-4.01 (m, 3H, H(3, 2'
 und 4')); 3.93-3.87 (dd, 1H, J₁= 2.4Hz, J₂= 21.4Hz, H(5')); 3.21 und 3.12 (2s, 6H,
 N(CH₃)-Gruppen); 1.07, 1.00 und 0.97 (3s, 28H, SiCH(CH₃)₂-Gruppen)

¹³C-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

168.13 (C=O); 158.30 (C=N); 153.86 (C(4)); 145.96 (C(6)); 91.37 (C(H1')); 80.77
 C(H4')); 73.66 (C(H2')); 69.78 (C(H3')); 59.93 (C(H5')); 55.91(C-I); 40.78 und
 34.83 (C-N(CH₃)); 17.52, 17.42, 17.24, 16.81, 16.72 und 16.67 (8C,
 SiCH(CH₃)₂-Gruppe); 12.72, 12.32, 12.08 und 11.87 (4C, SiC)

Elementaranalyse: berechnet: C(43.24); H(6.50); N(8.40); O(14.40); I(19.03); Si(8.43)

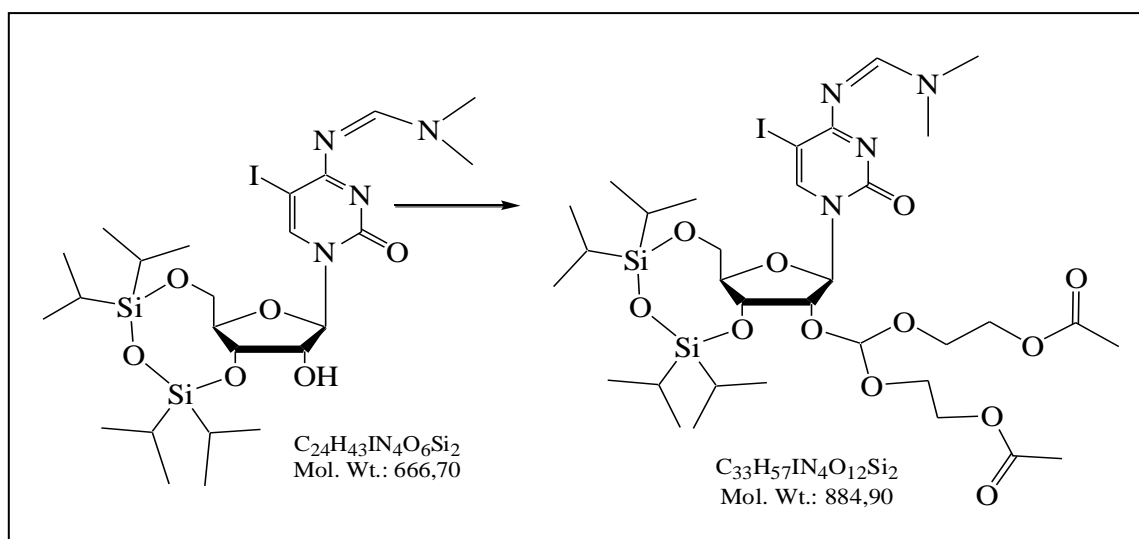
gefunden: C(43.11); H(6.54); N(8.18)

ESI(+/-): berechnet: 666.7

gefunden: 667.5 [M+H⁺]; 668.5 und 669.5 durch Iod-Isotopen bedingt

- Synthese von 5-Iodo-2'-*O*-bis(acetoxyethoxy)methylester-3',5'-*O*-tetra-isopropylidisiloxan-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-Cytidin (**24**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Die Reaktion erfolgt in einem ausgeheizten Kolben und unter Argonatmosphäre.

Das Edukt (1.55g/ 2.32mmol), Orthoester (1.73g/ 2.3eq) und Pyridinium-*para*-Toluolsulfonsäure (116.6mg/ 0.2eq) werden in 15mL Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur 5 Stunden gerührt. Anschließend wird der Ansatz mit 1.8eq (1mL) Tert-butyl-dimethyl-siloxy-3-pent-2-on und mit einem weiteren Drittel Orthoester versetzt und 5 Tage reagieren lassen. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 185µL TEMED gestoppt und das Lösungsmittel evaporiert. Das Produkt wird mittels einer präparativen Chromatographie (EE/*n*-Hex/MeOH/TEMED: 50/49/1/0.5) gereinigt.

Ausbeute: 1.543g (1.744mmol/ 75%)

DC: R_f (EE/MeOH: 95/5)= 0.51

¹H-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

8.58 (s, 1H, CH); 8.04 (s, 1H, H(6)); 5.71 (s, 1H, CH(ACE)); 5.63 (s, 1H, C(1'));
4.32-4.30 (t, 1H, $J=4.8\text{Hz}$, H(2')); 4.27-4.24 (t, 1H, $J=4.8\text{Hz}$, H(3')); 4.22-4.18 (d,
1H, $J=13.6\text{Hz}$, H(5')); 4.17-4.10 (dt, 4H, $J_1=4.8$, $J_2=14.0\text{Hz}$, ACE); 4.07-4.05
(pd, 1H, H(4')); 3.95-3.90 (dd, 1H, $J_1=2.2$, $J_2=13.6\text{Hz}$, H(5')); 3.87-3.74 (m, 4H,
ACE); 3.12 und 3.13 (2s, 6H, N(CH₃)₂); 2.00 und 1.99 (2s, 6H, Ac-Gruppen);
1.08-0.96 (m, 28H, SiCH(CH₃)₂)

¹³C-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

170.23 und 170.14 (C=O); 168.31 (C=O); 158.37 (C=N); 153.85 (C(4));
145.93 (C(6)); 111.59 (C(a)-ACE); 89.82 (C(H1')); 80.99 C(H4')); 76.22
(C(H2')); 69.10 (C(H3')); 67.60, 63.01, 62.77 und 61.74 (ACE); 60.81(C-I);
59.18 (C(H5')); 40.88 und 34.93 (C-N(CH₃)); 20.56 und 20.50 (2C, Ac-Gruppen);
17.51, 17.39, 17.18, 16.97, 16.77, 16.71, 16.66 und 16.61 (8C,
SiCH(CH₃)₂-Gruppe); 12.57, 12.25, 12.02 und 11.88 (4C, SiC)

Elementaranalyse: berechnet: C(44.79); H(6.49); N(6.33); O(21.70)

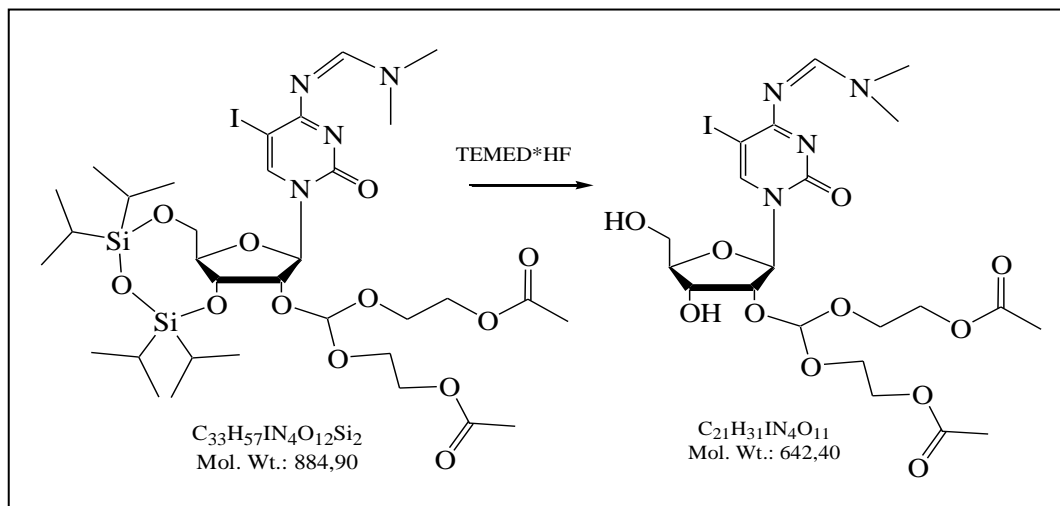
gefunden: C(44.95); H(6.67); N(6.14)

ESI(+/-): berechnet: 884.9

gefunden: 885.4; 885.8 und 886.6 durch Iod-Isotop bedingt

- Synthese von 5-Iodo-2'-*O*-bis(acetoxyethoxy)methylester-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-Cytidin (**25**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Die Reaktionsvorbereitung erfolgt in zwei separaten und wasserfreien Kolben. Die Lösung 1 enthält 1g (1.13mmol) Edukt gelöst in 5mL abs. Acetonitril. Die zweite Reaktionsmischung wird aus 5eq (865 μ L) TEMED-Lösung und 3.5eq (142 μ L) einer 48%-igen HF-Lösung bei 0°C hergestellt. Beide Komponenten (TEMED und 48%-HF-Lösung) werden nach einander in auf 0°C gehaltene 2mL abs. Acetonitril gegeben. Das so hergestellte Reagensgemisch wird langsam zur Edukt-Mischung zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 725mg (1.129mmol/ quantitativ)

DC: R_f (DCM/MeOH: 95/5)= 0.07

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

8.59 (s, 1H, CH); 8.57 (s, 1H, H(6)); 5.89-5.87 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$, C(1'));
 5.56 (s, 1H, CH(ACE)); 5.33-5.30 (pt, 1H, OH(5')); 5.23-5.20 (pd, 1H, OH(3'));
 4.19-4.17 (t, 1H, $J=4.8\text{Hz}$, H(2')); 4.14-4.07 (m, 5H, H(3') und ACE);
 3.93-3.91 (m, 1H, H(4')); 3.77-3.66 (m, 5H, H(5') und ACE); 3.62-3.55 (2m,
 1H, H(5')); 3.21 und 3.13 (2s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2.02 und 2.01 (2s, 6H, Ac-Gruppen)

^{13}C -NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

170.20 und 170.17 (C=O); 168.04 (C=O); 158.30 (C=N); 154.16 (C(4));
 147.37 (C(6)); 111.33 (C(a)-ACE); 87.75 (C(H1')); 84.34 (C(H4')); 76.31
 (C(H2')); 68.89 (C(H3')); 67.87, 62.86, 62.78 und 61.82 (ACE); 61.32 (C-I);
 59.44 (C(H5')); 40.81 und 34.83 (C-N(CH₃)); 20.56 und 20.55 (2C, Ac-Gruppen);

Elementaranalyse: berechnet: C(39.26); H(4.86); N(8.72); O(27.40)

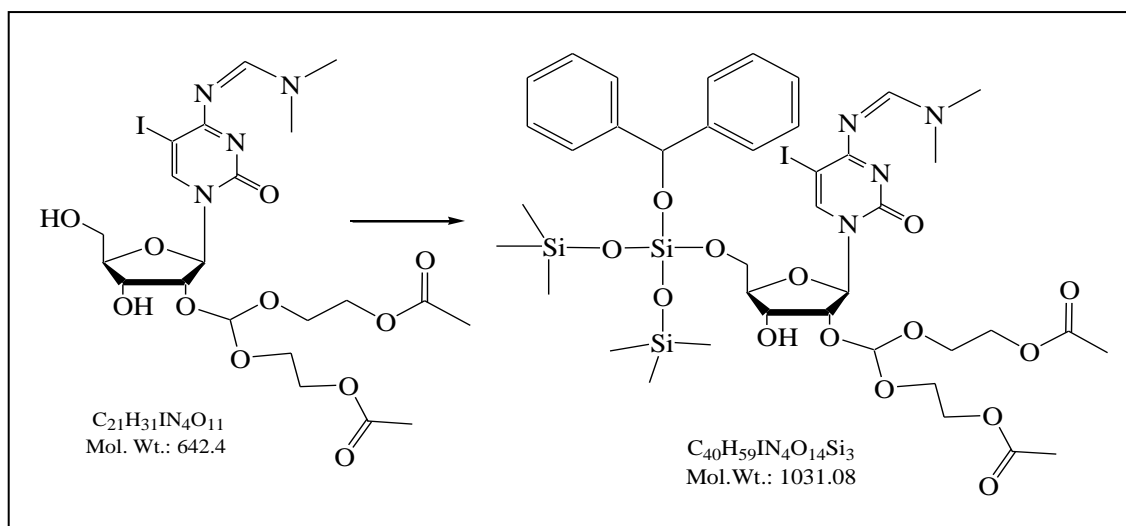
gefunden: C(39.41); H(5.01); N(8.60)

ESI(+/-): berechnet: 642.4

gefunden: 643.3 und 644.4 [M+H⁺]

- Synthese von 5-Iodo-5'-*O*-Bis(trimethylsilyloxy)benzhydroxysilyl-2'-*O*-bis(acetoxyethoxy)methylester-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-Cytidin (26)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Für die Reaktion werden zwei Lösungen vorbereitet. Die erste beinhaltet 0.3g (0.48mmol) Edukt gelöst in 3mL abs. Dichlormethan und versetzt mit 66 μL Diisopropylamin. Diese Mischung wird auf 0°C abgekühlt. Die zweite Reaktionslösung besteht aus BzH-Cl Schutzgruppe (291mg/ 1.5eq) in 1mL abs. Dichlormethan und 99 μL Diisopropylamin. Die

aktivierte Schutzgruppe wird langsam und portionsweise zur Edukt-Lösung zugetropft. Die Reaktion wird solange bei Raumtemperatur weiter gerührt bis keine weitere Umsetzung stattfindet, der Reaktionsverlauf wird mittels DC verfolgt. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe von 4mL einer 8%-igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gestoppt, mit wenig Brine-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Evaporierung des Lösungsmittels erfolgt die Reinigung mittels einer Säulenchromatographie (EE/*n*-Hex/MeOH, 50/49/1 plus 5% TEMED). Das Produkt liegt als ein farbloses Öl vor.

Ausbeute: 400mg (0.39mmol/ 83%)

DC: R_f (EE/MeOH: 95/5)= 0.4

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

8.58 (s, 1H, CH); 8.06 (s, 1H, H(6)); 7.39-7.37 (d, 2H, $J= 7.4\text{Hz}$, Benzyl-(H(1))); 7.31-7.27 (t, 2H, $J= 7.4\text{Hz}$, Benzyl-(H(2))); 7.22-7.18 (t, 1H, $J= 7.4\text{Hz}$, Benzyl-(H(3))); 5.98 (s, 1H, CH(BzH-Gruppe)); 5.85 (d, 1H, $J= 4.4\text{Hz}$, H(1')); 5.48 (s, 1H, CH(ACE)); 5.22-5.20 (d, 1H, $J= 6\text{Hz}$, OH(3')); 4.22-4.19 (t, 1H, $J= 5\text{Hz}$, H(2')); 4.10-4.05 (m, 4H, ACE); 4.00-3.97 (m, 1H, H(3')); 3.88-3.86 (m, 1H, H(4')); 3.82-3.78 (dd, 1H, $J_1= 3.2$, $J_2= 12\text{Hz}$, H(5')); 3.74-3.63 (m, 5H, H(5') überlagert von ACE); 3.21 und 3.13 (2s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 1.99 und 1.98 (2s, 6H, Ac-Gruppen); 0.01- -0.04 (m, 18H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

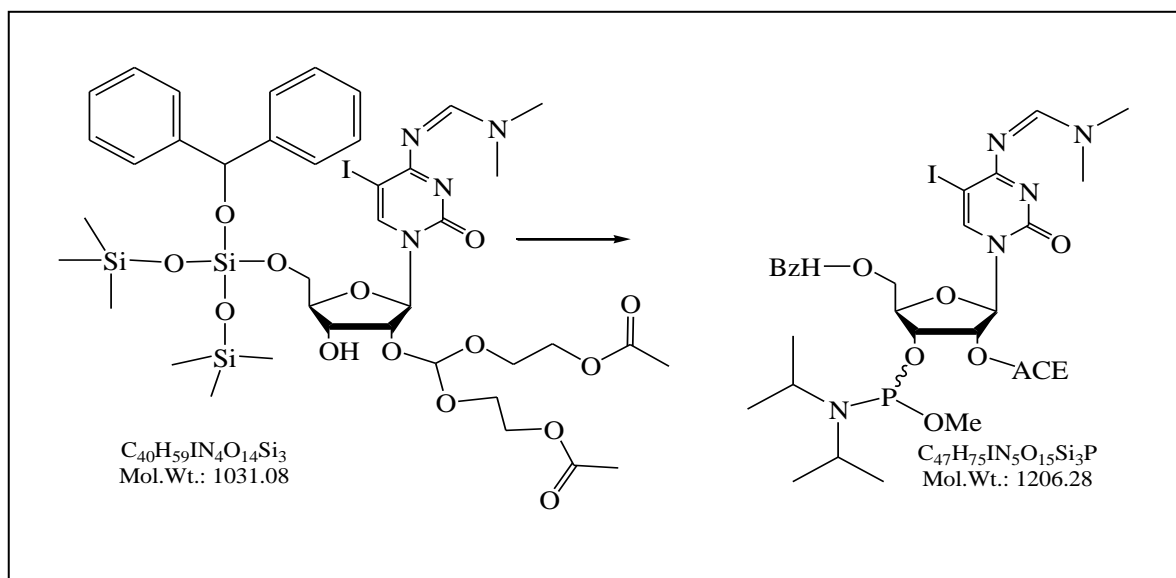
170.70 und 170.47 (C=O); 170.55 (C=O, ACE); 168.56 (C=O); 158.93 und 158.73 (C=N); 153.85 (C(4)); 147.46 (C(6)); 144.47/128.53 (Benzyl(-C(H(2)))); 127.43 (Benzyl(-C(H(1)))); 126.26 (Benzyl(-C(H(3)))); 111.93 (C(a)-ACE); 88.64 (C(H1')); 84.14 C(H4')); 76.33 (CH(BzH-Gruppe); 75.46 (C(H2')); 69.83(C-I); 68.82 (C(H3')); 63.35, 62.14 (ACE); 62.91 (C(H5')); 41.20 und 35.10 (C-N(CH₃)); 21.0 (2C, Ac-Gruppen); 1.8 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

ESI(+/-): berechnet: 1031.1

gefunden: 1031.8 und 1053.8 [M-Na^+]

- Synthese von 5-Iodo-5'-*O*-Bis(trimethylsilyloxy)benzhydryloxysilyl-3'-*O*-(*N,N*-diisopropylamino)methoxyphosphinyl-2'-*O*-bis(acetoxyethoxy)methylester-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-Cytidin (**27**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

In einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas werden 1.066g (1.034mmol) Edukt in 3mL abs. Dichlormethan vorgelegt und auf 0°C abgekühlt. Zur Aktivierung des Phosphitylierers (3-(bis(diisopropylamino)methylphosphin/ 1.25eq/ 0.384mL) wird dieser in 2.5mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 0.5eq (1.15mL) einer 0.45M-Tetrazol-Lösung versetzt. Nach einer Aktivierungszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wird dieser sehr langsam zur auf 0°C gehaltenen Edukt-Lösung zugetropft. Die Reaktion wird nach 10 Stunden bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 480µL Ethanol gestoppt und einrotiert. Das erhaltene Öl wird sofort gesäult (*n*-Hex/Aceton/TEMED: 65/35/0.5).

Ausbeute: 683mg (0.566mmol/ 55%)

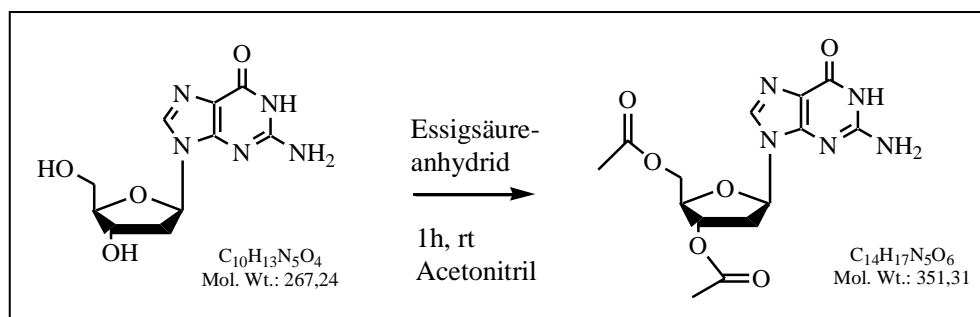
DC: R_f (EE/MeOH: 95/5)= 0.55

^{31}P -NMR: δ [ppm], 400 MHz, Aceton

150.73 und 150.29

6.4 Synthese von 2-Iodo-desoxy-Adenosin

- Synthese von 3',5'-*O*-diacetyl-desoxyguanosin (**28.I**)

Reaktionsgleichung:

Matsuda, 1986, Synthesis

Durchführung:

Auf Grund der Hydrolyse von Essigsäureanhydrid muss unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet werden.

Es werden 7.5 g (28.06mmol) Desoxy-Guanosin und 241mg (7mol-%) DMAP in 275mL abs. Acetonitril vorgelegt. Nach der Zugabe von 10.4mL (1.1eq bezogen auf Essigsäureanhydrid) und 2.4eq (6.4mL) Essigsäureanhydrid wird der Ansatz eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe von 5mL Methanol gestoppt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wird auf die Hälfte eingengt und zum Kristallisieren bei 4°C gelagert. Der farblose Feststoff wird mit Ethanol und Ether gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 9.587g (27.28mmol; 97%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 95/5)= 0.53

¹H-NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

10.70 (s, 1H, NH); 7.91 (s, 1H, H(8)); 6.51 (s, 2H, NH₂); 6.17-6.10 (dd, 1H, H(1'), $J_1 = 5.75\text{Hz}$, $J_2 = 8.5\text{Hz}$); 5.31-5.26 (dt, 1H, H(3'), $J_1 = 5.75\text{Hz}$, $J_3 = 1.75\text{Hz}$); 4.29-4.16 (m, 3H, H(4') und H(5')); 2.98-2.85 (m, 1H, H(2')); 2.49-2.40 (m, 1H, H(2')); 2.08 (s, 2H, Acetyl-Gruppe); 2.03 (s, 3H, Acetyl-Gruppe)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

170.15 und 169.97 (C=O); 156.69 (C(4)); 153.74 (C(2)); 151.07 (C(6));
135.14 (C(8)); 116.77 (C(5)); 82.57 (C(1')); 81.44 (C(4')); 74.46 (C(3'));
63.60 (C(5')); 35.44 (C(2')); 20.78 und 20.53 (CH₃-Gruppe)

Elementaranalyse: berechnet: C(47.86); H(4.88); N(19.93); O(27.32)

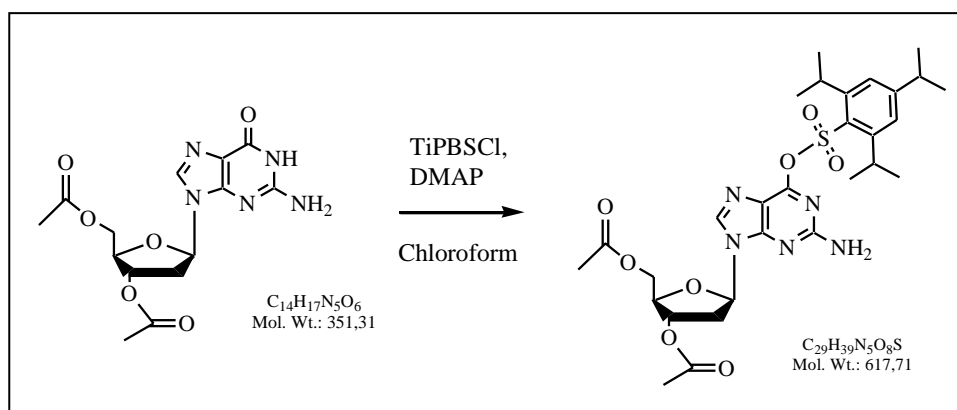
gefunden: C(47.29); H(4.92); N(20.17); O(27.62)

MALDI(+/-): berechnet: 351.3

gefunden: 352.8 [M+H⁺]

- Synthese von 3',5'-*O*-diacetyl-*O*'-(2,4,6-triisopropylbenzen)sulfonsäure-desoxyguanosin (**29.I**)

Reaktionsgleichung:



Janeba, JOC, 2003

Durchführung:

Es werden unter Argon 1.67g (4.8mmol) 3',5'-*O*-diacetyl-desoxyguanosin, 72mg (0.6mmol) Dimethyl-amino-pyridin, 2.73g (9.0mmol) 2,4,6-Triisopropyl-benzyl-sulfonylchlorid in 70 ml abs. Chloroform gelöst. Nach der Zugabe von 1.25mL (9.0mmol) Triethylamin wird die Suspension 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die leicht gelbliche Lösung wird vollständig einrotiert und säulenchromatographisch (Laufmittel: Dichlormethan/ Methanol 98/2) gereinigt.

Ausbeute: 2.534g (4.1mmol; 86%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 98/2)= 0.43

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 300 MHz, DMSO

11.16-11.11 (d, 1H, H von NH_2 , $J= 9.7\text{Hz}$); 8.66 (s, 1H, H(8)); 8.24-8.19 (d, 1H, H von NH_2 , $J= 9.7\text{Hz}$); 7.39 (s, 2H, Benzol); 6.37-6.10 (t, 1H, H(1'), $J= 7\text{Hz}$); 5.42-5.38 (bm, 1H, H(3')); 4.31-4.17 (m, 3H, H(4') und H(5')); 4.06-3.94 (m, 2H, *iPr* in ortho); 3.18-3.06 (m, 1H, H(2')); 3.06-2.90 (m, 1H, *iPr* in para, $J= 6.7\text{Hz}$); 2.60-2.53 (dd, 1H, H(2'), $J_1= 3.0\text{Hz}$, $J_2= 6.5\text{Hz}$); 2.08 (s, 3H, Acetyl-Gruppe); 1.97 (s, 3H, Acetyl-Gruppe); 1.27-1.19 (dd, 18H, CH_3 Gruppen, $J_1= 6.9\text{Hz}$, $J_2= 9.5\text{Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm], 300 MHz, DMSO

170.07 und 169.93 (C=O); 154.84 (C(6)); 154.65 (C(2)); 149.98 (Benzol, C-*iPr*); 147.21(C(8)); 146.77 (C(5)); 135.40 (C-S); 126.31 (C(4)); 121.32 (Benzol (C-H)); 83.96 (C(1')); 82.08 (C(4')); 74.02(C(3')); 63.48 (C(5')); 35.86 (C(2')); 33.22 (C-C, para); 27.99 (C-C, ortho); 24.77 und 23.79 (CH_3 -Gruppen); 20.73 und 20.50 (CH_3 -Gruppe)

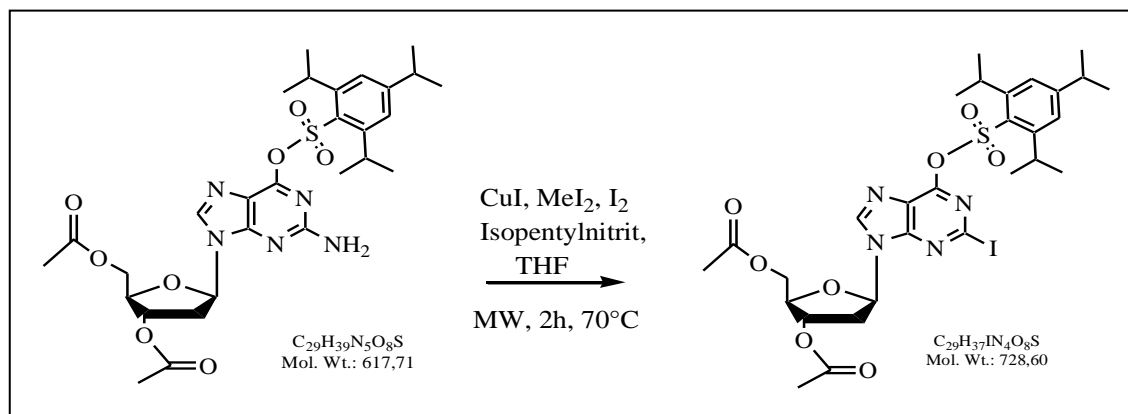
Elementaranalyse: berechnet: C(56.39); H(6.36); N(11.34); O(20.72); S(5.19)

gefunden: C(56.18); H(6.55); N(11.10)

MALDI(+/-): berechnet: 617.7

gefunden: 618.1 [$\text{M}+\text{H}^+$]

- Synthese von 2-Iodo-3',5'-*O*-diacetyl-*O'*-(2,4,6-triisopropylbenzen)sulfonsäure-desoxyguanosin (**30.I**)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

827mg (1.34mmol) Essigsäure-3-acetoxy-5-[2-amino-6-(2,4,6-triisopropyl-benzylsulfonyloxy)-purin-9-yl]-tetrahydro-furan-2-ylmethyl ester in 70mL abs. Tetrahydrofuran werden mit 340mg (1eq) Iod, 264mg (1.05eq) Kupferiodid, 10.72ml (10eq) Methyleniodid und 1.17mL (6.5eq) Isopentylnitrit versetzt und in der Mikrowelle bei 70 °C und 100 Watt eine Stunde reagieren lassen. Die iodhaltige Reaktionslösung wird zweimal mit je 15mL Natriumthiosulfat gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem vollständigen einengen, erfolgt die säulenchromatographische Aufreinigung (Dichlormethan).

Ausbeute: 683mg (0.94mmol; 70%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 98/2)= 0.77

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

8.76 (s, 1H, H(8)); 7.37 (s, 2H, Benzol); 6.42-6.36 (t, 1H, H(1'), $J = 7\text{Hz}$);

5.42-5.37 (bm, 1H, H(3')); 4.29-4.11 (m, 3H, H(4') und H(5')); 4.09-4.04 (p, 2H,

iPr in ortho); 3.11-2.94 (m, 1H, H(2') und 1H, *iPr* in para.); 2.64-2.60 (dd,

1H, H(2'), $J_1 = 3.25\text{Hz}$, $J_2 = 6.25\text{Hz}$); 2.08 (s, 3H, Acetyl-Gruppe); 1.96 (s, 3H,

Acetyl-Gruppe); 1.25-1.21 (dd, 18H, CH_3 -Gruppen, $J_1 = 3.0\text{ Hz}$, $J_2 = 6.75\text{Hz}$)

¹³C-NMR: δ [ppm], 300MHz, DMSO

170.32 (C(2)); 170.15 und 170.08 (C=O); 154.90 (C(6)); 147.26 (Benzol, (C-*i*Pr));
 146.78 (C(8)); 141.66 (C(5)); 121.35 (Benzol (C-H)); 98.11 (C-O); 97.36 (C-S);
 80.08 (C(1')); 79.38 (C(4')); 74.88 (C(3')); 63.81 (C(5')); 33.24 (C-C para);
 28.00 (C-C ortho); 24.78 und 23.80 (CH₃-Gruppen); 20.76 und 20.54
 (CH₃-Gruppe)

Elementaranalyse: berechnet: C(47.81); H(5.12); N(7.69); O(17.57); I(17.42); S(4.40)

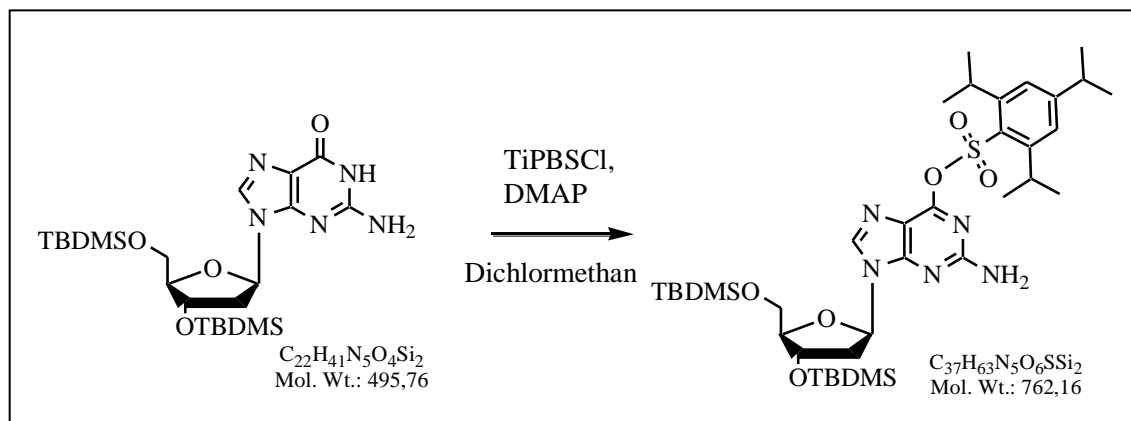
gefunden: C(47.61); H(5.23); N(7.90)

MALDI(+/-): berechnet: 728.6

gefunden: 729.2 [M+H]; 751.2 [M+Na]

- Synthese von 3',5'-*O*-tertbutyl-dimethylsilyl-*O*'-(2,4,6-triisopropylbenzen)sulfonsäure-desoxyguanosin (**29.II**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

3.13g (6.32mmol) TBDMS-geschützten Desoxy-Guanosin werden in 70mL abs. Dichlormethan gelöst und auf 0°C abgekühlt. Anschließend werden die Reihenfolge einhaltend 1.8mL (2eq) Triethylamin, 188mg (0.24eq) 4-Dimethylamino-pyridin und 2.1eq (4.019g) Triisopropyl-benzyl-sulfolen-chlorid zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur drei Tage gerührt. Die Lösung verfärbt sich dabei von hell-gelb über orangefarbig nach rot. Die organische Reaktionslösung wird mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser

gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockne evaporiert. Der erhaltene gelbliche Schaum wird säulenchromatographisch (DCM) gereinigt.

Ausbeute: 3.852g (5.055mmol/ 80%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 3/1)= 0.52

¹H-NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

8.22 (s, 1H, H(8)); 7.33 (s, 2H, Benzol); 6.64 (bs, 2H, NH₂); 6.22-6.17 (t, 1H, H(1'), J= 6.5Hz); 4.53-4.50 (pq, 1H, H(3'), J=3.5Hz); 4.16-4.06 (ph, 2H, *i*Pr in ortho, J=6.8Hz); 3.84-3.80 (m, 1H, H(4')); 3.70-3.68 (dd, 1H, H(5'), J₁=5.5Hz, J₂=11.1Hz); 3.65-3.61 (dd, 1H, H(5'), J₁=4.4Hz, J₂=11.1Hz); 2.30-2.28 (q, 1H, *i*Pr in para, J=6.8Hz); 2.80-2.72 (pq, 1H, H(2')); 2.31-2.25 (ddd, 1H, H(2'), J₁=3.5Hz, J₂=6.4Hz, J₃=13.1Hz); 1.29-1.19 (dd, 18H, CH₃-Gruppen, J₁=6.8Hz, J₂=9.0Hz); 0.88 und 0.83 (s, je 9H, *t*-Butyl-Gruppen); 0.10 (s, 6H, 2-mal SiCH₃-Gruppe); 0.01 und -0.1 (s, je 3H, SiCH₃-Gruppe)

¹³C-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

158.38 (C(4)); 154.52 (C(2)); 147.5 (C(6)); 146.85 (C(-*i*Pr)); 141.27 (Benzol-C); 135.20 (C-S); 134.20 (C(8)); 121.24 (Benzol-C); 119.22 (C(5)); 98.04 (C-O); 88.21 (C(4')); 85.26 (C(1')); 71.55 (C(3')); 60.90 (C(5')); 40.00 (C(2') von DMSO überlagert); 33.23 und 28.07 (*i*Pr-C); 25.74 (*i*Pr-(CH₃)-Gruppen); 24.74 (*t*-Butyl-Gruppen); 23.75 (*i*Pr-(CH₃)-Gruppen); 17.71 (Si-C); -3.29 und -4.90 (SiCH₃-Gruppen)

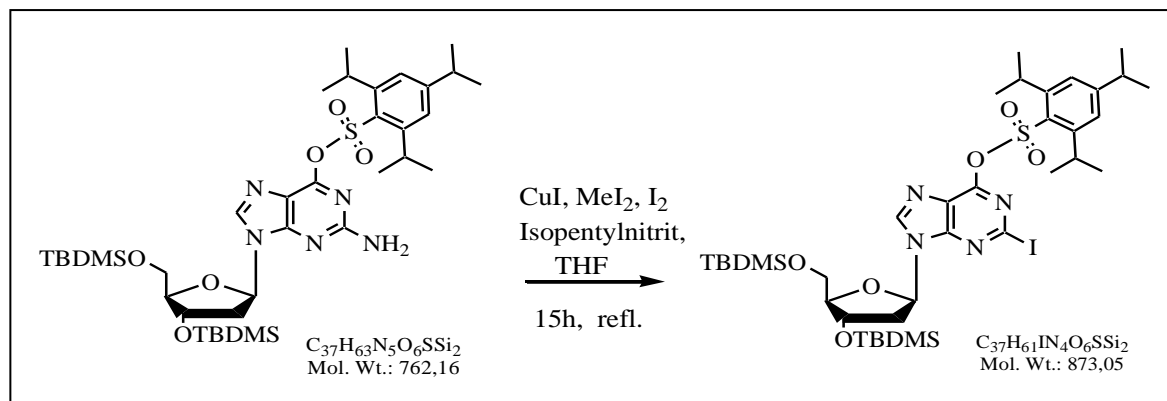
Elementaranalyse: berechnet: C(58.31); H(8.33); N(9.19); O(12.60); S(4.21); Si(7.37)

gefunden: C(58.54); H(8.36); N(9.10)

ESI(+/-): berechnet: 762.2

gefunden: 762.2; 762.8; 763.6 und 764.5

- Konventionelle Synthese von 2-Iodo-3',5'-*O*-tertbutyl-dimethylsilyl-*O*'-(2,4,6-triisopropyl-benzen)sulfonsäure-desoxyguanosin (**30.II**)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

In einer aufgeheizten Apparatur und unter Argonatmosphäre werden 1.0g (1.31mmol) 3',5'-*O*-tertbutyl-dimethylsilyl-*O*'-(2,4,6-triisopropyl-benzen)sulfonsäure-desoxyguanosin in abs. Tetrahydrofuran (40mL) gelöst und anschließend unter Argonstrom mit 1eq (333mg) Iod und 1.05eq (262mg) Kupferiodid versetzt. Die iod-farbige Lösung wird mit 1.06mL (10eq) Methyleniodid und mit 0.9mL (6.7eq) Isopentylnitrit versehen und 15 Stunden zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wird eingengt und der Rückstand in Dichlormethan gelöst. Zur Reinigung wird der Ansatz zweimal mit gest. Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen und die wässrige Phasen mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und mittels Säulenchromatographie gereinigt. Die Chromatographie wird mittels eines Gradienten von *n*-Hexan (100%) bis *n*-Hex/EE (9/1) durchlaufen.

Ausbeute: 0.96g (1.10mmol/ 84%)

DC: R_f (*n*-Hex/EE: 9/1)= 0.22

¹H-NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

8.67 (s, 1H, H(8)); 7.36 (s, 2H, Benzol); 6.35-6.30 (dd, 1H, H(1'), $J_1=5.3\text{Hz}$, $J_2=6.8\text{Hz}$); 4.76-4.68 (bm, 1H, H(3')); 4.10-4.04 (m, 2H, *i*Pr in ortho); 3.85-3.59 (m, 3H, H(4') und H(5')); 3.04-2.88 (m, 1H, H(2') und 1H, *i*Pr in para.); 2.42-2.31 (pq, 1H, H(2')); 1.25-1.19 (pt, 18H, *i*Pr-(CH₃)-Gruppen); 0.89 und 0.74 (s, je 9H, *t*-Butyl-Gruppen); 0.12 (s, 6H, 2-mal SiCH₃-Gruppe); 0.06 und -0.14 (s, je 3H, SiCH₃-Gruppen)

¹³C-NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

154.60 (C(2)); 154.25 (C(4)); 152.16 (C(6)); 149.96 (C(Phenyl-iPr)); 146.02 (C(8)); 145.48 (C-S); 130.35 (C(Phenyl-iPr)); 123.79 (Benzol-C); 122.59 (C-O); 116.53 (C(5)); 86.89 (C(4')); 84.16 (C(1')); 70.96 (C(3')); 61.81 (C(5')); 38.00 (C(2')); 33.43 und 29.24 (iPr-C); 25.50 (*t*-Butyl-Gruppen); 25.65, 24.25 und 23.10 (iPr-(CH₃)-Gruppen); 17.74 und 17.53 (Si-C); -3.36, -4.84, -4.93 und -5.10 (SiCH₃-Gruppen)

Elementaranalyse: berechnet: C(50.90); H(7.04); N(6.42); O(11.00); I(14.54); S(3.67); Si(6.43)

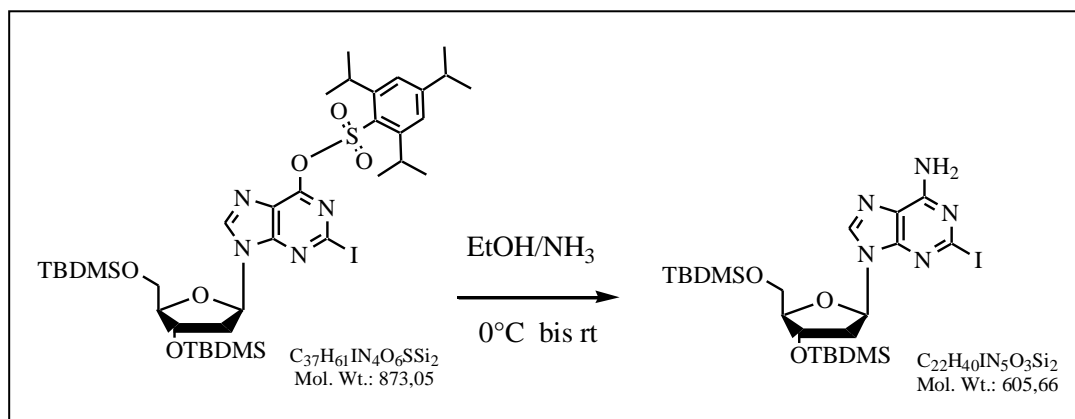
gefunden: C(51.60); H(7.17); N(6.31)

ESI(+/-): berechnet: 873.1

gefunden: 873.5; 874.6 und 895.5 [M +Na⁺]

- Synthese von 2-Iodo-3',5'-*O*-tertbutyl-dimethylsilyl-desoxy-Adenosin (31.II)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Das Edukt (2.625g /3mmol) wird in wenig Dichlormethan gelöst und in ein Druckgefäß überführt. Anschließend kühlt man die Mischung auf 0°C herunter und versetzt diese mit 350mL mit Ammoniak gesättigter Ethanol-Lösung. Der Ansatz wird weitere drei Stunden bei dieser Temperatur und anschließend noch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das

Lösungsmittel wird abgezogen und das erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Dichlormethan/Methanol 98/2).

Ausbeute: 1.42g (2.3mmol/ 78%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 98/2)= 0.2

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

8.20 (s, 1H, H(8)); 7.67 (bs, 2H, NH_2 -Gruppe); 6.25-6.21 (t, 1H, H(1'), $J_1=6.5\text{Hz}$);
4.67-4.63 (bm, 1H, H(3')); 3.83-3.70 (m, 2H, H(4') und 1H von H(5')); 3.67-3.63
(dd, 1H, H(5'), $J_1=4.3\text{Hz}$, $J_2=10.6\text{Hz}$); 2.91-2.84 (pq, 1H, H(2'), $J_1=6.2\text{Hz}$,
 $J_2=6.5\text{Hz}$); 2.33-2.27 (m, 1H, H(2')); 0.90 und 0.84 (s, je 9H, *t*-Butyl-Gruppen);
0.13 (s, 6H, SiCH_3 -Gruppen); 0.04 und -0.01 (s, je 3H, SiCH_3 -Gruppen)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

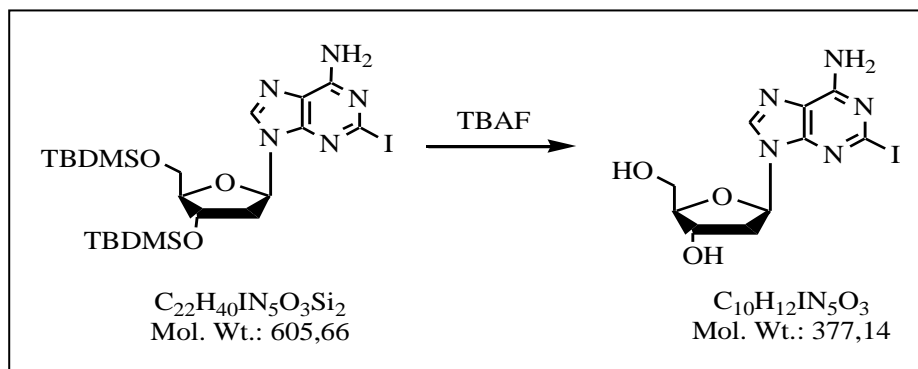
155.89 (C(2)); 149.24 (C(6)); 139.72 (C(8)); 120.67(C(5)); 119.22 (C(4));
86.98 (C(4')); 83.53 (C(1')); 71.81 (C(3')); 62.44 (C(5')); 38.16 (C(2'));
25.68 (*t*-Butyl-Gruppen); 17.93 und 17.69 (Si-C);
-4.74, -4.96 und -5.52 (SiCH_3 -Gruppen)

Elementaranalyse: berechnet: C(43.63); H(6.66); N(11.56); O(7.92); I(20.95); Si(9.27)
gefunden: C(43.82); H(6.71); N(11.41)

ESI(+/-): berechnet: 605.7

gefunden: 606.3 und 607.4 [$\text{M}+\text{H}^+$] und 628.3 [$\text{M}+\text{Na}^+$]

- Synthese von 2-Iodo-desoxy-Adenosin (**32**)

Reaktionsgleichung:**Durchführung:**

Das Edukt (869mg/ 1.43mmol) wird in 5mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C abgekühlt. Nach der langsamen Zugabe von 3eq einer 1M TBAF-THF-Lösung wird die Reaktion eine Stunde bei dieser Temperatur und anschließend noch eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt werden.

Ausbeute: 540mg (1.43mmol/ 99%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 9/1)= 0.24

1H -NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

8.27 (s, 1H, H(8)); 7.70 (bs, 2H, NH₂-Gruppe); 6.26-6.22 (t, 1H, H(1'), $J_1=6.4$ Hz);
 5.32-5.30 (d, 1H, OH(3'), $J_1=4.0$ Hz); 4.95-4.92 (t, 1H, OH(5'), $J_1=5.6$ Hz);
 4.39-4.36 (bm, 1H, H(3')); 3.86-3.83 (m, 1H, H(4')); 3.61-3.47 (2m, 2H H(5'));
 2.66-2.59 (m, 1H, H(2')); 2.37-2.26 (m, 1H, H(2'))

^{13}C -NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

156.26 (C(2)); 149.81(C(6)); 139.40 (C(8)); 121.05 (C(5)); 119.26 (C(4));
 88.16 (C(4')); 83.83 (C(1')); 71.30 (C(3')); 61.80 (C(5')); 39.60 (C(2'));

Elementaranalyse: berechnet: C(31.85); H(3.21); N(18.57); O(12.73); I(33.65)

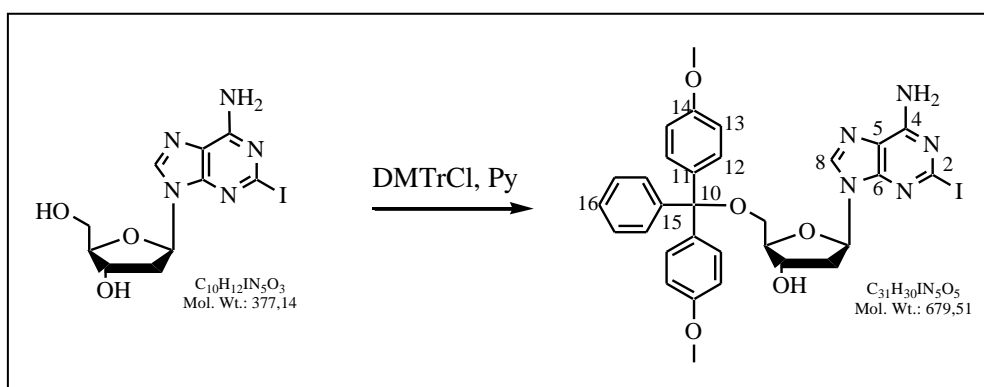
gefunden: C(31.62); H(3.17); N(18.65)

ESI(+/-): berechnet: 377.1

gefunden: 378.0 [M+H⁺]

- Synthese von 2-Iodo-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenyl-methyl-desoxy-Adenosin (**34.I**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Vor der Reaktion werden 455mg (1.206mmol) 2-Iodo-desoxy-Adenosin zweimal mit 5mL abs. Pyridin koevaporiert und über Nacht an der Vakuumpumpe getrocknet. Auch die abgewogene Menge an DMTr-Chlorid (1.2eq/ 491mg) wurden unter Vakuum getrocknet.

Die Reaktion erfolgt unter wasserfreien Bedingungen und unter Argon Atmosphäre. Das Edukt wird in 5mL abs. Pyridin gelöst und unter Argon-Gegenstrom portionsweise mit $\frac{3}{4}$ DMTr-Cl versetzt. Dies erfolgt über einen Zeitraum von 1.5 Stunden. Der Rest des Tritylchlorids wird in 5mL abs. Pyridin aufgenommen und auf einmal der Reaktion zugeführt. Zum Puffern der Reaktion werden dem Ansatz noch zusätzlich 0.5eq/ 84µL TEA zugegeben. Nach ca. 22 Stunden wird der Ansatz mit wenig Methanol gequentscht, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und mit wenig gest. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und mit DCM/MeOH (95/5) gesäult.

Ausbeute: 430mg (0.633mmol/ 52%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 95/5)= 0.25

¹H-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

8.18 (s, 1H, H(8)); 7.68 (s, 2H, NH₂); 7.35-7.17 (m, 9H, DMTr-Gruppe);
 6.78-6.70 (dd, 4H, J₁=9,0Hz, J₂=11,25Hz, arom. Protonen neben OCH₃-Gruppen);
 6.31-6.26 (t, 1H, H(1'), J₁=6,25Hz); 5.37-5.35 (d, 1H, J₁=4,75Hz, 3'-OH);
 4.50-4.40 (m, 1H, H(3')); 3.97-3.91 (m, 1H, H(4')); 3.75 und 3.71 (2s, je 3H,
 DMTr-OCH₃-Gruppen); 3.31-3.08 (dm, teilweise, H(5')); 2.81-2.70 (m, 1H, H(2'));
 2.39-2.27 (m, 1H, H(2'))

¹³C-NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

157.95 C(10); 155.87 (C(2)); 149.37 (C(6)); 144.88 (C(11)); 141.09 (C(8));
 135.60 und 135.51 (C(15)); 129.68, 129.66 und 129.62 (C(12));
 127.63 (C(16)); 126.52 (C(5)); 120.73 (C(4)); 113.03 und 112.98 (C(13));
 86.02 (C(4')); 85.38 (C(14)); 83.35 (C(1')); 70.54 (C(3')); 64.06 (C(5'));
 54.98 und 54.96 (C(OCH₃)); 30.64 (C(2'))

Elementaranalyse: berechnet: C(54.79); H(4.45); N(10.31); O(11.77); I(18.68)

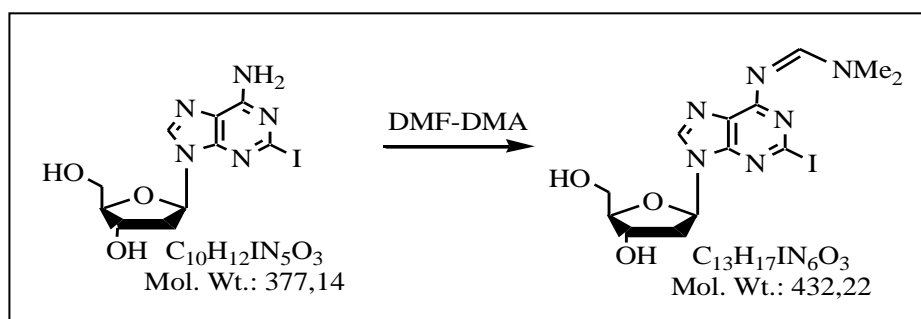
gefunden: C(54.45); H(4.88); N(9.64)

ESI(+): berechnet: 679.3

gefunden: 678.6 und 679.5

- Synthese von 2-Iodo-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-desoxy-Adenosin (**33**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

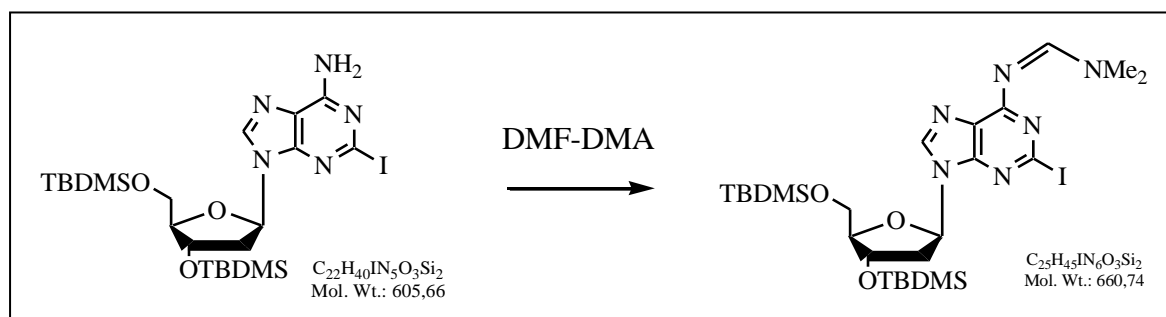
Unter Schutzgasatmosphäre wird der Lösung aus 202mg (0.536mmol) 2-Iodo-desoxy-Adenosin und 4mL abs. Di-methyl-formamid 4eq (0.3mL) Di-methyl-formamid-di-methyl-

acetal langsam zu getropft. Der Ansatz wird 5.5 Stunden bei 60°C gerührt. Die Lösung wird einrotiert, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser und Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat, erfolgte die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 9/1).

Ausbeute: 162mg (3.7mmol/70%)

- Synthese von 2-Iodo-3',5'-*O*-tetrabutyl-dimethylsilyl-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-desoxy-Adenosin (**32.II**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Unter Schutzgasatmosphäre wird der Lösung aus 1.17g (1.93mmol) 2-Iodo-3',5'-*O*-tertbutyl-dimethylsilyl-desoxy-Adenosin (**31.II**) und 20mL abs. Dimethylformamid 4eq (1.03mL) Dimethylformamid-di-methyl-acetal langsam zugetropft. Der Ansatz wird 6 Stunden bei 65°C und anschließend noch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird einrotiert und das Produkt mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 98/2) gereinigt.

Ausbeute: 1.020g (1.54mmol/ 80%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 98/2)= 0.26

1H -NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

8.79 (s, 1H, N=CH); 8.30 (s, 1H, H(8)); 6.30-6.24 (t, 1H, H(1'), J=6,5 Hz);
 4.66 (bs, 1H, H(3')); 3.34-3.63 (m, 3H, H(4'+5')); 3.21 (s, 3H, NCH₃-Gruppe);
 3.12 (s, 3H, NCH₃-Gruppe); 2.98-2.85 (m, 1H, H(2')); 2.35-2.25 (m, 1H, H(2'));
 0.89 und 0.83 (s, 18H, *t*-Butyl-Gruppen); 0.12 (s, 6H, SiCH₃-Gruppe);
 0.01 und -0.2 (s, je 3H, SiCH₃-Gruppen)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

159.29 (C(Formamid)); 158.14 (C(2)); 151.34 (C(6)); 141.42 (C(8)); 125.77 (C(5));
119.96 (C(4)); 86.96 (C(4')); 83.57 (C(1')); 71.84 (C(3')); 62.42 (C(5')); 40.77
(NCH₃-Gruppe); 38.00 (C(2')); 34.67 (NCH₃-Gruppe); 25.58 (*t*-Butyl-Gruppen);
17.83 und 17.56 (Si-C); -4.84, -5.04 und -5.94 (SiCH₃-Gruppen)

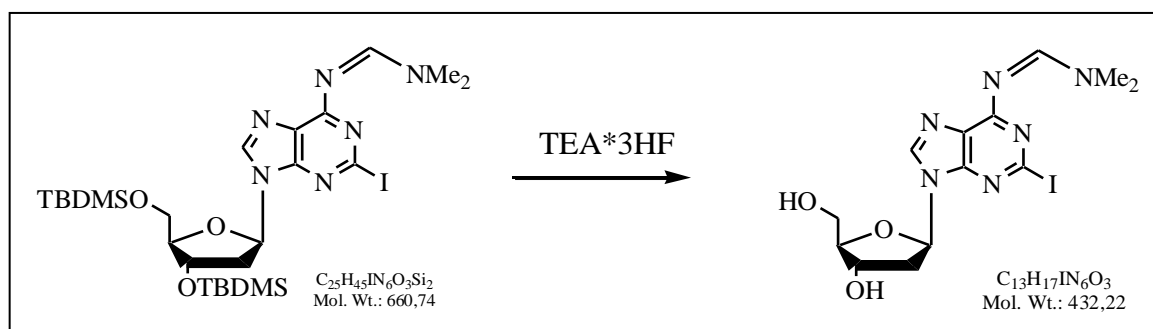
Elementaranalyse: berechnet: C(45.44); H(6.86); N(12.72); O(7.26); I(19.21); Si(8.50)
gefunden: C(45.34); H(6.73); N(12.57)

MALDI(+/-): berechnet: 660.7

gefunden: 659.8 und 675.3 [M+Na⁺]

- Synthese von 2-Iodo-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-desoxy-Adenosin (**33**)

Reaktionsgleichung:



Darstellung:

0.869g (1.32mmol) 2-Iodo-3',5'-*O*-tetrabutyl-dimethylsilyl-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-desoxy-Adenosin (**32.II**) werden in 35mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C gebracht. Bei dieser Temperatur werden 3.5eq (2.0mL) TEA* 3HF-Lösung zugetropft. Nach einer Stunde auf Eis lässt man die Reaktion sich auf Raumtemperatur erwärmen und rührt bei dieser weitere 20 Stunden. Nach einer weiteren Zugabe von 2.0eq der TEA* 3HF-Lösung und 2.5 Stunden Reaktionszeit, wird der Ansatz mit 10mL Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Im Reaktionsverlauf trübt sich die Lösung und ein Niederschlag ist zu beobachten. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 9/1).

Ausbeute: 489mg (1.13mmol/ 86%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 9/1)= 0.40

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

8.81 (s, 1H, N=CH); 8.38 (s, 1H, H(8)); 6.32-6.27 (t, 1H, H(1'), J=6,75 Hz);
5.33-5.31 (d, 1H, 3'-OH-Gruppe, J=4.25 Hz); 4.95-4.91 (t, 1H, 5'-OH-Gruppe,
J=5.25Hz); 4.66 (m, 1H, H(3')); 3.87-3.75 (m, 1H, H(4')); 3.64-3.45 (m,
2H, H(5')); 3.22 (s, 3H, NCH₃-Gruppe); 3.13 (s, 3H, NCH₃-Gruppe); 2.72-2.60
(m, 1H, H(2')); 2.33-2.24 (ddd, 1H, H(2'), J₁=3.25Hz; J₂= 6.0Hz, J₃=13.25Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

159.29 (C(Formamid)); 158.26 (C(2)); 151.54 (C(6)); 140.77 (C(8)); 125.45 (C(5))
120.12 (C(4)); 87.84 (C(4')); 83.30 (C(1')); 70.69 (C(3')); 61.51 (C(5'));
40.80 (NCH₃-Gruppe); 39.15 (C(2')); 34.68 (NCH₃-Gruppe)

Elementaranalyse: berechnet: C(36.13); H(3.96); N(19.44); O(11.11); I(29.36)

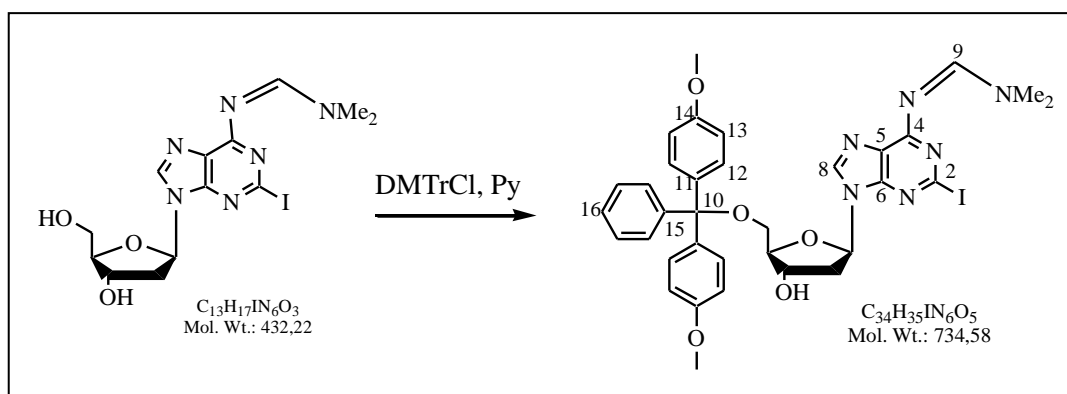
gefunden: C(36.41); H(4.19); N(19.17)

ESI(+): berechnet: 432.2

gefunden: 433.0 [M+H⁺]

- Synthese von 2-Iodo-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenyl-methyl)-N,N-dimethyl-N'-formamidin-desoxy-Adenosin (**34**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Vor der Reaktion werden 475mg (1.099mmol) 2-Iodo-*N,N*-dimethyl-*N'*-formamidin-desoxy-Adenosin zweimal mit 5mL abs. Pyridin koevaporiert und über Nacht an der Vakuumpumpe getrocknet. Auch die abgewogene Menge an DMTr-Chlorid (1.1eq/ 418mg) wird unter Vakuum getrocknet.

Die Reaktion erfolgt unter wasserfreien Bedingungen und unter Argon Atmosphäre. Das Edukt wird in 5mL abs. Pyridin gelöst und unter Argon-Gegenstrom portionsweise mit $\frac{3}{4}$ DMTr-Cl versetzt. Dies erfolgt über einen Zeitraum von 1.5 Stunden. Der Rest des Tritylchlorids wird in 5mL abs. Pyridin aufgenommen und auf einmal der Reaktion zugeführt. Nach 4 Stunden (Reaktion wird mittels DC-Kontrolle verfolgt) wird der Ansatz mit wenig Methanol hydrolysiert, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und mit wenig gest. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und gesäult. Zur besseren Reinigung kann mit Dichlormethan/ Essigester vorgesäult werden, doch erfolgt bei dieser Mischung nicht die Desorption des Produktes vom Kieselgel. Um das saubere Produkt zu bekommen empfiehlt es sich mit einem Gradienten aus Dichlormethan/Methanol von 100/0 bis 95/5 in ein Prozentschritten zu säulen.

Ausbeute: 605mg (0.823mmol/ 75%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 95/5)= 0.25

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

8.78 (s, 1H, N=CH); 8.29 (s, 1H, H(8)); 7.32-7.17 (m, 9H, DMTr-Gruppe);
6.78-6.70 (dd, 4H, $J_1=9.2\text{Hz}$, $J_2=26.0\text{Hz}$, arom. Protonen neben OCH_3 -Gruppen);
6.36-6.32 (t, 1H, H(1'), $J_1=6.0\text{Hz}$); 5.37-5.35 (d, 1H, $J_1=4.8\text{Hz}$, 3'-OH); 4.50-4.40
(q, 1H, $J_1=5.2\text{Hz}$, H(3')); 3.98-3.93 (pq, 1H, H(4')); 3.71 und 3.69 (2s, je 3H,
DMTr- OCH_3 -Gruppen); 3.28-3.08 (dm, teilweise überlagert von NCH_3 -Gruppen,
H(5')); 3.22 und 3.13 (2s, je 3H, NCH_3 -Gruppen); 2.82-2.75 (m, 1H, H(2'));
2.39-2.32 (m, 1H, H(2'))

^{13}C -NMR: δ [ppm], 400 MHz, DMSO

159.31 (C(9)); 158.16 (C(2)); 157.95 C(10) 151.51 (C(6)); 144.89 (C(11));
 141.09 (C(8)); 135.54 und 135.48 (C(15)); 129.71 und 129.51 (C(12)); 127.62
 (C(16)); 125.81 (C(5)); 120.19 (C(4)); 113.00 und 112.94 (C(13)); 86.09 (C(4'));
 85.32 (C(14)); 83.46 (C(1')); 70.56 (C(3')); 64.09 (C(5')); 54.94 und 54.89
 (C(OCH₃)); 40.85 (NCH₃-Gruppe); 39.15 (C(2'); überlagert von DMSO-Signal));
 34.73 (NCH₃-Gruppe)

Elementaranalyse: berechnet: C(55.59); H(4.80); N(11.44); O(10.89); I(17.28)

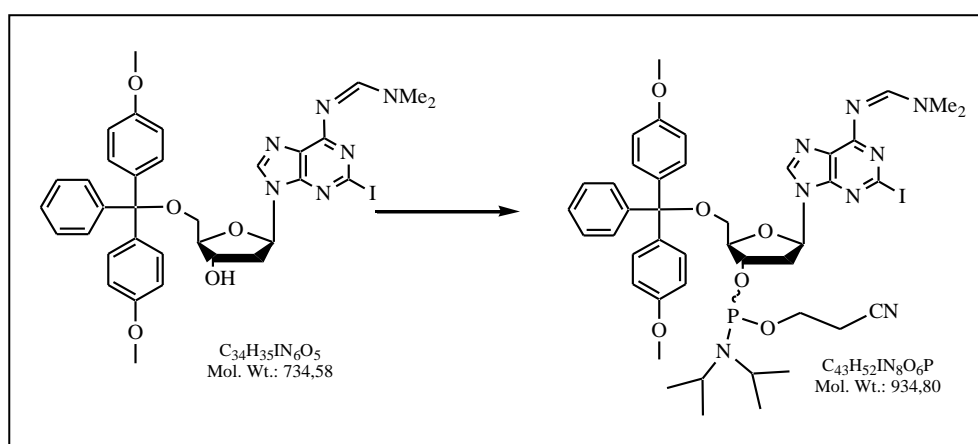
gefunden: C(55.11); H(4.86); N(10.57)

ESI(+): berechnet: 734.6

gefunden: 734.9 und 735.6 [M+H⁺]

- Synthese von 2-Iodo-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenyl-methyl)-3'-O-(2-cyanethoxydiisopropylphosphin)-N,N-dimethyl-N'-formamidin-desoxy-Adenosin (**35**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

300mg der tritylierten Verbindung 2-Iodo-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenyl-methyl)-N,N-dimethyl-N'-formamidin-desoxy-Adenosin werden unter Argon Atmosphäre vorgelegt und in 6mL abs. Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt und bei dieser Temperatur mit 1.15eq (55.5mg) DCI versetzt. Nach der langsamen Zugabe des Phosphitylierungs-Reagenzes (2-Cyanethyl-di(diisopropylamin)phosphoramidit) wird die

Reaktion bei Raumtemperatur gerührt bis keine weitere Umsetzung zu erkennen ist. Anschließend wird die Reaktion mit 3mL Natriumhydrogencarbonat- und Brine-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, einrotiert und gesüßt (*n*-Hex/Aceton/TEA). Als Produkt werden zwei Diastereomere erhalten.

Ausbeute: 315mg (0.334mol/ 82%)

DC: R_f (*n*-Hex/Aceton/TEMED: 55/45/0.5)= 0.25 und 0.21

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm], 300 MHz, Aceton

8.86 (s, 1H, N=CH); 8.15 (s, 1H, H(8)); 7.47-7.17 (m, 9H, DMTr-Gruppe);
6.84-6.73 (m, 4H, arom. Protonen neben OCH₃-Gruppen); 6.36-6.32 (m, 1H, H(1'), Diastereomere); 4.94-4.86 (m, 1H, H(3')); 4.27-4.18 (m, 1H, H(4'));
3.94-3.85 (m, 1H, H(5')); 3.78-3.75 (m, 6H, DMTr-OCH₃-Gruppen);
3.69-3.58 (m, 1H, H(5')); 3.30 und 3.21 (2s, je 3H, NCH₃-Gruppen); 3.12-3.02 (m, 1H, H(2')); 2.92-2.63 (m, 4H, Ethyl-H); 2.73-2.71 (m, 1H, H(2')); 1.28-1.11 (m, 12H, *iso*-Propyl)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm], 300 MHz, Aceton

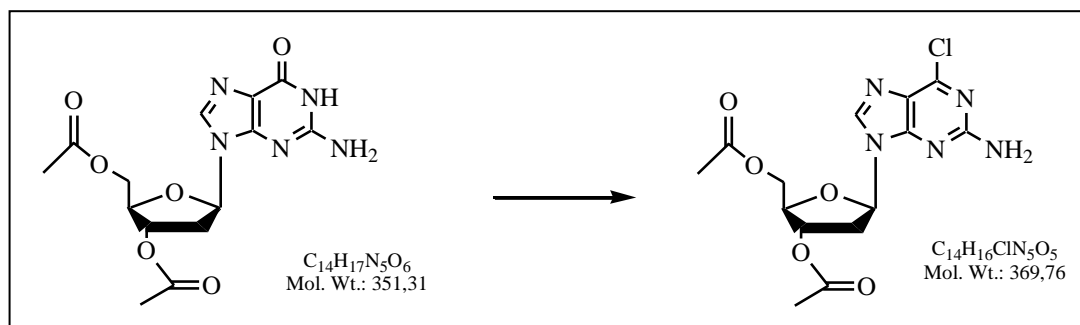
148.45 und 148.34 Phosphoramidit; 13.28 Phosphitylierer (Verhältnis 62.7:37.3)

ESI(+/-): berechnet: 934.8

gefunden: 936.0 [M+H⁺] und 936.9 [M+2H⁺]

- Synthese von 3',5'-*O*-diacetyl-1'-desoxy-1'-(2-amino-6-chlorpurin)- β -D-desoxyribofuranose (D2.I)

Reaktionsgleichung:



Janeba, 2002, JOC

Durchführung:

Das verwendete Triethyl-ammoniumchlorid wurde zwei Tage bei 80°C vorgetrocknet. In einem wasserfreien Kolben werden 2.5g (7.116mmol) von 3',5'-*O*-diacetyl-desoxyguanosin und 2.354g (2eq) Triethyl-ammoniumchlorid in 40mL abs. Acetonitril vorgelegt. Nach der Zugabe von 0.99mL (1.1eq) *N,N'*-Dimethylanilin und 5eq (3.31mL) Phosphoroxychlorid wird der Ansatz 10 Minuten bei 70°C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel vollständig eingeeengt und der ölige, leicht gelbe Rückstand auf Eis gegeben und zwanzig Minuten heftig gerührt. Zur Aufreinigung wird die wässrige Lösung mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das gelbliche Öl wird durch eine Säulenchromatographie (Dichlormethan/ Methanol 98/2) gereinigt. Als Produkt erhält man einen farblosen Schaum.

Ausbeute: 0.789mg (1.989mmol, 30%)

DC: R_f (DCM/MeOH: 98/2)= 0.2

¹H-NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

7.91 (s, 1H, H(8)); 6.51 (s, 2H, NH₂); 6.17-6.10 (dd, 1H, H(1'), $J_1= 5.75\text{Hz}$, $J_2= 8.5\text{Hz}$); 5.31-5.26 (dt, 1H, H(3'), $J_1= 5.75\text{Hz}$, $J_3= 1.75\text{Hz}$); 4.29-4.16 (m, 3H, H(4') und H(5')); 2.98-2.85 (m, 1H, H(2')); 2.49-2.40 (m, 1H, H(2')); 2.08 (s, 2H, CH₃-Gruppe); 2.03 (s, 3H, CH₃-Gruppe)

¹³C-NMR: δ [ppm], 250 MHz, DMSO

170.11 und 169.96 (C=O); 159.78 (C(4) C-Cl); 153.71 (C(2)); 149.61 (C(6)); 141.01 (C(8)); 123.55(C(5)); 83.06 (C(1')); 81.60 (C(4')); 74.31(C(3')); 63.49 (C(5')); 35.14 (C(2')); 20.75 und 20.49(CH₃-Gruppe)

Elementaranalyse: berechnet: C(45.48); H(4.36); N(18.94); O(21.63); Cl(9.59)

gefunden: C(45.51); H(4.48); N(18.98)

ESI(+/-): berechnet: 369.8

gefunden: 369.9 und 392.0 [M+Na⁺]

6.5 Oligonukleotide

6.5.1 Unmodifizierte Referenz-Stränge

6.5.1.1 Verwendete Chemikalien

Acetonitril, extra dry, $H_2O < 0.003\%$, Biosolve LTD

Deblock solution: Trichloressigsäure in Methylenchlorid, Perseptive Biosystems

DCI Activator, 4,5-Dicyanoimidazol in Acetonitril, Proligo Biochemie

CAP A: Essigsäureanhydrid in THF, Proligo Biochemie

CAP B: 1-Methylimidazol in THF/Pyridin, Proligo Biochemie

Oxidizer: Iod in Pyridin/Wasser/THF, Proligo Biochemie

DNA Bausteine: dA, dT, dG und dC: Pharmacia Biotech

RNA Bausteine: rA, rU, rG und rC: Proligo Biochemie

Die Oligonukleotidsynthesen werden im 1 μ mol Maßstab mit einem EXPEDITE® Synthesizer der Firma Perseptive Biosystems durchgeführt. Es wurden CPG mit einer Porengröße von 500 Å von Perseptive Biosystems eingesetzt: Entweder gekaufte fertig gepackte Säulen oder selbst gefüllte werden verwendet. Die DNA- und RNA-Phosphoramidite werden in Acetonitril (für DNA Synthese) in einer 0.1M Konzentration gelöst.

6.5.2 DNA

Die unmodifizierten DNA-Stränge werden mit dem „DMT-Off“ Modus synthetisiert. Die Oligonukleotide werden bei 55°C über Nacht durch Behandlung mit 2mL einer Mischung Ammoniak/Methanol: 3/1 entschützt und vom Träger abgespalten. Das CPG Material wird durch Filtration über Schleicher & Schuell 0.45 μ m Filterhalter abgetrennt und mit 2mal 400 μ L Millipore-Wasser gespült. Das Filtrat wird in einem Speed Vac Konzentrator bis zur Trockne eingeengt.

Für die mit iodierten Basen modifizierten DNA-Stränge erfolgte keine Verlängerung der Reaktionszeiten am Synthesizer und auch keine Unterbrechung der Synthese nach der Kupplung der iodierten Base. Nach der Einführung des Spin-Labels mittels der Sonogashira-Kreuzkupplung werden die Oligonukleotide bei Raumtemperatur 24 Stunden mit 2mL $NH_3/MeOH$: 3/1 behandelt.

6.5.2.1 Aufreinigung der DNA-Stränge

Reinigung nach Größe: Die Trennung erfolgt auf einer Jasco-HPLC mit einer „Anionen Exchange-HPLC“ (Dionex DNAPac® PA-100 (9x 250mm)) bei einer Säulentemperatur von 55°C. Hierbei werden die Synthese-Abbrüche nicht gewünschter Oligomerlänge vom gewünschten abgetrennt.

Puffer A: Millipore-Wasser

Puffer B: 0.25M Tris-Cl: 0.25M Tris werden in einem Liter Millipore-Wasser gelöst, der pH wird mittels Salzsäure auf pH=8 eingestellt

Puffer C: 1M NaCl

Tabelle 20: Gradient für DNA-Aufreinigung mittels Anionen Exchange-HPLC

Zeit [min] Puffer[%]	0	10	25	28	30	32-35
H₂O	100	85	41	0	0	85
0.25 Tris-Cl	0	10	10	0	0	10
1M NaCl	0	5	49	100	100	5

Reinigung nach Funktionalität: Bei dieser Methode ist die Differenzierung zwischen der gelabelten, ungelabelten und der reduzierten DNA möglich.

Puffer A: 1M Triethylammoniumacetat: 140mL Triethylamin und 58mL Essigsäure werden unter Eiskühlung gemischt und mit Millipore-Wasser auf 1L aufgefüllt. Der pH-Wert wird auf pH 7 mit TEA oder Essigsäure eingestellt.

Puffer B: Millipore-Wasser: zur Verdünnung des Puffers A

Puffer C: Acetonitril

Die Aufreinigung der DNA-Stränge wird mit einer Jasco Anlage mittels „Reverse-Phase-HPLC“ (Phenomenex, Jupiter 4 μ -Poter-90A) durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 260nm. Es wird ein linearer Gradient von Puffer C (Acetonitril, gradient grade) in A (1M TEAA) und B verwendet bei einer Flussgeschwindigkeit von 7mL/min.

Tabelle 21: Gradient zur DNA-Aufreinigung mittels Reverse-Phase HPLC

Zeit [min] Puffer [%]	0	25	27	30	32	35
1M TEAA	10	10	0	0	10	10
H₂O	85	55	0	0	85	85
AcCN	5	35	100	100	5	5

6.5.3 RNA

DEPC Wasser: 1L Millipore-Wasser wird über Nacht bei Raumtemperatur mit 1mL Diethylpyrocarbonat behandelt und bei 120°C 25min autoklaviert. Anschließend wird der pH-Wert mit Lithiumhydroxid auf pH= 8 eingestellt.

Alle benutzte Spitzen und 1mL-Reagiergefäße werden vor Benutzung im Autoklav bei 120°C 25 Minuten sterilisiert und anschließend im Trockenschrank bei 55°C gelagert.

6.5.3.1 TBDMS-Chemie

Nach beendeter Synthese wird die Dimethoxytritylgruppe vom letzten Baustein abgespalten und anschließend erfolgt die gleichzeitige Abspaltung der Schutzgruppen und der Festen-Phase erfolgt mit Ammoniak/Ethanol im Verhältnis 3/1 bei einer Dauer von 24 Stunden und bei 30°C. Der Überstand wird abgenommen und das Trägermaterial wird mit einem sterilen Spritzenfilter von der Firma Nalgene (Porengröße: 0.2µm) von der restlichen RNA-Lösung abgetrennt und zweimal mit je 400µL DEPC-Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Phasen werden eingengt und für die Entschützung der 2'-Hydroxy-Gruppe mit 300µL einer Mischung aus 0.3mL N-Methylpyrrolidon, 0.15mL Triethylamin und 0.2mL Triethylaminhydro-fluorid (NEt₃ x 3HF) versetzt und 1.5 Stunden bei 65°C inkubiert. Nach dem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt wird, versetzt man diese mit 1.2mL *n*-Butanol. Die RNA-Fällung erfolgt bei -80°C bei einer Dauer von 0.5 Stunden. Das Pellet wird mittels Zentrifugieren bei 0°C (0.5h, 9000rpm) erhalten und muss anschließend noch zweimal mit 300µL einer Lösung aus *n*-Butanol, 0.15mL N-Methylpyrrolidon und 0.15mL DEPC-Wasser gewaschen werden. Der nach dem Evaporieren erhaltene Rückstand wird über die HPLC gereinigt.

6.5.3.2 ACE[®]-Chemie

6.5.3.2.1 Verwendete Chemikalien

Deblocking der ersten DMT-Gruppe: 3% Dichloressigsäure in DCM

Activator: S-Ethyl-Tetrazol, 0.5M in Acetonitril, Dharmacon

CapA: 10% 1-Methylimidazol (Aldrich) in Acetonitril (synthesis grade)

CapB: 10% Essigsäureanhydrid (Riedel de Haen, ACS) in Acetonitril (synthesis grade)

Oxidizer: 1M tBuOOH in Toluol: 36mL tBuOOH (70% in Wasser) wird mit 150mL Toluol versetzt. Nach Ausschütteln werden die zwei Phasen in 30-60min in einem Scheidetrichter getrennt. Die organische Phase wird bei -20°C über Nacht abgekühlt, das gefrorene Wasser wird schnell über eine Nutsche abgesaugt.

Deblocking der 5'-Silylgruppen, Triethylamin, Hydrofluorid: 80mL Triethylamin werden in 120mL DMF gelöst und 7.8mL HF (48% in Wasser) langsam zugetropft (leicht exotherm).

RNA Bausteine: rA, rG, rC und rU: Dharmacon

Iodierten-RNA-Bausteine wurden im Arbeitskreis synthetisiert

6.5.3.2.2 Synthese von modifizierter RNA

Die Oligonukleotidsynthesen werden im 0.2 μmol Maßstab mit einem ABI 392 Applied Biosystems durchgeführt, das von Dharmacon umgebaut wurde. Es wurden Polystyrol-Träger mit einer Porengröße von 500Å von Dharmacon eingesetzt: Schon gepackte Säulen werden verwendet. Die öligen Phosphoramidite werden in Acetonitril (für DNA/RNA Synthese) in einer 0.1M Konzentration gelöst.

Die Oligonukleotidsynthese beginnt mit der Entschützung der DMTr-(Dimethoxytrityl)-Schutzgruppe der ersten Base mit anschließender Zufuhr des zweiten Nukleotids gleichzeitig mit dem Kupplungsreagenz. Beim Aktivator handelt es sich um S-Ethyl-tetrazol und die gesamte Kupplung erfolgt innerhalb von 60 Sekunden. Der Aktivator überführt das Phosphit des zweiten Nukleotids in eine reaktive Spezies und erleichtert somit die Kupplung an die freie 5'-Hydroxy-Gruppe. Die nicht abreagierten Hydroxylgruppen werden anschließend durch Blockieren (*engl. capping*) mit einem Acetylrest für die weitere Synthese nicht mehr zugänglich gemacht. Als *Capping*-Reagenz wird eine Mischung aus Essigsäureanhydrid-Lösung und einer *N*-Methylimidazol-Lösung benutzt. Um die Stabilität des entstandenen Dimers zu gewährleisten, wird der Phosphor von der reaktiven Oxidationsstufe (+III) in die unreaktive (+V) überführt. Als Oxidationsmittel fungiert hierbei das *tert*-Butylhydroperoxid

in Toluol. Vor der nächsten Kupplung wird die geschützte 5'-Hydroxylgruppe mit Triethylammoniumfluorid entschützt und der Syntheszyklus startet von neuem.

Der Zyklus wird vollständig durchlaufen und die Kupplung mit dem Spin-Label erfolgt anschließend immer noch auf der Säule. Bei der Sonogashira-Kreuz Kupplung arbeitet man mit wasserfreien und sauerstofffreien Lösungsmitteln. Als solche werden in diesem Fall Dichlormethan und Triethylamin im Verhältnis 3.5/1.5 verwendet. Der Katalysator ist Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-di-chlorid und der Co-Katalysator ist Kupferiodid (9.8mg). Das Radikal (2.2mg) wird mit dem Katalysator (2.0mg) und dem Co-Katalysator in 200 μ L gelöst und auf die Säule gegeben. Diese Reaktionslösung sollte innerhalb von 30 Sekunden hergestellt und in die Säule gespritzt werden (die Reaktionslösung sollte orange bis schwach braun sein), da sonst die reaktive Spezies abreagiert ist, es bildet sich das Homo-Radikal, und es zu keiner Kupplung mit dem Iodo-Nukleotid mehr kommen kann. Die beiden neuen Spin-Label **2** und **2*** zeigen scheinbar eine höhere Reaktivität als das 2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **1**, da die Kupplungslösung sich in wenigen Sekunden schon braun verfärbt^[34]. Anschließend wird die Säule lichtdicht verpackt und unter ständiger Bewegung wird innerhalb von 2.5 Stunden die Reaktion zur Ende gebracht. Die Kupplung wird, um die Ausbeute zu erhöhen, erneut durchgeführt. Nach der zweiten Reaktionszeit von 2.5 Stunden wird die Säule mit Dichlormethan gespült und getrocknet.

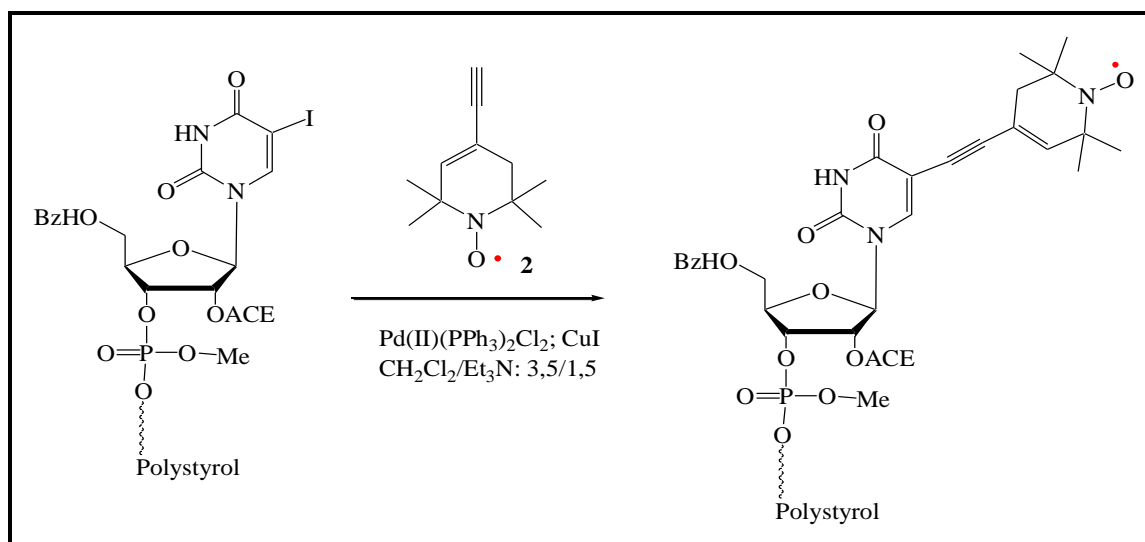


Abbildung 112: Sonogashira-Kreuz-Kupplung auf der Festphase mit TEMPA(2)

Die Entschützung der Phosphat-Einheit erfolgt noch auf der Säule durch die Zugabe einer 0.5M Di-Natrium-2-carbamoyl-2-cyanoethylen-1,1-di-thionat-trihydrat- Lösung in Dimethylformamid-Wasser-Gemisch 98:2. Dieser Entschützungsschritt besitzt eine Reaktionszeit von

30 Minuten, wobei die Reaktionslösung alle 10min in der Säule bewegt wird. Sollte sich die anfänglich gelbliche Lösung braun verfärben, so muss diese ausgewechselt werden. Der Farbumschlag ist auf die Reaktion mit den Katalysatorresten auf der Säule zurückzuführen. Anschließend wird das noch an die Säule gebundene Oligonukleotid mit Millipore-Wasser und Acetonitril gespült und mit einer 40%-igen *N*-Methylamin-Lösung versetzt. Dabei erfolgen die Entschützung der Basen, die Abspaltung der Esterfunktion der ACE-Schutzgruppe und die gleichzeitige Abspaltung von der Festphase. Die Dauer dieses Schrittes und die Temperatur sind von der Probe abhängig. Arbeitet man mit einer ungelabelten RNA, so ist die Reaktion bei 55°C in einem Zeitraum von 10 Minuten durchzuführen. Ist die synthetisierte RNA gelabelt, so sollte dieser Vorgang bei +4°C und innerhalb von 16 Stunden erfolgen. Das Trägermaterial wird mit einem Spritzfilter von der Firma Schleicher & Schuell (Porengröße: 0.45µm) abgetrennt und mit 2mal 400µL Millipore-Wasser nachgespült. Das Filtrat wird bis zur Trockne mit der Speed Vac eingeengt.

6.5.3.2.3 Abspaltung der 2'-OH-Schutzgruppe

Verwendeter Puffer: 2.86mL Essigsäure (100%) werden in 496mL DEPC Wasser gelöst (100mM). Der pH-Wert wird mit TEMED, RNase frei (ca. 400-500µL) zu 3.8 eingestellt.

Als letztes vor der Schmelzpunktbestimmung, der CD-Spektroskopie und EPR-Messungen werden die 2'-Hydroxyl-Schutzgruppen entfernt. Dies geschieht unter **sterilen** Bedingungen mit einem TEMED/Essigsäure-Puffer, welcher einen pH-Wert von 3.8 besitzt. 400µL dieses Puffers wird dem trockenen Oligonukleotid zugegeben und 10sec. gemischt. Nach 30min. bei 60°C wird die Lösung in der Speed-Vac zur Trockene einrotiert.

6.5.3.3 Aufreinigung der RNA-Stränge

Die Oligonukleotide werden mittels „Anionen Exchange-HPLC“ aufgereinigt. Es werden lineare Gradienten von Puffer B (1M LiCl, pH= 8) in A (Millipore-Wasser, pH= 8) verwendet, wie in der unteren Tabelle beschrieben ist. Die UV-Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 260nm. Die Reinigung wird an einem Jasco HPLC-System durch die Verwendung einer semi-präparativen Dionex DNAPac[®] PA-100 (9x 250mm)-Säule mit einer Flussrate von 5mL/min durchgeführt. Die vereinigten Fraktionen werden lyophilisiert und mittels PD 10-Säulen entsalzt. Dabei wird die Säule mit 25mL Millipore- oder DEPC-Wasser äquilibriert und mit der RNA-Probe gelöst in einem Milliliter beladen. Anschließend werden sechs Fraktionen zu je einem Milliliter aufgefangen. Die entsalzte Oligomere befinden sich in

Fraktion 3 und 4. Das erhaltene Produkt wird mittels Massenspektrometrie identifiziert und auf seine Reinheit untersucht. Die Ausbeutebestimmung erfolgt durch die Messung der optischen Dichte bei 260nm.

Puffer A: DEPC-Wasser pH= 8

Puffer B: 1M Lithiumchlorid in DEPC Wasser, pH= 8

Bei der Aufreinigung von RNA-Strängen synthetisiert mit ACE[®]-Chemie ist das arbeiten mit sterilem DEPC-Wasser nicht notwendig.

Tabelle 22: Gradienten für RNA-Aufreinigung

RNA-Länge	Gradient
12mer	von 0 bis 60% B in A bis 40min. ; 100%B bis 47min.
15mer	von 0 bis 56% B in A bis 32min. ; 100%B bis 36min.
34mer	von 0 bis 15% B in A bis 5.1min. ; bis 60% bis 50min. ; 100%B bis 60min.
49mer	von 0 bis 100% B in A bis 60min. ; 100%B bis 65min.

6.5.4 Analytik

6.5.4.1 Quantifizierung

Die aufgereinigten DNA und RNA werden in 1mL Millipore- bzw. DEPC Wasser ganz gelöst. 10µL von dieser Lösung werden in eine mit 1mL Millipore- bzw. DEPC Wasser gefüllten 10mm Quarzküvette gegeben. Die Extinktion oder optische Dichte (OD₂₆₀) wird dann bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen und das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor (100) multipliziert. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann diesen OD₂₆₀-Wert in Konzentration übersetzt werden.

$$OD_{260} = e \cdot c \cdot d$$

Gleichung 11

e: molarer Extinktionskoeffizient der Oligonukleotide

c: gesuchte Konzentration (molL⁻¹)

d: Schichtdicke der Küvette (1cm)

6.5.4.2 Massenspektroskopie

MALDI: Die Massenspektren der unmodifizierten Oligonukleotiden (DNA und RNA) wurden an einem MALDI-TOF Massenspektrometer der Firma Fisons, England (VG ToFSpec) aufgenommen.

ESI: die Massenspektren der gelabelten DNAs wurden auf einem Gerät der Firma Fisons, England (VG Platform II) gemessen.

MALDI:

- die Massenspektren der gelabelten RNAs wurden an einem MALDI-TOF Massenspektrometer VOYAGER DE-PRO der Firma Applied Biosystems aufgenommen.
- Hochaufgelöste Masse bei einer Länge von mehr als 20 Basen wurde an microTOF QII von Bruker durchgeführt (von M. Held, Gruppe von Prof. Heckel)

6.5.5 Charakterisierung der Oligonukleotide

6.5.5.1 Schmelzpunktbestimmung

Die UV-Schmelzkurven wurden in einem Zweistrahl UV-/VIS-600 Spektralphotometer der Firma Jasco mit einem thermoregulierbaren Küvettenhalter gemessen. Eine Küvette der Schichtdicke 1cm wurde mit 1mL des entsprechenden Puffers gefüllt und diente als Referenz. Die Probenküvette (Schichtdicke 1cm) wurde mit 1mL desselben Puffers gefüllt. Nach dem Nullabgleich bei 260nm bei 20°C wurde eine Probenabhängige Konzentration in der Probenküvette eingestellt (im Bereich von 0.25 bis 0.5OD₂₆₀).

Für die Charakterisierung der RNA werden die Küvetten mit einer wässrigen 2.5%igen Formamid-Lösung vorbehandelt und mit DEPC-Wasser mehrmals gespült.

Die Duplexe werden zuerst denaturiert (Temperatur anhängig vom Konstrukt) und anschließend bis auf 0°C abgekühlt. Die Kühlgeschwindigkeit beträgt dabei 5°C/min. für die Oligomere bis zur einer Länge von 20Basen. Bei der Analyse von längeren Konstrukten oder RNAs mit komplexer sekundärer Struktur erfolgt die Denaturierung in einem Thermostaten 5min bei 95°C. Nach einer schnellen Verdünnung auf 10mL und gleichzeitige Abkühlung auf 0°C wird die RNA 30 Minuten bei dieser Temperatur hybridisiert. Die Aufkonzentrierung wird durch die Verwendung der VIVASPIN Konzentratoren der Firma Sartorius durchgeführt.

Die Aufnahme der Schmelzkurven wurde bei 260nm und mit einer Heizrate von 0.5°C/min bis 95°C durchgeführt. Alle 30s wurde ein Datenpunkt registriert. Nach Beendigung der

Messung wurde die Probe auf 20°C abgekühlt. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt. Für alle Messungen unterhalb 15°C wurde die Küvettenkammer mit Stickstoff gespült, um Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenoberflächen zu vermeiden.

6.5.5.2 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem JASCO J-710 Spektropolarimeter mit der Software des J-810 mit einem Peltier thermoregulierbaren Küvettenhalter (Neslab RTE 100). In einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0.2cm wird eine neue Oligomer-Lösung von einer höheren Konzentration als für die T_m -Messungen hergestellt und gegeben falls neu hybridisiert. Alle Spektren wurden jeweils fünfmal bei 20°C im Bereich von 350nm bis 190nm akkumuliert. Die folgenden Messbedingungen werden verwendet: *resolution* 1nm, *scan speed* 50nm/min, *response* 1s und *band width* 1.0nm. Das unter den gleichen Bedingungen gemessene Spektrum des jeweiligen Puffers wird automatisch mit *baseline correct* subtrahiert.

6.5.5.3 EPR-Messungen

Durchgeführt und ausgewertet in der Gruppe von Prof. T.F. Prisner.

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: Die notwendige Konzentration von 0.1mM DNA/RNA in 100µL wurde in OD_{260} umgerechnet und vorgelegt. Die Duplexe wurden dann durch Denaturierung/Renaturierung im jeweiligen Puffer gebildet. Nach Einrotieren der Lösung wurden die Oligonukleotide in 100µL 20%-Ethylenglykol- oder 20%-Sucrose-Lösung gelöst. Anschließend wird diese Lösung in ein EPR-Röhrchen pipettiert.

Im Falle der RNAs wurden die EPR-Röhrchen zuvor sterilisiert, dabei werden diese zuerst mit einer 2.5%-igen Formamid-Lösung über Nacht behandelt, anschließend sorgfältig mit DEPC-Wasser gespült und bei 100°C über Nacht getrocknet.

Die PELDOR-Messungen erfolgen bei 50K an einem Bruker Elexsys E580 gepulsten X-Band Spektrometer. Als zweite Mikrowellen-Quelle wurde das Bruker E580-400 verwendet. Die Pulse wurden generiert durch die Benutzung des 1kW TWT-Amplifiers. Bei der 4-Puls Sequenz wurde ein Puls mit der Länge von 32ns für die Detektion und ein 12ns langer Puls für das Pumpen genutzt. Die weiteren Parameter unterscheiden sich je nach Konstrukt und sind bei den jeweiligen Kapiteln näher beschrieben.

Die Probenvorbereitung für die *cw*-EPR erfolgt wie oben beschrieben, das Volumen wird aber auf 20 μ L verringert.

Bei den meisten diskutierten *cw*-Spektren handelt es sich um die X-Band (9.54 GHz) EPR-Spektren, aufgenommen bei Raumtemperatur am Bruker E500 Spektrometer ausgerüstet mit einer TE102 Höhle.

7 Literatur

- [1] Avery, O.T.; MacLeod, C.M.; McCarty, M.; Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. *Exp. Med.*, 1944, 79, 137-158
- [2] <http://www.chemheritage.org/classroom/chemach/pharmaceuticals/watson-crick.html>
- [3] Fontana, W.; Struktur einzelsträngiger Nukleinsäuren; Vorlesungsskript, *Institut für Theoretische Chemie, Wien*, 1996
- [4] Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L.; *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; 5. Auflage, 2003
- [5] www.mathehotline.de/.../messages/26/1201.jpg
- [6] Groth, J.; Meine Moleküle, deine Moleküle. *Online-Buch*, <http://www.meine-molekuele.de>
- [7] Koolman, J.; Röhm, K.-H.; *Taschenatlas der Biochemie*; Thieme Verlag, Stuttgart; 3. Auflage, 2003
- [8] http://www.vsc.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/dna.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/nukleinsaeren/dna_strukturen/dna_doppelhelix/b_dna.vscml.html
- [9] Strube, T.; Synthese und Strukturuntersuchungen an 2'- Fluoro modifizierten UUCG-Haarnadelschleifen. Disputation, *Frankfurt am Main*, 2001
- [10] a) Merrifield, R.B.; Solid Phase Peptid Synthesis: Synthesis of a Tetrapeptide, *JACS*, 1963, 85, 2149
b) Marshall, G. R. J., A New Approach to the Continuous, Stepwise Synthesis of Peptides. *Peptide Sci.* 2003, 9, 534-544
- [11] Letsinger, R.L.; Lunsford, W.B.; Synthesis of Thymidine Oligonucleotides by Phosphite Triester Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98(12), 3655
- [12] Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*; 1992; 48(12); 2223
- [13] Khorana, H.G.; Total Synthesis of a Gene. *Science*; 1979; 203; 614
- [14] Beaucage, S.L., Caruthers, M.H.; Deoxynucleoside Phosphoramidites- A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide. Synthesis *Tetrahedron Letters*; 1981; 22(20); 1859
- [15] Narang, S.A.; DNA Synthesis. *Tetrahedron*, 1983, 39(1), 3
- [16] Garegg, P.J.; Lindh, I; Regberg, T.; Stawinski, J; Strömberg, R.; Nucleoside- H-Phosphonates. *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 4055
- [17] Ogilvie, K.K.; Sadana, K.L.; Thompson, E.A.; Quilliam, M.A.; Westmore, J.B.; The Use of Silyl Groups in Protecting the Hydroxyl Functions of Ribonucleosides. *Tetrahedron Lett.*, 1974, 33, 2861
- [18] Scaringe, S.A.; RNA Oligonucleotide Synthesis via 5'-Silyl-2'-Orthoester Chemistry. *Methods*, 2001, 23, 206
- [19] a) Scaringe, S.A.; Orthoester Protecting Groups; *United States Patent*: 6,111,086, 2000;

- b) Scaringe, S.A.; Kitchen, D.; Kaiser, R.; Marshall, W.S.; Preparation of 5'-Silyl-2'-Othoester Ribonucleosides for Use in Oligoribonucleotide Synthesis. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, **2004**, 2.10.1-2.10.15
- [20] Spaltenstein, A.; Robinson, B.H.; Hopkins, P.B.; A Rigid and Nonperturbing Probe of Duplex DNA Motion. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1299-1301
- [21] a) Spaltenstein, A.; Robinson, B.H.; Hopkins, P.B.; Sequence- and Structure-Dependent DNA Base Dynamics: Synthesis, Structure and Dynamics of Side and Sequence Specifically Spin-Labeled DNA. *Biochemistry*, **1989**, *28*, 9484-9495
b) Kirchner, J.J.; Hustedt, E.J.; Robinson, B.H.; Hopkins, P.B.; DNA Dynamics Form a Spin Probe: Dependence of Probe Motion on Tether Length. *Tetrahed. Lett.*, **1990**, *131(5)*, 593-596
- [22] Hubbell, W.L.; Cafiso, D.S.; Altenbach, C.; Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat. Struct. Biolog.*, **2000**, *7(9)*, 735-739
- [23] Macosko, J.C.; Pio, M.S.; Tinoco, I.; Shin, Y.-K.; A novel 5' displacement spin-labeling technique for electron paramagnetic resonance spectroscopy of RNA. *RNA*, **1999**, *5*, 1158-1166
- [24] Edwards, Th.E.; Sigurdsson, S.Th.; Electron Paramagnetic Resonance Dynamic Signature of TAR RNA-Small Molecule Complexes Provide Insight into RNA –structure and Recognition. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 14843-14847
- [25] Qin, P.Z.; Butcher, S.E.; Feigon, J.; Hubbell, W.L.; Quantitative Analysis of the Isolated GAAA Tetraloop/Receptor Interaction in Solution: A Side-Directed Spin Labeling Study. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 6929-6936
- [26] Aso, M.; Ikeno, T.; Norihisa, K.; Tanaka, M.; Koga, N.; Suemune, H.; Molecular Design of a New Class of Spin-Labeled Ribonucleosides with *N-tert*-Butylaminoxyl Radicals. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 3513-3520
- [27] Ramos, A.; and Varani, G.; A New Method To Detect Long-Range Protein-RNA Contacts: NMR Detection of Electron-Proton-Relaxation Induced by Nitroxide Spin-Labeled RNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10992-10993
- [28] Kim, N.K.; Murali, A.; DeRose, V.J.; A Distance Ruler for DNA Using EPR and Site-Directed Spin Labeling. *Chemistry & Biology*, **2004**, *11*, 939-948
- [29] Qin, P.Z.; Feigon, J.; Hubbell, W.L.; Site-directed Spin Labeling Studies Reveal Solutions Conformational Changes in a GAAA Tetraloop Receptor upon Mg²⁺- dependent Docking of a GAAA Tetraloop. *J. Mol. Biol.*, **2005**, *351*, 1-8
- [30] a) Barhate, N.; Cekan, P.; Massey, A.P.; Sigurdsson, S.Th.; A Nucleoside that Contains a Rigid Nitroxide Spin Label: A Fluorophore in Disguise. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2655-2658;
b) Cekan, P.; Smith, A.L.; Barhate, N.; Robinson, B.H.; Sigurdsson, S.Th.; Rigid Spin-Label Nucleoside Ç: a Nonperturbing EPR Probe of Nucleic Acid Conformation. *Nucl. Acids Res.*, **2008**, *36(18)*, 5946-5954
- [31] a) Schiemann, O.; Piton, N.; Mu, Y.; Stock, G.; Engels, J.W.; Prisner, T.F.; A PELDOR-Based Nanometer Distance Ruler for Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5722;
b) Piton, N.; Schiemann, O.; Mu, Y.; Stock, G.; Prisner, T.F.; Engels, J.W.; Synthesis of Spin-Labeled RNAs for long Range Distance Measurements by PELDOR. *Nucleos., Nucleot. Nucleic Acids*, **2005**, *24(5-7)*, 771
- [32] Agrawal, S.; Antisense oligonucleotides as antiviral agents. *TIBTECH*, **1992**, *10*, 152-158
-

-
- [33] Gannett, P.M.; Darian, E.; Powell, J.H.; Johnson, E.M.; A Short Procedure for Synthesis of 4-Ethynyl-2,2,6,6-Tetramethyl-3,4-Dehydroxy-Piperidine-1-oxyl Nitroxyde. *Synthetic Communications*, **2001**, 31(14), 2137
- [34] Frolow, O., Bode, B.E. und Engels, J. W.; The Synthesis of EPR Differentiable Spin-labels and Their Coupling to Uridine. *Nucleos., Nucleot. Nucleic Acids*; **2007**, 26 (6), 655
- [35] Piton, N.; Schiemann, O.; Mu, Y.; Stock, G.; Prisner, T.F.; Engels, J.W.; Base-specific spin-labeling of RNA for structure determination. *Nucl. Acids Res.*, **2007**, 3128-3144
- [36] Kohjama, N.; Katashima, T.; Yamamoto, Y.; Synthesis of Novel 2-Aryl AICAR Derivates. *Synthesis*, **2004**, 17, 2799-2804
- [37] Seela, F.; Peng, X.; Regioselective Synthesis of 7-Halogenated 7-Deazapurine Nucleosides Related to 2-Amino-7-deaza-2'-deoxyadenosine and 7-Deaza-2'-deoxyisoguanosine. *Synthesis*, **2004**, 8, 1203-1210
- [38] Keller, A.C.; Synthesis and enzymatic testing of reversible terminators for sequencing-by-synthesis (SBS). *Dissertation*, **2009**, Frankfurt am Main
- [39] Seela, F.; Peng, X.; 7-Functionalized 7-Deazapurine Ribonucleosides Related to 2-Aminoadenosine, Guanosine and Xanthosine. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 81-90
- [40] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. and Wothers, P.; *Organic Chemistry*, **2001**, Oxford, 1319-1330
- [41] Thorand, S.; Krause, N.; Improved Procedures for the Palladium-Catalyzed Coupling of Terminal Alkynes with Aryl Bromides (Sonogashira-Coupling). *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 8551
- [42] Khan, S.I.; Grinstaff, M.W.; Palladium(0)-Catalyzed Modification of Oligonucleotides during Automated Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 4704
- [43] Schiemann O., Piton N., Plackmeyer J., Bode B.E., Prisner T., Engels J.; Spin labeling of oligonucleotides with the nitroxid TPA and use of PELDOR, a Puls EPR method, to measure intermolecular distances. *Nature Protocols*, **2007**, 2(4), 904-923
- [44] Piton, N.; Dissertation; Synthese spingelabelter Oligonukleotide zur Abstandsmessung mittels gepulster EPR. *Frankfurt am Main*, 2007
- [45] Schiemann, O.; Kapitel aus dem Buch: *Bioanalytik*, first Eds., Lottspeich & Engels, *Spektrumverlag*, Heidelberg, Mai **2006**
- [46] Jeschke, G.; Einführung in die ESR-Spektroskopie; *Mainz*; **1998**
- [47] a) Hubbell, W.; Cafiso, D.S.; Altenbach C.; Identifying Conformational Change with Side-Directed Spin Labeling. *Nature Struct. Biol.*, **2000**, 7(9), 735;
b) Schiemann, O.; Weber, A.; Edwards, T.E.; Prisner, T.F.; Sigurdsson, S.Th.; Nanometer Distance Measurements on RNA using PELDOR. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 3434
- [48] Rabenstein, M.D.; Shin, Y.-K.; Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 8239-8243
- [49] Edwards, Th.E.; Okonogi, T.M.; Robinson, B.H.; Sigurdsson, S.Th.; Side-Specific Incorporation of Nitroxide Spin-Labels into Internal Side of the TAR RNA; Structure Dependent Dynamics of RNA by EPR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1527-1528
-

-
- [50] Hofmann, T.; Synthese minor groove gelabelter 2'- Desoxyguanosine, Diplomarbeit, *Frankfurt am Main*, **2004**
- [51] Hubbell, L.W.; Qin, P.Z.; Hideg, K.; Feigon, J.; Monitoring RNA Base Structure and Dynamics Using Site-Directed Spin Labeling, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6772
- [52] Cai, Q.; Kusnetzow, A.K.; Hubbell, W.L.; Haworth, I.S.; Gacho, G.P.C.; Eps, n.V.; Hideg, K.; Chambers, E.; Qin, P.Z.; Side-directed spin labeling measurements of nanometer distances in nucleic acids using a sequence-independents nitroxide probe. *Nucl. Acids. Res.*, **2006**, *34*(17), 4722-4730
- [53] Qin, P.Z. and Dieckmann, Th.; Application of NMR and EPR methods the study of RNA. *Curr. Op. Struct. Biology*, **2004**, *14*, 350-359
- [54] Bertini I.L.; *Coordination Chem Rev*, **1996**, *150*, chapter 3, 77-110
- [55] Chapman, D.A.; Killian, G.J.; Gelerinter, E.; Jarrett, M.T.; Reduction of the Spin-Label TEMPONE by Ubiquinol in the Electron Transport Chain of Interact Rabbit Spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **1985**, *32*, 884-893
- [56] Battista, J.L. and Wagner, G.; Utilization of Site-Directed Spin Labeling and High-Resolution Heteronuclear Nuclear Magnetic Resonance for Global Fold Determination of Large Proteins with Limited Nuclear Overhauser Effect Data. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 5355-5365
- [57] Puglisi, J.D. and Tinoco, I.Jr.; Absorbance Melting Curves of RNA. *Methods in the Enzymology*, **1989**, *280*, 304-325
- [58] Gray, D.M.; Hung; S.-H.; Johnson; K.H.; Absorption and Circular Dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes. *Methods in the Enzymology*, **1995**.246, 19-34
- [59] Velluz, L; Legrand, M.; Grosjean, M.; Optical Circular Dichroism, *Verlag Chemie GmbH, Weinheim*, **1965**
- [60] Holzwarth, G.; Circular dichroism measurements to 185 nm in a commercial recording spectrophotometer. *Rec. Sci. Inst.*, **1965**, *36*, 59
- [61] Woody, R.W.; Circular Dichroism. *Methods in the Enzymology*, **1995**, *246*, 34-73
- [62] Quadrioglio, F., Urry, D.W.; Ultraviolet rotatory properties of polypeptides in solution. I. Helical poly-L- alanine *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 2755-2760
- [63] Brahms, J. and Mommaerts, F.H.M.; A Study of Conformations of Nucleic Acids in Solution by Means of Circular Dichroism. *J. Mol. Biol.*, **1964**, *10*, 73-88
- [64] Sprecher, C.A.; Johnson, W.C.Jr.; Circular Dichroism of the Nucleic Acid Monomers. *Biopolymers*, **1977**, *16*, 2243-2264
- [65] Ivanov, V.I.; Minchenkova, L.E.; Minyat, E.E.; Frank-Kamenetskii, M.D.; Schyolkina, A.K.; The B to A Transition of DNA in Solution. *J. Mol. Biol.*, **1974**, *87*, 817-833
- [66] Hannoush; R.N.; Damha, M.J.; Remarkable stability of hairpins containing 2',5'-linked RNA loops. *JACS*, **2001**, *123*, 12368-12374
- [67] Clark, Ch.L.; Cecil, P.K.; Singh, D.; Gray, D.M.; CD, Absorption and thermodynamic analysis of repeating dinucleotide DNA, RNA and hybrid duplexes [d/r (AC)]₁₂*[d/r (GT/U)]₁₂ and the influence of phosphorothioate substitution. *Nucl. Acid Res.*, **1997**, *25*(20), 4098-4105
-

- [68] Moore, D.S.; Wagner, T.E.; Origins of the differences between the circular dichroism of DNA and RNA: Theoretical calculation. *Biopolymers*, **1973**, *12*, 201-221
- [69] Pohl, F.M. and Jovin, T.M.; Salt-induced Co-operative Conformational Change of a Synthetic DNA: Equilibrium and Kinetic Studies with Poly(dG-dC). *J. Mol. Biol.*, **1972**, *67*, 375-396
- [70] Kypr, J. and Vorlíčková, M.; Circular Dichroism Spectroscopy Reveals Invariant Conformations of Guanine Runs in DNA. *Biopolymers*, **2002**, *67*, 275-277
- [71] Elduque, X.; Romainczyk, O.; Engels, J.W.; Synthesis of Isotopically Labeled Nitroxides. in Preparation
- [72] a) Venkataramu, S.D.; Pearson, D.E.; Beth, A.H.; Perkins, R.C.; Park, C.R.; Park, J.H.; Synthesis of perdeuterio-N-81-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinylmaleimide, A highly spin Probe, *J. Label Compounds and Radiopharm.*, **1979**, *XVIII*(3), 371-383.
b) Yamada, K.; Kinoshita, Y.; Yamasaki, T.; Sadasue, H.; Mito, F.; Nagai, M.; Matsumoto, S.; Aso, M.; Suemune, H.; Sakai, K.; Utsumi, H.; Synthesis of Nitroxyl Radicals for Overhauser-enhanced magnetic Resonance Imaging. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2008**, *341*, 548-553.
c) Kelemen, P.; Lugtenburg, J.; Klumperman, B.; ¹⁵N NMR Spectroscopy of Labeled Alkoxyamines. ¹⁵N- Labeled Model Compounds for Nitroxide- Trapping Studies on Free-Radical (Co)Polymerization; *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 7322
- [73] a) Swager, T.M.; Gil, C.J.; Wrighton, M.S.; Fluorescence Studies of Poly(p-phenyleneethylene)s: The Effect of Anthracene Substitution. *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 4886-4893;
b) Höger, S.; Synthesis of brom-iodo-hydroquinone Monoalkyl Ether. *Liebigs Ann./ Recueil.*, **1997**, *273-277*
- [74] Yamaguchi, Y.; Tanaka, T.; Kobayashi, S.; Wakamiya, T.; Matsubara, Y.; Yoshida, Z.; Light-emitting Efficiency of Rod-shape π Conjugated System by donor and Acceptor Groups. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 9332-9333
- [75] Zhdanov, R.; Bioactive Spin Labels I and II; *Springer-Verlag*, Heidelberg (1992).
- [76] Markgraf, D.; Bode, B.E.; Marko, A.; Schiemann, O. and Prisner, T.F.; Conformational flexibility of nitroxide biradicals determined by X-band PELDOR experiments. *Mol. Phys.*; **2007**, *105*, 2153
- [77] Frolow, O., Bats, J.W. und Engels, J.W.; 3-Ethynyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-3-pyrroline. *Acta Crystallographica*, 2009, E65, o1848;
- [78] Bats, J.W., Frolow, O. und Engels, J.W.; 4-Ethynyl- 2,2,6,6-tetramethyl- 1,2,5,6-tetrahydropyridine- N-oxide. *Acta Crystallographica*, 2009, E65, o529
- [79] Grünwald, Ch.; Synthese Pyren-modifizierter RNA. *Diplomarbeit*, **2006**, Frankfurt am Main
- [80] Janeba, Z.; Francon, P; Robins, M.J.; Efficient Syntheses of 2-Chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine) from 2'-Deoxyguanosine. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 989-992
- [81] Kurreck, J.; Antisense technologies. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644
- [82] Romainczyk, O.; Endeward, B.; Prisner, T.F.; Engels, J.W.; RNA-DNA Hybrid structure determined by EPR and enzyme recognition. *Mol. Biosystems*. eingereicht
- [83] Weisbrod, S.H.; Marx, A.; Novel strategies for the site-specific covalent labelling of nucleic acids. *Chem. Commun.*, **2008**, 5675-5685
- [84] a) Lukavsky, P.J; Otto, G.A.; Kim, I.; Puglisi, J.D.; Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nature Struct. Biol.*, **2003**, *12*, 1033-1038
-

b) Dibrov, S.M.; Johnston-Cox, H.; Weng, Y.-H.; Hermann, Th.; Functional Architecture of HCV IRES domain II stabilized by Divalent Metal Ions in the Crystal and Solution. *Angw. Chem.* **2007**, *119*, 230-233

[85] Romainczyk, O.; Prisner, T.F.; Engels, J.W.; Schiemann, O.; Mapping the Global Structure of a Biologically Active RNA by Pulsed Electron-Electron Double Resonance. *Angw. Chem. Int. Ed.* eingereicht.

[86] Varani, G.; Cheong, C.; Tinoco, I.; Structure of an unusually stable RNA hairpin. *Biochem.*, **1990**, *30*, 3280-3289; Varani, G.; Exceptionally stable nucleic acid hairpins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 379-404

[87] a) Duchardt, E.; Schwalbe, H.; Residue specific ribose and nucleobase dynamics of the cUUCGg RNA tetraloop motif by NMR ¹³C relaxation. *J. Biomolec. NMR*, **2005**, *32*, 295-308;

b) Nozinovic, S.; Fuertig, B.; Jonker, H.R.A.; Richter, Ch.; Schwalbe, H.; High-Resolution NMR Structure of a RNA model system: the 14mer cUUCGg tetraloop hairpin RNA. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 683-694.

[88] Villa, A.; Widjajakusuma, E.; Stock, G.; Molecular dynamics simulation of the structure, dynamics and thermostability of the RNA hairpins uCACGg and cUUCGg. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 134-142

[89] Woese, C.R.; Winker, S.; Gutell, R.R.; Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 8467-8471

[90] Antao, V.P.; Tinoco, I.; Thermodynamic parameters for loop formation on RNA and DNA hairpin tetraloops. *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20(4)*, 819-824

[91] Ennifar, E.; Nikulin, A.; Tishchenko, S.; Serganov, A.; Nevskaya, N.; Garber, M.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Nikonov, S.; Dumas, P.; The crystal structure of UUCG tetraloop. *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 35-42

[92] Williams, D.J.; Hall, K.B.; Experimental and computational studies of the G[UUCG]C RNA tetraloop. *J.Mol.Biol.* **2000**, *297*, 1045-1061

[93] Antao, V.P.; Lai, S.Y.; Tinoco, I.; A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins. *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19*, 5901-5905.

[94] Woerner, K.; Dissertation, **1997**, Frankfurt am Main, Woerner, K.; Strube, T.; Engels, J.W.; Synthesis and stability of GNRA-loop analogs. *Hel. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 2094-2104

[95] Sanaka, T.; Hiroaki, H.; Oda, Y.; Tanaka, T.; Ikehata, M.; Uesugi, S.; Studies on the structure and stabilizing factor of the CUUCGG hairpin RNA using chemically synthesized oligonucleotids. *Nuc. Acids Res.*, **1990**, *18*, 3831-3839

[96] Romainczyk, O.; Nozinovic, S.; Endeward, B.; Prisner, T.; Schwalbe, H.; Engels, J.W.; The structure of the cUUCGg-Tetraloop. in Preparation

[97] a) Seelig, B. & Jäschke, A.; A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *A. Chem. Biol.*, **1999**, *6*, 167-176; b) Kobitski, A.Y.; Nierth, A.; Helm, M.; Jäschke, A.; Nierhaus, G.U.; Mg²⁺-dependent folding of a Dials-Alderase ribozyme probed by single-molecule FRET analysis. *Nucl. Asids Res.*, **2007** *35(6)*, 2047-2059

[98] Serganov, A.; Keiper, S.; Malinina, L.; Tereshko, V.; Skripkin, E.; Höbartner, C.; Polonskaia, A.; Tuân Phan, A.; Wombacher, R.; Micura, R.; Dauter, Z.; Jäschke, A. and Patel, D.J.; Structural basis

for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation. *Nature Structural & Molecular Biology*, **2005**, *12*, 218-224

[99] Kisseleva, N.; Kraut, S.; Jäschke, A.; Schiemann, O.; Characterizing multiple metal ion binding sites within a ribozyme by cadmium-induced EPR silencing. *HSFP Journal*, **2007**, *1*(2), 127-136

[100] Weigand, J.E.; Sanchez, M; Gunnesch, E.-B.; Zeiher, S.; Schroeder, R.; Suess, B.; Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA*, **2008**, *14*, 89-97

[101] Arya, D.P.; Xue, L.; Wills, B.; Aminoglycoside (Neomycin) Preference is for A-Form Nucleic Acids, Not Just RNA: Results from a Competition Dialysis Study. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 10148-10149

[102] Cowan, J.A.; Ohyama, T.; Wang, D.; Natarajan, K.; Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interaction. *Nucl. Acids Res.*, **2000**, *28*(15), 2935-2942

[103] Zapp, M.L.; Stern, S.; Green, M.R.; Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 rev protein inhibit rev function and viral production. *Cell*, **1993**, *74*, 969-978

[104] Duchardt-Ferner, E.; Weigand, J.E.; Ohlenschläger, O.; Schmidtke, S.R.; Suess, B.; Wöhnert, J.; Highly Modular Structure and Ligand Binding by Conformational Capture in a Minimalistic Riboswitch. *Angew. Chem. In. Ed.*, **2010**, *49*, 6212-6219

[105] Krstic, I., Frolow, O., Sezer, D., Endeward, E., Weigand, J.E, Suess, B., Engels, J. W. and Prisner, Th.F. PELDOR Spectroscopy Reveals Preorganization of the Neomycin-Responsive Riboswitch Tertiary Structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132* (5), 1454–1455

[106] Wurm, J.; Meyer, B.; Bahr, U.; Held, M.; Frolow, O.; Peter, K.; Engels, J.W.; Heckel, A.; Karas, M.; Entian, K.-D. Wöhnert, J; RNA-binding and enzymatic activity of the ribosome assembly factor Nep1: the protein responsible for Bowen-Conradi syndrome is a pseudouridine-N1-specific methyltransferase. *Nucleic Acids Research* . **2010**, 2010, *38* (7), 2387-2398

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Adenosin
abs.	trocken
Ac	Acetyl-Gruppe
ACE	Acetoxyethoxy-methyl-orthoester
Ade	Adenin
aq	wässrig
B ₁ und B ₂	Base 1 und Base 2
BzH	Benzhydryloxy-bis(trimethylsiloxy)-silan
C	Cytidin
CD	Circulardichroismus Spektroskopie
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
Cyt	Cytosin
d	Duplett
DCA	Dichloressigsäure
DCM	Dichlormethan
DEEP	Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
dest. Wasser	desmineralisierte Wasser
DMTr	Di-methoxytrityl-Schutzgruppe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-di-amin-tetra-acetat-di-natrium
EE	Essigester
ENDOR	Elektron-Nuklear-Doppel-Resonanz
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
cw-EPR	<i>continuous wave EPR</i>
ESEEM	<i>Electron-Spin-Echo-Envelope-Modulation</i>
ESI-MS	Elektrosprayionisationsmassen-Spektrometrie
eq	Äquivalente
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanosin
Gua	Guanin

<i>n</i> -Hex	normal Hexan
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) -ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSQC	Heteronuklear Single Quantum Kohärenz
HYSCORE	<i>Hyperfine-Sublevel-Correlation-Experiment</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
m	Multipllett
MALDI-MS	Matrix vermittelte Laserdesorptions- ionisationsmassen-Spektrometrie
MD	Molekulare Dynamik-Methode
Mol. Wt.	molekular Gewicht
MMTr	Mono-methoxytrityl-Schutzgruppe
Nep1	Neprilysin 1
NOE	Nuklear Overhauser Effekt
NMR	Kern-Magnetische-Resonanz
OD ₂₆₀	Optische Dichte gemessen bei 260nm
OPG	Hydroxyl-Schutzgruppe
p.a.	für die Analyse
PELDOR	Gepulste-Elektronen-Doppel-Resonanz
q	Quadruplett
RNA	Ribonukleinsäure
<i>m</i> RNA	<i>messenger</i> RNA
<i>t</i> RNA	<i>transfer</i> RNA
<i>r</i> RNA	<i>ribosomale</i> RNA
<i>sn</i> RNA	<i>small nuclear</i> RNA
<i>si</i> RNA	<i>small interfering</i> RNA
rt	Raumtemperatur
s	Singulett
t	Triplett
T	Thymidin
TAR	<i>Trans-Activation Responsive</i>
TBAF	Tetra-butyl-ammonium-fluorid

TBDMS	<i>tert</i> -Butyl-di-methylsilyl-Gruppe
TCA	Trichloressigsäure
TEAHF	Triethylammonium-fluorid
TEA	Triethylamin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-Ethylendiamin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperid-4-hydroxyl-1-oxyl
THF	Tetrahydrofuran
Thy	Thymin
T _m	Schmelzpunkt
TMS	Trimethylsilyl-Gruppe
TPA	2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-N-oxyl
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSCY	Transverse Relaxation Optimierte Spektroskopie
Try	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Uridin
Ura	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
Vis	Sichtbares Licht
δ	Chemische Verschiebung
2-I A	2-Iodo-Adenosin
5-I C	5-Iodo-Cytidin
5-I U	5-Iodo-Uridin

8.2 Spektren

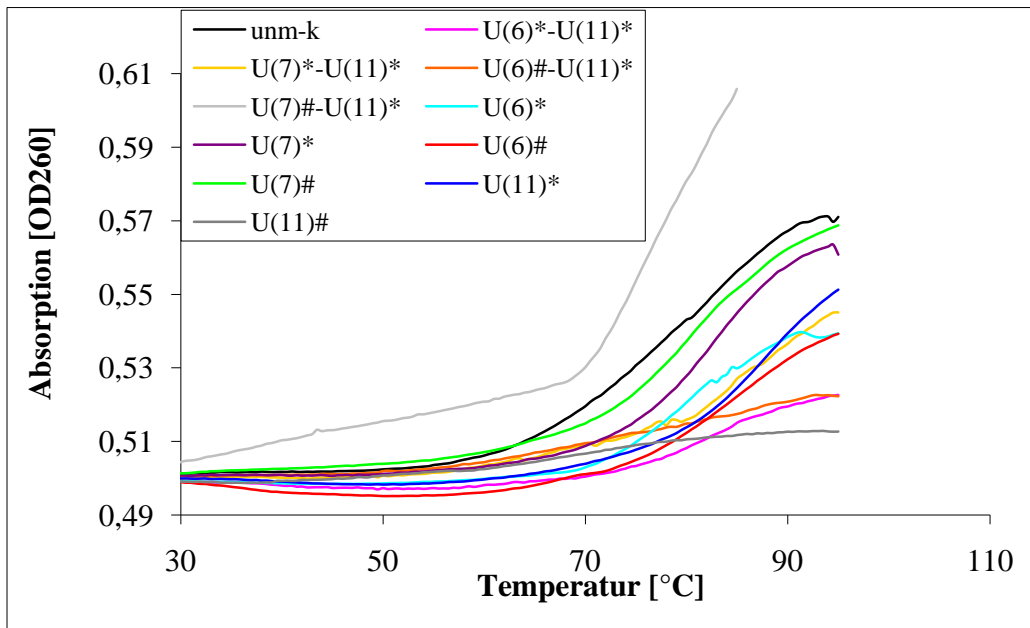
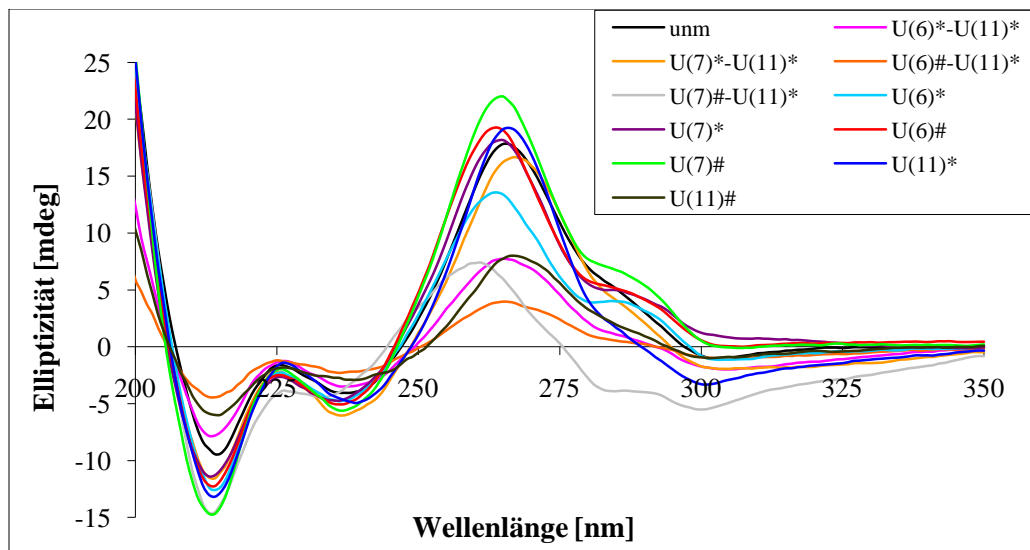


Abbildung 113: Schmelzkurven aller synthetisierter Tetra-Loops



a=TPA = *; b= TEMPA = #

Abbildung 114: Vergleich der CD-Spektren aller synthetisierter Tetra-Loops

Tabelle 23: Vergleich der verschiedenen Puffer anhand des Wild Typs

Puffer	Zusammensetzung	T _m [°C]
Phosphat-Puffer	140mM NaCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 10mM NaH ₂ PO ₄ , pH= 7	55.0±0.3
Puffer-1	30mM Na-cacodylat, 20mM MgSO ₄ , 100mM KCl, pH= 6.5	63.7±0.2
Puffer-2	20mM Na-cacodylat, 1mM MgCl ₂ , pH= 6.5	58.9±0.2
Puffer-3	30mM Na-cacodylat, 20mM MgSO ₄ , 30mM MgCl ₂ , 100mM KCl, pH= 6.5	65.4±0.3

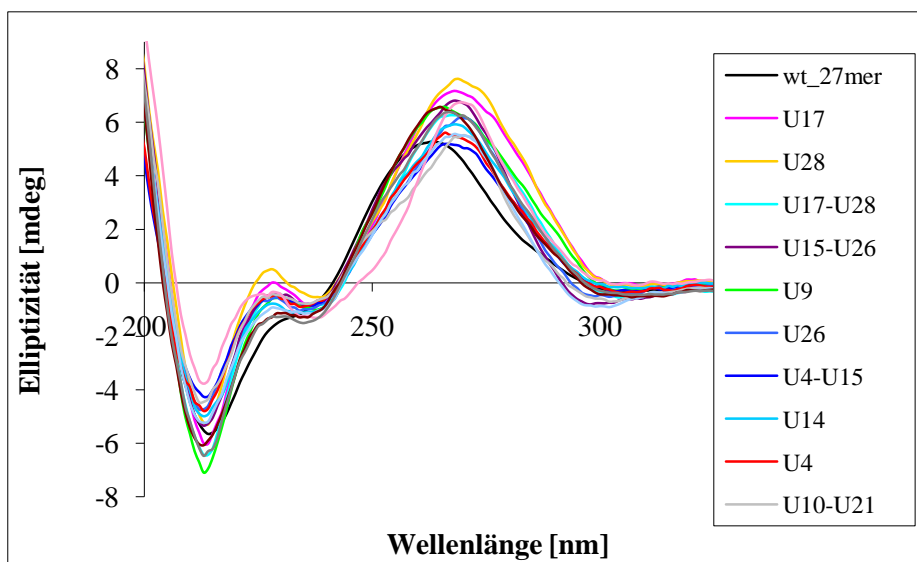


Abbildung 115: CD-Spektren aller synthetisierter Aptamere

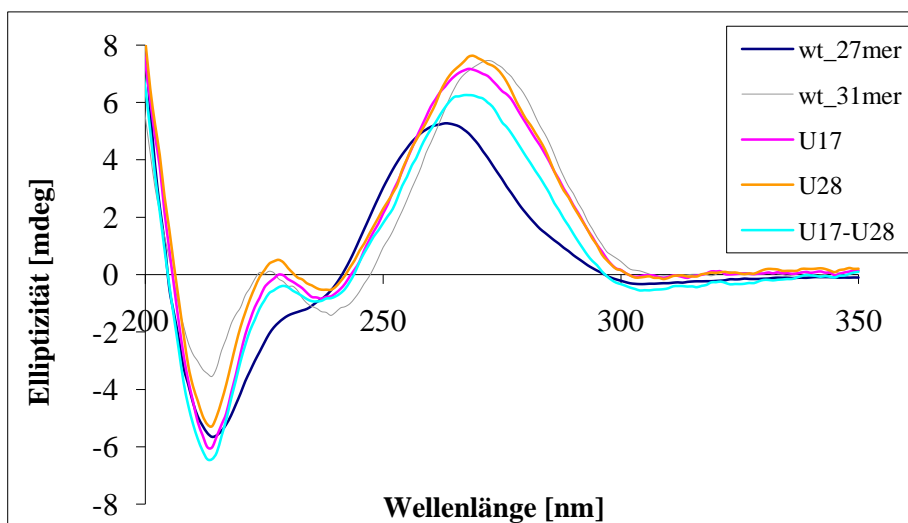
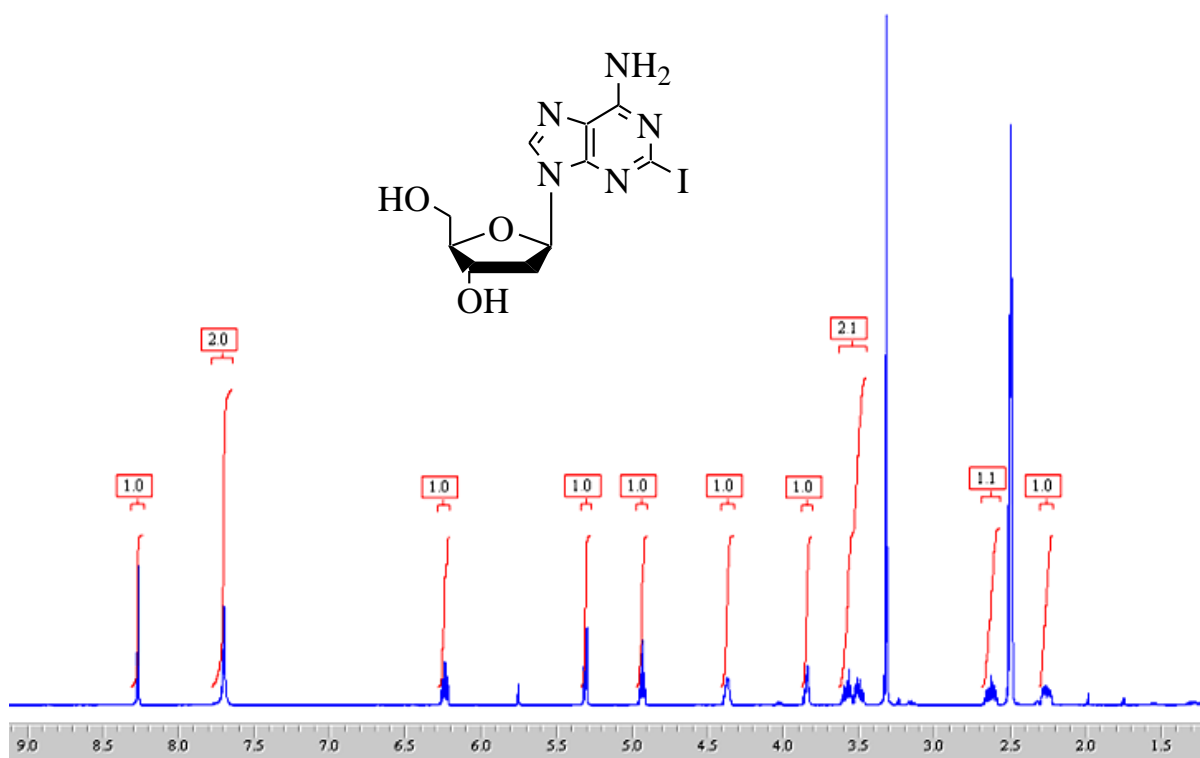
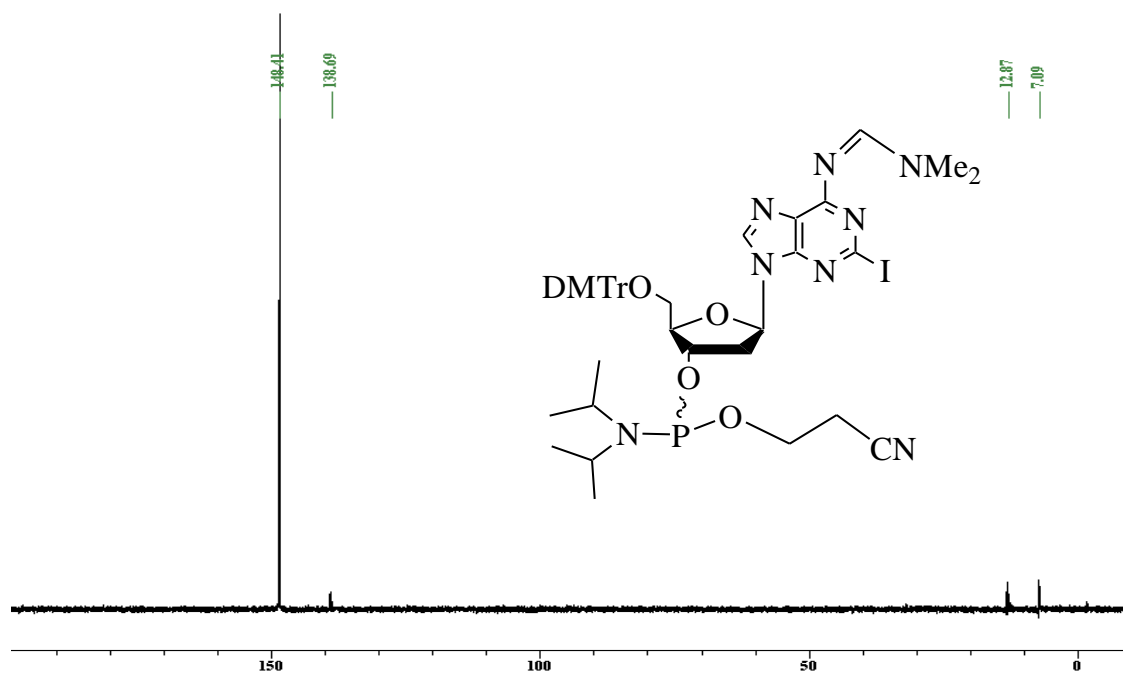


Abbildung 116: Vergleich der CD-Spektren von 27mer und 31mer Mutanten

Abbildung 117: $^1\text{H-NMR}$ von 2I-desoxy- AdenosinAbbildung 118: $^{31}\text{P-NMR}$ vom 2I-dA-Phosphoramidit

8.3 Lebenslauf

Name: Olga Romainczyk (geb. Frolow)
Geburtstag: 21. Juli 1980
Geburtsort: Alma-Ata (Kasachstan)
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch
Akademischer Abschluss: **Diplom Chemikerin**

Ausbildung

Promotion

04.2006-09.2010 Goethe-Universität, Frankfurt am Main bei Prof. Dr. J.W. Engels
Fachbereich organische Chemie und chemische Biologie

Titel: „*Synthese und Optimierung von Nitroxyl Spin-Label zur Analyse von Nukleinsäuren*“

Hochschulbildung

03.2006 Diplom in Chemie, mit Note 1,3
10.2000- 03.2006 Studium der Chemie mit Biochemie als Nebenfach,
Goethe-Universität, Frankfurt am Main
09.2005- 02.2006 Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. J.W. Engels,
mit Note „sehr gut“ (1,0)
06.2003 Vordiplom in Chemie, mit Note 1,1

schulische Ausbildung

06.2000 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife, „gut“ (2,5)
1997- 2000 Karl-Rehbein-Schule, Gymnasium, Hanau
1991- 1997 Schule am Schlossplatz, Realschule, Hanau
1987- 1991 Grundschule, Premoj Put (Kasachstan)

Berufserfahrung

Doktorandin, wissenschaftliche Mitarbeiterin

- 04.2006- 10.2009
- Planung** und **Synthese** von Iod-modifizierten Nukleosiden und Nukleotiden und deren Markierung für EPR und NMR
 - Organisation** von Kooperationstreffen und Seminaren
 - Umgang mit **RNA** und **DNA-Synthesizern**
 - Charakterisierung** und **Analyse** von organischen Molekülen und biologischen Konstrukten (NMR, MS, HPLC, UV/VIS- und CD-Spektrometer, Gel-Elektrophorese)
 - Betreuung** von Saalpraktika, Forschungspraktikanten, Auslandspraktikanten und Diplom- und Bachelorarbeiten
 - Dozentin** für ein Seminar zum Thema „Klonierung und PCR“

Tätigkeiten während des Studiums

- 12.2003- 02.2006 mehrfache Betreuung des Nebenfachpraktikums „Chemie für Mediziner“

Zusatzqualifikation

- 02.2009-06.2010 GDCh-Kurs, Fortbildung zum „geprüften Projektmanager Wirtschaftschemie“
- 05.2010 GRADE-Workshop, „GLP, GMP and Quality“
- 01.2010 Kurs, „Grundlagen der Europäischen Zulassung von Humanarzneimitteln“
- 10.2009 GDCh-Kurs, „Führung für Nachwuchsführungskräfte“
- 02.2008 GDCh-Kurs, „Betriebswirtschaft für Chemiker“

Kenntnisse und Interessen

Sprachen

- Deutsch (Muttersprache)
 - Englisch (fließend)
 - Russisch (Muttersprache)
-

EDV

MS-Office, Origin, SigmaPlot (Datenbearbeitung)
ChemOffice und ISISDraw (Strukturformeln)
MestRec und TopSpin (NMR-Auswertung)
PyMol, Weblab ViewerPro (Darstellung)
HPLC-Systeme von Jasco und Merck (Analyse und Trennung)
Scifinder Scholar, MDL Crossfinder (Recherche)

Mitgliedschaften

seit 01.2009 Verband akademischer Angestellter (VAA)
seit 05.2008 Turngemeinde Hanau (TGH), Volleyball
seit 08.2007 Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)

außerberufliche Aktivitäten

1996- 2005 Tanztheater
Zeichnen, Lesen und Fahrradfahren

8.4 Publikationen

Mapping the Global Structure of a Biologically Active RNA by Pulsed Electron-Electron Double Resonance

Romainczyk, O.; Prisner, T.F.; Engels, J.W.; Schiemann, O.; *Angw. Chem. Int. Ed.* eingereicht.

RNA-DNA Hybrid structure determined by EPR and enzyme recognition

Romainczyk, O.; Endeward, B.; Prisner, T.F.; Engels, J.W.; *Mol. Biosystems.* eingereicht

PELDOR Spectroscopy Classifies the Neomycin-Responsive Riboswitch as Type I

Krstic, I., Frolow, O., Sezer, D.; Endeward, B.; Weigand, J.; Suess, B.; Engels, J.W. und Prisner, T.F. *Journal of American Chemical Society.* 2010, 132 (5), 1454–1455

RNA-binding and enzymatic activity of the ribosome assembly factor Nep1: the protein responsible for Bowen-Conradi syndrome is a pseudouridine-N1-specific methyltransferase

Wurm, J.; Meyer, B.; Bahr, U.; Held, M.; Frolow, O.; Peter, K.; Engels, J.W.; Heckel, A.; Karas, M.; Entian, K.-D. und Wohnert, J. *Nucleic Acids Research* . 2010, 38 (7), 2387-2398

3-Ethynyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-3-pyrroline

Frolow, O., Bats, J.W. und Engels, J.W. *Acta Crystallographica*, 2009, E65, o1848

4-Ethynyl-2,2,6,6-tetramethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-N-oxide

Bats, J.W., Frolow, O. und Engels, J.W. *Acta Crystallographica*, 2009, E65, o529

TPA labeled oligonucleotides for long range distance measurements by EPR

Frolow, O. und Engels, J.W. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 2008, 10, 343-344

The Synthesis of EPR Differentiable Spinlabels and Their Coupling to Uridine

Frolow, O., Bode, B.E. und Engels, J. W. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*; 2007, 26 (6), 655

8.5 Tagungen und Vorträge

Vortrag: Ein Startup-Unternehmen an der Grenze zur EU-Ländern

Romainczyk, O.

„Geprüften Projektmanager Wirtschaftschemie (GDCh)“, Juni 2010: Münster

Poster: Synthesis of 2I-dA compound

Frolow, O. und Engels, J.W.

„3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences”, September 2009: Frankfurt am Main

Vortrag: **Synthesis and Modification of RNA for EPR-measurements**

Frolow, O.

Poster: **Spin-labeled 14mer Tetra-Loop-RNA**

Frolow, O., Endeward, .B., Prisner, T.F. und Engels, J.W

„International Symposium of RNA-Ligand Interaction” Januar 2009: Schmittgen

Poster: **Biologically relevant RNA analyzed by PELDOR**

Frolow, O., Endeward, .B., Prisner, T.F., Schiemann, O. und Engels, J.W

„XVIIIth International Roundtable”, September 2008: (Japan)

Poster **Spin-labelled Loop-RNA**

Frolow, O., Endeward, B., Prisner, T.F. und Engels, J.W

„XIVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components”, Juni 2008: Cesky Krumlov (Tschechische Republik), Poster ausgezeichnet mit einem **Posterpreis**

Poster: **Side Specific Labeled RNA-Mutants**

Frolow, O., Endeward, B., Prisner, T.F., Schiemann, O. und Engels, J.W

„Internationale Symposium of RNA-Ligand Interaction”, September 2007: Frankfurt

Poster: **Spin-labeled RNAs: Comparison between two EPR-different Spinlabels**

Frolow, O., Endeward, B., Prisner, T.F. und Engels, J.W

„2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences”, September 2007: Wroclaw (Polen)

Poster: **Synthesis of EPR differentiable spinlabels and their incorporation into RNA(2)**

Frolow, O., Endeward, B., Prisner, T.F. und Engels, J.W

„Nucleic Acid Chemical Biology/PhD Summer School”, Juni 2007: Odense (Dänemark)

Poster: **Synthesis of EPR differentiable spinlabels and their incorporation into RNA(1)**

Frolow, O., Piton, N., Schiemann, O., Prisner, T.F. und Engels, J.W.

„XVIIth International Roundtable”, September 2006: Bern (Schweiz)

Vortrag (Diplomarbeit): **Effective synthesis of nitroxide-radicals for EPR-measurement of RNA**

Frolow, O.

Seminar in Rahmen des „RNA-Ligand Interaction”- Sonderforschungsbereiches 579

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den

.....
(Olga Romainczyk, geb. Frolow)
