

**Synthese und Charakterisierung neuer
Terminatoren für die
DNA-(Genom-)Analyse**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Chemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Karin Schwarzer
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main

2002

DF1

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis März 2001 am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. W. Engels danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die ausserordentlich interessante Themenstellung. Ausdrücklich bedanke ich mich für die Möglichkeit zur freien wissenschaftlichen Entfaltung und seine stetige Bereitschaft für kritische und anregende Diskussionen.

Herrn Dr. Christian Wojczewski danke ich in besonderer Weise für die vorzügliche Zusammenarbeit bei der Optimierung der Aufreinigung der Triphosphate, der Thioamidsynthese und der Sequenzierung mit 3'-Aminonukleotiden sowie für die Diskussionen, die zur Grundlage zahlreicher neuer Ideen wurden.

Ein besonderer Dank gilt auch:

- Herrn Dipl. Chem. Thomas Lehmann, der das Labor mit mir teilte, für zahlreiche Diskussionen und eine hervorragende Arbeitsatmosphäre
- Frau Beate Conrady für zahlreiche HPLC-Trennungen und -Analysen
- Frau Ilona Priß und Frau Hannelore Brill für die Aufnahme der Massenspektren
- Herrn Dipl. Chem. Stefan Amberg, Herrn Dipl. Chem. Thomas Lehmann und Frau Angela Kiefer für die kritische Durchsicht dieser Arbeit
- allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern für die freundliche Arbeitsatmosphäre und wertvolle Diskussionen

Herrn Dr. Zimmermann und seinen Mitarbeitern danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, und Frau Christof für die Durchführung der Elementaranalysen.

Frau Dr. Ute Scheffler und Herrn Dipl. Chem. Markus Hey danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Benutzung des ALF-DNA Sequenzierers

Dem Graduiertenkolleg „Chemische und Biologische Synthese von Wirkstoffen“ danke ich für die Aufnahme als Mitglied und ein Promotionsstipendium.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Methoden der DNA-Sequenzanalytik	6
2.1 Maxam-Gilbert Sequenzierung	6
2.2 Sanger Sequenzierung	9
2.2.1 Detektionsmethoden für die Sanger Sequenzierung	12
2.2.1.1 Fluoreszenzfarbstoffmarkierung	13
2.2.1.2 Dye-Primer-Sequenzierung	13
2.2.1.3 Dye-Terminator-Sequenzierung	14
2.3 DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS	18
2.4 Genomanalyse: Random Shotgun Sequencing und Primer Walking	19
2.5 Sequenzierung durch Hybridisierung	21
2.6 Weitere Methoden	24
3. Synthese modifizierter Nukleoside	26
3.1 Synthese von Nukleosiden mit 3'-Modifikation	26
3.1.1 Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidin	26
3.1.2 Synthese von 3'-Desoxy-3'-{6-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-carbonyl]amino}-1-thioxohexyl}amino}thymidin	30
3.2 Synthese von 2',3'-Dideoxyguanosin mit N2-Basenmodifikation	42
3.2.1 Ausarbeitung einer geeigneten Synthesestrategie	42
3.2.2 Synthese von 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin	47
4. Synthese von Nukleosid-5'-Triphosphaten	59
4.1 Methoden der Triphosphatsynthese	59
4.1.1 Triphosphatsynthese durch nukleophilen Angriff von Pyrophosphat an ein aktiviertes Nukleosidmonophosphat	60
4.1.2 Triphosphatsynthese mittels Nukleosid-Phosphoramidaten	61

4.1.3 Triphosphatsynthese durch nukleophilen Angriff von Phosphat an ein aktiviertes Nukleosidpyrophosphat.....	62
4.1.4 Triphosphatsynthese durch nukleophilen Angriff eines Nukleosid -diphosphats an eine aktivierte Phosphateinheit.....	63
4.1.5 Triphosphatsynthese mittels aktivierter Phosphit- oder Phosphor -amidit-Nukleosidderivate.....	63
4.1.6 Triphosphatsynthese durch Angriff von Triphosphatnukleophilen auf 5'-O-Abgangsgruppen.....	65
4.1.7 Triphosphatsynthese durch biokatalytische Methoden.....	66
4.2 Synthese von 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat.....	67
4.3 Synthese von FITC gelabeltem 3'-N-(Caproylthioamido)-3'-desoxythymidin- 5'-triphosphat.....	69
4.4 Synthese des 2-Valeronitril-2',3'-didesoxyguanosin-5'-tri-phosphats und des FITC gelabelten 2-Pentylamin-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphats.....	72
4.5 Aufreinigung der Nukleosidtriphosphate.....	75
4.5.1 FPLC-Aufreinigung.....	75
4.5.2 HPLC-Aufreinigung.....	77
4.5.3 Analytik der Triphosphate.....	80
4.5.3.1 Massenspektrometrie.....	80
4.5.3.2 NMR-Spektroskopie.....	85
5. Verwendung der neuen Terminatoren für die DNA-Sequenzierung.....	90
5.1 Polymerasen.....	90
5.2 DNA-Sequenzierung mit 3'-modifizierten Nukleosid-5'-triphosphaten.....	94
5.2.1 3'-Modifizierte Nukleosid-5'-triphosphate.....	95
5.2.1.1 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleosid-5'-triphosphate.....	95
5.2.1.2 Weitere 3'-modifizierte 2',3'-Didesoxynukleosid-5'- triphosphate.....	96
5.2.1.3 3'-Thioamid-modifizierte 2',3'-Didesoxynukleosid-5'- triphosphate.....	101
5.2.2 Basen-modifizierte Nukleosid-5'-triphosphate.....	105
5.2.2.1 N ² -modifiziertes 2',3'-Didesoxyguanosin-5'-Triphosphat.....	107

6. Zusammenfassung.....	110
7. Experimentelles.....	114
7.1 Allgemeines.....	114
7.1.1 Chemikalien, Enzyme und Puffer.....	114
7.1.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel.....	114
7.1.1.2 Enzyme und DNA.....	116
7.1.1.3 Puffer für enzymatische Arbeiten.....	116
7.1.2 Analytik und Chromatographie.....	117
7.1.2.1 Allgemeine Geräte.....	117
7.1.2.2 Chromatographie.....	117
7.1.2.2.1 Dünnschichtchromatographie.....	117
7.1.2.2.2 Präparative Dünnschichtchromatographie.....	118
7.1.2.2.3 Präparative Säulenchromatographie.....	118
7.1.2.2.4 FPLC.....	118
7.1.2.2.5 HPLC.....	119
7.1.2.3 Spektroskopie.....	120
7.1.2.3.1 NMR-Spektroskopie.....	120
7.1.2.3.2 IR-Spektroskopie.....	120
7.1.2.3.3 Massenspektrometrie.....	120
7.1.2.3.4 UV-Photometrie.....	120
7.2 Synthese von Nukleosiden und Nukleotiden.....	121
7.2.1 Allgemeine Vorschriften.....	121
7.2.2 Einzelverbindungen.....	123
7.3 Enzymatische Reaktionen.....	176
7.3.1 DNA-Sequenzierung mit 3'-modifizierten Terminatoren.....	176
7.3.1.1 Terminationsmixe für die T7-Polymerase.....	176
7.3.1.2 Terminationsmixe für die AmpliTaq-Polymerase.....	182
7.3.1.3 Terminationsmixe für die Taq(exo ⁻)-Polymerase.....	184
7.3.1.4 Terminationsmixe für die Bst-Polymerase.....	185
7.3.1.5 Terminationsmixe für die Vent(exo ⁻)-Polymerase.....	187
7.3.2 Sequenz der eingesetzten Oligonucleotide.....	189

8. Literatur.....	190
9. Anhang.....	209
9.1 Abkürzungen und Symbole.....	209
9.2 Publikationen und Poster.....	215

1. Einleitung

Biopolymere wie Peptide und Nukleinsäuren sind derartig hochmolekulare und komplexe Verbindungen, dass erst durch die Analyse ihrer Sequenz neue Erkenntnisse über ihre Funktionsweise in biologischen Prozessen gewonnen werden konnten.

Peptide stellten die ersten biologisch relevanten Polymere dar, die zu sequenzieren man in der Lage war. 1953 entschlüsselte Frederick Sanger die Aminosäuresequenz des Insulins, eines Protein hormons. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein Protein eine genau definierte Aminosäuresequenz besitzt.

Ebenfalls 1953 setzten Watson, Crick, Franklin und Wilkins (Watson, 1953) mit der Ermittlung der doppelhelikalen, antiparallelen Struktur der DNA einen weiteren Meilenstein auf dem Weg zum Verständnis biologischen Informationsflusses. Francis Cricks Äusserung darüber, dass die spezifische Paarbildung an einen möglichen Kopiermechanismus denken lasse (Watson, 1968), stellte sich schon bald als Tatsache heraus. Die Spezifität der komplementären Basenpaarung ist das Prinzip, das jeder biologischen Informationsübertragung – Replikation, Rekombination, Transkription und Translation – zugrunde liegt. Studien der späten 1950er und frühen 1960er Jahre zeigten, dass die Aminosäuresequenz der Proteine genetisch bestimmt ist. Diese Erkenntnisse gipfelten in der Entschlüsselung des genetischen Codes durch Matthaei und Nierenberg zwischen 1961 und 1966. Damit wurde die Übersetzung von Nukleinsäuren in Proteine und umgekehrt möglich.

Auf diese Weise waren zwar die grundlegenden Prinzipien des biologischen Informationsflusses geklärt, aber die Voraussetzung zur Erforschung einzelner biologischer Systeme, nämlich die Kenntnis über die genaue Basenabfolge ihrer Nukleinsäuren, wurde erst 1977 durch die ersten effizienten Sequenzierverfahren von Allen Maxam und Walter Gilbert sowie Frederick Sanger möglich.

Die späte Entwicklung solcher Sequenziermethoden war auf die Instabilität der glykosidischen Bindung zurückzuführen. So führten Versuche der chemischen Spaltung des Phosphatrückgrats immer zuerst zur Spaltung der glykosidischen Bindung und damit zum Informationsverlust. Erst das Verfahren von Maxam-Gilbert vereinigte eine chemische Spaltung der glykosidischen Bindung mit der Spaltung des Phosphatrückgrats an ein und

derselben definierten Position. Auf diese Weise blieb die Information trotz Spaltung des Phosphatrückgrats erhalten.

Sanger nutzte bei seinem Verfahren die Fähigkeit der ebenfalls in den siebziger Jahren entdeckten DNA-Polymerasen, aus 5'-Nukleosidtriphosphaten einzelsträngige DNA aufzubauen. Der Einbau der 4 möglichen 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphate führte zu definierten Strangabbrüchen. Die gelelektrophoretische Analyse der auf diese Weise entstandenen unterschiedlich langen DNA-Stücke führte zur gesuchten Sequenz. Die Innovation dieses Verfahrens bestand vor allem darin, nicht die gesuchte Sequenz zu zerstückeln, sondern durch die Analyse des Aufbaus einer komplementären Sequenz die Sequenzinformation zu erhalten.

Bereits vor Sanger und Maxam-Gilbert gab es vergleichsweise kleinere Erfolge auf dem Gebiet der Nukleinsäure-Sequenzierung. 1964 wurde die erste vollständige Nukleotidsequenz von Robert Holley entschlüsselt. Es handelte sich dabei um ein Transkript eines Gens, das für Alanin-tRNA aus Hefe codierte. Aufgrund des noch sehr aufwendigen Verfahrens des partiellen Verdauens der Nukleinsäuren mittels RNA-schneidenden Enzymen und des Erzeugens von unterschiedlich langen Fragmenten mittels Exonucleaseabbau vom 3'-Ende her dauerte diese Sequenzierung von 76 Basen sieben Jahre und erforderte 1g Alanin-tRNA, die aus 200g einer tRNA Mischung stammte, welche ihrerseits aus 140 kg Bäckerhefe isoliert worden war. Holley erhielt für diese Leistung 1968 den Nobelpreis (Holley, 1968).

Ende der siebziger Jahre wurde die Sequenzierung von DNA vorangetrieben und beschleunigte sich bis heute auf ein nahezu unglaubliches Tempo. Begann man mit der Bestimmung von Phagen- und Viren-DNA, gefolgt von einzelnen Genen und Chromosomen höherer Organismen, so überschlug sich die Entwicklung Ende der achtziger und in den neunziger Jahren und gipfelte schliesslich 1990 in dem ehrgeizigen Projekt der Ermittlung des menschlichen Genoms (Human Genome Project, HUGO) mit seinen nahezu 3 Milliarden Basen.

Das Projekt startete offiziell im Oktober 1990 und war darauf angelegt, innerhalb von 15 Jahren die 3 Milliarden Basen des menschlichen Genoms zu entschlüsseln. 20 Forschungsgruppen aus den USA, Grossbritannien, Japan, Frankreich, Deutschland und China waren an dem Projekt beteiligt. Bereits im Oktober 1992 lagen erste Kartierungen von Chromosomen vor. David Page veröffentlichte die Kartierung des Y-Chromosoms (Vollrath,

1992), und Daniel Cohen kartierte das Chromosom 21 (Nature, 1992). In den darauffolgenden Monaten komplettierten amerikanische und französische Gruppen die Klonkarten von Maus und Mensch. Fast 5 Jahre nach dem Start des HUGOs wurde die erste Sequenz eines frei lebenden Organismus', des *Haemophilus influenza*, mit 1,8 Millionen Basen von Venter, Fraser und Smith veröffentlicht (Fraser, 1995). Ab diesem Zeitpunkt überflügelten sich die Genomgruppen geradezu, und eine Erfolgsmeldung löste die andere ab. Nur einige Höhepunkte dieser Entwicklung seien im Folgenden aufgeführt.

1996 wurde die Genomsequenz der Hefe *S. cerevisiae* komplettiert (Goffeau, 1996). 1997 folgte die DNA-Sequenz von *E. coli* mit 5 Millionen Basen (Blattner, 1997). 1998 gründete Craig Venter die Firma Celera und verkündete, dass er das menschliche Genom innerhalb von 3 Jahren mittels eines neuen Verfahrens (whole-genome-shot-gun-sequencing) sequenzieren werde.

Im Dezember desselben Jahres folgte die Veröffentlichung der Genomsequenz von *C. elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). 1999 wurde die erste Sequenz des menschlichen Chromosoms 22 publiziert (Dunham, 1999). Der bemerkenswerteste Erfolg wurde im März 2000 die Sequenzierung des bis dahin grössten untersuchten Genoms der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit 180 Millionen Basen durch Celera. Im Mai 2000 publizierten deutsche und japanische Autoren die vollständige Sequenz des menschlichen Chromosoms 21 (Chromosome 21 mapping and sequencing Consortium, 2000). Im Oktober folgte die Sequenzierung des Genoms des Kugelfischs *Fugu rubripes*, und im Dezember wurde die Genomsequenz der ersten Pflanze, der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*, mit 125 Millionen Basen veröffentlicht (Dennis, 2000). Trotz dieser unglaublichen Geschwindigkeit, mit der das HUGO allein in den Jahren 1999 und 2000 vorangetrieben wurde, war die Veröffentlichung der Sequenz des menschlichen Genoms am 12. 02. 2001 eine wissenschaftliche Sensation. Das menschliche Genom ist schliesslich 25 mal umfangreicher als das bisher grösste untersuchte Genom der Fruchtfliege, und es ist das erste Genom eines Wirbel- und Säugetiers, das in diesem Umfang bisher untersucht worden ist. Laut dem öffentlichen Genom Projekt liegen 90 % (2,7 Gigabasen) des Genoms in allgemein zugänglichen Datenbanken als Arbeitsversion vor. Das bedeutet, dass die Sequenz noch ca. 145.000 Lücken aufweist und nur für 91% der 2,7 Gigabasen eine Fehlerrate kleiner als 1 auf 10.000 garantiert werden kann. Diese Lücken sollen in den nächsten Jahren geschlossen werden, und man geht davon aus, die gesamte Sequenz in einer Genauigkeit von 99,99% nicht später als 2003 vorlegen zu können. Weitere Ziele werden dann die Auffindung aller menschlichen Gene und deren Funktionen sein. Die Analyse der Arbeitsversion des

menschlichen Genoms geht davon aus, dass der Mensch 30.000 – 40.000 Gene besitzt. Das ist nur etwa die doppelte Anzahl Gene im Vergleich zur Fruchtfliege. Trotzdem oder sogar deswegen ist das Repertoire der menschlichen Proteine (Proteom) und ihrer Funktionen deutlich komplexer als bei den Wirbellosen. Aus dieser Tatsache erschliesst sich auch die Richtung, in die die Genomforschung in der Zukunft gehen wird. Die Frage nach der Funktion einzelner oder nach dem Zusammenspiel mehrerer Gene wird in den Vordergrund treten.

Zwar sind und werden immer mehr Gene für erblich bedingte Erkrankungen isoliert, doch inwiefern unsere DNA, die sich individuell um schätzungsweise nur 0,1% (Beardsley, 1997) unterscheidet, an komplexen menschlichen Eigenheiten und Erkrankungsdispositionen - von Intelligenz bis Suchtanfälligkeit - beteiligt ist, kann das HUGO bis jetzt nicht beantworten, zumal es sich bei den untersuchten Genomen um das Sequenzgemisch vieler tausend Personen handelt. In der Zukunft werden die Fragen nach der Funktion der Gene und Proteine in den Vordergrund treten, und die Proteomforschung wird weiter vorangetrieben werden.

Unter anderem aus diesen Gründen wurde 1999 ein SNP-Konsortium gegründet, das sich die Aufklärung und Veröffentlichung einer SNP-Datei des menschlichen Genoms zur Aufgabe gemacht hat. SNP (single nucleotide polymorphism) oder auch Punktmutationen entstehen durch Austausch, Verlust oder Hinzufügen einzelner Basen. Diese Mutationen stellen die häufigste Form genetischer Variation dar und sind ursächlich für viele Erbkrankheiten und auch die bereits angesprochenen individuellen Unterschiede zwischen einzelnen Menschen. In diesem Kontext wird auch die Methodenentwicklung zur Detektion solcher SNPs in den nächsten Jahren immer weiter in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses rücken.

Das Entwicklungspotential der Genomforschung hing stark von den technischen Möglichkeiten der Automatisierung, Miniaturisierung und Parallelisierung ab. Auch dieser Tatsache ist es unter anderem zu verdanken, dass die DNA-Sequenzierung ausser in der Gentechnik auch noch in anderen Bereichen an Bedeutung gewann. Medizin, Biologie Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie, Kriminalistik, Evolutionslehre und Umwelttechnik seien hier als wichtigste Vertreter genannt.

Die Medizin bedient sich der DNA-Sequenzierung vor allem bei der Erforschung der Ursache von Krankheiten, wie z.B. Krebs, der Detektion von Mutationen zur Erkennung von

Erbkrankheiten, der Aufklärung von Nucleinsäuren in der Virologie und nicht zuletzt bei der Entwicklung der Gentherapie.

Fast täglich ist in der Tagespresse über das DNA-Sequenzierungs-Einsatzgebiet Forensik zu lesen. Die Sequenzanalyse wird zur eindeutigen Überführung und Identifizierung benötigt. Sogar über prophylaktische Gendatenbanken wird derzeit diskutiert.

In der Paläontologie und Evolutionslehre nutzt man die DNA-Sequenzanalyse zur Erstellung von Stammbäumen, die auf der Analyse von Genomen und Genomabschnitten beruhen.

Im May 2001 konnte die sogenannte „Out-of-Africa“-Theorie von Wissenschaftlern des Instituts für Genetik in Shanghai erhärtet werden (Ke, Y. 2001). Diese Theorie besagt, dass alle modernen Menschen von afrikanischen Vorfahren abstammen, die vor ca. 100.000 Jahren begannen die Welt zu bevölkern. Die Wissenschaftler untersuchten auf dem Y-Chromosom vorkommende Mutationen, die ihren Ursprung in Afrika hatten. Alle Studienteilnehmer aus 163 ostasiatischen Regionen trugen mindestens eine von drei Mutationen in ihrer DNA, die auf eine Mutation zurückzuführen ist, welche in ähnlicher Form schon bei früheren afrikanischen Bevölkerungsgruppen vorlag. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass die archaischen, asiatischen Populationen in Asien nicht zur Herkunft des modernen Homo sapiens beigetragen haben.

Die Erwähnung dieser wenigen Beispiele zeigt, dass die Einsatzmöglichkeiten der DNA-Sequenzanalyse sehr weitreichend sind und sich durchaus nicht nur auf die Naturwissenschaften beschränken. Die Anwendungsschwerpunkte der DNA-Sequenzierung werden trotzdem in der Zukunft in der Molekularbiologie, der Genetik und der Humanmedizin zu finden sein. Die Entwicklung noch schnellerer, automatisierbarer und preisgünstigerer Sequenziermethoden und Mutationsdetektionen wird auch in Zukunft die Entwicklung in diesen Wissenschaften beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur DNA-Sequenzanalytik dar. Hierfür wurden an unterschiedlichen Positionen modifizierte Nukleosid-5'-triphosphate synthetisiert und auf ihre Eignung als Terminatoren untersucht.

Neu entwickelte fluoreszenzmarkierte Terminatoren sind neben ihrer Anwendung in der DNA-Sequenzierung auch für die Detektion von Punktmutationen von grossem Interesse.

2. Methoden der DNA-Sequenzanalytik

2.1 Maxam-Gilbert Sequenzierung

Das chemische Verfahren der DNA-Sequenzierung nach Allan Maxam und Walter Gilbert wurde erstmals 1977 zeitgleich mit dem enzymatischen Verfahren nach Frederick Sanger veröffentlicht (Maxam, 1977; Gilbert, 1981). Das Verfahren bedient sich der statistischen, basenspezifischen Spaltung einer einzelsträngigen DNA. Die dabei erzeugten Bruchstücke werden gelelektrophoretisch getrennt und nach ihrer Grösse sortiert. Die Basenabfolge kann auf diese Weise direkt abgelesen werden. Mit dieser Methode können bis zu 750 Basenpaare ermittelt werden.

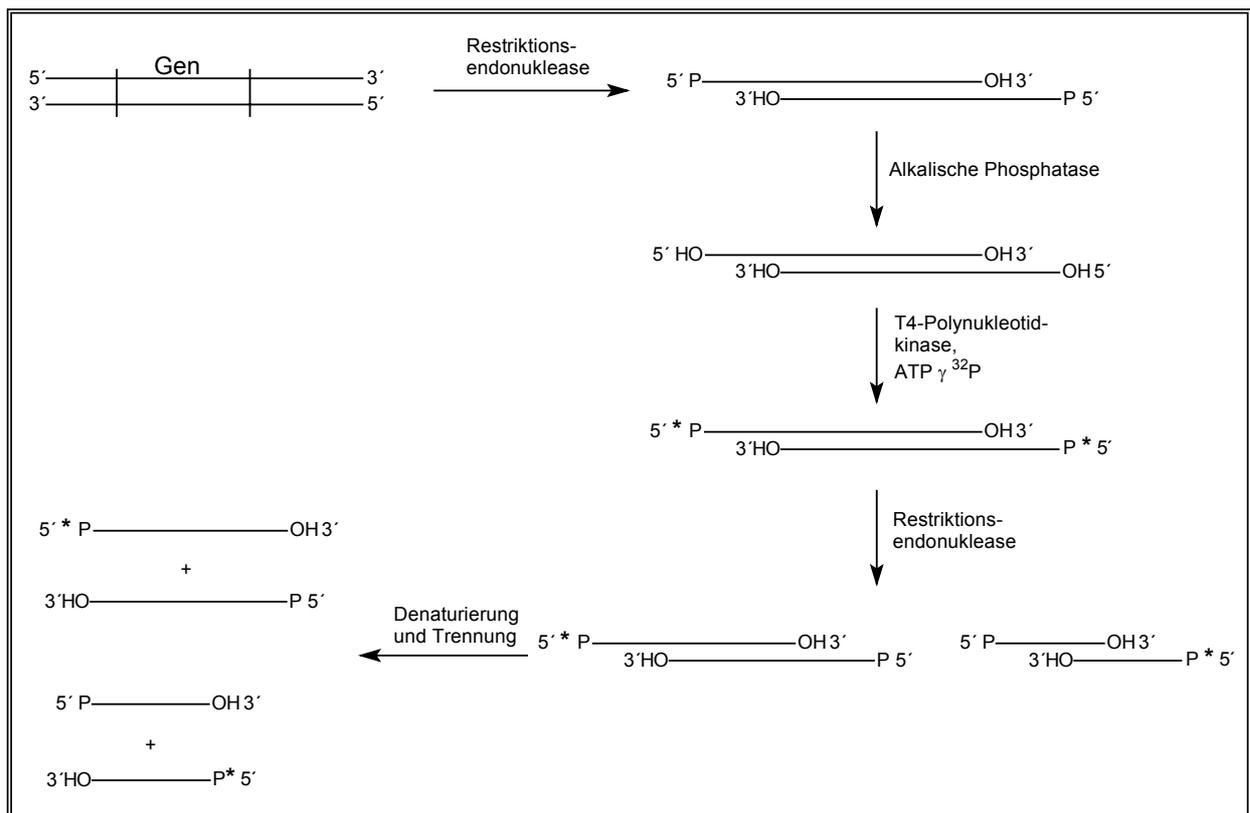


Abb. 1: Darstellung einzelsträngiger DNA für das Maxam-Gilbert-Verfahren;

P = Phosphat, * = radioaktiv markiert

Zur Sequenzanalyse wird zunächst aus dem Genom, das den zu sequenzierenden Bereich enthält, mittels einer Restriktionsendonuklease ein linearer Duplex ausgeschnitten (Abb. 1). Anschliessend folgt die Dephosphorylierung der endständigen Phosphatgruppen dieses Duplex' mittels alkalischer Phosphatase. Mit der darauf folgenden Rephosphorylierung mittels T4 Polynucleotid-Kinase und ATP- γ ³²P oder ATP- γ ³⁵S wird der benötigte radioaktive Label an den 5'-Enden eingeführt. Um bei der Sequenzierung nur einen Strang detektieren zu können, wird der Doppelstrang erneut mit einer Restriktionsendonuklease behandelt. Die so erzeugten, unterschiedlich langen Duplexfragmente werden denaturiert. Mittels Gelelektrophorese kann nun einer der beiden radioaktiv markierten Einzelstränge isoliert und zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Der auf diese Weise isolierte, radioaktiv markierte Einzelstrang kann dann, in vier Aliquots unterteilt, den 4 basenspezifischen chemischen Spaltreaktionen unterzogen werden.

Prinzipiell verläuft jede dieser Spaltreaktionen in drei Schritten:

1. Modifikation der Nucleobase
2. Abspaltung der modifizierten Base durch Spaltung der glykosidischen Bindung
3. Spaltung des Phosphatrückgrats durch zweifache β -Eliminierung

Die Modifikation der Nucleobase bewirkt die Destabilisierung der glykosidischen Bindung. Sie verläuft bei den Purinbasen nach einem anderen Mechanismus als bei den Pyrimidinbasen. Purine reagieren besonders leicht mit Elektrophilen, wie z. B. Dimethylsulfat, Methyljodid oder Protonen. Beim Maxam-Gilbert-Verfahren hat sich die Methylierung mittels Dimethylsulfat als effektiv erwiesen, wobei Guanin an der N⁷-Position und Adenin bevorzugt an der N³-Position methyliert wird. Guanin wird bei diesen Bedingungen ausserdem mit einer fünf- bis zehnfach höheren Geschwindigkeit methyliert als Adenin. Die Reaktion mit Ameisensäure hingegen verläuft mit nahezu gleicher Reaktionsgeschwindigkeit für beide Purine. Diese Tatsache wird bei der spezifischen Strangspaltung genutzt. Die Reaktion mit Dimethylsulfat führt bei optimalen Reaktionsbedingungen fast ausschliesslich bei Guanin zum Strangabbruch, während bei Behandlung mit Ameisensäure der Strang bei Guanin- und Adenin-Basen gespalten wird. Abbildung 2 zeigt exemplarisch den Reaktionsmechanismus für die Spaltung von Guanin. Die Pyrimidinbasen werden durch das gute Nukleophil Hydrazin in den entsprechenden Hydrazondesoxyribozylharnstoff überführt. Auch in diesem Fall findet eine Spezifizierung dadurch statt, dass die Reaktion bei Cytidin unter Zusatz von 5 M NaCl wesentlich schneller verläuft als bei Thymin. Anschliessend an die Basenmodifikation folgt die Abspaltung der jeweiligen Nucleobase mittels Piperidin unter

Bildung eines Imins. Das Imin spaltet spontan unter doppelter β -Eliminierung den Zucker und damit das Phosphatrückgrat.

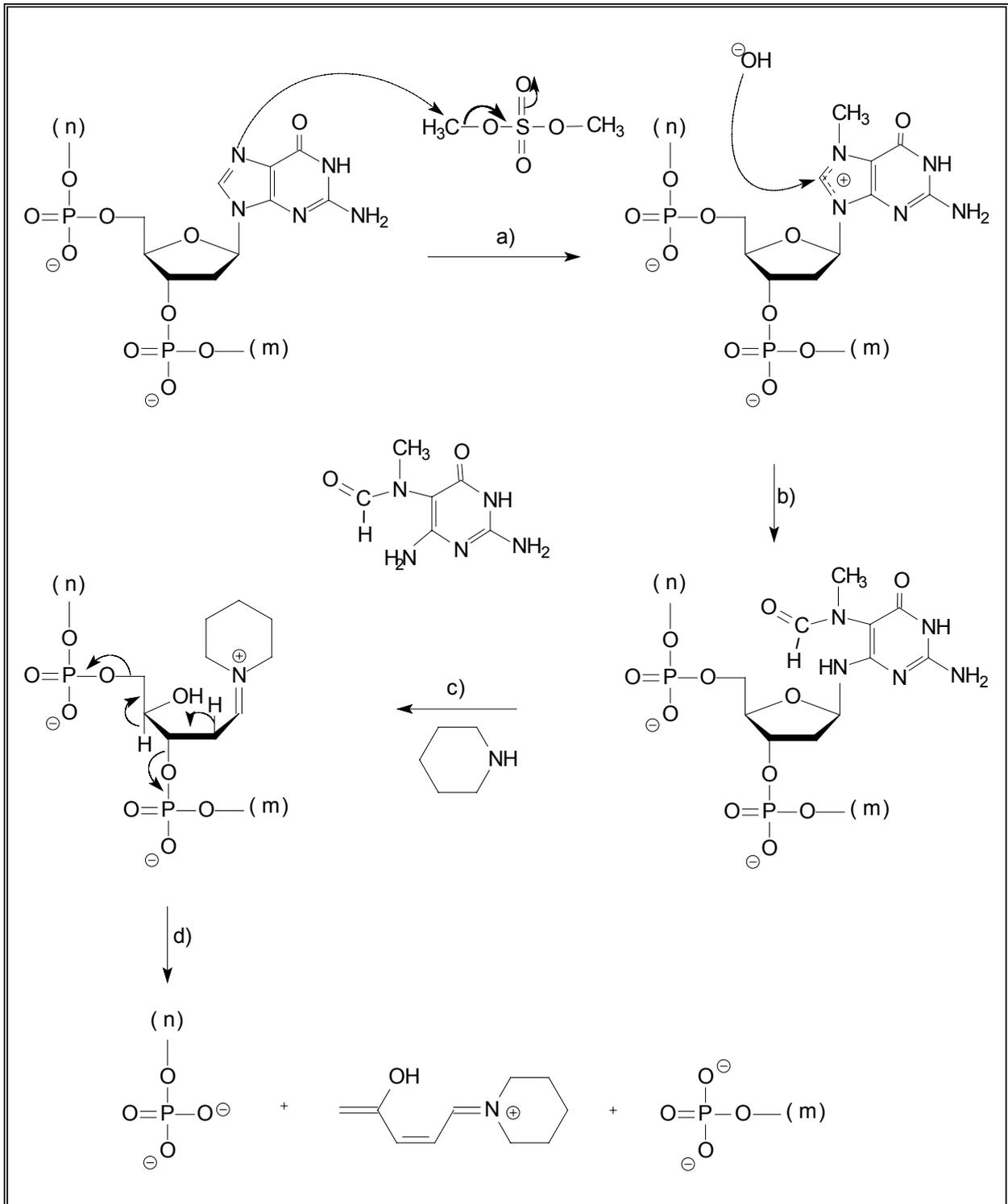


Abb. 2: Mechanismus der chemischen Spaltung eines DNA-Einzelstranges am Beispiel des Guanins.

- Methylierung an der N7-Position mittels Dimethylsulfat.
- basische Hydrolyse des Heterozyklus';
- Ringöffnung an der C-8-Position.
- Abspaltung der Base durch Piperidin.
- spontane doppelte β -Eliminierung unter Spaltung des Phosphatrückgrats (n, m = fortlaufender Strang in 5'-bzw 3'-Richtung)

Die Reaktionsbedingungen werden so gewählt, dass durchschnittlich eine Spaltung pro DNA-Molekül erfolgt. Da die Position des Strangbruchs zufällig ist, entsteht eine statistische Verteilung aller möglichen Bruchstücke. Weil die DNA an ihrem 5'-Ende ^{32}P -gelabelt ist, können anschließend alle Bruchstücke der vier Reaktionsansätze (Tabelle 1) elektrophoretisch getrennt werden, und die Sequenz kann direkt abgelesen werden (Abb. 3).

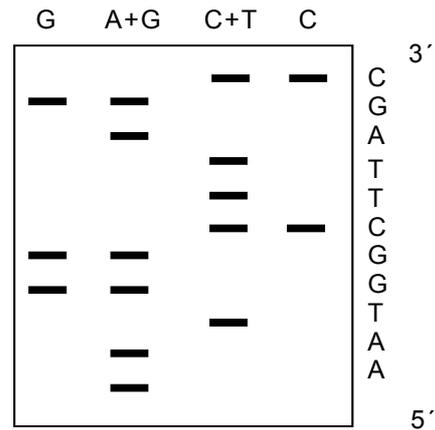


Abb. 3: Gelbild einer Maxam-Gilbert-Sequenzierung

Nr.	Spezifität	Basenmodifikationsreagenz	Spaltung der glykosidischen Bindung und Spaltung des Phosphatrückgrats
1	G	Dimethylsulfat	1 M Piperidin
2	G + A	Ameisensäure	1 M Piperidin
3	C + T	Hydrazin	1 M Piperidin
4	C	Hydrazin, 5 M NaCl	1 M Piperidin

Tabelle 1: Standardbedingungen für die vier Reaktionsansätze der Sequenziermethode nach Maxam-Gilbert

2.2 Sanger Sequenzierung

Die von Frederick Sanger entwickelte enzymatische Methode der DNA-Sequenzierung bedient sich des kontrollierten Abbruchs der enzymatischen Replikation. Aufgrund der wesentlich einfacheren Durchführbarkeit im Vergleich zur Maxam-Gilbert Sequenzierung hat sich diese Methode als Grundlage aller modernen Sequenziermethoden durchgesetzt.

Ausgehend von der gesuchten einzelsträngigen DNA-Matrize wird ein komplementärer Gegenstrang mittels enzymatischer Replikation synthetisiert. Dazu wird die entsprechende DNA-Matrize zunächst mit einem kurzen, komplementären Oligonucleotid, einem Primer, hybridisiert (Abb. 4). Durch Zugabe der vier 3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphate (dNTPs; Abb. 6) und einer DNA-Polymerase erfolgt der enzymatische Elongation des Primers in 5' => 3'-Richtung.

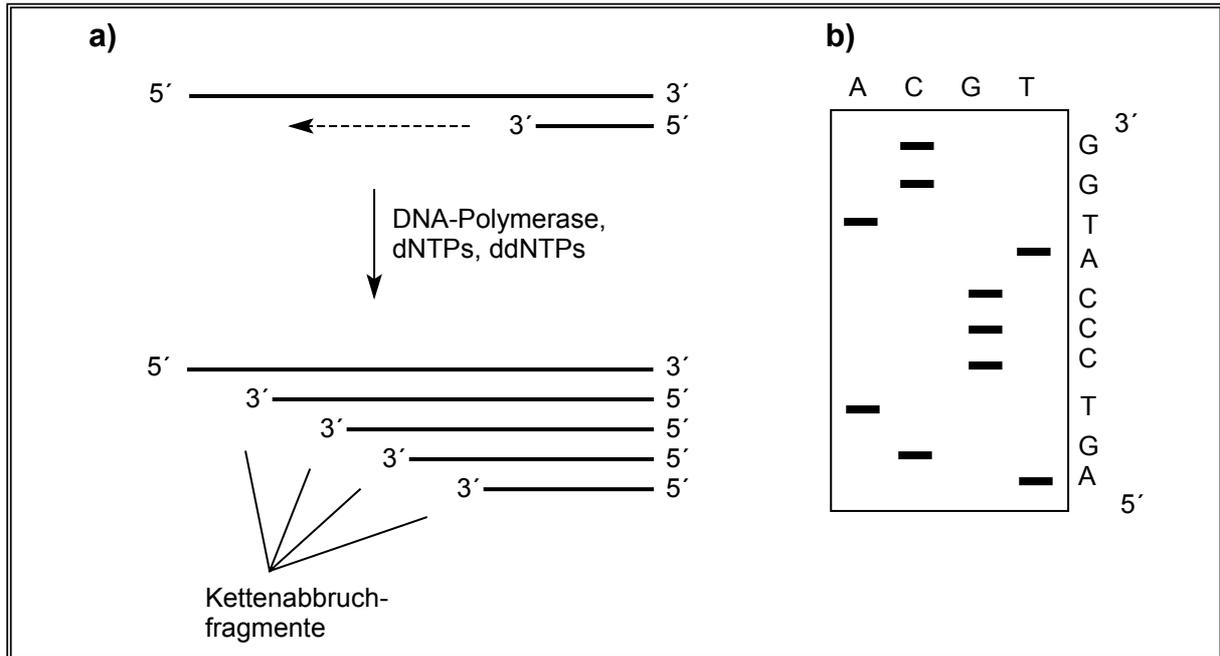


Abb. 4: Schematische Darstellung der Kettenabbruchmethode nach F. Sanger: a) Hybridisierung eines Primers an die Templat-DNA, Replikation mittels dNTPs und Polymerase und Kettenabbruch durch statistischen Einbau der ddNTPs; b) Gelbild einer Sanger-Sequenzierung; Übersetzung in die komplementäre Sequenz ergibt die gesuchte Basenabfolge rechts

Dabei verknüpft die Polymerase die 3'-Hydroxylfunktion der letzten Base des Primers mit dem 5'-Ende des entsprechenden 3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphats (Abb. 5). Die dNTPs werden komplementär unter Berücksichtigung der Watson-Crick-Basenpaarung eingebaut. Dieser Reaktionsansatz wird in vier verschiedenen Gefäßen durchgeführt, wobei jedem der Gefäße jeweils eine geringe Menge eines der vier 2',3'-Dideoxynucleosid-5'-triphosphate (ddNTPs; Abb. 6) hinzugegeben wird. Auf diese Weise kommt es während der enzymatischen Kettenverlängerung auch zu einem statistischen Einbau der ddNTPs. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylfunktion ist die Polymerase nicht mehr in der Lage, weitere 3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphate anzuknüpfen. Es kommt also zu einem spezifischen Abbruch der Kettenverlängerung, der Termination. Aus diesem Grund werden die ddNTPs auch als Terminatoren bezeichnet. Die Abbruchstelle ist dabei dadurch definiert, dass sie komplementär zum verwendeten Terminator ist, so dass über die Länge der erzeugten Fragmente auf die Position der Basen in der DNA geschlossen werden kann. Die unterschiedlich langen Fragmente werden gelelektrophoretisch der Länge nach sortiert, so dass man nach geeigneter Detektion die Basenabfolge des replizierten Stranges direkt vom

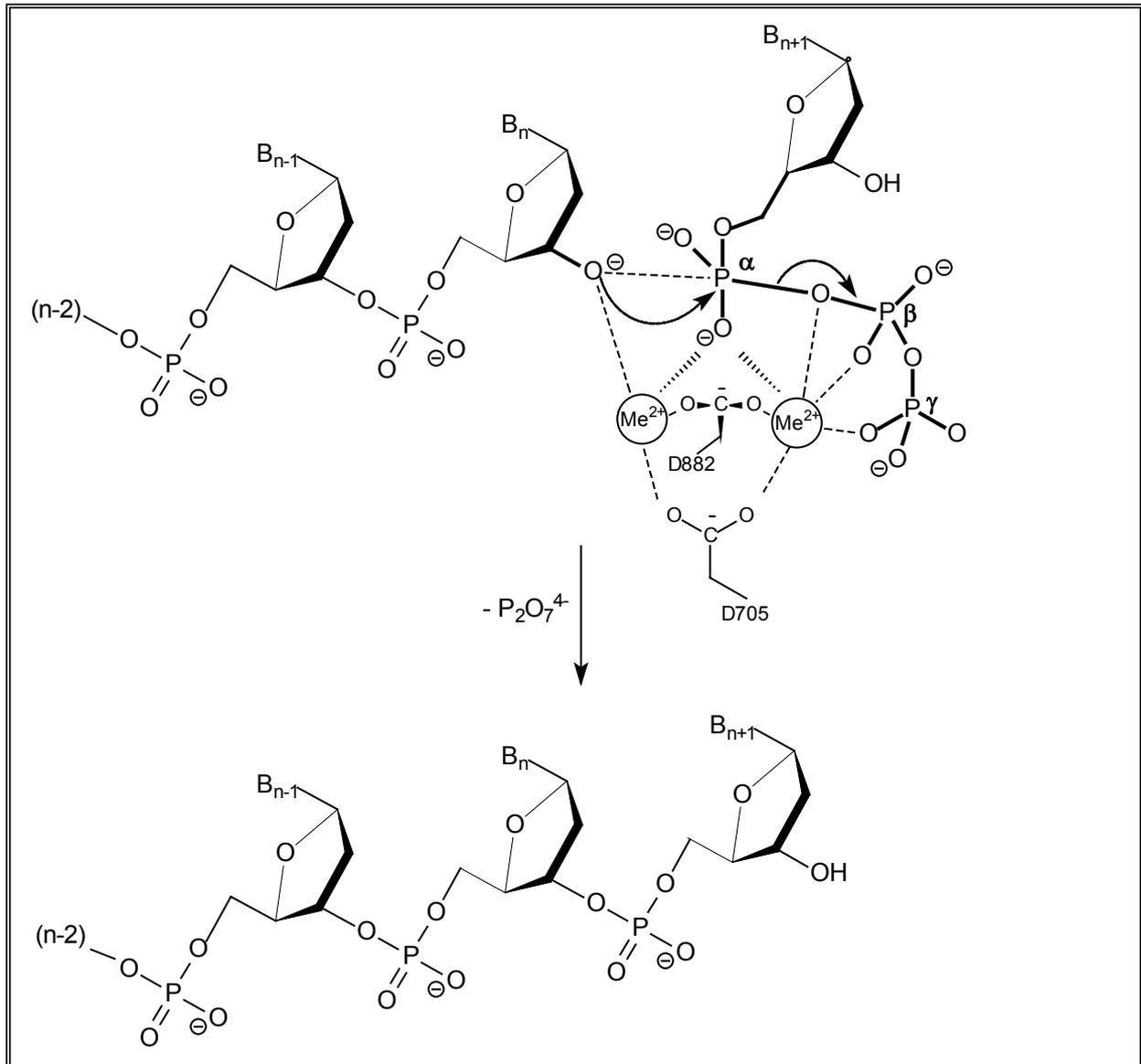


Abb. 5: Reaktionsschema der enzymatischen Kettenverlängerung durch Einbau eines 2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphats an die freie Hydroxylfunktion eines DNA-Stranges durch die T7-Polymerase; Polymerase-Substratkomplex nach Steitz 1998; B = Nucleobase

Gel ablesen kann. Durch einfache Übersetzung in die entsprechende komplementäre Sequenz wird die gesuchte Basenabfolge bestimmt.

Im Laufe der Zeit wurden, basierend auf dem Verfahren von Sanger effiziente, automatisierbare Sequenziermethoden entwickelt, die sich unter anderem in der Art der Detektion unterscheiden. Auf die bedeutendsten Detektionsmethoden soll deshalb im Folgenden eingegangen werden.

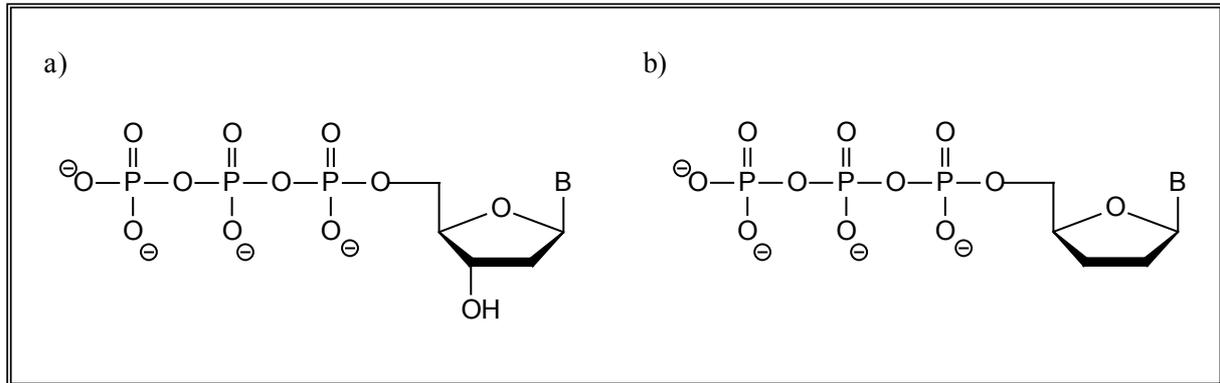


Abb. 6: a) 2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat (dNTP); b) 2',3'-Dideoxynucleosid-5'-triphosphat (ddNTP)

2.2.1 Detektionsmethoden für die Sanger Sequenzierung

Die Detektion der bei der Sanger Sequenzierung entstehenden Fragmente erfolgte anfangs durch Radioaktivmarkierung des Primers oder der Terminatoren. Aufgrund der vielen Nachteile, die die Arbeit mit radioaktiv markierten DNA-Molekülen mit sich bringt, konzentrierte man sich bald auf die Entwicklung alternativer nichtradioaktiver Verfahren. Heutzutage erfolgt die Detektion der DNA-Fragmente meist mittels Fluoreszenzfarbstoffmarkierung, oder seltener auch mittels Massenspektrometrie.

Bei den Techniken, die auf Fluoreszenzmarkierung beruhen, unterscheidet man grundsätzlich drei unterschiedliche Prinzipien:

1. *Dye-Primer Sequenzierung*

Dieses Verfahren bedient sich 5'-farbstoffmarkierter Primer. Analog zur Radioaktivmarkierung sind demzufolge alle erzeugten Fragmente 5'-farbstoffmarkiert.

2. *Dye-Terminator Sequenzierung*

Statt der üblicher Weise verwendeten ddNTPs kommen bei diesem Sequenzierverfahren Terminatoren zum Einsatz, die an ihrer Nukleobase mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs chemisch modifiziert wurden. Auf diese Weise ist jedes Fragment, das durch Einbau des Terminators entstanden ist, farbstoffmarkiert.

3. *Internal Labeling*

Ein farbstoffmarkiertes dNTP wird in einem ersten Kettenverlängerungsschritt direkt an das 3'-Ende des Primers gebunden. So erhält jedes Fragment eine „interne“ Farbstoffmarkierung.

2.2.1.1 Fluoreszenzfarbstoffmarkierung

Die Grundlage aller Sequenziertechniken mittels Fluoreszenzfarbstoffen sind die Anregung der Farbstoffe durch einen Laser während der Gelelektrophorese und die direkte Analyse und Auswertung der Information durch einen optischen Detektor. Auf diese Weise muss vom Gel kein Bild mehr aufgenommen werden wie bei der Radioaktivmarkierung. Die Fluoreszenztechniken zeichnen sich durch ihre Automatisierbarkeit, einen hohen Datendurchsatz und eine sichere Datenermittlung aus.

2.2.1.2 Dye-Primer-Sequenzierung

Beim Dye-Primer-Verfahren verwendet man 5'-farbstoffmarkierte Primer für die Sequenzierung (Smith, 1986; Ansorge, 1986; Smith, 1987; Voss, 1989). Diese Technik vereinigt mehrere Vorteile in sich. Zum einen ist sie völlig unabhängig von der Wahl der Polymerase, da jede DNA-Polymerase verwendet werden kann, die 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphate einbaut. Zum anderen können hohe Leselängen und geringe Fehlerraten erreicht werden. Ein Nachteil des Dye-Primer-Verfahrens besteht jedoch darin, dass die Markierung am 5'-Ende zur Folge hat, dass alle Abbruchfragmente detektiert werden, auch diejenigen, die durch unspezifische Termination zustande kommen können. Ein weiterer Nachteil ergibt sich aus der Limitierung auf die Verwendung nur eines Farbstoffs. Die Reduzierung von vier auf einen Reaktionsansatz mit jeweils einem Farbstoff pro Base zur Durchführung automatisierter Kapillarelektrophorese ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Zur Anbringung des Farbstoffs am Primer während der automatisierten DNA-Synthese können mehrere Methoden genutzt werden. Die einfachste Möglichkeit ist die Verwendung von Farbstoff-Phosphoramiditen (Schubert, 1990; Korshun, 1992; Schubert, 1992; Theissen, 1992). Im letzten Syntheseschritt wird dafür das Farbstoff-Phosphoramidit anstelle eines gewöhnlichen Amidits eingesetzt und in der Regel die Kupplungszeit erhöht. Es können ebenso auch basenmarkierte Nukleosid-Phosphoramidite (Maier, 1995; Sigmund, 1997; Casale, 1990; Markiewicz, 1997) oder 2'- oder 5'-zuckermarkierte Nukleosid-Phosphoramidite (Yamana, 1995; Yamana, 1997a; Yamana, 1997b; Kinjo, 1998) im letzten Syntheseschritt eingesetzt werden.

Eine weitere Variation des Dye-Primer-Verfahrens stellt das Internal Labeling dar. Vom Sequenzierprinzip her bestehen die gleichen Vor- und Nachteile wie beim Dye-Primer-

Verfahren. Lediglich die Art und der Ort der Anbringung des Fluoreszenzfarbstoffs unterscheiden sich. Der Label wird an das 3'-Ende des Primers gebunden. Dazu wird im ersten Sequenzierschritt der Primer mittels eines getrennten Kettenverlängerungsansatzes um genau ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid verlängert. Anschliessend wird die Sequenzierreaktion wie beschrieben fortgesetzt (Voss, 1992a; Voss, 1992b; Hou, 1993; Zhu, 1994).

2.2.1.3 Dye-Terminator-Sequenzierung

Die beiden erwähnten Nachteile der Dye-Primer-Sequenzierung werden durch die Farbstoffmarkierung des Terminators (Prober, 1987) beim Dye-Terminator-Verfahren vermieden. Die chemische Modifikation der 2',3'-Didesoxynukleotide geht allerdings meist mit einer geringeren Akzeptanz durch die gängigen Polymerasen einher. Entweder muss die Position der Modifikation so gewählt werden, dass die Polymeraseakzeptanz erhalten bleibt, oder die Polymerase muss der Modifikation angepasst werden. Letzteres bedeutet, dass eine spezielle Polymerase für den entsprechenden Satz Terminatoren gentechnisch entwickelt werden muss und die Sequenzierbedingungen speziell auf dieses Terminator/Polymerase-System eingestellt werden müssen (Trainor, 1990). Für die chemische Modifikation von 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphaten kommen im Wesentlichen drei Gruppierungen in Frage (Abb. 7).

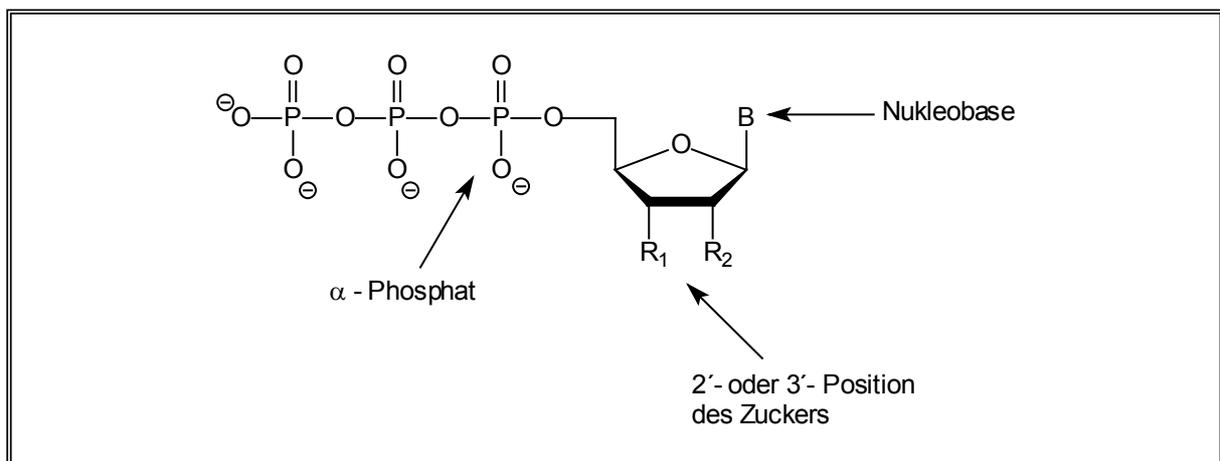


Abb. 7: Mögliche Positionen für die Markierung eines Terminators. Bei der Modifikation des Zuckers ist $R_1 = \text{Linker}$; $R_2 = \text{H}$ und für die Basenmodifikation ist $R_1 = R_2 = \text{H}$

Vielfach in der Literatur beschrieben worden ist die Modifikation der Nukleobase an fast allen möglichen Positionen. Kommerziell erhältliche Terminatoren tragen im Fall der Pyrimidine einen über einen Amino-Propargyllinker an der C-5 Position gebundenen Farbstoff. Bei den Purinbasen ist das Linker-Farbstoff-System an der C-7 Position der entsprechenden Deazaverbindungen gebunden (Abb. 8); (Lee, 1992; Rosenblum, 1997). Auch die Markierung der C-8 Position der Purine ist bereits beschrieben.

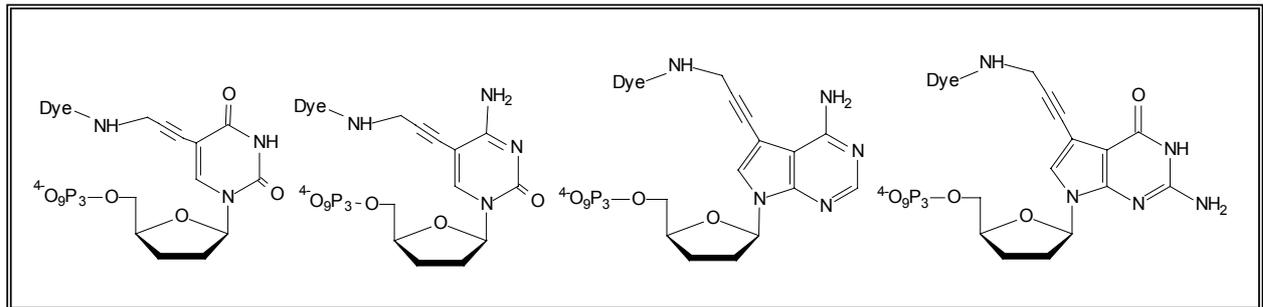


Abb. 7: Struktur der C-5 modifizierten Pyrimidine und der C-7 modifizierten Purine

Seit 1999 wird die Modifikation der exozyklischen Aminofunktionen der Nukleobasen bearbeitet. Gelungen ist bereits eine entsprechende Modifikation des 2',3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphats (Schoetzau, 1999) und des ddUTP (Stolze, 1999). Eine derartige Modifikation des 2',3'-Desoxyguanosins ist bis jetzt nicht bekannt und Bestandteil dieser Arbeit.

Eine weitere Alternative der Farbstoffmarkierung von Terminatoren besteht in der Modifikation des Zuckers. 3'-ether- bzw. 3'-estermodifizierte ddNTPs erwiesen sich bereits als Terminatoren (Metzker, 1994). Ebenfalls terminierende Eigenschaften zeigten die 1998 von Marx hergestellten 4'-acetylierten ddTTP-Derivate (Marx, 1998).

Die Farbstoffmarkierung der 3'-Position war in der Vergangenheit Gegenstand mehrerer Arbeiten (Hovinen, 1994; Herrlein, 1994; Holletz, 1995; Canard und Sarfati, 1994; Sarfati, 1995; Faulstich, 1997; Wojczewski, 2000). Der Grund für die umfangreichen Bemühungen, effiziente 3'-modifizierte Terminatoren zu entwickeln, liegt in der Notwendigkeit, eine bessere Polymeraseakzeptanz zu erreichen. Die bisher eingesetzten, kommerziell erhältlichen basenmodifizierten Terminatoren weisen eine erhöhte Fehlerrate beim enzymatischen Einbau auf. Diese Fehlerrate steigt mit zunehmender Leselänge dramatisch an, so dass zur Zeit routinemässig nur etwa 350 bis 400 Basen mit einer Fehlerrate von weniger als 1% gelesen werden können. Aus diesem Grund muss bei gewünschten Leselängen von mehr als 400 Basen auf das Dye-Primer-Verfahren mit den genannten Nachteilen zurückgegriffen werden. Daher ist die Entwicklung von neuen Terminatoren ohne die genannten Nachteile

lohnenswert. Mit der Modifikation der 3'-Position erhofft man sich, durch einen Positionswechsel des sterisch immens anspruchsvollen Farbstoffs von der Nukleobase weg die Polymeraseakzeptanz und Lesegenauigkeit zu erhöhen.

Unmarkierte 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleosid-5'-triphosphate erwiesen sich als potente Terminatoren (Chidgeavadze, 1984; Krayevsky, 1984; Herrlein, 1993; Herrlein, 1994; Holletz, 1995). Ausserdem zeichnen sich die 3'-Aminoterminatoren durch eine höhere Stabilität ihrer glykosidischen Bindung im Vergleich zu den Didesoxynukleotiden aus. Auch der Synthesaufwand ist mit dem der Didesoxynukleotide vergleichbar. Die leichte Derivatisierbarkeit der Aminofunktion ermöglicht das unkomplizierte Ankuppeln eines Farbstoffs direkt an der 3'-Position. Leider führte die Sequenzierung mit derartigen farbstoffmarkierten Terminatoren zu unerwarteten Detektionsproblemen (Herrlein, 1993; Holletz, 1995; Faulstich, 1997).

Herrlein kam zu dem Ergebnis, dass 3'-fluoresceingelabeltes 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat ein Substrat für die T7-DNA Polymerase darstellte, aber die Detektion der Abbruchfragmente nur bei 5'-Cy5-gelabeltem Primer möglich war. Der Fluoreszenzfarbstoff am 3'-Ende konnte nicht detektiert werden. Der Grund für diese Detektionsprobleme liegt in der Fähigkeit der Polymerasen zur Hydrolyse von Amid-, Ester- und Thioharnstoffbindungen von unmittelbar auf DNA folgenden Modifikationen (Pley, 1995; Burgstaller, 1995).

Im Rahmen eines BMBF-Projekts wurden deshalb verschiedene Strategien der Bindungsknüpfung an der 3'-Position ausgearbeitet. Ziel dieser Arbeiten sollte es sein, eine Verknüpfung zu finden, die nicht von der Polymerase hydrolysiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese und Charakterisierung einer im Rahmen dieses Projekts entwickelten Thioamid-Verknüpfung beschrieben.

Neben der Anwendung in der DNA-Sequenzierung können die hergestellten fluoreszenzmarkierten Verbindungen auch zur Detektion von Punktmutationen mittels des SNUPE-Verfahrens sowie beispielsweise zur Abstandsmessung oder Sequenzierung mittels FRET-Technologie genutzt werden.

Bei der Detektion von bereits bekannten SNPs eignet sich besonders das SNUPE (single nucleotide primer extention)-Verfahren. Dabei wird ein zur Targetsequenz komplementärer Primer synthetisiert, der genau eine Base vor der entsprechenden Mutationsstelle endet. Setzt man nun einem darauffolgenden Terminationsansatz beispielsweise vier unterschiedlich farbstoffmarkierte Terminatoren zu, erfolgt der Einbau desjenigen Terminators der zur

Mutation komplementär ist (Abb.8). Aufgrund der Absorption seines Farbstofflabels kann auf den Terminator und damit auf die zu ihm komplementäre Mutation geschlossen werden.

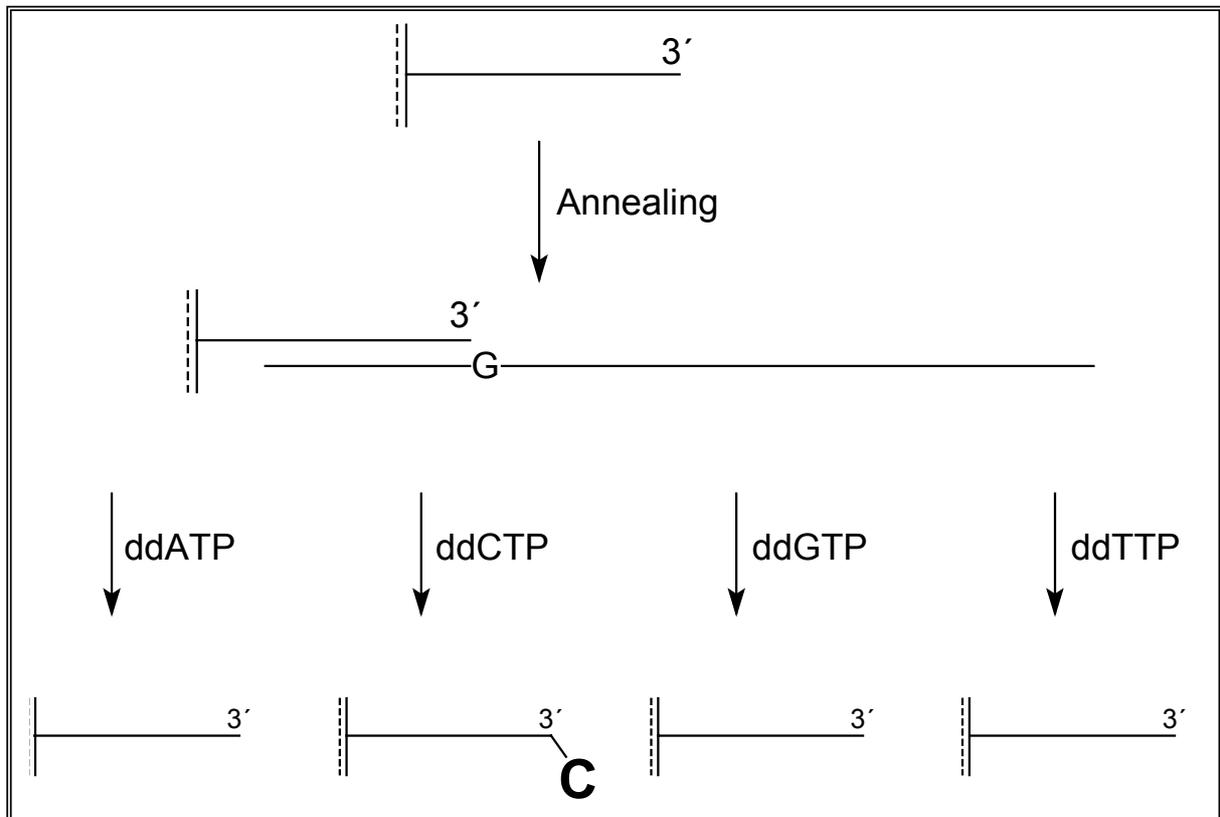


Abb. 8: SNUPE-Verfahren am Beispiel der Mutation G. Der Primer endet genau eine Base vor der zu detektierenden Mutation. Wird komplementär zur Mutation ein farbstoffmarkiertes ddCTP eingebaut, kann die Mutation detektiert werden

In vielen Anwendungen, z. B. der Abstandmessung in Oligonukleotiden oder auch der Sequenzierung bedient man sich des sogenannten Fluoreszenzenergietransfers (FRET). Fluoreszenz-Energietransfer findet statt, wenn zwei Fluoreszenzfarbstoffe in guter Nähe zueinander stehen und das Emissionsspektrum des einen gut mit dem Absorptionsspektrum des anderen überlappt. Der Donorfarbstoff transferiert nach Anregung Energie auf den Akzeptorfarbstoff. Der Energietransfer kann gemessen werden, da die Fluoreszenz des Donors abnimmt und die des Akzeptors zunimmt. Eine Möglichkeit zur Einführung dieser Farbstoffe besteht sicherlich je nach Anwendung im enzymatischen Einbau eines entsprechend gelabelten Terminators.

2.3 DNA-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS

Es existieren derzeit zwei Methoden, die sich zur Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS eignen. Eine Möglichkeit stellt die schnelle Fragmentierung oder PSD-Analyse (metastabiler Zerfall) dar (Juhasz, 1996; Nordhoff, 1995). Dabei werden die bei der DNA-Fragmentierung in der Gasphase entstandenen Fragmente für die Sequenzanalyse genutzt. Eine eindeutige Identifizierung aller Bruchstücke setzt jedoch eine bisher zumindest für Standardsequenzierungen unerreichbar hohe Signalauflösung und Massengenauigkeit voraus. Weitere ungelöste Probleme dieser Technik sind eine schlechte Reproduzierbarkeit, komplexe Spektren und nicht identifizierbare Fragmente.

Bessere Chancen auf baldigen Einsatz in der Routinesequenzierung erhofft man sich von der MALDI-TOF-Analyse von Exonuklease-Abbauprodukten (Pieles, 1993; Bentzley, 1996) und von Sanger-Abbruchfragmenten. Das Problem beim Exonuklease-Abbau besteht in der geringen Massendifferenz der Fragmente. Die Massendifferenz zwischen der Abspaltung von Thymidin und Adenin beträgt gerade 9 Da. Daher ist auch in diesem Fall eine sehr gute Massengenauigkeit zur eindeutigen Basenzuordnung nötig.

Bei der MALDI-TOF-Analyse von Sanger-Abbruchfragmenten besteht der grosse Vorteil gegenüber den anderen Verfahren darin, dass die Sequenzleitern der vier Basen unabhängig voneinander gemessen werden (Bentzley, 1996). Deshalb beträgt die kleinstmögliche Massendifferenz ca. 300 Da, nämlich genau die zweier aufeinanderfolgender gleicher Basen, wie TT oder CC (Abb. 9).

Die daraus resultierenden geringeren Anforderungen an Massengenauigkeit und -auflösung sprechen für die Weiterentwicklung dieses Verfahrens. Bis jetzt kann die Sequenzanalyse mittels MALDI-TOF-MS mit den etablierten Verfahren nicht konkurrieren. Bisher können Sequenzen bis zu 600 bp sequenziert werden, doch die immer noch zu niedrige Massengenauigkeit und -auflösung erfordert viel grössere Substanzmengen als die beschriebenen gelelektrophoretischen Verfahren.

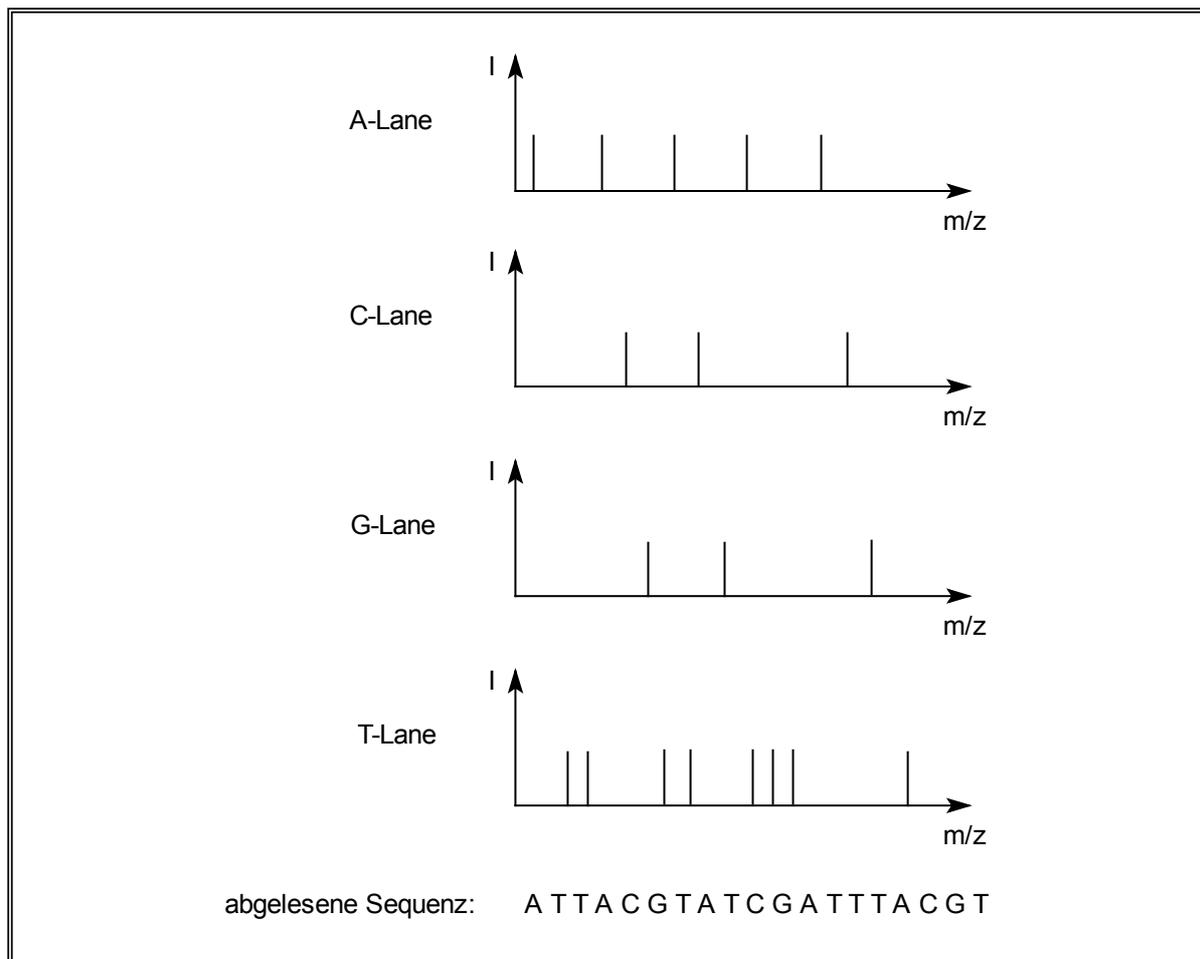


Abb. 9: MALDI-Sanger Sequenzierung in vier Spuren. Es muss nur die Reihenfolge der terminierenden Fragmente bestimmt werden, nicht die genaue Masse.

2.4 Genomanalyse: Random Shotgun Sequencing und Primer Walking

Auf einem Sequenziergel können maximal 10^3 Basen gelesen werden, meist jedoch nur 500 bis 800 Basen. Wenn grosse DNA-Stücke sequenziert werden sollen, muss das Verfahren des Random Shotgun Sequencing angewendet werden. Für die beschriebenen Genomsequenzierungsprojekte wurde fast ausschliesslich diese Technik verwendet (Martin-Gallardo, 1994). Im ersten Schritt dieses Verfahrens wird die DNA zunächst in ein Cosmid inkloniert, das 40 bis 50 kb Fremd-DNA aufnehmen kann. Die anschliessende Behandlung mit Ultraschall führt zur zufälligen und schrotschussartigen Zerstückelung der DNA in unterschiedlich lange Fragmente (Abb. 10). Die durchschnittliche Länge der Fragmente kann durch Wahl der entsprechenden Sonifikationsdauer beeinflusst werden. Anschliessend folgt

die Insertion der mittels Gelelektrophorese erhaltenen Fragmente von gewünschter Länge in einen Vektor. Diesen Vektor transformiert man in *E. coli*, so dass er vermehrt, einzelsträngig isoliert und sequenziert werden kann.

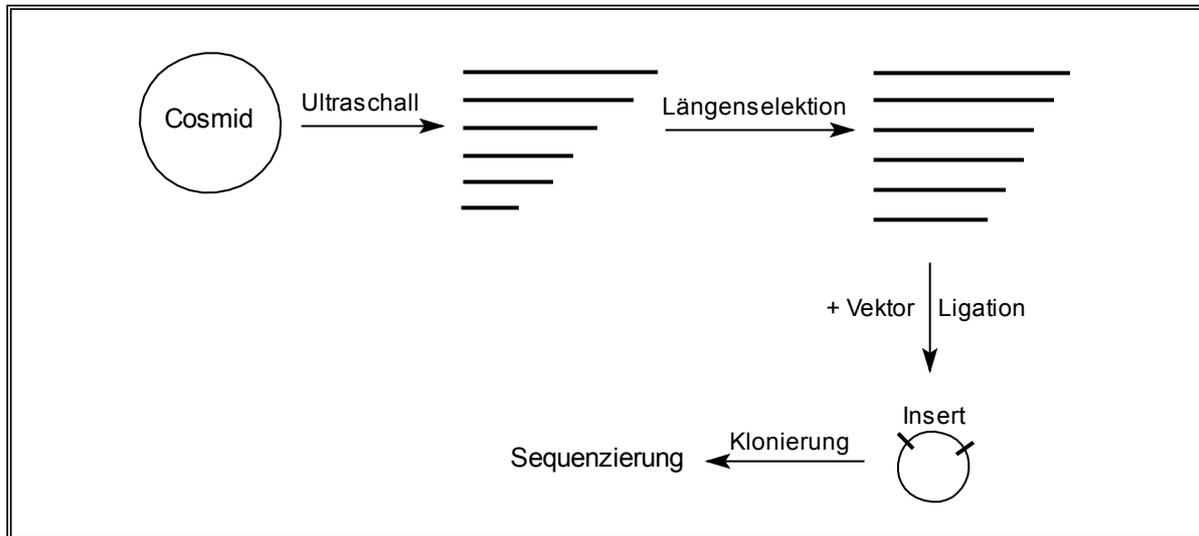


Abb. 10: Random Shotgun Sequencing: im Cosmid ist die zu untersuchende DNA enthalten

(Abb. nach Wojczewski, 2000)

Da diese Inserts mit 1,5 bis 4 kb immer noch zu gross für die Sanger-Sequenzierung sind, wird zur weiteren Sequenzierung das Primer Walking Verfahren angewendet. Dabei werden die Daten aus der Sequenz der ersten Sequenzierung genutzt, um einen neuen Primer zu synthetisieren, der ein Weitersequenzieren erlaubt (Abb. 11). Als ersten Primer verwendet man in diesem Fall eine komplementäre Sequenz aus dem Bereich des Vektors, der benachbart zum Insert ist. Mit diesem Primer wird einige hundert Basen weit sequenziert. Mit Hilfe der so gewonnenen Sequenzinformation wird ein weiterer Primer synthetisiert, der im Abstand von 300 bis 800 Basen vom ersten Primer positioniert ist. Diese Schritte werden solange wiederholt, bis die gesamte Sequenz entschlüsselt ist. Auf diese Weise können DNA-Sequenzen von bis zu 50 kb sequenziert werden.

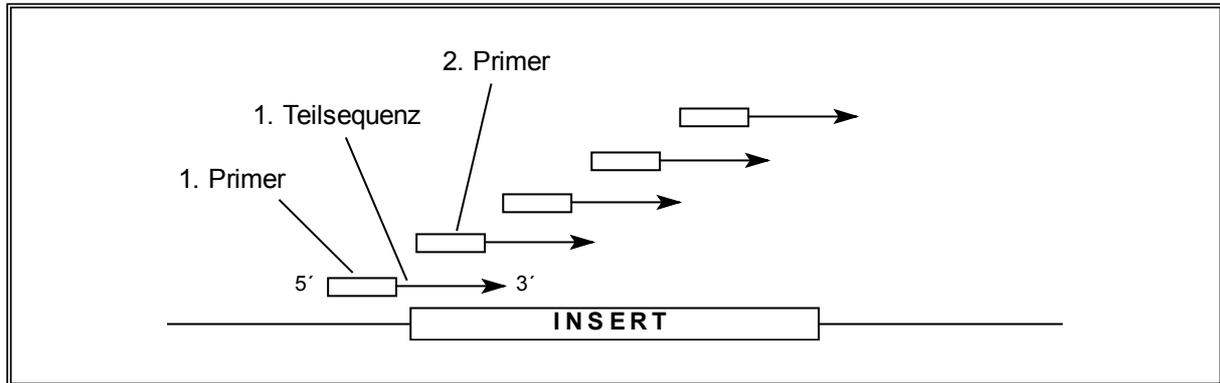


Abb. 11: Primer Walking: der 1. Primer ist komplementär zur bekannten Vektorsequenz. Aus den Daten der 1. Teilsequenz wird ein neuer Primer generiert und weitersequenziert. (Abb. nach Wojczewski, 2000)

2.5 Sequenzierung durch Hybridisierung

Das Verfahren der Sequenzanalyse durch Hybridisierung beruht auf der Hybridisierung einer unbekannt, fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sequenz mit Oligonukleotiden bekannter Sequenz, die auf einer Chipoberfläche immobilisiert sind (Khrapko, 1989; Bains, 1988; Southern, 1992; Kerk, 1999). Die gesuchte DNA hybridisiert entsprechend sequenzspezifisch, wodurch ein eindeutiges Muster entsteht, das mit Proben bekannter Sequenz verglichen wird. Auf diese Weise erhält man die gesuchte Sequenz. Die computerunterstützte Analyse überlappender Abschnitte hilft, die gesamte Sequenz zusammenzufügen.

Entsprechende Oligonukleotidbibliotheken werden durch kombinatorische Synthese an fester Phase (Chip-Oberfläche) mittels Fotoschablonen erstellt. Bei diesem Verfahren wird mit photolabilen Schutzgruppen gearbeitet, mit denen die 5'-Hydroxylgruppen auf der Chipoberfläche versehen sind. Mittels einer Maske werden bestimmte offenliegende Bereiche durch gezielte UV-Strahlung entschützt. Die so freiliegenden Hydroxylgruppen werden mit Nucleosidphosphoramiditen, die wiederum eine photolabile Schutzgruppe an ihrem 5'-Ende tragen, zur Reaktion gebracht. Auf diese Weise können mittels weiterer Masken weitere Nucleotide nach der Phosphoramiditmethode angeknüpft werden (Beaucage, 1992; 1993a,b). Durch entsprechende Einstellung der fotolithographischen Maske kann der Ort der Schutzgruppenabspaltung und Nucleotidankopplung kontrolliert werden (Abb.12). Die Sequenz der synthetisierten Oligonukleotide ist damit an jeder Position genau bestimmbar. Da die zu sequenzierende DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist, werden erfolgreiche Hybridisierungen mit den Oligonukleotiden auf dem Chip erkannt. Fehlhybridisierungen

können durch einfache Waschschrte abgetrennt werden. Durch computergestützte Analyse des Überlapps erhält man die Gesamtsequenz. Die Methode ist leicht automatisierbar, parallelisierbar und miniaturisierbar. Die Bibliotheken sind wiederverwendbar. Obwohl die Sequenzierung durch Hybridisierung diesbezüglich alle Voraussetzungen für Genom-Sequenzierprojekte erfüllt, wird sie aufgrund einiger Nachteile noch nicht für „large scale“ Sequenzierungen eingesetzt. Das Hauptproblem liegt in der unzureichenden Länge der festphasengebundenen Oligonukleotide. Längere homopolymere Sequenzen und mehrfache Wiederholungen gleicher Abschnitte können mit den kurzen Oligonukleotiden (8-10mere) nicht exakt bestimmt werden.

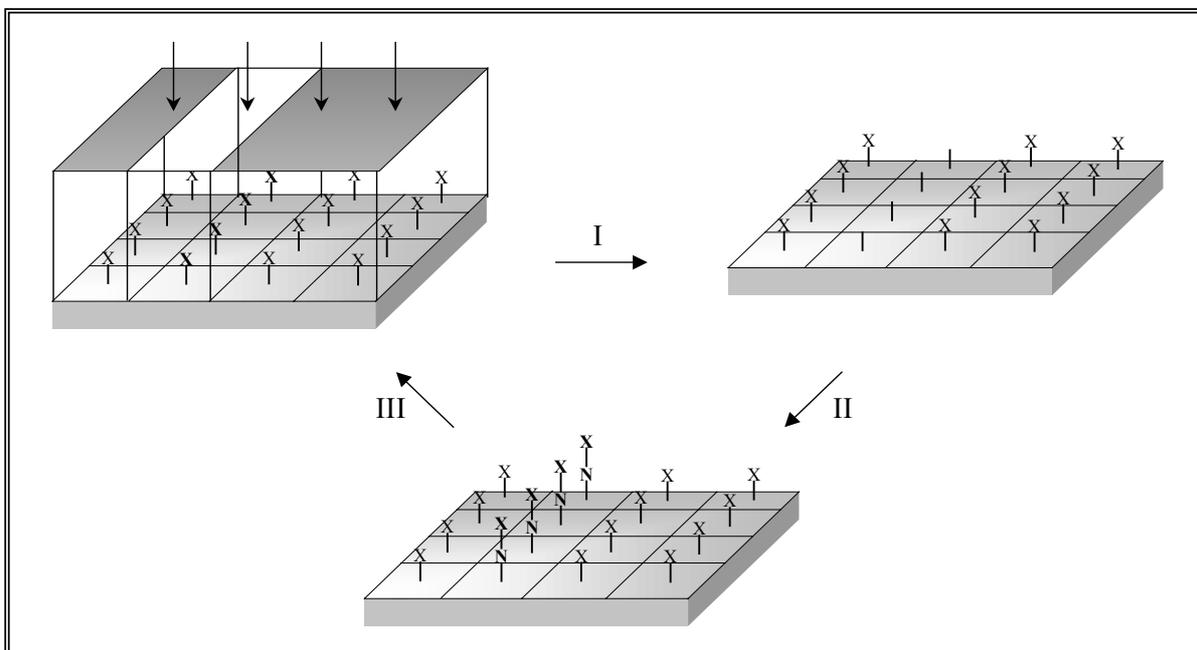
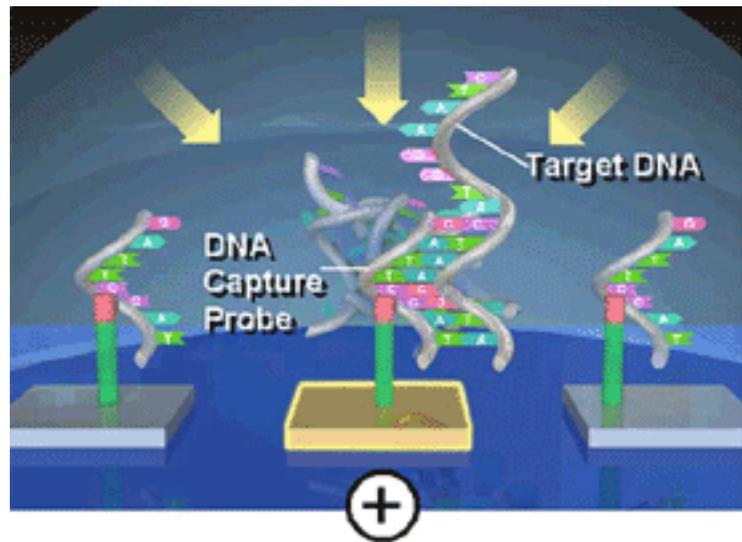


Abb. 12: Sequenzierung durch Hybridisierung; auf einem Raster werden zunächst durch eine lithographische Maske in ausgewählten Bereichen die photolabilen Schutzgruppen (X) entfernt (I). Die freigebliebenen Hydroxylgruppen werden gemäß der Phosphoramidit-Methode zur Festphasensynthese von Oligonukleotiden mit einem Nucleosid (N) versehen (II). Das hinzugefügte Nucleosid verfügt über die gleiche Schutzgruppe am 5'-Ende, so daß der Zyklus wiederholt werden kann (III). Die fertige Matrix wird mit einer unbekannt DNA hybridisiert.

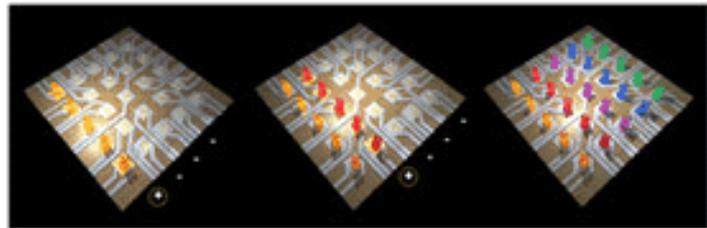
Ein Alternative zum fotolithographischen Verfahren ist ein von Nanogen entwickelter Ansatz (Manz, 1996). Die negativ geladenen Oligonukleotide werden durch ein ortsselektives Anlegen einer positiven Spannung auf dem Chip positioniert und dann chemisch gebunden. Anschliessend wird durch das Anlegen einer negativen Spannung die überschüssige DNA entfernt (Edman, 1997).

Abb. 13:

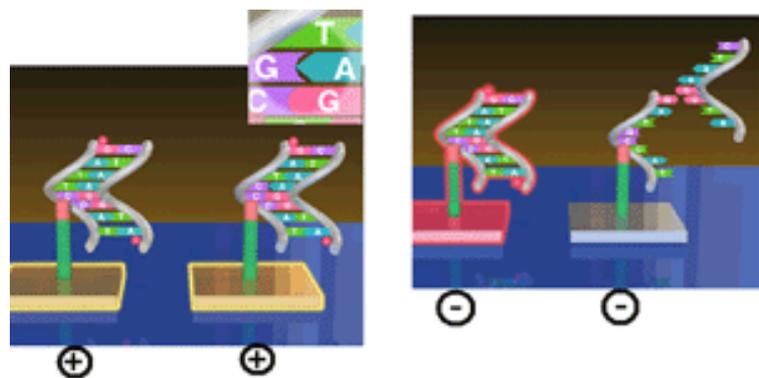
1. Positionierung der negativ geladenen Oligonukleotide durch ortsselektives Anlegen einer positiven Spannung Auf dem Chip.



2. Chemische Bindung des positionierten Oligonukleotids, z.B. mittels Biotin/ Streptavidin



3. Nichtgebundene und unspezifisch gebundene DNA wird durch Anlegen einer negativen Spannung entfernt und abgewaschen. (Bilder: Nanogen)



Auch das Sanger-Verfahren findet bei der Festphasensequenzierung seine Anwendung. Eine Möglichkeit stellt der Einsatz von Oligonukleotidbibliotheken mit identischer Anfangssequenz dar. Diese bekannte Region wird als Primerbindungsstelle für die Sanger Sequenzierung verwendet (Markiewicz, 1996). Der Vorteil dieses Verfahrens ist die Wiederverwertbarkeit der Bibliothekbestandteile, da sie nicht verändert werden.

Eine weitere Anwendung des Sanger-Verfahrens ist die einfache Sequenzierung nach Sanger an der festen Phase (Solid Phase Sequencing). Dabei wird der Vorteil von Festphasenreaktionen, nämlich eine leichte Entfernung ungewollter Reaktionsbestandteile durch einfache Waschschriffe, genutzt. Vor der Auftrennung der Sanger-Fragmente mittels Gelelektrophorese werden Puffer, Enzyme, DNA und überschüssige Nukleotide abgetrennt. Damit erzielt man ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Eine besonders clevere Reinigungsmethode ist mit den sogenannten Magnetic Beads von DYNAL gegeben. Dabei wird der Primer am 5'-Ende mit Biotin markiert und der Sequenzieransatz nach erfolgter enzymatischer Kettenverlängerung mit an Polystyrol gebundenem Streptavidin inkubiert. Die Polystyrolkügelchen besitzen einen magnetischen Kern und können somit mittels eines Magneten besonders leicht von der flüssigen Phase getrennt werden.

2.6 Weitere Methoden

Im Folgenden seien der Vollständigkeit halber weitere Methoden der DNA-Sequenzierung erwähnt, die sehr interessante Ansatzpunkte darstellen, sich aber zum Teil noch in der Entwicklung befinden.

Bei der Resonanz-Ionen-Spektroskopie wird eine Sanger Sequenzierung durchgeführt. Zur Detektion der Fragmente nutzt man Primer, die für jede basenspezifische Terminationsreaktion ein anderes Isotop des gleichen Elements enthalten (Jacobson, 1992). Dabei werden vor allem die nicht radioaktiven Isotope der Elemente Zinn oder Eisen verwendet.

Die Echtzeit-Pyrophosphat-Sequenzierung stellt ein elektrophorese- und markerfreies Verfahren dar, das auf der Detektion der Inkorporation jedes Nukleotids bei der Strangverlängerung basiert. Dabei wird das bei der Polymerisation abgespaltene Pyrophosphat detektiert (Ronaghi, 1996; Ronaghi, 1998).

Als physikalische Methoden seien die Raster Tunnel- und die Kraftfeldmikroskopie erwähnt. Erstere bedient sich des quantenmechanischen Tunneleffekts eines Elektrons im elektrischen Feld zwischen zwei Elektroden, und die zweite basiert auf der Messung der Federkonstanten zweier Atome durch Kraftmessung einer Feder mit geringerer Federkonstante (Maier, 1997).

Als ein Beispiel der Sequenzierung durch Amplifikation sei das Cycle Sequencing erwähnt. Darunter versteht man die lineare Amplifikation von Sequenzierfragmenten durch Temperaturvariation. Die Sanger-Sequenzierreaktion wird nicht nur einmal durchgeführt, sondern das Hybrid aus Targetstrang und Primer wird wiederholt aufgeschmolzen, rehybridisiert und erneut der Primer verlängert. Im Gegensatz zur Polymerase Kettenreaktion (PCR) werden Terminatoren und nur ein Primer eingesetzt. Wie bei der PCR ist der Einsatz thermostabiler Polymerasen notwendig. Die Vorteile dieser Kombination aus PCR und Sanger Sequenzierung liegen in der sehr geringen benötigten Menge an DNA (ng-Bereich) und in der Steigerung der Konzentration der Sanger-Fragmente.

3 Synthese modifizierter Nucleoside

3.1 Synthese von Nucleosiden mit 3'-Modifikation

3.1.1 Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidin

Aufgrund seiner antiviralen Eigenschaften (Zimmermann, 1987; Lin, 1983a; Lin, 1983b; Lin, 1987) war die Entwicklung effektiver Synthesemethoden für 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT) seit langem Gegenstand intensiver Forschung. Für das als Polymeraseinhibitor zur Therapie des HIV bekannt gewordene AZT existieren bereits einige optimierte Synthesemethoden (Jeong, 1993; Krenitzky, 1983; Benhaddou, 1991; Lin, 1987; Chen, 1995; Gurjar, 1993; Saha, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Synthesemethoden zur Herstellung von AZT verwendet.

Für die Synthese von 3'-Amino-3'-desoxy-5'-triphosphat wurde nach Czernecki das Azid unter doppelter Mitsunobu-Reaktion an der 3'-Hydroxylfunktion eingeführt (Czernecki, 1991).

Ausgehend von Thymidin **1** wird im ersten Schritt der Reaktion unter doppelter Mitsunobu-Reaktion sowohl die 5'-OH-Schutzgruppe Methoxybenzoyl eingeführt als auch unter Inversion am C-3' die entsprechende 3'-Anhydroverbindung **2** in 74% Ausbeute generiert (Abb. 14). Im ersten Schritt versetzt man Thymidin unter Mitsunobu-Bedingungen mit Triphenylphosphin, DIAD und p-Anissäure in DMF und lässt 15 min bei RT rühren. Anschliessend generiert man durch erneute Zugabe von Triphenylphosphin und DIAD in einer zweiten Mitsunobu-Reaktion die gewünschte Anhydroverbindung **2**.

Anschliessendes Erhitzen der Anhydroverbindung **2** mit LiN_3 führt unter nukleophilem Angriff des Azid-Ions an der C-3'-Position zum gewünschten 3'-Anhydro-3'-desoxy-5'-O-(4-methoxybenzoyl)thymidin **3**. Die abschliessende Entschützung der 5'-Position erfolgte mittels ammoniakalischer Methanol-Lösung und führte in 80% Ausbeute zu AZT **4**.

Eine sehr analoge Strategie arbeitet mit Diethylaminoschwefeltrifluorid zur Darstellung der Anhydroverbindung (Chen, 1995). Falls die Schutzgruppenstrategie einer nachfolgenden Synthese es zulässt, ist die Methode der doppelten Mitsunobu-Reaktion derjenigen von Horwitz zur Darstellung von AZT aufgrund ihrer Effizienz und der preisgünstigeren Reagenzien vorzuziehen.

Bei der zweiten Methode diente 5'-DMTr-geschütztes AZT als Zwischenprodukt für die Synthese eines 3'-Thioamid-modifizierten Thymidinderivats. Das AZT-Intermediat für diese Synthese wurde nach der von Horwitz und Miller entwickelten Methode der Inversion am C-3' durchgeführt (Horwitz, 1964; Miller, 1964; Fox, 1963).

Im ersten Schritt dieser Synthese erfolgt das Schützen der 5'-Hydroxylgruppe des Thymidins **1**. Für die Synthese und die spätere Entschützung ist die säurelabile Dimethoxytrityl-Gruppe

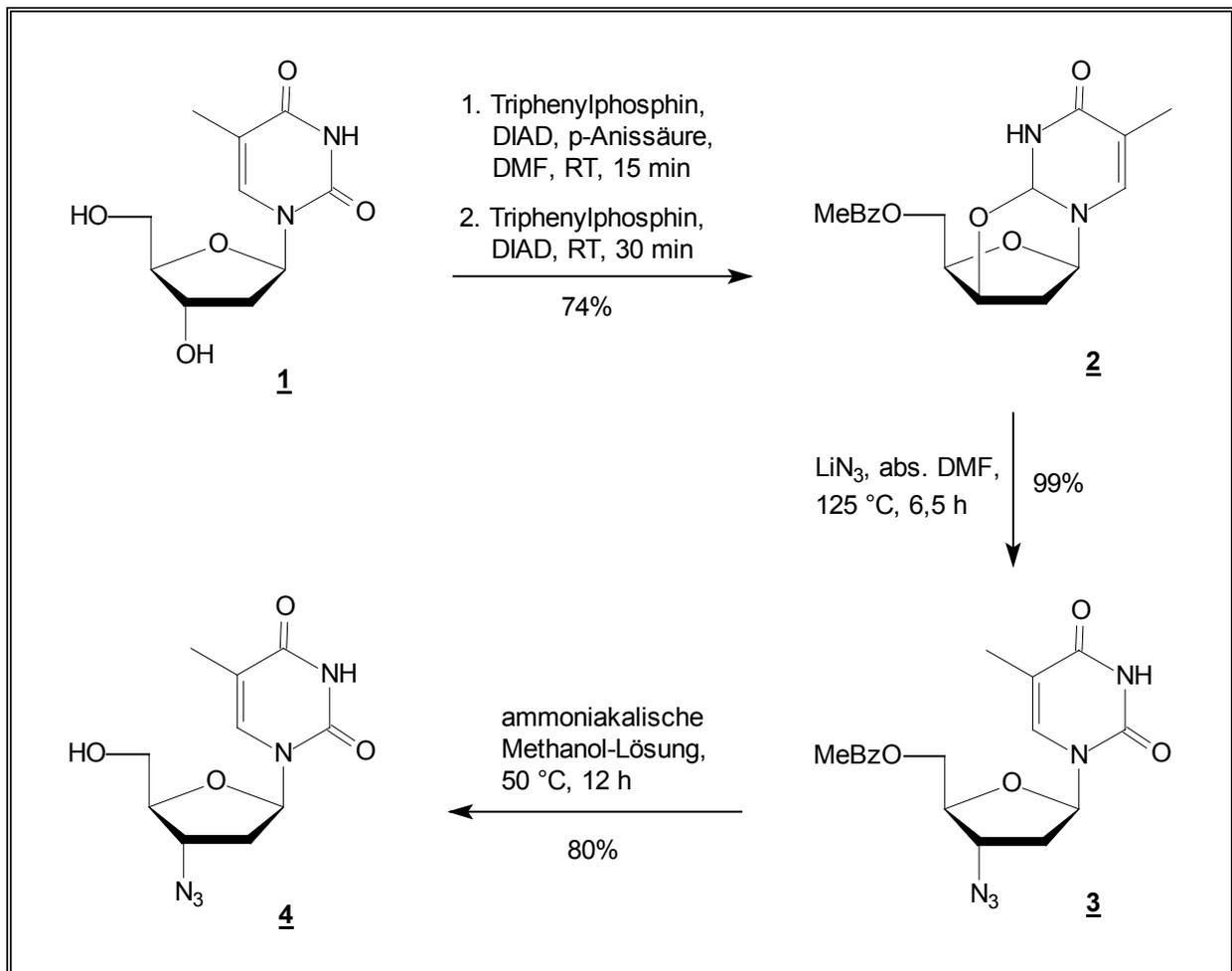


Abb. 14: Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT) mittels doppelter Mitsunobu-Reaktion

zweckmässig (Smith, 1962; Schaller, 1963). Die sterisch anspruchsvolle Schutzgruppe reagiert mit hoher Selektivität an der primären 5'-OH-Funktion. Die Reaktion wurde unter Standardbedingungen durchgeführt und führte mit 90% Ausbeute zum gewünschten Produkt **5** (Abb. 15). Im nächsten Schritt wurde an der 3'-Position eine Mesylabgangsgruppe generiert. Dafür wurde das Edukt in abs. Pyridin gelöst und bei 0 °C mit Methansulfonylchlorid zur Reaktion gebracht. Nach abgeschlossener Reaktion wurde die

Reaktionslösung mit Methanol gequencht und auf Eiswasser gegossen. Das Produkt 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-methylsulfonylthymidin **6** kristallisierte bei langsamem Zugiessen in ausreichender Reinheit mit 96 %iger Ausbeute. Geschieht das Giessen in Eiswasser zu schnell, kann es zu Pyridineinschlüssen in den Niederschlag kommen, was sich auf die Reinheit des Produkts negativ auswirkt. Die anschliessende Umsetzung der Verbindung **6** mit Kaliumphthalimid in DMF und Wasser unter einstündigem Refluxieren führte mit 89%iger Ausbeute zur gewünschten Anhydroverbindung *O*²,3'-Anhydro-1-(5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-*threo*-pentofuranosylthymidin **7**. Die Base deprotoniert dabei den N-3-Stickstoff an der Nucleobase und verschiebt so das Keto-Enol-Gleichgewicht in die Richtung der Enolform. Aufgrund der dadurch erhöhten Nucleophilie des Sauerstoffs wird die Mesylgruppe am C-3' verdrängt. Langsames Eingiessen des Reaktionsgemischs in Eiswasser führt zur Bildung eines weissen Niederschlags von *O*²,3'-Anhydro-1-(5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-*threo*-pentofuranosylthymidin **7**. Auch in diesem Fall muss auf die Giessgeschwindigkeit geachtet werden, um ein ausreichend reines Produkt zu erhalten. Im Anschluss wurde die Anhydroverbindung mit LiN₃ in DMF zur Reaktion gebracht. Fünfstündiges Rühren bei 125 °C und säulenchromatographische Aufreinigung führten zu 80% des gewünschten Produkts 3'-Azido-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **8**. Die Verbindung **8** wurde als Zwischenprodukt für die Synthese eines 3'-Thioamid-modifizierten Thymidinderivats eingesetzt.

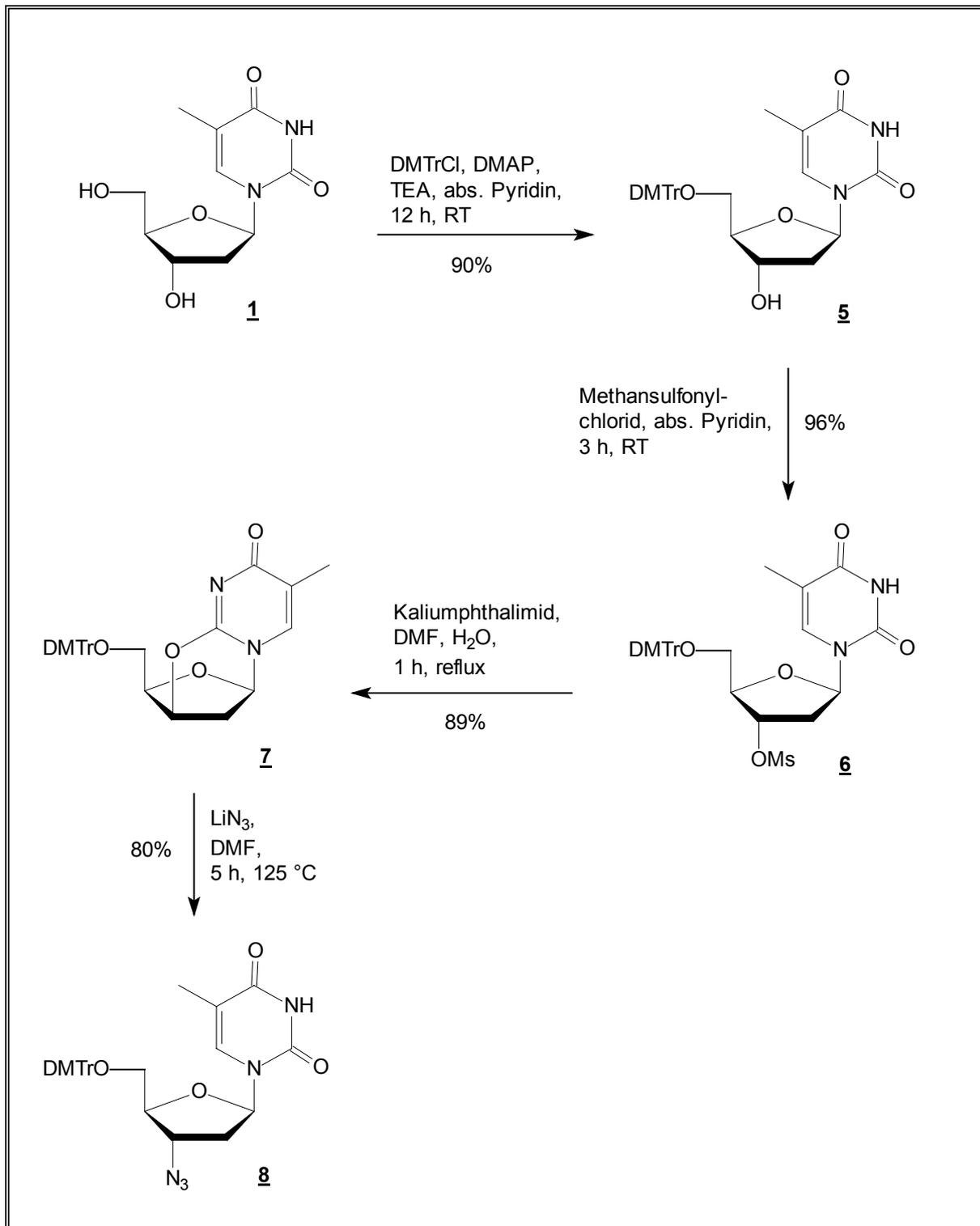


Abb. 15: Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT) nach Horwitz

3.1.2 Synthese von 3'-Desoxy-3'- $\{6-\{[(9H\text{-fluoren-9-ylmethoxy})\text{-carbonyl}]\text{amino}\}-1\text{-thioxohexyl}\}\text{amino}\}$ thymidin

Thioamide stellen im Gegensatz zu vielen anderen Thiocarbonylverbindungen sehr stabile Verbindungen dar. Sie sind sowohl thermisch als auch hydrolytisch stabil und zeigen nur eine geringe Tendenz zur Entschwefelung (Cava, 1985). Andererseits gehen Thioamide eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionen ein und sind deswegen für chemische, technologische und medizinische Anwendungen schon immer von grossem Interesse gewesen.

Ausgangsverbindung für die Synthese eines 3'-Thioamid-modifizierten Thymidins bildete 3'-Azido-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **8**, das wie in Abschnitt 3.1.1 aus *O*²,3'-Anhydro-1-(5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-*threo*-pentofuranosyl)-thymidin **7** hergestellt wurde.

Um an der 3'-Position eine Amidfunktion einführen zu können, musste zunächst das 3'-Azid reduziert werden. Zur Reduktion von Aziden in der Nucleosidchemie sind viele Methoden beschrieben worden. Eine häufig eingesetzte Methode ist die Staudinger-Reduktion mittels Triphenylphosphin (Staudinger, 1919; Mungall, 1975; Lin, 1978; Mag, 1991). Holletz entwickelte 1994 eine Variante dieser Methode, indem er Azidnucleoside mit polymer gebundenem Triphenylphosphin reduzierte (Holletz, 1994).

Ebenfalls zur Reduktion von Aziden in der Nucleosidchemie eingesetzt wurden einige metallvermittelte radikalische Reduktionsmethoden wie die Tributylstannan-Reduktion (Samano, 1991). Weiterhin wurden beispielsweise Magnesium und Calcium in Methanol (Maiti, 1988) und Zinn-, Titan-, Vanadium-, Chrom- und Molybdänchloride verwendet (Larock, 1989).

Auch einige katalytische Methoden zur Reduktion von Azidnucleosiden haben sich als sehr effizient erwiesen. Genannt seien hier die Reduktionen mittels Palladium (Stout, 1969) oder Platinoxid-Hydrat (Horwitz, 1962) als Katalysator und Wasserstoff oder Hydrazin als Reduktionsmittel (Malik, 1992). Lithiumaluminiumhydrid und Natriumborhydrid wurden ebenfalls zur Reduktion verwendet (Turnbull, 1988). H. C. Brown entwickelte eine chemoselektive Methode der Reduktion mittels Dichlorborandimethylsulfid, mit der das Azid auch in Anwesenheit vieler anderer funktioneller Gruppen reduziert werden konnte (Salunkhe, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde **8** metallkatalytisch reduziert. Wie die Arbeiten von Faulstich gezeigt haben, eignet sich besonders die Verwendung von Platinoxidhydrat für die katalytische Reduktion, zumal sich die Dimethoxytritylschutzgruppe völlig inert gegenüber

diesen Reaktionsbedingungen zeigt (Faulstich, 1997). Ein weiterer Vorteil dieser Reaktion ist eine schnelle und saubere Umsetzung, verbunden mit einer einfachen Isolierung des Produkts - meist ohne weitere Aufreinigung - und in guten Ausbeuten. **8** wurde demzufolge unter Schutzgasbedingungen in trockenem, engstem Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze des Katalysators versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Da nach dreistündigem Rühren bei RT die Umsetzung noch nicht vollständig war, wurde der Ansatz über Nacht über einer Wasserstoffatmosphäre stehen gelassen.

Anschliessend konnte das Produkt 3'-Amino-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **9** in 72%iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 17).

Zur Knüpfung der Amidbindung an der 3'-Position wurde eine Aminocaprinsäure-Einheit gewählt. Das Amino-Ende dieser C6-Einheit sollte zur Anknüpfung des Fluoreszenzfarbstoffs dienen, und die C6-Einheit sollte die Funktion eines mittellangen Linkers erfüllen, um einen gewissen Abstand zwischen Nucleosid und Fluorophor zu schaffen.

Für die Synthese musste die Amin-Funktion mit einer Schutzgruppe versehen werden, die sowohl unter den Synthesebedingungen stabil als auch unter milden und nicht sauren Bedingungen abspaltbar sein musste. Da die Abspaltbedingungen für die BOC- und die Trifluoracetylenschutzgruppe für Triphosphate nicht geeignet erschienen, wurde für den Aminocaprinsäurebaustein die Fmoc-Schutzgruppe verwendet. Die vergleichsweise milden, basischen Abspaltbedingungen mittels Piperidin in Pyridin schienen für Triphosphate am geeignetsten. In parallel zu dieser Synthesearbeit laufenden Untersuchungen konnte Wojczewski anhand der Synthese eines 3'-Thioether modifizierten Nucleosidtriphosphats diese Vermutungen bestätigen (Wojczewski, 2000). Zur Einführung der Fmoc-Schutzgruppe wurde Aminocaprinsäure **10** in einem Aceton/Wasser-Gemisch gelöst, *N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimid sowie NaHCO₃ zugegeben und zwei Stunden bei RT gerührt. Saure Aufarbeitung führte in 99 %iger Ausbeute zum gewünschten Produkt 6-{{(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl}amino}hexansäure **11** (Abb. 16).

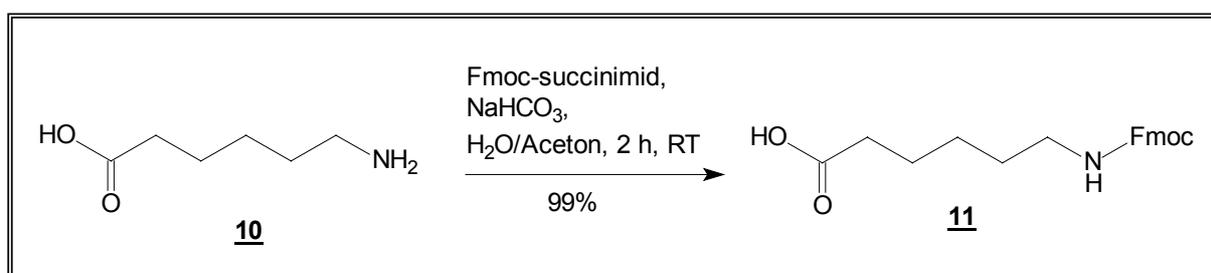


Abb. 16: Synthese von 6-{{(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl}amino}hexansäure **11**

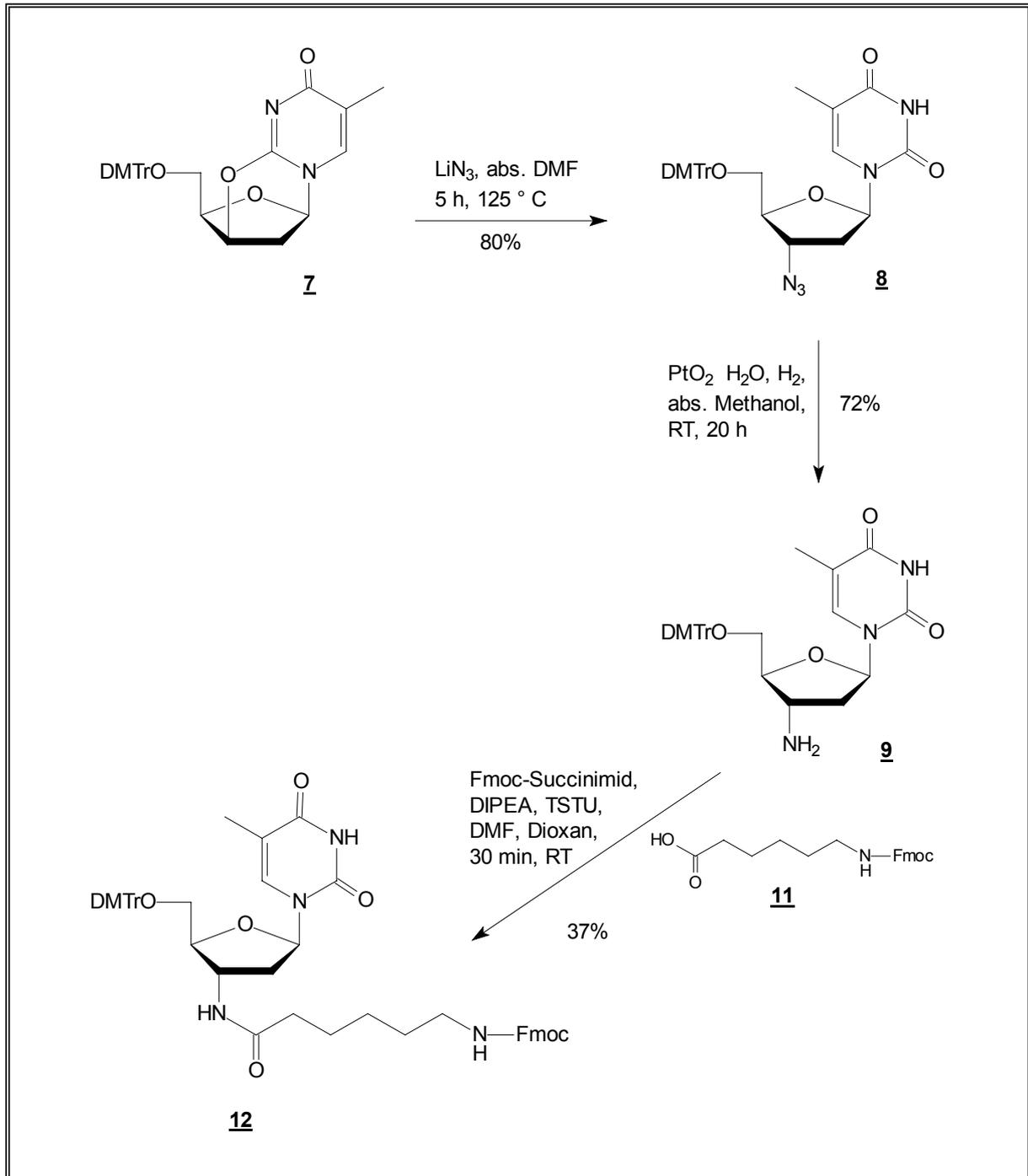


Abb. 17: Synthese des 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-N-(6''-N-(fluorenyl-methoxycarbonylamido)caproylamido)-3'-desoxythymidin **12**

Die Ankupplung des Aminocapronsäure-Linkers erfolgte nach Bannwarth. Danach wird die Carboxylgruppe als *N*-Hydroxysuccinimidylester aktiviert. Die Carboxylgruppe-tragende Verbindung wird mit *O*-(*N*-Succinimidyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TSTU) umgesetzt (Abb. 18). Die zweistufige Synthese wurde in einem Schritt durchgeführt (Bannwarth, 1991). Dazu wurden 3'-Amino-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **9**

und *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-6-aminocaprinsäure **11** in DMF gelöst und Diisopropylethylamin (DIPEA) und TSTU zugegeben. Dreissigminütiges Rühren bei RT ergab 3'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-oxohexyl}}amino}thymidin **12** in 37%iger Ausbeute. Auch mit einer zweistufigen Reaktionsführung konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden.

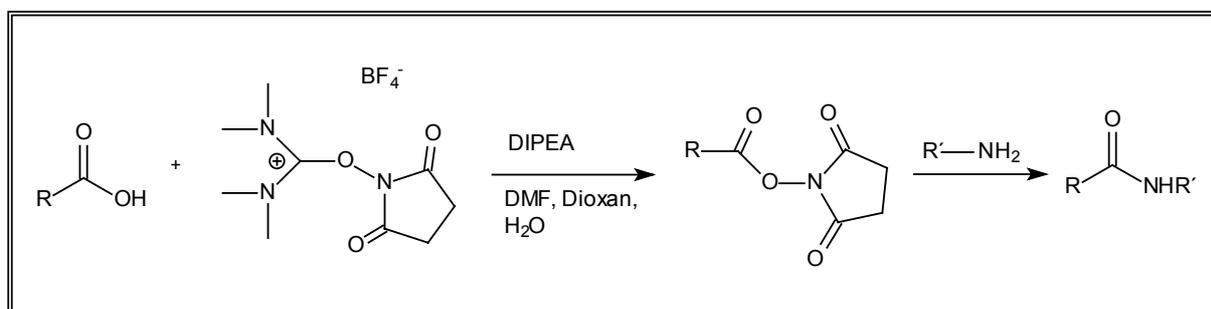


Abb. 18: TSTU-Aktivierung einer Carboxylfunktion nach Bannwarth (1991)

3'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-oxohexyl}}amino}thymidin **12** sollte nun an seiner 3'-Amidfunktion beschwefelt werden.

Thiocarbonylverbindungen, insbesondere Thiocarbonsäureamide, finden als Pharmaka, Pflanzenschutzmittel, Vulkanisationsbeschleuniger, Korrosionsinhibitoren und Schmieröle technische Verwendung. Zur Darstellung von Thioamiden sind in der Literatur genügend Beispiele enthalten (Walter, 1966; Hurd, 1961). Eine der ersten und häufig angewandten Methoden zur Darstellung von Thioamiden ist die direkte Schwefelung von Carboxamiden mit Phosphorpentasulfid. Aufgrund der sehr drastischen Reaktionsbedingungen und der Unspezifität bei Anwesenheit verschiedener Schutzgruppen ist diese Methode für die Nucleosidchemie ungeeignet (Cava, 1985). Die Addition nukleophiler Verbindungen an Isothiocyanate, beispielsweise die Umsetzung von Isothiocyanaten mit Grignard-Verbindungen, führt ebenfalls zur Bildung von Thioamiden (Walter, 1984). Bei der Sulphydrolyse von Iminoestern entstehen sowohl Thiocarbonsäureester als auch Thiocarbonsäureamide (Jones, 1984). Die Umsetzung von Arylketonen mit Schwefel und primären oder sekundären Aminen in der Kindler-Reaktion führt ebenfalls zur Bildung von Thioamiden (March, 1992). Dies sei nur ein kurzer Überblick über die zahlreichen Methoden zur Herstellung von Thioamiden, die sich allerdings meist nur auf bestimmte Substanzklassen beschränken.

Zur Darstellung von Thioamiden in der Nucleosidchemie gab es bis zu diesem Zeitpunkt keine Beschreibungen.

Eine universelle Methode zur Darstellung von Thiocarbonsäureamiden ist die Beschwefelung nach Lawesson. Das 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetan-2,4-disulfid - Lawessons-Reagenz (LR) **13** kann zur milden und selektiven Transformation von Amiden und Lactamen mit aromatischen, aliphatischen und ungesättigten Seitengruppen in ihre korrespondierenden Thio-Analoga eingesetzt werden. Die Spezifität des LR konnte anhand zahlreicher Substituenten gezeigt werden. Nitro-Substituenten wurden nicht angegriffen, eine Dealkylierung von Ethern sowie die Umwandlung primärer Amide in Nitrile wurde nicht beobachtet (Cava, 1985). Der vermutete Reaktionsmechanismus geht von zwei verschiedenen möglichen reaktiven Übergangszuständen A und B des LR aus (Abb. 19). Zum einen wurde ein pentakoordiniertes Phosphorintermediat analog der Wittig-Reaktion postuliert, in dem die Mercapto-Funktion an die Carbonylgruppe addiert wird.

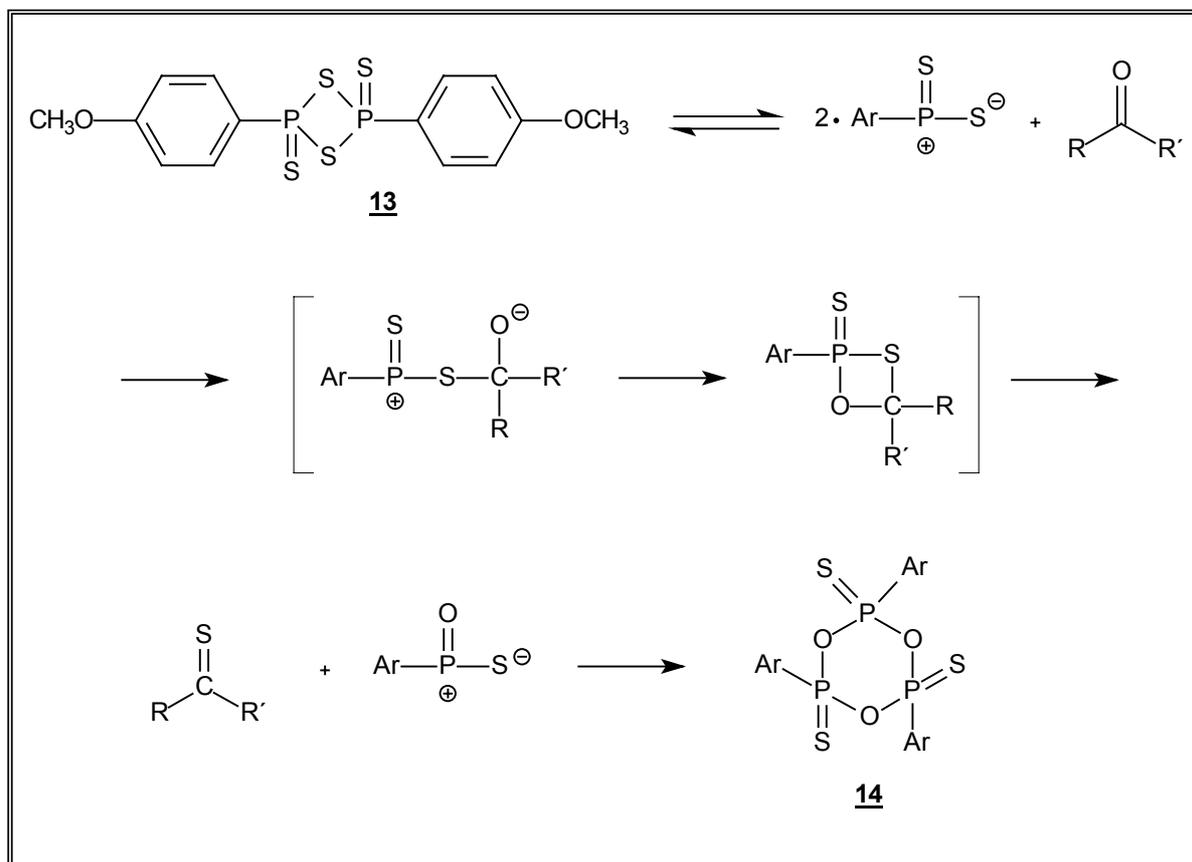


Abb. 19: Vermuteter Reaktionsmechanismus der Beschwefelung von Carbonylverbindungen mit Lawessons-Reagenz; Ar = Methoxyphenyl

Für diese Spezies spricht unter anderem die Tatsache, dass eine P-SH-Funktion zur erfolgreichen Beschwefelung von Carboxamiden nicht zwingend notwendig ist. Ausserdem konnte aus Produktmischungen verschiedener Beschwefelungsreaktionen mittels LR das Trimer **14** als weisses Pulver isoliert werden, das aus dem cyclischen Übergangszustand entsteht. Thioamide können auch mittels Thiophosphortrichlorid oder *N,N,N',N'*-Tetramethyldiamidothiophosphorylchlorid aus Amidien hergestellt werden.

Als Alternative dazu wird die Möglichkeit eines Angriffs des Carbonyl-Sauerstoffatoms auf den Phosphor betrachtet. In dem Fall wäre ein äusserst reaktives Dithiophosphylylid die eigentliche Beschwefelungsspezies. In ^{31}P -NMR-Studien konnte eine solche dipolare Verbindung in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Deswegen wurde ein Mechanismus, der beide reaktive Spezies impliziert, postuliert.

Die Reaktivität des LR ist stark substituentenabhängig. Während einfache, alkylsubstituierte Amide bereits nach wenigen Minuten bei Raumtemperatur beschwefelt sind, erfordert die Beschwefelung von Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungssystemen, wie z. B. Arylresten, mehrere Stunden und eine erhöhte Reaktionstemperatur von 60 °C (Yde, 1984). Den stärksten Einfluss auf Kinetik und Thermodynamik der Beschwefelungsreaktion haben Substituenten auf der dem Stickstoff abgewandten Carbonylseite. Je grösser ein solcher Substituent, um so grösser wird die Reaktionsdauer. Diese Tatsache kann zur selektiven Beschwefelung einzelner Carbonylfunktionen genutzt werden. So zeigte Wörner, dass die exocyclischen Carbonylgruppen von Nucleobasen erst bei längeren Reaktionszeiten und erhöhter Temperatur beschwefelt werden. Er setzte 2',3',5'-Tri-*O*-benzoyl-*N*²-benzoylguanosin sowie das analoge Inosin-Derivat mittels LR durch sechsständiges Refluxieren in Pyridin in die entsprechenden Mercaptoverbindungen um (Wörner, 1997). Die beschwefelten Spezies konnten dabei mit 86 % beziehungsweise 90 % Ausbeute isoliert werden.

Die Beschwefelung einer 3'-Thioamidfunktion sollte aufgrund der oben beschriebenen Substituenteneffekte leichter und bei geringerer Reaktionstemperatur gelingen. Wojczewski zeigte in parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, dass die 3'-Carbonylfunktion des 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-*N*-(isobutyrylamido)-3'-desoxythymidins selektiv mittels LR beschwefelt wird. Er setzte das Nucleosid in absolutem THF bei RT mit Lawesson's Reagenz um und erhielt das gewünschte Thioamid in 22 % Ausbeute. Zugunsten der Selektivität verzichtete er auf eine Temperaturerhöhung und akzeptierte die niedrige Ausbeute (Wojczewski, 2000).

Bei der Beschwefelung von 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'--{6-[[9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-oxohexyl}amino}thymidin **12** im Rahmen der vorgelegten Arbeit bestand neben der Selektivität (Abb. 20) auch das Problem, dass der Substituent auf der Carbonylseite wesentlich anspruchsvoller als die von Wojczewski eingesetzte Isobutyryl-Einheit war.

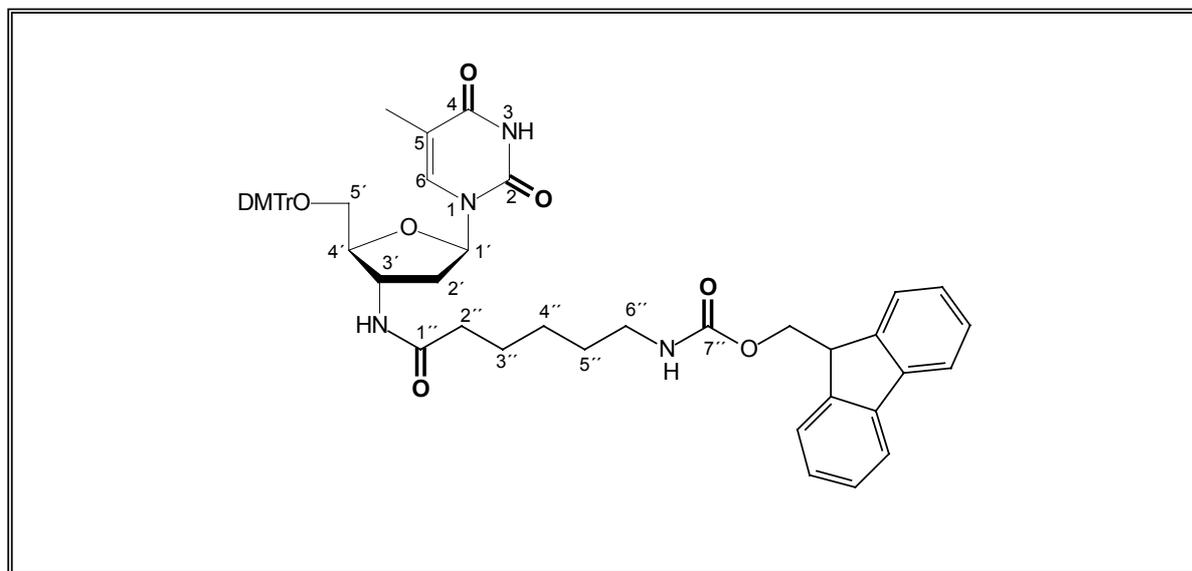


Abb. 20: Mögliche Positionen an 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'--{6-[[9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}-1-oxohexyl}amino}thymidin **12** für eine Beschwefelung mit Lawesson's Reagenz (fett gedruckt)

Die Umsetzung von **12** mit Lawesson's Reagenz in absolutem THF bei RT führte nicht allein zum gewünschten Produkt; sondern zu einem Gemisch aus **12** und der entsprechenden detritylierten Verbindung in einer Ausbeute von ca. 20 %. Trotz strikter wasserfreier Bedingungen bei der Reaktion konnte die Detritylierung von **12** nicht verhindert werden. Der Grund für die Detritylierung liegt in der Bildung entsprechender Phosphorsäuren während der Reaktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund dessen Überlegungen angestellt, diese entstehenden Phosphorsäuren während der Reaktion zu neutralisieren. In Frage kamen zu diesem Zweck organische Basen, die selbst keine beschwefelbare Carbonylfunktionen enthalten. Am geeignetsten erschien die Verwendung von Pyridin. Die Verwendung von absolutem Pyridin als alleinigem Lösungsmittel führte zu keiner Umsetzung. Das Edukt wurde vollständig reisoliert. Im Folgenden wurden Lösungsmittelmischungen aus abs. Pyridin und abs. THF getestet. Mischungen mit sehr geringem Pyridingehalt führten in geringer Umsetzung zum gewünschten Produkt. Erst die Erhöhung der verwendeten Äquivalente an Lawesson's Reagenz steigerte die Ausbeute an beschwefeltem Produkt. Schliesslich konnte

mit der Zugabe einer geringen, definierten Menge an Pyridin und der vierfachen Menge an Lawesson's Reagenz ein optimales Ergebnis erzielt werden. 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-oxohexyl}}amino}-thymidin **12** wurde in abs. THF gelöst und ein Äquivalent abs. Pyridin zugegeben. Unter Schutzgas wurden 4 Äquivalente Lawesson's Reagenz zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 Stunden bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Reaktion mittels gesättigter NaHCO₃-Lösung gequenchet und die wässrige Phase mehrfach mit Methylenchlorid extrahiert. Nach präparativer dünnschichtchromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-thiohexyl}}amino}-thymidin **15** mit 50 % Ausbeute isoliert werden. 20 % des Edukts wurden reisoliert. Diese Reaktionsführung erzielte trotz des anspruchsvolleren Substituenten eine Ausbeutesteigerung von 28 % im Vergleich zur Beschwefelung nach Wojczewski (Abb. 21). Eine Steigerung der Reaktionsdauer führte zu keiner weiteren Ausbeutesteigerung. Auf eine Steigerung der Reaktionstemperatur wurde zugunsten der Selektivität verzichtet.

Im Anschluss an die Beschwefelung wurde die 5'-DMTr-Schutzgruppe entfernt, um später an dieser Position das Triphosphat einführen zu können. Dazu wurde 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-thiohexyl}}-amino}-thymidin **15** in Methylenchlorid gelöst und mit 80 % aq. Essigsäure versetzt. Nach dreistündigem Rühren bei RT und anschliessender Aufreinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie konnte das Produkt 3'-Desoxy-3'-{{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-thiohexyl}}amino}-thymidin **16** in 74 %iger Ausbeute isoliert werden. Diese Verbindung war die Ausgangsverbindung zur Herstellung der 3'-Thioamidotriphosphate (Abschnitt 4).

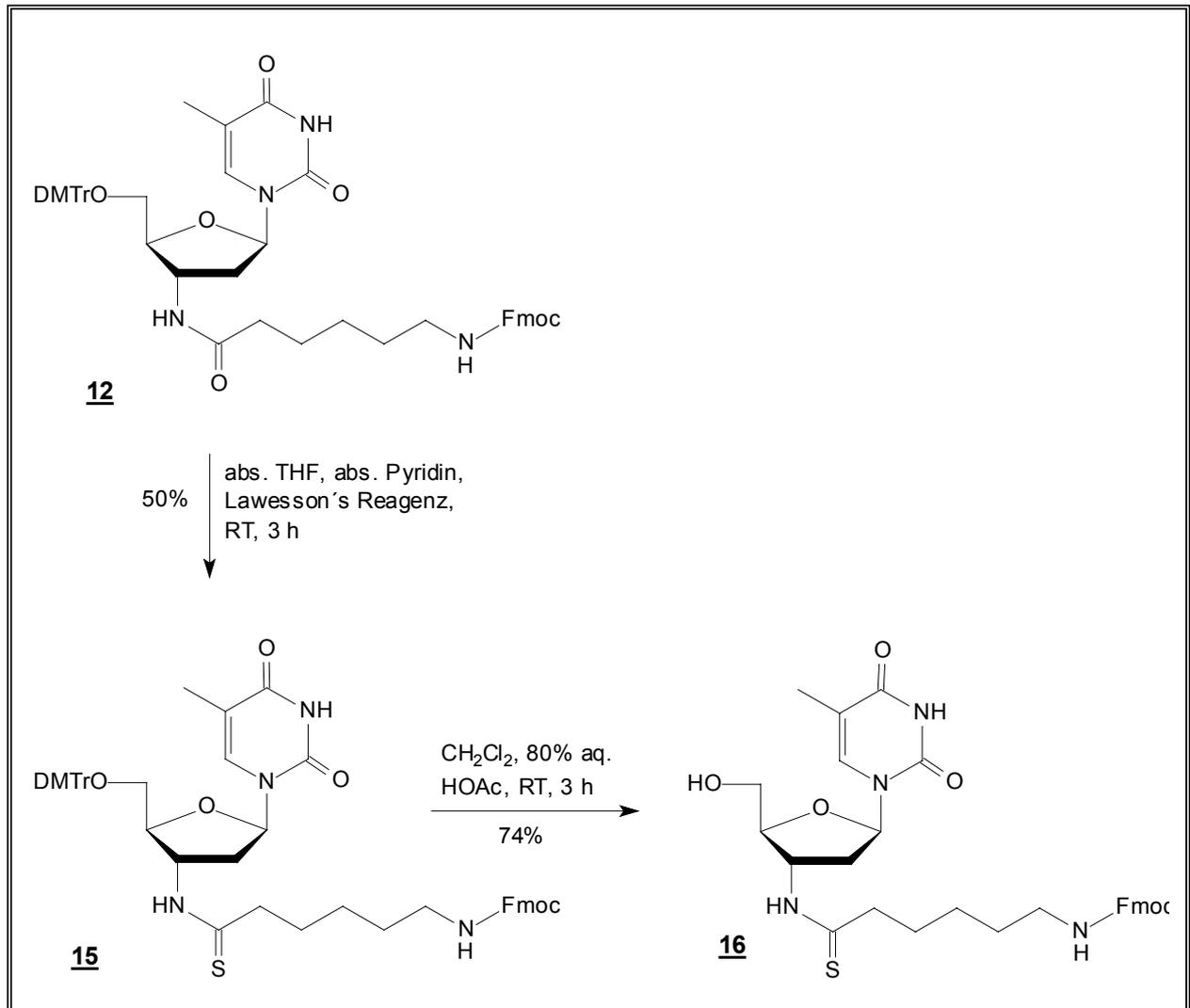


Abb. 21: Synthese von 3'-Desoxy-3'-{6-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-1-thioxohexyl}amino}-thymidin **16**

Der Nachweis der selektiven Beschwefelung der 3'-Amidfunktion gelang durch Massenspektrometrie sowie durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie. Zunächst konnte durch ESI-MS gezeigt werden, dass nur ein Sauerstoff einer Carbonylfunktion durch Schwefel ausgetauscht war. Die Masse des Produkts war um 16 höher als die des Edukts, was genau dem Austausch eines Sauerstoff-Atoms durch ein Schwefel-Atom entspricht.

Die ¹H-NMR-Spektren geben Aufschluss über die chemische Verschiebung der Protonen in Nachbarschaft der Carbonylfunktion vor und nach der Beschwefelung (Abb. 22-24). Es kommt zu einer Verschiebung des H-3' (4,6 => 4,9 ppm) und zu einer Verschiebung des H-2'' in direkter Nachbarschaft zur Carbonylfunktion (2,2 => 2,4 ppm). In den ¹³C-NMR-Spektren ist eine deutliche Verschiebung der 3'-Carbonylfunktion nach der Beschwefelung zu erkennen (173 => 206 ppm). Die chemische Verschiebung der beiden Carbonylkohlen-

stoffatome der Base bleibt annähernd gleich (C-2: 150,7 \Rightarrow 150,7 ppm; C-4: 163,8 \Rightarrow 164,2 ppm), ebenso wie auch die des Carbonylkohlenstoffs der Fmoc-Schutzgruppe (156,5 \Rightarrow 156,4 ppm (Abb. 25-27).

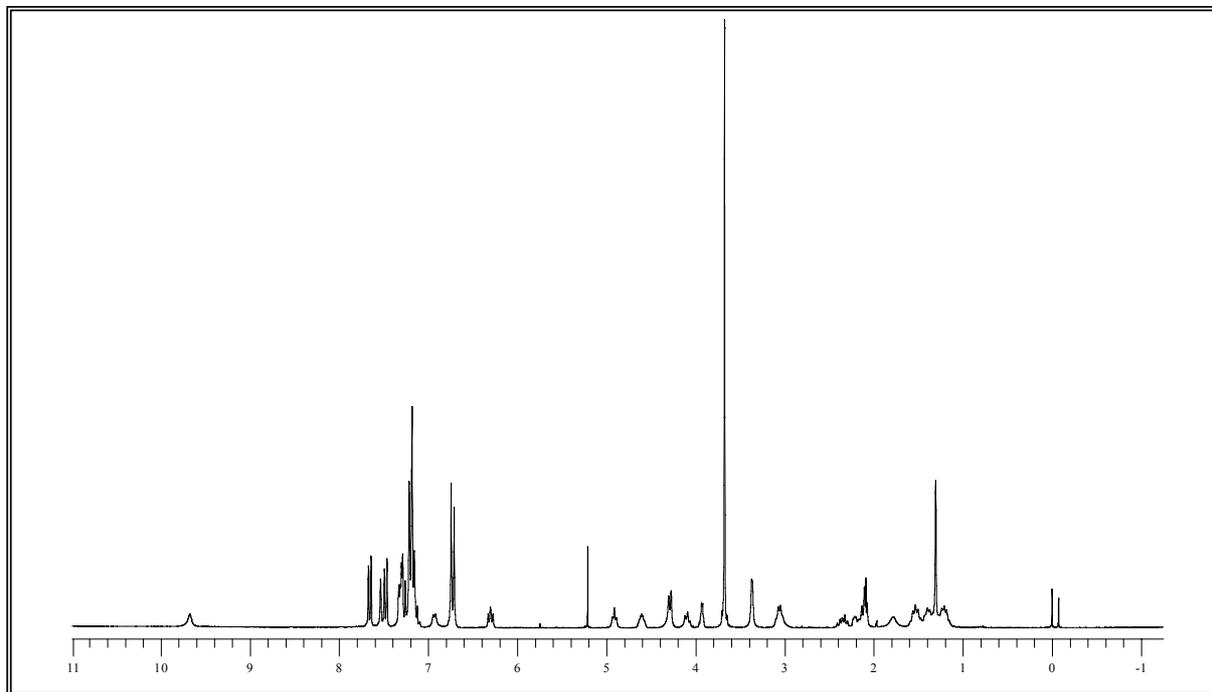


Abb. 22: $^1\text{H-NMR}$ von an 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'--{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-carbonyl]-amino}-1-oxohexyl}amino}thymidin **12**; H-3' bei 4,6 ppm und H-2'' bei 2,2 ppm

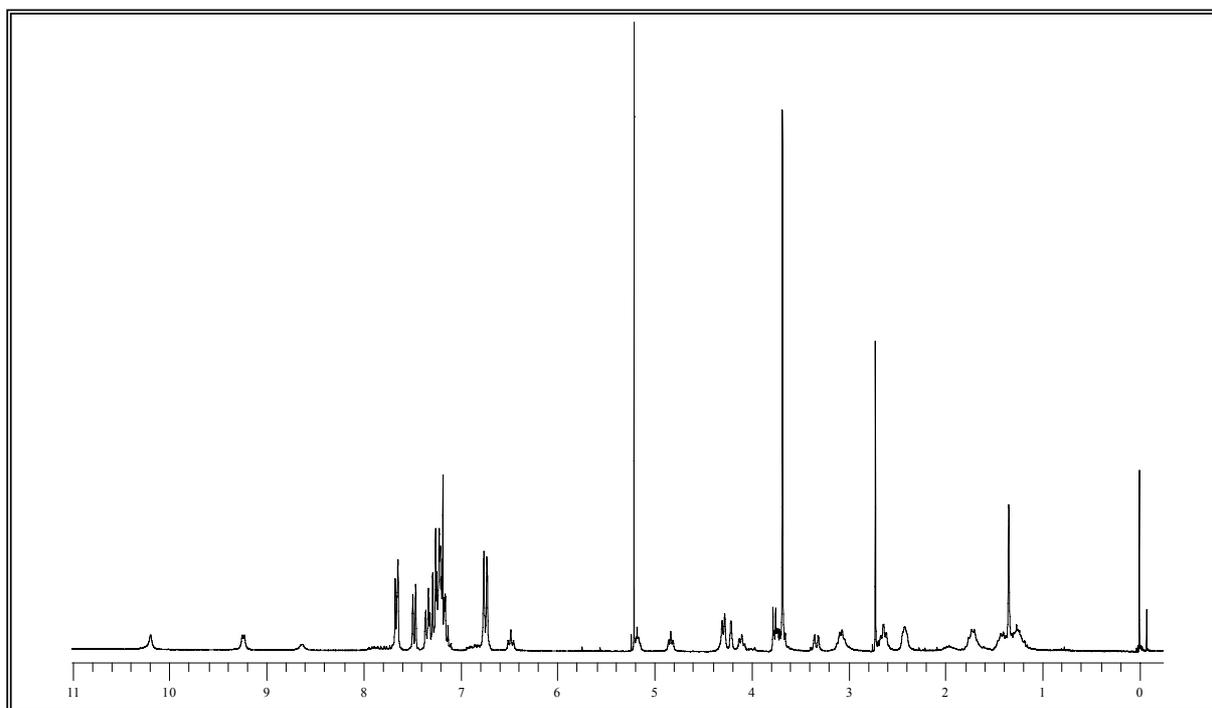


Abb. 23: $^1\text{H-NMR}$ von 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'--{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thiohexyl}-amino}thymidin **15**; H-3' bei 4,85 ppm und H-2'' bei 2,4 ppm

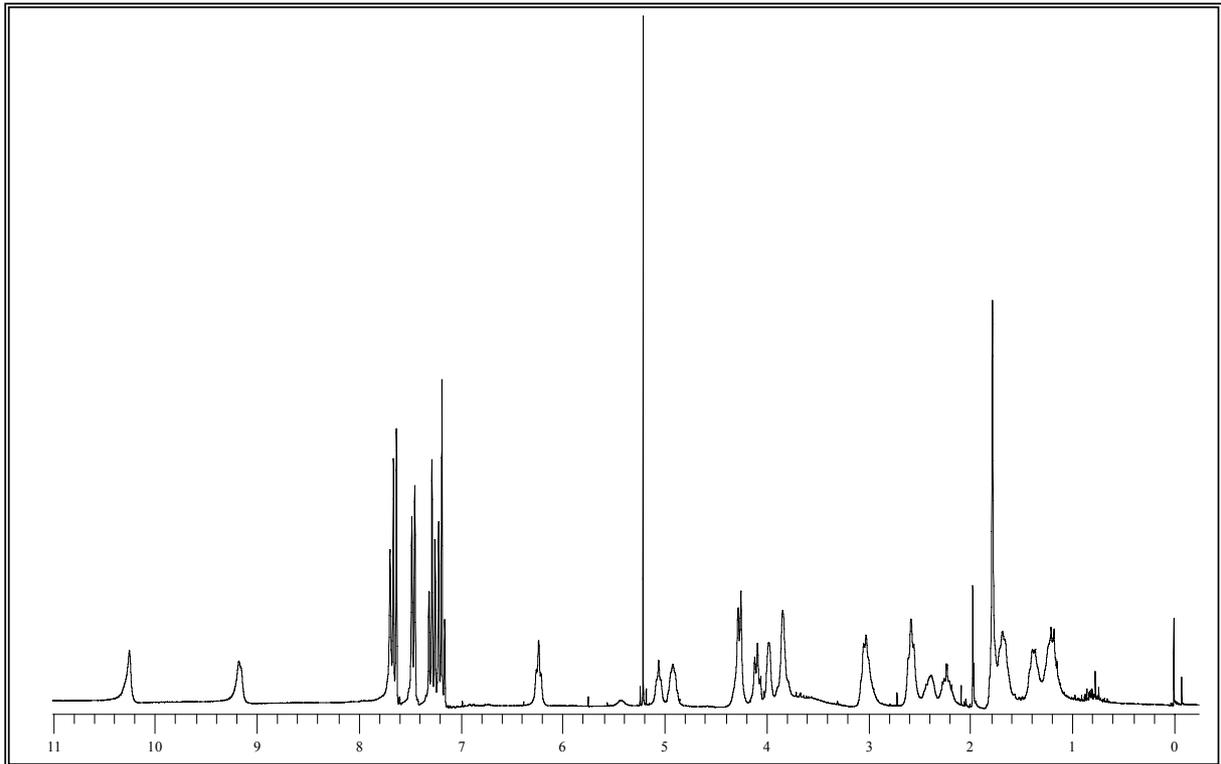


Abb. 24: ^1H -NMR von 3'-Desoxy-3'-{6-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thiohexyl}-amino}-thymidin **16**; H-3' bei 4,96 ppm und H-2'' bei 2,4 ppm

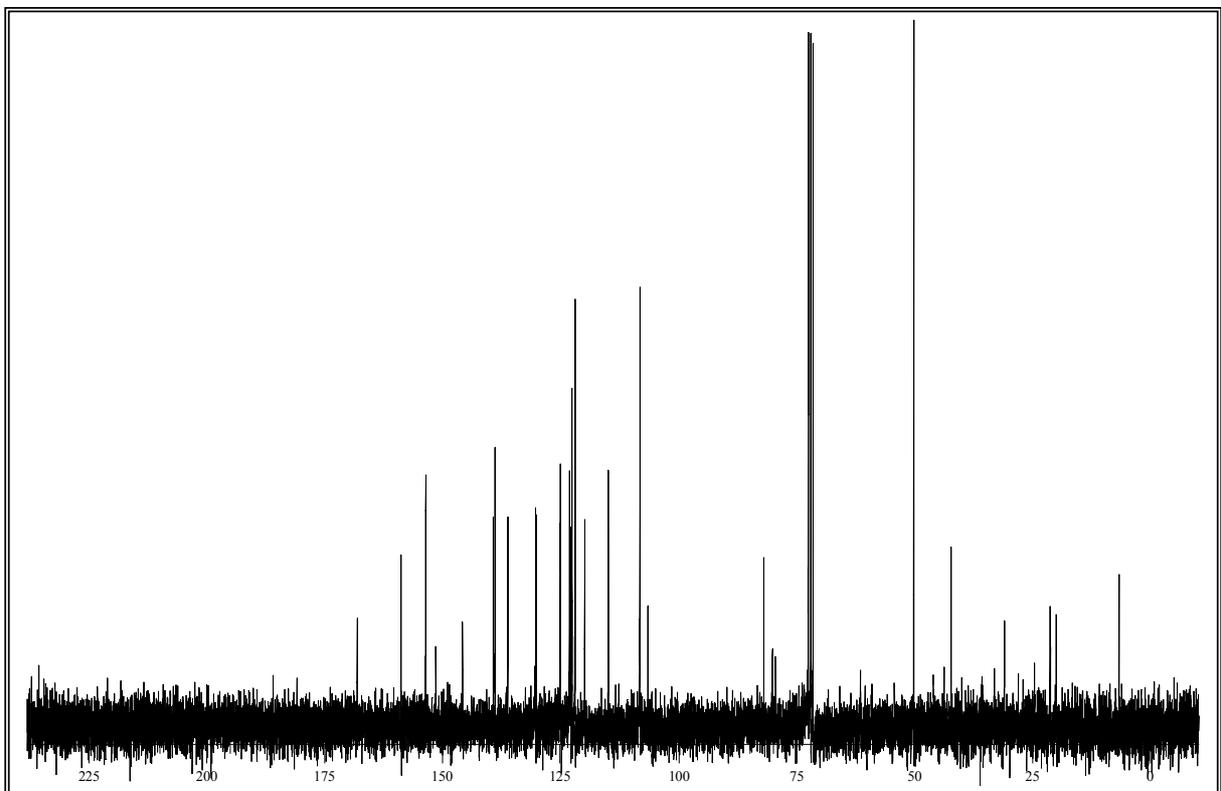


Abb. 25: ^{13}C -NMR von 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{6-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-oxohexyl}amino}-thymidin **12**; C-2 bei 150,7 ppm; C-4 bei 163,8 ppm; C-7'' bei 156,5 ppm
3'-N-CO bei 173,0 ppm

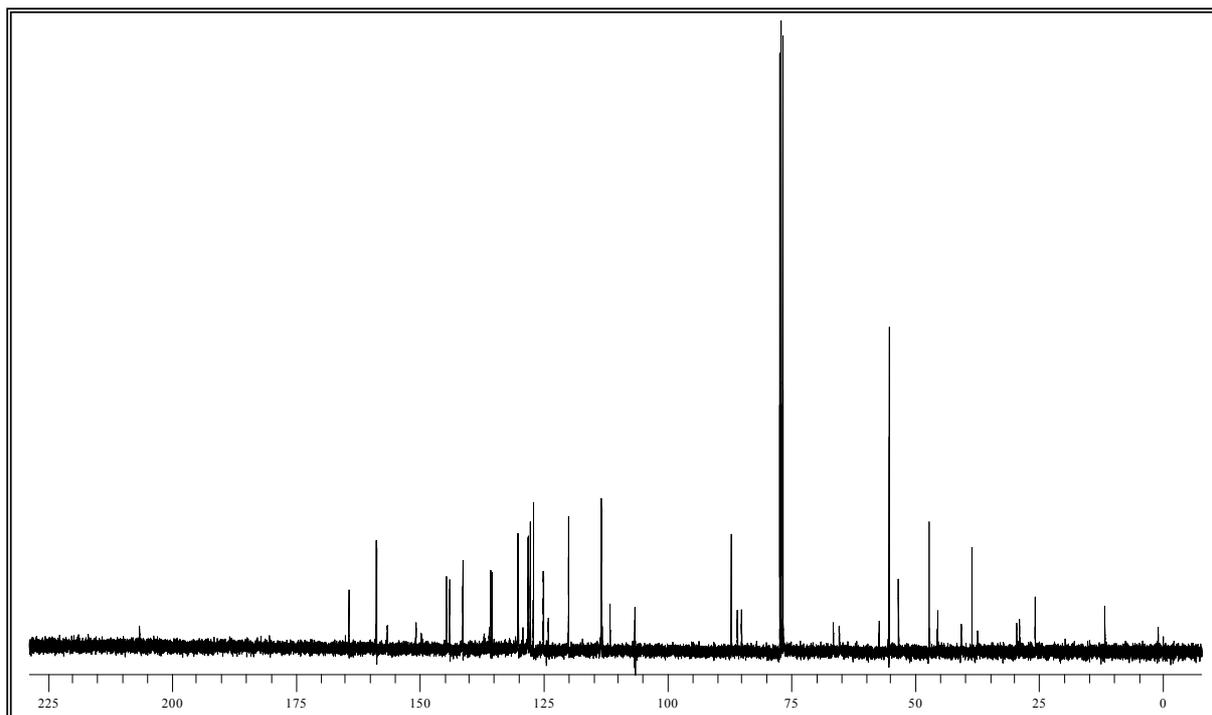


Abb. 26: ¹³C-NMR von 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{6-[[[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino]-1-thioxohexyl]-amino}thymidin **15**; C-2 bei 150,7 ppm; C-4 bei 164,2 ppm; C-7'' bei 156,4 ppm; 3'-N-CS bei 206,4 ppm

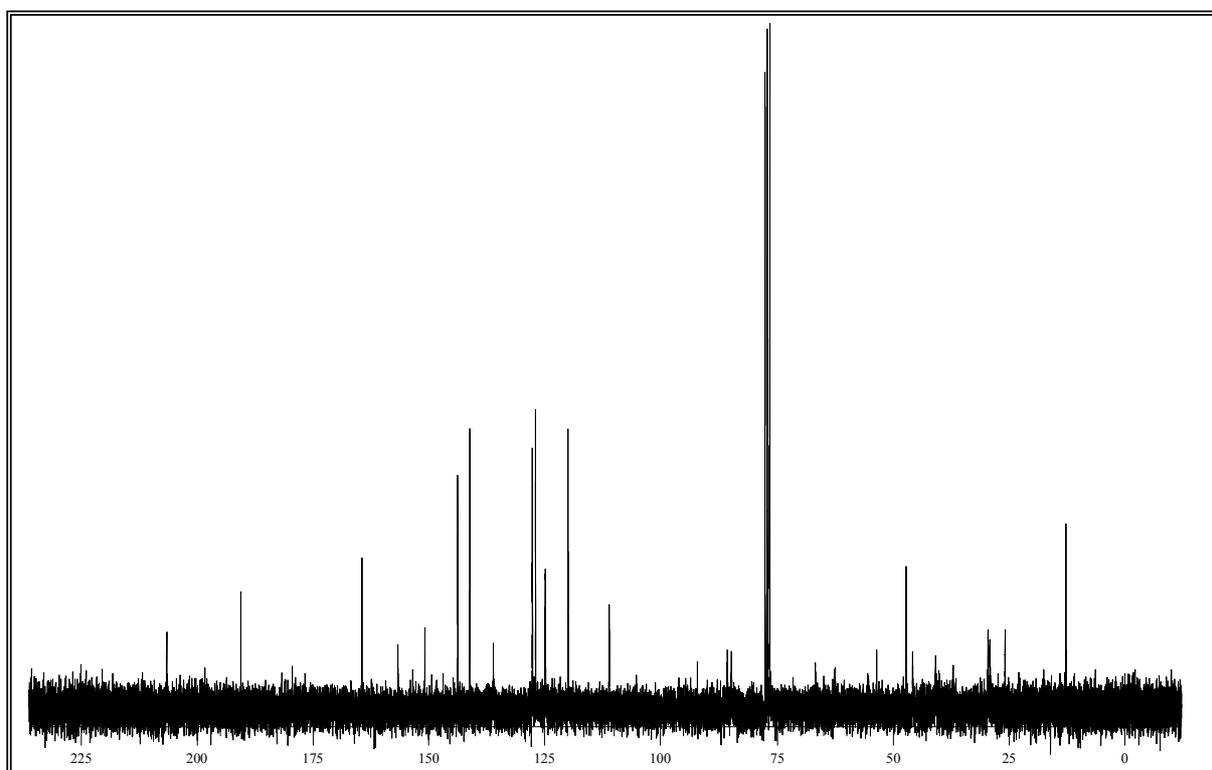


Abb. 27: ¹³C-NMR von 3'-Desoxy-3'-{6-[[[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino]-1-thioxohexyl]-amino}-thymidin **16**; C-2 bei 150,7 ppm; C-4 bei 164,2 ppm; C-7'' bei 156,4 ppm; 3'-N-CS bei 206,0 ppm

3.2 Synthese von 2',3'-Didesoxyguanosin mit *N*²-Basenmodifikation

3.2.1 Ausarbeitung einer geeigneten Synthesestrategie

Die im Rahmen des BMBF-Projekts hergestellten 3'-modifizierten Nucleosid-5'-triphosphate (3'-Alkyl-, 3'-Thioharnstoff- und 3'-Thioethermodifikationen) zeigten bei entsprechenden Sequenzierests der Firma Boehringer Mannheim keine Substratazeptanz durch die eingesetzten Polymerasen. Aus diesem Grund wurde alternativ eine zweite Strategie der Farbstoffmarkierung von Terminatoren verfolgt. Durch Arbeiten von Klingel (Boehringer Mannheim) konnte gezeigt werden, dass entsprechende an ihren exozyklischen Aminofunktionen modifizierte Nucleotide als Substrate von einigen DNA-Polymerasen akzeptiert wurden. Neben der Modifikation von 2',3'-Didesoxycytidin (Stolze, 1999) und 2',3'-Didesoxyadenosin (Schoetzau, 2000) bestand auch die Notwendigkeit der entsprechenden Modifikation des 2',3'-Didesoxyguanosins. Mittels eines Alkyl-Linkers sollte ein Fluoreszenzfarbstoff an der exozyklischen Aminofunktion eingeführt werden.

Zur Einführung eines entsprechenden Alkyl-Linkers an der *N*²-Position des 2',3'-Didesoxyguanosins wurden vorerst verschiedene Überlegungen angestellt.

Zum einen bestand die Möglichkeit, ein 2-Fluoroguanosin herzustellen und anschliessend den Linker an der fluorierten Position einzuführen. Eine entsprechende Synthese für 2',3'-Didesoxyguanosin war bis dahin nicht bekannt, und die Synthese eines 2-Fluoro-2'-desoxyguanosins war in der Literatur mit nur 22 % Ausbeute beschrieben (Seela, 1994). Aus diesem Grund wurde eine alternative Strategie zur Synthese eines *N*²-modifizierten Nucleosids ins Auge gefasst. Aufgrund der erfolgreich optimierten Beschwefelung des 3'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-oxohexyl}amino}-thymidin **12** bestand eine gute Aussicht darauf, eine entsprechende Gruppierung an der *N*²-Position des 2',3'-Didesoxyguanosins zunächst zu beschwefeln und anschliessend durch Reduktion mittels Raney-Nickel in die gewünschte Alkylfunktion zu überführen (Abb. 28). Zur Überprüfung dieser Idee wurden zunächst Beschwefelungstests mit *N*²-Isobutyryl-3',5'-*O*-benzoyl-2'-desoxythymidin durchgeführt. Es wurden diverse Reaktionsbedingungen bis hin zu einer leichten Temperatursteigerung getestet. In keinem Fall kam es zu einer zufriedenstellenden Umsetzung des Edukts. Eine Beschwefelung der Carbonylfunktion war

nicht möglich. Parallel zu diesen Versuchen wurde die Reduktion mit Raney-Nickel an 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'--{6-[[9H-fluoren-9-ylmethoxy]carbonyl]-amino}-1-thioxohexyl} amino} thymidin **15**

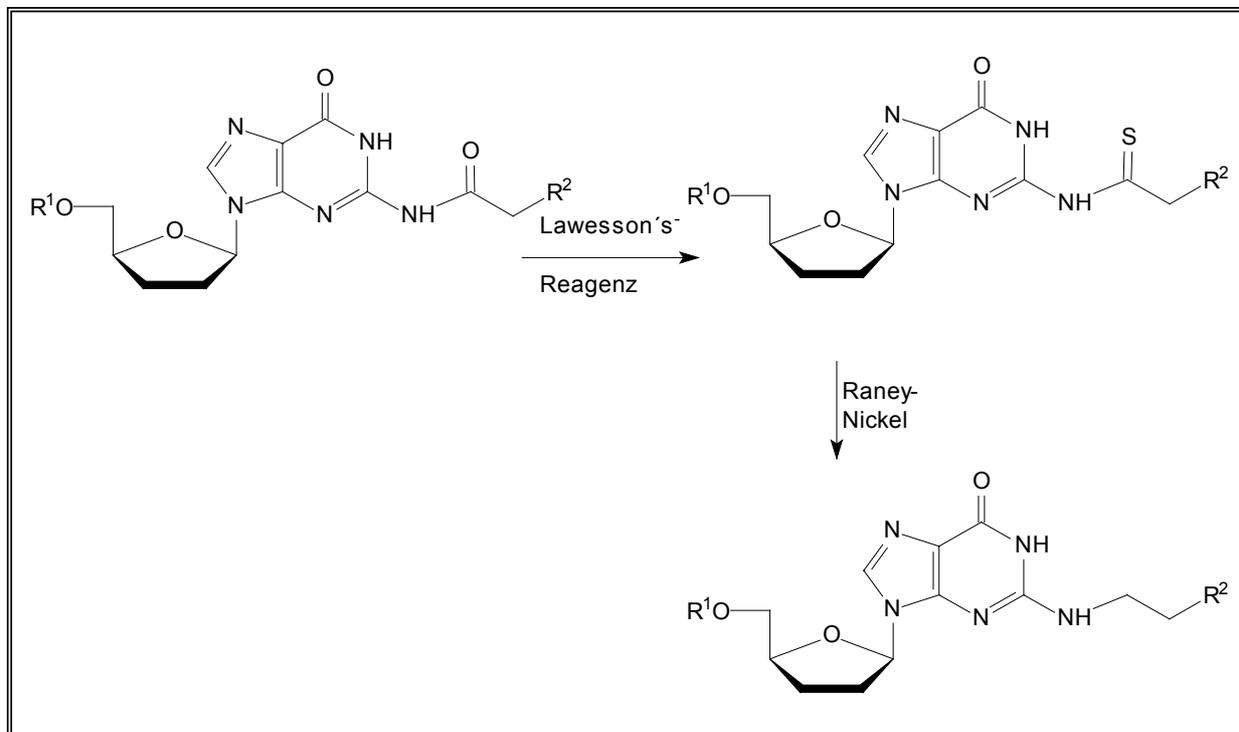


Abb. 28: Synthesestrategie zur Darstellung eines N²-alkylmodifizierten 2',3'-Dideoxyguanosins; R¹ = beliebige 5'-OH-Schutzgruppe; R² = geschützte Amidfunktion

getestet. Entsprechend reduziertes Produkt konnte nur in geringsten Mengen isoliert werden. Aus diesen Gründen wurde diese Synthesestrategie verworfen.

Eine weitere Möglichkeit zur Alkylmodifikation der N²-Position des 2'-Desoxyguanosins besteht in der Synthese eines analogen Wyosinderivats, der Ankupplung des Alkyl-Linkers an der N⁴-Position des Wyosins und der anschließenden Spaltung des Wyosins zurück zum Guanosin (Wang, 1993), (Abb. 29). Das Wyosin wird in diesem Fall als Schutzgruppe verwendet.

Auch die Schlüsselschritte dieser Synthesestrategie wurden vorerst an 2'-Desoxyguanosin überprüft. Als Edukt für die Wyosinsynthese wird Bromaceton **17** benötigt. Aufgrund seiner Eigenschaften als Tränengas ist Bromaceton nicht mehr käuflich zu erwerben und musste im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt werden. Dazu wurde eine Lösung aus Wasser, Aceton und Eisessig auf 65-70 °C erhitzt und langsam Brom zugetropft. Fand keine schnelle Entfärbung der Reaktionslösung mehr statt, war die Umsetzung abgeschlossen.

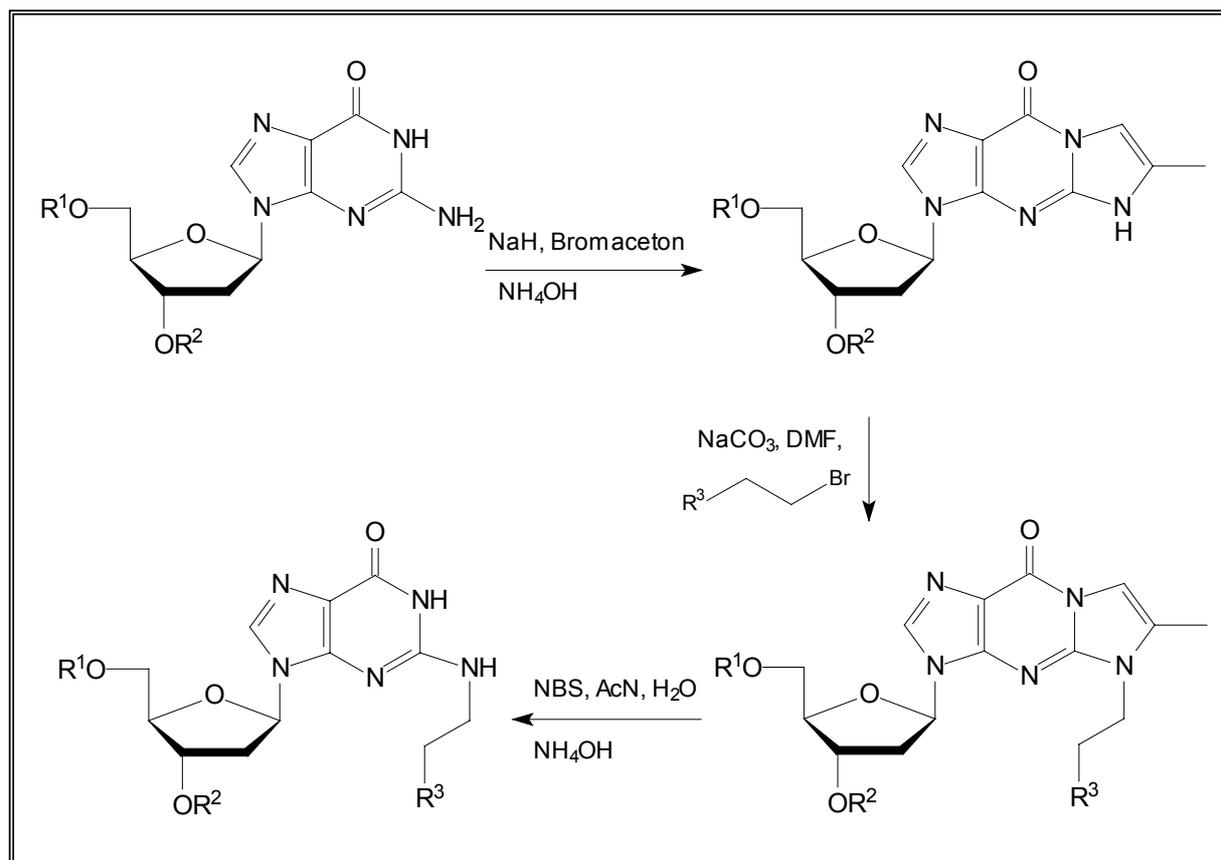


Abb. 29: Darstellung eines N²-alkylmodifizierten 2'-Dideoxyguanosins; R¹, R² = beliebige 5'-OH-Schutzgruppe; R³ = geschützte Amidfunktion

Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend in kaltes Wasser gegeben, auf 10 °C abgekühlt und der pH-Wert mittels Na₂CO₃ vorsichtig auf 5 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt, und durch fraktionierte Destillation im Wasserstrahlvakuum konnte das Produkt Bromaceton **17** in 28 %iger Ausbeute isoliert werden. Das Bromaceton **17** wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Synthese des 7-Desmethylwyosins (die Nummerierung der Nucleobase wurde im Vergleich zu Wang geringfügig modifiziert, siehe Abb. 30) nach Wang wurde 2'-Desoxyguanosin **18** unter Schutzgasbedingungen in absolutem DMSO gelöst und NaH in 60 %iger Suspension zugegeben. Nach einstündigem Rühren unter Feuchtigkeitsausschluss wurde Bromaceton zugegeben und erneut eine Stunde bei RT gerührt. Durch Zugabe von konz. Ammoniak und anschliessendes zweistündigem Rühren bei RT wurde die Reaktion abgeschlossen. Nach Absorption des Rohprodukts an Kieselgel und anschliessender säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt 2'-Desoxy-7-desmethylwyosin **19** in 82 %iger Ausbeute erhalten werden (Abb. 30).

Zur Knüpfung der Alkylbindung am N^7 -Atom des Desmethylwyosins wurde eine Valeriansäure-Einheit gewählt. Die C5-Einheit sollte die Funktion eines mittellangen Linkers erfüllen, um einen gewissen Abstand zwischen Nucleosid und Fluorophor zu schaffen.

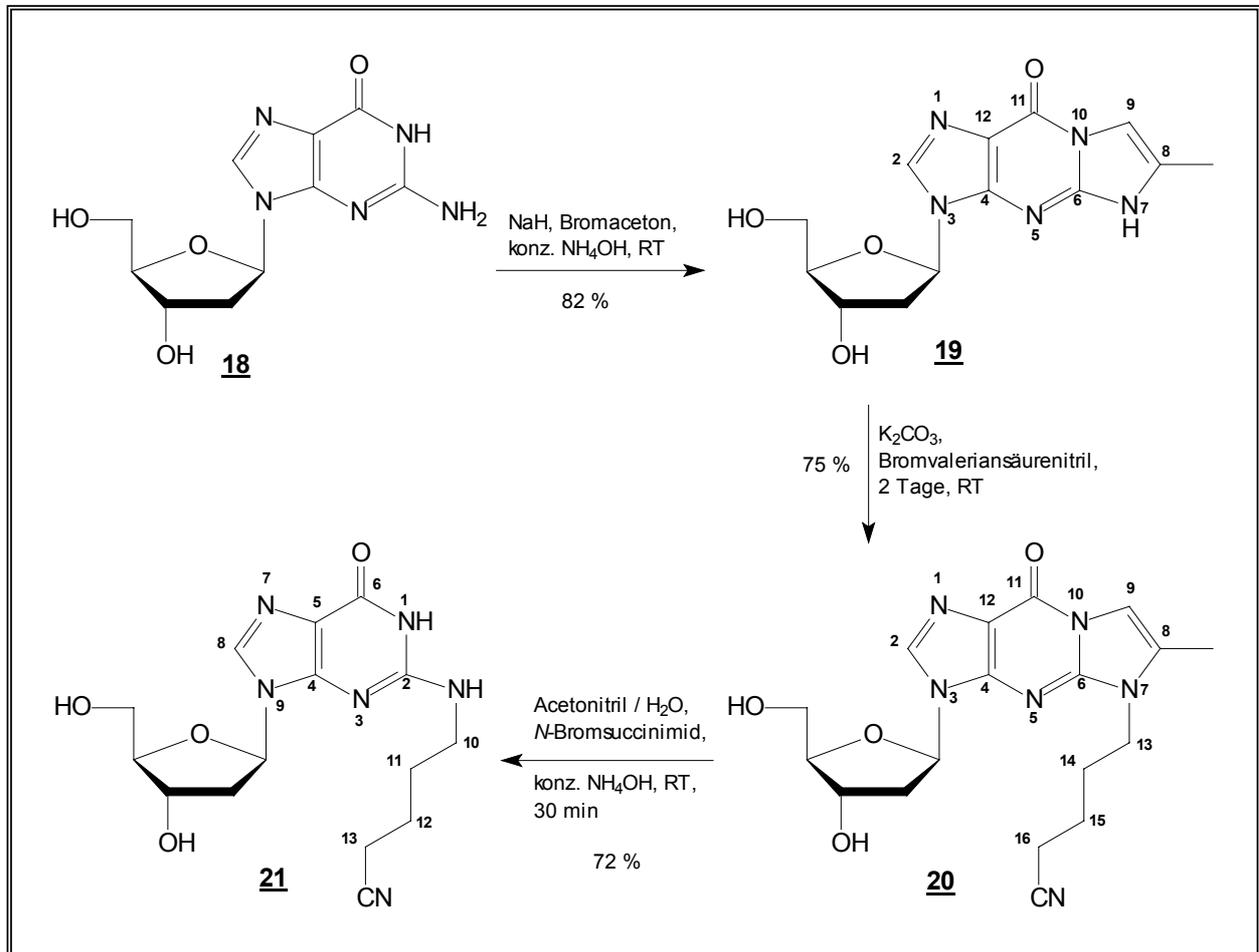


Abb. 30: Synthese des 2-Valeronitril-2'-desoxyguanosins

Zur Ankopplung des Linkers wurde zu einer Lösung aus 2'-Desoxy-7-desmethylwyosin **19** und K_2CO_3 in abs. DMF Bromvaleriansäurenitril gegeben und das Reaktionsgemisch 2 Tage bei RT gerührt. Anschliessend wurde der Ansatz über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel mittels des Stickstoffrotationsverdampfers abgezogen und das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert. Das gewünschte Produkt 7-Valeronitril-2'-desoxywyosin **20** konnte in 75 % Ausbeute isoliert werden. Zur Entschützung der exozyklischen Aminofunktion wurde **20** in einem Acetonitril / Wasser-Gemisch gelöst und *N*-Bromsuccinimid zugegeben. Nach 30-minütigem Rühren bei RT wurde dem Reaktionsansatz konz. Ammoniak zugegeben und weitere 30 Minuten bei RT gerührt. Absorption des Rohprodukts an Kieselgel und

anschliessende säulenchromatographische Aufreinigung ergab das N^2 -alkylierte Produkt 2-Valeronitril-2'-desoxyguanosin **21** in 72 %iger Ausbeute.

Nachdem die Testsynthese mit 2'-Desoxyguanosin in guten Ausbeuten durchgeführt werden konnte, sollte die Umsetzung zum entsprechenden Desmethylwyosin an 2',3'-Dideoxyguanosin überprüft werden. Zu diesem Zweck stellte die Firma Boehringer Mannheim N^2 -Isobutyryl-5'-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyguanosin **22** in geringen Mengen zur Verfügung. Zuerst musste die N^2 -Position entschützt werden. Dazu wurde N^2 -Isobutyryl-5'-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyguanosin **22** in Aceton gelöst und konz. Ammoniak zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 Stunden auf 65 °C erhitzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte 5'-Dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyguanosin **23** mit 88 % Ausbeute isoliert werden.

Die Umsetzung zum 5'-Dimethoxytrityl-2',3'-dideoxy-7-desmethylwyosin **24** erfolgte analog zur Darstellung des 7-Valeronitril-2'-desoxywyosins **20**. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte ohne vorherige Absorption des Rohprodukts an Kieselgel. 5'-Dimethoxytrityl-2',3'-dideoxy-7-desmethylwyosin **24** wurde in 44%iger Ausbeute erhalten (Abb. 31).

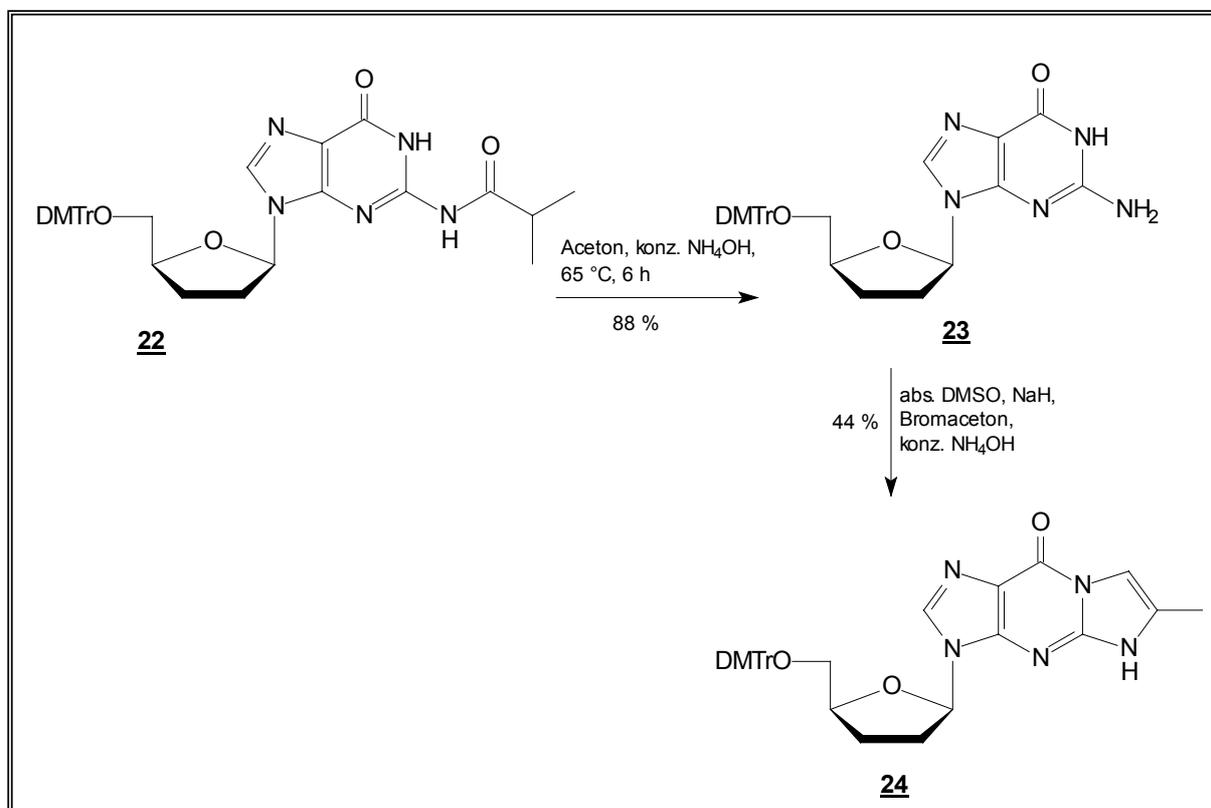


Abb. 31: Synthese von 5'-Dimethoxytrityl-2',3'-dideoxy-7-desmethylwyosin **24**

3.2.2 Synthese von 2-Pentylazid-2',3'-didesoxyguanosin

Da es auf diese Weise gelungen war, erstmals das Desmethylwyosin aus 2',3'-Didesoxyguanosin herzustellen, wurde in der Folge die Synthese der eigentlichen Zielverbindung begonnen. Dazu musste zuerst ein an der 5'-Position entsprechend geschütztes 2',3'-Didesoxyguanosin hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde eine literaturbekannte Synthese modifiziert und verbessert (Zeidler, 1996).

Als 5'-Schutzgruppe wurde *tert*-Butyldimethylsilyl gewählt, da die Entschützung mittels TBAF genügend mild für das desoxygenierte Nucleosid ist. Die saure Entschützung einer Dimethoxytritylschutzgruppe birgt das Risiko der Depurinierung. Zur Einführung der 5'-Schutzgruppe wurden 2'-Desoxyguanosin **18** und Imidazol unter strengen wasserfreien Bedingungen in abs. DMF suspendiert und unter Schutzgas *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 15 min bei 5 °C. Durch Zugabe von Methanol wurde die Reaktion anschliessend gequenchet, das Lösungsmittel am Stickstoffrotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in Eiswasser aufgenommen. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet. Das weisse Pulver wurde danach in Methylenechlorid suspendiert, um 5',3'-silyliertes 2'-Desoxyguanosin zu entfernen. Der verbliebene weisse Feststoff wurde abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **25** konnte in 81 %iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 32).

Um zur Synthese eines 2',3'-Didesoxyguanosins eine Barton-Desoxygenierung durchführen zu können, wurde an der 3'-Position im nächsten Reaktionsschritt ein Thiophil eingeführt. Zu diesem Zweck wurde 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **25** unter Schutzgasbedingungen in abs. DMF gelöst und 1,1'-Thiocarbonyldimidazol zugegeben. Statt Rühren bei RT wurde der Ansatz 3 Stunden auf 40 °C erhitzt und anschliessend noch 12 Stunden bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit Essigsäureethylester versetzt. Das entstandene weisse Pulver wurde abgesaugt und das gewünschte Produkt 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-*O*-(imidazol-1-yl)thiocarbonyl-2'-desoxyguanosin **26** in 80 %iger Ausbeute isoliert.

Zur Durchführung der Barton-Desoxygenierung wurde zu einer refluxierenden Suspension aus 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-*O*-(imidazol-1-yl)thiocarbonyl-2'-desoxyguanosin **26** und abs. Dioxan eine Lösung aus Tributylzinnhydrid und AIBN in abs. Dioxan getropft und anschliessend noch zwei Stunden refluxiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf 10 °C

abgekühlt und über Nacht stehen gelassen. Anschliessend wurde der entstandene weisse Niederschlag abgesaugt und mittels 2-Butanol / Methanol (95 : 5) umkristallisiert. Das Produkt 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27** wurde in 73 % Ausbeute erhalten.

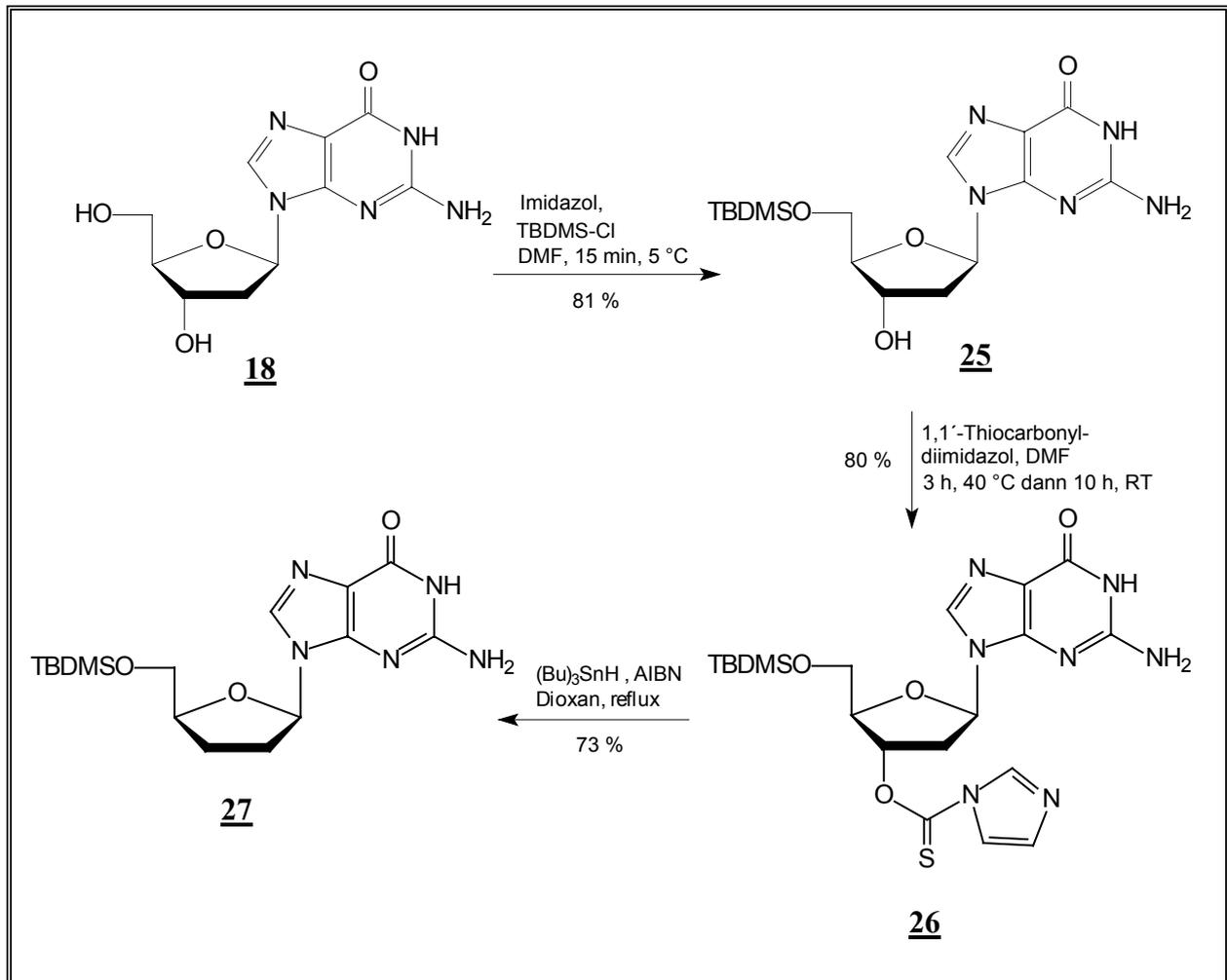


Abb. 32: Synthese von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27**

Der Nachweis der desoxygenierten Verbindung gelang durch Massenspektrometrie und durch ^1H - sowie ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Die Masse der desoxygenierten Verbindung nahm im Vergleich zu 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **25** genau um 16 ab (Abb. 33 und 34). Die ^1H -NMR-Spektroskopie zeigte einen deutlichen Unterschied in der chemischen Verschiebung der H-3'-Protonen vor und nach der Desoxygenierung (5,9 ppm \Rightarrow 2,0 ppm), (Abb. 35 und 36). Aufgrund der fehlenden Hydroxylfunktion der desoxygenierten Verbindung verschoben sich die 3'-Protonen beträchtlich zu höherem Feld. Der gleiche Effekt war bei der ^{13}C -NMR-Spektroskopie zu beobachten. Die chemische Verschiebung veränderte

sich von 84,3 ppm vor der Desoxygenierung auf 25,8 ppm nach der Reaktion (Abb. 37 und 38).

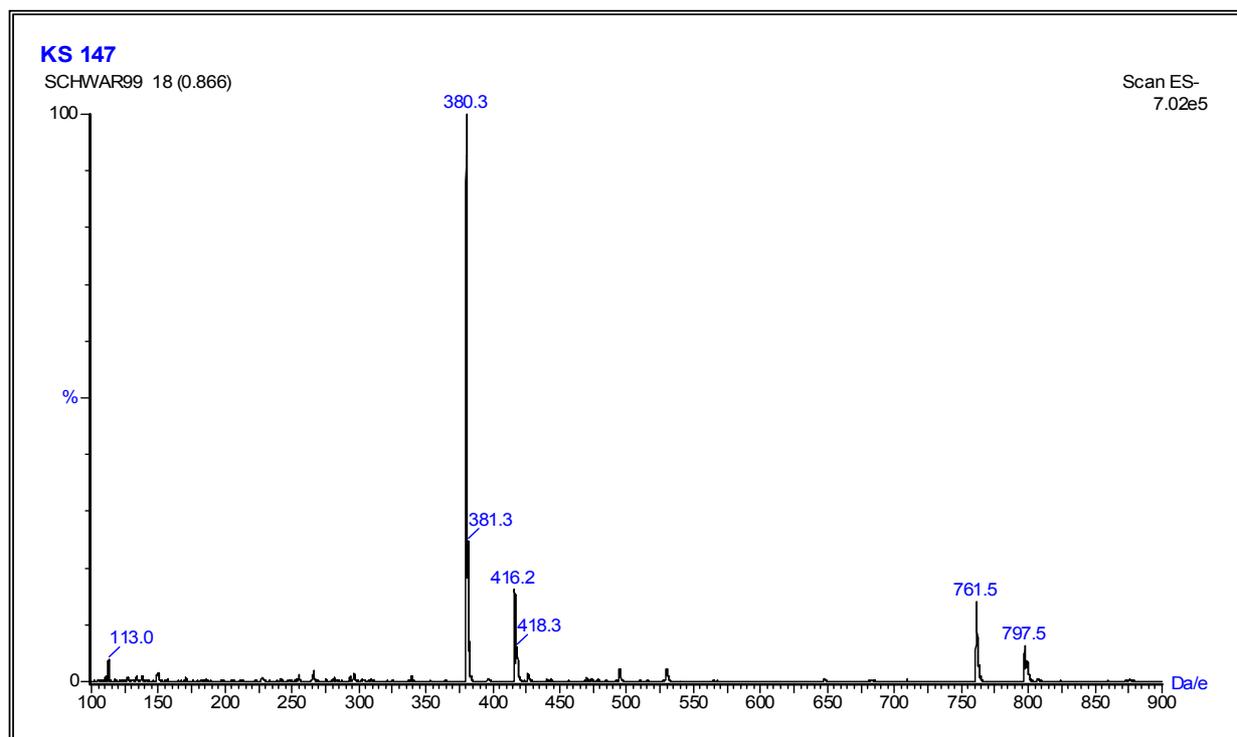


Abb. 33: Massenspektrum von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **25**

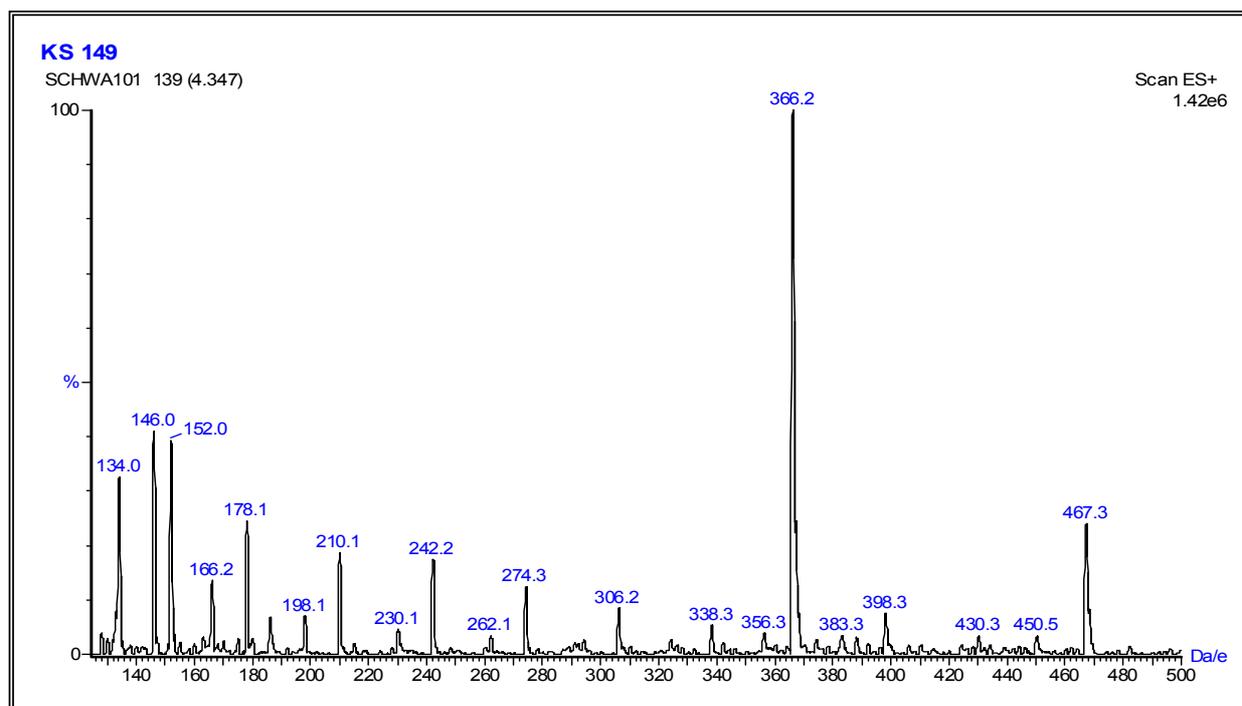


Abb. 34: Massenspektrum von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27**

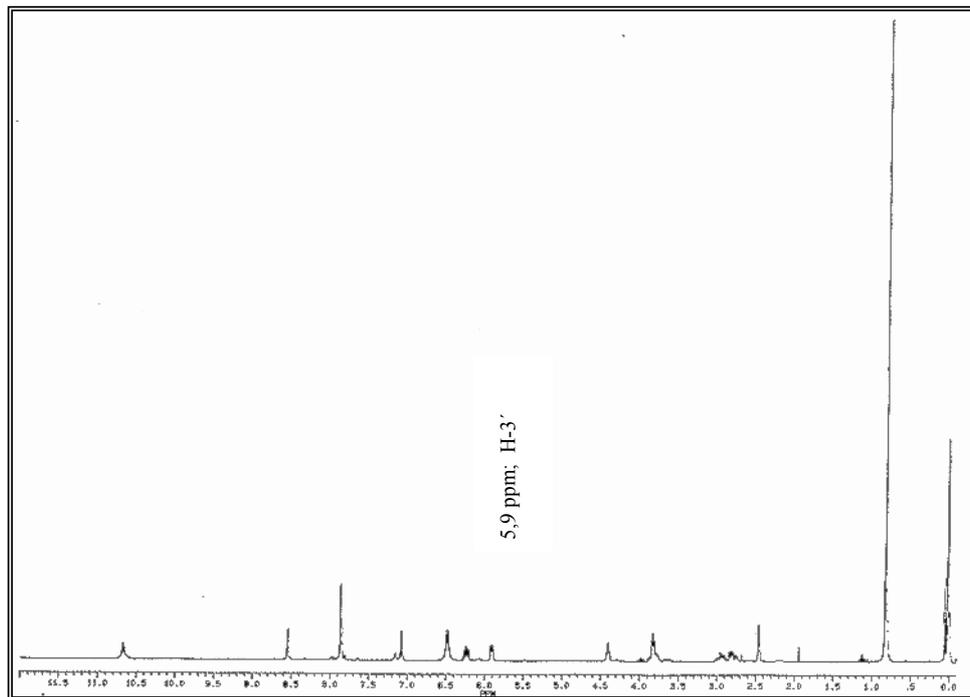


Abb. 35: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-*O*-(imidazol-1-yl)thiocarbonyl-2'-desoxyguanosin **26**

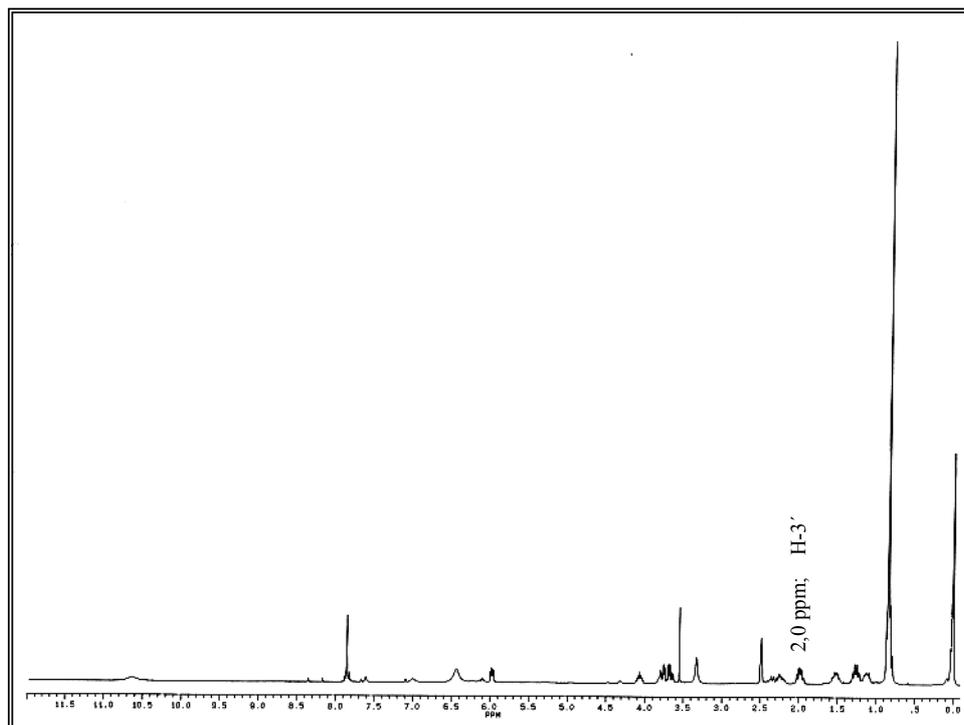


Abb. 36: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27**

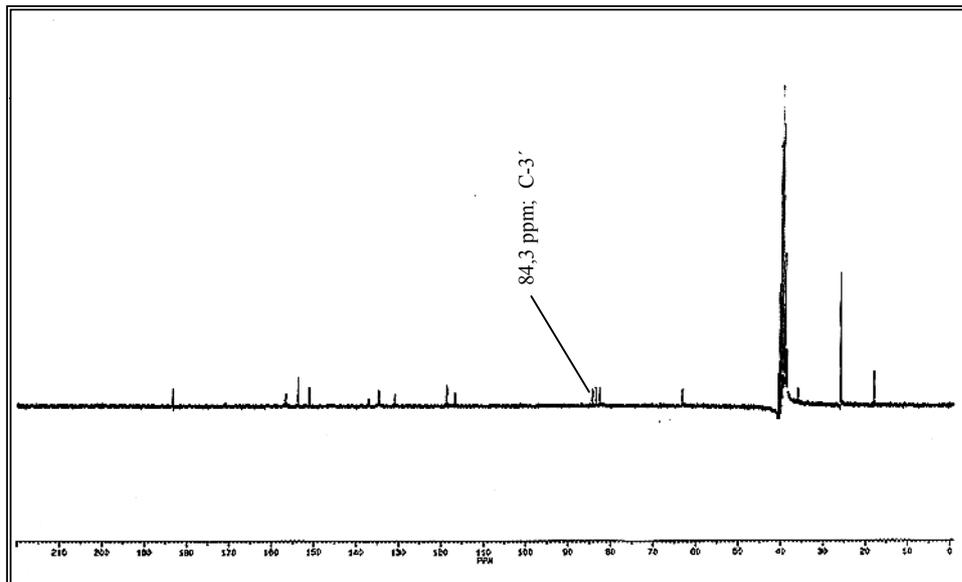


Abb. 37: ^{13}C -NMR-Spektrum von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-*O*-(imidazol-1-yl)thiocarbonyl-2'-desoxyguanosin **26**

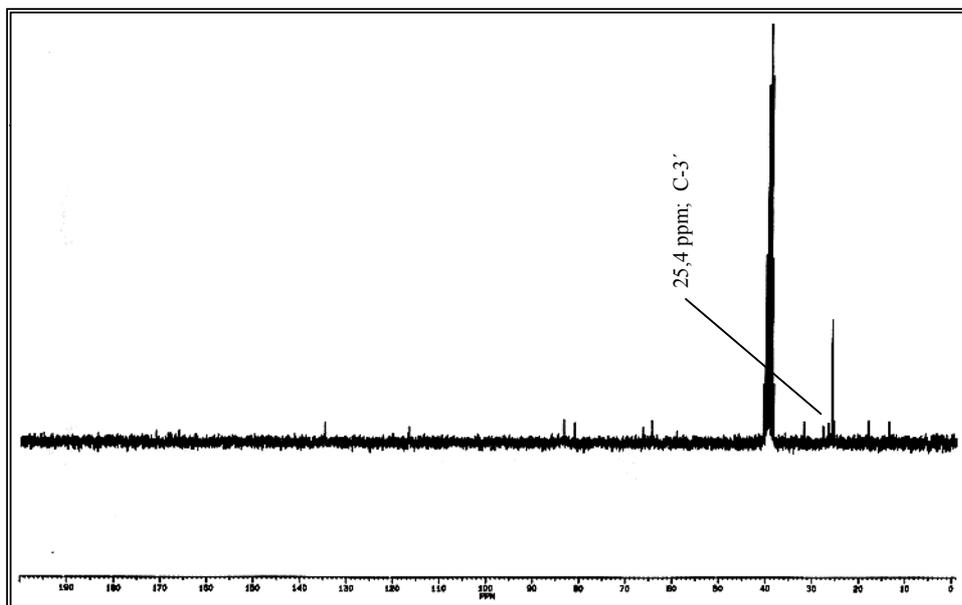


Abb. 38: ^{13}C -NMR-Spektrum von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27**

Die Umsetzung von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-didesoxyguanosin **27** zum entsprechenden Desmethylwyosin verlief je nach gewählten Lösungsmitteln und Reaktionszeiten sehr unterschiedlich. Die Umsetzung analog der Synthese von 2'-Desoxy-7-desmethylwyosin **19** resultierte in einer mässig guten Ausbeute von 53 %. Die Verwendung eines Lösungsmittelgemischs aus DMSO und THF verschlechterte die Ausbeute trotz gesteigerter Reaktionsdauer (Tab. 2). Erst die Verwendung eines DMSO / Dioxan-Lösungsmittelgemischs (2 : 1) führte zu einer Steigerung der Ausbeute bis zu 80 %. Je nach Dauer der Reaktionsschritte bewegte sich die Ausbeute in diesem Fall zwischen 60 % und 80 %. Das Edukt wurde je nach Umsetzung mit 10-20 %iger Ausbeute isoliert.

Lösungsmittel	Reaktionszeit im 1. Schritt (NaH)	Reaktionszeit im 2. Schritt (Bromaceton)	Ausbeute
DMSO	1 h	1 h	53 %
DMSO/THF	2 h	2 h	42 %
DMSO/Dioxan	2 h	1 h	72 %
DMSO/Dioxan	2 h	2 h	80 %
DMF/Dioxan	2 h	2 h	65 %

Tabelle 2: Getestete Reaktionsbedingungen der Umsetzung von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27** zu 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxy-7-desmethylwyosin **28**

Eine optimale Reaktionsführung gelang durch Lösen von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27** in abs. Dioxan / abs. DMSO (2 : 1) und Zugabe von NaH im Argongegenstrom. Nach zweistündigem Rühren bei RT wurde das Bromaceton durch ein Septum injiziert und weitere 2 Stunden bei RT gerührt. Anschliessend wurde konz. Ammoniak zugegeben und nochmals 2 Stunden gerührt. Die Lösungsmittel wurden am Stickstoffrotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Produkt 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxy-7-desmethylwyosin **28** konnte je nach verwendeter Methode in den beschriebenen Ausbeuten isoliert werden (Abb. 40).

Auch für die Ankopplung des Bromvaleriansäurenitrils wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit eine neue Synthesemethode verwendet und damit die Ausbeute gesteigert. Bei der Linkerankopplung analog zur Synthese von 7-Valeronitril-2'-desoxywyosin **20** mittels K_2CO_3 und Bromvaleriansäurenitril wurde das gewünschte Produkt in 48 %iger Ausbeute isoliert. Im Rahmen der neuen Synthesemethode wurde 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-didesoxy-7-desmethylwyosin **28** in abs. Dioxan gelöst und unter Argongegenstrom NaH und Bromvaleriansäurenitril zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 3 Stunden bei RT. Anschliessend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Das so synthetisierte Produkt 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-7-valeronitril-2',3'-didesoxywyosin **29** wurde in 65 %iger Ausbeute isoliert.

Bei der Ringöffnung mit *N*-Bromsuccinimid in Wasser / Acetonitril kam es aufgrund der zu sauren Reaktionsbedingungen zur Depurinierung. Es konnte kein Produkt isoliert werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde das Lösungsmittelgemisch Acetonitril / Wasser durch ein Acetonitril / Phosphatpuffer (pH = 7)-Gemisch ersetzt. Bei der so durchgeführten Reaktion resultierte neben dem gewünschten Produkt 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-didesoxyguanosin **30** (27,3 %) auch das an der C-8-Position bromierte Nucleosid 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-8-brom-2-valeronitril-2',3'-didesoxyguanosin **31** (18,2 %), (Abb. 39). Die beiden entstandenen Produkte konnten mit Säulenchromatographie getrennt werden, um sie durch Massenspektrometrie und 1H -NMR-Spektroskopie nachzuweisen. Das bromierte Produkt 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-8-Brom-2-valeronitril-2',3'-didesoxy-guanosin **30** eluierte als erstes von einer Kieselgelsäule mit einem Methylenchlorid / Methanol-Gemisch.

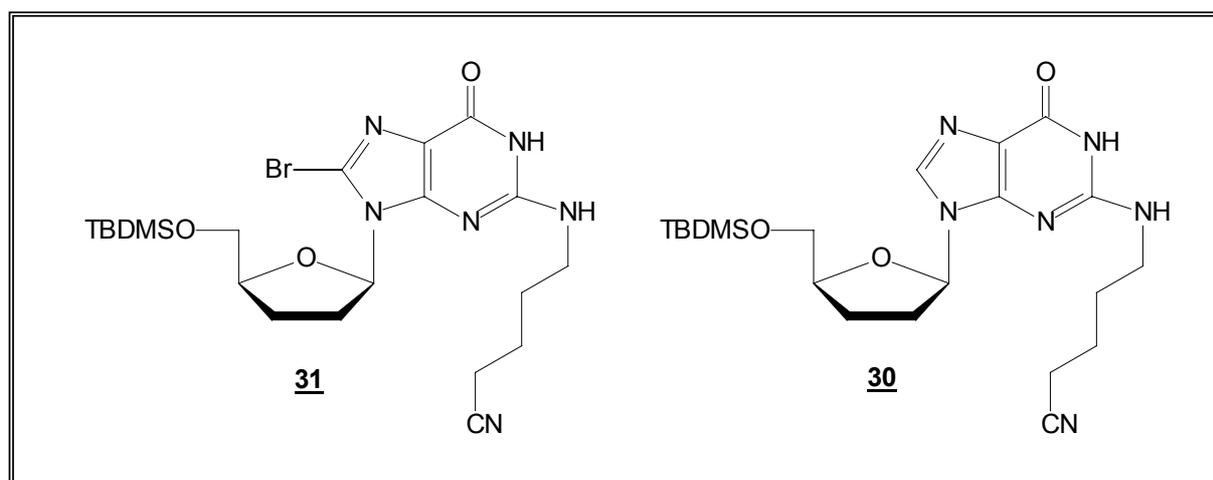


Abb. 39: Bei der Ringöffnung entstehende Produkte 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxy-guanosin **30** und 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-8-brom-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **31**

Obwohl es noch leicht mit 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-8-brom-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **31** verunreinigt ist, zeigt es eine um genau 79,9 g/mol höhere Masse als **30** und das Fehlen des H-8 im ¹H-NMR-Spektrum, das bei 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **30** bei 7,7 ppm zu finden ist (Abb. 41-44).

Mit der Änderung der Reaktionsführung konnte die Bromierung verhindert werden. 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-7-valeronitril-2',3'-dideoxywyosin **29** wurde in einem Acetonitril / Phosphatpuffergemisch (pH 7) gelöst und 0,8 Äquivalente anstelle der zuvor eingesetzten 1,2 Äquivalente *N*-Bromsuccinimid zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 3 Stunden bei 21 °C. Anschliessend wurden die Lösungsmittel abgezogen, und das Produkt 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **30** konnte nach Säulenchromatographie in 67 %iger Ausbeute isoliert werden.

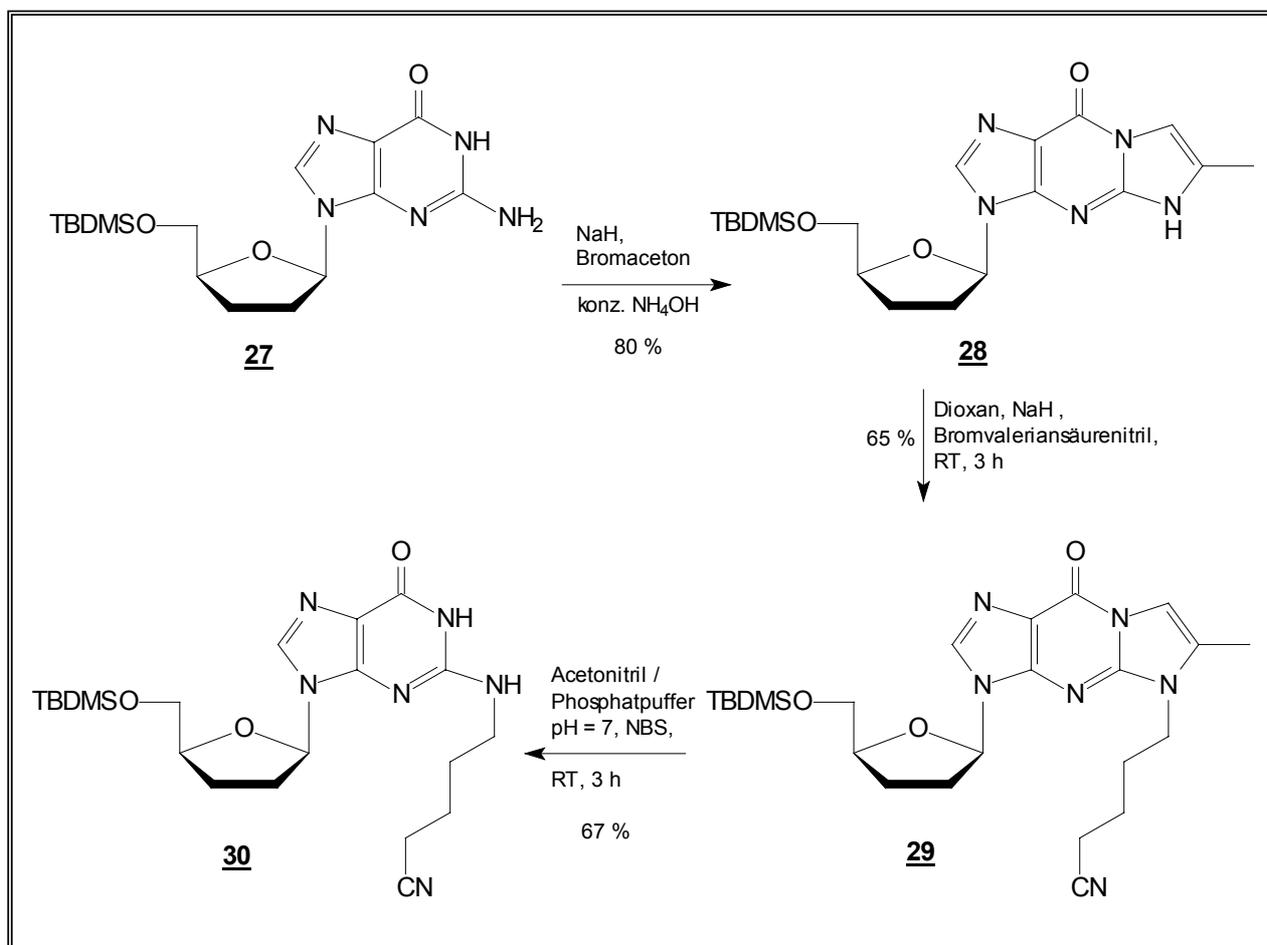
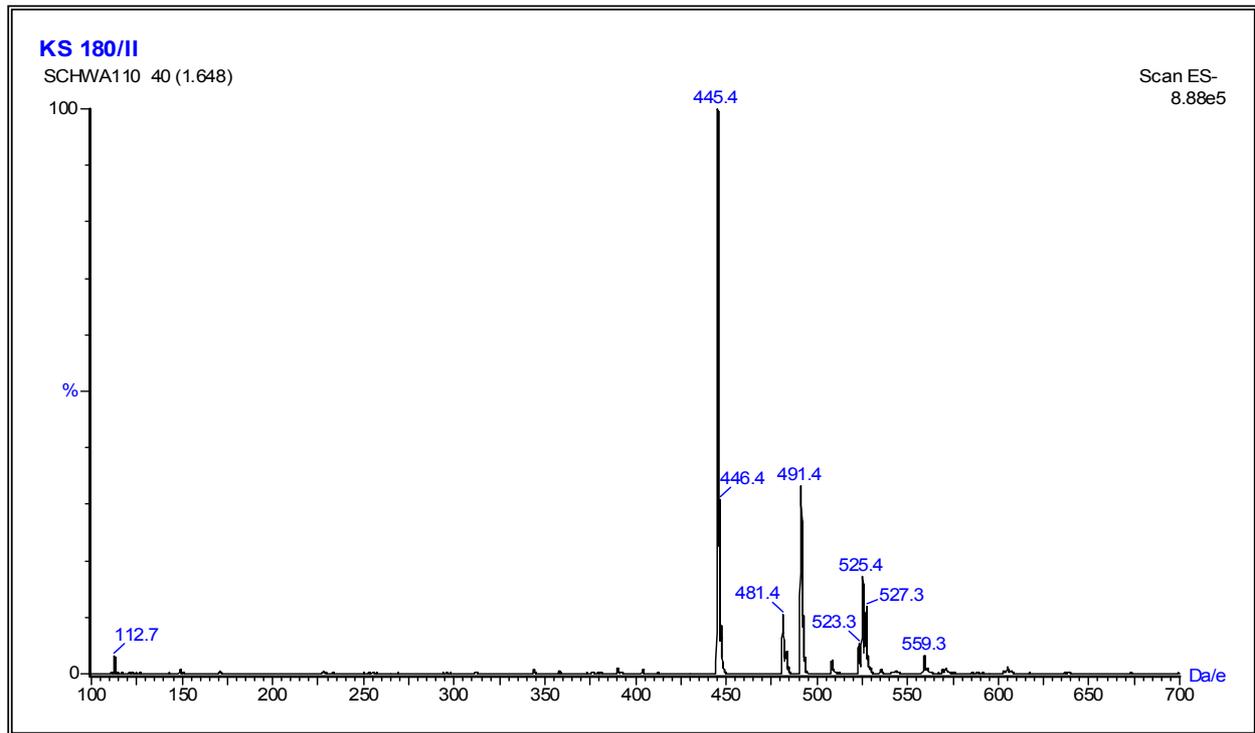
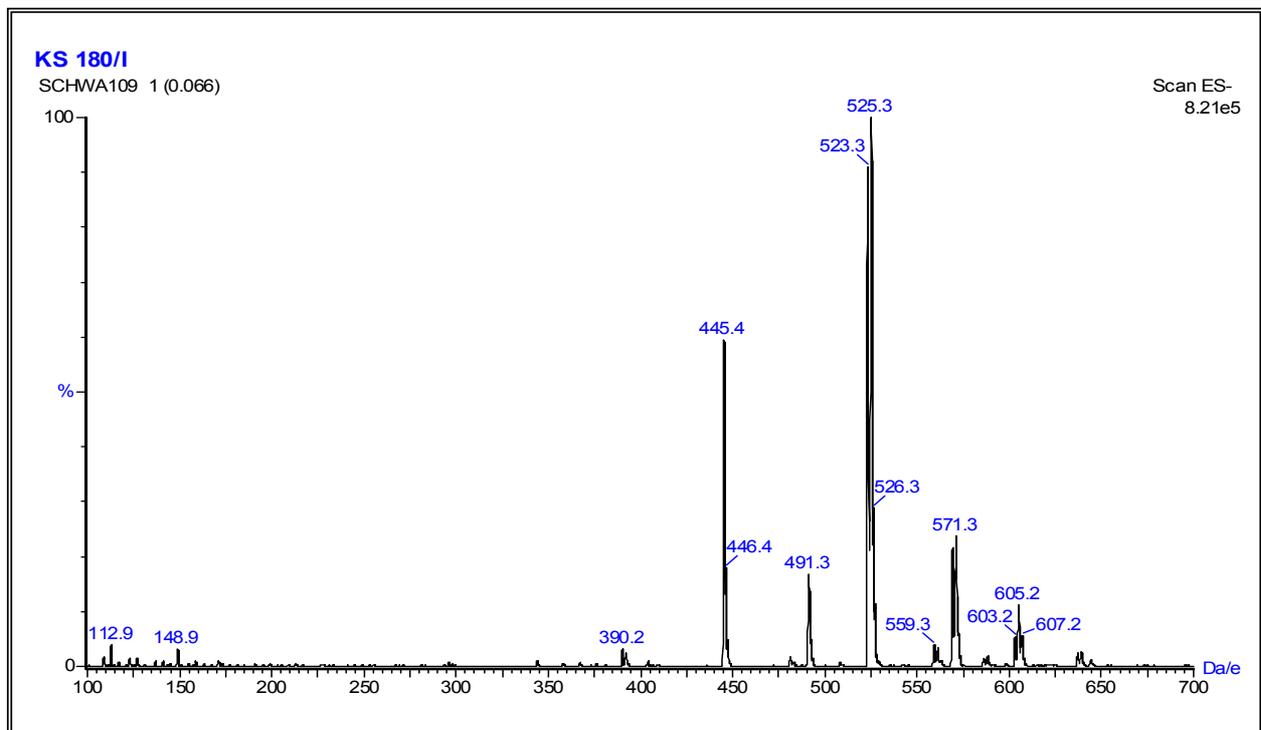


Abb. 40: Synthese von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **30**

Abb. 41: Massenspektrum von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **30**Abb. 42: Massenspektrum von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-8-brom-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **31**

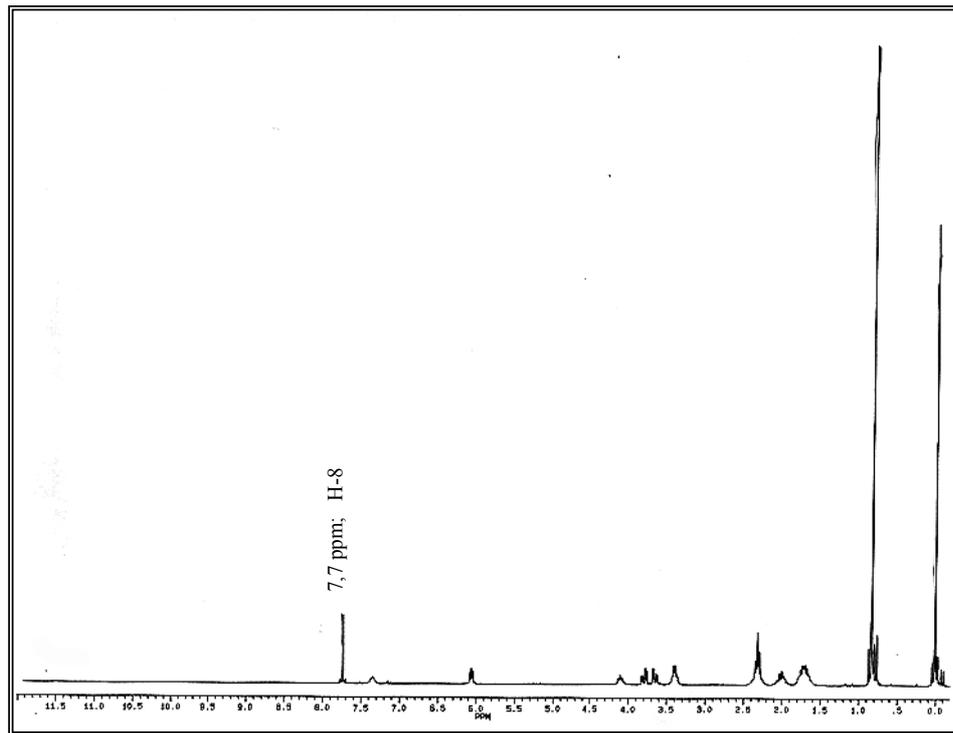


Abb. 43: ¹H-NMR-Spektrum von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **30**

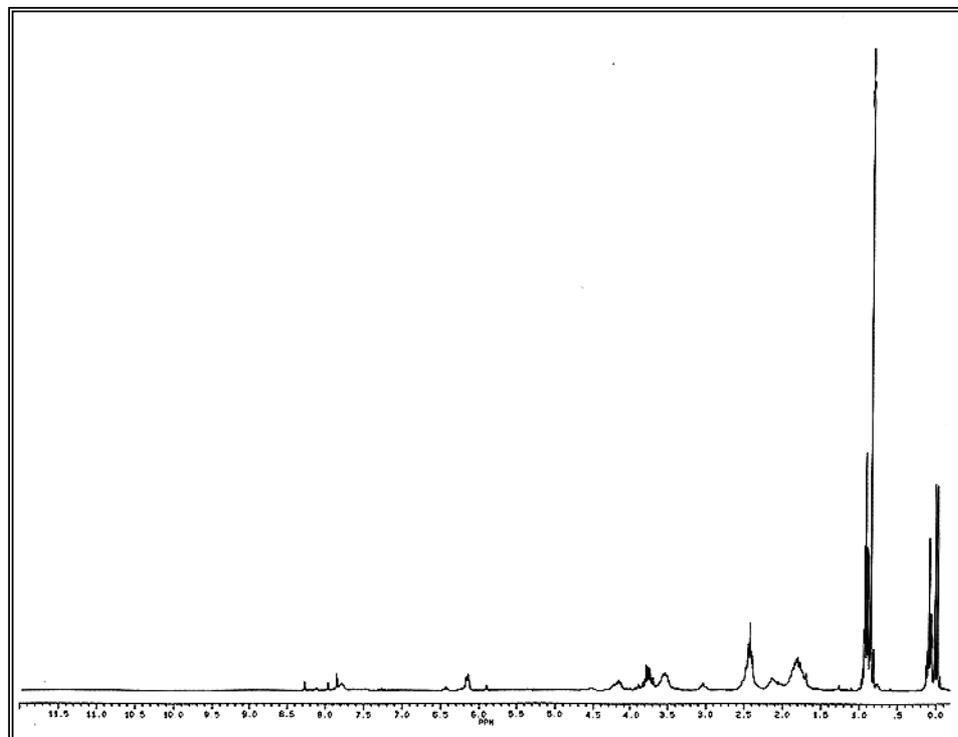


Abb. 44: ¹H-NMR-Spektrum von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-8-brom-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **31**

Ein Teil des so erhaltenen N^2 -alkylierten 2',3'-Dideoxyguanosins wurde anschliessend an seiner 5'-Position entschützt, um zum Triphosphat umgesetzt werden zu können. Dazu wurde 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **30** unter Schutzgasbedingungen in absolutem Pyridin gelöst und 1 M TBAF in THF durch ein Septum injiziert. Nach zweieinhalbstündigem Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand mittels Kieselgel-Säulenchromatographie aufgereinigt. Das gewünschte Produkt 2-Valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **32** konnte in 85 %iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 45).

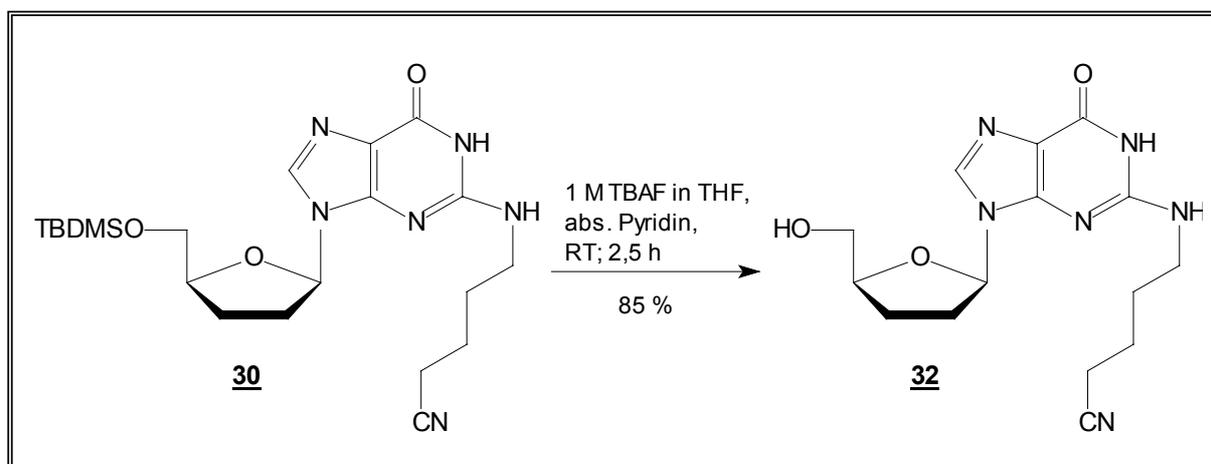


Abb. 45: Synthese von 2-Valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **32**

Die Nitrilfunktion der verbliebenen Verbindung 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **30** wurde anschliessend in ein Azid überführt, um später auf der Triphosphatstufe leicht zu einer Aminofunktion reduziert werden zu können.

Dazu wurde **30** zunächst katalytisch reduziert, indem man die Verbindung in entgastem abs. Methanol löste und unter Schutzgasatmosphäre $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zugab. Der Ansatz rührte 48 Stunden. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin **33** ohne weitere Aufreinigung mit 71 %iger Ausbeute isoliert werden.

Die Umsetzung der Aminofunktion in ein Azid mittels Trifluormethansulfonsäureazid ist in der Literatur beschrieben (Alper, 1996). Demnach wurde 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin **33** in Wasser gelöst und K_2CO_3 , kat. CuSO_4 sowie eine frisch angesetzte Trifluormethansulfonsäureazid-Lösung zugegeben. Der Reaktionsansatz rührte 18 Stunden bei RT. Das gewünschte Produkt 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **34** konnte nach kieselgelchromatographischer

Aufreinigung in 20 %iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 46). Anschliessend folgte die Entschützung der 5'-Position mittels 1 M TBAF in THF analog zur Darstellung von 2-Valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **32**. Das gewünschte Produkt 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **35** wurde mit 81 %iger Ausbeute isoliert und diente als Ausgangsverbindung für die Triphosphatsynthese.

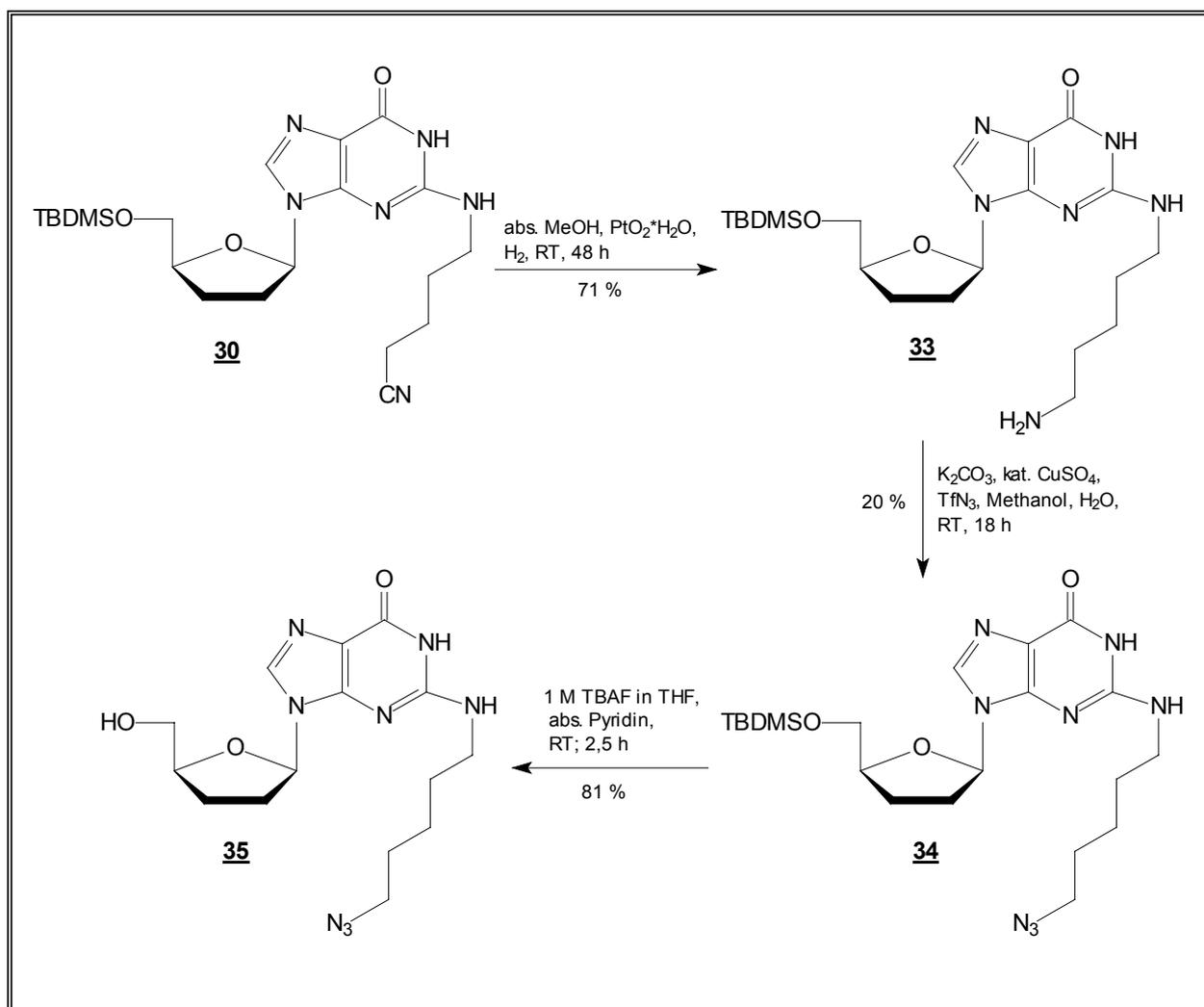


Abb. 46: Synthese von 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **35**

Durch direkte Einführung eines Linkers, der statt einer Nitrilfunktion eine Azidgruppe trägt, könnte dieser Umweg in Zukunft eingespart werden und die Synthese dadurch effizienter gestaltet werden. Aufgrund der vergleichsweise leichten Reduktion der Azidfunktion auf Triphosphatebene auch im Vergleich zu anderen Aminoschutzgruppen wie Fmoc ist die Synthese eines solchen Linkers lohnenswert.

4. Synthese von Nukleosid-5'-Triphosphaten

4.1 Methoden der Triphosphatsynthese

Nukleosidtriphosphate (NTPs und dNTPs) haben in den letzten Jahrzehnten ausserordentlich an biologischer Bedeutung zugenommen. Wichtige therapeutische und diagnostische Anwendungen sorgten dafür, dass die Entwicklung effektiver Synthesemethoden immer mehr in den Vordergrund rückte. Bis heute ist es allerdings nicht gelungen, eine universell verwendbare Synthese zu entwickeln, die Nukleosidtriphosphate einfach und in guten Ausbeuten liefert.

Nukleosidtriphosphate sind nicht problemlos zu synthetisieren, zu isolieren, zu charakterisieren und zu lagern. Die Schwierigkeiten bei der Synthese liegen vor allem darin, dass sowohl ionische wässrige Reagenzien als auch lipophile Substrate kombiniert werden müssen. Aus diesem Grund gestalten sich die Wahl der Reaktionsmedien und ebenso auch die entsprechenden Aufreinigungsmethoden äusserst schwierig.

Ein zweites Problem stellt die Haltbarkeit der Nukleosidtriphosphate dar. Sie können sowohl unter basischen als auch unter sauren Bedingungen hydrolysiert werden. Die Haltbarkeit dieser Verbindungen ist stark von den entsprechenden Gegenionen abhängig. Triphosphate in protischer Form sind aufgrund des niedrigeren pH-Werts in ungepufferten Lösungen sehr instabil. Die Verwendung von Trialkylammoniumgegenionen führt hingegen zu einer guten Haltbarkeit der Verbindungen (einige Jahre) allerdings nur bei niedrigen Temperaturen. Der Erfolg der existierenden Triphosphatsynthesen ist stark substratabhängig. Aus diesem Grund seien im folgenden die wichtigsten Synthesemethoden für Nukleosidtriphosphate aufgeführt.

4.1.1 Triphosphatsynthese durch nukleophilen Angriff von Pyrophosphat an ein aktiviertes Nukleosidmonophosphat

Diese Methode stellt die am häufigsten verwendete Strategie zur Synthese von Triphosphaten dar. Die Pyrophosphatsalze sind kommerziell erhältlich, und die aktivierten Nukleosidmonophosphate müssen synthetisiert werden. Hierfür existieren verschiedene Methoden, von denen einige im folgenden beschrieben werden.

Yoshikawa setzte 5'-ungeschützte NTPs mit POCl_3 in Trialkylphosphaten als Lösungsmittel um (Yoshikawa, 1967). Die 5'-Selektivität dieser Reaktion ist relativ hoch und ein grosser Vorteil dieser Reaktion. Aus diesem Grund wird diese Reaktion vor allem bei der Umsetzung von Riboverbindungen bevorzugt. Ludwig nutzte diesen Vorteil aus und verbesserte die Methode von Yoshikawa, indem er, anstatt das Nukleosidmonophosphat aufzuarbeiten, Tri-*N*-butylammoniumpyrophosphat in abs. DMF zugab und nach einer Minute den Ansatz mittels Triethylammoniumbicarbonat quenchte (Ludwig, 1981). Diese „one pot“-Methode (Abb. 47) bildete die Grundlage für verschiedenste Eintopfsynthesen zur Darstellung von Triphosphaten, die ausführlich in einem Übersichtsartikel von Burgess und Cook beschrieben sind (Burgess und Cook, 2000).

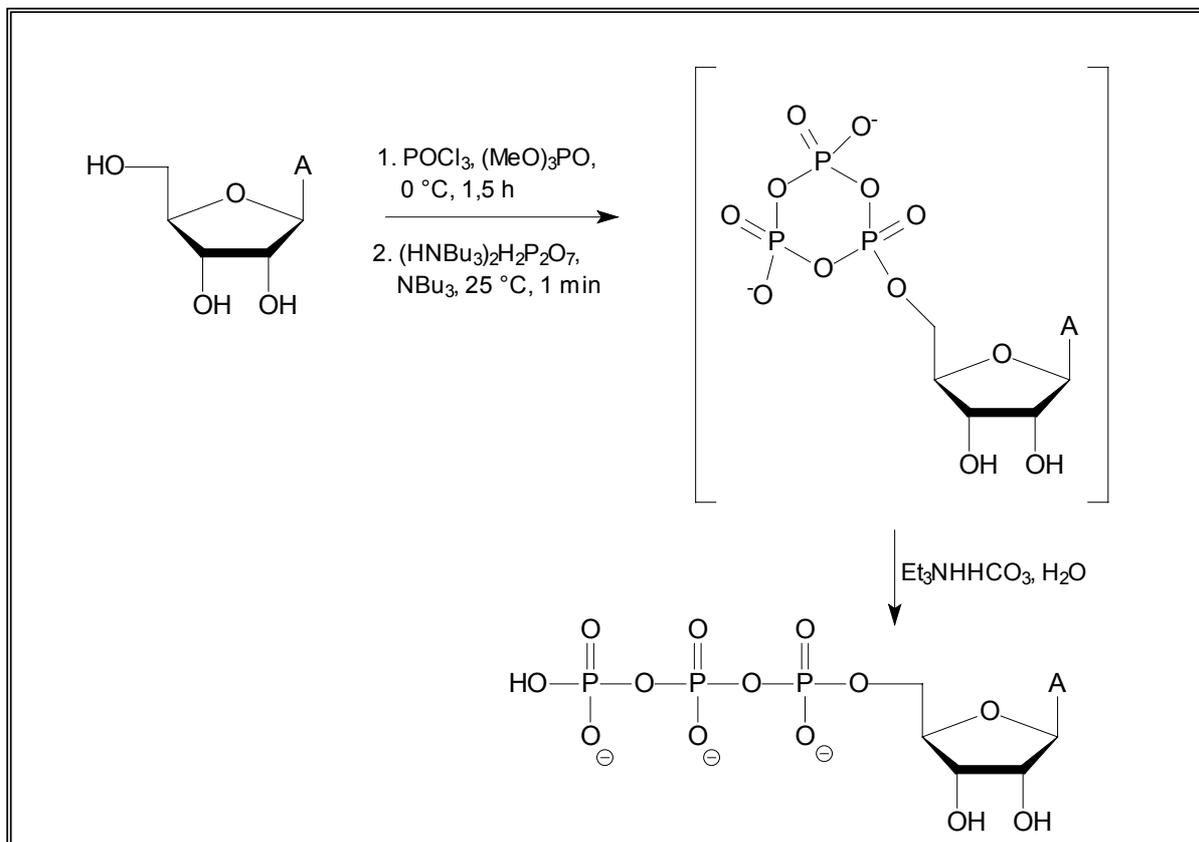


Abb. 47: Eintopfsynthese von Triphosphaten nach Ludwig

4.1.2 Triphosphatsynthese mittels Nukleosid-Phosphoramidaten

Frühe Untersuchungen stützten sich auf die Verwendung von DCC als Aktivator für Nukleosid-Monophosphate. Die 5'-Monophosphate wurden mit mindestens zehnfach molarem Überschuss an anorganischem Orthophosphat in Gegenwart von DCC versetzt. Das Orthophosphat reagiert dabei vermutlich im ersten Schritt mit DCC in Pyridin, wodurch die Elektrophilie am Phosphor erhöht und die nukleophile Substitution durch das 5'-Phosphat eingeleitet wird (Smith, 1958; Weimann, 1962; Shabarova, 1994). Der grosse Nachteil dieser Methode ist jedoch die Bildung von Mono-, Di- und anorganischen Polyphosphaten, die nur unter sehr grossem Aufwand vom gewünschten Produkt abzutrennen sind.

Eine weitere Methode ist die Aktivierung von 5'-Monophosphaten durch Morpholin und DCC. Das dabei auftretende Problem, dass das Triphosphat mit Pyridin Disproportionierungsreaktionen eingeht und bei längerer Reaktionsdauer unter Bildung von

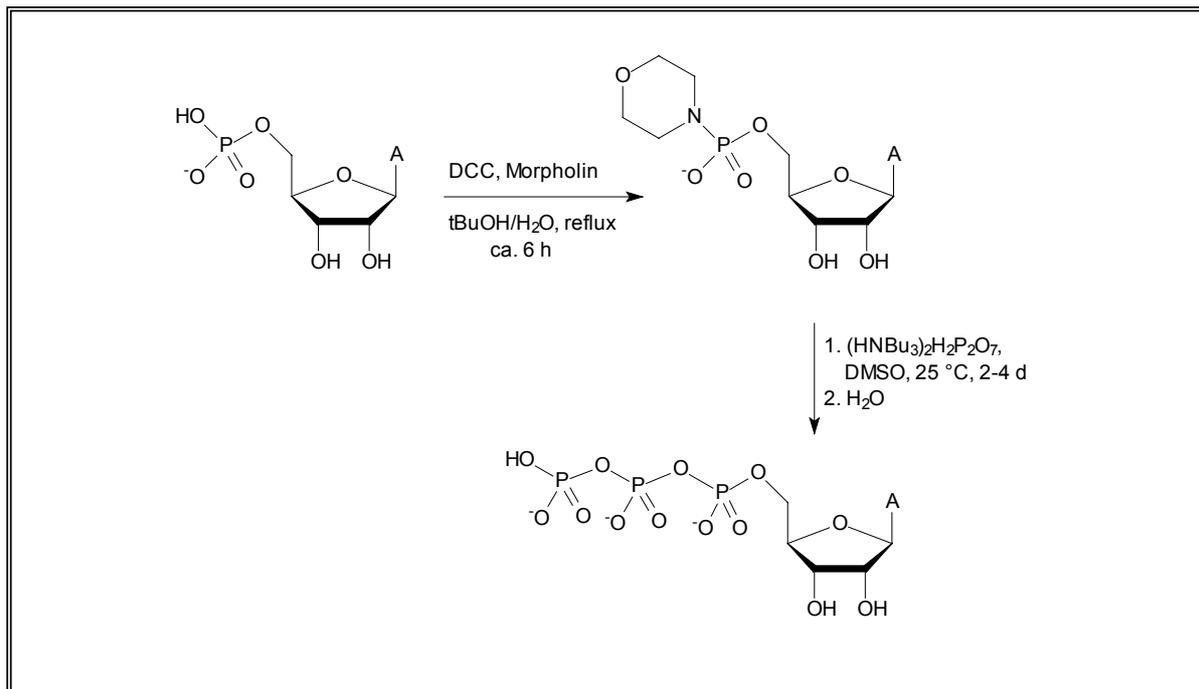


Abb. 48: Triphosphatsynthese nach Moffat

Diphosphat zerfällt, erkannte Moffat, und durch den Einsatz anderer Lösungsmittel, z. B. DMSO, umgehen (Moffat, 1961 und 1964). Zunächst wird durch Refluxieren einer Lösung aus 5'-Monophosphat, DCC und Morpholin in Wasser und *t*BuOH das entsprechende

Morpholidat hergestellt. Die Umsetzung des Zwischenprodukts mit Pyrophosphat in DMSO liefert das Triphosphat in 73-80 %iger Ausbeute (Abb. 48). Variationen der Methode nach Moffat bedienen sich anderer Aktivatoren, wie z. B. Piperidin oder Imidazol, das durch Reaktion von Monophosphaten mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol erhalten werden kann (Hoard, 1965; Kadokura, 1997; Simon, 1990).

4.1.3 Triphosphatsynthese durch nukleophilen Angriff von Phosphat an ein aktiviertes Nukleosidpyrophosphat

Bei diesem Reaktionstyp besteht die Schwierigkeit in der Aktivierung des β -Phosphors eines Nukleosidmonophosphats, ohne das α -Phosphoratom oder die Funktionalitäten der Nukleosideinheit zu beeinträchtigen. Hecht nutzte die Methode, um ^{32}P -gelabelte Triphosphate herzustellen (Hecht, 1973). Dazu wird ein 5'-Nukleosiddiphosphat mit 1,1'-Carbonyldiimidazol in DMF und Methanol versetzt und 12 h bei RT gerührt. Die anschließende Umsetzung mit ^{32}P gelabeltem Tributylammoniumorthophosphat führt zur Bildung des am γ -Phosphor gelabelten Nukleosidtriphosphats (Abb. 49). Eine andere häufig verwendete Methode nutzt zur Aktivierung Ethylchloroformat (Koziolkiewski, 1978).

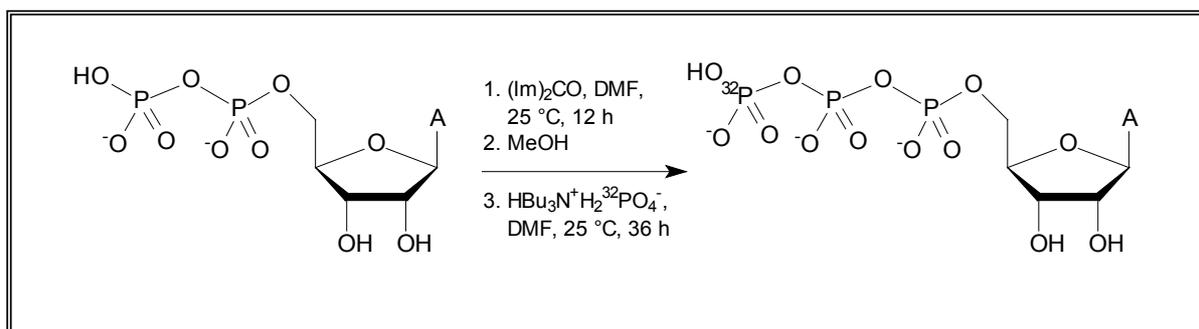


Abb. 49: Triphosphatsynthese nach Hecht

4.1.4 Triphosphatsynthese durch nukleophilen Angriff eines Nukleosiddiphosphats an eine aktivierte Phosphateinheit

Todd et al. setzten ein benzylgeschütztes Nukleosiddiphosphat mit Dibenzylchlorophosphat oder Benzylphosphoramidat um. Anschliessend wurden die Benzylschutzgruppen mittels Hydrogenolyse entfernt (Baddiley, 1948).

Eine interessante Anwendung dieser Synthesemethode ist die Darstellung von γ -Methyl-GTP. Das entsprechende Methylphosphorimidazolid wird in Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen mit Guanosindiphosphat zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt kann in 86%iger Ausbeute isoliert werden (Kadokura, 1997), (Abb. 50).

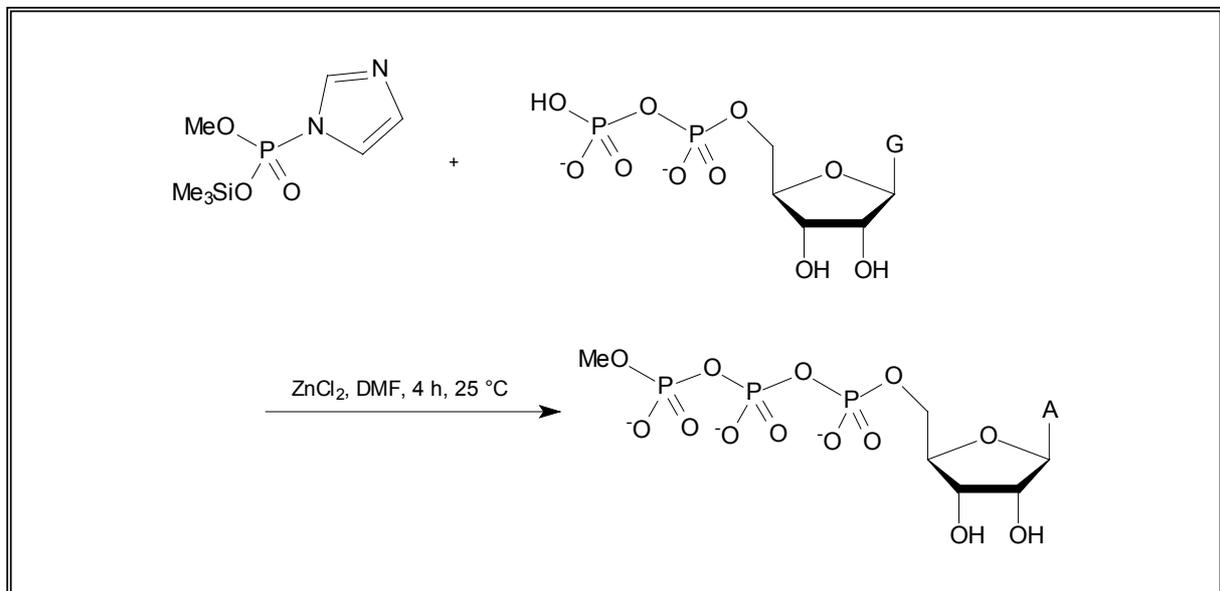


Abb. 50: Synthese von γ -Methyl-GTP nach Kadokura

4.1.5 Triphosphatsynthese mittels aktivierter Phosphit- oder Phosphoramidit-Nukleosidderivate

Die wichtigste Arbeit zu dieser Synthesemethode lieferten Ludwig und Eckstein (Ludwig, 1989). Aufgrund der zahlreichen Vorteile, insbesondere der kurzen Reaktionsdauer, der guten Aufreinigungsmöglichkeiten und der nur wenig ausgeprägten Bildung polymerer Phosphate wurde dieses Verfahren in den letzten Jahren häufig von verschiedenen Forschergruppen eingesetzt (Martinez, 1999; Gaur, 1992; Brownlee, 1995; McGee, 1995). Zwar sind die

Ausbeuten im Durchschnitt niedriger als bei den beschriebenen zweistufigen Reaktionen, jedoch müssen die funktionellen Gruppen der Nukleobasen nicht geschützt werden. Das Schützen der 3'-Hydroxylgruppe bzw. der 2'- und 3'-Hydroxylgruppen der Ribonukleoside ist bei der Methode nach Ludwig und Eckstein erforderlich. Entfällt die Notwendigkeit einer Schützung dieser Hydroxylfunktionen, da sie in fast allen Beispielen in der vorgelegten Arbeit nicht existent sind, ist diese Synthesemethode aufgrund ihrer Schnelligkeit die Methode der Wahl.

Die Synthese nach Ludwig und Eckstein ist eine mehrstufige Eintopfsynthese. Im ersten Schritt wird die freie 5'-Hydroxylgruppe des Nukleosids mit 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on, dem van Boom's-Reagenz, in einem Gemisch aus Dioxan, DMF und Pyridin umgesetzt. Der dabei vermutlich entstehende Phosphorigsäuretriester wird in einem zweiten Schritt mit einer Emulsion aus Bis-(tri-*n*-butylammonium)-pyrophosphat in DMF und Tributylamin zur Reaktion gebracht. Dabei wird das aktivierte Phosphit zweimal geöffnet, wobei die erste Abgangsgruppe wahrscheinlich die Carboxylgruppe ist und die phenolische Gruppe in einem zweiten Schritt intramolekular substituiert wird. Das entstandene zyklische Zwischenprodukt wird anschliessend in einem dritten Reaktionsschritt mittels eines Gemischs aus Iod, Pyridin und Wasser oxidiert. Gleichzeitig hydrolysiert der Sechsring unter Bildung des linearen Triphosphats (Abb. 51).

Durch Modifikation der Oxidationsbedingungen können mit diesem Verfahren relativ einfach 5'-*O*-(1-Thiotriphosphate) als Diastereomeregemische hergestellt werden. Das zyklische Zwischenprodukt wird dazu zunächst mit Schwefel und anschliessend mit Wasser und Ammoniak versetzt. Die Reaktion des zyklischen Zwischenprodukts mit Li₂S in Pyridin/Dioxan resultiert in einem trennbaren Gemisch aus 5'-*O*-(1,3-Dithiotriphosphat) und 5'-*O*-(1,1-Dithiotriphosphat).

Eine weitere interessante Anwendung der Ludwig-Eckstein-Methode ist die Festphasensynthese von Nukleosidtriphosphaten und 5'-Oligonukleotidtriphosphaten (Gaur, 1992; Schoetzau, 1996). Gaur geht von einem 5'-*O*-Dimethoxytrityl geschützten Ribonukleosid aus, dessen 3'-Funktion über einen Succinimidlinker an einen festen CPG-Träger gebunden ist. Im ersten Schritt der Festphasensynthese wird die 5'-Hydroxylfunktion mittels Trichloressigsäure entschützt und anschliessend unter Ludwig-Eckstein-Bedingungen zum Triphosphat umgesetzt. Die Abspaltung vom festen Träger erfolgt dann durch Hydrolyse mittels Ammoniaklösung.

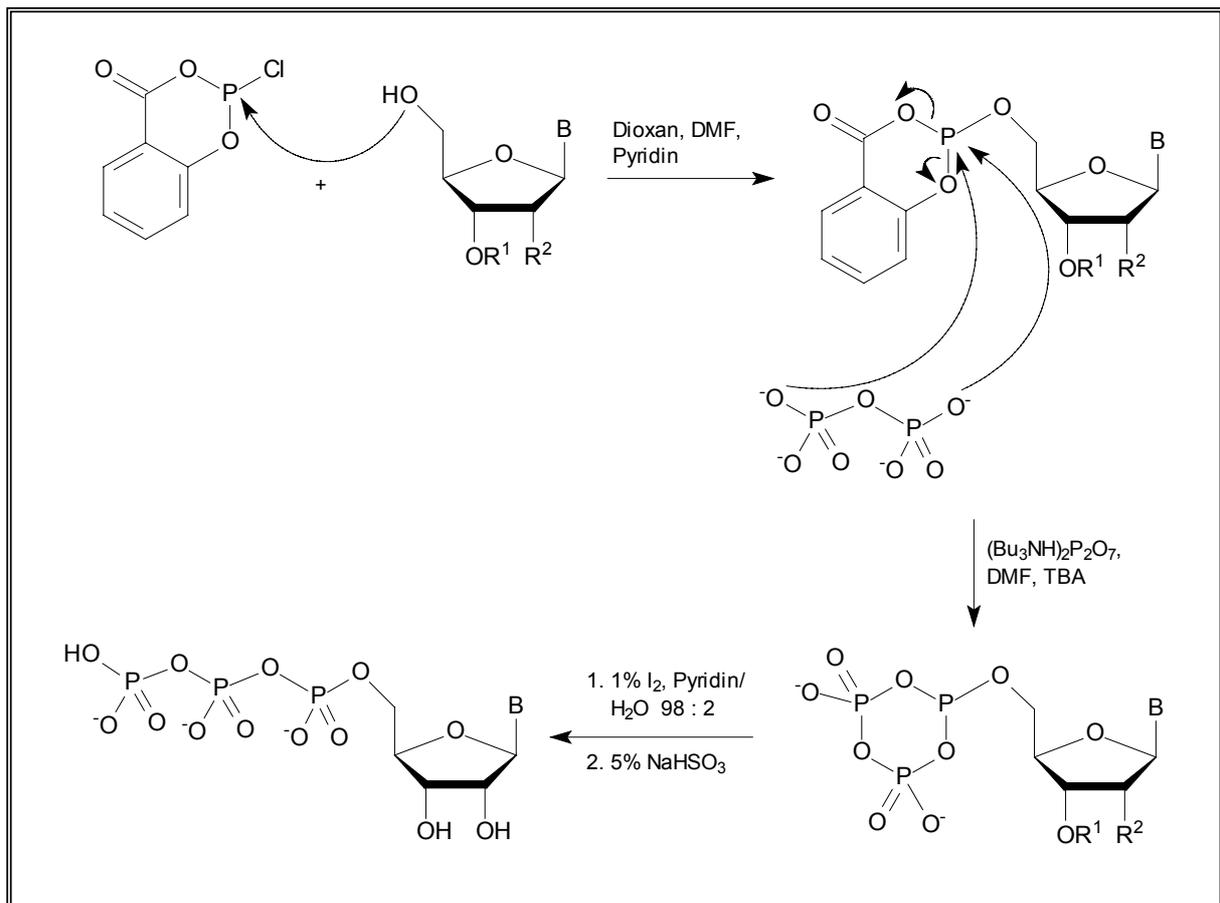


Abb. 51: Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein

4.1.6 Triphosphatsynthese durch Angriff von Triphosphatnukleophilen auf 5'-O-Abgangsgruppen

Eine durchführbare, allerdings in der Praxis wenig verwendete Methode der Triphosphatsynthese ist die direkte nukleophile Substitution einer Abgangsgruppe mittels Triphosphat-Ionen und Triphosphatanaloga. Die ersten durchgeführten Reaktionen dieses Typs verwendeten Phosphinsäuren, da diese stabiler sind als Triphosphat-Ionen (Saady, 1995). Die Reaktion von 4fach negativ geladenem Triphosphat mit 5'-O-Tosyladenosin bei RT in Acetonitril wird zur Synthese von ATP eingesetzt (Davisson, 1987; Dixit, 1984). Diese vergleichsweise einfache Reaktion konnte jedoch bis jetzt nur zur Synthese von ATP erfolgreich eingesetzt werden, dabei werden allerdings Ausbeuten bis zu 72 % erreicht. Eine interessante Anwendungsmöglichkeit dieser Methode ist die Synthese von Triphosphatanaloga, die Stickstoff in der Triphosphateinheit enthalten (Ma, 1992).

Beispielsweise wurde 5'-Hydroxylthymidin selektiv mit einem Iminotriphosphat unter Yoshikawa-Bedingungen zum entsprechend modifizierten Triphosphat in 26 %iger Ausbeute umgesetzt (Abb. 52).

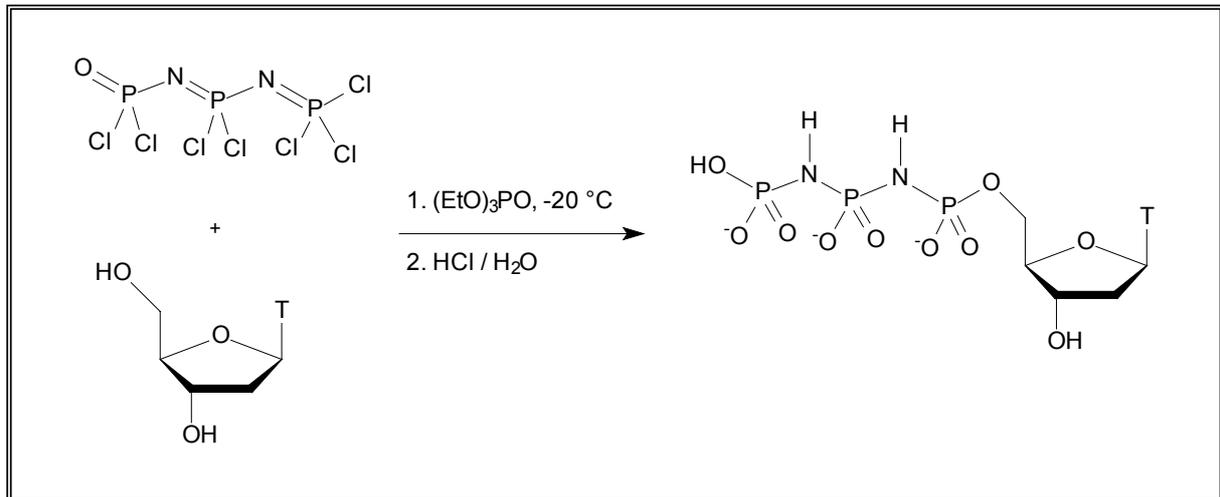


Abb. 52: Synthese von Triphosphatanaloga, die Stickstoff in ihrer Triphosphateinheit enthalten

4.1.7 Triphosphatsynthese durch biokatalytische Methoden

Enzymvermittelte Synthesen sind besonders nützlich zur Darstellung von natürlichen Triphosphaten, vor allem wenn diese als unaufgereinigte Mischung eingesetzt werden können. Biokatalytische Methoden können allerdings auch zur Synthese von Triphosphaten mit modifizierter Basen und/oder Zuckereinheit eingesetzt werden. Das Problem dabei besteht vor allem darin, Enzyme zu finden, die die unnatürlichen Substrate akzeptieren. In den meisten Fällen ist die Darstellung modifizierter Triphosphate auf enzymatischem Wege jedoch zu unwirtschaftlich, so dass im allgemeinen doch auf die wesentlich effektiveren chemischen Methoden zurückgegriffen wird.

Eine effektive Methode zur enzymatischen Darstellung von ATP bedient sich drei verschiedener Enzyme, der Adenosin-Kinase, der Adenylat-Kinase und der Acetat-Kinase. Auf diese Weise kann Adenosin in 98 %iger Ausbeute in eine 30 mM Lösung von ATP umgesetzt werden (Baughn, 1978).

Da natürliche Triphosphate oft als Gemische der vier Basen eingesetzt werden (ATP, GTP, CTP und UTP), bildet die Degradierung von RNA eine effektive Möglichkeit zur Darstellung

solcher Mischungen (Wong, 1983). In einem ersten Reaktionsschritt wird RNA mittels einer Nuklease partiell degradiert. Anschliessend werden die entstandenen Oligomere mittels einer Phosphorylase in die entsprechenden NDPs und diese wiederum mittels Pyruvat-Kinase in die NTPs überführt (Abb. 53).

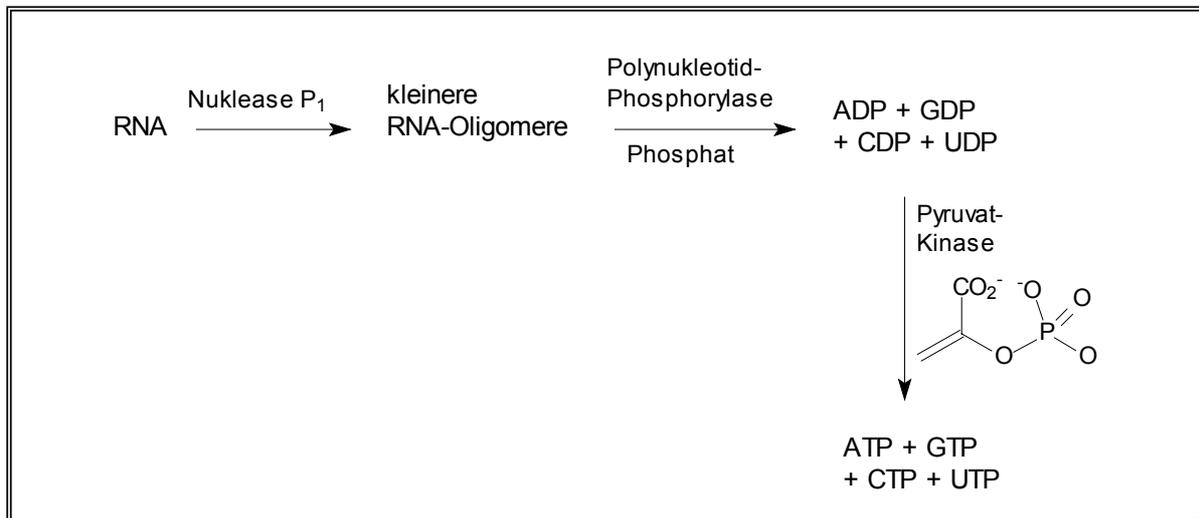


Abb. 53: Enzymatische Synthese eines Gemischs aus ATP, GTP, CTP und UTP

4.2 Synthese von 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat

Wie bereits in Abschnitt 4.1.5 erwähnt, wurden alle in dieser Arbeit hergestellten Nukleosidtriphosphate aufgrund der beschriebenen Vorteile nach dem Verfahren von Ludwig und Eckstein synthetisiert.

Dazu wurde das umzusetzende Nukleosid, in diesem Fall 3'-Azido-3'-desoxythymidin **4**, vor der Reaktion gründlich durch Coevaporation mit absolutem Pyridin und Lagern über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Die Reaktion wurde unter strengen Schutzgasbedingungen durchgeführt. Im ersten Schritt der Reaktion wurde das in Pyridin und DMF gelöste Edukt **4** mit einer frisch angesetzten 1 M Lösung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in Dioxan versetzt. Nach 20minütigem Rühren bei RT wurde die ebenfalls frisch angesetzte Pyrophosphatlösung zugegeben und weitere 30 min gerührt. Anschliessend wurde im dritten Schritt der Reaktion der dreiwertige Phosphor mittels einer 1%igen Iodlösung oxidiert und das zyklische Triphosphat geöffnet. Nach 20minütigem Rühren bei RT wurde das überschüssige Iod mittels einer 5%igen wässrigen NaHSO₃-Lösung reduziert (Abb. 54). Die Lösungsmittel wurden anschliessend am Stickstoffrotations-

verdampfer bei höchstens 30 °C abgezogen, um die Zersetzung des Triphosphats zu vermeiden. Der feste Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, durch einen Sterilfilter gedrückt, um kleinste ungelöste Bestandteile zu entfernen, und bei niedriger Temperatur lyophilisiert.

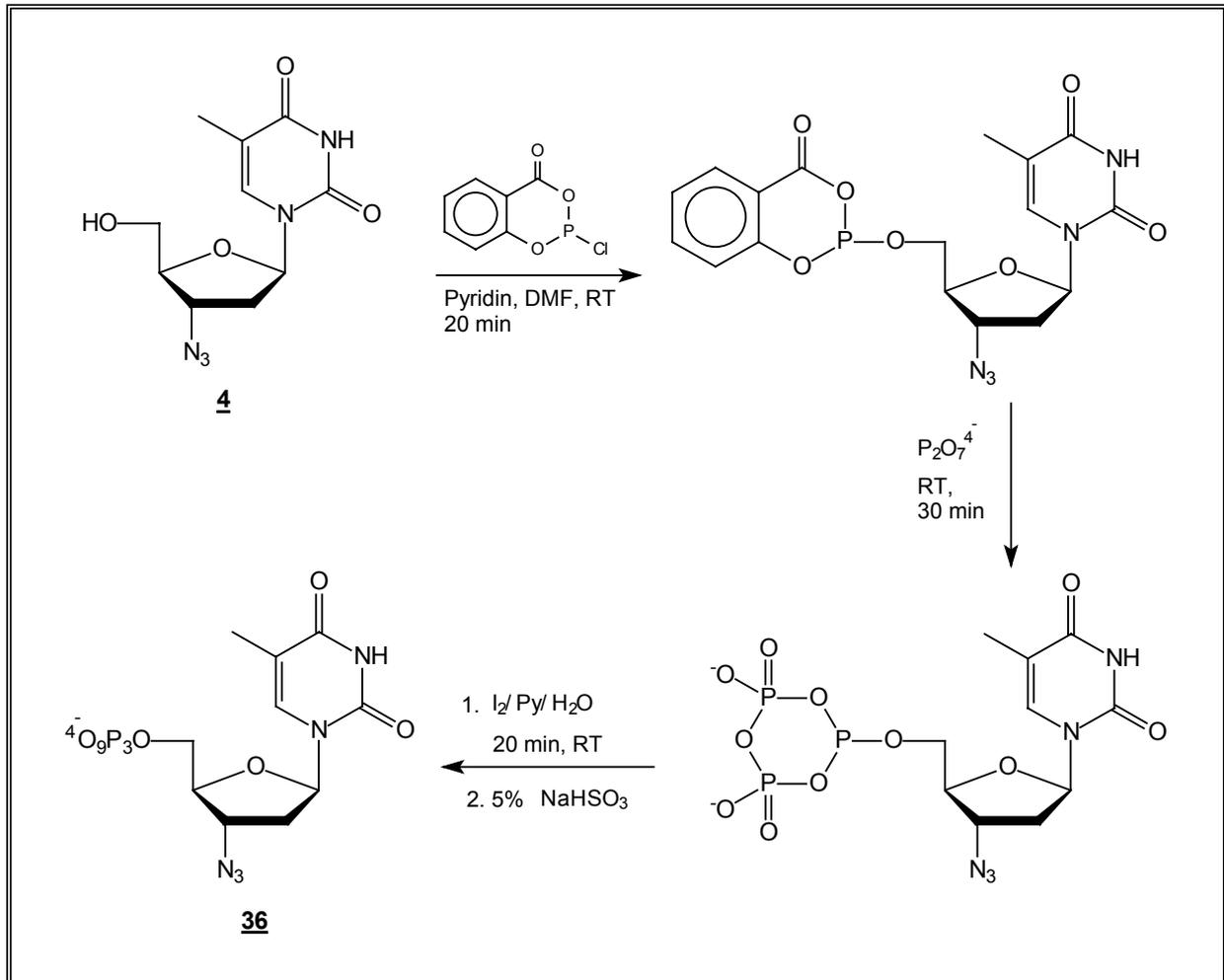


Abb. 54: Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **35**

Die Aufreinigung aller Triphosphate erfolgte mittels FPLC und im Anschluss daran mittels HPLC. Die genauen Aufreinigungsprotokolle werden in Kapitel 4.5 beschrieben. Nach FPLC-Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt 3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **36** mit 30 %iger Ausbeute isoliert werden. Eine Aufreinigung mittels HPLC entfiel in diesem Fall, da die sofortige Umsetzung zum entsprechenden 3'-Amin erfolgte.

Die vielfältigen Möglichkeiten der Azidreduktion wurden bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. In diesem Fall wurde die für Triphosphate häufig eingesetzte Staudinger-Reduktion durchgeführt. Dazu wurde das Edukt 3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat

36 in Pyridin gelöst und mit Triphenylphosphin versetzt. Nach 12stündigem Rühren bei RT wurde dem Ansatz konz. Ammoniak zugegeben und weitere 3 Stunden bei RT gerührt. Anschliessend wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und sterilfiltriert. Nach anschliessender Aufreinigung des Rohprodukts 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **37** mittels FPLC und HPLC konnte das Produkt in 42 %iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 55).

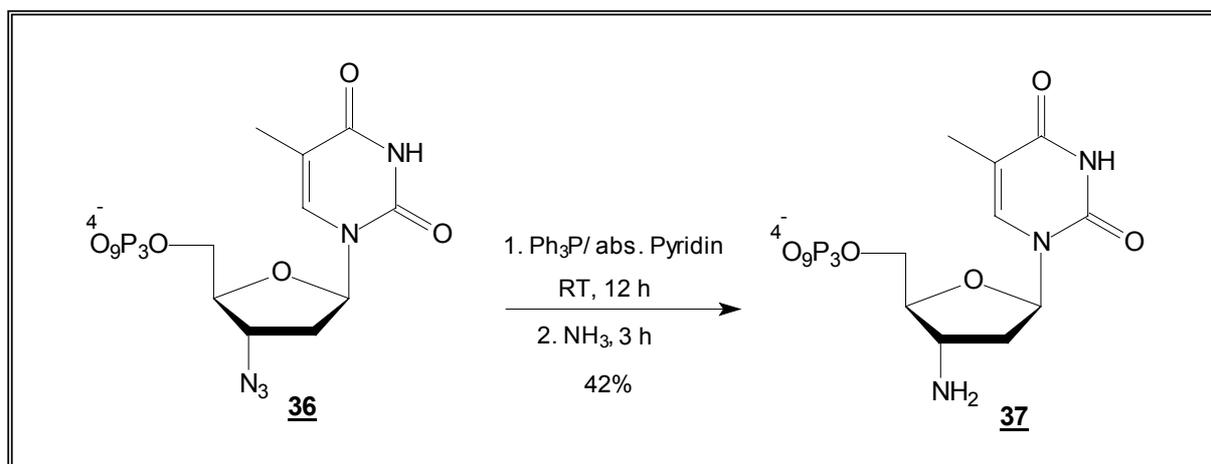


Abb. 55: Synthese von 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **37** nach Staudinger (Staudinger, 1919)

4.3 Synthese von FITC gelabeltem Produkt 3'-[[6-Amino-1-thiohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat

Ausgangsverbindung für die 3'-Thioamid-Triphosphatsynthese war 3'-Desoxy-3'-[[6-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-1-thiohexyl]amino}thymidin **16**. Die Reaktion wurde nach Ludwig-Eckstein analog zur Synthese des 3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **36** durchgeführt. Nach Aufreinigung mittels FPLC konnte das gewünschte Produkt 3'-Desoxy-3'-[[6-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-1-thiohexyl]amino}thymidin-5'-triphosphat **38** mit 19 %iger Ausbeute und in zufriedenstellender Reinheit isoliert werden. Die Charakterisierung der neuen Verbindung erfolgte mittels ESI-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie (Abb. 64 und 73).

Im nächsten Schritt folgte die Entschützung der Aminofunktion des Linkers. Dazu wurde 3'-Desoxy-3'-[[6-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-1-thiohexyl]amino}-

thymidin-5'-triphosphat **38** in einem Gemisch aus Pyridin, DMF und Piperidin gelöst und der Reaktionsansatz eine Stunde bei RT gerührt. Danach wurden die Lösungsmittel am Stickstoffrotationsverdampfer bei niedrigen Temperaturen abgezogen, der feste Rückstand in Wasser aufgenommen, sterilfiltriert und lyophilisiert.

Die anschließende Aufreinigung mittels FPLC und HPLC ergab das gewünschte Produkt 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** in sehr guter Reinheit und 81 %iger Ausbeute. Die Analytik erfolgte mittels ESI-Massenspektrometrie, ^1H -, ^{13}C und ^{31}P -NMR-Spektrometrie (Abb. 65, 74, 77 und 78).

Das so synthetisierte Triphosphat **39** wurde dann an der Aminofunktion des Linkers mit Fluorescein gelabelt. Dazu wurde 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** in NaHCO_3 -Lösung (pH = 9,3) gelöst und in DMF gelöstes Fluoresceinisothiocyanat zugegeben. Der Reaktionsansatz rührte 24 Stunden und wurde anschliessend mittels HPLC aufgereinigt, wobei das Produkt in 40 %iger Ausbeute isoliert werden konnte (Abb. 56). Die Analytik erfolgte in diesem Fall mittels ESI- und MALDI-Massenspektrometrie (Abb. 66 und 67).

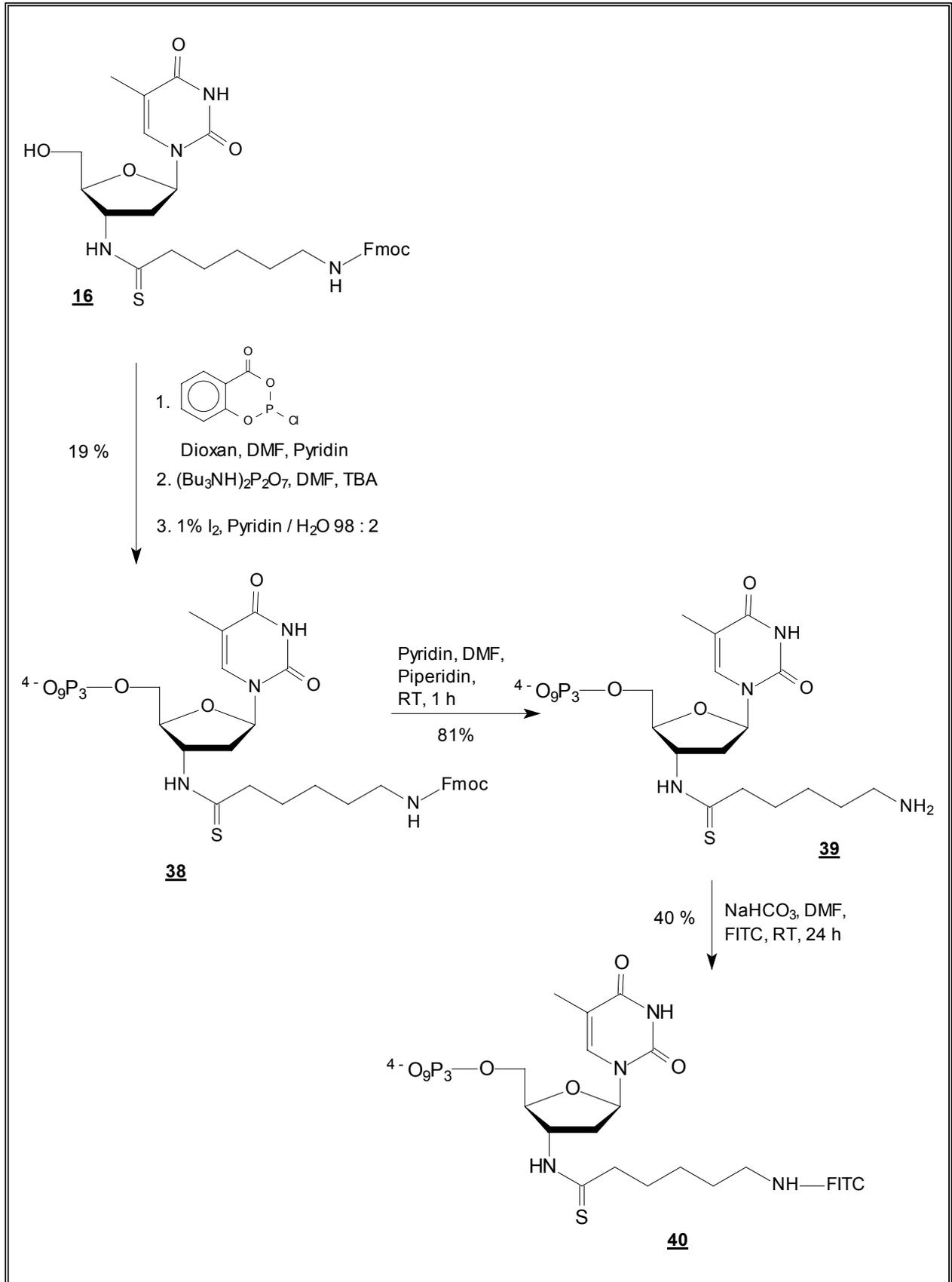


Abb. 56: Synthese fluoresceingelabelten 3'-Thioamido-Terminators

4.4 Synthese des 2-Valeriansäurenitril-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphats und des FITC gelabelten 2-Pentylamin-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphats

Ausgangsverbindung für die Synthese des 2-Valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphats **41** war das 2-Valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin **32**. Die Reaktion wurde wiederum nach Ludwig-Eckstein analog zur Synthese des 3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **36** durchgeführt. Nach Aufreinigung mittels FPLC und HPLC konnte das gewünschte Produkt 2-Valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphats **41** mit 30 %iger Ausbeute und in zufriedenstellender Reinheit isoliert werden (Abb. 57). Die Charakterisierung der neuen Verbindung erfolgte mittels ESI-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie (Abb. 75).

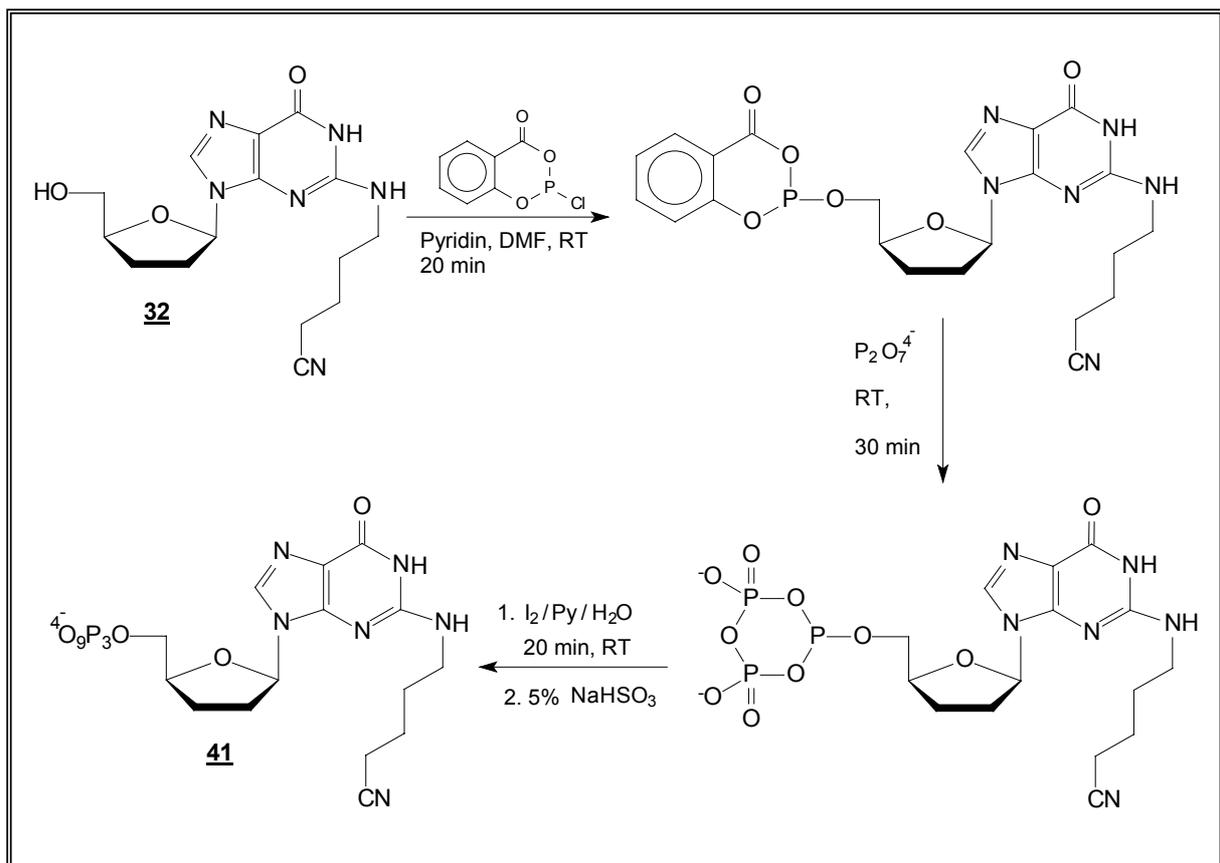


Abb. 57: Synthese des 2-Valeronitril-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphats **41**

Ausgangsverbindung für die Synthese des 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphats **42** war das 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **35**. Zunächst erfolgte erneut die Umsetzung zum Triphosphat nach Ludwig-Eckstein. Die Aufreinigung des Produkts wurde lediglich mittels FPLC durchgeführt, da anschliessend unmittelbar die Reduktion der Azidfunktion folgte. 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **42** konnte in 48 %iger Ausbeute - allerdings mit leichten Verunreinigungen - isoliert werden (Abb. 58). Die Charakterisierung erfolgte mittels ESI-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie (Abb. 68).

Für die folgende Reduktion der Azidfunktion wurde wiederum die für Triphosphate besonders geeignete Staudinger-Reduktion durchgeführt. Dazu wurde 2-Pentylazid-2',3'-dideoxy-guanosin-5'-triphosphat **42** in absolutem Pyridin gelöst und Triphenylphosphin zugegeben. Nach zwölfstündigem Rühren bei RT erfolgte die Zugabe von Ammoniak. Nach weiterem dreistündigem Rühren bei RT wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand sterilfiltriert und lyophilisiert. Nach Aufreinigung mittels FPLC und HPLC konnte das Produkt 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **43** in 40 %iger Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit isoliert werden. Die Analytik des Produkts erfolgte mittels ESI-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie (Abb. 70 und 76).

Die anschliessende Umsetzung mit Fluoresceinisothiocyanat erfolgte analog zur Darstellung des 3'-Thioamido-Terminators **40**. Die Aufreinigung wurde direkt mittels Anionenaustauscher-HPLC durchgeführt. Das Produkt **44** konnte in 50 %iger Ausbeute isoliert und mittels MALDI-Massenspektrometrie charakterisiert werden (Abb. 71).

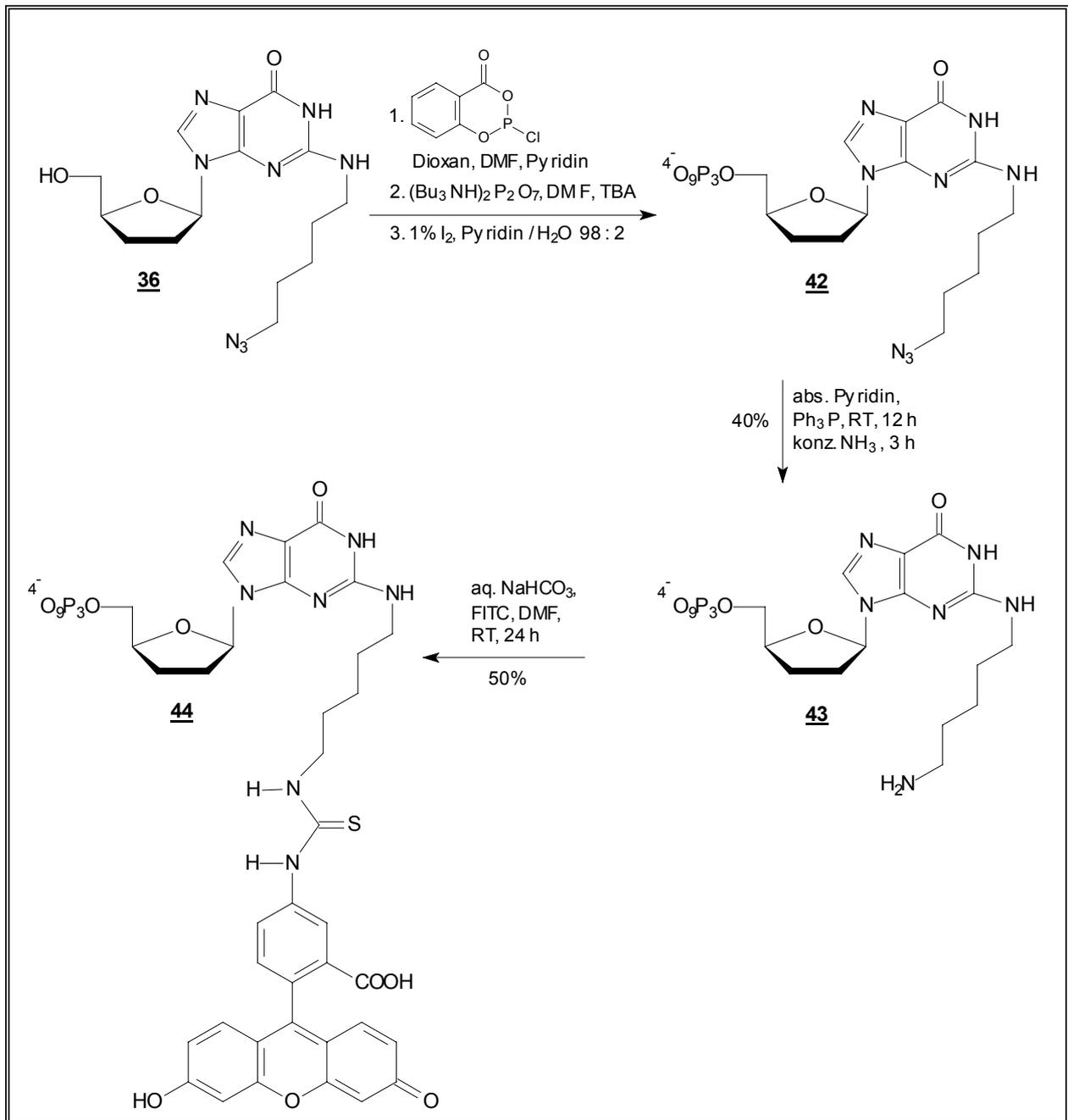


Abb. 58: Synthese von Fluorescein gelabeltem 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **44**

4.5 Aufreinigung der Nukleosidtriphosphate

4.5.1 FPLC-Aufreinigung

Die Rohprodukte jeder durchgeführten Triphosphatsynthese enthalten mehrere sowohl polare als auch geladene Verunreinigungen. Neben dem nicht umgesetzten Edukt, den Reaktanden und dem Produkt kann das unaufgereinigte Reaktionsgemisch das Mono- und Diphosphat des Nukleosids, Pyrophosphat und verschiedene anorganische Polyphosphate enthalten. Ausserdem ist die Entstehung von phosphatverbrückten Dinukleosiden denkbar. Aufgrund der starken Wechselwirkungen, die diese verschiedenen Komponenten mit Kieselgel eingehen, ist eine Aufreinigung mittels Kieselgelsäulenchromatographie nicht möglich. Die Triphosphate würden am Trennmateriale haften bleiben, und es könnte kein Trenneffekt zustande kommen. Schon die ersten, 1949 durchgeführten Isolationsversuche für Triphosphate nutzten Ionenaustauschverfahren (Michelson, 1949). Heute stellt die Anionenaustausch-chromatographie das Verfahren der Wahl zur Aufreinigung von Triphosphaten dar. Sie trennt negativ geladene Moleküle in Abhängigkeit ihrer Ladungszahl. So werden Mono-, Di- und Triphosphate aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladung getrennt. Ausserdem sollte eine Trennmatrix verwendet werden, die neben ihrer Trennfähigkeit nach Ladungszahl auch Moleküle verschiedener Grösse trennt. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Trennmaterialien gearbeitet. Das zuerst verwendete Material DEAE Sephadex A-25 von Pharmacia führte zu relativ guten Trennergebnissen geringer Mengen an Triphosphaten. Das später verwendete Material DEAE Sepharose Fast Flow von Pharmacia erlaubte eine wesentlich höhere Beladung der Säule und erzielte dabei sehr gute Trennleistungen.

Bei der FPLC-Reinigung aller hergestellten Triphosphate wurde analog verfahren. Zunächst wurden die Lösungsmittel des Reaktionsansatzes vollständig am Stickstoffrotationsverdampfer abgezogen, um eine Beeinflussung der Laufeigenschaften durch diese zu verhindern. Anschliessend wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit einer Spritze durch einen 0,2 mm Sterilfilter gepresst. Auf diese Weise konnten wasserunlösliche Bestandteile, vor allem das Edukt, vor der eigentlichen Chromatographie entfernt werden. Als Laufmittel wurde ein Gradient aus 0,05 M und 1 M wässriger TEAB-Lösung verwendet. Der pH-Wert wurde vor jeder Chromatographie auf 7,5 bis 8 eingestellt. Ein pH-Wert über 8

gewährleistet keinen ausreichenden Carbonatgehalt der Lösung, wodurch sich die Laufeigenschaften deutlich verändern können. Der Gradient muss in der Regel für jedes Triphosphat getestet und gegebenenfalls neu optimiert werden. Die Herstellung des TEAB-Puffers ist sehr zeitaufwendig, und der Carbonatgehalt sinkt in der Regel innerhalb weniger Tage unter sein Optimum. Aus diesem Grund müssen die Pufferlösungen ständig durch CO₂-Einleitung aufgefrischt werden. Eine direkte Verwendung eines frisch durch CO₂ begasten Puffers ist wenig empfehlenswert, da er während der Chromatographie wieder leicht entgast, was die Packung des Säulenmaterials beeinträchtigt und dazu führen kann, dass keine Trennung mehr möglich ist. Die Probleme der Entgasung können umgangen werden, indem man eine entsprechend höher konzentrierte Pufferlösung begast und anschliessend bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

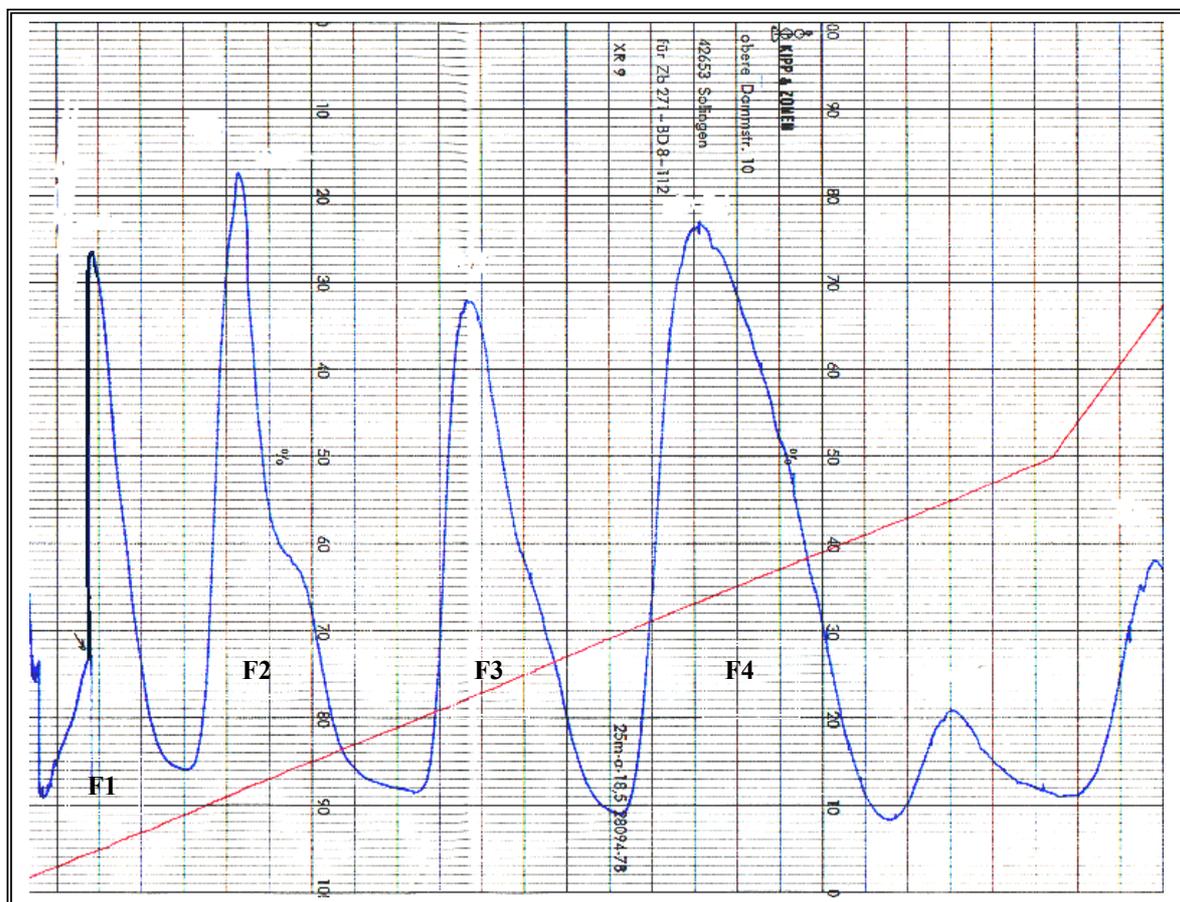


Abb. 59: Anionenaustausch-FPLC der Synthese von 3'-Azido-3'-dideoxythymidin-5'-triphosphat **36**. Trennmateriale: DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia). F4 = 3'-Azido-3'-dideoxythymidin-5'-triphosphat **36**; F3 = 3'-Azido-3'-dideoxythymidin-5'-diphosphat. Das Chromatogramm zeigt, dass Di- und Triphosphat (F3 und F4) durch das gewählte Verfahren praktisch basisliniengetrennt gereinigt werden können. F1 und F2 sind jeweils Gemische aus Edukt, Reaktanden und Nebenprodukten.

Die offensichtlichen Nachteile, die die Verwendung des TEAB-Puffers mit sich bringt, können leider nicht durch Verwendung von Chlorid als Gegenion umgangen werden, da es dabei auf der Säule zum Abbau des Triphosphats kommt (Moffat, 1964). Ein weiterer Vorteil des Triethylammoniumbicarbonat-Gegenions ist natürlich auch die Tatsache, dass es durch Vakuum weitestgehend entfernt werden kann.

4.5.2 HPLC-Aufreinigung

Jedes hergestellte Triphosphat, das zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde im Anschluss an die FPLC-Reinigung per HPLC gereinigt. Die übliche Verfahrensweise nach der FPLC-Reinigung ist die mehrmalige Coevaporation des Triphosphats mit Ethanol bis zur Gewichtskonstanz. Auf diese Weise soll der überschüssige Triethylammoniumbicarbonatpuffer entfernt werden. Wurde die Ausbeute der Triphosphate jedoch mittels Messung der optischen Dichte bestimmt, war sie niedriger als beim Wiegen der Substanzen. Diese Ausbeutedifferenz ist auf den nicht vollständig entfernten Puffer zurückzuführen. Der nach der Coevaporation noch vorhandene Überschuss an Triethylammonium konnte ebenfalls in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Triphosphate anhand der unterschiedlichen Integralverhältnisse zwischen Nukleosid und Triethylammonium erkannt werden.

Je nach Polarität des Triphosphats und Aufreinigungsbedingungen kann es vorkommen, dass überschüssiges Pyrophosphat oder andere Nebenprodukte nicht vollständig mittels FPLC abgetrennt werden können.

Eine Aufreinigung mittels HPLC ist aus diesen Gründen zur Generierung eines reinen Triphosphats unerlässlich. Zunächst wurden die FPLC-gereinigten, lyophilisierten Triphosphate über eine Synchronpac-Säule mit Anionenaustauscher aufgereinigt. Als Laufmittel diente eine 0,05M KH_2PO_4 -Lösung (pH = 5,5; 50 % Formamid) mit einem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten. Mit diesem Verfahren wurde eine sehr gute Trennleistung erzielt, auch bei Überladung der Säule. Im Anschluss daran wurde das Produkt mittels einer RP-HPLC entsalzt und das Formamid entfernt. Abbildung 60 zeigt beispielhaft das HPLC-Chromatogramm von **43** nach Aufreinigung über die Synchronpac-Anionenaustauscher-Säule. Zur Aufreinigung der FITC-gelabelten Triphosphate wurde die Reaktionslösung sofort auf die Synchronpac-Säule aufgespritzt und die einzelnen Fraktionen massenspektrometrisch untersucht. Das HPL-Chromatogramm von **40** zeigte 5 verschiedene Fraktionen (Abb. 61). Das gewünschte Produkt war in Fraktion 5 enthalten. Zur leichteren Identifikation wurde neben der UV-Detektion auch die Fluoreszenzdetektion verwendet.

Bei der Verdünnung des Reaktionsansatzes zur Darstellung von **44** fiel ein Niederschlag aus, der abzentrifugiert und in Acetonitril gelöst wurde. Im Überstand konnte kein Produkt festgestellt werden. Der aufgelöste Rückstand enthielt fast reines Produkt **44**, das mittels MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte (Abb. 62 und 63).

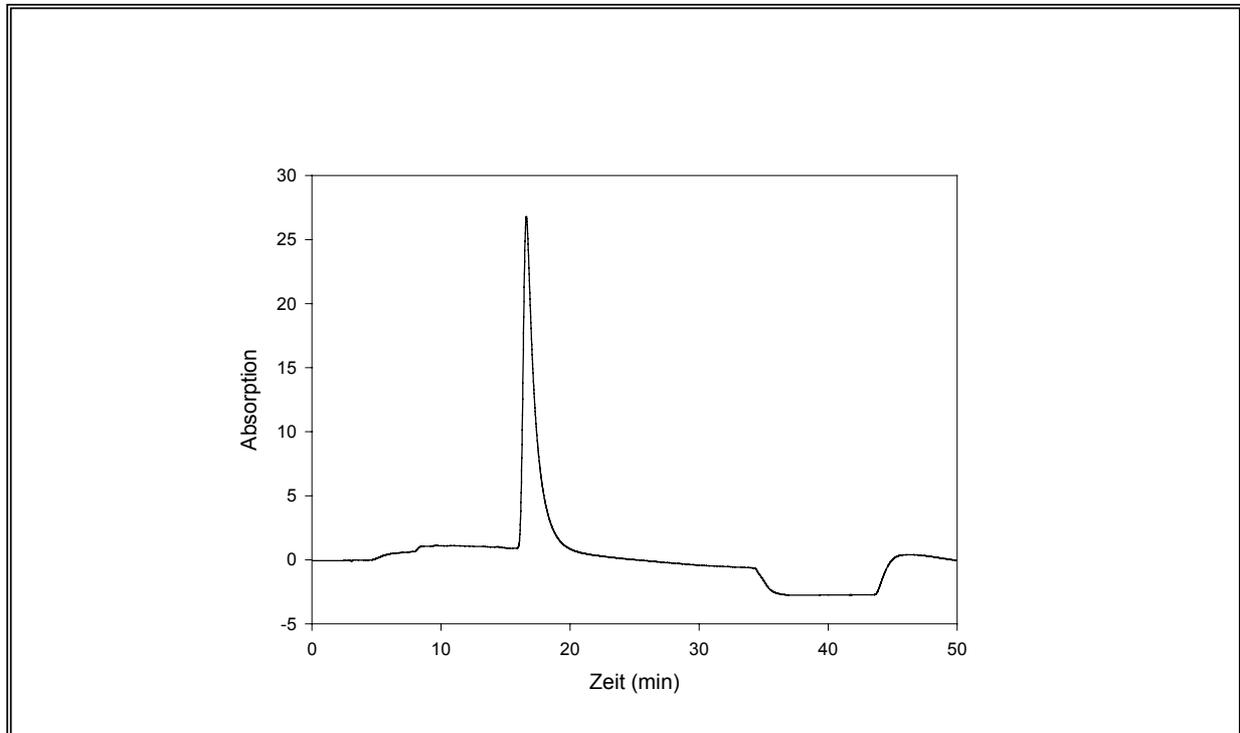


Abb 60: HPL-Chromatogramm von 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **43** nach Aufreinigung mittels Anionenaustausch-HPLC

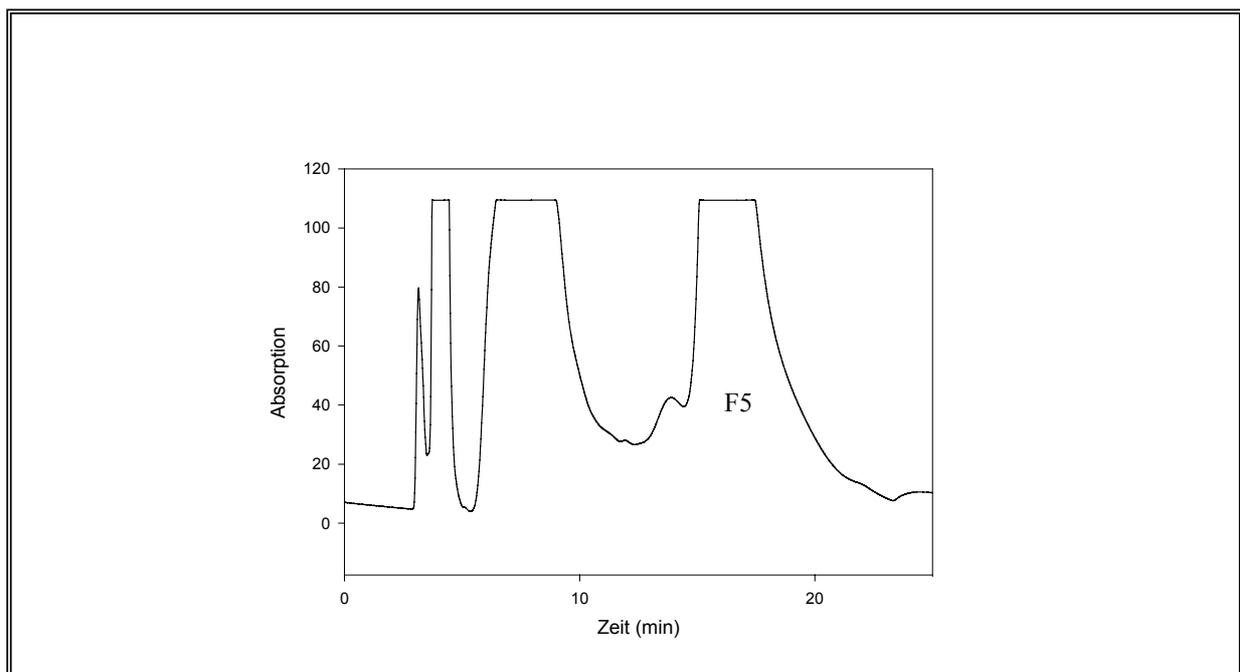


Abb. 61: HPL-Chromatogramm der Aufreinigung von **40** (UV-Kanal); F5 enthält das gewünschte Produkt

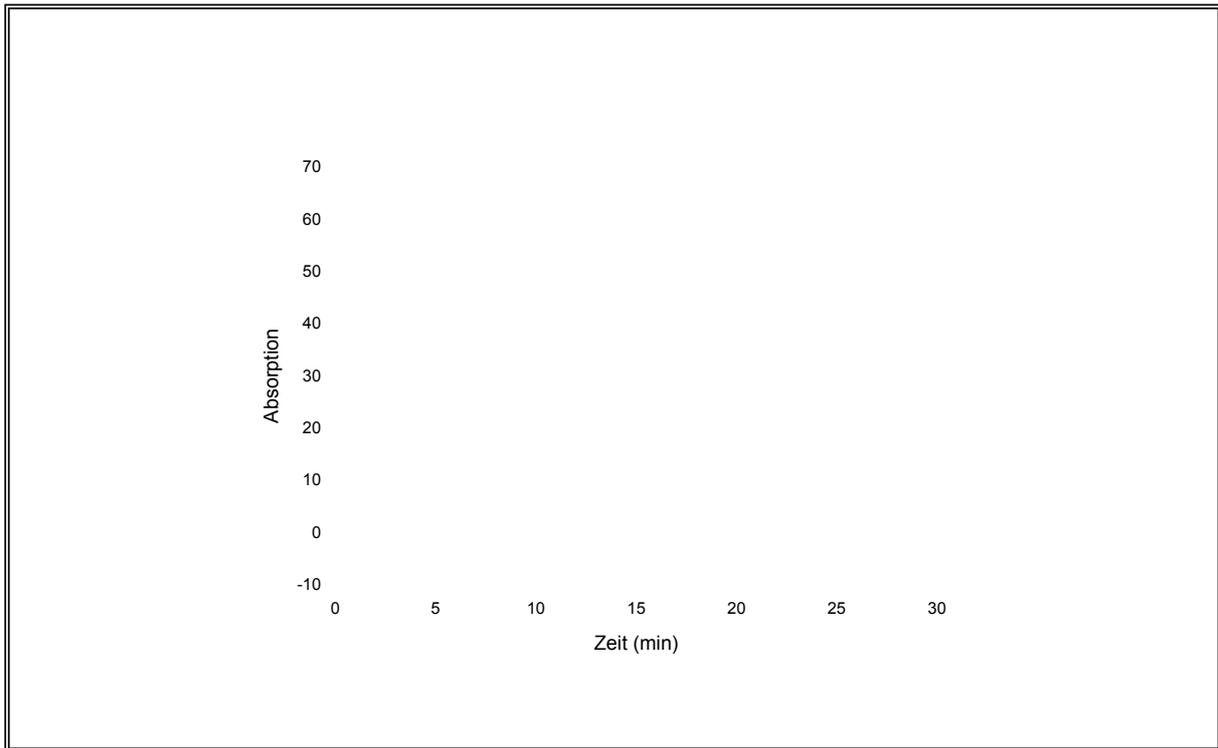


Abb. 62: RP-HPL-Chromatogram des Peaks 5 der Anionenaustauscher-HPLC von **40**

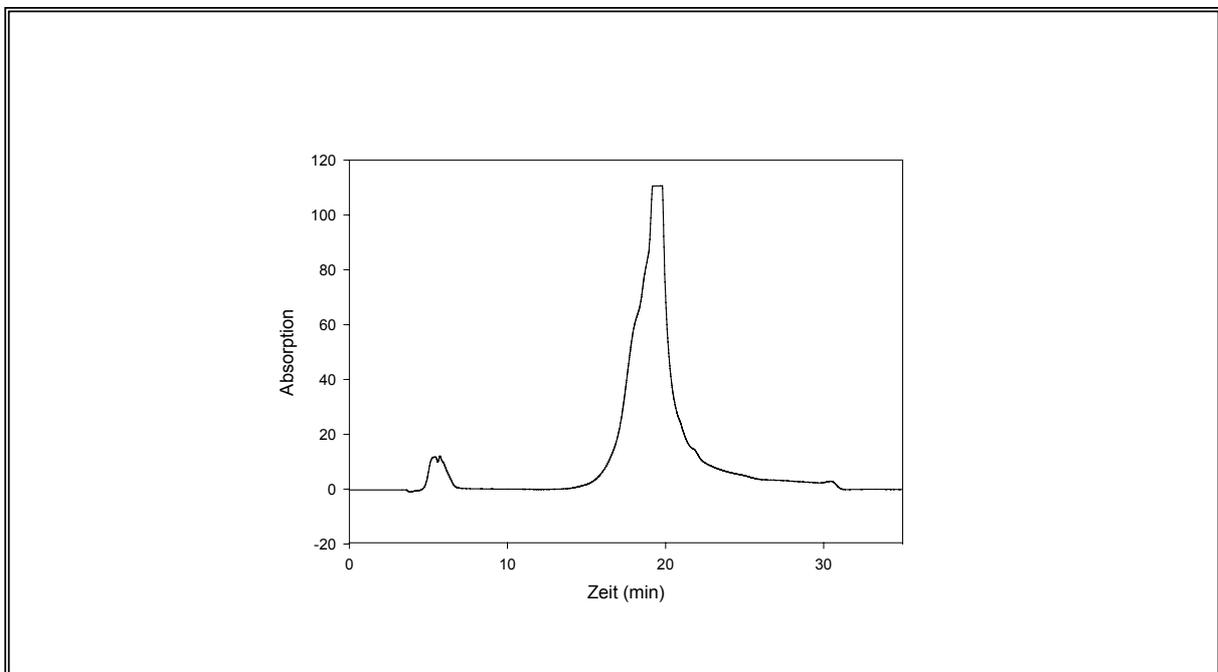


Abb. 63: HPL-Chromatogram der Aufreinigung von **44** (Fluoreszenzkanal)

4.5.3 Analytik der Triphosphate

4.5.3.1 Massenspektrometrie

Zur Massenspektrometrie von Triphosphaten müssen die entsprechenden Verbindungen besonders rein sein. Bereits kleinste Verunreinigungen können dazu führen, dass der Molpeak nicht mehr erkennbar ist. Ein Problem bei der massenspektrometrischen Analyse ist die Labilität von Triphosphaten. Durch die Ionisierungsenergie werden die Verbindungen im Laufe der Messung zerstört. Bei der Analyse von 3'-Desoxy-3'-{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}-1-thioxohexyl}amino}thymidin-5'-triphosphat **38** beispielsweise konnte man die Entstehung des Molpeaks des Diphosphats während der Messung beobachten. Je länger die Messung andauerte, desto grösser wurde die Intensität des Diphosphatpeaks (Abb. 64).

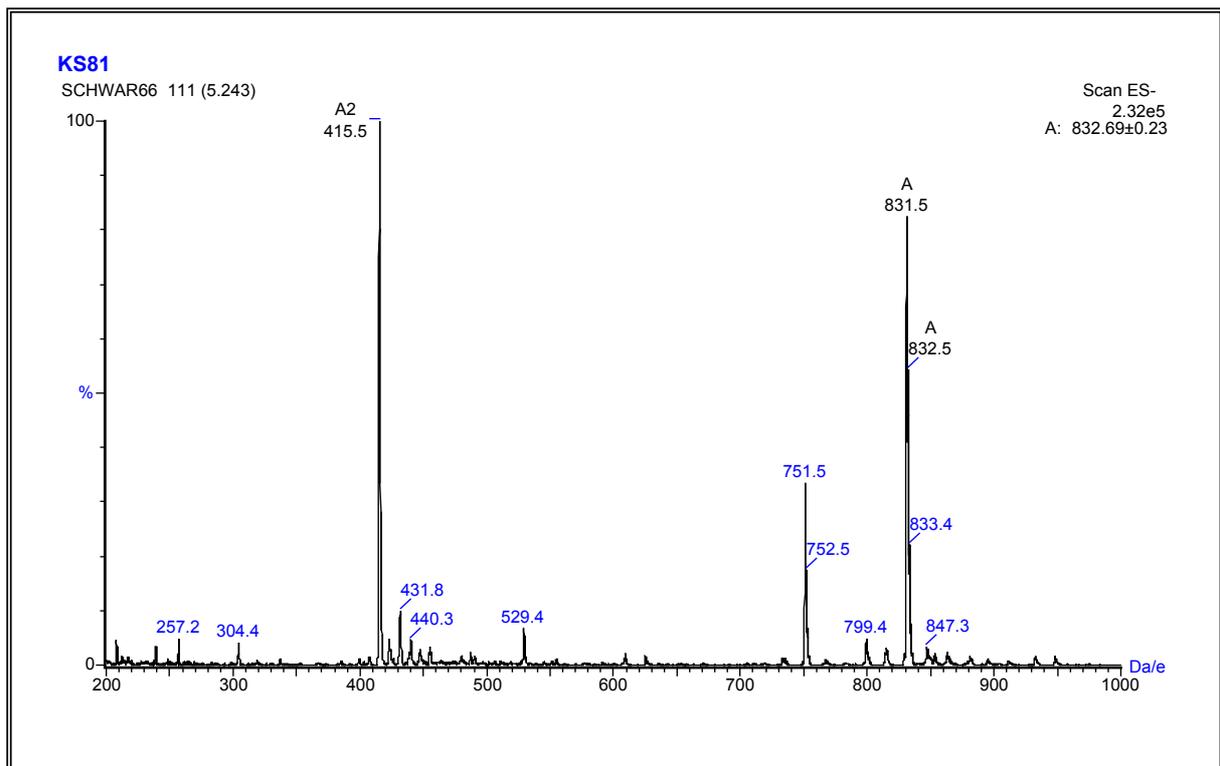


Abb. 64: ESI(-)-MS von 3'-Desoxy-3'-{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}-1-thioxohexyl}-amino}thymidin-5'-triphosphat **38**; Molpeak: $C_{31}H_{39}N_4O_{15}P_3S^-$ $m/z = [831,5]$ und $C_{31}H_{39}N_4O_{15}P_3S^{2-}$ $m/z = [415,5]$; 3'-Desoxy-3'-{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}-1-thioxohexyl}-amino}thymidin-5'-diphosphat $m/z = [751,5]$

Die exzellente Reinheit von 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** ist auch im Massenspektrum gut zu erkennen. Die Messzeit ist so kurz wie möglich gehalten worden, sodass der Molpeak des Diphosphats nur von geringer Intensität ist (Abb. 65).

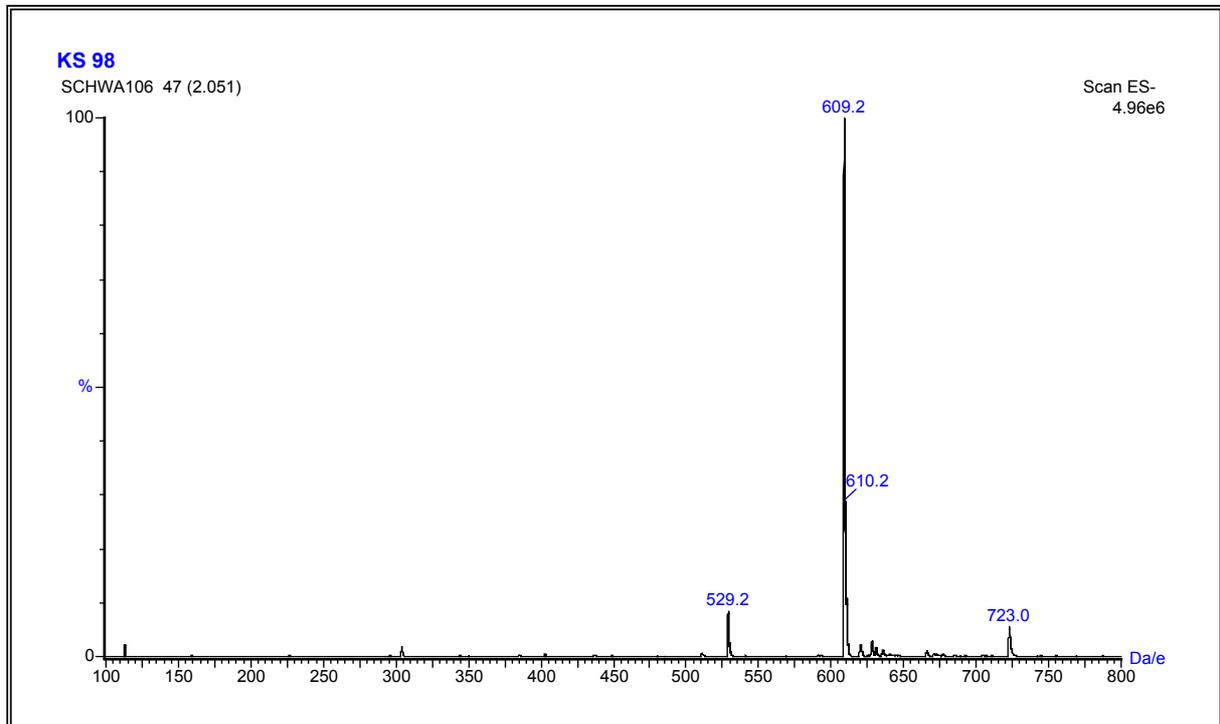


Abb. 65: ESI(-)-MS von 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** Molpeak:
 $C_{16}H_{25}N_4O_{13}P_3S^-$ $m/z = [609,2]$; 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin -5'-diphosphat
 $C_{16}H_{25}N_4O_{13}P_3S^{2-}$ $m/z = [529,2]$

Das FITC-gelabelte Thioamid-Triphosphat wurde sowohl mittels ESI- als auch mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Mit beiden Methoden wurden gute Analyseergebnisse erzielt (Abb. 66 und 67).

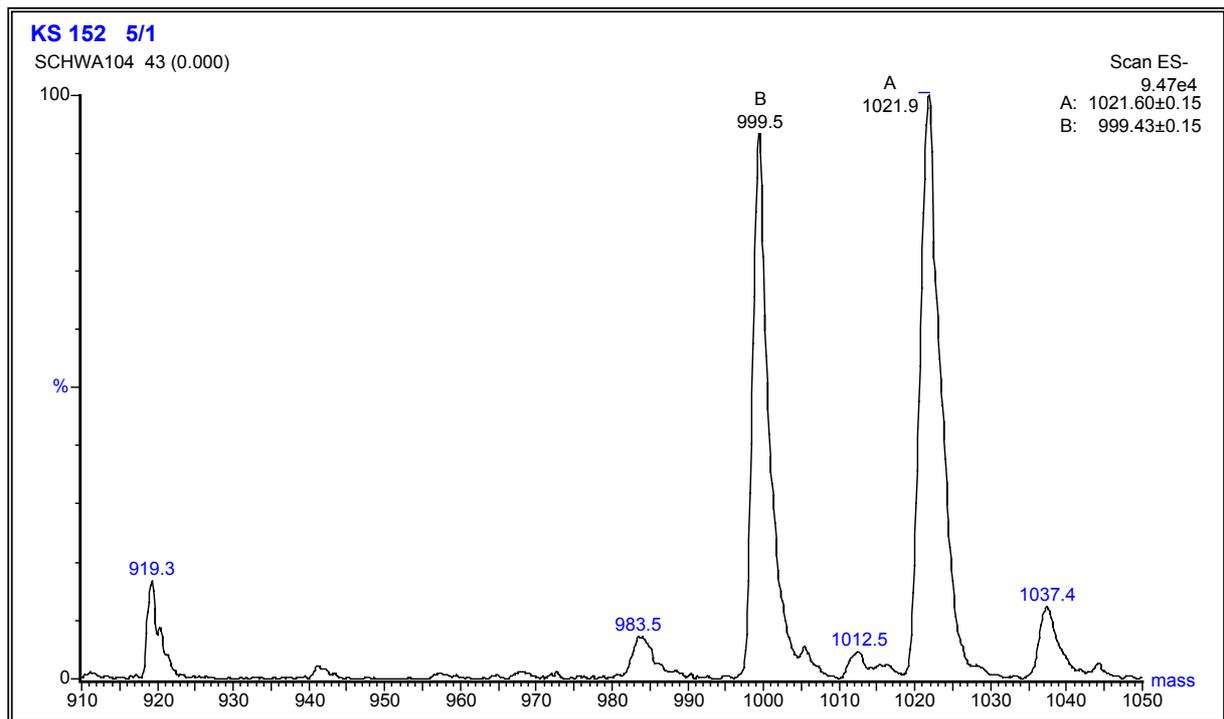


Abb. 66: ESI(-)-MS des FITC-gelabelten Thioamid-Triphosphats Molpeak: $C_{37}H_{40}N_5O_{18}P_3S_2^-$ $m/z = [999,5]$;
Peak A ist das entsprechende Na-Addukt

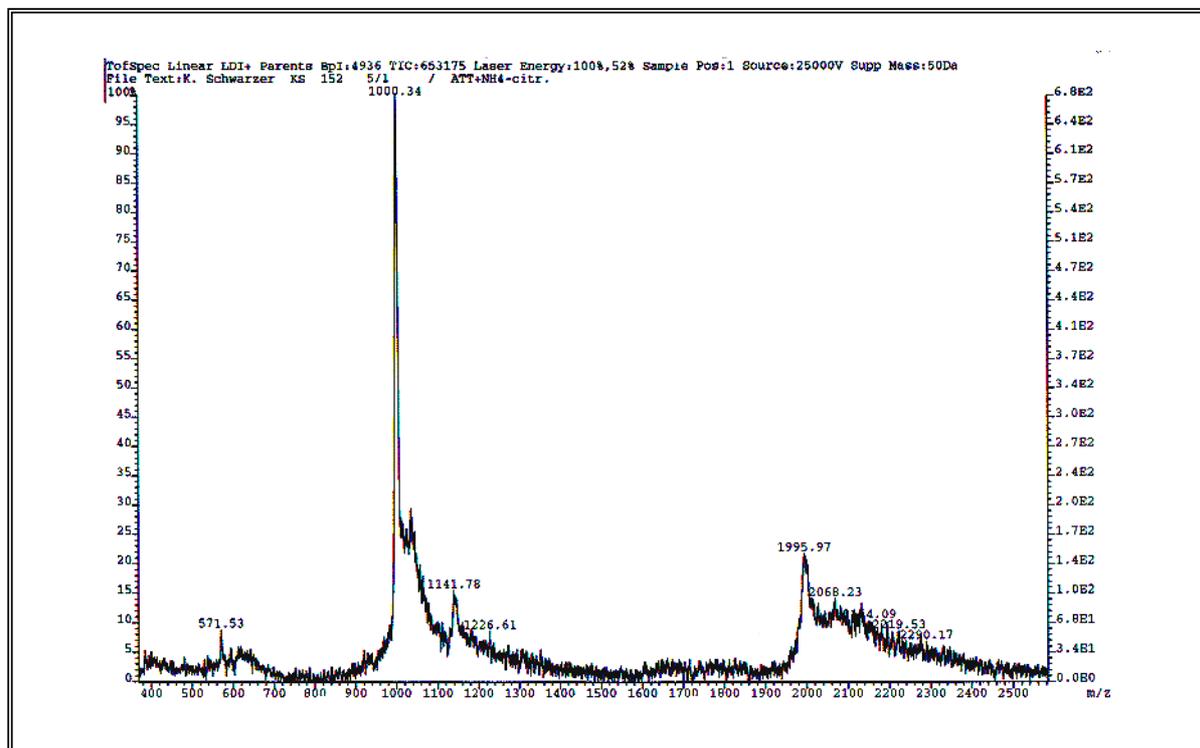


Abb. 67: MALDI-MS des FITC-gelabelten Thioamid-Triphosphats Molpeak: $C_{37}H_{40}N_5O_{18}P_3S_2$ $m/z = [1000,34]$

Auch die Massenspektren der Triphosphate des N^2 -modifizierten 2',3'-Dideoxyguanosins zeigen den bei der Messung entstehenden Diphosphatpeak und ansonsten eine zufriedenstellende Einheitlichkeit der Produkte (Abb. 68-70). Das FITC-gelabelte, N^2 -modifizierte 2',3'-Dideoxyguanosin **44** wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert (Abb. 71).

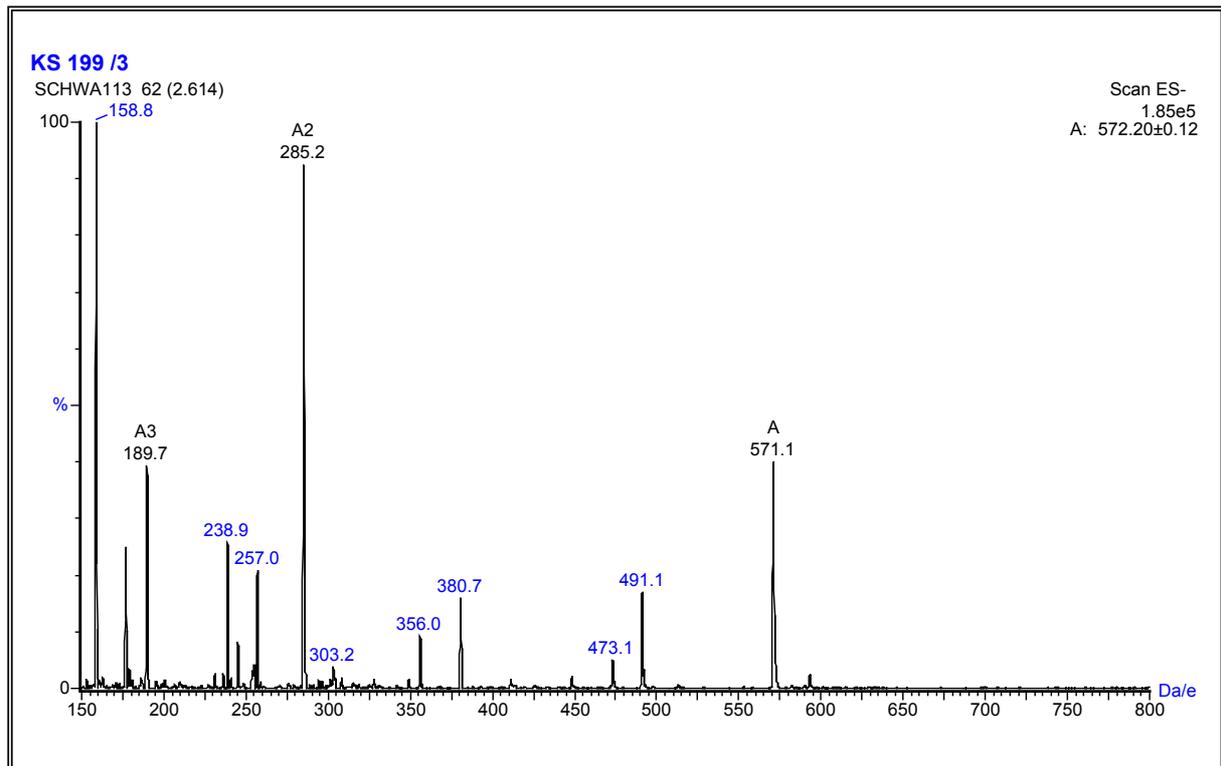


Abb. 68: ESI(-)-MS von 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **42** Molpeak: $C_{15}H_{23}N_6O_{12}P_3^-$ $m/z = [571,1]$; $C_{15}H_{23}N_6O_{12}P_3^{2-}$ $m/z = [285,2]$ und $C_{15}H_{23}N_6O_{12}P_3^{3-}$ $m/z = [189,7]$ und 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin-5'-diphosphat $C_{15}H_{23}N_6O_9P_2^-$ $m/z = [491,1]$

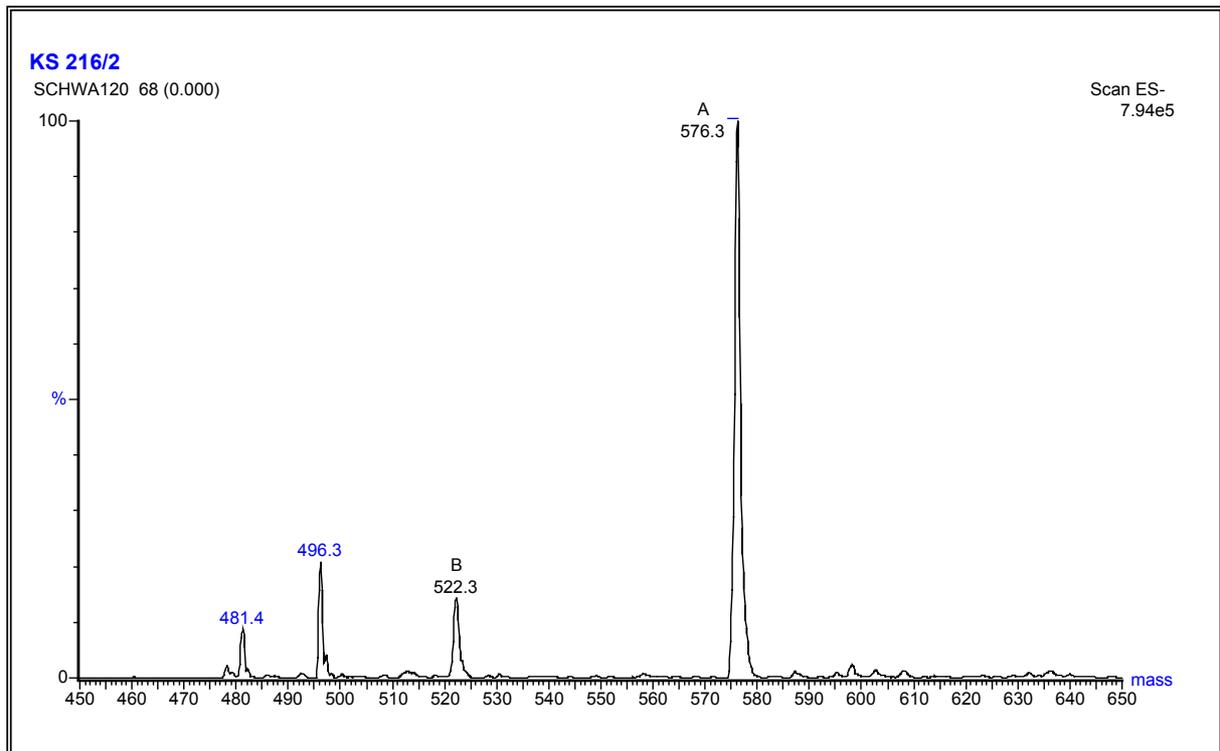


Abb. 70: ESI(-)-MS von 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **43** Molpeak:

$C_{15}H_{27}N_6O_{12}P_3^-$ $m/z = [576,3]$; 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-diphosphat

$C_{15}H_{27}N_6O_9P_2^-$ $m/z = [522,3]$

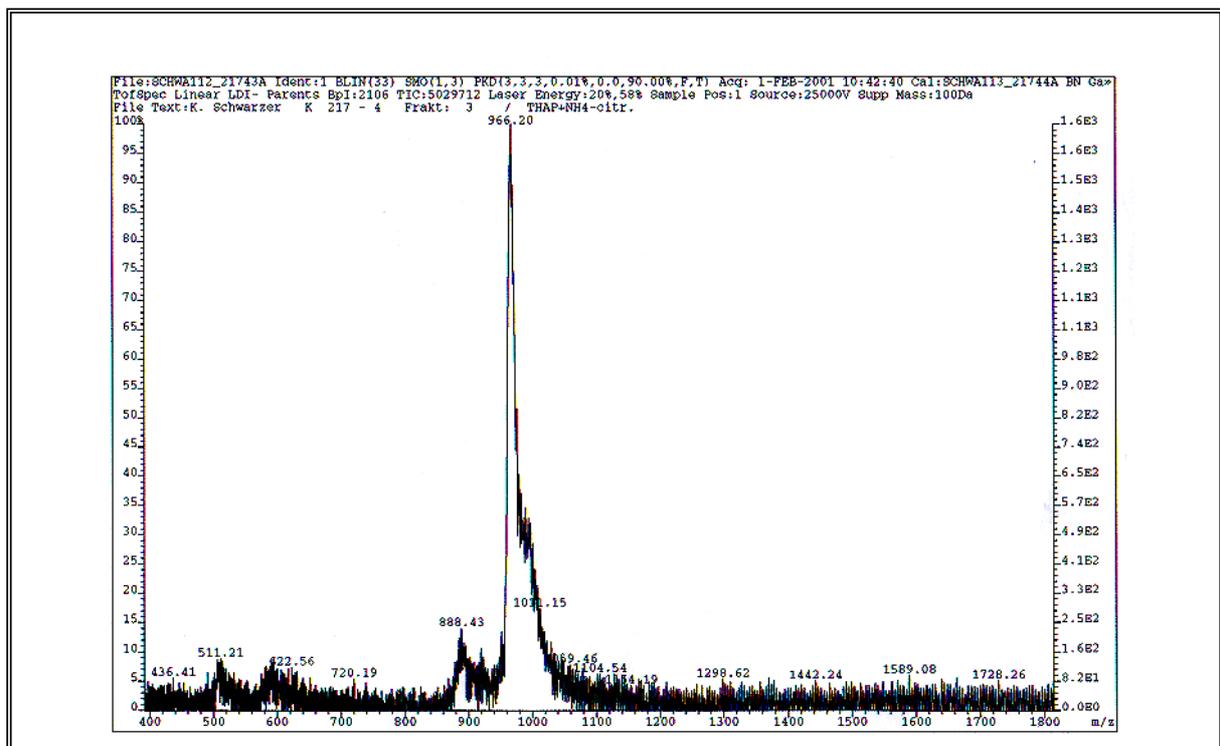


Abb. 71: MALDI-MS des FITC-gelabelten N^2 -modifizierten Dideoxyguanosin-5'-triphosphats **44**:

Molpeak: $C_{36}H_{38}N_7O_{17}P_3S$ $m/z = [966,2]$

4.5.3.2 NMR-Spektroskopie

Triphosphate können mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie identifiziert werden. Die Phosphatgruppen werden, ausgehend vom Zuckerrest, mit α , β und γ bezeichnet (Abb. 72). In D_2O findet man für den β -Phosphor, der mit zwei weiteren Phosphor-Atomen koppelt, im breitbandenkoppelten Spektrum ein Triplett bei etwa -22 ppm. Für den α -Phosphor findet man ein Dublett bei etwa -10 ppm. Das Dublett des γ -Phosphors kann in einem weiten Bereich zwischen -8 und -11 ppm auftreten. Dieser Effekt ist vermutlich auf die höhere pH-Sensitivität des endständigen Phosphats zurückzuführen. Abb. 73-76 zeigen die ^{31}P -NMR-Spektren der wichtigsten in dieser Arbeit hergestellten Nukleosidtriphosphate.

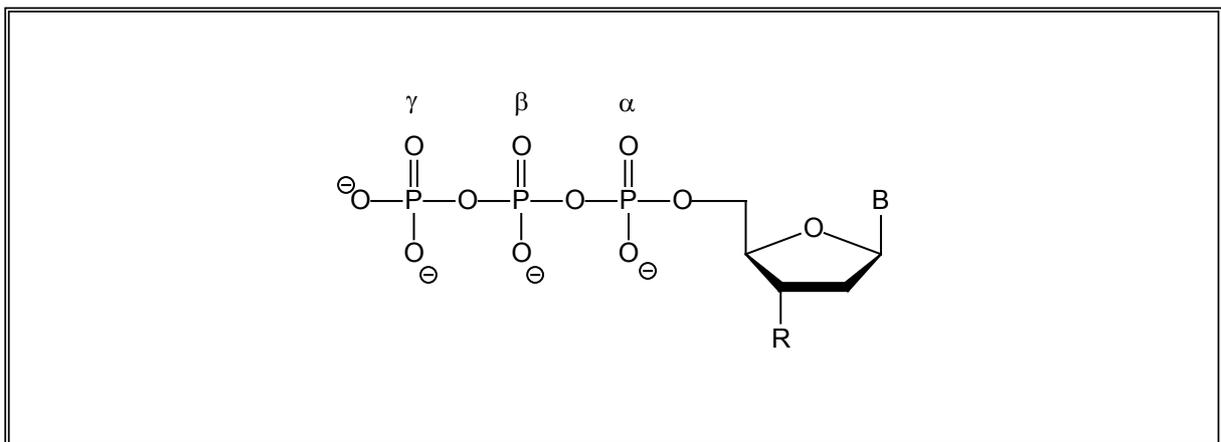


Abb. 72: Bezeichnung der Phosphat-Einheiten in Triphosphaten, B = Base, R = 3'-Modifikation oder H

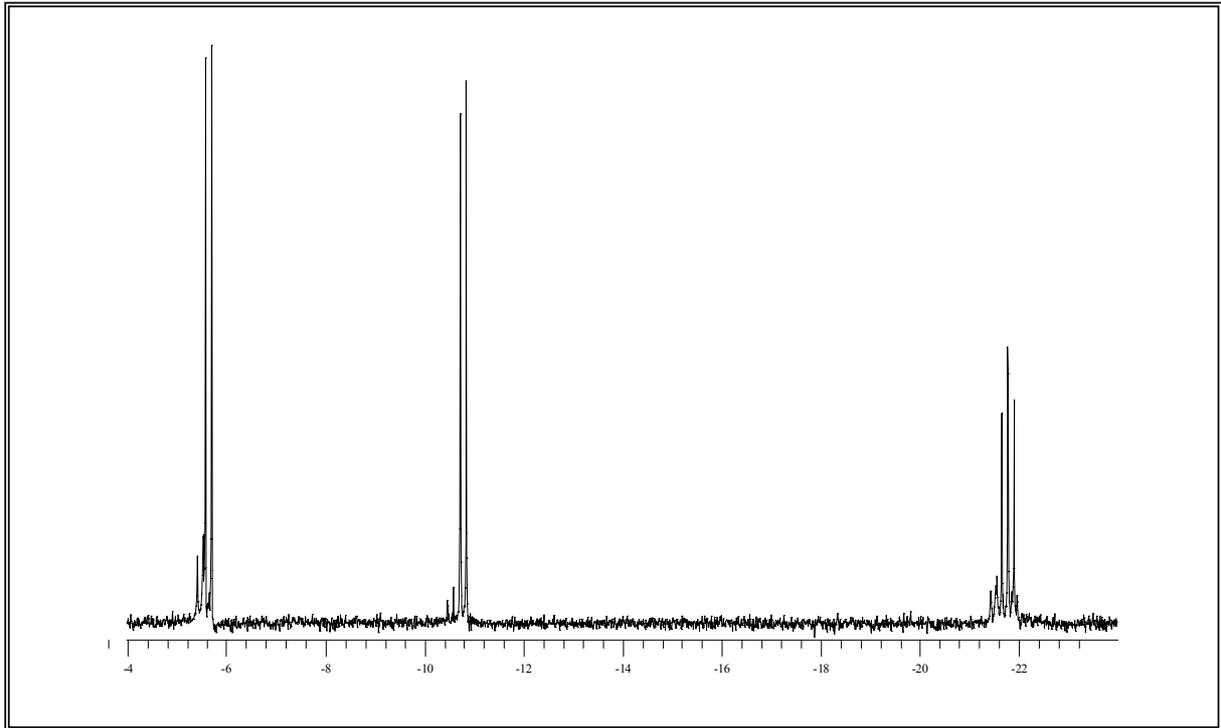


Abb. 73: ^{31}P -NMR von 3'-Desoxy-3'-{6-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}-1-thiohexyl}-amino;thymidin-5'-triphosphat **38** D_2O nach Aufreinigung durch FPLC

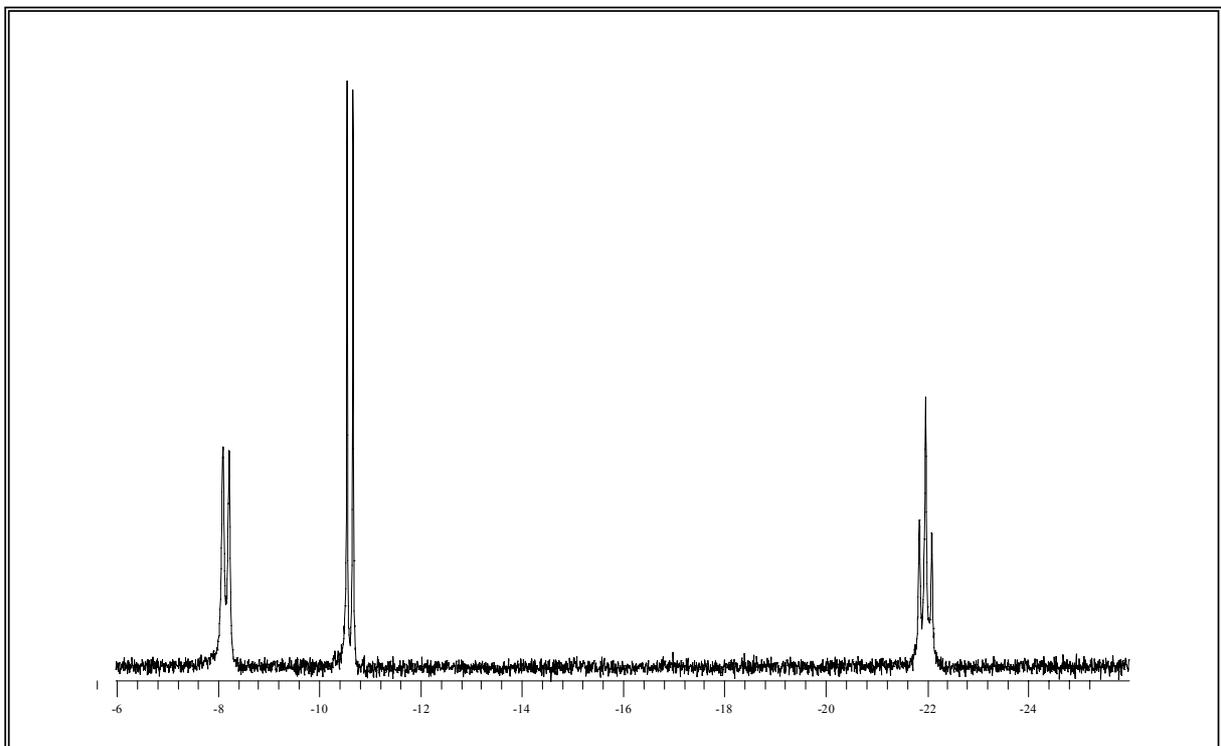


Abb. 74: ^{31}P -NMR von 3'-[[6-Amino-1-thiohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** in D_2O nach Aufreinigung durch FPLC und HPLC

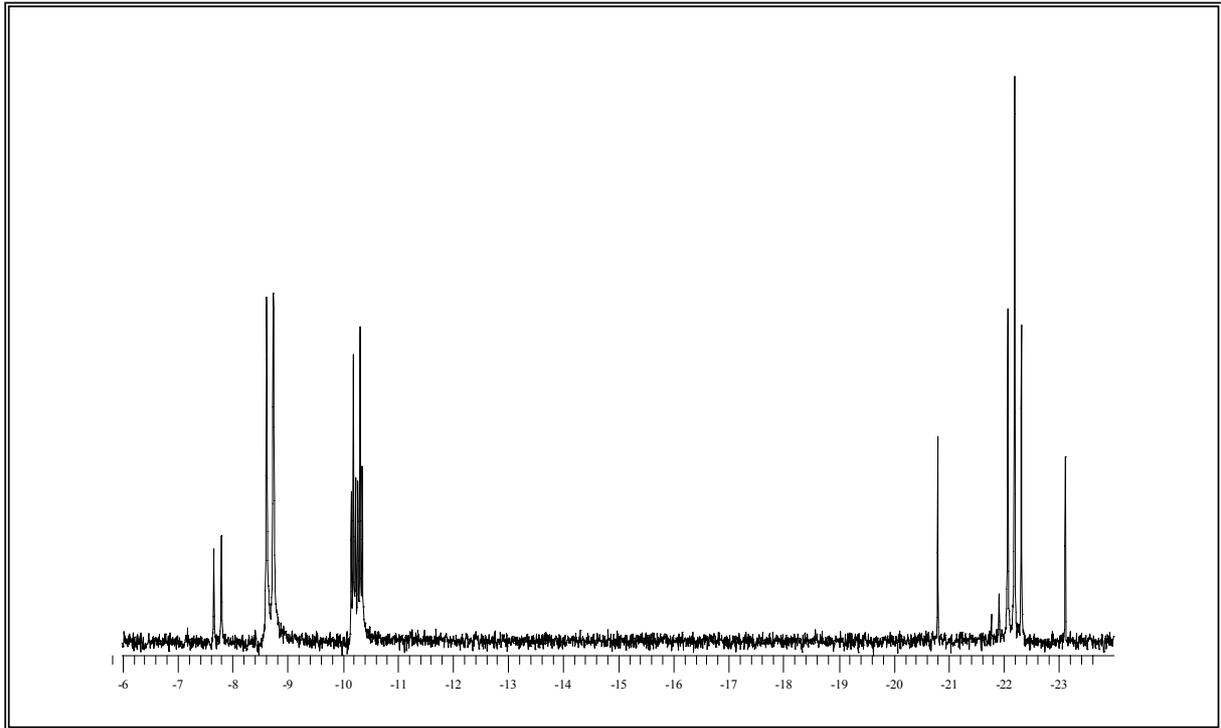


Abb. 75: ^{31}P -NMR von 2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **42** in D_2O nach Aufreinigung durch FPLC

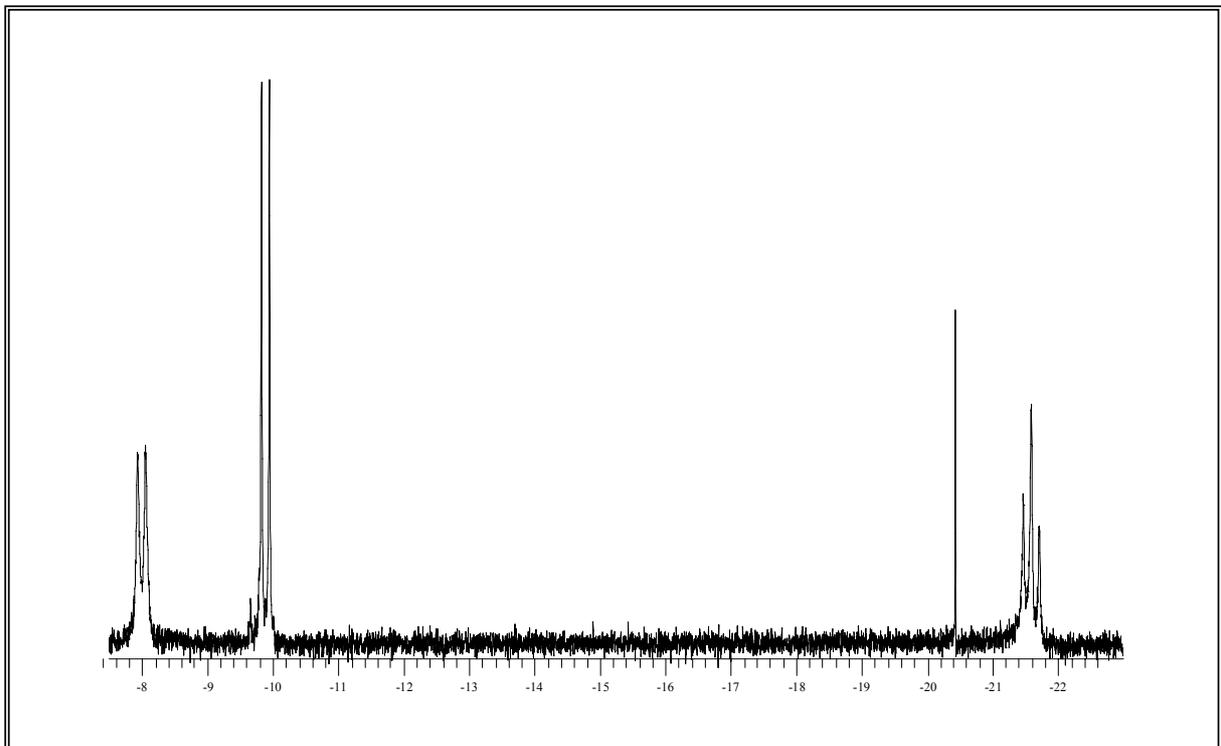


Abb. 74: ^{31}P -NMR von 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **43** in D_2O nach Aufreinigung durch FPLC

Wie schon erwähnt, ist in den ^1H -NMR-Spektren der Nukleosidtriphosphate eine variable Anzahl von Triethylammonium-Gegenionen zu erkennen. Die Spektren der Nukleotide unterscheiden sich von denen der Nucleoside ausser in den deutlich zu tiefem Feld hin verschobenen H-5' und H-5'' Signalen kaum. Gleiches gilt für die ^{13}C -NMR-Spektren. Beispielhaft sind die entsprechenden NMR-Spektren von 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** abgebildet (Abb. 77 und 78).

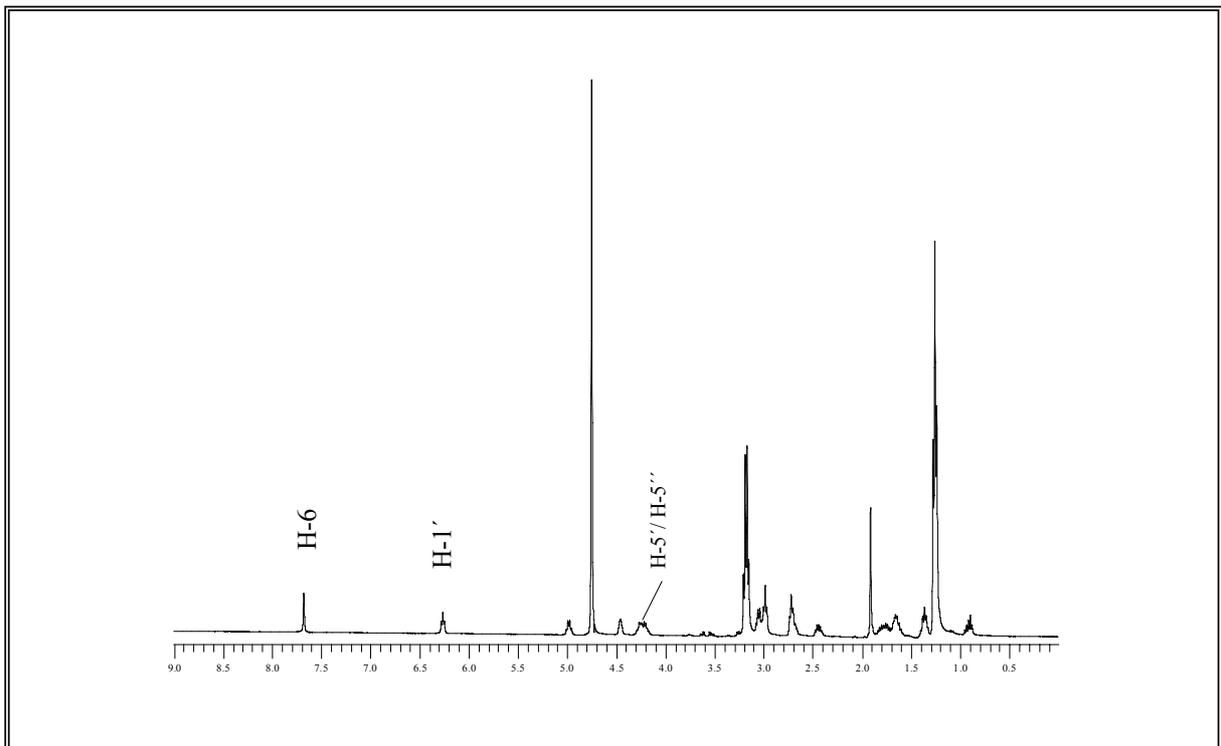


Abb. 77: ^1H -NMR von 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** in D_2O nach Aufreinigung durch FPLC und HPLC

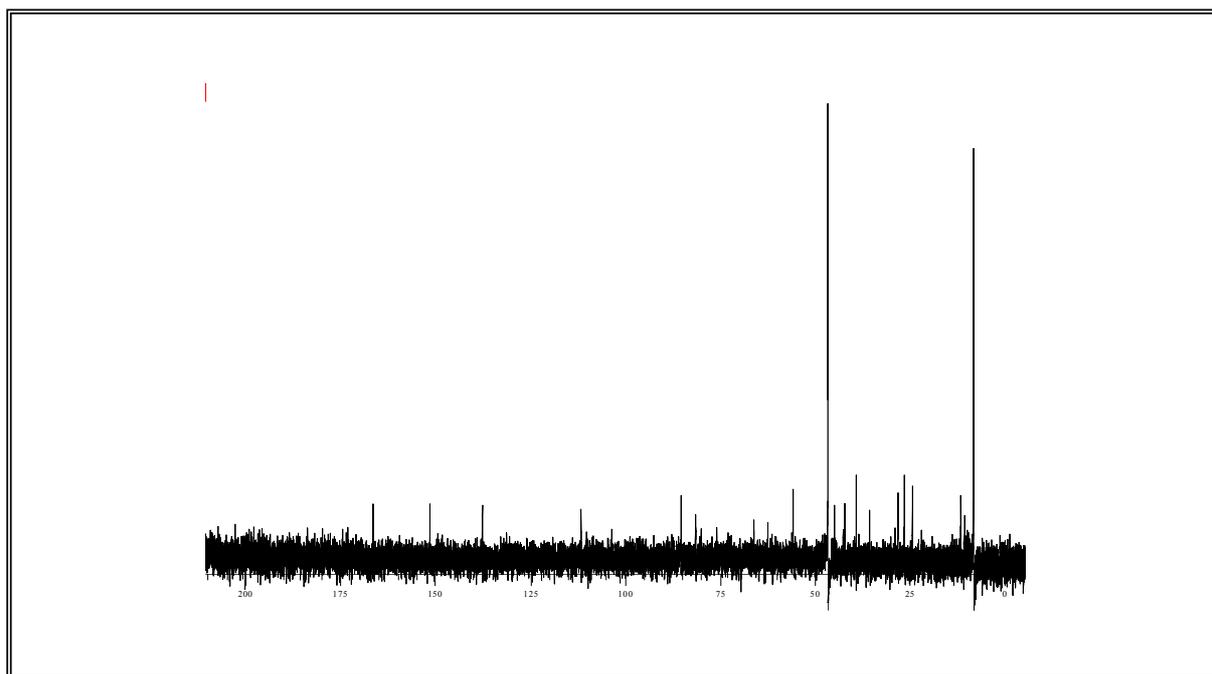


Abb. 78: ^{13}C -NMR-Spektrum 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** in D_2O nach Aufreinigung durch FPLC und HPLC

5. Verwendung der neuen Terminatoren für die DNA-Sequenzierung

5.1 Polymerasen

Die in der vorgelegten Arbeit synthetisierten Verbindungen sind für die Anwendung in der enzymatischen Sequenzierung nach F. Sanger bestimmt. Aus diesem Grund soll im Folgenden näher auf die Funktionsweise und Struktur der Enzyme eingegangen werden. Polymerasen sind als multifunktionale Enzyme an der Reparatur und der Replikation von Desoxyribonukleinsäuren beteiligt. Polymerasen, wie zum Beispiel die DNA-Polymerase I aus *E. coli* tragen auf derselben Polypeptidkette vielseitige katalytische Aktivitäten, die in unterschiedlichen Domänen separiert sind (Fersht, 1985).

Der Einsatz neuer und modifizierter Polymerasen resultierte in der Möglichkeit der Entwicklung neuer und effizienterer DNA-Sequenziermethoden. Die Gründe dafür liegen in der verbesserten Akzeptanz der zum Einsatz kommenden ddNTPs und der erhöhten Prozessivität sowie Kopiergenauigkeit.

Die Verwendung thermostabiler Polymerasen erlaubt beispielsweise eine ähnliche Vorgehensweise wie bei der PCR. Dieses sogenannte Cycle Sequencing erzielt mit äusserst geringen DNA-Mengen optimale Sequenzierergebnisse.

Eine weitere Möglichkeit der Optimierung von Sequenzierreaktionen mittels Einsatz einer modifizierten Polymerase zeigten Tabor und Richardson 1995. Durch Mutation einer einzigen Aminosäure im aktiven Zentrum der Taq DNA Polymerase konnte die Akzeptanz gegenüber selbst modifizierten Didesoxynukleotiden erhöht werden. Derartiges Proteindesign hilft unter anderem bei der Aufklärung des Mechanismus' von Enzymreaktionen.

Bis heute ist der genaue Mechanismus der enzymatischen Synthese von Polynukleinsäuren noch nicht vollständig geklärt. Tatsache ist, dass zwischen einzelnen Polymerasen zwar geringe Sequenzhomologien bestehen (Braithwaite, 1993), sie jedoch wesentliche Übereinstimmungen in ihrer Tertiärstruktur und im katalytischen Zentrum aufweisen.

Zahlreiche kinetische Studien und Röntgenstrukturen von DNA Polymerasen sind bereits beschrieben und geben zumindest einen Einblick in die Vorgänge, die bei der enzymatischen Synthese ablaufen (Tyagi, 1992; Patel, 1995; Pandey, 1988; Tabor, 1995; Kohlstaedt, 1992; Joyce, 1987). Besonders aufschlussreich waren Strukturen von Komplexen aus Enzym, Templat, Primer und Triphosphat, die 1998 unabhängig voneinander von drei

unterschiedlichen Arbeitsgruppen veröffentlicht wurden (Huang, 1998; Doublé, 1998; Kiefer, 1998).

Schon seit längerem bekannt ist die charakteristische Tertiärstruktur von Polymerasen. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit der Form einer rechten Hand wird sie in drei Bereiche aufgeteilt (Kohlstaedt, 1992). Der Finger, der Daumen und der Handteller bilden eine Vertiefung in deren Innerem sich das katalytische Zentrum der Polymerase befindet.

Doublé et. al kristallisierten T7 DNA Polymerase zusammen mit einem *E. coli* Thioredoxin, einem Prozessivitätsfaktor, den der Phage T7 erst während seines Wachstums in *E. coli* erwirbt und der der Polymerase erlaubt, das ganze Genom zu replizieren, ohne vorher von der Matrize abzudiffundieren. Der Kristall enthielt ausserdem ein dNTP im Primer-Templat-Komplex. Um nachfolgende Reaktionen zu vermeiden, setzten die Autoren anstelle eines natürlichen dNTP's ein die Elongation terminierendes ddNTP ein. Auf diese Weise konnte das Triphosphat nicht eingebaut werden und der Komplex konnte im Status direkt vor der Kettenverlängerung fixiert werden (Doublé, 1998; Abb. 79).

Die anschliessende Röntgenstrukturanalyse negierten die frühere Vermutung, dass der Hohlraum zwischen Finger und Daumen dazu genutzt wird, um auf der DNA entlang zu gleiten. Vielmehr kristallisierte sich die Erkenntnis, dass das Templat am katalytischen Zentrum einen scharfen Knick macht und aus der Vertiefung heraus an der Oberfläche der Finger-Region entlang verläuft. Bei fortschreitender Kettenverlängerung wechselt das Enzym demzufolge zwischen offener und geschlossener Form. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten diese Vorgänge bei verschiedenen Polymerasen (Kiefer, 1998; Huang, 1998). Die Doppelhelix wird durch mehrere unterschiedliche Wechselwirkungen, insbesondere des Phosphatrückgrats mit den drei Enzymregionen fixiert. Während im aktiven Zentrum ausschliesslich eine Wechselwirkung mit der Fingerregion besteht, übernimmt strangaufwärts die Tellerregion diese Aufgabe und anschliessend wechselwirkt der Daumen auf beiden Seiten des Duplex'. Der Daumen drückt etwa vier bis fünf Basen vom katalytischen Zentrum auf die kleine Furche und bringt das 3'-Ende des Primers somit in die richtige Position. Bereits seit längerem wird ein Zwei-Metallionen-Mechanismus der Nukleotidaddition vermutet. Die zweiwertigen Metallionen werden von zwei Aspartatresten aus der Handteller-Region komplexiert. Diese beiden Aminosäuren sind in allen Vertretern der Pol I Familie strikt konserviert (Braithwaite, 1993). Die Metallionen erleichtern den Angriff der 3'-Hydroxylgruppe des Primers (Abb. 5). Der im bereits angesprochenen Experiment von Tabor und Richardson vorgenommene Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin bewirkt eine Verschlechterung der Toleranz gegenüber natürlichen dNTPs um den Faktor 2000.

Abb. 79: Tertiärstruktur der T7 DNA Polymerase
Komplexiert mit einem Primer-Templat
Duplex (rot-gelb) und ddGTP (hellblau)
während des Einbaus. Der Primer-Tem-
plat Komplex liegt auf der Handtellerre-
gion und wird von der Finger- und der
Daumenregion umschlossen.
(Doublé, 1998)

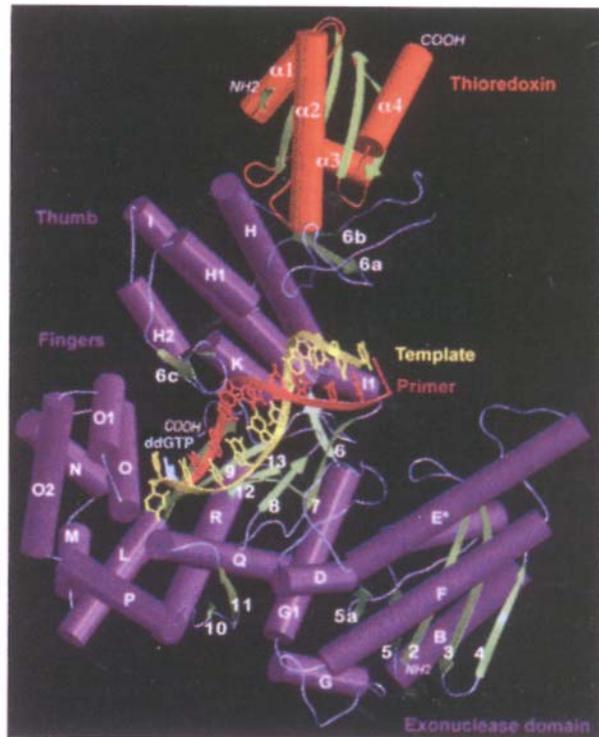
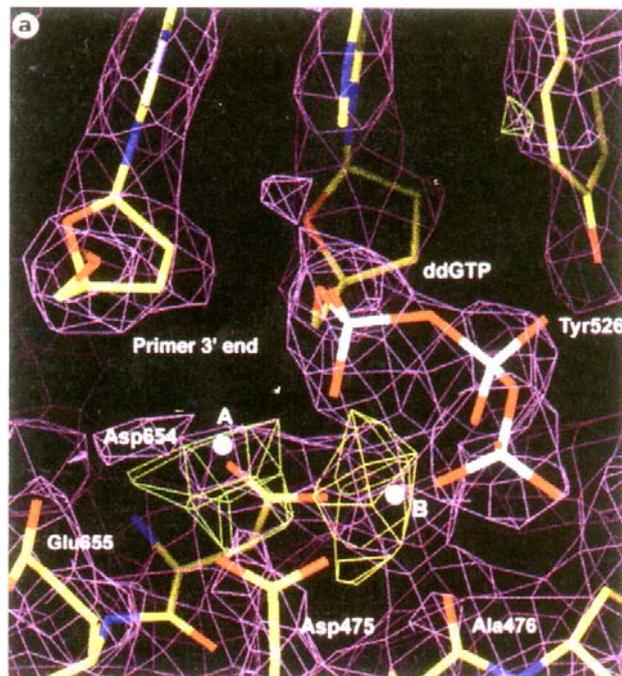


Abb. 80: Aktives Zentrum der T7 Polymerase
mit Darstellung der Elektronendichte.
Das α -Phosphat von ddGTP (rot-
weiss) wird durch die Komplexierung
mit den beiden Metallionen A und B in
Nähe zur 3'-Hydroxylfunktion des Pri-
mers gebracht. A und B wechselwirken
mit den strikt konservierten Aspartat-
Resten Asp654 und Asp 475.
(Doublé, 1998)



Diese Erkenntnis zeigt, dass die Hydroxylgruppe des Tyr 526 bei der Kettenverlängerung eine entscheidende Rolle spielt. Gleiches gilt für die 3'-Hydroxylfunktion, die von Doublé et. al an ddGTP im T7 DNA Polymerase-Komplex simuliert wurde. Diese beiden Hydroxylgruppen befinden sich in Reichweite für eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff des β -Phosphats der Triphosphat-Einheit (Abb. 80). Mindestens eine dieser beiden Hydroxylgruppen ist für eine erfolgreiche Inkorporation nötig. Aus dieser Erkenntnis resultiert eine für die Praxis besonders hilfreiche Schlussfolgerung. 3'-modifizierte Terminatoren sollten nur in Zusammenhang mit Polymerasen mit vorhandenem Tyrosin zur Anwendung kommen. Ein letzter Aspekt, der im Zusammenhang mit den Untersuchungen des T7 DNA Polymerase Komplexes mit ddGTP angesprochen werden soll, ist die Beobachtung, dass die Base nach Watson-Crick mit dem Cytosin des Templates paarte. Gleichzeitig stapelte sie mit der vorhergehenden Base des Primers sowie einem Tyrosin und einem Glutamat der O-Helix der Fingerregion. Auf diese Weise ist die Base ober- und unterhalb der Ebene vollständig abgeschirmt und ihre Bewegungsfreiheit dadurch stark eingeschränkt. Die Autoren sehen diese Situation als Grund für die Bevorzugung der Watson-Crick-Bedingungen. Allerdings konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass auch die Modifikation der Watson-Crick-Seite des ddGTP die Inkorporation des Terminators nicht beeinträchtigt. Vermutlich ist der Linker lang genug, um den sterisch anspruchsvollen Farbstoff auf Abstand zu halten und die Base trotzdem wie beschrieben abzuschirmen.

5.2 DNA-Sequenzierung mit 3'-modifizierten Nukleosid-5'-triphosphaten

Alle im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführten Sequenzierungen basieren auf dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren. Auf enzymatischem Wege wird ein Satz unterschiedlich langer DNA-Fragmente erzeugt. Auf die Detektion dieser Fragmente wurde bereits in Abschnitt 2.2.1 eingegangen. Aus den dort genannten Gründen wird die Radioaktivmarkierung heutzutage nur noch selten angewendet. Allerdings reicht die Eigenfluoreszenz der vier Nukleobasen bei Raumtemperatur, für die Detektion durch Fluoreszenzmessung nicht aus. Sie wird erst bei Temperaturen um -200 °C beobachtet (Blackburn, 1996; Jameson, 1997). Die DNA-Sequenzierung mittels synthetisch hergestellten, selbstfluoreszierenden Nukleobasen ist bisher noch nicht gelungen. Sie erreichen nicht die benötigten Fluoreszenzausbeuten oder paaren schlecht mit anderen Basen (Jameson, 1997; Bloom, 1993; Secrist, 1972; Seela, 1995; Adams, 1994; Ren, 1996; Schweitzer, 1995; Rösler, 1997; Seto, 1983; Ikehira, 1985; Lehbauer, 1997; Burdzy, 1995; de Boer, 1995; Toulmé, 1980).

Die effektivste Möglichkeit der Detektion der Kettenabbruchfragmente bleibt damit die Anbringung eines entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffs. Die in dieser Arbeit hergestellten Terminatoren sollen im Dye-Terminator-Verfahren eingesetzt werden (Kap. 2.2.1.1.2). Dazu müssen sie sich hauptsächlich durch drei grundlegende Eigenschaften auszeichnen. Zum einen müssen sie als Substrat von der entsprechenden Polymerase erkannt und in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden, zum anderen sollen sie die Fähigkeit besitzen, einen Kettenabbruch zu ermöglichen. Durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe soll der Einbau weiterer dNTPs verhindert werden. Die farbstoffmarkierten Terminatoren sollten drittens durch Laseranregung die Detektion der Kettenabbruchfragmente ermöglichen. Das grösste Problem der farbstoffmarkierten Terminatoren im Vergleich zu unmodifizierten Didesoxynukleotiden besteht in der erhöhten Fehlerrate beim enzymatischen Einbau. Mit steigenden Leselängen nimmt die Fehlerrate drastisch zu. Trotz verschiedener Optimierungsansätze (z. B. Verwendung von Mangancitrat: Korch, 1999) können mittels moderner Kapillarelektrophorese-Sequenzierer zur Zeit nur etwa 350 bis 400 Basen routinemässig mit einer Fehlerrate von weniger als 1% gelesen werden. Der Grund dafür liegt hauptsächlich in der reduzierten Akzeptanz des modifizierten Nukleosids durch das Enzym. Die Basenpaarung mit dem Templat wird durch die sterisch anspruchsvolle Farbstoffgruppe

beeinflusst. Zwei Ansätze werden derzeit zur Lösung dieses Problems verfolgt. Zum einen wird durch die Modifikation der 3'-Position von Nukleosid-5'-Triphosphaten eine Umpositionierung des Farbstoffs von der Base zum Zucker angestrebt, um die Enzymakzeptanz zu erhöhen. Der zweite Ansatz beschäftigt sich mit dem gezielten Design von Polymerasen für einen spezifischen Terminator. Aufgrund dessen ist also auch die Synthese neuer basenmodifizierter Terminatoren von Interesse.

5.2.1 3'-Modifizierte Nukleosid-5'-triphosphate

5.2.1.1 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleosid-5'-triphosphate

Wie bereits in Kap. 2.2.1.1.2 beschrieben erwiesen sich die 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleosid-5'-triphosphate (3'-NH₂-ddNTP, Aminoterninatoren) als potente Terminatoren für die DNA-Sequenzanalyse. Sie erzielen mit den Didesoxynukleotiden vergleichbare Leselängen und Fehlerraten. In eigenen Sequenzierexperimenten wurden mit 3'-NH₂-ddTTP ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit ddTTP (Abb. 81). Dazu wurde auf die von Christian Wojczewski optimierten Bedingungen für die Sequenzierung mit der T7 DNA Polymerase zurückgegriffen (Wojczewski, 2000).

Wie ebenfalls in Abschnitt 2.2.1.1.2 erwähnt, zeigen farbstoffmarkierte Aminoterninatoren zwar unter bestimmten Bedingungen spezifische Strangabbrüche, aber der entsprechende Farbstoff konnte nicht detektiert werden (Herrlein, 1993; Holletz, 1995; Faulstich, 1997).

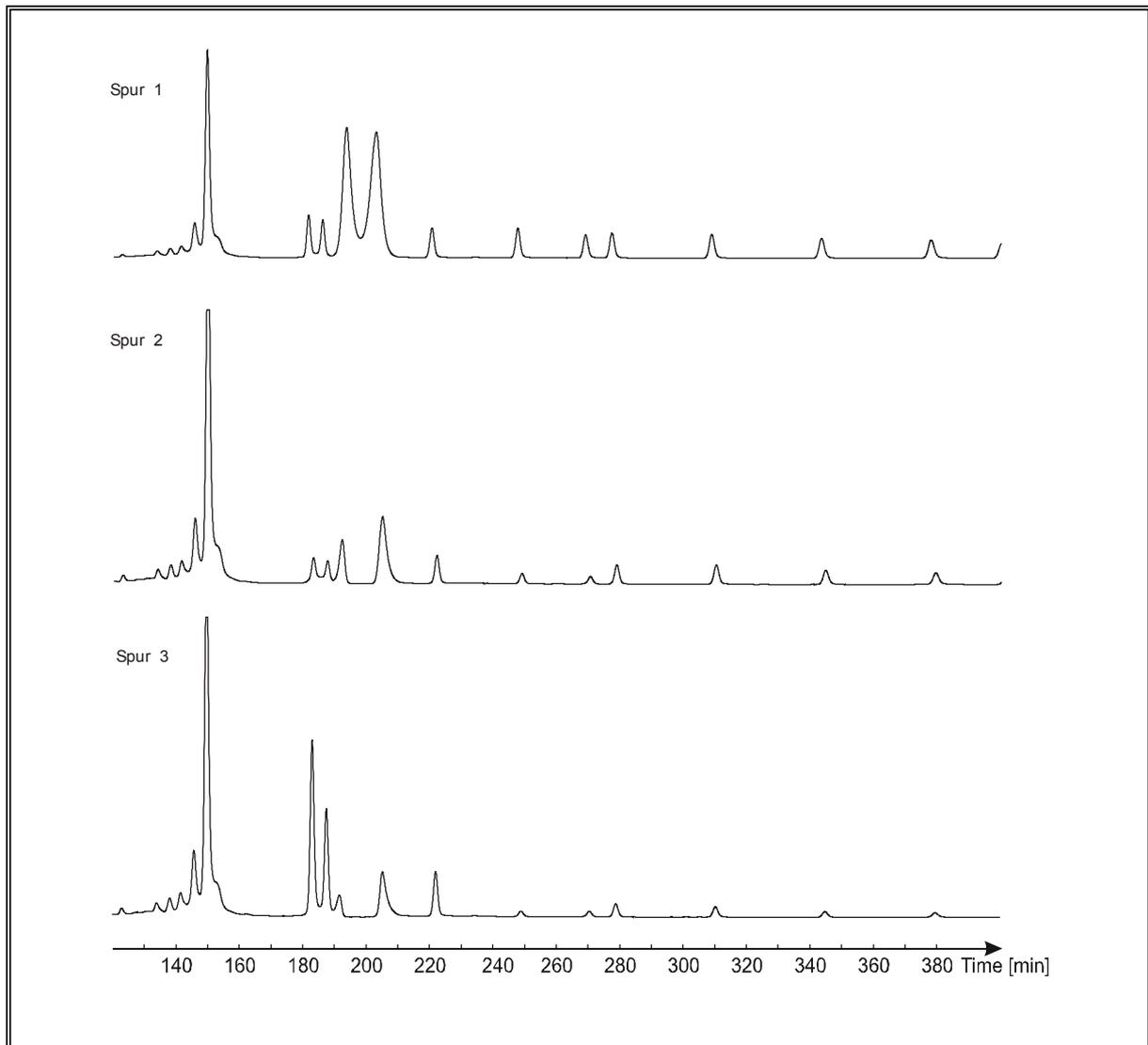


Abb. 81: Ausschnitt aus einer T-Sequenzierung mit T7 DNA Polymerase, M13mp18 Templat, Cy 5 markiertem Primer cwo 18 sowie Spur 1: ddTTP als Terminator; Spur 2: 3'-NH₂-ddTTP als Terminator; Spur 3: 3'-NH₂-ddTTP als Terminator unter Mn-Katalyse, aufgenommen auf einem ALF Sequencer

5.2.1.2 Weitere 3'-modifizierte 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphate

3'-modifizierte 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphate mit anderen Modifikationen als der Aminofunktion sind bereits teilweise in der Literatur beschrieben. Einige gut untersuchte Modifikationen seien im Folgenden aufgeführt.

Hovinen et. al entwickelten 3'-Aminoalkoxymethylether, deren freie Aminofunktion mit Fluoreszein markierte wurde (Hovinen, 1994). Auf diese Weise konnte zum einen der Fluoreszenzfarbstoff auf Abstand zum katalytischen Zentrum der Polymerase gehalten werden und zum anderen wurde der Zucker aufgrund des flexiblen Linkers in seiner

konformationellen Beweglichkeit nicht eingeschränkt. Entsprechende Sequenzieretests wurden sowohl mit markiertem als auch mit unmarkiertem 3'-Aminoalkoxymethylether durchgeführt. Beide Verbindungen erwiesen sich als spezifische Terminatoren mit der Tet/z DNA Polymerase. Von der T7 DNA Polymerase wurden diese Verbindungen jedoch nicht als Substrat akzeptiert (Holletz, 1995). Die Detektion der Abbruchfragmente erfolgte mittels radioaktivem dATP auf dem Gel, eine Fluoreszenzdetektion konnte nicht nachgewiesen werden. Erstaunlicher Weise konnte zwischen unmarkiertem und markiertem Terminator kein Laufunterschied auf dem Gel festgestellt werden, obwohl das unmarkierte Nukleotid eine freie Aminofunktion, die unter den gewählten Bedingungen protoniert vorliegt besitzt, während das markierte Nukleotid die deprotonierte Carboxylfunktion des Farbstoffs aufweist. Dieser Unterschied der zwei Terminatoren von zwei Nettoladungen sollte sich in Form eines Laufunterschieds auf dem Gel bemerkbar machen.

Metzger et al. synthetisierten 7 verschiedene 3'-modifizierte Adenosin-5'-Triphosphate und ein 3'-*O*-Methyl-Thymidin-5'-Triphosphat und testeten deren terminierende Eigenschaften mittels acht verschiedener Polymerasen (Metzger, 1994). Für die 3'-Ether und 3'-Ester-Modifikationen waren dabei nur geringe Erfolge erzielt worden. Der 3'-Methylether des dATP terminierte mit zwei verschiedenen Reversen Transkriptasen und der *O*-Nitrobenzylester mit 3 anderen Enzymen. Der 3'-Methylether des dTTP zeigte Termination mit vier verschiedenen Polymerasen. Keinerlei Terminationseigenschaften konnten mit dem Klenow-Fragment und der Sequenase, einer rekombinanten T7 DNA Polymerase, beobachtet werden. Die wichtigsten Ergebnisse dieser umfangreichen Untersuchungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Damit übereinstimmende Ergebnisse wurden von Fedorov et al. erzielt. Sie untersuchten die Terminationseigenschaften von 3'-Alkyl-3'-desoxythymidin-5'-triphosphaten.

Terminierende Eigenschaften konnten mit AMV und HIV-1 Reverser Transkriptase, nicht jedoch mit DNA Polymerase I beobachtet werden (Fedorov, 1992).

Sarfati und Mitarbeiter konnten in ihren Untersuchungen 3'-Ester-modifizierter Nukleosid-5'-triphosphate einige Fragen der Fluoreszenzdetektion klären. Diese Verbindungen terminierten mit Taq- und T7 DNA Polymerase und mit dem Klenow-Fragment (Sarfati, 1995; Canard, 1994; Sarfati, 1996). Die Verbindungen wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff über einen Allyl-Linker am C-5 markiert.

In weiterführenden Arbeiten beschrieben die Autoren die katalytischen Eigenschaften von DNA Polymerasen und zeigten, dass dem 3'-Kohlenstoffatom direkt benachbarte Ester- und

Amid-Bindungen der enzymvermittelten Hydrolyse unterliegen können (Canard, 1995). Die in diesen Arbeiten entdeckte Esterase- und Amidaseaktivität der Polymerasen klärte die immer wieder auftretenden Detektionsprobleme bei der Verwendung von 3'-Aminoterminalen. Ob der Farbstoff bereits beim Mischen von Enzym und Terminator oder später beim Einbau des Nukleotids erfolgt, ist noch nicht geklärt. Am wahrscheinlichsten ist jedoch die Hydrolyse bei Einbau des Terminators, da ansonsten Polymerasen auch eine allgemeine Peptidase-Aktivität besitzen müssten.

Fest steht, dass bei der Hydrolyse der 3'-Ester-modifizierten Nukleotide eine Hydroxylfunktion entsteht und damit keine terminierenden Eigenschaften mehr detektiert werden können. Im Gegensatz dazu entsteht bei der Hydrolyse der 3'-Amid-modifizierten Verbindungen eine freie Aminofunktion und die Nukleotide können weiter als Terminatoren fungieren. Mit einem entsprechend farbstoffmarkierten Primer können aus diesem Grund die korrekten Abbruchfragmente detektiert werden.

3'-modifiziertes dATP (ausser Verbindung [8])	AMV-RT	M-MuLV-RT	Bst DNA Polymerase	AmpliTaq DNA Polymerase	Vent_R (exo⁻) DNA Polymerase
[1] O-Methyl	Termination	Termination	-	-	Inhibition
[2] O-Acyl	-	-	-	-	Inhibition
[3] O-Allyl	-	-	-	-	Termination
[4] O-Tetrahydropyran	-	-	-	-	-
[5] O-(4-Nitrobenzoyl)	-	-	-	-	-
[6] O-(2-Aminobenzoyl)	-	-	-	-	-
[7] O-(2-Nitrobenzyl)	-	-	Termination	Termination	Termination
[8] 3'-O-Methyl.dTTP	-	Inhibition	Termination	Termination	Termination

Tab. 3: Alle Verbindungen hatten eine Endkonzentration von 250 μM . „-“ (keine Aktivität); „Termination“ (Terminationsbanden konnten detektiert werden); „Inhibition“ (nicht spezifischer Einbau); nach Metzger, 1994

Im Rahmen eines BMBF-Projekts wurde nach Alternativen der 3'-Modifikation gesucht. Um die Esterase- bzw. Amidasefunktion der Polymerasen zu umgehen wurden andere Arten der 3'-Verknüpfung synthetisiert. Mit den entsprechenden 5'-Triphosphaten wurden Sequenzieretests durchgeführt. Synthetisiert wurden 3'-sekundäre Alkylamine von Dr. Sven Klingel (Roche Diagnostics, Penzberg), 3'-Harnstoff- und Thioharnstoffderivate von Dr. Karen Stolze (Humboldt-Universität Berlin; Stolze, 1999; Zehl, 1997), ein 3'-Allylderivat von Dr. Thomas Schoetzau (Humboldt-Universität Berlin) sowie die Thioetherderivate und ein Thioamidderivat von Dr. Christian Wojczewski (Universität Frankfurt; Wojczewski, 2000).

Diese Verbindungen wurden von Dr. Sven Klingel nach einem standardisierten Verfahren als Terminatoren für die DNA Sequenzierung getestet, indem sie zusammen mit dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie einem DNA-Primer Duplex zur Reaktion gebracht wurden. Als Polymerasen dienten in diesem Fall Sequenase, Thermosequenase (beides rekombinante T7 DNA Polymerasen) und Taq DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* in ihren optimalen Sequenzierpuffern. Drei verschiedene Terminatorkonzentrationen wurden getestet. Die niedrigste Konzentration entsprach der üblichen Standardkonzentration für unmodifizierte ddNTPs. Im Zweiten und dritten Experiment wurde die zehnfache bzw. hundertfache Terminatorkonzentration verwendet. Bei Verwendung der Taq Polymerase wurde zusätzlich zur Standardkonzentration eine fünf- und siebenfache Konzentration eingesetzt. Die Detektion der Sequenzierfragmente erfolgte mittels eines 5'-IRD-41 markierten Primers auf einem LICOR DNA-Sequenziergerät. Die Sequenzierung mit Taq DNA Polymerase und Sequenase ergab bei dem 3'-Thioharnstoff-Derivat eine geringe spezifische Termination. Bei allen anderen Verbindungen konnte lediglich unspezifische Termination gezeigt werden (Tab. 4). Aus Gründen dieser unbefriedigenden Sequenzierergebnisse wurden die 3'-Terminatoren im Rahmen des BMBF-Projekts für die Sequenzierung, zumindest mit den getesteten Polymerasen als ungeeignet erachtet. Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen jedoch, dass diese Schlussfolgerung in dieser Form nicht aufrecht erhalten werden kann.

Nr.	3'-Modifikation	Sequenzierergebnisse
1		spezifische Termination
2		spezifische Termination
3		unspez. Termination mit allen drei Enzymen
4		unspez. Termination mit allen drei Enzymen; keine Fluoreszenzdetektion
5		geringe spezifische Termination mit Taq-DNA Polymerase und Sequenase
6		keine Termination
7		unspez. Termination mit allen drei Enzymen; keine Fluoreszenzdetektion
8		unspez. Termination mit allen drei Enzymen
9		unspez. Termination mit allen drei Enzymen
10		unspez. Termination mit allen drei Enzymen
11		unspez. Termination mit allen drei Enzymen

Tab. 4: Ergebnisse der Sequenzierreaktionen mit 3'-modifizierten Nukleosid-5'-triphosphaten im Vergleich zu den 3'-Amino- und 3'-Azido-Terminatoren Nr. 1 und 2 (Übersicht nach Klingel, 1998). Dargestellt sind nur die Substituenten an C-3' der Thymidin-Derivate. Nr. 3 und 4 (Klingel); Nr. 5, 6 und 7 (Stolze); Nr. 8 (Schoetzau); Nr. 9, 10 und 11 (Wojczewski). Polymerasen: Thermosequenase, Sequenase und Taq DNA Polymerase

5.2.1.3 3'-Thioamid-modifizierte 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphate

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit synthetisierten 3'-Thioamid modifizierten 5'-Triphosphate konnten im Rahmen des Projekts nicht mehr auf ihre Enzymakzeptanz getestet werden. Aus diesem Grund wurden eigene Sequenziertests mit verschiedenen Polymerasen durchgeführt. Die Wahl der verwendeten Polymerasen richtete sich unter anderem auch nach den beschriebenen Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen. Als universell einsetzbar erschienen besonders T7-, Taq(exo⁻)-, AmpliTaq-, Vent(exo⁻)- und *Bst* DNA Polymerase. Die Detektion der Sequenzierfragmente erfolgte mittels eines 5'-Cy5 markierten Primers auf einem ALF DNA-Sequenziergerät der Fa. Pharmacia. Als Vergleich wurde unmodifiziertes ddTTP und 3'-NH₂-ddTTP verwendet.

Die niedrigste Konzentration an neuem Terminator entsprach der üblichen Standardkonzentration für unmodifizierte ddNTPs. Im Zweiten und dritten Experiment wurde die zehnfache bzw. hundertfache Terminorkonzentration eingesetzt. Bei Verwendung der farbstoffmarkierten Verbindung wurde daneben noch eine zweihundertfache Konzentration angesetzt.

Bei der Sequenzierung mit der T7 DNA Polymerase konnte bereits bei der zehnfachen Terminorkonzentration an unmarkiertem Thioamid **39** eine schwache Termination beobachtet werden. Eindeutige Termination ergab die Verwendung der hundertfachen Konzentration bei Thioamid **39** (Abb. 82) und eine leichte T-Spur war bei zweihundertfacher Konzentration des farbstoffmarkierten Thioamids **40** zu beobachten (Abb. 82). Das farbstoffmarkierte Thioamid **40** zeigte ausserdem einen leichten Laufunterschied auf dem Gel im Vergleich zu den Vergleichsterminatoren und dem unmarkierten Nukleotid **39**.

Bei Verwendung der AmpliTaq DNA Polymerase konnte bereits mit der zehnfachen Konzentration an unmodifiziertem Thioamid **39** eine vergleichbar gute Termination wie mit ddTTP und AminoddT erreicht werden (Abb. 83).

Um zu testen, ob die Abbruchbanden fluoreszent sind, wurden die entsprechenden Sequenzieransätze auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels einer UV-Lampe die fluoreszenten Banden sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnten schwach fluoreszente Banden im Bereich kleiner Bruchstücke bis etwa 29 Basen Länge beobachtet werden. Die schwache Fluoreszenz bei den kurzen und die fehlende Fluoreszenz bei längeren Bruchstücken kann höchstwahrscheinlich auf die ungenügende Sensitivität des Verfahrens zurückzuführen sein. Weiterführende Experimente sollten in diesem Zusammenhang in Zukunft noch durchgeführt werden.

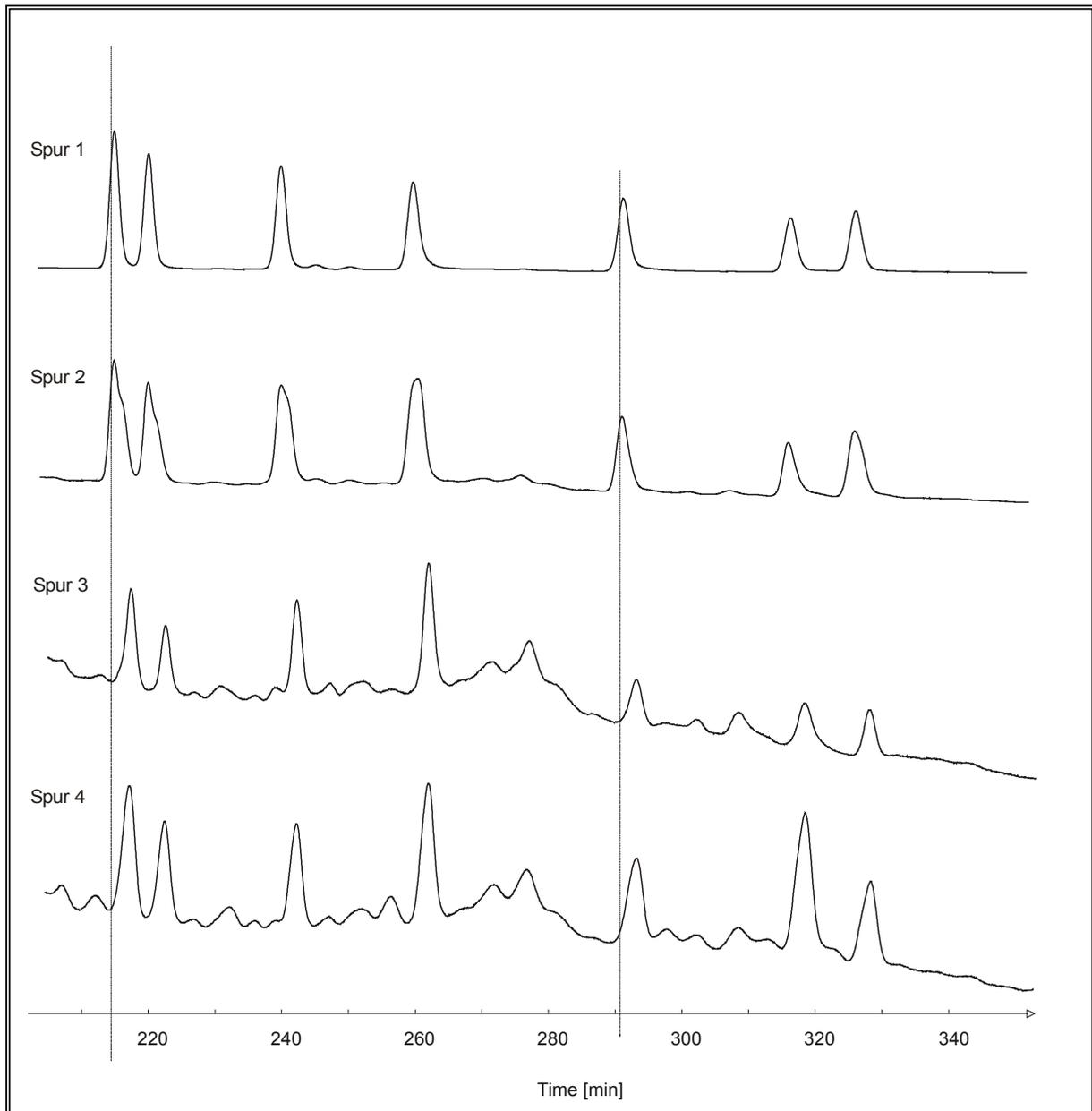


Abb. 82: Ausschnitt aus einer T-Sequenzierung mit T7 DNA Polymerase, M13mp18 Templat, Cy 5 markiertem Primer cwo 18 sowie Spur 1: ddTTP als Terminator; Spur 2: Thioamid **39** als Terminator; Spuren 3 und 4: markiertes Thioamid **40** als Terminator in unterschiedlichen Konzentrationen unter Mn-Katalyse, aufgenommen auf einem ALF Sequencer; die gestrichelten Hilfslinien verdeutlichen die leichten Laufunterschiede zwischen FITC-gelabeltem und ungelabeltem Terminator

Die dabei insgesamt etwas schwache Ausbildung der T-Spur ist wahrscheinlich auf die nicht ganz optimalen Sequenzierbedingungen zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde auf Tests mit dem farbstoffmarkierten Thioamid **40** verzichtet.

Die Verwendung der thermostabilen Polymerasen Vent (exo⁻) und Taq(exo⁻) gestaltete sich als besonders schwierig was die Wahl der optimalen Bedingungen angeht. Erst durch Cycle

Sequencing konnten erkennbare T-Spuren mit ddTTP erhalten werden. Unter diesen Bedingungen konnte auch eine schwache T-Spur für das unmarkierte Nukleotid **39** bei Verwendung der Taq(exo⁻) DNA Polymerase beobachtet werden. Mit der Vent(exo⁻) DNA Polymerase wurde keinerlei Termination erreicht.

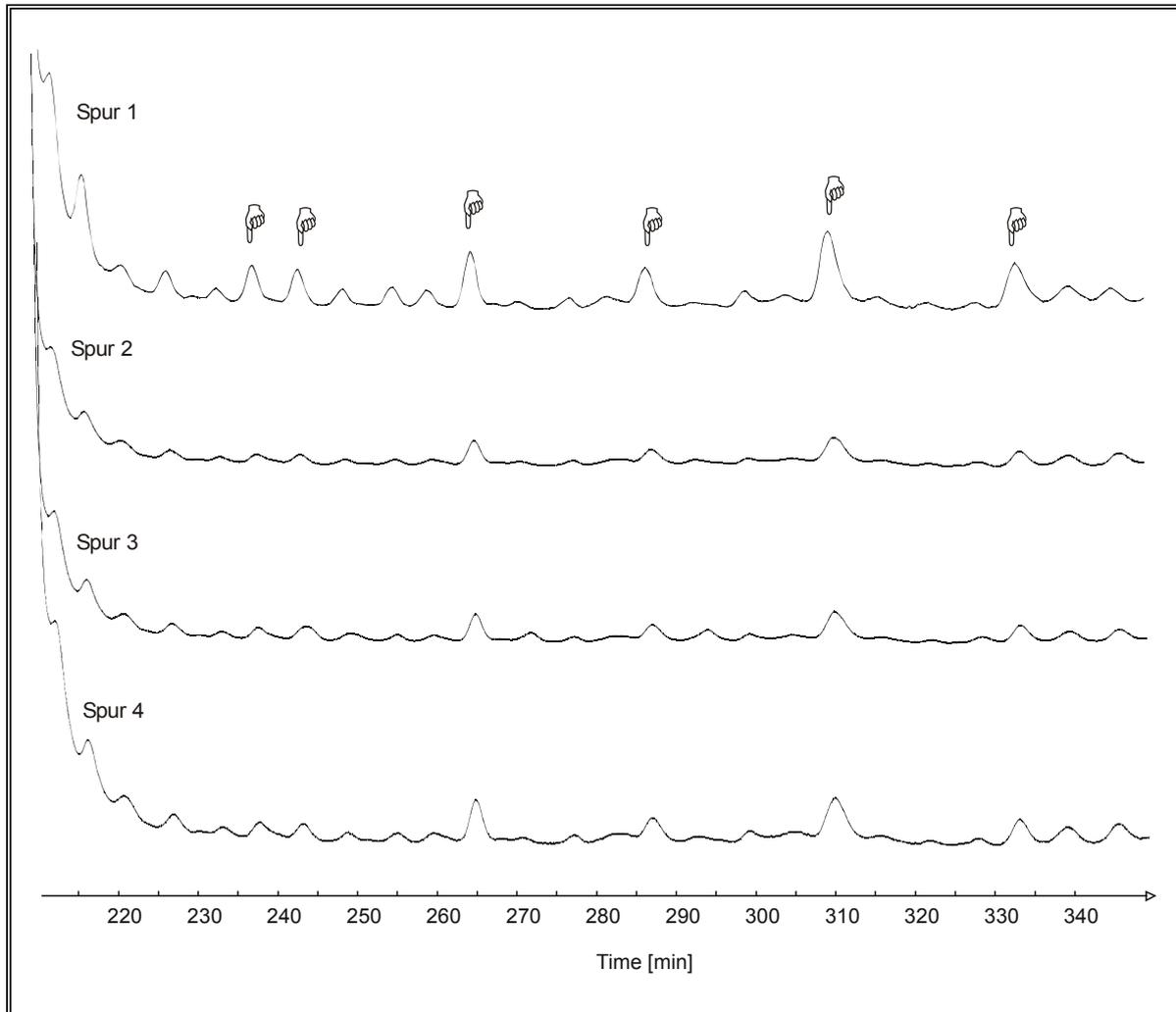


Abb. 83: Ausschnitt aus einer T-Sequenzierung mit Taq(exo⁻) DNA Polymerase, M13mp18 Templat, Cy 5 markiertem Primer cwo 18 sowie Spur 1: ddTTP als Terminator; Spur 2: Amino-ddT **37** als Terminator; Spuren 3 und 4: Thioamid **39** als Terminator in unterschiedlichen Konzentrationen unter Mn-Katalyse, aufgenommen auf einem ALF Sequencer; die hinweisenden Hände zeigen die T-Abbruchfragmente

Bei Verwendung der Bst DNA Polymerase konnte mit Thioamid **39** eine unspezifische und mit FITC markiertem Nukleotid **40** keine Termination beobachtet werden (Abb. 84).

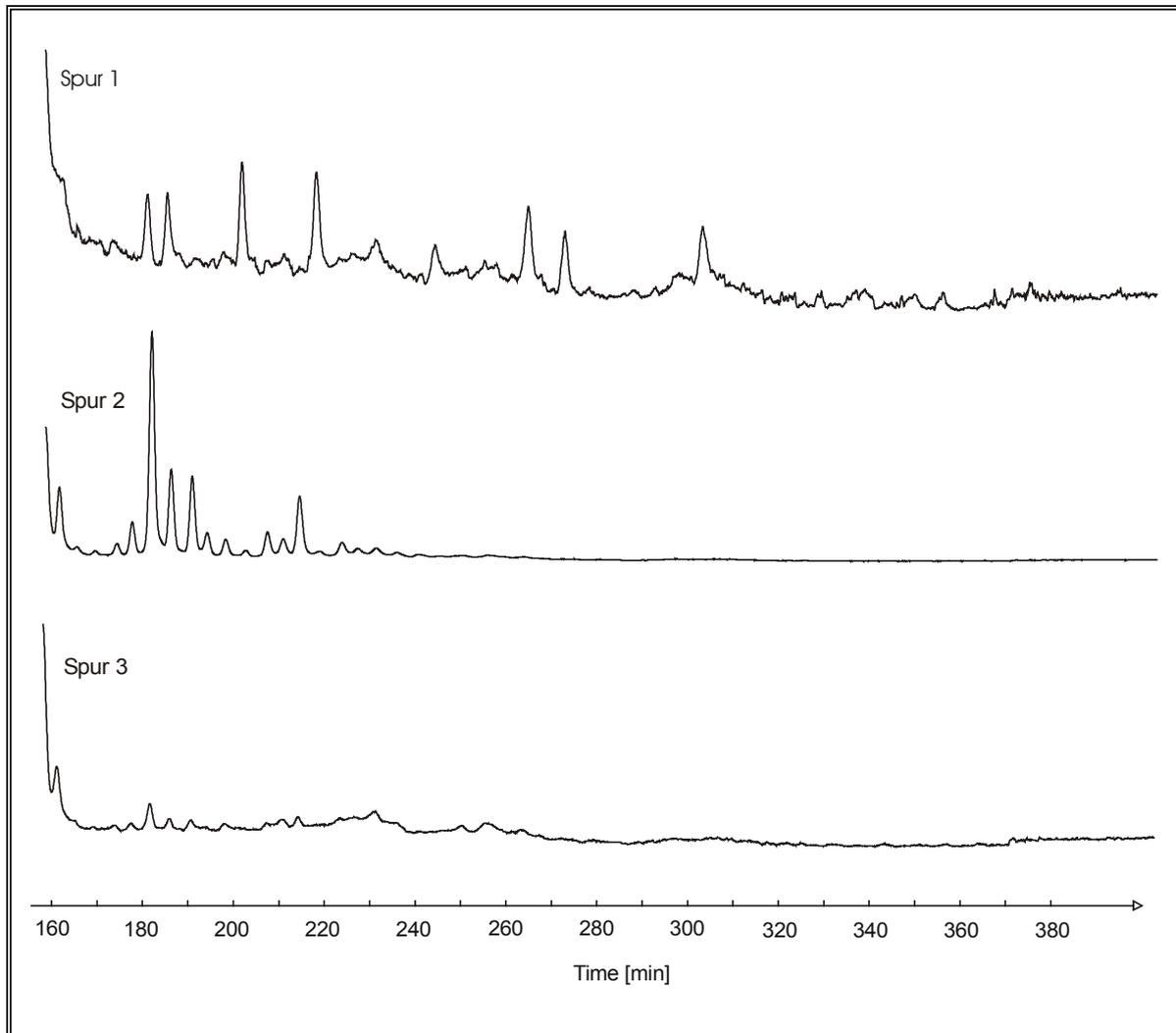


Abb. 84: Ausschnitt aus einer T-Sequenzierung mit Bst DNA Polymerase, M13mp18 Templat, Cy 5 markiertem Primer cwo 18 sowie Spur 1: ddTTP als Terminator; Spur 2: Thioamid **39** als Terminator; Spur 3: markiertes Thioamid **40** als unter Mg-Katalyse, aufgenommen auf einem ALF Sequencer

5.2.2 Basen-modifizierte Nukleosid-5'-triphosphate

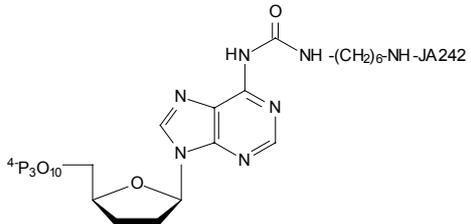
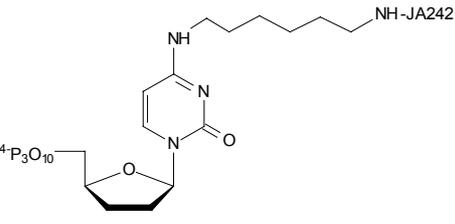
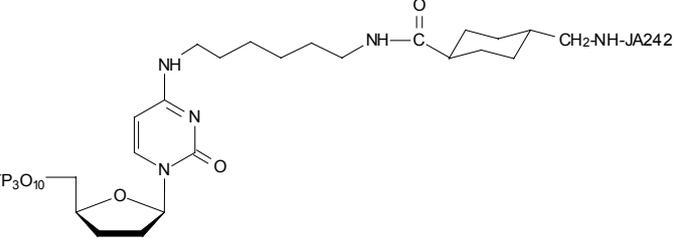
Als Alternative zu den 3'-C-modifizierten 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphaten wurde im gleichen BMBF-Projekt die Synthese neuer basenmodifizierter Nukleotide durchgeführt. Wie bereits in Kap. 2.2.1.2 erwähnt sind bereits basenmodifizierte Nukleosidtriphosphate beschrieben, die als Terminatoren in der DNA-Sequenzanalyse eingesetzt werden. Die neuen Verbindungen sind an der exozyklischen Aminofunktion der jeweiligen Base modifiziert. Im Rahmen des Projekts wurde bereits ein Cytidin- und ein Adenosin-Derivat synthetisiert und auf enzymatische Akzeptanz hin untersucht.

Das von Dr. Schoetzau synthetisierte N^6 -modifizierte ddATP wurde mittels dreier Enzyme auf seine terminierenden Eigenschaften untersucht (Schoetzau, 2000). Zum Einsatz kamen Thermosequenase, pTMA-30FS und E 681 K aus *Thermus aquaticus*. Die Detektion der Abbruchfragmente erfolgte wiederum über einen 5'-IRD 41-markierten Primer bei 778 nm bzw. bei 653 nm für den gekoppelten Farbstoff JA242.

Für die Sequenzierung mit pTMA-30FS und E 681 K konnten spezifische Abbruchfragmente bei entsprechender Primerdetektion gezeigt werden. Mit E 681 K wurden die besten Ergebnisse erzielt. Im Vergleich zum unmodifizierten ddATP konnte erwartungsgemäss ein Laufunterschied des farbstoffmarkierten Terminators beobachtet werden. Die zusätzliche positive Ladung des JA242-Farbstoffs führt dabei zu einem veränderten Laufverhalten der Fragmente.

Die Verwendung von Thermosequenase ergab nur schwache spezifische Termination. Der Fluoreszenzfarbstoff konnte nach der Sequenzierung in jedem Fall detektiert werden.

Dr. Karen Stolze synthetisierte zwei unterschiedliche N^4 -modifizierte 2',3'-Didesoxycytidin-5'-Triphosphate. Beide Verbindungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie das N^6 -modifizierte ddATP von Schoetzau auf ihre Enzymakzeptanz hin untersucht (Stolze, 1999). Zum Einsatz kamen ebenfalls die Polymerasen pTMA, E 681 K und Thermosequenase. Mit allen drei Enzymen wurde eine spezifische Termination erreicht. Auch in diesen Fällen zeigte die pTMA-Polymerase die besten Ergebnisse. Der Fluoreszenzfarbstoff konnte auch im Fall der modifizierten 2',3'-Dideoxy-5'-Triphosphate detektiert werden. Die Ergebnisse der Sequenzierungsversuche aller dieser bisher untersuchten basenmodifizierten Terminatoren sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Verbindung	Enzyme	Ergebnisse
	E 6 8 1 K p T M A ThermoSequenase	geringe spezifische Termination geringe spezifische Termination geringe spezifische Termination
	E 6 8 1 K p T M A ThermoSequenase	spezifische Termination mit allen drei Enzymen, alle Banden fluoreszent
	E 6 8 1 K p T M A ThermoSequenase	spezifische Termination mit allen drei Enzymen, alle Banden fluoreszent

Tab. 5: Ergebnisse der Sequenzierungsversuche aller bisher untersuchten an der exozyklischen Aminofunktion basenmodifizierten Terminatoren

5.2.2.1 N^2 -modifiziertes 2',3'-Dideoxyguanosin-5'-Triphosphat

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit synthetisierten N^2 -modifizierten 2',3'-Dideoxyguanosin-5'-triphosphate konnten ebenfalls im Rahmen des BMBF-Projekts nicht mehr auf ihre Enzymakzeptanz getestet werden. Aus diesem Grund wurden eigene Sequenziertests mit der T7-, der Taq (exo^-) und der Vent (exo^-)-Polymerase durchgeführt. Aufgrund der gesammelten Erfahrungen bei der Sequenzierung mit den 3'-modifizierten 5'-Triphosphaten erschien eine Akzeptanz durch diese Polymerasen als wahrscheinlich. Die Detektion der Sequenzierfragmente erfolgte wiederum mittels eines 5'-Cy5 markierten Primers auf einem ALF DNA-Sequenziergerät der Fa. Pharmacia. Als Vergleich wurde unmodifiziertes ddGTP verwendet.

Die niedrigste Konzentration an neuem Terminator entsprach der der üblichen Standardkonzentration für unmodifizierte ddNTPs. Im Zweiten und dritten Experiment wurde die zehnfache bzw. hundertfache Terminorkonzentration eingesetzt. Bei Verwendung der farbstoffmarkierten Verbindung kam daneben noch eine zweihundertfache Konzentration zum Einsatz.

Bei Verwendung der T7 DNA Polymerase konnte bereits bei der zehnfachen Terminorkonzentration an unmarkiertem modifiziertem ddGTP **41** eine schwache Termination beobachtet werden. Eindeutige Termination ergab die Verwendung der hundertfachen Konzentration bei modifiziertem ddGTP **43** (Abb. 85) und eine leichte T-Spur war bei zweihundertfacher Konzentration des farbstoffmarkierten ddGTP's **44** zu beobachten (Abb. 81). Das farbstoffmarkierte ddGTP **44** zeigte ausserdem einen Laufunterschied von ca. 2 Basen auf dem Gel im Vergleich zu den Vergleichsterminatoren und dem unmarkierten Nukleotid **43**. Dieser eindeutige Laufunterschied ist ein Indiz dafür, dass der Fluoreszenzfarbstoff am Terminator verblieben ist und nicht von der Polymerase abgespalten wurde. Auch bei Schoetzau und Stolze wurde dieser eindeutige Laufunterschied beobachtet. Um zu testen, ob die Abbruchbanden fluoreszent sind, wurden ebenfalls die entsprechenden Sequenzieransätze auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels einer UV-Lampe die fluoreszenten Banden sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind nahezu identisch zu denen, die mit den Thioamid-modifizierten Terminatoren beobachtet wurden. Weiterführende Experimente sollten in diesem Zusammenhang in Zukunft noch durchgeführt werden.

Die Ergebnisse aller durchgeführten Sequenzierungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

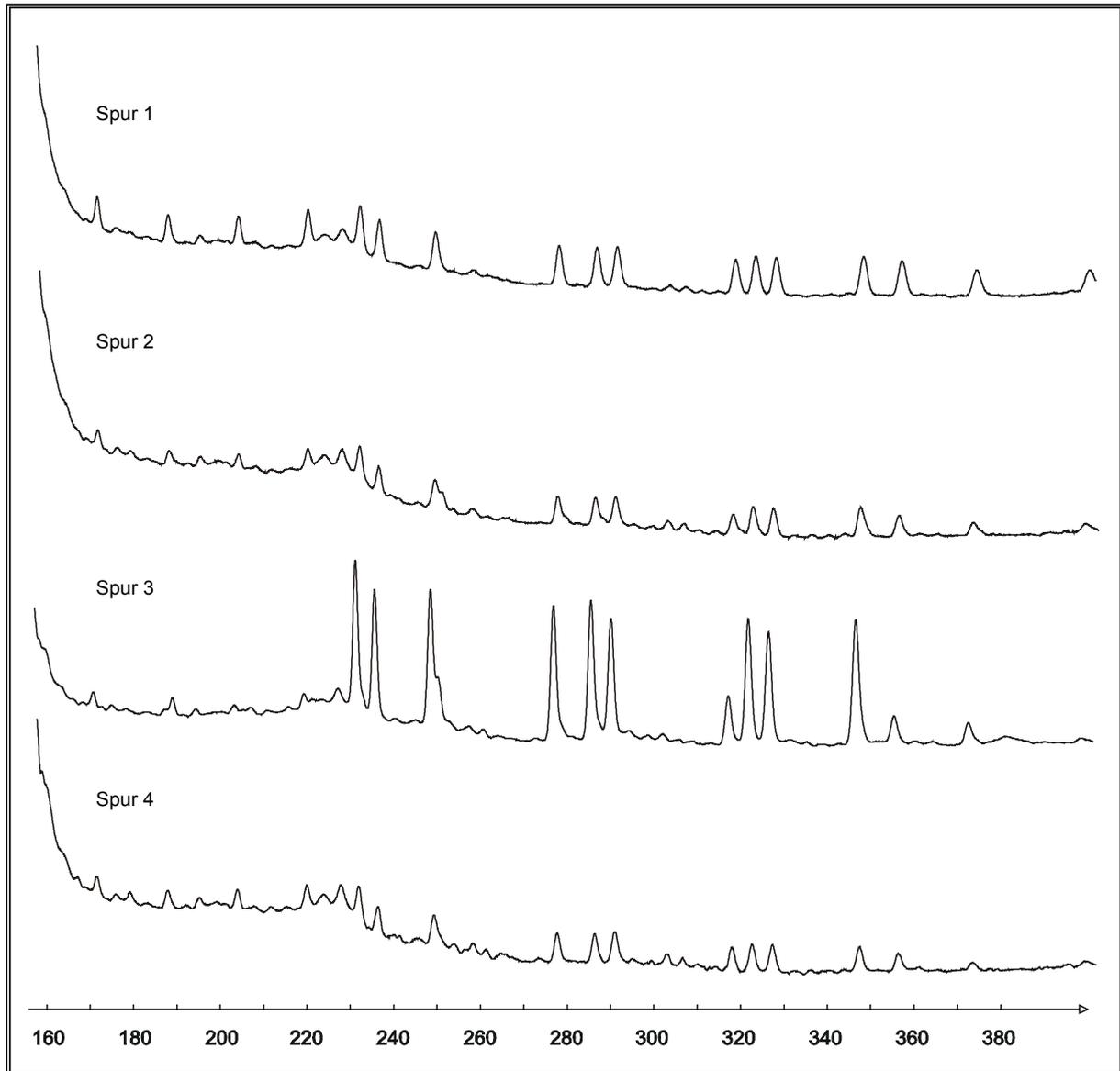


Abb. 85: Ausschnitt aus einer G-Sequenzierung mit T7 DNA Polymerase, M13mp18 Templat, Cy 5 markiertem Primer cwo 18 sowie Spur 1: ddGTP als Terminator; Spur 2: ddGTP **41** als Terminator; Spur 3/4: ddGTP **43** in unterschiedlicher Konzentration als unter Mn-Katalyse, aufgenommen auf einem ALF Sequencer

Modifizierte Verbindung	T7	AmpliTaq	Taq(exo-)	Vent(exo-)	Bst
Thioamid <u>39</u>	Termination	schwache Termination	schwache Termination	keine Termination	unspezifische Termination
FITC- markiertes Thioamid <u>40</u>	schwache Termination	-	-	-	-
ddGTP <u>41</u>	Termination	-	schwache Termination	-	-
ddGTP <u>43</u>	Termination	-	schwache Termination	-	-
FITC- markiertes ddGTP <u>44</u>	schwache Termination	-	-	-	-

Tabelle 6: Ergebnisse der durchgeführten Sequenzierests mit den neuen Terminatoren; „-“: auf eine Sequenzierung wurde verzichtet

6 Zusammenfassung

Im Rahmen eines BMBF-Verbundprojekts beschäftigt sich die vorgelegte Arbeit zunächst mit der Synthese von neuen 3'- und basenmodifizierten Nukleotiden und deren Markierung mit Fluoresceinisithiocyanat (Abb. 86 zeigt vier dieser neuen Nukleotide).

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Überprüfung der synthetisierten Verbindungen auf ihre Eignung als Terminatoren für die enzymatische DNA-Sequenzierung.

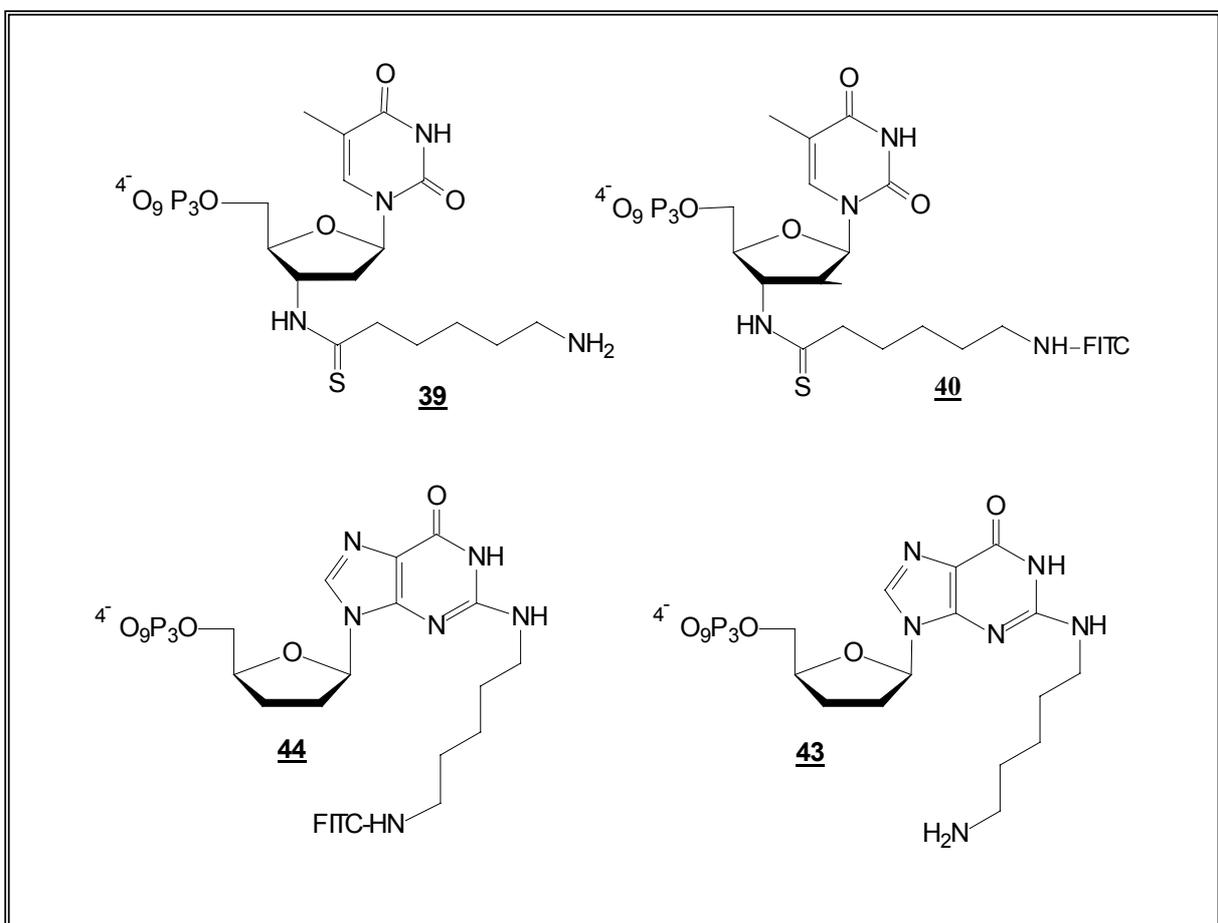


Abb. 86: Vier der wichtigsten Zielverbindungen der vorgelegten Arbeit

Die Synthese des neuen Thioamidtriphosphats 3'-[[6-Amino-1-thiohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **39** und dessen Markierung mit Fluoresceinisithiocyanat konnte in 10 Schritten ausgehend vom Thymidin erfolgreich durchgeführt werden.

Zunächst erfolgte die Umsetzung zum 3'-Amino-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **9**, an dessen 3'-Aminofunktion ein Aminocaprinsäurelinker angekuppelt wurde. Der Schlüsselschritt der Synthese war die Beschwefelung der so generierten 3'-Amidfunktion mittels Lawesson's Reagenz. Dabei konnte durch Optimierung der Synthesebedingungen (Abschnitt 3.1.2) die Ausbeute der Beschwefelungsreaktion um 30 % gesteigert werden. Das Thioamid 3'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{6-[[*(*9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thioxohexyl}amino}thymidin **15** wurde in guter Ausbeute und Reinheit zum Triphosphat umgesetzt und anschliessend über die entschützte Aminogruppe mit FITC markiert.

Für die Synthese des *N*²-modifizierten 2-Pentylamin-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphat **43** wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben mehrere Synthesewege erwogen und auch teilweise beschrritten. Schliesslich führte der Trick des Ausnutzens von Desmethylwyosin als Schutzgruppe zum Erfolg.

Ausgehend vom 2'-Desoxyguanosin konnte die Synthese der unmarkierte Verbindung 2-Valeriansäurenitril-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphat **41** in 8 Schritten und die des Triphosphats 2-Pentylamin-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphat **43** und dessen FITC-Markierung in 12 Schritten erfolgreich durchgeführt werden.

Ausgehend von 2'-Desoxyguanosin wurde zunächst das 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-didesoxy-7-desmethylwyosin **28** in 4 Schritten synthetisiert. Der anschliessende Schlüsselschritt der Synthese, die Ankopplung des Bromvaleriansäurenitrils konnte Dank veränderter Synthesebedingungen in Ausbeuten bis zu 65 % durchgeführt werden. Die anschliessende Ringöffnung wurde ebenfalls durch Syntheseoptimierung in Ausbeuten bis zu 67 % erreicht.

Die 5'-entschützte Verbindung 2-Valeriansäurenitril-2',3'-didesoxyguanosin **32** wurde erfolgreich und in guter Ausbeute und Reinheit zum Triphosphat umgesetzt.

Die Verbindung 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-Valeriansäurenitril-2',3'-didesoxyguanosin **30** wurde über einen Umweg in ein Azid überführt. Das anschliessend synthetisierte Triphosphat 2-Pentylazid-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphat **42** wurde reduziert und über die entstandene freie Aminofunktion mit FITC markiert.

Das bereits bekannte 3'-Amino-Nukleotid 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-Triphosphat **37** wurde sowohl als Vergleich für die Sequenzierung als auch zur Optimierung der Triphosphataufreinigungsmethoden eingesetzt.

Die Synthese verlief durch doppelte Inversion über das Anhydronukleosid nach Horwitz und ist in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

Alle neuen Triphosphate konnten durch optimierte Aufreinigungsbedingungen in hochreinem, salzreien Zustand isoliert werden. Vor dem Einsatz als Terminatoren für die DNA-Sequenzierung wurden alle Triphosphate als Na-Salze gefällt. In der vorgelegten Arbeit ist die Synthese, Aufreinigung und Analytik von Nukleosid-5'-Triphosphaten ausführlich beschrieben.

Die synthetisierten Thioamidtriphosphate sind im Laufe dieser Arbeit als neue Verbindungen synthetisiert und veröffentlicht worden.

Die hergestellten N^2 -modifizierten Didesoxyguanosintriphosphate sind bisher nicht beschrieben und neue Vertreter ihrer Verbindungsklasse.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die neuen, modifizierten Triphosphate **39**, **40**, **41**, **43** und **44** auf ihre Eignung als Terminatoren für die Sanger-DNA-Sequenzierung getestet. Dabei wurden fünf verschiedene Polymerasen eingesetzt: Die thermostabilen Polymerasen AmpliTaq, Taq(exo⁻), Vent(exo⁻), Bst und die nicht thermostabile T7 Polymerase. Neben den Standard Sequenziermethoden wurden für die thermostabilen Polymerasen zusätzlich Cycle Sequencing durchgeführt. Die besten Ergebnisse konnten mit der T7 Polymerase erreicht werden.

Alle getesteten Terminatoren wurden wie in Kapitel 5 beschrieben als Terminatoren von der T7 Polymerase akzeptiert. Die entsprechenden Sanger-Abbruchfragmente konnten mittels des Cy5-markierten Primers detektiert werden.

Die Verbindung **39** wurde auch von der AmpliTaq- und der Taq(exo⁻) Polymerase akzeptiert. Die Terminatoren **41** und **43** wurden von der Taq(exo⁻) Polymerase eingebaut. Entsprechende Abbruchfragmente konnten in schwacher Konzentration detektiert werden. Mit der Bst- und der Vent(exo⁻)-Polymerase konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

Die Frage der Fluoreszenzdetektion konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Fluoreszente Banden im Bereich kurzer Abbruchfragmente konnten sowohl beim Thioamid **40** als auch beim basenmodifizierten Didesoxyguanosin **44** auf einem Gel detektiert werden. Über die Spezifität kann jedoch bisher keine Aussage getroffen werden.

Entsprechende Experimente mit einem geeigneten Sequenziergerät müssen in Zukunft noch durchgeführt werden.

Mit Sicherheit können alle getesteten Triphosphate als Substrate zumindest für die positiv getesteten Polymerasen T7, AmpliTaq und Taq(exo⁻) bezeichnet werden.

In Zukunft sollten mit beiden FITC-markierten Nukleotiden Sequenziersuche mit einem geeigneten Laser durchgeführt werden, um Klarheit darüber zu bekommen, ob der Farbstoff nach dem enzymatischen Einbau am Terminator verbleibt und zur Dye-Terminator-Sequenzierung eingesetzt werden kann.

Ausserdem ist mit der Synthese des N^2 -modifizierten ddG's die Grundlage für ein Sequenziersystem mit den bereits existierenden modifizierten ddA- und ddC-Terminatoren geschaffen. Die Synthese der Verbindung **44** oder einer ähnlichen Verbindung könnte mittels direkter Einführung eines Linkers mit einer Azidfunktion am Anfang der Synthese äusserst effektiv durchgeführt werden.

7 Experimentelles

7.1 Allgemeines

7.1.1 Chemikalien, Enzyme und Puffer

7.1.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Aceton >99,5 %	Riedel-de Haën
Acetonitril abs. >99,5 % über Molsieb	Fluka
Ammoniak p.a. 25 % aq.	Roth
Anisaldehyd purum, >98 %	Fluka
Argon 4,8; eingesetzt wie gekauft	Linde
Benzol puriss. >99,5 %	Fluka
<i>tert</i> -Butyldiphenylchlorsilan (TBDPS), purum, >97 %	Fluka
Celite Filter	Fluka
2-Chloro-4 <i>H</i> -1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on	Aldrich
Chloroform- <i>d</i> 99,8 %	Merck
2'-Desoxyguanosin-Monohydrat	Pharma-Waldhof
Deuteriumoxid 99,9 %	Deutero
Diisopropylazadicarboxylat (DIAD), purum, >97 %	Fluka
4,4'-Dimethoxytritylchlorid >99 %	Merck
4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin (DMAP), purum, >98 %	Fluka
Dimethylsulfoxid abs. >99,5 % über Molekularsieb	Fluka
Dimethylsulfoxid >99 %	Janssen
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆ 99,9 %	CIL
Dioxan abs. über Molsieb >99,5 %	Fluka
DL-Dithioreitol 99 %	Sigma
DMF abs. über Molsieb >99,5 %	Fluka
Dowex Ionenaustauscher 50x8 mesh 400, H ⁺	Fluka
Essigsäure >99,8 %	Riedel-de Haën
Essigsäureethylester techn., destilliert über CaCO ₃	

Ethanol abs. 99,8 %	Riedel-de Haën
9-Fluorenylmethoxycarbonyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimid >98 %	Novabiochem
Fluorescein-5-isothiocyanat 90 %	Sigma
n-Hexan techn., destilliert	
Iod >99,5 %	Riedel-de Haën
DL-Isocitronensäure Trinatriumsalz 99 %	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat 99,5 %	Fluka
Kaliumphthalimid >99 %	Fluka
Kohlendioxid; CO ₂ ; eingesetzt wie gekauft	Messer Griesheim
Lawesson's Reagenz 97 %	Aldrich
Lithiumsulfat Monohydrat >99 %	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
Mangan(II)chlorid Tetrahydrat	Sigma
Methanol >99 %	Fluka
Methanol abs. >99,5 % über Molekularsieb	Fluka
Methansulfonylchlorid >99 %	Aldrich
Methylenchlorid abs. >98,5 %	Fluka
Methylenchlorid techn. destilliert über CaH ₂	
Molekularsieb 4Å, ausgeheizt im Ölpumpenvakuum	
Natriumazid 99 %	Janssen
Natriumcarbonat p.a. 99,5 %	Merck
Natriumchlorid 99,5 %	Roth
Natriumhydrid in 60 % Suspension	Fluka
Natriumhydrogencarbonat p.a. >98 %	Fluka
Natriumhydrogensulfit	Skil Craft
Natriumhydroxid 99 %	Riedel-de Haën
Natriumsulfat techn. 99 %	Riedel-de Haën
Ninhydrin p.a. >99 %	Merck
Phosphorpentoxid 98,5 %	Riedel-de Haën
Piperidin puriss. >99,5 %	Fluka
Platin(IV)oxid Monohydrat 80,8 %	Degussa
Pyridin >99,5%, dest. über CaH ₂	Grüssing
Pyridin abs. über Molekularsieb >99,8 %	Fluka
Salzsäure konz. p.a. >37 %	Riedel-de Haën

Schwefelsäure konz. p.a. 95-97 %	Riedel-de Haën
Sephadex DEAE A-25	Pharmacia
Sepharose DEAE Fast Flow	Pharmacia
Tetrahydrofuran abs. über Molsieb >99 %	Fluka
Tetranatriumdiphosphat Decahydrat p.a. >99 %	Fluka
Thymidin 99,4 %	Pharma Waldhof
Tributylamin puriss. p.a. >99 %	Fluka
Triethylamin abs. 99,5 %	Fluka
Wasserstoff	Linde

7.1.1.2 Enzyme und DNA

M13mp18 single stranded DNA, 0,25 µg/µl	New England Biolabs
Bst DNA Polymerase	New England Biolabs
T7 DNA Polymerase	Pharmacia Biotech
AmpliTaq DNA Polymerase	New England Biolabs
Taq(exo ⁻) DNA Polymerase	Promega
Vent(exo ⁻) DNA Polymerase	New England Biolabs

7.1.1.3 Puffer für enzymatische Arbeiten

Alle Puffer wurden sterilisiert oder in sterilem H₂O angesetzt.

Annealing Puffer

Mn-Puffer: 2 µl Mn-Mix 1 (311 mM Tris-HCl (pH 7,5)); 2 µl Mn-Mix 2 (177 mM DTT), 2 µl

Mn-Mix 3 (62 mM MnCl₂; 460 mM Isocitrat)

Mg-Puffer: 1M Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM MgCl₂, 160 mM DTT

10xPCR-Puffer

ThermoPol Puffer (New England Biolabs) bestehend aus:

100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100

Stop-Solution

Deionisiertes Formamid

7.1.2 Analytik und Chromatographie

7.1.2.1 Allgemeine Geräte

ALF Express DNA-Sequencer Amersham Pharmacia

Analysenwaage Mettler H20T

Lyophylle Christ LDC-1

pH-Meter Knick 761 Calimatic

Speed Vac Savant SC 110

Elementaranalyse Foss Heraeus CHN-O Rapid

NMR-Geräte AM 250, WH 270 und AMX 400 der Firma Bruker

Elektrospray-Gerät der Firma Fisons (VG Platform II) mit Quadrupol Analysator

MALDI Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) der Firma Fisons

UV-Photometer der Firma Hitachi, Modell 1100

7.1.2.2 Chromatographie

7.1.2.2.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumplatten mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck; 0,2 mm Schichtdicke). Die Verbindungen wurden unter Kammersättigung eluiert. UV-aktive Substanzen wurden mittels einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Dünnschichtchromatogramme wurden zur Identifizierung von Zuckerverbindungen mittels einer Lösung aus 10% konz. Essigsäure, 5% Anisaldehyd und 5% konz. Schwefelsäure in 75%igem Ethanol bestrichen. Zur

Identifikation von bromhaltigen Verbindungen wurde eine Lösung aus

Eosin in Ethanol und eine zweite Lösung aus verd. Essigsäure verwendet.

Die bestrichenen Platten wurden mit einem Heissluftfön auf etwa 300°C erhitzt. Dabei färbten sich die Zuckerverbindungen schwarz und die Bromverbindungen rosa. Die

Dimethoxytritylschutzgruppe konnte durch Überleiten von Salzsäure oder durch Erhitzen mit einem Heissluftfön durch die einsetzende Orangefärbung detektiert werden.

7.1.2.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurde ein Chromatotron der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, verwendet. Die Glasplatten wurden mit gipshaltigem Kieselgel mit Fluoreszenzindikator beschichtet (Merck 60 PF254). Die Schichtdicke betrug 1, 2 oder 4 mm. Die Methode wurde zur Auftrennung von Substanzmengen bis 1 g eingesetzt.

7.1.2.3 Präparative Säulenchromatographie

Die Flashchromatographie wurde mit Kieselgel 60 (Korngrösse 40-63 μM , Merck) als Trennmittel durchgeführt.

7.1.2.4 FPLC

FPLC wurde auf einem Pharmacia Instrument mit LCC-500 Plus Controller, zwei P-500 Pumpen und einem Single Path UV Monitor UV-1 durchgeführt. Als Fraktionssammler diente ein Fraction Collector RediFrac'. Zum Auftragen der Proben wurde eine Peristaltic Pumpe P1 eingesetzt. Zur Trennung wurden zwei Pharmacia Säulen (1 cm x 20 cm; 2,5 cm x 15 cm) mit selbst gefülltem Säulenmaterial (DEAE Sephadex A25 oder DEAE Sepharose Fast Flow von Pharmacia) eingesetzt.

Herstellung einer 2M TEAB-Lösung:

278 ml TEA p.a. und 722 ml H₂O wurden gemischt und unter starkem Rühren und Eiskühlung bis zur Homogenität des Gemischs CO₂ über ein Gaseinleitungsrohr eingeleitet. Der pH-Wert des Gemischs wurde geprüft und bis zu einem pH von 7,5 weiter CO₂ eingeleitet.

Programmierung für eine präparative Trennung (4ml/min)

Volumen [ml]	Funktion	Wert
0,00	CONC % B	0,0
0,00	ML / MIN	4,0
0,00	CM / ML	0,10
0,00	ML / MARK	20
0,00	CLEAR DATA	
0,00	MONITOR	1
0,00	LEVEL %	0,5
0,00	VALVE.POS	1,1
0,00	PORT.SET	6,1
0,00	PORT.SET	3,1
0,00	VALVA.POS	1,1
500,00	CONC % B	50
650,00	CONC % B	100
650,00	PORT.SET	3,0
650,00	PORT.SET	6,0
650,00	INTEGRATE	1
650,00	PRT PK	1,20
651,00	CONC % B	0,0
651,00	ML / MIN	0,30
651,00	HOLD	

7.1.2.2.5 HPLC

Die HPL-Chromatographie wurde durchgeführt auf einer Merck-Hitachi Anlage mit folgenden Komponenten: L6220 Intelligent Pump, Mixer, D6000 Interface, L4250 UV-VIS Detektor, Shimadzu RF-535 Fluoreszenz Monitor.

Methode 1:

Chrom-Säule (250 x 4,6 mm); Synchropak Anionenaustauscher (PA100) 1 ml / min;

(0-->30 min: 0-->40% B)

A = 0,05M KH₂PO₄, 50% Formamid, pH 5,5; B = 0,05M KH₂PO₄, 1M (NH₄)₂SO₄, 50% Formamid, pH 5,5

Methode 2:

Chrom-Säule (250 x 4,6 mm); Nucleosil-RP (300 C4, 5µm)

1 ml / min; (0-->30 min: 0-->20% B)

A = 0,05 M TEAA, pH 5,5; B = 0,05 M TEAA, 50% CH₃CN, pH 5,5

7.1.2.3 Spektroskopie

7.1.2.3.1 NMR-Spektroskopie

Die ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren wurden auf den Geräten AM 250, WH 270 und AMX 400 der Firma Bruker erstellt. Die chemische Verschiebung δ (ppm) wurde auf das jeweilige Lösungsmittelsignal geeicht. Das Lösungsmittelsignal wurde bei ^1H -Spektren für DMSO- d_6 auf 2,50; für CDCl_3 auf 7,26 und für D_2O auf 4,80 ppm festgelegt. Für ^{13}C -Spektren wurde für DMSO- d_6 39,5 und für CDCl_3 76,9 ppm verwendet. Für die ^{31}P -Signale wurde 85%ige Phosphorsäure als externer Standard genutzt. Phosphorspektren wurden breitbandgekoppelt aufgenommen. Die Temperatur betrug bei allen Messungen 300 K.

7.1.2.3.2 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden an einem Spektrometer der Firma Perkin Elmer (1600 Series FTIR) aufgenommen.

7.1.2.3.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem Elektrospray-Gerät der Firma Fisons (VG Platform II) mit Quadrupol Analysator bzw. auf einem MALDI Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) der Firma Fisons aufgenommen.

7.1.2.3.4 UV-Photometrie

Die optische Dichte der Nukleotide wurde bei 260 nm mit einem Molaren Absorptionskoeffizienten von $8700 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ in Wasser bestimmt. Als Messgerät diente ein UV-Photometer der Firma Hitachi, Modell 1100.

7.2 Synthese von Nucleosiden und Nucleotiden

7.2.1 Allgemeine Vorschriften

Bis(tri-*N*-butylammonium)pyrophosphat

$C_{24}H_{58}N_2O_7P_2$ [548,68]

Vorschrift zur Herstellung einer 0,5 M Stammlösung von Bis(tri-*N*-butylammonium)pyrophosphat in DMF:

100 g unbenutzter oder frisch regenerierter Ionenaustauscher (Dowex 50x8 mesh 400, H⁺) wurden in eine Kieselgel-Chromatographie-Säule ohne Fritte, aber mit Glaswolle am Auslauf gefüllt und mit Wasser gespült, bis das Eluat pH-neutral war. Na₄P₂O₇·10 H₂O (8,29 g; 20 mmol) wurde in 200 ml H₂O gelöst, auf die Säule aufgetragen und mit H₂O gewaschen, bis das Eluat pH = 5 aufwies (ca. 280 ml). Das Eluat tropfte dabei direkt in eine eisgekühlte Lösung aus Tributylamin (9,54 ml; 40 mmol) in Ethanol (80 ml). Die Lösung trübte sich zunächst milchig, klarte aber mit zunehmender Elutionsdauer wieder auf. Das Ethanol/Wasser-Gemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das resultierende gelbliche, leicht zähflüssige Öl wurde zweimal mit abs. Ethanol coevaporiert, anschliessend mit 100 ml abs. DMF versetzt und am Stickstoff-Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Apparatur wurde danach mit Argon geflutet und der Rückstand unter Argon in 40 ml abs. DMF gelöst. Die Lösung wurde in einem Schlenkkolben über Molsieb (4Å) bei 4°C gelagert.

Pyrophosphat-Reaktionslösung

Die Lösung muss direkt vor der Zugabe zum Reaktionsgemisch angesetzt werden. 1,5 ml der 0,5 M Stammlösung von Bis(tri-*N*-butylammonium)pyrophosphat in DMF wurden mit 0,5 ml TBA gemischt und intensiv geschüttelt (Vortexer). Die benötigte Menge des Gemischs wurde sofort mit einer Spritze entnommen und zur Reaktionslösung injiziert, da die Phasentrennung innerhalb weniger Minuten vonstatten geht.

1%ige Iod-Oxidationslösung

Die Lösung sollte immer frisch angesetzt werden, um einer Zersetzung vorzubeugen. 100 mg Iod wurden in 9,8 ml Pyridin gelöst und 0,2 ml H₂O zugegeben.

Herstellung von LiN₃

In einem Erlenmeyerkolben wurden nacheinander 13 g NaN₃ und 14,1 g Li₂SO₄·H₂O in 80 ml Wasser gelöst. Anschliessend liess man 370 ml Ethanol langsam zutropfen. Das ausgefallene Na₂SO₄ wurde abfiltriert. Das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt und der weisse Rückstand in der Trockenpistole im Ölpumpenvakuum bei 55°C drei Tage getrocknet.

Ausbeute: 9,71 g (99%)

Herstellung von Trifluorsulfonylazid

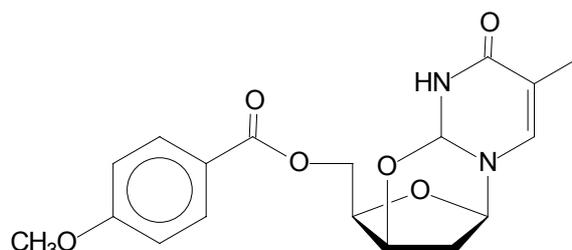
NaN₃ (1,43 g; 21,96 mmol) wurde in 3,6 ml Wasser gelöst. Unter Eiskühlung wurde diese Lösung mit 6 ml Dichlormethan versetzt und innerhalb von 5 Minuten Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1,3 g; 4,44 mmol) zugegeben. Der Reaktionsansatz rührte 2 Stunden bei RT. Anschliessend wurde die organische Phase separiert und die wässrige Phase zweimal mit Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung gewaschen und sofort in Lösung für die entsprechende Reaktion eingesetzt, um die Explosionsgefahr so gering wie möglich zu halten.

Na-Salze der 5'-Triphosphate

Die folgenden Arbeiten wurden im 4 °C Kühlraum oder unter Eiskühlung durchgeführt. Aus dem entsprechenden Triphosphat wurde durch Lösen in abs. Methanol eine 0,1 M Lösung hergestellt (0,1 mmol Triphosphat in 1 ml Methanol). Zu dieser Lösung wurde langsam eine Lösung aus 15 Äquivalenten wasserfreiem Natriumperchlorats in der 5-fachen Menge Aceton getropft. Das dabei ausgefallene Natriumsalz des Triphosphats wurde durch 5minütige Zentrifugation bei 12000 U/min und 4 °C isoliert. Der Niederschlag wurde noch 4mal mit je 2 ml Aceton gewaschen und anschliessend in der Speed Vac getrocknet.

7.2.2 Einzelverbindungen

3'-Anhydro-3'-desoxy-5'-O-(4-methoxybenzoyl)thymidin 2



Zu einer Lösung aus 2'-Desoxythymidin 1 (10 g, 41 mmol) und Triphenylphosphin (16 g, 61 mmol) in 100 ml DMF wurde innerhalb von 1 h eine Lösung aus Diisopropylazadicarboxylat (DIAD: 12 ml, 61 mmol) und p-Anissäure (9,28 g, 61 mmol) in 25 ml DMF getropft. Nach 15minütigem Rühren bei RT wurden erneut 1,5 eq Triphenylphosphin und 1,5 eq DIAD zugegeben und weitere 30 min gerührt. Anschliessend wurde die Reaktionsmischung in 1 l Diethylether gegeben und 2 h im Eisbad gekühlt. Der entstandene weisse Niederschlag wurde abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 10,92 g (74 %)

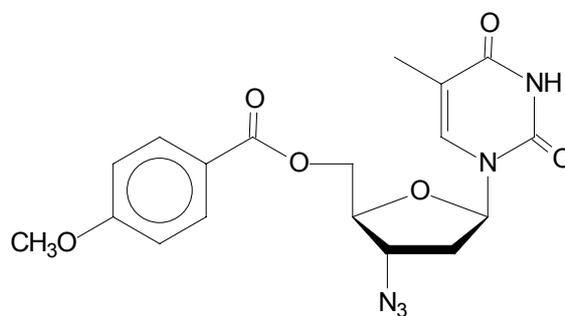
DC: $R_f = 0,38$ (Methylenchlorid / Methanol 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 7,88-7,84 (d“t“, 2H, H-3“-Ar, $^3J_{\text{H,H}} = 8,79$ Hz); 7,56 (s, 1H, H-6); 7,02-6,99 (d“t“, 2H, H-2“-Ar, $^3J_{\text{H,H}} = 8,8$ Hz); 5,89-5,88 (ψ t, 1H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 6,6$ Hz); 5,41 (m, 1H, H-3'); 4,58-4,45 (m, 2H, H-4' und H-5'); 4,34-4,27 (m, 1H, H-5'); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 2,64-2,54 (m, 2H, 2 H-2'); 1,73 (s, 3H, C5-CH₃)

Elementaranalyse:	berechnet:	C: 60,33	gefunden:	C: 60,19
		H: 5,06		H: 5,14
		N: 7,81		N: 7,81

ESI-MS: $m/z = 359,1$ gefunden; $359,4$ berechnet $[M+H]^+$

3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-(4-methoxybenzoyl)thymidin 3



$C_{18}H_{19}N_5O_6$ [401,35]

3'-Anhydro-3'-desoxy-5'-O-(4-methoxybenzoyl)thymidin 2 (9 g, 25 mmol) und LiN_3 (siehe allg. Vorschriften; 1,84 g, 37,7 mmol) wurden in 45 ml abs. DMF suspendiert und 4,5 h bei $125^\circ C$ gerührt. Erst die Zugabe eines weiteren Äquivalents LiN_3 und erneutes 2stündiges Erhitzen führten zur vollständigen Umsetzung des Edukts. Anschliessend wurde das rotbraune Reaktionsgemisch abgekühlt und in eine Lösung aus 230 ml H_2O und 23 ml 5%ige HCl (1 eq) gegeben. Der dabei entstandene zähflüssige Niederschlag löste sich bei Zugabe von 90 ml Essigsäureethylester auf. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit Wasser und gesättigter $NaCl$ -Lösung gewaschen. Anschliessend trocknete man die organische Phase mittels Na_2SO_4 und zog das Lösungsmittel unter reduziertem Druck ab. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte umgesetzt.

Ausbeute: 10 g (ca. 100 % des unaufgereinigten Produkts)

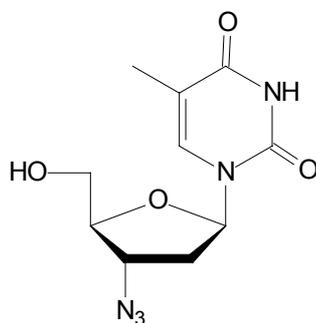
DC: $R_f = 0,79$ (Methylenchlorid / Methanol 9:1)

IR: $\nu(\text{N}_3)$: 2105 ($[\text{cm}^{-1}]$, KBr)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 11,34 (s, 1H, N-H3); 7,98-7,93 (d“t“, 2H, H-3''-Ar, $^3J_{\text{H,H}} = 11,68$); 7,41-7,40 (s, 1H, H-6); 7,06-7,03 (d“t“, 2H, H-2''-Ar, $^3J_{\text{H,H}} = 8,9$ Hz); 6,18-6,13 (ψ t, 1H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 6,53$); 4,63-4,40 (m, 3H, H-3' und H-5'); 4,13-4,09 (m, 1H, H-4'); 3,84 (s, 3H-OCH₃); 2,51-2,34 (m, 2H, 2 H-2'); 1,63 (s, 3H, C5-CH₃)

ESI-MS: $m/z = 402,2$ gefunden; 402,4 berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-Azido-3'-desoxythymidin 4



3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-(4-methoxybenzoyl)thymidin **3** (9 g, 22,4 mmol) wurden mit 100 ml ammoniakalischer Methanol-Lösung versetzt und 12 h bei 50°C gerührt. Da die Reaktion danach noch unvollständig war, wurde der einrotierte Ansatz erneut mit 100 ml ammoniakalischer Methanol-Lösung versetzt und weitere 12 h gerührt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

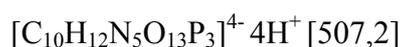
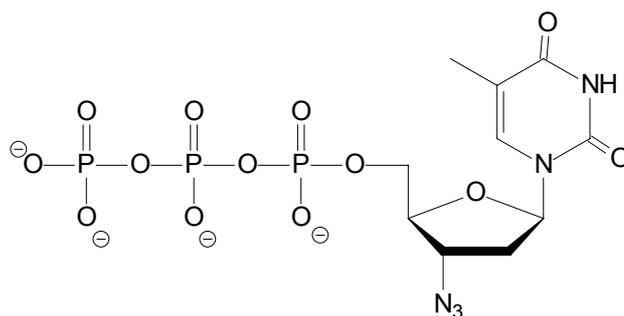
Ausbeute: 4,81 g (80 %)

DC: $R_f = 0,42$ (Methylenchlorid / Methanol 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 9,28 (b, 1H, N-H3); 7,42 (s, 1H, H-6); 6,10-6,05 (ψt, 1H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 6,51$); 4,43-4,38 (m, 1H, H-3'); 4,03-3,80 (m, 3H, H-4', 2 H-5'); 2,60-2,34 (m, 2H, 2 H-2'); 1,90 (d, 3H, C5-CH₃, $^4J_{\text{H,H}} = 1,17$ Hz)

ESI-MS: $m/z = 266,1$ gefunden; 266,2 berechnet $[\text{M-H}]^-$

3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat **36**



Die Reaktion und die vorbereitende Trocknung wurden bis zum Oxidationsschritt unter strenger Kontrolle der Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Lösungsmittel wurden absolut und über Molsieb getrocknet eingesetzt und die Reaktionsgefäße ausgeheizt.

3'-Azido-3'-desoxythymidin **4** (300 mg, 1,12 mmol) wurde zunächst durch dreimaliges Coevaporieren mit je 4 ml abs. Pyridin getrocknet. Der Rückstand wurde im Reaktionskolben unter Argon in einen Exsikkator überführt und über Nacht unter reduziertem Druck über P_2O_5 getrocknet. Der Reaktionskolben wurde mit einem Septum verschlossen. Das trockene Nukleosid wurde in 2,25 ml Pyridin und 9 ml DMF gelöst und 1,26 ml einer frisch hergestellten 1 M Lösung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in Dioxan unter Argongegendruck injiziert. Nach 20minütigem Rühren bei RT wurden 4,5 ml der

Pyrophosphat-Reaktionslösung (Allg. Vorschriften) ebenfalls unter Argongegendruck injiziert und die Reaktion für weitere 30 min gerührt. Durch Zugabe von 22,5 ml der 1%igen Iodlösung (Allg. Vorschriften) wurde der dreiwertige Phosphor oxidiert und das zyklische Triphosphat geöffnet. Nach weiteren 20 min wurde das überschüssige Iod durch Zutropfen einer 5%igen wässrigen NaHSO₃-Lösung zum Reaktionsgemisch reduziert. Die benötigte Menge an Reduktionsmittel konnte durch den Umschlagspunkt des Gemischs von dunklem Braun zu einem leichten Gelb ermittelt werden. Die Lösungsmittel wurden unter reduziertem Druck bei gelinder Erwärmung auf höchstens 30°C abgezogen (Stickstoffrotationsverdampfer). Der feste Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, in eine Spritze aufgezogen und durch einen Filter (0,2 µm Nalgene Syringe Filter) gedrückt, um kleinste, ungelöste Bestandteile zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert, erneut in Wasser aufgenommen und mittels FPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 300 mg (30 %)

DC: R_f = 0,05 (Isopropanol / 25 % NH₃/H₂O 7 : 1 : 2)

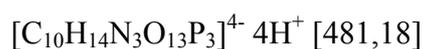
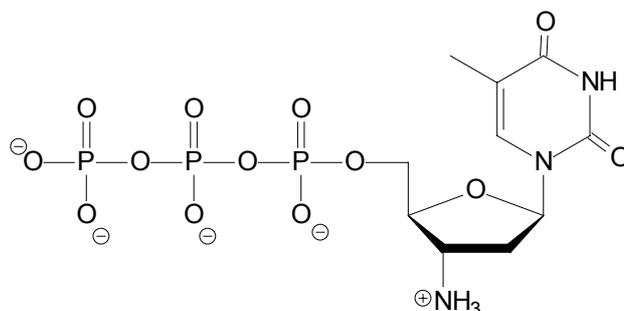
FPLC: Laufmittel: A = 0,05 TEAB; B = 1 M TEAB
Fluss: Methode 1: 1ml / min
Methode 2: 2ml / min
Gradient (Methode 1): 0 ml => 500 ml => 600 ml => 650 ml
0 % => 35 % => 50 % => 100 %
(Methode 2): 0 ml => 500 ml => 650 ml
0 % => 50 % => 100 %
Elutionskonzentration: 0,14 M TEAB

¹H-NMR: 400 MHz; D₂O; δ (ppm) = 7,7 (s, 1H, H-6); 6,21 (ft, 1H, H-1'); 4,56 (m, 1H, H-3'); 4,17 (m, 3H, H-4', 2 H-5'); 2,46-2,44 (m, 2H, 2 H-2'); 1,87 (s, 3H, C5-CH₃)

³¹P-NMR: 162 MHz; D₂O; δ (ppm) = -9,9 (d, 1P, γ-P); -10,7 (d, 1P, α-P); -22,4 (t, 1P, β-P)

ESI-MS: $m/z = 506,1$ gefunden; $506,2$ berechnet $[M-H]^-$

3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat 37



3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat 36 wurde in Pyridin gelöst und mit Triphenylphosphin (104 mg; 0,4 mmol) versetzt. Nach 12stündigem Rühren bei RT wurden 20 ml aq. NH_3 zugegeben und weitere 3 Stunden bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter leichtem Unterdruck abgezogen. Der verbleibende Rückstand wurde sterilfiltriert (0,2 μm Nalgene Syringe Filter). Die wässrige Lösung wurde lyophyllisiert, erneut in Wasser aufgenommen und mittels FPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 110 mg (42 %)

DC: $R_f = 0,02$ (Isopropanol / 25 % NH_3/H_2O 7 : 1 : 2)

FPLC: Laufmittel: A = 0,05 TEAB; B = 1 M TEAB
 Fluss: Methode 1: 1 ml / min
 Methode 2: 2 ml / min
 Gradient (Methode 1): 0 ml => 500 ml => 600 ml => 650 ml
 0 % => 35 % => 50 % => 100 %

(Methode 2): 0 ml => 500 ml => 650 ml

0 % => 50 % => 100 %

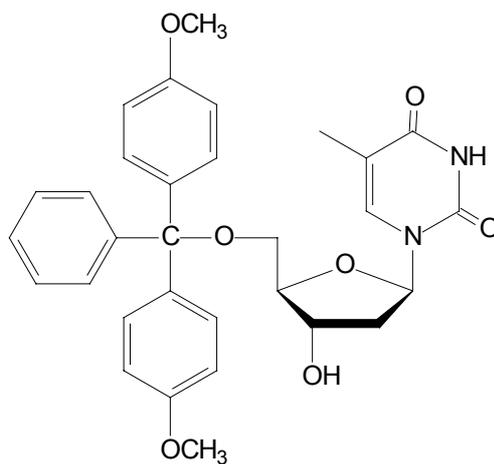
Elutionskonzentration: 0,12 M TEAB

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz; D_2O ; δ (ppm) = 7,76 (s, 1H, H-6); 6,25 (m, 1H, H-1'); H-3', H-4', H-5', H-5'' von H_2O überlagert; 2,62-2,56 (m, 2H, H-2' und H-2''), 1,84 (s, 3H, C5- CH_3)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162 MHz; D_2O ; δ (ppm) = -10,0 (d, 1P, γ -P), -10,6 (d, 1P, α -P), -21,2 (t, 1P, β -P)

ESI-MS: $m/z = 480,0$ gefunden; $480,2$ berechnet $[\text{M-H}]^-$

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidin 5



$\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$ [544,62]

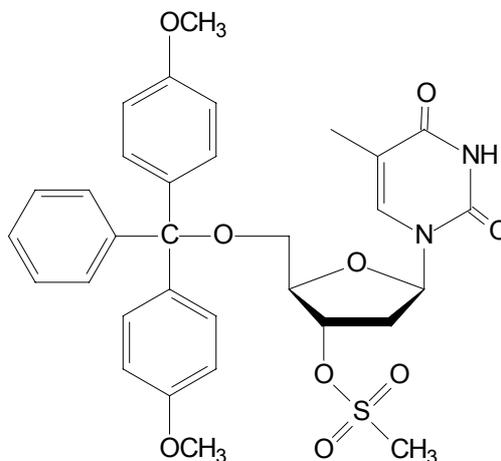
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde Thymidin (9,7 g; 40 mmol) über Nacht über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Das Edukt und *N,N*-Dimethylaminopyridin (0,224 g; 2mmol) wurden anschliessend in Pyridin (300 ml) vorgelegt und Triethylamin (8,4 ml; 60 mmol)

sowie Dimethoxytritylchlorid (17,7 g; 52 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 12 Stunden bei RT. Anschliessend wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol (120 ml) abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden nach 30 Minuten unter reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand durch Coevaporation mit Toluol von Pyridinresten befreit. Der Feststoff wurde in 400 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 100 ml H₂O gewaschen. Anschliessend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Das Rohprodukt wurde zur Umkristallisation mit 350 ml Benzol und 20 ml Essigsäureethylester 4-5 Stunden unter Rückfluss gekocht.

Ausbeute: 19,57 g (90 %)

DC: R_f = 0,27 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

¹H-NMR: 250 MHz; DMSO-d₆; δ (ppm) = 11,30 (s, 1H, N3-H, Thymidin); 7,51 (s, 1H, H-6), 7,41-6,88 (m, 13 H, Ar-H); 6,24-6,18 (ψt, 1H, H-1', ³J_{H,H} = 6,8 Hz); 5,32-5,30 (d, 1H, 3'-OH); 4,33 (b, 1H, 3'-H); 3,90-3,88 (m, 1H, 4'-H); 3,74 (s, 6H, O-CH₃); 3,20 (m, 2H, 2 H-5'); 2,31-2,13 (m, 2H, 2 H-2'); 1,46 (s, 3H, C5-CH₃)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-methylsulfonylthymidin 6

In einem ausgeheizten Schlenkcolben wurde 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidin 5 (10 g; 18,36 mmol) unter Argon in abs. Pyridin (70 ml) gelöst, auf 0°C abgekühlt und Methansulfonylchlorid (2,14 ml; 27,54 mmol) langsam über ein Septum zugespritzt, so dass sich die Lösung nicht erwärmt. Nach dreistündigem Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mittels 30 ml Methanol gequenchet und weitere 30 min gerührt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung langsam und unter ständigem Rühren auf 500 ml Eiswasser gegossen. Der gebildete weisse Niederschlag wurde abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und über P₂O₅ im Exsikkator getrocknet.

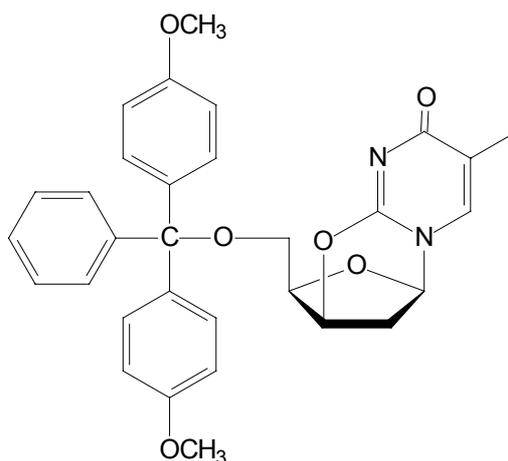
Ausbeute: 11,0 g (96%)

DC: R_f = 0,59 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

¹H-NMR: 250 MHz; DMSO-d₆; δ (ppm) = 11,39 (s, 1H, N3-H, Thymidin); 7,49-6,88 (s, 1H, H-6 und m, 13 H, Ar-H); 6,24-6,19 (ψt, 1H, H-1', ³J_{H,H} = 7,0 Hz); 5,36-5,35 (m, 1H, 3'-H); 4,21-4,20 (m, 1H, 4'-H); 3,74 (s, 6H, O-CH₃); 3,30 (m, 2H, 2 H-5'); 3,25 (s, 3H, S-CH₃); 2,59-2,54 (m, 2H, 2 H-2'); 1,48 (s, 3H, C5-CH₃)

ESI-MS: $m/z = \text{gefunden } 621,2; \text{ berechnet } 621,7 [M-H]^-$

***O*²,3'-Anhydro-1-(5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-*threo*-pentofuranosyl)thymidin 7**



Zunächst wurde Kaliumphthalimid (13,4 g; 72,25 mmol) in 150 ml DMF und 40 ml H₂O gelöst und anschliessend 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-*O*-methylsulfonylthymidin 6 (9 g; 14,45 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 1 Stunde unter Reflux gekocht, abgekühlt und langsam unter Rühren in 500 ml Eiswasser gegossen. Der gebildete weisse Niederschlag wurde abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und über P₂O₅ im Exsikkator getrocknet.

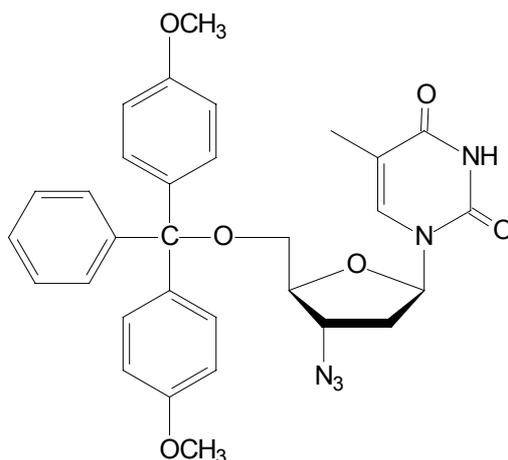
Ausbeute: 6,76 g (89 %)

DC: $R_f = 0,33$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

¹H-NMR: 250 MHz; DMSO-d₆; δ (ppm) = 7,39-6,82 (m, 1H, H-6 und m, 13 H, Ar-H); 5,89-5,88 (d, 1H, H-1'); 5,31 (s, 1H, 3'-H); 4,43-4,38 (m, 1H, 4'-H); 3,72 (s, 6H, O-CH₃); 3,17-3,03 (m, 2H, 2 H-5'); 2,60-2,43 (m, 2H, 2 H-2'); 1,78 (s, 3H, C5-CH₃)

ESI-MS: $m/z = 527,3$ gefunden; $527,6$ berechnet $[M+H]^+$

3'-Azido-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin 8



$C_{31}H_{31}N_5O_6$ [569,6]

*O*²,3'-Anhydro-1-(5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-*threo*-pentofuranosyl)thymidin 7 (5,53 g, 10,5 mmol) und LiN_3 (siehe allg. Vorschriften; 2,6 g; 53 mmol) wurden in einem ausgeheizten Schlenk Kolben unter Argon in 60 ml abs. DMF suspendiert und 5 Stunden bei $125^\circ C$ gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung wurde der Ansatz in 150 ml Essigsäureethylester aufgenommen und je dreimal mit 5%iger $NaHCO_3$ -Lösung und gesättigter $NaCl$ -Lösung gewaschen und mittels $MgSO_4$ getrocknet. Anschliessend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand durch Kieselgel-Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: 4,8 g (80 %)

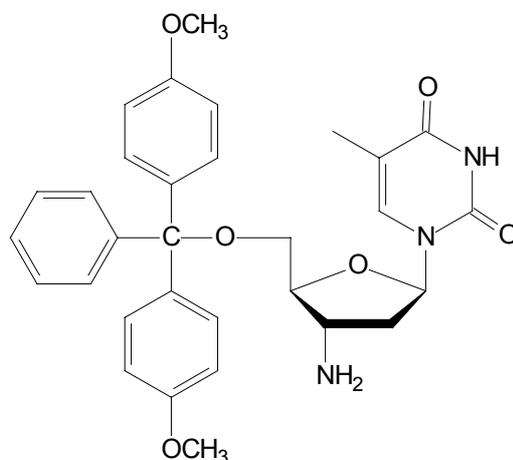
DC: $R_f = 0,73$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

1H -NMR: 250 MHz; $DMSO-d_6$; δ (ppm) = 11,39 (s, 1H, N3-H); 7,51-6,90 (m, 1H, H-6)

und m, 13 H, Ar-H); 6,20-6,15 (vt, 1H, H-1', $^3J_{H,H} = 6,34$ Hz); 4,64-4,56 (dd, 1H, 3'-H); 3,95-3,89 (m, 1H, 4'-H); 3,77 (s, 6H, O-CH₃); 3,28 (m, 2H, 2 H-5'); 2,57-2,52 (m, 1H, H-2') 2,49-2,34 (m, 1H, H-2'); 1,59 (s, 3H, C5-CH₃)

IR: v (N3): 2103 ([cm⁻¹], KBr)

3'-Amino-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **9**



C₃₁H₃₃N₃O₆ [543,63]

3'-Azido-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **8** (5,9 g; 10,5 mmol) wurde in einem ausgeheizten Schlenkcolben unter Argon in 500 ml abs. Methanol gelöst. Die Lösung wurde durch mehrmaliges Evakuieren und anschließendes Belüften mittels Argon entgast. Unter Schutzgas wurden 3 Spatelspitzen PtO₂·H₂O zugegeben und Wasserstoff durch die Lösung geleitet. Da die Umsetzung nach 3 Stunden noch nicht vollständig war, wurde eine Spatelspitze des Katalysators nachdosiert und über Nacht mit H₂-Ballon weitergerührt. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert, das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen und mittels Kieselgel-Säulenchromatographie aufgereinigt.

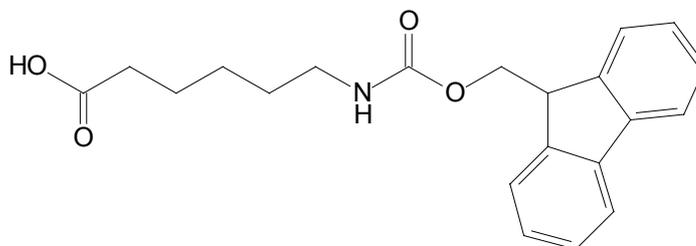
Ausbeute: 3,9 g (72 %)

DC: R_f = 0,29 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 7,57-7,56 (d, 1H, H-6) 7,48-6,93 (m, 13 H, Ar-H); 6,21-6,18 (ψ t, 1H, H-1'); 3,79 (s, 6H, O-CH $_3$); 3,58-3,27 (m, 4H, H-3', H-4', 2 H-5'); 2,33-2,22 (m, 1H, H-2'); 2,15-2,04 (m, 1H, H-2'); 1,53 (d, 3H, C5-CH $_3$, $^4J_{\text{H,H}} = 1,18$ Hz)

IR: ν (NH $_2$): 2930 ([cm $^{-1}$], KBr)

6-{{(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl}amino}hexansäure 11



Aminocaprinsäure (1,95 g; 14,82 mmol) wurde in 80 ml H $_2$ O / Aceton (1 : 1) gelöst und *N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimid (5 g; 14,82 mmol) sowie NaHCO $_3$ (1,24 g; 14,82 mmol) zugegeben. Die Suspension löste sich nach 1 Stunde fast vollständig. Eine weitere Stunde später fiel ein weisser Niederschlag aus. Anschliessend wurde das Aceton unter reduziertem Druck abgezogen, der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und mit 0,1 N HCl und H $_2$ O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO $_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der weisse Rückstand wurde in einem 1 : 1-Gemisch aus Methylenchlorid und *n*-Hexan umkristallisiert, wobei bis zur vollständigen Löslichkeit erneut Methylenchlorid zugegeben werden musste.

Ausbeute: 5,2 g (99 %)

DC: $R_f = 0,13$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

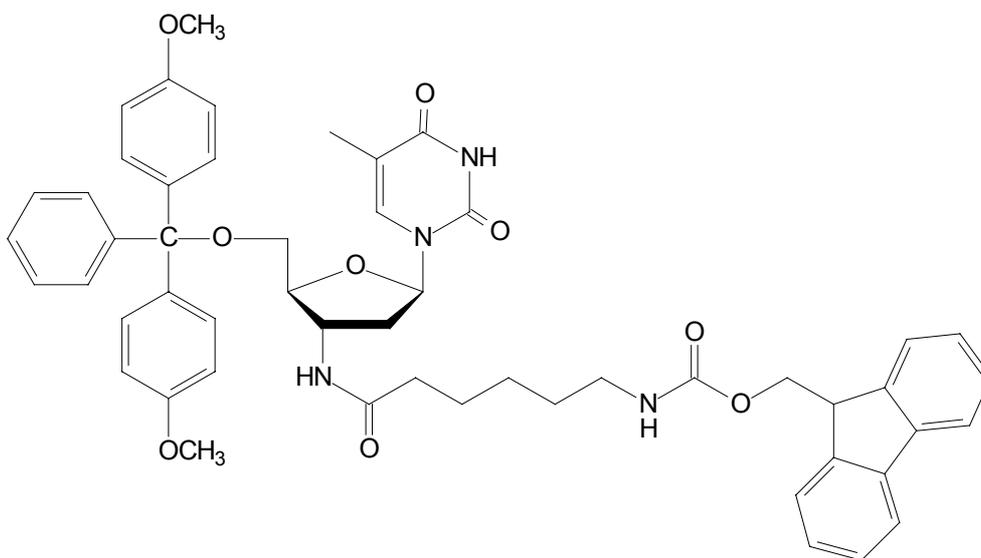
$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 7,78-7,75 (d, 2H, Ar-Fmoc); 7,61-7,58 (d, 2H, Ar-Fmoc); 7,43-7,26 (m, 4H, Ar-Fmoc); 4,80 (b, 1H, N-H); 4,43-4,41 (d, 2H, H-10); 4,24-4,20 (m, 1H, H-11); 3,21-3,07 (m, 2H, H-6); 2,39-2,33 (t, 2H, H-2); 1,66-1,37 (m, 6H, H-3, H-4, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$: 63 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 178,8 (C-1); 156,34 (C-8); 143,8; 141,2; 127,5; 126,9; 124,9; 119,8 (C-Fmoc); 66,4 (C-10); 47,1 (C-11); 40,6 (C-2); 33,6 (C-2); 29,4 (C-5); 25,9 (C-3); 24,1 (C-4)

ESI-MS: m/z = 354,1 gefunden; 354,3 berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$

Smp.: 117-120°C

3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl}amino}-1-oxohexyl}amino}thymidin 12



$\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_9$ [879,02]

Zu einer Lösung aus 3'-Amino-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-desoxythymidin **9** (1,17 g; 2,15 mmol) und *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-6-aminocaprinsäure **11** (0,636 g; 1,8 mmol) in

DMF (5 ml) wurden Diisopropylethylamin (DIPEA; 0,4 ml, 2,4 mmol) und TSTU (0,845 g; 2,8 mmol) gegeben. Nach 30minütigem Rühren bei RT (DC-Kontrolle) wurde die wässrige Phase viermal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck abgezogen. Die Aufreinigung des Rückstands erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie.

Ausbeute: 0,585 g (37 %)

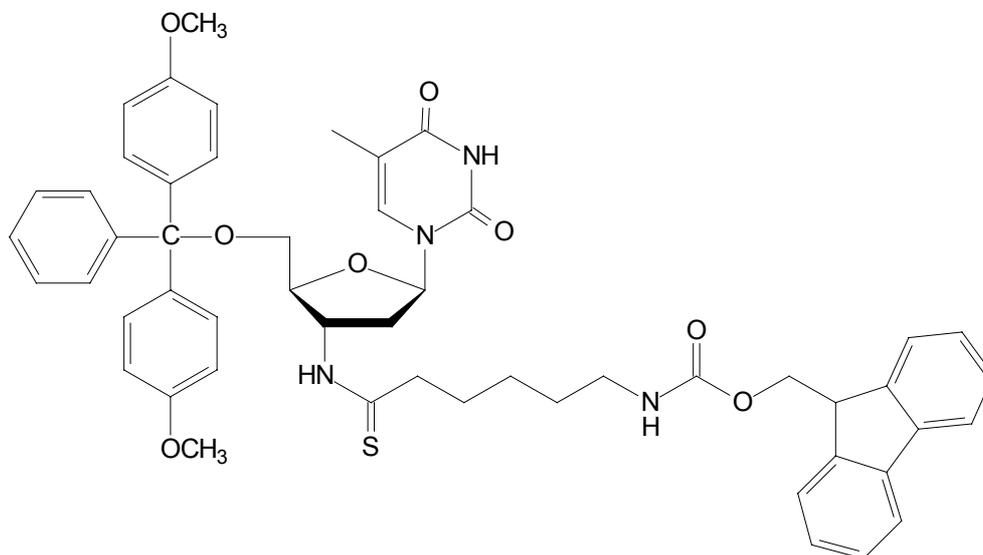
DC: R_f = 0,38 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

¹H-NMR: 250 MHz; CDCl₃; δ (ppm) = 9,90 (b, 1H, N-H); 7,99 (s, 1H, H-6); 7,73-7,71 (d, 2H, Ar-Fmoc); 7,61-6,78 (m, 19H, Ar-Fmoc und DMTr); 6,36 (pt, 1H, H-1'); 5,08 (b, 1H, H-7''); 4,71-4,70 (m, 1H, H-3'); 4,36-4,34 (d, 2H, H-10''); 4,22-4,20 (m, 1H, H-11''); 4,01-4,00 (m, 1H, H-4'); 3,79 (s, 6H, O-CH₃); 3,43-3,42 (m, 2H, 2 H-5'); 3,14-3,12 (m, 2H, H-6''); 2,45-2,15 (m, 4H, H-2' und H2''); 1,62-1,25 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-5''); 1,37 (s, 3H, C5-CH₃)

¹³C-NMR: 63 MHz; CDCl₃; δ (ppm) = 173,2 (N-3'-CO); 163,9 (C-4); 158,6 (C-DMTr); 156,5 (C-8''); 150,8 (C-2); 144,3 (C-DMTr); 143,9; 141,2 (C-Fmoc); 135,6; 135,4 (C-6; C-DMTr); 130,1; 128,2; 127,9; 127,0 (C-DMTr); 127,6; 126,9; 124,9; 119,9 (C-Fmoc); 113,2 (C-DMTr); 111,4 (C-5); 87,0; 85,0; 84,4 (C-1', C-4', C-DMTr); 66,5 (C-10''); 64,1 (C-5'); 55,2 (OCH₃); 47,2 (C-11''); 40,7 (C-2''); 38,0; 35,9 (C-3', C-2'); 31,4; 29,5; 26,2; 25,0 (C-6'', C-5'', C-4'', C-3''); 11,6 (C5-CH₃)

ESI-MS: m/z = 897,0 (NH₄-Addukt) gefunden; 896,6 (NH₄-Addukt) berechnet [M+H]⁺

3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-thiohexyl}amino}thymidin 15



Zu einer Lösung von 3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}}-1-oxohexyl}amino}thymidin 12 (1 g; 1,14 mmol) in abs. THF und abs. Pyridin (92 μ l; 1,14 mmol) wurde unter Schutzgas Lawesson's Reagenz (1,84 g; 4,56 mmol) gegeben. Die Lösung rührte 3 Stunden bei RT. Anschliessend wurden 100 ml einer gesättigten $NaHCO_3$ -Lösung zugegeben und die wässrige Phase zweimal mit Methylenechlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen. Die Aufreinigung des Rückstands erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie.

Ausbeute: 0,510 g (50 %)

DC: $R_f = 0,49$ (Methylenechlorid / Methanol 9 : 1)

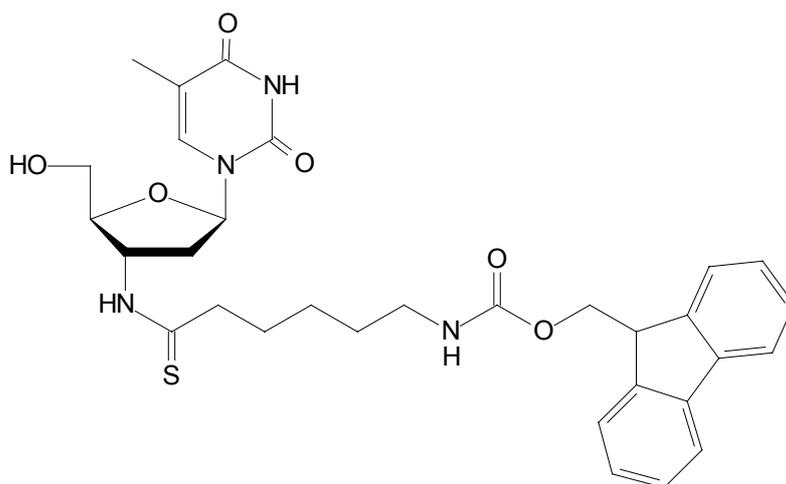
1H -NMR: 250 MHz; $CDCl_3$; δ (ppm) = 10,19 (b, 1H, N-H); 9,22 (b, 1H, N-H); 7,67-6,72 (m, 22H, H-6, Ar-Fmoc und DMTr); 6,49 (ψ t, 1H, H-1'); 5,42 (m, 1H, H-7');

4,83 (m, 1H, H-3'); 4,30-4,27 (d, 2H, H-10''); 4,21 (m, 1H, H-11''); 4,10 (m, 1H, H-4'); 3,78-3,70 (m, 1H, H-5'); 3,68 (s, 6H, O-CH₃); 3,35-3,31 (m, 1H, H-5'); 3,09-3,06 (m, 2H, H-6''); 2,66-2,61 (m, 2H, H-2'); 2,42-2,27 (m, 2H, H-2''); 1,96-1,27 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-5''); 1,35 (s, 3H, C5-CH₃)

¹³C-NMR: 63 MHz; CDCl₃; δ (ppm) = 206,4 (N-3'-CS); 164,2 (C-4); 158,4 (C-DMTr); 156,4 (C-8''); 150,7 (C-2); 144,6 (C-DMTr); 143,9; 141,3 (C-Fmoc); 135,6; 135,4 (C-6; C-DMTr); 130,1; 128,1; 127,9; 127,05 (C-DMTr); 127,6; 126,9; 125,0; 119,9 (C-Fmoc); 113,3 (C-DMTr); 111,5 (C-5); 87,1; 85,8; 85,0 (C-1', C-4', C-DMTr); 66,5 (C-10''); 65,3 (C-5'); 55,3 (OCH₃); 47,22 (C-11''); 45,4 (C-2'); 40,7 (C-2''); 38,6; 37,4 (C-3', C-6''); 29,5; 28,9; 25,8 (C-5'', C-4'', C-3''); 11,7 (C5-CH₃)

ESI-MS: m/z = 893,6 gefunden; 894,1 berechnet [M-H]⁻

3'-Desoxy-3'-{{6-{{(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thioxohexyl}amino}-thymidin 16



C₃₁H₃₆N₄O₆S [592,65]

3'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-{6-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thioxohexyl}amino}thymidin **15** (0,140 g; 0,156 mmol) wurde in Dichlormethan (2 ml) gelöst und 80% aq. Essigsäure zugespritzt. Nach dreistündigem Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand je dreimal mit Wasser und einmal mit *n*-Hexan coevaporiert. Die Aufreinigung des Rückstands erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie.

Ausbeute: 68 mg (74 %)

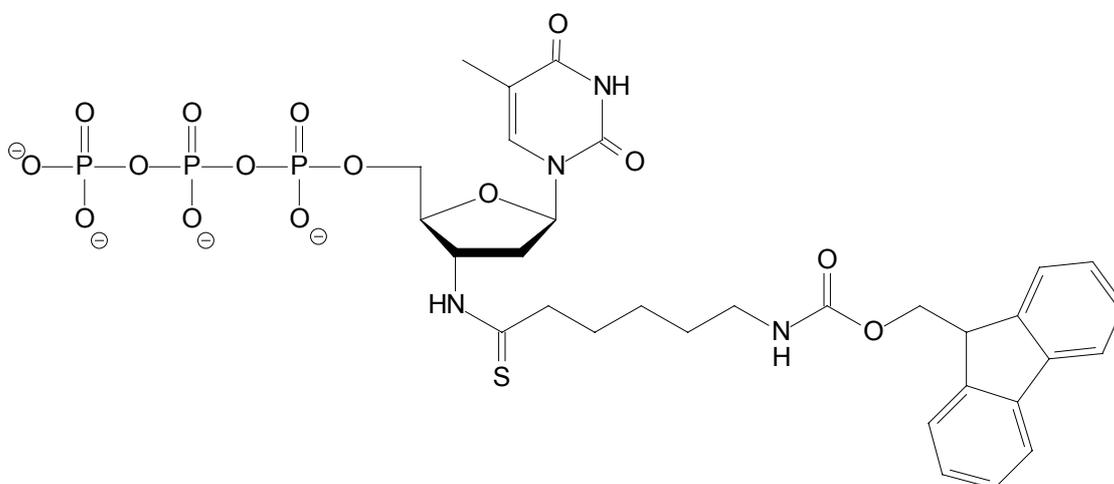
DC: $R_f = 0,37$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 10,25 (s, 1H, N-H); 9,17 (d, 1H, N-H3'); 7,69-7,63 (m, 3H, H-6 und Ar-Fmoc); 7,37 (d, 2H, Ar-Fmoc); 6,23 (ψ t, 1H, H-1'); 5,15 (b, 1H, 5'-OH); 4,92 (m, 1H, H-3'); 4,26 (d, 2H, H-10''); 4,11-4,05 (m, 1H, H-11''); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,84 (m, 2H, H-5' und H-5''); 3,04-3,02 (m, 2H, H-6''); 2,58-2,55 (m, 2H, H-2'); 2,38-2,18 (m, 2H, H-2''); 1,78 (s, 3H, C5-CH₃); 1,68-1,15 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-5'')

$^{13}\text{C-NMR}$: 63 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 206,4 (N-3'-CS); 164,3 (C-4); 156,6 (C-8''); 150,8 (C-2); 143,7; 141,1 (C-Fmoc); 136,0 (C-6); 127,6; 126,9; 124,8; 119,9 (C-Fmoc); 111,0 (C-5); 85,6; 84,7 (C-1', C-4'); 66,6 (C-10''); 62,4 (C-5'); 47,0 (C-11''); 45,6 (C-2'); 40,6 (C-2''); 36,9 (C-3'); 29,0; 25,6 (C-5'', C-4'', C-3''); 12,5 (C5-CH₃)

ESI-MS: $m/z = 591,5$ gefunden; 591,6 berechnet $[\text{M-H}]^-$

3'-Desoxy-3'-{6-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thioxohexyl}amino}-thymidin-5'-triphosphat 38



Die Reaktion und die vorbereitende Trocknung wurden bis zum Oxidationsschritt unter strenger Kontrolle der Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Lösungsmittel wurden absolut und über Molsieb getrocknet eingesetzt und die Reaktionsgefäße ausgeheizt.

3'-Desoxy-3'-{6-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thioxohexyl}amino}-thymidin 16 (150 mg; 0,253 mmol) wurde zunächst durch dreimaliges Coevaporieren mit je 0,5 ml abs. Pyridin getrocknet. Der Rückstand wurde im Reaktionskolben unter Argon in einen Exsikkator überführt und über Nacht unter reduziertem Druck über P_2O_5 getrocknet. Der Reaktionskolben wurde mit einem Septum verschlossen. Das trockene Nukleosid wurde in 0,5 ml Pyridin und 2,55 ml DMF gelöst und 0,3 ml einer frisch hergestellten 1 M Lösung von 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in Dioxan unter Argongegendruck injiziert. Nach 20minütigem Rühren bei RT wurden 1,07 ml der Pyrophosphat-Reaktionslösung (Allg. Vorschriften) ebenfalls unter Argongegendruck injiziert und die Reaktion für weitere 30 min gerührt. Durch Zugabe von 5,4 ml der 1 %igen Iodlösung (Allg. Vorschriften) wurde der dreiwertige Phosphor oxidiert und das zyklische Triphosphat geöffnet. Nach weiteren 20 min wurde das überschüssige Iod durch Zutropfen einer 5 %igen wässrigen NaHSO_3 -Lösung zum Reaktionsgemisch reduziert. Die benötigte Menge an Reduktionsmittel konnte durch den Umschlagspunkt des Gemischs von dunklem Braun zu einem leichten Gelb ermittelt werden. Die Lösungsmittel wurden unter reduziertem Druck bei gelinder Erwärmung auf höchstens 30°C abgezogen (Stickstoffrotationsverdampfer). Der

festen Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, in eine Spritze aufgezogen und durch einen Filter (0,2 µm Nalgene Syringe Filter) gedrückt, um kleinste, ungelöste Bestandteile zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert, erneut in Wasser aufgenommen und mittels FPLC aufgereinigt, wobei das Produkt bei 0,28 M TEAB-Puffer eluierte.

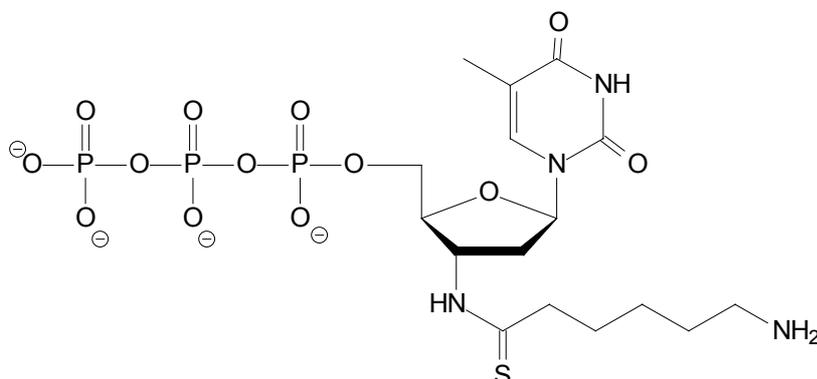
Ausbeute: 48 µmol (19 %)

DC: $R_f = 0,15$ (Isopropanol / 25 % $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 7 : 1 : 2)

FPLC: Laufmittel: A = 0,05 M TEAB; B = 1 M TEAB
Fluss: 1 ml / min
Gradient: 0 ml => 100 ml => 300 ml => 600 ml
0 % => 30 % => 50 % => 100 %
Elutionskonzentration: 0,2 M TEAB

^{31}P -NMR: 162 MHz; D_2O ; δ (ppm) = -5,7 (d, 1P, γ -P); -10,8 (d, 1P, α -P);
-21,8 (t, 1P, β -P)

ESI-MS: $m/z = 831,5$ gefunden; 831,7 berechnet $[\text{M}-\text{H}]^-$

3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat 39

3'-Desoxy-3'-{{6-{{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino}-1-thioxohexyl}amino}-thymidin-5'-triphosphat 38 (48 μmol) wurde zu einer Lösung aus Pyridin (20 ml), DMF (12 ml) und Dioxan (8 ml) gegeben. Die Reaktionslösung rührte eine Stunde bei RT und wurde anschliessend unter reduziertem Druck ohne Erwärmung (Stickstoffrotationsverdampfer) evaporiert. Der feste Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, in eine Spritze aufgezogen und durch einen Filter (0,2 μm Nalgene Syringe Filter) gedrückt, um kleinste, ungelöste Bestandteile zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert, erneut in Wasser aufgenommen und mittels FPLC aufgereinigt, wobei das Produkt bei 0,14 M TEAB-Puffer eluierte.

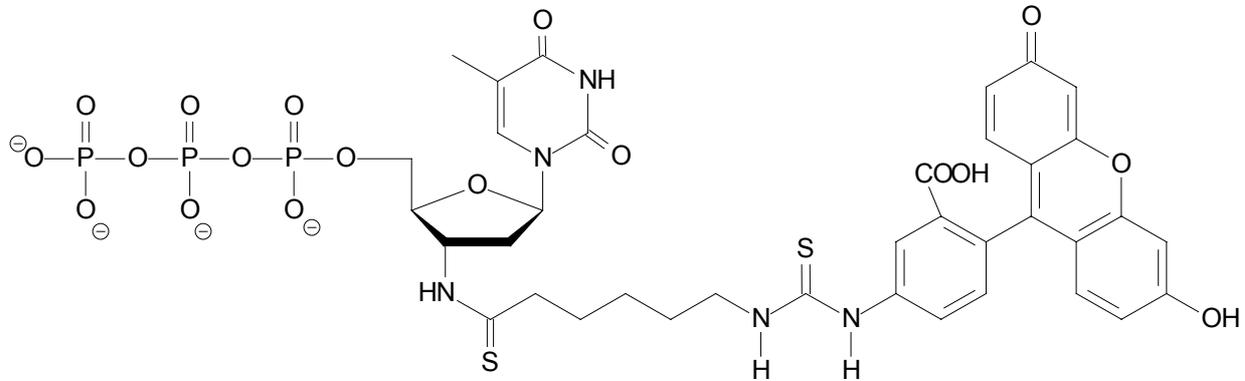
Ausbeute: 39 μmol (81 %)

DC: $R_f = 0,13$ (Isopropanol / 25 % $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 7 : 1 : 2)

FPLC:	Laufmittel:	A = 0,05 M TEAB; B = 1 M TEAB
	Fluss:	1 ml / min
	Gradient:	0 ml => 500 ml => 650 ml
		0 % => 50 % => 100 %
	Elutionskonzentration:	0,14 M TEAB

- HPLC: $R_t = 4,80$ min (UV-Detektion)
- $^1\text{H-NMR}$: 400 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 7,86 (s, 1H, H-6); 6,26 (ψ t, 1H, H-1'); 5,00-4,95 (m, 1H, H-3'); 4,46 (m, 1H, H-4'); 4,28-4,18 (m, 2H, 2 H-5'); 3,15-2,97 (m, 2H, H-6'); 2,74-2,66 (m, 3H, H-2', H-2''); 2,47-2,40 (m, 1H, H-2'); 1,91 (s, 3H, C5- CH_3); 1,84-1,33 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-5'')
- $^{13}\text{C-NMR}$: 63 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 207,0 (N-3'-CS); 166,5 (C-4); 151,4 (C-2); 137,6 (C-6); 111,6 (C-5); 85,3; 81,4 (C-1', C-4'); 66,06 (C-5'); 42,54 (C-2'); 39,1 (C-2''); 35,5 (C-3'); 28,1; 26,4; 24,3 (C-5'', C-4'', C-3''); 11,5 (C5- CH_3)
- $^{31}\text{P-NMR}$: 162 MHz; D_2O ; δ (ppm) = -8,2 (d, 1P, γ -P); -10,6 (d, 1P, α -P); -22,0 (t, 1P, β -P)
- ESI-MS: $m/z = 609,2$ gefunden; 609,4 berechnet $[\text{M-H}]^-$

Markierung von 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat 39 mit Fluoreszeinisothiocyanat



Zu einer Lösung von 3'-[[6-Amino-1-thioxohexyl)amino]-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat 39 (10 μmol) in 6 ml aq. NaHCO_3 (pH = 9,3) wurde eine Lösung aus Fluoreszeinisothiocyanat (12 mg) in 6 ml DMF gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 24 Stunden bei RT. Die Aufreinigung erfolgte mittels Anionenaustauscher-HPLC (Synchropac; 0,05 M KH_2PO_4 ; 50 % Formamid; pH = 5,5 von 0 % bis 100 % in 30 min).

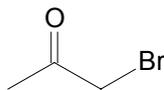
Ausbeute: 4 μmol (40 %); Bestimmung durch optische Dichte bei 270 nm

HPLC: $R_t = 19,47$ min (UV-Detektion)

$R_t = 18,28$ min (Fluoreszenz-Detektion; $I_{\text{Ex}} = 490$ nm; $I_{\text{Em}} = 525$ nm)

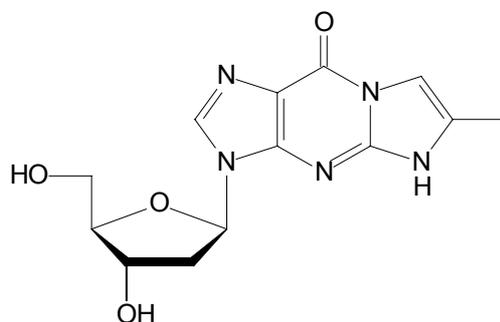
$R_t(\text{FITC}) = 12,52$ min (Fluoreszenz-Detektion; $I_{\text{Ex}} = 490$ nm; $I_{\text{Em}} = 525$ nm)

ESI-MS: $m/z = 998,3$ gefunden; 998,8 berechnet $[\text{M}-\text{H}]^-$

Bromaceton 17

Eine Lösung aus H_2O (160 ml; 8,87 mol), Aceton (50 ml; 0,68 mol) und Eisessig (37,2 ml; 0,65 mol) wurde auf 65-70 °C erhitzt und langsam Brom (35,4 ml; 0,69 mol) zugetropft. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch bei RT in 80 ml kaltes Wasser gegeben und unter Rühren auf 10 °C gekühlt und der pH-Wert mit Na_2CO_3 auf 5 eingestellt. Anschliessend wurde die milchig-trübe Suspension in einen Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde über CaCl_2 getrocknet und im Wasserstrahlvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt destillierte in Form einer farblosen Flüssigkeit bei 95-104 °C.

Ausbeute: 25,6 g (27,5 %)

2'-Desoxy-4-desmethylwyosin 19

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde unter Schutzgas 2'-Desoxyguanosin (5 g; 18,71 mmol) in abs. DMSO (60 ml) gelöst und NaH (940 mg einer 60 %igen Suspension; 19,64 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 1 Stunde unter Feuchtigkeitsausschluss bei RT. Anschliessend injizierte man Bromaceton (2,69 g; 19,64 mmol) und rührte eine weitere Stunde bei RT. Mit der Zugabe von konz. NH_4OH (30 ml) wurde die Reaktion abgeschlossen. Nach zweistündigem Rühren bei RT wurde die dunkelrote Lösung am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von ca. 30 ml eingengt. Der in 30 ml Aceton gelöste Rückstand wurde unter Rühren zu einem Gemisch aus 400 ml Aceton und 100 ml Diethylether gegeben. Nach dreistündigem Rühren bei 0 °C wurde der ölige Rückstand durch Dekantieren von den Lösungsmitteln getrennt, mit Diethylether gewaschen und unter reduziertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Anschliessend löste man das bräunliche Pulver in 200 ml Wasser und absorbierte es durch mehrmalige Coevaporation mit Ethanol an 15 g Kieselgel. Die Aufreinigung erfolgte durch Kieselgelsäulenchromatographie mittels Methylenchlorid und steigendem Methanolgradienten.

Ausbeute: 4,7 g (82 %)

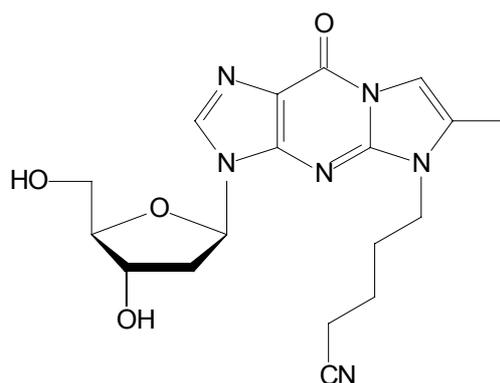
$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 12,38 (s, 1H, N-H); 8,14 (s, 1H, H-2); 7,37 (d, 1H, H-9); 6,29-6,23 (ψt, 1H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 6,84$ Hz); 5,35-5,34 (d, 1H,

3'-OH); 5,16-5,00 (t, 1H, 5'-OH); 4,41 (b, 1H, H-3'); 3,88-3,87 (m, 1H, H-4');
3,63-3,51 (m, 2H, 2 H-5'); 2,68-2,32 (m, 2H, 2 H-2'); 2,28 (d, 3H, C8-CH₃)

¹³C-NMR: 63 MHz; DMSO-d₆; δ (ppm) = 151,15 (C-11); 149,46 (C-4); 145,49 (C-6);
136,92 (C-2); 126,13 (C-8); 115,53 (C-12); 103,29 (C-9); 87,63 (C-1'); 83,00
(C-4'); 70,76 (C-5'); 40,65-38,48 (C-2' und C-3' von DMSO verdeckt);
10,54 (C8-CH₃)

ESI-MS: m/z = 304,3 gefunden; 304,3 berechnet [M-H]⁻

7-Valeriansäurenitril-2'-desoxy-7-desmethylwyosin 20



C₁₈H₂₂N₆O₄ [386,41]

Zu einer Lösung aus 2'-Desoxy-4-desmethylwyosin 19 (1 g; 3,3 mmol) in abs. DMF (25 ml) wurde K₂CO₃ gegeben und 2 Tage bei RT gerührt. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch über Celite abfiltriert und mit erwärmtem DMF solange gewaschen, bis im Filtrat keine UV-Aktivität mehr zu beobachten war. Das Lösungsmittel wurde mittels des Stickstoffrotationsverdampfers abgezogen, mit Wasser coevaporiert und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0,958 g (75 %)

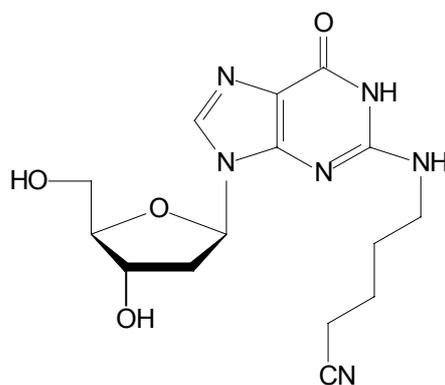
DC: $R_f = 0,64$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 8,12 (s, 1H, H-2); 7,48 (d, 1H, H-9); 6,29-6,23 (ψ t, 1H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 6,95$ Hz); 5,34-5,32 (d, 1H, 3'-OH); 4,96-4,92 (t, 1H, 5'-OH, $^3J_{\text{H,H}} = 5,31$ Hz); 4,43-4,41 (m, 1H, H-3'); 4,11-4,07 (t, 2H, H-13, $^3J_{\text{H,H}} = 7,07$ Hz); 3,89-3,84 (m, 1H, H-4'); 3,66-3,49 (m, 2H, 2 H-5'); 2,77-2,67 (m, 1H, H-2'); 2,59-2,49 (m, 3H, H-2' und H 16) 2,34 (d, 3H, C8-CH₃); 1,89-1,77 (m, 2H, H 14); 1,65-1,54 (m, 2H, H 15)

$^{13}\text{C-NMR}$: 63 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 150,92 (C-11); 149,07 (C-4); 144,78 (C-6); 137,33 (C-2); 127,33 (C-8); 120,39 (C-CN); 115,94 (C-12); 103,13 (C-9); 87,70 (C-1'); 83,56 (C-4'); 61,84 (C-5'); 41,11 (C-13); 27,47 (C-14); 21,94 (C-15); 9,57 (C-16); 6,16 (C8-CH₃)

ESI-MS: $m/z = 385,3$ gefunden; $385,4$ berechnet $[\text{M-H}]^-$

2-Valeriansäurenitril-2'-desoxyguanosin **21**



5-Valeriansäurenitril-2'-desoxy-4-desmethylwyosin **20** (0,25 g; 0,646 mmol) wurde in Acetonitril (5 ml) / Wasser (5 ml) gelöst und *N*-Bromsuccinimid (0,138 g; 0,775 mmol) zugegeben. Nach 30minütigem Rühren wurde die Reaktionslösung mit konz. NH_4OH versetzt und weitere 30 min bei RT gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion (Dünnschichtchromato-

graphie) wurden die Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand durch mehrfache Coevaporation mit Ethanol an 3 g Kieselgel absorbiert. Die Aufreinigung erfolgte anschliessend mittels Kieselgel Säulenchromatographie.

Ausbeute: 0,162 g (72 %)

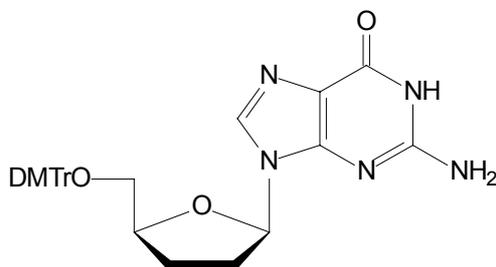
DC: $R_f = 0,5$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 10,72 (b, 1H, N2-H); 7,89 (s, 1H, H-8); 6,62-6,59 (bt, 1H; N1-H, $^3J_{\text{H,H}} = 5,50$ Hz); 6,16-6,12 (ψ t, 1H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 7,07$ Hz); 5,28-5,27 (d, 1H, 3'-OH); 4,73-4,70 (t, 1H, 5'-OH, $^3J_{\text{H,H}} = 5,81$ Hz); 4,46-4,42 (m, 1H, H-3'); 3,89-3,84 (m, 1H, H-4'); 3,63-3,42 (m, 2H, 2 H-5'); 3,31-3,22 (m, 2H, H 13); 2,56-2,50 (m, 3H, H-2' und H 16) 2,17-2,11 (m, 1H, H-2'); 1,62-1,1,61 (m, 4H, H 14 und H 15)

$^{13}\text{C-NMR}$: 63 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 155,43 (C-6) 152,17 (C-2); 151,53 (C-4); 120,54 (C-CN); 117,64 (C-5); 87,47 (C-4'); 85,11 (C-1'); 70,79 (C-3'); 61,97 (C-5'); 40,42-38,57 (von DMSO- d_6 verdeckt); 36,06 (C-2'); 27,81 (C-14); 22,24 (C-15); 15,91 (C-16)

ESI-MS: $m/z = 348,9$ gefunden; 349,3 berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$

Deacylierung von *N*²-Isobutyryl-5'-dimethoxytrityl-2',3'-didesoxyguanosin 22 zu 5'-Dimethoxytrityl-2',3'-didesoxyguanosin 23



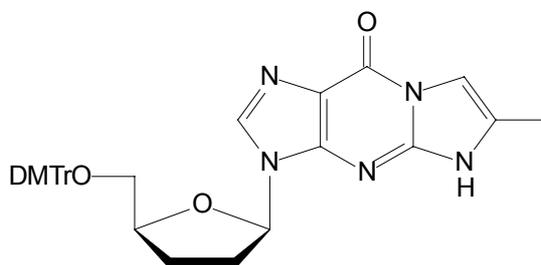
*N*²-Isobutyryl-5'-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyguanosin 22 (0,2 g; 0,32 mmol) wurde in Aceton gelöst und anschliessend konz. NH_4OH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 Stunden auf 65 °C erhitzt. Nach abgeschlossener Reaktion (Dünnschichtchromatographie) wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen. Der Rückstand wurde Kieselgel-Säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 0,157 g (88 %)

DC: $R_f = 0,31$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

¹H-NMR: 250 MHz; DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 10,61 (b, 1H, N2-H); 7,78 (s, 1H, H-8); 7,35-7,18 (m, 9H, Ar-DMTr); 6,84-6,78 (m, 4H, Ar-DMTr); 6,07-6,03 (ψ t, 1H, H-1', ³J_{H,H} = 4,85 Hz); 5,28-5,27 (d, 1H, 3'-OH); 4,73-4,70 (t, 1H, 5'-OH, ³J_{H,H} = 5,81 Hz); 4,22-4,19 (m, 1H, H-4'); 3,72 (s, 6H, OCH₃); 3,09-3,03 (m, 2H, 2 H-5'); 2,52-2,49 (m, 2H, H-3'); 2,43-2,36 (m, 1H, H-2') 2,07-1,99 (m, 1H, H-2')

ESI-MS: $m/z = 554,5$ gefunden; 554,6 berechnet $[M+H]^+$

5'-Dimethoxytrityl-2',3'-dideoxy-7-desmethylwyosin 24

5'-Dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyguanosin 23 (1g; 1,18 mmol) wurde unter Schutzgas in einem ausgeheizten Schlenkcolben in abs. DMSO (8 ml) gelöst und NaH (60% Suspension; 71,5 mg; 1,86 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 1 Stunde bei RT. Anschliessend wurde Bromaceton (187 mg; 1,52 mmol) durch ein Septum injiziert und weitere 60 Minuten gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von 15 ml konz. NH_4OH . Nach zweistündigem Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen (Stickstoffrotationsverdampfer). Der braune, ölige Rückstand wurde mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

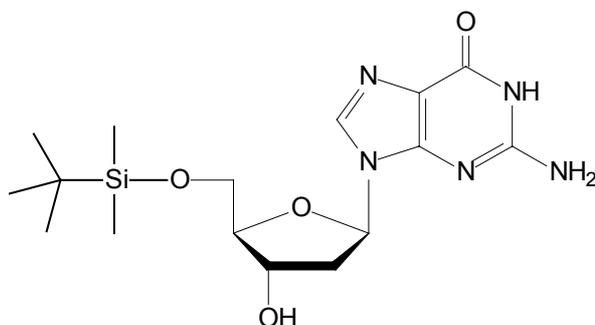
Ausbeute: 470 mg (44 %)

DC: $R_f = 0,56$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO-d_6 ; δ (ppm) = 9,32 (b, 1H, N-H); 7,71 (s, 1H, H-2); 7,37-7,09 (m, 10H, Ar-DMTr, H-9 verdeckt); 6,78-6,70 (m, 4H, Ar-DMTr); 6,12-6,08 (ψ t, 1H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 5,02$ Hz); 4,29 (b, 1H, H-4'); 3,25-3,22 (m, 2H, 2 H-5'); 2,39-2,35 (m, 2H, 2 H-2'); 2,24 (d, 3H, C8- CH_3); 2,06-2,02 (m, 2H, 2 H-3')

ESI-MS: $m/z = 592,4$ gefunden; $592,7$ berechnet $[M+H]^+$

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 25



$C_{16}H_{27}N_5O_4Si$ [381,51]

2'-Desoxyguanosin (10 g; 37,4 mmol) und Imidazol (10,2 g; 149,6 mmol) wurden in einem ausgeheizten Schlenkkolben über P_2O_5 einen Tag im Exsikkator getrocknet und anschließend in abs. DMF suspendiert. Unter Schutzgas wurde *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (11,3 g; 74,8 mmol) zugegeben und 15 min bei $5\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt (4 min nach der Zugabe bildete sich eine klare Lösung). Danach wurde die Reaktion mittels Zugabe von 5 ml Methanol gequenchet und das Lösungsmittel am Stickstoffrotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde in 400 ml Eiswasser aufgenommen und stark gerührt. Dabei bildete sich ein weisser Niederschlag der abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen, und über P_2O_5 getrocknet wurde. Anschliessend wurde das weisse Pulver zur Entfernung von 5'-3'-silyliertem 2'-Desoxyguanosin in 500 ml Methylenchlorid aufgenommen und eine Stunde bei RT gerührt. Der weisse Feststoff wurde abgenutscht und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 11,8 g (81 %)

DC: $R_f = 0,12$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

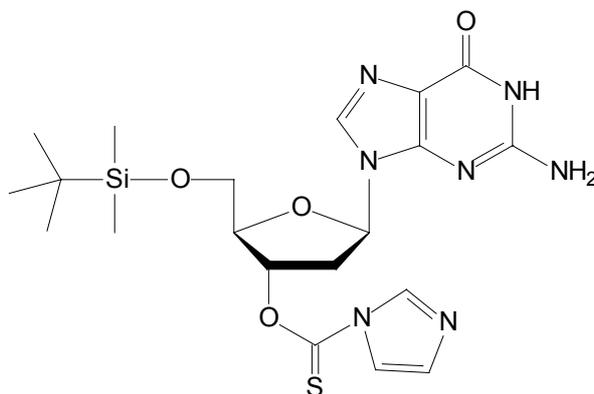
$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 10,59 (s, 1H, N1-H); 7,81 (s, 1H, H-8);

6,44 (s, 2H, N2-H); 6,11-6,06 (ψt, 1H, H-1', $^3J_{H,H} = 6,73$ Hz); 5,27 (b, 1H, 3'-OH); 4,30 (m, 1H, H-3'); 3,82-3,77 (m, 1H, H-4'); 3,74-3,66 (m, 2H, 2 H-5'); 2,51-2,40 (m, 1H, H-2'); 2,25-2,16 (m, 1H, H-2'); 0,83 (s, 9H, Si-(CH₃)₃); 0,00 (s, 6H, Si-CH₃)

¹³C-NMR: 63 MHz; DMSO-d₆; δ (ppm) = 156,73 (C-6) 153,71 (C-2); 150,90 (C-4); 134,80 (C-8); 116,62 (C-5); 86,96 (C-4'); 82,39 (C-1'); 70,36 (C-3'); 63,35 (C-5'); 38,5 (C-2', von DMSO-d₆ verdeckt); 25,82 (C-TBDMS); 18,02 (C-TBDMS); -5,43 (C-TBDMS)

ESI-MS: m/z = 380,3 gefunden; 380,5 berechnet [M-H]⁻

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-O-(imidazol-1-yl)thiocarbonyl-2'-desoxyguanosin **26**



Über P₂O₅ im Exsikkator getrocknetes 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **25** (10 g; 26,21 mmol) wurde in 60 ml abs. DMF gelöst und 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol (9,34 g; 52,42 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 3 Stunden bei 40 °C und anschliessend weitere 12 Stunden bei RT (Dünnschichtchromatographie). Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel am Stickstoffrotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde mit Essigsäureethylester versetzt, das entstandene weisse Pulver abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 10,2 g (80 %)

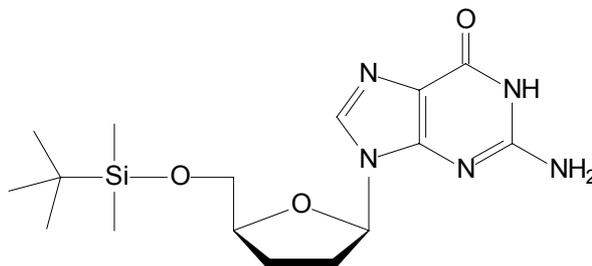
DC: $R_f = 0,22$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 10,66 (s, 1H, N1-H); 8,58 (s, 1H, H-Imidazol); 7,90-7,89 (m, 2H, H-8 und H-Imidazol); 7,12-7,11 (m, 1H, H-Imidazol); 6,48 (s, 2H, N2-H); 6,30-6,26 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 5,7; 5,8$ Hz); 5,97-5,96 (m, 1H, H-3'); 4,45-4,43 (m, 1H, H-4'); 3,91-3,83 (m, 2H, 2 H-5'); 3,03-2,96 (m, 1H, H-2'); 2,88-2,73 (m, 1H, H-2'); 0,86 (s, 9H, Si-(CH₃)₃); 0,06 (s, 6H, Si-CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100,6 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 182,80 (C-S); 156,21 (C-6) 153,29 (C-2); 150,64 (C-4); 136,69 (CH-Imidazol); 134,27 (CH-Imidazol); 130,40 (CH-Imidazol); 118,19 (C-8); 116,31 (C-5); 83,83 (C-3'); 83,03 (C-4'); 82,20 (C-1'); 62,68 (C-5'); 35,53 (C-2'); 25,29 (C-TBDMS); 17,46 (C-TBDMS); -5,90 (C-TBDMS)

Elementaranalyse:	berechnet:	C: 48,86	gefunden:	C: 49,06
		H: 5,95		H: 6,09
		N: 19,94		N: 19,77

ESI-MS: $m/z = 492,3$ gefunden; 492,7 berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin 27

Zu einer refluxierenden Suspension aus 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-O-(imidazol-1-yl)thiocarbonyl-2'-desoxyguanosin **26** (9 g; 18,3 mmol) und abs. Dioxan (100 ml) wurde eine Lösung aus Tributylzinnhydrid (10,43 ml; 39,35 mmol) und AIBN (0,962 g; 5,86 mmol) in abs. Dioxan (50 ml) unter Argon innerhalb von 45 min zugetropft. Anschliessend refluxierte das Reaktionsgemisch weitere zwei Stunden, wurde danach auf 10 °C abgekühlt und blieb über Nacht bei RT stehen. Der entstandene weisse Niederschlag wurde abgesaugt, mit *n*-Hexan gewaschen und aus 2-Butanol / Methanol (95 :5) umkristallisiert.

Ausbeute: 4,86 g (73 %)

DC: $R_f = 0,28$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 10,56 (s, 1H, N1-H); 7,85 (s, 1H, H-8); 6,42 (s, 2H, N2-H); 5,99-5,95 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 3,3; 3,3$ Hz); 4,09-4,04 (m, 1H, H-4'); 3,80-3,30 (m, 2H, 2 H-5'); 2,40-2,19 (m, 2H, 2 H-2'); 2,04-1,94 (m, 2H, 2 H-3'); 0,84 (s, 9H, Si-(CH₃)₃); 0,00 (s, 6H, Si-CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100,6 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 156,77 (C-6); 153,58 (C-2); 150,57 (C-4); 134,79 (C-8); 116,70 (C-5); 83,48 (C-1'); 81,15 (C-4'); 64,45 (C-5'); 31,81 (C-2'); 25,82 (C-TBDMS); 25,35 (C-3'); 18,04 (C-TBDMS); 0,79 (C-TBDMS)

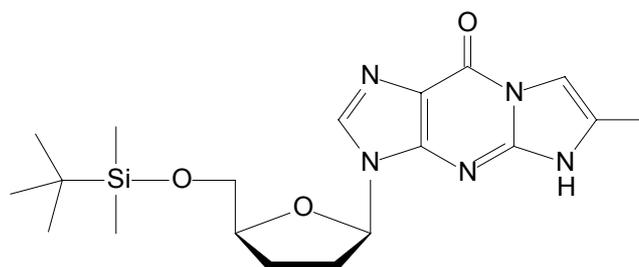
Elementaranalyse: berechnet: C: 52,58 gefunden: C: 52,36

H: 7,45

H: 7,36

N: 19,16

N: 18,98

ESI-MS: $m/z = 366,3$ gefunden; $366,5$ berechnet $[M+H]^+$ **5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxy-7-desmethylwyosin 28** $C_{19}H_{29}N_5O_3Si$ [403,56]

Methode 1:

Zu einer Lösung aus 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin 27 (0,5 g; 1,37 mmol) in abs. Dioxan / abs. DMSO (2 : 1) wurde unter Argongegenstrom NaH in 60 % Suspension (60 mg; 1,51 mmol) gegeben und 2 Stunden bei RT gerührt. Anschliessend wurde Bromaceton (206 mg; 1,51 mmol) durch ein Septum injiziert. Bei der Zugabe fiel ein NS aus, der sich bei Zugabe von weiteren 5 ml abs. DMSO wieder auflöste. Nach einstündigem Rühren bei RT wurden 15 ml konz. NH_4OH zugegeben und erneut 2 Stunden bei RT gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wurden die Lösungsmittel zuerst am Rotationsverdampfer und anschliessend am Stickstoffrotationsverdampfer unter reduziertem Druck abgezogen. Der braune, ölige Rückstand wurde mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 415 mg (75 %; Ausbeuten zwischen 60 und 80 % waren bei Methode 1 reproduzierbar)

Methode 2:

Zu einer Lösung aus 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyguanosin **27** (2 g; 5,47 mmol) in abs. Dioxan / abs. DMF (1 : 1) wurde unter Argongegenstrom NaH in 60 % Suspension (240 mg; 6,04 mmol) gegeben und 2 Stunden bei RT gerührt. Anschliessend wurde Bromaceton (824 mg; 6,04 mmol) durch ein Septum injiziert. Nach einstündigem Rühren bei RT wurden 60 ml konz. NH₄OH zugegeben und erneut 2 Stunden bei RT gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wurden die Lösungsmittel zuerst am Rotationsverdampfer und anschliessend am Stickstoffrotationsverdampfer unter reduziertem Druck abgezogen. Der braune, ölige Rückstand wurde mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

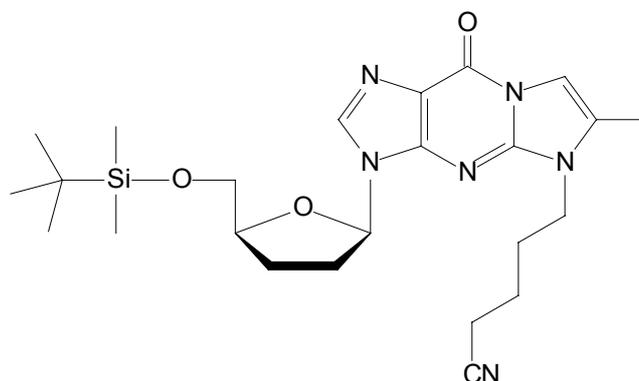
Ausbeute: 1,4 g (64 %; Ausbeuten zwischen 60 und 70% waren bei Methode 2 reproduzierbar)

DC: R_f = 0,48 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

¹H-NMR: 250 MHz; DMSO-d₆; δ (ppm) = 12,32 (s, 1H, N-H); 8,05 (s, 1H, H-2); 7,33 (d, 1H, H-9); 6,14-6,12 (dd, 1H, H-1', J_{H,H} = 3,19; 3,20 Hz); 4,15-4,09 (m, 1H, H-4'); 3,82-3,67 (m, 2H, 2 H-5'); 2,49-2,30 (m, 2H, 2 H-2'); 2,25 (d, 3H, C8-CH₃); 2,07-2,00 (m, 2H, 2 H-3'); 0,84 (s, 9H, Si-(CH₃)₃); 0,00 (s, 6H, Si-CH₃)

¹³C-NMR: 100,6 MHz; DMSO-d₆; δ (ppm) = 151,08 (C-11); 149,20 (C-4); 145,61 (C-6); 136,23 (C-2); 125,88 (C-8); 115,50 (C-12); 103,21 (C-9); 83,74 (C-1'); 81,19 (C-4'); 64,40 (C-5'); 31,65 (C-2'); 25,75 (C-TBDMS); 25,33 (C-3'); 17,98 (C-TBDMS); 10,46 (C8-CH₃); -5,50 (C-TBDMS)

ESI-MS: m/z = 404,2 gefunden; 404,6 berechnet [M+H]⁺

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-7-valeriansäurenitril-2',3'-didesoxy-7-desmethylwyosin 29

Methode 1:

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxy-4-desmethylwyosin **28** (350 mg; 0,87 mmol) wurde in abs. DMF (5 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde K_2CO_3 (240 mg; 1,74 mmol) und Bromvaleriansäurenitril (202 μl ; 1,74 mmol) gegeben und 16 Stunden bei RT gerührt.

Anschliessend wurde das Lösungsmittel am Stickstoffrotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 170 mg (48 %)

Methode 2:

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxy-4-desmethylwyosin **28** (1 g; 2,48 mmol) wurde in abs. Dioxan (15 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter Argongegenstrom NaH in 60 % Suspension (100 mg; 2,98 mmol) und Bromvaleriansäurenitril (563 μl ; 4,96 mmol) gegeben und 3 Stunden bei RT gerührt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel am Stickstoffrotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 770 mg (65 %)

DC: $R_f = 0,67$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

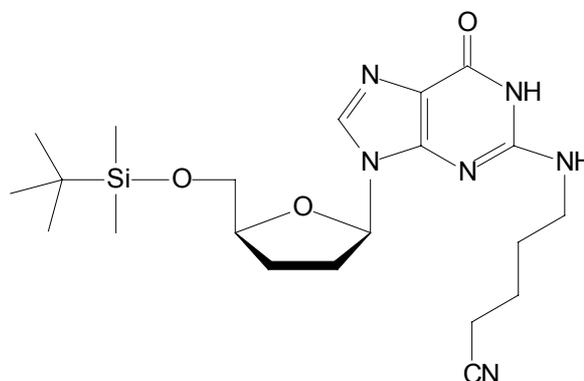
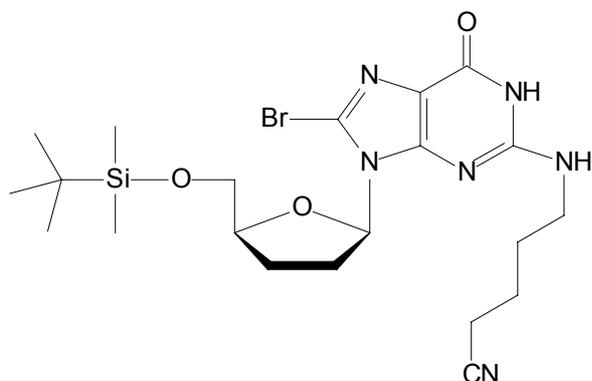
$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 7,91 (s, 1H, H-2); 7,27 (d, 1H, H-9); 6,14-6,12 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 3,39; 3,40$ Hz); 4,13-4,09 (m, 1H, H-4'); 4,00-3,96 (m, 2H, 2 H-13); 3,81-3,64 (m, 2H, 2 H-5'); 2,45-2,33 (m, 3H, 2 H-16 und H-2'); 2,27-2,23 (m, 1H, H-2'); 2,21 (d, 3H, C8- CH_3); 2,06-1,98 (m, 2H, 2 H-3'); 1,90-1,86 (m, 2H, 2 H-14); 1,65-1,60 (m, 2H, 2 H-15); 0,80 (s, 9H, Si-(CH_3)₃); 0,00 (s, 6H, Si- CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100,6 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 151,76 (C-11); 149,04 (C-4); 145,51 (C-6); 136,26 (C-2); 125,81 (C-8); 119,02 (C-CN); 116,77 (C-12); 103,87 (C-9); 84,55 (C-1'); 81,78 (C-4'); 64,63 (C-5'); 41,16 (C-13); 33,03 (C-2'); 28,02 (C-14); 25,96 (C-TBDMS); 25,82 (C-3'); 22,39 (C-15); 18,45 (C-TBDMS), 16,70 (C-16); 10,21 (C8- CH_3); -5.36 (C-TBDMS)

Elementaranalyse:	berechnet:	C: 59,48	gefunden:	C: 59,28
		H: 7,49		H: 7,55
		N: 17,34		N: 17,36

ESI-MS: $m/z = 485,3$ gefunden; 485,7 berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeriansäurenitril-2',3'-didesoxyguanosin 30 / 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-8-brom-2-valeriansäurenitril-2',3'-didesoxyguanosin 31



5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-7-valeriansäurenitril-2',3'-dideoxy-4-desmethylwyosin 29 (360 mg; 0,74 mmol) wurde in 10 ml Acetonitril / Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und *N*-Bromsuccinimid (158 mg; 0,89 mmol) zugegeben. Nach 60minütigem Rühren bei RT wurde konz. NH_4OH (30 ml) zugegeben und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschliessend wurden die Lösungsmittel bei reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 30: 60 mg (18,2 %)

31: 90 mg (27,3 %)

DC: R_f (30)= 0,43 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

R_f (31)= 0,42 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

1H -NMR (31): 250 MHz; $CDCl_3$; δ (ppm) = 7,79 (b, 1H, N-H); 6,16-6,10 (m, 1H, H-1'); 4,20-4,11 (m, 1H, H-4'); 3,80-3,67 (m, 2H, 2 H-5'); 3,59-3,49 (m, 2H, 2 H-13); 2,74-2,39 (m, 3H, 2 H-16 und H-2'); 2,16-1,97 (m, 1H, H-2'); 1,83-1,68 (m, 6H, 2 H-3', 2 H-14, 2 H-15); 0,84 (s, 9H, Si-(CH_3)₃); 0,00 (s, 6H, Si- CH_3)

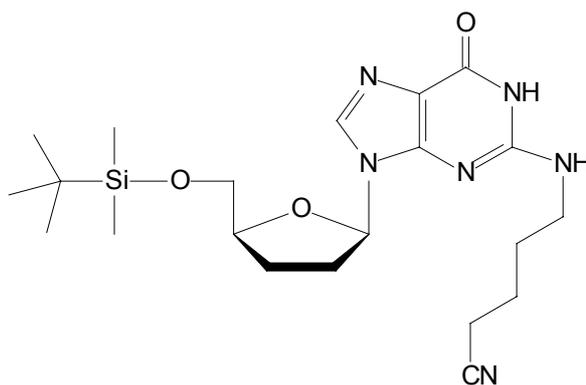
$^1\text{H-NMR}$ (**30**): 250 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 7,77 (s, 1H, H-8); 7,18 (b, 1H, N-H); 6,08-6,04 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 3,70; 3,73$ Hz); 4,16-4,08 (m, 1H, H-4'); 3,85-3,65 (m, 2H, 2 H-5'); 3,43-3,39 (m, 2H, 2 H-13); 2,43-2,27 (m, 3H, 2 H-16 und H-2'); 2,08-1,93 (m, 1H, H-2'); 1,76-1,67 (m, 6H, 2 H-3', 2 H-14, 2 H-15); 0,83 (s, 9H, Si-(CH_3)₃); 0,00 (s, 6H, Si- CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (**30**): 100,6 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 159,59 (C-4) 153,21 (C-6); 151,68 (C-2); 136,07 (C-8); 120,11 (C-CN); 117,35 (C-5); 85,22 (C-1'); 82,19 (C-4'); 65,13 (C-5'); 40,29 (C-13); 33,03 (C-2'); 28,89 (C-14); 26,35 (C-TBDMS und C-3'); 23,11 (C-15); 18,84 (C-TBDMS); 17,21 (C-16); -5,01 (C-TBDMS)

ESI-MS (**31**): $m/z = 525,3$ gefunden; $524,5$ berechnet $[\text{M-H}]^-$

ESI-MS (**30**): $m/z = 445,4$ gefunden; $446,6$ berechnet $[\text{M-H}]^+$

5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-2-valeriansäurenitril-2',3'-dideoxyguanosin 30



$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_3\text{Si}$ [446,62]

5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-7-Valeriansäurenitril-2',3'-dideoxy-4-desmethylwyosin **29** (750 mg; 1,55 mmol) wurde in 10 ml Acetonitril / Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und *N*-Bromsuccinimid (214 mg; 1,24 mmol) zugegeben. Nach dreistündigem Rühren bei RT wurde

konz. NH_4OH (50 ml) zugegeben und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschliessend wurden die Lösungsmittel bei reduziertem Druck abgezogen, der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

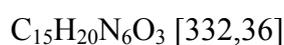
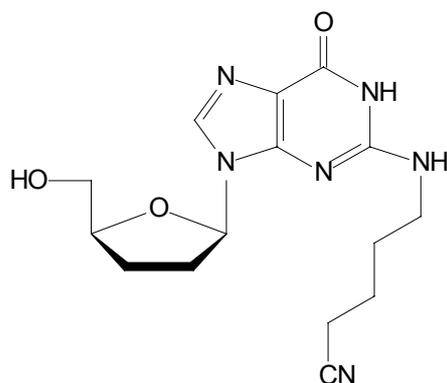
Ausbeute: 463 mg (67 %)

DC: R_f (**30**) = 0,42 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$ (**30**): 250 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 7,77 (s, 1H, H-8); 7,18 (b, 1H, N-H); 6,08-6,04 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 3,70; 3,73$ Hz); 4,16-4,08 (m, 1H, H-4'); 3,85-3,65 (m, 2H, 2 H-5'); 3,43-3,39 (m, 2H, 2 H-13); 2,43-2,27 (m, 3H, 2 H-16 und H-2'); 2,08-1,93 (m, 1H, H-2'); 1,76-1,67 (m, 6H, 2 H-3', 2 H-14, 2 H-15); 0,83 (s, 9H, Si-(CH_3)₃); 0,00 (s, 6H, Si- CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (**30**): 100,6 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 159,59 (C-4); 153,21 (C-6); 151,68 (C-2); 136,07 (C-8); 120,11 (C-CN); 117,35 (C-5); 85,22 (C-1'); 82,19 (C-4'); 65,13 (C-5'); 40,29 (C-13); 33,03 (C-2'); 28,89 (C-14); 26,35 (C-TBDMS und C-3'); 23,11 (C-15); 18,84 (C-TBDMS); 17,21 (C-16); -5.01 (C-TBDMS)

ESI-MS (**30**): $m/z = 445,4$ gefunden; $446,6$ berechnet $[\text{M-H}]^-$

2-Valeriansäurenitril-2',3'-dideoxyguanosin 32

5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeriansäurenitril-2',3'-dideoxyguanosin **30** (350 mg; 0,78 mmol) wurde in abs. Pyridin (6 ml) gelöst und 1 M TBAF in THF (1,96 ml; 1,96 mmol) durch ein Septum injiziert. Nach 2,5 Stunden Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 220 mg (85 %)

DC: $R_f = 0,16$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

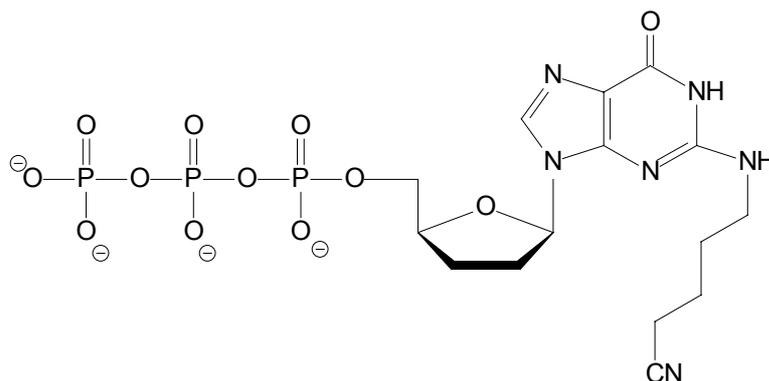
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 10,60 (s, 1H, N1-H); 7,91 (s, 1H, H-8); 6,59-6,56 (t, 1H, N2-H, $^3J_{\text{H,H}} = 5,43$ Hz); 6,06-6,03 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 4,03$; 4,06 Hz); 4,88-4,85 (t, 1H, 5'-OH, $^3J_{\text{H,H}} = 5,40$ Hz); 4,09-4,03 (m, 1H, H-4'); 3,61-3,48 (m, 2H, 2 H-5'); 3,34-3,30 (m, 2H, 2 H-13); 2,56-2,50 (m, 2H, 2 H-16); 2,38-2,32 (m, 2H, 2 H-2'); 2,10-1,99 (m, 2H, 2 H-3'); 1,63-1,60 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-15)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100,6 MHz; DMSO- d_6 ; δ (ppm) = 157,69 (C-4); 153,38 (C-6); 151,04 (C-2); 136,47 (C-8); 121,47 (C-CN); 117,69 (C-5); 84,67 (C-1'); 82,42 (C-4'); 63,92 (C-5'); 40,39 (C-13; von DMSO- d_6 verdeckt); 32,33 (C-2'); 28,78 (C-

14); 26,84 (C-3'); 23,14 (C-15); 16,77 (C-16)

ESI-MS: $m/z = 333,2$ gefunden; $333,4$ berechnet $[M+H]^+$

2-Valeriansäurenitril-2',3'-didesoxyguanosin-5'-triphosphat 41



$[C_{15}H_{19}N_6O_{12}P_3]^+ 4H^+$ [572,3]

Die Reaktion und die vorbereitende Trocknung wurden bis zum Oxidationsschritt unter strenger Kontrolle der Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Lösungsmittel wurden absolut und über Molsieb getrocknet eingesetzt und die Reaktionsgefäße ausgeheizt.

2-Valeriansäurenitril-2',3'-dideoxyguanosin 32 (200 mg; 0,6 mmol) wurde zunächst durch dreimaliges Coevaporieren mit je 1 ml abs. Pyridin getrocknet. Der Rückstand wurde im Reaktionskolben unter Argon in einen Exsikkator überführt und über Nacht unter reduziertem Druck über P_2O_5 getrocknet. Der Reaktionskolben wurde mit einem Septum verschlossen. Das trockene Nukleosid wurde in 1,3 ml Pyridin und 4,5 ml DMF gelöst und 0,68 ml einer frisch hergestellten 1 M Lösung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in Dioxan unter Argongegendruck injiziert. Nach 20minütigem Rühren bei RT wurden 2,4 ml der Pyrophosphat-Reaktionslösung (Allg. Vorschriften) ebenfalls unter Argongegendruck injiziert und die Reaktion für weitere 30 min gerührt. Durch Zugabe von 11,3 ml der 1 %igen Iodlösung (Allg. Vorschriften) wurde der dreiwertige Phosphor oxidiert und das zyklische Triphosphat geöffnet. Nach weiteren 20 min wurde das überschüssige Iod durch Zutropfen einer 5 %igen wässrigen $NaHSO_3$ -Lösung zum Reaktionsgemisch reduziert. Die benötigte Menge an Reduktionsmittel konnte durch den Umschlagspunkt des Gemischs von dunklem

Braun zu einem leichten Gelb ermittelt werden. Die Lösungsmittel wurden unter reduziertem Druck bei gelinder Erwärmung auf höchstens 30 °C abgezogen (Stickstoffrotationsverdampfer). Der feste Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, in eine Spritze aufgezogen und durch einen Filter (0,2 µm Nalgene Syringe Filter) gedrückt, um kleinste, ungelöste Bestandteile zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert, erneut in Wasser aufgenommen und mittels FPLC aufgereinigt, wobei das Produkt bei 0,28 M TEAB-Puffer eluierte. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Anionenaustauscher-HPLC (Synchropac; 0,05 M KH₂PO₄; 50 % Formamid; pH = 5,5 von 0 % bis 40 % in 30 min).

Ausbeute: 120 mg (Na-Salz; 30 %)

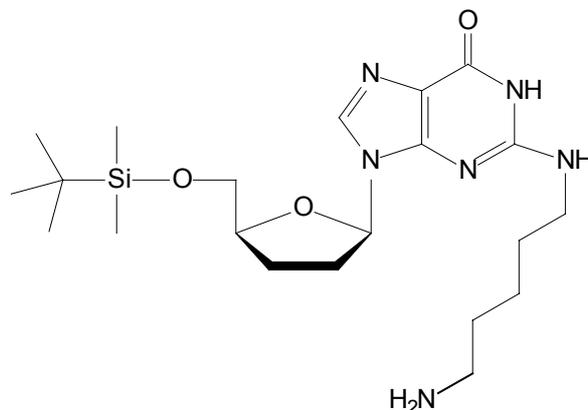
DC: R_f = 0,05 (Isopropanol / 25 % NH₃/H₂O 7 : 1 : 2)

FPLC: Laufmittel: A = 0,05 M TEAB; B = 1 M TEAB
Fluss: 1 ml / min
Gradient: 0 ml => 500 ml => 650 ml
0 % => 50 % => 100 %
Elutionskonzentration: 0,12 M TEAB

HPLC: R_t: 16,61 min (UV-Detektion)

³¹P-NMR: 162 MHz; D₂O; δ (ppm) = -8,6 (d, 1P, γ-P); -10,2 (d, 1P, α-P);
-22,2 (t, 1P, β-P)

ESI-MS: m/z = 571,1 gefunden; 571,3 berechnet [M-H]⁻

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin 33

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-valeriansäurenitril-2',3'-dideoxyguanosin **30** (1,0 g; 2,24 mmol) wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Argon in 100 ml abs. Methanol gelöst. Die Lösung wurde durch mehrmaliges Evakuieren und anschliessendes Belüften mittels Argon entgast. Unter Schutzgas wurden 3 Spatelspitzen $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zugegeben und Wasserstoff durch die Lösung geleitet. Da die Umsetzung nach 24 Stunden noch nicht vollständig war, wurde eine Spatelspitze des Katalysators nachdosiert und über Nacht mit H_2 -Ballon weitergerührt. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert, und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 710 mg (71 %)

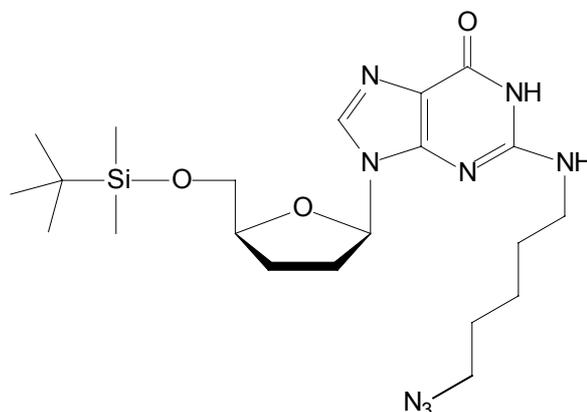
DC: $R_f = 0,11$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 7,73 (s, 1H, H-8); 6,06-6,04 (m, 1H, H-1'); 4,10 (b, 1H, H-4'); 3,82-3,66 (m, 2H, 2 H-5'); 3,30-2,95 (m, 4H, 2 H-13 und 2 H-17); 2,32 (m, 2H, 2 H-2'); 2,12-1,99 (b, 2H, 2 H-3'); 1,60-1,53 (m, 6H, 2 H-14, 2 H-15, 2 H-16); 0,83 (s, 9H, $\text{Si}-(\text{CH}_3)_3$); 0,00 (s, 6H, $\text{Si}-\text{CH}_3$)

^{13}C -NMR: 100,6 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 158,83 (C-4); 152,88 (C-6); 151,10 (C-2); 135,20 (C-8); 116,74 (C-5); 84,55 (C-1'); 81,56 (C-4'); 64,65 (C-5'); 53,27 (C-17); 32,51 (C-2'); 25,80 (C-TBDMS und C-3'); 23,15 (C-15); 18,84 (C-TBDMS); -5.01 (C-TBDMS)

MALDI-MS: m/z = 457,8 gefunden (Li-Addukt); 457,6 berechnet

5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **34**



$\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_3\text{Si}$ [476,65]

5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin **33** (1 g; 2,22 mmol) wurde in 7,2 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurde K_2CO_3 (461 mg; 3,33 mmol), CuSO_4 Hydrat (3,30 mg; 21,12 μmol), und Trifluormethansulfonsäureazid-Lösung (siehe Allgemeine Vorschriften) in 14,4 ml Methanol gegeben. Der Reaktionsansatz rührte 18 Stunden bei RT. Anschliessend wurden die Lösungsmittel unter reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 200 mg (19 %)

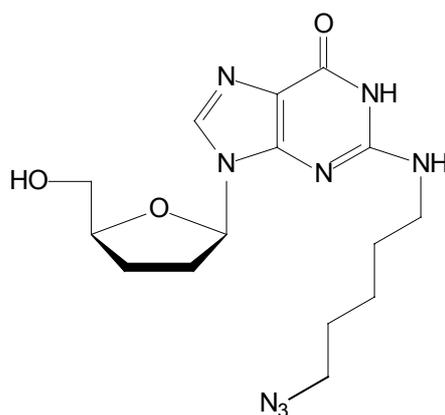
DC: R_f = 0,21 (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 11,96 (b, 1H, N1-H); 7,85 (s, 1H, H-8); 6,15-6,13 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 3,52; 3,63$ Hz); 4,22-4,18 (m, 1H, H-4'); 3,91-3,75 (m, 2H, 2 H-5'); 3,44-3,41 (m, 2H, 2 H-13); 3,27-3,24 (t, 2H, 2 H-17, $^3J_{\text{H,H}} = 6,97$ Hz); 2,45-2,41 (m, 2H, 2 H-2'); 2,13-2,06 (m, 2H, 2 H-3'), 1,70-1,60 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-16); 1,48-1,42 (m, 2H, 2 H-15); 0,91 (s, 9H, Si-(CH₃)₃); 0,00 (s, 6H, Si-CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100,6 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 159,68 (C-4); 152,69 (C-6); 151,12 (C-2); 135,80 (C-8); 84,88 (C-1'); 81,86 (C-4'); 64,77 (C-5'); 51,34 (C-17); 40,95 (C-13); 32,94 (C-2'); 28,85-28,60 (C-14 und C16); 26,00-25,88 (C-TBDMS und C-3'); 24,08 (C-15); 18,50 (C-TBDMS); -5.31 (C-TBDMS)

ESI-MS: $m/z = 477,3$ gefunden; $477,7$ berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **35**



$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_3$ [362,39]

5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2-pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **34** (140 mg; 0,29 mmol) wurde in abs. Pyridin (3 ml) gelöst und 1 M TBAF in THF (0,75 ml; 0,75 mmol) durch ein Septum injiziert. Nach 2,5 Stunden Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel unter

reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt.

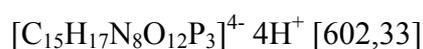
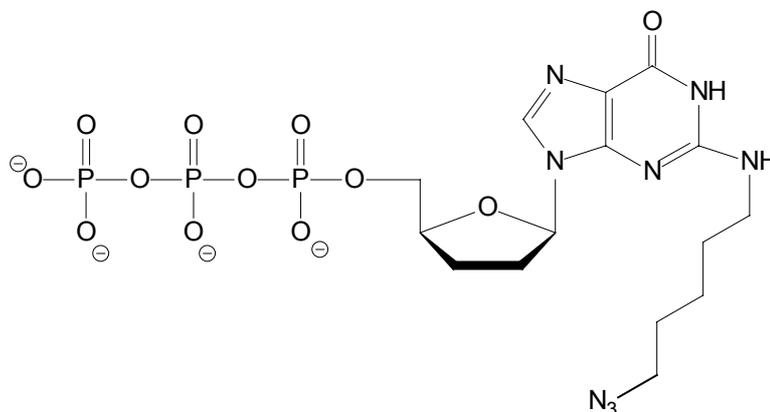
Ausbeute: 85 mg (81 %)

DC: $R_f = 0,1$ (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1)

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz; Pyridin- d_5 ; δ (ppm) = 8,06 (s, 1H, H-8); 6,40-6,38 (dd, 1H, H-1', $J_{\text{H,H}} = 3,25; 3,71$ Hz); 4,38-4,36 (m, 1H, H-4'); 4,14-3,96 (m, 2H, 2 H-5'); 3,57-3,47 (m, 2H, 2 H-13); 3,20-3,17 (t, 2H, 2 H-17, $^3J_{\text{H,H}} = 6,84$ Hz); 2,52-2,40 (m, 2H, 2 H-2'); 2,25-2,10 (m, 2H, 2 H-3'), 1,61-1,53 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-16); 1,35-1,26 (m, 2H, 2 H-15);

$^{13}\text{C-NMR}$: 100,6 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 159,06 (C-4); 153,58 (C-6); 151,36 (C-2); 136,42 (C-8); 117,79 (C-5); 85,11 (C-1'); 82,77 (C-4'); 63,80 (C-5'); 51,30 (C-17); 41,15 (C-13); 32,56 (C-2'); 28,99-28,61 (C-14 und C16); 26,30 (C-3'); 24,21 (C-15)

ESI-MS: $m/z = 361,3$ gefunden; 361,4 berechnet $[\text{M-H}]^-$

2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat 42

Die Reaktion und die vorbereitende Trocknung wurden bis zum Oxidationsschritt unter strenger Kontrolle der Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Lösungsmittel wurden absolut und über Molsieb getrocknet eingesetzt und die Reaktionsgefäße ausgeheizt.

2-Pentylazid-2',3'-dideoxyguanosin **35** (80 mg; 0,22 mmol) wurde zunächst durch dreimaliges Coevaporieren mit je 500 µl abs. Pyridin getrocknet. Der Rückstand wurde im Reaktionskolben unter Argon in einen Exsikkator überführt und über Nacht unter reduziertem Druck über P_2O_5 getrocknet. Der Reaktionskolben wurde mit einem Septum verschlossen. Das trockene Nukleosid wurde in 600 µl Pyridin und 2,2 ml DMF gelöst und 0,29 ml einer frisch hergestellten 1 M Lösung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in Dioxan unter Argongegendruck injiziert. Nach 20minütigem Rühren bei RT wurden 0,88 ml der Pyrophosphat-Reaktionslösung (Allg. Vorschriften) ebenfalls unter Argongegendruck injiziert und die Reaktion für weitere 30 min gerührt. Durch Zugabe von 4,5 ml der 1 %igen Iodlösung (Allg. Vorschriften) wurde der dreiwertige Phosphor oxidiert und das zyklische Triphosphat geöffnet. Nach weiteren 20 min wurde das überschüssige Iod durch Zutropfen einer 5 %igen wässrigen NaHSO_3 -Lösung zum Reaktionsgemisch reduziert. Die benötigte Menge an Reduktionsmittel konnte durch den Umschlagspunkt des Gemischs von dunklem Braun zu einem leichten Gelb ermittelt werden. Die Lösungsmittel wurden unter reduziertem Druck bei gelinder Erwärmung auf höchstens 30°C abgezogen (Stickstoffrotationsverdampfer). Der feste Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, in eine Spritze aufgezogen und durch einen Filter (0,2 µm Nalgene Syringe Filter) gedrückt, um kleinste, ungelöste Bestandteile zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert, erneut in Wasser

aufgenommen und mittels FPLC aufgereinigt, wobei das Produkt bei 0,13 M TEAB-Puffer eluierte.

Ausbeute: 52 mg (Na-Salz; 48 %)

DC: $R_f = 0,05$ (Isopropanol / 25 % $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 7 : 1 : 2)

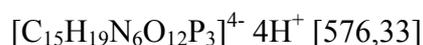
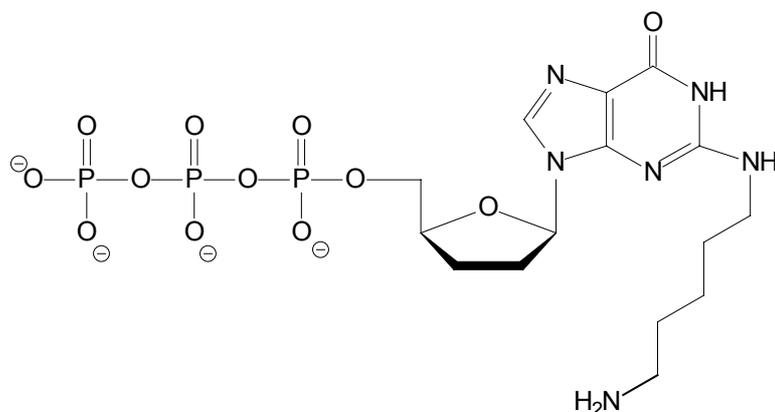
FPLC: Laufmittel: A = 0,05 M TEAB; B = 1 M TEAB
Fluss: 1 ml / min
Gradient: 0 ml => 500 ml => 650 ml
0 % => 50 % => 100 %
Elutionskonzentration: 0,13 M TEAB

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz; Pyridin- d_5 ; δ (ppm) = 8,00 (s, 1H, H-8); 6,18-6,05 (m, 1H, H-1'); 4,41-4,35 (m, 1H, H-4'); 4,19-4,12 (m, 1H, H-5'); 4,03-3,95 (m, 1H, H-5'); 3,35-3,24 (m, 4H, 2 H-13 und 2 H-17); 2,54-2,38 (m, 2H, 2 H-2'); 2,23-2,08 (m, 2H, 2 H-3'); 1,60-1,51 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-16); 1,37-1,29 (m, 2H, 2 H-15)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100,6 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm) = 159,66 (C-4); 153,77 (C-6); 152,12 (C-2); 137,24 (C-8); 116,14 (C-5); 85,05 (C-1'); 82,22 (C-4'); 66,25 (C-5'); 51,46 (C-17); 41,11 (C-13); 31,67 (C-2'); 28,30-28,12 (C-14 und C16); 26,23 (C-3'); 23,69 (C-15)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162 MHz; D_2O ; δ (ppm) = -9,0 (d, 1P, γ -P); -10,0 (d, 1P, α -P); -22,1 (t, 1P, β -P)

ESI-MS: $m/z = 601,3$ gefunden; $601,3$ berechnet $[\text{M-H}]^-$

2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat 43

2-Pentylamid-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat 42 (50 mg, 70 μmol) wurde in 2 ml abs. Pyridin gelöst und mit Triphenylphosphin (32 mg; 1,12 mmol) versetzt. Nach 12stündigem Rühren bei RT wurden 5 ml aq. NH_3 zugegeben und weitere 3 Stunden bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter leichtem Unterdruck abgezogen. Der verbleibende Rückstand wurde sterilfiltriert (0,2 μm Nalgene Syringe Filter). Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert, erneut in Wasser aufgenommen und mittels FPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 28 μmol (40 %)

DC: $R_f = 0,02$ (Isopropanol / 25 % $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 7 : 1 : 2)

FPLC: Laufmittel: A = 0,05 M TEAB; B = 1 M TEAB
 Fluss: 1 ml / min
 Gradient: 0 ml => 500 ml => 650 ml
 0 % => 50 % => 100 %
 Elutionskonzentration: 0,12 M TEAB

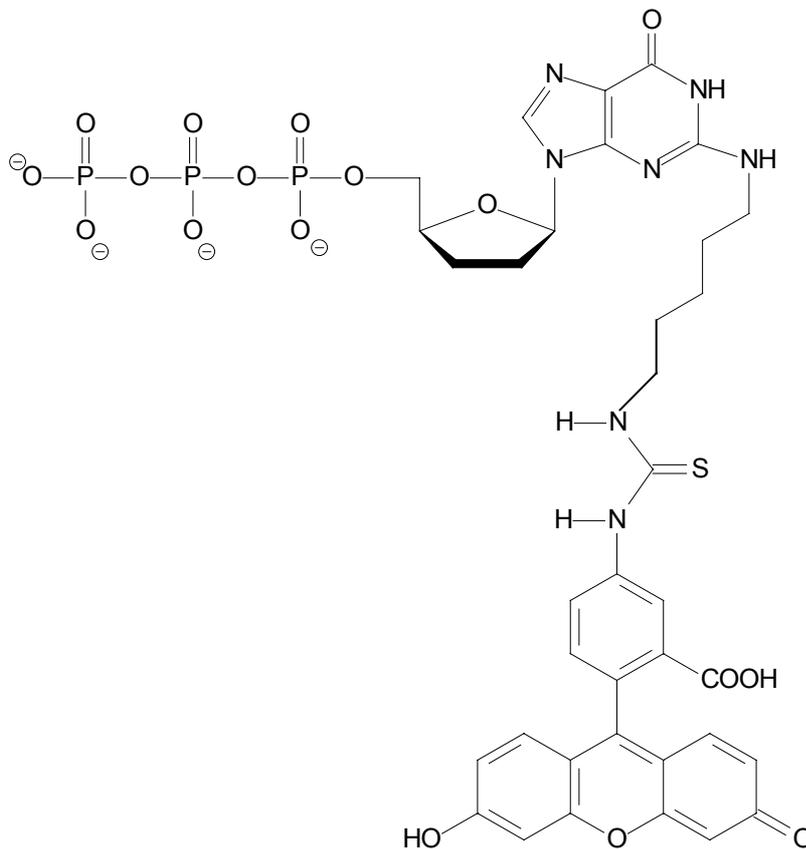
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz; D_2O ; δ (ppm) = 7,99 (s, 1H, H-8); 6,17-6,14 (m, 1H, H-1'); 4,38-4,34 (m, 1H, H-4'); 4,19-4,13 (m, 1H, H-5'); 4,01-3,91 (m, 1H, H-5');

3,34-3,16 (m, 4H, 2 H-13 und 2 H-17); 2,51-2,38 (m, 2H, 2 H-2'); 2,21-2,06 (m, 2H, 2 H-3'); 1,61-1,51 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-16); 1,39-1,29 (m, 2H, 2 H-15)

^{31}P -NMR: 162 MHz; D_2O ; δ (ppm) = -7,9 (d, 1P, γ -P); -9,7 (d, 1P, α -P); -21,5 (t, 1P, β -P)

ESI-MS: $m/z = 575,2$ gefunden; $575,3$ berechnet $[\text{M}-\text{H}]^-$

Markierung von 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **43** mit FITC



Zu einer Lösung von 2-Pentylamin-2',3'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat **43** (10 μmol) in 6 ml aq. NaHCO_3 (pH = 9,3) wurde eine Lösung aus Fluoreszeinisothiocyanat (12 mg) in 6 ml

DMF gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte 24 Stunden bei RT. Die Aufreinigung erfolgte mittels Anionenaustauscher-HPLC (Synchropac; 0,05 M KH_2PO_4 ; 50 % Formamid; pH = 5,5 von 0 % bis 100 % in 30 min).

Ausbeute: 5 μmol (50 %); Bestimmung durch optische Dichte bei 270 nm

HPLC: $R_t = 34,21$ min (UV-Detektion)

$R_t = 35,89$ min (Fluoreszenz-Detektion; $\lambda_{\text{Ex}} = 490$ nm; $\lambda_{\text{Em}} = 525$ nm)

$R_t(\text{FITC}) = 12,52$ min (Fluoreszenz-Detektion; $\lambda_{\text{Ex}} = 490$ nm; $\lambda_{\text{Em}} = 525$ nm)

MALDI-MS: $m/z = 966,2$ gefunden; $965,7$ berechnet

7.3 Enzymatische Reaktionen

7.3.1 DNA-Sequenzierung mit 3'-modifizierten Terminatoren

7.3.1.1 Terminationsmixe für die T7-Polymerase

Terminationsmix Nr. 1

ddTTP

Komponente	c _{Stamm} [mM]	c _{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	1	0,01	0,5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			40,4
Summe			50

Terminationsmix Nr. 2

3'-NH₂-ddTTP (37)

Komponente	c _{Stamm} [mM]	c _{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	1	0,1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 3**3'-NH₂-ddTTP (37)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	1	0,01	0,5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			40,4
Summe			50

Terminationsmix Nr. 4**3'-NS-ddTTP (39)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 5**3'-NS-ddTTP (39)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	2	10
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			30,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 6**3'-NS-FITC-ddTTP (40)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [µl]
Terminator	10	1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 7**3'-NS-FITC-ddTTP (40)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [µl]
Terminator	10	2	10
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			30,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 8**ddGTP**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [µl]
Terminator	1	0,01	0,5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			40,4
Summe			50

Terminationsmix Nr. 9**ddGTP**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	1	0,1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 10**N²-CN-ddGTP (41)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	1	0,1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 11**N²-CN-ddGTP (41)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 12 **N^2 -NH₂-ddGTP (43)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 13 **N^2 -NH₂-ddGTP (43)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	2	10
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			30,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 14 **N^2 -NH-FITCddGTP (44)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	2	10
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			30,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 15***N*²-NH-FITCddGTP (44)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	5	25
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			15,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 16***N*²-NH-FITCddGTP (44)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	0,5	2,5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			38,4
Summe			50

Terminationsmix Nr. 17***N*²-NH-FITCddGTP (44)**

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Nachfolgend wird das Standardprotokoll zur Sequenzierung mit der T7-Polymerase beschrieben mit dem alle Sequenzierungen mit der T7-Polymerase durchgeführt wurden: DNA, Primer und Annealing Puffer wurden in folgenden Mengen gemischt:

DNA: 10 μ l M13mp18 (2 μ g)
+ Primer: 2 μ l cwo 18 (1 pmol)
+ Annealing Puffer: 6 μ l Mn-Mix
18 μ l

Das Gemisch wurde auf 85 °C erhitzt, 3 min bei 85 °C gehalten und anschliessend in 35 min auf 20 °C abgekühlt.

+ Enzym: 2 μ l T7-DNA-Polymerase (3 U)
20 μ l

Je 4,5 μ l des Gemischs wurden sofort zu 2,5 μ l Terminationsmix gegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert und anschliessend 2 min bei 85 °C denaturiert. Vor der Hitzebehandlung wurden 7 μ l Stop-Solution zugegeben.

7.3.1.2 Terminationsmixe für die AmpliTaq-Polymerase

Terminationsmix Nr. 1	3'-ddTTP
Terminationsmix Nr. 3	3'-NH₂-ddTTP (<u>37</u>)
Terminationsmix Nr. 6	3'-NS-ddTTP (<u>39</u>)

Terminationsmix Nr. 18**3'-NS-ddTTP (39)**

Komponente	c _{Stamm} [mM]	c _{End} [mM]	Volumen [µl]
Terminator	1	0,1	5
dNTP-Mix	10	1	5
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	2
H ₂ O			35,9
Summe			50

Nachfolgend wird das Standardprotokoll zur Sequenzierung mit der AmpliTaq-Polymerase beschrieben, mit dem alle Sequenzierungen mit der Ampli-Taq-Polymerase durchgeführt wurden:

DNA, Primer und Annealing Puffer wurden in folgenden Mengen gemischt:

DNA: 10 µl M13mp18 (2 µg)
 + Primer: 2 µl cwo 18 (1 pmol) oder 2 µl KS 1 (1 pmol)
 + Annealing Puffer: 6 µl Mn-Mix
 18 µl

Das Gemisch wurde auf 85 °C erhitzt, 3 min bei 85 °C gehalten und anschliessend in 35 min auf 20 °C abgekühlt.

+ Enzym: 2 µl AmpliTaq-DNA-Polymerase (5 U)
 20 µl

Je 4,5 µl des Gemischs wurden sofort zu 2,5 µl Terminationsmix gegeben und 10 min bei 68 °C inkubiert und anschliessend 2 min bei 85 °C denaturiert. Vor der Hitzebehandlung wurden 7 µl Stop-Solution zugegeben.

7.3.1. Terminationsmixe für die Taq(exo⁻)-Polymerase

Terminationsmix Nr. 1	3'-ddTTP
Terminationsmix Nr. 3	3'-NH₂-ddTTP (37)
Terminationsmix Nr. 6	3'-NS-ddTTP (39)
Terminationsmix Nr. 7	3'-NS-FITC-ddTTP (40)
Terminationsmix Nr. 11	N²-CN-ddGTP (41)
Terminationsmix Nr. 12	N²-NH₂-ddGTP (43)
Terminationsmix Nr. 15	N²-NH-FITC-ddGTP (44)
Terminationsmix Nr. 19	3'-NS-ddTTP (39)

Komponente	c_{Stamm} [mM]	c_{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	5	25
dNTP-Mix	10	2	10
NaCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	40	0,5
H ₂ O			12,4
Summe			50

Nachfolgend wird das Standardprotokoll zur Sequenzierung mit der Taq(exo⁻)-Polymerase beschrieben, mit dem alle Sequenzierungen mit der Taq(exo⁻)-Polymerase durchgeführt wurden:

DNA, Primer und Annealing Puffer wurden in folgenden Mengen gemischt:

DNA:	1 μ l M13mp18 (0,2 μ g)
+ Primer:	2 μ l cwo 18 (1 pmol) oder 2 μ l KS 1 (1 pmol)
+ Annealing Puffer:	5 μ l Taq(exo ⁻)-Puffer
+ H ₂ O	<u>10 μl</u>
	18 μ l

Das Gemisch wurde auf 85 °C erhitzt, 3 min bei 85 °C gehalten und anschliessend in 35 min auf 20 °C abgekühlt.

+ Enzym:	<u>2 μl</u> Taq(exo ⁻)-DNA-Polymerase (5 U)
	20 μ l

Je 4,5 μ l des Gemischs wurden sofort zu 2,5 μ l Terminationsmix gegeben und mittels Cycle Sequencing auf 85 °C erhitzt, 30 Sekunden gehalten, anschliessend auf 42 °C abgekühlt, 30 Sekunden gehalten und danach bei 70 °C für eine Minute inkubiert. Der Cyclus wurde 15mal bzw. 30mal wiederholt. Vor der letzten Hitzebehandlung wurden 7 μ l Stop-Solution zugegeben.

7.3.1.4 Terminationsmixe für die Bst-Polymerase

Terminationsmix Nr. 20

3'-NS-ddTTP (39)

Komponente	c _{Stamm} [mM]	c _{End} [mM]	Volumen [μ l]
Terminator	100	10	5
dNTP-Mix	10	1	5
KCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	20	1
H ₂ O			36,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 21**3'-NH₂-ddTTP (37)**

Komponente	c _{Stamm} [mM]	c _{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	6	30
dNTP-Mix	10	1	5
KCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	20	1
H ₂ O			11,9
Summe			50

Terminationsmix Nr. 22**3'-NS-ddTTP (39)**

Komponente	c _{Stamm} [mM]	c _{End} [mM]	Volumen [μl]
Terminator	10	6	30
dNTP-Mix	10	1	5
KCl-Lösung	1200	50	2,1
Tris-HCl pH 7,5	1000	20	1
H ₂ O			11,9
Summe			50

Nachfolgend wird das Standardprotokoll zur Sequenzierung mit der Bst-Polymerase beschrieben mittels dessen alle Sequenzierungen mit der Bst-Polymerase durchgeführt wurden:

DNA, Primer und Annealing Puffer wurden in folgenden Mengen gemischt:

DNA: 10 μl M13mp18 (2 μg)

+ Primer: 2 μl cwo 18 (1 pmol)

+ Annealing Puffer: 6 μl ThermoPol Puffer

18 μ l

Das Gemisch wurde auf 85 °C erhitzt, 3 min bei 85 °C gehalten und anschliessend in 35 min auf 20 °C abgekühlt.

+ Enzym: 2 μ l Bst-DNA-Polymerase (3 U)

20 μ l

Je 4,5 μ l des Gemischs wurden sofort zu 2,5 μ l Terminationsmix gegeben und 20 min bei 50 °C inkubiert und anschliessend 2 min bei 85 °C denaturiert. Vor der Hitzebehandlung wurden 7 μ l Stop-Solution zugegeben.

7.3.1.5 Terminationsmixe für die Vent(exo⁻)-Polymerase

Terminationsmix Nr. 1	3'-ddTTP
Terminationsmix Nr. 3	3'-NH₂-ddTTP (37)
Terminationsmix Nr. 6	3'-NS-ddTTP (39)
Terminationsmix Nr. 7	3'-NS-FITC-ddTTP (40)
Terminationsmix Nr. 11	N²-CN-ddGTP (41)
Terminationsmix Nr. 12	N²-NH₂-ddGTP (43)
Terminationsmix Nr. 15	N²-NH-FITC-ddGTP (44)

Nachfolgend wird das Standardprotokoll zur Sequenzierung mit der Vent(exo⁻)-Polymerase beschrieben, mit dem alle Sequenzierungen mit der Vent(exo⁻)-Polymerase durchgeführt wurden:

DNA, Primer und Annealing Puffer wurden in folgenden Mengen gemischt:

DNA: 1 μ l M13mp18 (0,2 μ g)

+ Primer: 2 μ l cwo 18 (1 pmol) oder 2 μ l KS 1 (1 pmol)

+ Annealing Puffer: 5 μ l Thermopol-Puffer

+ H₂O 10 μ l

18 μ l

Das Gemisch wurde auf 85 °C erhitzt, 3 min bei 85 °C gehalten und anschliessend in 35 min auf 20 °C abgekühlt.

+ Enzym: 2 μ l Vent-DNA-Polymerase (5 U)

20 μ l

Je 4,5 μ l des Gemischs wurden sofort zu 2,5 μ l Terminationsmix gegeben und mittels Cycle Sequencing auf 85 °C erhitzt, 30 Sekunden gehalten, anschliessend auf 42 °C abgekühlt, 30 Sekunden gehalten und danach bei 70 °C für eine Minute inkubiert. Der Cyclus wurde 15mal bzw. 30mal wiederholt. Vor der letzten Hitzebehandlung wurden 7 μ l Stop-Solution zugegeben.

7.3.2 Sequenz der eingesetzten Oligonucleotide

	Länge	Modifikation	3	6	9	12	15	18	21	24	27
cwo18	18	5'-Cy5	TGT	AAA	ACG	ACG	GCC	AGT			
KS	24	5'-Cy5	TGT	AAA	ACG	ACG	GCC	AGT	GCC	AAG	

Nachfolgend ist ein Ausschnitt der Sequenz der M13mp18 DNA aufgeführt, die als Templat für die Sequenzierexperimente eingesetzt wurde. Der Bereich zwischen 6151-6350 ist in 5'-3'-Richtung angegeben. Die zu den Primern cwo 18, 19 und KS komplementären Bereiche sind unterschiedlich gekennzeichnet.

cwo18, cwo19, KS

TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTTC
 ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGAGCT CGGTACCCGG
 GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTTGGCA CTGGCCGTCG
TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC

8 Literatur

A

Ansorge, W.; Sproat, B. S.; Stegemann, J.; Schwager, C., A non-radioactive automated method for DNA sequence determination, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1986**, *13*, 315

Adams, C. J.; Murray, J. B.; Arnold, J. R. P.; Stockley, P. G., Incorporation of a fluorescent nucleotide into oligonukleotides, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1597

B

Baddiley, J.; Michelson, A. M.; Todd, A. R., *J. Chem. Soc.* **1948**, 582

Bains, W.; Smith, G., A novel method for nucleic acid sequence determination, *J. Theor. Biol.* **1988**, *135*, 303

Bannwarth, W.; Knorr, R., Formation of Carboxamides with N,N,N',N'-Tetramethyl-(succinimido)uroniumtetrafluoroborate in aqueous/organic solvent systems, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1157

Baughn, R. L.; Adalsteinson, O.; Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 304

Beardsley, T.; Hoefler, I., Entschlüsseltes Leben, in Digest: Gene und Genome, Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg, **1997**

Beaucage, S. L.; Iyer, R. P., Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223

Beaucage, S. L.; Iyer, R. P., The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives, *Tetrahedron*, **1993a**, *49*, 1925

Beaucage, S. L.; Iyer, R. P., The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications, *Tetrahedron*, **1993b**, 49, 6123

Benhaddou, R.; Czernecki, S.; Valéry, J. M.; Bellosta, V., Préparation de la 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT) à partir du D-xylose, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1991**, 127, 108

Bentzley, C. M.; Johnson, M. V.; Larsen, B. S.; Gutteridge, S., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2141
Burgess

Blattner, F. R.; Plunkett III, G.; Bloch, G. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado.Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y., The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* **1997**, 277, 5.Sept., 1453

Bloom, L. B.; Otto, M. R.; Beechem, J. M.; Goodman, M. F., Influence of 5'-nearest neighbors on the insertion kinetics of the fluorescent nucleotide analog 2-aminopurine by Klenow fragment, *Biochemistry*, **1993**, 32, 11247

Boer, R. F. de; Petra, D. G. I.; Wanner, M. J.; Boesaart, A.; Koomen, G.-J., Mechanism of formation of fluorescent adenosine analogues, *Heterocycles* **1995**, 41, 1197

Brownlee, G. G.; Fodor, E.; Pritlove, D. C.; Gould, K. G.; Dalluge, J. J., Solid phases synthesis of 5'-diphosphorylated oligoribonucleotides and their conversion to capped m⁷Gppp-oligoribonucleotides for use as primers for influenza A virus RNA polymerase *in vitro*, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 2641

Burdzy, A.; Skalski, B.; Biala, E.; Kowalewski, A.; Paszyc, S.; Adamiak, R. W., Postsynthetic transformations of oligodeoxynucleotides originated at 6-methylthio-purine site, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, 14, 979

Burgstaller, P.; Famulok, M., Synthetische Ribozyme und das erste Desoxyribozym, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1303

C

Canard, B.; Cardona, B.; Sarfati, R. S., Catalytic editing properties of DNA polymerases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10859

Canard, B.; Sarfati, R. S., DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags, *Gene* **1994**, *148*, 1

Casale, R.; McLaughlin, L. W., Synthesis and properties of an oligonucleotide containing a polycyclic aromatic hydrocarbon site specifically bound to the N² amino group of a 2'-deoxyguanosine residue, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5264

Cava, M. P.; Levinson, M. I., Thionation reactions of Lawesson's reagents, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 5061

C. elegans Sequencing Consortium, Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*; A Platform for Investigating Biology, *Science* **1998**, *282*, 11. Dec., 2012

Chen, J.-K.; Schultz, R. G.; Lloyd, D. H.; Gryaznov, S. M., Synthesis of oligodeoxyribonucleotide N³=>P5' phosphoramidates, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2661

Chidgeavadze, Z. G.; Beabealashvilli, R. S.; Atrazhev, A. M.; Kukhanova, M. K.; Azhayev, A. V.; Krayevsky, A. A., 2',3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 1671

Chromosome 21 mapping and sequencing Consortium, The DNA sequence of human Chromosome 21, *Nature* **2000**, *405*, 18. May, 311

Czernecki, S.; Valéry, J. -M., An Efficient Synthesis of 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT), *Synthesis*, **1991**, 239

D

Davisson, V. J.; Davis, D. R.; Dixit, V. M.; Poulter, C. D., *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1794

Dennis, C.; Surridge, C., et al., *A. thaliana* genome, *Nature* **2000**, *408*, 14. Dec., 791

Dixit, V. M.; Pohlter, C. D., *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4055

Dunham, I.; Hunt, A. R.; Collins, J. E.; Bruskiewich, R.; Beare, D. M.; Clamp, M.; Slink, L. J.; Ainscough, R.; Almeida, J. P., et al., The DNA sequence of human chromosome 22, *Nature* **1999**, *402*, 2. Dec., 489

E

Edman, C.; Raymond, D.; Wu, D.; Tu, E.; Sosnowski, R.; Butler, W.; Nerenberg, M.; Heller, M., Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4907

F

Faulstich, K.; Sequenzierung von Nucleinsäuren: Methoden und Methodenentwicklungen, Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, **1997**

Fedorov, I. I.; Kazmina, N. A.; Gurskaya, G. V.; Bochkarev, A. V.; Jasko, M. V.; Victorova, L. S.; Kukhanova, M. K.; Balzarini, J.; DeClercq, E.; Krayevsky, A. A., 3'-C-Branched 2'-deoxy-5-methyluridines: synthesis, enzyme inhibition, and antiviral properties, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4567

Fox, J. J.; Miller, N. C., Nucleosides. XVI. Further studies of anhydronucleosides, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 936

Fraser, M. C.; Gocayne, D. J.; White, O.; Adams, M. D.; Clayton, R. A.; Fleischmann, R. D.; Bult, C. J.; Kerlavage, A. R.; Sutton, G.; Kelley, J. M.; Fritchman, J. C.; Weidman, J. F.; Small, K. V.; Sandusky, M.; Fuhrmann, J.; Nguyen, D.; Utterback, T. R.; Sandek, D. M.; Phillips, C. A.; Merrick, J. M.; Tomb, J-F.; Dougherty, B. A.; Bott, K. F.; Hu, P-C.; Lucier, T. S.; Peterson, S. N.; Smith, H. O.; Hutchinson III, C. A.; Venter, J. C., The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*, *Science* **1995**, *270*, 20. Oct., 397

G

Gaur, R. K.; Sproat, B. S.; Krupp, G., Novel solid phase synthesis of 2'-O-methylribo-nucleoside 5'-triphosphates and their a-thio analogues, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3301

The Genome international Sequencing Consortium, The Human Genome, *Nature* **2001**, *409*, 15. Feb., 860

Gilbert, W., DNA-Sequenzierung und Gen-Struktur (Nobel-Vortrag), *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 1037

Goffeau, A.; Barrell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E. J.; Mewes, H. W.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H.; Oliver, S. G., Life with 6000 Genes, *Science* **1996**, *274*, 25. Oct, 546

Gurjar, M. K.; Kunwar, A. C.; Reddy, D. V.; Islam, A.; Lalitha, S. V. S.; Jagannadh, B.; Rama Rao, A. V., Synthesis and conformational studies on AZT and its deuterated analogues, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4373

H

Hecht, S. M.; Kozarich, J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *331*, 307

Herrlein, M. K., Synthese von modifizierten Nucleosiden, Nucleotiden und Oligonucleotiden zur Fluoreszenzmarkierung in der DNA-Analytik, Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, **1993**

Herrlein, M. K.; Konrad, R. E.; Engels, J. W.; Holletz, T.; Cech, D., 3'-Amino-modified nucleotides useful as potent chain terminators for current DNA sequencing methods, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 586

Holletz, T.; Cech, D., A Facile Procedure for the Reduction of Azido Nucleosides to Amines Using Polymer Bound Triphenylphosphine, *Synthesis*, **1994**, 789

Holletz, T., Synthese von farbstoffmarkierten Nucleosiden und Nucleotiden für neue Verfahren der nichtradioaktiven DNA-Sequenzierung, Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin, **1995**

Holley, R. W., Alanin-Transfer-RNA, Nobelvortrag, *Angew. Chem.* **1968**, *81*, 1039-1045

Hoard, D. E.; Ott, D. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785

Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M., Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy-b-D-lyxofuranosyl)thymidine, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2076

Horwitz, J. P.; Tomson, A. J.; Urbanski, J. A.; Chua, J., Nucleosides I. 5'-Amino-5'-deoxyuridine and 5'-Amino-5'-deoxythymidine, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3045

Hou, W.; Smith, L. M., Fluorescence-based DNA sequencing with hexamer primers, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3331

Hovinen, J.; Azhayeva, E.; Azhayev, A.; Guzaev, A.; Lönnberg, H., Synthesis of 3'-O-(w-Aminoalkoxymethyl)thymidine 5'-triphosphates, terminators of DNA synthesis that enable 3'-labelling, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 211

Hurd, R. N.; DeLaMater, G., The preparation and chemical properties of thioamides, *Chem. Reviews* **1961**, 61, 45

I

Ikehira, H.; Matsuura, T.; Saito, I., Photochemistry of 6-halo- and 5,6-dihalouraciles. A simple synthesis of fluorescent uracil derivatives, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 25, 1743

J

Jacobson, K. B.; Arlinghaus, H. F., Development of Resonance Ionization Spectroscopy for DNA sequencing and genome mapping, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 315

Jameson, D. M.; Eccleston, J. F., Fluorescent nucleotide analogs: synthesis and applications, *Methods Enzymol.* **1997**, 278, 363

Jeong, L. S.; Beach, J. W.; Chu, C. K., Stereoselective synthesis of 3-azido-2,3-dideoxy-D-ribose derivatives and its utilization for the synthesis of Anti-HIV nucleosides, *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, 30, 1445

Jones, B. A.; Bradshaw, J. S., Synthesis and reduction of thiocarboxylic O-esters. *Chem. Rev.* **1984**, 84, 17

Juhasz, P.; Roskey, M. T.; Smirnov, I. P.; Takach, E. J.; Haff, L. A.; Martin, S. A., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 941

K

Kadokura, M.; Wada, T.; Urashima, C.; Sekine, M., Efficient synthesis of g-methyl-cap-ped guanosine 5'-triphosphate as a 5'-terminal unique structure of U6 RNA via a new triphosphate bond formation involving activation of methyl phosphorimidazolidate using $ZnCl_2$ as a catalyst in DMF under anhydrous conditions, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8359

Ke, Y.; Su, B.; Song, X.; et al., *Science* **2001**, *292*, 1151 (May, 11)

Kerk, A., DNA-Chips: Diagnostik vom Fließband, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1999**, *47*, 777

Khrapko, K.; Lysov, Y.; Khorlyn, A.; Shick, V.; Florentiev, V.; Mirzabekov, A., An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing, *FEBS Lett.* **1989**, *256*, 118

Kinjo, M.; Arais, T.; Koyoma, T., Synthesis of a bioactive fluorescent dye and enzymatic labeling at the 3-termini of RNAs: an application for the characterization of the thermal stability of tRNAs and oligonucleotides using fluorescent anisotropy measurements, *Dyes and Pigments* **1998**, *38*, 771

Korch, C.; Drabkin, H., Manganese citrate improves base-calling accuracy in DNA sequencing reactions using rhodamine-based fluorescent dye-terminators, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1405

Korshun, V. A.; Pestov, N. B.; Birikh, K. R.; Berlin, Y. A., Reagent for introducing pyrene residues in oligonucleotides, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 559

Koziolkiewicz, J.; Pankowski, J.; Janecka, A., *Prep. Biochem.* **1978**, *8*, 471

Krayevski, A.; Kukhanova, M.; Alexandroya, L.; Belyakova, N.; Krutyakov, V., 2',3'-Di-deoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates inhibit the repair of DNA in rat liver chromatin, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *783*, 216

Krenitzky, T. A.; Freeman, G. A.; Shaver, S. R.; Beacham III, L. M.; Hurlbert, S.; Cohn, N. K.; Elwell, L. P.; Selway, J. W. T., 3'-Amino- 2',3'-dideoxyribonucleosides of some pyrimidines: synthesis and biological activities, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 891

L

Larock, R. C., *Comprehensive Organic Transformations*, VCH, ISBN 0-89573-710-8, 410, **1989**

Lee, L. G.; Connell, C. R.; Woo, S. L.; Cheng, R. L.; McArdle, B. F.; Fuller, C. W.; Halloran, N. D.; Wilson, R. K., DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2471

Lehbauer, J.; Pfeleiderer, W., Synthesis of 8-(2-deoxy-b-D-ribofuranosyl)-isoxanthopterin. New fluorescent analogs of 2'-deoxyguanosine, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 869

Lin, T.-S.; Gao, Y.-S.; Mancini, W. R., Synthesis and biological activity of various 3'-azido and 3'-amino analogues of 5-substituted pyrimidine deoxyribonucleosides, *J. Med. Chem.* **1983a**, *26*, 1691

Lin, T.-S.; Mancini, W. R., Synthesis and antineoplastic activity of 3'-azido and 3'-amino analogues of pyrimidine deoxyribonucleoside, *J. Med. Chem.* **1983b**, *26*, 544

Lin, T.-S.; Chen, M. S.; McLaren, C.; Gao, Y.-S.; Ghazzouli, I.; Prusoff, W. H., Synthesis and antiviral activity of various 3'-Azido, 3'-Amino, 2',3'-unsaturated, and 2',3'-dideoxy analogues of pyrimidine deoxyribonucleosides against retroviruses, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 440

Lin, T. S.; Prusoff, W. H., Synthesis and Biological Activity of Several 5-Halo-5'-amino Analogues of Deoxyribopyrimidine, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 106

Ludwig, J., *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131

M

Ma, Q.; Bathurst, I. C.; Barr, P. J.; Kenyon, G. L., *J. Med. Chem.* **1992**, *35*

Mag, M., Synthese, Charakterisierung und biologische Verwendung von modifizierten Oligo(desoxy)nukleotiden, Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, **1991**

Maier, T.; Pfeleiderer, W., Synthesis and properties of new fluorescein-labeled oligonucleotides, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 961

Maier, E.; Lehrach, H., Neue Techniken zur Automatisierung in der DNA-Sequenzierung, *Chemie in unserer Zeit* **1997**, *31*, 66

Maiti, S. N.; Spevak, P.; Reddy, A. V. N., Alkaline Earth Mediated Reduction of Azides to Amines, *Synth. Commun.* **1988**, 1201

Malik, A. A.; Preston, S. B.; Archibald, T. G.; Cohen, M. P.; Baum, K., A Facile Reduction of Azides to Amines Using Hydrazine, *Synthesis* **1989**, 450

Manz, A., What can chips technologie offer for next century's chemistry and life sciences, *Chimia* **1996**, *50*, 140

March, J., Advanced organic chemistry – reactions, mechanisms, and structure, John Wiley & Sons, New York, 4. Auflage, **1992**

Markiewicz, W. T.; Markiewicz, M.; Astriab, A., Studies on the Synthesis and Applications of Synthetic Oligonucleotide Combinatorial Libraries, *Tenth Symposium On The Chemistry Of Nucleic Acid Components, Trest Castle, Czech Republic, September 1st-7th* **1996**, 315

Markiewicz, W. T.; Gröger, G.; Rösch, R.; Zebrowska, A.; Markiewicz, M.; Klotz, M.; Hinz, M.; Godzina, P.; Seliger, H., A new method of synthesis of fluorescently labelled oligonucleotides and their application in DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3672

Martinez, C. I.; Thoresen, L. H.; Gibbs, R. A.; Burgess, K., An allylic / acyclic adenosine nucleoside triphosphate for termination of DNA synthesis by DNA template-dependent polymerases, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1271

Maxam, A. M.; Gilbert, W., A New Method for Sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 560

McGee, D. C. P.; Vargese, C.; Zhai, Y.; Kirschenheuter, G. P.; Settle, A.; Siedem, C. R.; Pieken, W. A., Efficient synthesis of 2'-amino-2'-deoxypyrimidine 5'-triphosphates, *Nucl. Nucl.* **1995**, *14*, 1329

Metzker, M. L.; Raghavachari, R.; Richards, S.; Jacutin, S. E.; Civitello, A.; Burgess, K.; Gibbs, R. A., Termination of DNA synthesis by novel 3'-modified deoxyribonucleotide 5'-triphosphates, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4259

Miller, N.; Fox, J. J., Nucleosides XXI. Synthesis of Some 3'-Substituted 2',3'-Dideoxyribonucleosides of Thymidine and 5-Methylcytosine, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 1772

Moffat, J. G., A general synthesis of nucleoside-5'triphosphates, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 599

Moffat, J. G.; Khorana, H. G., Nucleoside Polyphosphates. X. The synthesis and some reactions of nucleoside-5'phosphoromorpholidates and related compounds. Improved methods for the preparation of nucleoside-5'polyphosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649

Mungall, W. S.; Greene, G. L.; Heavner, G. A.; Letsinger, R. L., Use of the Azido Group in the Synthesis of 5'-Terminal aminodeoxythymidine Oligonucleotides, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1659

N

Nordhoff, E., *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 99

P

Pieles, U.; Zürcher, W.; Schär, M.; Moser, H. E., *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3191

Pley, H. W.; Flaherty, K. M.; McKay, D. B., Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme, *Nature* **1995**, *372*, 68

Prober, J. M.; Tainor, G. L.; Dam, R. J.; Hobbs, F. W.; Robertson, C. W.; Zagurski, R. J.; Cocuzza, A. J.; Jensen, M. A.; Baumeister, K., A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides, *Science* **1987**, *238*, 336

R

Ren, R. X.-F.; Chaudhuri, N. C.; Paris, P. L.; Rumney, S.; Kool, E. T., Naphthalene, phenanthrene, and pyrene as DNA base Analogues: synthesis, and fluorescence in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671

Ronaghi, M.; Karamouhamed, S.; Petterson, B.; Uhlen, M.; Nyren, P., Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Anal. Biochem.* **1996**, *241*, 1

Ronaghi, M.; Uhlen, M.; Nyren, P., A sequencing method based on real-time pyrophosphate, *Science* **1998**, *281*, 363

Rosenblum, B. B.; Lee, L. G.; Spurgeon, S. L.; Khan, S. H.; Menchen, S. M.; Heiner, C. R.; Chen, S. M., New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4500

Rösler, A.; Pfeleiderer, W., Synthesis of condensed N1-(2'-deoxy-b-D-ribofuranosyl)lumazines, new fluorescent building blocks in oligonucleotide synthesis, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1869

S

Saady, M.; Lebeau, L.; Mioskowski, C., *Helv. Chim. Acta* **1995**, *36*, 5183

Saha, A. K.; Schairer, W.; Upson, D. A., 3'-substituted pyrimidines via alkylation-opening of 2',3'-cyclothymidine, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8411

Salunke, A. M.; Brown, H. C., Dichloroboranedimethyl sulfide, A highly selective reducing agent for reduction of organyl azides to amines, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7987

Samano, M. C.; Robins, M. J., Efficient reduction of azides with tributylstannane. High-yield synthesis of amino and diamino deoxynucleosides, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6293

Sanger, F., Bestimmung von Nucleotidsequenzen der DNA (Nobel-Vortrag), *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 937

Sanger, F., Coulson, A. R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J. Mol. Biol.* **1975**, *94*, 441

Sanger, F., Nicklen, S.; Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463

Sarfati, R. S.; Berthod, T.; Guerreiro, C.; Canard, B., Synthesis of fluorescent derivatives of 3'-O-(6-aminohexanoyl)-pyrimidine nucleosides 5'-triphosphates that act as DNA polymerase substrates reversibly tagged at C-3', *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1995**, 1163

Sarfati, R. S.; Rasolonjatovo, I.; Guerreiro, C.; Canard, B., 3'-Modified nucleosides for DNA sequencing without gel electrophoresis, XII International Roundtable. Nucleosides, nucleotides and their biological applications, La Jolla, CA, **1996**

Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H. G., Studies of polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribonucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3'-phosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821

Schötzau, T., Synthese von farbstoffmodifizierten Nucleotiden zur Fluoreszenzmarkierung als Beitrag zur Weiterentwicklung von Verfahren der nichtradioaktiven DNA-Sequenzierung, Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, **1999**

Schubert, F.; Ahlert, K.; Czech, D.; Rosenthal, A., One-step labelling of oligonucleotides with fluoresceine during automated synthesis, *Nucleic Acids. Res.* **1990**, *18*, 3427

Schweitzer, B. A.; Kool, E. T., Hydrophobic, non-hydrogen-bonding bases and base pairs in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863

Secrist, J. A.; Barrio, J. R.; Leonhard, N. J., A fluorescent modification of adenosine triphosphate with activity in enzyme systems: 1, N⁶-ethenadenosine triphosphate, *Science* **1972**, *175*, 646

Seela, F.; Chen, Y.; Bindig, U.; Kazimierczuk, Z., Synthesis of 2'-deoxyisoinosine and related 2'-deoxyribonucleotides, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 194

Seto, H.; Okuda, T.; Takesue, T.; Ikemura, T., Reaction of malonaldehyde with nucleic acid. I. Formation of fluorescent Pyrimido[1,2-a]purin-10(3*H*)-one nucleosides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 1799

Shabarova, Z., Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids VCH, Weinheim, **1994**

Sigmund, H.; Maier, T.; Pfeleiderer, W., A new type of fluorescence labeling of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 685

Simon, E. S.; Grabowski, S.; Whitesides, G. M., Convenient synthesis of cytidine 5'-triphosphate, guanosine 5'-triphosphate, and uridine 5'-triphosphate and their use in the preparation of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid, and GDP-mannose, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1834

Smith, L. M.; Sanders, J. Z.; Kaiser, R. J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Connell, C. R.; Heiner, C.; Kent, S. B. H.; Hood, L. E., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature* **1986**, *321*, 674

Smith, L. M.; Kaiser, R. J.; Sanders, J. Z.; Hood, L. E., The synthesis and use of fluorescent oligonucleotides in DNA sequence analysis, *Methods Enzymol.* **1987**, *155*, 260

Smith, M.; Khorana, H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1141

Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G., Specific synthesis of c-3'-C-5'-interribonucleotide linkage. Synthesis of uridylyl-(3'-5')-uridine and uridylyl-(3'-5')-adenosine, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430

Southern, E. M.; Maskos, U.; Elder, J. K., Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models, *Genomics* **1992**, *13*, 1008

Staudinger, H.; Meyer, J., Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635

Stout, M.G.; Robins, M. J.; Olsen, R. K.; Robins, R. K., Purine Nucleosides. XXV. The Synthesis of Certain Derivatives of 5'-Amino-5'-deoxy- and 5'-Amino-2',5'-dideoxy-b-D-ribofuranosylpurines as Purine Nucleotide Analogs, *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 658

Steitz, T. A., A mechanism for all polymerases, *Nature* **1998**, *391*, 231

Stolze, K.; Koert, U.; Klingel, S.; Sagner, G.; Wartbichler, R.; Engels, J. W., Synthesis of 3'-sugar- and base-modified nucleotides and their application as potent chain terminators in DNA sequencing, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1311

T

Theisen, P.; McCollum, C.; Upadhyaya, K.; Jacobson, K.; Vu, H.; Andrus, A., Fluorescent dye phosphoramidite labelling of oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5033

Toulmé, J. J.; Héline, C., Fluorescence study of the association between gene 32 protein of the bacteriophage T4 and poly(1- N^6 -ethenoadenylic acid). Evidence for energy transfer, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *606*, 95

Trainor, G. L., DNA sequencing, automation, and the Human Genome, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 418

V

Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; et al., The Human Genome, *Science* **2001**, *291*, 16. Feb., 5507

Vollrath, D.; Foote, S.; Hilton, A.; Brown, L.G.; Beer-Romero, P.; Bogan, J. S.; Page, D. C., The Human Y Chromosome: A 43-Interval Map Based on Naturally Occuring Deletions, *Science* **1992**, *258*, 2. Oct., 52

Voss, A.; Schwager, C.; Wirkner, U.; Sproat, B.; Zimmermann, J.; Rosenthal, A.; Erfle, H.; Stegemann, J.; Ansorge, W., Direct genomic fluorescent on-line sequencing and analysis using in vitro amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 2517

Voss, A.; Schwager, C.; Wirkner, U.; Zimmermann, J.; Erfle, H.; Hewitt, N. A.; Rupp, T.; Stegemann, J.; Ansorge, W., A new procedure for automated DNA sequencing with multiple internal labelling by fluorescent dUTP, *Meth. Mol. Cell. Bioll.* **1992a**, 3, 30

Voss, A.; Wiemann, S.; Wirkner, U.; Schwager, C.; Zimmermann, J.; Stegemann, J.; Erfle, H.; Hewitt, N. A.; Rupp, T.; Ansorge, W., Automated DNA sequencing system resolving 100 bases with fluoresceine-15-dATP as internal label, *Meth. Mol. Cell. Bioll.* **1992b**, 3, 153

W

Wang, G.; Bergstrom, D. E., Synthesis of Oligonucleotides Containng N²-(5-Carboxypentyl)-2'-deoxyguanosine and 5-[2(4'-Methyl-2,2'-dipyrid-4-yl-carbocamido)ethylthio]-2'-deoxyuridine, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 42, 6724

Walter, W.; Bode, K.-D., Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie IV. Synthesen von Thiocarbonsäureamiden, *Angew. Chem.* **1966**, 78, 517

Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular structure of nucleic acids, *Nature* **1953**, 171, 737

Watson, J. D., Die Doppelhelix, **1969**, Rohwohlt Verlag GmbH, Reinbek bei Hamburg, 1968

Weimann, G.; Khorana, H. G., *J. Am Chem. Soc.* **1962**, 84, 4329

Wojczewski, Synthese 3'-modifizierter Nukleotide und Entwicklung neuer Methoden für die DNA-Sequenzanalytik, Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, **2000**

Wong, C. H.; Haynie, S. L.; Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 115

Wörner, K., Synthese und Charakterisierung kleiner strukturbildender Oligoribonukleotide, Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, **1997**

Y

Yamana, K.; Aota, R.; Nakano, H., Oligonucleotides having covalently linked anthracene at specific sugar residues: differential binding to DNA and RNA and fluorescence properties, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8427

Yamana, K.; Kumamoto, S.; Nakano, H., Homopyrimidine oligonucleotides modified by a pyrenylmethyl group at the terminal position: enhanced fluorescence upon binding to double helical DNA, *Chem. Lett.* **1997a**, 1173

Yamana, K.; Mitsui, T.; Hayashi, H.; Nakano, H., An uridine derivative containing a hydrophobic fluorescent probe at the 2'-position: synthesis and its incorporation into oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1997b**, *38*, 5815

Yde, B.; Yousif, N. M.; Pedersen, U.; Thomsen, I.; Lawesson, S.-O., Studies on organophosphorus compounds XLVII. Preparation of thiated, synthons of amides, Lactams, and imides by use of some new P, S-containing reagents, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 2047

Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T., *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065

Z

Zehl, A.; Cech, D., Synthesis and application of isothiocyanato derivatives of nucleosides, *Liebigs Ann.* **1997**, 595

Zeidler, J.; Golankiewicz, B., Synthesis and ¹H and ¹³C NMR spektral characteristics of 8-Bromo-2',3'-dideoxyguanosine and 8-Bromo-2',3'-dideoxyinosine, *Nucl. Nucl.* **1996**, *15*, 1077-1095

Zimmermann, T. P.; Mahony, W. B.; Prus, K. L., 3'-Azido-3'-deoxythymidine, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5748

Zhu, Z.; Chao, J.; Yu, H.; Waggoner, A. S., Directly labeled DNA probes using fluorescent nucleotides with different length linkers, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3418

9 Anhang

9.1 Abkürzungen und Symbole

A	Adenin, Adenosin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
aq	wässrig
äq	Äquivalente
arom.	aromatische Protonen
AZT	3'-Azido-2',3'-desoxythymidin
B	Nukleinsäurebase
b	breites Signal
bp	Basenpaare
BSA	Benzolsulfonsäure
Bz	Benzoyl
C	Cytosin, Cytidin
c	Konzentration
CE	Capillary Electrophoresis
ca.	circa
c _{End}	Konzentration im Reaktionsgemisch
COSY	Correlated Spectroscopy
CPG	Controlled Pore Glass
c _{Stamm}	Konzentration der Stammlösung
D	Dalton
d	Dublett
d	Tage

d	Dichte in g/ml
d	Desoxyribo
d	chemische Verschiebung
DB	Dynabeads
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dd	Dublett von Dublett
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat ¹⁾
DIAD	Diisopropylazadicarboxylat
DIPEA	Diisopropylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMPU	<i>N,N</i> -Dimethylpropylenuronium (1,3-Dimethyltetrahydro-2(1H)-pyrimidinon)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d6	Dimethylsulfoxid sechsfach deuteriert
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat ¹⁾
DTT	Dithioreitol (<i>threo</i> -1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
E	Extinktion
e	Extinktionskoeffizient
EA	Elementaranalyse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ESI(-)	Elektrospray-Ionisation im negativen Modus
ESI(+)	Elektrospray-Ionisation im positiven Modus
et al.	et alii (und andere)
Fa.	Firma
FC	Flash-Chromatographie
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl

FP	Foreward Primer
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
ges.	gesättigt
h	Stunden
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUGO	Human Genome Project
Hz	Hertz
<i>i</i> Bu	Isobutyryl
IR	Infrarot-Spektroskopie
J	Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
kb	kiloBasen
K _d	Dissoziationskonstante
Konz.	Konzentration
konz.	konzentriert
l	Literatur
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
m	Masse
m	Multiplett

MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl.: matrix assisted laser desorption/ionisation)
max.	maximal
Me	Methyl-(Modifikation)
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
Ms	Mesyl (Methylsulfonyl)
N	Nukleosid
3'-NH ₂ -ddNTP	3'-Amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-triphosphat ¹⁾
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl.: nuclear magnetic resonance)
Nr.	Nummer
NS	Niederschlag
OD	Optische Dichte
pt	Pseudotriplett
p	Phosphat
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pDC	Präparative Dünnschichtchromatographie
ppm	parts per million
PSL	Post Sequencing Labeling
Py	Pyridin
R _f	Retentionsfaktor

RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
s	Sekunde
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
SNUPE	Single Nucleotide Primer Extention
T	Thymin, Thymidin
T	Temperatur
t	Triplett
T4-PNK	T4-Polynukleotid Kinase
Tab.	Tabelle
Taq	Thermococcus aquaticus
TBA	Tributylamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
techn.	technisch
Tf	Triflat (Trifluormethylsulfonyl)
TFA	Trifluoacetat; Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Flugzeit (engl.: time of flight)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	transfer-RNA
TSTU	<i>O</i> -(<i>N</i> -Succinimidyl)- <i>N,N,N,N</i> '-tetramethyluroniumtetrafluoroborat

U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
z	Elementarladung

¹⁾ 3'-Desoxythymidin-Derivate werden mit ddTTP gekennzeichnet, Thymidin-Derivate mit dTTP, um eine einheitliche Bezeichnung aller vier Nukleoside zu gewährleisten.

9.2 Publikationen und Poster

a) Publikationen

Lehmann, T. J.; Schwarzer, K.; Schweitzer, M.; Engels, J. W., Collection Symposium Series 1999, 2, 302, Thermodynamic and CD-spectroscopic characterization of selfcomplementary methyl- and benzyl-modified d(CGCpGCG)-hexamers

Wojczewski, C.; Schwarzer, K.; Engels, J. W., Helv. Chim. Acta 2000, 83, 1268, Synthesis and characterization of 3'-Thioamido-modified 3'-Deoxythymidine-5'-triphosphates and their use as chain terminators in Sanger-DNA Sequencing

Schwarzer, K.; Engels, J. W., Nucl. Nucl. In press, Synthesis of 3'-Thioamido-modified 3'-Deoxythymidine-5'-triphosphates and their use as chain terminators in Sanger-DNA Sequencing

b) Posterpräsentationen

04. – 09. September 1999: Chemistry of Nucleic Acid Components, XIth Symposium, Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik

Poster: „Thermodynamic and CD-spectroscopic characterization of methyl- and benzyl-modified d(CGCpGCG)-hexamers

10. – 14. September 2000: Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications, XIV International Round Table, San Francisco, USA

Poster: Synthesis of 3'-Thioamido-modified 3'-Deoxythymidine-5'-triphosphates and their use as chain terminators in Sanger-DNA Sequencing