

**Synthese von isotopenmarkierten Mono-  
und Oligonukleotiden zur verbesserten  
NMR-Spektroskopischen Untersuchung von  
Oligonukleotiden**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Michael Czech**  
aus  
Eltville am Rhein  
Frankfurt 2001  
DF1

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main als Dissertation  
angenommen.

Dekan: Prof. Engels

erster Gutachter: Prof. Griesinger

zweiter Gutachter: Prof. Schwalbe, MIT, Cambridge, USA

Datum der Disputation:

*Meinen Eltern*

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. Griesinger in der Zeit von November 1996 bis Juni 2001 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. C. Griesinger danke ich für die Überlassung des sehr interessanten und anspruchsvollen Themas, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und den sehr guten Arbeitsbedingungen in seinem Arbeitskreis

Herrn Prof. Dr. H. Schwalbe danke ich, mir mit der Markierung der mSox5-DNA eine geeignete Anwendung für die isotopenmarkierten Nukleosidbausteine zur Verfügung gestellt zu haben, für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Hilfe bei der Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren.

Meinen Laborkollegen Frau Kristina Münnich, Herrn Dr. Christian Albrecht und Herrn Dr. Ulf Reimer danke ich für die gute und freundliche Atmosphäre. Besonders danke ich Herrn Christian von der Heyden für die gute Zusammenarbeit.

Frau Elke Stirnal und Frau Ellen Lichte danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der HPLC-Trennungen.

Herrn Dr. Dierk Blechschmidt danke ich für die Hilfestellung bei der Aufarbeitung der DNA.

Herrn Dr. Chris Read danke ich für die Zusammenarbeit auf dem Projekt des mSox5-Protein-DNA-Komplexes.

Für die Zusammenarbeit auf dem EF Tu-Projekt danke ich Frau Dr. Teresa Carlomagno, Frau Dr. Isabella Felli, Herrn Robert Fischer und Herrn Prof. Sprinzel.

Herrn Dr. Christian Richter und Frau Heike Neubauer danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme von NMR-Spektren.

Den Systemadministratoren Herrn Dr. Jochen Junker, Herrn Dr. Christian Richter, Herrn Wolfgang Peti, Herrn Dirk Bockelmann und Herrn Peter Gröschke danke ich für die Unterhaltung des Computer-Netzes und die stete Hilfsbereitschaft bei Computer-Problemen aller Art.

Dem NMR-Service unter Leitung von Herrn Dr. G. Zimmermann danke ich für die Aufnahme von Routine-NMR-Spektren

Herrn Peter Gröschke danke ich für das kritische Durchlesen der Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, daß sie mir das Studium meiner Wahl ermöglicht haben und für die große Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Isotopenmarkierung bei Oligonukleotiden	5
1.2	Ziele der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Glykosylierung der Nukleoside</b>	<b>14</b>
2.1	Durchführung der Synthesen	19
2.2	Entschützung der Nukleoside	20
2.3	Glykosylierungen mit isotopenmarkierter Ribose	22
2.4	$^{13}\text{C}_5$ -markiertes Anthraniloyl-Adenosin als tRNA-Mimetikum	24
<b>3</b>	<b>Deoxygenierung der Nukleoside</b>	<b>27</b>
3.1.1	Schützung der 3'- und der 5'- Position	29
3.1.2	Die Bildung des PTC-Esters	31
3.1.3	Deoxygenierung zum 3',5'-TPDS-2'-Desoxynukleosid	32
3.2	Deoxygenierung von $^{13}\text{C}$ -markiertem <i>N</i> -6-Benzoyl-Adenosin	37
<b>4</b>	<b>Synthese der Phosphoamidite.</b>	<b>40</b>
4.1	Festphasensynthese von Oligonukleotiden	41
4.2	Die Synthese der DNA-Phosphoamidite	42
4.2.1	Schützung der exozyklischen Aminofunktion	43
4.2.2	Tritylierung der Desoxynukleoside	48
4.2.3	Die Phosphitylierung zum Phosphoamidit	49
4.3	Synthese des $^{13}\text{C}_5$ -markierten Desoxyadenosinphosphoamidits	50
<b>5</b>	<b>Synthese von <math>^{13}\text{C}</math>-markierter zweifach deuterierter Ribose</b>	<b>52</b>
5.1	Syntheseplanung	52
5.1.1	Wahl der Schutzgruppen	56
5.1.2	Einführung der Deuterierung	57
5.2	Durchführung der Synthese	60

5.2.1	Schützung zu Diacetonglukose	60
5.2.2	Oxidation des C3	62
5.2.3	Periodatspaltung und Reduktion zur 1,2-Isopropyliden-3,5-D- ribofuranose 4	63
5.2.4	Benzoylierung der 3,5-Position	67
5.2.5	Acetylierung zur 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-O-acetyl-3,5-D <sub>2</sub> - ribofuranose	68
5.3	Synthese von <sup>13</sup> C-markierter zweifach deuterierter Ribose	70
<b>6</b>	<b>Der Transkriptionsfaktor mSox5</b>	<b>71</b>
6.1	Die HMG-Box-Proteine	72
6.2	Die Struktur der HMG-Box	75
6.3	Die HMG-Box von mSox5	77
6.4	Der Sox5-Protein-DNA-Komplex	80
7	Der <sup>13</sup> C-markierte mSox5-DNA-Duplex	81
7.1	Synthese und Aufreinigung der <sup>13</sup> C-markierten DNA	81
7.2	Bildung und Untersuchung des <sup>13</sup> C-markierten mSox5-DNA- Duplexes	87
<b>8</b>	<b>Der mSox5-Protein-DNA-Komplex</b>	<b>92</b>
8.1	Bildung des mSox5-Protein-DNA-Komplexes	92
8.2	Die Untersuchung des mSox5-Protein-DNA-Komplex	95
8.3	Vorteile der <sup>13</sup> C-Markierung	103
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>112</b>
10.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen	116
10.2	Versuche zu Kapitel 2	118
10.2.1	Versuche zu Adenosin	118
10.2.2	Reaktionen zu <sup>13</sup> C-markiertem Adenosin	121
10.2.3	Versuche zu zweifach deuteriertem Adenosin	124

10.2.4	Versuche zu zweifach deuteriertem $^{13}\text{C}$ -markiertem Adenosin	126
10.2.5	Versuche zu Guanosin	128
10.3	Versuche zu Kapitel 3	130
10.3.1	Versuche zu Adenosin	130
10.3.2	Versuche zu $^{13}\text{C}$ -markiertem Adenosin	134
10.3.3	Versuche zu Guanosin	137
10.4	Versuche zu Kapitel 4	141
10.4.1	Versuche zu Desoxyadenosin	141
10.4.2	Versuche zu $^{13}\text{C}$ -markiertem Desoxyadenosin	145
10.4.3	Versuche zu Desoxyguanosin	147
10.5	Versuche zu Kapitel 5	151
10.5.2	Versuche mit $^{13}\text{C}$ -markiertem Material	157
10.6	Versuche zu Kapitel 7	160
10.6.1	Synthese des $^{13}\text{C}$ -markierten Oligonukleotids	160
10.6.2	Bildung des DNA- Duplexes	162
10.7	Versuche zu Kapitel 8	164
	<b>Anhang</b>	<b>165</b>
	Literaturverzeichnis	165

## Abkürzungsverzeichnis

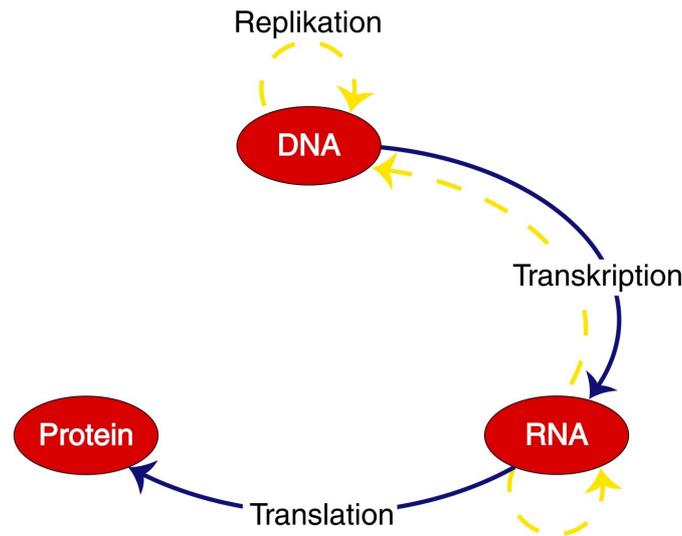
AA	Aminosäure
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AIBN	$\alpha, \alpha$ -Azobutyronitril
BSA	<i>N</i> -O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
Bn	Benzyl
Bz	Benzoyl
COSY	Correlation Spectroscopy
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatogramm
dd	doppelt destilliert
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMF-	Dimethylformamidin
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DMT-Cl	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Human
HMG	High Mobility Group

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
iPr	Isopropyl
kDa	Kilodalton
m	murine, Mäuse
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy
OD	Optical Density
PTC	Thioameisensäure- <i>O</i> -Phenylester
PTC-Cl	Chlorothioameisensäure- <i>O</i> -Phenylester
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOX	humanes <b>Sry Homeo Box-Gen</b>
SOX	humanes Protein, codiert von <i>Sox</i> -Gen
<i>Sox</i>	nicht-humanes <b>Sry Homeo Box-Gen</b>
Sox	nicht-humanes Protein, codiert von <i>Sox</i> -Gen
<i>SRY</i>	sex-determining region Y gene
SRY	Protein, codiert von <i>SRY</i>
TEAA	Triethylammoniumacetat
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung
TEMED	Tetraethylmethyldiamin

TMSTF	Trifluormethansulfonsäure-trimethylsilylester
TOCSY	Total Correlation Spectroskopie
TPDS	<i>1,1,3,3-Tetraisopropyldisilox-1,3-diyl</i>
TPDS-Cl <sub>2</sub>	<i>1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan</i>
[u]	uniformly

# 1 Einleitung

Jede Zelle eines Organismus enthält dessen gesamtes Genom, somit seinen vollständigen Bauplan. Wird in einer Zelle ein Protein benötigt, so wird aus der DNA zunächst eine Kopie des entsprechenden Gens in Form der mRNA transkribiert, mit deren Hilfe im Ribosom das Protein entsteht. Dieses Dreistufenmodell, das auch das zentrale Dogma der Molekularbiologie genannt wird, wurde 1958 von Francis Crick aufgestellt (Crick, 1970). Auf welcher der drei Ebenen die wesentliche Regulation stattfindet, war lange Zeit unklar. Zwar wurde allgemein vermutet, daß die Regulation der Genexpression bereits bei der Transkription stattfindet und jede Zelle nur die DNA transkribiert, deren Proteine sie auch produziert, doch erst 1981 konnte dies von James Darnell bestätigt werden (Darnell, 1982).



**Abbildung 1.1: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie.**

Wichtiger Bestandteil der Regulation der Genexpression sind die Transkriptionsfaktoren. Dies sind Proteine, die selektiv an regulatorische Gen-Sequenzen – sogenannte Promotor und Enhancer – binden und so die Bindung von RNA Polymerasen an die DNA steuern. Mit der so beeinflussten Initiierung der Transkription wird auch die Aktivität des Gens kontrolliert.

Die Abläufe von regulativen Prozessen sind ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente. Zum einen, weil ihre Störung selbst eine häufige Ursache von Krankheiten ist, und man damit Krankheiten direkt an ihrem Ursprung behandeln kann. Zudem bieten sie die Möglichkeit, an einer übergeordneten Stelle auf den Organismus einzuwirken. Deswegen ist es wünschenswert möglichst genaue Informationen über solche Prozesse zu erlangen. Auch der Aufbau und die räumliche Struktur der beteiligten Stoffe ist von Interesse, da die räumlichen Daten für die gezielte Suche nach Leitstrukturen von neuen Medikamenten notwendig sind.

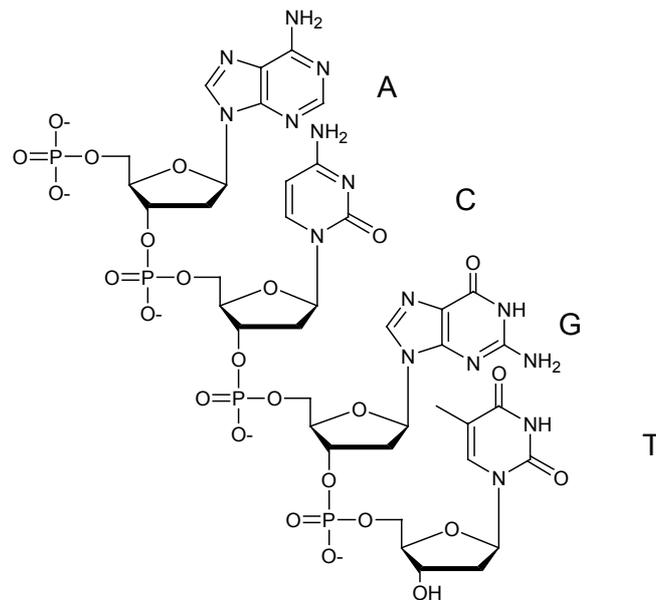
Die SOX-Proteine, eine interessante Untergruppe der Transkriptionsfaktoren, sind an einer Vielzahl von regulativen Prozessen beteiligt (Prior et al., 1996). SOX-Proteine binden über die in der Mitte des Proteins liegende HMG-Box an die kleine Furche der DNA. Die DNA wird hierdurch um einen Winkel von 70-85° geknickt, was zu einer massiven Veränderung der Geometrie der DNA führt.

Die gestörte Struktur der komplexierten DNA wurde bislang nur an dem Komplex der HMG-Box von SRY, dem Hauptvertreter der SOX-Proteine, mit einem 8 Basenpaar-langen DNA-Duplex untersucht (Werner et al., 1995). Aufgrund methodischer Beschränkungen war die Genauigkeit begrenzt, mit der die Struktur der DNA bestimmt werden konnte.

Die Struktur der 79 Aminosäuren großen HMG-Box von mSox5 wird seit mehreren Jahren von der Gruppe um Colyn Crane-Robinson an der Universität Portsmouth, England untersucht (Connor et al., 1994; Crane-Robinson et al., 1998; Jelesarov et al., 1999; Privalov et al., 1999). Die Struktur der freien HMG-Box konnte durch NMR-Spektroskopische Untersuchungen weitgehend geklärt werden, ist aber noch unveröffentlicht. Welche Strukturen HMG-Box und DNA im Komplex einnehmen, ist noch weitgehend ungeklärt.

Hochaufgelöste Strukturen von Biomakromolekülen kann man durch Röntgenstrukturanalyse an Kristallen und durch NMR-Spektroskopie erhalten. Letztere wird üblicherweise in Lösung durchgeführt; in der letzten Zeit gewinnt aber auch die Festkörper-NMR-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung.

NMR-Spektren können nur von Atomkernen aufgenommen werden, die einen Kernspin aufweisen. Das Proton, das einen Spin von  $\frac{1}{2}$  aufweist, ist im Bereich der Organischen Chemie bzw. der Biochemie der wichtigste und am häufigsten vertretene NMR-aktive Kern. Für die NMR-Spektroskopische Untersuchung von biologischen Strukturen sind neben dem Wasserstoffatom in erster Linie das  $^{13}\text{C}$ -, das  $^{15}\text{N}$ - und das  $^{31}\text{P}$ -Isotop geeignet. Während Wasserstoff und Phosphor zu 99,98% bzw. zu 100 % in diesen Isotopen vorliegen, ist die natürliche Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  mit 1,1% und 0,37 % äußerst gering (Holleman-Wiberg, 1985).  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -Spektren von Proben mit natürlicher Häufigkeit können deshalb nur von sehr konzentrierten Proben und unter sehr langen Meßzeiten aufgenommen werden. Durch gezielte Anreicherung der NMR-aktiven Isotopen im Probenmolekül, kann man daher sehr viel mehr Informationen durch ein NMR-Experiment erhalten. Nicht nur die Empfindlichkeit wird gesteigert, sondern es können auch zusätzliche Kopplungen, der Kohlenstoff bzw. der Heteroatome untereinander erhalten werden. Dadurch ist die Aufnahme heteronuklearer mehrdimensionaler NMR-Spektren möglich, die nicht nur



**Abbildung 1.2:** DNA setzt sich aus den vier Desoxynucleotiden zusammen, die sich nur in den Basen unterscheiden.

heteronukleare Versionen der bisherigen Protonenspektren sind, sondern neue Spektren, die ein „walking“ entlang des Backbone ermöglichen. Als Beispiel seien HCP und HCCH-TOCSY genannt. Außerdem ermöglicht die Isotopenmarkierung die Nutzung weiterer Effekte, wie zum Beispiel die Kreuzkorrelierte Relaxation und dipolare Kopplungen (Reif et al., 1997; Tjandra et al., 1997; Griesinger et al., 1998; Richter et al., 2000).

RNA und DNA bestehen aus einem Zuckerphosphat-Rückgrat, das sich nur in den an der 1'-Position verknüpften Basen unterscheidet. Während der Backbone aus den immer gleichen Bausteinen Ribose und Phosphat aufgebaut ist, sind die Basen Purin- und Pyrimidin-Derivate. Diese leichten Unterschiede sind für den genetischen Code verantwortlich. Wie leicht einzusehen ist, ist der Aufbau des Genoms aus den immer gleichen Bausteinen ein Hindernis bei der Strukturaufklärung von DNA und RNA mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Die NMR-Spektren weisen nur eine geringe Dispersion der chemischen Verschiebung auf. Die daraus resultierende Signalüberlagerung erschwert die Auswertung außerordentlich. Die routinemäßige Strukturaufklärung von DNA und RNA ist nur durch heteronukleare mehrdimensionale NMR-Spektroskopie möglich. Da diese isotopenmarkierte Proben voraussetzt, konnte sich die NMR-Spektroskopische Strukturaufklärung von DNA und RNA erst mit dem Zugang zu markierten Proben entwickeln.

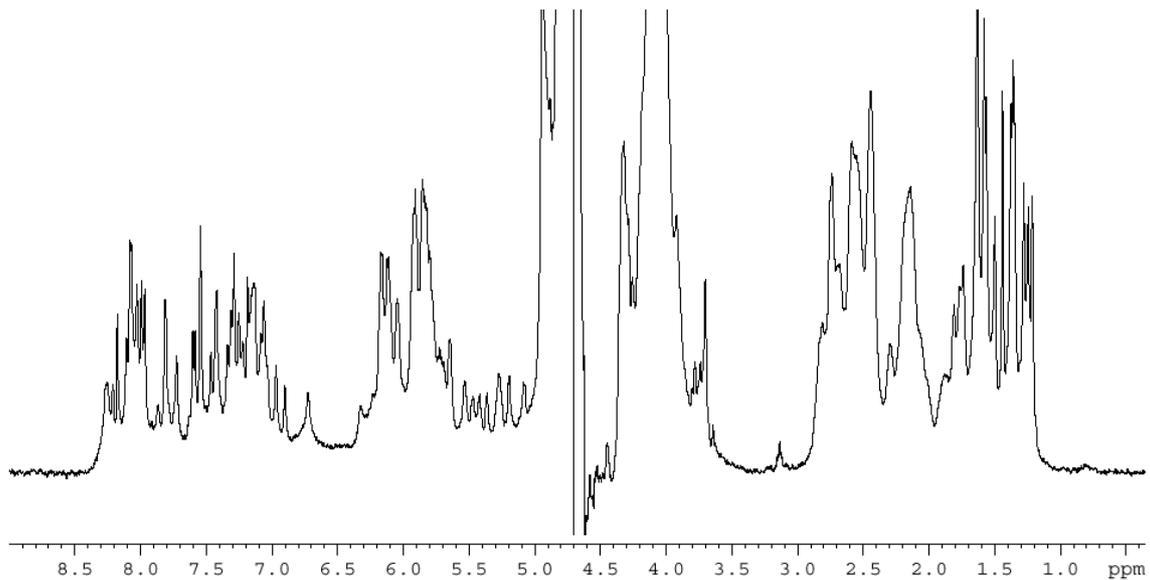


Abbildung 1.3: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des mSox5-DNA-Duplex. Durch die Überlagerung ist eine Zuordnung der Signale unmöglich.

### 1.1 Isotopenmarkierung bei Oligonukleotiden

Auf dem Gebiet der RNA ist die Isotopenmarkierung inzwischen Standardmethode geworden, was zu der Aufklärung einer Vielzahl von Strukturen geführt hat. Die Isotopenmarkierung von DNA ist bislang nur in Einzelfällen durchgeführt worden, wofür es mehrere Gründe gibt. Isotopenmarkierte RNA kann auf biochemischen Wege verhältnismäßig einfacher als DNA gewonnen werden. Außerdem bieten sich bei der RNA mehr Anwendungsmöglichkeiten in Form von kurzen Strukturen, die interessante Geometrien bilden und die damit ideale Forschungsobjekte für die Erforschung der Formensprache von Nucleinsäuren bilden. Im Bereich der DNA sind solche Strukturen rar, freie DNA liegt zumeist als einfach strukturierte Doppelhelix vor. Dabei unterscheidet man zwischen der selten vorkommenden A-DNA, der B-DNA, die die Regelform bildet und der sehr seltenen Z-DNA. Ausnahmen hierzu bilden z. B. die 4Way-junktion (Altona et al., 1995; Grainger et al., 1998) und die DNA-Triplexe bzw. Quadruplexe (Shafer, 1998; Gilbert et al., 1999). Konformationen, die auf Grund ihrer Struktur bzw. ihrer Funktion interessante Untersuchungsobjekte darstellen, nimmt die DNA häufig erst im Verbund mit anderen Partnern an, wie z. B. im Falle der Protein-DNA-Komplexe.

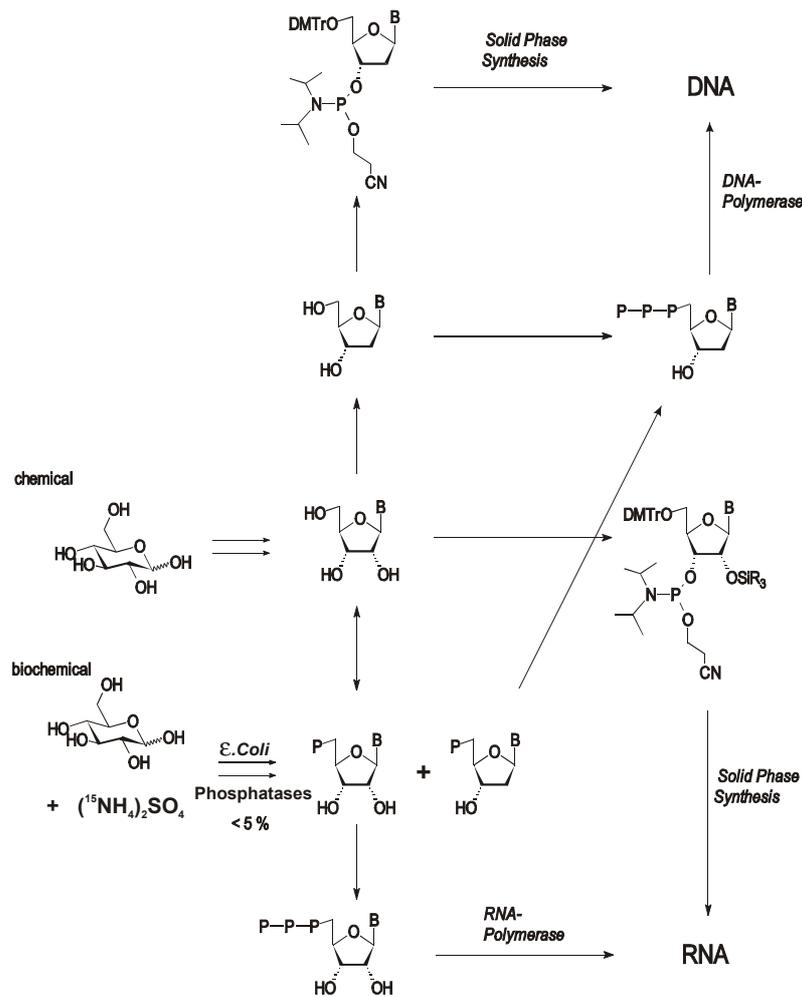


Abbildung 1.4: Übersicht über die verschiedenen Wege zur Erzeugung isotopenmarkierter Oligonucleotide.

Isotopenmarkierte DNA und RNA kann sowohl auf biochemischem, als auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

Bei der biochemischen Methode wird die DNA bzw. RNA durch geeignete Polymerasen aus den isotopenmarkierten Nucleosidtriphosphaten synthetisiert (Blehschmidt, 1999). Dazu lässt man Mikroorganismen wie *Methylophilus Methylophilus* oder *Escherichia Coli* in Nährmedien wachsen, die die geeigneten Isotopenquellen –  $^{13}\text{C}$ -Glukose,  $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$  bzw.  $\text{D}_2\text{O}$  - enthalten. Durch präparativen Verdau können die markierten Nucleosidmonophosphate und Desoxynucleosidmonophosphate isoliert werden. Mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Systems werden die Monophosphate zu den korrespondierenden Triphosphaten phosphory-

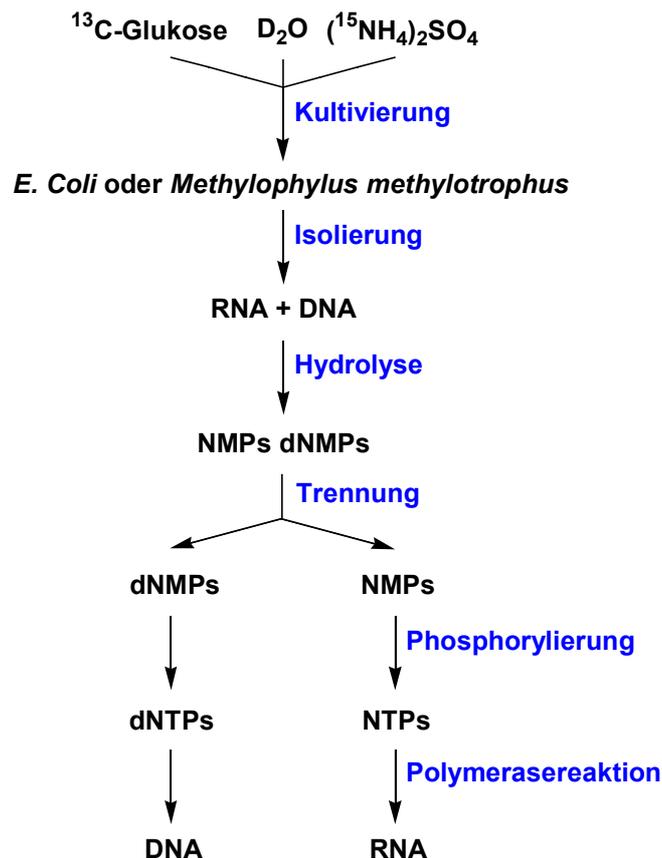
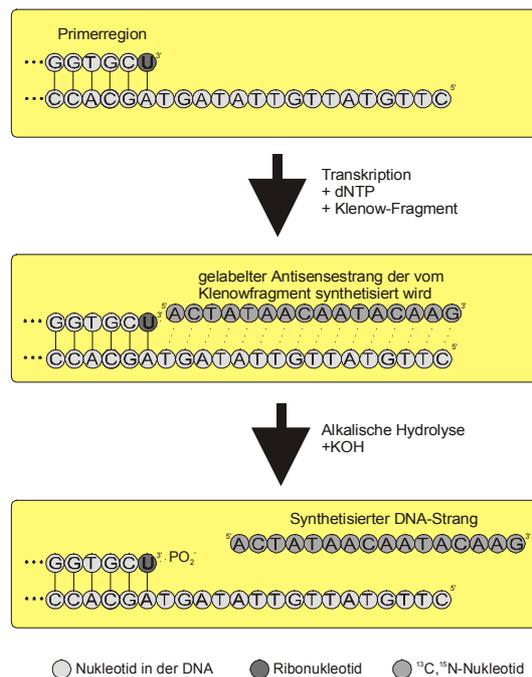


Abbildung 1.5: Die bei der biochemischen Synthese von Oligonukleotiden benötigten Nucleosidtriphosphate werden durch Kultivierung von *E. Coli* oder *Methylophilus Methylophilus methylotrophus* erhalten. Nach Isolierung der DNA und RNA, erfolgt die Hydrolyse zu den Nucleosidmonophosphaten bzw. Desoxynucleosidmonophosphaten. Diese werden voneinander getrennt und enzymatisch zu den Triphosphaten phosphoryliert. Mit Hilfe von Polymerasen können schließlich die Oligonukleotide synthetisiert werden.

liert. Aus den Triphosphaten wird mit Hilfe der Polymerasen die DNA bzw. die RNA transkribiert.

Bei der RNA-Synthese verwendet man üblicherweise die T7-RNA-Polymerase, die die RNA aus den Nucleosidtriphosphaten mit Hilfe einer DNA-Matrize mit dem spezifischen T7-Promotor transkribiert.

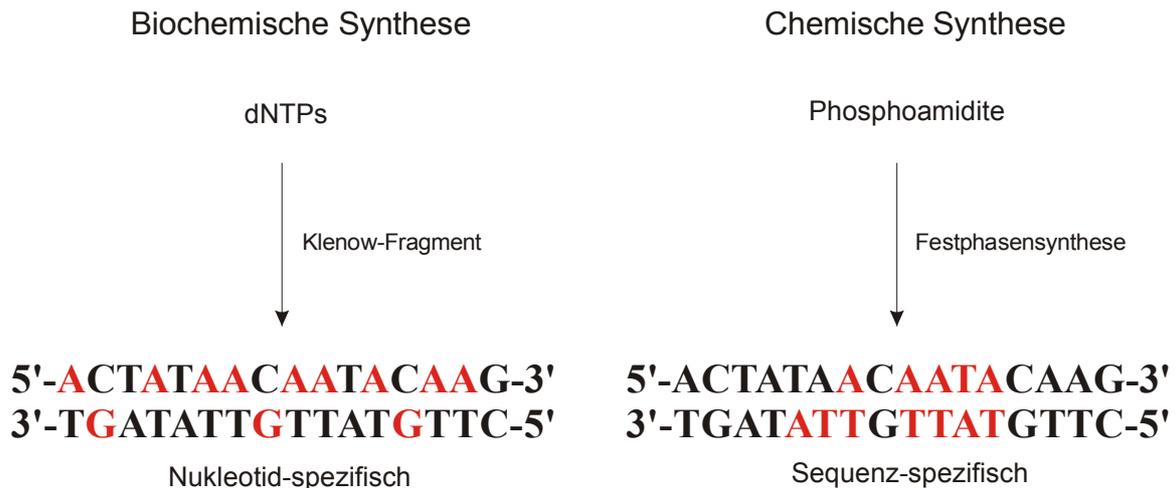
Für die Synthese der DNA aus den Desoxynucleosidtriphosphaten stehen mehrere Enzyme zur Auswahl. Die wichtigsten sind die Taq-Polymerase, die T7-DNA-Polymerase und das Klenow-Fragment der Polymerase I, das den Vorteil einer geringen Fehlerquote besitzt (Klenow, 1970; Zimmer, 1995; Louis et al., 1998; Blechschmidt, 1999).



**Abbildung 1.6: Prinzip der Synthese von DNA-Oligonukleotiden mit dem Klenow-Fragment und einem Primer mit einem Ribonukleotid am 3'-Terminus; Oben: Darstellung der Matrize; Mitte: Durch Transkription mit dem Klenow-Fragment entsteht ein „aufgefüllter Doppelstrang“, Unten: durch alkalische Hydrolyse wird das Zielmolekül als Einzelstrang erhalten.**

Die DNA wird an einer Matrize synthetisiert, die neben einem doppelsträngigen Teil, der als Primer für die Polymerase dient, einen einzelsträngigen Teil besitzt, der die komplementäre Sequenz der gewünschten Zielsequenz besitzt. Die Polymerase ergänzt diesen Teil mit Hilfe der Desoxynukleosidtriphosphate zu dem Doppelstrang und synthetisiert so die gewünschte Sequenz. Wenn das Klenow-Fragment verwendet wird, ist am Ende des Primers ein RNA-Nukleotid. Durch einen alkalischen Abbau kann die Phosphordiesterbindung zwischen dem Ribonukleotid und dem ersten ansynthetisierten Nukleotid gespalten werden, wodurch man das gewünschte isotopenmarkierte Oligonukleotid erhält. Bei den anderen Polymerasen kann die Zielsequenz durch Restriktionsenzyme vom Primer abgetrennt werden. Die unmarkierte Matrize muß dann chromatographisch abgetrennt werden.

Die Markierung erfolgt bei der biochemischen Methode Nukleotid-spezifisch. Innerhalb eines Oligonukleotids sind alle Nukleotide eines Typs bei Einsatz der isotopenmarkierten Nukleosidtriphosphate entsprechend markiert.



**Abbildung 1.7: Vergleich der Markierungsmuster von DNA durch biochemische und durch chemische Synthese. Die biochemische Synthese ermöglicht nur eine Nukleotid-spezifische Markierung: alle Nukleotide eines Typs sind innerhalb eines Einzelstrangs markiert. Die chemische Synthese ermöglicht hingegen eine Sequenz-spezifische Markierung.**

Bei der chemischen Synthese wird das Oligonukleotid aus den geeigneten Monomeren durch eine Festphasensynthese an einem vollautomatischen Synthesizer gewonnen. Als Monomerbausteine dienen dabei Phosphoamidite, das sind Nukleosidderivate, die zu dem gewünschten Oligonukleotid zusammen gekoppelt werden. Durch Verwendung von isotopenmarkierten Phosphoamiditen, die in einer mehrstufigen Synthese aus den entsprechend isotopenmarkierten Nukleosiden synthetisiert werden können, ist eine Isotopenmarkierung der Oligonukleotide möglich. Ausgangsstoff der Synthese ist in der Regel  $^{13}\text{C}$ -markierte Glukose **1**, die, nachdem sie in einer mehrstufigen Synthese in Ribose **6** überführt wurde, mit der Base zum Nukleosid **16** glykosyliert wird. Aus diesen ribosyl markierten Bausteinen können die RNA-Phosphoamidite für eine RNA synthetisieren werden, deren Backbone  $^{13}\text{C}$ -markiert ist. Es können auch biochemisch gewonnene Nukleotide eingesetzt werden, bei denen - im Gegensatz zu den aus Glukose gewonnenen Nukleosiden - nicht nur die Ribose, sondern auch die Base isotopenmarkiert ist.

Für die chemische Synthese von DNA müssen die Nukleoside **16** durch eine Deoxygenierung zu Desoxynukleosiden **20** verarbeitet werden, bei der die 2'-OH-Gruppe selektiv abgespalten wird. Die Desoxynukleoside können dann zu den DNA-Phosphoamiditen **22** funktionalisiert werden.

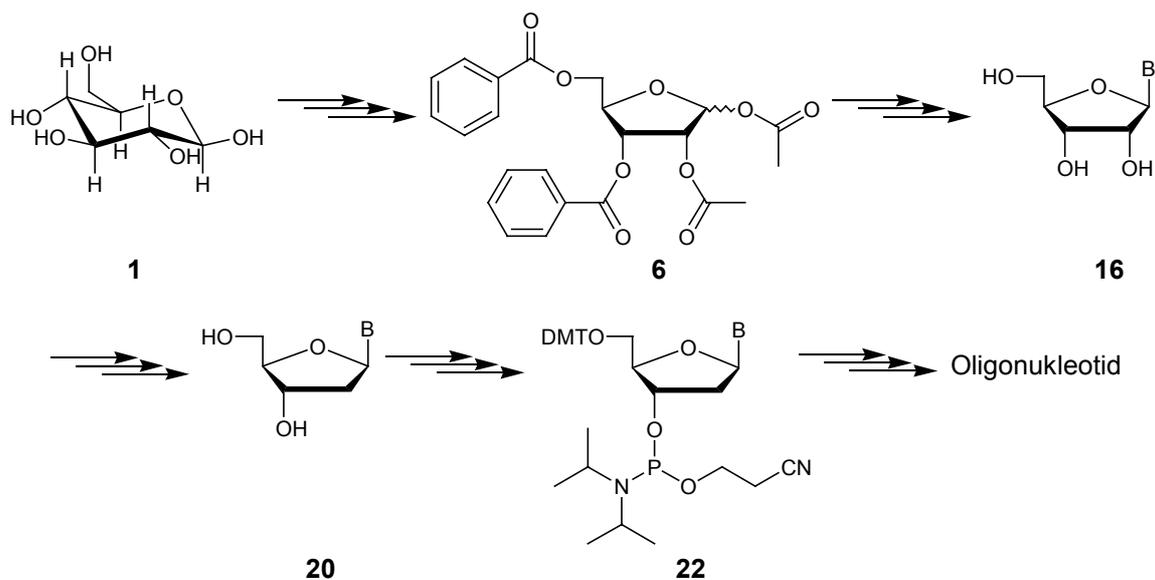
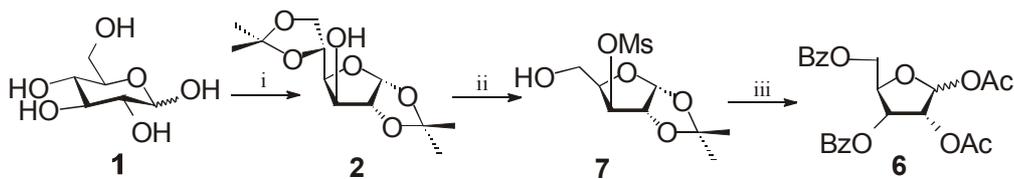


Abbildung 1.8.: Schema der chemischen Synthese von DNA ausgehend von Glukose: Die Glukose 1 wird in Ribose 6 überführt, worauf die Kopplung mit der Base zum Nukleosid 16 erfolgen kann. Nach der Deoxygenierung zum Desoxynukleosid 20 kann die Funktionalisierung zum Phosphoamidit erfolgen. Die Phosphoamidite 22 werden in der Festphasensynthese zum Oligonukleotid verknüpft.

Die chemische Methode bietet den großen Vorteil, daß das Markierungsmuster beliebig gewählt werden kann. Somit kann die Isotopenmarkierung Sequenz-spezifisch eingeführt werden. Voraussetzung ist allerdings, daß die entsprechenden DNA-Bausteine vorhanden sind. Da für jeden Nukleotidtyp eine eigene Synthese nötig ist, kann bei Oligomeren, bei denen mehrere Nukleotidtypen markiert sein sollen der synthetische Aufwand leicht sehr groß werden. Hier ist die biochemische Methode sinnvoller, bei der in einem Oligonukleotid jeweils alle Nukleotide eines Typs markiert sind, wenn das entsprechende Desoxynukleosidtriphosphat eingesetzt wurde. Da man alle Desoxynukleosidtriphosphate zugleich synthetisieren kann, ist der biochemische Ansatz bei Oligonukleotiden, die vollständig markiert sein sollen, im Vorteil.

## 1.2 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes der Arbeitsgruppen von Prof. Griesinger, Frankfurt und Prof. Schwalbe vom Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA, zur Ausarbeitung von Synthesewegen von isotopenmarkierten Oligonukleotiden, bei dem sowohl biochemische als auch chemische Methoden untersucht werden. Die biochemische Synthese isotopenmarkierter DNA und RNA wurde von Dr. Dierk Blechschmidt ausgearbeitet (Blechschmidt, 1999). Die Arbeiten an der chemischen Synthese von Oligonukleotiden begannen mit der Synthese von  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose ausgehend von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose, die Dr. Stefanie Quant im Rahmen ihrer Promotion erarbeitet hat (Quant et al., 1994; Quant, 1997). Die Synthese der DNA-Phosphoamidite wurde bei den Pyrimidinen von Dr. Valentin Wittmann begonnen, der die Synthese des Thymidin-Phosphoamidits entwickelt und auch mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Material ausgeführt hat. Die Synthese des Desoxycytosin-Phosphoamidits wurde von ihm ebenfalls begonnen, konnte aber nicht zu Ende geführt werden. Seine Arbeiten wurden von Christian von der Heyden weitergeführt (von der Heyden, 1996).



**Abbildung 1.9: Synthese der  $^{13}\text{C}$ -markierten Ribose von Dr. Stefanie Quant:**  
 i:  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Aceton; ii: 1. Methansulfochlorid ( $\text{MsCl}$ ), DMAP,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 2.  $\text{HCl}$  2N, Methanol; 3.  $\text{NaIO}_4$ , Wasser/ $\text{NaBH}_4$ , Ethanol; iii: 1. Benzoylchlorid ( $\text{BzCl}$ ), DMAP, Pyridin; 2.  $\text{AcOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaOAc}$ ; 3. Tetrabutylammoniumbenzoat, Toluol/Wasser;

Bei den Purinen hat Dr. Rainer Wechselberger an der Synthese des Desoxyadenosin-Phosphoamidits gearbeitet. Er hat auch eine Synthese von ribosyl  $^{13}\text{C}$ -markierten Desoxyadenosin begonnen, konnte sie aber nicht zu Ende führen, da die Planung der kompletten Synthese noch nicht abgeschlossen war.

Die bis dahin noch völlig unbearbeitete Synthese des Desoxyguanosin-Phosphoamidits wurde in der vorhergehenden Diplomarbeit angegangen (Czech, 1996). Dabei konnte eine Synthese ausgearbeitet werden, die aus Zeitgründen und mangels einer geeigneten Anwendung nicht mit isotoopenmarkierten Material vollendet werden konnte. Der dabei ausgearbeitete Weg war sowohl auf die Synthese von ribosyl  $^{13}\text{C}$ -markierten DNA-Bausteinen, als auch auf die Verwendung von biochemisch gewonnenen vollständig  $^{15}\text{N}$ -markierten Guanosen optimiert, da im Rahmen einer Kooperation mit der Fa. Cambridge Isotope Laboratories CIL, Andover, Mas. 700mg  $^{15}\text{N}_5$ -markiertes Guanosen zur Verfügung stand, das zu Desoxyguanosin deoxygeniert wurde.

Unter Berücksichtigung der vorhergehenden Arbeiten soll für die Purine die Synthese von ribosyl markierten DNA-Phosphoamiditen untersucht und weiter optimiert werden. Die Ergebnisse der Arbeiten sind in den Kapiteln 2-4 dargestellt.

Mit Hilfe der isotoopenmarkierten DNA-Bausteine soll die Ziel-DNA von mSox5 im Bereich der Bindungsstelle der HMG-Box des Proteins ribosyl  $^{13}\text{C}$ -markiert werden. Dadurch wird die genaue Untersuchung der Struktur der komplexierten DNA durch NMR-Spektroskopie ermöglicht. Die Strukturaufklärung der DNA ist ein Bestandteil der NMR-Spektroskopischen Untersuchung des mSox5-Protein-DNA-Komplexes. Das Projekt wird im Rahmen einer internationalen Kooperation zusammen mit der Gruppe von Colyn Crane-Robinson an der Universität Portsmouth, England, und Prof. Harald Schwalbe vom Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA, durchgeführt. Die Untersuchung des Proteins im Komplex bleibt dabei der Gruppe aus Portsmouth vorbehalten. In den Kapiteln 6-8 werden neben einer allgemeinen Einführung zu der Familie der SOX-Proteine die Arbeiten an der freien und der komplexierten mSox5-DNA und deren Ergebnisse umfassend beschrieben.

Ein grundlegendes Problem bei der NMR-Spektroskopie an großen Molekülen ist die Relaxation der Magnetisierung. Durch Deuterierung der Proben kann diese deutlich reduziert werden. Deswegen soll eine neuer Weg zur Synthese vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose ausgehend von  $^{13}\text{C}_6$ -Glukose untersucht werden. Ziel der Synthese ist es, durch Deuterierung der Ribose an einzelnen Positionen die Relaxationseigenschaften der daraus zu synthetisierenden DNA zu verbessern. Dabei soll keine voll-

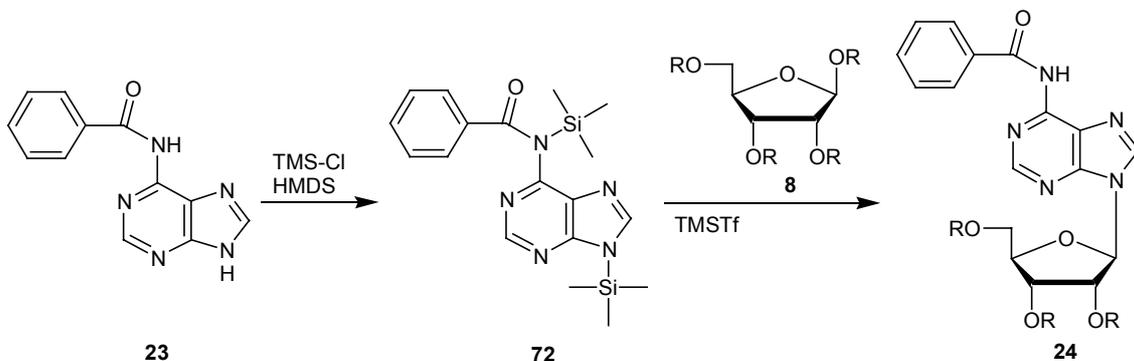
ständige Deuterierung der Ribose der DNA durchgeführt werden, sondern es soll ein Markierungsmuster gefunden werden, das mit begrenzten Aufwand im Rahmen der Synthese der Ribose eingeführt werden kann. Angesichts der hohen Kosten von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose ist dabei die Ausbeute, mit der die Synthese durchgeführt werden kann, ein maßgebliches Kriterium. Die Ergebnisse der Arbeiten sind in Kapitel 5 erläutert.

## 2 Glykosylierung der Nukleoside

Die Glykosylierung, also die Kopplung von Ribose und Base ist der Schlüsselschritt zur chemischen Synthese von Nukleotiden. Mit der 1984 von Dudycz und Wright veröffentlichten Eintopfsynthese hat sie sich zu einer gut durchführbaren Reaktion entwickelt. Dudyczs Vorschrift ist die zuletzt entwickelte Variante der Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion. Namensgeber der Reaktion waren G. E. Hilbert und T. B. Johnson (Hilbert et al., 1930), denen Anfang der 30er Jahre erstmals die selektive Alkylierung von 2,6-Dimethoxypyrimidin durch Methyljodid zu *N*-1-Methyl-2,6-Dimethoxypyrimidin gelang und die später auch eine Synthese von Glucosido-Uracil, ausgehend von Acetobromoglucose und 2,6-Dimethoxypyrimidin erarbeiteten.

Aufbauend auf den Arbeiten von B. R. Baker, der erstmals Friedel-Crafts-Katalysatoren zur Glykosylierung eingesetzt hat und auf L. Birkofers (Birkhofer et al., 1960) Erkenntnis, daß Stickstoff-haltige Heterocyklen wie Imidazol N-trialkylsilyliert eine höhere Reaktivität als die unsubstituierten Heterozyklen aufweisen, hat H. Vorbrüggen die Glykosylierung von Beginn der 70er Jahre an ständig weiterentwickelt (Niedballa et al., 1974). Vorbrüggen verwendete silylierte Pyrimidin-Basen und vollacylierte Kohlenhydrate zur Synthese von Pyrimidinnukleosiden. Für die Purinbasen hat F. W. Lichtenthaler (Lichtenthaler et al., 1974) die Bedingungen optimiert.

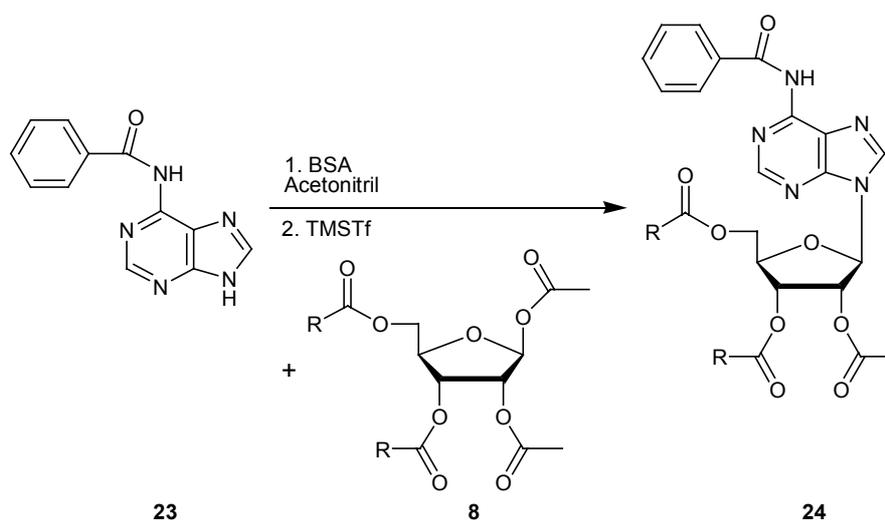
Bei der Vorbrüggen-Glykosylierung wird zuerst die Base mit Trimethylsilylchlorid TMS-Cl und Hexamethyldisilazan HMDS silyliert, worauf in der zweiten Stufe die Glykosylierung mit der geschützten Ribose stattfindet (siehe Abb. 2.1) Zunächst verwendete Vorbrüggen SnCl<sub>4</sub> als Katalysator, bevor er 1975 Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure TMS-Triflat als Friedel-Crafts-Katalysator bei Glykosylierungen einführte (Vorbrüggen et al., 1975; Vorbrueggen et al., 1981b). Damit waren erstmals Glykosylierungen mit hohen Ausbeuten von 75% möglich.



**Abbildung 2.1:** Bei der Vorbrüggen-Glykosylierung muß die silylierte Base 72 aufgearbeitet werden, da die Silylierungsmittel bei der Kopplung mit der Ribose 8 stören. Die Kopplung der Base mit der Ribose erfolgt deshalb in einer getrennten zweiten Stufe. Als Lösungsmittel wird Dichlorethan oder Acetonitril verwendet

Problematisch ist bei der Vorbrüggen-Glykosylierung, daß die Silylierungsmittel vor der eigentlichen Glykosylierung entfernt werden müssen, da sie den Katalysator inaktivieren. Die Entfernung erfolgt im Vakuum, wobei Reste des Silylierungsmittel

durch mehrmaliges Coevaporieren mit Toluol entfernt werden. Da die silylierten Basen äußerst feuchtigkeitsempfindlich sind, können die Ausbeuten durch eingeschleppte Feuchtigkeit stark sinken. Die dadurch notwendigen Gegenmaßnahmen – trockene Lösungsmittel, Schutzgasatmosphäre, äußerst sorgfältige Arbeitsweise – machen die Durchführung der Reaktion wesentlich aufwendiger und schwieriger. Eine Alternative zu den von Vorbrüggen verwendeten Silylierungsmitteln stellt *N*-O-Bis(trimethylsilyl)acetamid BSA dar, bei dessen Verwendung Trimethylsilylacetamid und Acetamid als Nebenprodukte entstehen. Beide stören bei der Glykosylierung nicht, wodurch eine Aufreinigung der silylierten Base entfällt. BSA wurde erstmals Ende der 70er Jahre von F. Eckstein (Imazawa, 1978, 1979) in der Nukleosidchemie verwendet, der damit Transglykosylierungen durchführte, bei denen Pyrimidinbasen eines Nukleosids gegen Purinbasen ausgetauscht werden.



**Abbildung 2.2:** Reaktionsschema der Glykosylierung nach Dudycz am Beispiel von Adenosin. Die Reaktion kann als Eintopfreaktion erfolgen, da das Silylierungsmittel nach der 1. Stufe nicht entfernt werden muß. R = Benzoyl bzw. Acetyl.

Die Glykosylierung unter Verwendung von BSA wurde 1984 von Dudycz und Wright (Dudycz et al., 1984; Wright et al., 1984) veröffentlicht. Die Silylierung der Base erfolgt mit BSA, das ein sehr starkes Silylierungsmittel ist, innerhalb weniger Minuten in der Siedehitze. Da keine störenden Nebenprodukte entstehen, muß vor der eigentlichen Glykosylierung keine Aufreinigung erfolgen. Der in abs. Acetonitril gelöste Zucker und das TMS-Triflat können direkt nach der Silylierung zu der Reaktionslösung zugegeben werden, wodurch die Reaktion als Eintopfreaktion durchge-

führt werden kann. Sollte dennoch Feuchtigkeit eingeschleppt werden, kann sie mit dem verbliebenen BSA bzw. MSA abreagieren. Ebenso kann abreagiertes TMS-Triflat von BSA erneut silyliert werden. Die Gefahr der Desilylierung konnte so beseitigt werden, wodurch die Durchführung der Glykosylierung wesentlich vereinfacht wurde.

Der Mechanismus der Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion wurde für Purine mehrfach untersucht (Watanabe et al., 1974; Vorbrüggen et al., 1981a). Vorbrüggen hat bei seinen Arbeiten am Beispiel des *N*-6-Benzoyl-Adenosins festgestellt, daß drei Prozesse gleichzeitig ablaufen: die Bildung des elektrophilen Zuckerkations **71**, die  $\sigma$ -Komplexbildung zwischen der silylierten Base **72** und dem Friedel-Crafts-Katalysator und die Reaktion des elektrophilen Zuckerkations **71** mit der silylierten Base zum Nucleosid.

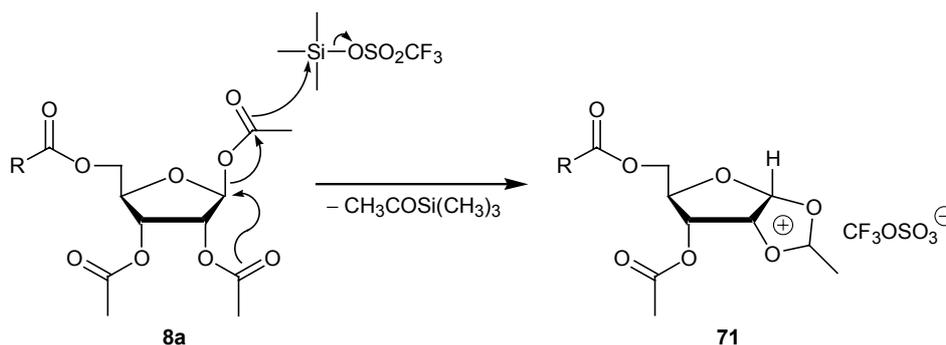


Abbildung 2.3: Bildung des Zuckerkations **71**.

Der Zucker **8a** bildet, wie in Abb. 2.3 gezeigt wird, mit dem Katalysator durch Abspaltung der Acetyl-Gruppe an der C-1-Position ein Zuckerkation **71**, das von der silylierten Base nur von der Oberseite, also der  $\beta$ -Seite angegriffen werden kann. Deshalb entstehen nach der 1954 von B. R. Baker (Baker, 1954) aufgestellten und nach ihm benannten Baker-Regel bei Anwesenheit von Acylgruppen an der 2'-Position stereoselektiv nur die  $\beta$ -Glykoside.

Vorbrüggen postuliert, wie in Abb. 2.4 dargestellt wird, die Bildung eines  $\sigma$ -Komplex **73** aus der silylierten Base **72** und dem Katalysator TMS-Triflat, der in die Verbindung **74** übergeht. Diese kann an verschiedenen Positionen glykosyliert werden. Es entstehen daher neben dem erwünschten *N*-9-Nucleosid **76** verschiedene Isomere **75**

und 77, die zum Teil während der Reaktion zu der Zielverbindung 76 isomerisieren. Setzt man die Base im Überschuß ein, ist nach einer halben Stunde in der DC-Kontrolle keine freie Ribose mehr nachweisbar. Die lange Reaktionsdauer von bis zu acht Stunden ist allein für die Isomerisierung der fehlgebundenen Isomere nötig. Der Reaktionsverlauf kann dabei in der DC-Kontrolle verfolgt werden.

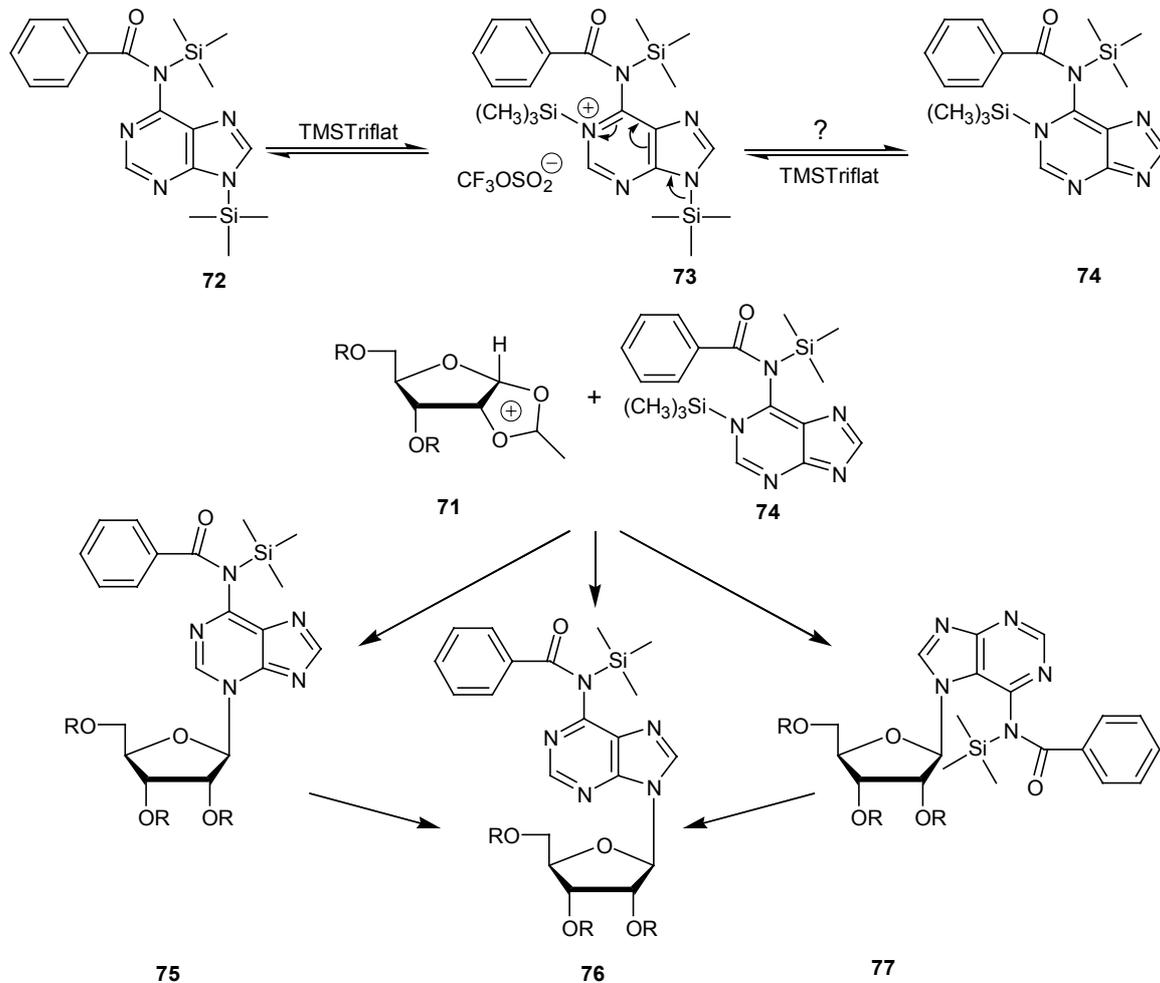


Abbildung 2.4: Vorbrüggen postuliert die Bildung eines *N*-1-silylierten Intermediats 74, das mit dem Zuckerkation 71 zum einen direkt zu dem gewünschten Nukleosid 76 reagiert. Zum Teil entstehen zuerst die Regioisomeren 75 und 77, die zu der Zielverbindung 76 weiterreagieren können.

Dudycz hat bei der Glykosylierung von Guanosin die gebildeten Isomere im zeitlichen Verlauf der Reaktion untersucht. Dabei konnte er unter anderem die Bildung eines doppelt glykosylierten Guanosins nachweisen. Deswegen ginge die Glykosylierung von Guanosin zunächst über ein an der *N*-9-Position glykosyliertes Interme-

diat, das im Laufe der Reaktion über die zweite Glykosylierung an der *N*-7-Position und der Abspaltung der Ribose von der *N*-9-Position in die gewünschte *N*-7-glykosylierte Verbindung übergeht.

## 2.1 Durchführung der Synthesen

Für die Synthese der Purin-Nukleoside wurde ausschließlich die Methode von Dudydz und Wright verwendet. Dazu werden die geschützten Basen, *N*-2-Acetylguanin **34** bzw. *N*-6-Benzoyladenin **23** in Acetonitril suspendiert und binnen 10 Minuten mit zwei bzw. mit drei Äquivalenten BSA silyliert. Nach Zugabe des in Acetonitril gelösten Ribosebausteins und des als Friedel-Crafts-Katalysator dienenden TMS-Triflats, wird noch 6 Stunden refluxiert. In der DC-Kontrolle ist bereits nach 15 Minuten keine freie Ribose mehr detektierbar. Statt dessen kann man bei der Guanosin-Synthese das Produkt sowie ein Nebenprodukt erkennen, das während

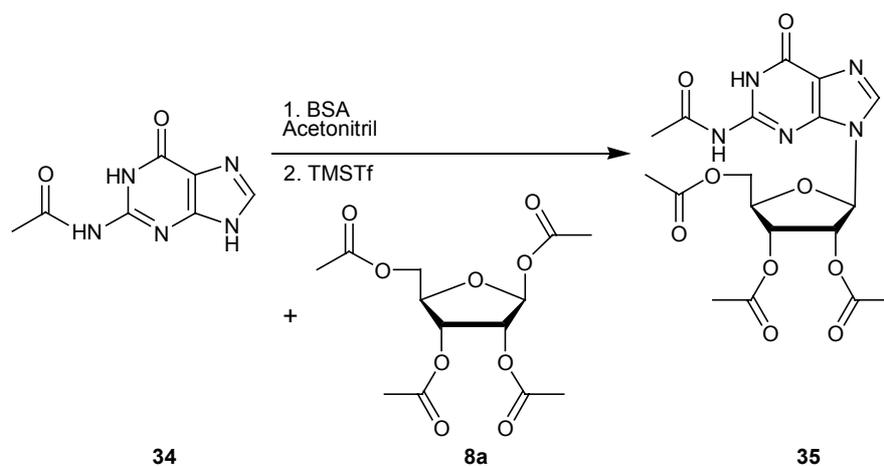


Abbildung 2.5: Glykosylierung von acylgeschütztem Guanosen **35**

der Reaktionszeit aber weitgehend abgebaut wird. Bei der Synthese von Adenosin kann man in der DC-Kontrolle neben dem Produkt noch zwei Nebenprodukte erkennen. Im Gegensatz zu der Glykosylierung von Guanosen kommt es aber nur zu einem unvollständigem Abbau der Nebenprodukte. Ein im DC-Chromatogram tiefer als das Produkt laufendes Nebenprodukt wird auch nach einer verlängerten Reaktionsdauer nicht vollständig abgebaut. Es kann durch Flashchromatographie abge-

trennt werden. Sein Anteil im Rohprodukt beträgt unter 10%. Die Glykosylierung des vollgeschützten Adenosins **24** läuft gewohnheitsgemäß mit einer Ausbeute von ca. 87%. Vollgeschütztes Guanosin **35** ist durch Glykosylierung in einer Ausbeute von 85% erhältlich.

## 2.2 Entschützung der Nucleoside

Die Abspaltung der Schutzgruppen wird je nach Nucleotid verschieden durchgeführt. Bei Adenosin ist eine Teilentschützung unter Verbleib der exozyklischen Basenschutzgruppe wünschenswert. Wie in Kapitel 4 erläutert wird, muß die Base im fertigen Phosphoamidit durch eine Benzoylgruppe geschützt sein.

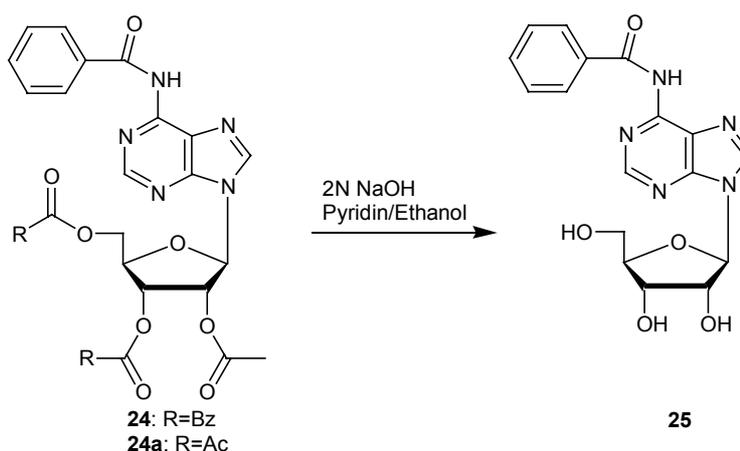


Abbildung 2.6: Basenkatalysierte Vollentschützung des acylgeschützten Guanosins **35** mit Hilfe von methanolischem Ammoniak

Auch bei Guanosin ist die Base im Phosphoamidit geschützt. Die bereits an der N-2-Position vorhandene Acetylgruppe ist eine der möglichen Schutzgruppen. Allerdings stört die Acetylgruppe bei den dazwischenliegenden Schritten der Deoxygenierung. Deshalb muß hier eine Vollentschützung des acylisch geschützten Guanosins **35** zum freien Guanosin **36** erfolgen (siehe Abb. 2.6). Diese wird basenkatalysiert über Nacht bei Raumtemperatur mit einer 2 M methanolischen Ammoniaklösung durchgeführt. Die Ammoniaklösung wird unter Vakuum abgezogen, wodurch man

ein Rohprodukt erhält, das für den nächsten Syntheseschritt von ausreichender Reinheit ist. Eine Quantifizierung der Ausbeute ist nicht möglich, da in Folge der geringen Löslichkeit eine Aufreinigung nur mit deutlichen Verlusten durchzuführen ist. Bei Verwendung des Rohprodukts in den nachfolgenden Reaktionen der Deoxygenierung zeigen sich allerdings in der Ausbeute nur geringe Unterschiede zu kommerziell erhältlichen Guanosin, so daß von einer nahezu quantitativen Ausbeute ausgegangen werden kann.

Die Teilentschützung zum *N*-6-Benzoyl-Adenosin **25** erfordert besonders bei Verwendung von 3',5'-benzoylgeschützter Ribose **8** bei der Glykosylierung mehr Feingefühl, da es ansonsten auch zu einer Entschützung der Base kommen kann. Die Verseifung der Ester wird deshalb mit 2 N NaOH-Lösung bei 0°C durchgeführt. Das vollgeschützte Nukleotid **24** wird dazu in einem Gemisch aus Pyridin/Ethanol gelöst. Acetylgruppen werden auf diese Weise innerhalb von 15 Minuten abgespalten.

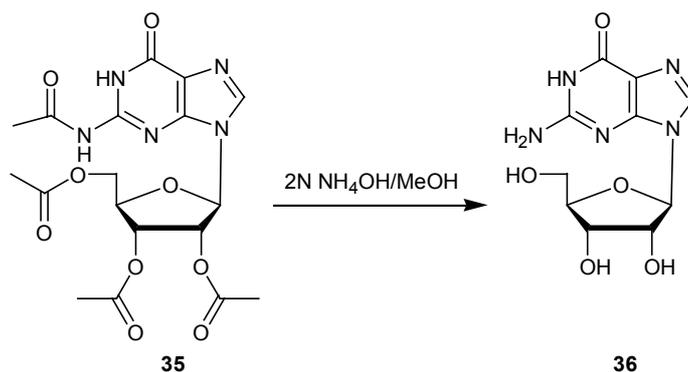
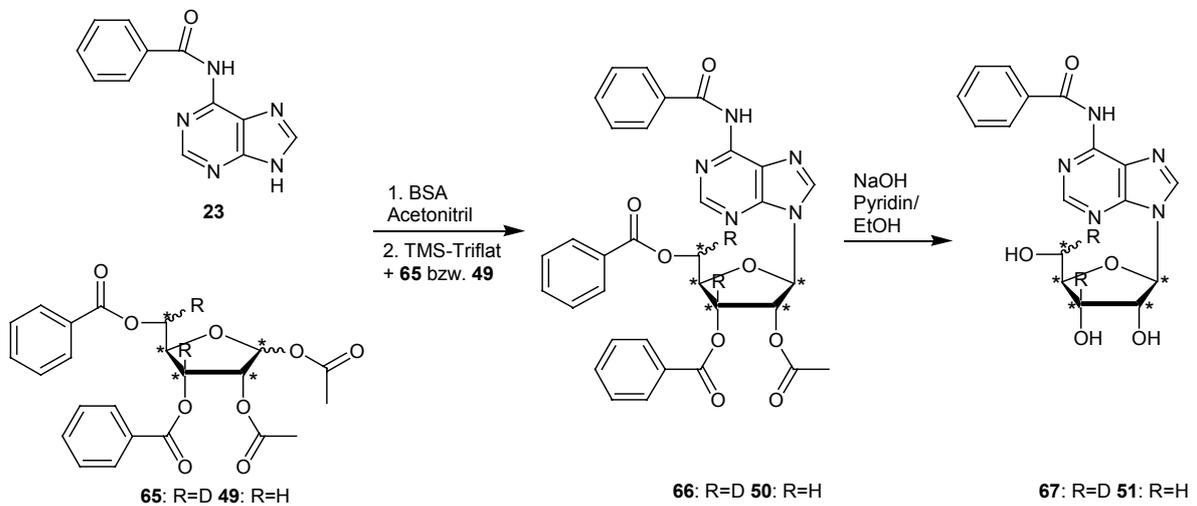


Abbildung 2.7: Teilentschützung von acylgeschütztem Adenosin zu *N*-6-Benzoyl-Adenosin. Je nach verwendeter Ribosequelle ist R= Benzoyl bzw. Acetyl. Bei ribosyl benzoylgeschütztem Adenosin dauert die Entschützung 35 Minuten statt 15 Minuten.

Verwendet man benzoylgeschützte Ribose, dauert die Entschützung auf Grund der erhöhten Stabilität der Benzoessäureester 35 Minuten. Das Benzoessäureamid an der exozyklischen Aminofunktion der Base ist unter den Bedingungen ausreichend stabil, daß es zu keiner Hydrolyse kommt. Die Reaktion wird durch Neutralisieren der Reaktionslösung mit Dowex 50 WX 8, einem saurem Ionentauscher gestoppt. Durch Lyophilisieren erhält man ein Rohprodukt, das für die darauf folgende Reaktion ausreichend sauber ist. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Produkts ist eine Auf-

reinigung mittels Flashchromatographie nur unter Verlusten möglich, daher wurde keine Quantifizierung der Ausbeute durchgeführt. Vergleicht man die Ausbeute bei der ersten Reaktionsstufe der Deoxygenierung des so erhaltenen *N*-6-Bz-Adenosin mit kommerziell erhältlichem Adenosin, kann man nur geringe Unterschiede feststellen, so daß man von einer nahezu quantitativen Ausbeute ausgehen kann.

### 2.3 Glykosylierungen mit isotoopenmarkierter Ribose



**Abbildung 2.8:**  $^{13}\text{C}_5$ -markiertes Adenosin wurde mit und ohne Deuterierung ausgehend von der entsprechenden  $^{13}\text{C}_5$ -markierter Ribose hergestellt. Die Schutzgruppen an der Riboseinheit des Adenosins wurden durch selektive Teilentschützung mit 2N NaOH abgespalten.

Die Glykosylierungen wurden nach der erfolgreichen Untersuchung mit unmarkierter Ribose mit  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose durchgeführt. Dabei wurde sowohl die  $^{13}\text{C}_5$ -markierte Ribose **49** von Dr. Stefanie Quant, als auch die im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellte  $^{13}\text{C}_5$ -markierte und zweifach deuterierte  $^{13}\text{C}_5$ -D<sub>2</sub>-Ribose **65** verwendet (siehe Abbildung 2.8). Als Base wurde dabei immer *N*-6-Bz-Adenin an die Ribose gekoppelt. Ribosyl isotoopenmarkiertes Guanosin wurde nicht hergestellt, da bislang kein Bedarf dafür bestand.

## 2 Glykosylierung der Nukleoside

Bei der Synthese des vollgeschützten Adenosins erzielten Ausbeuten lagen mit 80-90% im Rahmen der üblichen Werte. Es konnten keine Unterschiede zu Glykosylierungen mit unmarkierter Ribose festgestellt werden. Dies gilt sowohl im Vergleich zu der kommerziell erhältlichen Tetra-*O*-Acetyl-Ribose **8a**, als auch im Vergleich zu der selbst hergestellten nicht  $^{13}\text{C}$ -markierten zweifach deuterierten 3,5-Di-*O*-Benzoyl-1,2-*O*-acetyl-3,5- $\text{D}_2$ -Ribose **6**, die im Rahmen der Optimierung der Synthese  $^{13}\text{C}$ -markierter zweifach deuterierter Ribose **65** anfiel. Das isotonenmarkierte Adenosin **50** bzw. **66** wurde auf die übliche Weise mit 2 N NaOH teilentschützt.

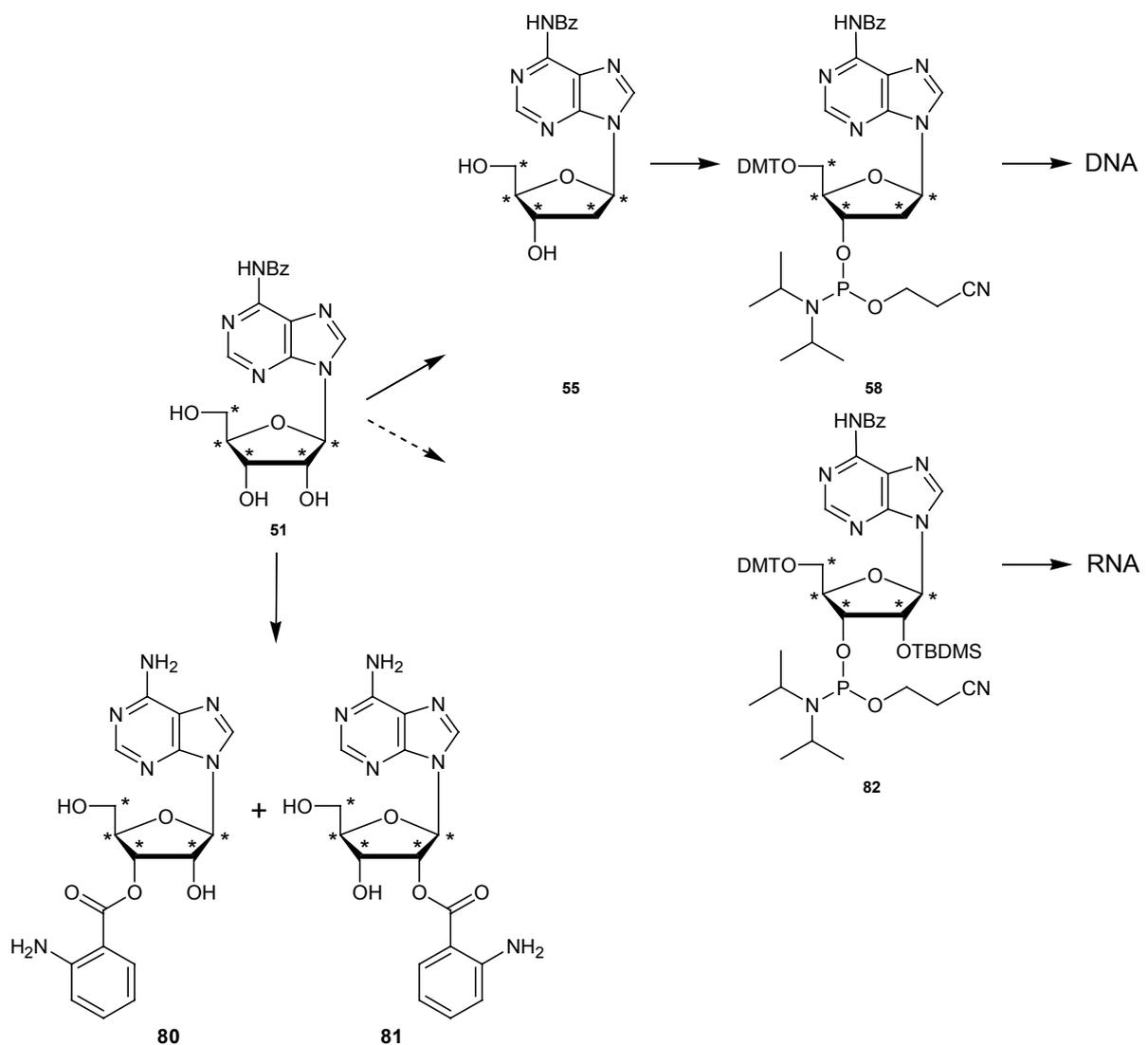


Abbildung 2.9: Das  $^{13}\text{C}_5$ -N-6-Bz-Adenosin **51** wurde in zur Synthese von  $^{13}\text{C}$ -markierter DNA verwendet. Weiterhin soll es zur Synthese von  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA verwendet werden. In Form von Anthraniloyl-Adenosin **80** bzw.- **81** konnte es als RNA-Mimetikum genutzt werden.

Das  $^{13}\text{C}_5$ -*N*-6-Bz-Adenosin **51** war Ausgangspunkt für verschiedene Synthesen (siehe Abbildung 2.9). Hauptsächlich wurde es nach der Deoxygenierung zum Desoxyadenosin zum DNA-Phosphoamidit funktionalisiert (siehe Kapitel 3 und 4) Das  $^{13}\text{C}$ -markierte Phosphoamidit wurde in den mSox5-DNA-Duplex eingebaut (siehe Kapitel 7). Weiterhin wurde Herr Christian von der Heyden  $^{13}\text{C}$ -markiertes *N*-6-Bz-Adenosin **51** zur Darstellung des RNA-Phosphoamidits bereitgestellt.

Das zweifach deuterierte  $^{13}\text{C}_5$ -D<sub>2</sub>-*N*-6-Bz-Adenosin **67** soll ebenfalls zum Desoxyadenosin deoxygeniert werden, woraufhin die Funktionalisierung zum DNA-Phosphoamidit erfolgen kann.

### 2.4 $^{13}\text{C}_5$ -markiertes Anthraniloyl-Adenosin als tRNA-Mimetikum

Außerhalb der Synthese von Oligonukleotiden konnte  $^{13}\text{C}_5$ -markiertes Adenosin im Rahmen des Projektes zur Untersuchung der Transfer Kreuzkorrelierten Relaxation am Beispiel eines schwach an den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) gebundenen aminoacetylierten tRNA-Mimetikums eingesetzt werden (Carlomagno et al., 1999).

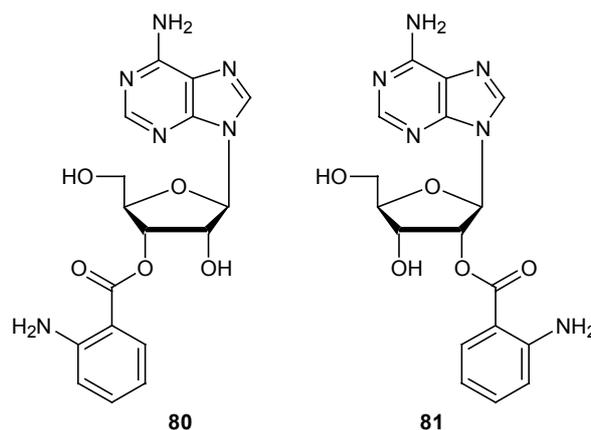
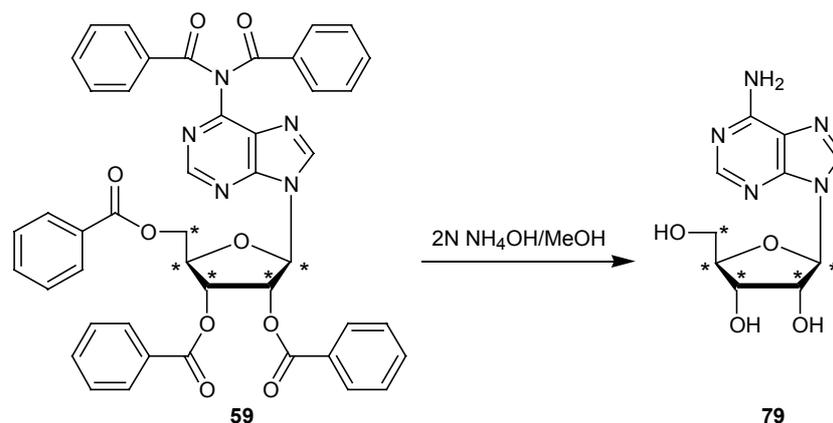


Abbildung 2.10: Das aus der Veresterung von Anthranilsäure und Adenosin erhältliche Anthraniloyl-Adenosin ist als tRNA-Mimetikum verwendbar.

In der Proteinbiosynthese muß die mit der spezifischen Aminosäure beladene tRNA an das Ribosom transportiert werden. Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) kontrolliert hierbei, daß nur die korrekt beladene tRNA, an deren terminalen Adenosin also an der 2'-oder 3'-Position die Aminosäure gebunden ist, an das Ribosom vordringen kann (Abrahams et al., 1990; Glocker et al., 1998). An die Bindungsstelle von EF-Tu kann nicht nur die aminoacetylierte tRNA binden, sondern auch ein Minimalmodell, das nur aus dem terminalen Adenosin, an dessen 2'-bzw. 3'-Position eine Aminosäure gebunden ist, besteht. Da die Esterbindung zwischen Aminosäuren und dem Adenosin labil ist, wird als hydrolysestabiles Aminosäureanalog die Anthranilsäure d. h. 2-Amino-Benzoessäure benutzt. (Limmer et al., 1997) Die Bindung von 2'-bzw. 3'-Anthraniloyl-Adenosin an EF-Tu ist so schwach, daß ein schneller Austausch zwischen der freien und der gebundenen Form stattfindet. Durch die  $^{13}\text{C}$ -Markie-



**Abbildung 2.11: Vollentschützung von perbenzoyliertem  $^{13}\text{C}_5$ markiertem Adenosin 59 zu  $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin 79 mit Hilfe von 2M methanolischem Ammoniak**

rung des Adenosins kann an dem Komplex von 2'-bzw. 3'-Anthraniloyl-Adenosin und EF-Tu die Transfer Kreuzkorrelierte Relaxation genutzt werden, um Projektionsrestraints zu erhalten, die als Parameter bei der Strukturberechnung genutzt werden können.

Damit ergibt sich eine weitere Anwendungsmöglichkeit von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Adenosin, für die perbenzoyliertes  $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin, das bei der Deoxygenierung von Adenosin zurückgewonnen wurde, verwendet wurde. Dazu wurde das perbenzoylierte  $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin über Nacht mit 2M methanolischer Ammoniak-Lösung vollentschützt.

Nach Abziehen des Lösungsmittel wurde ein Rohprodukt erhalten, das neben dem Produkt noch deutliche Spuren von Benzoesäure enthielt.

Die Aufreinigung wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel durchgeführt. Wegen der geringen Löslichkeit des Adenosins wurde das Rohprodukt in 2 ml Methanol gelöst, worauf 600 mg Kieselgel zu der Lösung zugegeben wurden. Nach Abziehen des Lösungsmittel unter Vakuum wurde das leicht feuchte Pulver auf die Flashsäule aufgetragen. Nachdem die Säule zur Entfernung der Benzoesäure mit Dichlormethan/Methanol 9/1 gespült wurde, konnte das Produkt mit Acetonitril/Wasser 4/1 eluiert werden. Erwartungsgemäß war die Aufreinigung mit großen Verlusten verbunden, da das Produkt bei dieser Methode nicht quantitativ eluiert werden kann. Deshalb betrug die Ausbeute an Adenosin nur 39%. Durch Auswertung des NMR-Spektrums konnte erkannt werden, daß das Produkt noch  $\frac{1}{2}$  Äquivalent Benzoesäure enthielt, das aber bei der nachfolgenden Umsetzung zum Anthraniloyl-Adenosin nicht stört. Die Umsetzung wurde von Josef Fischer an der Universität Bayreuth durchgeführt. Aus dem  $^{13}\text{C}_5$ -markierten Adenosin konnten 3 mg Anthraniloyl-Adenosin gewonnen werden.

Für die NMR-Spektroskopischen Messungen wurden verschiedene Proben angesetzt, die 0, 20 und 35  $\mu\text{M}$  EF-Tu in einer 1 mM Lösung von Anthraniloyl-Adenosin in  $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_4$ -Methanol enthielten. Wegen der begrenzten Haltbarkeit der Proben wurden diese jeweils für jede Messung frisch zubereitet. Die Ergebnisse der Messung der Transfer Kreuzkorrelierten Relaxation wurden 1999 im Journal of the American Chemical Society veröffentlicht (Carlomagno et al., 1999).

### 3 Deoxygenierung der Nukleoside

Die Deoxygenierung von Nukleosiden, also die Reduktion vom Nukleosid zum Desoxynukleosid wird üblicherweise nach der Methode von Robins und Hansske (Robins et al., 1983) durchgeführt. Wenn trotzdem häufig von der Barton-Deoxygenierung gesprochen wird, liegt das an der Tatsache, daß Bartons (Barton et al., 1975) allgemeine Methode zur radikalischen Deoxygenierung von Alkoholen von Robins und Hansske auf Nukleoside übertragen wurde.

Die Reaktionsfolge besteht aus 4 Schritten (siehe Abb. 3.1). Zunächst werden mit Hilfe der Markiewicz-Schutzgruppe die 3'- und die 5'-OH-Gruppe geschützt. An dem polyfunktionalen Nukleosid **17** ist damit nur noch die 2'-OH-Gruppe für die zweite Stufe reaktiv. Im zweiten Schritt wird unter Basenkatalyse mit Phenoxythiocarbonylchlorid PTC-Cl der Ester zwischen Phenoxythioameisensäure und dem

Nucleosid gebildet. In der dritten Stufe der Reaktionsfolge, der eigentlichen Deoxygenierung zum Desoxynucleosid **19**, wird der Ester in **18** mit Hilfe von Tributylzinnhydrid radikalisch gespalten, wobei das C2'-Atom hydriert wird. Mit der fluoridinduzierten Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe endet die Deoxygenierung.

Die Leistung von Robins und Hansske war es, die Bedingungen der Barton-Deoxygenierung unter Zuhilfenahme der Markiewicz-Schutzgruppe auf die Nucleoside zu übertragen. Auch die Verwendung von Phenoxythioameisensäure als Abgangsgruppe wurde von ihnen entwickelt, da die von Barton verwendeten Thionobenzonate bzw. zyklischen Thionocarbonate für die Deoxygenierung von Nucleosiden nicht geeignet waren.

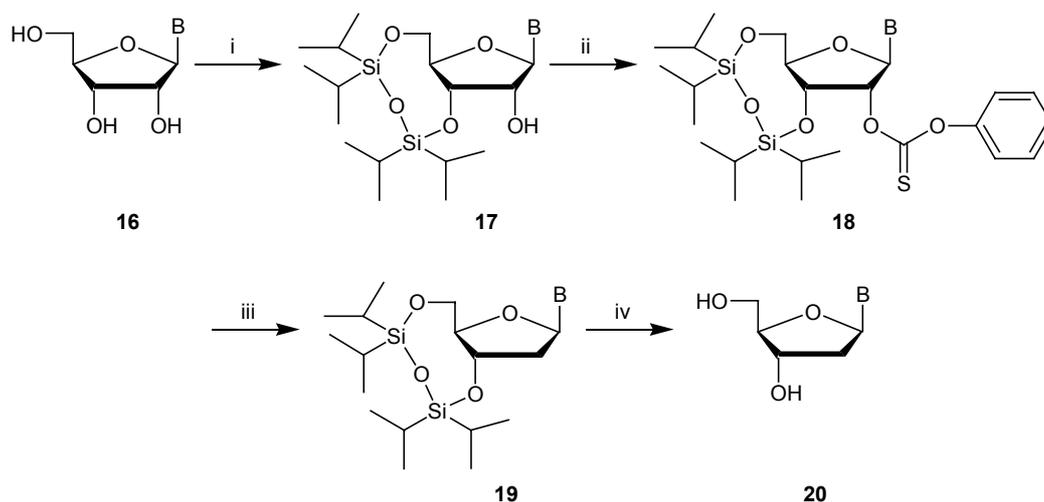
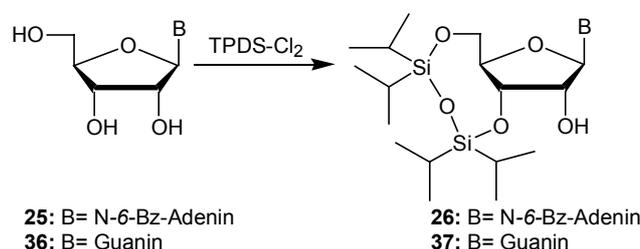


Abbildung 3.1: Schema der Deoxygenierung von Nucleosiden: i: Schützung der 3'-5'-Position, ii: Bildung des PTC-Esters an der 2'-Position, iii: Deoxygenierung zum Desoxynucleosid **19**, iv: Entschützung zum freien Desoxynucleosid **20**.

Robins und Hansske haben die freien Nucleoside eingesetzt, bei denen die exozyklischen Aminofunktionen ungeschützt waren. Für die Purinnucleoside wurde bereits im Rahmen der vorhergehenden Diplomarbeit die Möglichkeit der Verwendung der basengeschützten Nucleoside *N*-2-Ac-Guanosin **46** bzw. *N*-6-Bz-Adenosin **25** geprüft. Da der zeitliche Aufwand bei *N*-6-Bz-Adenosin für die Diplomarbeit zu groß war, konnten diese nicht zu Ende geführt werden. Deshalb wurden sie im Rahmen dieser Doktorarbeit fortgesetzt. Die dabei gewonnen Erkenntnisse wurden später

auch auf die Deoxygenierung von Guanosin übertragen, bei dem die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, daß *N*-2-Ac-Guanosin **46** als Ausgangspunkt für die Deoxygenierung ungeeignet ist. Auf die Gründe soll später noch genauer eingegangen werden.

#### 3.1.1 Schützung der 3'- und der 5'- Position



**Abbildung 3.2:** Durch die Kopplung mit der TPDS-Schutzgruppe werden die 3'- und die 5'-Position im Nucleosid blockiert. Die Reaktion läuft bei Adenosin in Pyridin ab, Guanosin muß in einem Gemisch aus DME/Pyridin geschützt werden

In der ersten Stufe der Deoxygenierung muß die Riboseeinheit des Nucleosids an der 3'- und der 5'- Position geschützt werden. Durch die 1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxangruppe TPDS, die W. T. J. Markiewicz 1979 (Markiewicz, 1979) entwickelt hat, werden zwei der drei Hydroxylgruppen blockiert. Das entsprechende Edukt ist 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan TPDS-Cl<sub>2</sub>. Die Regioselektivität wird durch die größere Reaktivität des primären Alkohols an der 5'-Position, die zunächst mit dem Disiloxan reagiert und der dann intramolekular ablaufenden Kopplung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und der zweiten reaktiven Gruppe des Disiloxans, erwirkt. Die Reaktion entspricht einer Zyklisierung, weshalb die Markiewicz-Gruppe auch als Silylhenkel bezeichnet wird. Eine Reaktion mit der 2'-Hydroxylgruppe kann aus sterischen Gründen nur stattfinden, wenn an der 3'-Position keine reaktive Gruppe vorhanden ist.

Kritisch ist bei der Reaktion eingeschleppte Feuchtigkeit, die mit dem TPDS-Cl<sub>2</sub> abreagieren kann. Typischerweise wird nur eine der beiden Chloridfunktionen hydrolysiert. Reagiert die zweite Chlorid-Funktion mit dem Nukleosid, führt dies zu unvollständig geschützten Nukleosiden. Diese können allerdings durch Abspaltung der Schutzgruppe mit TBAF/THF wieder recycelt werden. Durch Trocknen des Edukts im Exsikkator über Phosphorpentoxid bei 60°C, der Verwendung absoluten Pyridins als Lösungsmittel und der Durchführung der Reaktion unter Schutzgasatmosphäre, konnte der Anteil der teilgeschützten Nebenprodukte allerdings auf unter 5% minimiert werden. Aufgearbeitet wird die Reaktion durch Abziehen des Lösungsmittels und Ausschütteln des in Dichlormethan aufgenommenen Rückstands gegen 1M HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg und ges. NaCl-Lösung. Nebenprodukte können durch Flashchromatographie abgetrennt werden.

*N*-6-Benzoyl-Adenosin **25** kann wie ungeschütztes Adenosin nach dem Standardprotokoll in Pyridin mit dem TPDS-Cl<sub>2</sub> umgesetzt werden. Durch die Benzoylgruppe wird die Löslichkeit verbessert, was die Handhabung allgemein erleichtert. Eine Aufreinigung durch Flashchromatographie ist gut möglich. Als Nebenprodukt kann 3',5'-TPDS-Adenosin anfallen, das durch den Verlust der Benzoylschutzgruppen an der exozyklischen Aminofunktion entsteht. Diese kann entweder bei der vorhergehenden Teilentschützung des voll acylierten Adenosins oder durch eine zu lange Reaktionsdauer während der TPDS-Schützung abgespalten werden. Üblicherweise lag der Anteil an Nebenprodukt unter 10%, so daß das gewünschte 3',5'-TPDS-*N*-6-Bz-Adenosin **26** in einer Ausbeute von ca. 87% erhalten wurde.

Bei Guanosin **36** unterscheidet sich die Reaktion von den anderen Nukleosiden. Durch die geringe Löslichkeit muß die Schützung von Guanosin **36** in einem Gemisch aus abs. DMF und abs. Pyridin durchgeführt werden. Da das entstehende 3',5'-TPDS-Guanosin **37** nur gering in Dichlormethan löslich ist, kann auch nicht die übliche Aufarbeitung angewendet werden. Stattdessen wird das Produkt durch Eintropfen der Reaktionslösung in Eiswasser gefällt. Der Niederschlag kann dann abgesaugt werden. Eine Aufreinigung durch Flashchromatographie scheitert ebenfalls an der geringen Löslichkeit. Bei konsequentem Ausschluß von Feuchtigkeit während der Reaktion, entsteht nur ein sehr kleiner Anteil von Nebenprodukt, der im Dün-

schichtchromatogramm sowie im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kontrolliert werden kann. Die Ausbeute liegt bei der Reaktion üblicherweise bei über 90%.

Die Verwendung von *N*-2-Acetyl-Guanosin **46** als Edukt für die Deoxygenierung scheitert an der Löslichkeit des Markiewicz-geschützten 3',5'-TPDS-*N*-2-Acetyl-Guanosin **47**. Durch die Acetylgruppe wird die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln gegenüber dem ungeschützten Guanosin leicht erhöht. Allerdings ist keine dem Adenosin vergleichbare Löslichkeit vorhanden. Es ist aber auch nicht ausreichend in Dichlormethan löslich, wodurch die saure Aufarbeitung wie bei den anderen Markiewicz-geschützten Nucleosiden scheitert. Dadurch kann die Reaktion nicht unter den gleichen Bedingungen, wie bei den anderen Nucleosiden durchgeführt werden. Wie Guanosin kann *N*-2-Acetyl-Guanosin andererseits auch nicht verarbeitet werden. 3',5'-TPDS-*N*-2-Acetyl-Guanosin **47** fällt in Wasser nur unzureichend aus, so daß ein Absaugen des Produkts - wie bei 3',5'-TPDS-Guanosin **37** - nicht möglich ist. Da eine Vollentschützung von Guanosin mit methanolischem Ammoniak gut möglich ist und auch die Deoxygenierung zum Desoxyguanosin gut durchführbar ist, wurde der Syntheseweg über *N*-2-Acetyl-Guanosin nicht weiterverfolgt.

### 3.1.2 Die Bildung des PTC-Esters

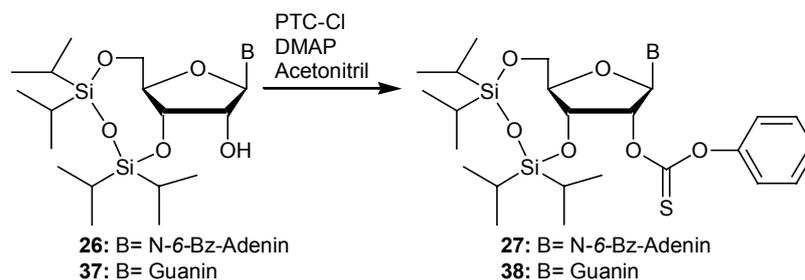


Abbildung 3.3: In der zweiten Stufe der Deoxygenierung werden die TPDS-geschützten Nucleoside **26** bzw. **37** an der 2'-Position mit Phenoxythiocarbonylchlorid verestert.

Die Veresterung der Markiewicz-geschützten Nucleoside mit Phenoxythiocarbonylchlorid wird unter Basenkatalyse in abs. Acetonitril durchgeführt. Als Katalysator

dient dabei DMAP, das mit 1,5 Äquivalenten eingesetzt wird. Die Rohprodukte sind von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Deoxygenierung. Durch die mangelnde Stabilität der Verbindung ist eine Aufreinigung durch Flashchromatographie nur unter Verlusten möglich.

Für die Umsetzung von 3',5'-TPDS-N-6-Bz-Adenosin **26** konnten die Standardbedingungen übernommen werden. Da keine adäquaten Reinigungsmethode zur Verfügung steht, konnte die Ausbeute des labilen Produkts nicht quantifiziert werden. Allerdings ist in der DC-Kontrolle die Bildung von Nebenprodukten erkennbar, weshalb nicht von einer vollständigen Umsetzung ausgegangen werden kann.

3',5'-TPDS-Guanosin **37** ist als Edukt in Acetonitril nur schwach löslich. Durch die Reaktion zum 2'-O-PTC-3',5'-O-TPDS-Guanosin **38** wird es allerdings wesentlich unpolarer und dadurch sowohl in Acetonitril, als auch in Dichlormethan löslich. Deswegen kann die allgemein übliche Aufarbeitung durchgeführt werden. Bei Guanosin sind keine Nebenprodukte in der DC-Kontrolle erkennbar. Bei konsequentem Ausschluß von Feuchtigkeit sind auch keine Eduktspuren zu erkennen. Eine Aufreinigung durch Flashchromatographie ist durch die ausreichende Löslichkeit theoretisch zwar möglich, wegen der Labilität des PTC-Esters allerdings mit großen Ausbeuteverlusten verbunden. Eine Quantifizierung der Ausbeute der Reaktion wurde deshalb nicht durchgeführt.

### 3.1.3 Deoxygenierung zum 3',5'-TPDS-2'-Desoxynucleosid

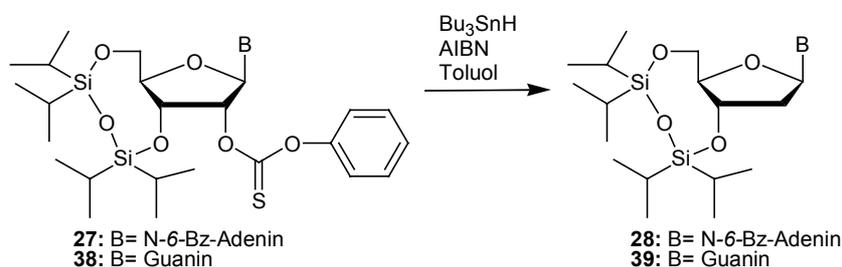


Abbildung 3.4: Die eigentliche Deoxygenierung findet bei 75°C in Toluol statt.

Nach der Funktionalisierung der Nucleoside kann die eigentliche Deoxygenierung mit Tributylzinnhydrid durchgeführt werden. Nach dem von Robins und Hansske

postulierten Mechanismus wird zunächst durch  $\alpha,\alpha'$ -Azo-isobutyronitril AIBN ein Tributylzinnradikal gebildet, das an dem Schwefelatom des PTC-Esters angreift. Durch eine unimolekulare  $\beta$ -Spaltung wird zunächst ein Alkylradikal gebildet, an dem das Wasserstoffradikal anlagern kann. Die Übertragung erfolgt dabei bevorzugt auf die 2''-Position. Verwendet man statt dem Tributylzinnhydrid das Tributylzinndeuterid, wird mit einer Diastereoselektivität von 90% das Deuterium an der H2''-Position eingeführt, was durch das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum leicht geprüft werden kann (siehe Abb. 3.6). Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, die Methylengruppe am C2'-Atom der Ribose in eine Methingruppe zu überführen. Wie in Kapitel 5 über die Synthese deuterierter Ribose näher erläutert wird, ist dies wünschenswert, da sich Methylengruppen ungünstig auf die T2-Relaxationseigenschaften von Makromolekülen auswirken. Bei der Deoxygenierung des Adenosins, das aus der zweifach deuterierten Ribose gewonnen wurde, soll dementsprechend auch die Deoxygenierung mit Tributylzinndeuterid zum 2''-Deutero-Desoxyadenosin durchgeführt werden.

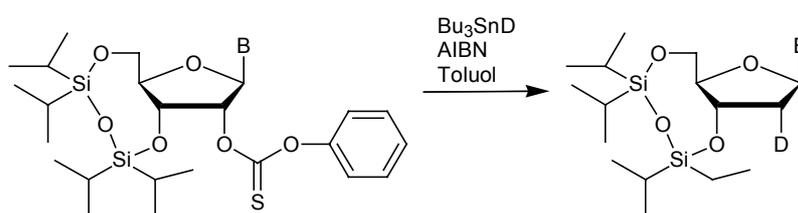


Abbildung 3.5: Bei der Deoxygenierung mit  $\text{Bu}_3\text{SnD}$  wird selektiv die 2''-Position deuteriert.

Die Deoxygenierung wird bei  $75^\circ\text{C}$  in abs. Toluol durchgeführt. Der Reaktionsverlauf kann durch DC-Kontrolle gut mitverfolgt werden. Neben der Reaktion zum Desoxynukleosid kommt es zu einem geringen Teil auch zum Zerfall des PTC-Esters. Dies ist neben der unvollständigen Umsetzung ein Grund, weshalb bei der Aufarbeitung außer dem Desoxynukleosid auch Nukleosid anfällt.

Die Benzoylgruppe im *N*-6-Bz-Adenosin ist unter den Reaktionsbedingungen nicht völlig stabil, so daß es zur teilweisen Entschützung der Base kommt. In der DC-Kontrolle ist dies durch Auftreten eines zweiten Satzes von Punkten erkennbar. Ansonsten unterscheiden sich die Deoxygenierungen von Guanosin und *N*-6-Bz-Adenosin nur unerheblich.

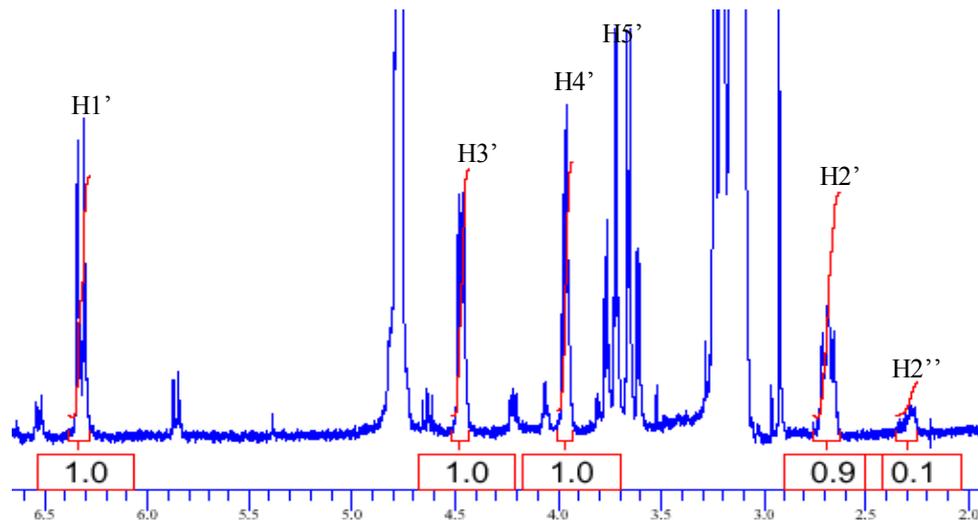


Abbildung 3.6: NMR-Spektrum des Rohprodukts von 2''-D-Desoxyadenosin in D<sub>2</sub>O. Wie an dem Restsignal bei 2,3 ppm zu erkennen ist, ist durch die Deuterierung im Rahmen der Deoxygenierung mit Bu<sub>3</sub>SnD das Desoxyadenosin an der 2''-Position zu 90% deuteriert.

Nach der Deoxygenierung muß in einem letzten Schritt die TPDS-Schutzgruppe abgespalten werden. Die Entschützung erfolgt durch Fluoridinduktion mit Tetrabutylammoniumfluorid TBAF/THF. Diese kann entweder direkt in der Reaktionslösung der Deoxygenierung als Eintopfreaktion durchgeführt werden oder nach der Aufarbeitung der Deoxygenierung in einem eigenem Schritt. Bei einer getrennten Durchführung kann vor der Entschützung eine Aufreinigung durch Flashchromatographie erfolgen. In dem Fall muß nach der Entschützung aber noch ein zweiter Reinigungsschritt erfolgen. Deshalb erscheint eine getrennte Entschützung nur unter besonderen Umständen sinnvoll.

Nach der Entschützung erhält man ein öliges Rohprodukt, das neben dem Desoxynucleosid auch das ursprünglich eingesetzte Nucleosid enthält. Die Retentionszeiten beider Verbindungen unterscheiden sich bei der Chromatographie nur gering, wodurch die Trennung erschwert ist. Robins und Hannske haben eine Aufreinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Bei Guanosin erfolgt die Elution durch einen Et<sub>4</sub>N<sup>+</sup>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (TEAB)-Puffer. Bei der im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Deoxygenierung von <sup>15</sup>N-markierten Desoxyguanosin wurde aufgrund der schlechten Trennleistung der Ionenaustausch-Chromatographie eine HPLC-chromatographische Trennung über eine Reversed-Phase Säule mit einem Gradienten aus 0,1m TEAA-Puffer (pH7) mit Acetonitril entwickelt. Der dabei im

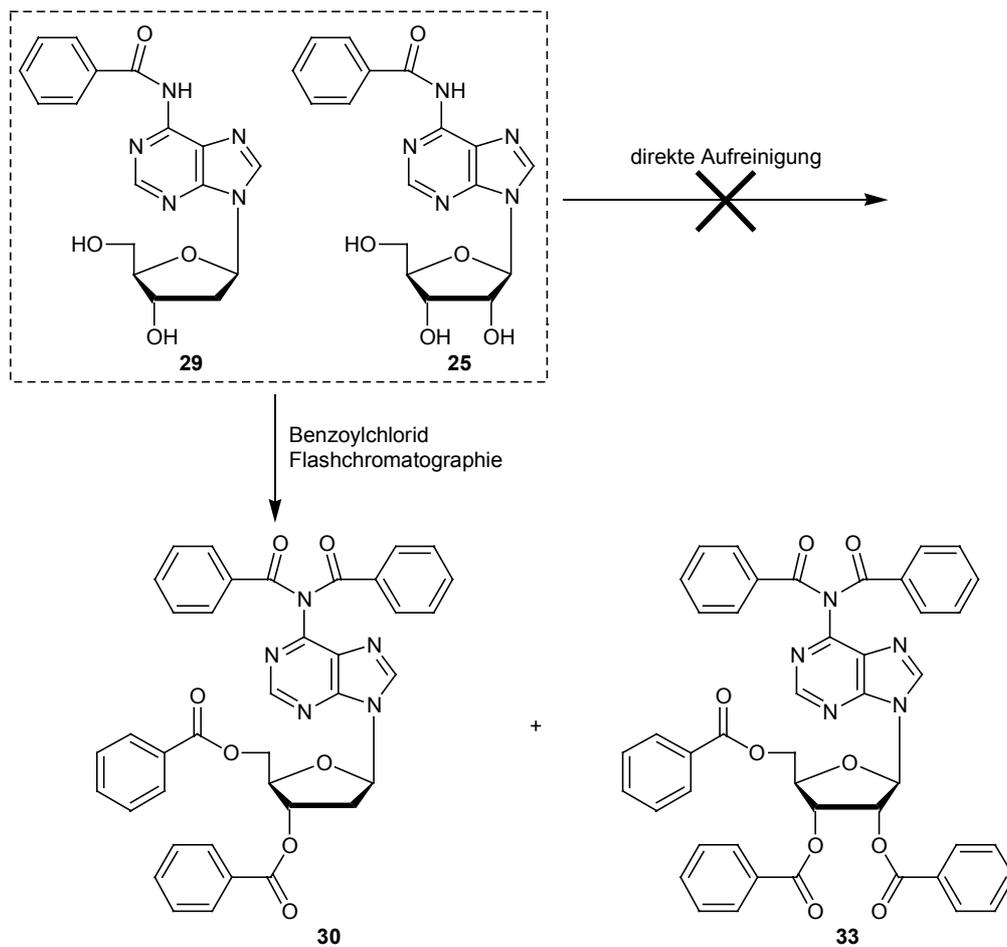


Abbildung 3.7: Trennung durch Derivatisierung bei Desoxyadenosin. Das Rohprodukt der Deoxygenierung enthält neben dem N-6-Bz-Desoxyadenosin **29** auch noch geringe Mengen an N-6-Bz-Adenosin **23**. Eine direkte Trennung ist nicht möglich. Nach der Benzoylierung kann das vierfach veresterte Desoxyadenosin **30** durch Flachchromatographie vom fünffach veresterten Adenosin **33** gereinigt werden.

Produkt enthaltene Puffer ist allerdings nur durch mehrmaliges Lyophilisieren zu entfernen. Da das Desoxyguanosin beim Lyophilisieren leicht auffliegt, und in die Gefriertrocknungsanlage gesaugt wird, ist die Gefahr von Verlusten groß. Bei der Synthese des  $^{15}\text{N}$ -markierten Desoxyguanosin kam es so zu bedeutenden Verlusten. Bei N-6-Bz-Desoxyadenosin **29** ist eine HPLC-chromatographische Trennung aufgrund der fast identischen Retentionszeiten von N-6-Bz-Desoxyadenosin **29** und N-6-Bz-Adenosin **25** nicht möglich. Deshalb wurde eine Methode ausgearbeitet, bei der die Trennung nach einer Derivatisierung erfolgt (siehe Abb. 3.8). Da es bei der Deoxygenierung zu einem geringen Anteil zu einer Entschützung der Base kommt, lag es

nahe eine Perbenzoylierung des Rohprodukts mit Benzoylchlorid in Pyridin durchzuführen. Dies entspricht auch dem ersten Schritt der Synthese des Desoxyadenosin-Phosphoamidits aus Desoxyadenosin. Durch die Peracylierung erhält man ein Gemisch aus Tetra-Benzoyl-Desoxyadenosin **30** und Penta-Benzoyl-Adenosin **33**. Die exozyklische Aminofunktion der Base ist dabei doppelt benzoyliert. Die beiden Verbindungen können sowohl durch HPLC-Chromatographie als auch durch einfache Flashchromatographie getrennt werden. Durch eine basenkatalysierte Teilentschützung mit 2N NaOH erhält man *N*-6-Bz-Desoxyadenosin **29**. Die Teilentschützung entspricht der Teilentschützung nach der Glykosylierung. Aufgrund der veränderten Löslichkeit der Edukte mußten die Reaktionsbedingungen neu ausgearbeitet werden. Der Umweg über die Peracylierung hat den Vorteil, daß man eine gut durchführbare Methode zur Aufreinigung des *N*-6-Bz-Desoxyadenosin **29** besitzt, bei der das nicht umgesetzte *N*-6-Bz-Adenosin **25** zurückgewonnen werden kann. Außerdem erhält man nach der Teilentschützung ein Rohprodukt, das gut für die nachfolgende Tritylierung geeignet ist. Für eine direkte Tritylierung des Rohprodukts der Deoxygenierung ist das Rohprodukt zu unsauber.

Die Ausbeute der Deoxygenierung von *N*-6-Bz-Adenosin **29** beträgt 47%. An *N*-6-Bz-Adenosin **25** können dabei 15% zurückgewonnen werden. Die Ausbeute an *N*-6-Bz-Desoxyadenosin **29** beträgt damit 55% des umgesetzten *N*-6-Bz-Adenosin **25**.

Nach den guten Erfahrungen mit der Trennung durch Derivatisierung bei Desoxyadenosin wurde die Methode auch auf Desoxyguanosin übertragen. Dabei wurde Isobutyryl als Schutzgruppe verwendet. Isobutyryl ist bei der Phosphoamiditchemie neben Acetyl eine der für Guanosin üblichen Schutzgruppen (siehe Kapitel 4). Durch die Reaktion des Rohprodukts der Deoxygenierung mit Isobutyrylchlorid in abs. Pyridin erhält man ein Gemisch aus Tri-Isobutyryl-Desoxyguanosin **41** und Tetra-Isobutyryl-Guanosin **45**. Bei Guanosin reagiert die exozyklische Aminofunktion der Base nur einmal. Beide Verbindungen können durch einfache Flashchromatographie gut voneinander getrennt werden. Von einer HPLC-chromatographischen Aufreinigung wurde daher abgesehen. Die Deoxygenierung von Guanosin erfolgt mit einer Gesamtausbeute von über 4 Stufen von 55%.

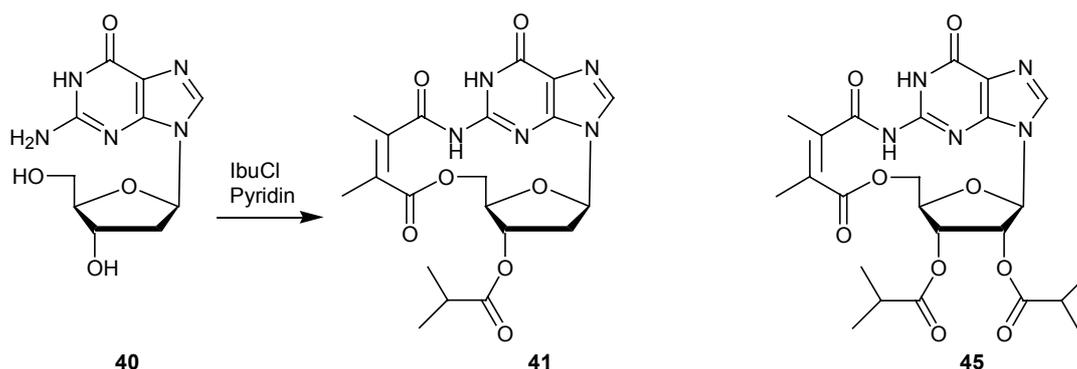


Abbildung 3.8: Trennung durch Derivatisierung bei Desoxyguanosin: Nach der Peracetylierung mit Isobutyrylchlorid kann das Desoxyguanosin durch Flashchromatographie aufgereinigt werden. Bei der Deoxygenierung nicht umgesetztes Guanosin kann als Tri-Isobutyryl-Guanosin 45 zurückgewonnen werden.

Auch die Teilentschützung zum *N*-2-Ibu-Desoxyguanosin **42** erfolgt nach dem Standardprotokoll mit 2M NaOH-Lösung in Pyridin/Ethanol bei 0°C innerhalb von 20 Minuten (siehe Kapitel 4). Das dabei erhaltene Rohprodukt ist von ausreichender Reinheit für die Tritylierung zum 5'-DMT-*N*-2-Ibu-Desoxyguanosin **43**, das die nächste Stufe der Synthese des Desoxaguanosin-Phosphoamidits bildet.

### 3.2 Deoxygenierung von $^{13}\text{C}$ -markiertem *N*-6-Benzoyl-Adenosin

Nach der Optimierung der Synthese wurde die Deoxygenierung mit  $^{13}\text{C}_5$ -markiertem *N*-6-Benzoyl-Adenosin **51** umgesetzt (siehe Abb. 3.9). Isotopenmarkiertes Guanosin wurde nicht deoxygeniert, da kein Bedarf an isotopenmarkiertem 2'-Desoxyguanosin bestand.

Die Deoxygenierung von ribosyl  $^{13}\text{C}_5$ -markiertem *N*-6-Benzoyl-Adenosin **51** zu *N*-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin **56** wurde ausgehend von dem Rohprodukt der Teilentschützung mit der Schützung der 3',5'-Positionen durch die TPDS-Schutzgruppe begonnen. Für die Teilentschützung wurden 1,3 mmol vollgeschütztes  $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin **50** eingesetzt. Nimmt man diese Menge als Grundlage für die Berechnung der Aus-

beute an **52**, so kommt man auf einen Wert von 85% über 2 Stufen, was im üblichen Bereich liegt. Außerdem konnten bei der Aufreinigung durch Flashchromatographie 70 mg Nebenprodukt zurückgewonnen werden, was ca. 10% des eingesetzten Edukts entspricht. Ein recyceln der Nebenprodukte ist durch Entschützen mit TBAF/THF möglich. Nach der Bildung des PTC-Esters **53** wurde die eigentliche Deoxygenierung mit Tributylzinnhydrid und AIBN durchgeführt. Die Entschützung der Markiewicz-Gruppe mit TBAF/THF wurde direkt in der Reaktionslösung durchgeführt. Die Trennung des Rohprodukts von nicht umgesetzten *N*-6-Benzoyl-Adenosin **59** mittels Flashchromatographie, wurde nach der Perbenzoylierung des Rohproduktes der Entschützung mit Benzoylchlorid in abs. Pyridin durchgeführt. Dabei wurden 300 mg Tetrabenzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -Desoxyadenosin **56**, sowie 190 mg Pentabenzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin **59** erhalten. Auf den Umsatz des ursprünglich eingesetzten Di-*O*-Benzoyl-*O*-Acetyl-*N*-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin **50** bezogen beträgt die Ausbeute über 6 Stufen 50%.

Ein Teil des bei der Aufreinigung der Deoxygenierung zu  $^{13}\text{C}_5$ -Desoxyadenosin an-

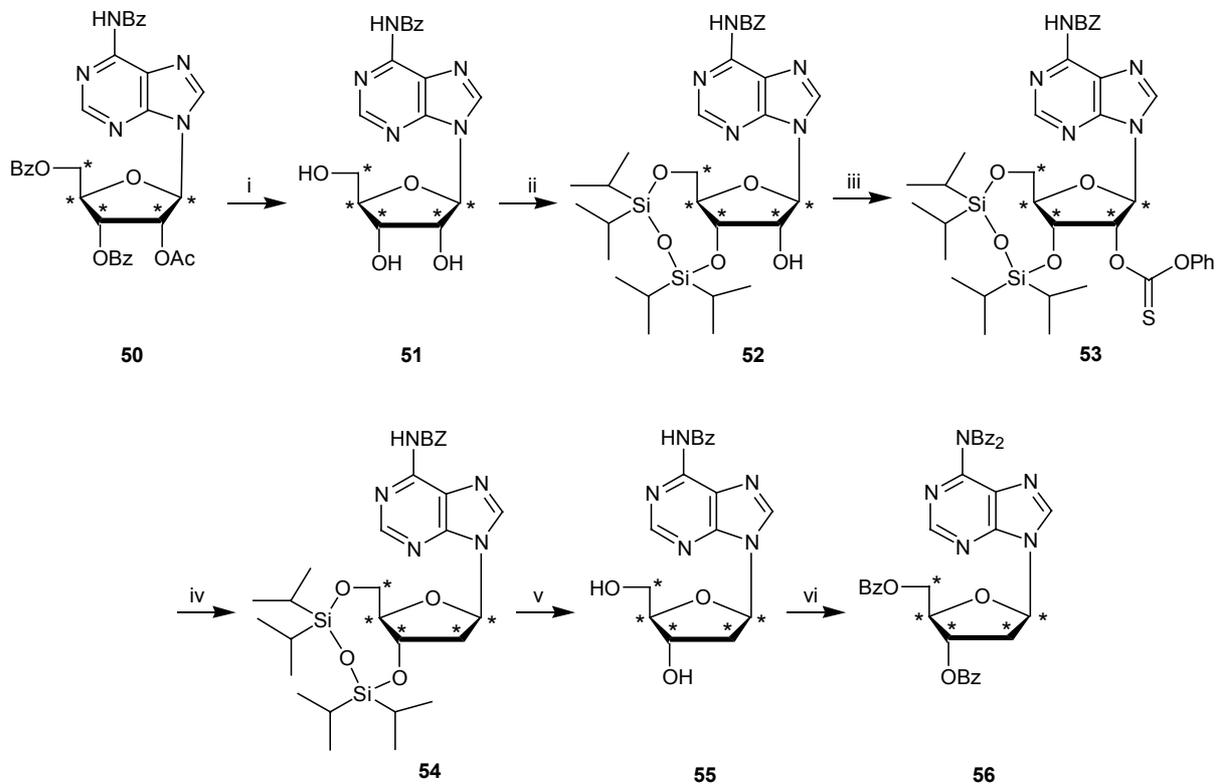


Abbildung 3.9: Deoxygenierung von  $^{13}\text{C}_5$ -markierten *N*-6-Benzoyl-Adenosin zu *N*-6-Benzoyl-Desoxyadenosin. Die Quantifizierung der Gesamtausbeute von 50% ist auf das vollgeschützte *N*-6-Benzoyl-Adenosin **50** bezogen.

gefallenen  $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin konnte im Rahmen des Projektes zur Untersuchung der Transfer Kreuzkorrelierten Relaxation am Beispiel eines schwach an den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) gebundenen aminoacetylierten tRNA-Mimetikums eingesetzt werden. Da es sich eine Anwendung von Adenosin handelt, wird diese im Kapitel 2.4 über die Glykosylierung der Nukleoside ausführlich behandelt. Das  $^{13}\text{C}_5$ -Desoxyadenosin wurde zur Synthese des  $^{13}\text{C}_5$ -markierten Phosphoamidits eingesetzt. Die Synthese wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

## 4 Synthese der Phosphoamidite.

Für die Festphasen-Synthese der Oligonukleotide müssen die Nukleoside zu reaktiven Einheiten modifiziert werden. Die Natur nutzt bei der enzymatischen Oligonukleotidsynthese aus den Nukleosidtriphosphaten durch Polymerasen die Energie der Hydrolyse des Pyrophosphats. Bei der chemischen Synthese von DNA werden leicht zu aktivierende Phosphorderivate verwendet. Im Gegensatz zu der ersten chemischen Synthese eines Oligonukleotids zu Beginn der 60er Jahre durch Khorana (Khorana, 1979), wird die Synthese von DNA und RNA seit langem durch Festphasensynthese durchgeführt.

## 4.1 Festphasensynthese von Oligonukleotiden

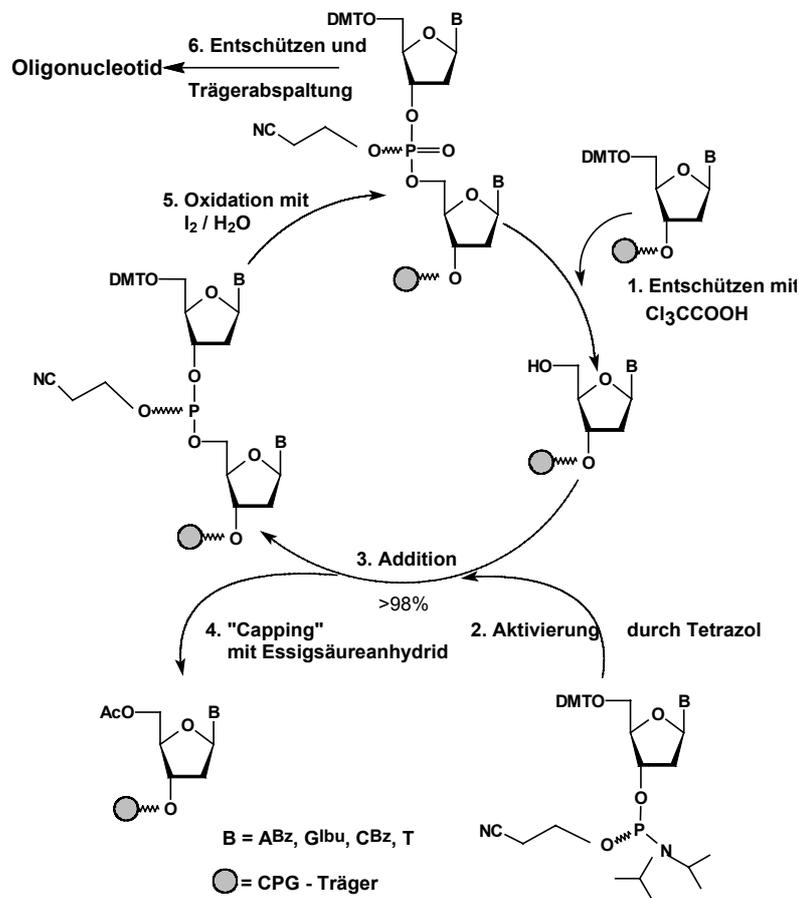


Abbildung 4.1: Synthesesyklus der Festphasensynthese von Oligonukleotiden nach der Phosphoamiditmethode (Engels, 1991).

Aufgrund ihrer guten Durchführbarkeit und der nahezu quantitativen Kupplungsrate, die eine hohe Ausbeute ermöglicht, hat sich die Mitte der 80er Jahre von Beaucage und Caruthers (Beaucage et al., 1981) ausgearbeitete Phosphoamiditmethode zu der meistverwendeten Methode entwickeln können. Neben der Phosphoamiditmethode gibt es noch die Phosphortriester- (Gait, 1984) und die H-Phosphonatmethode (Froehler et al., 1986). Sie unterscheiden sich durch die Funktionalität der eingesetzten Phosphorverbindung und den Synthesesyklen der Festphasensynthese.

Der Synthesesyklus für die Festphasensynthese der Oligonukleotide nach der Phosphoamiditmethode besteht aus 5 Stufen. Das zu synthetisierende Oligonucleotid ist mit einem Linker an einem Träger aus Controlled Pore Glass (CPG-Träger)

oder aus Polystyrol gebunden, wobei das erste Nukleotid in der Regel zu Beginn der Synthese bereits an dem Linker angekoppelt ist. Im Gegensatz zu der biochemischen DNA-Synthese durch Polymerasen, die in 5'-3'-Richtung erfolgt, wächst das Oligonukleotid bei der Festphasensynthese in 3'-5'-Richtung. Der Syntheszyklus (siehe Abbildung 4.1) beginnt mit dem Abspalten der Dimethoxytritylschutzgruppe von der 5'-Position des zuletzt angekoppelten Nukleotids mit Trichloressigsäure. Das Phosphoamidit, das die nächste Position in der Kette einnehmen soll koppelt darauf mit seiner an der 3'-Position hängenden Amiditfunktion an das freigewordene 5'-Ende des Oligonukleotids an. Hierzu wird das Phosphoamidit mit Tetrazol aktiviert, wobei die Diisopropylfunktion protoniert wird. Dadurch ist ihre Austrittstendenz erhöht. In den letzten beiden Schritten werden die nicht umgesetzten 5'-Enden mit Essigsäureanhydrid gecappt und der bei der Kupplungsreaktion entstandene Phosphitriester mit Iod zum Phosphotriester oxidiert. Je nach Hersteller und Modell des Synthesizers kann die Reihenfolge der beiden Schritte unterschiedlich sein. Nach Beendigung der Synthese wird das Oligonukleotid durch Behandlung mit konzentrierter Ammoniaklösung bei 55°C innerhalb von mehreren Stunden vom Träger abgelöst. Parallel erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppen. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt durch HPLC-Chromatographie.

## 4.2 Die Synthese der DNA-Phosphoamidite

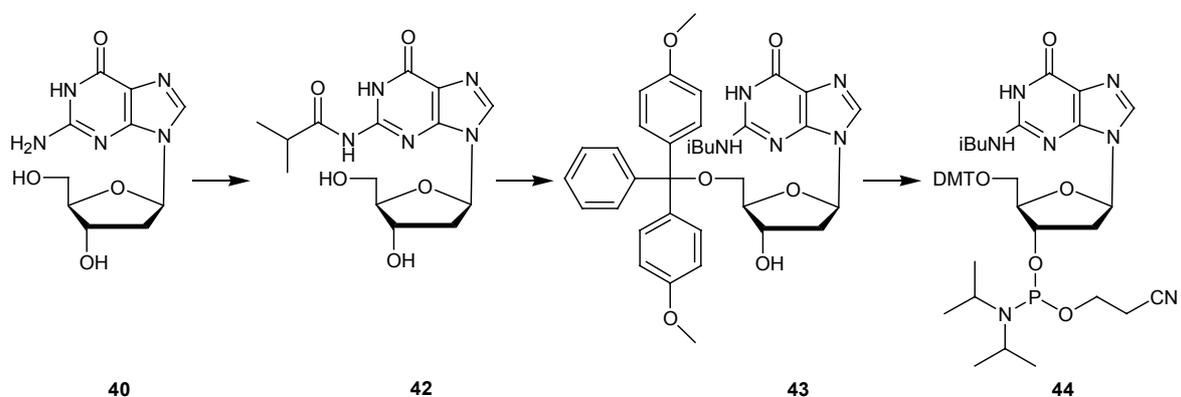


Abbildung 4.2: Die Synthese der Phosphoamidite - hier am Beispiel von Desoxyguanosin - gliedert sich in 3 Stufen: Der Schützung der Base, der Tritylierung der 5'-Position und die Phosphitylierung zum Phosphoamidit 44

Die Synthese der DNA-Phosphoamidite gliedert sich in 3 Schritte (siehe Abbildung 4.2): der Schützung der Aminofunktion der Base, der Tritylierung der 5'-OH-Gruppe der Ribose und schließlich der eigentlichen Bildung des Amidits. Im Gegensatz zu dem Desoxyadenosin-Amidit müssen bei dem Desoxyguanosin-Amidit die Schutzgruppen in der angegebenen Reihenfolge angekoppelt werden, da bei der Tritylierung die freie Aminofunktion bevorzugt reagiert. Die Tritylschutzgruppe an der N-2-Funktion wird allerdings von Isobutyrylchlorid nicht abgespalten (Gait, 1984).

#### 4.2.1 Schützung der exozyklischen Aminofunktion

Die ersten Benzoylierungen der exozyklischen Aminofunktion im Adenin wurden bereits im 19. Jahrhundert von Kossel (Kossel, 1888) durchgeführt. Ging es damals in den Anfängen der Nukleosidchemie eher um die ersten Versuche mit der neuentdeckten Verbindungsklasse, so hat sich in der Zwischenzeit die Benzoylgruppe als bevorzugte Schutzgruppe für Adenosin durchsetzen können. Die Schützung erfolgt in der Regel mit Benzoylchlorid in abs. Pyridin. Dabei kommt es zur Vollschützung aller potentiellen Anlagerungsstellen, also der OH-Gruppen und der Aminofunktion zum Tetra-Benzoyl-Desoxyadenosin. **30** Die Aminofunktion reagiert dabei doppelt zum Dibenzoylamid. In einem 2. Schritt erfolgt die Teilentschützung zum N-6-Benzoyl-Desoxyadenosin **29**. Blockiert man dagegen vor der Benzoylierung die OH-

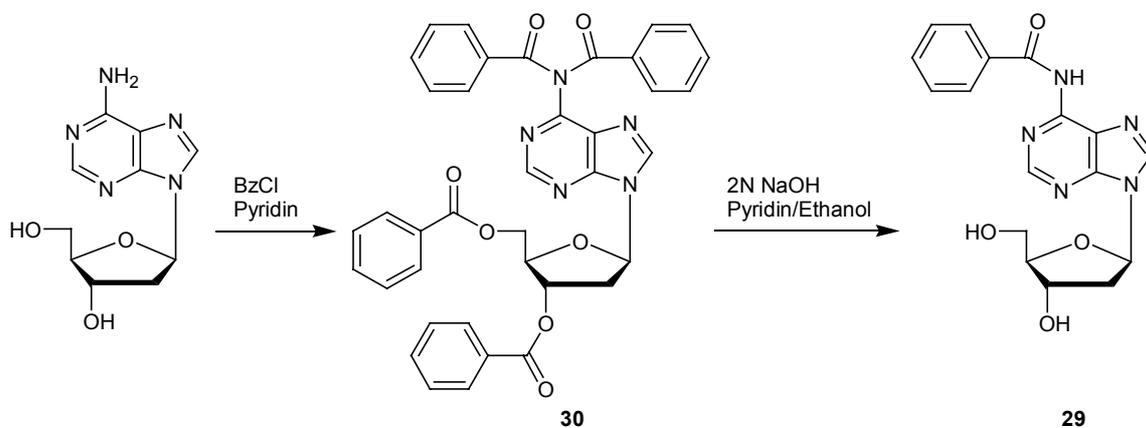


Abbildung 4.3: Die Schützung von Desoxyadenosin durch Peracylierung und Teilentschützung zum N-6-Benzoyl-Desoxyadenosin **29**.

Gruppen der Riboseeinheit durch Silylschutzgruppen, reagiert nur die Aminofunktion. Diese sogenannte transiente Schützung wurde 1984 von Gaffney und Jones (Gaffney et al., 1984) entwickelt. Allerdings reagiert auch hier die Aminofunktion doppelt zum Dibenzoylamid, weshalb die zweite Benzoylgruppe basenkatalysiert mit 25%iger Ammoniaklösung bzw. mit 1 N NaOH-Lösung abgespalten werden muß. Da die vollständige Silylierung der Riboseeinheit selbst bei striktem Feuchtigkeitsausschluß schwierig ist, kommt es bei der eigentlichen Benzoylierung leicht zu Nebenreaktionen. Die diffizile Reaktionsdurchführung, die trotzdem die doppelte Schützung der Aminofunktion nicht verhindern kann, macht die Vorteile der transienten Schützung zum Teil wieder zunichte. Die Vollschützung ist die wesentlich robustere Methode. Eingeschleppte Feuchtigkeit kann durch einen größeren Überschuß an Benzoylchlorid ausgeglichen werden. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur mit quantitativer Ausbeuten in abs. Pyridin durchgeführt.

Die Teilentschützung von Tetra-Benzoyl-Desoxyadenosin **30** zu *N*-6-Benzoyl-Desoxyadenosin **29** erfolgt innerhalb von 45 Minuten durch Verseifung mit 2 M NaOH in Pyridin/Ethanol bei 0°C. Die verbleibende Bindung des Säureamids ist dabei so beständig, daß es unter den Reaktionsbedingungen nicht zur Vollentschützung kommt. Der Vorgang der Teilentschützung entspricht dem nach der Glykosylierung. Tetra-Benzoyl-Desoxyadenosin **30** ist allerdings durch die vierfache Veresterung mit Benzoessäure unpolarer, als das vierfach veresterte Adenosin nach der Glykosylierung. Besonders die doppelte Schützung der exozyklischen Aminofunktion macht sich hierbei bemerkbar, weshalb die Reaktionsbedingungen der Teilentschützung neu ausgearbeitet werden mußten. Tetra-Benzoyl-Desoxyadenosin **30** war unter den üblichen Bedingungen nicht ausreichend löslich. Deswegen wurden im Rahmen der Syntheseoptimierung verschiedene andere Lösungsmittel ausprobiert. Die Zugabe von Dichlormethan erhöht zwar die Löslichkeit, allerdings bildet sich bei Zugabe der verdünnten Natronlauge ein Zweiphasengemisch. Die Zugabe von Aceton und Methanol konnte die Löslichkeit zwar ebenfalls erhöhen, allerdings können wäßrige Lösungen, die Aceton und Methanol enthalten, nicht an der Lyophile getrocknet werden, da der Schmelzpunkt von Aceton und Methanol zu tief ist, um in der Kühlfalle der Gefriertrocknungsanlage auszufrieren. Die Teilentschützung in einem Ace-

ton/Pyridin-Gemisch verlief zudem außerordentlich langsam. Auch eine Entschützung in reinem Pyridin verläuft nur extrem langsam.

Nach umfangreichen Testreihen konnte festgestellt werden, daß ein Gemisch aus Pyridin/Ethanol letztendlich doch die besten Voraussetzungen bietet, weshalb die Teilentschützung mit diesem Lösungsmittelgemisch optimiert wurde. Das Löslichkeitsproblem konnte mit einer abgeänderten Reaktionsdurchführung behoben bekommen werden. Danach wird die Reaktion in der doppelten Menge an Lösungsmittel durchgeführt, wobei das Edukt zunächst in reinem Pyridin gelöst wird. Das Ethanol wird erst zu der Lösung des Edukts zugegeben, worauf der Ansatz auf 0°C gekühlt wird. Nach Zugabe der Natronlauge erfolgt die selektive Teilentschützung zum *N*-6-Benzoyl-Desoxyadenosin **29** innerhalb von 45 Minuten.

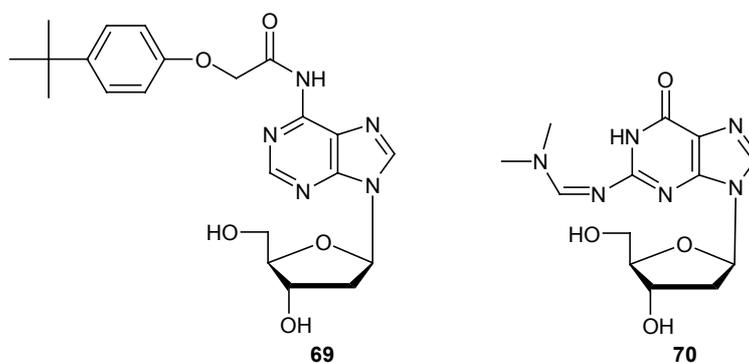


Abbildung 4.4: Als basenlabile Schutzgruppen werden die *t*BPA-Schutzgruppe und die DMF-Schutzgruppe verwendet. Hier am Beispiel von *N*-6-*t*BPA-DesoxyAdenosin **69** und *N*-2-DMF-Desoxyguanosin **70**

Die große Stabilität des *N*-6-Bz-Desoxyadenosin **29** ist bei der Entschützung des fertigen Oligonukleotid von Nachteil. Diese wird mit einer 50 % Ammoniaklösung entweder bei Raumtemperatur innerhalb eines Tages oder bei 55°C innerhalb von 8 Stunden durchgeführt, wobei es zu einer Hydrolyse des Oligonukleotids kommen kann. Als Alternative wurden deshalb die sogenannten basenlabilen Schutzgruppen entwickelt, deren Einsatz zu wesentlich kürzeren Abspaltzeiten führt. Dabei wird die Base durch die *tert*-Butylphenoxyacetyl-Schutzgruppe (*t*BPA) geschützt. Die Entschützung erfolgt mit Ammoniak bei 55°C innerhalb von 15 Min, bei Raumtemperatur dauert die Entschützung 2 Stunden.

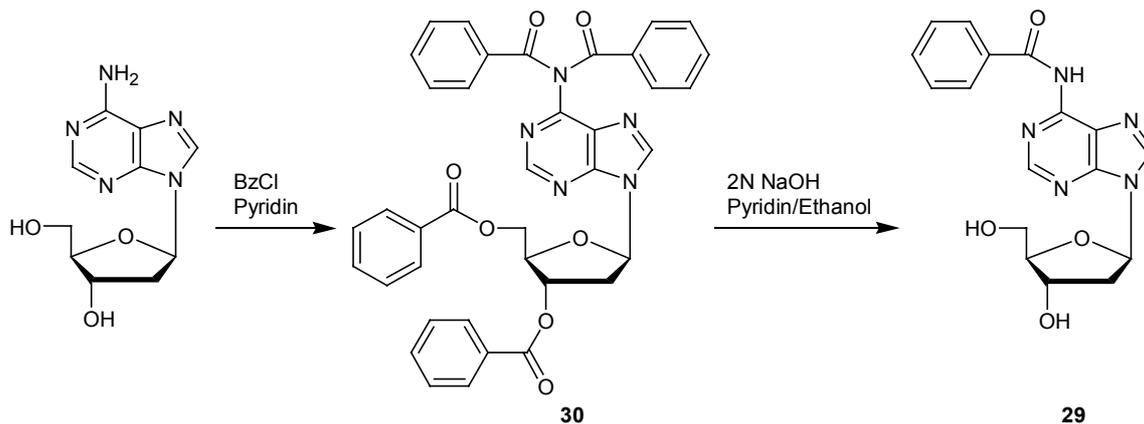


Abbildung 4.5: Die Schützung der exocyclischen Aminofunktion bei Desoxyguanosin durch Peracylierung und anschließende Teilentschützung

Bei der Synthese der isotopenmarkierten Amidite wurde die bewährte Benzoylschutzgruppe verwendet, da die fertigen Amidite äußerst säurelabil sind, mithin eine Lagerung unter leicht basischen Bedingungen vorteilhaft ist. Inwieweit dies mit den basenlabilen Schutzgruppen möglich ist, konnte nicht geklärt werden. Auch war nicht bekannt, ob die Trennung des Rohprodukts der Deoxygenierung durch Peracylierung mit der *t*BPA-Gruppe möglich ist.

Desoxyguanosin ist nach der Deoxygenierung an der Base ungeschützt. Daher unterliegt man im Gegensatz zum *N*-6-Bz-Desoxyadenosin bei der Wahl der Schutzgruppe keiner Vorgabe.

Als basenlabile Schutzgruppe werden bei Guanosin auch die Amidin-Schutzgruppen in der Regel als Dimethylformamidin-Schutzgruppe verwendet, die Beaucage und Caruthers (McBride et al., 1986) entwickelt haben (siehe Abbildung 4.4). Dabei wird die Aminogruppe durch Dialkylformamidindimethylacetal unter Bildung einer Dialkylformamidingruppe geschützt. Nebenreaktionen der Hydroxylgruppen treten nicht auf. Die Formamidinschutzgruppen sind basenlabil, wobei die Labilität um so ausgeprägter ist, je kleiner die Alkylgruppen sind. Obwohl Caruthers die Dibutylformamidin-Schutzgruppe deshalb am geeignetsten fand, hat sich die Dimethylformamidin- (DMF)-Schutzgruppe durchgesetzt. In der vorhergehenden Diplomarbeit (Czech, 1996) wurde ihre Verwendung untersucht. Die DMF-Schutzgruppe kann in Methanol quantitativ eingeführt werden. Eine Aufreinigung ist deshalb nicht nötig, kann allerdings wegen der geringen Löslichkeit des Produkts auch nicht durchge-

führt werden. Bei der nachfolgenden Tritylierung von *N*-2-DMF-Desoxyguanosin **70** zum 5'-DMT-*N*-2-DMF-Desoxyguanosin macht sich die mangelnde Löslichkeit kritisch bemerkbar, da auch hier keine Flashchromatographie möglich ist. Erst das fertige Amidit kann durch Flashchromatographie gereinigt werden.

Durch die Basenlabilität kann es auch unter den üblichen Reaktionsbedingungen zu einer Abspaltung der Schutzgruppe kommen. Daß eine Trennung des Desoxyguanosins von nicht umgesetzten Guanosin nach der Deoxygenierung mit der DMF-Schutzgruppe nicht durchgeführt werden kann, ist durch die mögliche Trennung der beiden Verbindungen durch HPLC-Chromatographie nicht entscheidend. Maßgeblich gegen die weitere Verwendung der DMF-Schutzgruppe spricht die mangelnde Stabilität und vor allem die schlechte Löslichkeit der DMF-geschützten Zwischenprodukte. Dadurch kann im Falle einer schlecht verlaufenden Reaktion wie z. B. der Tritylierung der Schaden nur schlecht eingegrenzt werden, da eine Abtrennung des Edukts und dessen erneute Umsetzung nicht möglich ist. Angesichts des hohen Preises der Edukte ist es allerdings gerade bei Synthesen von isotopenmarkierten Verbindungen wichtig, daß die Reaktionen nicht nur eine hohe Ausbeute bieten, sondern auch wenig störanfällig sind. Falls eine Reaktion trotz der guten Vorbereitung schlecht verläuft, ist es wichtig, daß man das Edukt zurückgewinnen und so eine Schadensbegrenzung betreiben kann.

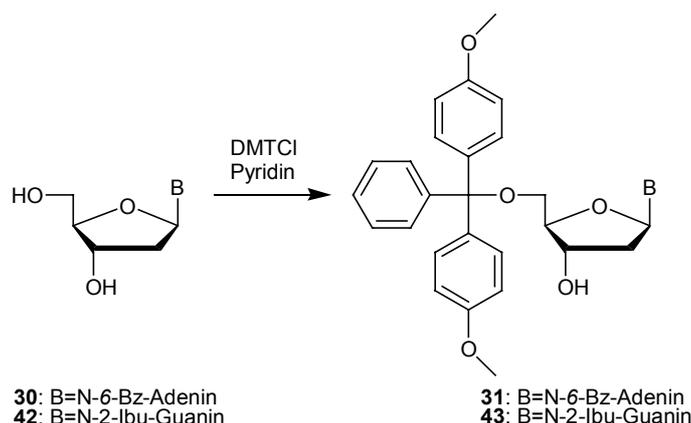
Die klassischen Schutzgruppen für Guanosin sind die Acetyl- und die Isobutyrylschutzgruppe. Beide können durch die basenkatalysierte Veresterung z. B. mit dem Säurechlorid oder auch mit dem Säureanhydrid analog der Benzoylierung von Desoxyadenosin in quantitativer Ausbeute eingeführt werden. In einem zweiten Schritt erfolgt die Teilentschützung zum einfach geschützten *N*-2-Isobutyryl-Desoxyguanosin **42** bzw. *N*-2-Acetyl-Desoxyguanosin. Auch die Schützung nach Gaffneys Methode der transienten Schützung ist möglich, wurde allerdings nach den eher schlechten Erfahrungen bei der Schützung von Desoxyadenosin nicht durchgeführt.

Da sich die Isobutyrylschutzgruppe durch ihre größere Stabilität in den letzten Jahren gegenüber der Acetylschutzgruppe immer mehr durchsetzen konnte, wurde sie als Schutzgruppe der Wahl verwendet. Die Versuche der Vollschützung des Rohproduktes der Deoxygenierung und dessen Trennung durch Flashchromatographie

fürten rasch zum Ziel. Auch ist die Teilentschützung in Ethanol/Pyridin bei 0°C mit 2 M NaOH gut durchführbar. Die Stabilität des Säureamids ist ausreichend höher, als die der Ester an der Riboseinheit, wodurch es binnen 20 Minuten nur zu einer vollständigen Hydrolyse der Ester unter Verbleib des Säureamids kommt.

Das bei der Teilentschützung der peracylierten Desoxynucleoside erhaltene Rohprodukt ist sowohl bei *N*-2-Ibu-Desoxyguanosin **42** als auch bei *N*-6-Bz-Desoxyadenosin **29** von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Tritylierung. Eine Reinigung durch Chromatographie kann wegen der geringen Löslichkeit allerdings nur unter Ausbeuteverlusten mit Acetonitril/Wasser durchgeführt werden.

#### 4.2.2 Tritylierung der Desoxynucleoside



**Abbildung 4.6:** Die Tritylierung der 5'-Position. Durch die Blockade der 5'-Position, die mit einer Ausbeute von 75% durchgeführt werden kann, ist nur noch die 3'-Position im Desoxynucleosid frei.

Die Tritylierung der 5'-OH-Gruppe der Desoxynucleoside erfolgt durch Basenkatalyse in Pyridin, wobei Pyridin als Lösungsmittel und gleichzeitig als Katalysator dient. Außerdem fängt das Pyridin das Chlorid ab, das bei der Reaktion freigesetzt wird, da die Tritylschutzgruppe als Chlorid eingeführt wird. Auf eine Zugabe von Triethylamin kann bei der Reaktion verzichtet werden. Allerdings muß bei der Aufreinigung durch Flashchromatographie die Kieselgelsäule vor der Trennung durch Triethylamin neutralisiert werden. Die Ausbeuten liegen bei Verwendung des Rohprodukts der Teilentschützung über 2 Stufen üblicherweise bei 75%.

### 4.2.3 Die Phosphitylierung zum Phosphoamidit

Die eigentliche Bildung des Amidits erfolgt mit *N,N*-Diisopropyl-amino-(2-cyanoethanol)-phosphinchlorid in Dichlormethan. Als Katalysator und Säurefänger des freiwerdenden Chlorids wird Triethylamin bzw. Diisopropylethylamin verwendet. Die Reaktion unterscheidet sich bei Desoxyguanosin und Desoxyadenosin nicht. Entscheidend ist, daß bei der Reaktion auf den Ausschluß von jeglicher Feuchtigkeit geachtet wird. Es empfiehlt sich daher, die Edukte vor der Reaktion im Reaktionsgefäß aus abs. Benzol zu lyophilisieren. Das als Lösungsmittel eingesetzte Dichlormethan muß frei von Säure sein, was z. B. durch Abdestillieren von Calciumhydrid zu erreichen ist. Die Amidite sind äußerst oxidationsempfindlich. Deshalb muß unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet werden. Die Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie. Durch Zugabe von 5% Triethylamin zum Laufmittel wird das leicht saure Kieselgel der Flashsäule beim Konditionieren neutralisiert.

Die Ausbeute liegt üblicherweise bei 80%. Bei der Reaktion entsteht ein Paar von Diastereomeren, das bei der Aufreinigung durch Flashchromatographie auch getrennt werden kann. Die Qualität des Amidits kann durch  $^{31}\text{P}$ -NMR geprüft werden. Das Signal der Amidite erscheint bei ca. 150 ppm, während die oxidierte Form Signale zwischen 10 und 20 ppm zeigt. Bei sorgfältiger Arbeitsweise ist der Anteil der oxidierten Form weit unter 5%.

Die Amidite können unter Schutzgasatmosphäre bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  über mehrere Jahre gela-

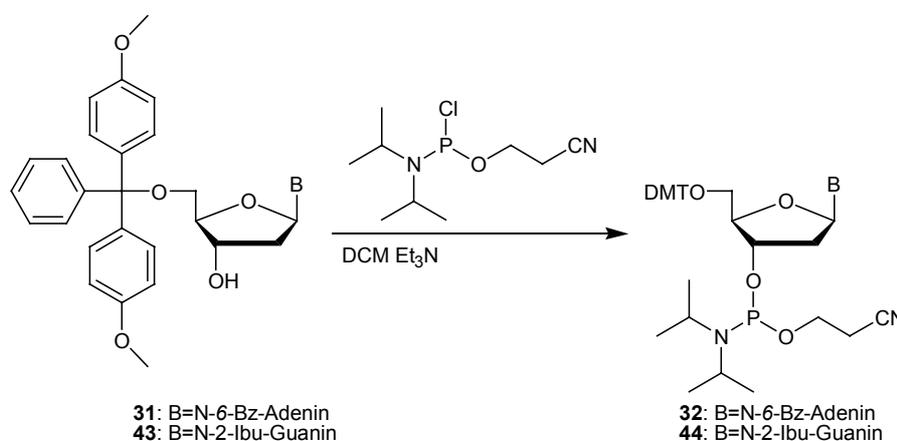


Abbildung 4.7: Die Phosphitylierung zum Phosphoamidit erfolgt bei Desoxyguanosin wie auch bei Desoxyadenosin mit einer Ausbeute von 80%.

gert werden, ohne daß es zu einem nennenswerten Abbau kommt. Trotzdem empfiehlt es sich die Amidite jeweils frisch zuzubereiten.

### 4.3 Synthese des $^{13}\text{C}_5$ -markierten Desoxyadenosinphosphoamidits

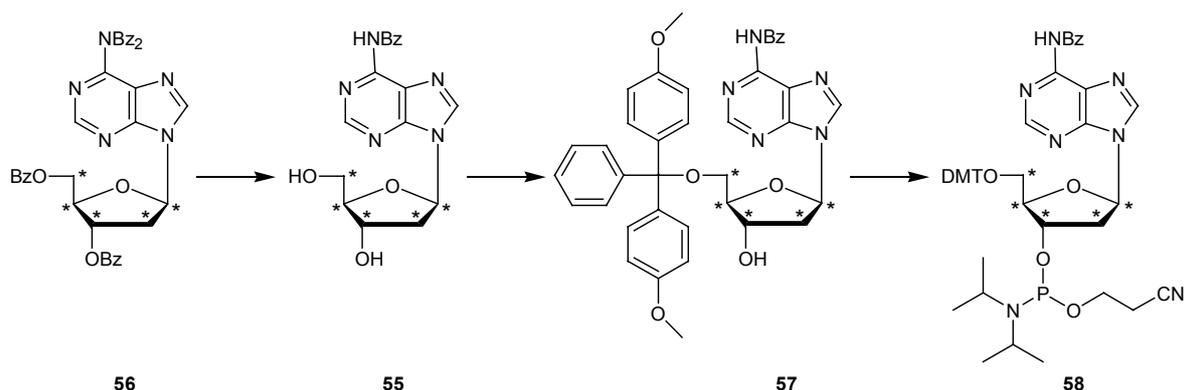
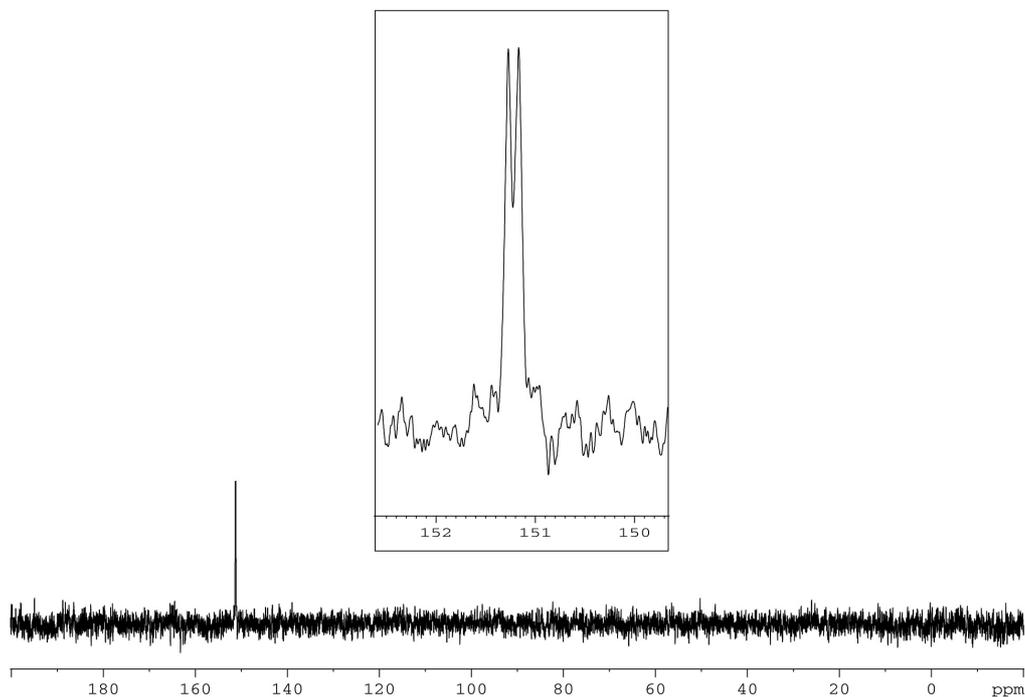


Abbildung 4.8: Die Synthese des Phosphoamidits von  $^{13}\text{C}_5$ -markiertem Desoxyadenosin wurde ausgehend von perbenzoyliertem Desoxyadenosin durchgeführt. Nach der Entschützung wurde das Rohprodukt trityliert und schließlich zum Phosphoamidit **58** umgesetzt. Die Gesamtausbeute bezogen auf **56** betrug 55%.

Von Desoxyadenosin wurden 140mg des ribosyl  $^{13}\text{C}_5$ -markierten Desoxyadenosin-Phosphoamidits **58** hergestellt. Ausgehend von perbenzoyliertem Desoxyadenosin **56** wurde die Synthese mit der selektiven Teilentschützung zum N-6-Benzoyl-Desoxyadenosin **55** begonnen. Die Reaktion wurde basenkatalysiert bei  $0^\circ\text{C}$  mit 2M NaOH-Lösung in Pyridin/Ethanol durchgeführt. Das Rohprodukt wurde direkt bei der nachfolgenden Tritylierung eingesetzt. Erfahrungsgemäß verläuft die Tritylierung von  $^{13}\text{C}$ -markierten Nucleosiden schlechter als bei unmarkierten Verbindungen. Auch bei der Schützung von  $^{13}\text{C}_5$ -markierten N-6-Benzoyl-Desoxyadenosin **55** war die Ausbeute mit 64% über 2 Stufen deutlich schlechter. Die Empfindlichkeit des Produkts zeigt sich auch in der Tatsache, daß beim Ansetzen einer NMR-Probe von 5'-DMT-N-6-Bz-Desoxyadenosin **57** mit Deuteriochloroform bereits die leichte Säure des Lösungsmittels ausgereicht hat, um das Produkt innerhalb einer knappen Minute zu zersetzen.

Die Phosphitylierung zum Phosphoamidits wurde analog der Synthese der unmarkierten Phosphoamidite durchgeführt. Die Ausbeute an **58** betrug 85%. Bei der Aufreinigung durch Flashchromatographie wurden die Diastereomere getrennt. Im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des höher laufenden Diastereomers ist deshalb jeweils nur ein Signalsatz zu erkennen, der aufgrund der C-P-Kopplung eine Dublettstruktur aufweist (siehe Abbildung 4.9). Durch Aufnahme von  $^{31}\text{P}$ -Spektren bei verschiedenen Feldstärken konnte nachgewiesen werden, daß es sich hierbei wirklich um Kopplungen und nicht um zwei verschiedene Signalsätze handelt. Die Größe der Kopplung blieb mit 17 Hz gleich, während sich Kopplung in ppm bei der  $^{31}\text{P}$ -Frequenz von 162 MHz und bei 100 MHz unterschied.

Das isotoopenmarkierte Phosphoamidit zeigte bei der Festphasensynthese keine Unterschiede zu den kommerziell erworbenen Phosphoamiditen und konnte erfolgreich in den mSox5-DNA-Duplex eingebaut werden (siehe Kapitel 7).



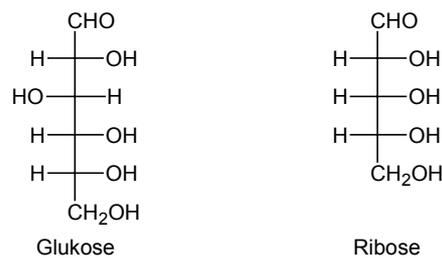
**Abbildung 4.9:**  $^{31}\text{P}$ -Spektrum des im DC-Chromatogram höher laufenden Diastereomers des  $^{13}\text{C}$ -markierten Desoxyadenosin-Phosphoamidits **58**. Durch die CP-Kopplung von 17 Hz erscheint der Phosphor als Dublett. Oxidationsprodukte, deren Signale im Bereich von 0-20 ppm im Spektrum zu sehen wären, können nicht erkannt werden.

# 5 Synthese von $^{13}\text{C}$ -markierter zweifach deuterierter Ribose

## 5.1 Syntheseplanung

Der Bedarf an isotoopenmarkierter Ribose hat in den letzten 10 Jahren zu einer Reihe von Synthesen geführt, die üblicherweise von Glukose ausgehen. Glukose ist ein günstigster Ausgangsstoff und kann inzwischen in verschiedene Qualitäten mit unterschiedlichen Markierungsmustern und verschiedenen Anreicherungsgraden kommerziell erworben werden. Dabei ist sowohl einfach, als auch mehrfach und vollständig  $^{13}\text{C}_6$ -markierte Glukose erhältlich. Außerdem ist Glukose mit verschiede-

nen Deuterierungsgraden erhältlich, wobei sowohl selektiv an einzelnen Positionen, sowie vollständig deuterierte Glukose angeboten wird. Auch vollständig  $^{13}\text{C}_6$ -markierte Glukose ist mit 50%iger und mit 97% Deuterierung kommerziell erhältlich. Von der Ribose unterscheidet sich Glukose bei der Kettenlänge des Kohlenstoffrückgrads, das bei der Glukose um ein Kohlenstoffatom länger ist und bei der Stereochemie der C-3-Position, die im Vergleich zur Ribose invertiert ist.



**Abbildung 5.1: Vergleich von Glukose und Ribose.**

Die erste Synthese vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose ausgehend von  $^{13}\text{C}_6$ -Glukose wurde 1994 von Kainosho (Ono et al., 1994) bekannt gegeben. Die eigentliche Synthese wurde allerdings nicht veröffentlicht. Es wurde nur angegeben, daß eine von Hardegger (Hardegger, 1962) entwickelte Methode verwendet wurde. Hardegger hat 1962 die basenkatalysierte Spaltung von 3'-Methylsulfonyl-glukose mit Natronlauge beschrieben, wodurch man direkt die 2-Desoxyribose erhält.

Weitere Synthesen, bei denen unterschiedliche Wege verwendet wurden, sind ebenfalls 1994 von Quant (siehe Abbildung 1.9) (Quant et al., 1994) und 1997 von Agrofoglio (Agrofoglio et al., 1997) veröffentlicht worden. Sie hatten gemein, daß die Kettenverkürzung durch eine Periodatspaltung durchgeführt wurde. Die Invertierung der C-3-Position wurde von Quant et al. durch nukleophile Substitution des Mesylats 7, von Agrofoglio et. al. durch Oxidation und anschließende Reduktion bewirkt.

Eine biochemische Methode wurde 2000 von Cromsigt und Wijmenga (Cromsigt et al., 2000) entwickelt, bei der die Enzyme des Pentosephosphat-Zyklus genutzt werden, um Glukose in Ribose umzuwandeln. In einer zweiten Stufe werden aus der Ribose enzymatisch die Nukleosidtriphosphate aufgebaut.

Einen anderen interessanten Weg verfolgt die Synthese von Tolbert und Williamson (Tolbert et al., 1996), die als einzige Synthese deuterierter Ribose von deuterierten Glycerin ausgeht. Ziel war hierbei, auf biochemischen Wege aus der ungeschützten vierfach deuterierten Ribose die Nukleosidtriphosphate zu synthetisieren. Deswegen wurde die Ribose auch nicht acylisch geschützt. Eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung wurde dabei nicht eingeführt.

Die erste Synthese von  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose mit Einführung von Deuterium wurde 1997 von Ono et al. publiziert. Dabei wurde das (5S)-Proton selektiv deuteriert. Umfangreiche Beiträge von Chattopadhyaya et al. (Foldesi et al., 1998; Trifonova et al., 1999) folgten. Dabei wurde mit zum Teil erheblichen präparativen Aufwand eine

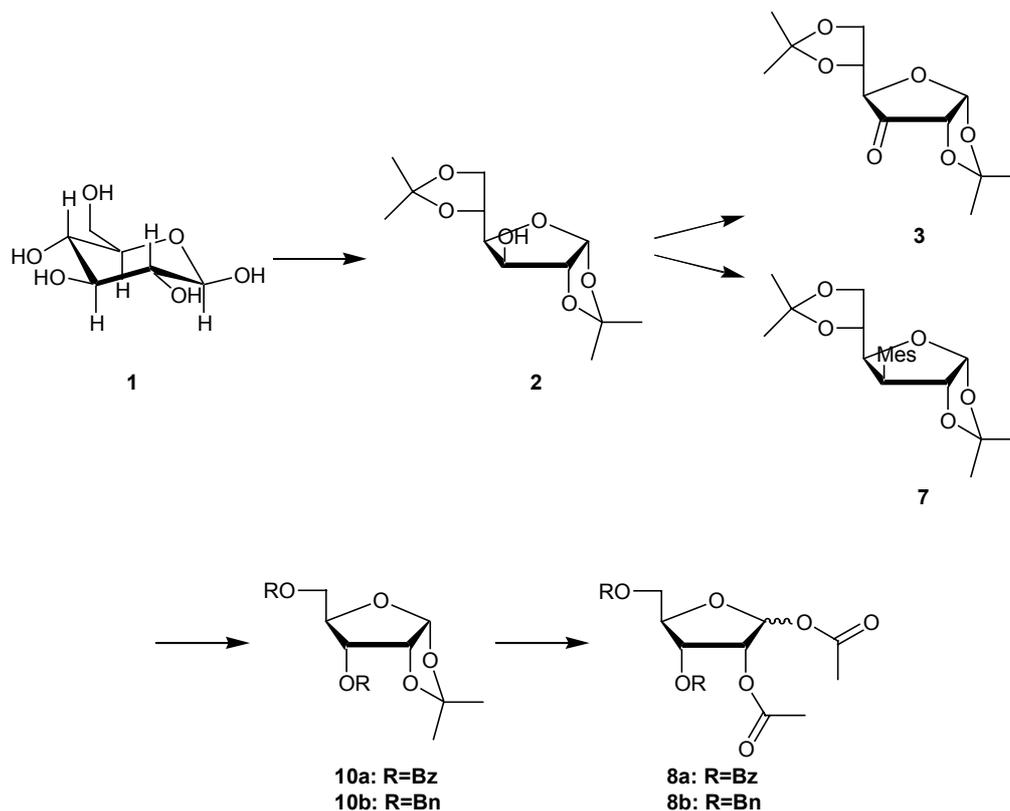


Abbildung 5.2: Die Überführung von Glukose zu Ribose beginnt mit der der Bildung von Diacetonglukose. Die Inversion von C3 kann durch die Substitution des Mesylats 7 oder über die Reduktion von des Ketons 3 gehen. Die Kettenverkürzung zu der Ribose erfolgt üblicherweise durch eine Periodatspaltung. Ein weiterer Teil der Synthese ist das Schützen der OH Gruppen durch Veresterung bzw. mit Ethern. Die einzelnen Schritte können teils in unterschiedlicher Reihenfolge durchgeführt werden.

vierfache Deuterierung erreicht.

Ausgangspunkt aller von Glukose ausgehender Synthesen ist Diacetonglukose, also das zweifache Vollacetal von Glukose mit 2 Molekülen Aceton. Dabei wird die in freier Form überwiegend als Glukopyranose vorliegende Glukose in die Furanoseform überführt, der Sechsring zum Fünfring verengt. Beide Acetale zwingen die Glucose zu einer festen Ringstruktur, bei der die 1- und 2- sowie die 5- und 6-Hydroxylgruppen jeweils cis-ständig zueinander sind. Lediglich die 3-Hydroxylgruppe ist ungeschützt und damit für die Inversion frei zugänglich.

Die Inversion kann auf verschiedenen Wegen durchgeführt werden. Bei der Synthese von Quant et al. (siehe Abb. 1.9 in Kapitel 1) wurde die mit der nukleophilen  $\text{S}_{\text{N}}1$ -Substitution einhergehende Inversion ausgenutzt. Hierzu wurde die Hydroxylgruppe zur Steigerung der Abgangsfähigkeit zuvor mit Methansulfochlorid in das Mesylat **7** überführt. In einem späteren Schritt der Synthese wurde das Mesylat **7** dann durch Tetrabutylammoniumbenzoat substituiert. Dabei wurden anfangs zwar sehr gute Ausbeuten erzielt, die aber durch Nebenreaktionen nicht durchgängig erreicht werden konnten. In wechselnden Anteilen kam es zu der Eliminierung, sowie zu der Bildung des 2,3-Epoxids. Die Ausbeute wurde dadurch erheblich reduziert. Trotz intensiver Untersuchung konnte keine Ursache für die Nebenreaktionen gefunden werden. Auch Agrofoglio et al. haben den Syntheseweg von Quant untersucht, ohne allerdings deren Ausbeuten erreichen zu können.

Eine andere Möglichkeit der Invertierung der 3-Position ist die Oxidation zum Keton mit anschließender stereoselektiver Reduktion. Dabei wird bei der Reduktion die sterische Abschirmung des  $\alpha$ -Halbraumes durch die 1,2-O-Isopropylidengruppe ausgenutzt. Der Angriff des Hydrids bzw. des Deuterids kann deshalb nur aus dem  $\beta$ -Halbraum erfolgen.

Der Abbau der C-6-Gruppe zur Ribose wird durch eine Periodatspaltung bewirkt. Die Reaktion kann entweder mit  $\text{NaIO}_4$  in Wasser oder durch  $\text{H}_5\text{IO}_6$  in Essigester durchgeführt werden. Bei letzterer Methode kann auch das 5,6-Acetonid eingesetzt werden. Ohne die säureinduzierte Öffnung des Acetals kann auf einen Reaktionsschritt verzichtet werden.

### 5.1.1 Wahl der Schutzgruppen

Entscheidend für die Synthese ist die Wahl der Schutzgruppen. Maßgeblich ist dabei die spätere Verwendung der Ribose bei der Glykosylierung der Nucleoside (siehe Kapitel 2). Bei der Verwendung der Vorschriften von Vorbrüggen bzw. von Dudycz ist zum Schutz der 1- und der 2-Hydroxylgruppen eine Acylgruppe notwendig, da nur so die nötige Stereoselektivität erreicht werden kann. Dabei wird durch den Friedel-Crafts Katalysator der Ester an der 1-Position als Anion abgespalten. Mit Hilfe der Carbonylgruppe des Esters der 2-Position wird ein zyklischer, positiv geladener Übergangszustand gebildet, der einen dirigierenden Nachbargruppeneffekt ausübt. Die Base kann daher nur von der  $\alpha$ -Seite angreifen. Üblicherweise werden die 1- und der 2-Hydroxylgruppen durch Acetylgruppen geschützt. Die Veresterung wird dabei mit Acetylchlorid bzw. mit Essigsäureanhydrid durchgeführt.

Für die 3- und die 5-Hydroxylfunktionen gibt es mehrere Möglichkeiten. Benzoylgruppen haben sich bei mehreren Synthesen sehr gut bewährt. Als Benzoylchlorid können sie sehr gut eingeführt werden. Durch ihre Säurestabilität sind sie auch für die nachfolgenden Schritte der Ribosesynthese geeignet. Nach der Glykosylierung können sie durch Verseifung schonend vom Nucleosid abgespalten werden.

Etherschutzgruppen wie z. B. die Benzylgruppe sind ebenfalls quantitativ einföhrbar. Da sie auch gegen Basen stabil sind, haben sie den Vorteil, daß eine selektive Entschützung der 2-Position unter Beibehaltung der Schutzgruppen an der 3- und der 5-Position möglich ist, vorausgesetzt, die 2-Hydroxylgruppe ist durch die Acetyl-schutzgruppe geschützt. Sowohl bei der RNA-Synthese als auch bei der DNA-Synthese ist dies von Vorteil. Bei der Synthese des RNA-Phosphoamidits kann so die Schützung der 2-Position ohne Konkurrenzreaktion mit der 3-Position erfolgen. Bei der Synthese von DNA-Bausteinen kann auf die sonst im Rahmen der Deoxygenierung notwendige Schützung der 3- und der 5-Position durch die TPDS-Schutzgruppe nach Markiewicz verzichtet werden (siehe Kapitel 3). Die Stabilität der Etherschutzgruppen ist aber auch ihr Nachteil, da die Entschützung bei den Purin-Nucleosiden nur äußerst unbefriedigend verläuft. Unter den Reaktionsbedingungen der Entschützung durch Hydrierung mit Wasserstoff an Palladium/Kohlenstoff

wird auch die Purin-Base angegriffen. Die Ausbeuten sind dadurch unbefriedigend (Müller, 1996; Chen et al., 1998).

Da die Ribose auch für die Synthese von Purinnukleosiden eingesetzt werden soll, ist die schwierige Entschützung ein schwerwiegendes Argument. Darüber hinaus ist der Vorteil der Etherschutzgruppen bei der Synthese der DNA-Bausteine gering, da die TPDS-Schutzgruppe je nach Nukleosid erfahrungsgemäß in Ausbeuten von 75-95% eingeführt werden. Dadurch kamen die Etherschutzgruppen nicht mehr in Frage. Bisher wurde bei der Synthese von  $^{13}\text{C}$ -markierten Nukleosiden 3,5-Benzoyl-1,2-Acetyl-geschützte Ribose verwendet (siehe Kapitel 2). Die Reaktionen wurden darauf abgestimmt. Durch Beibehaltung des Schutzgruppenmuster konnten die Reaktionen in gewohnter Weise fortgeführt werden.

### 5.1.2 Einführung der Deuterierung

Deuterium kann in Zucker auf verschiedene Weise eingeführt werden. Bei wasserlöslichen Zuckern kann unter Katalyse von Raney-Nickel Wasserstoff an primären und sekundären Alkoholen durch Deuterium ersetzt werden. Dazu wird der Zucker zusammen mit Raney-Nickel für 2-100 Stunden in  $\text{D}_2\text{O}$  erhitzt. Die Ausbeuten dieser eher drastisch anmutenden Methode sind allerdings unveröffentlicht (Koch, 1977; Koch et al., 1977).

Eine bequeme Möglichkeit zu deuterieren ist die Verwendung von Natriumbordeuterid an Stelle von Natriumborhydrid bei den Reduktionsschritten. Dadurch kann Deuterium ohne zusätzliche Schritte verlustfrei an der 3- und der 5-Position eingeführt werden. Die 5-Position kann allerdings mit  $\text{NaBD}_4$  nur unselektiv deuteriert werden, da die Reduktion des Aldehyds nicht stereoselektiv verläuft.

Andere Reduktionsmittel, wie  $\text{LiAlH}_4$  sind bei der Deuterierung der 5-Position ebenfalls unselektiv (Oogo et al., 1998). Durch Zugabe von  $\text{LiI}$  und oder t-Amyl-Alkohol kann die Stereoselektivität zwar erhöht werden. Die Stereoselektivität ist allerdings an einen Nachbargruppeneffekt der durch eine Benzylgruppe geschützten 3-OH-Gruppe gebunden, der bei der vorgesehenen gleichzeitigen Reduktion der 3- und der 5-Position nicht ausgenutzt werden kann.

Eine selektive Deuterierung der 5-Position bietet die Reduktion mit Grignard-Reagenzien, wie [2- $\text{D}_1$ ]-Isobornylmagnesiumbromid. Dabei koordiniert sich das Magnesium im Grignardaddukt so an die benachbarten Sauerstoffatome, daß das Deuterium ausschließlich von der *si*-Seite aus auf die Aldehydgruppe übertragen wird. Für die Reduktion der 3-Ketogruppe wurden die Grignard-Reagenzien bislang nicht eingesetzt.

Schwieriger ist die Substitution des 2- und des 4-Protons. Das 4-Proton wurde erstmals von Perlin (Ritchie et al., 1975) unter Ausnutzung der Keto-Enol-Tautomerie bei 1,2:5,6-Di-*O*-Isopropyliden-glucos-3-ulose, also dem 3-Keton der Diacetonglukose durch Deuterium ersetzt. Dazu wurde die 1,2:5,6-Di-*O*-Isopropyliden-glucos-3-ulose mehrfach in einer 20%Pyridin/ $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung erhitzt. Der Deuterierungsgrad wurde mit 95% angegeben. Allerdings wurde keine Ausbeute genannt. Chattopadhyaya (Trifonova et al., 1999) hat diese Methode ebenfalls ausprobiert und Ausbeuten von 50% erreicht, während Kainosho (Ono et al., 1998) auf dem selben Weg eine Ausbeute von 93% erreicht haben will. Chattopadhyaya hat darauf die Deuterierung unter Ausnutzung der Enolisierung des 5-Aldehyds durchgeführt. Nach 22-tägigem Erhitzen des in  $\text{D}_2\text{O}$ /Pyridin 1:1 gelösten Zuckers auf  $50^\circ\text{C}$  konnte der deuterierte Zucker mit einer Ausbeute von 77 % und einem Deuterierungsgrad von 97% erhalten werden.

Nach mehreren Voruntersuchungen wurde deshalb auf eine Deuterierung der 4-Position verzichtet, da die Vorteile der Deuterierung die Ausbeuteverluste nicht aufwiegen. Außerdem bietet das 4-Proton einen interessanter Ausgangspunkt für NMR-Experimente, der durch eine Deuterierung verloren ginge.

Ebenfalls nur durch größeren präparativen Aufwand kann das 2-Proton gegen Deuterium ausgetauscht werden. Chattopadhyaya hat es durch Oxidation und anschließende stereoselektive Reduktion der C2-Alkoholfunktion erreicht.

Der Anlaß für die Deuterierung ist neben der Reduktion der Signalüberlagerung vor allem die Verlangsamung der  $T_2$ -Relaxationszeiten der besonders schnell relaxierenden Methylengruppen. Desoxynukleoside enthalten 2 Methylengruppen am C2 und am C5-Kohlenstoffatom. Die 5-Methylengruppe kann durch die unselektive Reduktion mit  $\text{NaBD}_4$  leicht deuteriert werden. Bei der 2-Methylengruppe kann im Rahmen

der Deoxygenierung der Nucleoside zu den Desoxynucleosiden durch Verwendung von Tributylzinndeuterid stereoselektiv die 2''-Position deuteriert werden. Eine Deuterierung der 2-Position der Ribose ist deshalb zur Verbesserung der Relaxationseigenschaften nicht notwendig.

Der Vollständigkeit halber sollte noch erwähnt werden, daß das 1-Proton als Ausgangspunkt für zahlreiche NMR-Experimente dient und deshalb nicht deuteriert werden sollte. Andernfalls könnte die Synthese auch von der inzwischen kommerziell erhältlichen volldeutierten  $^{13}\text{C}$ -Glukose ausgehen. Die Möglichkeit Deuterium selektiv an den gewünschten Positionen einzuführen ist der große Vorteil der chemischen Synthese von Nucleosiden gegenüber der biochemischen Synthese. Biochemisch hergestellte Nucleoside sind entweder überhaupt nicht oder aber vollständig deuteriert.

Nach Abwägung der Vorteile, die eine Deuterierung der einzelnen Positionen bringt und des synthetischen Aufwands der dazu erforderlich ist, wurde nur die Deuterierung der 3- und die unselektive Deuterierung der 5-Position angestrebt. Die unselektive Deuterierung der 5-Position bietet den Vorteil, daß durch die Restsignale beider Protonen Informationen von beiden 5-Protonen erhalten werden können.

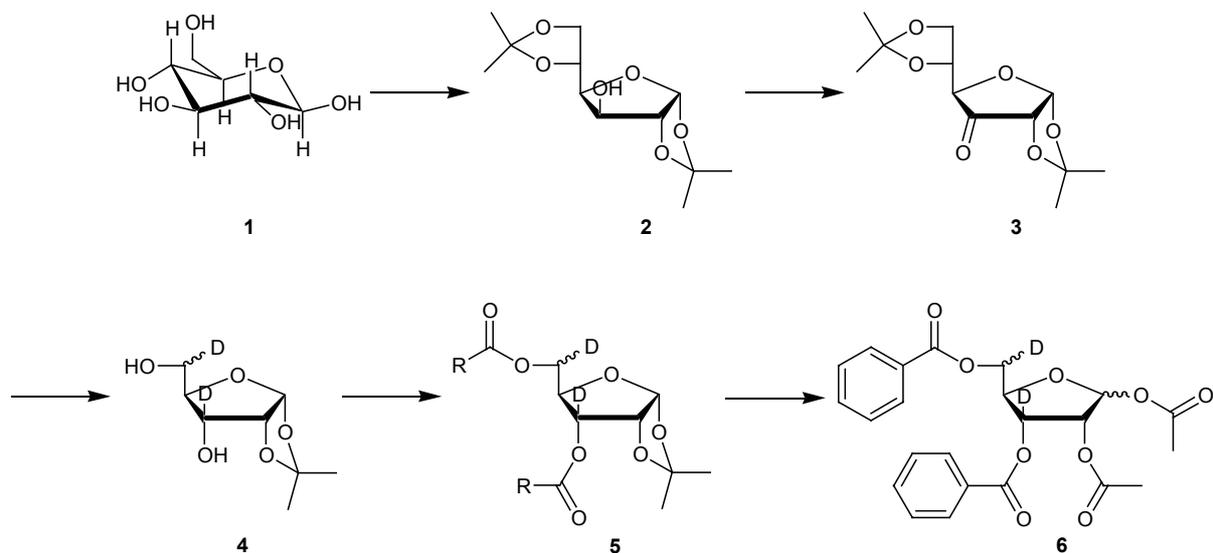


Abbildung 5.3: Die Synthese der Ribose gliedert sich in 4 Stufen. Nach der Schützung zur Diacetonglukose erfolgt die Oxidation des C3. Der Keton 3 wird im 3. Schritt zur Pentose abgebaut und zur Deuterierung mit  $\text{NaBD}_4$  reduziert. In den letzten beiden Stufen erfolgt die Benzoylierung der 3- und der 5-OH-Gruppe und nach Öffnung des Acetals die Acetylierung der 1- und der 2-OH-Gruppe.

Mit der während der Deoxygenierung möglichen Deuterierung der 2''-Position sind alle Methylengruppen im Desoxynukleosid einfach deuteriert. Die erwünschte Verbesserung der Relaxationszeiten sollte damit gewährleistet sein. Die geplante Synthese ist in Abb. 5.3 dargestellt.

## 5.2 Durchführung der Synthese

### 5.2.1 Schützung zu Diacetonglukose

Die Bildung der Diacetonglukose **2** ist der erste Schritt der Synthese. Die Reaktion wurde im Laufe der letzten Jahrzehnte mehrfach untersucht. Da die Bildung von Acetalen eine Gleichgewichtsreaktion ist, kann kein vollständiger Umsatz des eingesetzten Edukts erwartet werden. Als Katalysatoren werden z. B.  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{I}_2$  oder  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /Ultraschall verwendet. Am erfolgversprechendsten erscheint die Methode von Glen und Myers (Glen et al., 1951), die mit  $\text{ZnCl}_2$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Katalyse arbeitet. Bei der Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit einer 25M NaOH-Lösung neutralisiert. Die dabei laut Stevens (Stevens, 1975) mögliche Hydrolyse einer der beiden Acetonide kann durch Verwendung von ges.  $\text{NaCO}_3$ -Lösung verhindert werden. Als Nebenprodukt wird bei der Reaktion ein Teil des eingesetzten Edukts zurückgewonnen. Je nach Umsetzungsgrad sind die zu erwartenden Produktmengen sehr verschieden. Das zurückgewonnene Edukt ist zudem stark mit anorganischen Verunreinigungen versetzt und reagiert bei der erneuten Umsetzung nicht so gut wie die ursprüngliche Glukose. Deswegen sind die Ausbeuten der verschiedenen Methoden schlecht zu vergleichen.

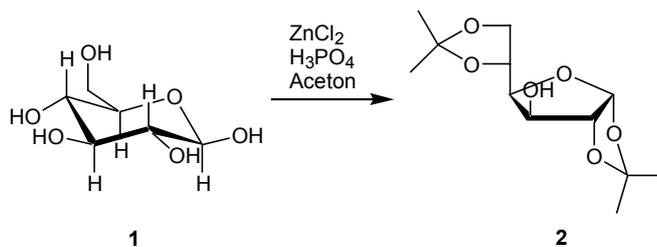


Abbildung 5.4: Bildung von Diacetonglukose.

Nachdem Quant in ihrer Synthese isotopenmarkierter Ribose eine modifizierte Version der Methode von Glen und Myers ausgearbeitet hat, bei der die Neutralisation ähnlich Stevens Vorschlag mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung durchgeführt wird, und damit Ausbeuten von 95% bei einem Umsatz von bis zu 83% erreichen konnte, wurde dieser Ansatz weiterverfolgt. Allerdings wird statt der hochviskosen und dementsprechend schlecht abzumessenden 85%igen Phosphorsäure die entsprechende Menge kristallines  $\text{H}_3\text{PO}_4$  eingesetzt. Während der 36stündigen Reaktionsdauer wird die Suspension fast klar. Bei der DC-Kontrolle ist auch kein gelöstes Edukt mehr zu erkennen. Eine Filtrierung der Reaktionslösung wird lediglich durchgeführt, da es erfahrungsgemäß bei dem Abziehen des Acetons unter Vakuum zu heftigem Schäumen kommt. Die geklärte Lösung ist wesentlich besser einzuengen. Der Filtrerrückstand beträgt nur wenige 100 mg und ist fast ausschließlich anorganisch. Bei der Neutralisation wird wie bei Glen und Myers  $\text{NaOH}$ -Lösung verwendet. Dabei kann keine Hydrolyse zur einfach geschützten 1,2-Isopropyliden-glukose beobachtet werden. Allerdings wird nur eine 5 N Natronlauge eingesetzt, während Glen und Myers mit 25 N Natronlauge gearbeitet haben.

Bereits das erhaltene Rohprodukt ist elementaranalysenrein. Eine Aufreinigung mit Flashchromatographie kann deshalb unterbleiben. Die Ausbeute beträgt 97%, bei vollständigem Umsatz. Weshalb die Reaktion besser läuft, als in der Literatur angegeben, konnte nicht ermittelt werden. Die versuchsweise Verwendung von 85 % Phosphorsäure statt der kristallinen Phosphorsäure ergab identische Ergebnisse. Offen bleibt, ob mit 5 N Natronlauge das optimale Neutralisationsmittel gefunden wurde, da keine anderen Neutralisationsmittel überprüft wurden.

### 5.2.2 Oxidation des C3

Für die Oxidation der Diacetonglukose **2** zur 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glucofuranose **3** wurden schon zahlreiche Oxidationsmittel verwendet. Als Beispiel seien nur Pyridinium/Chromat (PDC) und die Swern-Oxidation genannt. Dabei sind in der Literatur für die Pyridinium/Chromat-Oxidation Ausbeuten von 83% bis 97% bei Verwendung von PDC/Essigsäure zu finden. Mit der Swern-Oxidation erreicht man je nach Oxidationsmittel lediglich Ausbeuten von 60-70% (Jones et al., 1972; Hodosi, 1994). Angesichts der allgemein guten Erfahrungen mit Dess-Martin-Oxidationen wurde der Versuch unternommen, die Diacetonglukose mit dem Dess-Martin-Periodinan zu oxidieren. Das Oxidationsmittel kann in 2 Stufen auch in größeren Mengen leicht hergestellt werden (Ireland et al., 1993) bzw. ist in Dichlormethan gelöst kommerziell erhältlich. Die Oxidation ist einfach durchzuführen. Außerdem fällt weder giftiger Schwermetallabfall wie bei Chromat-Oxidationen an, noch kommt es, wie bei der nur mäßige Ausbeuten liefernden Swern-Oxidation, zu starker Geruchsbelästigung.

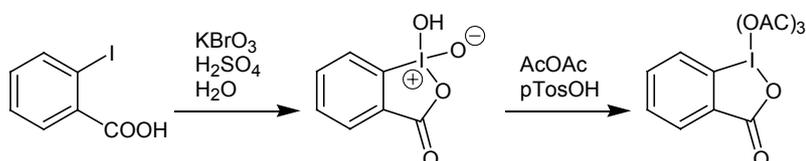


Abbildung 5.5: Darstellung des Dess-Martin Periodinan ausgehend von Iodbenzoesäure.

Für die Dess-Martin-Oxidation wurde ein Standard-Protokoll für die Oxidation von sekundären Alkoholen verwendet (Dess et al., 1991). Die Reaktivität des Oxidationsmittels kann durch Zugabe weniger Tropfen Wasser erhöht werden (Meyer et al., 1994). Durch die Feuchtigkeit kommt es zur teilweisen Abspaltung der Acetylgruppen im Periodinan. Bei der Reaktion erhält man ein Rohprodukt mit 95% Ausbeute, das bereits weitgehend sauber ist. Die Abbauprodukte des Oxidationsmittels verbleiben bei der Aufarbeitung in der wässrigen Phase und können einfach abgetrennt werden. Schwerlöslicher Niederschlag, wie bei der PDC-Oxidation fällt dabei nicht

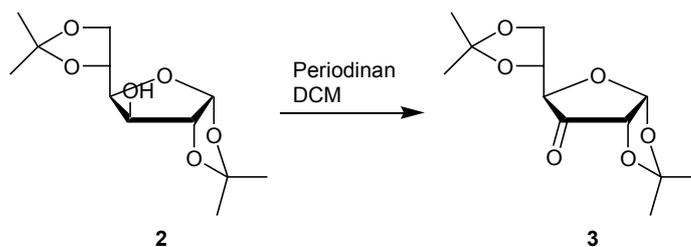


Abbildung 5.6: Dess-Martin-Oxidation von Diacetonglukose 2.

an. Das Reinprodukt erhält man durch Aufreinigung mittels Flashchromatographie mit einer Ausbeute von 88%. Da diese gute Ausbeute von Beginn an mit großer Regelmäßigkeit erreicht werden konnte, wurde davon abgesehen durch Verwendung anderer Oxidationsmittel eine weitere Ausbeutesteigerung durchzuführen.

### 5.2.3 Periodatspaltung und Reduktion zur 1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 4

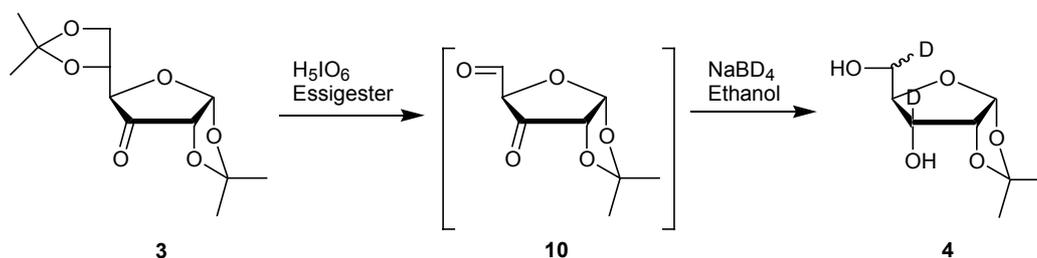
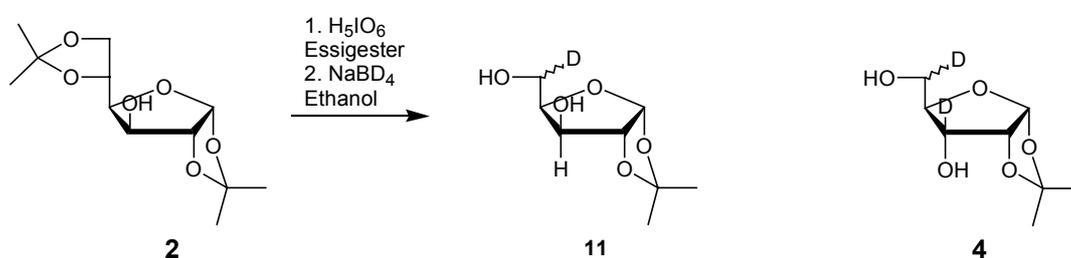


Abbildung 5.7: Bei der Periodatspaltung mit  $\text{H}_5\text{IO}_6$  kann das zweifache Vollacetal 3 eingesetzt werden. Nach der Kettenverkürzung zur Pentose erfolgt direkt die Reduktion des Intermediats 10 zu 4, bei der die Deuterierung eingeführt wird.

Die Periodatspaltung wurde bei früheren Synthesen häufig nach vorheriger säurekatalysierter Öffnung des 5,6-Acetonids mit  $\text{NaIO}_4$  in Wasser durchgeführt. Die selektive Öffnung des 5,6-Acetonids ist mit 80%iger Essigsäure möglich, wobei die größere Basizität der 5-Position ausgenutzt wird. 1996 veröffentlichte Robins (Xie et al., 1996) eine Methode bei der das Diacetonid in Essigester mit  $\text{H}_5\text{IO}_6$  oxidiert wird. Das bei der Reaktion entstehende  $\text{NaIO}_3$  fällt aus, wodurch die anfangs trübe Reaktions-

lösung klar wird. Der Reaktionsverlauf kann so optisch nachverfolgt werden. Die Reaktionslösung mit dem Rohprodukt wird durch Celite abgesaugt und eingengt. Die nur allgemein veröffentlichte Reaktionsvorschrift konnte mit kleinen Änderungen nachvollzogen werden. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, den Essigester vor der Reaktion mit Alox N zu trocknen. Weiterhin hat es sich als sinnvoll erwiesen, das im Überschuß eingesetzte und deshalb bei Reaktionsende noch teilweise in der Lösung vorliegende Periodat, durch Zugabe von Ethylenglykol abzubauen. Die Reaktionslösung wird zur besseren Abtrennung des ausgefallenen  $\text{NaIO}_3$  bei der Aufarbeitung von Celite abgesaugt und unter Vakuum eingengt.



**Abbildung 5.8:** Bei der Periodatspaltung von Diacetonglukose entsteht 1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-arabinofuranose 11. Sie bildet das Epimer zu 1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 4

In der 2. Stufe der Reaktion erfolgt die stereoselektive Reduktion mit NaBD<sub>4</sub>. Diese kann direkt mit dem Rohprodukt der Periodatspaltung in abs. Ethanol durchgeführt werden. Das Reduktionsmittel kann bei kleinen Ansätzen direkt als Pulver zugegeben werden oder wird in Ethanol gelöst langsam zugegeben. Bei der ursprünglichen Vorschrift von Robins wird das Produkt bei der Aufarbeitung mit Essigsäure versetzt, eingengt und in Wasser/Dichlormethan aufgenommen. Nach Trennung der Phasen soll es in der organischen Phase gelöst sein, tatsächlich war das Produkt überwiegend in der wässrigen Phase gelöst. Frühere Ansätze von Wolter (Wolter, 1992), durch Soxlett-Extraktion das Produkt in die organische Phase zu ziehen, wurden nicht weiterverfolgt. Statt dessen wurde die organische Phase dreimal mit Wasser extrahiert, um die vereinigte wässrige Phase zu lyophilisieren. Dabei wurden die Erfahrungen aus der Synthese von Nucleosiden genutzt, daß die Benzoylierung von gefriergetrockneten wässrigen Phasen sehr gut durchzuführen ist. Durch die

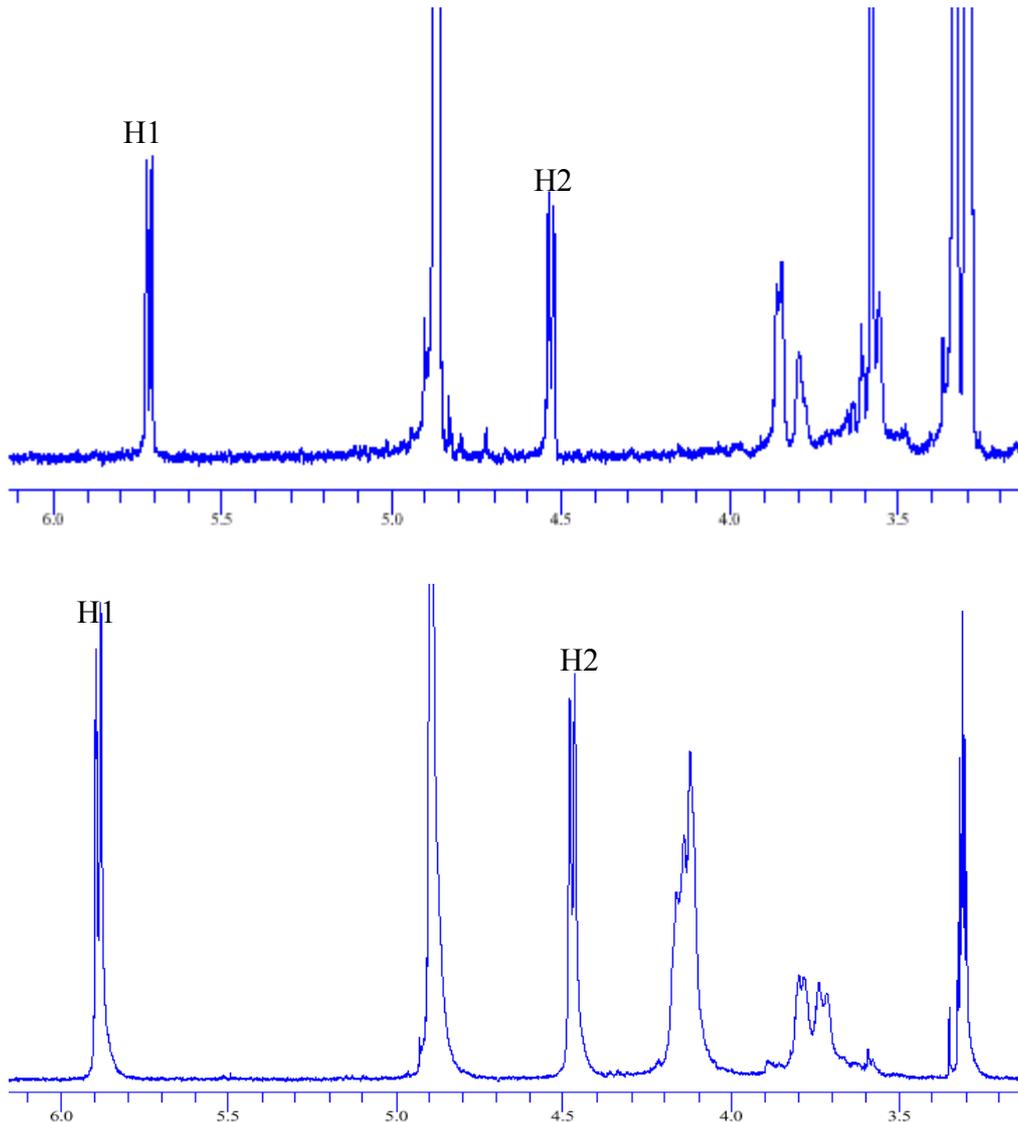


Abbildung 5.9: NMR-Spektrum von 1,2-Isopropyliden-3,5- $\text{D}_2$ -ribofuranose **4** (oben) und 1,2-Isopropyliden-5-D-arabinofuranose **11** in MeOD. Das 1-Proton ist bei 4 um 0,15 ppm auf 5,72 ppm hochfeldverschoben.

Benzoylierung wird die Verbindung sehr viel unpolarer, so daß eine Aufreinigung durch Flashchromatographie ermöglicht wird.

Die Optimierung der Periodatspaltung wurde unter anderem an Diacetonglukose durchgeführt. Einer der Gründe war die leichtere Zugang zu Diacetonglukose. Bei der Reaktion erhält man 1,2-Isopropyliden-5-D-arabinofuranose **11**, die sich von der 1,2-Isopropyliden-3,5- $\text{D}_2$ -ribofuranose **4** durch die stereochemische Konfiguration an der 3-Position unterscheidet. Die 3-Position ist bei der Arabinofuranose **11** außerdem nicht deuteriert.

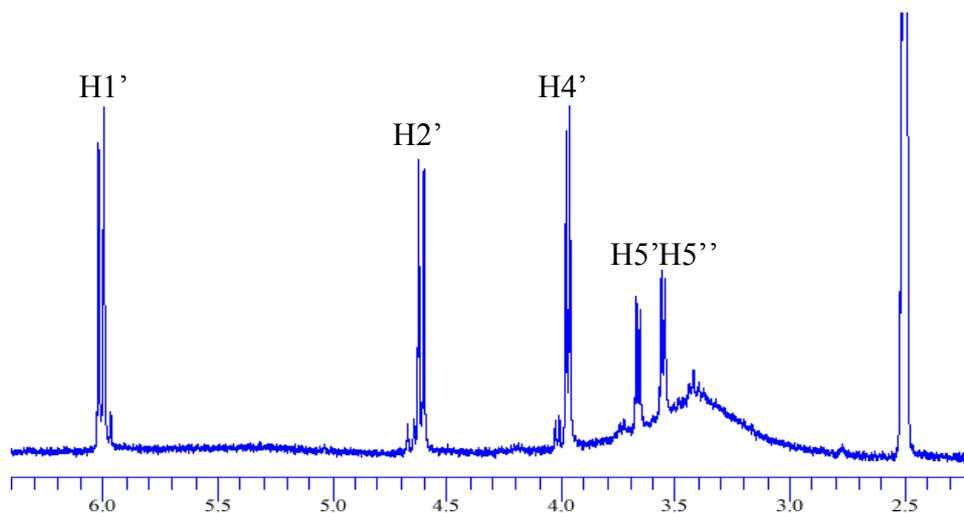
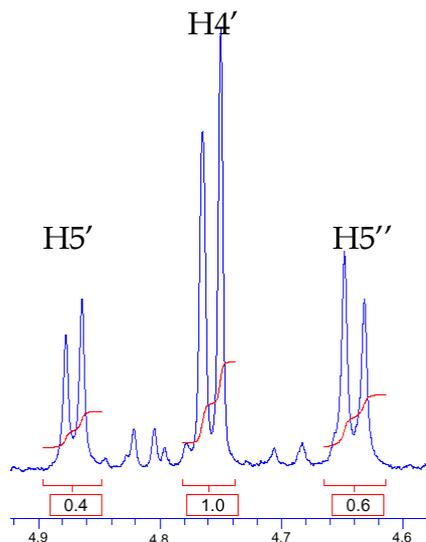


Abbildung 5.10:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von *N*-6-Bz-D<sub>2</sub>-Adenosin in DMSO. Durch die Deuterierung ist das Signal des H3', das bei 4,2 ppm erscheint bis auf ein Grundrauschen verschwunden. Das Signal des 2'-Protons ist nach dem Wegfall der 5,3 Hz großen Kopplung mit dem 3'-Proton ein Duplett. Auch das Signal des 4'-Protons ist zu einem Duplett reduziert, da nach Deuterierung des 3'- und einem der 5'-Wasserstoffe nur noch ein Kopplungspartner vorhanden ist.

Zur Kontrolle der Stereoselektivität der Reduktion der 3-Position mit  $\text{NaBD}_4$  mußte eine geeignete Methode gefunden werden. Durch Vergleich der NMR-Spektren von 1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose **4** und 1,2-Isopropyliden-5-D-arabinofuranose **11** konnte gezeigt werden, daß die Reduktion der 3-Position stereoselektiv verläuft. Die Signale der 1-Protonen unterscheiden sich um 0,15 ppm und sind daher ein sicheres Unterscheidungsmerkmal. In den NMR-Spektren der zahlreichen durchgeführten Reduktionen konnte in der Regel kein Restsignal des Epimers entdeckt werden. An der 3-Position selbst, kann man die Stereoselektivität der Reduktion im NMR-Spektrum durch die Deuterierung mangels Signal nicht erkennen. Der Deuterierungsgrad kann in den NMR-Spektren der Ribose durch die Überlagerung mit dem H4 nicht überprüft werden. In den NMR-Spektren von *N*-6-Benzoyl-Adenosin sind die Signale der Protonen allerdings gut aufgelöst. Das Restsignal des H-3' geht nahezu im Grundrauschen unter, wodurch auf eine quantitative Deuterierung geschlossen werden kann. Der Grund für die Stereoselektivität der Reduktion des Ketons liegt in dessen sterischen Abschirmung durch die 1,2-Isopropyliden-Gruppe. Das  $\text{NaBD}_4$  bildet zusammen mit dem Lösungsmittel Ethanol Natriumtriethoxybor-

deuterid, das durch seine Sperrigkeit die Carbonylfunktion nur von der  $\beta$ -Seite des Zuckers angreifen kann.

Die 5-Protonen werden unselektiv deuteriert. Der bei der Periodatspaltung entstehende Aldehyd ist sterisch nicht ausreichend blockiert, um eine deutlich bevorzugte Reaktionsrichtung zu bewirken. Durch Vergleich der Intensitäten in NMR-Spektren erkennt man, daß die Reduktion mit einem Verhältnis von etwa 60/40 stattfindet.



**Abbildung 5.11:** Ausschnitt des Bereichs der 4' und 5'-Protonen von 3',5'-deuteriertem Tribenzoyl-acetyl-Adenosin **24**. Durch die Deuterierung bildet das 4'-Proton ein Duplett. Die Integration der 5'-Protonen ergibt eine Selektivität der Deuterierung von etwa 6:4.

Das Rohprodukt enthält größere Mengen anorganischer Nebenprodukte, wodurch es nur schlecht löslich ist. Eine Aufreinigung des Rohprodukts der Periodatspaltung scheiterte an der schlechten Löslichkeit. Eine Aufreinigung mit Flashchromatographie war deshalb nur unter großen Verlusten durchzuführen. Deswegen wurde versucht das Rohprodukt zu benzoylieren und erst danach aufzureinigen.

#### 5.2.4 Benzoylierung der 3,5-Position

Durch die zweifache Benzoylierung wird die Löslichkeit von 1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose **4** wesentlich erhöht. Obwohl das Rohprodukt der Reduktion im NMR-Spektrum eindeutig ist, konnte die Benzoylierung zunächst nur sehr schlecht

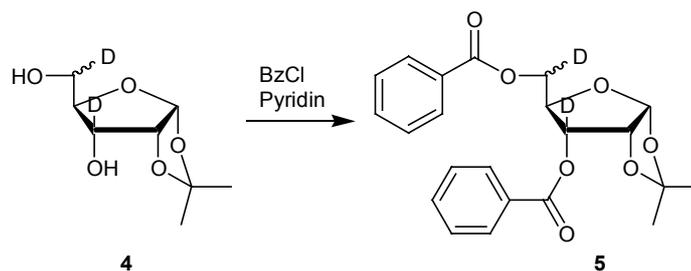


Abbildung 5.12: Benzoylierung von 1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 4

durchgeführt werden. Bei der Reaktion entstanden 2 Produkte, die nur unbefriedigend getrennt werden konnten. Deshalb wurde die Aufarbeitung der Reduktion überarbeitet. Statt der Hydrolyse mit Essigsäure wird die Reaktionslösung zur Aufarbeitung mit Aceton und Wasser versetzt. Außerdem wird die wässrige Lösung vor dem Lyophilisieren mit 0.5M HCl neutralisiert, wodurch bei der nachfolgenden Benzoylierung ein einheitliches Produkt erhalten wird.

Die Benzoylierung des Rohproduktes der Reduktion findet mit Benzoylchlorid in Pyridin statt. Während der Reaktion löst sich das Edukt weitgehend auf. Die anorganischen Anteile des eingesetzten Rohproduktes sind zusammen mit dem bei der Reaktion ausfallenden Pyridiniumchlorid als unlöslicher Bodensatz erkennbar. Nach der Aufarbeitung erhält man ein Rohprodukt, das mittels Flashchromatographie aufreinhigt wird. Die Ausbeute an 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 5 liegt über 2 Stufen bei 70%.

### 5.2.5 Acetylierung zur 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-O-acetyl-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose

Nach der Benzoylierung zu der 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 5 muß noch das 1,2-Acetonid abgespalten werden und die freien Hydroxylgruppen durch Acetylgruppen geschützt werden. Während in anderen Synthesen

dies in 2 Stufen gemacht wurde, hat bereits Quant eine Eintopfmethode verwendet, bei der die säurekatalysierte Entschützung und sofortige Veresterung unter Katalyse von konz. Schwefelsäure mit Acetanhydrid in konz. Essigsäure ablaufen (Sowa, 1972). Die Anleitung von Quant wurde weitgehend übernommen. Allerdings wurde bei der Optimierung dieser Synthese die Aufarbeitung modifiziert, da es sich gezeigt hat, daß die Neutralisation des zuvor eingeeengten und in Dichlormethan aufgenommen Ansatzes mit ges. Hydrogencarbonatlösung nur unter heftigem Schäumen möglich ist, da der Ansatz noch zu große Mengen Essigsäure enthält. Deshalb wurde

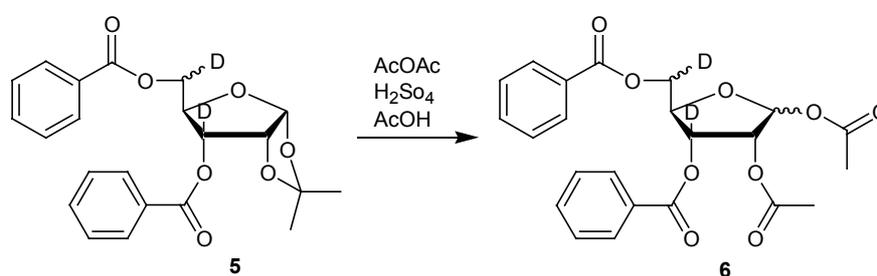


Abbildung 5.13. Die Öffnung des Acetals und die nachfolgende Acetylierung werden als Eintopfreaktion durchgeführt.

auf den Neutralisationsschritt verzichtet und die verbleibende Essigsäure später im Vakuum abgezogen bzw. beim Aufreinigen mittels Flashchromatographie abgetrennt. Da die spätere Glykosylierung unter Säurekatalyse abläuft, wäre sogar eine Restmenge Essigsäure im Produkt tolerierbar. Die Ausbeute der Acetylierung beträgt 85%, wobei man ein Gemisch der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isomere erhält.

Die Gesamtausbeute der Synthese beträgt 45 % über 5 Stufen. Bei der Glykosylierung der 3,5-Di-*O*-Benzoyl-1,2-*O*-acetyl-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 6 mit *N*-6-Benzoyladenin 23 zum 3',5'-deuterierten Tribenzoylacetyl-adenosin 24 konnten keine Unterschiede zu Glykosylierungen mit anderen Ribosequellen bemerkt werden. Die Ausbeute der Glykosylierung beträgt zum Beispiel bei Adenosin wie üblich ca. 88 % (siehe Kapitel 2).

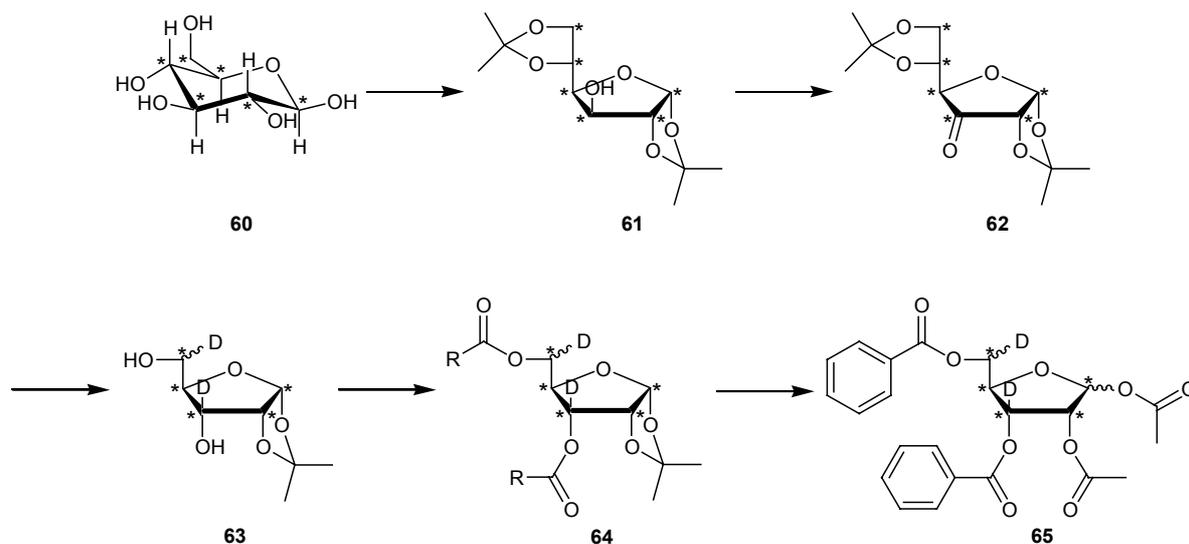
5.3 Synthese von  $^{13}\text{C}$ -markierter zweifach deuterierter Ribose

Abbildung 5.14: Die Umwandlung von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose 60 zu zweifach deuterierter acylgeschützter Ribose 65 findet in 5 Stufen statt. Die Gesamtausbeute beträgt 45%

Nachdem die Synthese von acylierter und zweifach deuterierter Ribose ausgehend von Glukose erfolgreich ausgearbeitet war, wurde sie ausgehend von 2g  $^{13}\text{C}_6$ -markierter Glukose 60 durchgeführt. Dabei wurden die üblichen Ausbeuten erreicht. Es wurden keine Unterschiede zu den Reaktionen mit unmarkierten Verbindungen festgestellt. Bei der Synthese wurden 1,4 g 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-O-acetyl-3,5-D<sub>2</sub>- $^{13}\text{C}_5$ -Ribose 65 hergestellt. Dabei wurden von den Zwischenstufen jeweils Proben von 30-50mg zurückbehalten. Bei den vorangegangenen Synthesen hat sich gezeigt, dass einzelne Zwischenstufen wie z. B.  $^{13}\text{C}_6$ -Diacetonglukose interessante Modellverbindungen für NMR-Spektroskopische Untersuchungen bzw. für die Entwicklung neuer NMR-Spektroskopischer Methoden (Duchardt, 1999) darstellen. Die Menge an Endprodukt hat sich dementsprechend verringert. Aus einem Teil der Ribose wurde durch Glykosylierung mit Bz-Adenin Bz<sub>3</sub>-Ac- $^{13}\text{C}_5$ -D<sub>2</sub>-Adenosin 66 gewonnen. Auch hierbei konnte kein Unterschied zu früheren Synthesen mit anderen Ribosequellen festgestellt werden. Die Ausbeute lag mit 90% im üblichen Bereich.

## 6 Der Transkriptionsfaktor mSox5

Ein entscheidender Schritt in der Entwicklung des heranreifenden Säugetierembrios ist die Ausbildung der Geschlechtsmerkmale. Routinemäßig läuft die Entwicklung in Richtung eines weiblichen Organismus, bei der es zur Bildung der Eierstöcke und der weiteren weiblichen Geschlechtsorgane kommt. Zur Entwicklung männlicher Individuen ist es notwendig, daß dieser Prozess zur Anlage der männlichen Geschlechtsorgane abgeändert wird. Der Auslöser für das Umschwenken der Entwicklung von einem weiblichen auf ein männliches Wesen ist das dominante Gen *Sry* (sex-determining region Y gene), das auf dem Y-Chromosom liegt. Die einzelnen Prozesse, die hierbei ablaufen sind bisher nur bruchstückhaft bekannt. *Sry* wird bei Mäusen in einem engen Zeitraum ungefähr 10-12 Tage nach dem Coitus in den Prä-Sertoli-Zellen des Gonad exprimiert, unmittelbar bevor die unterschiedliche Ausbil-

derung von Eierstock bzw. Hoden bemerkbar wird. Darauf entwickeln sich aus den Prä-Sertoli-Zellen die männlichen Hoden (Pevny et al., 1997; Bianchi et al., 1998; Capel, 1998). *Sry* codiert ein gleichnamiges Protein, das neben flankierenden Protein-Sequenzen mit nur geringen Ähnlichkeiten zu anderen Transkriptionsfaktoren, eine HMG-Box enthält. HMG steht für High Mobility Group, der Name leitet sich aus der Eigenschaft der HMG-Proteine ab, schnell durch SDS-Gele zu wandern. Die HMG-Box ist ein 79 Aminosäuren großes DNA-bindendes Motiv.

Die Bedeutung von *Sry* zeigt sich auch in der Tatsache, dass Fehlentwicklungen von *Sry* für zahlreiche Geschlechtsvertauschungen verantwortlich sind (Cameron et al., 1997). So führen Translokationen von *Sry* vom Y-Chromosom auf ein anderes Chromosom bei XX-Individuen zur Ausprägung der männlichen Geschlechtsmerkmale. Genauso führen Mutationen innerhalb von *Sry* bei XY-Individuen zu einer unterschiedlich starken Ausprägung weiblicher Geschlechtsmerkmale. Alle bekannten Mutationen treten, von einer Ausnahme abgesehen, in der HMG-Box auf. Während die HMG-Box von *Sry* zwischen den Säugetieren hoch konserviert ist, ist die Homologie von *Sry* außerhalb der HMG-Box sowohl auf Nukleotid-, wie auf Aminosäureebene nur gering. Auch ist die Länge der N und C-terminalen-Domänen zwischen den Säugetieren sehr verschieden.

### 6.1 Die HMG-Box-Proteine

Die Gruppe der HMG-Box Proteine zeichnet sich durch die Eigenschaft an die kleine Furche der DNA zu binden aus, wobei die DNA signifikant geknickt wird. Entsprechend der Sequenzspezifität der Bindung an die DNA und der phylogenetischen Verwandtschaft kann die Familie der HMG-Boxen in 2 Klassen eingeteilt werden, der HMG/UBF und der SRY-SOX-Klasse (Soullier et al., 1999). Die HMG/UBF-Klasse bindet nur unspezifisch an die DNA. Innerhalb eines Proteins können bis zu 2 HMG-Boxen auftreten. SRY bindet hingegen mit der einfach im Protein vorkommenden HMG-Box sequenzspezifisch an die DNA. Auch die sich von *Sry* ableitende Klasse der Sox-Proteine (**Sry Homeo Box**) bindet mit ihrer HMG-Box sequenzspezi-

fisch an die DNA. Das Consensus Motiv für die Bindung ist das Heptamer 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' (Mertin et al., 1999). Die Bindungskonstanten der Sox-Proteine bzw. ihrer HMG-Box liegen wie bei SRY im Nanomolbereich.

Proteine werden der SOX-Klasse zugeordnet, wenn die Aminosäuresequenz ihrer HMG-Box mindestens zu 50% mit der von SRY identisch ist. Vergleiche der beiden Klassen ergaben, daß von einem gemeinsamen Ursprung ausgegangen werden kann, wobei noch unklar ist, ab wann sich beide Klassen unterschiedlich weiterentwickelt haben. Vertreter der HMG/UBF-Klasse wurden in allen Hauptphyla von Eukaryonten entdeckt, während bisher Vertreter der SOX-Klasse nur in Pilzen und Tieren, nicht aber in Pflanzen entdeckt wurden.

<b>Group A:</b>										
SRY	DRVKREMNAF	IWVSRDQRRK	MALENPRMN	SEISKQLGYQ	WKMLTEAEKW	PFQEQAQLQ	AMHREKYPNY	KYRPRRKAQM		
<b>Group B:</b>										
Sox-1	DRVKREMNAF	MVWSRGQRRK	MAQENPRMN	SEISKRLGAE	WKVMSAEKR	PFIDEAKRLR	ALHMKEHBDY	KYRPRRKTCT		
SOX2	-----	-----	-----	-----	--LL--T--	-----	-----	-----		
SOX3	-----	-----	--L-----	-----D	--LLTD---	-----	-V---Y--	-----		
Sox-14	-----	-----	-----	-----	--LL-----	-----	-Y-----	-Q--E		
<b>Group C:</b>										
SOX4	GHIKREMNAF	MVWSQIERRK	IMEQSPDMN	AEISKRLGSR	WKLKDSDKI	PFIREAERLR	LQHMADYBDY	KYRPRRQVKS		
SOX11	-----	--K-----	-----	-----	--M---E--	-----	-----	-----		
Sox-12	-----	--H-----	--D-W----	-----GR-	-Q-Q-E--	--E-----	-----	-----		
<b>Group D:</b>										
Sox-5	PHIKREMNAF	MVWAKERRK	ILQAEPDMN	SNISKILGSR	WKAMTNLEKQ	PYVEEQARLS	KQHLEKYBDY	KYKPRPKRTC		
Sox-6	-----	-R-----	-----	-----	--S-S-Q-N-	-----	-I-----	-----		
Sox-13	-----	-----	-----	-S-----	--S--Q---	-----	R-----	-----		
<b>Group E:</b>										
Sox-8	MVWAQAARRK	LADQYPHYHN	AELSKTLGHL	WRLLSESEKR	PFVDEAERLR	VQHKKD				
SOX9	SRGQ---	M-QEN-KM--	S---R--AE	-K--TDA---	--ID--K--	AV-M--Y				
SOX10	SR-Q---	M-QEN-KM--	S---R--AE	-K--T-----	--ID--K--	AM-N-EH				
<b>Group F:</b>										
Sox-7		AKDERKR	LAVQNPDLHN	AELSKMLGKS	WKALTLGSKR	PFVDEAERLR	LQHMQDY			
Sox-17	MVW-----	--Q-----	-----	-----	-----TAE--	-F-E-----	V-----			
Sox-18	LRIRREMNAF	MVW-----	--Q-----	-V-----A	--E-NTAE--	-F-E-----	V--LR-HENY	KYRPRRKAQM		

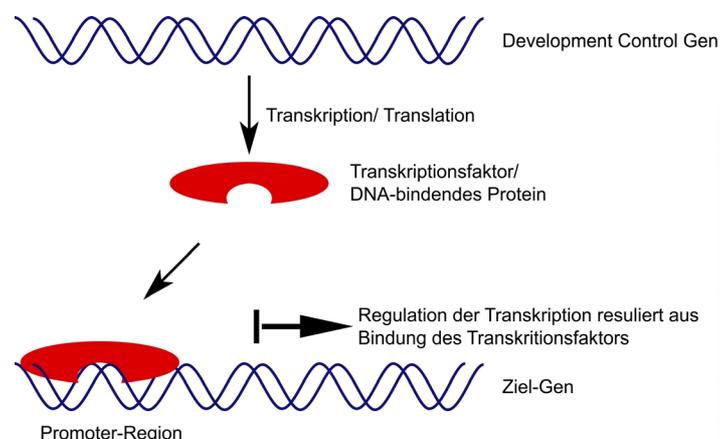
Abbildung 6.1: Übersicht über die Gruppeneinteilung der SOX-Proteine mit der Aminosäuresequenz ihrer HMG-Box (Prior et al., 1996)

Im Laufe der letzten Jahre konnten zahlreiche Vertreter der Sox-Proteine entdeckt werden. Inzwischen kennt man über 20 verschiedene Mitglieder. Leider ist die Durchnummerierung, die sich aus der Reihenfolge der Erstveröffentlichung ergibt, nicht stringent, weshalb z. B. hSOX12 nicht mit mSox12 identisch ist, wobei SOX (durchgängig großgeschrieben) immer für menschliche, Sox (nur erster Buchstabe großgeschrieben) für tierische Proteine steht (Wegner, 1999). Die Entdeckung neuer Sox-Proteine bzw. deren Gene geschieht überwiegend durch Isolation und Sequen-

zierung von cDNA-Bibliotheken, die man durch reverse Transkription von mRNA durch die Reverse Transkriptase erhält. Die cDNA ist damit komplementär zu der mRNA und nicht zu der ursprünglichen genomischen DNA und enthält deshalb z. B. keine Introns, also nicht codierte Abschnitte.

Sox-Proteine sind als Transkriptionsfaktoren an der Regulation von zahlreichen entscheidenden Prozessen in der Entwicklung eines Organismus beteiligt. Durch Ihre Bindung an Promoterregionen von Genen steuern sie deren Aktivität. *Sox4* wird in B- und T-Zellen ausgeschüttet und aktiviert die Transkription. Weiterhin nimmt es eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Herzens ein. *Sox1*, *Sox2*, *Sox3* und *Sox17* werden im sich entwickelnden Nervensystem ausgeschüttet, wobei ihre Funktion noch unklar ist. *Sox10* reguliert die Expression des Protein zero (P<sub>0</sub>)-Gen, ein Myelin-Gen, das ausschließlich in den Schwannschen Zellen der Myelinscheide der Neuronen expremiert wird (Wegner, 1999). *mSox7* konnte bei Mäusen in den Oozyten der Eierstöcke und im Herz nachgewiesen werden. Ebenfalls in den Eierstöcken, sowie in der Niere konnte bei Mäusen *Sox13* gefunden werden (Kido et al., 1998).

In den Vorläuferzellen von Mäusezähnen konnten durch Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, RT-PCR, 14 Tage Postcoitus 14 verschiedene *Sox*-Gene nachgewiesen werden (Stock et al., 1996). Allerdings waren die gemessenen Konzentrationen je nach *Sox*-Gen sehr verschieden. So konnten *Sox4* und *Sox9* wesentlich häufiger gefunden werden, als die restlichen *Sox*-Gene. Die Autoren haben



**Abbildung 6.2:** Development Control Gene codieren Transkriptionsfaktoren mit DNA-bindenden Domänen. Transkriptionsfaktoren binden an die Promoter-Region eines Ziel-Gens und beeinflussen so die Aktivität des nachrangigen Gens. Häufig sind mehrere Proteine im Verbund an der Regulation beteiligt.

deswegen eine Redundanz der Sox-Proteine bei ihrer Funktion postuliert. Die Möglichkeit der Redundanz wird auch durch die Ähnlichkeit der Bindungssequenzen untermauert, die so groß ist, daß verschiedene SOX-Proteine zur gleichen Sequenz binden können.

Die Länge der cDNAs und damit auch die Größe der codierten Proteine können je nach Expressionsort und Zeitpunkt verschieden sein. *mSox5* wurde ursprünglich im Hoden nachgewiesen, wo es an der Regulation der Spermatogenese beteiligt ist und ein 392 Aminosäure großes Protein codiert (Denny et al., 1992). 1998 konnte eine cDNA von mSox5 in Mäuseembryos gefunden werden, die ein 763 Aminosäuren großes Protein codiert (Hiraoka et al., 1998). Die HMG-Box ist bei beiden Varianten identisch. Unterschiede finden sich vor allem im N-Terminus, wo die verlängerte Variante mSox5L einen Leuzin-Zipper und eine Glutaminreiche Sequenz, die Q-Box genannt wird, enthält. Leuzin-Zipper und Q-Box wurden zuvor schon bei mSox13 gefunden (Kido et al., 1998).

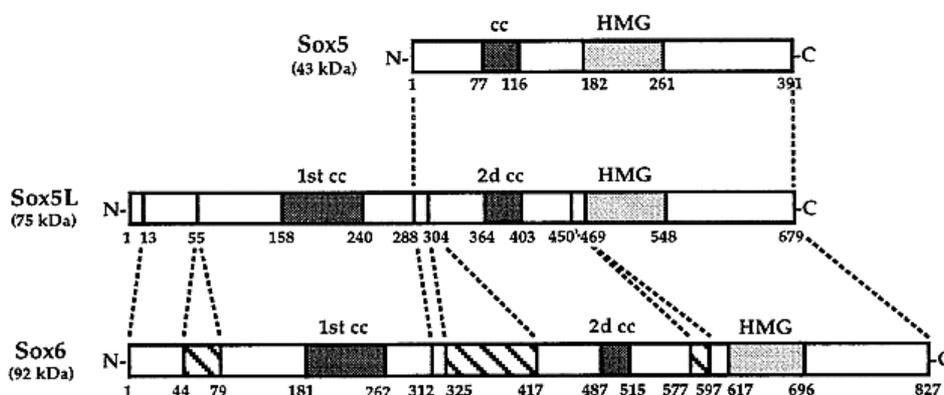
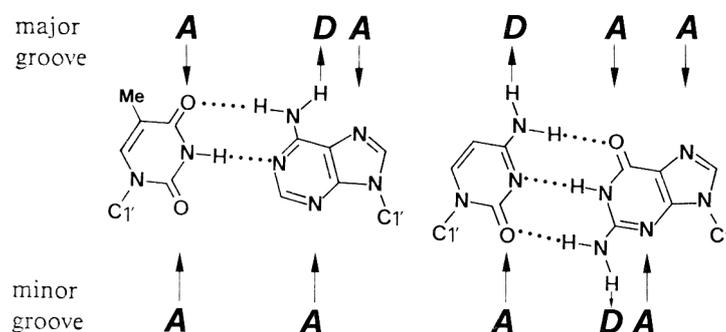


Abbildung 6.3: Schematischer Vergleich der Proteine mSox5 mSox5L und mSox6 (Lefebvre et al., 1998). Mit cc sind potentielle „coiled-coil-Bereiche markiert. Gestreifte Bereiche in Sox6 symbolisieren Regionen >10 AA in Sox6, die in Sox5L nicht vorhanden sind. Gepunktete Linien verbinden entsprechende Regionen zwischen den Proteinen.

## 6.2 Die Struktur der HMG-Box

Bislang wurde die Struktur der HMG-Box von SRY in der DNA-gebundenen Form und von SOX4 in freier Form bestimmt. Analog der Struktur von HMG1 besteht sie aus drei  $\alpha$ -Helices (I-III), die L-förmig zusammengelagert sind. Den langen Arm der

verdrehten L-Form bilden die antiparallelen Helices I und II, während Helix III den kurzen Arm bildet. Die Struktur wird von einem Hydrophobic Core stabilisiert, dessen Aminosäuresequenz unter den verschiedenen Mitgliedern der Sox-Proteine hoch konserviert ist. Die Bindung an die DNA erfolgt überwiegend über die Helix II, die sich in die kleine Furche der DNA schiebt, so dass die DNA um einen Winkel von 70-85° geknickt wird, wobei die DNA-Helix im Vergleich zur klassischen B-DNA entwunden und die kleine Furche der DNA geweitet wird. Die Struktur des Proteins bleibt dabei fast unverändert.



**Abbildung 6.4:** Bei den Watson Crick Basenpaaren bietet die große Furche mehr potentielle Bindungsstellen, als die kleine Furche. Für die Bindung über Wasserstoffbrücken gilt dies sowohl für Akzeptoren A, wie auch für Donatoren D. Für hydrophobe Wechselwirkungen ist in der großen Furche z. B. die Methylgruppe im Thymin erreichbar.

Die kleine Furche der DNA erscheint wegen ihrer geringen Tiefe und den wenigen erreichbaren sequenzspezifischen Bindungsstellen weniger zur Proteinbindung geeignet, als die große Furche, in der die Wasserstoffbrücken bildenden Gruppen der Basen zugänglich sind und die als Bindungsstelle für zahlreiche DNA-bindende Proteine dient. Gerade AT-Basenpaare bieten in der kleinen Furche z. B. nur 2 Ansatzpunkte für Wasserstoffbrückenakzeptoren. Deswegen wird auch postuliert, daß die Sox-Proteine neben ihrer Aufgabe als Transkriptionsfaktoren auch architektonische Aufgaben übernehmen. Einerseits könnte die durch die Bindung des Proteins erfolgende Abwinklung der DNA eine Anlagerung eines an die große Furche bindenden Proteins verhindern (Wolffe, 1994; Werner et al., 1997).

Im Gegensatz dazu könnten die SOX-Proteine aber auch die lokale Chromatinstruktur ordnen und so die Anordnung weiterer DNA-bindender Transkriptions-

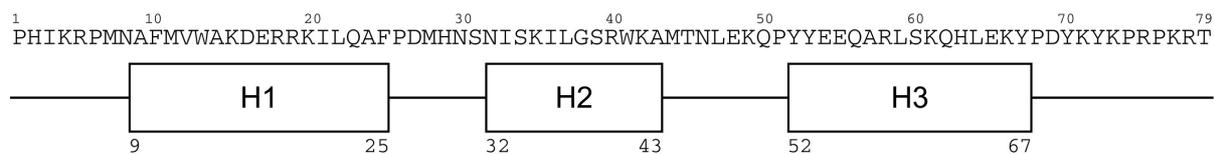
faktoren steuern, wodurch die Bildung größerer biologisch aktiver, sterisch definierter Multiproteinkomplexe ermöglicht wird. Sox-Proteine binden als Monomer, können aber auch als Dimer an DNA binden. Im Falle von Sox10 erfolgt die Bindung als homomeres Dimer an zwei Bindungsstellen der Zielsequenz der DNA, dem P<sub>0</sub>-Promoter, die 4 Basenpaare entfernt liegen (Peirano et al., 2000a; Peirano et al., 2000b). Da die zweite Bindungsstelle nicht der Consensussequenz entspricht, erfolgt bei Entfernung der vorderen Bindungsstelle keine Bindung eines Sox10-Proteins an die zweite Bindungsstelle der DNA, während bei der Entfernung der hinteren Bindungsstelle ein einzelnes Sox10-Protein an die vordere Bindungsstelle bindet.

Als heteromeres Dimer binden Sox5L und Sox6 an die DNA (Lefebvre et al., 1998). Beide gehören der D-Subfamilie der Sox-Proteine an. In Mäuseembrios werden in allen Chondrogenic Sites mSox5L, mSox6 und das zur E-Subfamilie gehörende mSox9 coexprimiert. Der N-Terminus von mSox5L enthält eine coiled-coil Domäne, die zu 90% mit der entsprechenden Domäne in mSox6 identisch ist (siehe Abb. 6.3). Diese Domäne, die einen Leucin-Zipper und eine Glutamin-reiche Sequenz enthält, moderiert die Bindung an mSox6. Durch die Dimerisierung wird die Bindungseigenschaft an DNA's mit zwei benachbarten HMG-Bindungsstellen wesentlich verstärkt. Durch verschiedene Tests konnte gezeigt werden, daß die Bindung der beiden Proteine untereinander von den Leucinzippern vermittelt werden. mSox5L und mSox6 binden zusammen mit Sox9 an einen 48 Basenpaar langen chondrocyte specific enhancer von *Col2a1*, der mehrere HMG-Bindungsstellen enthält. *Col2a1* codiert die Aminosäuresequenz von Kollagen II. Durch die Bindung der drei Sox-Proteine wird das Gen stark aktiviert.

### 6.3 Die HMG-Box von mSox5

Die zuerst entdeckte kürzere Form von Sox5 besitzt keine coiled-coil-Domäne. Bislang sind auch keine Dimere bekannt. *mSox5* wird im Hoden in post-meiotischen Keimzellen während der Spermatogenese exprimiert, weshalb angenommen wird, daß es an der Regulation der Spermatogenese beteiligt ist. Gefunden wurde es 1992

von Ashworth et al. durch ein Screening von cDNA-Bibliotheken nach *SRY*-verwandten Sequenzen (Denny et al., 1992). 1996 wurde die menschliche Variante von *SOX5* entdeckt (Wunderle et al., 1996). Die gefundene cDNA von *SOX5* codiert ein Protein, das zu 97% mit dem der Maus identisch ist. Die HMG-Box ist völlig identisch. Im Menschen konnten im Gegensatz zur Maus *SOX5*-cDNAs in allen untersuchten Geweben gefunden werden. Dabei wurden cDNA-Bibliotheken sowohl von Kindern, als auch von Erwachsenen untersucht.



**Abbildung 6.5:** Aminosäuresequenz der HMG-Box von mSox5 mit der Lage der Helices.

Bei Mäusen ist mSox5 ein 46 kDa bzw. 392 Aminosäure großes Protein, das eine 79 Aminosäure große HMG-Box zwischen den AA 183 - 261 enthält. Die HMG-Box von mSox5 ist zu 53 % mit der von mSry identisch. Sox5 ist das einzige Protein der Gruppe D, das ein Intron in seiner HMG-Box aufweist. Das Intron befindet sich an der Stelle der AS 38. Introns Vor der HMG-Box befindet sich im N-Terminus zwischen den AA 9-69 eine Prolin-reiche Sequenz mit 18 % Prolin-Anteil, die sich mit einer Serin-reichen Sequenz mit 20 % Serin-Anteil zwischen AA 20-74 überlappt. Der C-Terminus von mSox5 ist zwischen AA 347-392 reich an sauren Aminosäuren, mit einem Anteil von Glutamin- und Asparaginsäure von 41 %.

Die Struktur der HMG-Box von mSox5 wurde von P. D. Cary durch NMR-Spektroskopie an einer 81 Aminosäure großen Domäne untersucht, die neben der 79 Aminosäure großen HMG-Box ein N-terminales Glycin-Serin-Di-Peptid enthielt. Das Dipeptid stammt aus dem Gluthation-S-Transferase (GST) - Fusions-Expressionssystem. Exprimiert wurde die HMG-Box von mSox5 in E-Coli. Die gefundene Struktur ist allerdings noch unveröffentlicht. Eine Abbildung der vorläufigen Struktur wurde im Rahmen der Veröffentlichung der Ergebnisse der Thermodynamischen Eigenschaften des mSox5-Protein-DNA-Komplexes veröffentlicht (siehe Abbildung 6.6) (Crane-Robinson et al., 1998; Jelesarov et al., 1999; Privalov et al., 1999).

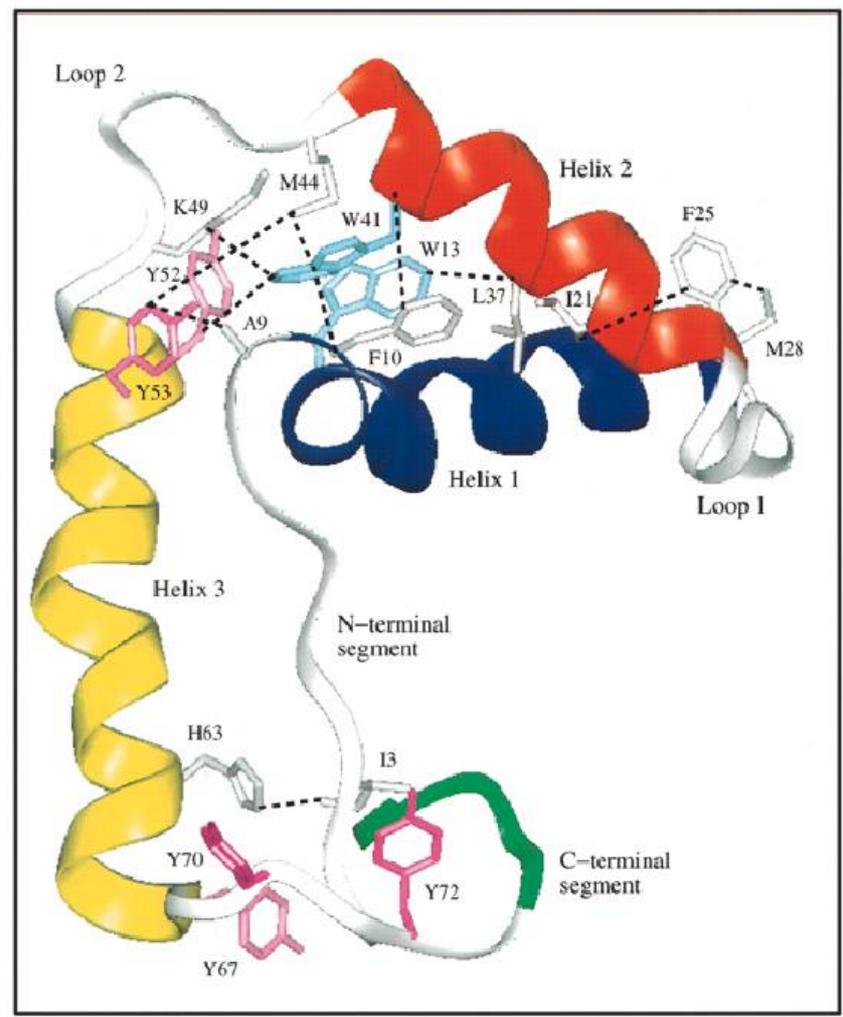


Abbildung 6.6: Die Tertiärstruktur der HMG-Box von mSox5 besteht aus 2 Flügeln, die L-förmig gefaltet sind. Der kleine Flügel besteht aus dem verlängerten N-Terminus bis zu AA9 und der parallel liegenden Helix 3 (gelb). Grün gezeichnet sind die 6 weitgehend unstrukturierten Reste des C-Terminus. Der Hauptarm der Domäne besteht aus Helix 1 (blau) Helix 2 (rot) und die Loops 1 und 2. Hervorgehobene Seitenketten tragen zur Stabilisierung der Struktur bei (Crane-Robinson et al., 1998).

Die HMG-Box von mSox5 besitzt die übliche L-Form, die aus 3  $\alpha$ -Helices gebildet wird. Durch Analyse des CD-Spektrums konnte nach der Methode von Johnson und Compton (Compton et al., 1986) ein  $\alpha$ -Helixanteil von 55 % bestimmt werden. Helix 1 (Phe10-Phe25) und Helix 2 (Asn32-Ala43) bilden den Hauptarm des spitzwinkligen L. Helix 3 (Pro51-Tyr67) bildet mit dem leicht antiparallel zu ihr stehenden N-Terminus den Querbalken. Da der Winkel zwischen dem Haupt- und dem Querbalken ca.  $60^\circ$  beträgt und Helix 1 und Helix 2 mit einem Winkel von ca.  $55^\circ$  leicht antiparallel zueinander liegen, wird in der Literatur auch häufig von einer Pfeilspitze gesprochen. Die Zahl der in den helikalen Sequenzen eingebauten Aminosäuren liegt

bei 45 von 81, was in Übereinstimmung mit der durch CD-Spektren ermittelten Helikalität ist.

Die Struktur wird durch ein ausgeprägtes Hydrophobes Core stabilisiert. Die aromatischen Seitenketten von Phe10, Trp13 und Trp41 stapeln sich co-planar und regeln so die gegenseitige Orientierung von Helix 1 und Helix2. Leu22 und Leu37 sind für die hydrophoben Kontakte sowohl von Helix 1 und Helix 2 als auch von Helix 1 und dem Beta-turn Pro26-His29 in Loop 1 wichtig. Der Aromat in der Seitenkette von Phe25 hat engen Kontakt zu den Methylgruppen von Ile21, Met28 und Ile36, wodurch der Winkel von Helix 1 und Helix 2, sowie der zwischen beiden Helices liegende Loop 1 stabilisiert wird.

Zwischen Helix 1 und Helix 3 gibt es Kontakte zwischen den Methylgruppen von Ala9 und Val12 in Helix1 zu den Aromaten von Tyr52 in Helix 3, wodurch die relative Orientierung beider Helices zueinander gefestigt wird. Der N-Terminus hat über die Seitenkette von Ile3 bzw. dem Backbone von Lys4 und Arg5 Kontakte zu den Seitenketten von His63, Leu64 und Tyr67 von Helix 3. Die Aminosäuren von Tyr67-Tyr70 bilden einen TypIII-Beta-Turn am Ende von Helix3.

### 6.4 Der Sox5-Protein-DNA-Komplex

mSox5 bindet mit seiner HMG-Box wie alle SRY/SOX-Proteine sequenzspezifisch an DNA. Durch ein Random Oligonukleotid-Bindungs Assay wurde die Sequenz AACAAAT als Bindungssequenz ermittelt. Die Bindung erfolgt mit einer Bindungskonstante  $K_d$  von 35nM. Auch bei der Bindung der HMG-Box von mSox5 wird die DNA um 70° in Richtung der großen Furche abgeknickt. Durch die starken Änderungen, die die DNA bei der Komplexierung erfährt, bildet der Sox5-Protein-DNA-Komplex eine interessante Struktur deren NMR-Spektroskopische Untersuchung durch Verwendung eines isotopenmarkierten DNA-Duplex ermöglicht werden sollte. In den nachfolgenden Kapiteln wird die Synthese des DNA-Duplex und dessen Komplexierung mit der HMG-Box von mSox5 beschrieben. Weiterhin werden die bisherigen Ergebnisse der NMR-Spektroskopischen Untersuchung besprochen.

## 7 Der $^{13}\text{C}$ -markierte mSox5-DNA-Duplex

### 7.1 Synthese und Aufreinigung der $^{13}\text{C}$ -markierten DNA

Die Festphasensynthese von DNA erlaubt mit dem sequenzspezifischen Einbau von isotopenmarkierten Nukleosiden ein Markierungsmuster, das an die spezifischen Anforderungen der zu Grunde liegenden Problemstellung angepaßt werden kann. Im mSox5-Protein-DNA-Komplex ist der NMR-Spektroskopisch interessante Bereich bei der DNA auf die Nukleotide der Bindungsregion beschränkt. Eine darüber hinausgehende Markierung der benachbarten Nukleotide bringt durch die damit einhergehende Signalüberlagerung in den NMR-Spektren auch Nachteile, die nur teil-

weise durch dadurch zusätzlich erhaltbare Informationen über die Struktur der DNA aufgewogen werden. Auf der Grundlage der vorhergehenden NMR-Spektroskopischen Untersuchung des freien Proteins bzw. des DNA-Proteinkomplexes mit unmarkierter DNA konnte die Bindungsregion innerhalb des DNA-Duplexes auf die Nukleotide 7-12 im Top-strand und 21-28 im Bottom-strand eingeschränkt werden.

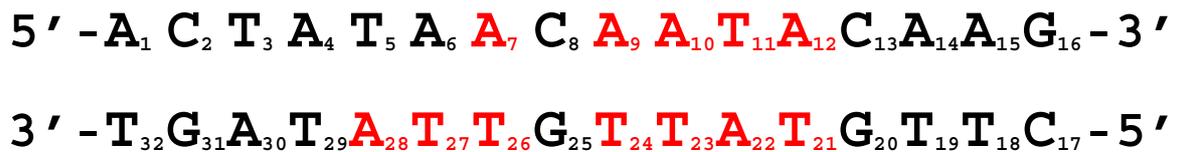


Abbildung 7.1: Sequenz der mSox5-DNA. Ribosyl <sup>13</sup>C-markierte Nukleotide sind rot markiert

Die Bindungsregion ist - wie die gesamte DNA-Sequenz - außerordentlich reich an AT-Basenpaaren. Auf 16 Basenpaare kommen nur 4 GC-Paare, innerhalb der Bindungsregion tritt nur ein GC-Paar auf. Nach eingehender Analyse der Ergebnisse wurde die DNA unter Verwendung der bereits synthetisierten ribosyl <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-markierten Phosphoamidite von Desoxyadenosin und Thymidin mit Ausnahme des einzelnen GC-Paars im Bereich der gesamten Bindungsregion der DNA an das Protein in der Ribose <sup>13</sup>C-markiert. Auf die <sup>13</sup>C-Markierung des einzelnen GC-Paars wurde aus Gründen der eher geringen zusätzlichen Information und aus Gründen der Effizienz verzichtet. Die Synthesen des Desoxyguanosin- und des Desoxycytidin-Phosphoamidits sind ausgearbeitet. Allein zum Spülen des Synthesizers vor der Synthese wäre allerdings eine größere Menge an <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-markierten Amidit benötigt worden, als die eigentlich in der Synthese benötigte Menge. Bei Einbau von nur jeweils einem isotopenmarkierten Desoxyguanosins bzw. Desoxycytidins hätte der synthetische wie materielle Aufwand deshalb in keinem Verhältnis zu dem dadurch möglichen Informationsgewinn gestanden. Ausreichende strukturelle Informationen über das GC-Paar können auch über die benachbarten Basenpaare gewonnen werden.

Die Festphasensynthese der DNA, deren Methode in Kapitel 4 über die Synthese der Phosphoamidite erklärt wird, wurde in Zusammenarbeit mit Marten Wiersma am

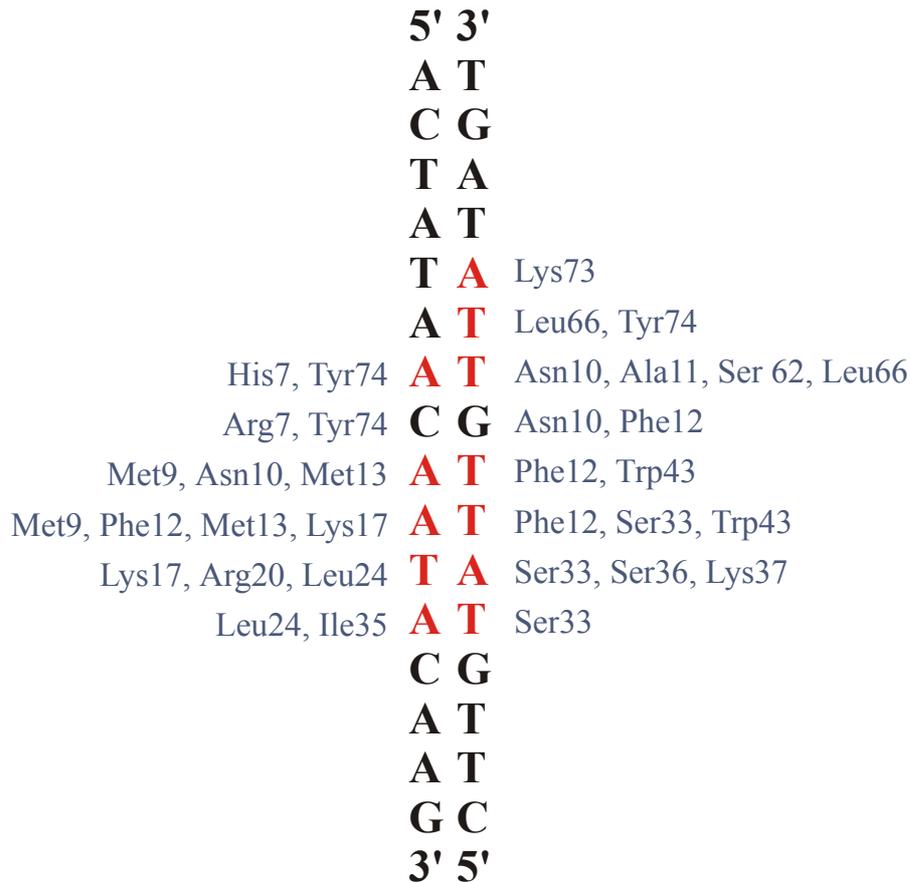
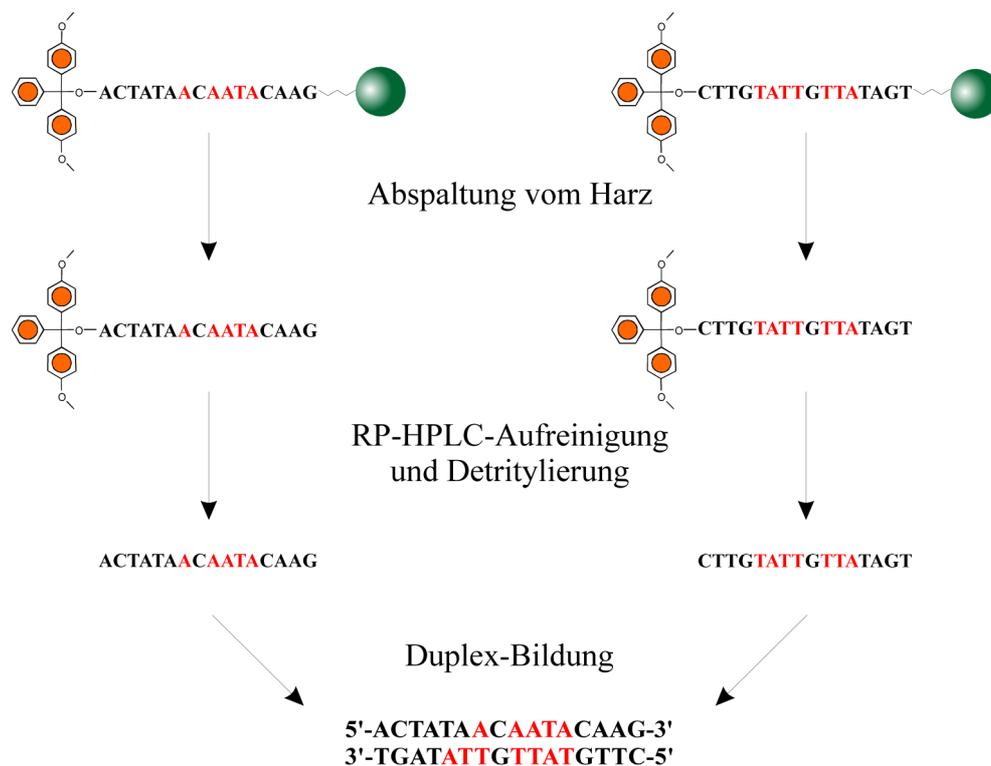


Abbildung 7.2: Die nach der bisherigen Untersuchung des Protein-DNA-Komplexes durch Dr. Chris Read ermittelten Kontakte der HMG-Box von mSox5 mit der Ziel-DNA (Read, 1999).

DNA-Service des EMBL in Heidelberg durchgeführt. Da ausreichende Mengen der Phosphoamidite vorhanden waren, konnten beide Einzelstränge des DNA-Duplexes jeweils zweimal im 1 µmol-Maßstab synthetisiert werden. Es wurden alle Desoxyadenosine und Thyminidine, die Kontakt zum Protein haben, durch Einbau der <sup>13</sup>C-markierten Amidite in der Riboseeinheit isotopenmarkiert. Im Top-strand wurden die Nucleoside A7, A9, A10, T11, und A12 und im Bottom-strand die Nucleoside T21, A22, T23, T24, T26, T27 und A28 markiert. Im Top-strand wurden damit 5 Nucleotide (vier A und ein T) im Bottom-strand 7 Nucleotide (zwei A und fünf T) markiert.

Die Phosphoamidite wurden vor der Synthese mittels <sup>31</sup>P-NMR auf ihre Qualität getestet und zum Trocknen aus Benzol lyophilisiert. Trotz der langen Lagerzeit des Thyminidin-Phosphoamidits von zweieinhalb Jahren bzw. des Desoxyadenosin-

Phosphoramidits von knapp einem Jahr, war der Anteil an Oxidationsprodukt unter 5%, weshalb die Amidite ohne erneute Aufreinigung eingesetzt werden konnten. Zur Absicherung einer hohen Kupplungseffizienz wurde durch Umprogrammierung des Syntheszyklus am Synthesizer die Kupplungszeit bei den  $^{13}\text{C}$ -markierten Amiditen statt der bei DNA-Kupplungen üblichen 1,5 Minuten auf 15 Minuten verlängert. Dies entspricht der Kupplungszeit bei der RNA-Synthese. Über das Tritylmonitoring, also der photometrischen Konzentrationsbestimmung der Tritylschutzgruppe in der Abspaltlösung des nach jedem Kupplungsschritt erfolgenden Entschützens der endständigen 5'-Gruppe, konnte die Güte der Kupplungen kontrolliert werden. Dabei konnten keine Unterschiede zu den nicht markierten Amiditen festgestellt werden. Die Kupplungseffizienz der markierten Amidite entspricht damit der von kommerziell erhältlichen Amiditen. Da eine Trityl-on-Trennung durch RP-HPLC vorgesehen war, wurde die endständige Tritylschutzgruppe nach dem letzten Kupplungsschritt nicht abgespalten.



**Abbildung 7.3:** Schema der DNA Aufbereitung: Die bei der Festphasensynthese erhaltenen Oligonukleotide werden basenkatalysiert vom Trägerharz abgespalten, wobei auch die exocyclischen Aminogruppen der Basen entschützt werden. Nach der Aufreinigung durch RP-HPLC werden die terminalen Tritylschutzgruppen durch Essigsäure abgespalten.

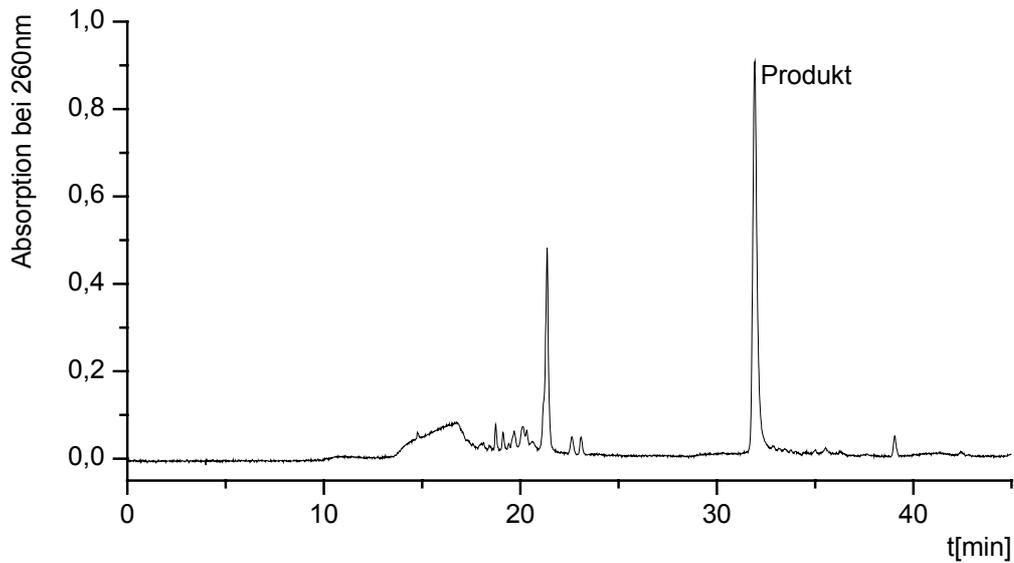


Abbildung 7.4: HPLC-Chromatogramm des Top-strands

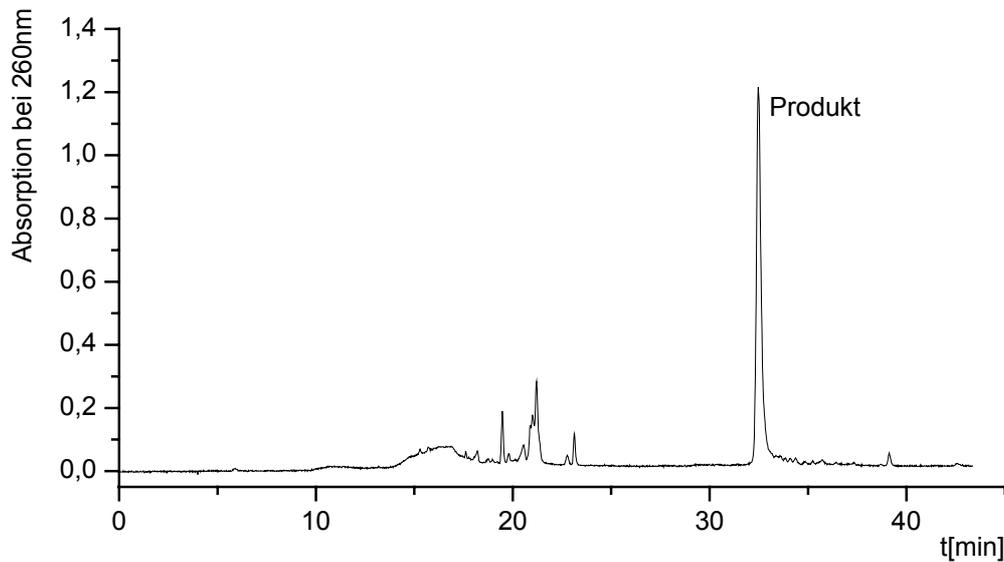


Abbildung 7.5: RP-HPLC-Chromatogramm des Bottom-Strands. Durch die Detritylierung ist ein größerer Peak bei den Nebenprodukten zu erkennen, der aus der Zielsequenz ohne der terminalen Tritylschutzgruppe entspricht.

Die Abspaltung der Oligonukleotide vom Harz bzw. der Basenschutzgruppen von den Aminogruppen erfolgte über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  mit halbkonzentriertem Ammoniak. Die Aufreinigung der Einzelstränge erfolgte Trityl-on durch RP-HPLC mit einem

0,1 %igen TEAAC-Puffer (pH 7,0) gegen einen Gradienten aus Acetonitril. Durch die endständige Tritylschutzgruppe, die bei den Abbruchsequenzen nicht vorhanden ist, ergibt sich ein Unterschied in der Retentionszeit von 10 Minuten, bei einer Retentionszeit von 33 Minuten.

Durch die starke Säureempfindlichkeit der Tritylschutzgruppe muß bei allen Schritten auf strikten Ausschluß von Säure geachtet werden. Nachteilig hat sich bei der Trennung das endständige Desoxyadenosin im Top-strand ausgewirkt, da die sterisch anspruchsvolle Tritylgruppe mit der ebenfalls sterisch anspruchsvollen Base kollidiert, was die Abspaltungstendenz der Tritylgruppe zusätzlich verstärkt. Erwartungsgemäß traten im Top-strand wesentlich mehr tritylfreie Nebenfraktionen auf, als im Bottom-strand, von dem nach der HPLC 107 OD erhalten wurden. Vom Top-strand wurden 67 OD erhalten.

Die Nebenfraktionen des Top-strands enthielten neben den Abbruchsequenzen auch einen deutlich erkennbaren großen Peak, der wahrscheinlich aus dem gewünschten 16mer ohne Tritylschutzgruppe bestand. Durch Ionenaustausch-Chromatographie hätte die Möglichkeit bestanden, die Nebenfraktion zusätzlich aufzureinigen und die Zielsequenz von den Abbruchsequenzen abzutrennen. Ionentauschersäulen nutzen die unterschiedlichen Retentionszeiten der kürzeren und damit weniger geladenen Abbruchsequenzen gegenüber der längeren Zielsequenz. Mittels einen Salzgradienten aus 6 M LiCl-Lösung werden die Oligonukleotide von der Säule eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen sind allerdings sehr salzhaltig, was bei NMR-Proben massiv störend ist. Die NMR-Probe soll in einem Puffer aus 100 mM NaCl und 10 mM Phosphat, pH 6,5 gelöst werden. Gerade Lithiumsalze, die äußerst fest an die Phosphatgruppen der DNA binden und nur schlecht durch Umsalzen entfernt werden können, sind deshalb unerwünscht. Zudem mußte im Arbeitskreis die Erfahrung gemacht werden, daß in NMR-Spektren von anderen DNA-Sequenzen Unterschiede von Proben, die mit Ionenaustausch-Chromatographie getrennt wurden, zu RP-HPLC-aufgereinigten Proben festzustellen sind. Auch durch mehrmaliges Umsalzen konnten diese Unterschiede nicht immer beseitigt werden. Die mögliche Trennung der Nebenfraktionen wurde wegen der Salzproblematik nicht durchgeführt. Das Risiko, dadurch die Einheitlichkeit der Probe zu gefährden, erschien zu hoch. Die Salz-

problematik war überhaupt der Grund, weshalb die RP-HPLC-Trennung durchgeführt wurde.

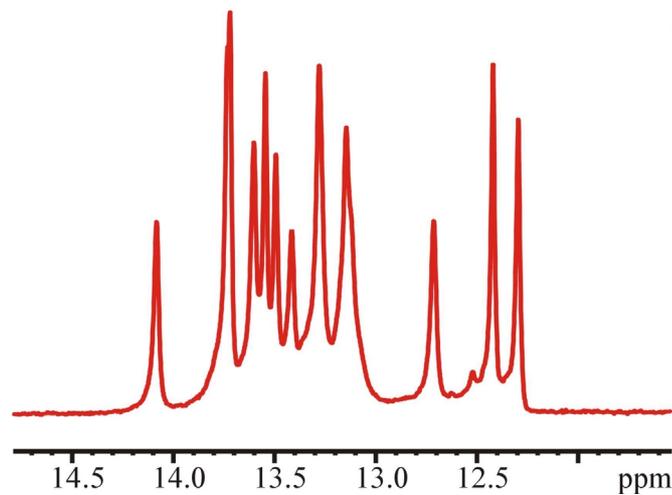
Die Abspaltung der Tritylschutzgruppe erfolgte standardgemäß mit 80%iger Essigsäure. Durch eine Butanolfällung wurden die DNA-Einzelstränge aus der Lösung gefällt. Die bei der Fällung erhaltenen Pellets enthielten nach dem Auflösen in ddH<sub>2</sub>O für den Top-strand 67 OD bzw. für den Bottom-strand 107 OD, was eine quantitativen Fällung bedeutet. Eine Ethanol-fällung wurde wegen der Gefahr, daß die relativ kurzen 16mere nicht vollständig ausfallen, nicht vorgenommen.

## 7.2 Bildung und Untersuchung des $^{13}\text{C}$ -markierten mSox5-DNA-Duplexes

Erfahrungsgemäß erfolgt die Bildung des Duplexes in dd-H<sub>2</sub>O nur unvollständig. Deswegen wurden die Einzelstränge nach erneutem Einengen in einem Puffer aus 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM TrisHCl, pH 8 aufgenommen. Nach nochmaliger genauer Konzentrationsbestimmung wurde durch Zugabe eines Aliquots der Lösung des Bottom-strands zu der Lösung des Top-strands und kurzes Erhitzen im Wasserbad der Duplex gebildet. Nach Entsalzen des Duplexes auf einer G15-Säule konnte die NMR-Probe angesetzt werden.

Die NMR-Probe des 16mers wurde in einem Puffer aus 100 mmol NaCl und 10 mmol Phosphat, 10 % D<sub>2</sub>O, pH 6,5) angesetzt. Die Probe hat eine Anfangskonzentration von 1 mmol/ml bei einem Probenvolumen von 250 µl gehabt.

Durch Vergleich des Iminospektrums konnte sichergestellt werden, daß die Probe mit den vorherigen NMR-Proben identisch ist. Die Imminospektren der markierten und der unmarkierten Probe zeigten keine Abweichungen, was bedeutet, das die Bildung des Duplexes erfolgreich verlaufen ist.



**Abbildung 7.6:** Iminospektrum des  $^{13}\text{C}$ markierten mSox5-DNA-Duplexes. Es konnten keine Unterschiede zu den Spektren anderer mSox5-DNA-Duplexe festgestellt werden (vgl. Abbildung 7.1 Kapitel 7)

In dem Iminospektrum kann durch den schnellen Austausch keine einzelsträngige DNA detektiert werden. Die Kontrolle der Probe auf einzelsträngige DNA erfolgt mittels eines Acrylamid-Gels (siehe Abb. 7.7). Dabei konnte neben der Bande des Doppelstrangs keine weitere Bande entdeckt werden. Der Gehalt an einzelsträngiger DNA liegt demnach unter der Nachweisgrenze. Weiterhin wurde die Masse des DNA-Duplexes durch MALDI-Massenspektroskopie untersucht.

Für die Aufnahme eines CT-HSQC wurde die Probe lyophilisiert und in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst.



**Abbildung 7.7:** Acrylamid-Gel: Bahn 1 mSox5 16mer Duplex, Bahn 2 Top-strand, Bahn 3 Marker

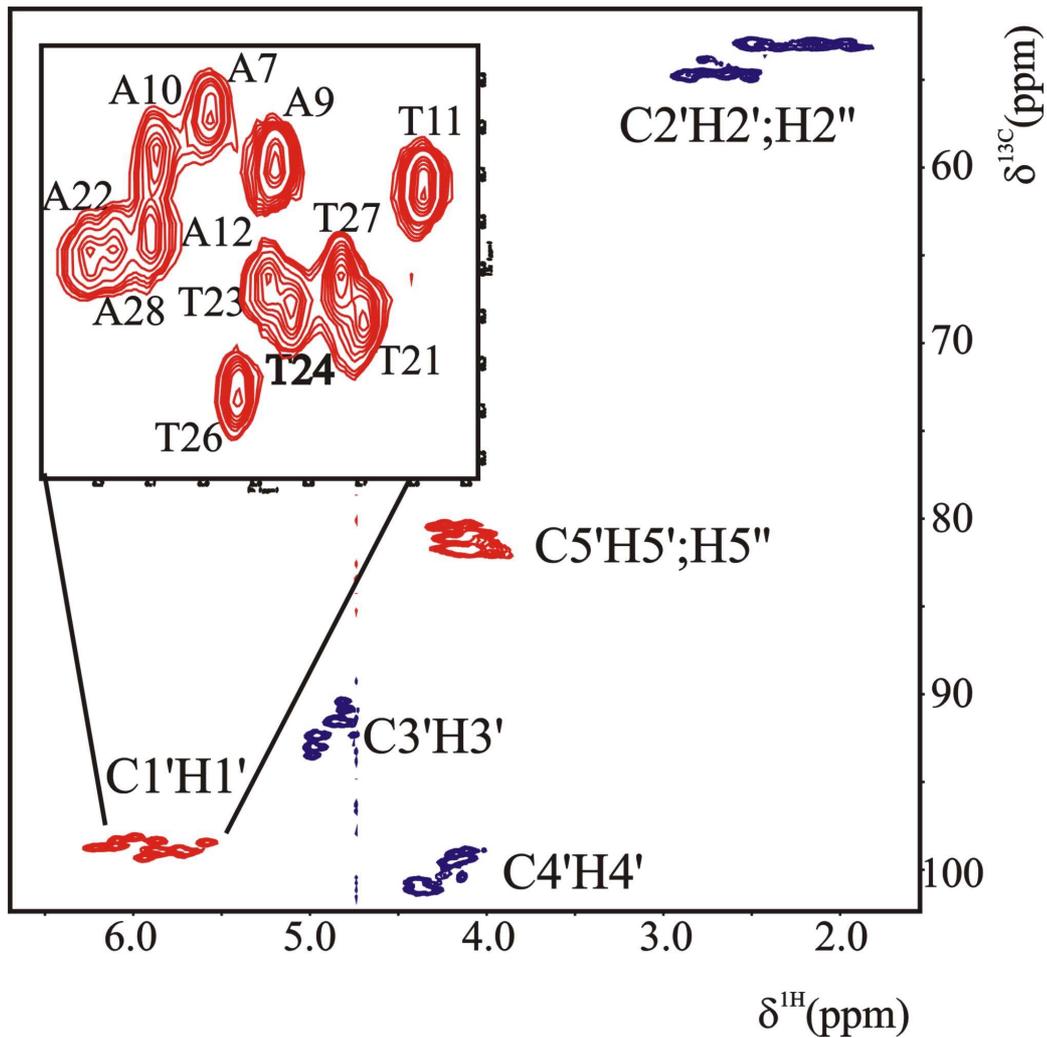


Abbildung 7.8: CT-HSQC des mSox5-DNA-Duplexes. Der  $\text{C1}'\text{H1}'$ -Bereich ist in der Vergrößerung dargestellt. Die Signale der isotopenmarkierten Nukleotide sind deutlich aufgelöst.

Die  $\text{H1}'/\text{C1}'$ -Signale der 12 isotopenmarkierten Nukleotide sind deutlich aufgelöst (siehe Abb. 7.9). Interessant ist die Gruppierung der Signale entsprechend der Basen, die sich auch in den anderen Positionen wiederholt.

Die Lage der Signale ergibt sich im wesentlichen aus der unmittelbaren Umgebung in Abhängigkeit der benachbarten Nukleotide. Betrachtet man z. B. die Lage der  $\text{H1}'$ -Protonen der Thymidine, so fällt auf, daß das von zwei Desoxyadenosinen umgebene T11 am weitesten Hochfeld verschoben ist. Das von einem Adenosin und von einem Guanodin umgebene T21 ist 0,1 ppm weniger Hochfeld verschoben. Die anderen Thymidine haben nur je ein Purin in ihrer Nachbarschaft, wobei sich durch Vergleich der chemischen Verschiebungen zeigt, daß ein 5'-benachbartes Desoxyadenosin stärker hochfeldverschiebend wirkt, als ein Desoxyguanodin. Außerdem wirken

sich 3'-benachbarte Purine weniger aus, als 5'-benachbarte. Der Einfluß von Desoxycytidin konnte nicht untersucht werden, da kein Desoxycytidin in der Nachbarschaft eines Thymidins liegt.

Die Zuordnung der Signale erfolgte über ein NOESY-Spektrum. Es konnten bis auf wenige alle Signale zugeordnet werden (siehe Tabelle 7.1). Für den Vergleich der Strukturen des freien DNA-Duplexes und der komplexierten DNA wurden weiterhin HCP- und HCCH-TOCSY-Spektren aufgenommen.

Der Vorteil der Isotopenmarkierung des DNA-Duplexes konnte von Dr. Christian Richter auch zur Entwicklung eines neuen NMR-Experiments genutzt werden, bei dem durch ein quantitatives  $\Gamma$ -HCP die Winkel  $\alpha$  und  $\zeta$  des DNA-Rückgrads bestimmt werden können.

	Met	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'	H2/H5	H6 H8
A1		6.22	2.8	2.7	4.83	4.26	3.74		8.22
C2		5.87	2.47	2.11	4.83	4.22	4.1	5.41	7.48
T3	1.63	5.68	2.5	2.17	4.87	4.17	4.08		7.39
A4		6.21	2.88	2.64	5	4.4	4.16		8.32
T5	1.42	5.46	2.25	1.9	4.81	4.23	4.1		7.09
A6		5.81	2.8	2.64	4.99	4.3	3.95		8.13
A7		5.81	2.75	2.5	4.96	4.38	4.17		8.02
C8		5.32	2.22	1.79	4.81	4.39	4.1	5.13	7.11
A9		5.86		2.64	4.98	4.33	4.08		8.08
A10		6.09	2.85	2.51	4.97	4.41	4.21		8.09
T11	1.32	5.59	2.36	1.94	4.82	4.25	4.12		7.03
A12		6.1	2.8	2.58	4.98	4.38	4.07		8.16
C13		5.31	2.17	1.81	4.86	4.38	4.07	5.24	7.21
A14		5.76	2.8	2.57	4.99	4.3	3.95		8.13
A15		5.98	2.8	2.57	4.99	4.39	4.16		8.05
G16		5.96	2.35		4.57	4.14	4.07		7.6
C17		5.92	2.59	2.23	4.66	4.11	3.83	5.95	7.86
T18	1.68	6.15	2.59	2.19	4.88	4.24	4.07		7.6
T19	1.61	5.84	2.5	2.18	4.88	4.21	4.12		7.37
G20		5.91	2.74	2.58	4.94	4.15			7.87
T21	1.41	5.69	2.49	2.12	4.85	4.2	4.12		7.2
A22		6.22	2.91	2.64	4.98	4.39	4.16		8.27
T23	1.29	5.88	2.49	1.96	4.8	4.17	4.11		7.14
T24	1.55	5.83	2.49	2.17	4.86	4.16	4.11		7.28
G25		5.83	2.74	2.56	4.93				7.78
T26	1.26	5.91	2.5	2.06	4.81	4.21	4.13		7.19
T27	1.61	5.93	2.5	2.16	4.88	4.14	4.08		7.36
A28		6.18	2.88	2.64	4.99	4.4	4.16		8.3
T29	1.39	5.52	2.29	1.93	4.82	4.23	4.1		7.12
A30		5.97	2.8	2.63	4.99	4.35	4.09		8.12
G31		5.89	2.62	2.48	4.88	4.34	4.17		7.65
T32	1.49	6.17	2.18	2.06	4.49	4.19	4.05		7.34

Tabelle 7.1: Zuordnung der Protonensignale des mSox5-DNA-Duplexes.

# 8 Der mSox5-Protein-DNA-Komplex

## 8.1 Bildung des mSox5-Protein-DNA-Komplexes

Der nächste Schritt nach Abschluß der NMR-Spektroskopischen Untersuchung des mSox5-DNA-Duplexes, die in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Richter durchgeführt wurde, war die Bildung des mSox5-Protein-DNA-Komplexes. Die Arbeiten fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Ch. Read von der Universität Portsmouth statt, der auch das unmarkierte Protein bereitgestellt hat. Es wurden zwei Proben parallel angesetzt. Neben dem Komplex mit der  $^{13}\text{C}$ -markierten DNA wurde ein zweiter Komplex mit unmarkierter DNA angesetzt. Die Einzelstränge der unmarkierten

DNA stammten von der Fa. Biospring, wurden kurz zuvor geliefert und analog der markierten DNA zum Duplex dimerisiert. Die Qualität der DNA-Duplexe wurde durch ein Acrylamid-Gel auf eventuellen Abbau bzw. auf Einzelstrang untersucht. Der markierte DNA-Duplex war zu diesem Zeitpunkt 9 Monate alt. Beide Duplexe zeigten dabei keinerlei Auffälligkeiten. Es konnten auch keine Unterschiede zwischen dem markierten und dem unmarkierten DNA-Duplex gefunden werden.

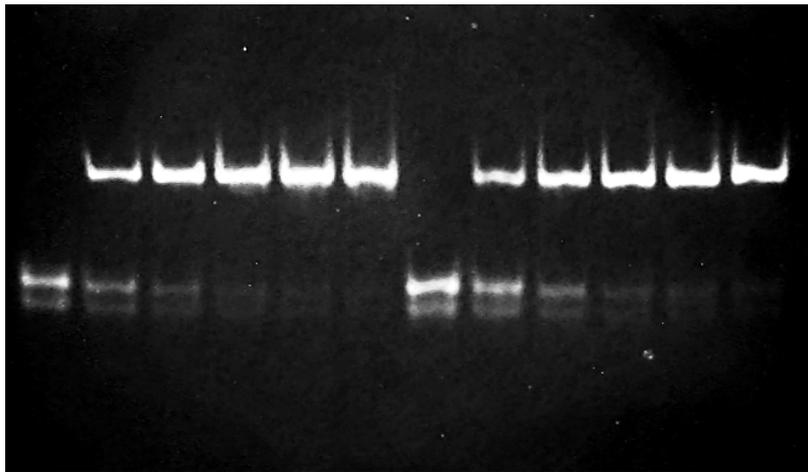


Abbildung 8.1: Nichtdenaturierendes Acrylamid-Gel der Test-Titration des mSox5-Protein-DNA-Komplex. Bahn 1-6 zeigt den unmarkierten Duplex ohne bzw. dessen Titration gegen das Protein im Verhältnis 0,75:1; 0,9:1; 1:1; 1,1:1; und 1,2:1 (Protein/DNA). Bahn 6-12 zeigt entsprechend den  $^{13}\text{C}$ -markierten Duplex in freier Form bzw. dessen Titration gegen das Protein.

Die DNA-Duplexe wurden durch Ultrafiltration über ein Centricon-Cap mit einer 3000er Membran entsalzt und in einen  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer aus 40mM Kaliumphosphat pH 6 überführt. Der genaue Gehalt an DNA in der Lösung wurde durch Messung des OD-Wertes UV-spektroskopisch ermittelt. Um die notwendige Genauigkeit der Messung zu gewährleisten, wurden von jeder Lösung der DNA-Duplexe ungefähr 1 OD entnommen und mit Phosphodiesterase abgebaut. Anschließend wurde die UV-Absorption gemessen. Die Messung der Summe der Absorptionen der Nucleosidmonophosphate ist genauer, als die Messung der Oligonukleotide.

Das Protein wurde von Dr. Ch. Read durch Expressierung aus E-Coli gewonnen (Connor et al., 1994). Das Protein hat eine Länge von 81 Aminosäuren und enthält neben der mSox5-HMG-Box noch ein N-terminales Dipeptid, das aus dem GST-Fusions-Expressionssystem stammt. Die Aufreinigung des Peptids erfolgt im entfaltenen

Zustand über HPLC- bzw. Gel-Chromatographie, bevor das Protein durch Überführen in einen Phosphatpuffer wieder gefaltet wird. Die Qualität des so erhaltenen Proteins wird durch ein Agarosegel getestet. Zum Ansetzen der NMR-Probe wurde das lyophilisierte Protein in einem Puffer aus Kaliumphosphat in D<sub>2</sub>O aufgenommen.

Für die Bildung der Komplexe wurde zunächst eine Test-Titration von markierter und unmarkierter DNA gegen das Protein vorgenommen und über ein Acrylamid-Gel ausgewertet. Dazu wurden das in einem Puffer aus 40mmol Kaliumphosphat in D<sub>2</sub>O gelöste Protein in 4 verschiedenen Verhältnissen von Protein/DNA 0,75:1-1,2:1 zu den DNA-Lösungen zugegeben. Während bei dem Verhältnis 0,9:1 (Protein/DNA) noch Spuren der freien DNA zu erkennen sind, ist bei dem 1:1 Verhältnis fast keine freie DNA mehr zu erkennen. Bei dem Verhältnis 1,1:1 ist keine freie DNA mehr zu erkennen.

Um sicher zu gehen, daß in den NMR-Proben des Komplexes keine freie DNA enthalten ist, wurde der Komplex in einem Verhältnis von DNA zu Protein von 1:1,05 angesetzt. Damit sollte sichergestellt werden, daß die fertigen NMR-Proben trotz möglicher Ungenauigkeiten beim Ansetzen keine freie DNA enthalten. Die freie DNA würde durch die Isotopenmarkierung in den NMR-Spektren mehr stören als freies Protein. Da erst bei einem sehr hohen Überschuß von freiem Protein ein zweites Protein unselektiv an die DNA bindet (Privalov et al., 1999), besteht keine Gefahr, das die Einheitlichkeit der Probe durch den Proteinüberschuß gefährdet wird. Die Protein-DNA-Komplexe wurden durch langsames Zufügen des Proteins zur DNA angesetzt. Dabei konnte beobachtet werden, daß nach Zugabe des Proteins jeweils eine kurze Trübung der Lösung auftrat, die innerhalb einer knappen Minute wieder verschwand. Die Lösungen der fertigen Komplexe waren jeweils klar. Beide Lösungen wurden nach Kontrolle des pH-Werts von pH 6 und Zugabe von 0.01 % Natriumazid und 100 µM Dithiothreitol (DTT) zur Stabilisierung der NMR-Proben gegen Oxidation bzw. Abbau in ein Shigemi-NMR-Röhrchen überführt. Die fertige NMR-Probe des markierten Komplexes hat eine Endkonzentration von 0.7 mmol bei einem Probenvolumen von 300 µl. Die Probe des unmarkierten Komplexes hat eine Konzentration von 1 mmol.

## 8.2 Die Untersuchung des mSox5-Protein-DNA-Komplex

Die Bildung des DNA-Protein-Komplexes wurde schon früher durch Aufnahme einer NMR-Titration von DNA gegen Protein untersucht. Dabei wurde die unmarkierte DNA gegen das Protein titriert und die Veränderung des Iminospektrums beobachtet. Es konnte deutlich die Veränderung der Signale erkannt werden. Von den angesetzten Komplexen konnte kein Iminospektrum aufgenommen werden, da die Proben in  $D_2O$  gelöst sind. Iminospektren können aber nur in wasserhaltigen Lösungsmitteln aufgenommen werden, da die Iminprotonen in  $D_2O$  gegen Deuterium austauschen.

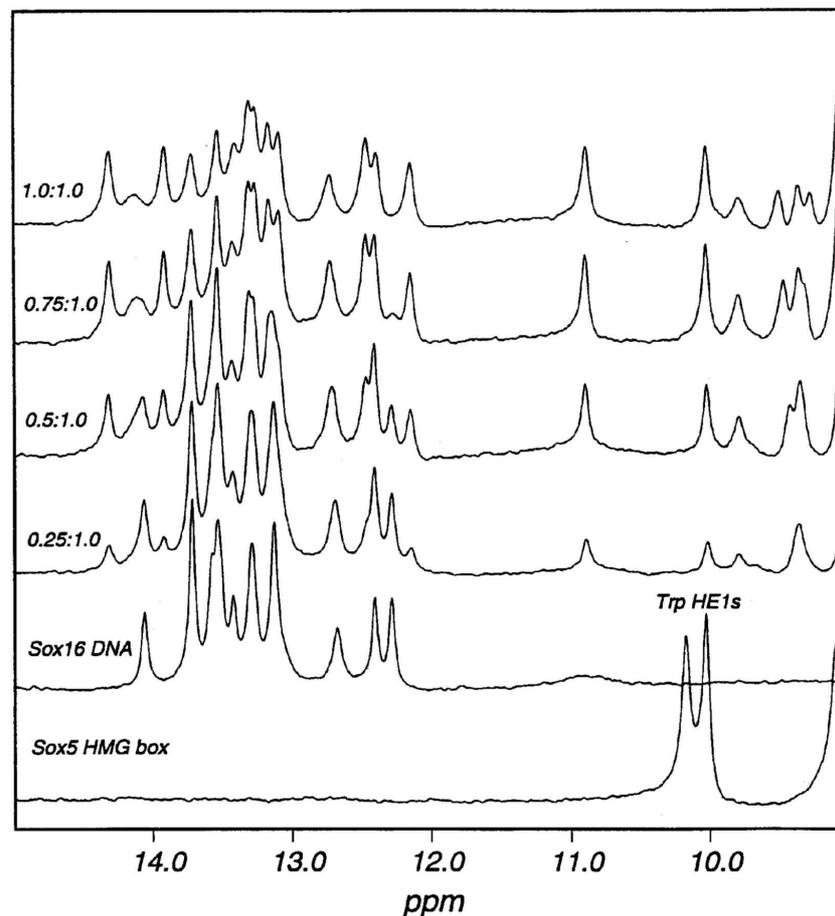


Abbildung 8.2:  $^1H$ -NMR-Spektrum der Titration des DNA-Duplex gegen die mSox5-HMG-Box.

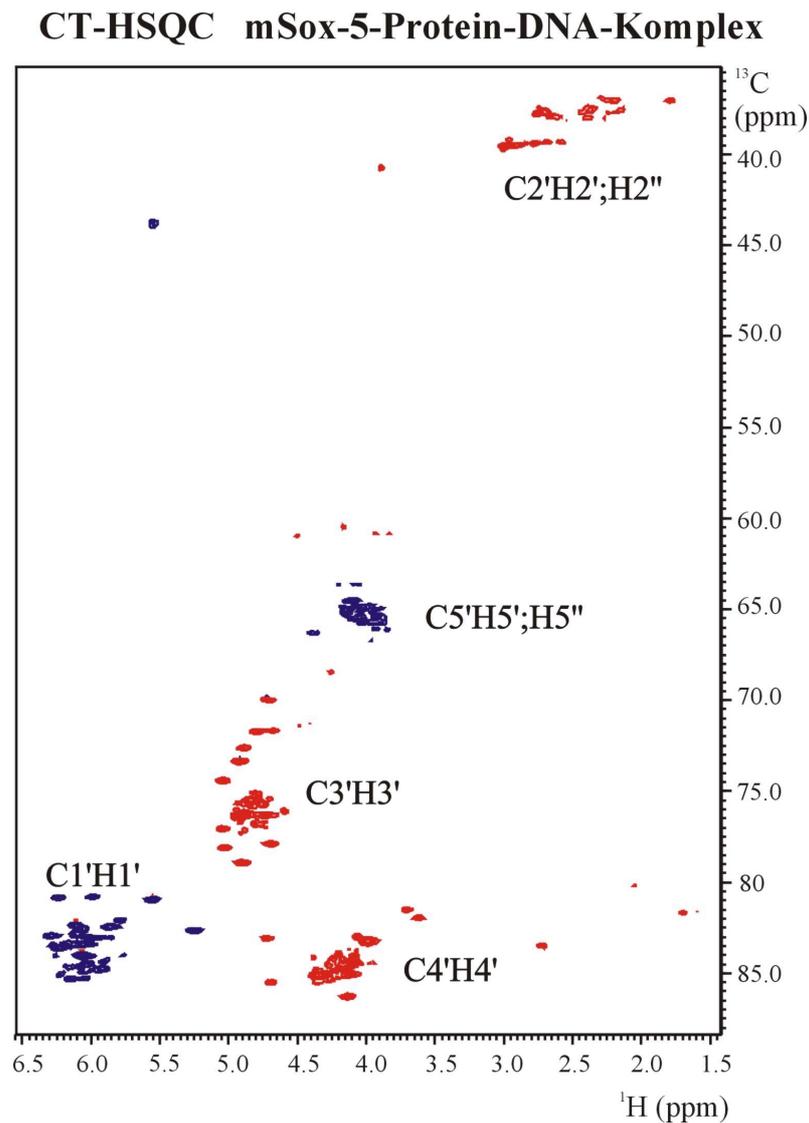


Abbildung 8.3: CT-HSQC des markierten mSox5-Protein-DNA-Komplexes.

Direkt nach Ansetzen der Komplexe wurde ein CT-HSQC des markierten Komplexes gemessen (siehe Abb. 8.3). Da zum ersten Mal ein mSox5-Protein-DNA-Komplex mit markierter DNA angesetzt wurde, ist es das erste HSQC-Spektrum, bei dem bei der komplexierten DNA die  $1J$ -Verknüpfung von Proton zu Kohlenstoff gemessen wurde. Dabei wurde festgestellt, daß in dem Spektrum zwei Signalsätze im Verhältnis von 2:3 zu erkennen sind. Auch durch Aufnahme von Spektren bei verschiedenen Temperaturen konnte dies nicht geändert werden.

Da zum ersten Mal ein doppelter Signalsatz festgestellt wurde konzentrierte sich die Untersuchung des mSox5-Protein-DNA-Komplexes auf die Ursache der Signalsatz-

verdopplung. Zunächst wurde untersucht, ob diese auf einen Fehler der in Frankfurt bereiteten Proben zurückzuführen ist.

Dazu hat Dr. Ch. Read die in Frankfurt bereiteten Proben an einem nichtdenaturierenden Acrylamidgel auf Anormalitäten geprüft. Die DNA-Duplexe unterscheiden sich im Gel nicht von anderen Duplexen. Es konnten auch keine Anzeichen auf einzelsträngige DNA, die sich durch Auftreten weiterer Banden bemerkbar gemacht hätte, erkannt werden. Das Protein bindet bevorzugt an doppelsträngige DNA, kann aber auch fest an einzelsträngige DNA binden. Das der zweite Signalsatz durch Bindung des Proteins an einzelsträngige DNA auftritt, kann dadurch ausgeschlossen werden.



**Abbildung 8.4:** Nichtdenaturierendes Acrylamid-Gel zur Kontrolle der Komplexe, durchgeführt von Chris Read: Bahn 1: mSox5-DNA Top-strand; Bahn 2: mSox5-DNA Bottom-strand; Bahn 3: mSox5-DNA-Duplex, unmarkiert Kontrolle aus Portsmouth; Bahn 4, 5: mSox5-DNA-Duplex, unmarkiert, Frankfurt; Bahn 6: mSox5-Protein-DNA-Komplex, Protein/DNA-Verhältnis 1:1, unmarkiert, von Test-Titration Frankfurt; Bahn 7: mSox5-Protein-DNA-Komplex Protein/DNA-Verhältnis 1,05:1, unmarkiert, von NMR-Probe Frankfurt; Bahn 8, 9: 16mer DNA-Duplex, selektiv  $^{13}\text{C}$  markiert, Frankfurt; Bahn 10: Sox5-Protein-DNA-Komplex, Protein/DNA-Verhältnis 1:1,  $^{13}\text{C}$  markiert, von Test-Titration Frankfurt; Bahn 11: Sox5-Protein-DNA-Komplex, Protein/DNA-Verhältnis 1,05:1,  $^{13}\text{C}$  markiert, von NMR-Probe Frankfurt. Nach Angaben von Chris Read kann auf dem Gel keine Auffälligkeit entdeckt werden (Read, 1999).

Bei den Komplexen konnten im Gel keine Auffälligkeiten festgestellt werden (siehe Abb. 8.4). Auf den Bahnen der Komplexe ist jeweils eine Bande zu erkennen. Auch ist die Lage der Banden gleich. Da keine weiteren Banden zu erkennen sind, gibt es

keine Anzeichen für eine doppelte Bindung von Protein an die DNA oder für noch vorhandene freie DNA. Eine uneinheitliche Bindung von Protein an die DNA z. B. ein Nebeneinander von doppelt komplexierter DNA und freier DNA kann daher ausgeschlossen werden. Es kann von einer vollständigen Bildung von Komplexen mit einem Protein-DNA-Verhältnis von 1:1 ausgegangen werden. Der Gehalt der Probe an freiem Protein kann über ein Acrylamid-Gel nicht getestet werden. Zur Kontrolle des Protein-DNA-Verhältnisses wurden deswegen vor dem Ansetzen der eigentlichen Proben die Test-Titrations der DNA gegen das Protein durchgeführt.

Die sequenzspezifische Bindung des Proteins an dem 16mer DNA-Duplex erfolgt mit einer Bindungskonstante von  $K_d=34\pm 3,1$  nM. (Privalov et al., 1999) Deshalb kann davon ausgegangen werden, das sämtliches zugegebenes Protein sequenzspezifisch an die DNA bindet, solange freie DNA in der Lösung vorhanden ist. Ein großer Überschuß von Protein zu DNA sollte damit ausgeschlossen sein. Auch kann man im Gel keine Unterschiede von den Test-Titrations zu den NMR-Proben erkennen. Das freie Protein wurde von Dr. Ch. Read in Portsmouth vor dem Ansetzen der Komplexe über ein Agarosegel auf seine Qualität getestet.

Andere Untersuchungsmethoden, wie Massen- oder CD-Spektroskopie wurden nicht durchgeführt. Nach Angaben von Dr. Ch. Read sind in Massenspektren auf Grund der Fragmentierung keine neuen Erkenntnisse zu erwarten. Auch durch die Aufnahme und Auswertung von CD-Spektren ist laut Dr. Ch. Read kein Aufschluß über mögliche Ursachen für den doppelten Signalsatz zu erwarten (Read, 1999).

Bei dem Ansetzen des Proteinkomplex wurden Proben zurückbehalten, die für Analytik vorgesehen waren. Diese Proben wurden entgegen der Absprache von Dr. Ch. Read bei der Rückreise nach England mitgenommen. Ein Teil der Proben hat er für die Gele verwendet. Da auch nach Aufforderung keine Rückgabe der restlichen Proben erfolgte, konnte keine weitere Analytik durchgeführt werden.

Trotz intensiver Untersuchungen konnte bislang keine Erklärung für den zweiten Signalsatz gefunden werden. Offensichtlich liegt der Komplex in einer zweiten Konformation vor. Ob diese auf einen noch unentdeckten Fehler bei den in Frankfurt bereiteten NMR-Proben zurückzuführen ist oder ob es sich um eine natürliche Eigenschaft des mSox5-Protein-DNA-Komplexes handelt, daß dieser in zwei Konformati-

onen existiert, muß offen bleiben. Die Probe des markierten Komplexes unterscheidet sich nur in den NMR-Spektren von anderen Proben. Da es keine Probe mit einem vergleichbaren Markierungsmuster gibt, ist ein Vergleich mit den Spektren anderer Proben schwierig. Durch Vergleich von homonuklearen NOESY-Spektren der markierten und der unmarkierten Probe konnte festgestellt werden, daß beide in Frankfurt angesetzte Proben identisch sind. Vergleicht man allerdings den C1'H1'-Bereich in den HSQC-Spektren der unmarkierten Probe mit einer Probe aus markiertem Protein und unmarkierter DNA zeigen sich in der unmarkierten Probe deutlich mehr Signale. Als Ergebnis der Untersuchungen kann ausgeschlossen werden, daß die Ursache für die Signalsatzverdopplung auf einen Fehler des isotoopenmarkierten DNA-Duplex oder auf Effekte durch die Isotoopenmarkierung zurückzuführen ist.

Das Projekt zur Untersuchung des mSox5-Protein-DNA-Komplexes ist eine Kooperation zwischen den Gruppen in Frankfurt und Portsmouth. In Portsmouth wird das mSox5-Protein in freier, wie in komplexierter Form seit mehreren Jahren untersucht. Deshalb war es der Gruppe in Frankfurt nur gestattet, die DNA zu untersuchen. Die Aufklärung der Struktur des Proteins hat sich Dr. Ch. Read vorbehalten. Die Spektren des komplexierten Proteins konnten von Dr. Ch. Read bisher nicht vollständig zugeordnet werden. Aus den bisher gewonnenen Daten konnte vorhergesagt werden, welche Aminosäuren an der Bindung zur DNA beteiligt sind und an welche Nukleotide der Kontakt erfolgt (siehe Abb. 7.2 in Kapitel 7).

Zur Unterstützung der Gruppe in Portsmouth wurden in Frankfurt NMR-Spektren eines von Dr. Ch. Read hergestellten Komplexes aus unmarkierter DNA und <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-markiertem Protein aufgenommen. In den Spektren traten mehr Signale des komplexierten Proteins auf, als erwartet. So konnte bei mehreren Signalen, die von an der Bindung des Proteins an die DNA beteiligten Aminosäuren stammen, eine Signalaufspaltung entdeckt werden. Die Signalaufspaltung tritt bei 3 Aminosäuren im C-Terminus (K79-T81) auf. Außerdem zeigen die Aminogruppen der Asparagine und der Glutamine eine Signalaufspaltung. Diese wurden von Seiten der Gruppe aus Portsmouth bislang immer auf Kopplungseffekte zurückgeführt. Da es NMR-technisch keine Begründung für Kopplungseffekte gibt, muß davon ausgegangen werden, daß die Signalverdopplung durch einen 2. Signalsatz hervorgerufen

wird. Da die Konformation des Proteins bei der Komplexbildung nur wenig geändert wird, könnten die Unterschiede zwischen den beiden Konformationen auch gering sein, so daß sie durch Überlagerung nicht bei allen Signalen zu finden ist. Die NMR-Spektren des Komplexes mit markiertem Protein verdeutlichen, daß eine endgültige Auswertung der Struktur der komplexierten DNA erst möglich ist, wenn von Seiten der Gruppe aus Portsmouth eine Erklärung für die widersprüchlichen Daten gefunden werden konnte.

Bedauerlicherweise musste auch festgestellt werden, daß die Angebote, bei der Untersuchung des komplexierenden Proteins zu helfen, kaum angenommen wurden. Auch wurde die Kommunikation mit Dr. Ch. Read zunehmend schwieriger, nachdem er eingestehen musste, das auch in den Spektren andere Proben zumindest von einzelnen Resten doppelte Signale auftreten und somit der Wert seiner bisher gewonnenen Daten in Frage gestellt wurde.

Die Schwierigkeiten bei der Untersuchung des Komplexes und die ungeklärte Ursache für die Signalsatzverdopplung waren letztlich auch Anlass, weshalb auf die biochemische Synthese des vollmarkierten DNA-Duplex und dessen Komplexierung mit mSox5 verzichtet wurde. Die Synthese der DNA sollte von Dr. D. Blechschmidt im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt werden (Blechschmidt, 1999)

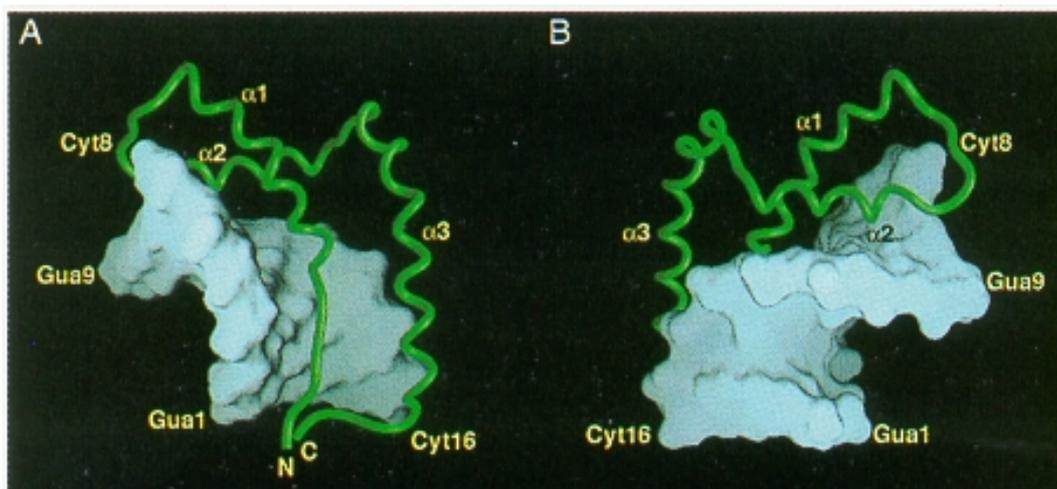


Abbildung 8.5: Der SRY-Protein-DNA-Komplex (Werner, 1995): a) Blick in die kleine Furche, b) Blick in die große Furche. Das Protein drängt sich in die kleine Furche, wodurch diese geweitet wird. Die Oberfläche der DNA ist grau, das Protein als grünes Band dargestellt.

Da bei der NMR-Spektroskopischen Untersuchung die Zuordnung der Signale des Protein-DNA-Komplexes noch nicht abgeschlossen ist, konnte auch noch keine Struktur berechnet werden. Bislang konnte die HMG-Box von mSox5 in freier sowie in DNA-gebundener Form lediglich durch CD- und Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen untersucht werden. Dabei wurde eine große Ähnlichkeit zu SRY festgestellt. Das Protein ändert seine Form durch die Komplexbildung kaum, während die DNA im Komplex wie bei HMG-Boxen üblich stark gekrümmt wird. Der Winkel um den die DNA geknickt ist, beträgt wie bei SRY ca. 70°.

Im Komplex von SRY mit der DNA schmiegt sich die DNA eng an das Protein an, wobei SRY ausschließlich an die kleine Furche bindet (Werner et al., 1995). Die Oberflächen von DNA und Protein ergänzen sich sehr gut. Die HMG-Box von SRY bildet mit der konkaven Oberfläche ihrer L-förmigen Struktur eine genaue Matrix, an die sich die DNA anpaßt. Die Helix 2 bewirkt dabei den charakteristischen Knick der DNA, indem sie sich in die kleine Furche der DNA zwängt.

Da die kleine Furche viel kleiner ist als die große Furche, ist dies nur unter einer massiven Störung der Geometrie der DNA möglich, wodurch es zu dem Abknicken der DNA in Richtung der großen Furche kommt, was mit einer Weitung der kleinen Furche einhergeht. Die Doppelhelix wird dabei entwunden und der Rollwinkel mehrerer Basenpaare im unmittelbaren Bereich des Knicks erhöht.

Auch bei mSox5 ist die Geometrie der DNA stark gestört, was bereits im CT-HSQC zu erkennen ist (siehe Abb. 8.6). Waren beim Duplex die Signale nach der Herkunft im Ribosering gruppiert, sind besonders die H1'C1', H3'C3' und H4'C4'-Signale jetzt deutlich uneinheitlicher. Einzelne Signale sind in der Kohlenstoffdimension über mehrere ppm, in der Protonendimension über mehrere Zehntel ppm verschoben. Es ist anzunehmen, daß die besonders weit verschobenen Signale von den Nukleotiden des geknickten Bereichs stammen. Wegen des doppelten Signalsatz war eine Zuordnung bislang allerdings unmöglich. Selbst eine grobe Bewertung des HSQC fällt schwer. Sollten die zwei Konformationen des Komplexes eine ähnliche Gestalt haben, könnte man auch eine ähnliche Signallage der sich entsprechenden Protonen erwarten. Eine Paarbildung von Signalen ist aber nicht zu beobachten. Lediglich fällt auf, daß jeweils eine geradzahlige Anzahl von isoliert stehenden Signalen zu beo-

bachten ist. Allerdings stehen die Signale soweit auseinander, daß kaum von einer paarweisen Gruppierung gesprochen werden kann.

Die weitergehende Untersuchung der DNA im mSox5-Protein-DNA-Komplex musste ausgesetzt werden, bis Dr. Chris Read die Zuordnung des Proteins abgeschlossen hat. Die bislang gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß die Signalsatzverdopplung nicht auf Fehler bei der Synthese des isotopenmarkierten DNA-Duplexes zurückzuführen sind.

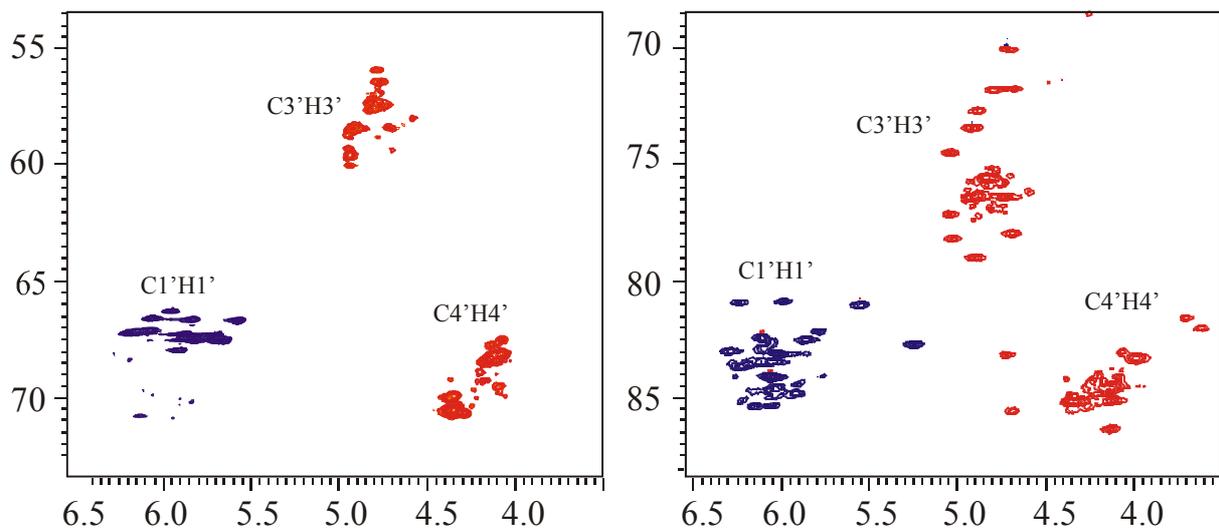


Abbildung 8.6: Ausschnitte der CT-HSQC des freien DNA-Duplexes (links) und des Protein-DNA-Komplexes (rechts). Auffallend ist die klare Gruppierung der Signale je nach Rest in dem Spektrum des Duplexes, die in dem Spektrum des Komplexes aufgelöst ist.

### 8.3 Vorteile der $^{13}\text{C}$ -Markierung

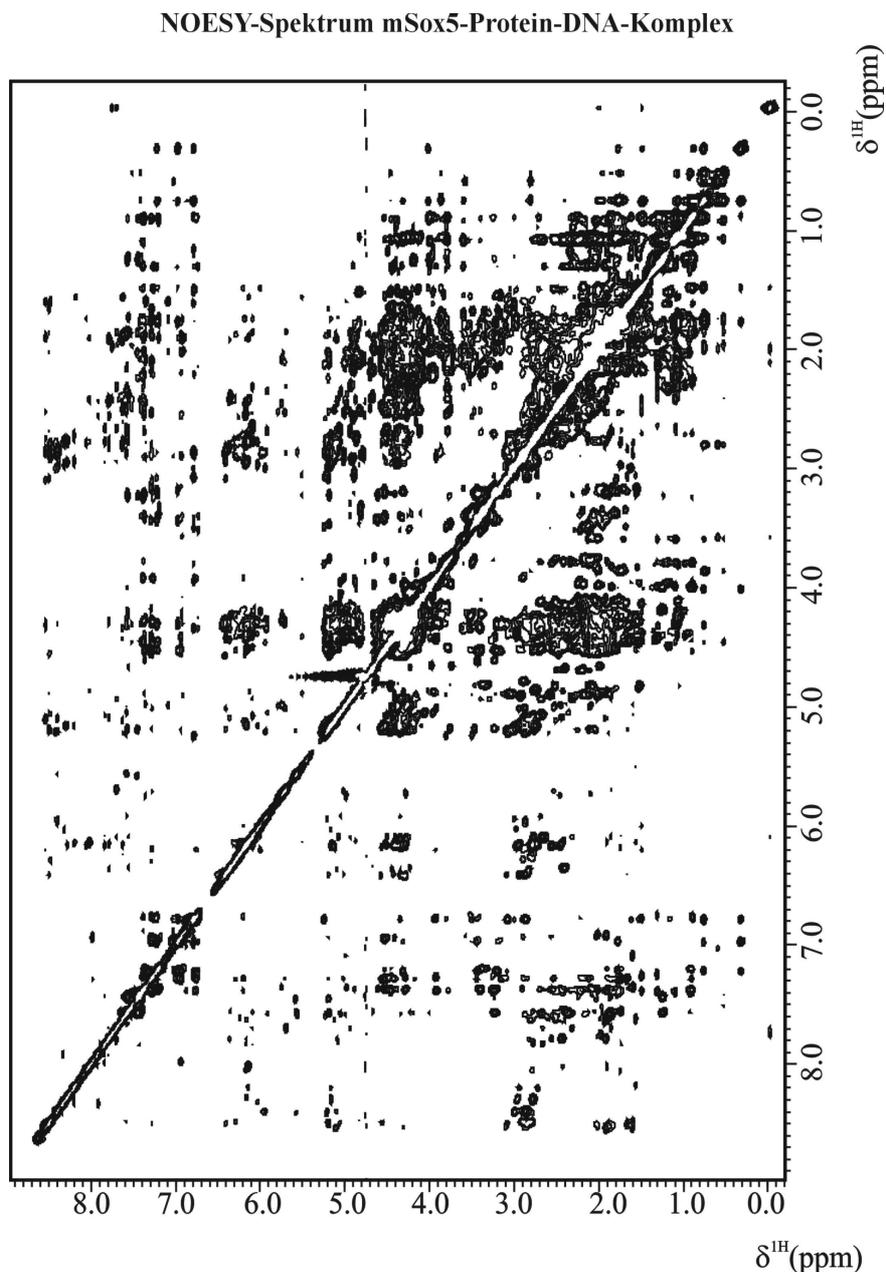


Abbildung 8.7: NOESY-Spektrum des Komplexes

Das NOESY-Spektrum des Komplexes (siehe Abb. 8.7) weist eine starke Signalüberlagerung auf, weshalb es von Dr. Ch. Read bislang nicht vollständig zugeordnet werden konnte. Durch die Markierung der DNA konnten Double-X-Filter-NOESY-Spektren aufgenommen werden (Richter, 1999).

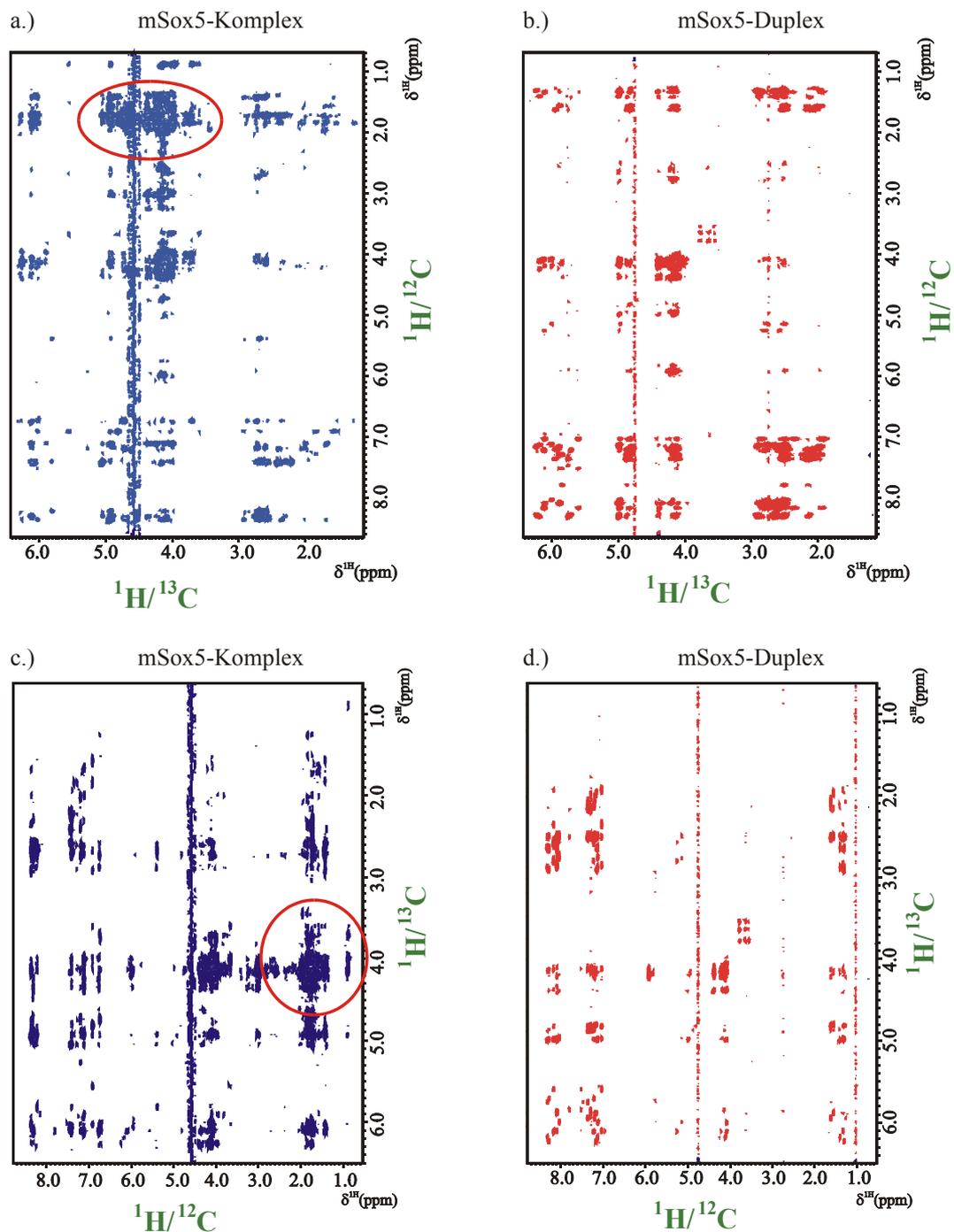


Abbildung 8.8  $^{13}C/^{13}C$  gefilterte NOESY-Spektren: a) und c) des mSox5-Protein-DNA-Komplexes und b) und d) des  $^{13}C$ -markierten DNA-Duplex: Die gefilterten NOESY-Spektren a) und c) am Sox5-HMG-Box-Protein DNA-Komplex b) und d) an der  $^{13}C$  markierten DNA. In den Spektren a) und b) treten nur Kreuzsignale von Protonen, die in  $\omega_1$  an  $^{12}C$  gebunden sind, zu Protonen, die in  $\omega_2$  an  $^{13}C$  gebunden sind auf. In den Spektren c) und d) ist die entgegengesetzte Konstellation zu beobachten.

Bei diesen können an  $^{13}C$ -markierten Kohlenstoffen gebundene Protonen, von solchen unterschieden werden, die an unmarkierten Kohlenstoffen gebunden sind. Man erhält so Spektren, die wahlweise nur die Signale von Protonen die an  $^{13}C$ -Kerne ge-

bunden sind bzw. von Protonen die an  $^{12}\text{C}$ -Kerne gebunden sind. Außerdem erhält man Spektren, in denen ausschließlich Resonanzen zwischen an  $^{13}\text{C}$ -Kerne gebundene Protonen und Protonen, die an  $^{12}\text{C}$ -Kerne gebunden sind auftreten.

Da ein Proton nicht gleichzeitig an einen  $^{12}\text{C}$ -Kern und einen  $^{13}\text{C}$ -Kern gebunden sein kann, werden Diagonalpeaks unterdrückt. Welche Protonen in welcher Dimension zu beobachten sind, ist je nach der Filterung beim Prozessieren beliebig. Dadurch kann die höhere Auflösung der  $\omega_1$ -Dimension ausgenutzt werden. Weitere Unterschiede können sich durch Artefakte ergeben.

In Abb. 8.8 sind die  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Spektren des Komplexes und der freien DNA gezeigt. Die DNA ist in beiden Proben isotonenmarkiert. Die nur durch die Isotopenmarkierung mögliche Filterung vereinfacht die Spektren wirksam. Vergleicht man die Spektren von Komplex und freier DNA fallen in den Spektren des Komplexes zusätzliche Signale auf, die von Kontakt-NOEs zwischen der DNA und dem Protein herrühren.

Die gefilterten NOESY-Spektren wurden auch genutzt, um einen Austausch zwischen den beiden Konformationen des Komplex zu prüfen. Dazu wurde der Bereich der  $\text{H1}'$ -Signale im  $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Spektrum des Komplexes auf Kreuzpeaks zwischen den  $\text{H1}'$ -Protonen untersucht. Bei der B-DNA treten zwischen den  $\text{H1}'$ -Protonen keine Kreuzpeaks auf, da die Distanzen zwischen den Protonen zu groß sind. Sollte es trotzdem Kreuzpeaks geben, können diese entweder durch die gestörte Geometrie der komplexierten DNA auftreten oder aber auf Austauscheffekten beruhen, wenn der Austausch zwischen den Konformationen während der Mischzeit der Messung stattfindet. Die Mischzeit des hier gezeigten Spektrums beträgt 300ms. In Abbildung 8.9 ist der  $\text{H1}'$ -Bereich des  $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Spektrums gezeigt. Im Gegensatz zu den  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Spektren treten hier wieder Diagonalsignale auf. Neben den Diagonalsignalen sind noch weitere schwache Signal zu sehen, die in Reihenform neben den Diagonalpeaks zu sehen. Diese könnten auf Austauscheffekten beruhen, können aber auch Artefakte z. B. aufgrund von Kopplungseffekten sein. Es gibt deshalb keinen sicheren Hinweis, dass es zwischen den Konformationen des mSox5-Protein-DNA-Komplex einen Austausch gibt.

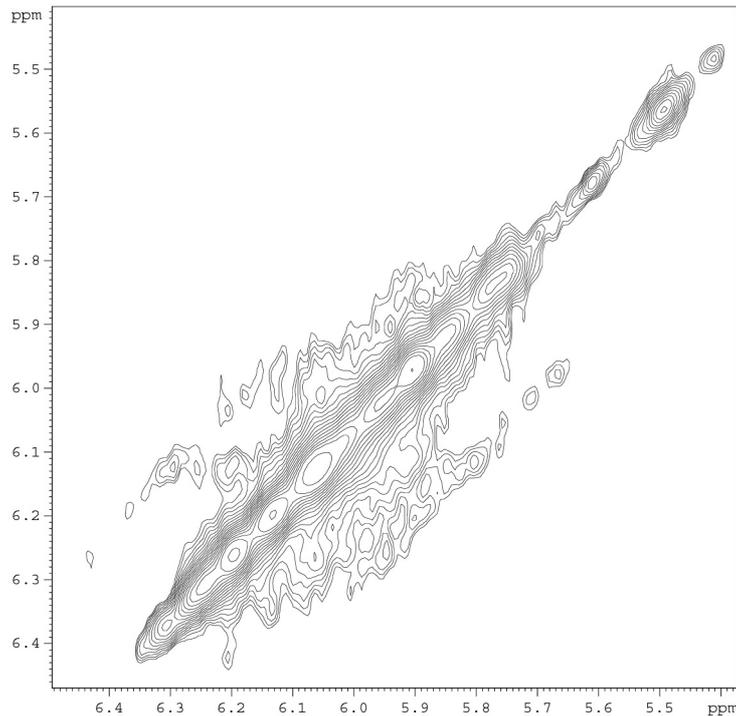


Abbildung 8.9: Ausschnitt der H1'-Region des  $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Spektrums.

Die vorläufigen Ergebnisse zeigen den großen Vorteil der Sequenz-selektiven Isotopenmarkierung. Durch die Markierung ergeben sich neue Magnetisierungstransfers, die die Entwicklung neuer Pulssequenzen ermöglichen. Die Zuordnung und Auswertung von NMR-Spektren ist hierdurch wesentlich vereinfacht. Außerdem können neue Strukturparameter ermittelt werden, die eine genauere Berechnung der Struktur ermöglichen. Als Beispiel seien nur die Messung von kreuzkorrelierter Relaxation und von dipolaren Kopplungen genannt. An dem DNA-Duplex konnten die dipolaren Kopplungen gemessen werden. Da die NMR-spektroskopische Untersuchung des ribosyl  $^{13}\text{C}$ -markierten Protein-DNA-Komplexes auf Grund der ungeklärten Signalsatzverdopplung nicht abgeschlossen ist, konnten die großen Vorteile, die die Sequenz-selektive  $^{13}\text{C}$ -Markierung bietet bislang nur zum Teil genutzt werden. Trotzdem zeigt sich, daß sich die Methode der Sequenz-selektiven  $^{13}\text{C}$ -Markierung von DNA durch chemische Synthese bewährt.

## 9 Zusammenfassung

Die moderne Strukturaufklärung von komplexen biologischen Systemen mittels NMR-Spektroskopie ist durch den Zugang zu isotopenmarkierten Proben sehr erleichtert worden. Die Untersuchung von DNA-Strukturen ist im Vergleich zur Untersuchung von Proteinen und von RNA im Rückstand, was nicht zuletzt an den beschränkten Zugangswegen von isotopenmarkierter DNA liegt.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines über mehrere Jahre laufenden Projekts der Arbeitskreise Prof. Griesinger und Prof. Schwalbe zur Entwicklung von Zugangswegen zu  $^{13}\text{C}$ -markierten Oligonukleotiden durch chemische Synthese, das mit der Synthese von  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose durch Dr. Stefanie Quant begann. Ihre Arbeit wurde mit der Synthese der Phosphoamidite bei den Pyrimidinen von Dr. Valentin Wittmann und Christian von der Heyden fortgesetzt. Bei den Purinen hat Dr. Rainer Wechsel-

berger kurzzeitig an einer Synthese des Desoxyadenosin-Phosphoamidits gearbeitet, ohne die Synthese zu einem Abschluß bringen zu können. Eine erste Synthese des Desoxyguanosin-Phosphoamidits wurde in der vorhergehenden Diplomarbeit entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Synthese und Untersuchung eines  $^{13}\text{C}$ -markierten DNA-Duplex durchgeführt werden, der die Ziel-DNA des Transkriptionsfaktor mSox5 bildet. Auch die Bildung des Protein-DNA-Komplexes konnte ausgeführt werden. Damit konnte das DNA-Projekt erstmals zum Ziel gebracht werden. Grundlage war hierzu die erfolgreich entwickelte Synthese der Phosphoamidite von Desoxyadenosin und Desoxyguanosin. Mit der neuentwickelten Synthese von zweifach deuterierter vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose wurde bereits mit der weiteren Fortentwicklung des DNA-Projektes begonnen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in mehrere Unterpunkte auf: Der in den Kapiteln 2-4 beschriebenen Synthesen der Phosphoamidite, dem Protein-DNA-Komplex der HMG-Box von mSox5 und der ribosyl  $^{13}\text{C}$ markierten Ziel-DNA, der Inhalt der Kapitel 6-8 ist. und der neuentwickelten Synthese von zweifach deuterierter  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose, die in Kapitel 5 beschrieben wird.

Die Synthese der Phosphoamidite gliedert sich in drei Stufen: der Synthese der Nucleoside, deren Deoxygenierung zu den Desoxynucleosiden, die in der letzten Stufe zu den Phosphoamiditen funktionalisiert werden. Angesichts der sehr teuren Edukte galt es, die einzelnen Reaktionsvorschriften nicht nur auf eine möglichst hohe Ausbeute, sondern auch deren hohe Reproduzierbarkeit zu optimieren.

Die Synthese des Desoxyadenosin-Phosphoamidits konnte erfolgreich ausgearbeitet werden. Nach der weiter optimierten Glykosylierung von Adenosin, galt es bei der Deoxygenierung des basengeschützten Adenosins zum N-6-Bz-Desoxyadenosin, die die 2. Stufe bildet, vor allem eine geeignete Aufreinigung des Rohprodukts der Deoxygenierung zu finden. Die bisherigen Versuche der Synthesen sind in dieser Stelle immer gescheitert. Mit der neuentwickelten Trennung nach Derivatisierung konnte das Reinigungsproblem erfolgreich gelöst werden. N-6-Bz-Desoxyadenosin kann aus N-6-Bz-Adenosin mit einer umsatzbezogenen Gesamtausbeute von 55% gewonnen

werden. Die abschließende Synthese des Phosphoamidits erfolgt in 3 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 60%.

Die bei der Synthese des Desoxyadenosin-Phosphoamidits gewonnen Erkenntnisse wurden auch auf die Synthese des Desoxyguanosin-Phosphoamidits übertragen. Hierzu wurde die im Rahmen der Diplomarbeit ausgearbeitete Synthese modifiziert, wodurch die Ausbeute gesteigert werden konnte. Nach der Glykosylierung und Vollentschützung zum Guanosin erfolgt die Deoxygenierung zum Desoxyguanosin. Auch bei Desoxyguanosin erfolgt Aufreinigung nach der Deoxygenierung jetzt analog zum Desoxyadenosin durch Trennung nach der Derivatisierung zum Triisobutryl-Desoxyguanosin. Die Durchführung der auch anderweitig veränderten Synthese konnte hierdurch wesentlich vereinfacht werden.

Nach der erfolgreichen Optimierung der Reaktionen mit unmarkiertem Material konnte die Synthese der ribosyl  $^{13}\text{C}$ -markierten Verbindungen erfolgen.  $^{13}\text{C}$ -markiertes Adenosin wurde für mehrere Verwendungszwecke hergestellt. Nach dessen Deoxygenierung zum Desoxyadenosin konnte das  $^{13}\text{C}$ -markierte DNA-Phosphoamidit synthetisiert werden.

Auch für die Synthese des RNA-Phosphoamidits wurde  $^{13}\text{C}$ -markiertes Adenosin hergestellt. Die Funktionalisierung zum Amidit wird von Christian von Heyden durchgeführt.

Weiterhin konnte  $^{13}\text{C}$ -markiertes Adenosin nach seiner von Josef Fischer, Bayreuth durchgeführten Veresterung mit Anthranilsäure zum  $^{13}\text{C}_5$ -markiertem Anthraniloyl-Adenosin als tRNA-Mimetikum eingesetzt werden. Das Anthraniloyl-Adenosin bindet an den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu). Die Isotopenmarkierung ermöglichte Dr. Isabella Felli und Dr. Teresa Carlomagno durch Messung der Transfer Kreuzkorrelierten Relaxation einen weiteren Parameter zur Strukturbestimmung fortzuentwickeln.

Die Synthese des Desoxyguanosin-Phosphoamidits soll erst mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Material ausgeführt werden, wenn eine adäquate Verwendung zur Verfügung steht. Der synthetische Aufwand, der mit hohen Kosten verbundenen Synthese ist zu groß, um das empfindliche Phosphoamidit auf Vorrat zu produzieren. Die Synthese ist ausgereift und kann kurzfristig durchgeführt werden.

Das Phosphoamidit von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Desoxyadenosin konnte in die Ziel-DNA von mSox5 eingebaut werden. In dem DNA-16mer-Duplex sind je 7 Desoxyadenosine und Thymidine in der Bindungsregion des Proteins ribosyl  $^{13}\text{C}$ -markiert. Das hierbei verwendete Thymidin-Phosphoamidit wurde von Dr. Valentin Wittman synthetisiert. Die hohe Qualität der Amidite bewies sich in der Festphasensynthese in der hohen Kupplungsrate, mit der die isotopenmarkierten Amidite reagiert haben. Nach der Festphasensynthese wurden die Einzelstränge mittels RP-HPLC gereinigt und zum Duplex dimerisiert.

Bereits bei der NMR-Spektroskopischen Untersuchung des DNA-Duplex, die in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Richter erfolgte, zeigten sich die Vorteile der Isotopenmarkierung. Die Isotopenmarkierung ermöglicht neue Pulssequenzen, durch die die Konformationsbestimmung des Zuckerrings wesentlich genauer durchgeführt werden kann.

Das Projekt zur Untersuchung des mSox5-Protein-DNA-Komplexes ist eine Kooperation mit Dr. Chris Read von der Universität Portsmouth, der das mSox5-Protein in freier, wie in komplexierter Form seit mehreren Jahren untersucht. Die Komplexierung der  $^{13}\text{C}$ -markierten DNA, sowie einer unmarkierten DNA mit der HMG-Box von mSox5 wurde in Zusammenarbeit mit ihm durchgeführt. Auch wurde das Protein von Dr. Chris Read zur Verfügung gestellt.

In den NMR-Spektren der in Frankfurt bereiteten Komplexe ist ein doppelter Signalsatz zu beobachten, weshalb die NMR-Spektroskopische Untersuchung der Struktur der komplexierten DNA noch nicht abgeschlossen werden konnte. Durch Untersuchungen konnte sicher gestellt werden, daß die Signalverdopplung nicht auf einen Fehler des  $^{13}\text{C}$ -markierten DNA-Duplex zurückzuführen ist. Ob die Bindung des Proteins an die DNA in einer zweite Konformation erfolgen kann oder ob doch ein Fehler der Proben zu den auch in anderen NMR-Proben des Komplex auftretenden Effekten führt, konnte bislang nicht geklärt werden. Die NMR-Spektroskopische Untersuchung der komplexierten DNA, die auch durch die sich zunehmend schwieriger gestaltete Zusammenarbeit mit Dr. Ch. Read erschwert wurde, kann erst nach dessen Abschluß der Arbeiten an dem komplexierenden Protein fortgesetzt werden.

Auch wenn die NMR-Spektroskopische Untersuchung des mSox5-Protein-DNA-Komplex noch nicht abgeschlossen ist, zeigen sich auch hier bereits die Vorteile der Isotopenmarkierung. Als Beispiel seien nur die gefilterte NOESY-Spektren genannt, durch die das Problem der Signalüberlagerung wesentlich entschärft werden kann.

Mit der Synthese von deuterierter Ribose konnte das laufende Projekt zur Isotopenmarkierung von DNA- und RNA-Proben auf eine weitere Ebene gebracht werden. Die Synthese fügt sich in die bisher ausgearbeiteten Synthesewege ein, so daß die nachfolgenden Stufen der Synthese der Phosphoamidite nicht neu ausgearbeitet werden müssen. Die Vorteile, die die Deuterierung von Oligonukleotiden bietet, können so ohne weiteren Aufwand genutzt werden.

Die fünfstufige von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose ausgehende Synthese der Ribose wird mit einer Gesamtausbeute von 45% durchgeführt. Im Vergleich zu der früheren Synthese von Dr. Steffi Quant wurden die zwei Schlüsselschritte der Synthese geändert, genauer gesagt die Kettenverkürzung zur Pentose und die jetzt durch Oxidation und anschließende stereoselektive Reduktion erfolgende Invertierung des C3. Das Deuterium wird im Rahmen der Reduktionsschritte eingeführt. Dadurch ist die Deuterierung ohne Ausbeuteverluste möglich. Die Qualität der zweifach deuterierten vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten Ribose zeigte sich bei der Glykosylierung von zweifach deuteriertem ribosyl  $^{13}\text{C}$ -markierten Adenosin, aus dem das Desoxyadenosin-Phosphoamidit hergestellt werden soll.

Die NMR-Spektroskopisch wünschenswerte selektive Deuterierung einzelner Positionen im Nukleotid ist nur bei der chemischen Synthese von Phosphoamiditen möglich. Mit der selektiven Deuterierung hat die chemische Synthese von isotopenmarkierter DNA einen weiteren sehr wichtigen Vorteil gewinnen können. Durch die im Rahmen dieser Dissertation erfolgte Synthese von zweifach deuterierter vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierter Ribose für die Synthese von Nukleosiden, konnte mit der Fortsetzung des seit mehreren Jahren erfolgreich laufende Projekts zur Synthese und NMR-Spektroskopische Untersuchung von Oligonukleotiden begonnen werden.

# 10 Experimenteller Teil

<b>10.1</b>	<b>Allgemeine experimentelle Bedingungen</b>	<b>116</b>
<b>10.2</b>	<b>Versuche zu Kapitel 2</b>	<b>118</b>
<b>10.2.1</b>	<b>Versuche zu Adenosin</b>	<b>118</b>
10.2.1.1	<i>N</i> -6-Benzoyladenin <b>23</b>	118
10.2.1.2	Tri- <i>O</i> -Acetyl- <i>N</i> -6-Benzoyl-Adenosin <b>24</b>	119
10.2.1.3	<i>N</i> -6-Benzoyl-Adenosin <b>25</b>	120
<b>10.2.2</b>	<b>Reaktionen zu <sup>13</sup>C-markiertem Adenosin</b>	<b>121</b>
10.2.2.1	Di- <i>O</i> -Benzoyl- <i>O</i> -Acetyl- <i>N</i> -6-Benzoyl- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> - Adenosin <b>50</b>	121
		112

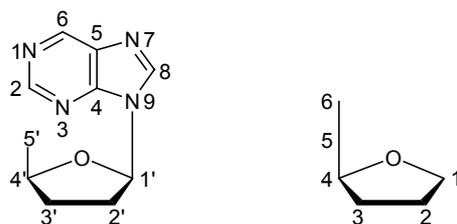
10.2.2.2	<i>N</i> -6-Benzoyl- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin <b>51</b>	122
10.2.2.3	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin <b>79</b>	123
<b>10.2.3</b>	<b>Versuche zu zweifach deuteriertem Adenosin</b>	<b>124</b>
10.2.3.1	Di- <i>O</i> -Benzoyl- <i>O</i> -Acetyl- <i>N</i> -6-Benzoyl-3,5-D <sub>2</sub> -Adenosin <b>24a</b>	124
10.2.3.2	<i>N</i> -6-Benzoyl-3,5-D <sub>2</sub> -Adenosin <b>25a</b>	125
<b>10.2.4</b>	<b>Versuche zu zweifach deuteriertem <sup>13</sup>C-markiertem Adenosin</b>	<b>126</b>
10.2.4.1	Di- <i>O</i> -Benzoyl- <i>O</i> -Acetyl- <i>N</i> -6-Benzoyl-3,5-D <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin <b>66</b>	126
10.2.4.2	<i>N</i> -6-Benzoyl-3,5-D <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin <b>67</b>	127
<b>10.2.5</b>	<b>Versuche zu Guanosin</b>	<b>128</b>
10.2.5.1	Tri- <i>O</i> -Acetyl- <i>N</i> -2-Acetyl-Guanosin <b>35</b>	128
10.2.5.2	Guanosin <b>36</b>	129
<b>10.3</b>	<b>Versuche zu Kapitel 3</b>	<b>130</b>
<b>10.3.1</b>	<b>Versuche zu Adenosin</b>	<b>130</b>
10.3.1.1	3',5'-TPDS- <i>N</i> -6-Bz-Adenosin <b>26</b>	130
10.3.1.2	2'- <i>O</i> -PTC-3',5'-TPDS- <i>N</i> -6-Bz-Adenosin <b>27</b>	131
10.3.1.3	<i>N</i> -6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin <b>29</b>	132
10.3.1.4	3',5'-Dibenzoyl- <i>N</i> -6-Dibenzoyl-2'-Desoxyadenosin <b>30</b>	133
<b>10.3.2</b>	<b>Versuche zu <sup>13</sup>C-markiertem Adenosin</b>	<b>134</b>
10.3.2.1	3',5'-TPDS- <i>N</i> -6-Bz- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin <b>52</b>	134
10.3.2.2	2'- <i>O</i> -PTC-3',5'-TPDS- <i>N</i> -6-Bz- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin <b>53</b>	134
10.3.2.3	<i>N</i> -6-Benzoyl- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -2'-Desoxyadenosin <b>11</b>	135
10.3.2.4	3',5'-Dibenzoyl- <i>N</i> -6-Dibenzoyl- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -2'-Desoxyadenosin <b>56</b>	136
<b>10.3.3</b>	<b>Versuche zu Guanosin</b>	<b>137</b>
10.3.3.1	3',5'- <i>O</i> -TPDS-Guanosin <b>37</b>	137
10.3.3.2	2'- <i>O</i> -PTC-3',5'- <i>O</i> -TPDS-Guanosin <b>38</b>	138
10.3.3.3	3',5'-TPDS-2'-Desoxyguanosin <b>39</b>	138
10.3.3.4	2'-Desoxyguanosin <b>40</b>	139
		113

10.3.3.5	Tri-Isobutyryril-2'-Desoxyguanosin <b>41</b>	140
<b>10.4</b>	<b>Versuche zu Kapitel 4</b>	<b>141</b>
<b>10.4.1</b>	<b>Versuche zu Desoxyadenosin</b>	<b>141</b>
10.4.1.1	3',5'-Dibenzoyl-N-6-Dibenzoyl-2'-Desoxyadenosin <b>30</b>	141
10.4.1.2	N-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin <b>29</b>	142
10.4.1.3	5'-O-DMT-N-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin <b>31</b>	143
10.4.1.4	5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-( $\beta$ -cyanoethyl)-N,N,-diisopropylamino-phosphyl-N-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin <b>32</b>	144
<b>10.4.2</b>	<b>Versuche zu <math>^{13}\text{C}</math>-markiertem Desoxyadenosin</b>	<b>145</b>
10.4.2.1	N-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -2'-Desoxyadenosin <b>55</b>	145
10.4.2.2	5'-O-DMT-N-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -2'-Desoxyadenosin <b>57</b>	146
10.4.2.3	5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-( $\beta$ -cyanoethyl)-N,N,-diisopropylamino-phosphyl-N-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -2'-Desoxyadenosin <b>58</b>	147
<b>10.4.3</b>	<b>Versuche zu Desoxyguanosin</b>	<b>148</b>
10.4.3.1	Tri-Isobutyryril-2'-Desoxyguanosin <b>41</b>	148
10.4.3.2	N-2-Isobutyryril-2'-Desoxyguanosin <b>42</b>	149
10.4.3.3	5'-O-Dimethoxytrityl-N-2-isobutyryl-2'-desoxyguanosin <b>43</b>	150
10.4.3.4	5'-O-Dimethoxytrityl-N-2-isobutyryl-3'-O-( $\beta$ -cyanoethyl)-N,N,-diisopropylamino-phosphyl-2'-Desoxyguanosin <b>44</b>	151
<b>10.5</b>	<b>Versuche zu Kapitel 5</b>	<b>152</b>
10.5.1.1	1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glukofuranose <b>2</b> , (Diacetonglukose)	152
10.5.1.2	1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glukofuranose <b>3</b>	153
10.5.1.3	1,2-O-Isopropyliden-3,5-D <sub>2</sub> -ribofuranose <b>4</b>	154
10.5.1.4	3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-Isopropyliden-3,5-D <sub>2</sub> -ribofuranose <b>5</b>	155
10.5.1.5	3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-O-acetyl-3,5-D <sub>2</sub> -ribofuranose <b>6</b>	156
10.5.2	Versuche mit $^{13}\text{C}$ -markiertem Material	157

10.5.2.1	1,2:5,6-Di- <i>O</i> -isopropyliden- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> - $\alpha$ -D-glukofuranose <b>61</b> , ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Diacetonglukose)	157
10.5.2.2	1,2:5,6-Di- <i>O</i> -isopropyliden- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> - $\alpha$ -D-glukofuranose <b>62</b>	157
10.5.2.3	1,2- <i>O</i> -Isopropyliden-3,5-D <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -ribofuranose <b>63</b>	158
10.5.2.4	3,5- <i>Di-O</i> -Benzoyl-1,2-Isopropyliden-3,5-D <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -ribofuranose <b>64</b>	159
10.5.2.5	3,5- <i>Di-O</i> -Benzoyl-1,2- <i>O</i> -acetyl-3,5-D <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -ribofuranose <b>65</b>	159
<b>10.6</b>	<b>Versuche zu Kapitel 7</b>	<b>160</b>
<b>10.6.1</b>	<b>Synthese des <sup>13</sup>C-markierten Oligonukleotids</b>	<b>160</b>
10.6.1.1	Festphasensynthese der <sup>13</sup> C-markierten DNA-Oligomere	160
10.6.1.2	Abspaltung der Oligonukleotide vom Trägerharz	161
10.6.1.3	Aufreinigung der Oligonukleotide durch RP-HPLC	161
10.6.1.4	Detritylierung und Butanol-Fällung	162
<b>10.6.2</b>	<b>Bildung des DNA- Duplexes</b>	<b>162</b>
10.6.2.1	Annealing des DNA-Duplexes	162
10.6.2.2	Natives Acrylamidgel	163
10.6.2.3	Ansetzten der NMR-Probe	163
<b>10.7</b>	<b>Versuche zu Kapitel 8</b>	<b>164</b>
10.7.1.1	Aufbereitung des DNA-Duplexes	164
10.7.1.2	Test-Titrationen	164
10.7.1.3	Ansetzen des Komplexes	164

## 10.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

NMR-Spektroskopie: Bruker AMX 400, Bruker AMX 600, Bruker AM 250 und Bruker WH 270 mit einer X32-Workstation. Bruker DMX 600 mit einer SGI INDY-Workstation, Bruker DRX600 mit einer SGI O2-Workstation, Bruker DMX 800 mit einer SGI INDY-Workstation.  $\delta$ -Werte in ppm. Bei Spektren, die in Dichlormethan aufgenommen sind, diente Tetramethylsilan ( $\delta=0,0$  ppm) bzw.  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta=7,26$  ppm) als Referenzsubstanz. Bei Spektren, die in  $\text{D}_6$ -DMSO aufgenommen wurden, diente DMSO als Referenz (2,52 ppm). Die Feinstruktur der Signale wurde mit s=Singulet, d=Dublett, dd= Doppeldublett, t=Triplett, m= Multiplett angegeben. Kopplungskonstanten in Hz. Die Nummerierung der Spektren erfolgte nach folgenden Schemata:



Elementaranalysen : C, H, N -Analysenautomat von Heraeus

Dünnschichtchromatographie: Fertigfolien Polygram<sup>®</sup>SIL G/UV<sub>254</sub> von Macherey-Nagel, Düren, Schichtdicke 0,25 mm. Soweit nicht anders angegeben diente bei allen angegebenen  $R_f$ -Werten Dichlormethan/Methanol (9/1) als Laufmittel. Die Chromatogramme wurden unter einer Fluotest-UV-Lampe von Heraeus betrachtet.

Flash-Chromatographie: Kieselgel G60 15-40  $\mu\text{m}$ , Merck, Darmstadt

RP-HPLC: Präparative HPLC: Bruker HPLC Pump LC22, Merck Hitachi I-4000 UV-Detektor; Analytische HPLC: Merck Hitachi L6200 Intelligent Pump, L3000 Photo Diode Array Detektor.

Gelelektrophorese: Biometra Multigel 8x11x0,1

Lyophilisator: Christ Alpha 2-4

SpeedVac: Jouan RC10.22

Transilluminator: Biometra T1

UV-Spektrometer: Perkin Elmer Lamda 16 mit Temperatureinheit PTP1

Zentrifugen: Heraeus Biofuge 13, Heraeus Biofuge Primo, Hettich Universal

ESI: VG Platform II

FPLC-Chromatographie: Pharmacia Peristaltic Pump P1, Pharmacia 2510 Uvicord SD, Pharmacia 2210 Superrac, ABB SE 420 Schreiber,

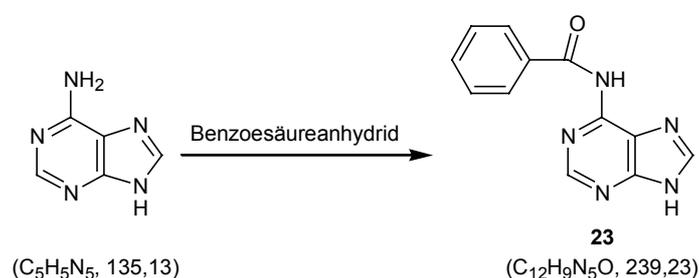
Die Chemikalien wurden über die Chemikalienausgabe der Chemischen Institute der Goethe-Universität Frankfurt bezogen.

Schutzgas: Argon 4.8, Linde

## 10.2 Versuche zu Kapitel 2

### 10.2.1 Versuche zu Adenosin

#### 10.2.1.1 *N*-6-Benzoyladenin 23

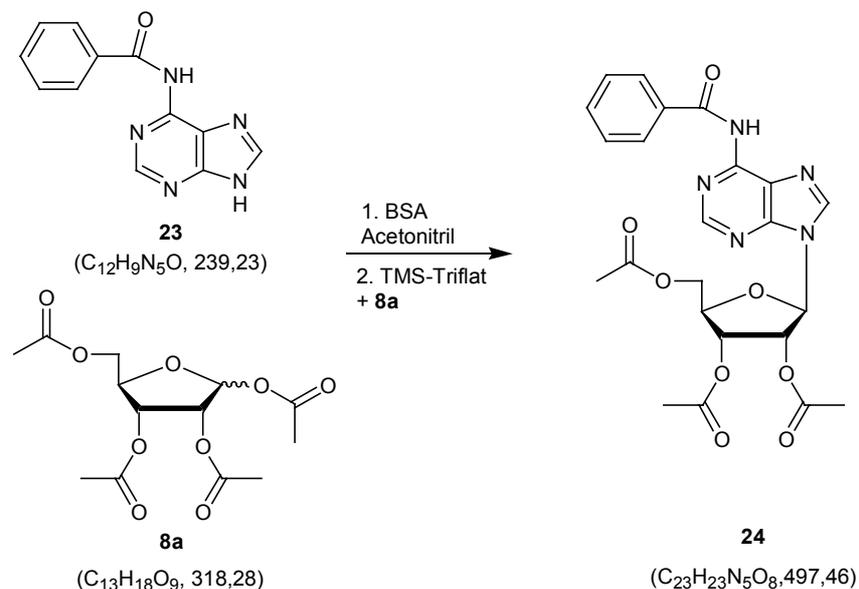


1,35 g (10 mmol) Adenin werden zusammen mit 4,25 g (20 mmol) Benzoessäureanhydrid zum Schmelzen erhitzt. Wenn die Masse vollständig geschmolzen ist, hält man sie noch eine halbe Stunde erwärmt. Nach dem Abkühlen wird die Masse in Ethanol/Diethylether umkristallisiert.

Produkt: 1,75 g (74% d.Th.)

Elementaranalyse: C: 60,03 (Ber.: 60,25), H: 4,02 (Ber.: 3,79) N: 29,37 (Ber.: 29,37)

$^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  11,98, (s, 1H,  $N_{-6}\text{-H}$ );  $\delta$  8,73 (s, 1H,  $H_8$ );  $\delta$  8,51 (s, 1H,  $H_2$ );  $\delta$  8,11 (d, 2H, Bz);  $\delta$  7,69-7,52 (m, 4H, Bz)

10.2.1.2 Tri-*O*-Acetyl-*N*-6-Benzoyl-Adenosin 24

*N*-6-Benzoyladenin und Tetra-*O*-Acetylribose werden über Nacht im Exsikkator über  $P_2O_5$  bei 60 C getrocknet.

287 mg (1,2 mmol) Benzoyladenin werden unter einer Argonatmosphäre in 8 ml abs. Acetonitril suspendiert und innerhalb von 15 Minuten in der Siedehitze durch 580  $\mu$ l (2,4 mmol) BSA silyliert, wobei die Lösung klar wird.

Darauf gibt man 318 mg (1 mmol) in 5 ml abs. Acetonitril gelöste Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranose und 270  $\mu$ l (1,5 mmol) TMSTf zu und refluxiert weitere acht Stunden. In der DC-Kontrolle sind anfangs drei Flecken zu erkennen. Der mittlere Fleck ( $R_f$ -Wert=0,53) stammt vom Produkt. Der obere Fleck ( $R_f$ -Wert=0,6) und der untere Fleck ( $R_f$ -Wert=0,45) stammen von Nebenprodukten. Während der obere nach ca. fünf Stunden nicht mehr zu sehen ist, bleibt der untere Fleck erhalten.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 45 ml Dichlormethan/Wasser (3/1) aufgenommen. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase nochmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit ges.  $NaHCO_3$ -Lösung und dest. Wasser extrahiert und mit  $MgSO_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man einen leicht gelben Schaum.

Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgt durch Flashchromatographie an 25 g Kieselgel. Elution erfolgt mit Dichlormethan/Methanol (39:1).

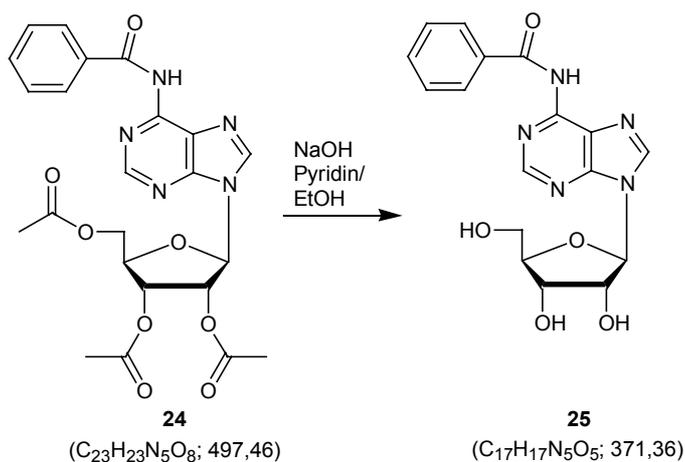
Produkt: 430 mg, (87% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,53

ESI: M(+): 498 (Theor. Wert für M(+): 498)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 9,08 (s, 1H, N<sub>6</sub>-H); δ 8,79 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ 8,18 (s, 1H, H<sub>2</sub>); δ 8,02 (d, 2H, Bz); δ 7,58- 7,48 (m, 3H, Bz); δ 6,26 (d, J<sub>1'-2'</sub>=5,5Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ 5,97 (t, J<sub>2'-3'</sub>=5,5Hz, 1H, H<sub>2'</sub>); δ 5,67 (dd, J<sub>3'-4'</sub>= 4,5Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); δ 4,45 (m, 3H, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>); δ 2,15-2,05 (3s, 9H, -CO-CH<sub>3</sub>)

### 10.2.1.3 N-6-Benzoyl-Adenosin 25



430 mg Tri-O-acetyl-N-6-Benzoyl-Adenosin werden in einem Gemisch aus 3 ml Pyridin und 3 ml Ethanol gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren gibt man 2 ml 2 M NaOH hinzu. Nach 15 Minuten wird die Lösung mit saurem Ionentauscher Dowex 50 WX 8 neutralisiert und vom Ionentauscher abgesaugt, wobei gut mit Wasser nachgespült wird. Die wässrige Lösung wird zweimal mit 30 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und lyophilisiert, wodurch man ein weißes Pulver von ausreichender Reinheit erhält.

Produkt: 340 mg (105% d. Th.)

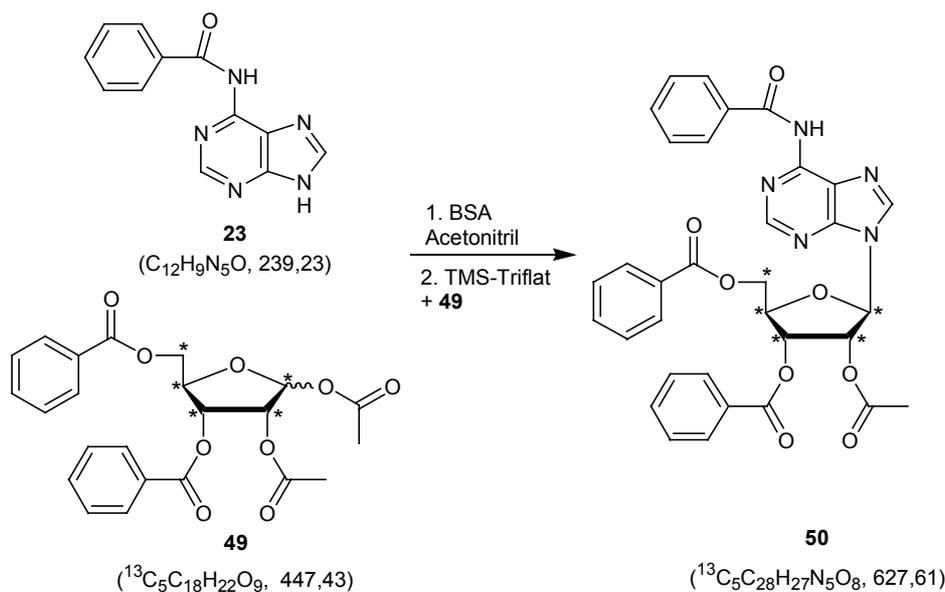
R<sub>f</sub>-Wert: 0,15

ESI: M(+): 372 (Theor. Wert für M(+): 372)

<sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 8,65 (s, 1H, H<sub>2</sub>); δ 8,07 (s, 1H, H<sub>8</sub>) δ 8,04(d, 2 H, Bz); δ 7,63- 7,5 (m, 3H, Bz); δ 6,01 (d, J<sub>1'-2'</sub>=5,5Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ 4,6 (t, J<sub>2'-3'</sub>=5,3Hz, 1H, H<sub>2'</sub>); δ 4,19 (t, J<sub>3'-4'</sub>=3,5Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); δ 3,99 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); δ 3,72 - 3,54 (m, 2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>)

## 10.2.2 Reaktionen zu <sup>13</sup>C-markiertem Adenosin

### 10.2.2.1 Di-O-Benzoyl-O-Acetyl-N-6-Benzoyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>- Adenosin 50



Die Reaktion wird entsprechend Reaktion 10.2.1.2 ausgehend von 720 mg (3 mmol) *N*-6-Benzoyl-Adenin und 1,1 g (2,5 mmol) 3,5-Di-*O*-Benzoyl-1,2-*O*-acetyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-Ribose **8** mit 1,5 ml BSA und 675 ml TMSTF in insgesamt 25 ml abs. Acetonitril durchgeführt.

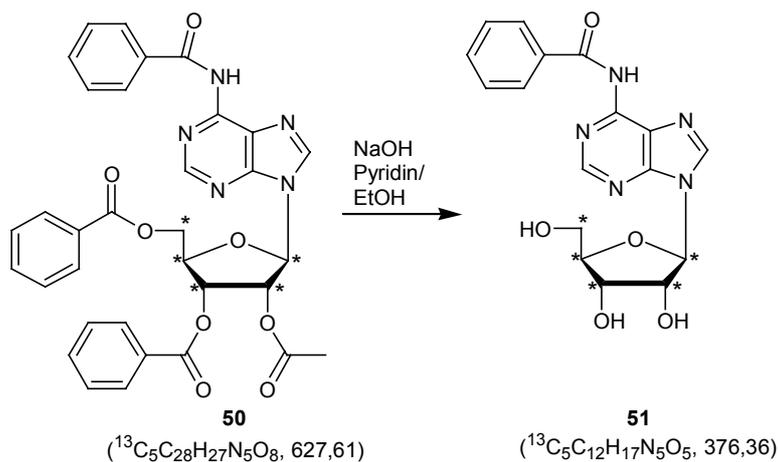
Produkt 1,33 g, (85% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,53

ESI: M(+):627,3 (Theor. Wert für M(+): 628)

NMR (CDCl<sub>3</sub>): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung.

### 10.2.2.2 *N*-6-Benzoyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-Adenosin 51



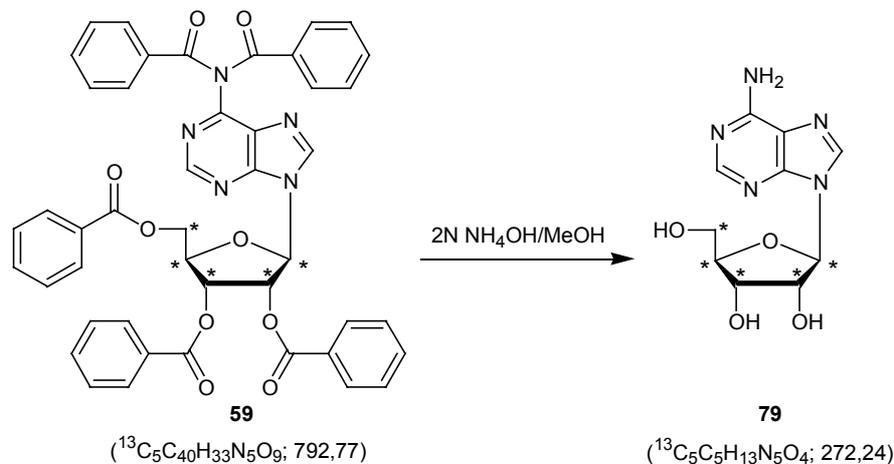
820 mg (1.3 mmol ) Di-*O*-Benzoyl-*O*-acetyl-*N*-6-Benzoyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-Adenosin werden entsprechend Reaktion 10.2.1.3 in einem Gemisch aus 6 ml Pyridin und 6 ml Ethanol gelöst und bei 0°C mit 3 ml 2 M NaOH innerhalb 35 Minuten entschützt. Das Rohprodukt ist von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Reaktion.

Produkt: 620 mg (128% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,15

ESI: M(-): 375,3 (Theor. Wert für M(-): 375)

NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

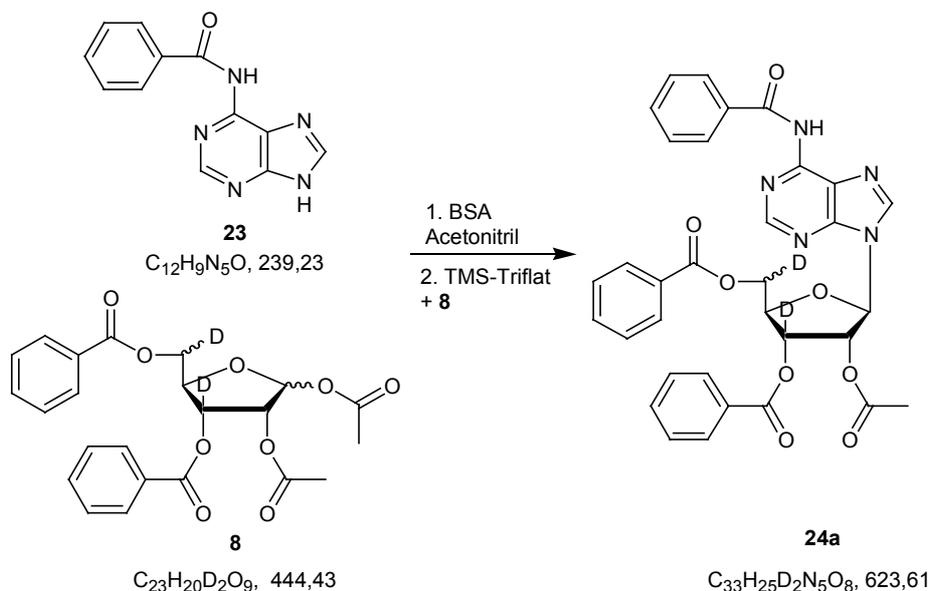
10.2.2.3  $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin 79

50 mg (0,85 mmol) Tri-*O*-Benzoyl-Di-*N*-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin werden in 4 ml 2 M  $\text{NH}_3$ /Methanol gelöst und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Adenosin als weißer Niederschlag ausfällt. Die entstandene Suspension wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, in 50 ml Wasser gelöst und lyophilisiert. Die Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie, wobei das Rohprodukt trocken vorgelegt wird. Dazu wird das Rohprodukt in 2 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 600 mg Kieselgel im Vakuum eingengt. Das dabei erhaltene Pulver wird auf eine mit Dichlormethan/Methanol 39/1 konditionierte Kieselgelsäule aufgetragen. Nachdem die Benzoesäure mit Dichlormethan/Methanol 39/1 von der Säule gespült wurde, wird das Produkt mit Acetonitril/Wasser 4/1 eluiert.

Produkt: 14 mg (36% d. Th.)

NMR ( $d_6$ -DMSO): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

## 10.2.3 Versuche zu zweifach deuteriertem Adenosin

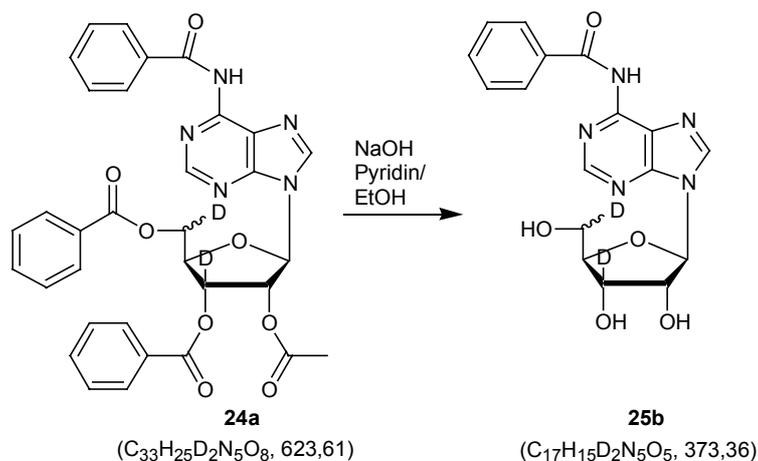
10.2.3.1 Di-O-Benzoyl-O-Acetyl-N-6-Benzoyl-3,5-D<sub>2</sub>-Adenosin 24a

Die Reaktion wird entsprechend Reaktion 10.2.1.2 ausgehend von 720 mg (3 mmol) *N*-6-Benzoyl-Adenin und 1,1 g (2,5 mmol) 3,5-Di-*O*-Benzoyl-1,2-*O*-acetyl-3,5-D<sub>2</sub>-Ribose **6** mit 1,5 ml BSA und 675 ml TMSTF in insgesamt 25 ml abs. Acetonitril durchgeführt.

Produkt 1,33 g, (85% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,53

NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,9 (s, 1H, N-6-H); δ 8,67 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ 8,18-8,02 (m, 7H, H<sub>2</sub>, Bz); δ 7,68-7,48 (m, 9H, Bz); δ 6,37 (d, J<sub>1'-2'</sub>=6 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ 6,26 (d, 1H, H<sub>2'</sub>); δ 4,86 (d, J<sub>5'-4'</sub>=3,5 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); δ 4,75 (d, 1H, H<sub>4'</sub>), δ 4,64 (d, 1H, J<sub>5'-4'</sub>=4 Hz, H<sub>5'</sub>); δ 2,05 (s, 3H, -CO-CH<sub>3</sub>)

10.2.3.2 *N*-6-Benzoyl-3,5-D<sub>2</sub>-Adenosin 25a

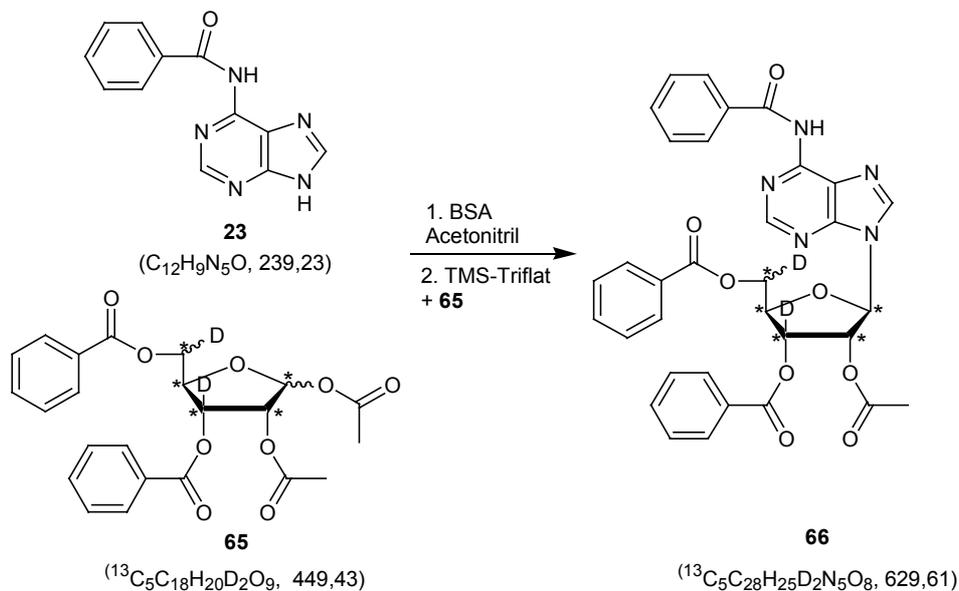
820 mg (1.3 mmol) Di-*O*-Benzoyl-*O*-acetyl-*N*-6-Benzoyl-3,5-D<sub>2</sub>-Adenosin werden entsprechend Reaktion 10.2.1.3 in einem Gemisch aus 6 ml Pyridin und 6 ml Ethanol gelöst und bei 0°C mit 3 ml 2 M NaOH innerhalb 35 Minuten entschützt. Das Rohprodukt ist von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Reaktion.

Produkt: 620 mg (128% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,15

ESI: M(-): 372 (Theor. Wert für M(-): 372)

NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 8,65 (s, 1H, H<sub>2</sub>); δ 8,07 (s, 1H, H<sub>8</sub>) δ 8,04(d, 2 H, Bz); δ 7,63- 7,5 (m, 3H, Bz); δ 6,01 (d, J<sub>1'-2'</sub>=5,5Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ 4,6 (d, 1H, H<sub>2'</sub>); δ 3,99 (d, J<sub>4'-5'</sub>=5,5Hz 1H, H<sub>4'</sub>); δ 3,7(d, 1H, H<sub>5'</sub>); δ 3,54 (d, 1H, H<sub>5''</sub>)

10.2.4 Versuche zu zweifach deuteriertem  $^{13}\text{C}$ -markiertem Adenosin10.2.4.1 Di-*O*-Benzoyl-*O*-Acetyl-*N*-6-Benzoyl-3,5- $\text{D}_2$ - $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin 66

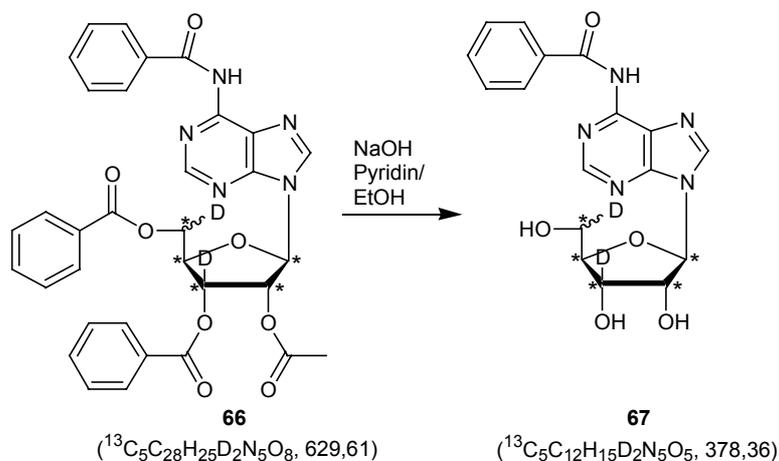
Die Reaktion wird entsprechend Reaktion 10.2.1.2 ausgehend von 290 mg (1,2 mmol) *N*-6-Benzoyl-Adenin und 440 mg (1 mmol) 3,5-Di-*O*-Benzoyl-1,2-*O*-acetyl-3,5- $\text{D}_2$ - $^{13}\text{C}_5$ -Ribose **65** mit 580  $\mu\text{l}$  (2,4 mmol) BSA und 270 ml (1,5 mmol) TMSTF in insgesamt 15 ml abs. Acetonitril durchgeführt.

Produkt 680 mg, (90% d. Th.)

$R_f$ -Wert: 0,53

ESI:  $M(+)$ : 629 (Theor. Wert für  $M(-)$ : 630)

NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): in Übereinstimmung zu Verbindung 10.2.3.1

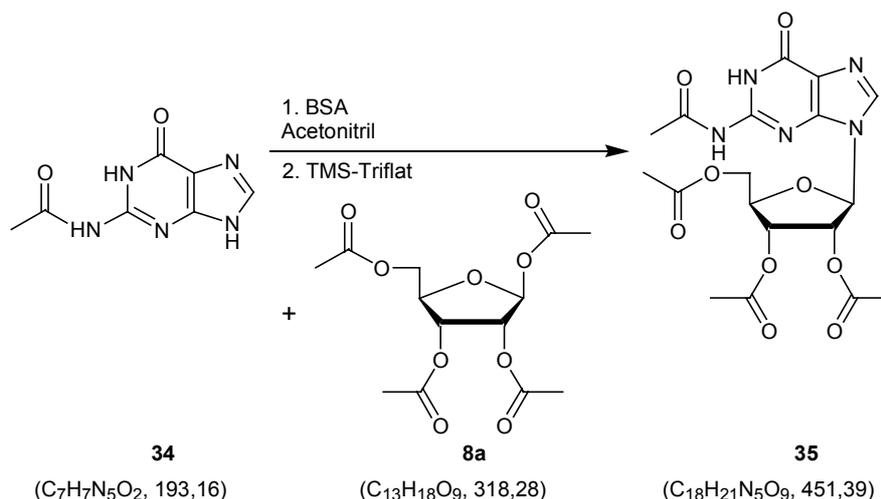
10.2.4.2 *N*-6-Benzoyl-3,5-D<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-Adenosin 67

480 mg (0,76 mmol ) Di-*O*-Benzoyl-*O*-acetyl-*N*-6-Benzoyl-3,5-D<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-Adenosin werden entsprechend Reaktion 10.2.1.3 in einem Gemisch aus 3 ml Pyridin und 3 ml Ethanol gelöst und bei 0°C mit 2 ml 2 M NaOH innerhalb 40 Minuten entschützt. Das Rohprodukt ist von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Reaktion.

Produkt: 400 mg (130% d. Th.)

NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

## 10.2.5 Versuche zu Guanosin

10.2.5.1 Tri-*O*-Acetyl-*N*-2-Acetyl-Guanosin 35

*N*-2-Acetylguanin und Tetra-*O*-Acetylribose werden über Nacht im Exsikkator über Phosphorpentoxid bei 60 °C getrocknet.

230 mg, 1,2 mmol der geschützten Base werden unter einer Argonatmosphäre in 7 ml abs. Acetonitril suspendiert und innerhalb von 15 Minuten unter Rückfluß mit 870 µl, 3,6 mmol BSA silyliert, wobei die Lösung klar wird. Dazu gibt man die in 5 ml abs. Acetonitril gelösten 318 mg, 1 mmol der Tetra-*O*-acetyl-β-*D*-ribofuranose sowie 270 µl (1,5 mmol) TMSTF und läßt weitere vier Stunden refluxieren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 45 ml eines Gemisches aus Wasser/Dichlormethan (3:1) aufgenommen. Nach der Phasentrennung wird die organische Phase mit ges.  $NaHCO_3$ -Lösung und dest. Wasser extrahiert und über  $MgSO_4$  abgesaugt. Nach Abziehen des Dichlormethans erhält man einen leicht gelben Schaum, der in Dichlormethan gelöst an 25 g Kieselgel flashchromatographiert wird. Elution erfolgt mit Dichlormethan/Methanol (39:1).

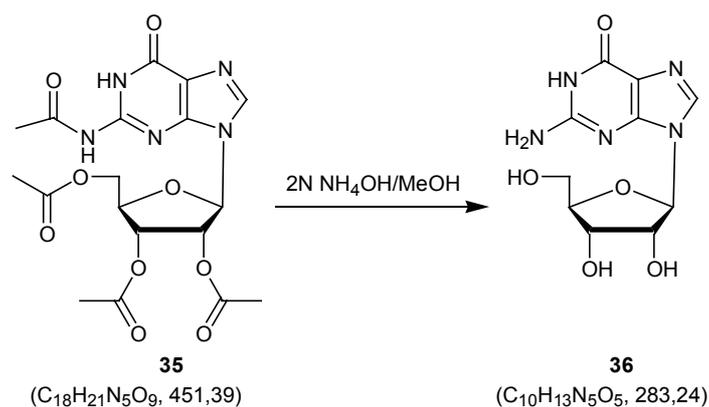
Produkt: 380 mg (85% d. Th.)

ESI:  $M(+)$ : 452 (Theor. Wert für  $M(+)$ :452)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,48

NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,73 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ 5,93 (m, , J<sub>1'-2'</sub>=5,5Hz, 2H, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>); δ 5,72 (t, J<sub>2'-3'</sub>=5,5Hz, 1H, H<sub>3'</sub> ); δ 4,62 (dd, J<sub>3'-4'</sub>= 4,5Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); δ 4,45 (m, 2H, H<sub>5'</sub>,H<sub>5''</sub>); δ 2,32 (s, 3H, N-CO-CH<sub>3</sub>); δ 2,1 (3s, O-CO-CH<sub>3</sub>)

### 10.2.5.2 Guanosin 36



380 mg (0,85 mmol) Tri-*O*-Acetyl-*N*-2-Acetyl-Guanosin werden in 10 ml 2 M NH<sub>3</sub>/Methanol gelöst und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Guanosin als weißer Niederschlag ausfällt. Die entstandene Suspension wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, in 50 ml Wasser gelöst und lyophilisiert. Man erhält ein Rohprodukt mit über 100% Ausbeute.

Produkt: 250 mg (110% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,13

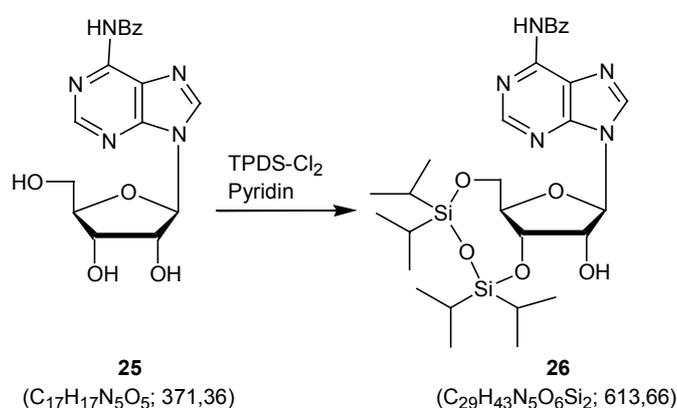
ESI (-): 282 (Theor. Wert für M(-):2,8)

NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 10,67 (s, 1H, H<sub>1</sub>); δ 7,94 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ 6,47 (s, 2H, N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>); δ 5,79 (d, J<sub>1'-2'</sub>=6Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ 5,04 (dd, J<sub>2'-3'</sub>=5,5Hz, 1H, H<sub>2'</sub>); δ 4,41 (dd, J<sub>3'-4'</sub>=5Hz, H<sub>3'</sub>); δ 4,08 (dd, 1H, H<sub>4'</sub>); δ 3,65(m, 2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>)

## 10.3 Versuche zu Kapitel 3

### 10.3.1 Versuche zu Adenosin

#### 10.3.1.1 3',5'-TPDS-*N*-6-Bz-Adenosin 26



Das Edukt wird über Nacht im Exsikkator bei 60°C über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. 370 mg (1 mmol) *N*-6-Bz-Adenosin werden unter einer Schutzgasatmosphäre in 7 ml abs. Pyridin gelöst und unter Rühren mit 340 µl (1,1 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan TPDS-Cl<sub>2</sub> versetzt. Nach 6 Stunden wird im Vakuum das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in 15 ml Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wird mit je 20 ml 1 N HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung extrahiert und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Dichlormethan wird im Vakuum entfernt, wodurch man einen klaren Schaum erhält, der zur Aufreinigung durch Flashchromatographie in Dichlormethan gelöst und an 15 g Kieselgel getrennt wird. Eluiert wird mit Dichlormethan/Methanol (20:1).

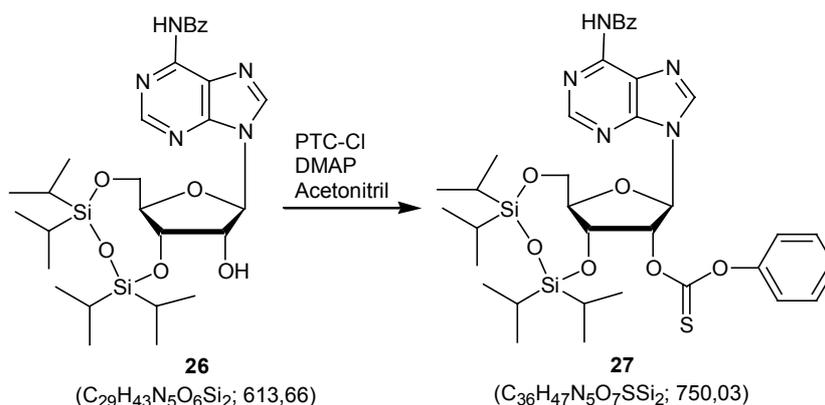
Produkt: 530 mg (87% d. Th)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,55

ESI: M(+) 614 (Theor. Wert für M(+): 614)

NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9,02 (s, 1 H, H<sub>1</sub>),  $\delta$  8,75 (s, 1 H, H<sub>8</sub>),  $\delta$  8,15 (s, 1 H, H<sub>2</sub>),  $\delta$  8,02 (d, 2H, Bz),  $\delta$  7,64 - 7,5 (m, 3 H, Bz),  $\delta$  6,04 (d, J<sub>1'-2'</sub>=1,2Hz, 1H, H<sub>1'</sub>),  $\delta$  5,13 (dd, J<sub>3'-4'</sub>=7,3Hz, 1H, H<sub>3'</sub>),  $\delta$  4,64 (dd, J<sub>2'-3'</sub>=4,5Hz, 1H, H<sub>2'</sub>),  $\delta$  4,17 - 4,06 (m, 3 H, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>)  $\delta$  1,15 - 1,05 (m, 28 H, IPr<sub>3</sub>)

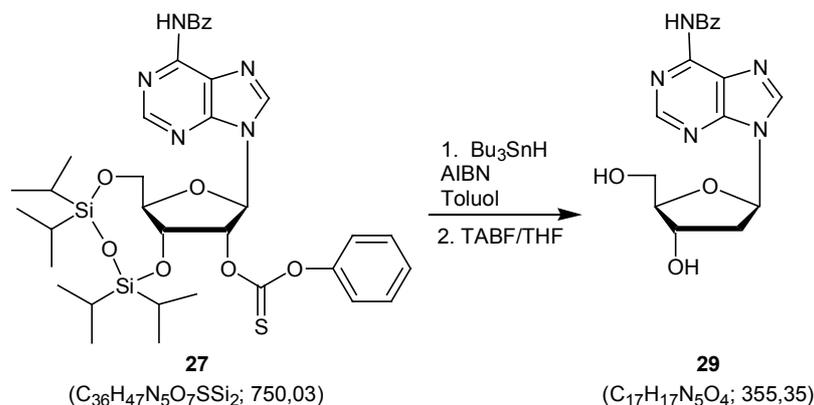
### 10.3.1.2 2'-O-PTC-3',5'-TPDS-N-6-Bz-Adenosin 27



530 mg (0,87 mmol) im Vakuum getrocknetes 3',5'-TPDS-N-6-Bz-Adenosin wird zusammen mit 160 mg (1,3 mmol) DMAP in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und unter Schutzgas mit 180  $\mu$ l (1 mmol) PTC-Cl versetzt. Die entstehende gelbe Lösung rührt 16 Stunden. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird in 20 ml Dichlormethan aufgenommen und mit je 20 ml 1N HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung extrahiert sowie durch MgSO<sub>4</sub> filtriert. Das Rohprodukt kann ohne Aufreinigung weiter umgesetzt werden.

Produkt: 660 mg Rohprodukt (103% d. Th.)

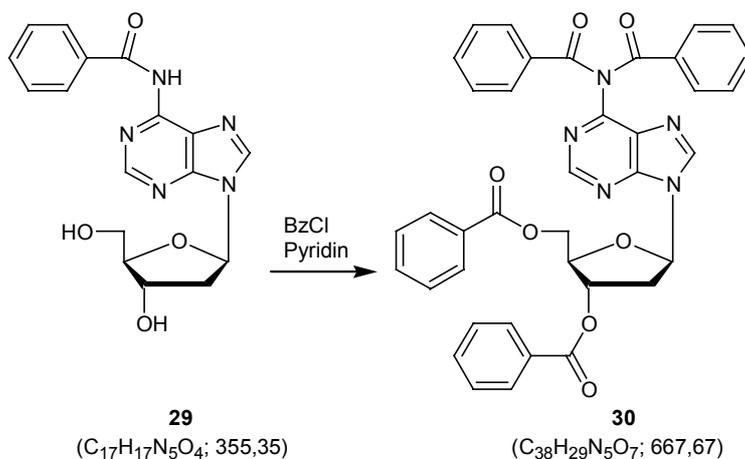
R<sub>f</sub>-Wert: 0,77

10.3.1.3 *N*-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin 29

Das Rohprodukt des vorhergehenden Schrittes wird mit Toluol coevaporiert und im Vakuum getrocknet. Zu 660 mg 2'-O-PTC-3',5'-TPDS-*N*-6-Benzoyl-Adenosin gibt man 50 mg (0,3 mmol) AIBN und löst in 15 ml abs. Toluol. Die Lösung wird durch fünfminütiges Durchleiten von Argon entgast, mit 250  $\mu$ l (1 mmol) Tributylzinnhydrid versetzt und nochmals für fünf Minuten durch Durchleiten von Argon entgast. Anschließend wird auf 75°C erhitzt. Nach drei Stunden werden nochmals 25 mg (0,15 mmol) AIBN und 100  $\mu$ l (0,4 mmol) Tributylzinnhydrid in 3 ml abs. Toluol gelöst, mit Argon entgast und zu dem Ansatz zugegeben. Nach weiteren zwei Stunden Rühren bei 75°C wird durch Zugabe von 1,6 ml einer 1M Lösung von TBAF in THF die Silylschutzgruppe entfernt. Es wird noch eine Stunde bei 75°C gerührt, wobei sich ein braunes Öl an der Kolbenwand absetzt. Nach Abkühlen der Lösung wird das Toluol im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml Wasser/Ether 1:1 aufgenommen. Die organische Phase wird noch zweimal mit je 30 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden lyophilisiert.

Man erhält ein Rohprodukt von ausreichender Reinheit für den nachfolgenden Syntheseschritt.

## 10.3.1.4 3',5'-Dibenzoyl- N-6-Dibenzoyl-2'-Desoxyadenosin 30



Das Rohprodukt der Deoxygenierung wird in Abänderung von Reaktion 10.4.1.1 in 20 ml abs. Pyridin gelöst und unter Schutzgasatmosphäre mit 1,5 ml (13mmol) Benzoylchlorid versetzt. Nach einstündigem Rühren wird der Ansatz unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit und in 20 ml Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird mit je 20 ml 1N HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung extrahiert und durch MgSO<sub>4</sub> getrocknet.

Die Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigester 3/1. Bei der Deoxygenierung nicht umgesetzt Adenosin wird als Pentabenzoyladenosenin zurückgewonnen.

Ausbeute: 270 mg (47% d. Th. über 5 Stufen, 55% auf den Umsatz von N-6-Bz-Adenosin **25** bezogen)

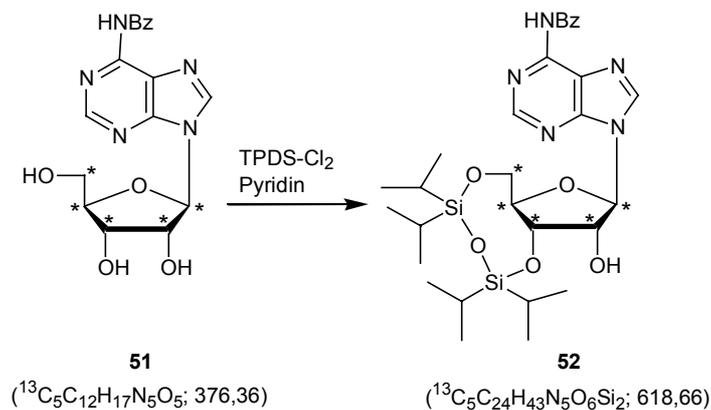
R<sub>f</sub>-Wert (Hexan/Essigester 1/3): 0,55

ESI: M(+) 658,4 (Theor. Wert für M(+): 658,4)

<sup>1</sup>H-NMR: (CDCl<sub>3</sub>): δ8,57 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ8,25 (s, 1H, H<sub>2</sub>); δ8,11-7,31 (m, 20H, Bz); δ6,58 (dd, J<sub>1'-2'</sub>=6Hz J<sub>1'-2''</sub>= 8Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ5,85 (ddd, 1H, H<sub>3'</sub>); δ (ddd, 1H, H<sub>4'</sub>); δ4,8-4,61 (m, 3H, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>), δ3,22 (m, 1H, H<sub>2''</sub>), δ2,85 (m, 1H, H<sub>2'</sub>)

### 10.3.2 Versuche zu $^{13}\text{C}$ -markiertem Adenosin

#### 10.3.2.1 3',5'-TPDS-N-6-Bz- $^{13}\text{C}_5$ -Adenosin 52

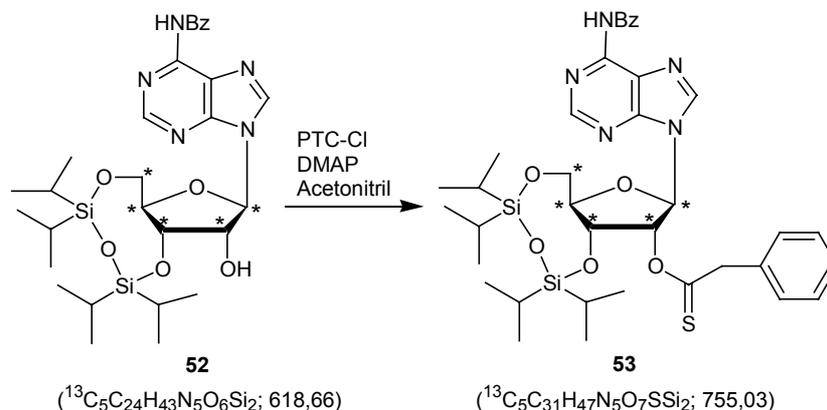


Die Reaktion wird entsprechend 10.3.1.1 mit dem Rohprodukt der Teilentschützung 10.2.2.2 sowie 500  $\mu\text{l}$  (1,66 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan TPDS- $\text{Cl}_2$  in 16ml abs. Pyridin durchgeführt.

Produkt: 660 mg (85% d. Th)

$R_f$ -Wert: 0,55

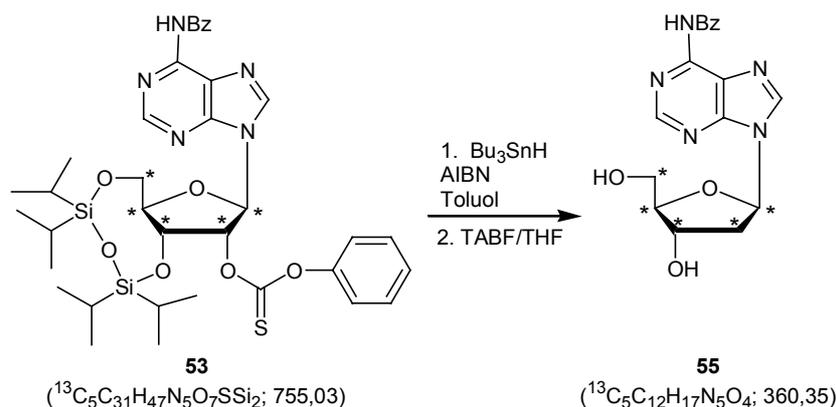
NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

10.3.2.2 2'-O-PTC-3',5'-TPDS-N-6-Bz-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-Adenosin 53

640 mg (1 mmol) im Vakuum getrocknetes 3',5'-TPDS-N-6-Bz-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-Adenosin werden zusammen mit 250 mg (2mmol) DMAP und 250 µl (1,4 mmol) PTC-Cl in 15 ml abs. Acetonitril entsprechend Reaktion 10.3.1.2 umgesetzt. Das Rohprodukt kann ohne Aufreinigung weiter umgesetzt werden.

Produkt: 800 mg Rohprodukt (105% d. Th.)

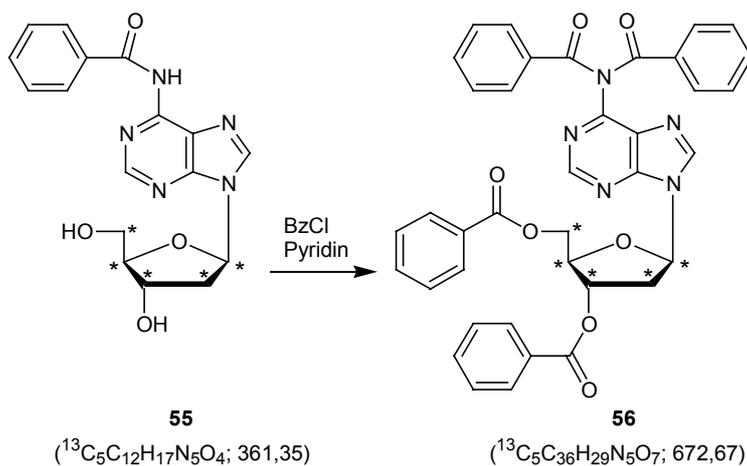
R<sub>f</sub>-Wert: 0,77

10.3.2.3 N-6-Benzoyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-2'-Desoxyadenosin 11

Das Rohprodukt des vorhergehenden Schrittes wird analog Reaktion 10.3.1.3 mit insgesamt 78 mg (0,5 mmol) AIBN und insgesamt 700 µl (2,8 mmol) Tributylzinnhydrid in 20 ml abs. Toluol umgesetzt.

Man erhält ein Rohprodukt von ausreichender Reinheit für den nachfolgenden Syntheseschritt.

#### 10.3.2.4 3',5'-Dibenzoyl- N-6-Dibenzoyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-2'-Desoxyadenosin 56



Das Rohprodukt der Deoxygenierung wird in Abänderung von Reaktion 10.4.1.1 in 12 ml abs. Pyridin gelöst und unter Schutzgasatmosphäre mit 1,2 ml (1,2 mmol) Benzoylchlorid umgesetzt.

Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigester 3/1. Bei der Deoxygenierung nicht umgesetztes Adenosin wird als Pentabenzoyladenosen (190 mg; 0,2 mmol) zurückgewonnen.

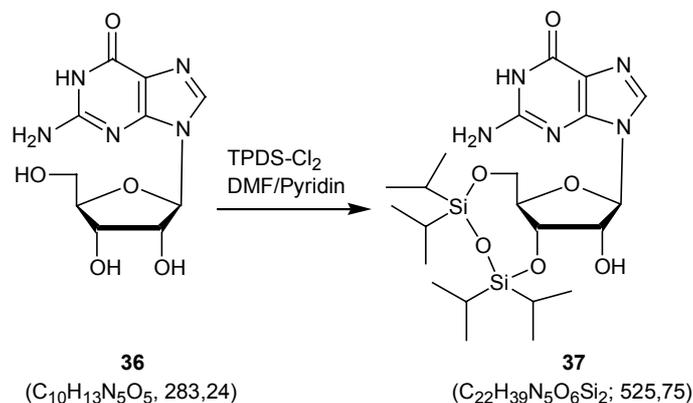
Produkt: 300 mg (45% d. Th. über 6 Stufen) Auf den Umsatz berechnet beträgt die Ausbeute 60%

R<sub>f</sub>-Wert (Hexan/Essigester 1/3): 0,55

<sup>1</sup>H-NMR: (CDCl<sub>3</sub>): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

### 10.3.3 Versuche zu Guanosin

#### 10.3.3.1 3',5'-O-TPDS-Guanosin 37



Das Edukt wird über Nacht im Exsikkator über  $\text{P}_2\text{O}_5$  bei  $60^\circ\text{C}$  getrocknet. 340 mg (1,2 mmol) Guanosin wird in 15 ml abs. DMF und 4 ml abs. Pyridin suspendiert. Dazu tropft man 390  $\mu\text{l}$  (1,2 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan TPDS- $\text{Cl}_2$  und rührt fünf Stunden, wobei sich das Edukt langsam auflöst. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung langsam auf stark gerührtes Eiswasser getropft. Der sich dabei bildende weiße Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gut nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

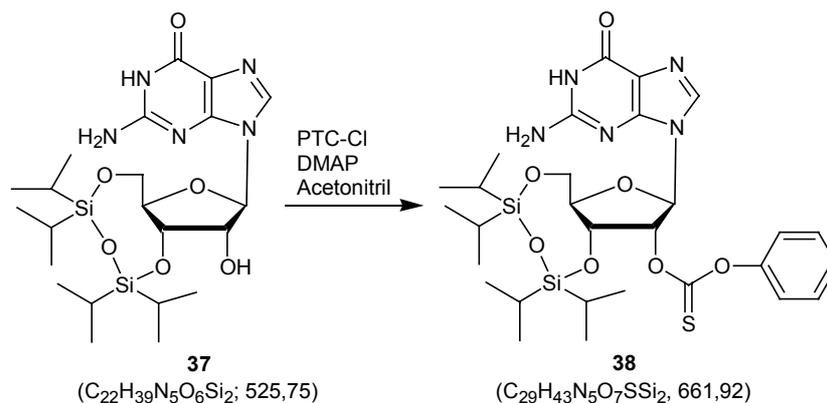
Produkt: 630 mg (90% d. Th.)

Rf-Wert: 0,22

ESI:  $\text{M}^+$  526 (Theor. Wert für  $\text{M}^+$ ): 526)

$^1\text{H-NMR}$ :(D6-DMSO)  $\delta$  10,62 (s, 1H,  $\text{N}_1\text{-H}$ );  $\delta$  7,75 (s, 1H,  $\text{H}_8$ );  $\delta$  6,46 (s, 2H,  $\text{H}_2$ );  $\delta$  5,67 (d,  $J=1,8\text{Hz}$ , 1H,  $\text{H}_{1'}$ );  $\delta$  5,58 (d,  $J_{\text{H-}2'\text{-OH}}=5\text{Hz}$ , 1H,  $\text{O}_{2'\text{-H}}$ );  $\delta$  4,35 (m, 1H,  $\text{H}_{2'}$ );  $\delta$  4,25 (m, 1H,  $\text{H}_{3'}$ );  $\delta$  4,08 (m, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $\text{H}_{5''}$ );  $\delta$  1,1-0,9 (m, 28H, iPr)

## 10.3.3.2 2'-O-PTC-3',5'-O-TPDS-Guanosin 38

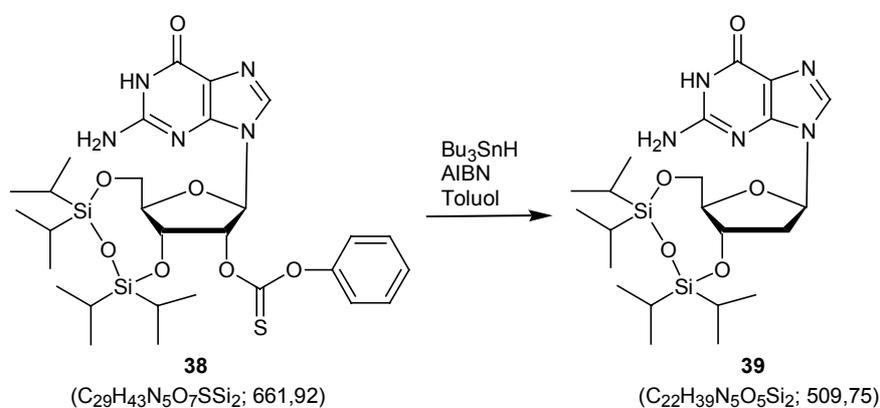


630 mg (1,2 mmol) 3',5'-O-TPDS-Guanosin werden im Vakuum getrocknet und unter Schutzgas zusammen mit 260 mg (2,1 mmol) DMAP in 10 ml Acetonitril suspendiert. Zu der Suspension werden 240 µl (1,3 mmol) PTC-Cl gegeben. Nach 16stündigem Rühren wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit je 20 ml 1N HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung extrahiert und durch MgSO<sub>4</sub> filtriert.

Produkt: 820 mg Rohprodukt (103% d. Th.)

R<sub>f</sub>Wert: 0,4

## 10.3.3.3 3',5'-TPDS-2'-Desoxyguanosin 39



Das Rohprodukt aus dem vorherigen Versuch wird mit Toluol coevaporiert und über Nacht im Vakuum getrocknet. 820 mg 2'-O-PTC-3',5'-O-TPDS-Guanosin werden mit 50 mg (0,3 mmol) AIBN in 10 ml Toluol gelöst und durch fünfminütiges Durchleiten von Argon entgast. Nach der Zugabe von 400  $\mu$ l (1,5 mmol) Tributylzinnhydrid wird nochmals 5 Minuten entgast und auf 75°C erhitzt. Wenn nach vier Stunden noch deutliche Eduktspuren im DC zu sehen sind, löst man 25 mg (0,15 mmol) AIBN und 100  $\mu$ l (0,4 mmol) Tributylzinnhydrid in 3 ml Toluol, entgast und gibt diese Lösung zu dem Ansatz.

Will man zur Aufreinigung den Ansatz aufarbeiten, zieht man das Lösungsmittel im Vakuum ab und löst den Rückstand in Dichlormethan. Die Lösung wird mit je 20 ml 1N HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung extrahiert sowie durch MgSO<sub>4</sub> filtriert. Aufreinigung durch Flashchromatographie an 25 g Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (39/1) ergibt ein weißes Produkt.

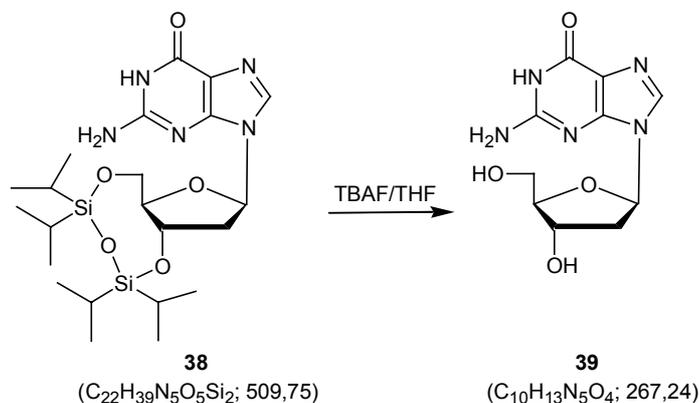
Produkt: 290 mg (50% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,33

ESI: M(+): 510 (Theor. Wert für M(+): 510)

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$ 10,66 (s, 1H, H<sub>1</sub>),  $\delta$ 7,79 (s, 1H, H<sub>8</sub>);  $\delta$ 6,47  $\delta$ (s, 2H, N<sub>2</sub>-H);  $\delta$ 6,05 (dd, J<sub>1'-2'</sub>=6Hz, J<sub>1-2''</sub>=8Hz, 1H, H<sub>1'</sub>);  $\delta$ 4,67 (ddd, 1H, H<sub>3'</sub>);  $\delta$ 3,9-3,75 (m, 3H, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>);  $\delta$ 2,75-2,42 (m, 2H, H<sub>2'</sub>, H<sub>2''</sub>);  $\delta$ 1,11-0,94 (m, 28H, iPr)

#### 10.3.3.4 2'-Desoxyguanosin 40



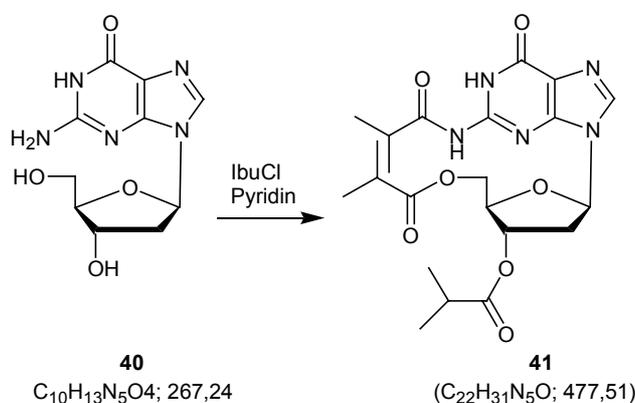
Zu dem Deoxygenierungsansatz gibt man 2,4 ml einer 1M Lösung von TBAF in THF hinzu und rührt noch eine Stunde bei 75°C. Anschließend zieht man das Lösungsmittel ab und nimmt den Rückstand in 50 ml eines Zweiphasengemisches aus Wasser/Ether (1:1) auf. Nach der Phasentrennung wird die Etherphase noch zweimal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden lyophilisiert.

Das Rohprodukt ist von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Peracylierung zum Tri-Isobutyryril-2'-Desoxyguanosin

ESI: M(-): 266 (Theor. Wert für M(-): 266)

$^1\text{H-NMR}$  (D6-DMSO):  $\delta$ 10,62 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 7,91 (s, 1H, H<sub>8</sub>),  $\delta$ 6,46 (s, 2H, N<sub>2</sub>H),  $\delta$ 6,12 (dd, J<sub>1'-2'</sub>=6Hz, J<sub>1'-2''</sub>=8Hz, 1H, H<sub>1'</sub>);  $\delta$ 4,33 (ddd, 1H, H<sub>3'</sub>);  $\delta$ 3,82 (ddd, 1H, H<sub>4'</sub>);  $\delta$ 3,51(m, 2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>),  $\delta$ 2,6-2,44 (m, 1H H<sub>2''</sub>),  $\delta$ 2,21-2,13 (m, 1H, H<sub>2'</sub>)

### 10.3.3.5 Tri-Isobutyryril-2'-Desoxyguanosin 41



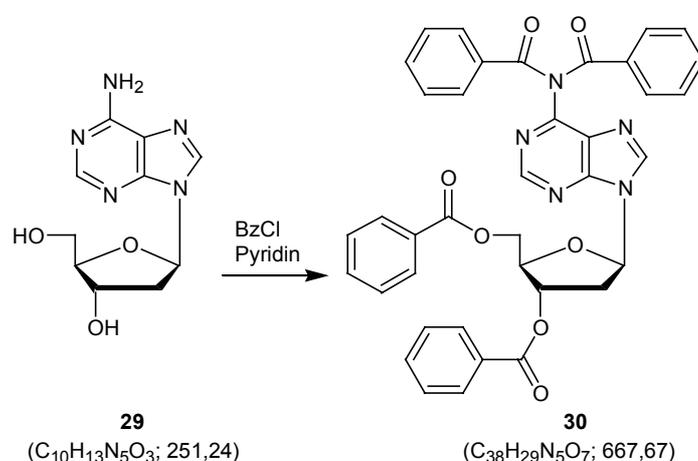
Die Acylierung des Rohprodukts der Entschützung erfolgt analog Reaktion 10.4.3.1 mit 1 ml Isobutyrylchlorid in 15 ml abs. Pyridin. Die Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 25 g Kieselgel. Bei der Deoxygenierung nicht umgesetztes Guanosin wird als Tetra Isobutyryl-Guanosin zurückgewonnen.

Produkt: 315 mg (55% d. Th. bezogen auf das Edukt von Reaktion 10.3.1.1)

## 10.4 Versuche zu Kapitel 4

### 10.4.1 Versuche zu Desoxyadenosin

#### 10.4.1.1 3',5'-Dibenzoyl- N-6-Dibenzoyl-2'-Desoxyadenosin 30



267 mg (1 mmol) zuvor im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknetes Desoxyadenosin, werden in 10 ml abs. Pyridin gelöst und unter Schutzgasatmosphäre mit 1 ml (1 mmol) Benzoylchlorid versetzt. Nach einstündigem Rühren wird der Ansatz im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und in 20 ml Dichlormethan aufgenommen. Die org. Phase wird mit je 20 ml 1N HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung extrahiert und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Durch Flashchromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigester 3/1 wird das Produkt gereinigt.

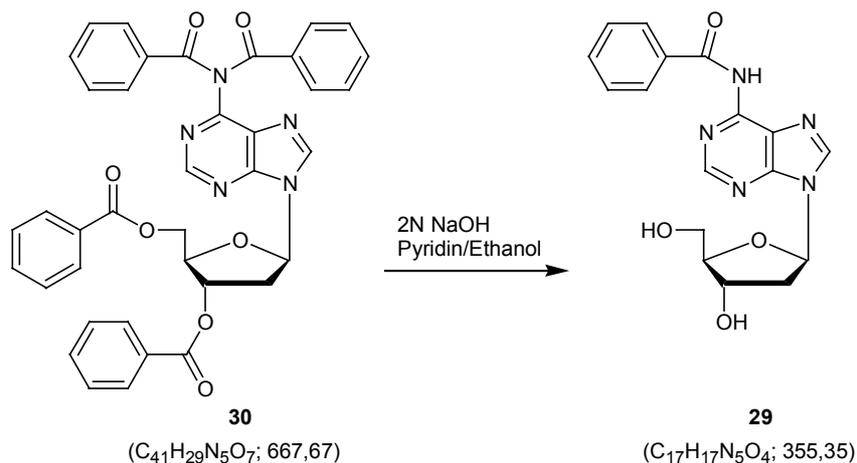
Produkt: 600 mg (90% d. Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,55 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI(+): 668 (Theor. Wert für M(+): 668)

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 8,57 (s, 1H,  $\text{H}_8$ );  $\delta$ 8,25 (s, 1H,  $\text{H}_2$ );  $\delta$ 8,11-7,31 (m, 20H, Bz);  $\delta$ 6,58 (dd,  $J_{1'-2'}=6\text{Hz}$   $J_{1'-2''}=8\text{Hz}$ , 1H,  $\text{H}_{1'}$ );  $\delta$ 5,85 (ddd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ );  $\delta$  (ddd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ );  $\delta$ 4,8-4,61 (m, 3H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $\text{H}_{5'}$ ,  $\text{H}_{5''}$ ),  $\delta$ 3,22 (m, 1H,  $\text{H}_{2''}$ ),  $\delta$ 2,85 (m, 1H,  $\text{H}_2$ )

#### 10.4.1.2 *N*-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin 29



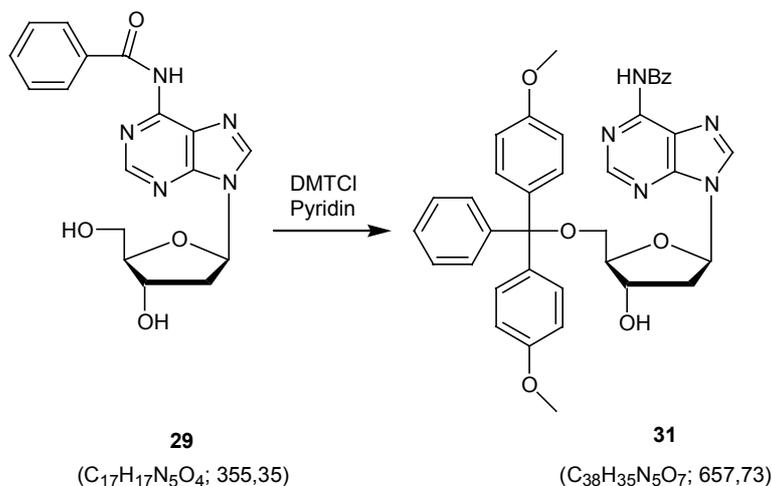
600 mg (0.9mmol) 3',5'-Dibenzoyl- *N*-6-Dibenzoyl-2'-Desoxyadenosin werden in einem Gemisch aus 6 ml Pyridin und 6 ml Ethanol gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren gibt man 2 ml 2M NaOH hinzu. Nach 45 Minuten wird die Lösung mit saurem Ionentauscher Dowex 50 WX 8 neutralisiert und vom Ionentauscher abgesaugt, wobei gut mit Wasser nachgespült wird. Die wässrige Lösung wird zweimal mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und lyophilisiert, wodurch man ein weißes Pulver von ausreichender Reinheit erhält.

$R_f$ -Wert: 0,15

ESI:  $M(-)$ : 354 (Theor. Wert für  $M(-)$ : 354)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta$ 8,73 (s, 1H,  $\text{H}_8$ );  $\delta$ 8,57 (s, 1H,  $\text{H}_2$ );  $\delta$ 8,03 (m, 2H, Aryl);  $\delta$ 6,47 (dd,  $J_{1'-2'}=J_{1'-2''}=6\text{Hz}$ , 1H,  $\text{H}_{1'}$ );  $\delta$ 4,45 (ddd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ );  $\delta$ 3,9 (ddd, 1H,  $\text{H}_{4'}$ );  $\delta$ 3,66-3,51 (m, 2H,  $\text{H}_{5'}$ ,  $\text{H}_{5''}$ ),  $\delta$ 2,80 (m, 1H,  $\text{H}_{2''}$ ),  $\delta$ 2,35 (m, 1H,  $\text{H}_2$ )

## 10.4.1.3 5'-O-DMT- N-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin 31



N-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin aus dem Rohprodukt der Entschützung und 450 mg (1,3mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid werden unter Schutzgasatmosphäre in 15ml abs. Pyridin gelöst. Nach 3stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird im Vakuum das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Nach Ausschütteln gegen je 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet.

Nach Aufreinigung durch Flashchromatographie erhält man einen weißen Schaum. Die Chromatographiesäule wird mit Dichlormethan/Methanol/Triethylamin (35:1:2) konditioniert, das Rohprodukt in Dichlormethan gelöst aufgetragen und mit Dichlormethan/Methanol (39:1) eluiert.

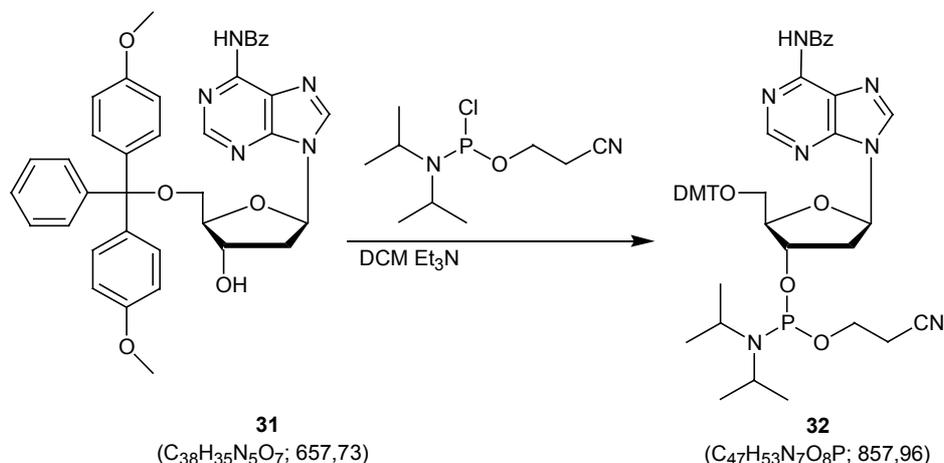
Produkt: 440 mg (75% d Th. bezogen auf das Edukt von Reaktion 10.4.1.2)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,45

ESI: M(+): 658 (Theor. Wert für M(+): 658)

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ8,7 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ8,17 (s, 1H, H<sub>2</sub>); δ8,03-7,16 (m, 14H, DMT, Bz); δ6,81 (d, 4H, DMT); 6,48 (dd, 1H, H<sub>1'</sub> J<sub>1'-2'</sub>=J<sub>1'-2''</sub>=6Hz); δ4,71 (m, 1H, H<sub>3'</sub>); δ 4,21 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); δ3,74 (s, 6H, O-CH<sub>3</sub>), δ3,38 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5''</sub>); δ2,85 (m, 1H, H<sub>2''</sub>); δ2,55(m, 1H, H<sub>2'</sub>)

#### 10.4.1.4 5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-( $\beta$ -cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphyl-*N*-6-Benzoyl-2'-Desoxyadenosin 32



5'-O-DMT-2-N-Bz-Desoxyadenosin wird mit Toluol coevaporiert und über Nacht im Vakuum getrocknet.

Unter Schutzgas werden 440 mg (0.67mmol) 5'-O-DMT- N-6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin in 10 ml abs. Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 400  $\mu$ l (3 mmol) Triethylamin wird der Ansatz auf 0°C gekühlt. Innerhalb von 10 Minuten werden 335  $\mu$ l (1 mmol) *N,N*-Diisopropyl-amino-(2-cyanoethoxy)-phosphinichlorid zugetropft, worauf das Eisbad entfernt werden kann. Es wird noch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 25 g Kieselgel. Die Säule wird mit Dichlormethan/Methanol/Triethylamin (35:1:2) konditioniert, das Rohprodukt in Dichlormethan gelöst aufgetragen und mit Dichlormethan/Methanol (39:1:1) eluiert.

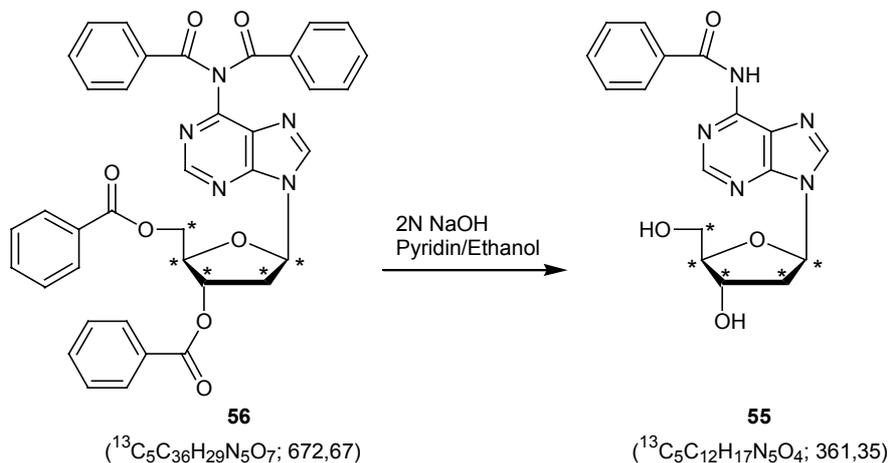
Produkt: 446mg (80% d Th.)

Rf-Wert: 0,85

<sup>31</sup>PNMR: (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$ 151

## 10.4.2 Versuche zu $^{13}\text{C}$ -markiertem Desoxyadenosin

### 10.4.2.1 *N*-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -2'-Desoxyadenosin 55

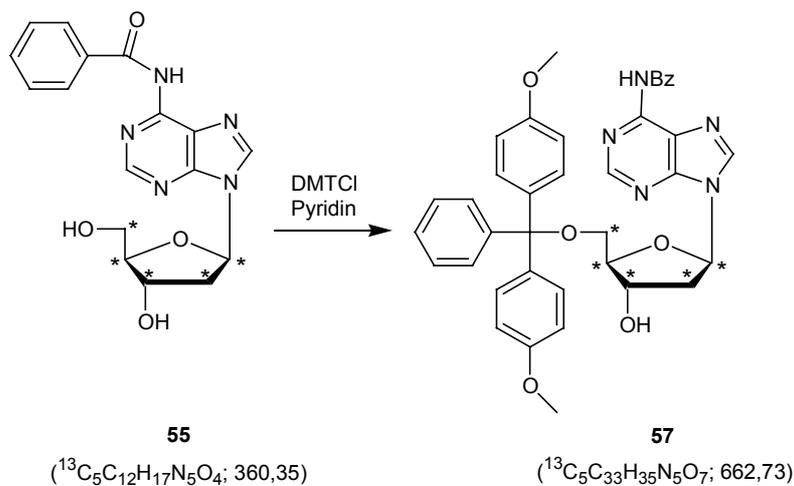


290 mg (0.43 mmol) 3',5'-Dibenzoyl- *N*-6-Dibenzoyl-2'-Desoxyadenosin werden analog Reaktion 10.4.1.1 in einem Gemisch aus 6 ml Pyridin und 6 ml Ethanol gelöst und bei 0° mit 2 ml 2M NaOH teilentschützt.

Das bei der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt ist von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Reaktion.

$R_f$ -Wert: 0,15

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

10.4.2.2 5'-O-DMT-N-6-Benzoyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-2'-Desoxyadenosin 57

N-6-Benzoyl-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-2'-Desoxyadenosin aus dem Rohprodukt der Entschützung und 300 mg (0,9 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid werden entsprechend Reaktion 10.4.1.3 in 15 ml abs. Pyridin umgesetzt.

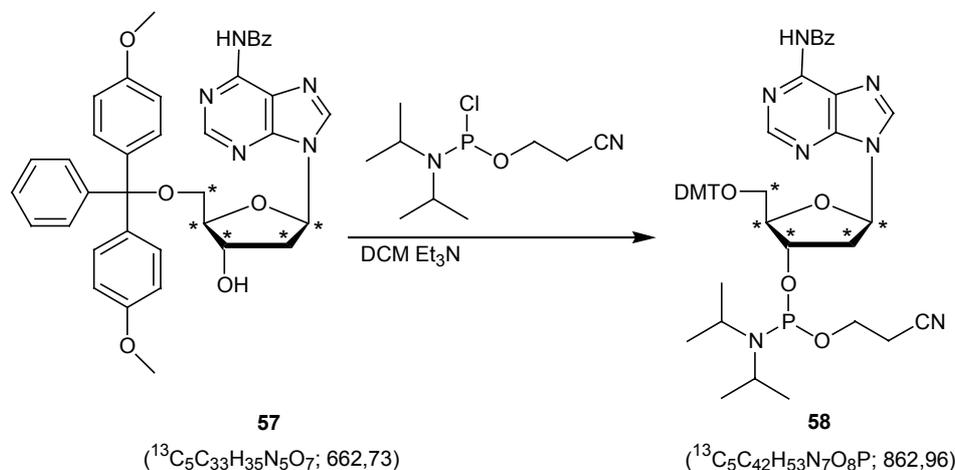
Produkt: 140 mg (50% d Th. über 2 Stufen)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,45

ESI: M(-): 662 (Theor. Wert für M(-): 661)

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

### 10.4.2.3 5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-( $\beta$ -cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphyl-*N*-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -2'-Desoxyadenosin 58



5'-O-DMT-*N*-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -2'-Desoxyadenosin wird mit Toluol coevaporiert und über Nacht im Vakuum getrocknet.

Unter Schutzgas werden 130 mg (0.21 mmol) 5'-O-DMT-*N*-6-Benzoyl- $^{13}\text{C}_5$ -2'-Desoxyadenosin in 8ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 300 $\mu\text{l}$  (1,8 mmol) Diisopropylethylamin und 75 $\mu\text{l}$  (1mmol) *N,N*-Diisopropyl-amino-(2-cyanoethanol)-phosphin-chlorid umgesetzt

Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 25 g Kieselgel. Die Säule wird mit Dichlormethan/Methanol/Triethylamin (39:1:2) konditioniert, das Rohprodukt in Dichlormethan gelöst aufgetragen und mit Dichlormethan/Methanol/Triethylamin (39:1:1) eluiert.

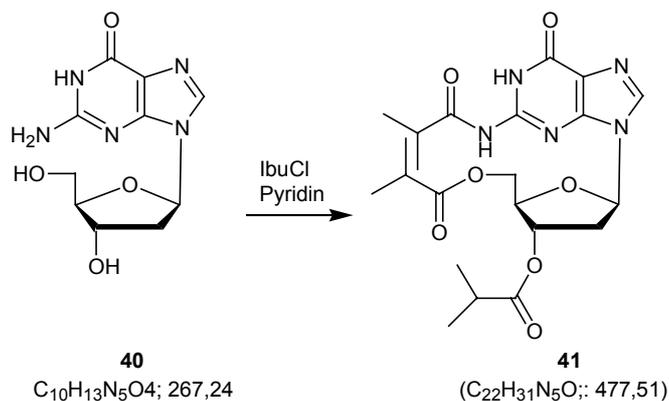
Produkt: 142 mg (80% d Th.)

Rf-Wert: 0,85

$^{31}\text{P}$ -NMR: ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ): 151,21(D,  $J_{\text{P-C}3'} = 17\text{Hz}$ , 1P)

### 10.4.3 Versuche zu Desoxyguanosin

#### 10.4.3.1 Tri-Isobutyryl-2'-Desoxyguanosin 41



Zu in 15 ml abs. Pyridin gelöst über Nacht im Exsikkator über Phosphorpentoxyd getrockneten 267mg (1 mmol) Desoxyguanosin gibt man unter Schutzgasatmosphäre 0,5 ml (5 mmol) Isobutyrylchlorid zu und rührt für 1h bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit je 20 ml 1N HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung extrahiert und durch MgSO<sub>4</sub> getrocknet.

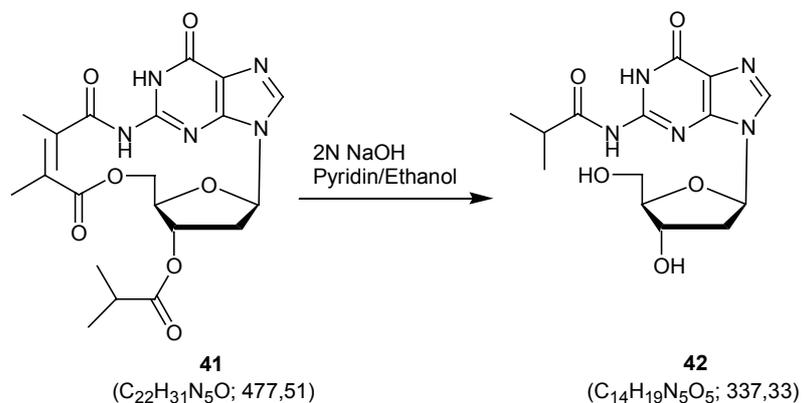
Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel. Als Laufmittel dient Dichlormethan/Methanol (39:1)

Produkt: 450 mg (95% d Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,15

ESI(-): 476,2 (Theor. Wert für M(-): 476)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ7,72 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ6,19 (dd, J<sub>1'-2'</sub>= J<sub>1' 2'</sub>=7,5Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ5,39 (ddd, 1H, H<sub>3'</sub>); δ4,77 (ddd, 1H, H<sub>4'</sub>); 4,34 (m, 2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>); δ, 3,08-2,98 (m, 1H, H<sub>2''</sub>); δ2,58-2,43 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) δ1,28-1,11 (m, 21H, ibu)

10.4.3.2 *N*-2-Isobutyryryl-2'-Desoxyguanosin 42

450 mg Tri-Isobutyryl-2'-Desoxyguanosin werden in einem Gemisch aus 6 ml Pyridin und 6 ml Ethanol gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren gibt man 2 ml 2M NaOH hinzu. Nach 15 Minuten wird die Lösung mit saurem Ionentauscher Dowex 50 WX 8 neutralisiert und von dem Ionentauscher abgesaugt, wobei gut mit Wasser nachgespült wird. Die wässrige Lösung wird zweimal mit 20 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und lyophilisiert, wodurch man ein weißes Pulver von ausreichender Reinheit erhält.

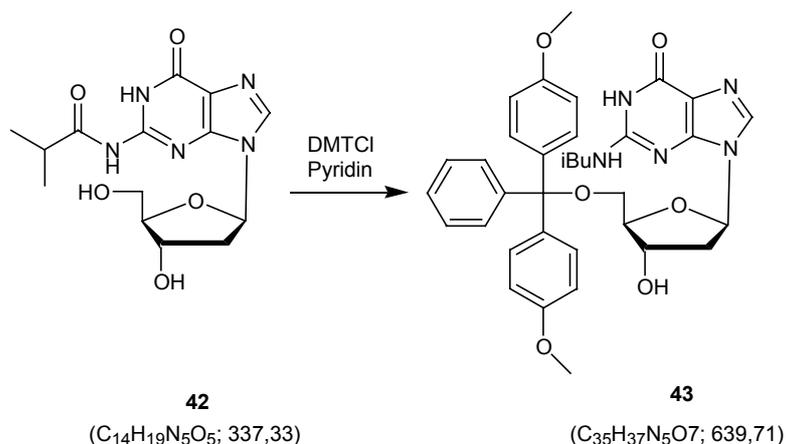
Produkt: 380 mg (120% d Th.)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,45

ESI: M(-) 336 (Theor. Wert für M(-): 336)

<sup>1</sup>H-NMR (D6-DMSO): δ8,06 (s, 1H, H<sub>8</sub>); δ6,24 (dd, J<sub>1'-2'</sub>=6Hz, J<sub>1'2'</sub>=7,5Hz, 1H, H<sub>1'</sub>); δ4,35 (ddd, 1H, H<sub>3'</sub>); δ3,83 (ddd, 1H, H<sub>4'</sub>); 3,6-3,47 (m, 2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>); δ, 2,57-2,48 (m, 1H, H<sub>2''</sub>); δ2,26-2,17 (m, 1H, H<sub>2'</sub>) δ1,17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); δ1,12 (s, 1H, MeCHMe); δ1,05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

## 10.4.3.3 5'-O-Dimethoxytrityl-N-2-isobutyryl-2'-desoxyguanosin 43



380 mg *N*-2-Isobutyryl-2'-desoxyguanosin aus dem Rohprodukt der Teilentschützung und 500 mg (1,5 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid werden unter Schutzgasatmosphäre in 15 ml Pyridin gelöst. Nach 3stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird im Vakuum das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Nach Ausschütteln gegen je 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. Kochsalzlösung wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet.

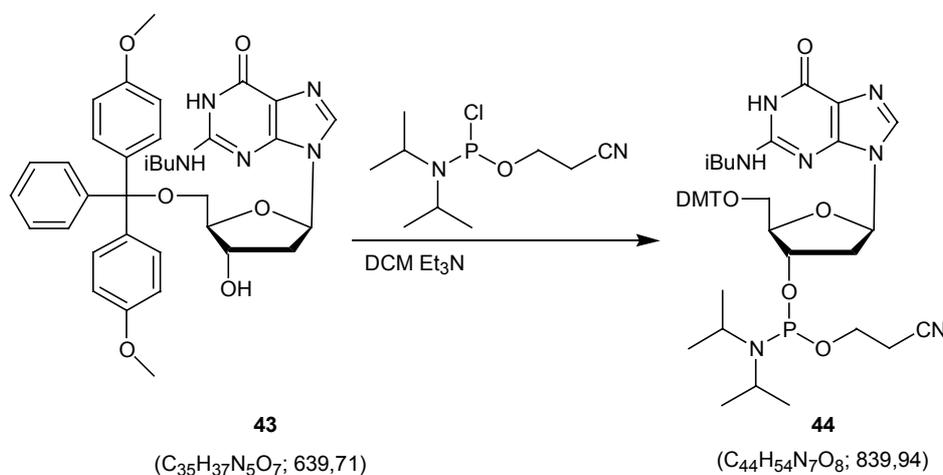
Nach Aufreinigung durch Flashchromatographie erhält man einen weißen Schaum. Nach der Konditionierung der Chromatographiesäule mit Dichlormethan/Methanol/Triethylamin (35:1:2), erfolgt die Elution mit Dichlormethan/Methanol (39:1).

Produkt: 450 mg (75% d Th. über 2 Stufen)

ESI: M(-) 638 (Theor. Wert für M(-): 638)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ7,81 (s, 1H, H<sub>8</sub>), δ7,38 -7,11 (m, 9H, DMT); δ6,81-6,75 (m, 4H, DMT); 6,18 (dd, 1H, H<sub>1'</sub> J<sub>1'-2', 2''</sub>=6,4Hz); δ4,71 (m, 1H, H<sub>3'</sub>); δ 4,18 (ddd, 1H, H<sub>4'</sub>); δ3,70 (s, 6H, O-CH<sub>3</sub>); δ3,34-3,25 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5''</sub>); δ2,69-2,63 (m, 1H, H<sub>2</sub>); δ2,47-2,41 (m, 1H, H<sub>2''</sub>); δ1,08 (m, 9H, iBu)

#### 10.4.3.4 5'-O-Dimethoxytrityl-N-2-isobutyryl-3'-O-( $\beta$ -cyanoethyl)-N,N-diisopropylamino-phosphyl-2'-Desoxyguanosin 44



Unter Schutzgas werden 450 mg (0,7 mmol) 5'-O-DMT-N-2-Ibu-Desoxyguanosin, welches mit Toluol coevaporiert und über Nacht im Vakuum getrocknet wurde, in 10 ml abs. Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 400  $\mu$ l (3 mmol) Triethylamin wird der Ansatz auf 0°C gekühlt. Innerhalb von 10 Minuten werden 200  $\mu$ l (0,85 mmol) N,N-Diisopropyl-amino-(2-cyanoethanol)-phosphinchlorid zugetropft. Das Eisbad kann darauf entfernt werden. Es wird noch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 25 g Kieselgel. Die Säule wird mit Dichlormethan/Methanol/Triethylamin (35:1:2) konditioniert, das Rohprodukt in Dichlormethan gelöst aufgetragen und mit Dichlormethan/Methanol (39:1:1) eluiert.

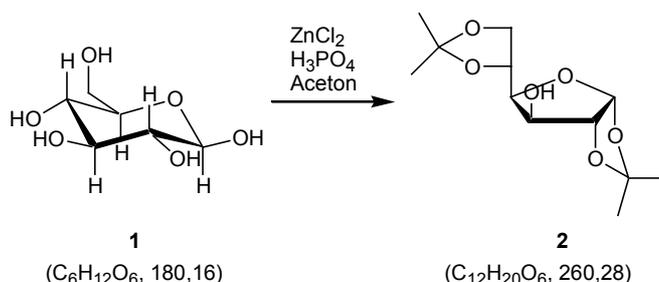
Produkt: 470 mg (80% d Th.)

RF-WERT: 0,8

<sup>31</sup>P-NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 148

## 10.5 Versuche zu Kapitel 5

### 10.5.1.1 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glukofuranose 2, (Diacetonglukose)



6 g (33,3 mmol) Glukose werden zusammen mit 5,22g (28,4 mmol) wasserfreiem Zinkchlorid und 300 mg (3 mmol) krist.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in 300 ml abs. Aceton suspendiert. Nach 24stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die leicht trübe Lösung abgesaugt und mit 10 ml 5N NaOH-Lösung versetzt. Der Aceton wird im Vakuum abgezogen. Der weiße Rückstand wird in 100 ml Dichlormethan/Wasser (1:1) suspendiert und vom anorganischen Niederschlag abgesaugt. Die organische Phase wird mit 50 ml ges. NaCl-Lösung extrahiert und mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittel im Vakuum erhält man das Produkt Elementaranalysen rein.

Produkt: 8,2g (97% d. Th.)

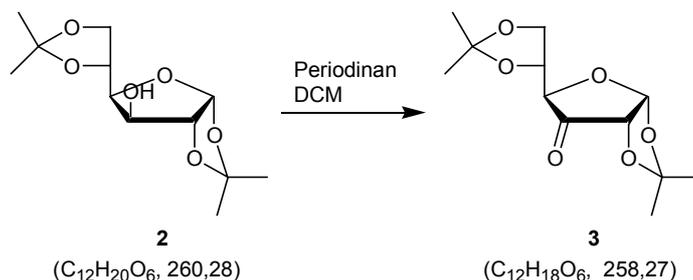
Elementaranalyse: ber.: C: 55,37 H: 7,74, gef.: C: 55,56 H: 7,78

$R_f$ Wert: 0,5 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI: M(+) 261 (Theor. Wert für M(+): 261)

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 5,95 (d,  $J_{1-2}=3,6$  Hz, 1H, H1);  $\delta$ 4,41 (d, 1H, H2);  $\delta$ 4,38 (m, 2H, H3,H5);  $\delta$ 4,15 (dd, 1H, H6a);  $\delta$ 4,05 (dd, 1H, H4);  $\delta$ 3,98 (dd, 1H, H6b);  $\delta$ 1,46 (d, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ );  $\delta$ 1,34 (d, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 104,1 ( $\text{C}_1$ ),  $\delta$ 84,00 ( $\text{C}_2$ )  $\delta$ 81 ( $\text{C}_4$ ),  $\delta$ 74,8 ( $\text{C}_3$ ),  $\delta$ 72,3 ( $\text{C}_5$ ),  $\delta$ 67,7 ( $\text{C}_6$ )

10.5.1.2 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glucofuranose 3

Zu einer Suspension aus 5,08 g (12 mmol) Dess-Martin-Periodinan und 20 ml Dichlormethan tropft man bei 0°C innerhalb von 5 Minuten 2,6 mg (10 mmol) Diacetonglukose, die in 40 ml Dichlormethan gelöst ist, zu. Man rührt noch 3 h bei Raumtemperatur, wobei eine weiße Trübung entsteht. Sollte die Reaktion nicht vollständig ablaufen, kann die Oxidation durch Zugabe von wenigen Tropfen Wasser beschleunigt werden.

Zur Aufarbeitung werden zu der Reaktionslösung 15 ml ges.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lsg. und 50 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg zugegeben und für 30 Minuten heftig gerührt. Nach der Trennung der Phasen wird die organische Phase noch mit 50 ml ges.  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen und mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet.

Aufreinigung erfolgt mit Flashchromatographie an Kieselgel. Die Säule wird mit Hexan/Essigester/Triethylamin (90:30:1) konditioniert, das Rohprodukt in Dichlormethan gelöst aufgetragen und mit Hexan/Essigester (3:1) eluiert.

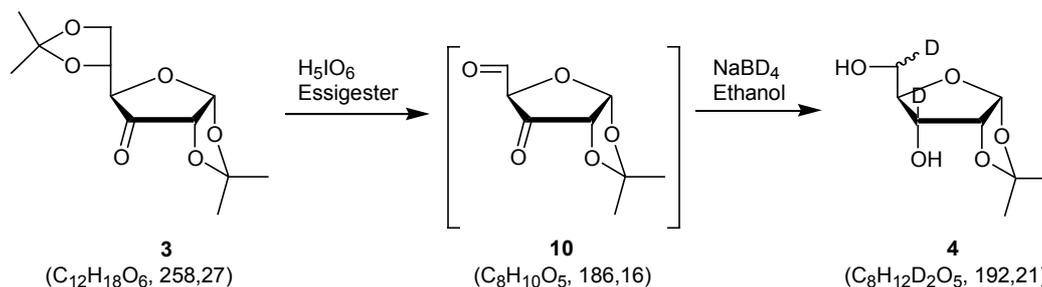
Produkt: 2,2g (86% d. Th.)

$R_f$ Wert: 0,3 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI:  $M(+)$  259 (Theor. Wert für  $M(+)$ : 259)

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 6,16 (d, 1H, H1);  $\delta$ 4,41 (d, 1H, H4);  $\delta$ 4,38 (m, 2H, H2,H5);  $\delta$ 4,05 (d, 2H, H6);  $\delta$ 1,43 (d, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ );  $\delta$ 1,32 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 104,1 ( $\text{C}_1$ ),  $\delta$ 80,00 ( $\text{C}_4$ ),  $\delta$ 78,3 ( $\text{C}_2$ ),  $\delta$ 77,6 ( $\text{C}_5$ ),  $\delta$ 65,37 ( $\text{C}_6$ )

10.5.1.3 1,2-O-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 4

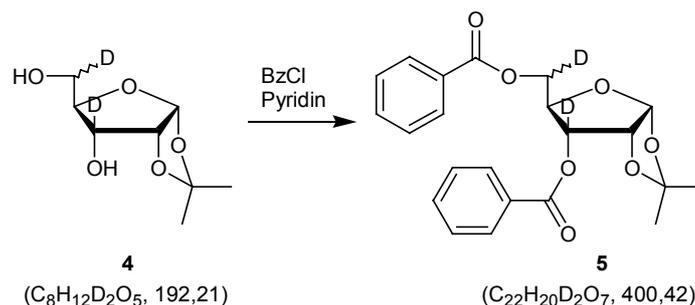
1,04 g (4 mmol) 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glucofuranose und 1,1 g (4,8 mmol) H<sub>5</sub>IO<sub>5</sub> werden in 40 ml abs. Essigester suspendiert und 2h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildet. Wenn die Lösung klar ist, werden 80  $\mu$ l abs. Ethylendiglykol zugegeben. Wenn die Lösung wieder klar ist, wird vom Niederschlag abgesaugt und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Zur Reduktion löst man den Rückstand in 60 ml abs. Ethanol und gibt unter Rühren langsam 400 mg (6 mmol) NaBD<sub>4</sub> zu. Nach 30 Minuten werden zur 5 ml Aceton und 5 ml Wasser zugegeben, worauf der Ansatzes im Vakuum eingengt wird. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1N HCl neutralisiert und mit 30 ml Dichlormethan extrahiert. Durch Gefriertrocknen der wässrigen Phase erhält man ein weißes Pulver von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Synthesestufe.

R<sub>f</sub>Wert: 0,22

ESI: M(+) 215 (Natriumsalz) (Theor. Wert für M(+): 215)

<sup>1</sup>H-NMR: (MeOD):  $\delta$  5,75 (d, J<sub>1-2</sub>=4Hz 1H, H<sub>1</sub>);  $\delta$  4,56 (d, 1H, H<sub>2</sub>);  $\delta$  3,86 (d, H<sub>4</sub>);  $\delta$  3,83 (d 0,4H, H<sub>5</sub>);  $\delta$  3,59 (m, 0.6H, H<sub>5</sub>); 1,51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (MeOD):  $\delta$  104,7 (1C, C<sub>1</sub>);  $\delta$  80,8 (1C, C<sub>4</sub>);  $\delta$  80,3 (1C, C<sub>2</sub>);  $\delta$  80,83 (1C, C<sub>5</sub>)

10.5.1.4 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 5

Das Rohprodukt der Periodatspaltung wird unter Schutzgasatmosphäre in 20 ml abs. Pyridin suspendiert und mit 2 ml Benzoylchlorid versetzt. Nach einstündigem Rühren wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 30 ml Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und dest. Wasser extrahiert und über MgSO<sub>4</sub> abgesaugt. Nach Abziehen des Dichlormethans erhält man einen leicht gelben Schaum, der in Dichlormethan gelöst an 25 g Kieselgel flashchromatographiert wird. Elution erfolgt mit Hexan/Essigester (3:1).

Produkt: 1,1 g (70% über 2 Stufen)

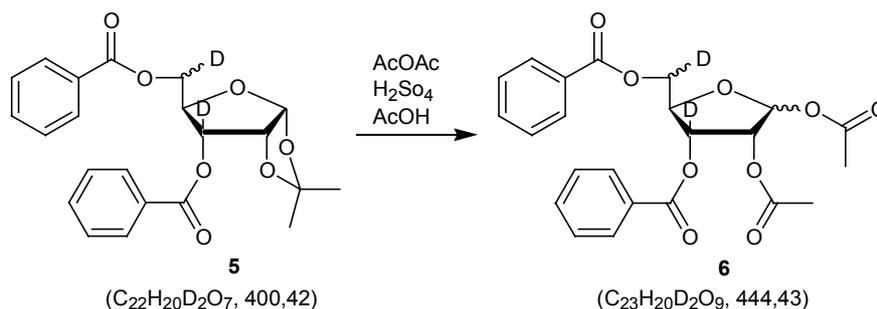
R<sub>f</sub>Wert: 0,5 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI: M(+):343 (ohne Isopropyliden-Gruppe) (Theor. Wert für M(+): 343)

Elementaranalyse: C: 65,72 (Ber.: 65,99), H: 5,56 (Ber.: 6,04)

<sup>1</sup>H-NMR: (CDCl<sub>3</sub>) δ8,2-7,9(m, 4H, Bz); δ7,6-7,3 (m, 6H, Bz); δ5,94 (d, J<sub>1-2</sub>=4Hz 1H, H<sub>1</sub>); δ5,01 (d, 1H, H<sub>2</sub>); δ4,61 (d, H<sub>4</sub>); δ4,68 (d, 0,5H, H<sub>5</sub>); δ4,48 (d 0,5H, H<sub>5</sub>); δ1,51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); δ1,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (CDCl<sub>3</sub>): δ105,3 (1C, C<sub>1</sub>); δ78,2 (1C, C<sub>2</sub>); δ76,6 (1C, C<sub>4</sub>); δ63,8 (1C, C<sub>5</sub>)

10.5.1.5 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-O-acetyl-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose 6

Zu 1.1 g (2,8 mmol) 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-O-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-ribofuranose gibt man unter Schutzgasatmosphäre 40 ml abs. Essigsäure und 2,8 ml Essigsäureanhydrid. Unter Rühren werden langsam 1.2 ml abs. Schwefelsäure zugetropft worauf man weitere 16 h rührt. Zur Aufarbeitung werden 120 ml 10% Natriumacetatlösung zugegeben. Nach 30 Minuten wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird noch zweimal mit ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittel erhält man ein klares Öl.

Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigester (3:1) als Laufmittel.

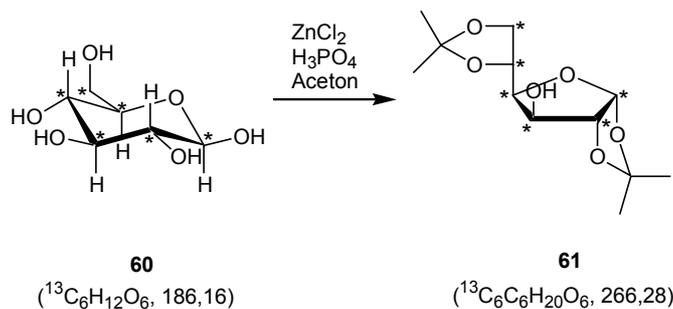
Produkt: 1 g (80% d. Th.)

R<sub>f</sub>Wert: 0,8 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI: M(+) 462 (Ameisensäureaddukt) (Theor. Wert für M(+):462), 385 (ohne Acetyl) (Theor. Wert für M(+):385)

<sup>1</sup>H-NMR: δ8,15-7,95 (m, 4H, Bz); δ7,6-7,3 (m, 6H, Bz); δ6,54 (d, J<sub>1-2</sub>=4Hz 1H, H<sub>1α</sub>); δ6,26 (d, J<sub>1-2</sub>=1Hz 1H, H<sub>1β</sub>); δ5,55 (d, 1H, H<sub>2β</sub>); δ5,45 (d, 1H, H<sub>2α</sub>); δ4,74 (d, 0.5H, H<sub>5β</sub>); δ4,68 (m, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>); δ4,53 (d, 0.5H, H<sub>5α</sub>); δ4,45 (d 0,5H, H<sub>5β</sub>); δ2,16 (s, 3H, CH<sub>3α</sub>); δ2,09 (s, 3H, CH<sub>3β</sub>); δ2,02 (s, 3H, CH<sub>3α</sub>); δ1,96 (s, 3H, CH<sub>3β</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (CDCl<sub>3</sub>): δ99,4 (1C, C<sub>1β</sub>); δ95,3 (1C, C<sub>1α</sub>); δ75,2 (1C, C<sub>2β</sub>); δ71,2 (1C, C<sub>2α</sub>); δ85,5 (1C, C<sub>4α</sub>); δ83,1 (1C, C<sub>4β</sub>); δ64,6-63,7 (1C, C<sub>5α+β</sub>)

10.5.2 Versuche mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Material10.5.2.1 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $^{13}\text{C}_6$ - $\alpha$ -D-glukofuranose 61,  
( $^{13}\text{C}_6$ -Diacetonglukose)

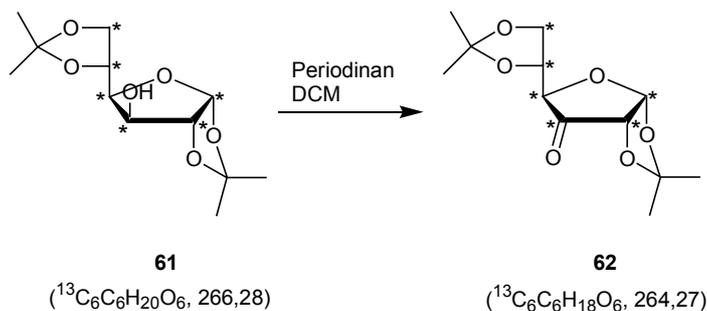
1,95g (10,8mmol)  $^{13}\text{C}_6$ -Glukose werden analog Reaktion 10.5.1.1 zusammen mit 1,77g (9mmol) wasserfreiem Zinkchlorid und 100 mg (1mmol) krist.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in 100 ml abs. Aceton suspendiert. Nach 24stündigem Rühren wird wie üblich aufgearbeitet, wodurch die Diacetonglukose elementaranalysenrein erhalten wird.

Produkt: 2,7g (95% d. Th.)

$R_f$ Wert: 0,5 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI: M(+) 267 (Theor. Wert für M(+):267)

NMR: in Übereinstimmung mit der unmarkierten Verbindung

10.5.2.2 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $^{13}\text{C}_5$ - $\alpha$ -D-glukofuranose 62

Die DessMartin Oxidation wird entsprechend Reaktion 10.5.1.2 mit 1,3 g (5 mmol) 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $^{13}\text{C}_6$ - $\alpha$ -D-glucofuranose und 2,5 g (6 mmol) DesMartin Periodinan in insgesamt 45 ml Dichlormethan durchgeführt.

Die Aufarbeitung erfolgt mit 8 ml ges.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lsg. und 25 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. .

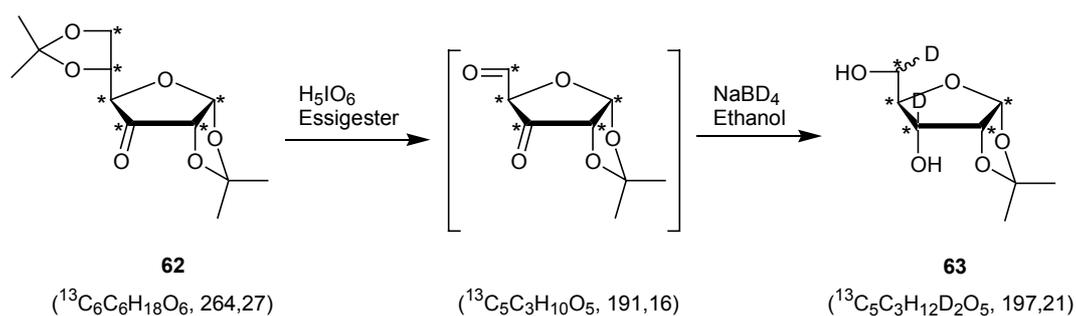
Produkt: 1,05 g (85% d. Th.)

$R_f$ Wert: 0,3 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI: M(+) 265 (Theor. Wert für M(+):265)

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ ): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

### 10.5.2.3 1,2-O-Isopropyliden-3,5-D $_2$ - $^{13}\text{C}_5$ -ribofuranose 63



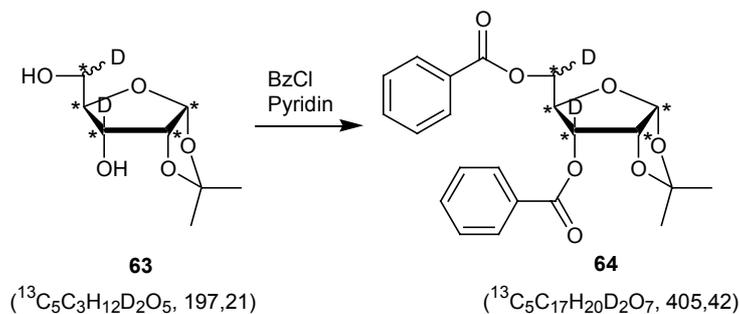
530 mg (2 mmol) 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glucofuranose werden wie in Reaktion 10.5.1.3 mit 550 mg (2,4 mmol)  $\text{H}_5\text{IO}_5$  in 20 ml abs. Essigester innerhalb 2h oxidiert. Überschüssiges Periodat wird mit 40  $\mu\text{l}$  abs. Ethylendiglykol abgebaut. Nach der Aufarbeitung wird in der 2. Stufe die Reduktion mit 200 mg (6 mmol)  $\text{NaBD}_4$  in 30 ml abs. Ethanol durchgeführt. Nach 30 Minuten wird das überschüssige Bordeuterid mit 3 ml Aceton und 3 ml Wasser abgebaut, bevor der Ansatz aufgearbeitet wird. Man erhält ein weißes Pulver von ausreichender Reinheit für die nachfolgende Synthesestufe.

ESI: M(+) 198, 215 (Na-Salz) (Theor. Wert für M(+):198, 215 (Na-Salz)

$R_f$ -Wert: 0,22

$^1\text{H-NMR}$ : (MeOD): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

#### 10.5.2.4 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-Isopropyliden-3,5-D<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-ribofuranose 64



Das Rohprodukt der Periodatspaltung wird unter Schutzgasatmosphäre in 15ml abs. Pyridin suspendiert und mit 1ml Benzoylchlorid umgesetzt.

Aufarbeitung und Aufreinigung erfolgt wie in Reaktion 10.5.1.4.

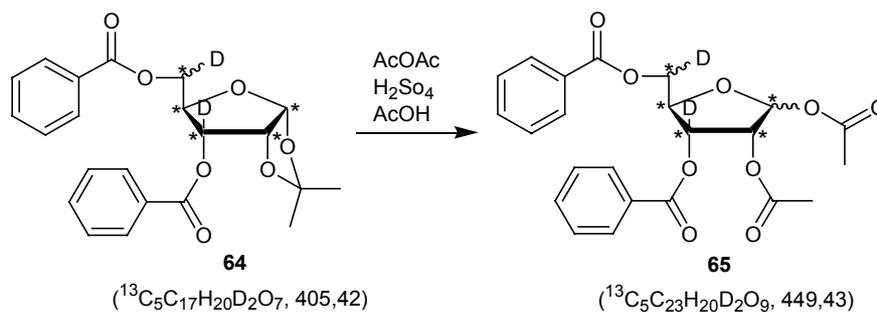
Produkt: 470 mg (60% über 2 Stufen)

R<sub>f</sub>-Wert : 0,5 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI: M(+) 406, (Theor. Wert für M(+):406) 348 (ohne Isopropyliden-Gruppe) (Theor. Wert für M(+):348)

$^1\text{H-NMR}$ : (CDCl<sub>3</sub>): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

#### 10.5.2.5 3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-O-acetyl-3,5-D<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-ribofuranose 65



Analog Reaktion 10.5.1.4 werden 460 mg (1,15mmol) Dibenzoyldeuteroacetonribose in 15ml abs. Essigsäure mit 1,1ml Essigsäureanhydrid und 350µl abs. Schwefelsäure umgesetzt.

Die Aufreinigung des bei der Reaktion erhaltenen klaren Öls erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel mit Hexan/Essigester (3:1) als Laufmittel

Produkt: 1 g (80% d. Th.)

R<sub>f</sub>Wert: 0,8 (Hexan/Essigester 1/3)

ESI: M(+) 390 (ohne Acetylgruppe) (Theor. Wert für M(+):390)

<sup>1</sup>H-NMR: (CDCl<sub>3</sub>): in Übereinstimmung mit dem Spektrum der unmarkierten Verbindung

## 10.6 Versuche zu Kapitel 7

### 10.6.1 Synthese des <sup>13</sup>C-markierten Oligonukleotids



#### 10.6.1.1 Festphasensynthese der <sup>13</sup>C-markierten DNA-Oligomere

Zur Vorbereitung der Festphasensynthese der DNA werden die ribosyl isotopenmarkierten Phosphoamidite aus 8 ml abs. Benzol lyophilisiert und mittels <sup>31</sup>P-NMR auf ihre Qualität überprüft. Für die Synthese der beiden Einzelstränge mit insgesamt jeweils 6 ribosyl <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-markierten Adenosin- und 6 ribosyl <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-markierten Thymin-Nukleosiden werden je 75 mg, des Desoxyadenosin- und des Thymin-Phosphoamidits unter Argon in Probenfläschchen abgefüllt. Der verwendete Perseptive-Synthesizer arbeitet mit einer Lösung von 50 mg Amidit/ml Acetonitril. Bei ei-

ner 1  $\mu\text{mol}$ -Synthese werden pro Nukleosid 140  $\mu\text{l}$  Amidit gebraucht. Unabhängig von der Anzahl der eingebauten Nukleoside werden vor Beginn der Synthese 400  $\mu\text{l}$  der Amidit-Lösung zum Spülen der Schläuche und Ventile des Synthesizers gebraucht. Für die Festphasensynthese werden die Amidite in je 1.5 ml abs. Acetonitril gelöst. Zum Schutz vor Verstopfungen werden die Lösungen durch einen Spritzenfilter filtriert. Beide Einzelstränge werden je zweimal im 1  $\mu\text{mol}$ -Maßstab synthetisiert. Zum Ausgleich des verringerten Überschusses an Amidit, wird die Kupplungsdauer bei den Kupplungsschritten mit markierten Phosphoamiditen auf 15 Min erhöht. Die Kupplungseffizienz wird durch Tritylmonitoring überwacht.

### 10.6.1.2 Abspaltung der Oligonukleotide vom Trägerharz

Die Abspaltung der DNA-Oligomere vom Trägerharz erfolgt mit je 4 ml halbkonzentriertem Ammoniak bei 55°C über Nacht. Die Überstände werden abpipettiert und an der SpeedVac getrocknet.

### 10.6.1.3 Aufreinigung der Oligonukleotide durch RP-HPLC

Die bei der Abspaltung vom Trägerharz erhaltenen Einzelstränge werden mittels Reversed Phase HPLC an einer Eurospher RP18-Säule (8x250 mm 5  $\mu\text{m}$ ) Trityl-On getrennt. Als Laufmittel dient 0,1% TEAA-Puffer (pH 7,0) gegen einen Gradienten aus Acetonitril (0-25% 20 Minuten, 40% 35 min). Die geeigneten Fraktionen werden jeweils vereint und lyophilisiert, wodurch man weiße Pellets erhält. Zur Konzentrationsbestimmung werden beide Einzelstränge in je in 1 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Bei dem Top-Strand werden 75 OD, beim Bottom-Strand 115 OD gemessen.

### 10.6.1.4 Detritylierung und Butanol-Fällung

Zur Abspaltung der 5'-ständigen Tritylschutzgruppe werden die Pellets der beiden Einzelstränge in je 300  $\mu\text{l}$  80% Essigsäure gelöst, wobei eine leichte Rotfärbung auf-

tritt. Nach 30 Minuten werden die Lösungen der DNA-Einzelstränge mit je 3 ml abs. *n*-Butanol versetzt und zur Fällung 45 Minuten bei -20°C gelagert. Die Lösungen beider Einzelstränge werden in einer Kühlzentrifuge bei für 45 Minuten bei 8500 U/Min. zentrifugiert, worauf die Überstände abpipettiert werden. Die Rückstände werden kurz getrocknet und zur Konzentrationsbestimmung in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Die Konzentrationsmessung in je 1 ml Wasser ergibt für den Top-Strand 67 OD und für den Bottom-Strand 107 OD.

### 10.6.2 Bildung des DNA- Duplexes

#### 10.6.2.1 Annealing des DNA-Duplexes

Beide Einzelstränge werden zur Bildung des Duplex in je 1 ml HMG-Puffer, bestehend aus 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM TrisHCl, pH 8, aufgenommen. Nach erneuter Bestimmung des OD-Gehaltes wird ein Aliquot des Bottom-strands zu der Lösung des Top-strands pipettiert und vermischt. Hierbei entspricht bei dem Bottom-strand 1 OD=40 µg, bei dem Top-strand 1 OD=34,81 µg (Read, 1998). Das Eppendorf-Cap mit der Lösung wird 3 Minuten einem Becherglas mit 300 ml kochendem Wasser erhitzt und anschließend langsam abgekühlt, indem das Becherglas in die Kühlzelle bei 4°C gestellt wird.

Die Aufreinigung und Entsalzung des Duplex erfolgt mittels Gelfiltration an einer G15-Säule. Elution erfolgt aus ddH<sub>2</sub>O. Die geeigneten Fraktionen werden vereint und anschließend lyophilisiert.

Die Konzentrationsmessung des erhaltenen <sup>13</sup>C-markierten DNA-Duplex ergibt 105 OD/ml

Die vollständige Bildung des Duplex wird über ein Natives Acrylamidgel kontrolliert.

### 10.6.2.2 Natives Acrylamidgel

Für ein 10x8x0,1cm Gel werden 6,7ml einer 40% Acrylamidlösung bestehend aus 380 g Acrylamid und 20 g Bisacrylamid auf 1000 ml dest. Wasser, mit 1,3 ml dest. Wasser und 2 ml 5xTBE-Puffer (135 g Tris, 69 g Borsäure, 9,2 g EDTA-Dinatriumsalz mit dest. Wasser auf ein Volumen von 2,5 l auffüllen) verdünnt. Die Polymerisation wird mit 100 µl einer 10% (m/v) Ammoniumperoxydisulfatlösung (APS) und 10 µl TEMED gestartet. Die Lösung wird kurz gevortext und zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Anschließend wird der Kamm eingesteckt. Nach 30-45 min ist das Gel gebrauchsfertig.

Die Lösung des DNA-Oligonukleotids wird mit 0,2 Äquivalenten des Probenpuffer, bestehend aus 2,5% Ficoll MW300.000 0,25% Bromphenolblau, versetzt und auf das Gel aufgetragen.

### 10.6.2.3 Ansetzten der NMR-Probe

Die lyophilisierte DNA wird in 250 µl eines Phosphat-Puffers bestehend aus 100 mmol NaCl und 10 mmol Phosphat, 10% D<sub>2</sub>O, pH 6,5 aufgenommen. Nach Kontrolle des pH-Werts wird die Probe in ein Shigemie-Probenröhrchen überführt.

## 10.7 Versuche zu Kapitel 8

### 10.7.1.1 Aufbereitung des DNA-Duplexes

Der DNA-Duplex wird zur Überführung in einen D<sub>2</sub>O-Puffer bestehend aus 40 mmol Kaliumphosphat, pH 6,5 in ein Centricon-Cap überführt und bei 7500 UPM ultrafiltriert. Nach Einengen auf 100 µl wird der Rückstand auf 1ml aufgefüllt. Nach dreimaligem Aufkonzentrieren wird die Lösung durch Zentrifugieren in ein geeichtes Eppendorfcap überführt.

Eine Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte ergibt bei dem  $^{13}\text{C}$ -markierten Duplex einen OD-Wert von 65 OD.

### 10.7.1.2 Test-Titrationen

Für die Test-Titrationen werden der DNA-Duplex und das Protein jeweils in einem Puffer aus 40mmol Kaliumphosphat, pH 6,5 gelöst und im Verhältnis 0,75; 0,9; 1,0; 1,1 und 1,2 zusammenpipettiert. Die Auswertung der Test-Titration erfolgt durch ein natives Acrylamidgel (20%).

### 10.7.1.3 Ansetzen des Komplexes

Protein und DNA-Duplex werden in einem Puffer bestehend aus 40 mmol Kaliumphosphat in  $\text{D}_2\text{O}$ ; pH 6,5 aufgenommen. Zu der Lösung des DNA-Duplexes wird ein Aliquot der Proteinlösung innerhalb 5 Minuten langsam zugegeben und durch vortexen vermischt. Zur Stabilisierung der Probe werden zusätzlich 100  $\mu\text{M}$  Dithiotreitol (DTT) und 0,01% Natriumazid zugegeben.

# Anhang

## Literaturverzeichnis

Abrahams, J. P., J. J. C. Acampo, G. Ott, M. Sprinzl, J. M. De Graaf, A. Talens and B. Kraal (1990). *Biochim. Biophys. Acta* **1050** (1-3): 226-9.

Agrofoglio, L. A., J.-C. Jacquinet and G. Lancelot (1997). *Tetrahedron Lett.* **38** (8): 1411-1412.

Altona, C. and J. A. Pikkemaat (1995). *Mol. Eng.* **5** (1-3): 179-94.

Andersson, F. and B. Samuelsson (1984). *Carbohydr. Res.* **129**: C1-C3.

Baker, B. R. J., J. P.; Schaub, R. E.; Williams, J. H. (1954). *J. Amer. Chem. Soc.*: 1786.

- Barton, D. H. R. and S. W. McCrombie (1975). *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*: 1574.
- Beaucage, S. L. and M. H. Caruthers (1981). *Tetrahedron Lett.* **22** (20): 1859-62.
- Bewley, C. A., A. M. Gronenborn and G. M. Clore (1998). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**: 105-131.
- Bianchi, M. E. and M. Beltrame (1998). *Am. J. Hum. Genet.* **63** (6): 1573-1577.
- Birkhofer, L., R. Richter and A. Ritter (1960). *Chem. Ber.* **97**: 2804.
- Blechs Schmidt, D. (1999). *Doktorarbeit*. Frankfurt.
- Cameron, F. J. and A. H. Sinclair (1997). *Hum. Mutat.* **9** (5): 388-395.
- Capel, B. (1998). *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 497-523.
- Carlomagno, T., I. C. Felli, M. Czech, R. Fischer, M. Sprinzl and C. Griesinger (1999). *J. Am. Chem. Soc.* **121** (9): 1945-1948.
- Chen, T. and M. M. Greenberg (1998). *Tetrahedron Lett.* **39** (10): 1103-1106.
- Compton, L. A. and W. C. Johnson (1986). *Analytical Biochemistry* **155**: 155-167.
- Connor, F., P. D. Cary, C. M. Read, N. S. Preston, P. C. Driscoll, P. Denny, C. Crane-Robinson and A. Ashworth (1994a). *Nucleic Acids Res.* **22** (16): 3339-46.
- Connor, F., P. D. Cary, M. Read, S. Preston, P. C. Driscoll, P. Denny, C. Crane-Robinson and A. Ashworth (1994b). *Nucleic Acids Res.* **22** (16): 3339-3346.
- Connor, F., E. Wright, P. Denny, P. Koopman and A. Ashworth (1995). *Nucleic Acids Res.* **23** (17): 3365-72.
- Crane-Robinson, C., C. M. Read, P. D. Cary, P. C. Driscoll, A. I. Dragan and P. L. Privalov (1998). *J. Mol. Biol.* **281** (4): 705-17.
- Crick, F. (1970). *Nature* **227**: 562.
- Cromsigt, J. A., J. Schleucher, K. Kidd-Ljunggren and S. S. Wijmenga (2000). *Proc. Conversation Biomol. Stereodyn., 11th* **11** (2): 211-219.
- Czech, M. (1996). *Diplomarbeit*. Frankfurt am Main.
- Darnell, J. E. (1982). *Nature* **297**: 365-371.
- Denny, P., S. Swift, F. Connor and A. Ashworth (1992). *Embo J.* **11** (10): 3705-12.
- Dess, D. B. and M. J. C. (1991). *J. Amer. Chem. Soc.* **113**: 7277-7287.

- Duchardt, E. (1999). *Diplomarbeit*. Frankfurt.
- Dudycz, L. W. and G. E. Wright (1984). *Nucleosides Nucleotides* **3** (1): 33-44.
- Engels, J. W. (1991). *Nach. Chem Tech. Lab.* **39**: 1250.
- Fisher, E. F. and M. H. Caruthers (1983). *Nucleic Acids Res.* **11** (5): 1589-99.
- Foerster, C., S. Limmer, W. Zeidler and M. Sprinzl (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (10): 4254-7.
- Foldesi, A., T. V. Maltseva, Z. Dinya and J. Chattopadhyaya (1998). *Tetrahedron* **54** (48): 14487-14514.
- Froehler, B. C. and M. D. Matteucci (1986). *Tetrahedron Lett.* **27**: 469.
- Gaffney, G. S., L. A. Marky and R. A. Jones (1984). *Tetrahedron Lett.* **40**: 3-13.
- Gaffney, G. S., B. L. Ti and R. A. Jones (1982). *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 1316.
- Gait, M. J. (1984). *Oligonucleotide Synthesis, a practical approach*. Oxford, IRL-Press.
- Gilbert, D. E. and J. Feigon (1999). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** (3): 305-14.
- Glen, W. L., G. S. Myers and G. A. Grant (1951). *J. Chem. Soc.*: 2568-2572.
- Glocker, M. O., S. Nock, M. Sprinzl and M. Przybylski (1998). *Chem.--Eur. J.* **4** (4): 707-715.
- Grainger, R. J., A. I. H. Murchie and D. M. J. Lilley (1998). *Biochemistry* **37** (1): 23-32.
- Graves, J. A. (1998). *Bioessays* **20** (3): 264-9.
- Griesinger, C., M. Hennig, J. P. Marino, B. Reif, C. Richter and H. Schwalbe (1998). *Biol. Magn. Reson.* **16** (Modern Techniques in Protein NMR): 259-267.
- Hardegger (1962). *Methods Carbohydr. Chem.* **1**: 177-79.
- Hilbert, G. E. and T. B. Johnson (1930). *J. Amer. Chem. Soc.* **52**: 4489.
- Hiraoka, Y., M. Ogawa, Y. Sakai, S. Kido and S. Aiso (1998). *Biochim. Biophys. Acta* **1399** (1): 40-6.
- Hodosi, G. (1994). *Carbohydr. Res.* **252**: 291-6.
- Holleman-Wiberg (1985). *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Berlin, New York, de Gruyter.
- Imazawa, M., Eckstein, F. (1978). *J. Org. Chem.* **43**: 3044.

- Imazawa, M., Eckstein, F. (1979). *J. Org. Chem.* **44**: 2039.
- Ireland, R. E. and L. Liu (1993). *J. Org. Chem.* **58**: 2899.
- Jelesarov, I., C. Crane-Robinson and P. L. Privalov (1999). *J. Mol. Biol.* **294** (4): 981-95.
- Jones, G. H. and J. G. Moffatt (1972). *Methods Carbohydr. Chem.* **6**: 315-22.
- Kido, S., Y. Hiraoka, M. Ogawa, Y. Sakai, Y. Yoshimura and S. Aiso (1998). *Gene* **208** (2): 201-6.
- Klenow (1970). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **65**: 168.
- Koch, H. J. (1977), Kanada, 800708; 1081217
- Koch, H. J. and R. S. Stuart (1977). *Carbohydr. Res.* **59** (1): C1-C6.
- Kossel, A. (1888). *Z. physiol. Chemie* **12**: 247.
- Lefebvre, V. and B. De Crombrughe (1998a). *Matrix Biol.* **16** (9): 529-540.
- Lefebvre, V., P. Li and B. de Crombrughe (1998b). *Embo J.* **17** (19): 5718-33.
- Lichtenthaler, F. W., P. Voss and A. Heerd (1974). *Tetrahedron. Lett.*: 2141.
- Limmer, S., M. Vogtherr, B. Nawrot, R. Hillenbrand and M. Sprinzl (1997). *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **36** (22): 2485-2489.
- Louis, J. M., R. G. Martin, G. M. Clore and A. M. Gronenborn (1998). *J. Biol. Chem.* **273** (4): 2374-2378.
- Maltseva, T. V., A. Foldesi and J. Chattopadhyaya (1998a). *Tetrahedron* **54** (48): 14515-14528.
- Maltseva, T. V., A. Foldesi and J. Chattopadhyaya (1998b). *Magn. Reson. Chem.* **36** (4): 227-239.
- Markiewicz, W. T. (1979). *J. Chem. Res. (S)* (1): 24-5.
- Matteucci, M. D. and M. H. Caruthers (1980). *Tetrahedron Lett.* **21** (8): 719-22.
- McBride, L. J. and M. H. Caruthers (1983). *Tetrahedron Lett.* **24** (29): 2953-6.
- McBride, L. J., R. Kierzek, S. L. Beaucage and M. H. Caruthers (1986). *J. Am. Chem. Soc.* **108** (8): 2040-8.
- Mertin, S., S. G. McDowall and V. R. Harley (1999). *Nucleic Acids Res.* **27** (5): 1359-64.
- Meyer, S. D. and S. L. Schreiber (1994). *J. Org. Chem.* **59** (7549-7552).
- Müller, T. (1996). *Diplomarbeit*. Frankfurt.

- Ng, L. J., S. Wheatley, G. E. Muscat, J. Conway-Campbell, J. Bowles, E. Wright, D. M. Bell, P. P. Tam, K. S. Cheah and P. Koopman (1997). *Dev. Biol.* **183** (1): 108-21.
- Niedballa, U. and H. Vorbrüggen (1974). *J. Org. Chem.* **39**: 3654.
- Nock, S., N. Grillenbeck, M. R. Ahmadian, S. Ribeiro, R. Kreutzer and M. Sprinzl (1995). *Eur. J. Biochem.* **234** (1): 132-9.
- Ono, A. and M. Kainosho (1997). *Tetrahedron Lett.* **38** (3): 395-398.
- Ono, A., J. Kurita, T. Inoue, I.-H. Pae, S.-i. Tate, Y. Ishido and M. Kainosho (1994). *Nucleic Acids Symp. Ser.* **31** (21st Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 1994): 295-6.
- Ono, A. M., T. Shiina, A. Ono and M. Kainosho (1998). *Tetrahedron Lett.* **39** (18): 2793-2796.
- Onodera, K. and N. Kashimura (1972). *Methods Carbohydr. Chem.* **6**: 331-6.
- Oogo, Y., A. M. Ono, A. Ono and M. Kainosho (1998). *Tetrahedron Lett.* **39** (18): 2873-2876.
- Peirano, R. I., D. E. Goerich, D. Riethmacher and M. Wegner (2000a). *Mol. Cell. Biol.* **20** (9): 3198-209.
- Peirano, R. I. and M. Wegner (2000b). *Nucleic Acids Res.* **28** (16): 3047-55.
- Pevny, L. H. and R. Lovell-Badge (1997). *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7** (3): 338-44.
- Prior, H. M. and M. A. Walter (1996). *Mol. Med.* **2** (4): 405-12.
- Privalov, P. L., I. Jelesarov, C. M. Read, A. I. Dragan and C. Crane-Robinson (1999). *J. Mol. Biol.* **294** (4): 997-1013.
- Quant, S. (1997). *Doktorarbeit*. Frankfurt.
- Quant, S., R. W. Wechselberger, M. A. Wolter, K. H. Woerner, P. Schell, J. W. Engels, C. Griesinger and H. Schwalbe (1994). *Tetrahedron Lett.* **35** (36): 6649-52.
- Read, C. M. (1998). persönl. Mitteilung.
- Read, C. M. (1999). persönl. Mitteilung.
- Reif, B., M. Hennig and C. Griesinger (1997). *Science (Washington, D. C.)* **276** (5316): 1230-1233.
- Richter, C. (1999). *Doktorarbeit*. Frankfurt.

- Richter, C., B. Reif, C. Griesinger and H. Schwalbe (2000). *J. Am. Chem. Soc.* **122** (51): 12728-12731.
- Ritchie, R. G. S., N. Cyr, B. Korsch, H. J. Koch and A. S. Perlin (1975). *Can. J. Chem.* **53** (10): 1424-33.
- Robins, M. J., J. S. Wilson and F. Hansske (1983). *J. Am. Chem. Soc.* **105** (12): 4059-65.
- Shafer, R. H. (1998). *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **59** (3): 55-94.
- Soullier, S., P. Jay, F. Poulat, J. M. Vanacker, P. Berta and V. Laudet (1999). *J. Mol. Evol.* **48** (5): 517-27.
- Sowa, W. (1972). *Can. J. Chem.* **50**: 1092-94.
- Stevens, J. D. (1975). *Aust. J. Chem.* **28** (3): 525-57.
- Stock, D. W., A. V. Buchanan, Z. Zhao and K. M. Weiss (1996). *Genomics* **37** (2): 234-7.
- Takamatsu, N., H. Kanda, I. Tsuchiya, S. Yamada, M. Ito, S. Kabeno, T. Shiba and S. Yamashita (1995). *Mol. Cell. Biol.* **15** (7): 3759-66.
- Tjandra, N. and A. Bax (1997). *J. Magn. Reson.* **124** (2): 512-515.
- Tolbert, T. J. and J. R. Williamson (1996). *J. Am. Chem. Soc.* **118** (34): 7929-7940.
- Trifonova, A., A. Foldesi, Z. Dinya and J. Chattopadhyaya (1999). *Tetrahedron* **55** (15): 4747-4762.
- van Houte, L. P., V. P. Chuprina, M. van der Wetering, R. Boelens, R. Kaptein and H. Clevers (1995). *J. Biol. Chem.* **270** (51): 30516-24.
- von der Heyden, C. (1996). *Diplomarbeit*. Frankfurt.
- Vorbrueggen, H. and B. Bennua (1981a). *Chem. Ber.* **114** (4): 1279-86.
- Vorbrueggen, H. and G. Hoefle (1981b). *Chem. Ber.* **114** (4): 1256-68.
- Vorbrueggen, H., K. Krolkiewicz and B. Bennua (1981c). *Chem. Ber.* **114** (4): 1234-55.
- Vorbrüggen, H. and K. Krolkiewicz (1975). *Angew. Chem.* **87**: 417.
- Watanabe, K. A., D. H. Hollenberg and J. J. Fox, J. (1974). *Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides* **1**: 1.
- Wegner, M. (1999). *Nucleic Acids Res.* **27** (6): 1409-20.

- Werner, M. H., J. R. Huth, A. M. Gronenborn and G. M. Clore (1995). *Cell (Cambridge, Mass.)* **81** (5): 705-14.
- Werner, M. H. and B. S.K. (1997). *Cell (Cambridge, Mass.)* **88**: 733-736.
- Wolffe, A. P. (1994). *Science (Washington, D. C.)* **264**: 1100-1101.
- Wolter, M. (1992). *Diplomarbeit*. Frankfurt.
- Wright, G. E. and L. W. Dudycz (1984). *J. Med. Chem.* **27** (2): 175-81.
- Wunderle, V. M., R. Critcher, A. Ashworth and P. N. Goodfellow (1996). *Genomics* **36** (2): 354-8.
- Xie, M., D. A. Berges and M. J. Robins (1996). *J. Org. Chem.* **61** (15): 5178-5179.
- Zimmer, D. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3091.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Michael Czech  
Geburtsdatum 18. Januar 1970  
Geburtsort Eltville am Rhein  
Nationalität deutsch

## Schulbildung

1976-1980 Grundschule Taubenbergschule, Idstein  
1980-1982 Förderstufe Limeschule, Idstein  
1982-1989 Gymnasium Pestalozzischule, Idstein

## Grundwehrdienst

1989-1990 Wehrdienst, Hermeskeil und Diez

## Studium

1990-1996 Studium Diplom-Chemie Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
1993 Vordiplom  
1996 Diplom  
Diplomarbeit: „Beiträge zur Synthese von isotopenmarkierten Amiditbausteinen“  
Betreuer: Prof. Ch. Griesinger  
1996 Beginn der Doktorarbeit zum Thema „Synthese von isotopenmarkierten Mono und Oligonukleotiden“  
Betreuer: Prof. Ch. Griesinger

## **Akademische Lehrer**

Prof. Bock, Prof. Brutschy, Prof. Comes, Prof. Egert, Prof. Engels, Prof. Fasold,  
Prof. Gerhard, Prof. Gericke, Prof. Griesinger, Prof. Hensen, Prof. König,  
Prof. Kolbesen, Prof. Martiensen, Prof. Quinkert, Prof. Rehm, Prof. Rüterjans,  
Prof. Reinsch, Prof. Schaarschmidt, Prof. Schlögl, Prof. Schwalbe, Prof. Trömel

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main,

Michael Czech