

**Die Synthese 2'-Aminoalkyl substituierter, fluorierter  
Nucleosidanaloga und ihr Einfluss auf die katalytische  
Aktivität von anti-HIV Hammerhead Ribozymen**



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

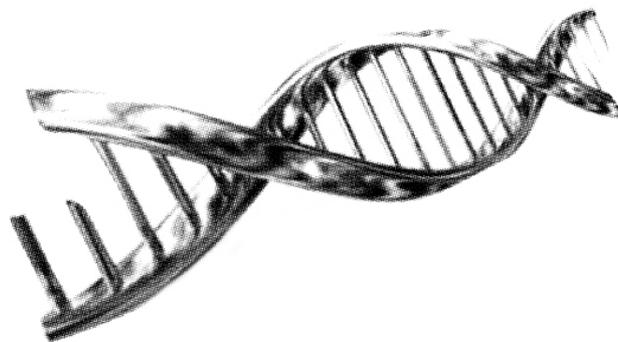
von  
**Astrid E. Klöpffer**  
aus  
Frankfurt a.M.

Frankfurt a. M.  
August 2004  
(D F 1)



*Für meine Eltern*





*"Dieses Eindringen der Wissensstrahlen von allen Seiten ins erwachende Gehirn! Ich leugne es nicht: es beglückte mich."*

Franz Kafka in "Ein Bericht für eine Akademie"



**Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels in der Zeit von Oktober 2000 bis August 2004 angefertigt.**

Herrn **Prof. Dr. Joachim W. Engels** danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, die sehr guten experimentellen Bedingungen und die gewährte akademische Freiheit. Durch seine Kenntnisse und Erfahrungen sowie die stetige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen hat er wesentlichen Einfluss auf diese Arbeit genommen.

Herrn Prof. Göbel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Ute Scheffer und Frau Elisabeth Kalden vom Arbeitskreis Göbel danke ich für die Arbeit am ALF Express<sup>®</sup> System und die Durchführung der T7-Polymerase-Assays.

**Darüber hinaus danke ich allen Angehörigen des Instituts und des Fachbereichs 14, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:**

- Meinen Laborkollegen Stefan Amberg und Jörg Parsch für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre
- Meinen Kollegen Stefan Amberg, Aleksandra Živković, Jörg Parsch, Katharina & Thorsten Strube und Kerstin Jahn-Hofmann für Freundschaft, die gute Zusammenarbeit sowie deren stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft
- Hannelore Brill und Ilona Priess für die Messung der Massenspektren
- Ewa Rheinberger, Rainer Schmidt, Beate Conrady und Bettina Bermann-Kömpel für deren stete Hilfsbereitschaft
- Den Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches "RNA-Ligand-Wechselwirkungen" für interdisziplinäre Zusammenarbeit und interessante Vorträge und Diskussionen.
- Prof. Dr. Valentin Wittmann für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die Bestellung von Literatur

- Dr. Zimmermann für seine Hilfe bei der Aufnahme und Auswertung der 2D-NMR-ROESY Spektren. Ferner seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Frau Schmid, Frau Langner, Frau Kaiser und Herrn Olbrich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren
- Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeiterinnen für die präparativen HPLC-Trennungen

Allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

**Mein Dank gilt ferner:**

- dem Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Hermann Willkomm-Stiftung für die finanzielle Unterstützung auf nationalen und internationalen Tagungen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Chemie und Biologie von RNA – eine Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Grundlagen der Nucleinsäurechemie.....	2
1.1.1 Aufbau von Nucleinsäuren.....	4
1.1.2 RNA-Strukturen.....	8
1.2 Therapeutische Oligonucleotide.....	10
1.2.1 Regulation der Genexpression.....	11
1.2.2 Wirkstoffe auf Nucleinsäure-Basis.....	17
<b>2 Katalytische RNA .....</b>	<b>23</b>
2.1 Ribozyme.....	24
2.1.1 Die unterschiedlichen Ribozym-Klassen.....	24
2.1.2 Das Hammerhead-Ribozym.....	26
2.2 RNA-Interferenz.....	32
<b>3 Artifizielle Nucleoside – universelle Basen und 2´-Modifikationen</b>	<b>35</b>
3.1 Universelle Nucleobasen.....	35
3.2 2´-Modifizierte Nucleoside.....	40
3.2.1 Synthetischer Zugang zu 2´-modifizierten Nucleosiden.....	41
3.2.2 Eigenschaften 2´-Aminoalkyl modifizierter Oligonucleotide.....	43
<b>4 HIV und anti-HIV Ribozyme.....</b>	<b>45</b>
4.1 Der HI-Virus: Verbreitung, Struktur und Therapien.....	45
4.2 Anti-HIV Ribozyme.....	50

<b>5</b>	<b>5'-Triphosphate – Synthese und Anwendung</b>	<b>55</b>
5.1	Synthese nucleosidischer 5'-Triphosphate	56
5.2	Enzymatischer Einbau von 5'-Nucleosid-Triphosphaten	60
<b>6</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Synthese 2'-Aminoethyl modifizierter, fluorierter Nucleosid-analoga</b>	<b>67</b>
7.1	Synthese der 4,6-Difluorbenzimidazol- und 2,4-Difluorbenzol-Ribonucleoside	68
7.1.1	Synthese von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose <b>8</b>	69
7.1.2	Synthese von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose <b>9</b>	74
7.1.3	Unterschiedliche Schutzgruppenstrategien (TOM / TBDMS) und Synthese der Phosphoramidite der Nucleoside <b>8</b> und <b>9</b>	77
7.2	Darstellung der 2'-Aminoethyl-modifizierten, fluorierten Nucleosid-analoga, ausgehend von den Verbindungen <b>8</b> und <b>9</b>	87
7.2.1	Synthese der 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl)-modifizierten Nucleosid-analoga <b>76</b> und <b>77</b>	87
7.2.2	Synthese der 2'-O-( $\beta$ -Aminoethyl)-modifizierten Nucleosid-analoga <b>82</b> und <b>83</b>	92
7.3	Optimierung der Synthesestrategie	96
7.3.1	Direkte Kupplung der 2'-Alkylseitenkette	96
7.3.2	Umsetzung des 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl) modifizierten Verbindungen unter "Mitsunobu-Bedingungen"	98
7.4	Synthese der Phthalimido- bzw. Trifluoracetyl-geschützten, 2'-Aminoethyl modifizierten fluorierten Benzimidazol- und Benzolnucleosid-phosphoramidite <b>92</b> und <b>95</b>	101

## **8 UV/VIS- und CD-spektroskopische Untersuchungen an monomodifizierten RNA 12meren.....109**

8.1 Synthese von RNA- und DNA- Oligonucleotiden.....	110
8.1.1 Der Festphasen-Synthesesyklus nach Caruthers.....	110
8.1.2 Aufreinigung und Analytik von Oligonucleotiden.....	114
8.2 UV/VIS-Spektroskopie an modifizierten RNA 12meren.....	118
8.2.1 Synthetisierte 12mer RNA-Stränge.....	118
8.2.2 Thermodynamische Untersuchungen an monomodifizierten RNA 12mer Duplexen.....	120
8.2.3 Schlussfolgerungen aus den erhaltenen Schmelzkurven.....	131
8.3 CD-Spektroskopie an RNA 12meren.....	133

## **9 Kinetische Untersuchungen an chemisch modifizierten anti-HIV Hammerhead-Ribozymen.....137**

9.1 Die Kinetik und Analytik der Ribozym katalysierten Spaltungsreaktion....	138
9.1.1 Kinetische Grundlagen.....	139
9.1.2 Synthetisierte Hammerhead Ribozyme und Substratstränge.....	140
9.1.3 Charakterisierung chemisch modifizierter Hammerhead Ribozyme mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	145
9.1.4 Die Analytik Fluoreszenz markierter Substrate und Spaltprodukte..	150
9.2 Untersuchung des Einflusses der fluorierten, 2'-unmodifizierten Nucleoside auf die Ribozymaktivität.....	155
9.2.1 Kinetische Analyse unter "single turnover"-Bedingungen.....	155
9.2.2 CD-Spektren von Ribozym-Substrat-Komplexen.....	158
9.3 Untersuchung des Einflusses der 2'-Aminoethyl substituierten, fluorierten Nucleosidanaloga 27 und 28 auf die Ribozymaktivität.....	161
9.3.1 Optimierung des anti-HIV Ribozyms <b>R1</b> in Bezug auf Größe und Effizienz.....	161
9.3.2 Kinetische Analyse unter "multiple turnover"-Bedingungen.....	166

9.3.3 Schlussfolgerungen.....	171
-------------------------------	-----

## **10 Synthese und biologische Eigenschaften fluorierter**

### **Nucleosid-5'-Triphosphate.....173**

10.1 Synthese und Aufreinigung der 5'-Triphosphate <b>96</b> und <b>97</b> .....	174
10.1.1 Synthese der Triphosphate <b>96</b> und <b>97</b> nach Yoshikawa.....	174
10.1.2 Aufreinigung der Triphosphate mittels FPLC, AE-HPLC und RP-HPLC.....	176
10.1.3 Analytik der synthetisierten Triphosphate <b>96</b> und <b>97</b> .....	179
10.2 Überprüfung der Templateigenschaften der universellen Basen <b>8</b> und <b>9</b> mittels reverser Transkription.....	182
10.3 Einsatz der Triphosphate <b>96</b> und <b>97</b> als Substrate der T7 RNA Polymerase.....	187

## **11 Zusammenfassung & Ausblick.....193**

## **12 Experimenteller Teil.....201**

12.1 Allgemeines.....	201
12.1.1 Analysemethoden für die chemische Synthese.....	201
12.1.2 Eingesetzte Pufferlösungen.....	205
12.2 Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen.....	207
12.3 Oligonucleotidsynthese und enzymatische Assays.....	279
12.3.1 Eingesetzte Pufferlösungen.....	279
12.3.2 Synthese, Aufreinigung und Analytik der Oligonucleotide.....	281
12.3.3 UV/VIS-Spektroskopie der Oligonucleotide.....	286
12.3.4 CD-Spektroskopie der Oligonucleotide.....	286
12.3.5 Analysen am ALF Express® DNA Sequencer.....	287
12.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	288

**13 Literatur.....291**

**14 Anhang.....321**

14.1 Abkürzungsverzeichnis.....322

14.2 Publikations- und Vortagsliste.....328



# 1

## Chemie und Biologie von RNA – eine Einführung

Im Jahre 2003 wurde das 50jährige Jubiläum der Entdeckung der DNA-Doppelhelix-Struktur durch James D. Watson und Francis H. C. Crick gefeiert. Dieser Meilenstein in der Geschichte der Naturwissenschaften bildete die Basis für die Entwicklungen in der Molekularbiologie und der Nucleinsäurechemie der letzten Jahrzehnte. Das tiefgreifende Verständnis molekularer Vorgänge wie z.B. der Replikation, der Evolution und der Diversität von Spezies wurde so ermöglicht. Schließlich führten diese Entwicklungen zu einem der größten Projekte der Menschheit: zur Sequenzierung des 3,3 Milliarden Basen umfassenden humanen Genoms im Rahmen des HUGO-Projektes ("*Human Genome Project*", Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001). Die Weiterentwicklung medizinischer Anwendungen wie z.B. der Gentherapie, Fortschritte bei molekularbiologischen Technologien wie z.B. dem Klonen und nicht zuletzt die Entdeckung der RNA-Interferenz, welche das gezielte Ausschalten beliebiger Gene ermöglicht, sind weitere eindrucksvolle Beispiele der modernen "*Life Sciences*".

Die Ausweitung der Forschung von DNA - dem Träger der genetischen Information - auf die Ribonucleinsäure (RNA) führte dazu, dass der RNA heute eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie der Zelle zugeschrieben wird. Zuvor wurde RNA lediglich eine Vermittlerrolle zwischen DNA und Protein zugesprochen ("*Vom Boten zum Boss*";

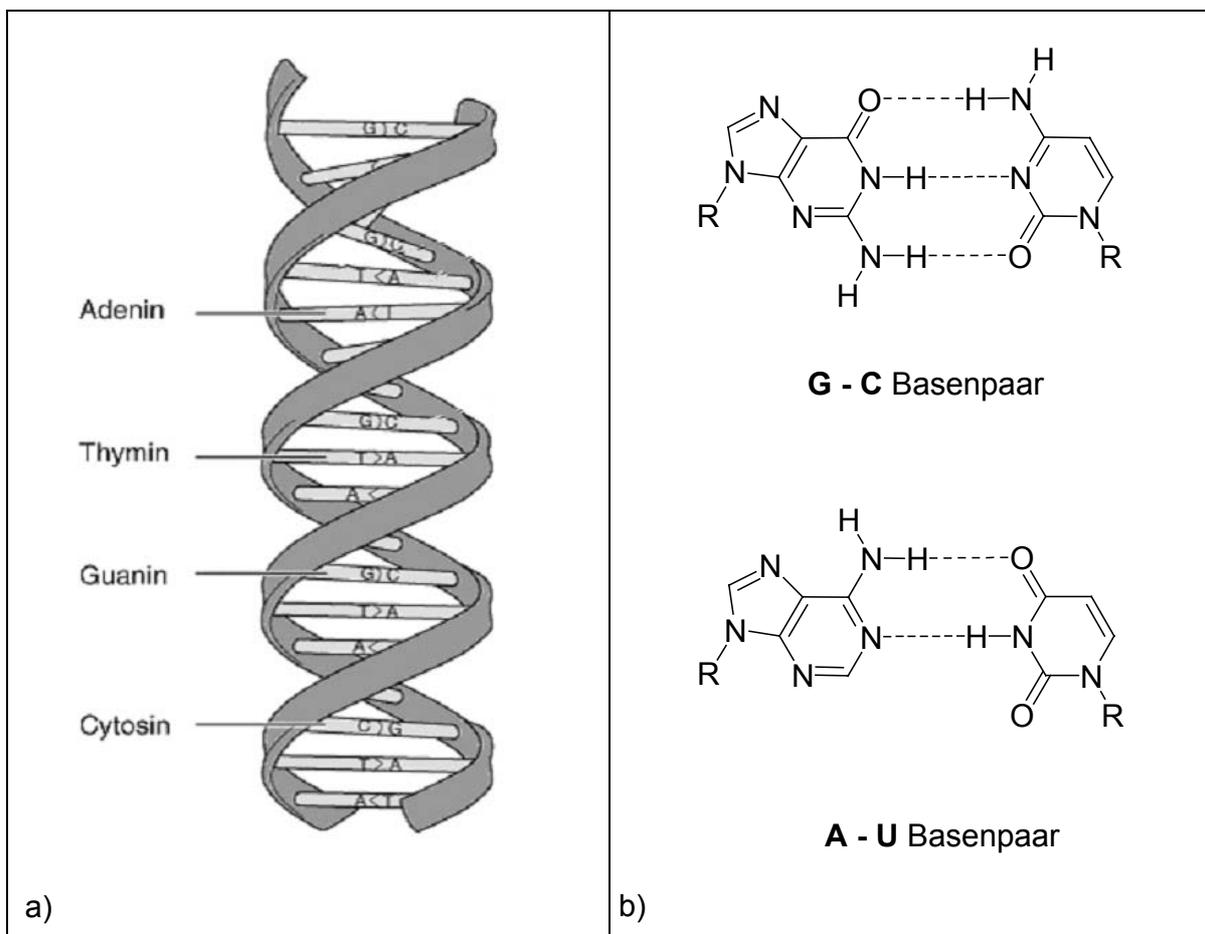
v. Bredow, 2003). Aufgrund neuer Erkenntnisse über die Mechanismen, Strukturen und Funktionen von RNA entwickelte sich das Gebiet der funktionellen Genetik ("*Functional Genomics*"). Dies eröffnet die Möglichkeit mit Hilfe von synthetischen Oligonucleotiden die Genexpression zu regulieren und zu studieren. Nicht zuletzt aufgrund der Weiterentwicklung des Konzeptes der RNA-Interferenz zur therapeutischen Anwendung wurde die RNA im Jahre 2002 vom *Science*-Magazin zum "Molekül des Jahres" gekürt ("*Breakthrough of the Year*"; Couzin, 2002); eine Auszeichnung, welche die wichtige und zentrale Rolle der RNA-Chemie in diesem Jahrzehnt verdeutlicht. Die Bedeutung der RNA spiegelt sich nicht zuletzt in der Steigerung der RNA relevanten Publikationen der letzten Jahre wider (1970: 7724, 2003: 37202 Publikationen). Auch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) hat die zunehmende Bedeutung der RNA erkannt und fördert dieses Gebiet unter anderem durch den Sonderforschungsbereich "RNA-Ligand-Wechselwirkungen" (SFB 579) der J.W. Goethe-Universität.

## 1.1 Grundlagen der Nucleinsäurechemie

Die 2'-Desoxyribonucleinsäure (DNA) wurde schon früh als Träger der genetischen Information identifiziert (Avery, 1944). Zu Beginn der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts begann man verstärkt mit der Strukturanalyse dieses Biopolymers. Die Feststellung Erwin Chargaffs, dass sich die Mengen an Adenin und Thymin sowie die Mengen an Guanin und Cytosin in DNA-Strängen jeweils entsprechen (Chargaff, 1951a&b), lieferte erste Hinweise darauf, dass DNA-Moleküle als Dimere vorliegen. Alexander Todd identifizierte die internucleosidischen Bindungen als 3'-5'-Phosphordiester-Brücken (Brown & Todd, 1952). Die von M. Wilkins und Rosalind Franklin durchgeführten Röntgenbeugungs-Untersuchungen an DNA-Fasern ließen eindeutig auf eine Helixstruktur schließen. Diese sollte aus zwei antiparallel ausgerichteten DNA-Strängen bestehen (Wilkins, 1952; Wilkins 1953a&b; Franklin, 1953). Zuvor war es R. Franklin bereits gelungen zwischen kristalliner A- und B-Form der DNA zu unterscheiden (Olby, 2003).

Unter Berücksichtigung von Chargaffs Regel und den Erkenntnissen von Todd, Wilkins und Franklin postulierten James Watson und der erst kürzlich verstorbene Francis Crick im Jahre 1953 die korrekte Doppelhelix-Struktur der DNA (Watson & Crick,

1953a&b). Sie widerlegten damit Raummodelle aus drei umeinander geschlungenen Strängen, die zuvor von Pauling und Corey vorgeschlagen wurden (Pauling & Corey, 1953a&b). Die postulierte Doppelhelix nach Watson & Crick besteht aus zwei zueinander komplementären, antiparallelen DNA-Strängen, die sich rechtsgängig um eine gemeinsame Achse winden (*Abbildung 1a*). Die 2'-Desoxyribose und das polyanionische Phosphordiester-Rückgrat zeigen dabei nach außen, während die Nucleobasen zueinander in die Helixmitte gerichtet sind. Dabei stehen sich immer Adenin und Thymin gegenüber und bilden durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen ein Basenpaar. Das zweite sogenannte "Watson-Crick-Basenpaar" bilden Guanin und Cytosin durch die Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken (*Abbildung 1b*). Ein G-C-Basenpaar trägt somit mehr zur Stabilität einer Doppelhelix bei als ein A-T-Basenpaar.



*Abbildung 1: a) schematische Darstellung der DNA-Doppelhelix; b) die Watson-Crick-Basenpaare. R = Ribose (RNA), 2'-Desoxyribose (DNA). In der DNA ist Uracil durch Thymin (5-Methyluracil) ersetzt*

Grundvoraussetzung dafür ist, dass die Nucleobasen in der Amino-Keto-Tautomerform vorliegen, damit die Donor-Akzeptormuster kompatibel sind. Die Nucleobasen stehen dabei senkrecht zur Ebene des Furanoserings. Unter Einbeziehung allgemeiner chemischer (Struktur-)Daten gaben Watson & Crick als Helixradius, d.h. als Abstand zwischen dem Phosphoratom und der Helixachse, 10 Å an (Watson & Crick, 1953a).

Die Möglichkeit, dass auch Ribonucleinsäuren helicale Strukturen ausbilden könnten, wurde von Watson und Crick ausgeschlossen (Watson & Crick, 1953a). Sie vermuteten, dass die Ribose mit der – im Vergleich zur DNA zusätzlichen 2'-Hydroxygruppe – sterisch zu anspruchsvoll sei.

Bereits in diesem "legendären" *Nature*-Artikel wird erwähnt, dass die sequenzspezifische Hybridisierung von DNA-Strängen einen Kopiermechanismus für die genetische Information darstellen könnte. Die Untersuchungen zum Fluss der genetischen Information vom Gen zum Protein wurden erstmals 1958 von F. Crick veröffentlicht (Crick, 1958).

Später wurde dieses grundlegende Prinzip als "zentrales Dogma der Molekularbiologie" bekannt (*siehe auch Kapitel 1.2*). Die beschriebenen Wegweisenden Arbeiten auf dem Gebiet der DNA-Strukturanalyse wurden 1962 mit dem Nobelpreis für Medizin an James Watson, Francis Crick und Maurice Wilkins honoriert.

### 1.1.1 Aufbau von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren können in drei unterschiedlichen Doppelhelix-Konformationen vorliegen: der A-, B-, und Z-Form. Während die beiden Konformationstypen A- und B-Form eine rechtsgängige Helix ausbilden, liegt die selten zu beobachtende Z-Form linksgängig vor (Saenger, 1984).

Die klassische DNA-Doppelhelix bildet eine B-Form-Helix mit einer breiten "großen Furche" ("*major groove*") und einer engen und tiefen "kleinen Furche" ("*minor groove*") aus. Sie wird in hohem Maße durch Hydratation stabilisiert; in den Furchen wird eine hochgeordnete Anlagerung von Wassermolekülen beobachtet. Die breite und kompakte A-Form-Helix kann durch Dehydratisierung der B-Form entstehen. Die Konformationsänderungen in den Helixformen sind reversibel. In erster Linie wird die

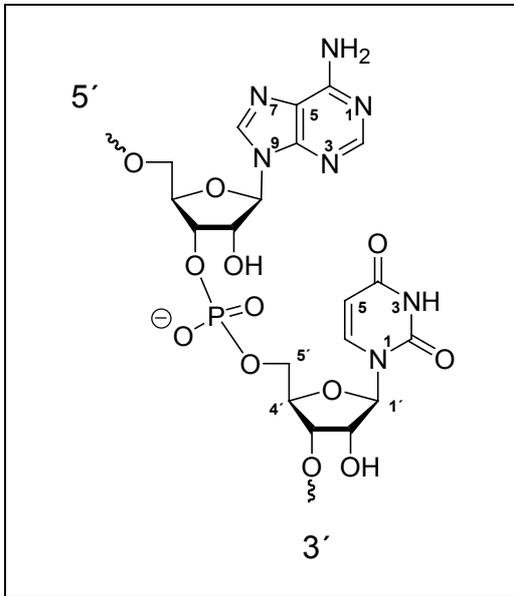
A-Form-Helix jedoch von RNA-RNA-Doppelsträngen ausgebildet. RNA/DNA-Hybride, wie sie in Promoter/Templat-Regionen als Erkennungssequenz für bestimmte Enzyme (z.B. Reverse Transkriptase) vorkommen, liegen ebenfalls in der A-Form vor. Diese wird durch den breiten Helixdurchmesser von 2,6 nm und der starken Neigung ihrer Nucleobasen zur Helixachse charakterisiert (Stryer, 1991).

Tabelle 1: Strukturelle Eigenschaften von idealen A-, B- und Z-Form Helices (Voet, 1994)

	<b>A-Form</b>	<b>B-Form</b>	<b>Z-Form</b>
helicaler Drehsinn	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Helixdurchmesser	2,6 nm	2 nm	1,8 nm
Basenpaare pro helicaler Windung	11	10	12
Helicaler Anstieg pro Basenpaar	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
Konformation der glycosid. Bindung	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i> (Pyrimidine); <i>syn</i> (Purine)
Ganghöhe (Anstieg/Windung)	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm
Basenneigung zur Helixachse	20°	6°	7°
große Furche	eng, tief	breit, tief	flach
kleine Furche	breit, flach	eng, tief	eng, tief
Ribose-Konformation	C3'- <i>endo</i>	C2'- <i>endo</i>	C2'- <i>endo</i> (Pyrimidine) C3'- <i>endo</i> (Purine)

Bei hohen Salzkonzentrationen bilden sich bevorzugt Helices der linksgängigen Z-Form aus (Wang, 1979; Gessner, 1989). Die lange, schmale Form der Helix weist grundlegende Unterschiede zur A- und B-Form auf, welche aus *Tabelle 1* zu entnehmen sind. Die schlanke Helixform bewirkt eine erhöhte elektrostatische Abstoßung der Polynucleotidstränge, welche durch die hohe Salzkonzentration reduziert wird. Bei allen drei Helixformen kann es zu deutlichen, sequenzspezifischen Abweichungen von den in *Tabelle 1* aufgestellten Daten kommen.

Die heterocyclischen Nucleobasen der natürlichen Nucleotide weisen ein planares Purin-Grundgerüst (bei A und G) bzw. ein Pyrimidin-Grundgerüst (bei C und T/U) auf. Diese sind jeweils  $\beta$ -N-glycosidisch mit dem C1'-Kohlenstoff des Zuckers verknüpft (*Abbildung 2*). Zeigt die Watson-Crick Bindungsseite der Nucleobase von der Ribose



*Abbildung 2: Aufbau eines RNA-Stranges am Beispiel 5'-AU-3'*

weg, so spricht man von einer *anti*-Konformation der glycosidischen Bindung. Diese wird aufgrund von sterischen Effekten bevorzugt eingenommen. In der *syn*-Konformation ist der Hauptteil der Nucleobase dem Zucker zugewandt. Die Ebene der Nucleobasen steht dabei nahezu senkrecht zur Ebene der (2'-Desoxy-) Ribose. Die nucleosidische Zuckerkonformation ("*sugar puckering*") unterscheidet sich je nach Helixform. Der nicht planare Ribofuranosering kann dabei zwei verschiedene Hauptkonfor-

mationen einnehmen: die E- ("*envelope*") und die T-Konformation ("*twist*"). Bei der E-Konformation liegen vier Atome des Furanoserings in einer Ebene und das fünfte Atom steht um ca. 0,5 Å nach oben oder unten aus der Ebene heraus. Steht das Atom in Richtung C5' und Nucleobase aus der Ebene, spricht man von einer *endo*-Konformation; die gegensätzliche Orientierung wird mit *exo* bezeichnet. In Doppelhelices liegen die Zucker in einer C2'-*endo* (DNA) und C3'-*endo* (RNA)-Konformation vor. Die *twist*-Konformation entsteht, wenn nur drei Atome des Furanoserings in einer Ebene liegen und je eines der anderen Atome über bzw. unter der Ebene liegt (*Abbildung 3*).

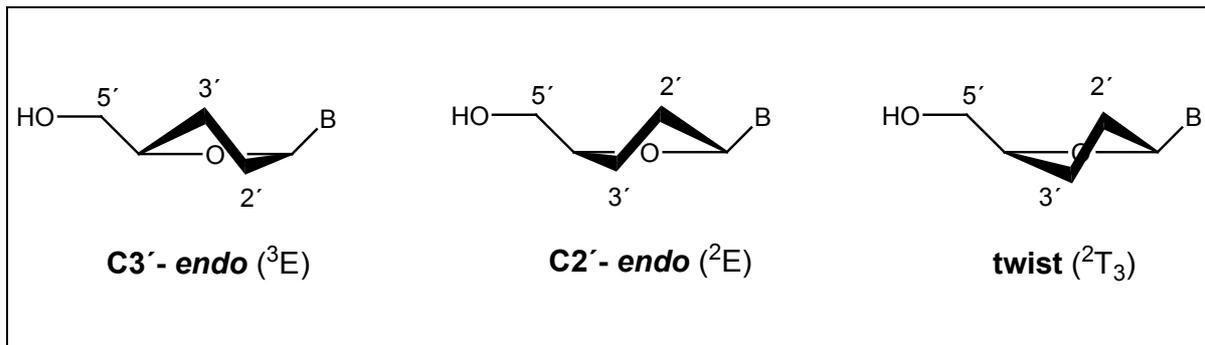


Abbildung 3: Drei mögliche Konformationen des Furanoserings

Statt des fünfgliedrigen Furanoserings können in synthetischen DNA-Strängen auch Hexopyranose-Analoga eingebaut werden. Untersuchungen haben gezeigt (Hendrix, 1997), dass solche Nucleinsäuren oft keine helicalen Strukturen mehr ausbilden, sondern flache, "Leiter artige" Strukturen. Zudem ist in vielen Fällen die Bindung solcher Oligonucleotide an RNA verstärkt, so dass sie gute mRNA-Inhibitoren darstellen (van Aerschot, 2003).

Neben den Wasserstoffbrücken in den Basenpaaren werden Doppelhelices auch durch  $\pi$ - $\pi$ -Basenstapelungs-Wechselwirkungen stabilisiert (" $\pi$ - $\pi$ - base stacking"). Diese entstehen zwischen benachbarten Nucleobasen eines Oligonucleotidstranges. Die Stärke der Wechselwirkung hängt von der Lage der planaren  $\pi$ -Systeme der Nucleobasen ab.  $\pi$ - $\pi$ -Basenstapelungs-Wechselwirkungen zwischen Purinen sind dabei immer stärker als zwischen Pyrimidinen.

Auch die Solvation spielt bei der Stabilität von Oligonucleotiden eine entscheidende Rolle. Der Grad der Hydratation bestimmt die Ausbildung zur A- oder B-Form-Helix. In Abhängigkeit von der Salzkonzentration im wässrigen Medium werden auch ausgebildete Sekundär- und Tertiärstrukturen stabilisiert (Edelhoch & Osborne, 1976). Durch ihr polyanionisches Phosphatrückgrat sind Oligonucleotide gut wasserlöslich. Ihre Polarität steigt durch Ausbildung der Doppelhelix-Struktur, da hier die Phosphordiester dem Solvens stärker exponiert sind. Oligonucleotide können daher gut mit Alkoholen gefällt werden.

### 1.1.2 RNA-Strukturen

Ribonucleinsäuren weisen eine wesentlich größere strukturelle Diversität, konformationelle Flexibilität und funktionelle Vielseitigkeit auf als DNA. Sie können neben helicalen, doppelsträngigen Bereichen auch komplexe, globuläre Strukturen ausbilden, deren Untereinheiten durch Einzelstrangsegmente verbunden sind. Die Unterschiede der ausgebildeten Konformationen und der chemischen Reaktivität der Ribonucleinsäure im Vergleich zur DNA liegt in der Präsenz der 2'-Hydroxygruppe. Computer gestützte Strukturaussagen sind bei komplexen Systemen wie der ribosomalen RNA und viralen RNA-Komplexen sehr hilfreich (z. B. <http://rna.chem.rochester.edu>). In Zellen vorkommende RNA ist in drei Klassen eingeteilt: die Boten-RNA ("*messenger RNA*"; mRNA), die Transfer-RNA (tRNA) und die ribosomale RNA (rRNA) (Blackburn & Gait, 1992).

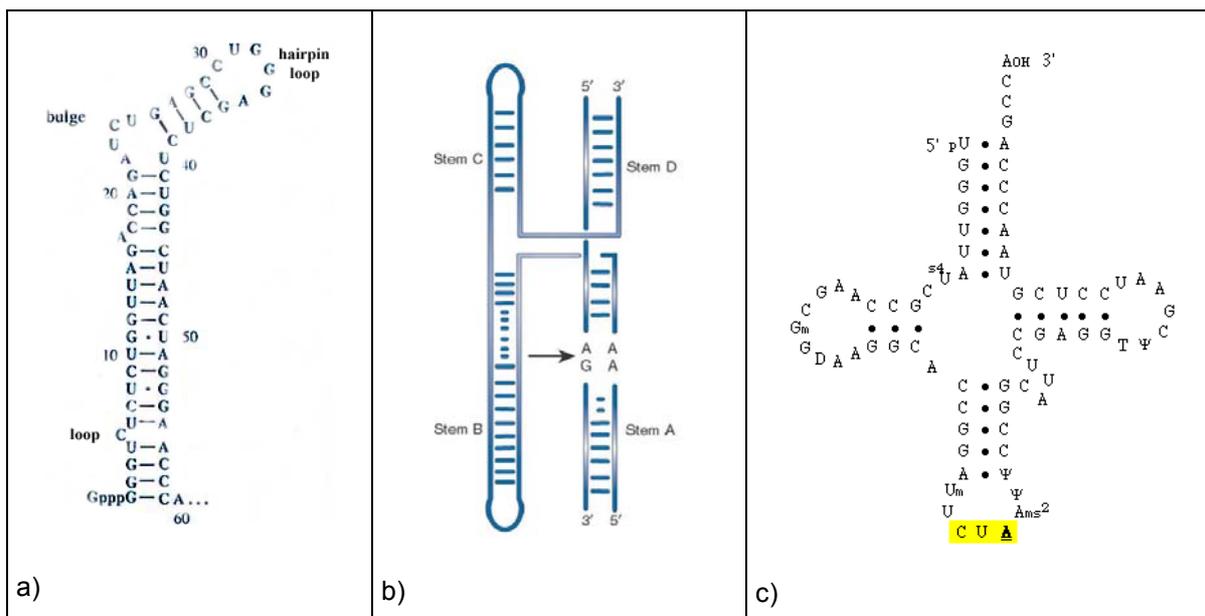
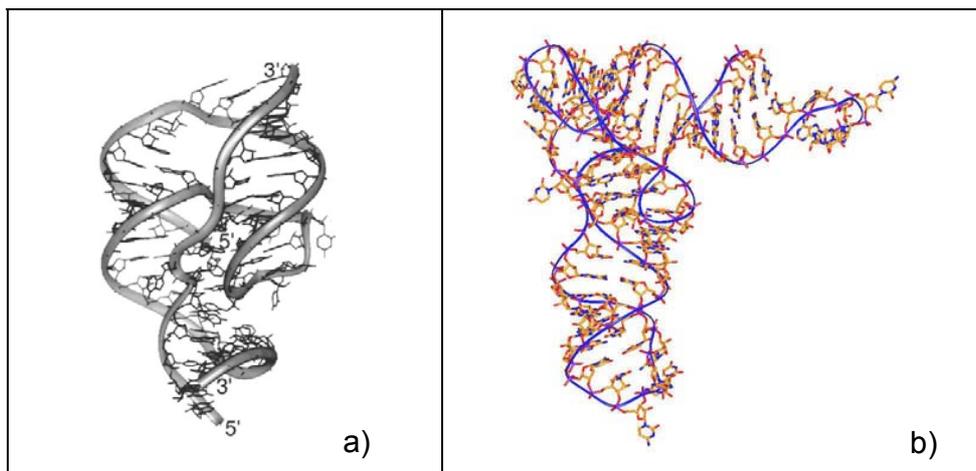


Abbildung 4: Sekundärstrukturen biologisch relevanter RNAs. a) HIV-Tar-RNA, b) Hairpin-Ribozym, c) tRNA

Aufgrund der Ribose in den Nucleotiden der RNA kann diese keine B-Form-Helix wie DNA ausbilden, sondern nimmt die Helixkonformation des A-Typs an. Bei nicht oder nur teilweise komplementären Regionen werden RNA-charakteristische Sekundärstruktur-Elemente beobachtet (Holbrook, 1998; Puglisi, 1998). Es existieren einfache Motive wie die Haarnadelschleife ("*hairpin loop*") und interne Schleifen ungepaarter

Nucleotide ("*loops*"). Ein- und beidseitige Ausstülpungen ("*bulges*") werden von ungepaarten Strangabschnitten in einer Helix ausgebildet. Zudem sind oft komplexe Systeme wie z.B. Kreuzungen ("*junctions*") zu beobachten. Diese sind häufig in biologischen RNA-Strukturen anzutreffen. In *Abbildung 4* sind das HIV-Tar-Motif (a), der Ribozym-Substrat-Komplex eines Hairpin-Ribozyms (b) und die tRNA (c) als Beispiele für die strukturelle Vielfalt der RNA aufgeführt.

Ungepaarte RNA-Regionen dienen oft als biologische Erkennungsmuster oder stabilisierende Elemente. Dabei spielt die Tertiärstruktur der RNA eine wichtige Rolle. Oft wird die korrekte dreidimensionale Konformation erst durch die Anlagerung eines Proteins, eines  $Mg^{2+}$ -Ions o.ä. induziert. Die korrekte Tertiärstruktur einer RNA ermöglicht in vielen Fällen überhaupt erst deren biologische Aktivität. In *Abbildung 5* sind die Tertiärstrukturen bzw. Kristallstrukturen des Hairpin-Ribozyms und der tRNA aufgeführt.



*Abbildung 5: Tertiärstrukturen von RNA am Beispiel des Hairpin-Ribozyms (a) und der tRNA (b).*

## 1.2 Therapeutische Oligonucleotide

Die genetische Information, die in den DNA-Sequenzen codiert ist, wird in der Zelle zunächst in RNA umgeschrieben ("Transkription") und aus dem Zellkern geschleust. Diese *messenger*-RNA (mRNA; Jacob, 1961) tritt im Cytoplasma in die ribosomale Einheit ein und die Proteinbiosynthese wird gestartet ("Translation"). Dabei codieren jeweils Sequenztriplets (Codons) für bestimmte Aminosäuren (Ochoa, 1963; Nirenberg *et al.*, 1963; Khorana, 1965). Dieses Prinzip, das mit wenigen Ausnahmen allen Zellen zugrunde liegt, wird als "zentrales Dogma der Molekularbiologie" bezeichnet (*Abbildung 6*). In seiner erweiterten Form berücksichtigt man auch die Replikation, d.h. die Vervielfältigung der DNA, und die Möglichkeit der reversen Transkription wie sie von Retroviren ausgeübt wird. Hierbei wird die virale RNA in die Wirtszelle eingeschleust und deren Zellmaschinerie wird dazu verwendet mittels einer reversen Transkriptase virale DNA zu synthetisieren, um so die Vermehrung des Virus zu sichern.

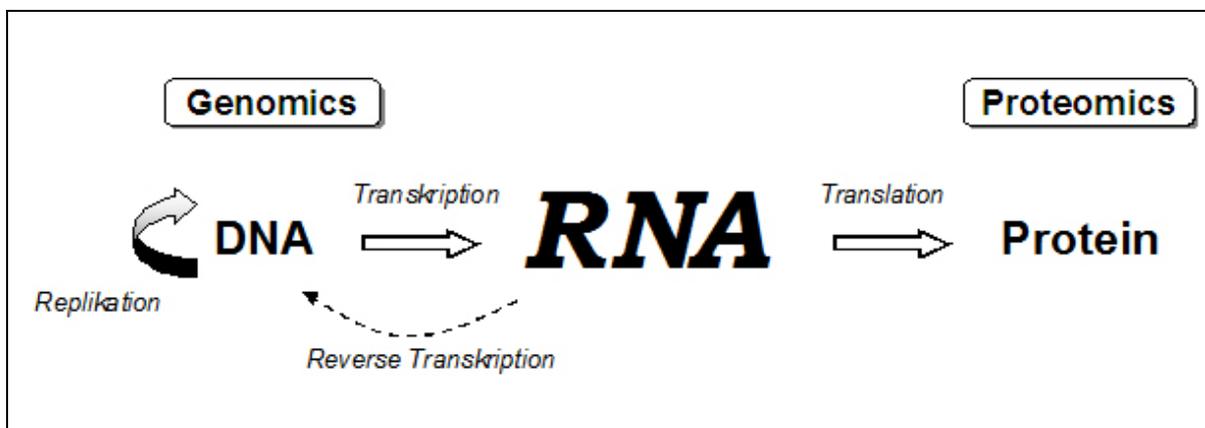


Abbildung 6: Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Die Wissenschaft hat in den letzten Jahren zunehmend die zentrale Rolle der RNA bei Zellprozessen erkannt. Sie wird daher nicht nur verstärkt als wichtiges Kontrollelement und Mediator der Proteinbiosynthese angesehen, sondern auch als geeignetes Ziel, um die Genexpression zu regulieren. Die in *Abbildung 6* skizzierten zellulären Prozesse bieten ideale Angriffspunkte für therapeutische Oligonucleotide. Im Falle von

Onkogenen, viralen RNAs oder z.B. krankhaften Mutationen im menschlichen Erbgut ist diese gezielte Inhibierung der Genexpression von besonderem therapeutischen Interesse.

Die meisten Wirkstoffe, die heute auf dem Markt sind, interagieren mit krankheits-spezifischen Enzymen und Rezeptoren. Da einige Krankheiten jedoch auf defektem/ mutiertem genetischen Material und dessen Prozessierung in der Zelle beruhen, versucht man seit Beginn der 90er Jahre diese Produktion defekter Proteine bereits auf der Ebene der Nucleinsäuren zu stoppen (Engels, 1991). Dieses Vorgehen hat zwei entscheidende Vorteile: Zum einen liegt im Vergleich zu Proteinen eine wesentlich geringere Zahl krankheitsrelevanter Nucleinsäuren (Faktor  $10^4$ ) vor und zum anderen kann die Inhibierung viraler RNA die Vermehrung eines Virus stoppen ohne die Zelle zu beschädigen.

### 1.2.1 Regulation der Genexpression

Therapeutische Oligonucleotide stellen eine neue Substanzklasse an Arzneimitteln dar (Hartmann, 2003). Der Eingriff in die Genexpression kann sowohl auf der Ebene der DNA, der mRNA als auch der Proteine stattfinden. Hierbei liegen verschiedene Konzepte zugrunde, die im folgenden eingehend diskutiert werden. In *Abbildung 7* ist der Ablauf der Genexpression in einer Zelle schematisch dargestellt. Neben den möglichen Angriffspunkten von synthetischen Oligonucleotiden sind die wichtigsten Mechanismen zur Regulation der Genexpression skizziert.

Es handelt sich hierbei um folgende Konzepte:

- Antisense
- Ribozyme
- RNA Interferenz (RNAi)
- Tripelhelices
- Aptamere

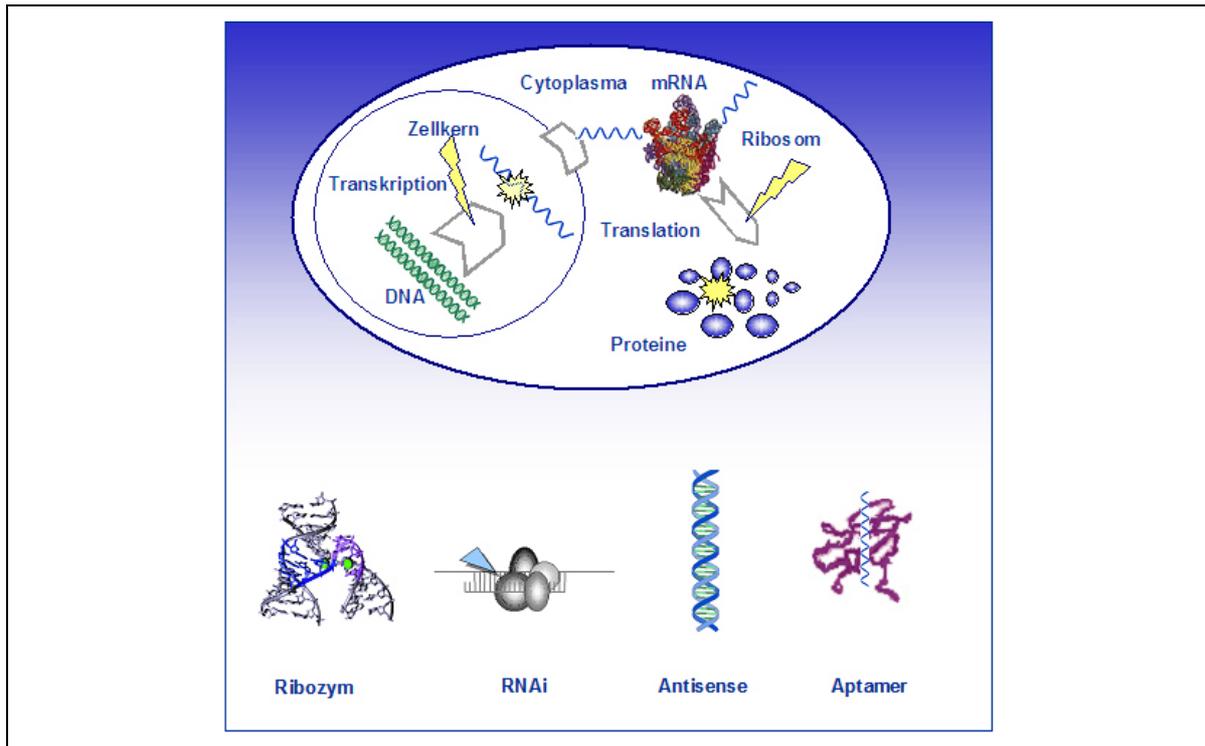


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression

### Tripelhelix-Konzept

Nur eine der Methoden, die Tripelhelixbildung, greift bereits auf der Stufe der DNA in den zellulären Mechanismus ein. Bei dieser auch als "Anti-Gen-Konzept" bekannten Methode blockieren Oligonucleotide die DNA-Doppelhelix im Zellkern durch Anlagerung und Bildung einer dreisträngigen Helix. Idealerweise erfolgt diese sequenzspezifische Bindung an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren oder an Promoterregionen der RNA-Polymerase, so dass der Transkriptionsstart direkt verhindert werden kann. Die Hemmung kann dabei aus sterischen Gründen erfolgen oder durch eine Konformationsänderung der Helix, die durch die Anlagerung des dritten Stranges induziert worden ist (Batey, 1999).

Die stabilsten Tripelhelices werden in homopolymeren poly(U-A)Strängen gebildet, bei denen in paralleler Ausrichtung ein Homopyrimidin-Strang hybridisiert ist. Die Anlagerung dieses dritten Stranges erfolgt über Hoogsteen-Basenpaarung in der großen Furche der DNA-Doppelhelix (Blake, 1967; Massoulié, 1968; Klinck, 1995). Neben den Basentriplets (U-A-U), die aus dem Watson-Crick-Basenpaar U-A und

dem Hoogsteen-Basenpaar A·U bestehen, können auch Tripelhelices der Form (C·G·C<sup>+</sup>) ausgebildet werden. Hierbei ist es für die Stabilität des Komplexes unerlässlich, dass das Cytidin protoniert vorliegt; das heißt, es müssen Bedingungen um pH6 vorliegen.

Der große Vorteil des Anti-Gen-Konzeptes liegt darin, dass pro Zelle nur ein diploider Satz an Chromosomen vorliegt. Somit müssen nur zwei identische DNA-Sequenzen inhibiert werden (Engels, 2004). Die Beschränkung auf bestimmte Sequenzbereiche (allg.: homoPy-Pu·Py), die in dieser Form in biologischen Systemen selten vorkommen, schränkt den Einsatz von Tripelhelices erheblich ein. Tripelhelices sind relativ instabil, so dass eine permanente Inhibierung der DNA nicht gewährleistet werden kann. Zudem muss eine ausreichend hohe Menge an Oligonucleotid in den Zellkern geschleust werden und die mit Histonen verpackten DNA-Stränge müssen für das Oligonucleotid zugänglich sein. Aufgrund dessen hat dieser Ansatz zur Regulation der Genexpression in den letzten Jahren an Bedeutung verloren (Gewirtz, 1998; Vasquez, 1998; Sun, 1996).

### *Antisense-Ansatz*

Der Antisense-Ansatz richtet sich gegen die prä-mRNA oder die mRNA im Cytoplasma. Hierbei erfolgt die Watson-Crick-abhängige Anlagerung eines synthetischen Oligonucleotids an den RNA-Einzelstrang. Durch diese Blockierung der mRNA wird z.B. die Anlagerung des Spliceosoms oder der Eintritt der mRNA in die ribosomale Einheit verhindert (Zamecnik, 1978; Stephenson, 1978).

Der Einsatz von synthetischen Antisense-Oligonucleotiden ist die älteste Methode zur Regulation der Genexpression und wurde erstmals 1978 an der Harvard Medical School in Boston, USA, am Beispiel der Inhibierung des "Rous sarcoma"-Virus beschrieben. Das Wirkprinzip wird auch in Bakterien und Viren als natürlich vorkommender Regulationsmechanismus der Proteinbiosynthese beobachtet (Uhlmann, 1990; Weintraub, 1990; Hjalt, 1992; Brantl, 2002). Die Wirksamkeit ist hochgradig von der Zugänglichkeit der Sekundärstruktur der Ziel-RNA abhängig. Auch die Kenntnis der korrekten Sequenz des anvisierten mRNA-Bereiches ist essentiell, da unter physiologischen Bedingungen bereits ein "mismatch"-Basenpaar zu instabilen Duplexen führen kann. Dies wird in späteren Kapiteln am Beispiel der Ribozym

vermittelten Spaltung von HIV-Sequenzen mit Punktmutationen eingehend erläutert und mit Ergebnissen belegt, die im Rahmen dieser Doktorarbeit erarbeitet wurden.

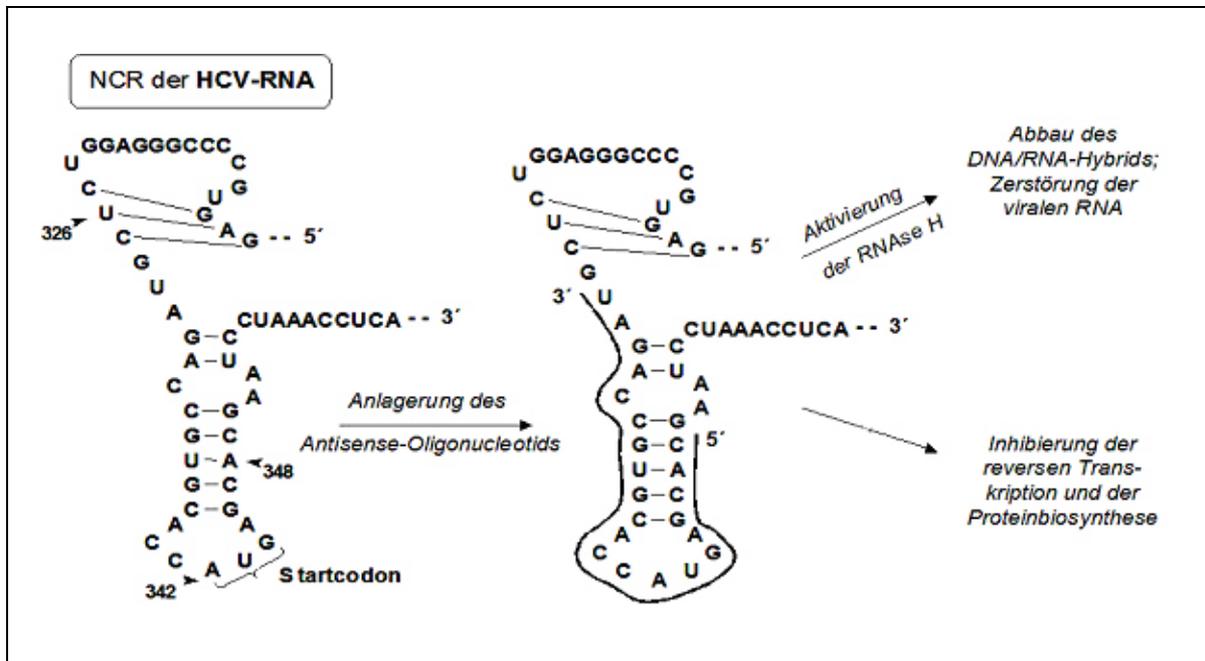


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Wirkprinzips von Antisense-Oligonucleotids am Beispiel der nicht codierenden Region (NCR) des Hepatitis C-Virus

Die Wirkungsweise von Antisense-Oligonucleotids führt zu verschiedenen mechanistischen Modellen (Crooke, 1999):

- **Inhibierung des Spleißvorgangs**  
Das Ausschneiden der Introns aus der prä-mRNA (primäres RNA-Transkript) wird durch Anlagerung des Antisense-Oligonucleotids verhindert.
- **Sterische Blockade der Translation**  
Abbruch der Proteinbiosynthese durch Blockierung des AUG-Startcodons oder einer anderen mRNA-Region. Dies unterbindet die Anlagerung bzw. die Translokation des Ribosoms an der mRNA.
- **Aktivierung der Ribonuclease H**  
Das Antisense-Oligonucleotid induziert den selektiven,  $Mg^{2+}$ -abhängigen Abbau von RNA in RNA/DNA-Duplexen mittels RNase H. Die zerschnittene mRNA wird im Cytoplasma rasch durch Exonucleasen vollständig abgebaut.

Die RNase H reguliert innerhalb der gesunden Zelle den Abbau von an der DNA angelagerten RNA-Primern nach der Transkription; mRNA-Einzelstränge werden zellintern durch 5'-Maskierung (CAP) und 3'-PolyA-Überhänge vor dem Abbau durch Exonucleasen geschützt (Kanaya, 1993).

Die Aktivierung der RNase H ist der effektivste Mechanismus des Antisense-Konzeptes, da hierbei die mRNA irreversibel zerstört wird und es sich um einen katalytischen Prozess handelt.

Neben den verschiedenen Mechanismen des Antisense-Ansatzes müssen beim Design der Oligonucleotide noch weitere Parameter berücksichtigt werden: die Selektivität, die Nucleasestabilität und die Erhöhung der Bindungsaffinität. Zur selektiven Inhibierung einer bestimmten mRNA-Sequenz muss aus statistischen Gründen mindestens ein 17mer Oligonucleotid eingesetzt werden (Uhlmann, 1999; Peyman, 1997). Die Länge des Oligonucleotides sollte jedoch 35 Nucleotide nicht übersteigen, da bei großen Nucleinsäuren die Zellaufnahme drastisch reduziert ist (Frauendorf, 1993). Die ausgewählten Bereiche der Ziel-RNA sollten hochkonserviert sein, also keine Mutationen oder Deletionen aufweisen. Die Stabilität gegenüber Nucleasen kann durch die Einführung von Rückgrat-Modifikationen erhöht werden (Crooke, 2000). Die Phosphorthioate, bei denen ein Sauerstoffatom des Phosphordiesters durch ein Schwefelatom ersetzt ist, haben sich als Standard durchgesetzt (Stein, 1991), da sie die Halbwertszeit des Antisense-Oligonucleotides im Serum verlängern. Auch unpolare Rückgratmodifikationen wie Methylphosphonate (Miller, 1991) und Benzylphosphonate (Caselmann, 1997) verzögern deutlich den Abbau durch Nucleasen.

Wie in der Arbeitsgruppe Engels gezeigt werden konnte (Amberg, 2003) inhibieren sechsfach Rückgrat modifizierte Antisense-Oligonucleotide die Genexpression des Hepatitis C-Virus (HCV) in CCI13-Zellen sehr effizient. Die Inhibierungsraten der arylalkyl-modifizierten DNA-Stränge lagen aufgrund der erhöhten Lipophilie über den Werten der Phosphorthioat-modifizierten Stränge. Im Falle der Phenylethyl-Modifikation konnte RNase H-Aktivität nachgewiesen werden.

### *Ribozyme und RNAi*

Ribozyme und das Konzept der RNA-Interferenz beruhen auf den katalytischen Eigenschaften von Ribonucleinsäuren. Die Mechanismen sowie ihre Vor- und Nachteile werden in *Kapitel 2 "Katalytische RNA"* ausführlich beschrieben.

### *Aptamer-Konzept*

Das Aptamer-Konzept beruht auf der Inhibierung von Proteinen durch Oligonucleotide. Die eingesetzten RNA-Einzelstränge bilden definierte dreidimensionale Strukturen aus und binden hochspezifisch und mit großer Affinität an ihre Zielstruktur. Durch *in vitro*-Selektionstechniken (SELEX) können hochaffine RNA-Aptamere aus kombinatorischen Bibliotheken entwickelt werden (Tuerk, 1990; Famulok, 1999). Der SELEX-Prozess kann dabei auf beinahe beliebige Ziel-Strukturen angewandt werden. Aptamere sind nur schwach immunogen und durchdringen Zellmembranen aufgrund ihrer Größe wesentlich besser als z.B. monoklonale Antikörper.

Aptamere, die den Eintritt des HI-Virus in die Zelle unterbinden, indem Hüllproteine inhibiert werden, haben den Vorteil, dass sie extrazellulär arbeiten. Ein erstes RNA-Aptamer, welches den HIV-1 Eintritt kompetitiv inhibiert, wurde kürzlich beschrieben (von Laer, 2004). Dieses bindet an die CCR5-Co-Rezeptor-Bindungsdomäne auf dem HIV-1 gp120 Hüllprotein. Eine interessante Entwicklung sind die sog. "Spiegelmer" (Klussmann, 2003). Diese Form der Aptamere besteht aus L-Nucleosiden. Dies führt zu einer extrem hohen Stabilität gegenüber Nucleasen, welche chirale Moleküle sind und nur Substrate in der korrekten chiralen Konformation, also RNA-Moleküle bestehend aus D-Nucleosiden, akzeptieren.

### 1.2.2 Wirkstoffe auf Nucleinsäure-Basis

Vor ca. 20 Jahren wurden die ersten Konzepte zu Therapien auf Nucleinsäure-Basis entwickelt. Der ersten Gentherapie-Studie 1990 gegen ADA Defizienz (Blaese, 1995) folgten in kurzer Zeit klinische Untersuchungen gegen verschiedenste Krankheiten auf dem Gebiet genetischer Defekte, viraler Infektionen oder als Tumorstatika. Die exogen applizierten Oligonucleotide müssen dabei für die optimale Wirkung verschiedene Kriterien wie Serumstabilität, gute Zellaufnahme, geringe Toxizität und geringe Kosten erfüllen. Hinzu kommen noch die Faktoren der Zugänglichkeit des Zielmoleküls, die Kolokalisation, die Verteilung im Organismus und die Pharmakokinetik. Um all diese Anforderungen zu erfüllen, wurden eine Reihe von Modifikationsmöglichkeiten an Oligonucleotiden untersucht.

#### *Chemische Modifikationen zur Erhöhung der Nucleasestabilität*

Die Instabilität von RNA im Serum ist auf die Präsenz der 2'-OH-Gruppe zurückzuführen. Von den intrazellulären Nucleasen ist vor allem die 3'-Exonuclease am Abbau der RNA beteiligt. Neben den bereits erwähnten Phosphorthioaten stehen heute eine Reihe 2'-modifizierter Nucleotide zur Verfügung (Wincott, 1995): 2'-Methoxy, 2'-Amino, 2'-Fluor, 2'-O-Methoxyethyl, 2'-O-Allyl und 2'-C-Allyl sind die gängigsten Modifikationen (Pieken, 1991; Paoletta, 1992; Beigelman, 1995; Usman, 1996). Auch der Übergang vom Phosphordiester-Rückgrat zu einem Peptid-Rückgrat (PNA, "*peptide nucleic acid*"; Corey, 2002) oder der Austausch des Zuckers gegen einen Morpholinrest (Summerton, 1999) führt zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Nucleasen. Sterisch gehinderte Konstrukte wie die LNA ("*locked nucleic acid*"), deren Ribose über die 2-Position verbrückt und somit konformationell fixiert vorliegt, sind zusätzlich in der Lage die RNase H zu aktivieren (Wengel, 1998; Leumann, 2002).

Die meisten chemischen Modifikationen an der 2'-Position führen zu einer geringeren Aktivität des Oligonucleotids. Dieser vermeintliche Nachteil wird jedoch durch die erhöhte Halbwertszeit des Oligonucleotides im Serum und die in vielen Fällen verbesserte Zellaufnahme wieder ausgeglichen. Die Kombination von 2'-Modifikationen in Oligonucleotiden mit partiellem Phosphorthioat-Rückgrat schließlich kann die Lebensdauer eines Ribozyms von wenigen Minuten auf Tage erhöhen.

Zusätzliche Informationen sind den nachfolgend aufgeführten Übersichtsartikeln zu entnehmen (Engels, 2000; Eckstein, 2000; de Mesmaeker, 1995; Uhlmann, 1990).

### *Membrandurchlässigkeit und Zellaufnahme*

Die Zellaufnahme von Oligonucleotiden kann durch einen aktiven Mechanismus wie der Rezeptor vermittelten Endozytose stattfinden oder durch passive Diffusion. Die Länge des Oligonucleotids ist dabei limitierend (Loke, 1989) und antiproportional zur intrazellulären Konzentration an Oligonucleotid. Die Überwindung der Lipiddoppelschicht der Zellmembran kann durch kationische Trägerlipide erleichtert werden und die intrazelluläre Verteilung kann verbessert werden. Das meist verwendete kationische Liposom ist Lipofektin<sup>®</sup>, eine Kombination aus einem Lipid und einem Cytofectin (Felgner, 1987). Neben diesen "*uptake enhancern*" werden auch Dendrimere, Nanopartikel und andere Systeme für den nichtviralen Transport von Oligonucleotiden getestet (Weber, 2000; Fattal, 1998).

Bestimmte Zelllinien, z.B. Eizellen des chinesischen Hamsters, nehmen chemisch modifizierte Oligonucleotide aufgrund ihrer besonders aktiven Membran gut auf (Mariani, 2000). Die Gründe hierfür müssen noch eingehend untersucht werden und könnten entscheidende Erkenntnisse für das Design von Oligonucleotiden liefern. Eine neue Methode die Zellaufnahme von Ribozymen zu verbessern führt zu Peptid-RNA-Chimären, bei denen spezifische Ribozyme mit zelltypischen Peptiden ligiert werden.

Die Verteilung innerhalb der Zelle ist oftmals ein limitierender Faktor für die Aktivität des Oligonucleotides. Diese liegen oft proteingebunden im Zytoplasma oder in bestimmte Zellstrukturen eingeschlossen vor, so dass sie zur Hybridisierung an die mRNA nicht mehr zur Verfügung stehen. Die verbesserte Kollokalisierung eines Oligonucleotids mit der Ziel-RNA wird durch endogene Transfektion ermöglicht, da hierbei ein Vektor z.B. das Ribozym direkt in der Zelle exprimiert wird (Rossi, 1999; Review: Sun, 1998). Die Verteilung von Oligonucleotiden wurde in verschiedenen Organismen wie Maus (Zhao, 1998), Affe (Henry, 1999) und Mensch (Séréni, 1999) eingehend untersucht. Die Akkumulation und die Stoffwechselprodukte von Oligonucleotiden sind vor allem in Niere, Leber und dem retikulärem Endothelialsystem zu beobachten (Desjardins, 1996).

Es sind bereits große Fortschritte bei der chemischen Modifikation von RNA hinsichtlich Serumstabilität und Zellaufnahme erreicht worden. Die Verwendung von RNA basierten Therapeutika wie Ribozymen ist bisher jedoch immer noch limitiert (Hartmann, 2003).

### *Ausbietung als Arzneimittel*

Bisher sind nur Antisense-Oligonucleotide als Arzneimittel zugelassen. Als erstes therapeutisches Oligonucleotid wurde 1998 Formiviren, ein 20 Basen langes Phosphorthioat modifiziertes Antisense-Oligodesoxynucleotid, für die Behandlung von Virostatika-refraktärer CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten von der FDA zugelassen (Grillone, 2001). Genasense<sup>®</sup>, welches in einer multizentrischen Phase III-Studie von Genta Inc. und Aventis S.A. untersucht wird, wird in Kombination mit der Chemotherapie gegen maligne Melanome angewendet und ist gegen bcl-2 gerichtet (Zaman, 2003). Erst vor wenigen Wochen sprach sich das Fachgremium der FDA (*U.S. Federal Drug Administration*) jedoch gegen eine Zulassung des Präparates aus. Dies wurde mit einer zu geringen Wirkung des Oligonucleotids im menschlichen Körper begründet. Bei "Resten-NG" handelt es sich um ein Morpholino-Oligonucleotid. *Tabelle 2* gibt eine Übersicht über den Oligonucleotid basierten Arzneimittelentwicklungen und die wichtigsten Wirkstoffkandidaten in klinischer Prüfung. Gem92 zur Behandlung von AIDS ist der erste Wirkstoffkandidat zur oralen Aufnahme von therapeutischen Oligonucleotiden.

Tabelle 2: Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme, die als Arzneimittel zugelassen oder in klinischer Prüfung sind

Indikation	Produkt	Firma	target	Status
<b>Antisense</b>				
CMV Retinitis	Formivirsin, Vitravene®	ISIS	CMV	zugelassen
Krebs	Genasense®	Genta Inc.	bcl-2	III (gestoppt)
Lungenkrebs	Affinitac	ISIS / Lilly	PKC- $\alpha$	III
Restenose	Resten-NG	AVI BioPharm	c-myc	III
NHL	G3139	ISIS	bcl-2	III
Morbus Crohn	Alicaforsen	ISIS	ICAM-1	III
Hepatitis C	Isis14803	ISIS	HCV	II
Eierstockkrebs	ISIS5132	ISIS	C-Raf	II
Bauchspeicheldrüsenkrebs	ISIS2503	ISIS	H-Ras	II
Asthma	EPI2010	EpiGenesis	Adenosin1-Rezeptor	II
Restenose	LR3280	Lynx	c-myc	II
AIDS	Gem92	Hybridon	HIV-1	II
<b>Ribozyme</b>				
HCV	Heptazyme	SIRNA	antiviral	gestoppt
Krebs	Angiozyme	SIRNA	VEGF-1	II
Krebs	Herzyme	SIRNA	HER2	I
AIDS		SIRNA	HIV-1	I / II
AIDS		City of Hope	HIV-1	I / II
AIDS		Gene Shears	HIV-1	I / II
HIV, HCV		Immusol	antiviral	I / II

Die präklinischen und klinischen Prüfungen von Ribozym basierten Arzneimitteln fokussierten zunächst auf AIDS und andere virale Infektionskrankheiten (Sun, 2000). Als Ziel-Regionen für Ribozyme wurden in Zellstudien u.a. auch N-ras (Scherr, 1997), Proteinkinase C (Sioud, 1998), HCV (Grillone, 2001) und der Dopamin D2-Rezeptor (Salmi, 2000) untersucht. Interessant ist, dass bei der überwiegenden Zahl an getesteten Ribozymen die Inhibierungsrate unabhängig von der Ziel-RNA und der verwendeten Zelllinie bei 51-77% lag (Engels, 2004). In den letzten Jahren wurden einige Phase I/II-Studien mit *trans*-schneidenden, exogen applizierten Ribozymen gestartet (Sullenger, 2002). Bei Herzzyme und Angiozyme der Firma SIRNA (vormals "Ribozyme Pharmaceuticals") handelt es sich um vielversprechende Wirkstoffkandidaten für die Krebstherapie, die derzeit in Phase I bzw. II getestet werden. Die klinischen Studien am dritten Ribozym von SIRNA, Heptazyme, wurden in Phase II beendet, da es an Patienten nur eine geringe antivirale Wirkung zeigte und bei einer Toxizitätsstudie ein Affe sein Augenlicht verlor.

Neben Antisense-Oligonucleotiden und Ribozymen befindet sich auch ein Aptamer in der Phase III der klinischen Prüfung. Die Inhibierung des VEGF-Rezeptors ("*vascular endothelial growth factor*") führt zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums durch eine reduzierte Vaskularisierung.

Bei der Therapie vieler viraler Infektionen stößt die Wissenschaft auf das Problem der Punktmutationen, durch die sich der Virus dem Immunsystem des Wirtes entzieht. Die Toleranz dieser Punktmutationen durch geeignet chemisch modifizierte Ribozyme am Beispiel des HI-Virus ist u.a. Gegenstand dieser Doktorarbeit.



# 2

## Katalytische RNA

Zwei der wichtigsten Voraussetzungen für das Leben von Organismen sind die Speicherung bzw. Weitergabe der genetischen Information sowie die katalytische Aktivität. Neben der allgemein bekannten enzymatischen Katalyse ist auch RNA in der Lage biologische Abläufe zu katalysieren. Es ist den Entdeckungen von Thomas Cech und Sidney Altman zu verdanken, dass katalytische Ribonucleinsäuren heute im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses stehen (Cech *et al.*, 1982; Altman *et al.*, 1983). Sie beobachteten erstmals, dass RNA in der Lage ist die Hydrolyse von RNA-Strängen zu katalysieren. Diese enzymatisch aktiven RNAs werden als Ribozyme bezeichnet. Das "Gruppe I Intron"-Ribozym, welches RNA spleißt und die benachbarten Exons ligiert, und die RNA-Untereinheit der RNase P, isoliert aus *E.coli*, wurden als erste Ribozyme identifiziert. Der Einfluss katalytisch aktiver RNAs ist bei vielen biologischen Prozessen zu beobachten und umfasst ein weites Gebiet. Neben der grundlegenden Unterscheidung zwischen der internen Spaltung und der Spaltung eines separaten RNA-Stranges ist eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen, Cofaktoren, Strukturen und Anwendungsgebiete bekannt. In den folgenden Unterkapiteln wird über die Grundlagen und aktuellsten Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Ribozyme und der RNA-Interferenz, einem Mechanismus zum gezielten Ausschalten von Genen, berichtet.

## 2.1 Ribozyme

Ribozyme sind aus RNA Pflanzenviroiden, z.B. dem *Tobacco ringspot*-Virus, oder aus kleinen RNA-Satelliten bekannt (Symons, 1992). Ihre selbst-spleißende Aktivität wird dabei im Replikationsmechanismus und zur Translationskontrolle verwendet. Das Herausschneiden der Introns aus der prä-rRNA ist eine mehrstufige Reaktion und beinhaltet neben der Katalyse des Spleißvorgangs auch eine Ligation. Aufgrund der natürlichen Funktion der Ribozyme, zu dem u.a. das Schneiden und Ligieren von cyclischen RNA Satellitplasmiden zählt, muss die katalysierte Reaktion kinetische nicht schnell ablaufen. Die Reaktionen müssen in diesen Fällen sehr präzise sein (McKay, 1999). Diese Spezifität ist durch die Substraterkennung mittels Watson-Crick-Basenpaarung gegeben. Die Spaltung des Phosphordiesters erfolgt bei Ribozymen in der Größenordnung von 1 pro Minute. Dies ist zwar langsam im Vergleich zu den klassischen Enzym katalysierten Reaktionen, jedoch sehr schnell in Bezug auf die Zeitskala des viralen Infektionszyclus. Im folgenden wird näher auf die unterschiedlichen Klassen von Ribozymen eingegangen. Dabei wird das Hammerhead-Ribozym in den Vordergrund gestellt, da es im Rahmen dieser Doktorarbeit eingehend untersucht wurde und für den Einsatz gegen Punktmutationen im HIV-Genom chemisch modifiziert wurde.

### 2.1.1 Die unterschiedlichen Ribozym-Klassen

Man unterteilt die verschiedenen Ribozyme zum einen nach ihrer Größe und zum anderen nach der Art der Spaltungsreaktion. Diese kann intern erfolgen, d.h. in einem Selbst-Spleißvorgang, bei dem sich die katalytisch aktive Struktur und die zu spaltende Sequenz auf einem Strang befinden (*cis*-Mechanismus). Beim externen Spaltvorgang sind das Ribozym und das Substrat zwei separate RNA-Stränge (*trans*-Mechanismus). Die interne Stranghydrolyse wird vor allem bei großen Ribozymen (>150 Nucleotide) beobachtet. Da die sog. kleinen Ribozyme (<150 Nucleotide) sehr gut charakterisiert sind und oft auf die für ihre katalytische Aktivität essentiellen Merkmale reduziert sind, werden sie vornehmlich für *trans*-Spaltungen eingesetzt.

Daraus resultiert ihr möglicher Einsatz als Therapeutika, da sie beliebig gegen fast alle mRNA-Sequenzen gerichtet werden können. Sie spalten den RNA-Substratstrang vornehmlich durch eine Umesterungsreaktion unter Bildung eines cyclischen Phosphordiesters; ihr Mechanismus ist daher ähnlich dem der Proteinribonucleasen (Doherty & Doudna, 2000). In nachstehender Aufzählung werden die verschiedenen Ribozyme vorgestellt:

<u>kleine Ribozyme</u>	<u>große Ribozyme</u>
Hammerhead	Gruppe I Intron
Hairpin	Gruppe II Intron
HDV	RNAse P Untereinheit
Neurospora VS	

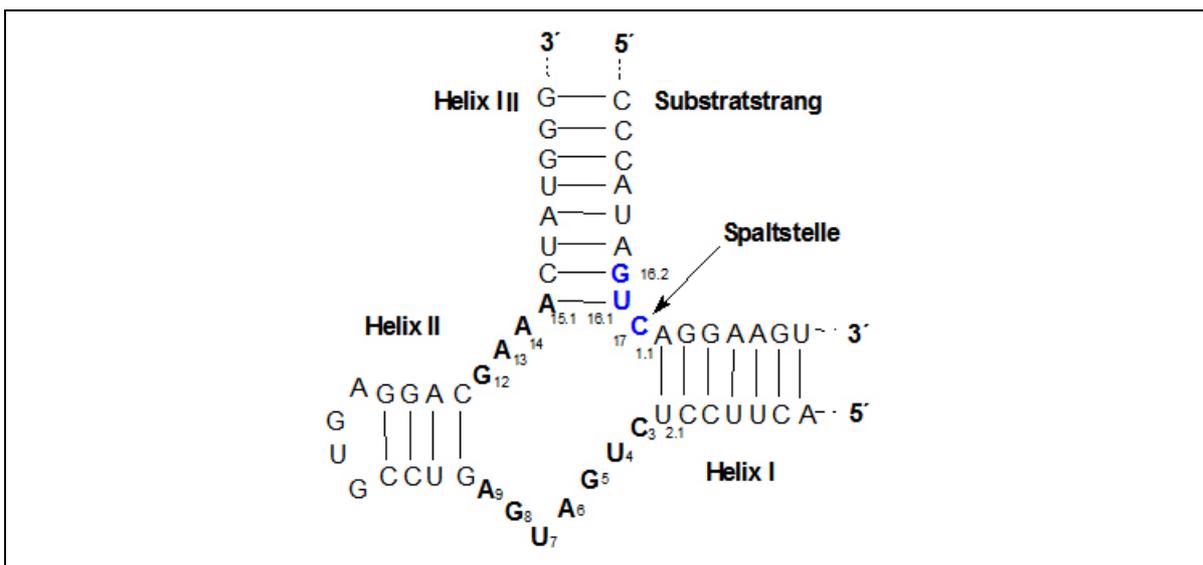
Das Gruppe I Intron-Ribozym verwendet wie die meisten anderen langkettigen Ribozyme externe Nucleophile zur Katalyse der RNA-Spaltung. Hierbei vermittelt die 3'-Hydroxygruppe eines Guanosin-Cofaktors die Hydrolyse der Substrat-RNA. Aufgrund des externen Nucleophils ist die Spaltungsreaktion nicht auf RNA beschränkt. Da die 2'-Hydroxygruppe der Substrat-RNA nicht essentiell für die Reaktion ist, kann z.B. das *Tetrahymena* Gruppe I Intron-Ribozym auch DNA-Stränge spalten (Cech, 1990; Joyce, 1990). Die RNAse P Untereinheit hydrolysiert spezifisch das Rückgrat von tRNA-Vorläufern ("*precursor*").

Im Gegensatz dazu verwenden kleine, nucleolytische Ribozyme die 2'-Hydroxygruppe des (zumeist separaten) Substratstranges als Nucleophil. An der Spaltstelle werden dabei ein cyclischer 2',3'-Phosphordiester und eine freie 5'-OH-Gruppe gebildet. Das Hairpin-Ribozym stellt in dieser Gruppe eine Besonderheit dar, da es in der Lage ist die gespaltenen RNA-Stränge wieder zu ligieren. Dieses Ribozym ist um eine Vier-Wege-Kreuzung organisiert. Das katalytische Zentrum ist dabei in den Sequenzen zweier jeweils ungepaarter Schleifen konserviert (Ferré-d'Amaré, 2003). Während die katalytisch aktive Konformation durch zweiwertige Metallionen induziert wird und die beiden Helices bei der Spaltung miteinander wechselwirken, wird für die Ligation die ungefaltete Kreuzung favorisiert (Lilley, 2001). Die Varkus Satellit (VS)-Ribozyme

bestehen aus fünf helicalen Bereichen und sind die größten nucleolytischen Ribozyme für die noch keine Kristallstruktur vorhanden ist (Lilley, 2004).

### 2.1.2 Das Hammerhead-Ribozym

Das Hammerhead-Ribozym ist das kleinste bekannte Ribozym und benötigt nur 25-50 Nucleotide, um die katalytische Aktivität zu gewährleisten. Es besitzt eine hochkonservierte Kernstruktur aus 11 Nucleotiden, die für die Katalyse essentiell sind (Kuimelis & McLaughlin, 1998). Diese Nucleotide sind in *Abbildung 9* hervorgehoben. In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen bilden sich bei Anlagerung des Substrates drei Helices um die Kernstruktur aus. Die  $Mg^{2+}$ -Ionen induzieren dabei die korrekte, katalytisch aktive Konformation. Die hochspezifische Anlagerung des RNA-Substratstranges beruht auf Watson-Crick-Basenpaarung. Die effektivste Spaltstelle im Substratstrang ist ein GUC-Triplett, oder allgemein ein Triplett der Form NUH (N = A, C, G, U; H = A, C, U), an dessen 3'-Ende die Spaltung stattfindet. Die Erkennungssequenz NUH kehrt in genomischen Nucleinsäuresequenzen statistisch alle 100 Basen wieder. Die Länge und Sequenz der Helix II ist unter *in vitro*-Bedingungen nicht essentiell (Eckstein, 2001).



*Abbildung 9: Sekundärstruktur des Hammerhead-Ribozyms mit angelagertem Substratstrang. Das katalytische Zentrum ist hervorgehoben. Zur Nummerierung siehe Hertel, 1992.*

### Struktur und Faltung des Hammerhead-Ribozyms

Die RNA-Faltungsmechanismen bilden die Grundlage für das Verständnis der RNA-Katalyse und sind stark von der Konzentration an Metallkationen abhängig. Das Hammerhead-Ribozym unterliegt dabei wie alle kleinen Ribozyme einem sehr präzisen, Ionen induzierten Faltungsprozess. Man unterscheidet dabei zwischen einer diffusen Anordnung von  $M^{2+}$ -Ionen in der Umgebung des polyanionischen RNA-Stranges und den chelatierenden Ionen, die über elektrostatische Wechselwirkungen direkten Kontakt zur Bindungsstelle haben (Draper, 2004). Der energetische Aufwand liegt für die chelatierenden Ionen in der Verdrängung der Wassermoleküle der Solvathülle und in der Abstoßung durch die anwesenden, ungeordneten Ionen. Während die diffuse Anordnung der Ionen an der Oberfläche des RNA-Stranges ausschlaggebend für die Ausbildung der allgemeinen RNA-Struktur ist, sind die chelatierenden Ionen essentiell für die Katalyse.

Die Faltung des Hammerhead-Ribozyms in die katalytisch aktive Konformation erfolgt durch einen zweistufigen Übergang. Es bildet sich durch Anlagerung des ersten Ions an A9 zunächst die coaxiale Anordnung der Helix II und III aus (Abbildung 10). Dieses auch als "Domäne 2" bezeichnete Tertiärstrukturelement stabilisiert das Hammerhead-Ribozym (Lilley, 2000). Der wichtigste energetische Beitrag sind dabei die Basenstapelungswechselwirkungen (" $\pi$ -stacking"). Die Organisation von Verbindungsstellen durch coaxiale Stapelung wird oft durch die Bindung zweiwertiger Metallkationen in der Nähe der Stapelstelle erreicht (Batey, 1999; Saenger, 1984; Shen, 1994; Batey, 1998).

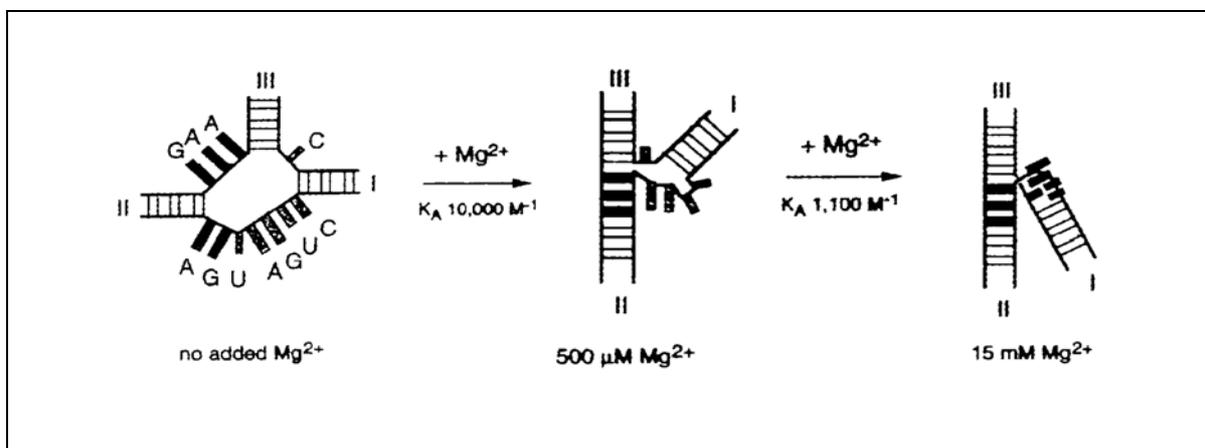


Abbildung 10: Schematische Darstellung des zweistufigen Faltungsprozesses des Hammerhead-Ribozyms (Lilley, 2000)

Das zweite Magnesium-Ion bindet direkt im katalytischen Zentrum an den Nucleotiden C3 bis A6 und generiert so die "Domäne 1" (Knoll, 1997). Diese Bindungstasche liegt direkt unter dem 3'-Phosphat des Nucleosids C17, also der Spaltstelle des Substratstranges.

Die globale Konformationsänderung des Hammerhead-Ribozym bei zunehmender Konzentration an Magnesium-Ionen ist in *Abbildung 10* dargestellt. Die Helices stellen in der katalytischen Konformation eine Y-Form mit einem spitzen Winkel zwischen Helix I und II dar.

Der Faltungsmechanismus des Hammerhead-Ribozyms wurde anhand von Kristallstrukturen (Pley, 1994; Scott, 1995), mit Hilfe der FRET-Fluoreszenzanalyse (Tuschl, 1994; Bassi, 1997) und durch Kryo-Experimente (Scott, 1996) analysiert. Die Beteiligung von Magnesium-Ionen an der Katalyse des Hammerhead-Ribozyms konnte so geklärt werden. Durch Koordination des  $Mg^{2+}$ -Ions an das Nucleophil (2'-OH von C17) wird die Deprotonierung der Hydroxygruppe erleichtert (Dahm, 1993). Die Stabilisierung des trigonal-bipyramidalen Übergangszustandes erfolgt durch direkte Koordination an die pentavalente, an der Spaltung beteiligte Phosphatgruppe (Koizumi, 1991; Scott, 1996). Ob das 5'-Sauerstoffatom der Abgangsgruppe ebenfalls durch ein Magnesium-Ion stabilisiert wird, ist noch ungeklärt (Doherty, 2000).

Die Kristallstruktur des Hammerhead-Ribozym (*Abbildung 11*) wurde u.a. anhand eines inaktiven Ribozyms gelöst. An dessen Spaltstelle war eine 2'-O-Methyl-Funktion eingebaut, um zu gewährleisten, dass das Ribozym in der katalytisch aktiven Konformation kristallisiert, ohne jedoch die Substratspaltung zu induzieren. Es stellte sich heraus, dass die Kristallstruktur die gleiche Konformation offenbart wie sie in Lösung bei  $>10$  mM  $Mg^{2+}$  vorliegt (Bassi, 1997; Tuschl, 1994).

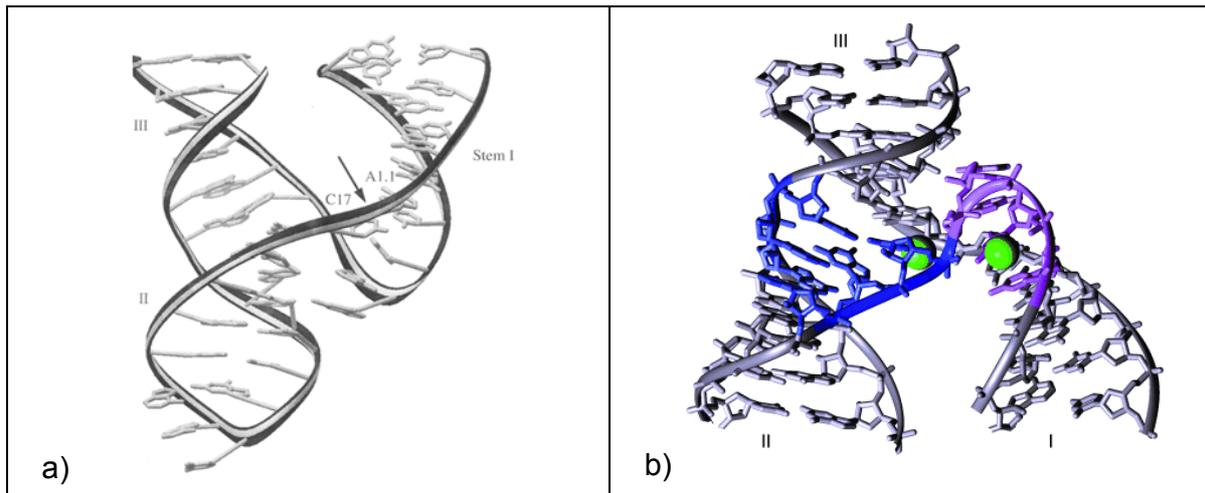


Abbildung 11: Kristallstruktur des Hammerhead-Ribozyms a) ohne und b) mit  $Mg^{2+}$ -Bindungsstellen (Hammann, 2002)

### Mechanismus der katalytischen Spaltung

Die *trans*-spaltenden Hammerhead-Ribozyme sind in der Lage fast jede beliebige Sequenz zu schneiden und können unter Substratüberschuss-Bedingungen ("*multiple turnover*") eingesetzt werden. Ihre katalytische Aktivität resultiert dabei aus der korrekten, durch  $Mg^{2+}$ -Ionen induzierten Faltung. Dabei sind die Helices II und III durch coaxiale Stapelung nahezu übereinander angeordnet. Dies ermöglicht den *inline*-Angriff des Nucleophils auf die Phosphatgruppe des Cytosins 17. Die Koordination von  $Mg^{2+}$ -Ionen unterstützt dabei vermutlich die allg. Säure-Base-Katalyse durch anwesende Wasser-Moleküle (Olivanen, 1998; Perreault, 1997). Der Mechanismus der Spaltung ist jedoch bis heute nicht exakt geklärt. Die Erleichterung der Deprotonierung der 2'-Hydroxygruppe des Nucleosids C17 führt zum nucleophilen Angriff auf das 3'-Phosphoratom. Es handelt sich um eine  $S_N2$ -Reaktion unter Inversion des Reaktionszentrums. Im Übergangszustand (Abbildung 12) befinden sich das 2'-Sauerstoffatom, der 3'-Phosphor und der 5'-Sauerstoff der Abgangsgruppe in einer colinearen Position. Diese Störung der lokalen RNA-Struktur beschleunigt die Hydrolyse des Übergangszustandes (Karplus, 1994). Daraus resultiert ein cyclischer 2',3'-Phosphordiester und eine primäre 5'-OH-Funktion des nächsten Nucleosids.

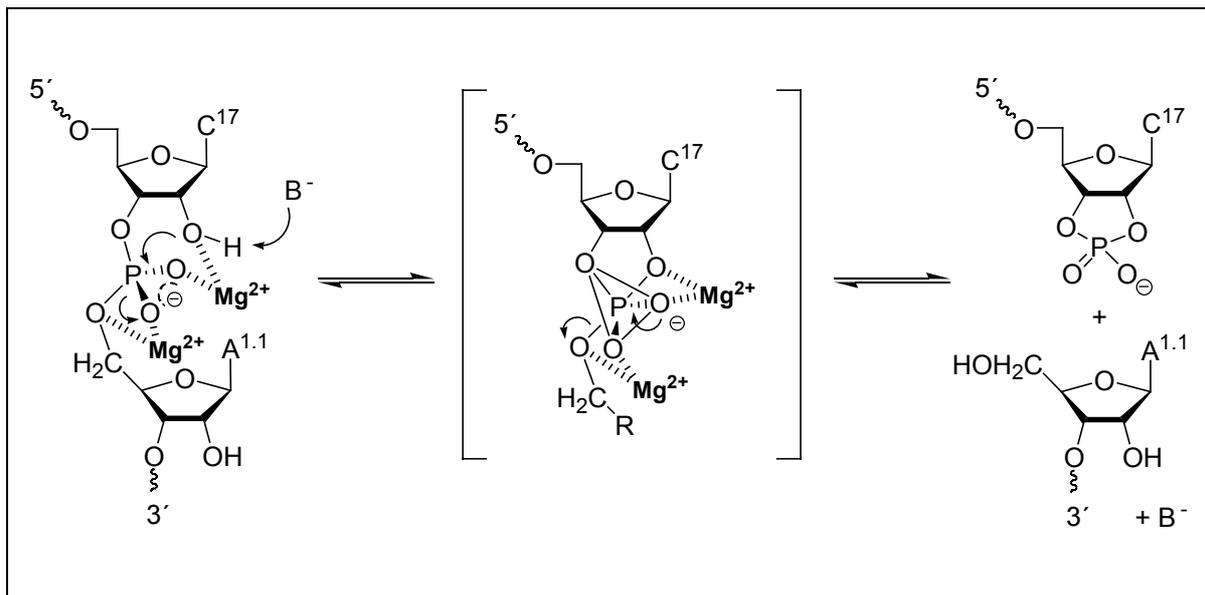


Abbildung 12: Mechanistische Betrachtung der RNA-Spaltung durch das Hammerhead-Ribozym

Die Spaltung der RNA-Substrate folgt dabei einer Michaelis-Menten-Kinetik wie sie von den klassischen Enzymreaktionen bekannt ist. Die Assoziation des Substrates an die komplementären Ribozymarme bewirkt die bereits diskutierte Faltung des Ribozyms. Nach Spaltung des Stranges am 3'-Ende des NUH-Triplets erfolgt die Dissoziation der Spaltprodukte vom Ribozym (Abbildung 13). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist die Spaltung der 3'-P-5'-O-Bindung (Zhou, 1998). Die Katalyse von Hammerhead-Ribozymen kann durch verschiedene Faktoren beschleunigt werden (Burgin, 1996). Eine effizientere Anlagerung des Substrates, z.B., bewirkt die Modulation der Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  (Herschlag, 1994). Eine schnellere Dissoziation der Spaltprodukte (Hendry & McCall, 1995) erhöht zusätzlich den Umsatz ("turnover") des Ribozyms ( $k_{cat}$ ).

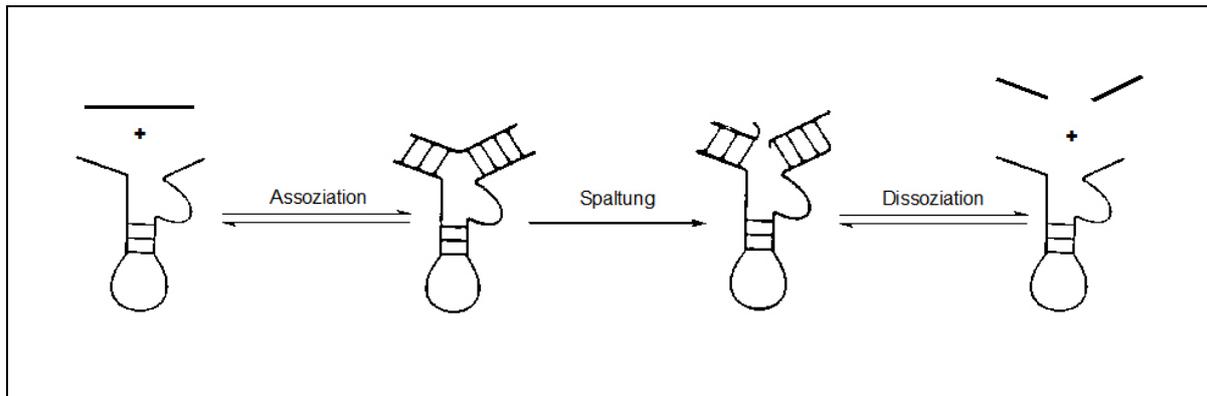


Abbildung 13: Schema der durch das Hammerhead-Ribozym katalysierten Spaltungsreaktion

Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  entspricht bei kleinen Ribozymen der Dissoziationskonstante des Ribozym-Substrat-Komplexes. Mit steigender Länge der Ribozymarme (>6 Nucleotide) und damit einhergehender erhöhter Spezifität des Ribozyms und Stabilität des Ribozym-Substrat-Komplexes sinkt die katalytische Geschwindigkeitskonstante  $k_{cat}$  drastisch (Thompson, 1996).

Erst vor kurzem entdeckten Khvorova et al., dass das minimale Motiv für das Hammerhead-Ribozym aus *Abbildung 9* nur für die kinetischen *in vitro*-Analysen bei  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen von  $\geq 10$  mM geeignet ist. Die Reduktion des Hammerhead-Ribozyms für mechanistische Studien, zur besseren Zellaufnahme und zur preiswerteren Synthese führte zur Eliminierung wichtiger Sequenzabschnitte außerhalb des katalytischen Zentrums. Diese Strukturelemente ermöglichen durch tertiäre Wechselwirkungen jedoch die optimale intrazelluläre Aktivität. Die Loop-Loop-Wechselwirkungen zwischen Helix I und II sind für die katalytische Effizienz unter physiologischen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen (100  $\mu$ M statt 10 mM) notwendig und konnten durch *Modelling*-Experimente und Mutationsanalysen bestätigt werden.

## 2.2 RNA-Interferenz

Unter RNA-Interferenz versteht man die gezielte Zerstörung von mRNA-Sequenzen durch kurze RNA-Duplexe. Die Grundlage für dieses Konzept liegt in der Beobachtung, dass die Injektion von langer, doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Nematoden *C. elegans* zu einer spezifischen Inhibierung der Gene führt, die zur verabreichten dsRNA homolog sind (Fire, Mello, 1998). Die doppelsträngige, 500-1500 bp lange RNA wird in der Zelle durch das sog. Dicer-Enzym in 19-23 nt lange RNA-Duplexe geschnitten. Das Dicer-Enzym ist eine spezifische Endonuclease der RNase III- Familie (Mondal, 2003). Die kurzen RNA-Duplexe, sog. siRNAs ("*small interfering RNA*") sind der Grund für den Sequenz spezifischen Abbau der mRNA (Elbashir, 2001). Sie werden durch eine ATP-abhängige Kinase am 5'-Ende phosphoryliert und mittels einer Helicase entwunden. Sowohl der *sense*- als auch der *antisense*-Strang werden in den RISC ("*RNA induced silencing complex*") aufgenommen (Hannon, 2002). Dieser Enzym-Komplex lagert sich mit dem siRNA-Einzelstrang an den komplementären mRNA-Sequenzabschnitt an (*Abbildung 14*). Dadurch wird zum einen die mRNA blockiert und der Eintritt in das Ribosom inhibiert. Zum anderen wird die mRNA durch die Nucleaseaktivität des RISC-Komplexes irreversibel gespalten (Elbashir, 2001; Micura, 2002). Die Spaltung erfolgt 10 Nucleotide vom 3'-Ende des siRNA-Stranges entfernt (Tuschl, 2001; Bartel, 2004). Nach Dissoziation des Komplexes von der mRNA steht die siRNA für eine erneute Spaltung zur Verfügung. Die RNA-Interferenz ist ein katalytischer Prozess und kann bis zu Faktor 30 erreichen (Sijen, 2001).

Da lange, doppelsträngige RNA in menschlichen Zellen eine unspezifische Immunantwort auslöst und diese Interferonausschüttung toxisch für die Zellen ist, ließ sich das Prinzip der RNA-Interferenz zunächst nicht auf den Menschen übertragen. Thomas Tuschl stellte fest, dass die Injektion chemisch synthetisierter siRNAs hingegen keine Immunantwort auslöst und dass siRNAs trotzdem die gewünschte Wirkung erzielen (Elbashir, 2001). Damit stellt die RNA-Interferenz eine simple und effektive Methode dar, die Funktion bestimmter Proteine zu analysieren ("*functional genomics*"). Dies konnte bereits in Zebrafischen (Wargelius, 1999), in der Fruchtfliege

*D. melanogaster* (Misquitta, 1999) und in *C. elegans* (Tuschl, 2003) erfolgreich gezeigt werden.

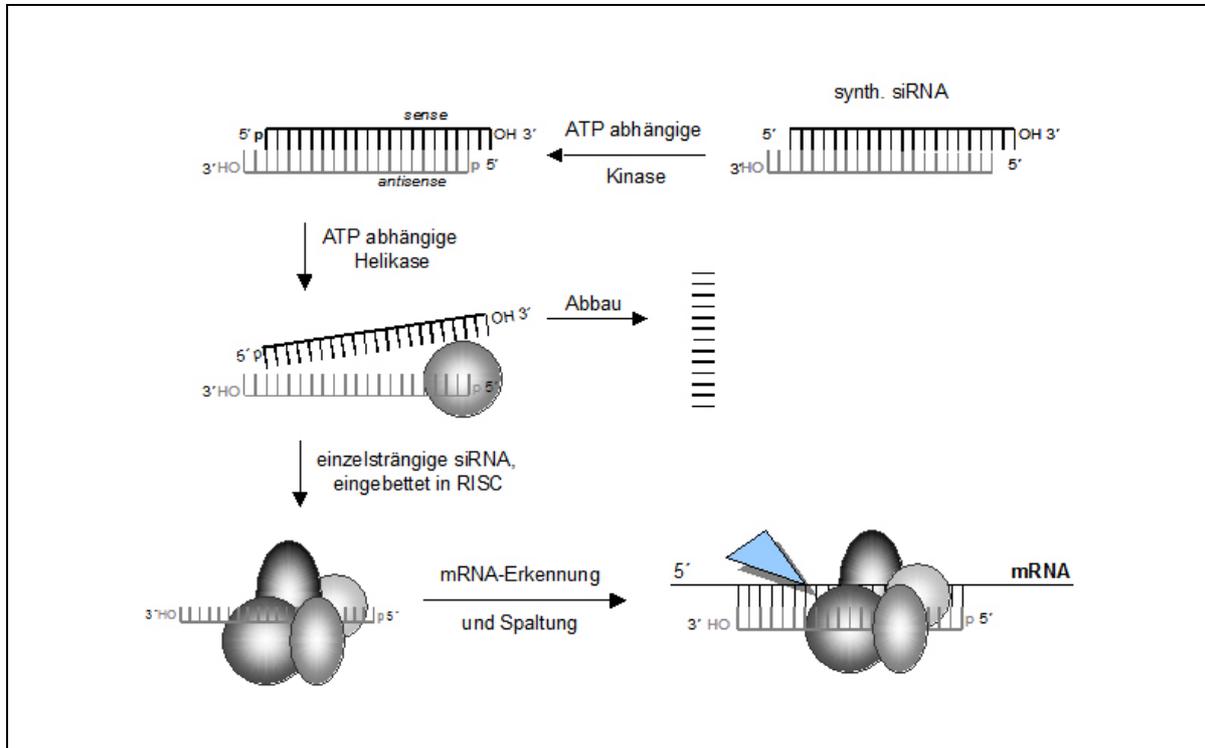


Abbildung 14: Mechanismus der RNA-Interferenz (Schwarz, 2003)

Bei der Anwendung chemisch synthetisierter siRNAs haben sich Duplexe mit 2' 3'-TT-Überhängen als überlegen erwiesen (Tuschl, 2003). Generell werden Modifikationen im *sense*-Strang toleriert, während Modifikationen im *antisense*-Strang zu hohem Verlust an katalytischer Aktivität führen. Dies konnte anhand der Modifizierung mit 2'-Aminouridin und 5-Iod-Uridin gezeigt werden (Parrish, 2000). Auch die Erhaltung der A-Helix-Geometrie ist ein wichtiger Aspekt für die Effizienz synthetischer siRNAs. Ein großer Vorteil der RNA-Interferenz ist, dass die injizierten siRNAs mehrere Zellteilungen lang im Serum stabil sind. Für den therapeutischen Einsatz werden Konzentrationen von 1-200 nM getestet. Bereits für das Jahr 2005 sind die ersten klinischen Studien für einen Wirkstoff auf siRNA-Basis vorgesehen.

Zur Gestaltung hocheffizienter siRNAs müssen einige Punkte beachtet werden (Prydz, 2004; Frantz, 2004). Neben einem G/C-Gehalt von 30-50%, um einen stabilen siRNA/mRNA-Duplex zu gewährleisten, sollten siRNAs keine internen komplementären Sequenzen haben, um Sekundärstrukturbildungen zu verhindern. Es hat sich herausgestellt, dass eine gewisse Konsensus-Sequenz existiert, die hoch

aktive siRNAs garantieren, sofern die mRNA gut zugänglich ist. Als Konsensus-Sequenz haben sich folgende Positionen des *sense*-Stranges erwiesen: Pos. 3: A; Pos. 13: G; Pos. 19: A; Pos. 10: U. An der Spaltstelle wird ein U bevorzugt (Pos. 10), während die restlichen Positionen eine verbesserte Aufnahme in den RISC bewirken (Reynolds, 2004).

Die Toleranz von chemischen Modifikationen in siRNAs wurde u.a. an einem Faktor, der die Blutgerinnung initiiert, getestet (Amarzguioui, 2003). Neben Mutationen wurde auch die Empfindlichkeit auf 2'-OMe, 2'-OAllyl und Phosphorthioate untersucht. Es stellte sich heraus, dass chemische Modifikationen in siRNA-Strängen toleriert werden, wobei jedoch die Position eine entscheidende Rolle spielt. Veränderungen in der Strangmitte wirken sich nicht so stark auf die Aktivität der siRNAs aus wie Modifikationen am 5'-Ende der siRNAs. Bei Modifikationen am 5'-Ende ist unter Umständen die Phosphorylierung durch die ATP-abhängige Kinase nicht so effizient wie bei unmodifizierten Nucleotiden (Nykänen, 2001). Zudem ist das 5'-Ende des in den RISC eintretenden Stranges besonders sensibel, da dieser spezifische Wechselwirkungen mit dem Enzymkomplex eingeht, die gestört werden könnten.

Auch die thermodynamische Stabilität der Duplex-Enden steuert die Aufnahme in den RISC-Komplex. Durch die Helicase wird das A/U-reiche, thermodynamisch instabilere Ende bevorzugt aufgeschmolzen. Um eine möglichst effektive Aufnahme des *antisense*-Stranges zu bewirken, muss also das 5'-Ende dieses Stranges im Duplex möglichst schwach gebunden sein (Frantz, 2004). Dieses Prinzip der asymmetrischen Strangselektion wurde auch im Rahmen dieser Doktorarbeit aufgegriffen.

# 3

## Artifizielle Nucleoside – universelle Basen und 2'-Modifikationen

### 3.1 Universelle Nucleobasen

Universelle Basen sind Nucleosidanaloga, die bei der Basenpaarung nicht zwischen den vier natürlichen Nucleosiden diskriminieren (Loakes, 2001). Neben dieser primären Definition werden noch weitere, sowohl chemische als auch biologische Anforderungen gestellt:

- geringe Destabilisierung des gebildeten Duplex
- die Eigenschaft, als Templat für die Polymersase zu dienen
- keine Inhibierung der Polymerase-Aktivität beim Einbau als Triphosphat

Bis heute wurde keine universelle Base entwickelt, die alle Eigenschaften erfüllt. Jedoch sind einige artifizielle Nucleoside dargestellt worden, die ein paar der aufgeführten Punkte sehr gut erfüllen (Loakes, 2001). Eine Auswahl wird im folgenden kurz vorgestellt.

Universelle Basen sollen die natürlichen Nucleobasen imitieren ohne jedoch spezifischen Wechselwirkungen im Duplex einzugehen. Dies wird bis heute am besten durch isostere Strukturen mit hydrophoben Basen erreicht. Auf diese Weise kann der Einfluss der Wasserstoffbrückenbindungen auf die Struktur komplexer Biomoleküle untersucht werden. Ihre Eigenschaften als Enzymsubstrate oder Template in Polymerase-Reaktionen sind ebenfalls von wissenschaftlichem Interesse.

Die meisten veröffentlichten Strukturen, die als universelle Basen untersucht wurden, sind DNA-Analoga mit erhöhter Hydrophobizität. Dies hat seinen Ursprung darin, dass universelle Basen zunächst in "*Primern*" für die PCR und der Sequenzierung verwendet wurden. Da die RNA-Polymerase jedoch wesentlich toleranter bei der Inkorporation modifizierter Nucleoside ist, verwundert es, dass die Eigenschaften der Ribonucleoside bis jetzt nicht eingehender untersucht wurden. Ihre geringe Genauigkeit erhöht die Wahrscheinlichkeit des Einbaus als Triphosphat bzw. den Einbau aller vier natürlichen Nucleobasen gegenüber der universellen Base.

Da RNA-Duplexe vor allem durch Basenstapelung und Wasserstoffbrücken stabilisiert werden ( $\approx 1$  kcal/mol pro Bp) und die Erkennung von Nucleosiden in erster Linie vom Akzeptor-Donor-Muster für die H-Brückenbildung abhängt, wurden als universelle Basen zunächst hydrophobe Moleküle entwickelt, welche die Basenstapelungseffekte erhöhen, jedoch nicht auf die Wasserstoffbrückenbildung angewiesen sind. Damit wird ermöglicht, dass der Duplex weiterhin stabilisiert, die Basenpaarung jedoch unspezifischer wird.

Eine natürlich vorkommende annähernd universelle Base ist Hypoxanthin (Ohtsuka, 1985; Takahashi, 1985). Trotz ihrer suboptimalen Hybridisierungseigenschaften wurde die Nucleobase erstmals als universelle Base eingehend untersucht und derivatisiert. Die große Schwankungsbreite in den  $T_m$ -Werten konnte jedoch nicht unterbunden werden (Martin, 1985; Kamayaha, 1992). 3-Nitropyrrol **1** (*Abbildung 15*) hingegen diskriminiert nicht zwischen den vier natürlichen Nucleobasen (Bergstrom, 1993&1995; Nichols, 1994). Die Erhöhung der Basenstapelungseigenschaften werden durch die Nitrogruppe ermöglicht, die das aromatische  $\pi$ -System des Pyrrolringes polarisiert. Jedoch wird trotz dieses Einflusses eine starke Destabilisierung des Duplexes beobachtet. Von den substituierten Nitroindolen hat sich 5-Nitroindol **2** als sehr gute universelle Base erwiesen (Loakes, 1994&1995; Vallone, 1999). Die Destabilisierung des modifizierten, selbstkomplementären "Dickerson"-Dodecamers

5'-d(CGC **2AA** TTN GCG)-3' ist mit  $\Delta\Delta G = 0,4$  kcal/mol sehr gering (Bergstrom, 1997). Dass nicht nur elektronische, sondern auch sterische Effekte eine entscheidende Rolle spielen, ist am Beispiel des 4-Nitrobenzimidazols **3** zu erkennen. Die zu Adenosin isostere Nucleobase bevorzugt bei der Duplexbildung ein Thymidin als Partner. Dasselbe Ergebnis liefert auch 4-Aminobenzimidazol **4**, welches formal Elektronen in das  $\pi$ -System schiebt (Seela, 1995&1996).

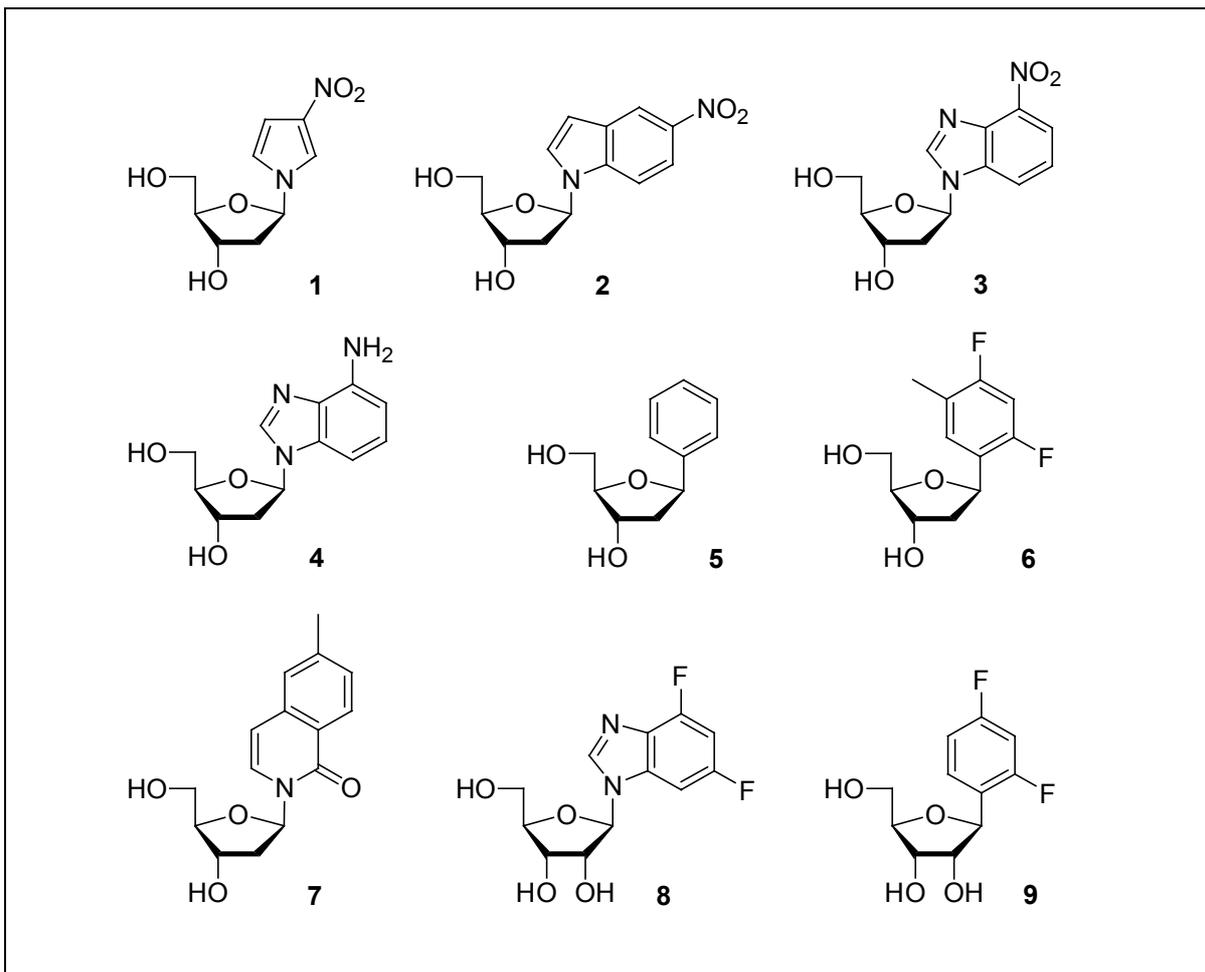


Abbildung 15: Universelle Nucleobasen (Loakes, 2001; Kool, 1994; Parsch, 2000)

Dass ein Phenylring alleine mit seinem aromatischen System keinen zusätzlichen Beitrag zum "Stacking" leistet, zeigt das Beispiel von 1,2-Didesoxy-1-phenyl- $\beta$ -D-ribofuranose **5**. Diese Modifikation bewirkt eine ausgeprägte Destabilisierung sowohl des DNA- (Millican, 1984), als auch -in der Ribonucleotidform- des RNA-Duplexes (Parsch, 2000).

Das bestmögliche sterische Mimetikum für Thymidin ist 1',2'-Didesoxy-1'-(2,4-difluortoluol-5-yl)- $\beta$ -D-ribofuranose **6** (Kool, 1994). Dieses deutlich hydrophobere

Nucleosid besitzt eine nahezu identische Kristallstruktur wie Thymidin. 2D-NMR-Untersuchungen und Moleküldynamik-Simulationen bestätigen, dass bei Einbau in ein Oligonucleotid die DNA-Doppelhelixstruktur durch die Modifikation nicht gestört wird (Guckian, 1998). Dennoch fällt der  $T_m$ -Wert des Duplexes um 14-19°C. Die Ergebnisse belegen, dass neben der räumlichen Anordnung und den Wasserstoffbrückenbindungen mehrere physikalische Effekte an der Stabilisierung eines modifizierten Oligonucleotid-Duplexes beteiligt sind. Dies führte zu breit angelegten Untersuchungen an hydrophoben Nucleosidanaloga. Neben 1,2-Didesoxy-1-phenyl- $\beta$ -D-ribofuranose **5** wurden auch Naphthalin-, Phenanthren- und Pyren-Substituenten getestet (Kool, 2002). Physikalische Parameter wie der Verteilungskoeffizient  $\log P$  aus Octanol/Wasser, die Polarisierbarkeit und das Dipolmoment wurden bestimmt; auch die Oberflächenstrukturen wurden berücksichtigt. Mit Ausnahme der Feststellung, dass der "dangling end"-Effekt mit zunehmender Ringgröße ansteigt, konnte jedoch keine Korrelation zwischen den einzelnen physikalischen Eigenschaften der untersuchten Verbindungen und der Basenstapelungsfähigkeit gefunden werden (Schweitzer, 1994; Guckian, 2000; Matray, 1998; Kool, 2000). Werden neuartige Basenpaare aus zwei hydrophoben Nucleosiden geformt, so kommt es zu einer Stabilisierung um bis zu 5 kcal/mol.

Tabelle 3: Einfluss der universellen Nucleobasen auf die Schmelztemperaturen von Duplexen

Universelle Nucleobase	Reduktion der Stabilität $\Delta T_m$ [°C]	Schwankungsbreite der $T_m$ -Werte [°C]
<b>1</b>	8 - 11	3
<b>2</b>	4 - 7	3
<b>6</b>	14 - 19	5
<b>7</b>	3 - 5	2
<b>8</b>	9 - 10	1
<b>9</b>	10 - 10,5	0,5

5-Methyl-isocarbostyryl **7** (Berger, 2000) besitzt durch das zweite aromatische Ringsystem eine erhöhte Lipophilie und zeigt verbesserte Basenstapelungseigenschaften, die sich in einer geringen Destabilisierung des Duplex äußert. Zudem bildet diese Nucleobase mit allen vier natürlichen Nucleosiden ähnlich stabile Basenpaare (*Tabelle 3*).

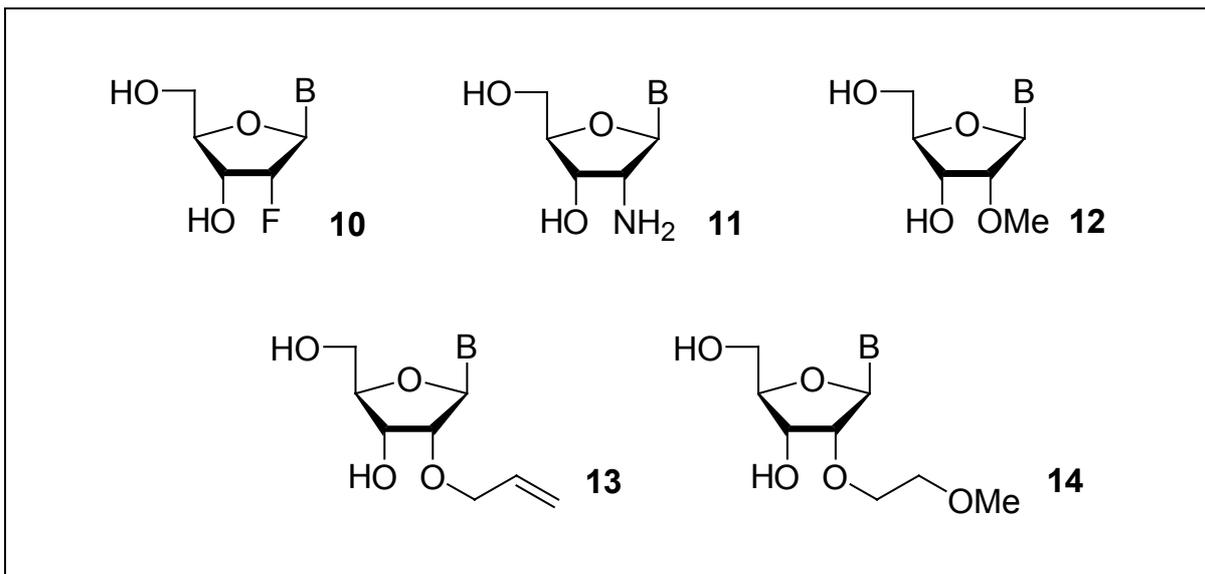
Die fluorierten Benzimidazol- und Benzolnucleoside **8** und **9** zeigen die mit Abstand geringste Schwankung der  $T_m$ -Werte ( $1^\circ\text{C}$  bzw.  $0,5^\circ\text{C}$ ). Aufgrund der hydrophoben Natur dieser Nucleobasen ( $\log P$  **8**: 4,23;  $\log P$  **9**: 1,68;  $\log P$  U: 0,02) und der daraus resultierenden geringeren Solvatation ergibt sich eine Destabilisierung der Duplexe. Bei diesen fluorierten Benzimidazol- und Benzolnucleosiden ist noch ein zusätzlicher Effekt zu beobachten (Parsch, 2002): Bilden die beiden Nucleoside ein Basenpaar, ergibt sich ein um 0,6 kcal/mol stabilerer Duplex als durch die Berechnungen der einzelnen Beiträge. Diese zusätzliche Stabilisierung könnte einer F...H-Wasserstoffbrücke zugeschrieben werden. Diese konnte auch in der Kristallstruktur von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** nachgewiesen werden (Bats, 2000).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die beiden Nucleoside **8** und **9** als Grundlage für weitere Untersuchungen verwendet. Die Destabilisierung des Duplex sollte dabei durch elektrostatische Wechselwirkungen einer protoniert vorliegenden Aminoalkylgruppe an der 2'-Position unterbunden werden. Die Nucleoside **8** und **9** wurden zudem auf ihre Eigenschaften als universelle Basen im biologischen Sinne getestet. Dazu wurden sowohl die Triphosphate synthetisiert und der Einbau mittels einer RNA-Polymerase getestet.

### 3.2 2'-Modifizierte Nucleoside

2'-Modifizierte Nucleoside sind aus vielen Gründen wissenschaftlich und biologisch interessante Moleküle. Da die 2'-Hydroxygruppe den Hauptunterschied zwischen DNA und RNA darstellt, können Modifikationen an dieser Position weitreichende Einflüsse auf die chemische Stabilität und die biologische Aktivität der Oligonucleotide haben. Die Substitution der 2'-OH-Funktion führt zum einen zu einer deutlich erhöhten Resistenz des Oligonucleotides gegenüber Nucleasen, zum anderen kann die Stabilität von Duplexen und Triplexen dadurch gezielt moduliert werden. Das Einführen neuer Funktionalitäten und die daraus resultierende Möglichkeit zur Kupplung von anderen Molekülen (Farbstoffe, Peptide) oder zur Verzweigung der Struktur (dendritische Strukturen) eröffnet ein ganzes Gebiet neuartiger Anwendungsmöglichkeiten (Kachalova, 2000).

Die klassische Anwendung 2'-modifizierter Nucleoside ist die Erhöhung der Stabilität von RNA im Serum. Hierfür haben sich die in *Abbildung 16* aufgeführten Modifikationen etabliert: 2'-Fluor- **10** (Heidenreich, 1994), 2'-Amino- **11** (Heidenreich, 1993), 2'-O-Methyl- **12**, 2'-O-Allyl- **13**, 2'-O-Methoxyethyl- **14** (Scherr, 1997).



*Abbildung 16: Gebräuchlichste 2'-Modifikationen zur Erhöhung der Nucleasestabilität; B = Nucleobase*

### 3.2.1 Synthetischer Zugang zu 2'-modifizierten Nucleosiden

Zur Synthese 2'-modifizierter Nucleoside gibt es zwei wichtige Synthesewege: Die erste Synthesestrategie startet bei der Ribose und liefert nach Alkylierung einen 2'-modifizierten Zucker **15**, der anschließend mit gängigen Techniken, z.B. in einer Glycosilierungsreaktion nach *Vorbrüggen*, zum Nucleosid **16** umgesetzt wird (Martin, 2003). Die effiziente Darstellung der dafür benötigten modifizierten Zucker wurde schon früh beschrieben (Imbach, 1982). Das Verhältnis der entstehenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nucleoside hängt dabei von der verwendeten Glycosilierungsmethode und den Edukten ab. Die zweite Methode ist die direkte Alkylierung des geeignet geschützten Nucleosids **18** (siehe *Abbildung 17*). Diese geht von den Nucleosiden **17** aus, welche im Falle von modifizierten Nucleobasen zuvor glycosiliert wurden (Legorburu, 1999). Die modifizierten Nucleoside können zum Phosphoramidit umgesetzt und leicht in ein Oligonucleotid eingebaut werden. Werden funktionelle Gruppen an der 2'-Position eingeführt, so ist auch eine weitere postsynthetische Derivatisierung möglich.

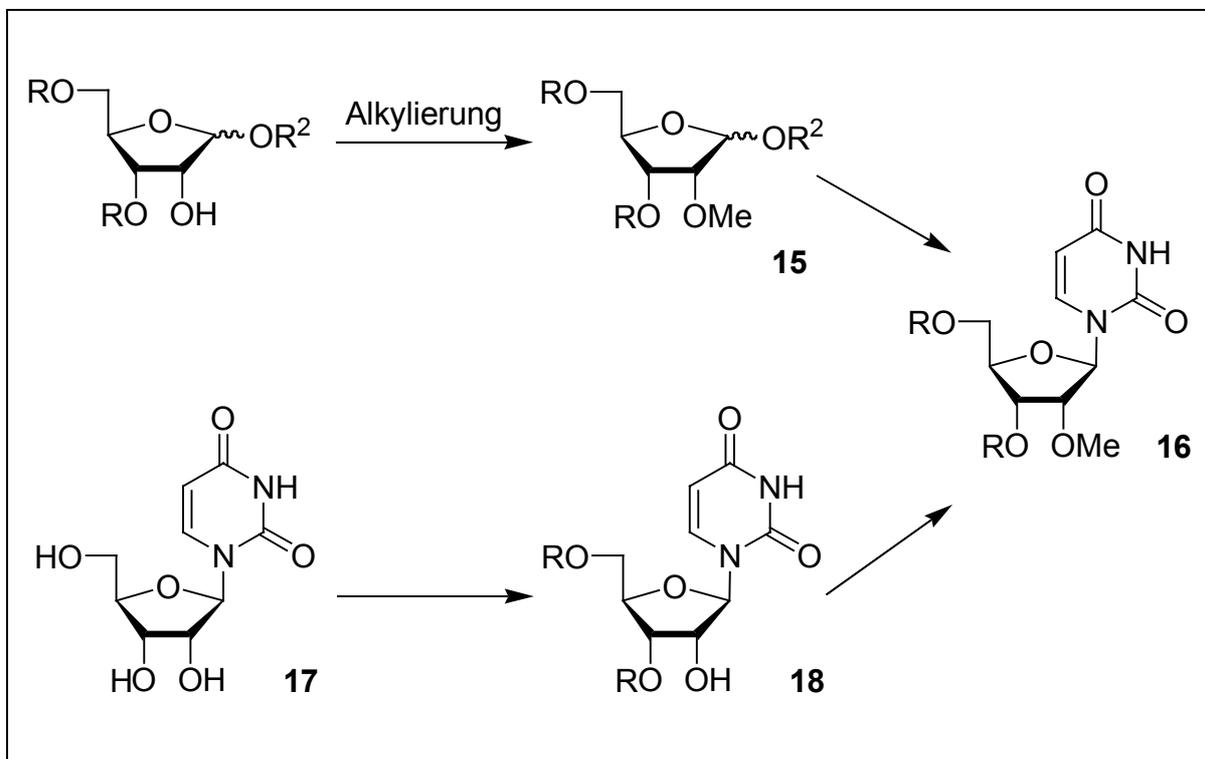


Abbildung 17: Prinzipielle Synthesestrategien zur 2'-Modifizierung von Nucleosiden am Beispiel des 2'-O-Methyluridins **16**; R, R<sup>2</sup> = Schutzgruppen

Der klassische Zugang zu 2'-O-Methylribonucleosiden führt über die Reaktion mit Diazomethan (Broom & Robins, 1965). Die Aktivierung des *cis*-Diol-Systems der Ribose erfolgt dabei über einen cyclischen Zinn organischen Übergangszustand (Robins, 1974). Wird die Reaktion mit Methyljodid durchgeführt, hat sich der Zusatz von Ag<sub>2</sub>O vor allem bei der Darstellung von Pyrimidinnucleosiden bewährt (Furukawa, 1965; Chattopadhyaya, 1986; Inoue, 1987).

Die Alkylierung der 2'-Position von Nucleosiden hängt stark von der Deprotonierung der 2'-Hydroxygruppe ab. Neben den heute zumeist verwendeten Alkalimetallhydriden sehen die üblichen Alkylierungsvorschriften auch die Verwendung von starken organischen Basen und anorganischen Basen wie z.B. Alkalimetallhydroxide vor. Dies schränkt die Auswahl an Schutzgruppen für die Nucleobase, die 5'- und die 3'-Hydroxygruppe stark ein (Zatsepin, 2002). Während die Alkylierung in Anwesenheit von Alkalimetallhydroxiden in relativ guten Ausbeuten verläuft und keine Nebenreaktionen an den Nucleobasen zu beobachten sind, limitieren die drastischen Reaktionsbedingungen jedoch den generellen Einsatz dieser Methode (Tazawa, 1972). Sproat et al. entwickelten eine erfolgreiche Methode unter Verwendung von 2-[(*tert*-Butyl)imino]-2-(dimethylamino)-perhydro-1,3-dimethyl-1,3,2-diazaphosphorin BEMP (Grath, 1999; Sproat, 1990). Der Einsatz von Natriumhydrid zur Alkylierung der 2'-Position hat sich als sehr effiziente Reaktionsführung etabliert. Die Reaktion ungeschützter Ribonucleoside mit NaH und Alkylierungsreagenz liefert das gewünschte Produkt, da die 2'-Hydroxygruppe das acideste Proton trägt (Chattopadhyaya, 2001). Die Menge an Nebenprodukten durch Reaktionen des primären 5'-Alkohols und der 3'-OH-Gruppe sind jedoch beträchtlich. Die von W. Markiewicz entwickelte Schutzgruppe, ein substituiertes Disiloxan, stellt eine hervorragende Möglichkeit zur simultanen Protektion der 5'- und 3'-Hydroxygruppe dar (Markiewicz, 1979). Die Reaktivität des Alkylierungsreagenzes spielt neben der Diskussion der zu verwendenden Base und Schutzgruppe eine entscheidende Rolle. Aufgrund der zu geringen Reaktivität von Alkylhalogeniden haben sich die Ester der Bromessigsäure als gute Alkylierungsreagenzien erwiesen (Cuenoud, 1998; Keller, 1993).

### 3.2.2 *Eigenschaften 2'-Aminoalkyl modifizierter Oligonucleotide*

Viele chemische Modifikationen an Nucleosiden beschränken sich auf die Nucleobase. Diese ist jedoch durch die Ausbildung von hochspezifischen Wasserstoffbrückenbindungen eine besonders sensitive Stelle in Bezug auf Duplexbildung und biologische Erkennungsmuster. Die 2'-Position hingegen ist nicht in diesem Maß an diesen Prozessen beteiligt; Substituenten an dieser Stelle können mit den Molekülen der kleinen Furche einer Doppelhelix interagieren.

Aminoalkyl-Gruppen eignen sich in besonderer Weise als funktionelle Gruppe im Oligonucleotid. Die Tatsache, dass sie unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen, führt zu möglichen elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat im Duplex. Eine Erhöhung der Assoziationsgeschwindigkeit bei Ausbildung eines Duplex und die Zunahme der Bindungsaffinität können zu deutlich verbesserten biologischen Eigenschaften der Oligonucleotide führen (Cuenoud, 1998). Durch die Reduktion der Nettoladung des Oligonucleotids wird zudem eine größere Membrandurchlässigkeit und somit eine verbesserte Zellaufnahme induziert.

Im Falle eines 3'-endständigen 2'- $\gamma$ -Aminopropyl modifizierten Nucleosids wird deutlich erhöhte Resistenz gegenüber 3'-Exonucleasen beobachtet. Dieses Prinzip lässt sich auch auf Hammerhead-Ribozyme zur Erhöhung der Serumstabilität anwenden (Burlina, 1997). Dies ist auf eine spezifische Wechselwirkung der Aminogruppe mit der Metallbindungsstelle der Nuclease zurückzuführen (Teplova, 1999) und führt zu einer bis zu 100fach erhöhten Resistenz gegenüber Nucleasen.

Die Position der Aminoalkyl-Seitenkette im Nucleosid ist ebenfalls von Bedeutung, da Aminoalkyle, die in Richtung der großen Furche eines Duplex zeigen, aufgrund fehlender Wechselwirkungen keine Veränderung der Duplexstabilität herbeiführen (Hashimoto, 1993a&b). Der stabilisierende Effekt einer Aminoalkyl-Seitenkette auf eine Doppelhelix ist eindeutig auf die Aminogruppe zurückzuführen wie Hashimoto *et al.* zeigen konnten. Oligonucleotide mit Aminoethyl modifizierten Nucleosiden, deren Aminogruppe unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt, binden gleich gut an komplementäre DNA-Stränge wie der natürliche Strang. Ethyl modifizierte Stränge hingegen beeinträchtigen die Duplexstabilität signifikant. Dies kommt auch in den

Beträgen der freien Energien der DNA Duplexe zum Ausdruck (Hashimoto, 1993b). Die Aminogruppen gehen keine Wechselwirkungen zu den im selben Strang benachbarten Carbonylgruppen der Nucleobase oder zu O4' ein. Dies konnte durch Moleküldynamikstudien von Griffey *et al.* gezeigt werden (Griffey, 1996).

In Bezug auf Triplex ausbildende Oligonucleotide sind 2'-Aminoethyl modifizierte Oligonucleotide die besten *in vivo*-Inhibitoren der Genexpression im Vergleich zu anderen modifizierten Strängen (Stütz, 2001).

# 4

## HIV und anti-HIV Ribozyme

### 4.1 Der HI-Virus: Verbreitung, Struktur und Therapien

Der HI-Virus (*HIV = human immunodeficiency virus*) gehört zur Gruppe der Retroviren. Das Virus trat erstmals in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts in Afrika auf. Der Öffentlichkeit bekannt wurde es durch die ersten Krankheitsfälle in Kalifornien, USA, in den frühen 80er Jahren. Die Patienten wiesen ein unbekanntes Krankheitsbild mit einer Dysfunktion der T-Lymphozyten auf. Zwei Phasen der HIV-Infektion sind charakteristisch für die Krankheit: Nach der Infektion kommt es über Jahre hinweg zu einer symptomfreien Vermehrung der Viren im Organismus und zu einer langsamen Schwächung des Immunsystems. Die zweite Phase, der Ausbruch der Krankheit AIDS ("*acquired immune deficiency syndrome*"), wird vor allem über das Auftreten bestimmter opportunistischer Infektionen wie z.B. der PCP (Pneumocystis Carini Pneumonie) definiert.

Weltweit sind nach Angaben der WHO ca. 40 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert ([www.who.int](http://www.who.int); *Abbildung 18*). 3 Millionen Menschen sind allein im Jahr 2003 dem Virus zum Opfer gefallen. Die Zahl der Infizierten steigt trotz der Aufklärungs- und

Präventionsmaßnahmen weiter an. So sind im Jahr 2003 ca. 5 Millionen Neuinfektionen hinzugekommen, weit über die Hälfte davon in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara, ca. 30000 in Westeuropa.

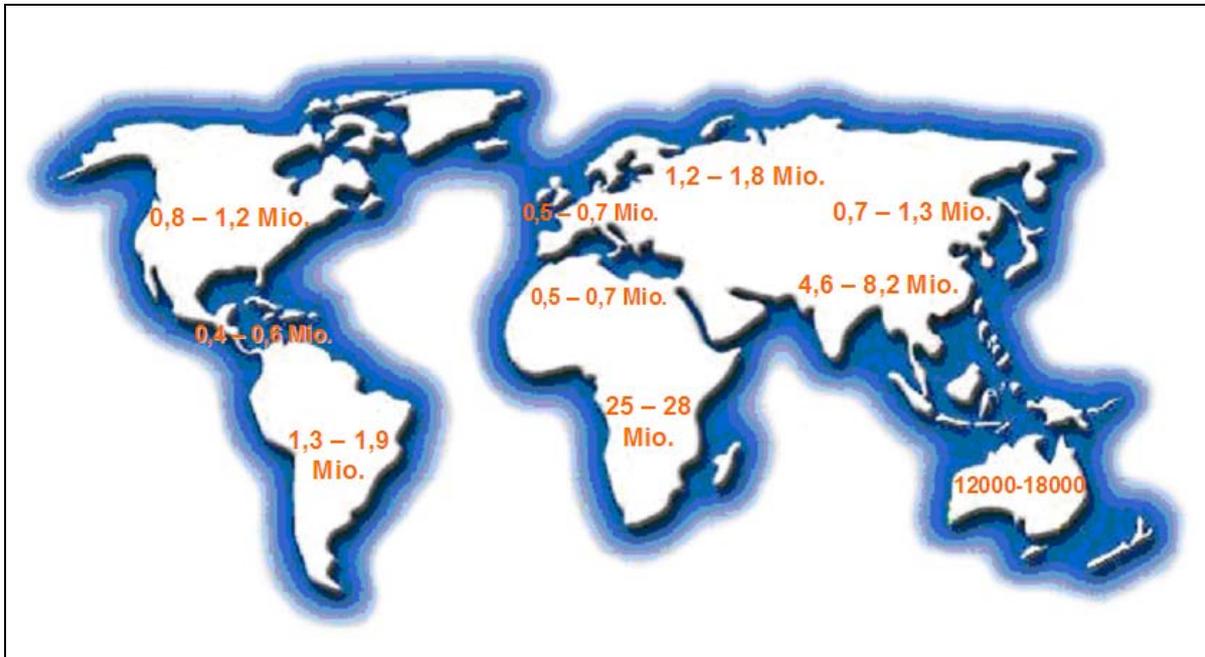


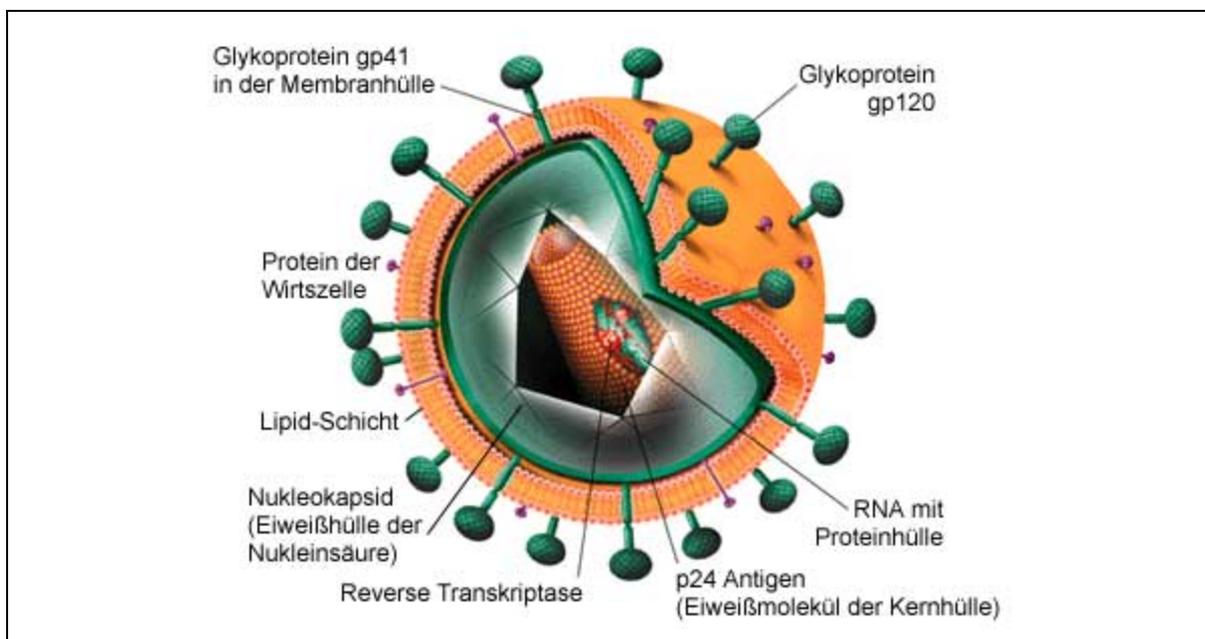
Abbildung 18: Anzahl und weltweite Verteilung HIV-infizierter Personen (WHO, 2003)

1984 wurde das Virus von L. Montagnier am Pasteur-Institut, Paris, und von R. Gallo in den USA identifiziert (Montagnier, 2002; Gallo, 1984&2002). Die Infektion mit HIV erfolgt durch Austausch von Körperflüssigkeiten. Das menschliche Immunsystem reagiert auf das Eindringen des Virus mit der Bildung von Antikörpern, die gegen die Kern- und die Hüllproteine gerichtet sind. Der Verlauf der HIV-Infektion lässt sich am Spiegel der CD4-Zellen des Immunsystems verfolgen.

#### *Aufbau und Struktur des Virus*

Der HI-Virus ist ein Retrovirus aus der Gruppe der Lentiviren. Retroviren besitzen eine viruseigene Reverse Transkriptase und ihr Provirus wird ins Wirtsgenom integriert. Er enthält zwei Kopien einer einzelsträngigen (+)-RNA und besteht aus ca. 9200 Basen. Der retrovirale Replikationszyklus des HI-Virus nutzt die Zellmaschinerie der Wirtszelle zur Vermehrung. Die Vermehrung findet dabei in Zellen statt, die den CD4-Rezeptor

tragen (v.a. T-Helfer-Lymphozyten, Makrophagen). Für den Eintritt von HIV in die Zelle sind die viralen Hüllproteine gp120 und gp41 verantwortlich (*Abbildung 19*). Das Glycoprotein gp120 ist nicht kovalent an das in der Membran verankerte gp41 gebunden und bindet an den CD4-Rezeptor der Wirtszelle. Nach Fusion mit der Zellmembran wird das HIV-Genom in die Wirtszelle geschleust und die Virushülle aufgelöst. Der Reversen Transkriptase dient eine tRNA der Wirtszelle als *Primer*, bevorzugt tRNA<sup>Pro</sup> oder tRNA<sup>Lys</sup>. Nach der reversen Transkription der viralen RNA, welche in subviralen Partikeln stattfindet, wird die synthetisierte DNA in den Zellkern geschleust.



*Abbildung 19 Struktur und Aufbau eines HI-Viruspartikels (GlaxoSmithKline, 2004)*

Retrovirale Genome integrieren unspezifisch in zelluläre Chromosomen. Diese Integration der Virus-DNA in die DNA der Wirtszelle erfolgt mit Hilfe der viruseigenen Integrase, einer polynucleotidischen Transferase. Diese besitzt sowohl eine Spalt- als auch eine Ligasefunktion. Nach der Transkription erfolgt der RNA-Export aus dem Zellkern, und die Translation im Cytoplasma. Aus der entstehenden Polypeptidkette werden die viralen Proteine mittels einer Protease herausgeschnitten (Wills, 1991). Nach Assemblierung erfolgt die Virusknospung aus der Zellmembran. Das neue Viruspartikel verlässt die Wirtszelle und reift außerhalb der Zelle (Flint, 1999; Coffin,

1997). Im Innern des Viruspartikels sind die Erbinformationen in ein konisches Kapsid verpackt und durch Nucleokapsid-Proteine geschützt.

Die Kernproteine des HIV weisen – verglichen mit denen anderer Retroviren – eine sehr konstante Primär-Struktur auf. Das HIV-Genom enthält an beiden Enden je eine LTR-Sequenz ("long terminal repeat"), welche *Promotor*- und *enhancer*-Elemente besitzt. Drei typische Strukturgene sind *gag*, *pol* und *env* (Abbildung 20). Die Sequenz des *gag*-Gens codiert für die Kernproteine wie das 240 AS umfassende Kapsidprotein p24, *env* steht für die Sequenz der Membranproteine. Diese Hüllproteine werden im endoplasmatischen Reticulum glycosiliert und gefaltet. Das *pol*-Gen ist aus therapeutischer Sicht das wichtigste und am häufigsten inhibierte Gen und codiert für die Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase (Klebba, 2000). Die Polymerase des HI-Virus besitzt wie andere Retroviren auch neben der Reverse Transkriptase auch eine RNase H- Funktion. Das HIV-Genom besitzt zwei wichtige regulatorische Gene, welche die virale Genexpression auf transkriptioneller Ebene kontrollieren: *Tat* ist für die Expressionssteigerung zuständig und *rev* transportiert das RNA-Transkript in das Cytoplasma.

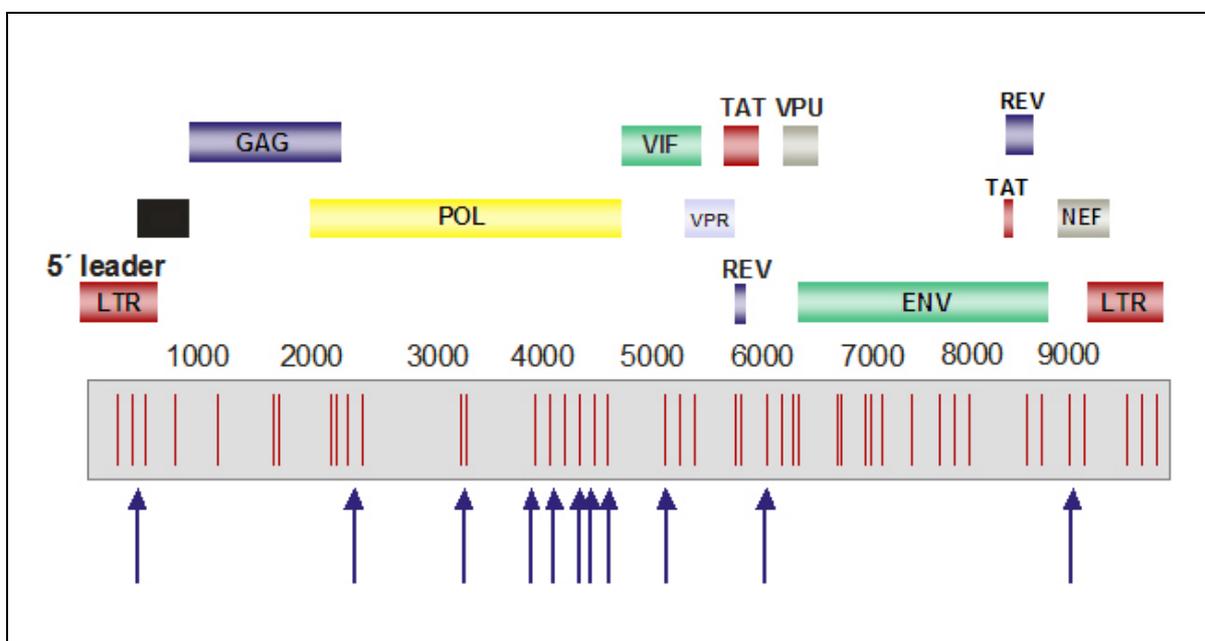


Abbildung 20: Zusammensetzung und wichtigste Strukturgene des HIV-Genoms; rote Balken: zugängliche GUC-Tripletts im HIV-Genom; blaue Pfeile: GUC-Tripletts, gegen die anti-HIV Ribozyme eingesetzt wurden.

Als Therapiemöglichkeit hat sich die "hochaktive antiretrovirale Therapie" ("HAART") durchgesetzt. Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft erzielt diese Kombinationstherapie, die sich aus mehreren hochwirksamen Substanzen zusammensetzt, in den meisten Fällen die größten Erfolge. Trotz der erzielten Fortschritte können bis heute nur lebensverlängernde Maßnahmen gegen AIDS angewandt werden, da sich der HI-Virus, wie im folgenden Abschnitt verdeutlicht wird, durch Mutationen und Resistenzen den Therapeutika entzieht.

Im Zuge von HAART werden vor allem sog. "*small molecules*" (Molekulargewicht <1000 g/mol) eingesetzt. Diese artifiziellen Nucleoside wie auch nicht-nucleosidische Verbindungen werden als Reverse Transkriptase-Hemmer (RTI) oder Protease-Hemmer eingesetzt. Im Gegenteil zu RTIs unterdrücken die Protease-Hemmer den viralen Reifungsprozess in bereits infizierten Zellen. Integrase-Hemmer sind zur Zeit noch nicht auf dem Markt, die erste Zulassung wird für das Jahr 2009 angestrebt.

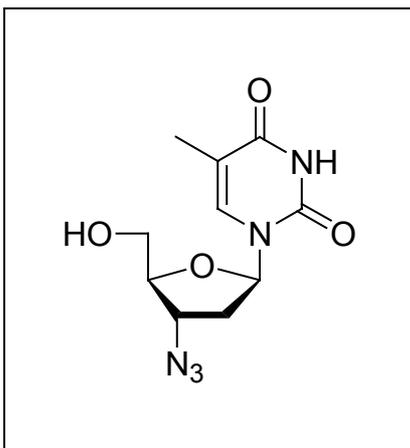


Abbildung 21: 3'-Azidothymidin **19**

Eines der ersten Medikamente, die zur Unterdrückung der Replikation des HI-Virus zur Verfügung standen, war 3'-Azidothymidin **19** (Zidovudine<sup>®</sup>) im Jahr 1986 (Abbildung 21). Dieser RTI wird auch heute noch erfolgreich in der Kombinationstherapie eingesetzt. Die Kombinationstherapie besagt, dass mindestens zwei Reverse Transkriptase-Hemmer eingesetzt werden. Eine Dreier-Kombination enthält zur Zeit häufig zusätzlich einen Protease-Hemmer, jedoch sind

auch andere Mehrfachkombinationen denkbar. Dabei werden die potenziellen Kombinationsmöglichkeiten an eventuell auftretenden Neben- und Wechselwirkungen mit anderen Substanzen sowie an den spezifischen Bedürfnissen des Patienten ausgerichtet.

Die Reverse Transkriptase des HIV hat eine sehr hohe Fehlerrate (1:1700 – 1:4000). Aufgrund der fehlenden 3'-5'-Exonuclease-Aktivität zum "*Proofreading*", d.h. zur Kontrolle der korrekten Synthese, kommt es leicht zu Mutationen (Williams, 1992). Um schnell aufkommende Resistenzen durch Mutationen zu verhindern, muss bei der Kombinationstherapie auf einen ausreichenden Wirkstoffspiegel geachtet werden, d.h.

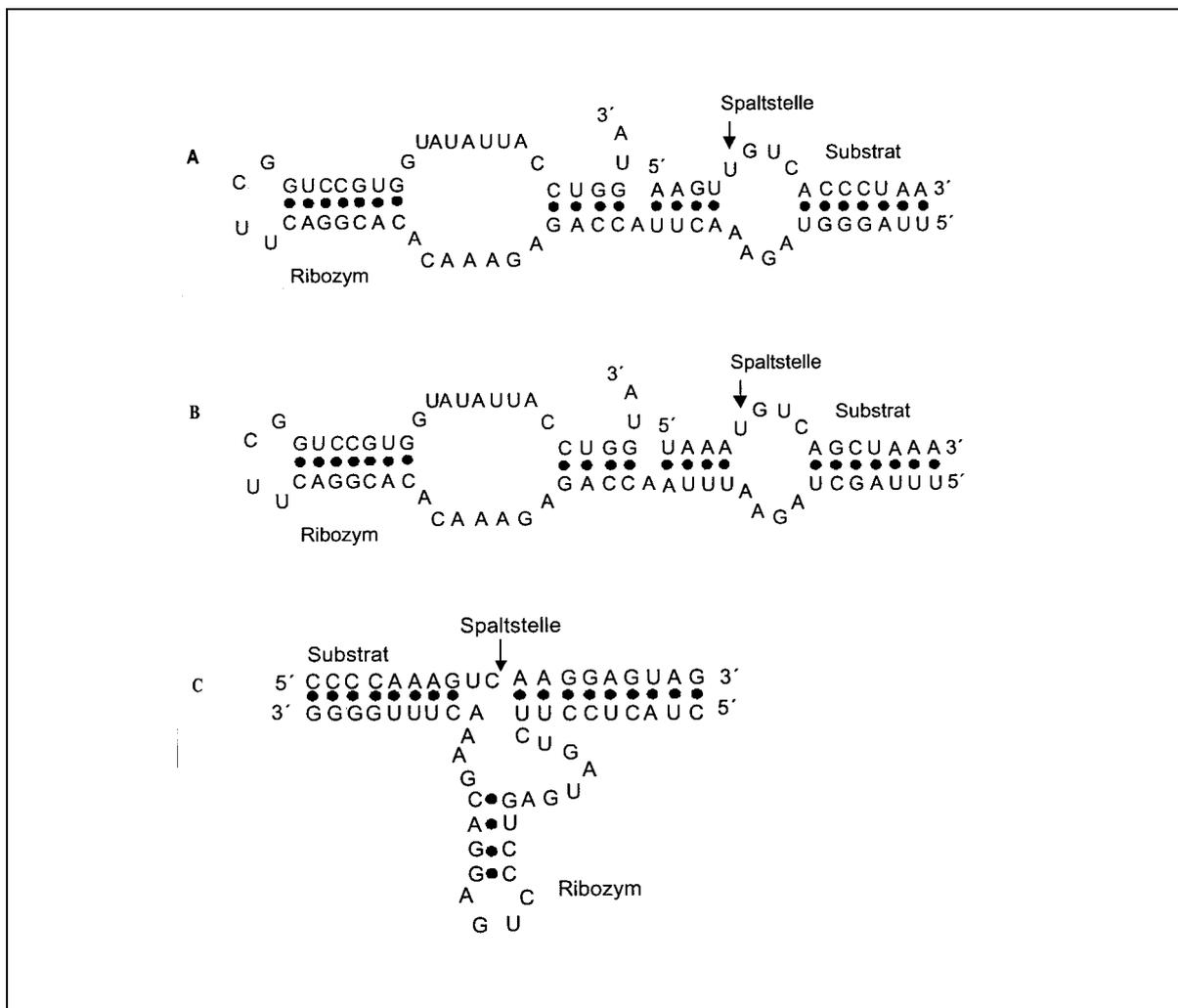
auch der Talspiegel muss im therapeutischen wirksamen Bereich liegen. Damit wird ein relativ schneller Rückgang des Virus-Titers induziert und eine Selektion resistenter Viren verhindert. Die Methoden zur Regulation der Genexpression stellen ein aussichtsreiches Mittel zur Unterdrückung der HIV-Replikation dar. Es wurden - wie im folgenden Abschnitt beschrieben - bereits anti-HIV Ribozyme und Aptamere entwickelt. Die chemische Modifikation solcher Ribozyme, deren Aktivität durch HIV-Punktmutationen nicht beeinträchtigt werden sollte, ist Hauptbestandteil der vorliegenden Doktorarbeit.

## 4.2 Anti-HIV Ribozyme

Entscheidend für die Aktivität eines Ribozyms in einem zellulären System ist die Zugänglichkeit der Zielsequenz. Komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen können die Anlagerung des Ribozyms unterbinden. Die Aufklärung der räumlichen Strukturen einzelner Regionen des viralen Genoms kann durch Analyse gezielt durchgeführter Nuclease katalysierter Reaktionen oder durch Einsatz spezifischer Chemikalien erfolgen (Kronenwell, 1996). Auch Computer gestützte RNA-Faltungsprogramme sowie *in vitro* Evolutionstechnologien (SELEX) können entscheidende Beiträge zur Strukturaufklärung liefern (Chapman, 1994). Bei anti-HIV Ribozymen spielt auch die Übertragung der Resultate von zellfreien kinetischen Studien in das zelluläre System eine wichtige Rolle. Unter physiologischen Bedingungen im Cytoplasma bewirken multiple Effekte oft eine Modulation der Ribozymaktivität. Neben der Konzentration der Ziel-RNA ist auch die Art ihrer Prozessierung und der Transport des Ribozyms innerhalb der Zelle limitierend. Bei retroviral exprimierten Ribozymen ist eine geeignete Colokalisation von Ribozym und Ziel-RNA entscheidend. Auch der Transport des Ribozyms vom Zellkern in das Cytoplasma muss effektiv sein.

Die ersten anti-HIV Ribozyme waren gegen das *gag*-Gen gerichtet (Sarver, 1990). Transfizierte Humane CD<sup>4+</sup>-HeLa-Zellen wiesen nach HIV-Infektion einen niedrigeren p24-Antigen-Spiegel im Kulturüberstand auf als die Kontrollzellen. Neben dem *gag*-Gen wurden die meisten anti-HIV-Ribozyme gegen 5'-LTR (Yu, 1993) und *tat* (Zhou,

1994) gerichtet. In Analogie zur antiretroviralen Kombinationstherapie wurden die "Multitarget-Ribozyme" entwickelt (Klein, 2002). Dabei werden mehrere Ribozyme, die gegen verschiedene Regionen des HIV-Genoms gerichtet sind, simultan exprimiert, um eine möglichst effiziente Unterdrückung der HIV-Replikation zu gewährleisten. In *Abbildung 22* sind anhand von zwei Hairpin- und einem Hammerhead-Ribozym drei Beispiele gegeben.

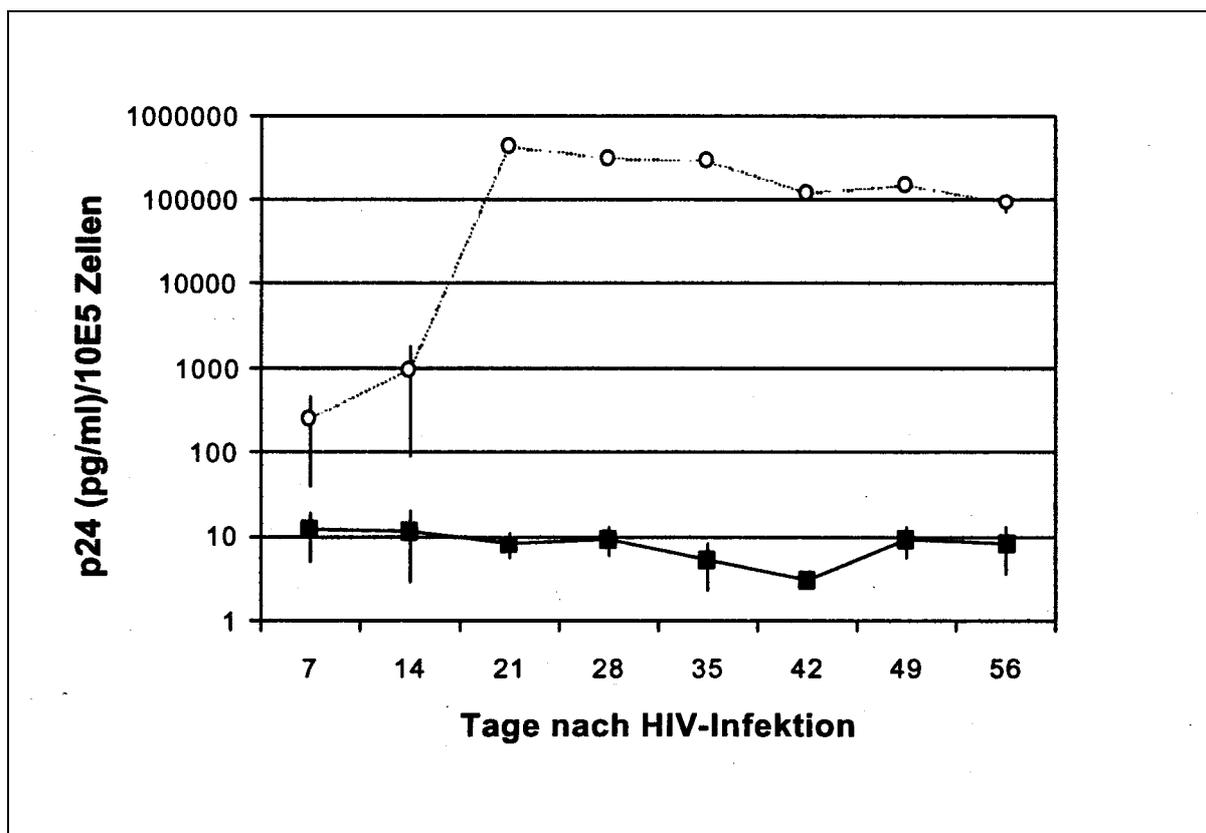


*Abbildung 22: Drei effiziente retroviral exprimierte anti-HIV-Ribozyme (Klein, 2002). A: LHPPol7; B: LHPPol11; C: LHHPol13*

Unterschiedliche Vektoren und retrovirale Transkripte haben unter Umständen großen Einfluss auf die anti-HIV-Effektivität der Ribozyme. Der antivirale Effekt ist daher das wichtigste Kriterium zur funktionellen Charakterisierung und zur optimalen Evaluation eines anti-HIV Ribozyms. Die p24-Konzentration ist dabei ein wichtiger Indikator für

die Konzentration an infizierten, Viren produzierenden Zellen. Die Analyse des antiviralen Effektes erfolgt deshalb über die Messung der p24-Konzentration nach der HIV-Infektion. Als Schwellenwert für p24 gilt 100 pg/ml im Kulturüberstand, da es ab dieser Konzentration theoretisch immer zu einem Durchbruch der HIV-Infektion kommen kann. Entscheidend für die Effektivität der Ribozymkonstrukte ist in diesem Fall die Größe des Zeitraumes nach Unterdrückung der HIV-Replikation bis der p24-Schwellenwert wieder erreicht wird. In *Abbildung 22* sind die effektivsten retroviral exprimierten anti-HIV Ribozyme aufgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Hammerhead-Ribozym LHHPol13, welches gegen das 13. GUC-Triplett des HIV-Genoms im Pol-Gen gerichtet ist, am effizientesten die HIV-Replikation inhibiert. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach acht Wochen konnte die HIV-Replikation vollständig unterdrückt werden (*Abbildung 23*).



*Abbildung 23:* Kinetik der HIV-Replikation in LCo und LHHPol13 exprimierenden Hut78-Zellen nach der HIV-Infektion. ○ = infizierte Kontrollzellen, ■ = LHHPol13 exprimierende, infizierte Zellen.

Dabei wurden Inhibierungsraten von 3-4 Zehnerpotenzen erreicht. Nach 56 Tagen lag die Konzentration an p24 im Kulturüberstand lediglich bei ca. 10 mg/ml; ein Wert, der deutlich unter dem Schwellenwert liegt und die effiziente Inhibierung der HIV-Replikation verdeutlicht. Das Hammerhead-Ribozym LHHPol13 wurde aufgrund dieser guten Inhibitionsraten als Grundsequenz für die Ribozyme genommen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelt wurden.



# 5

## 5'-Triphosphate – Synthese und Anwendung

Chemisch modifizierte Nucleosid-Triphosphate sind von großem therapeutischen und vor allem diagnostischem Interesse. Ihr Einsatz als Terminatoren bei der DNA-Sequenzierung und Mutationsanalyse erforderte die Entwicklung eines kurzen, effizienten Syntheseweges. In den letzten Jahren wurden verschiedenste Synthesestrategien publiziert (Burgess & Cook, 2000). Allen gemein ist, dass sie für verschiedene Substrate sehr unterschiedliche Ausbeuten liefern. Somit ist ein kombinatorischer Ansatz zur Triphosphat-Synthese heute noch nicht verfügbar.

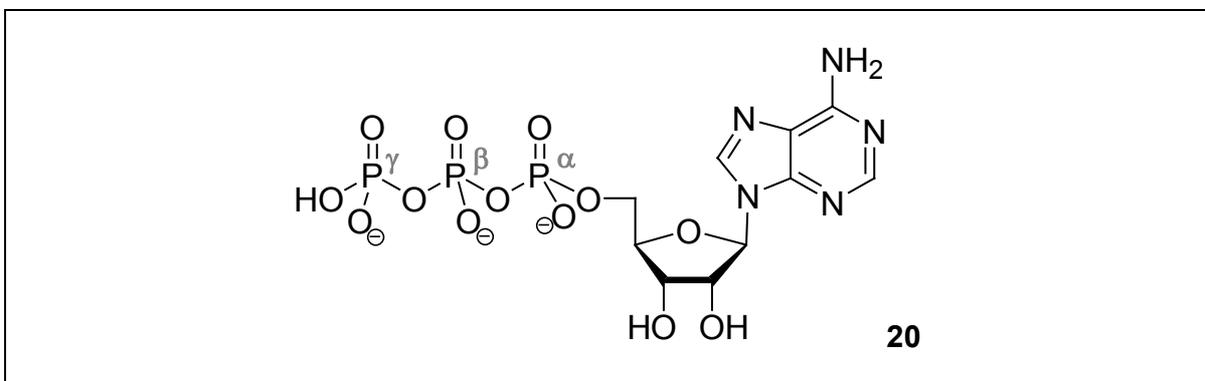


Abbildung 24: Aufbau eines Nucleosid-5'-Triphosphats am Beispiel des ATP 20

## 5.1 Synthese nucleosidischer 5'-Triphosphate

Die biologische Relevanz von Triphosphaten und ihr Einsatz in chemischen Laboratorien hat zur Entwicklung verschiedener Synthesestrategien geführt. Als günstigste Synthesemethode hat sich der nucleophile Angriff von Pyrophosphat an ein aktiviertes Monophosphat erwiesen. Als Alternative besteht die Möglichkeit des nucleophilen Angriffs eines Phosphats an ein aktiviertes Nucleosidpyrophosphat oder die direkte Einführung des Triphosphats, wenn die 5'-Hydroxyfunktion eine geeignete Abgangsgruppe trägt.

### *Synthese nach Yoshikawa*

Der erste Reaktionsschritt bei der chemischen Triphosphatsynthese ist die regioselektive Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe. Ein häufig verwendetes Reagens bei dieser Reaktion ist  $\text{POCl}_3$ . Yoshikawa konnte zeigen, dass die Verwendung von Trialkylphosphaten als Lösungsmittel die Reaktion erheblich beschleunigt (Yoshikawa, 1967). Zum einen bildet sich ein hochreaktiver, "Vilsmeier-Haack"-artiger Komplex **21** aus z. B. Trimethylphosphat und  $\text{POCl}_3$  (Abbildung 25). Zum anderen sind sowohl das relativ unpolare Nucleosid als auch die polaren Reagenzien in Trimethylphosphat größtenteils löslich. Das Monophosphat **22** mit fünfwertigem Phosphor wird *in situ* mit Bis(tributylammonium)dihydrogenpyrophosphat umgesetzt. Das zyklische Triphosphat wird durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonat-Lösung hydrolysiert und resultiert im linearen Triphosphat **23**.

Der große Vorteil der Synthesemethode von Yoshikawa ist, dass die gesamte Synthese in einem Schritt durchgeführt werden kann ("*one-pot-synthesis*"). Die teils geringe Regioselektivität an der 5'-Position kann zu Nebenprodukten führen, deren Menge aber in den meisten Fällen vernachlässigt werden kann.

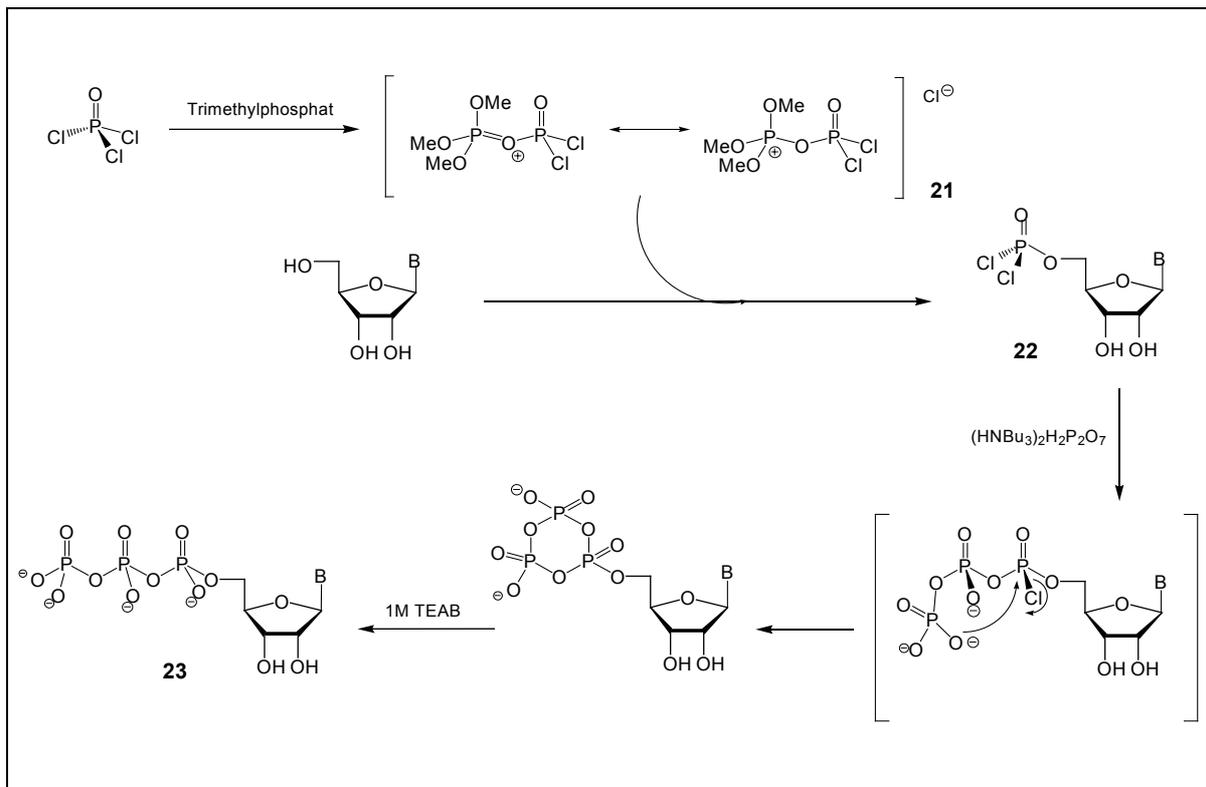


Abbildung 25: 5'-Triphosphatsynthese nach Yoshikawa; B = A, C; G; U

### Synthese nach Ludwig-Eckstein

Die Synthese von Triphosphaten nach der Methode von Ludwig-Eckstein bedient sich eines zusätzlichen Reaktionsschrittes (Ludwig & Eckstein, 1989). Um die Regioselektivität der Phosphorylierung an der 5'-Position zu erhöhen, führt man bei dieser Synthesevariante zunächst Schutzgruppen für die 2'- und 3'-Hydroxyfunktion ein. Die bevorzugt verwendeten zyklischen Acetale können in hohen Ausbeuten eingeführt werden und werden am Ende der Triphosphatsynthese *in situ* wieder abgespalten. Das aktivierte Monophosphat **24** wird mit Salicylchlorphosphit dargestellt (Abbildung 26). Durch Zugabe von Tributylammoniumpyrophosphat wird ein zyklisches Triphosphat **25** ausgebildet, dessen  $\alpha$ -Phosphoratom dreiwertig vorliegt. Aus diesem Grund muss bei der Methode nach Ludwig-Eckstein ein Oxidationsschritt mit 1%iger  $\text{I}_2$ -Lösung in einem Pyridin/ $\text{H}_2\text{O}$ -Gemisch erfolgen (Schoetzau, 2000). Die

nachfolgende Linearisierung des Triphosphates zu Verbindung **26** und die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt mit 5%iger Natriumhydrogensulfit-Lösung.

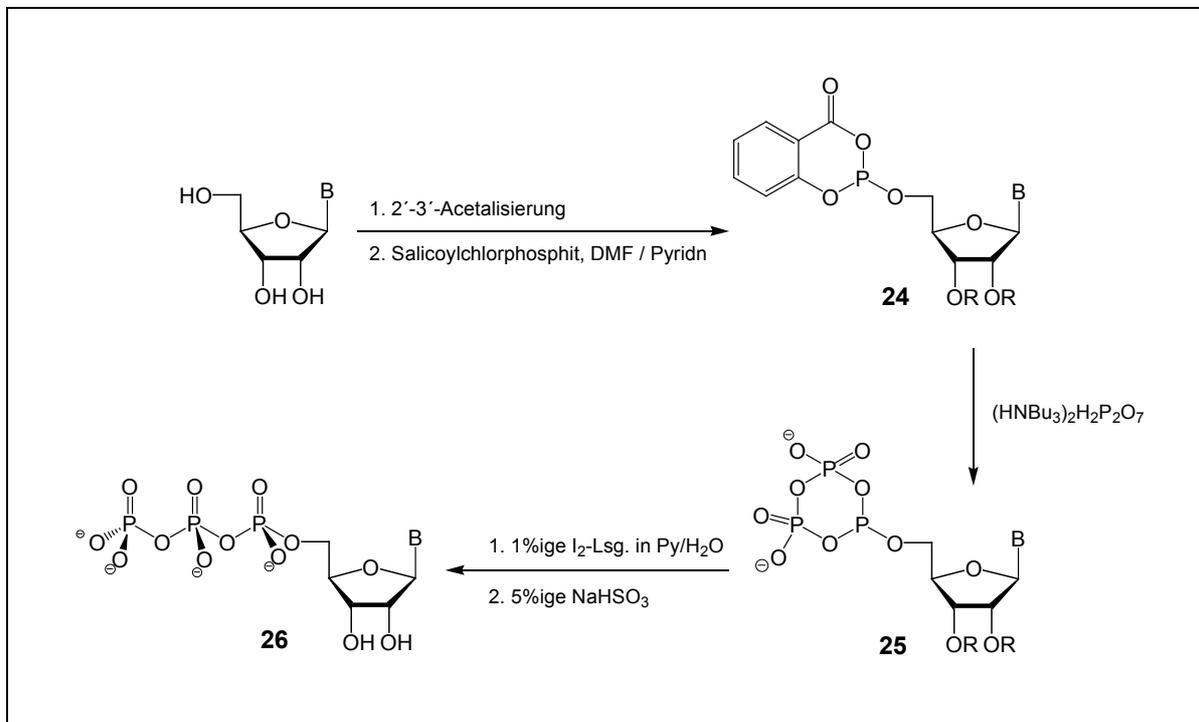


Abbildung 26: 5'-Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein; B = A, C, G, U

Eine weitere Methode zur Aktivierung der Monophosphate besteht in der *in situ*-Umsetzung mit 5'-Phosphormorpholidat. Auf diese Weise konnte dATP in hoher Ausbeute hergestellt werden (Moffatt, 1964). Zur Synthese von Nucleosid-5'-Triphosphaten stehen auch biokatalytische Methoden zu Verfügung. Ihr Einsatz wird jedoch durch die unterschiedliche Akzeptanz der Substrate stark limitiert.

Die Aufreinigung von nucleosidischen Triphosphaten nach der chemischen Synthese erfolgt über mehrere chromatographische Trennschritte. Zunächst wird über eine Anionenaustauscher-FPLC ein Großteil des Pyrophosphats, die unpolaren Reagenzien und Nebenprodukte wie Monophosphat und anorganische Polyphosphate abgetrennt. Als Trennmatrix dient hierbei DEAE-Cellulose mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB) als flüssiger Phase. Da Pyrophosphat die gleiche Ladung trägt wie das synthetisierte Triphosphat, ist die Trennung oftmals nicht vollständig und eine zweite chromatographische Reinigung wird notwendig. Diese zweite Anionenaustauscher-Chromatographie erfolgt meist an einem HPLC-System

mit einem Kaliumphosphat-Puffer und einem steigendem Gradienten an Formamid. Das auf diese Weise isolierte Triphosphat kann aufgrund der relativ unpolaren Nucleobase über *Reversed Phase*-HPL-Chromatographie entsalzt und von restlichem Formamid abgetrennt werden. Die leicht flüchtigen, protischen Ammoniumsalz-Puffer (TEAA, TEAB) eignen sich besonders für die Aufreinigung von Triphosphaten (Burgess & Cook, 2000).

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von nucleosidischen Triphosphaten zeigen in  $\text{D}_2\text{O}$  drei charakteristische Resonanzen: ein Duplett bei ca.  $-6$  ppm ( $\gamma$ -Phosphoratom) und ein Duplett bei ca.  $-11$  ppm ( $\alpha$ -Phosphoratom). In  $\text{D}_2\text{O}$  findet man für das  $\beta$ -Phosphoratom, das mit zwei weiteren Phosphoratomen koppelt, im Breitband entkoppelten Spektrum ein Triplett bei etwa  $-22$  ppm. Dabei ist die chemische Verschiebung der Peaks stark vom pH-Wert und den vorliegenden Gegenionen abhängig. Dies kann auch zur Überlagerung des  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Signals führen. Die Eichung erfolgt üblicherweise an einem externen Standard wie z.B.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Um Austauschprozesse während der Messung zu unterdrücken, eignet sich die Zugabe von EDTA (Ludwig, 1989).

Die Synthese nucleosidischer Triphosphate, ihre Aufreinigung, die Charakterisierung und Lagerung ist aus vielen Gründen problematisch. Durch die Anwesenheit unpolarer, geschützter Nucleoside und hochgeladener, ionisch vorliegender Reagenzien wie Pyrophosphat während der Synthese ist die Wahl des Lösungsmittels von entscheidender Bedeutung. Zudem sind Triphosphate leicht zu hydrolysieren, vor allem in sauren und basischen Medien. Auch nach der Aufreinigung ist im Umgang mit Triphosphaten äußerste Vorsicht geboten. Da Triphosphate beim Lösen in ungepuffertem Wasser den pH-Wert erniedrigen, wenn sie im protischen Zustand vorliegen, eignen sich Trialkylammonium-Ionen in besonderer Weise als Gegenionen. Sie sind im Vakuum leicht entfernbar und erhöhen die Beständigkeit der Triphosphate auch im festen Zustand.

## 5.2 Enzymatischer Einbau von 5'-Nucleosid-Triphosphaten

Die chemischen Eigenschaften universeller Nucleobasen und ihr Einfluss auf die Stabilität von RNA- und DNA-Duplexen wurde in Kapitel 3 ausführlich erläutert. Um zu untersuchen, ob ein Nucleosid auch im biologischen Sinn eine universelle Base ist, wird sowohl seine Eignung als Templat als auch seine Akzeptanz durch Polymerasen getestet. Zudem wird die Fähigkeit zur Kettenverlängerung in Oligonucleotiden untersucht.

Zur Überprüfung der Templateigenschaften kann das Ribonucleosid mittels Phosphoramidit-Chemie in ein RNA-Templat eingebaut werden. Handelt es sich bei dem Nucleosid um eine universelle Base, so müsste eine Reverse Transkriptase statistisch gesehen gegenüber der Modifikation jedes natürliche dNTP gleich häufig einbauen. Oft beobachtet man jedoch eine Bevorzugung der Pyrimidine oder Purine (Loakes, 2003). Dies kann sowohl sterische Gründe haben als auch am veränderten Donor-Akzeptor-Muster liegen, welches für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wichtig ist.

Die Akzeptanz eines Triphosphats durch ein Enzym kann auch durch dessen enzymatischen Einbau in ein naszierendes Oligonucleotid getestet werden. Hierfür wird das Nucleosid nach einer der in *Kapitel 5.1* beschriebenen Methoden zu einem Triphosphat umgesetzt. Im Falle von 5'-Triphosphat-Ribonucleosiden bietet sich ein *in vitro*-Transkriptionssystem mit einer RNA-Polymerase an. Polymerasen sind Enzyme, die als Nucleotidyl-Transferasen die Verknüpfung von Nucleosid-5'-Triphosphaten zu Nucleinsäuren unter Abspaltung von Diphosphat katalysieren (Young, 1991). Die DNA-Polymerasen und Reversen Transkriptasen weisen dabei einige Unterschiede zu den RNA-Polymerasen auf.

### *DNA-Polymerasen und Reverse Transkriptasen*

Die verschiedenen DNA-Polymerasen weisen große Sequenzhomologien auf – speziell im katalytischen Zentrum und der Tertiärstruktur (Braithwaite, 1993). Mechanistische Studien wurden dabei vor allem an Röntgenstrukturen von Komplexen

aus Enzym, Templat, Primer und Triphosphat durchgeführt. In Studien von Doubl   wurde der Mechanismus der Kettenverlängerung im katalytischen Zentrum der T7 DNA-Polymerase in einer Kristallstruktur festgehalten (Doubl  , 1998). Das Enzym wechselt bei der Kettenverlängerung zwischen einer offenen und geschlossenen Konformation, die der Form einer rechten Hand ähneln. Die Doppelhelix, die durch die Enzymtasche geleitet wird, wird bei der Kettenverlängerung am Phosphatrückgrat durch die "Finger"-, "Daumen"- und "Handteller"-Region – um bei dem Bild der rechten Hand zu bleiben – fixiert (siehe auch: Kiefer, 1998; Huang, 1998).

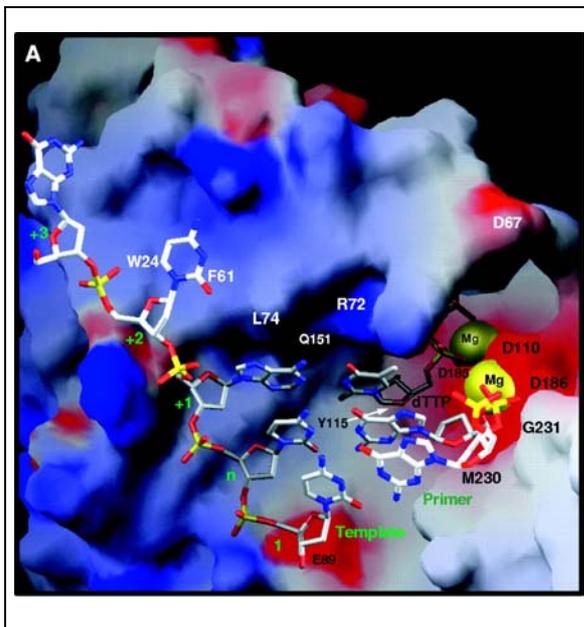


Abbildung 27: Oberflächendarstellung des katalytischen Zentrums einer HIV-1 RT (blau: pos. Bereiche; rot: neg. Bereiche; gelb:  $Mg^{2+}$ -Ionen; Huang, 1998)

Für die Polymerisation sind zwei Metallionen (z.B. Magnesiumionen) essentiell. Diese werden von zwei Aspartat-Resten komplexiert und wechselwirken mit den drei Phosphat-einheiten des einzubauenden Triphosphats (Abbildung 27). Durch den Angriff der 3'-Hydroxygruppe des entstehenden Oligonucleotides wird der Abgang des  $PP_i$  erleichtert, welches im Anschluss hydrolysiert wird. Dieser Mechanismus gilt sowohl für die Familie der DNA-Polymerasen als auch für Reverse Transkriptasen. Das hydrophobe Reaktionszentrum, vor allem im

Bereich der Zuckereinheit des Triphosphats, scheint für die Reverse Transkriptase das Diskriminierungsmerkmal zwischen der Desoxyribose und der Ribose zu sein (Huang, 1998).

### RNA-Polymerasen

Essentiell für die RNA-Polymerasen ist der doppelsträngige DNA-Promoter/Templat-Bereich, welcher mindestens 17 Nucleotide umfasst. Häufig verwendete RNA-

Polymerasen sind die T3, T7 und SP6 Polymerase. Sie verknüpfen den Primer nicht mit dem entstehenden RNA-Transkript und benötigen ein GG-Dimer als Startsequenz. Die T7 RNA-Polymerase erlaubt die Synthese fast jeder beliebiger RNA. Die Sequenz des Templates hat jedoch erheblichen Einfluss auf die Ausbeute der Transkription. Die T7-RNA-Polymerase kann an das 3'-Ende des Transkriptes ein Nucleotid anhängen, welches nicht durch das Template codiert wird (Uhlenbeck, 1987). Dieser Effekt wurde auch bei der SP6-Polymerase beobachtet.

RNA-Polymerasen und Reverse Transkriptasen besitzen eine wesentlich höhere Fehlerraten als andere Enzyme der Polymerase-Familie. Dies macht sie zu einem besonders wertvollen Werkzeug zur Untersuchung artifizierlicher Nucleoside.

#### *Enzymatischer Einbau nucleosidischer 5'-Triphosphate*

Der Einbau modifizierter Triphosphate hängt stark von der verwendeten Polymerase ab. Die humane DNA Primase weist zwar eine hohe Fehlerrate beim Einbau natürlicher dNTPs auf, sie ist jedoch gegenüber artifizierlichen Triphosphaten sehr selektiv. Ein Primase katalysierter Einbau artifizierlicher Triphosphate wurde bislang nur selten festgestellt (Kuchta, 2004) und hängt stark von der Möglichkeit des Triphosphats ab Wasserstoffbrückenbindungen im neuen Basenpaar aufzubauen. Im Gegensatz dazu bauen die T7 Polymerase und das Klenow-Fragment der DNA Polymerase I auch hydrophobe dNTPs ein wie z.B. das zum Thymin isostere 2,4-Difluortoluol modifizierte 5'-Triphosphat (Morales, 2000; Chiaramonte, 2003). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Polymerasen im Laufe der Evolution mindestens zwei grundlegend verschiedene Mechanismen entwickelten, um zwischen korrektem und inkorrektem Einbau von Nucleotiden zu differenzieren.

# 6

## Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Entwicklung und Synthese 2'-modifizierter universeller Nucleobasen, die RNA-Duplexe nicht destabilisieren. Diese sollten in ein anti-HIV Hammerhead-Ribozym eingebaut werden und ihr Einfluss auf die katalytische Aktivität der Ribozyme untersucht werden. Neben der Bestimmung der kinetischen Parameter war dabei von Interesse, inwiefern die Hammerhead-Ribozyme in der Lage sein würden die Anwesenheit von genomischen Punktmutationen zu tolerieren.

Basierend auf den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, dass es sich bei den fluorierten Nucleosiden 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** und 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** um universelle Basen handelt, sollte eine unter physiologischen Bedingungen protonierbare Gruppe in die Nucleoside eingeführt werden. Die potenziellen elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat eines RNA-Strangs sollten zu einer Stabilisierung der artifiziellen Basenpaare führen.

Die Durchführung der Synthese der 2'-Aminoethyl modifizierten Verbindungen **27** und **28** (*Abbildung 28*) und die Darstellung ihrer Phosphoramidite sollte kupplungsfähige Monomere für die Oligoribonucleotid-Festphasensynthese liefern. Nach Etablierung eines auf Fluoreszenz basierten Assays zur Bestimmung der kinetischen Parameter von Hammerhead-Ribozymen sollte zunächst der Einfluss der 2'-unmodifizierten

Nucleoside **8** und **9** auf die Ribozymaktivität untersucht werden. Das zugrunde liegende anti-HIV Hammerhead-Ribozym sollte soweit wie möglich minimiert und hinsichtlich seiner katalytischen Aktivität optimiert werden.

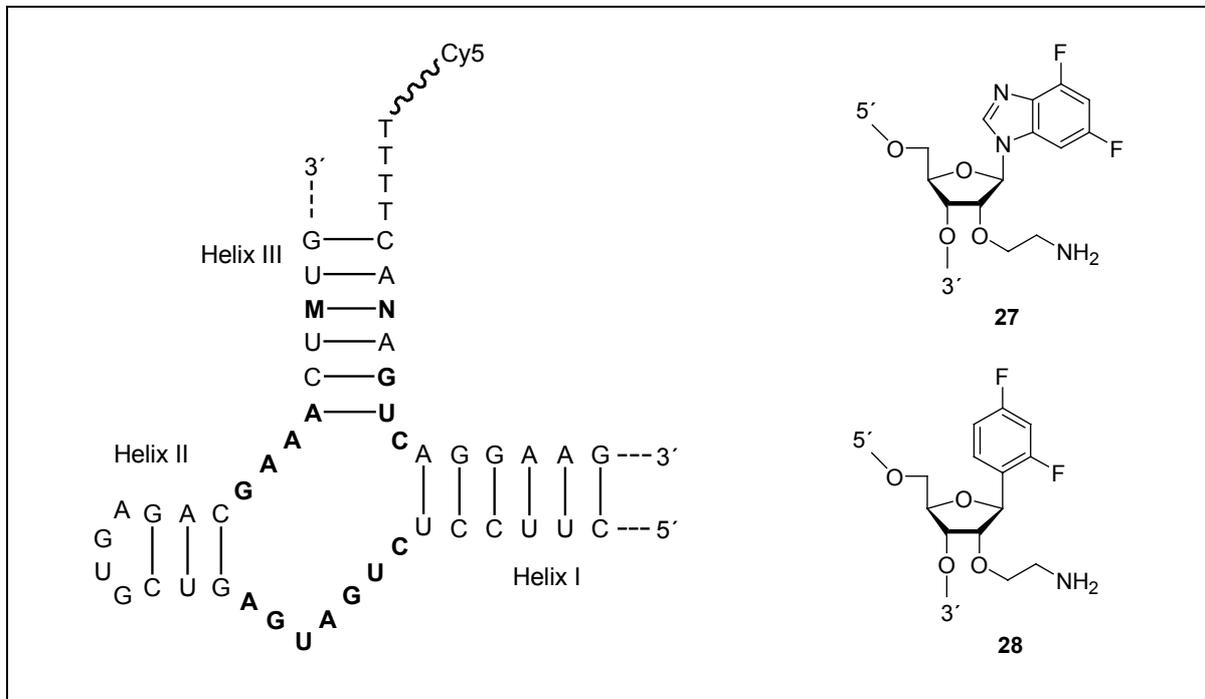


Abbildung 28: Anti-HIV Hammerhead-Ribozym und einzubauende Modifikationen **27** und **28**; **M** = Position der Modifikation, **N** = A, C, G, U

Um den Einfluss der 2'-Aminoethyl modifizierten Nucleoside **27** und **28** auf die thermodynamische Stabilität von RNA-Duplexen zu überprüfen, sollten UV-VIS spektroskopische Untersuchungen an monomodifizierten RNA 12meren durchgeführt werden.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter des optimierten Hammerhead-Ribozyms sollte unter "multiple turnover"-Bedingungen stattfinden. Die artifiziellen Nucleoside **27** und **28** sollten in das Ribozym eingebaut und gegen alle vier möglichen, natürlichen Substrate getestet werden, um das Vorliegen genomischer Punktmutationen zu simulieren (Abbildung 28).

Ein weiteres Ziel war das Verhalten der universellen Basen in Polymerase katalysierten Reaktionen. Hierbei sollten sowohl die Templateigenschaften der artifiziellen Nucleoside untersucht werden als auch ihre Fähigkeit als Substrate für eine Polymerase zu fungieren. Handelt es sich bei den vorliegenden Nucleosidanaloga auch um universelle Basen im biologischen Sinn?

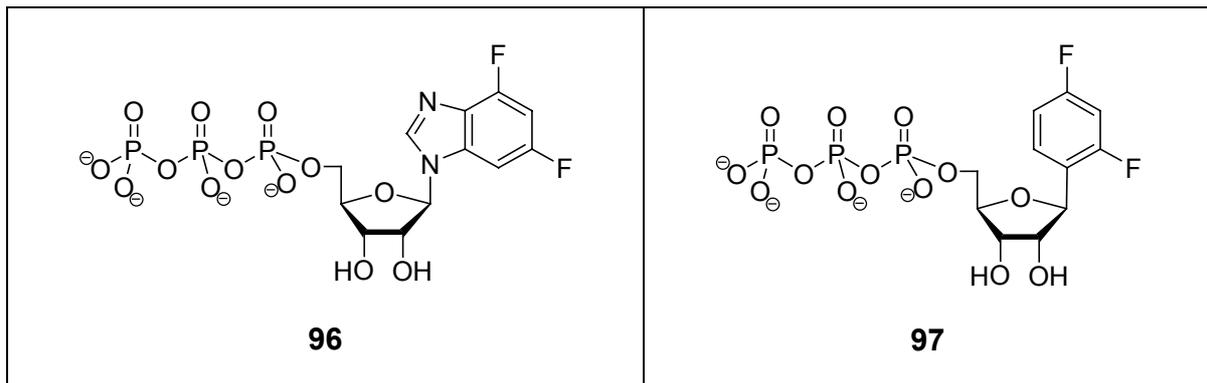


Abbildung 29: Nucleosidische 5'-Triphosphate **96** und **97** aus den Nucleosidanaloga **8** und **9**

Für beide Untersuchungen sollten geeignete Testsysteme entwickelt werden. Zum Einsatz der fluorinierten Nucleoside als Enzymsubstrate sollten die 5'-Triphosphate synthetisiert werden (Abbildung 29). Neben der Akzeptanz durch die Polymerase sollte dabei auch die Kettenverlängerung nach Einbau der Modifikation getestet werden.





## Synthese 2'-Aminoethyl modifizierter, fluorierter Nucleosidanaloga

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten universelle Nucleobasen entwickelt werden, die nicht zu einer Destabilisierung von RNA-Doppelhelices führen. Diese sollten in der Lage sein Punktmutationen in biologischen Systemen zu tolerieren, ohne die RNA-Erkennung zu beeinflussen. Ausgehend von den fluorierten Benzimidazol- und Benzolnucleosidanaloga **8** und **9**, die in unserer Arbeitsgruppe als gute universelle Basen identifiziert worden sind, sollte der Einfluss einer protonierbaren Aminoethylgruppe in 2'-Position evaluiert werden.

Bei diesem Ansatz spielen drei Effekte eine wichtige Rolle:

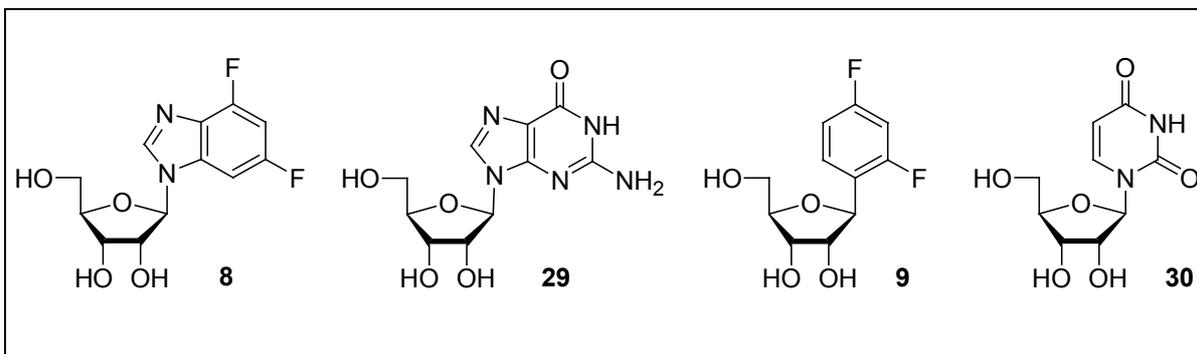
- 1) Die hydrophoben Nucleobasen 4,6-Difluorbenzimidazol und 2,4-Difluorbenzol sind den natürlichen Nucleobasen Guanin und Uracil sterisch nahezu identisch. Sie können keine klassischen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, sind jedoch durch die Substitution der Carbonylgruppen durch eine C-F-Bindung sterisch nicht anspruchsvoll.
- 2) Die Fluorsubstituenten am aromatischen System der Nucleobase führen zu erhöhten Basenstapelungseigenschaften (Parsch, 2000).

- 3) Durch die Einführung einer Ladung in der 2'-Position der Ribose können elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat zu einer zusätzlichen Stabilisierung des RNA-Duplex führen.

Dieses Prinzip der zweifachen Erkennung ("*dual recognition*"; Blommers, 1998) ist in den Zielmolekülen **27** und **28** vereint und sollte zu universellen Basen führen, die gut in biologischen Systemen anwendbar sind.

## 7.1 Synthese der 4,6-Difluorbenzimidazol- und 2,4-Difluorbenzol-Ribonucleoside

Die Nucleosidanaloga **8** und **9** sind den natürlichen Nucleosiden Guanosin **29** bzw. Xanthin und Uridin **30** sterisch sehr ähnlich. Alle Sauerstoff- und nahezu alle Stickstoffatome der Nucleobase sind formal substituiert worden, da diese ideale Donor- bzw. Akzeptor-eigenschaften für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen. Das beste Mimetikum für die Carbonylsauerstoffe in Nucleobasen sind Fluoratome (Pankiewicz, 2000). Dies betrifft sowohl die atomare Größe als auch die Polarität des Substituenten. In Anlehnung an die bereits in Kapitel 3 erwähnten Resultate von Eric Kool wurden die Stickstoffe im Sechsring der Nucleobasen durch  $sp^2$ -hybridisierte Kohlenstoffe ersetzt (*Abbildung 30*).



*Abbildung 30: Fluorierte Nucleoside 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **8** und 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose **9** verglichen mit den beiden entsprechenden natürlichen Nucleosiden Guanosin **29** und Uridin **30**.*

### 7.1.1 *Synthese von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8***

Zur Synthese des Nucleosids 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** muss zunächst das 4,6-Difluorbenzimidazol hergestellt werden. Die Vorbrüggen-Glycosilierung mit einer geeignet geschützten  $\beta$ -Ribofuranose liefert das gewünschte Nucleosid in hohen Ausbeuten. Der Syntheseweg wird im folgenden näher beschrieben.

#### *Darstellung von 4,6-Difluorbenzimidazol*

Ausgehend von käuflichem 2,4-Difluoracetanilid **31** wird im ersten Reaktionsschritt eine Nitrogruppe in Position 6 eingeführt. Die Nitrierung erfolgt unter Standardbedingungen mit Nitriersäure aus 65%iger  $\text{HNO}_3$  und konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in Eisessig (Finger, 1951). Nach 90minütiger Reaktionszeit wird das Produkt **32** durch Gießen auf Eiswasser gefällt und wird nach Umkristallisation aus Ethanol in 80%iger Ausbeute erhalten. Die induktiven und mesomeren Effekte dirigieren den Nitrosubstituenten dabei selektiv in die 6-Position. Das Auftreten anderer Substitutionsprodukte wird bei dieser Reaktion nicht beobachtet.

Die Acetylschutzgruppe des 2,4-Difluor-6-nitroacetanilid **32** wird unter sauren Bedingungen abgespalten. Die Reaktion erfolgt in konzentrierter Schwefelsäure bei 95°C (*Abbildung 31*). Aufgrund der im Vergleich zum Edukt erhöhten Wasserlöslichkeit von 2,4-Difluor-6-nitroanilins **33** ist nach der Auskristallisation des gelben Feststoffes aus Eiswasser auf eine gründliche Nachfällung zu achten. Bei der Filtration muss die restliche Säure vorsichtig ausgewaschen werden, um Ausbeuteverluste zu vermeiden. 2,4-Difluor-6-nitroanilin **33** konnte nach Umkristallisation aus einem Wasser/Ethanol-Gemisch (20:3) in 78%iger Ausbeute erhalten werden.

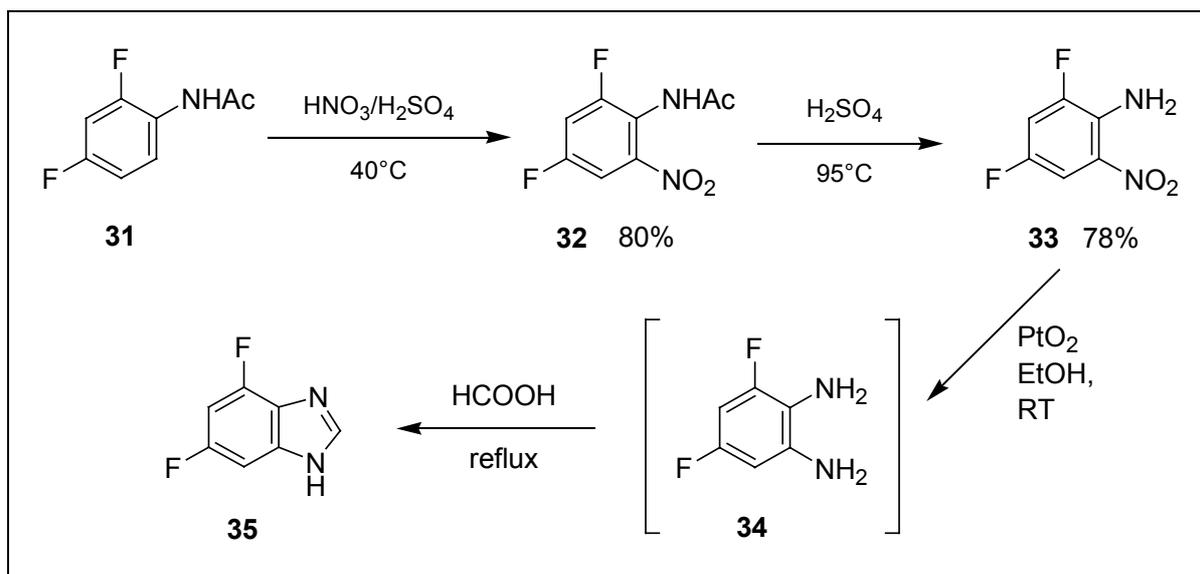


Abbildung 31: Synthese des 4,6-Difluorbenzimidazols **35**, ausgehend von 2,4-Difluoroacetanilid **31**

Die Darstellung von 3,5-Difluor-2-aminoanilin **34** erfolgt unter heterogener Metallkatalyse bei Atmosphärendruck. Die Reduktion der Nitrogruppe wird mit elementarem Wasserstoff über Platin(IV)oxid durchgeführt. Hierzu wird 2,4-Difluor-6-nitroanilin **33** in Ethanol p.a. gelöst. Die gelbe Lösung wird durch Anlegen von Vakuum entgast und anschließend wird unter Argonatmosphäre der feinpulvrige Katalysator zugegeben. Es ist darauf zu achten, dass der Katalysator vollständig mit Lösungsmittel benetzt ist, da ansonsten bei Berührung mit  $\text{H}_2$  Entzündungsgefahr besteht. Nach Fluten des Reaktionskolbens mit Wasserstoff und kompletter Verdrängung des Argons wird die Reaktionslösung drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei in regelmäßigen Abständen  $\text{H}_2$  eingeleitet werden sollte. Das Ende der Reaktion kann über die Entfärbung der Reaktionslösung, die durch die Reduktion der Nitrogruppe zustande kommt, und mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt werden. Der Katalysator wird zügig über Celite® Filtergel abgesaugt und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingengt. Das luftempfindliche Diamin **34** wird nicht weiter aufgereinigt (quantitativer Umsatz lt. DC) und aufgrund seiner Reaktivität direkt mit Ameisensäure zum 4,6-Difluorbenzimidazol umgesetzt **35**.

Diese Ringschlussreaktion (Kirk & Cohen, 1969) mit anschließender  $\beta$ -Eliminierung liefert das gewünschte 4,6-Difluorbenzimidazol **35** nach einer Stunde Rückfluss kochen mit quantitativem Umsatz (Abbildung 31). Aufgrund der hohen Reinheit des

Rohproduktes, nachgewiesen durch NMR-Spektroskopie und DC, und der schlechten Löslichkeit des 4,6-Difluorbenzimidazols **35** im Elutionsmittel wurde auf eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie verzichtet. Dies führt zu keinen detektierbaren Verlusten bei der anschließenden Glycosilierung wie in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte (Parsch, 2001).

### *Die Glycosilierungs-Reaktion nach Vorbrüggen*

Die Glycosilierungsreaktion zum Nucleosid wurde nach der Methode von H. Vorbrüggen durchgeführt (Vorbrüggen, 1981a). Diese für Purine und Benzimidazole geeignete Nucleosidsynthese liefert unter Friedel-Krafts-Katalyse  $\beta$ -N1-verknüpfte Nucleoside in hohen Ausbeuten.

Basierend auf der Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion wird bei der Vorbrüggen-Glycosilierung ein peracetylierter Zucker **36** mit einer Nucleobase in Acetonitril in Anwesenheit eines schwachen Friedel-Krafts-Katalysators oder einer Lewissäure wie z.B. (Trimethylsilyl)trifluormethansulfonat umgesetzt. Hierbei finden drei Prozesse statt:

- die Bildung eines elektrophilen Zuckerkations **37** unter Nachbargruppenbeteiligung
- die Silylierung der Nucleobase mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), idealerweise unter Bevorzugung der Position N1
- die Reaktion zum Nucleosid unter Beteiligung der beiden Komponenten

Die Reaktion verläuft unter thermodynamischer Kontrolle und liefert reine  $\beta$ -Nucleoside, da die silylierte Nucleobase nur von einer Seite die Zuckerebene angreifen kann (*Abbildung 32*). Das intermediäre Zuckerkation **37** entsteht durch Abspaltung eines Trimethylsilylacetesters. Der protonierte Fünfring steht dann in  $\alpha$ -Position an der Ribose. Die Silylierung der Nucleobase **35**, welche die Löslichkeit des 4,6-Difluorbenzimidazols **35** in Acetonitril deutlich erhöht, liefert aufgrund der Delokalisation des N1-Wasserstoffs zwei Intermediate: Die gewünschte N1-silylierte Nucleobase und das N3-Isomer. Der Grad der Delokalisation hängt stark von der Anzahl und der Position der Fluorsubstituenten und somit von der Elektronendichte am jeweiligen Stickstoffatom ab. Folglich erhält man nach Umsetzung mit dem

Zuckeraktion **37** ein Produktgemisch aus 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-3-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **38** und 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **39**.

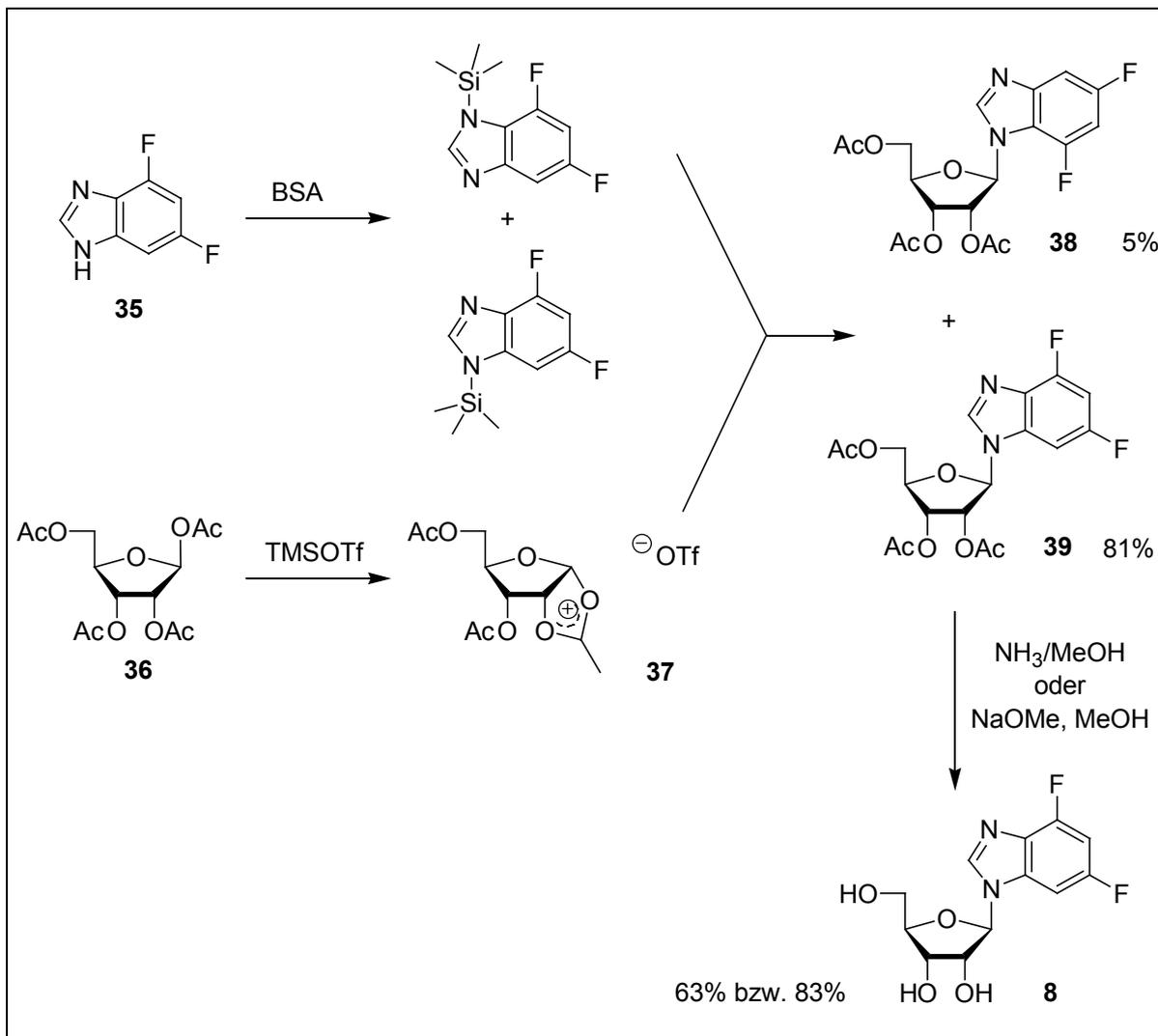


Abbildung 32: Synthese von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** mit mechanistischer Darstellung der Glycosilierungsreaktion nach Vorbrüggen

Das Produktverhältnis – im aufgeführten Beispiel beträgt es 1:16 – spiegelt das Gleichgewicht der Isomeren des Benzimidazols in Lösung wider. Günstigerweise liegt es im Falle des 4,6-Difluorbenzimidazol weit auf der Seite von N1 und führt zu einer Ausbeute von 81% an isoliertem Produkt 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **39**.

Die Unterscheidung der beiden Isomeren war mittels 2D-NMR-Spektroskopie möglich. In ROESY-Experimenten konnte für das gewünschte Isomer **39** ein intensiver Kreuzpeak zwischen H1' und H7 und eine schwache Kopplung zwischen H2' und H7 detektiert werden. Die Aufnahme des Spektrums der Verbindung **38** zeigte diese Kopplungen nicht. In  $^{13}\text{C}$ -Spektren Fluor-modifizierter Nucleoside koppeln die Kohlenstoffatome mit den Fluorsubstituenten und zeigen im Spektrum eine definierte Aufspaltung, da Fluor ein NMR-aktiver Kern ist (vgl. Kapitel 12 "Experimenteller Teil").

Für die Deacetylierung von 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **39** bieten sich zwei chemische Varianten an: Zum einen die Abspaltung der Schutzgruppe unter milden basischen Bedingungen durch 20stündiges Rühren in ammoniakalischem Methanol (Neilson, 1971). Ammoniakalisches Methanol kann durch Einleiten von  $\text{NH}_3$  in MeOH bei  $-20^\circ\text{C}$  hergestellt werden und ist bei dieser Temperatur lagerbar. Die Reaktion verläuft in guten Ausbeuten und die Bildung von Nebenprodukten wird nicht beobachtet. Das während der Reaktion entstehende Acetamid ist jedoch relativ schwer abtrennbar und führt bei der Auftrennung über Säulenchromatographie zu Ausbeuteverlusten. Aus diesem Grund wie auch durch die lange Reaktionszeit wurde auf die klassische Entschützung durch katalytische Mengen von Natrium-Methanolat zurückgegriffen. Die Reaktion erfolgt in absolutem Methanol bei Raumtemperatur und ist nach Zutropfen des Methanolats und 15minütigem Rühren beendet. In geringem Ausmaß kann es dabei zur Abspaltung der Nucleobase kommen. Die Aufreinigung des entschützten Nucleosids 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** erfolgt über Umkristallisation aus Wasser.

### 7.1.2 Synthese von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9**

Zur Synthese von Fluorbenzolnucleosiden bedient man sich einer metallorganischen C-Glycosilierungsreaktion. Ein Bromderivat der gewünschten Nucleobase kann dabei direkt mit einem Ribonolacton zum Nucleosid umgesetzt werden. Voraussetzung für diesen Syntheseweg ist die Herstellung des geeignet geschützten  $\gamma$ -Lactons. Wie nachfolgend beschrieben umfasst dessen Synthese vier Stufen und als Schutzgruppe wurde die Benzylgruppe gewählt.

#### *Darstellung des $\gamma$ -Lactons*

Als Ausgangsprodukt zur Synthese des  $\gamma$ -Lactons dient  $\beta$ -D-Ribofuranose **40**. Die Methylierung am anomeren Zentrum erfolgt unter Säurekatalyse in Methanol bei 4°C (Heath, 1983). Die niedrige Reaktionstemperatur gewährleistet, dass nur die reaktivste Hydroxygruppe methyliert wird, nicht jedoch die 2-, 3- und 5-Position. Durch die Anwesenheit von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird in Lösung eine Ringöffnung ermöglicht, so dass ein C1-Epimerengemisch entsteht. Beide Isomere **41** werden jedoch weiter bis zum Lacton umgesetzt, da sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Furanosen zum Lacton oxidiert werden können. Nach Neutralisation mit einem basischen Ionenaustauscher können die Benzylschutzgruppen aufgezo-gen werden. Diese sind sowohl unter den Bedingungen der Glycosilierung als auch im sauren Medium der anschließenden Dehydroxylierung stabil. Zur Reaktion von 1-Methyl-D-ribofuranose **41** wird Benzylchlorid in 9fachem Überschuss eingesetzt (Parsch, 2001). In Anwesenheit von KOH in THF werden die 2-, 3- und 5-Benzylether gebildet. Da pro Reaktion jedoch ein Wassermolekül entsteht, kommt es zu verschiedenen Nebenreaktionen. Neben Benzylalkohol, welcher aus Benzylchlorid hervorgehen kann, kann es unter Basenhydrolyse zu einer Dibenzyletherbildung kommen. Diese flüchtigen Nebenprodukte können im Anschluss an die Reaktion destillativ abgetrennt werden. Mit dieser Reaktionsführung kann 1-Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl-D-ribofuranose **42** in 90%iger Ausbeute erhalten werden (*Abbildung 33*).

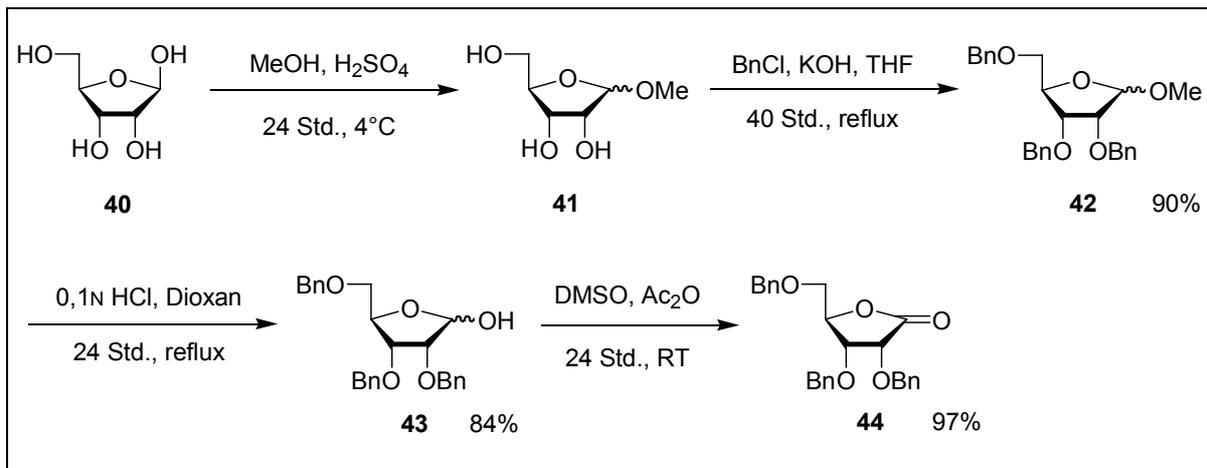


Abbildung 33 Schema zur Synthese des  $\gamma$ -Ribonolactons **44**

Vor der Oxidation zum Lacton muss die Methylgruppe des anomeren Zentrums wieder abgespalten werden. Dies erfolgt mit 0,1N Salzsäure in Dioxan. Nach 24 Stunden Rückfluss kochen, Neutralisation mit NaOH und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte das Produkt 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribofuranose **43** in 84%iger Ausbeute erhalten werden. Die Synthese des Lactons **44** erfolgte in Anlehnung an die Oxidation nach Swern mit DMSO und Acetanhydrid (Timpe, 1975). Das intermediäre entstehende "aktivierte DMSO" oxidiert den Sauerstoff an Position 1 und wird zu Disulfid reduziert. 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo- $\gamma$ -lacton **44** kann nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie in kristalliner Form und 97% Ausbeute erhalten werden.

### C-Glycosilierungsreaktion

Das furanosidische C-Glycosid 2',3',5'-Tri-O-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **47** kann in einer zweistufigen Reaktion dargestellt werden (Krohn, 1992). Die Lithierung des Difluorbrombenzols **45** wird mit Butyllithium in Diethylether bei  $-78^{\circ}\text{C}$  durchgeführt (Abbildung 34). Zu dem Reaktionsgemisch wird eine Lösung von 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo- $\gamma$ -lacton **44** in Diethylether getropft und eine Stunde bei  $-78^{\circ}\text{C}$  sowie eine weitere Stunde bei  $-50^{\circ}\text{C}$  gerührt. Durch den Brom-Lithium-Austausch am Fluoraromaten wird der nucleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff des Lactons ermöglicht. Die Wahl des Lösungsmittels ist dabei entscheidend: In THF

wird die Position zwischen den beiden Fluorsubstituenten lithiiert (Coe, 1995) und führt zu dem ungewünschten Produkt. Kohlenwasserstoffe hingegen führen zu höher aggregierten Addukten der Fluoraromaten. Auch die Natur der Base ist von Bedeutung: wird statt Butyllithium z.B. LDA eingesetzt wird ebenfalls das acideste Wasserstoffatom abgespalten.

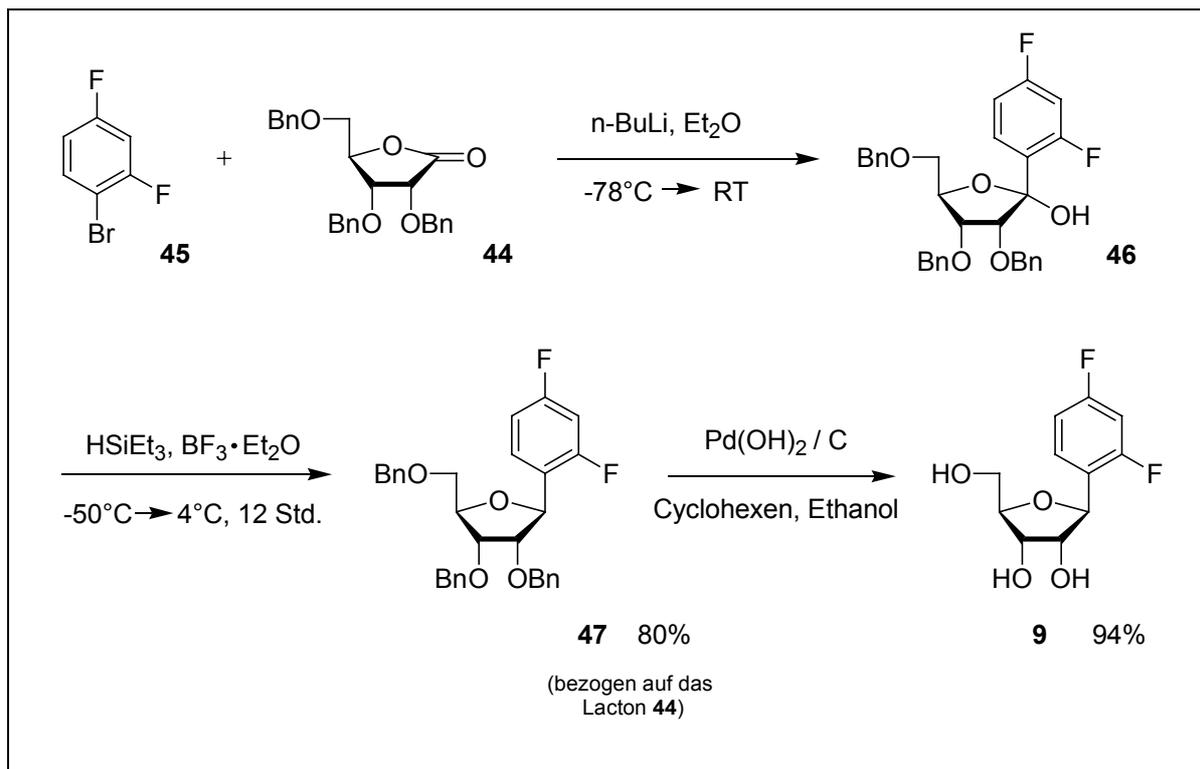


Abbildung 34: Synthese von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose **9**

Die Reduktion der tertiären Hydroxygruppe des Lactols erfolgt mit Triethylsilan und Bortrifluorid-Etherat (Rolf & Gray, 1982). Die Dehydroxylierung wird durch die Lewisäure  $\text{BF}_3$ , welche die OH-Gruppe komplexiert, ermöglicht. Durch den Angriff des Hydrids auf die Position C1' des Zuckers wird die Verbindung **46** zum Nucleosid **47** dehydroxyliert. Der nucleophile Angriff erfolgt – bedingt durch den anomeren Effekt – von der *re*-Seite aus. Dies führt zu reinen  $\beta$ -Nucleosiden, obwohl während der Dehydroxylierung des Hemiacetals ein planarer Übergangszustand durchlaufen wird (Brückner, 1988). Dass die gewünschten  $\beta$ -Nucleoside tatsächlich vorliegen, konnte anhand von Kristallstrukturanalysen am ungeschützten Nucleosid **9** nachgewiesen werden (Parsch, 2001).

Die Benzylschutzgruppen wurden in einem schonenden Verfahren hydrogenolytisch entfernt (Hanessian, 1981). Dazu wurde das geschützte Nucleosid 2',3',5'-Tri-O-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **47** in Ethanol suspendiert und mit Cyclohexen versetzt. Als Katalysator diente der sog. Pearlman-Katalysator Pd(OH)<sub>2</sub> auf Aktivkohle (Pearlman, 1967). Es handelt sich hierbei um eine Transfer-Hydrogenolyse, bei der Cyclohexen als Wasserstoff-Donor dient. Das Nucleosid 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** konnte in 94%iger Ausbeute dargestellt werden.

### 7.1.3 *Unterschiedliche Schutzgruppenstrategien (TOM / TBDMS) und Synthese der Phosphoramidite der Nucleoside 8 und 9*

Zur Synthese eines in der RNA-Festphasensynthese kupplungsfähigen Bausteines müssen zunächst die 5'- und die 2'-Hydroxygruppen orthogonal geschützt werden. Anschließend erfolgt die Phosphitylierung zum Phosphoramidit.

#### *Dimethoxytritylierung der 5' OH-Funktion*

Als Standardschutzgruppe in der Nucleosidchemie für die 5'-Position hat sich die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe etabliert. Diese kann in guten Ausbeuten eingeführt werden und während der Oligonucleotid-Festphasensynthese schnell und effizient mit Trichloressigsäure (TCA) abgespalten werden. Dabei wird die Menge an abgespaltenem Tritylkation detektiert und zur Verfolgung der Kupplungsausbeute und -effizienz herangezogen (siehe Kapitel 8.1).

Die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe wird bei Raumtemperatur in Pyridin und Triethylamin eingeführt (*Abbildung 35*; Smith, 1962; Schaller, 1963). Aufgrund der hohen Reaktivität des primären 5'-Alkohols erfolgt die Reaktion selektiv an dieser Position. Das bei der Reaktion entstehende HCl wird durch den Überschuss an Pyridin abgepuffert. Beide Nucleoside 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **48** und 5'-O-(4,4'-Dimethoxy-

triphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **49** konnten in sehr guten Ausbeuten von 89% bzw. 87% hergestellt werden.

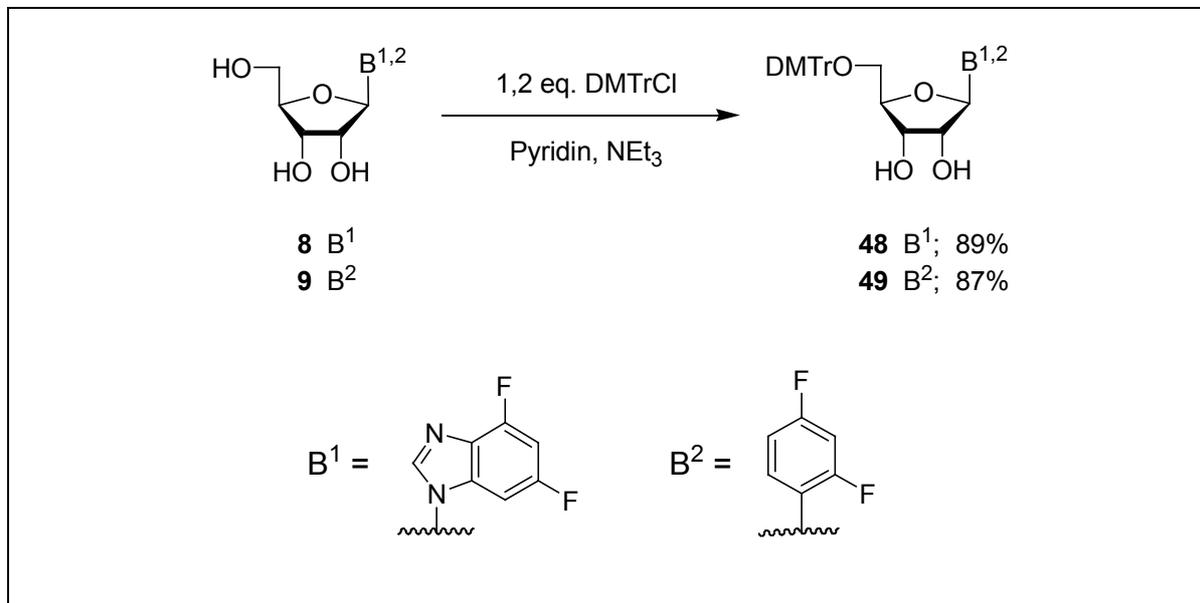


Abbildung 35: Synthese der tritylierten Verbindungen 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **48** und 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **49**.

### Die TBDMS-Schutzgruppe

Zur Protektion der 2'-Hydroxygruppe während der RNA-Festphasensynthese werden i.a. Silylschutzgruppen verwendet (Ogilvie, 1974 & 1978). Diese können nach erfolgter Oligoribonucleotidsynthese mit Fluoridionen abgespalten werden (zur RNA-Festphasensynthese und der Aufreinigung von Oligonucleotiden siehe Kapitel 8 und 12. In den letzten Jahren hat sich die *tert.*-Butyldimethylsilyl(TBDMS)-Gruppe als Standard in der Phosphoramiditchemie durchgesetzt.

Zur Synthese 2'-TBDMS-geschützter Nucleoside werden die 5'-geschützten Nucleoside in einer 1:1-Mischung aus Pyridin und THF gelöst und mit *tert.*-Butyldimethylchlorsilan (1M Lösung in THF) versetzt (Abbildung 36). Dabei entsteht immer ein Gemisch aus dem 2'- und 3'-Regioisomer, meist zu Ungunsten des gewünschten 2'-geschützten Produktes. Der Zusatz von Silbernitrat bewirkt eine Steigerung des Anteils an 2'-O-*tert.*-Butyldimethylsilyl-substituiertem Produkt (Hakimelahi, 1982). Zudem ermöglicht das *cis*-Diol-System der Ribose eine

Wanderung der Schutzgruppe von der 2'-Position zur thermodynamisch günstigeren 3'-Position (Jones & Reese, 1979). Dies wird vor allem in polaren Lösungsmitteln beobachtet und trägt zu deutlichen Ausbeuteverlusten bei.

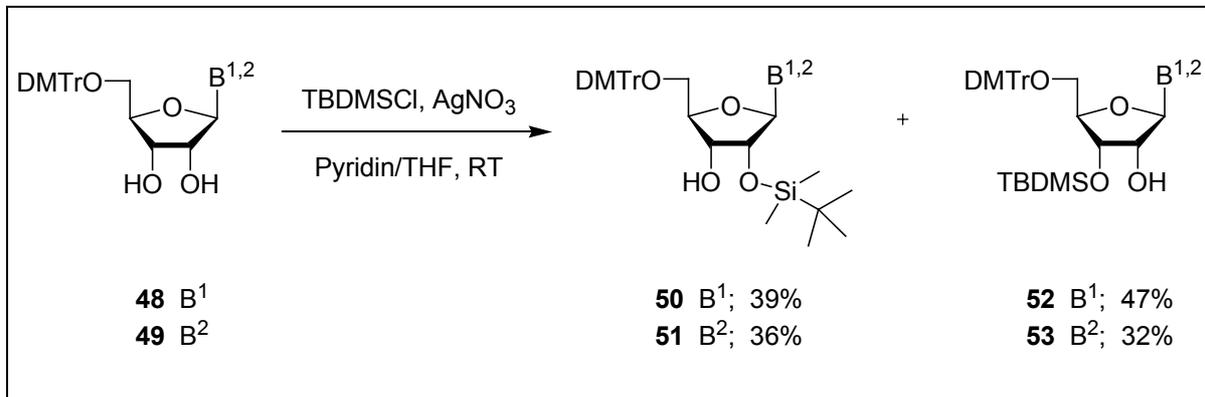


Abbildung 36: Einführung der TBDMS-Schutzgruppe; B<sup>1</sup> = 4,6-Difluorbenzimidazol; B<sup>2</sup> = 2,4-Difluorbenzol

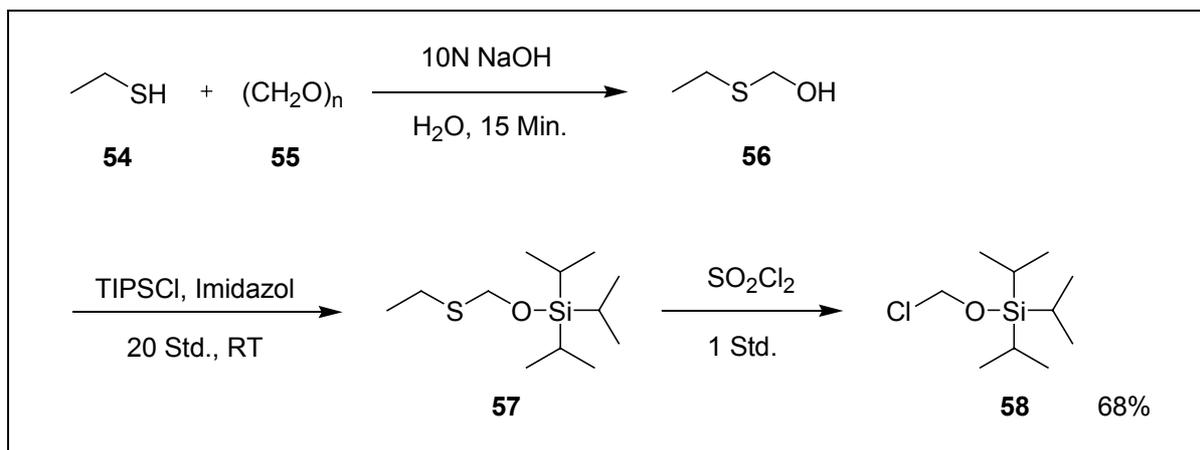
Die Synthese der 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranosen **50-53** war in Gesamtausbeuten von 86% bzw. 68% möglich. Das Verhältnis von 2'- zu 3'-silyliertem Produkt betrug dabei 1:1,2 bzw 1,1:1.

Die Trennung der 2'- und 3'-Regioisomeren war sowohl im Fall des 4,6-Difluorbenzimidazol-Bausteins als auch bei dem 2,4-Difluorbenzol-Baustein nur über präparative HPLC möglich. Die Charakterisierung und Unterscheidung der Isomeren erfolgte durch <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-NMR-Spektroskopie.

#### Die TOM-Schutzgruppe – Synthese, Einführung, Vor- und Nachteile

Aufgrund des im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Nachteils der TBDMS-Schutzgruppe – die postsynthetische Wanderung zwischen 2'- und 3'-Position – wurde die Triisopropoxyethyl(TOM)-Schutzgruppe entwickelt. Der Vorteil dieser von Stefan Pitsch erstmals publizierten Schutzgruppe ist eine acetalische Verknüpfung mit der Ribose (Pitsch, 1998). Diese unterbindet effektiv die Wanderung der Gruppe im *cis*-Diolsystem der Ribose. Aufgrund der Flexibilität der Methyleneinheit kommt es

bei der Festphasensynthese zu erhöhten Kupplungsausbeuten (99-99,5%), da das 3'-O-Phosphoratom nicht sterisch abgeschirmt wird. Mit Hilfe dieser neuartigen Schutzgruppe können bis zu 100mer RNA-Stränge synthetisiert werden. Die TOM-Schutzgruppe ist kompatibel mit den gängigen 5'- und Basenschutzgruppen der Phosphoramiditchemie und aus preiswerten Reagenzien synthetisierbar (*Abbildung 37*). Ihre Darstellung beginnt mit der basenkatalysierten Umsetzung von Ethanthiol **54** mit *para*-Formaldehyd zu einem Hydroxymethylethylthioether **56**, dessen OH-Funktion im folgenden Schritt mit Triisopropylchlorsilan geschützt wird. Das chlorierte Reagenz **58** erhält man durch die *in situ*-Umsetzung mit Sulfurylchlorid. Triisopropylsilyloxymethylchlorid **58** ist eine farblose Flüssigkeit, die durch Destillation im Ölpumpenvakuum aufgereinigt werden kann und in 68%iger Ausbeute isoliert wurde.



*Abbildung 37: Synthese von Triisopropylsilyloxymethylchlorid **58** ausgehend von Ethanthiol **54***

Die Einführung dieser trialkylsubstituierten Silyloxymethyl-Schutzgruppe erfolgt unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart eines Überschusses an tertiärer Aminbase. Zu den in Dichlorethan gelösten, tritylierten Verbindungen 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **48** und 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **49** wurde DIPEA und Dibutylzinnchlorid Bu<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub> gegeben (*Abbildung 38*); nach Zugabe des Reagenzes **58** wurde die Reaktionslösung drei Stunden bei 50°C bzw. 80°C gerührt.

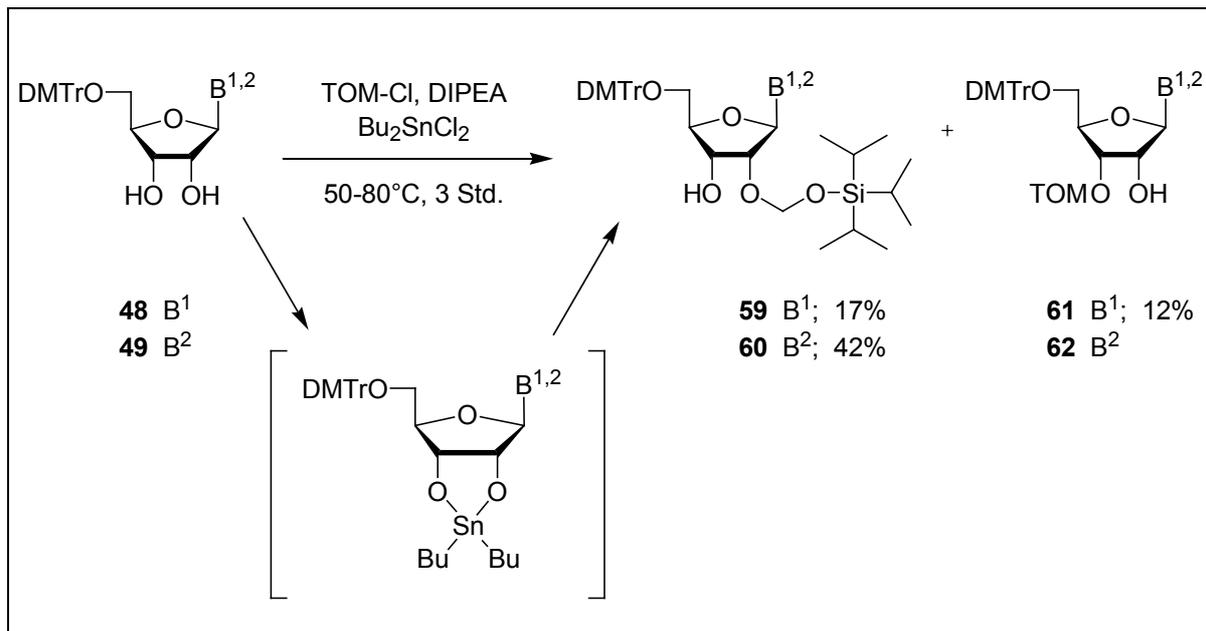


Abbildung 38: Einführung der TOM-Schutzgruppe mit mechanistischer Betrachtung;  $B^1$  = 4,6-Difluorbenzimidazol;  $B^2$  = 2,4-Difluorbenzol

Die Reaktion verläuft über einen zyklischen Übergangszustand, bei dem die Aktivierung des Übergangsmetalls durch Komplexbildung mit dem *cis*-Diol-System der Ribose stattfindet (Zatsepin, 2002). Die anschließende Alkylierung erfolgt bevorzugt an der 2'-Position. Auch hier ist eine HPLC-Aufreinigung notwendig, da die beiden Regioisomere aufgrund ihrer ähnlichen chromatographischen Eigenschaften nur schwer zu trennen sind. Im Falle der 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **59** musste die Trennung mehrmals durchgeführt werden, so dass durch die Ausbeuteverluste kein Vorteil mehr gegenüber der klassischen TBDMS-Schätzung besteht. Zudem führen die erhöhten Temperaturen im Reaktionsverlauf zu Nebenreaktionen und können bei *N*-glycosidisch verknüpften Nucleosiden zur Abspaltung der Nucleobase führen. Die Unterscheidung der Regioisomere erfolgt wie auch bei den TBDMS-geschützten Nucleosiden über  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektroskopie.

### Phosphitylierung

Die Umsetzung der 5'- und 2'-geschützten Nucleoside **50**, **51**, **59** und **60** zu kupplungsfähigen Monomeren, die in der RNA-Festphasensynthese eingesetzt werden können, erfolgt mit 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit. Dieses kann in zwei Substitutionsreaktionen aus  $\text{PCl}_3$ , 3-Hydroxypropionitril und Diisopropylamin hergestellt werden (Sinha, 1983). Zur Synthese der nucleosidischen Phosphoramidite **63-66** (Abbildung 39) wurden die Verbindungen in Acetonitril gelöst, mit Collidin und *N*-Methylimidazol als Aktivator versetzt und auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt. Nach Zugabe des Phosphitylierers wurde zunächst im Eisbad und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Um die Bildung von H-Phosphonaten zu vermeiden, ist darauf zu achten, dass nur kurze Zeit bei Raumtemperatur gerührt wird.

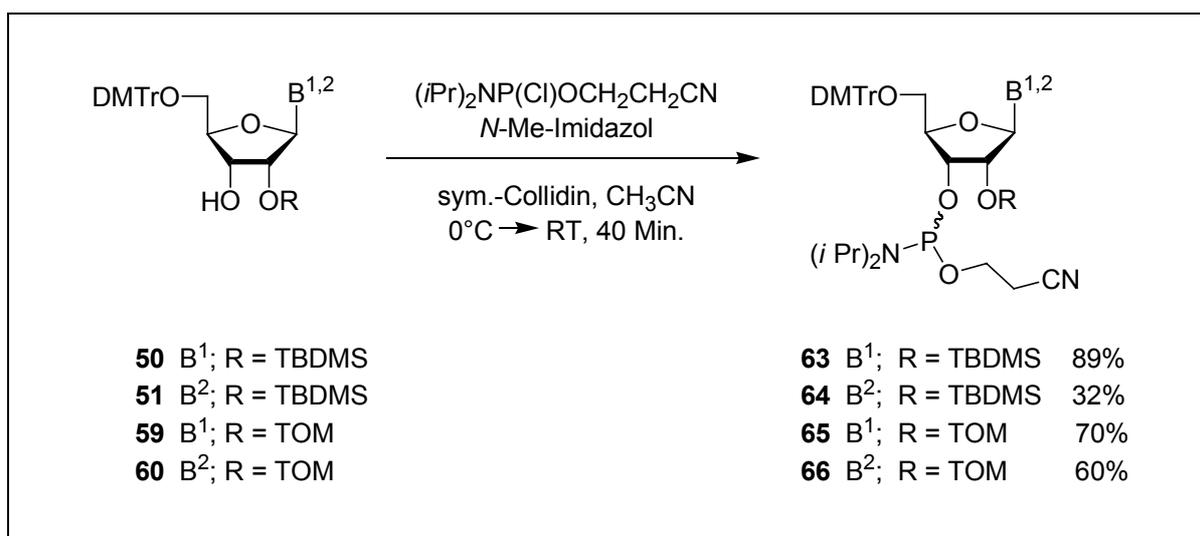


Abbildung 39: Synthese der Phosphoramidite **63-66**, B<sup>1</sup> = 4,6-Difluorbenzimidazol; B<sup>2</sup> = 2,4-Difluorbenzol

Bei der Isolierung des Reaktionsproduktes ist zur Abtrennung des sym. Collidins mit chromatographischen Methoden oft ein zweiter Trennschritt notwendig. Wird bei der Aufarbeitung die organische Phase jedoch mit 0,01M Zitronensäure ausgeschüttelt, geht das Collidin durch Protonierung direkt in die wässrige Phase über (Wozniak, 1997). Die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe ist unter diesen Bedingungen stabil und man erhält bereits vor der säulenchromatographischen Trennung ein relativ sauberes

Rohprodukt. Das gewünschte Phosphoramidit kann dann mit einer kurzen Chromatographie-Säule schnell und effizient isoliert werden.

Bei der Reaktion entstehen als Produkt zwei Diastereomere, welche bei der Aufreinigung über präparative Dünnschichtchromatographie nicht getrennt werden müssen. Beide Isomere können in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Die TBDMS-geschützten Phosphoramidite **63** und **64** konnten in 89% bzw. 32% Ausbeute hergestellt werden, die TOM-geschützten Phosphoramidite **65** und **66** konnten in 70% bzw. 60% Ausbeute synthetisiert werden. Die Charakterisierung der Phosphoramidite erfolgte sowohl über  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie als auch über  $^{31}\text{P-NMR}$  (Abbildung 40 und Abbildung 41)

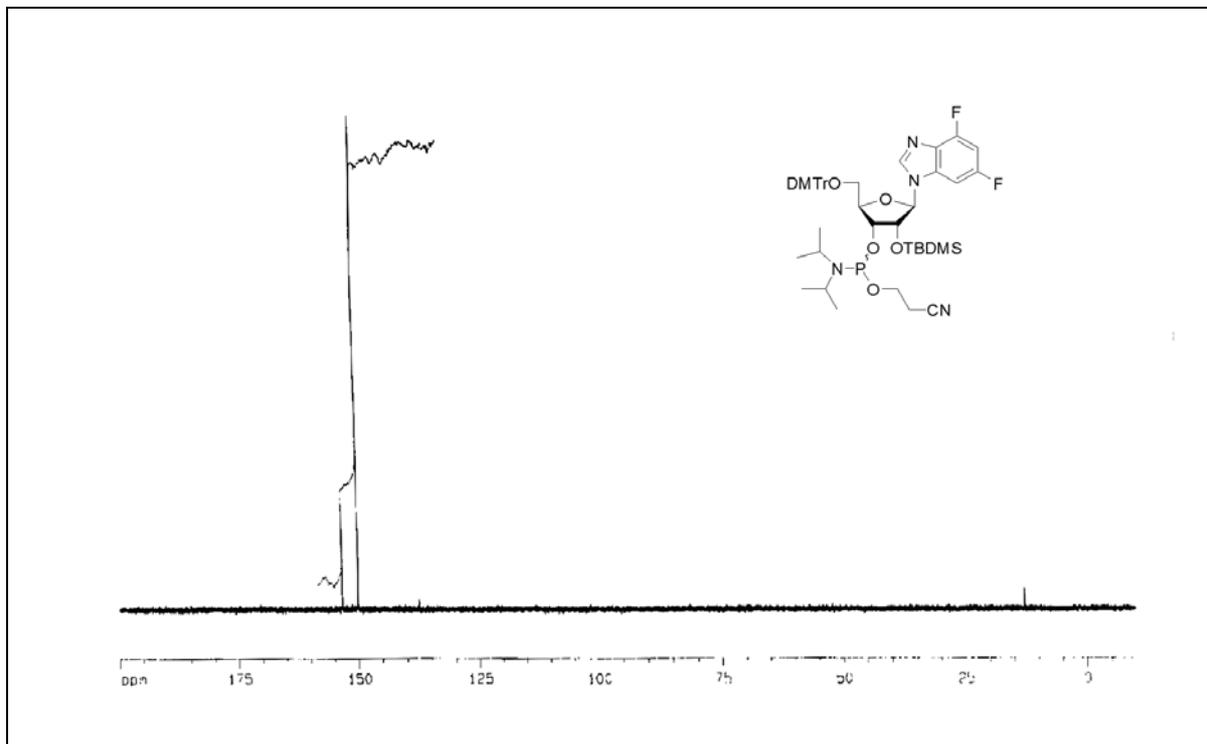


Abbildung 40:  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum von 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-tert.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **63**

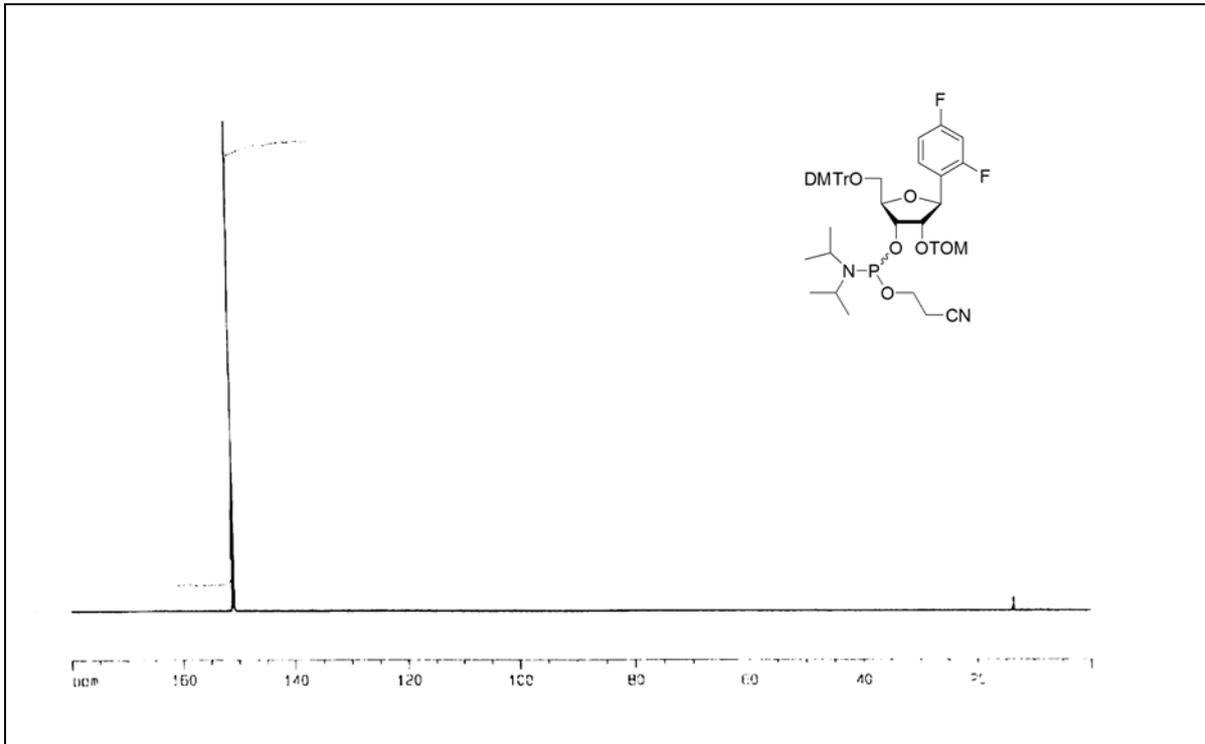
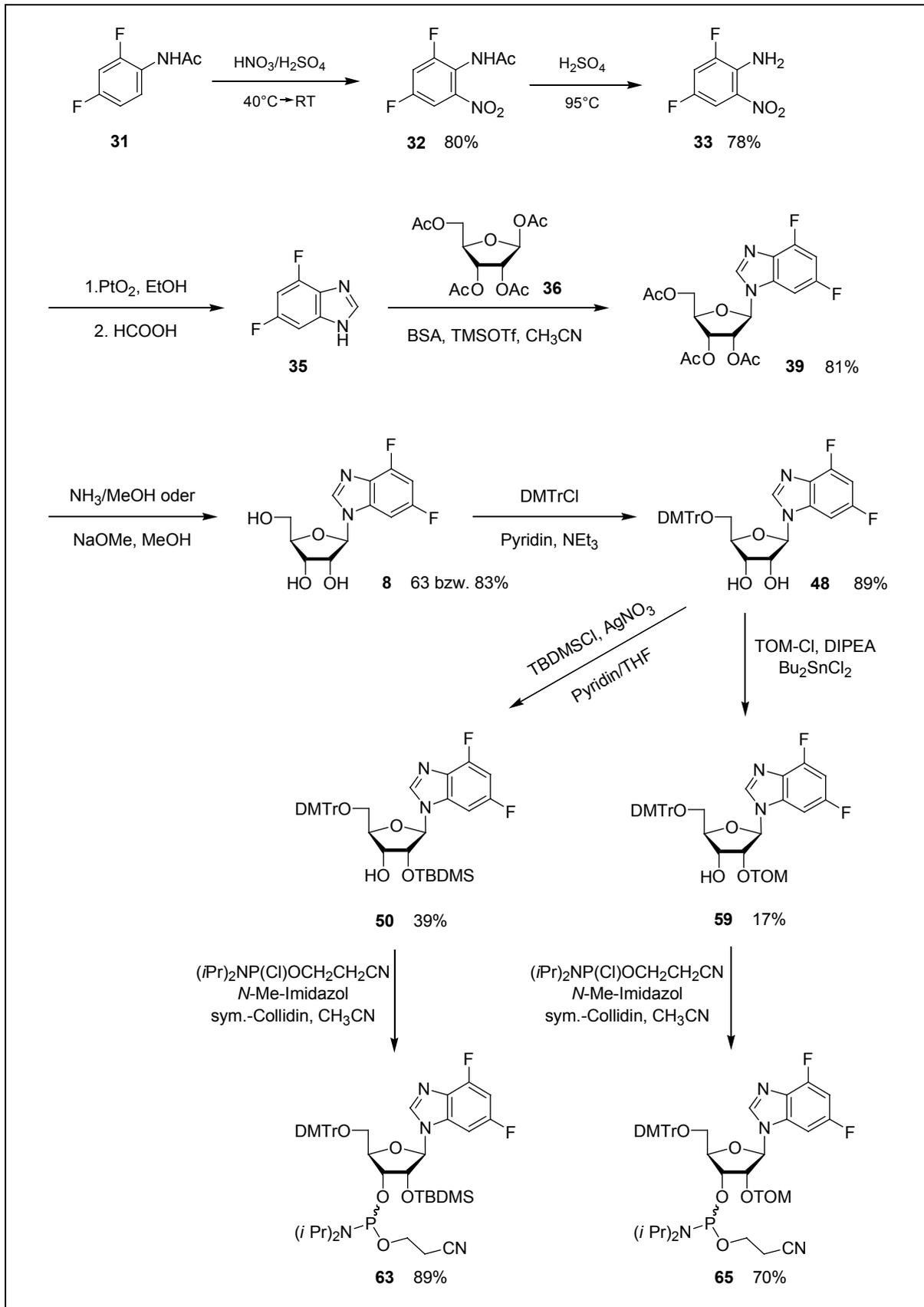
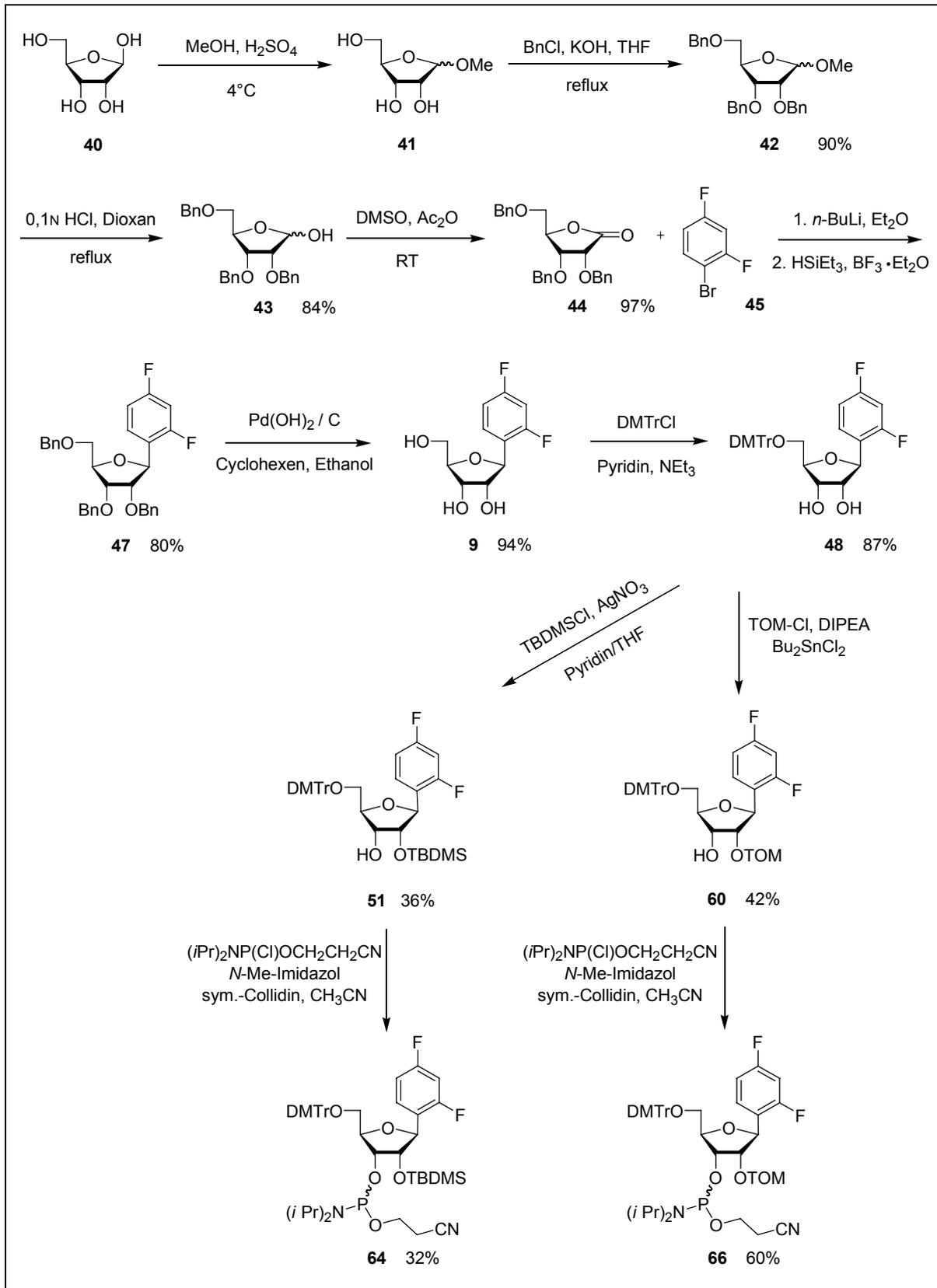


Abbildung 41  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorophenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **66**

### Syntheseübersicht

Zur besseren Übersicht der in Kapitel 7.1 vorgestellten Synthesen ist in *Abbildung 42* der Syntheseweg zu den 4,6-Difluorbenzimidazol modifizierten Amiditen **63** und **65** aufgeführt. *Abbildung 43* beschreibt die Darstellung der 2,4-Difluorbenzol modifizierten Amidite **64** und **66**.

Abbildung 42: Synthese der Phosphoramidite **63** und **65**

Abbildung 43: Synthese der Phosphoramidite **64** und **66**

## 7.2 Darstellung der 2'-Aminoethyl-modifizierten, fluorierten Nucleosidanaloga, ausgehend von den Verbindungen 8 und 9

Die Synthese der 2'-Aminoethyl modifizierten Nucleoside ist ein mehrstufiger Prozeß. Nach der simultanen Schützung der 5'- und 3'-OH-Funktion wird die 2'-Position mit Bromessigsäuremethylester alkyliert. Nach Reduktion zum Alkohol wird dieser in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt. Die Einführung der primären Aminofunktion erfolgt durch die Überführung des Tosylats in ein Azid und nachfolgender Reduktion zum Amin.

### 7.2.1 Synthese der 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl)-modifizierten Nucleosidanaloga 76 und 77

#### *Synthese und Einführung der Markiewicz-Schutzgruppe*

Die selektive Einführung von Schutzgruppen an verschiedenen OH-Funktionen in polyfunktionellen Verbindungen wie Nucleosiden ist von jeher problematisch. W. Markiewicz entwickelte eine auf einem Disiloxan basierende Schutzgruppe, welche die 5'- und 3'-Hydroxygruppe selektiv schützt (Markiewicz, 1979). Damit ist eine gezielte Funktionalisierung der 2'-Position möglich und die Schutzgruppe kann unter milden Bedingungen und in hoher Ausbeute wieder abgespalten werden.

Die Synthese von 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **71** beginnt mit einer klassischen Grignard-Reaktion mit Isopropylbromid **67** und Magnesium in Ether (*Abbildung 44*). Die Umsetzung dieses Grignardreagenzes **68** mit Trichlorsilan und anschließender Hydrolyse liefert das Diisopropylsilanol **69**. Die Reaktion stoppt kinetisch kontrolliert auf der Stufe der Disubstitution, da die Reaktionsgeschwindigkeit der dritten Substitution deutlich verlangsamt ist. Die Darstellung des Disiloxans **70**

erfolgt durch Dimerisierung des Silanols **69** unter Abspaltung von H<sub>2</sub>O. Die Kondensationsreaktion wird bei 100°C über Molsieb durchgeführt und anschließend im Membranpumpenvakuum fraktioniert destilliert (105°C, 25mbar). Das Produkt wurde mit 85%iger Ausbeute als farblose Flüssigkeit erhalten. Zur Chlorierung von 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan **70** muss zunächst eine an Cl<sub>2</sub>-gesättigte Tetrachlorkohlenstoff-Lösung hergestellt werden. Dies erfolgt durch Einleiten von trockenem Chlorgas in Tetrachlorkohlenstoff bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30 Minuten. Die gelbe Lösung wird im Anschluss so lange zu dem 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan **70** getropft bis die entstehende Gelbfärbung der Reaktionslösung auch nach längerem Rühren nicht mehr verschwindet. 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **71** konnte im Ölpumpenvakuum aufgereinigt und in 81% Ausbeute als farblose Flüssigkeit isoliert werden.

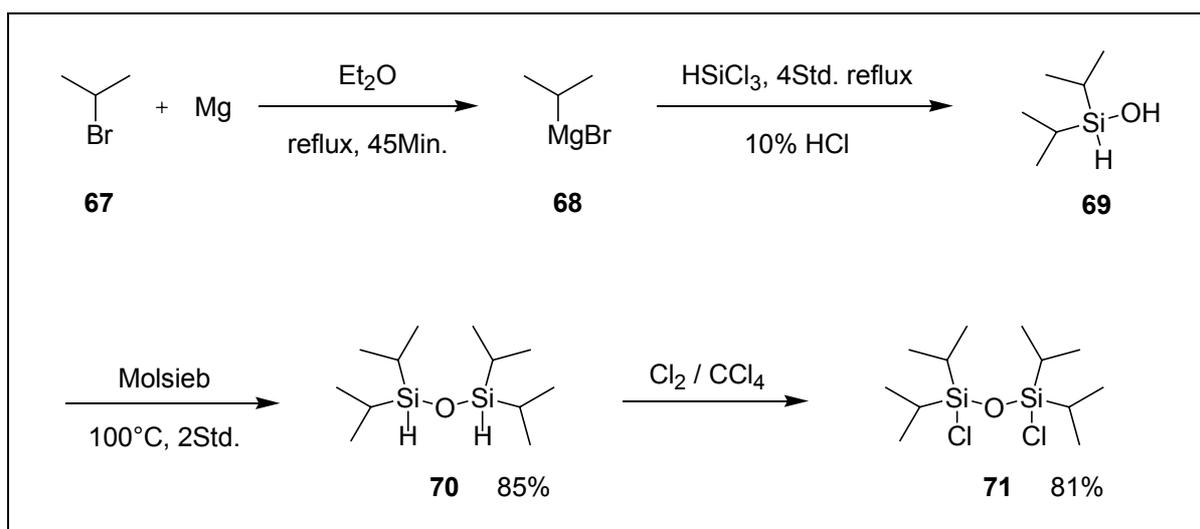


Abbildung 44: Synthetischer Zugang zu 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **71**

Die Einführung der Markiewicz-Schutzgruppe zur simultanen Schützung der 5'- und 3'-Hydroxyfunktion in Nucleosiden erfordert gut getrocknete Edukte und Reagenzien. Die unter Schutzgas durchgeführte Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur in Gegenwart von Pyridin (Brotschi, 2001). Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie sollte zügig erfolgen, um die Bildung von Isomeren zu unterbinden. Die mit 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan 3'- und 5'-geschützten Nucleoside **72** und **73** wurden in einer Ausbeute von 92% bzw. 88% erhalten (Abbildung 45). Als Alternative zu Pyridin kann als Lösungsmittel auch DMF unter Zusatz der Base Imidazol verwendet werden. Die

Markiewicz-Schutzgruppe ist unter leicht sauren (10% TFA in  $\text{CHCl}_3$  oder 0,3M TsOH in Dioxan) und unter basischen Bedingungen (5M  $\text{NH}_3$  in Dioxan/Wasser oder tertiäre Amine) stabil. Sie kann schnell und effizient durch Fluorid-Ionen, meistens durch Zugabe einer Lösung von TBAF in THF, innerhalb weniger Minuten quantitativ abgespalten werden (Markiewicz, 1979).

Eine Erhöhung der Stabilität dieser Schutzgruppe kann durch den Ersatz des verbrückenden Sauerstoffs im Disiloxan durch eine Methyleneinheit erreicht werden (Chow, 2003). Durch das Fehlen des induktiven Effektes ist die Schutzgruppe so stabil, dass sie zur Abspaltung mehrere Stunden bei erhöhter Temperatur mit Fluoridionen behandelt werden muss. Als weitere Alternative zur Markiewicz-Schutzgruppe kann auch eine Di(*tert.*-butyl)silandiylgruppe, die ähnliche Eigenschaften aufweist, verwendet werden (Furusawa, 1993; Sekine, 1995).

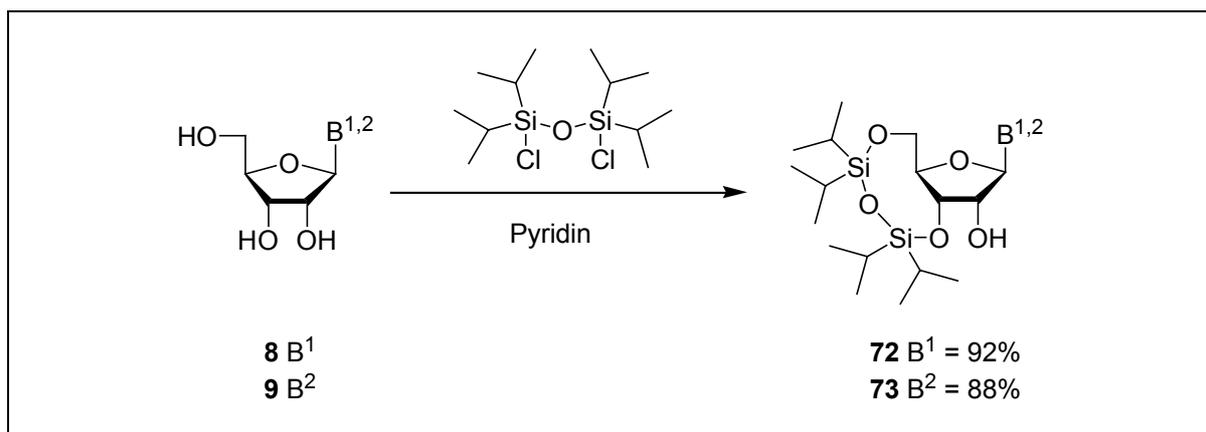


Abbildung 45: Synthese der mit der Markiewicz-Gruppe geschützten Nucleoside **72** und **73**; B<sup>1</sup> = 4,6-Difluorbenzimidazol; B<sup>2</sup> = 2,4-Difluorbenzol

### 2'-Alkylierung und Darstellung der 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl)-modifizierten Nucleoside

Die Modifizierung der 2'-Position der Zuckereinheit von Ribonucleosiden ist von genereller Bedeutung für die RNA-Chemie, da auf diese Weise eine erhöhte Resistenz der entsprechenden Oligonucleotide gegenüber Nucleasen erreicht werden kann. Der synthetische Zugang zu 2'-modifizierten Nucleosiden wurde bereits im Kapitel 3.2 erläutert.

Die Alkylierung der 4,6-Difluorbenzimidazol- und der 2,4-Difluorbenzol-modifizierten Nucleosidanaloga geht von den mit der Markiewicz-Gruppe geschützten Verbindungen **72** und **73** aus. Die Alkylierung der 2'-Position ist aufgrund ihrer geringen Reaktivität nicht trivial. Dies wird auch durch die bereits erwähnte Wanderung der TBDMS-Silylschutzgruppen im *cis*-Diol-System der Ribose belegt (vgl. Kapitel 7.1.3). Für die Einführung der Alkylseitenkette bedient man sich daher der Reaktivität eines  $\alpha$ -Brom substituierten Esters (Cuenoud, 1998). Zur Deprotonierung der Hydroxygruppe hat sich die Verwendung starker Basen wie Natriumhydrid oder Kaliumhydroxid bewährt (Zatsepin, 2002). Zur direkten Umsetzung zum 2'-O-Alkylribonucleosid ist eine Bromalkyl-verbindung nicht reaktiv genug. Der Einsatz des Bromessigsäuremethylesters ermöglicht durch die Anwesenheit der stark elektronenziehenden Gruppen im Molekül eine Reaktion bei Raumtemperatur. Der nucleophile Angriff des C2'-Sauerstoffatoms an die Methyleneinheit des Esters erfolgt unter Abspaltung des Bromrestes.

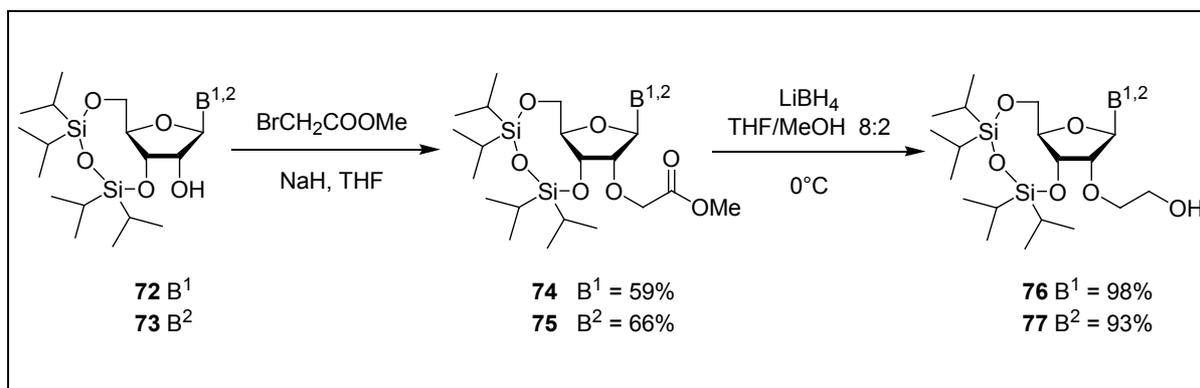


Abbildung 46: Synthese der 2'- $\beta$ -Hydroxyethyl modifizierten Nucleosidanaloga **76** und **77**;  $B^1$  = 4,6-Difluorbenzimidazol;  $B^2$  = 2,4-Difluorbenzol

Die 2'-alkylierten Verbindungen **74** und **75** wurden durch Reaktion der Edukte **72** und **73** mit je 1,3 Äquivalenten NaH und 3 Äquivalenten Bromessigsäuremethylester in THF bei Raumtemperatur erhalten (Abbildung 46). Sie konnten in guten Ausbeuten von 59% bzw. 66% erhalten werden. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur und des Überschusses an Reagenzien sowie eine längere Reaktionszeit konnte die Ausbeute nicht weiter erhöhen. Die mögliche Bildung von NaOH bei der wässrigen Aufarbeitung aus nicht abreagiertem Natriumhydrid muss bereits vor der Alkylierung bei der Wahl der Schutzgruppe berücksichtigt werden. Die Trennung des Produktes von nicht

abreagiertem Edukt erforderte zwei chromatographische Trennschritte, da der Unterschied in den  $R_f$ -Werten in beiden Fällen nur sehr gering war.

Ein Vorteil dieser Reaktion ist, dass keine Bildung von Nebenprodukten zu beobachten ist, so dass nicht abreagiertes Edukt wieder isoliert und wiederverwendet. Da Natriumhydrid an Luft sehr empfindlich ist und sich bei hoher Luftfeuchtigkeit entzünden kann, ist bei Umgang mit diesem Reagenz Vorsicht geboten. Zudem ist die Haltbarkeit des Hydrids begrenzt.

Durch die Einführung des Esters ist eine anschließende Reduktion zum primären Alkohol notwendig. Diese Transformation kann durch komplexe Hydridlieferanten wie  $\text{LiBH}_4$  leicht erreicht werden. Dabei findet eine nucleophile Addition des Hydrids an den elektrophilen Carbonylkohlenstoff statt (Vollhardt, 1992). Zunächst kommt es zu einer Komplexierung der Carbonylfunktion durch das Lithiumkation. Die Natur des Metallkations ist hierbei entscheidend.  $\text{Li}^+$  ist ein besserer Lewisäure-Komplexbildner als  $\text{Na}^+$ ; daher ist auch  $\text{LiBH}_4$  ein stärkeres Reduktionsmittel als  $\text{NaBH}_4$  (Carey & Sundberg, 1990). Nach Übertragung des Hydridanions auf den Carbonylkohlenstoff kann in protischen Lösungsmitteln der Alkohol aus einem Proton z.B. des Methanols gebildet werden. Die wässrige Aufarbeitung mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung führt zum Auflösen eventuell ausgefallener Borsalze.

Die Verbindungen **74** und **75** konnten durch einen hohen Überschuss an Lithiumborhydrid (8 eq.) bei  $0^\circ\text{C}$  in einem THF/Methanol-Gemisch reduziert werden. 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **76** und 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **77** konnten in 98%iger bzw. 93%iger Ausbeute als weißer Feststoff dargestellt werden.

### 7.2.2 Synthese der 2'-O-( $\beta$ -Aminoethyl)-modifizierten Nucleosidanaloga **82** und **83**

Ausgehend von den beiden 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl)-modifizierten Verbindungen **76** und **77** wurden die primären Alkoholfunktionen in einer im folgenden beschriebenen, dreistufigen Reaktionskaskade in Aminogruppen überführt (*Abbildung 47*).

Um die OH-Funktion der 2'-O-Hydroxyethyl-Seitenkette in eine gute Abgangsgruppe zu überführen, wurde diese in ein Tosylat umgewandelt. *p*-Toluolsulfonsäureester gelten als sehr gute Abgangsgruppen in nucleophilen Substitutionsreaktionen. Die beiden 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl)-modifizierten Verbindungen **76** und **77** wurden in Dichlormethan gelöst und mit *N,N'*-Dimethylaminopyridin (DMAP), Triethylamin und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt. Trotz leichter Gelbfärbung beider Reaktionslösungen konnten die gewünschten Produkte 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-[ $\beta$ -(*para*-toluolsulfonsäure)ethyl]- $\beta$ -D-ribofuranose **78** und 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-[ $\beta$ -(*para*-toluolsulfonsäure)ethyl]- $\beta$ -D-ribofuranose **79** in 86% bzw. 59% Ausbeute isoliert werden.

Die Tosylierung kann auch unter mildereren Bedingungen stattfinden: Neben der beschriebenen Reaktionsführung kann das System  $K_2CO_3/CH_3CN$  zur Deprotonierung verwendet werden (Koole, 1998). Die Tosylierung findet dann allerdings bei 60°C statt. Die Methode nach Sakata setzt die stärkere Base Triethylamin ein, um den Alkohol bei Raumtemperatur in eine gute Abgangsgruppe transformieren zu können (Sakata, 1982).

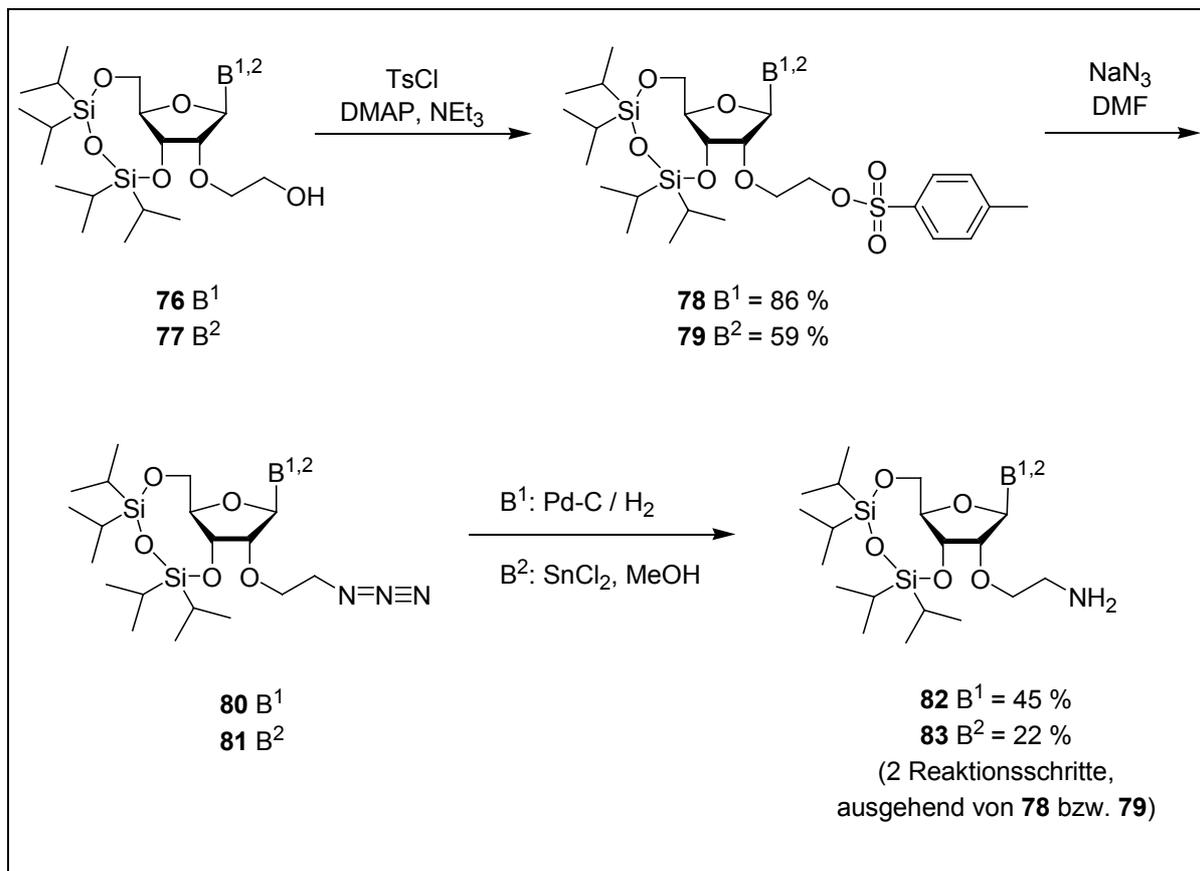


Abbildung 47: Synthese der 2'- $\beta$ -Aminoethyl modifizierten Nucleosidanaloga **82** und **83**; B<sup>1</sup> = 4,6-Difluorbenzimidazol; B<sup>2</sup> = 2,4-Difluorbenzol

Bei der anschließenden Reaktion zum Azid handelt es sich um eine nucleophile Substitution. Die Reaktion wurde mit Natriumazid in DMF bei 55°C bzw. 60°C durchgeführt. Aufgrund der hohen Polarität des Azidrestes kann das Produkt nur schwer säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Da die Umsetzung von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-[ $\beta$ -(para-toluolsulfonsäure)ethyl]- $\beta$ -D-ribofuranose **78** und von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-[ $\beta$ -(para-toluolsulfonsäure)ethyl]- $\beta$ -D-ribofuranose **79** laut DC-Kontrolle jedoch glatt verlief, wurde in beiden Fällen direkt mit dem Rohprodukt weitergearbeitet. Nur ein geringer Anteil wurde für die Charakterisierung aufgereinigt. Durch die Einführung des Azids wird der für das primäre Amin benötigte Stickstoff in die Alkylkette eingeführt. Durch Verwendung des Azids ist auch gewährleistet, dass es bei der Einführung des Stickstoff-Nucleophils nicht zu einer mehrfachen Alkylierung kommt.

Zur Reduktion des Azids steht eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen zur Verfügung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zunächst die Umsetzung zum primären Amin mit Zinndichlorid durchgeführt. Die katalytische Hydrierung (Pd/C) hat sich jedoch als effektivere und leichter durchzuführende Variante erwiesen. Beide Verfahren werden im folgenden näher erläutert (*Abbildung 47*).

Die Umsetzung der Verbindungen **80** und **81** erfolgte jeweils mit SnCl<sub>2</sub> in Methanol. Obwohl das Azid ohne Nebenreaktionen reduziert wurde, traten bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes durch die entstandenen zinnorganischen Verbindungen erhebliche Ausbeuteverluste auf. Diese behinderten die Phasentrennung beim Extrahieren der Reaktionslösung. Durch die Verwendung von Hyflo SuperCel, einer speziell beschichteten Filtrationshilfe, welche die Abtrennung von metallorganischen Verbindungen ermöglicht, konnten die durch dieses Problem entstandenen Ausbeuteverluste verringert werden. Die gewünschten Produkte **82** und **83** konnten in 39%iger bzw. 22%iger Ausbeute - ausgehend von den tosylierten Verbindungen **78** und **79** - erhalten werden.

Um die gewünschten Nucleoside 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β-aminoethyl)-β-D-ribofuranose **82** und 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-(β-aminoethyl)-β-D-ribofuranose **83** in besseren Ausbeuten zu erhalten, wurde die Reduktion des Azids auch mittels katalytischer Hydrierung durchgeführt.

Im Falle des 4,6-Difluorbenzimidazol modifizierten Nucleosids wurde die Verbindung in einem 1:1 Gemisch aus THF und Methanol gelöst, mit Palladium auf Aktivkohle (Pd-C) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre vier Stunden bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde über Celite<sup>®</sup> Filtergel abgesaugt. Die Verbindung 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β-aminoethyl)-β-D-ribofuranose **82** konnte in 45%iger Ausbeute erhalten werden. Die ESI-Massenspektren der beiden 2'-O-Aminoethyl modifizierten Verbindungen **82** und **83** sind in *Abbildung 48* aufgeführt.

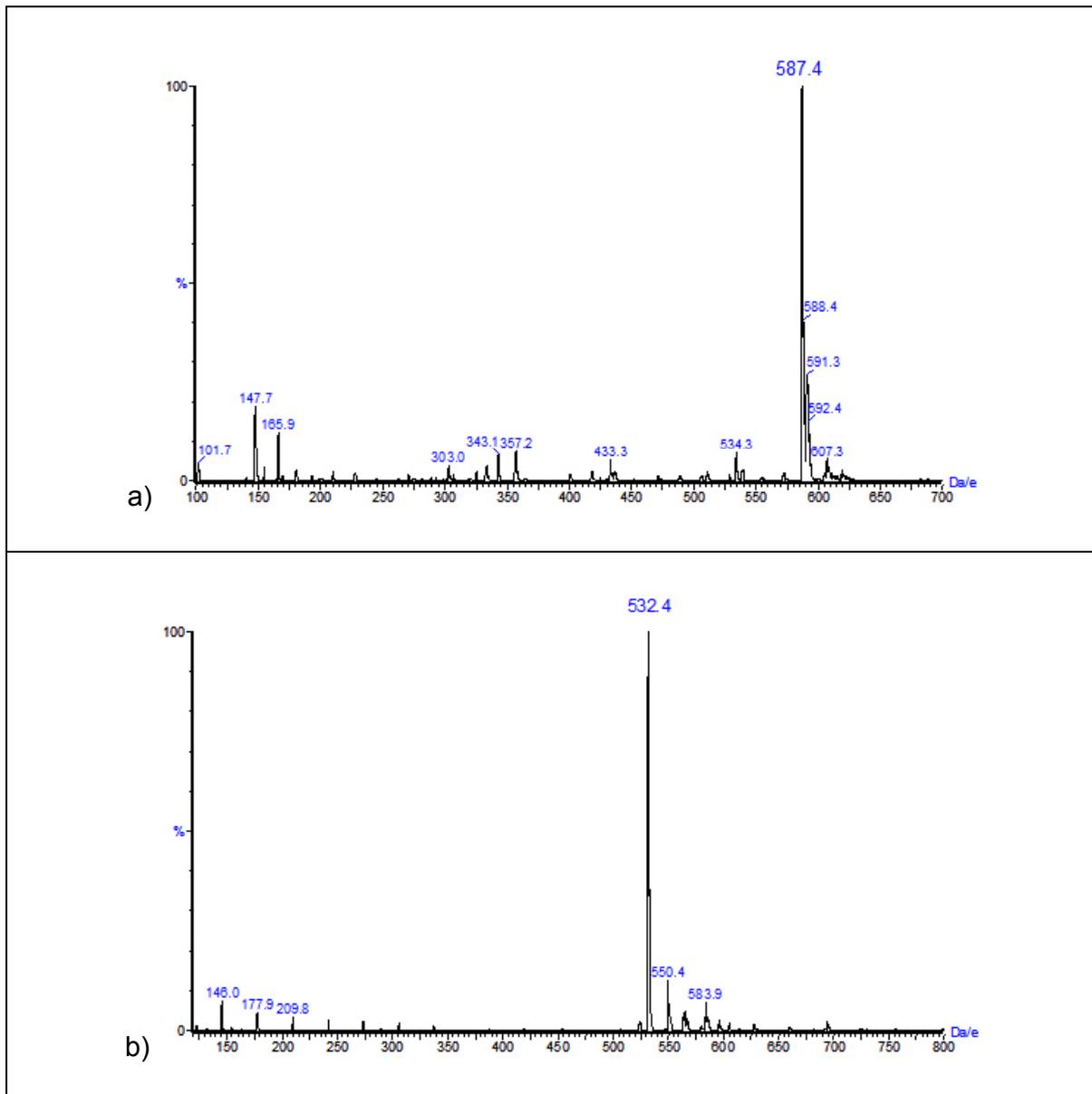


Abbildung 48: ESI-Spektren a) Verbindung **82**, b) Verbindung **83**

Aufgrund der im folgenden Unterkapitel erläuterten Optimierungen des Syntheseweges wurde auf die katalytische Hydrierung des 2,4-Difluorbenzol modifizierten Nucleosids verzichtet.

Bei beiden Reaktionswegen - Reduktion des Azids mit Zinndichlorid in Methanol und katalytische Hydrierung - mussten Ausbeuteverluste in Kauf genommen werden, die durch das "Schmierern" des primären Amins auf der Chromatographiesäule entstanden sind.

Die erhaltenen, 2'-Aminoethyl modifizierten Verbindungen 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -aminoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **82** und 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -aminoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **83** mussten nun durch eine geeignete Schutzgruppenstrategie in die entsprechenden Phosphoramidite überführt werden. Parallel zu den vorgestellten Reaktionen wurde versucht den Syntheseweg zu verkürzen. Durch die Anwendung einer Mitsunobu-Reaktion unter gleichzeitiger Änderung der Schutzgruppenstrategie ist dies effektiv gelungen. Der synthetische Aufwand wurde dadurch deutlich reduziert und vier lineare Reaktionsschritte konnten zu einer Reaktion zusammengefasst werden.

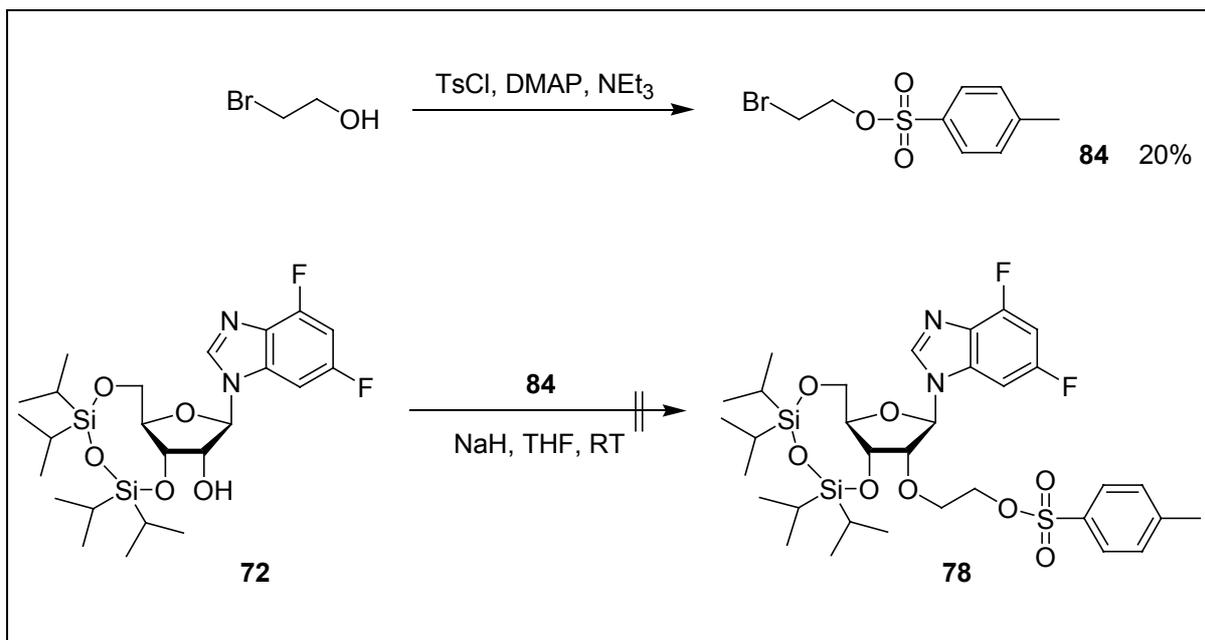
### 7.3 Optimierung der Synthesestrategie

Zur Optimierung und Verkürzung des Syntheseweges wurden zunächst Versuche unternommen, die 2'-O-Position direkt mit einem substituierten Bromethanol zu alkylieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Umsetzung der  $\beta$ -Hydroxyethyl modifizierten Verbindungen unter Mitsunobu-Bedingungen wesentlich effektiver ist, insbesondere die Reaktion mit Phthalimid, welches gleichzeitig als Schutzgruppe für das primäre Amin während der Oligonucleotidsynthese verwendet werden kann.

#### 7.3.1 Direkte Kupplung der 2'-Alkylseitenkette

Der Versuch zur direkten Alkylierung der 2'-O-Position wurde mit 2-Bromethyl-*para*-toluolsulfonsäureester **84** durchgeführt. Dieses geminal bifunktionale Reagenz gilt als sehr reaktiv und kann aus 2-Bromethanol dargestellt werden (Edgell, 1955; Hahn, 1988). Die Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin. Zur Tosylierung des Alkohols wurde zunächst *p*-Toluolsulfonsäurechlorid bei 0°C in Pyridin gerührt, um die Bildung des *p*-

Toluolsulfonylpyridiniumchlorids zu ermöglichen. Dieses ermöglicht die sog. "nucleophile Katalyse" der Reaktion und erleichtert den Angriff des Alkohols auf die *p*-Toluolsulfonsäure-Gruppe. Das gewünschte Produkt 2-Bromethyl-*para*-toluolsulfonsäureester **84** konnte isoliert und charakterisiert werden, jedoch nur in 20%iger Ausbeute (*Abbildung 49*). Zur direkten Alkylierung der 2'-Position wurden die gleichen Reaktionsbedingungen gewählt wie auch schon zur Einführung des Bromessigsäureethylesters. Ausgehend von der 3',5'-O-Markiewicz geschützten Verbindung **72** wurde die Reaktionslösung nach Zugabe von THF, Natriumhydrid und 2-Bromethyl-*para*-toluolsulfonsäureester **84** bei Raumtemperatur gerührt. Es konnte keine Reaktion beobachtet werden. Trotz langer Reaktionszeit wurde das gewünschte Produkt 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-[ $\beta$ -(*para*-toluolsulfonsäure)ethyl]- $\beta$ -D-ribofuranose **78** nicht erhalten.



*Abbildung 49: Synthese des 2-Bromethyl-*para*-toluolsulfonsäureesters **84** und der Versuch einer direkten 2'-O-Alkylierung*

### 7.3.2 Umsetzung der 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl) modifizierten Verbindungen unter "Mitsunobu-Bedingungen"

Eine weitere Möglichkeit der Verkürzung des Syntheseweges ergibt sich aus der Umsetzung der 2'-O-( $\beta$ -Hydroxyethyl) modifizierten Verbindungen unter "Mitsunobu-Bedingungen". Zunächst wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Umwandlung des Alkohols zum Azid getestet. Die erfolgreiche Einführung einer Phthalimidgruppe, erwies sich jedoch als optimal: Mit einem einzigen Reaktionsschritt konnte hier der Stickstoff eingeführt, eine geeignete Schutzgruppe für die Festphasensynthese aufgezogen und der Syntheseweg um vier Schritte verkürzt werden!

Die "Mitsunobu-Reaktion" ermöglicht die Substitution eines Alkohols durch ein Nucleophil unter Inversion der Konfiguration (Mitsunobu, 1981). Die Reagenzien Diethylazodicarboxylat **86** (DEAD) und Triphenylphosphin spielen dabei als Redox-System eine entscheidende Rolle.

Diethylazodicarboxylat **86** und Triphenylphosphin bilden unter Protonierung ein quartäres Phosphoniumsalz (*Abbildung 50*). Als Nucleophil dient hierbei das Phthalimid, welches in einem späteren Reaktionsschritt mit der 2'-O-Ethyl-Seitenkette des Nucleosids reagiert. Im nächsten Schritt reagiert das Phosphoniumsalz mit dem Alkohol **77** unter Abspaltung eines Hydrazindiethyldicarboxylats. Dieser Komplex führt durch Abspaltung von Triphenylphosphinoxid zum Produkt **85**.

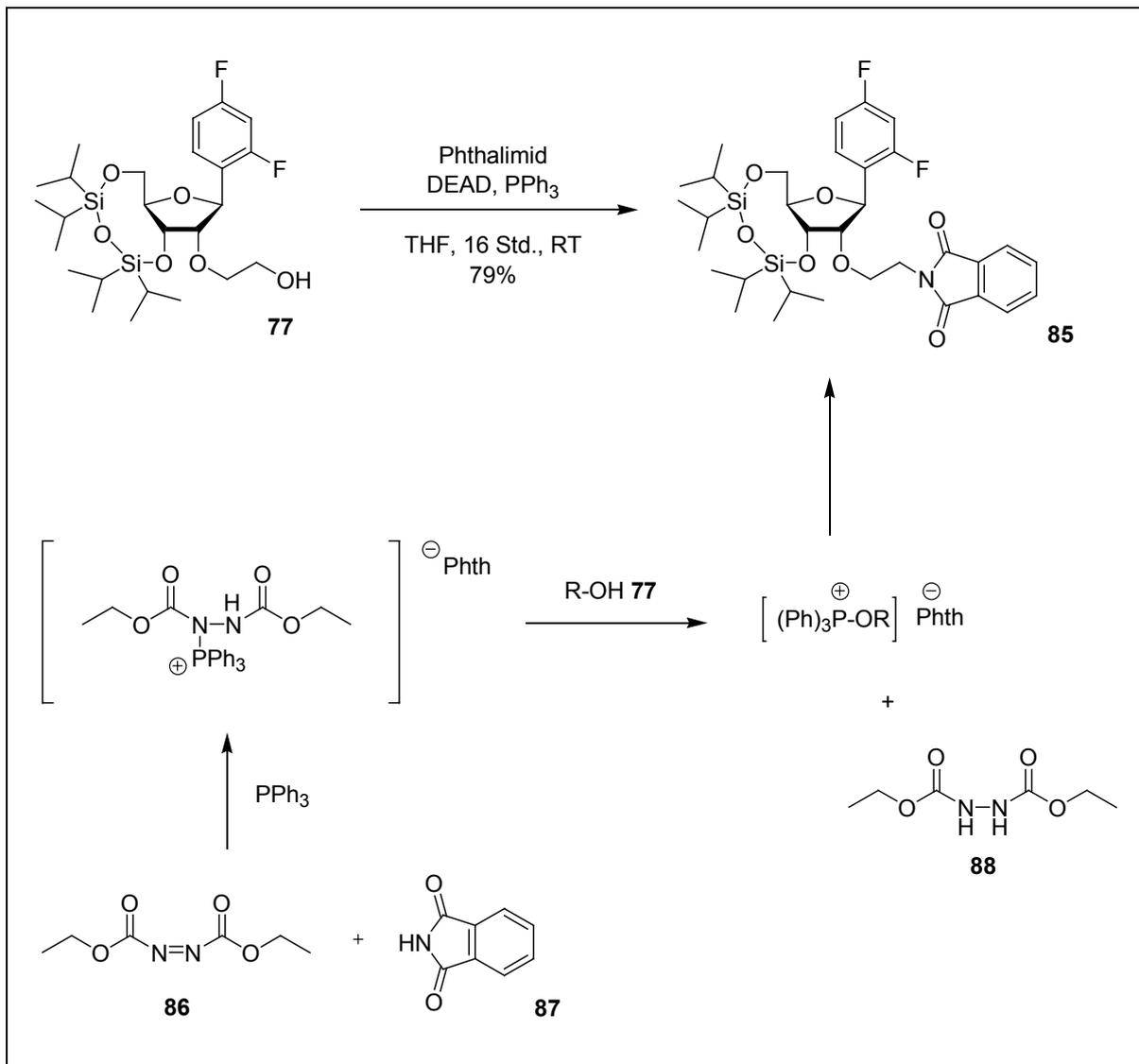


Abbildung 50: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion am Beispiel der 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-(β-N-phthalimidoethyl)-β-D-ribofuranose **85**

Die treibende Kraft der Reaktion ist die Bildung der Phosphor-Sauerstoff-Bindung im Triphenylphosphinoxid. Diese Redoxreaktion beinhaltet die Umwandlung einer Phosphor(III)- in eine Phosphor(V)-Verbindung. Als Alternative zu DEAD steht das wesentlich stabilere Diisopropylazodicarboxylat zur Verfügung, welches jedoch nicht so reaktiv ist. Die "Mitsunobu"-Reaktion verläuft am Reaktionszentrum (in diesem Fall das β-C-Atom der Ethylengruppe der 2'-O-Seitenkette) unter Inversion der Konfiguration.

Diese Reaktion wurde am 2,4-Difluorbenzol-Baustein **77** sowohl mit Natriumazid als auch mit Phthalimid durchgeführt (*Tabelle 4*). In beiden Fällen konnte das gewünschte Produkt in hoher Ausbeute erhalten werden. Durch die relativ schwierige Abtrennung des Triphenylphosphinoxids mussten jedoch geringe Ausbeuteverluste hingenommen werden. Der große Vorteil des Einsatzes der Phthalimido-Schutzgruppe ist, dass diese unter den Bedingungen der Oligonucleotid-Festphasensynthese stabil ist. Zudem kann sie zusammen mit den Basenschutzgruppen postsynthetisch und nahezu quantitativ mit  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$  abgespalten werden.

*Tabelle 4: Durchgeführte "Mitsunobu"-Reaktionen unter Verwendung der Nucleophile Natriumazid und Phthalimid*

<b>Edukt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Produkt</b>	<b>Ausbeute</b>
<b>77</b>	$\text{NaN}_3$	<b>81</b>	78 %
<b>77</b>	Phthalimid	<b>85</b>	79 %
<b>76</b>	Phthalimid	<b>88</b>	81 %

Die Phthalimidschutzgruppe konnte auch bei dem 4,6-Difluorbenzimidazol-Baustein **76** in hohen Ausbeuten (81%) eingeführt werden (*Abbildung 51*). Die Verbindung **88** wurde im Anschluss nicht zum Phosphoramidit umgesetzt, sondern wurde zur Synthese der ungeschützten 2'-Aminoethyl modifizierten Nucleosidanaloga verwendet, deren Zuckerkonformation in mehrdimensionalen NMR-Experimenten bestimmt wurde.

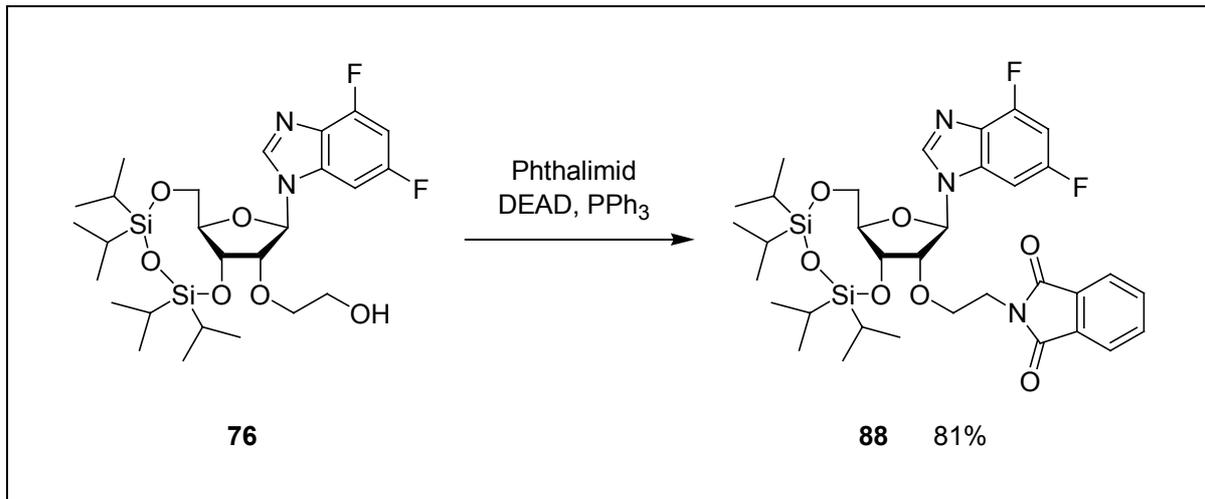


Abbildung 51: Die Mitsunobu-Reaktion am Beispiel der 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorbenzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **76**

#### 7.4 Synthese der Phthalimido- bzw. Trifluoracetyl-geschützten, 2'-Aminoethyl modifizierten fluorierten Benzimidazol- und Benzolnucleosidphosphoramidite **92** und **95**

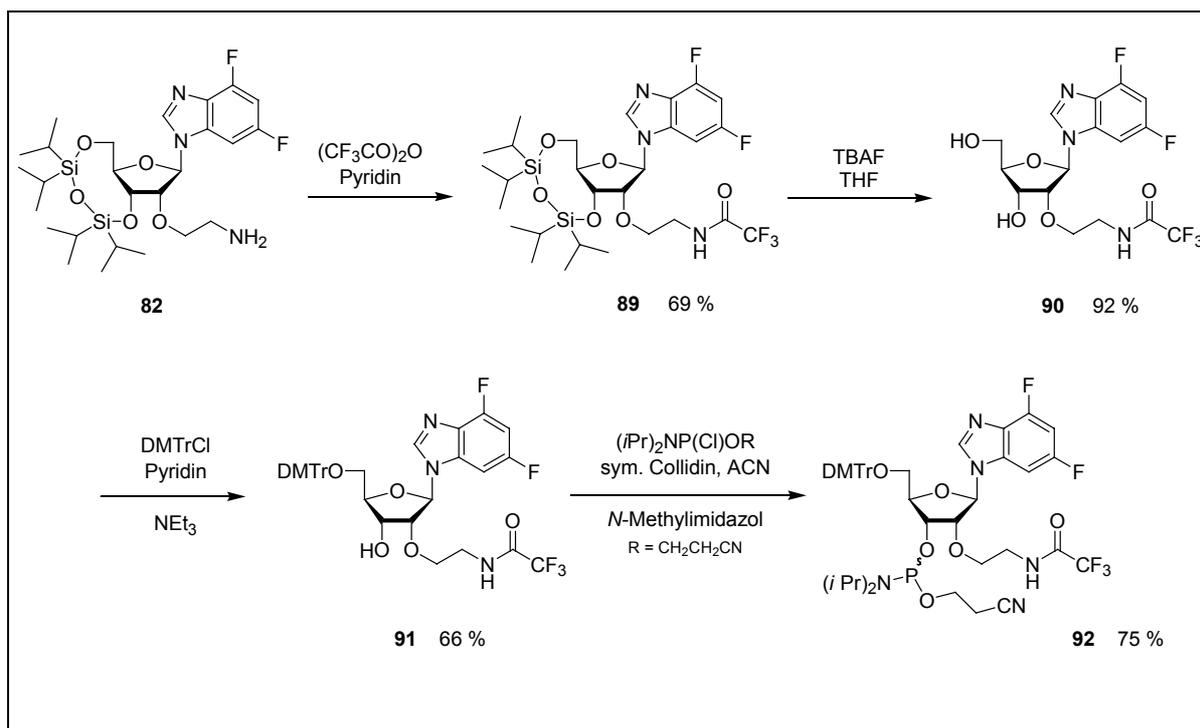
Für die Synthese kupplungsfähiger Monomere mussten die Nucleoside mit für die Oligonucleotid-Festphasensynthese geeigneten Schutzgruppen versehen werden und zu Phosphoramiditen umgesetzt werden. Hierzu war es nötig eine Aminoschutzgruppe einzuführen, die Markiewicz-Schutzgruppe zu entfernen und die 5'-Hydroxygruppe mit der säurelabilen Dimethoxytritylgruppe zu schützen. Im Anschluss wurden die beiden entsprechenden Phosphoramidite **92** und **95** dargestellt.

##### *Einführung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe*

Zur Einführung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe stehen verschiedene Reagenzien zur Verfügung. Die Anwendung von Trifluoressigsäureanhydrid erfordert aufgrund dessen

Reaktivität neben absoluten Lösungsmitteln auch die Kühlung des Reaktionsansatzes. Alternativ dazu kann auch Trifluoressigsäureethylester verwendet werden, welcher jedoch aufgrund seiner geringeren Reaktivität in hohem Überschuss (10 Äquivalente!) eingesetzt werden muss. Bei der Isolierung des Produktes muss daher überschüssiges Reagenz sowie Triethylamin gründlich abgetrennt werden.

Die Verbindung 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -*N*-trifluoracetamidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **89** wurde ausgehend vom 2'-Aminoethyl substituierten Analogon **82** hergestellt. Die Reaktion erfolgte bei 0°C in Pyridin unter Verwendung von Trifluoressigsäureanhydrid. Nach weiteren 3 Stunden Rührens bei Raumtemperatur konnte das Produkt **89** als weißer Schaum in 69%iger Ausbeute erhalten werden (*Abbildung 52*).



*Abbildung 52: Einführung geeigneter Schutzgruppen und Synthese des 2'-O-Trifluoracetamidoethyl modifizierten Phosphoramidits **92***

Bei der Verbindung **85** war die Einführung dieser Schutzgruppe nicht notwendig, da bereits die Phthalimidgruppe als geeignete Schutzgruppe angebracht worden ist. Die

Umsetzung der beiden Verbindungen **89** und **85** zum Phosphoramidit wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

### Synthese der Phosphoramidite der geschützten 2'-Aminoethyl modifizierten Verbindungen

Die Abspaltung der Markiewicz-Gruppe erfolgte sowohl beim 4,6-Difluorbenzimidazol-Baustein **89** als auch beim 2,4-Difluorbenzol-Baustein **85** durch TBAF in THF. Die sehr effiziente, nahezu quantitative Umsetzung zu den Produkten 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **90** und 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -N-phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **93** erfolgte in 5 bzw. 20 Minuten. Durch die im Vergleich zur Literatur erhöhte Anzahl an Äquivalenten von Tetrabutylammoniumfluorid konnte die Reaktionszeit von einer Stunde (bei 1 eq.) auf 5 Minuten (bei 2,1 eq.) verkürzt werden.

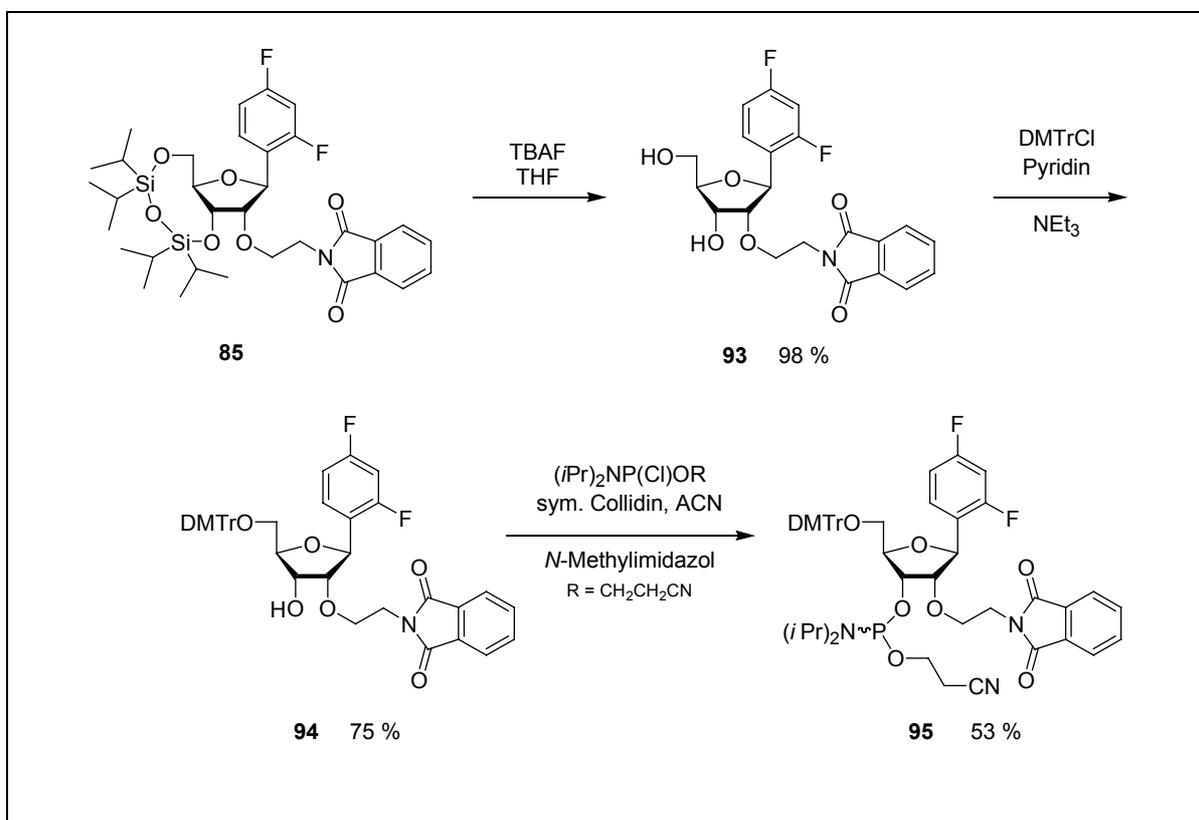


Abbildung 53: Einführung geeigneter Schutzgruppen und Synthese des 2'-O-Phthalimidoethyl modifizierten Phosphoramidits **96**

Die Einführung der 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe wurde bereits in Kapitel 7.1 ausführlicher beschrieben. Die DMTr-Gruppe wird bei Raumtemperatur in Pyridin und Triethylamin eingeführt (*Abbildung 53*). Auch hier wird Pyridin zum Puffern der entstehenden Säure zugegeben. Beide Nucleoside 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -*N*-trifluoracetamido-ethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **91** und 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -*N*-phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **94** konnten in guten Ausbeuten von 66% bzw. 75% hergestellt werden. Durch Einführung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe und der damit einhergehenden erhöhten Hydrophobizität der Produkte können die Verbindungen sehr leicht über Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Die Tritylierung erfolgt selektiv an der 5'-Hydroxygruppe und erlaubt dadurch die Umsetzung der 3'-OH-Gruppe, der verbleibenden ungeschützten funktionellen Gruppe im Molekül, zum Phosphoramidit.

Die Umsetzung der 5'- und Amino-geschützten Nucleoside **91** und **94** zu kupplungsfähigen Monomeren, die in der RNA-Festphasensynthese eingesetzt werden können, erfolgt mit 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit. Zur Synthese der nucleosidischen Phosphoramidite **92** und **95** (*Abbildung 52*, *Abbildung 53*) wurden die Verbindungen in Acetonitril gelöst, mit Collidin und *N*-Methylimidazol als Aktivator versetzt und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe des Reagenzes wurde zunächst im Eisbad und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Die gewünschten Phosphoramidite konnten in 75%iger bzw. 53%iger Ausbeute isoliert werden.

In *Abbildung 54* ist beispielhaft das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Phosphoramidites **95** aufgeführt.

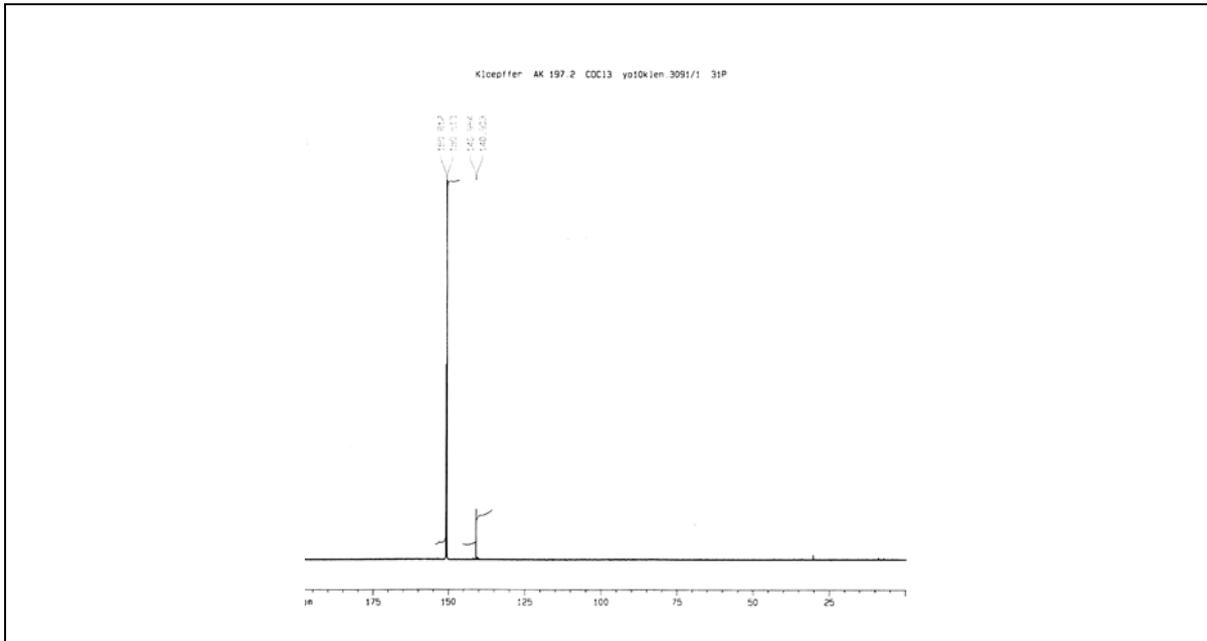
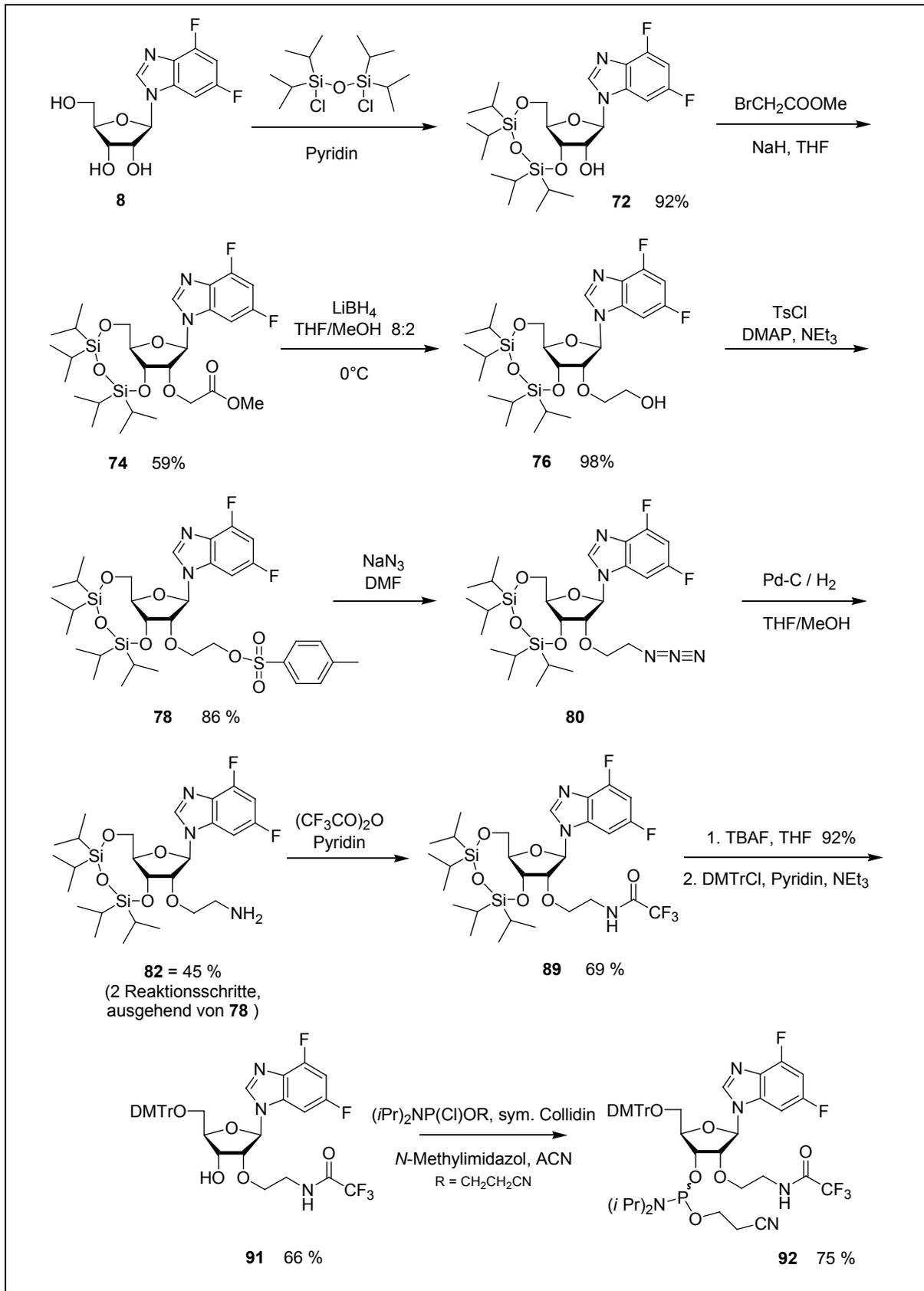


Abbildung 54:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Phosphoramidites **95**

### Syntheseübersicht

Zur besseren Übersicht der in Kapitel 7.2-7.4 vorgestellten Synthesen sind in *Abbildung 55* und *Abbildung 56* die Synthesewege zu den kupplungsfähigen 2'-O-Aminoethyl modifizierten Nucleosidanaloga **92** und **95** aufgeführt.

Abbildung 55: Synthese des Phosphoramidits **92**

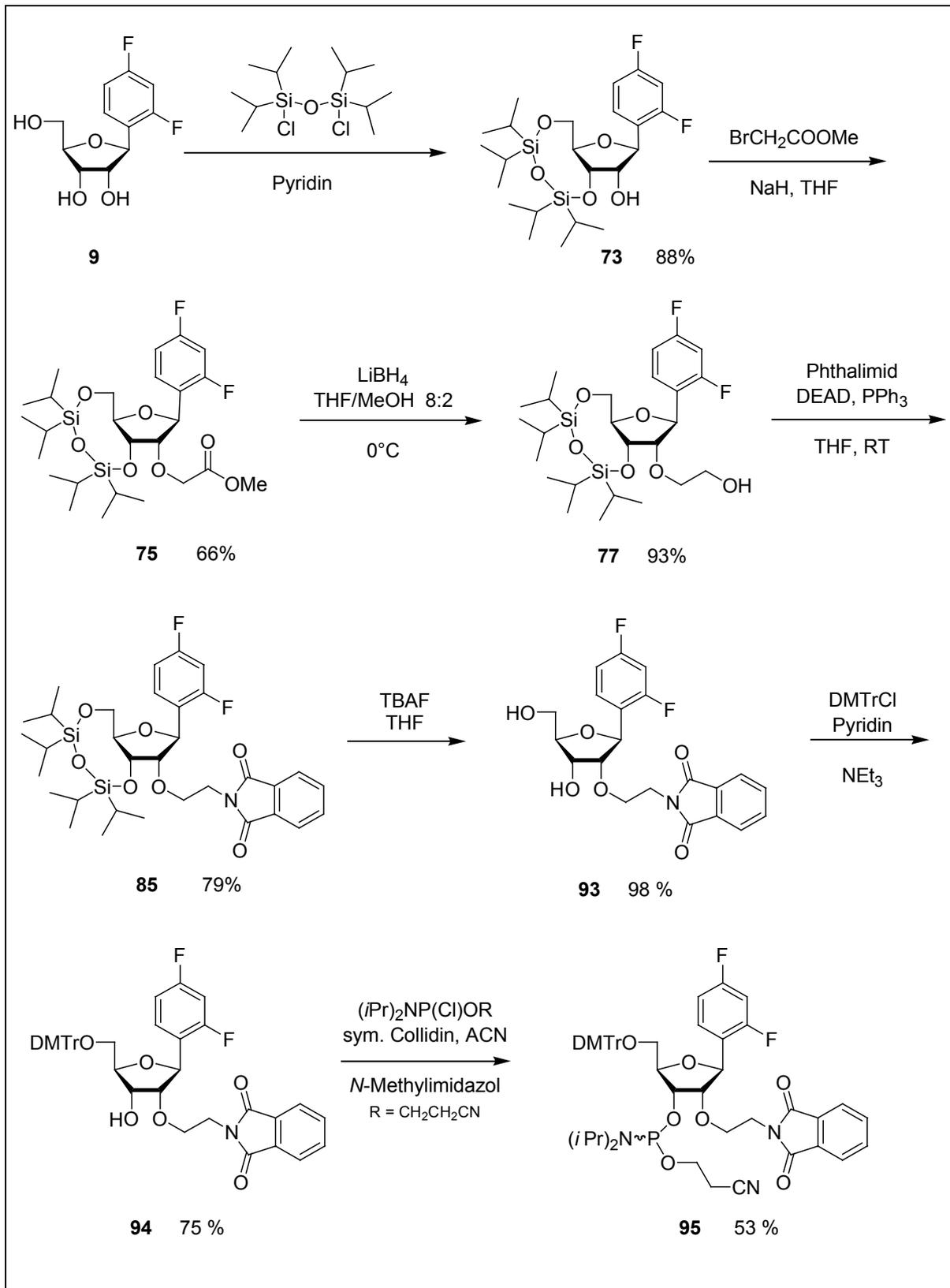


Abbildung 56: Synthese des Phosphoramidits 95



# 8

## **UV/VIS- und CD-spektroskopische Untersuchungen an mono-modifizierten RNA 12meren**

Um den Einfluss der modifizierten Nucleoside auf die Stabilität von RNA-Duplexen zu untersuchen, wurden thermodynamische Studien an RNA 12meren durchgeführt. Mittels UV/VIS-Spektroskopie und Circular Dichroismus (CD)-Messungen konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit artifizielle Nucleoside mit RNA stabilisierenden Eigenschaften identifiziert werden. Da es sich dabei gleichzeitig um universelle Basen handelt, sind diese 2'-O-Aminoethyl modifizierten, fluorierten Nucleoside von besonderem Interesse für die Toleranz von Punktmutationen in Oligonucleotiden.

Voraussetzung für die Untersuchungen an RNA Duplexen und Hammerhead-Ribozymen ist die automatisierte Synthese von modifizierten DNA- und RNA-Oligonucleotiden mittels Festphasensynthese. Nach Aufreinigung, Charakterisierung und Hybridisierung liefern die thermodynamischen Untersuchungen an den Duplexen über die Bestimmung der  $T_m$ -Werte und der thermodynamischen Parameter Aussagen über die Veränderung der Stabilität des modifizierten RNA 12mer-Duplexes im Vergleich zum unmodifizierten Duplex. Die Circular Dichroismus-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung der RNA-Helixstruktur und deren Veränderung, die durch den Einbau der artifiziellen Nucleoside hervorgerufen wird. Neben der Änderung der

Gesamtstruktur kann dabei auch der Einfluss auf die Stabilität der Helices erfasst werden.

## 8.1 Synthese von RNA- und DNA- Oligonucleotiden

Durch die Entwicklung der Oligonucleotid-Festphasensynthese wurde die rasche, routinemäßige Synthese von Oligonucleotiden ermöglicht. Der Aufbau von Oligonucleotiden aus Monomeren in beliebiger Sequenz war ein Meilenstein in der Geschichte der Nucleinsäurechemie und ermöglichte die Fortschritte auf dem Gebiet der therapeutischen Oligonucleotide und der Biotechnologie im Allgemeinen. Die Grundlagen dafür wurden durch die Diester-, Triester- und die H-Phosphonatmethode Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts gelegt (Letsinger, 1976; Letsinger, 1975). R. Letsinger konnte dabei auf die Ergebnisse von Merrifield zurückgreifen, der die Festphasensynthese für Polypeptide entwickelte (Merrifield, 1963). Die Synthese an der festen Phase bietet neben den hohen Ausbeuten an Oligonucleotid eine Reihe von Vorteilen: Neben der Automatisierbarkeit sind hohe Kupplungsausbeuten, einfache Spülschritte zur Entfernung überschüssiger Reagenzien und eine einmalige, effiziente Aufreinigung am Ende der gesamten Synthese zu nennen.

### 8.1.1 *Der Festphasen-Synthesezyklus nach Caruthers*

Als Standardmethode zur Festphasensynthese von Oligonucleotiden hat sich jedoch die Phosphoramidit-Chemie durchgesetzt (Beaucage & Caruthers, 1981; Sinha *et al.*, 1983, Caruthers, 1987).

Der Synthesezyklus basiert auf einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie. Diese ermöglicht die selektive Abspaltung bestimmter Gruppen während der Synthese und führt somit zu einer effizienten Kupplung der Phosphoramidite an die immobilisierten (Oligo-)Nucleotide. Die Synthese wird auf Glaskügelchen mit definierter Porenweite (CPG, engl.: *controlled pore glass*; 500 oder 1000 Å Porengröße) als fester Phase durchgeführt. Diese polymere Matrix ist im verwendeten Lösungsmittel Acetonitril

unlöslich und inert. Das erste Nucleosid ist über seine 3'-Hydroxygruppe mittels eines basenlabilen Linkers (z.B. Succinyllinker) mit der festen Phase verknüpft.

Die Synthese erfolgt – entgegen der biologischen, Polymerase vermittelten Nucleinsäure-synthese – in 3' → 5'-Richtung. Der Zyklus wird durch die Entschützung der 5'-Hydroxylgruppe mit 3%iger Trichloressigsäure gestartet.

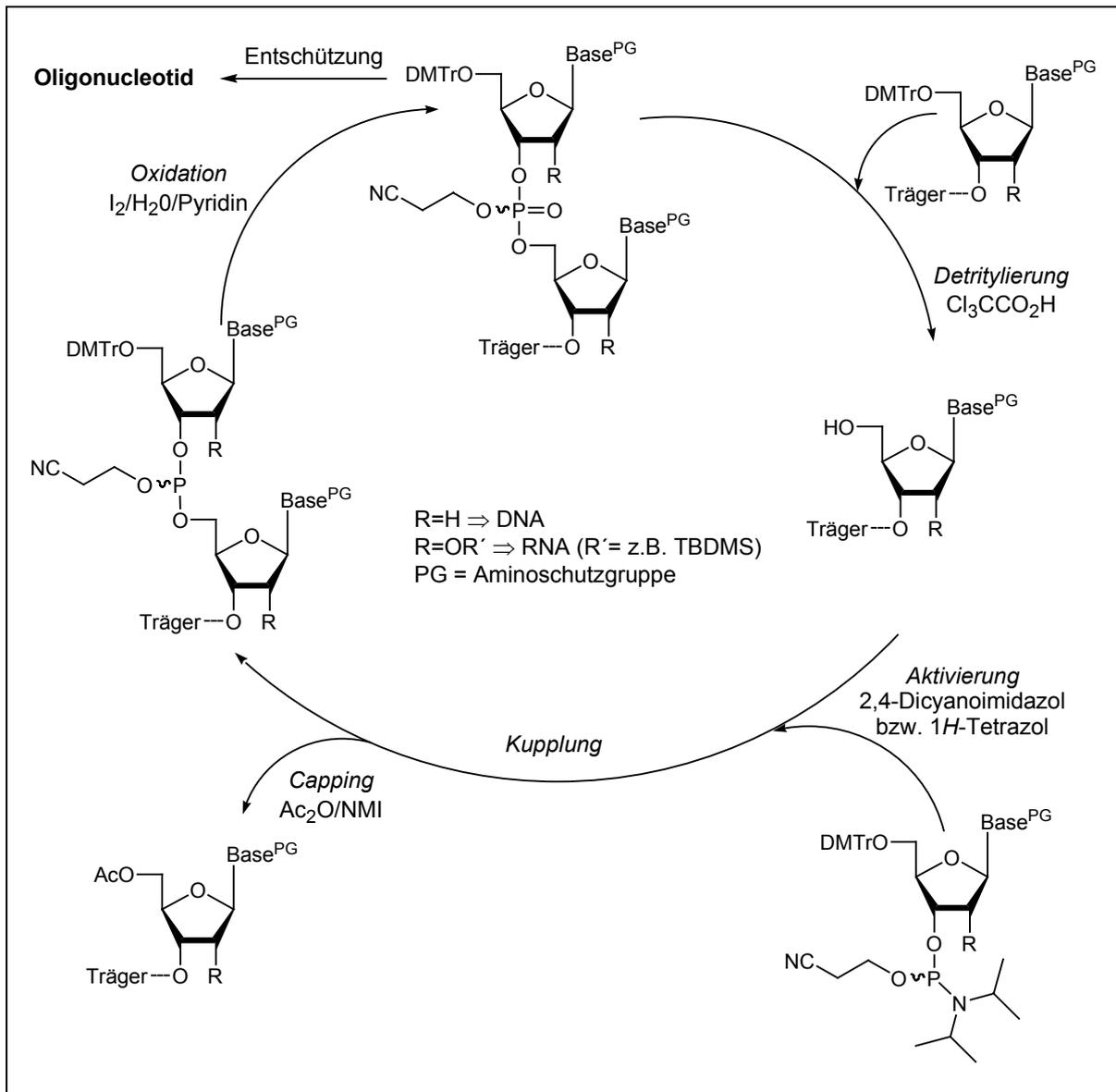


Abbildung 57: Oligonucleotid-Festphasensynthesezyklus nach Caruthers

Die 5'-Hydroxygruppe des ersten Nucleosids wird mit dem *N,N*-Diisopropylamino-phosphoramidit eines geschützten Nucleosids (50-100facher Überschuss) unter

Aktivierung durch 1*H*-Tetrazol (Dahl, 1987), 2,4-Dicyanoimidazol oder Pyridiniumhydrochlorid (Beier & Pfeleiderer, 1999) zur Reaktion gebracht (*Abbildung 57*). Durch die kovalente Anknüpfung bildet sich ein Phosphortriester aus. Im nächsten Schritt werden die nicht abreagierten 5'-Hydroxyfunktionen durch Zugabe von Acetanhydrid maskiert (*capping*), so dass diese für die weiteren Reaktionen nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies verhindert Nebenreaktionen und somit die Synthese von Fehlsequenzen. Im Anschluss wird der dreiwertige Phosphor durch ein Gemisch aus Iod/H<sub>2</sub>O/Pyridin zum fünfwertigen Phosphat oxidiert.

Dieser Zyklus wird bis zur gewünschten Länge des Oligonucleotides durchlaufen. Aufgrund der sehr hohen Kupplungsausbeuten (>99,5%) lassen sich DNA-Stränge mit einer Länge von bis zu 200 Nucleotiden und RNA-Stränge bis zu einer Länge von 60-100 Nucleotiden, je nach Wahl der Schutzgruppe, in guter Ausbeute darstellen. Der Unterschied zwischen den maximalen Längen der Oligonucleotide resultiert aus den etwas geringeren Kupplungsausbeuten bei der RNA-Synthese. Aufgrund der geschützten 2'-Hydroxy-gruppe ist das Phosphoratom sterisch abgeschirmt und entsprechend weniger reaktiv.

Alle während dieser Arbeit synthetisierten DNA- und RNA-Oligonucleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode im 1 µmol-Maßstab an einem Expedite8900-DNA/RNA Synthesizer von PerSeptive Biosystems hergestellt. Es wurden entweder vorgefertigte oder selbst befüllte Säulen mit CPG-Trägermaterial, die das erste Nucleosid tragen, eingesetzt. Für die Darstellung der Oligonucleotide wurden die modellspezifischen Syntheseprotokolle für RNA bzw. DNA übernommen. Dabei wurde sowohl für die Amidite natürlicher Nucleoside als auch für die modifizierten Phosphoramidite bei der RNA-Synthese eine Kupplungszeit von 12 Minuten eingehalten. Alle RNA-Oligonucleotid-Synthesen endeten mit Abspaltung der 5'-Dimethoxytritylgruppe (*DMTr-off*), während bei der Darstellung von DNA-Strängen die Schutzgruppe zur einfacheren Aufreinigung mittels RP-HPLC nicht entfernt wurde (*DMTr-on*).

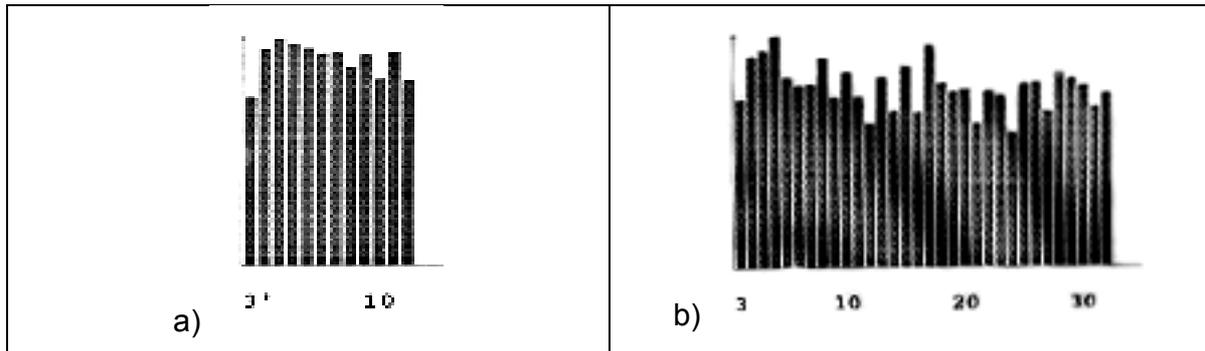


Abbildung 58: Trityl-Monitore der Synthesen zweier modifizierter RNA-Stränge; a) RNA 12mer, b) Hammerhead-Ribozym

Die Effizienz der einzelnen Kupplungen wurde mittels eines im Oligonucleotid-Syntesizer integrierten Trityl-Monitors verfolgt. Dabei wird nach jedem Zyklus die Abspaltung der 4,4'-Dimethoxytritylgruppe photometrisch bei 498 nm nach einer definierten Zeiteinheit quantifiziert. In *Abbildung 58* sind exemplarisch die Daten der Tritylabspaltung anhand zweier modifizierter RNA-Stränge aufgeführt. *Abbildung 58a)* zeigt den Trityl-Monitor der Synthese eines RNA 12mers der Sequenz 5'-CUU UUC **X**UU CUU-3', wobei **X** die Stelle der Modifikation ist. In diesem Fall handelt es sich dabei um Verbindung **28**. In *Abbildung 58b)* ist die photometrische Kupplungskontrolle für das mit dem Nucleotid **28** modifizierte Hammerhead-Ribozym aufgeführt. Die Modifikation befindet sich vom 3'-Ende aus an 3. Position. Die Kupplungsausbeute ist mit der natürlicher Nucleoside vergleichbar.

### ACE-Chemie

In den letzten Jahren hat die von der Firma Dharmacon entwickelte und patentierte ACE-Chemie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese verfolgt eine invertierte Schutzgruppenstrategie. Dabei befinden sich fluoridlabile Silylschutzgruppen an der 5'-Position und – im Falle von RNA – säurelabile Acetale an der 2'-Position (*Abbildung 59*).

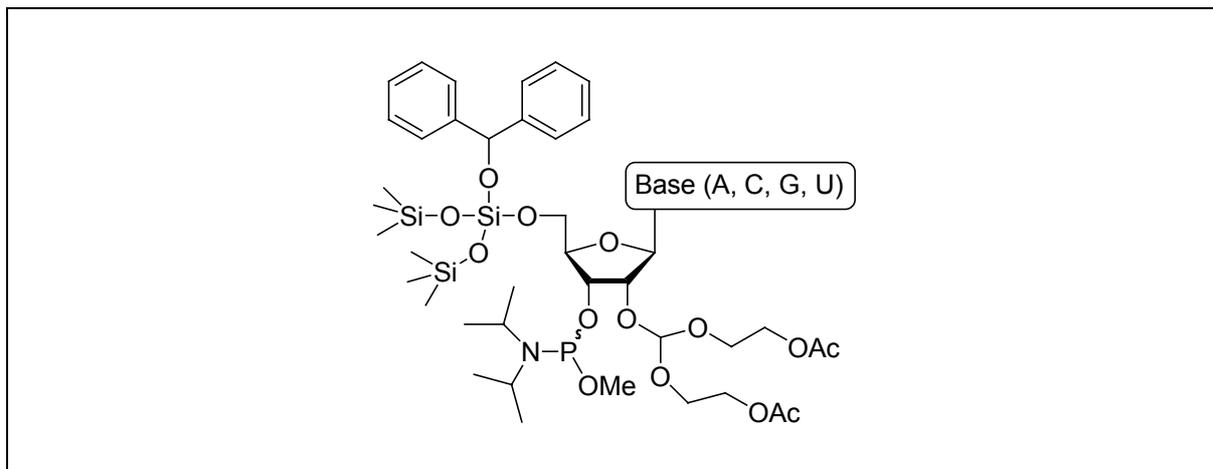


Abbildung 59: Kupplungsfähiges Monomer der Firma Dharmacon

Neben einer besonders effizienten, postsynthetischen Abspaltung der Schutzgruppen (hauptsächlich flüchtige Substanzen) und der Kompatibilität mit den gängigen Modifikationen sind die hohen Kupplungsausbeuten als Vorteil der Methode hervorzuheben. Gängige Synthesizer müssen jedoch für den permanenten Gebrauch von HF umgerüstet werden, da durch die Silylschutzgruppen an der 5'-Position nach jedem Kupplungsschritt das Oligonucleotid mit Fluorid behandelt werden muss.

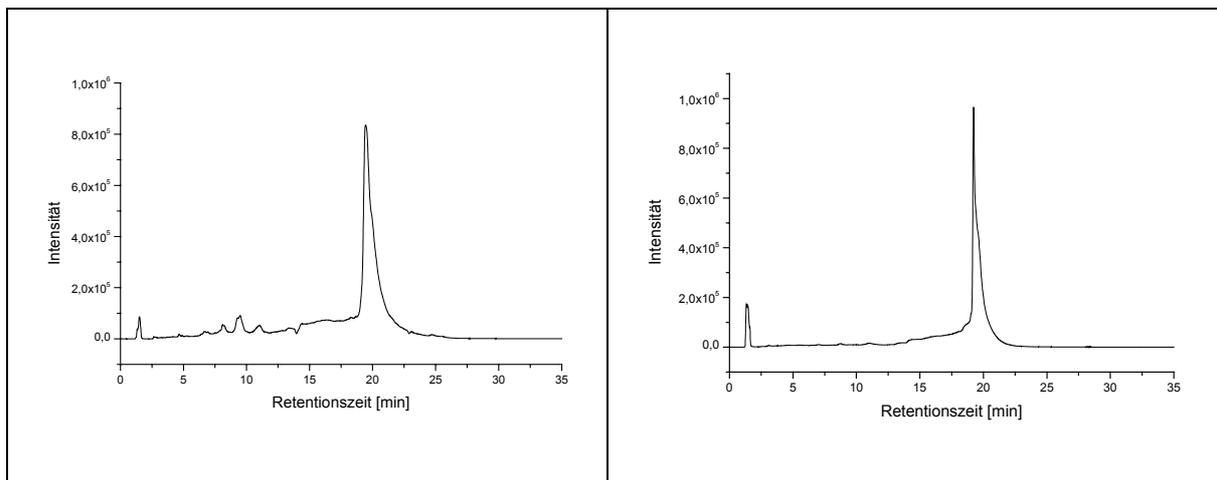
### 8.1.2 Aufreinigung und Analytik von Oligonucleotiden

Nach erfolgter Festphasensynthese muss das Oligonucleotid vom CPG-Material abgespalten werden, die Schutzgruppen müssen entfernt und das Oligonucleotid aufgereinigt und entsalzt werden. Die Methoden zur Aufreinigung von DNA und RNA unterscheiden sich aufgrund der Notwendigkeit bei RNA die 2'-TBDMS-Gruppen abzuspalten. Zudem wird bei der DNA-Synthese im letzten Schritt nicht die Trityl-Gruppe abgespalten, um die einfache, schnelle Aufreinigung mittels RP-HPLC zu ermöglichen. Da in dieser Doktorarbeit hauptsächlich RNA-Stränge synthetisiert wurden, wird in den folgenden Absätzen diese Aufreinigungsprozedur beschrieben. Das Protokoll zur Aufreinigung von DNA wird in Kapitel 12 beschrieben, da für die später beschriebenen enzymatischen Assays DNA-Primer und -template benötigt wurden.

Die Abspaltung von der festen Phase erfolgt in einem Ammoniak/Methanol-Gemisch (3:1) in 24 Stunden bei Raumtemperatur. Dabei werden auch die  $\beta$ -Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphat und die basenlabilen Schutzgruppen (Benzoyl, PAC, TAC) an den exocyclischen Aminogruppen der natürlichen Nucleoside im Strang quantitativ abgespalten (Sinha, 1993). Diese sehr milde Methode eignet sich besonders für modifizierte oder mit Farbstoff gelabelte Oligoribonucleotide. Unter diesen Bedingungen wird auch die Phthaloyl-Schutzgruppe der inkorporierten Modifikationen abgespalten (Beier, 1999). Nach Sterilfiltration der Lösung, um die Oligoribonucleotid-Lösung vom CPG-Material zu trennen, wurden die Lösungsmittel durch Vakuumzentrifugation in einer SpeedVac<sup>®</sup> entfernt. Zur Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen wurde der resultierende Feststoff unter sterilen Bedingungen in Triethylamin-Trihydrofluorid-Lösung aufgenommen (Gasparutto, 1992; Westman, 1994). Die Suspension wurde unter gelegentlichem Schütteln 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die anschließende Fällung des nun vollständig entschützten Oligoribonucleotids wurde die Lösung mit Butanol versetzt und mindestens 3-4 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Zur Entfernung der TOM-Schutzgruppe ist ein anderes Abspaltungsprotokoll verwendet worden (Pitsch, 1999; Stawinski, 1988). Die sterilfiltrierte, evaporierte Lösung wurde hier mit Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1 M in THF) versetzt und 8 Stunden bei  $35^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe von sterilem TRIS-Puffer (pH 7,4) wurde das Tetrahydrofuran im Vakuum entfernt. Die sehr salzhaltige Lösung wurde im Anschluss über Sephadex G25-Säulen entsalzt und die einzelnen Fraktionen in der SpeedVac<sup>®</sup> evaporiert.

Die entschützte RNA wurde mittels Anionenaustauscher-HPLC aufgereinigt. Diese Methode ist geeignet, um Oligoribonucleotide in höchster Reinheit zu erhalten. Die Anionenaustauscher-HPLC ist neben der präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) die Standardmethode zur Aufreinigung von RNA-Strängen (Vinayak, 1995). Diese Methode der Chromatographie trennt die Substanzen nach Ladungsunterschieden auf. Das Prinzip dieser sehr effektiven Methode beruht auf der Wechselwirkung des negativ geladenen Oligonucleotid-Rückgrats mit auf der stationären Phase immobilisierten kationischen Gruppen. Die elektrostatisch fixierten Oligonucleotide werden dann mit einem Gradienten von steigender Ionenstärke (Salzgehalt) von der Säule eluiert, wobei das gewünschte Oligonucleotid aufgrund der höchsten Anzahl an Ladungen stets zuletzt eluiert wird.

Die RNA-Oligonucleotide wurden in einem sterilen System mit einem Gradienten aus  $\text{H}_2\text{O}/1\text{M LiCl-H}_2\text{O}$  oder mit Laufmitteln steigender  $\text{NaClO}_4$ -Konzentration (Pitsch, 1999) aus den Synthese bedingten Abbruchsequenzen isoliert (*Abbildung 60a*). Man erkennt als Hauptpeak deutlich das gewünschte Produkt bei 20 Minuten Retentionszeit. Früher eluierte Stränge sind die bereits erwähnten kürzeren Abbruchsequenzen. Deutlich zu erkennen sind auch die besseren Kupplungsausbeuten und somit geringeren Abbruchsequenzen bei der DNA-Synthese (*Abbildung 60b*). Details zu den verwendeten Laufmittel, den Gradienten, Säulen und HPLC-Systemen sind im "Experimentellen Teil", Kapitel 12, beschrieben. Für die verschiedenen Stränge – RNA 12mer, Cy5 markierte Substrate und Hammerhead-Ribozyme – wurden jeweils die idealen Gradienten bestimmt und angewandt.



*Abbildung 60: Chromatogramm einer Anionenaustauscher-HPLC nach Synthese und Abspaltung der Schutzgruppen; a) RNA-Oligonucleotid (Hammerhead-Ribozym), b) DNA-Oligonucleotid*

Nach Evaporierung der Proben fand die Entsalzung der Proben mit Sephadex G25 Gelfiltrationssäulen statt. Das Trennprinzip der Gelfiltration beruht auf der größenabhängigen Diffusion der Probenmoleküle in Poren der stationären Phase. Die polymeren Trennmaterialien, wie z.B. Sephadex G25, besitzen mikroskopische Poren, in welche die Salzionen hinein diffundieren, während die großen Oligonucleotid-Moleküle ausgeschlossen bleiben und somit rasch eluiert werden. Die nach der Entsalzung erhaltenen Fraktionen haben unterschiedliche Salzgehalte. Für die Charakterisierung mittels Massenspektrometrie, die physikalisch-chemischen

Untersuchungen und die biologischen Anwendungen wurden jeweils die reinsten, salzärmsten Fraktionen verwendet.

Nach Quantifizierung der Menge an synthetisiertem Oligonucleotid durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm wurde die Abspaltung aller Schutzgruppen, die Reinheit und die korrekte Länge des Produktes kontrolliert. Diese Charakterisierung erfolgt mittels MALDI-TOF-MS. Die Matrix unterstützte Laserdesorption/-ionisation Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption/ionisation*, MALDI) ermöglicht die unfragmentierte Analyse von Oligonucleotiden mit hoher Empfindlichkeit. Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit gegenüber Salzen wurden alle Oligonucleotide, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden, ausschließlich mit MALDI-TOF(*time-of-flight*)-Massenspektrometrie und nicht mittels *Elektrospray*-Ionisation (ESI) untersucht (Huber, 1999).

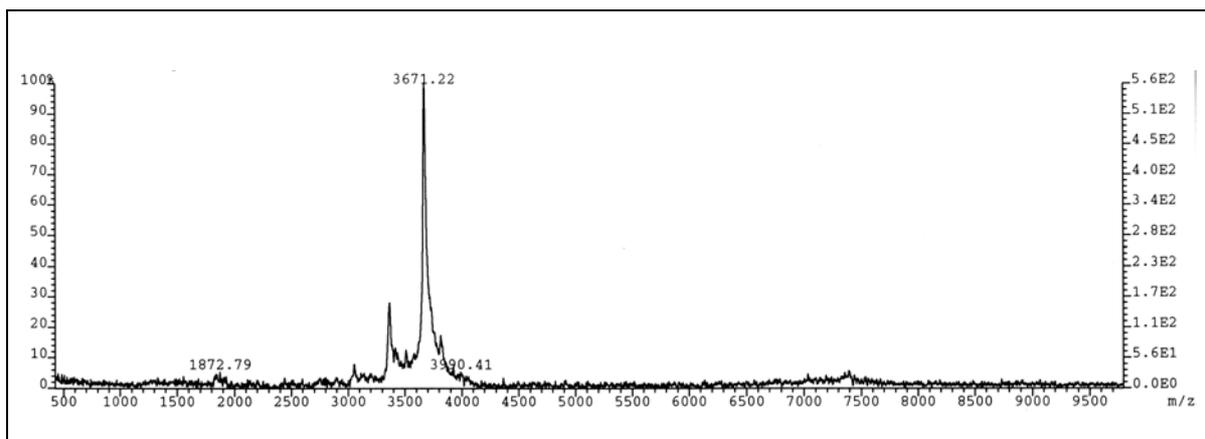


Abbildung 61: MALDI-Spektrum des monomodifizierten RNA 12mers **S3**

Einzelheiten zur Synthese und Analytik aller synthetisierten Oligonucleotide sind im "Experimentellen Teil", Kapitel 12, aufgeführt.

## 8.2 UV/VIS-Spektroskopie an modifizierten RNA 12meren

Zur Untersuchung des Einflusses 2'-O-Aminoethyl modifizierter Verbindungen auf die thermodynamische Stabilität von RNA 12meren wurden die Schmelzkurven der modifizierten Duplexe aufgenommen und analysiert. Die durch die fluorinierten Nucleoside bedingte geringere Solvatation der RNA-Stränge, das Fehlen von starken Wasserstoffbrückenbindungen und die elektrostatischen Wechselwirkungen durch die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegende Aminogruppe beeinflussen die Stabilität einer A-Helix stark. In diesem Kapitel werden die ermittelten  $T_m$ -Werte und thermodynamischen Daten diskutiert.

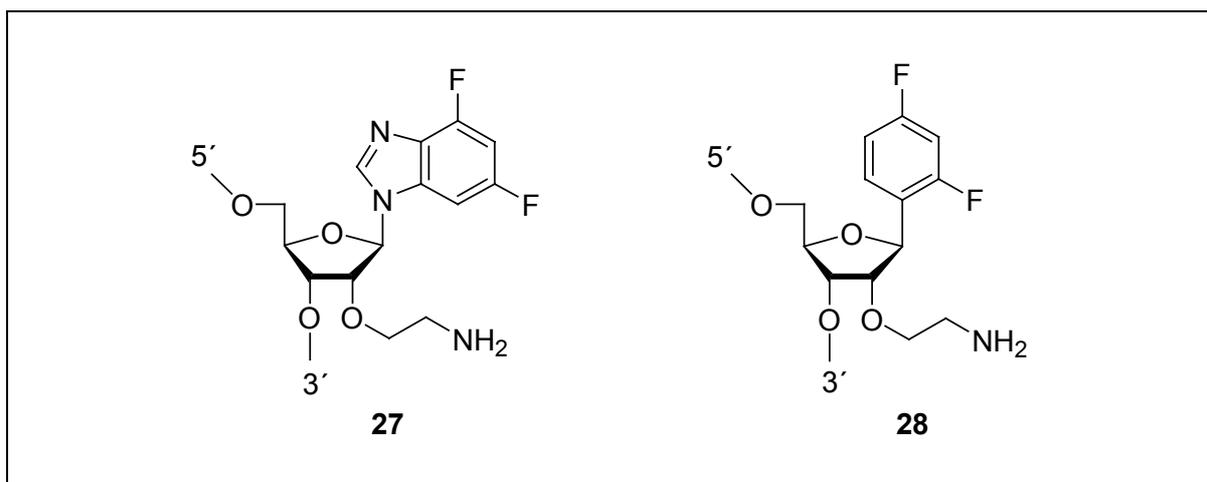
### 8.2.1 Synthetisierte 12mer RNA-Stränge

Zur Untersuchung der thermodynamischen Eigenschaften modifizierter RNA Duplexe wurde ein RNA 12mer ausgewählt, an dem bereits zuvor fluorinierte Nucleobasen untersucht worden sind (Parsch & Engels, 2000). Es handelt sich hierbei um einen A-U reichen Duplex, dessen  $T_m$ -Wert mit 37,8°C in einem gut zu untersuchenden Temperaturbereich liegt. Der U-reiche Strang besteht aus der Sequenz 5'- CUU UUC XUU CUU -3', wobei **X** für die Stelle der Modifikation codiert. Im unmodifizierten Fall ist **X** = U. Für den komplementären Gegenstrang ergibt sich die folgende A-reiche Sequenz: 5'- AAG AAN GAA AAG -3'. Die Position, die sich gegenüber der Modifikation **X** des U-reichen Stranges befindet, ist mit **N** gekennzeichnet und codiert für die vier natürlichen Nucleoside A, C, G, und U. Die modifizierten RNA 12mere wurden gegen jeden der vier Gegenstränge hybridisiert und untersucht, um die Modifikationen **27** und **28** hinsichtlich ihrer Eigenschaften als universelle Basen zu testen und um genomische Punktmutationen zu simulieren, die für die spätere Anwendung der Modifikationen in anti-HIV Hammerhead-Ribozymen von Bedeutung sind. Insgesamt wurden sieben verschiedene RNA 12mere synthetisiert (*Tabelle 5*), drei U-reiche Stränge **S1-S3** und die vier Gegenstränge **S4-S7**.

Tabelle 5: Synthetisierte, kurze RNA-Stränge

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
<b>S 1</b>	5'- CUU UUC UUU CUU -3'	
<b>S 2</b>	5'- CUU UUC <b>27</b> UU CUU -3'	U-reiche, monomodifizierte Stränge, <b>X = 27, 28</b>
<b>S 3</b>	5'- CUU UUC <b>28</b> UU CUU -3'	
<b>S 4</b>	5'- AAG AAA GAA AAG -3'	A-reiche, komplementäre Stränge mit <b>N = A, C, G, U</b> zur Simulation von Punktmutationen
<b>S 5</b>	5'- AAG AAC GAA AAG -3'	
<b>S 6</b>	5'- AAG AAG GAA AAG -3'	
<b>S 7</b>	5'- AAG AAU GAA AAG -3'	

In *Abbildung 62* sind noch einmal zur Verdeutlichung die beiden eingebauten Modifikationen **27** und **28** aufgeführt. Die fluorinierten, 2'-unmodifizierten Nucleoside **8** und **9** wurden in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls in der oben aufgeführten RNA 12mer-Sequenz untersucht. Die Ergebnisse, die von Dr. Jörg Parsch erhalten wurden, werden – soweit sie für diese Arbeit relevant sind – ebenfalls im folgenden diskutiert.

Abbildung 62: Eingebaute Modifikationen **27** und **28**

## 8.2.2 *Thermodynamische Untersuchungen an monomodifizierten RNA 12mer Duplexen*

Die thermodynamischen Untersuchungen zur Stabilität von RNA Duplexen wurde UV/VIS-spektroskopisch an einem CARY 1-Spektrometer der Firma Varian durchgeführt. Das Temperatur abhängige Aufbrechen eines Oligonucleotid-Duplex in zwei Einzelstränge geht einher mit einer Zunahme der Extinktion der Lösung bei 260 nm (Hyperchromizität). Die exakte Analyse dieses sog. Schmelzvorgangs liefert eindeutige Aussagen über die Duplexstabilität, die freie Enthalpie und Entropie des Vorgangs.

### *Der $T_m$ -Wert*

Der  $T_m$ -Wert ist ein charakteristischer Parameter für die thermodynamische Stabilität eines Oligonucleotid-Duplexes. Er definiert die Temperatur des Übergangs vom Duplex in die Einzelstränge. Der exakten Bestimmung des  $T_m$ -Wertes liegt ein Zwei-Phasenmodell für diesen Übergang einer geordneten Struktur in den ungeordneten Zustand zugrunde. Die Erhöhung der optischen Dichte beim Aufschmelzen des Duplex ist nicht linear, sondern bildet einen sigmaoidalen Kurvenverlauf. Die x-Koordinate [°C] am Wendepunkt dieser Kurve bildet den  $T_m$ -Wert. Bei dieser Temperatur liegen folglich exakt die Hälfte aller Moleküle in der Probenlösung als Duplex vor, während die andere Hälfte bereits zu Einzelsträngen aufgeschmolzen ist.

Der Schmelzpunkt eines Oligonucleotid-Duplexes ist von der Länge und Sequenz des Duplexes sowie von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung abhängig. Je länger eine Sequenz ist und je reicher an G-C-Basenpaaren, desto stabiler ist ein Duplex. Somit liegt auch die Schmelztemperatur höher. Hohe Salzkonzentrationen können auch zu einer Steigerung der Duplexstabilität führen (Puglisi & Tinoco, 1989). Aus diesem Grund werden die  $T_m$ -Wertmessungen unter standardisierten Bedingungen (10 mM Phosphatpuffer mit 140 mM Natriumchlorid bei pH 7,0) durchgeführt. In *Abbildung 63* ist beispielhaft die typische Schmelzkurve des modifizierten RNA 12mer-Duplex **S2/S6** gezeigt. Der Schmelzpunkt dieses Duplex ist durch den Pfeil markiert und beträgt 37,8°C. Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte durch computerunterstützte Anpassung unter Verwendung des Programms

SigmaPlot 8.0 (Parsch, 1999; Parsch, 2001; Schweitzer, 1998). Alle Daten wurden mittels einer Dreifachmessung bestimmt.

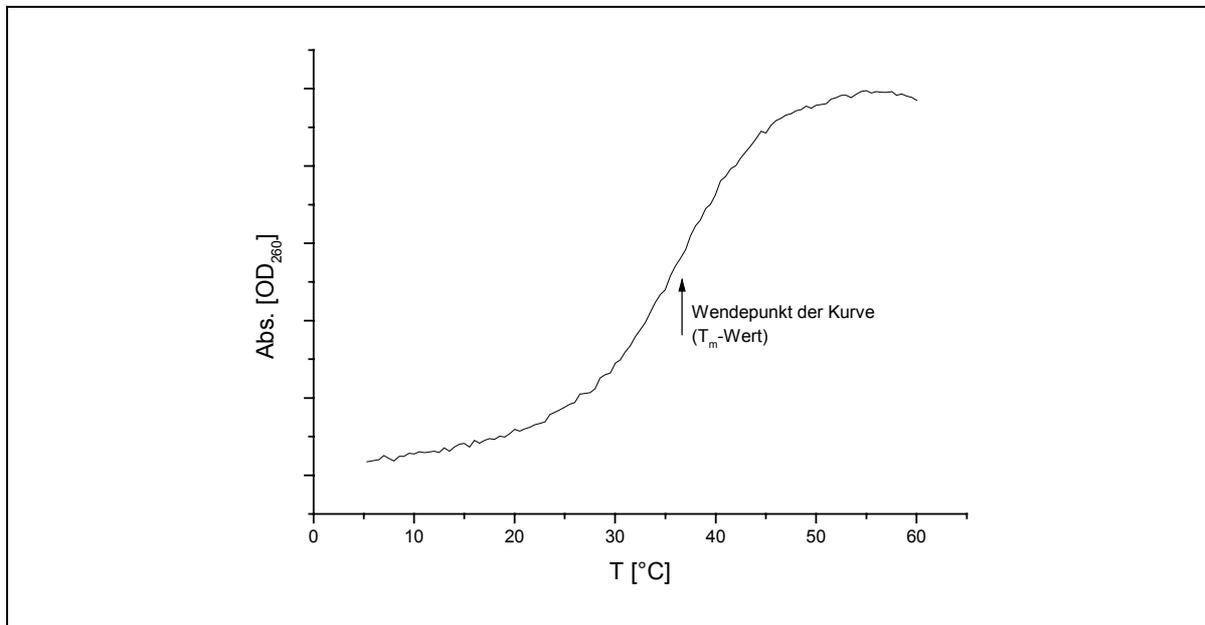


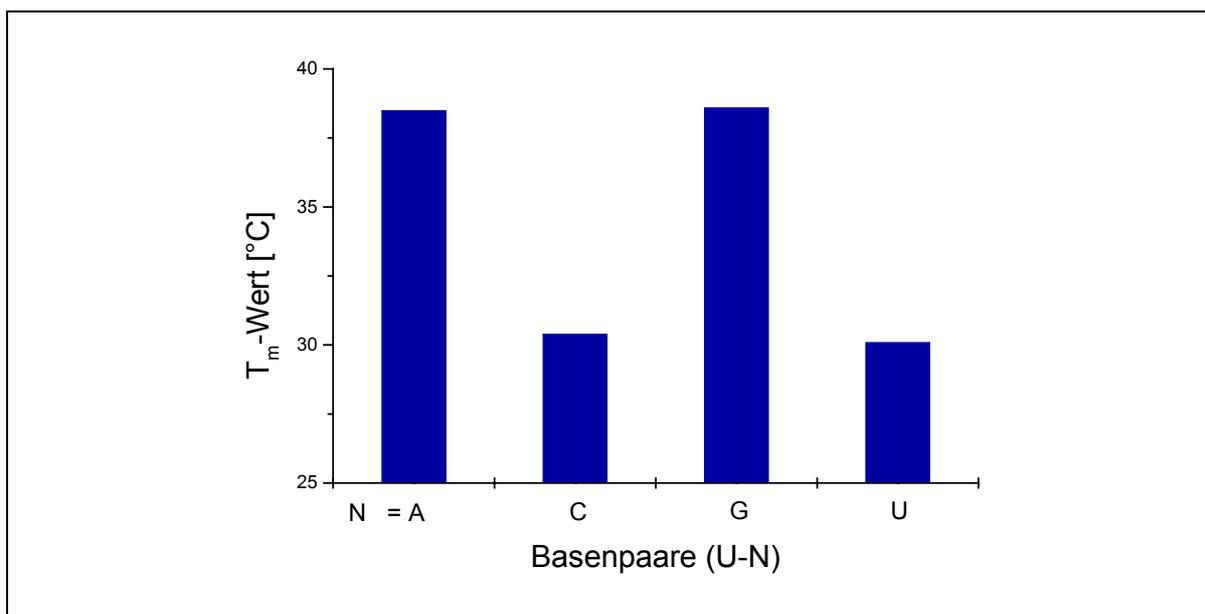
Abbildung 63: Charakteristische, sigmaoidale Schmelzkurve und Lage des Wendepunktes ( $T_m$ -Wertes) am Beispiel des modifizierten Duplex **S2/S6**

#### *$T_m$ -Werte der unmodifizierten Duplexe und der Einfluss 2'-unmodifizierter, fluorierter Nucleosidanaloga*

Die Untersuchung der Stabilität des unmodifizierten Duplex **S1/S4** und der mit 4,6-Difluorbenzimidazol- **8** bzw. 2,4-Difluorbenzol- **9** monomodifizierten Duplexe ist in unserer Arbeitsgruppe bereits von Dr. Jörg Parsch in Rahmen seiner Promotion durchgeführt worden (Parsch, 2001). Unpolare, zu den natürlichen Basen isostere Nucleobasen eignen sich in besonderer Weise zur Untersuchung des Beitrages der Basenstapelungs-Wechselwirkungen und der Solvatation zu der Stabilität von RNA-Duplexen. Hierzu wurde von J. Parsch eine A·U-reiche Sequenz ausgewählt, in welche die nicht zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen befähigten Nucleoside inkorporiert wurden. Die Ergebnisse dieser grundlegenden Vorarbeiten werden in diesem Abschnitt kompakt dargestellt, um die wissenschaftliche Basis für die Untersuchungen darzulegen, auf denen die Messungen der RNA-Duplexe

beruhen, welche 2'-Aminoethyl modifizierte, fluorierte Nucleosidanaloga enthalten. Dies ist essentiell hinsichtlich der Bewertung des Einflusses der 2'-Aminoethyl-Funktion.

Zur Beurteilung der thermodynamischen Stabilität modifizierter RNA-Duplexe wurden zunächst die vier möglichen Kombinationen natürlicher Nucleobasen – der Watson-Crick "match" und die drei Watson-Crick "mismatch"-Fälle – getestet. Der  $T_m$ -Wert des Watson-Crick "match"-Duplex **S1/S4**, welcher an der Stelle **X-N** ein A·U Basenpaar trägt, liegt bei 37,8°C (*Abbildung 64*). Wie zu erwarten war, liegen die  $T_m$ -Werte für die "mismatch" Basenpaare deutlich darunter. Die Schmelzpunkte der Duplexe **S1/S5** (**X-N** = U-C) und **S1/S7** (**X-N** = U-U) liegen bei 30,4°C bzw. bei 30,1°C. Das Wobble-Basenpaar U·G hingegen zeigt eine überraschend hohe Stabilität von 38,6°C.

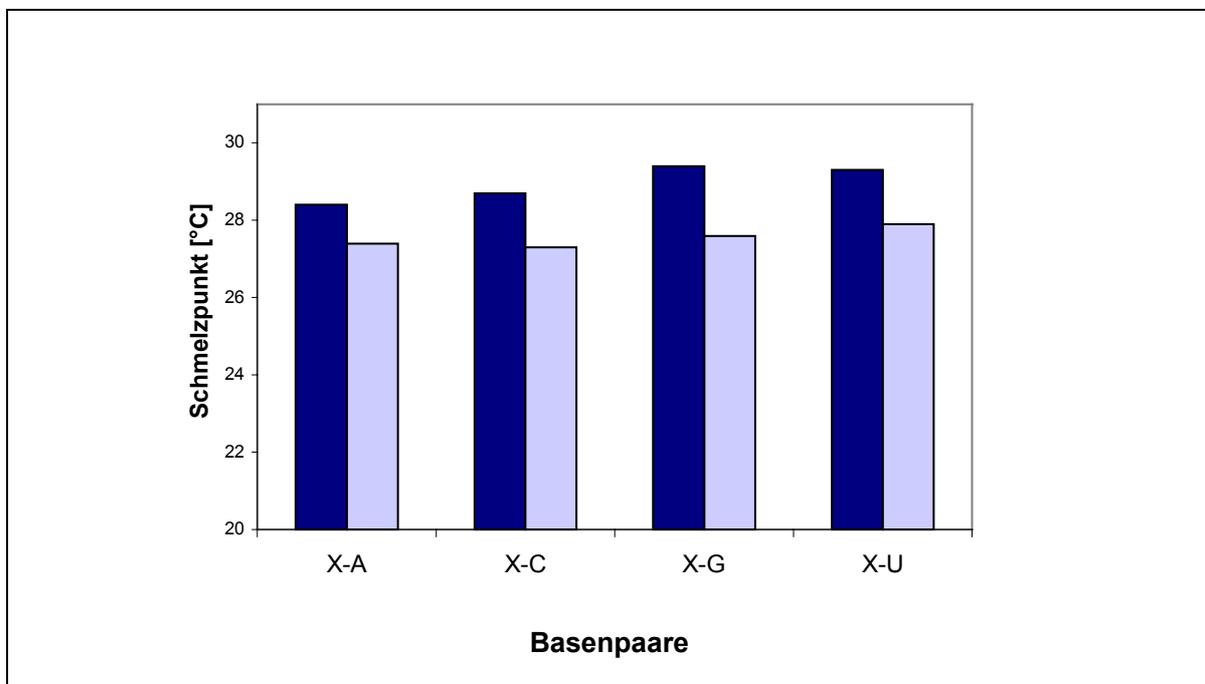


*Abbildung 64:  $T_m$ -Werte der unmodifizierten RNA 12mer Duplexe **S1/S4**, **S1/S5**, **S1/S6**, **S1/S7***

Auch die mit Verbindung **8** bzw. **9** monomodifizierten RNA-Stränge wurden mit jedem der vier Gegenstränge hybridisiert, so dass beide fluorierten Modifikationen mit jedem natürlichen Nucleosid gepaart wurden. Mit Hilfe dieses Ansatzes kann neben den thermodynamischen Eigenschaften der neuen RNA-Duplexe auch festgestellt werden, ob es sich bei den eingebauten Nucleosiden um universelle Basen handelt oder nicht. Universelle Basen im chemischen Sinn sind - wie bereits in Kapitel 3 ausführlich

erläutert – Nucleobasen, die bei der Basenpaarung im Duplex nicht zwischen den vier natürlichen Nucleosiden diskriminieren.

Die Hybridisierung der einfach 4,6-Difluorbenzimidazol- (**8**) und 2,4-Difluorbenzol- (**9**) modifizierten RNA-Stränge mit allen vier Gegensträngen resultierte in nahezu identischen  $T_m$ -Werten für jeden Satz der entsprechenden Duplexe. Im Falle des mit Verbindung **8** modifizierten Duplexes liegen die  $T_m$ -Werte bei 28,4°C-29,4°C (*Abbildung 65*). Die Einführung der 2,4-Difluorbenzol-Modifikation in einen RNA12mer-Duplex führt ebenfalls zu einem beträchtlichen Verlust an Stabilität. Die ermittelten  $T_m$ -Werte liegen hier bei 27,3°C-27,9°C.



*Abbildung 65: Schwankungen der  $T_m$ -Werte der universellen Basen **8** (dunkelblau) und **9** (hellblau); X = modifiziertes Nucleosid*

Wie in *Abbildung 65* graphisch dargestellt, ist die Schwankungsbreite der ermittelten  $T_m$ -Wert äußerst gering, unabhängig davon mit welchem natürlichen Nucleosid die fluoridierte Nucleobase gepaart wurde. In beiden Fällen handelt es sich somit um exzellente "universelle Basen".

Der Effekt, den die Fluorsubstituenten am Aromaten dabei bewirken, kann durch die Messung der korrespondierenden RNA-Stränge herausgestellt werden, welche nur ein

Benzol als nucleosidische Modifikation tragen. Diese zeigen eine noch einmal deutlich reduzierte Stabilität der Helix. Die  $T_m$ -Werte für die RNA-Duplexe mit der Benzolmodifikation liegen bei 22,6°C-23,5°C. Die Substitution von zwei Wasserstoffatomen am Aromaten bedingt somit eine deutliche Stabilisierung des Duplex, hervorgerufen durch verbesserte Basenstapelung.

Dennoch muss festgestellt werden, dass die modifizierten RNA-Duplexe deutlich instabiler sind als der unmodifizierte Duplex. Dies ist durch die Abwesenheit der Wasserstoffbrücken in dem neuen Basenpaar zu erklären und durch die geringere Solvatation der modifizierten Nucleoside durch Wassermoleküle. Die Destabilisierung der modifizierten RNA-Duplexe beträgt bis zu 2,4 kcal mol<sup>-1</sup>. Zur Toleranz von genomischen Punktmutationen muss die universelle Base jedoch einen stabileren Duplex ausbilden als eine einfach mutierte Sequenz. Der  $T_m$ -Wert des modifizierten Duplex sollte also über denen der Watson-Crick "mismatch"-Duplexe liegen. Aus diesem Grund wurde die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegende Aminoethylgruppe in die 2'-Position der Zuckereinheit eingeführt (Kapitel 7) und auf gleiche Weise untersucht.

#### *Der Einfluss 2'-Aminoethyl modifizierter, fluorierter Nucleosidanaloga auf die thermodynamische Stabilität von RNA 12mer Duplexen*

Für die Evaluierung des Einflusses der Aminoethyl-Gruppe in der 2'-Position fluorierter Nucleosidanaloga wurden die beiden Stränge **S2** und **S3** jeweils mit den komplementären Strängen 5'-AAG AAN GAA AAG-3' hybridisiert. Um die Eigenschaften einer universellen Base zu überprüfen wurden auch bei diesen Untersuchungen alle vier möglichen RNA-Stränge (**N** = A, C, G, U; **S4-S7**) verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit und aufgrund der Salzabhängigkeit der  $T_m$ -Werte bei Vorliegen einer Aminomodifikation (Hashimoto, 1993) wurden exakt diesselben Bedingungen zur Messung verwendet wie im vorangehenden Abschnitt.

Im Fall des 2'-( $\beta$ -Aminoethyl)-4,6-difluorbenzimidazol-modifizierten Nucleosids **27** führt die protoniert vorliegende Aminogruppe zu einer deutlich erhöhten Stabilität aller untersuchten RNA-Duplexe. Die Stabilität dieser monomodifizierten Duplexe, bestehend aus **S2**, jeweils gepaart mit **S4-S7**, ist mit der Stabilität des unmodifizierten Duplex **S1/S4** vergleichbar. Zudem bildet dieses Nucleosid mit jedem anderen

natürlichen Nucleosid nahezu gleich stabile Basenpaare. Dies resultiert in einer geringen Schwankungsbreite der vier  $T_m$ -Werte. Die maximale Schwankungsbreite der Duplexe, die den RNA-Strang **S2** enthalten, beträgt nur  $2,4^\circ\text{C}$  (*Tabelle 6*). Im Vergleich zu anderen Literaturwerten (Kapitel 3.1; siehe auch: Loakes, 2001) ist dieser Wert sehr gering. Dieses Nucleosid ist somit eine sehr gute universelle Base.

Im Vergleich zu den Watson-Crick "mismatch"-Basenpaaren U·C und U·U kann eine Erhöhung des  $T_m$ -Wertes um bis zu  $8,2^\circ\text{C}$  beobachtet werden. Dies entspricht einem Anstieg an Stabilität um 27%. Betrachtet man den Duplex mit dem Basenpaar **27**-U, liegt sogar ein Stabilitätsanstieg gegenüber dem natürlichen Watson-Crick "match"-Duplex vor.

*Tabelle 6: Schmelzpunkte der mit 27 und 28 modifizierten Verbindungen und ihre Veränderung gegenüber den modifizierten Duplexen ohne 2'-Aminoethylgruppe ( $\Delta T_m$ )*

Basenpaar		$T_m$ -Wert	$\Delta T_m$	$T_m$ -Wert	$\Delta T_m$
1. Base	2. Base	[ $^\circ\text{C}$ ]	[ $^\circ\text{C}$ ]	[ $^\circ\text{C}$ ]	[ $^\circ\text{C}$ ]
<b>27</b>	<b>A</b>	<b><math>35,9 \pm 0,2</math></b>	+ 7,5	<b><math>29,7 \pm 0,2</math></b>	+ 2,3
	<b>C</b>	<b><math>36,7 \pm 0,3</math></b>	+ 8	<b><math>30,7 \pm 0,2</math></b>	+ 3,4
<b>28</b>	<b>G</b>	<b><math>37,3 \pm 0,3</math></b>	+ 7,9	<b><math>26,6 \pm 0,3</math></b>	- 1
	<b>U</b>	<b><math>38,3 \pm 0,1</math></b>	+ 9	<b><math>32,0 \pm 0,2</math></b>	+ 4,1

Die  $T_m$ -Werte der mit **27** monomodifizierten RNA 12mer-Duplexe **S2/S4-S2/S7** liegen ca.  $8^\circ\text{C}$  über denen der RNA-Duplexe, die nur das fluorierte Nucleosid **8**, welches an der 2'-Position nicht modifiziert ist, enthalten (*Tabelle 6*). Diese Schmelzpunkterhöhung entspricht einer Stabilisierung um  $2,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  (*Tabelle 7*) und kann aufgrund der identischen Sequenz und Messbedingungen ausschließlich der Aminoethyl-Funktion zugeschrieben werden. Die deutliche Stabilisierung der RNA-Duplexe durch den Einbau des 2'-Aminoethyl modifizierten, 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosidanalogons **27** ist in *Abbildung 66* noch einmal graphisch dargestellt (dunkelblaue Balken).

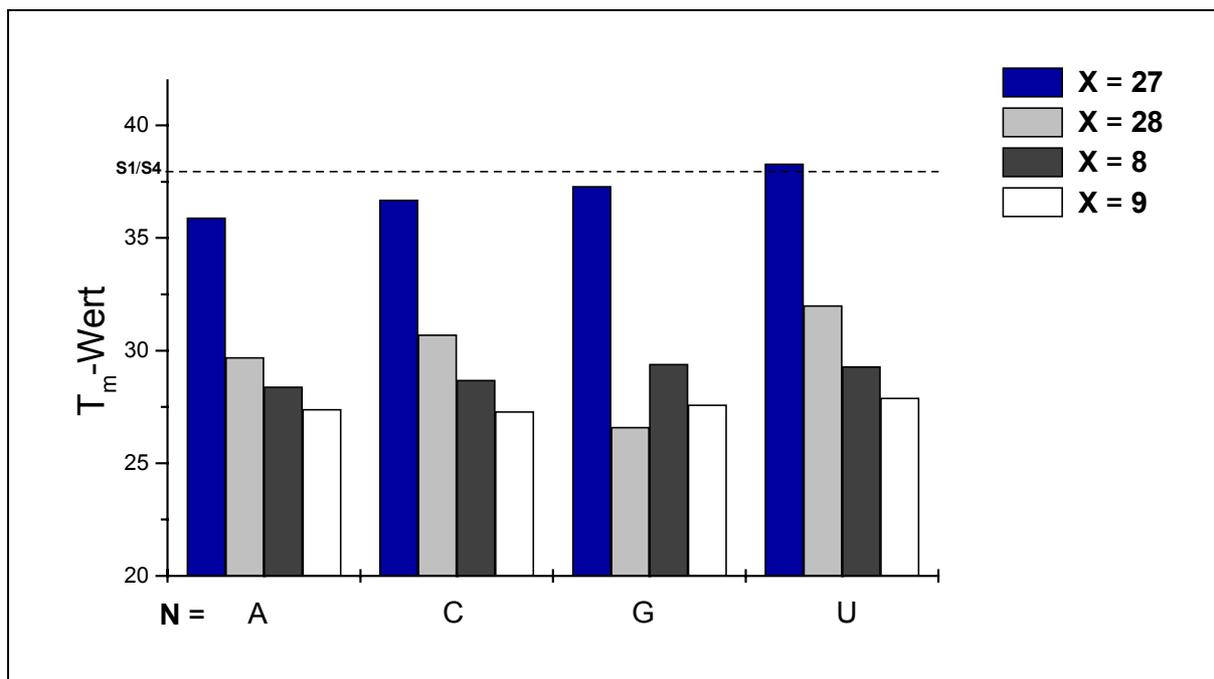


Abbildung 66: Graphische Darstellung der Schmelzpunkte der modifizierten Duplexe; modifizierter RNA-Strang 5'- CUU UUC XUU CUU -3', hybridisiert mit 5'- AAG AAN GAA AAG -3'

Die mit dem 2'-( $\beta$ -Aminoethyl)-2,4-difluorbenzol-Nucleosid **28** modifizierten RNA-Stränge zeigen bei der Hybridisierung ein völlig anderes Bild. Die analysierten Duplexe **S3/S4-S3/S7** weisen geringere Schmelzpunkte auf als die mit Verbindung **27** modifizierten Duplexe. Die Schmelzpunkte befinden sich im Bereich von 26,6°C-32,0°C (Tabelle 6), stabilisieren aber immer noch die RNA Duplexe. Im Vergleich zu den 2'-unmodifizierten, fluorierten Benzolnucleosidanaloga und im Vergleich zu den Watson-Crick "mismatch"-Basenpaaren ist immer noch eine deutliche Stabilisierung von bis zu 4°C zu beobachten (Abbildung 66). Eine Ausnahme bildet hier der Duplex **S3/S6** mit der Basenpaarung **28-G**. Dieser weist eine Duplex destabilisierende Wirkung von 1°C auf.

Aufgrund der Resultate der Schmelzkurven der RNA-Duplexe, in denen die Verbindung **28** eingebaut ist, kann festgestellt werden, dass es sich bei dieser Verbindung nicht um eine universelle Base handelt. Bei der Basenpaarung **28-N** findet eine deutliche Unterscheidung zwischen den natürlichen Nucleosiden statt. Steht **28** gegenüber einem Pyrimidin, so resultiert daraus ein deutlich höherer  $T_m$ -Wert ( $\Delta T_m = 2^\circ\text{C}$ ) als wenn die Modifikation mit einem Purin gepaart wird.

Tabelle 7: Thermodynamische Daten von RNA-Duplexen mit modifizierten Basenpaaren

Basenpaar		T <sub>m</sub> -Wert [°C]	ΔH° [kcal mol <sup>-1</sup> ]	TΔS° [kcal mol <sup>-1</sup> ]	ΔG° [kcal mol <sup>-1</sup> ]
1. Base	2. Base				
<b>27</b>	<b>A</b>	<b>29,7 ± 0,2</b>	74,2 ± 3,5	65,0 ± 2,9	9,0 ± 0,3
	<b>C</b>	<b>30,7 ± 0,2</b>	74,8 ± 1,2	65,2 ± 0,9	9,6 ± 0,1
	<b>G</b>	<b>26,6 ± 0,3</b>	90,5 ± 2,1	81,7 ± 1,5	8,8 ± 0,1
	<b>U</b>	<b>32,0 ± 0,2</b>	73,9 ± 4,7	64,0 ± 4,5	10,1 ± 0,2
<b>28</b>	<b>A</b>	<b>35,9 ± 0,2</b>	72,2 ± 2,0	61,5 ± 2,0	10,8 ± 0,1
	<b>C</b>	<b>36,7 ± 0,3</b>	74,3 ± 0,6	63,3 ± 0,6	10,9 ± 0,1
	<b>G</b>	<b>37,3 ± 0,3</b>	72,6 ± 2,0	61,5 ± 1,8	11,1 ± 0,1
	<b>U</b>	<b>38,3 ± 0,1</b>	83,3 ± 0,3	71,5 ± 0,3	11,8 ± 0,1

Das Vorliegen einer universellen Base kann auch durch das Übereinanderlegen der normierten Schmelzkurven von RNA Duplexen mit Basenpaaren aus **27** und den natürlichen Nucleobasen erfolgen. Wie in *Abbildung 67* gezeigt, bilden die Duplexe **S2/S4-S2/S7** sehr ähnliche Schmelzkurven. Es ist deutlich die geringe Schwankung der Schmelzpunkte zu erkennen. Die Tatsache, dass die Schmelzpunkte der Duplexe nahezu identisch sind, zeigt auch, dass zwischen den modifizierten Nucleobasen und den natürlichen Nucleosiden vermutlich keine Wasserstoffbrücken ausgebildet werden.

Die erhöhte Stabilität der mit **27** modifizierten Duplexe gegenüber dem unmodifizierten Duplex kann a) auf erhöhte Basenstapelungs-Wechselwirkungen durch das 4,6-Difluorbenzimidazol und b) auf die zusätzlichen elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminoethyl-Funktion mit dem negativ geladenen RNA-Phosphatrückgrat zurückgeführt werden.

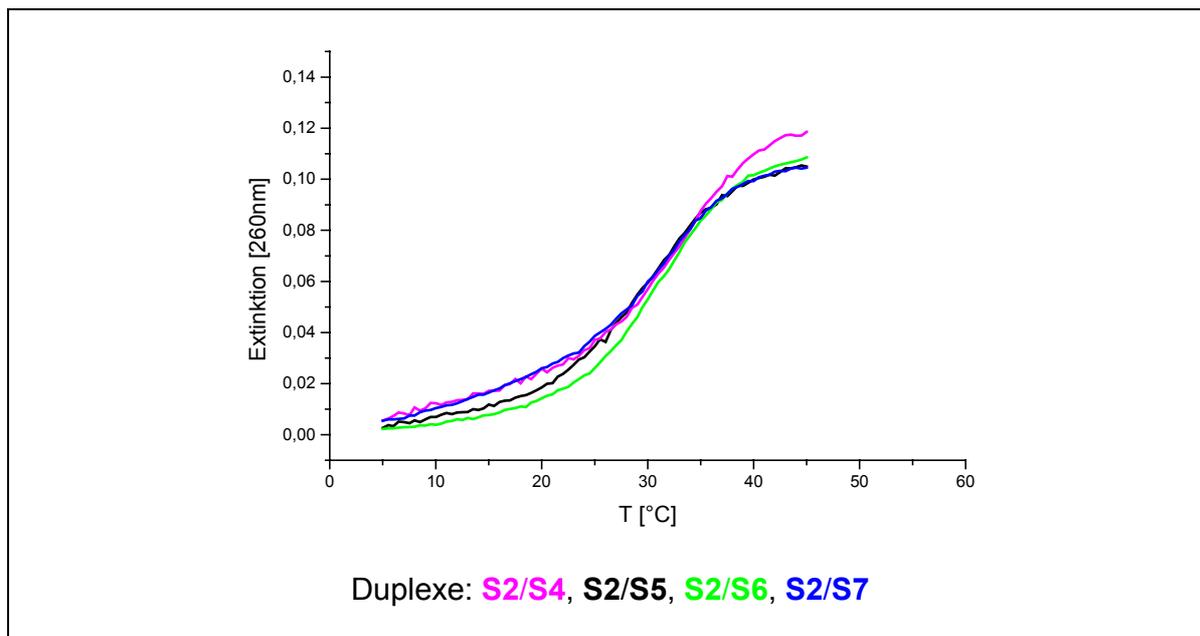


Abbildung 67: Schmelzkurven der RNA-Duplexe, die Verbindung 27 enthalten.

Um die exakte Ursache des stabilisierenden Effektes der 2'-Aminoethyl-Gruppe aufzuklären, wurden weitere analytische Untersuchungen durchgeführt. Die Konformationsanalyse aller synthetisierten, ungeschützten Nucleoside **8**, **9**, **27** und **28** wurde mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie durchgeführt. Die erhaltenen ROESY-Spektren lieferten jedoch keine zusätzlichen Erkenntnisse und konnten die Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen an modifizierten RNA 12meren nicht widerspiegeln. Durchgeführte Moleküldynamik-Simulationen an den 12mer Duplexen ergaben, dass der C-F...H-C-Abstand in Basenpaaren mit den fluorierten Benzimidazolen und Benzolen um 0,5 Å länger ist als die Wasserstoffbrücken-Bindungen in natürlichen Nucleosiden. Zudem nimmt der Winkel zwischen der fluorierten Nucleobase und dem benachbarten Nucleosid um 14° zu; er steigt von 36° auf 50°. Diese Änderung bewirkt einen engeren Kontakt des 4,6-Difluorbenzimidazols mit der in 5'-Richtung benachbarten Nucleobase und führt zu verbesserten Basenstapelungswechselwirkungen.

Die größere Hydrophobizität des 4,6-Difluorbenzimidazols ist eine mögliche Erklärung für die im allgemeinen besseren Resultate des fluorierten Benzimidazols gegenüber dem fluorierten Benzol. Kuchta *et al.* stellten fest, dass natürliche Systeme in ungezwungenen, nicht eingeschränkten Situationen bevorzugt Adenosin einbauen

(Chiaramonte, 2003). Dies wurde mit der höheren Hydrophobizität des Adenosins im Vergleich zu den anderen natürlichen Nucleosiden begründet.

### *RNA-Duplexe mit den artifiziellen Basenpaaren 8-9 und 27-9*

Auch bei Basenpaaren, die aus zwei modifizierten Nucleosiden bestehen, spielt der Einfluss der 2'-Aminoethyl-Gruppe eine entscheidende Rolle.

Die Überlegung, dass ein Basenpaar, welches aus zwei fluorierten Nucleosidanaloga besteht, in einem RNA-Duplex zu keiner weiteren Destabilisierung im Vergleich zum monomodifizierten Duplex führt, beruht darauf, dass keine weiteren Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden und keine geringere Solvation auftreten sollte. In der Tat konnte gezeigt werden, dass ein RNA-Duplex mit dem Basenpaar **X-N = 8-9** (Abbildung 68) einen um 5,3°C höheren  $T_m$ -Wert aufweist als der monomodifizierte RNA-Duplex mit dem Basenpaar **8-U**. Die erhöhte thermische Stabilität kann auf die zusätzlichen Basenstapelungswechselwirkungen zurückgeführt werden und auf die Tatsache, dass bei Einführung des zweiten fluorierten Nucleosids keine Stabilitätsverluste durch das Fehlen zuvor vorhandener Wasserstoffbrücken oder Solvationen auftreten.

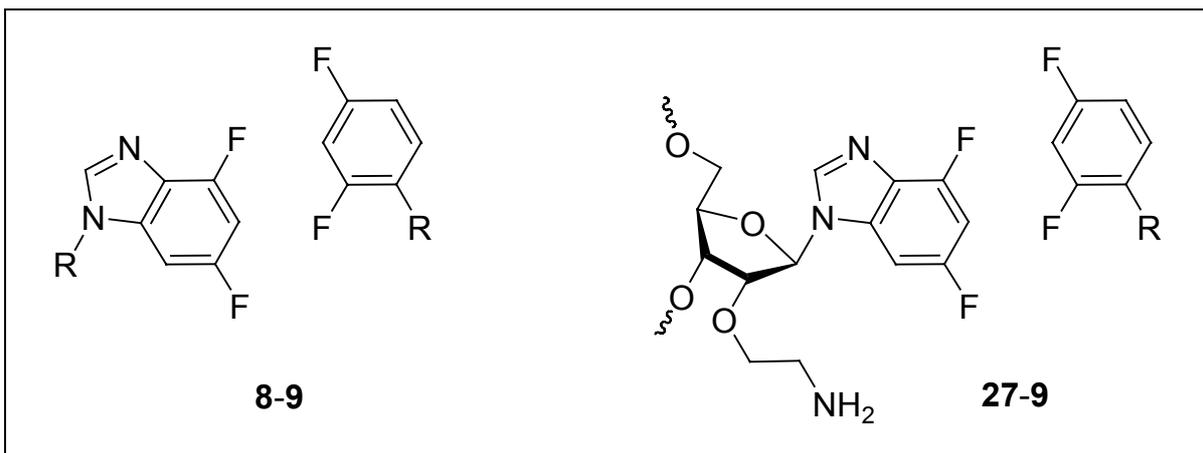


Abbildung 68: Artifizielle Basenpaare 8-9 und 27-9 mit fluorierten Nucleosidanaloga

Der Einfluss der Aminoethyl-Gruppe zeigt sich nun in der Bestimmung des  $T_m$ -Wertes des Duplex mit dem Basenpaar **27-9**. Dieses Basenpaar bewirkt im Vergleich zu dem

mit **8-9** modifizierten Duplex eine  $T_m$ -Wert-Erhöhung um ca.  $1^\circ\text{C}$  (*Tabelle 8*). Da diese beiden Duplexe abgesehen von der Aminoethyl-Gruppe nahezu identisch sind, kann die Stabilitätserhöhung dieser Gruppe zugeschrieben werden.

*Tabelle 8: Schmelzpunkte und thermodynamische Daten artifiziieller Basenpaare*

Basenpaar		$T_m$ value [ $^\circ\text{C}$ ]	$\Delta H^\circ$ [kcal mol $^{-1}$ ]	$T\Delta S^\circ$ [kcal mol $^{-1}$ ]	$\Delta G^\circ$ [kcal mol $^{-1}$ ]
1. Base	2. Base				
<b>8</b>	<b>9</b>	<b>34,6</b>	94,4	83,2	11,2
<b>27</b>	<b>9</b>	<b>35,4</b>	70,8	60,2	10,6

Weitere Untersuchungen zur Stabilität und Struktur von Basenpaaren mit zwei fluorierten Nucleosidanaloga werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe von Alexandra Zivkovic durchgeführt (Zivkovic, 2003).

### 8.2.3 Schlussfolgerungen aus den erhaltenen Schmelzkurven

Die UV/VIS-spektroskopischen Messungen an den chemisch modifizierten RNA 12meren wurden durchgeführt, um den Einfluss der aromatischen Fluorsubstituenten und der elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminogruppe zu untersuchen. Die Anwendung hydrophober, Fluor substituierter Nucleobasen, die nur in Ausnahmefällen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen (Dunitz, 2004), mit  $\beta$ -Aminoethyl-modifizierter 2'-Position führte im Fall des 4,6-Difluorbenzimidazols **27** zu deutlich stabilisierten RNA-Duplexen.

- Die mit Verbindung **27** modifizierten Duplexe **S2/S4-S2/S7** sind ähnlich stabil wie der unmodifizierte Watson-Crick-Duplex **S1/S4**.
- Bei Verbindung **27** handelt es sich um eine neue universelle Base. Da diese Modifikation nicht zwischen den natürlichen Nucleosiden unterscheidet, resultieren nahezu identische Schmelzkurven und  $T_m$ -Werte.
- Die Stabilisierung eines RNA-Duplex fällt geringer aus, wenn Verbindung **28** eingebaut ist. Es liegt jedoch noch eine Erhöhung der Stabilität um bis zu 4°C gegenüber den Watson-Crick "mismatch"-Basenpaaren und den 2'-unmodifizierten, fluorierten Nucleosiden vor. Eine Ausnahme ist die beobachtete Destabilisierung bei der Untersuchung des Duplexes **S3/S6**.
- Bei Verbindung **28** handelt es sich nicht um eine universelle Base, da die Basenpaarung mit Pyrimidinen der Paarung mit Purinen bevorzugt wird.
- Die 2'- $\beta$ -Aminoethyl-Gruppe bewirkt eine Erhöhung der thermischen Stabilität von RNA-Duplexen. Beide Nucleosidanaloga **27** und **28** bewirken eine zum Teil sehr ausgeprägte Stabilisierung des Duplex (bis zu 8°C) im Vergleich zu den 2'-unmodifizierten, fluorierten Nucleosiden **8** und **9**.
- In Analogie zu den Ergebnissen der 2'-unmodifizierten, fluorierten Nucleoside bewirken Modifikationen mit 4,6-Difluorbenzimidazol als Nucleobase immer eine größere Stabilisierung der Duplexe. Dies resultiert aus dem größeren

Beitrag der Basenstapelungswechselwirkungen und der erhöhten Hydrophobizität (O'Neill, 2002).

- Auch bei Basenpaaren, die aus zwei Nucleosidanaloga aufgebaut sind, ist eine Stabilitätserhöhung zu beobachten, die aus dem Einfluss der 2'-Aminoethyl-Gruppe resultiert.

Diese Untersuchungen legten die Grundlage für die Entwicklung von chemisch modifizierten Hammerhead-Ribozymen gegen Punktmutationen, die im nächsten Kapitel beschrieben werden. Besonders Erfolg versprechend für die kinetischen Analysen scheint dabei Verbindung **27** zu sein, da dieses Nucleosid deutlich stabilere Basenpaarungen eingeht als Watson-Crick "mismatch"-Basenpaare bei Punktmutationen.

Zur Untersuchung der Helixkonformationen der modifizierten Duplexe wurden CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Diese werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

### 8.3 CD-Spektroskopie an RNA 12meren

Zur Untersuchung des Einflusses 2'-O-Aminoethyl modifizierter Verbindungen auf die Struktur einer A-Helix RNA wurden die CD-Spektren der modifizierten Duplexe aufgenommen und analysiert.

Die Circular Dichroismus(CD)-Spektroskopie ist eine optische Methode zur Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstrukturen chiraler Biomakromoleküle. Sie beruht auf der unterschiedlich starken Absorption von links und rechts polarisiertem Licht durch optisch aktive Substanzen. Bei dieser nicht destruktiven Meßmethode wird die wellenlängenabhängige Elliptizität der Probe gemessen. Diese ist über die Intensität des rechts bzw. linkspolarisierten Lichts nach dem Absorptionsvorgang definiert und hängt über das Lambert Beer'sche Gesetz mit den Extinktionskoeffizienten der Probe zusammen. In CD-Spektren wird die Elliptizität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Die resultierenden Werte werden je nach Vorzeichen als positiver bzw. negativer Cotton-Effekt bezeichnet. Der große Vorteil der CD-Spektroskopie liegt in der Empfindlichkeit der Messung gegenüber Veränderungen in der Struktur der zu untersuchenden Moleküle, der einfachen Durchführbarkeit der Messung, der geringen Probenmenge und der bereits erwähnten nicht destruktiven Natur der Messung (Gray, 1992).

Ein CD-Spektrum liefert allerdings keine genaue Strukturinformation, sondern nur ein strukturabhängiges Gesamtbild. Die Intensität und die Lage einzelner Banden kann nur im Vergleich mit Spektren bekannter Strukturen interpretiert werden. Es können jedoch zuverlässige Aussagen über die Sekundär- und Tertiärstrukturen von Nucleinsäuren gemacht werden, da die entsprechende A-, B- und Z-Form von Helices charakteristische Spektren aufweisen (Woody, 1995). Die A-Helix weist dabei ein charakteristisches Maximum bei ca. 260 nm auf und ein Minimum bei ca. 240 nm. Während sich die Form der Spektren nicht verändert, ist eine Verschiebung der Maxima und Minima um einige Nanometer möglich. Diese sind durch die Sequenzabhängigkeit der Absorption bedingt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten CD-Untersuchungen wurden an einem JASCO J-710 Spektrometer mit einem thermostatisierten Küvettenhalter durchgeführt. Für die Messungen wurde der gleiche Puffer verwendet wie bei den UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen, jedoch nur ein Fünftel der Probenmenge, da für dieses Gerät kleinere Küvetten zur Verfügung standen. Details zur Durchführung der Messungen sind in Kapitel 12 aufgeführt.

Die monomodifizierten Duplexe **S2/S4** - **S2/S7** und **S3/S4** – **S3/S7** wurden im Wellenlängenbereich von 350-210 nm untersucht. Die vergleichenden Messungen erfolgten bei 10°C, um zu gewährleisten, dass die beiden Oligonucleotid-Stränge vollständig als Duplex vorliegen. Zudem wurden die Messungen unter kontinuierlichem N<sub>2</sub>-Strom durchgeführt, um eine Kondensation von Luftfeuchtigkeit an der Glaswand der Küvette und somit eine Störung der Messung zu unterbinden.

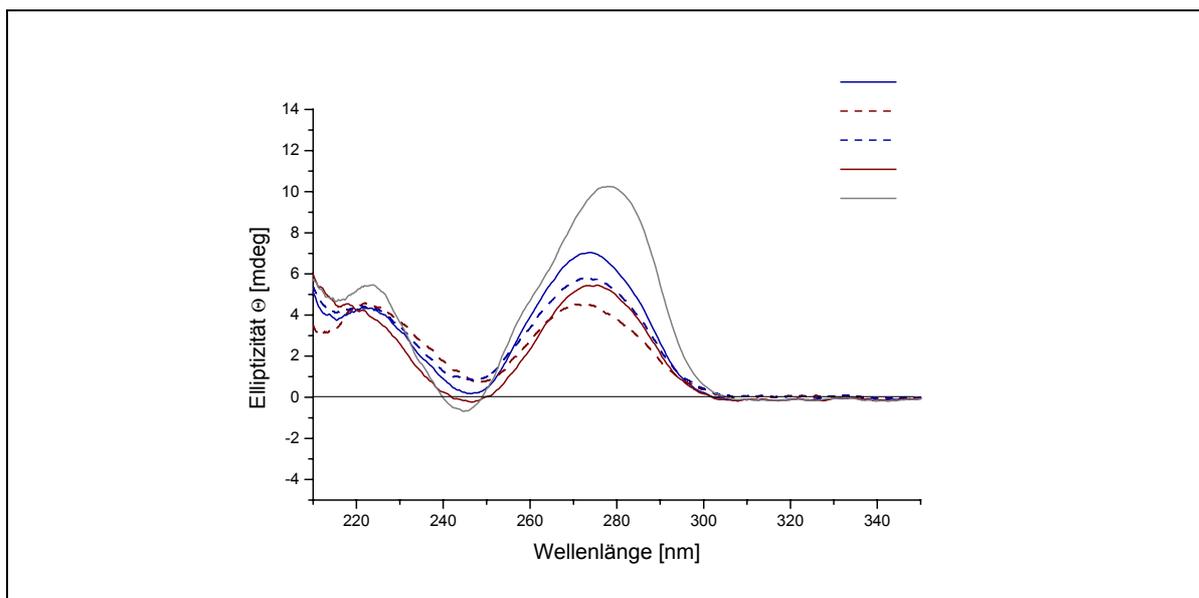


Abbildung 69: CD-Spektren der mit Verbindung 28 modifizierten Duplexe **S3/S4** – **S3/S7**

Die in *Abbildung 69* gezeigten CD-Spektren zeigen den für eine A-Helix charakteristischen Kurvenverlauf. Das Spektrum des unmodifizierten Duplex **S1/S4** ist in grau dargestellt. Es ist deutlich eine geringere Elliptizität der vier modifizierten Duplexe **S3/S4** – **S3/S7** bei dem Hauptmaximum festzustellen. Diese Abnahme der Elliptizität gegenüber dem Duplex **S1/S4** bei gleicher Meßtemperatur lässt auf eine deutlich geringere Stabilität der Duplexe schließen, die mit dem 2'-Aminoethyl

substituierten 2,4-Difluorbenzolnucleosid **28** modifiziert sind. Dies steht in Übereinstimmung mit den ermittelten  $T_m$ -Werten. Die minimale Verschiebung des Hauptmaximums hin zu niedrigeren Wellenlängen lässt auf eine geringfügige Veränderung der Doppelhelixstruktur wie z.B. eine Aufweitung durch die Anwesenheit des fluorierten Nucleosids schließen. Die Abnahme der Intensität am Hauptmaximum fällt bei den in *Abbildung 70* dargestellten CD-Spektren nicht so stark aus. Der Einbau des 2'-Aminoethyl substituierten 4,6-Difluorbenzimidazolnucleosid **27** beeinflusst die Stabilität der RNA-Duplexe in weitaus geringerem Maß als Verbindung **28**.

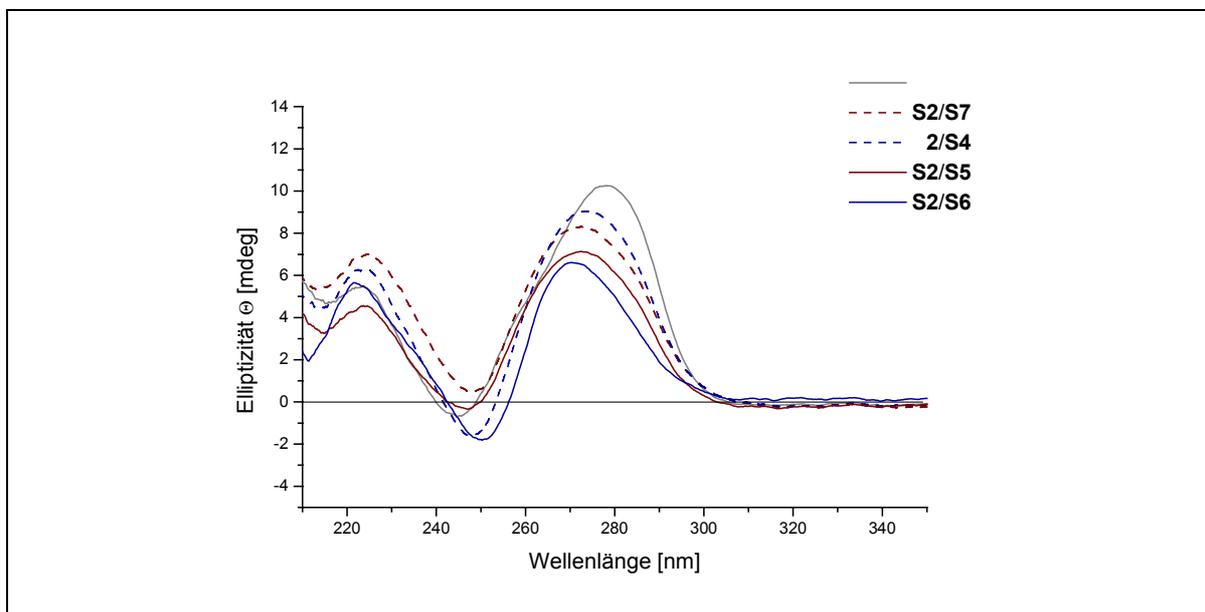


Abbildung 70: CD-Spektren der mit Verbindung **27** modifizierten Duplexe **S2/S4** – **S2/S7**



# 9

## **Kinetische Untersuchungen an chemisch modifizierten anti-HIV Hammerhead-Ribozymen**

Katalytische RNA, wie z.B. das Hammerhead-Ribozym, ist in der Lage die Genexpression durch die spezifische Spaltung von mRNA zu beeinflussen. Viren entziehen sich diesen Regulationsmechanismen häufig durch eine hohe Mutationsrate. Die sequenzspezifische Regulation der viralen Genexpression wird daher durch das Auftreten von Punktmutationen empfindlich gestört. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es chemisch modifizierte Ribozyme zu entwickeln, die in der Lage sind Punktmutationen in der Ziel-RNA zu tolerieren.

Dafür war es notwendig modifizierte Nucleoside zu entwickeln und in das Ribozym einzubauen, die bei Spaltung der mutierten Zielsequenz eine höhere katalytische Aktivität ermöglichen als das natürliche Ribozym, dessen Aktivität durch die Sequenzänderung an der Stelle der Punktmutation beeinträchtigt ist. Die Synthese und Überprüfung der Eignung solcher Modifikationen, z.B. durch Evaluierung des Einflusses auf die Stabilität von RNA-Duplexen, wurde in den letzten beiden Kapiteln ausführlich beschrieben.

Um den Einfluss der artifiziellen Nucleoside **8**, **9**, **27** und **28** auf die katalytische Aktivität von Hammerhead-Ribozymen zu untersuchen, wurden kinetische Analysen der Ribozym katalysierten Spaltungsreaktionen durchgeführt. Die Nucleosidanaloga wurden dabei speziell im Hinblick auf ihre Eignung im Einsatz gegen genomische Punktmutationen getestet, d.h. die Hammerhead-Ribozyme wurden gegen Substrate getestet, die gegenüber der Position der Modifikation mit allen vier natürlichen Nucleosiden permutiert wurden.

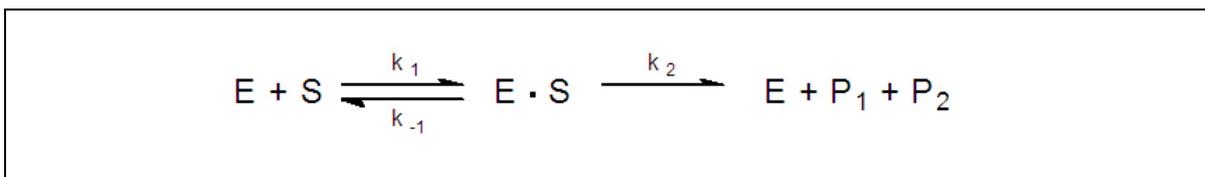
Zunächst wurde der Einfluss der fluorierten Nucleoside **8** und **9** auf die Ribozymaktivität untersucht. Neben der Etablierung des Fluoreszenz basierten Assays zur kinetischen Analyse der Spaltungsreaktion stand die Überprüfung im Mittelpunkt, inwiefern die Erkenntnisse aus der Auswertung der  $T_m$ -Werte auf die Änderung der katalytischen Aktivität von Ribozymen übertragen werden können. Nach der Optimierung des verwendeten anti-HIV Hammerhead Ribozyms hinsichtlich der Gesamtgröße, der Länge der Seitenarme und des "*stem loop*"-Bereiches der Helix II wurde das Ribozym mit den 2'-Aminoethyl substituierten Nucleosiden **27** und **28** modifiziert und wie oben beschrieben gegen Punktmutationen im Substratstrang getestet.

## **9.1 Die Kinetik und Analytik der Ribozym katalysierten Spaltungsreaktion**

Zur Analyse der Ribozym katalysierten Spaltungsreaktionen gehört neben dem Verständnis der Vorgänge auf molekularer Ebene ein geeigneter Assay, der die Quantifizierung der gebildeten Spaltprodukte erlaubt. Im folgenden Unterkapitel werden die Kinetik der Spaltungsreaktion, die Synthese der Ribozyme und der Fluoreszenz markierten Substrate sowie der Aufbau des Assays und die Detektion mittels eines ALF Express<sup>®</sup> DNA Sequenzier-Systems beschrieben.

### 9.1.1 Kinetische Grundlagen

Die Anwendung der Michaelis-Menten Kinetik für die von Hammerhead-Ribozymen katalysierten Spaltungen wurde erst durch die Trennung der autokatalytisch spaltenden RNA in zwei Fragmente, zum einen in das katalytisch aktive Ribozym und zum anderen in sein komplementäres Substrat, möglich (Haseloff & Gerlach, 1988). Der Michaelis-Menten Mechanismus beinhaltet die reversible Bildung des Ribozym-Substrat-Komplexes mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_{-1}$  sowie Spaltung des Substratstranges in zwei Spaltprodukte (siehe auch *Kapitel 2*). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird mit der Konstante  $k_2$  (bzw.  $k_{\text{cat}}$ ) beschrieben (*Abbildung 71*).



*Abbildung 71: Reaktionsschema einer Ribozym katalysierten Reaktion nach Michaelis-Menten*

Ribozym katalysierte Reaktionen können unter Substratüberschuss- oder Ribozymüberschuss-Bedingungen durchgeführt werden. Bei Messung unter Substratüberschuss-Bedingungen spricht man auch von "steady state"- oder "multiple turnover"-Bedingungen, da hier jedes einzelne Ribozym mehrere Substratspaltungen katalysiert. Die katalytische Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cat}}$  ist ein Maß für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Bei kleinen Hammerhead-Ribozymen, bei denen die Substratanlagerung und die Produktdissoziation aufgrund der geringen Anzahl an ausgebildeten Watson-Crick Basenpaaren schnell abläuft, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Spaltung der Phosphordiesterbindung. Die Michaelis-Menten Konstante  $K_M$  ist dann gleich der Dissoziationskonstanten  $K_D$  des Ribozym-Substrat-Komplexes. Erhöht man die Anzahl der Basenpaare im Substrat, wodurch der ausgebildete Komplex stabiler wird, so wird die Produktdissoziation geschwindigkeitsbestimmend die katalytische Konstante  $k_{\text{cat}}$  fällt von typischerweise  $1-2 \text{ min}^{-1}$  auf ca.  $1 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  (Hertel, 1994). Unter "single turnover"-Bedingungen liegt das Ribozym gegenüber dem Substrat im Überschuss vor. Solche Bedingungen

werden für die Spaltung von längeren RNA-Substraten mit großer Überlappung mit der Ribozymsequenz gewählt. Die katalytischen Konstanten sind unter diesen Bedingungen um mehrere Größenordnungen geringer (Heidenreich & Eckstein, 1992). Zudem wird die Produktdissoziation nicht berücksichtigt, da die Freisetzung der Spaltprodukte und somit die wieder zur Katalyse zur Verfügung stehenden Ribozyme aufgrund des Enzymüberschusses für die kinetische Betrachtung der Reaktion keine Rolle spielt. Generell wird durch eine Erhöhung des pH-Wertes, der Temperatur oder der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auch die Spaltungsgeschwindigkeit, die durch  $k_{cat}$  beschrieben wird, erhöht.

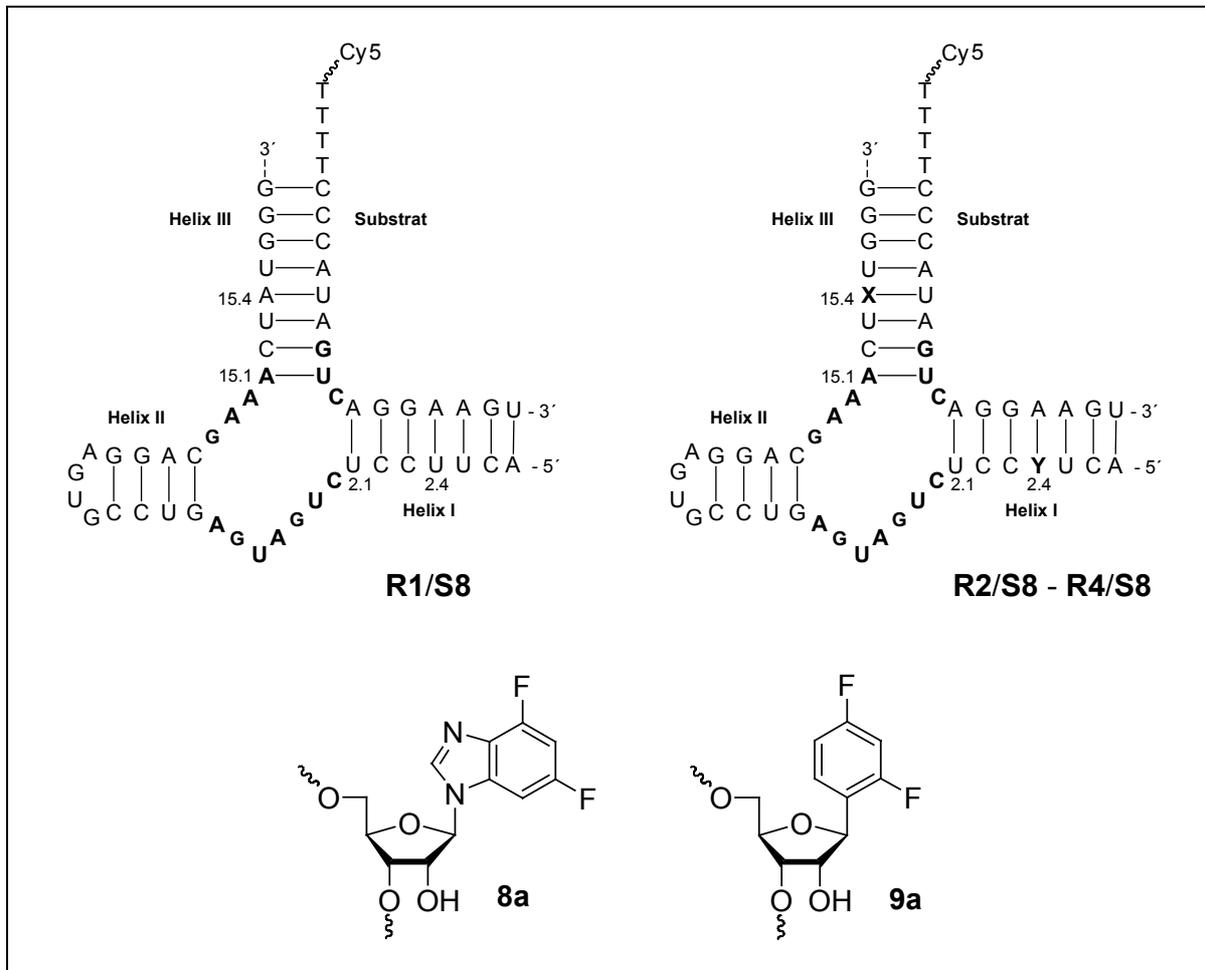
### 9.1.2 Synthetisierte Hammerhead Ribozyme und Substratstränge

Ausgehend von dem im Kapitel 4 vorgestellten Hammerhead-Ribozym LHPol13 wurde zunächst dieses anti-HIV Ribozym als Grundsequenz ausgewählt, untersucht und mit den fluorierten Nucleosidanaloga **8** und **9** chemisch modifiziert. Nach Verkleinerung und Optimierung dieses Ribozyms für die kinetischen Tests unter "multiple turnover"-Bedingungen wurden die Untersuchungen mit den 2'-modifizierten fluorierten Verbindungen **27** und **28** fortgeführt. Alle Hammerhead-Ribozyme und Substrate, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurden, sind im folgenden aufgeführt. Die RNA-Synthesen wurden nach den im vorangehenden Kapitel beschriebenen Methoden synthetisiert und aufgereinigt.

Die Ribozyme, die für die Messungen unter "single turnover"-Bedingungen verwendet wurden, sind mit den entsprechenden Modifikationen in *Abbildung 72* dargestellt. Das unmodifizierte Hammerhead-Ribozym **R1** ist komplementär zum Substratstrang **S8**, welcher über vier Thymidine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekuppelt ist. Die Kupplung des Farbstoffes an das Oligoribonucleotid und die Analytik wird in einem späteren Abschnitt ausführlicher beschrieben (Kapitel 9.1.4).

Das Ribozym **R1** wurde an den Positionen 2.4 (**Y**) und 15.4 (**X**) modifiziert. Das Adenosin an Position 15.4 (**X**) wurde durch das 2'-unmodifizierte 4,6-Difluorbenzimidazol **8** substituiert und das Uridin an Position 2.4 (**Y**) durch das 2'-

unmodifizierte 2,4-Difluorbenzol-Nucleosidanalogue **9** ersetzt (*Abbildung 72 rechts*). Die daraus resultierenden Ribozyme **R2** und **R3** wurden jeweils mit dem Substratstrang **S8** hybridisiert. Zudem wurde das zweifach modifizierte Ribozym **R4** hergestellt und untersucht.



*Abbildung 72: Sekundärstrukturen und Modifikationen der Hammerhead-Ribozyme für die Messungen unter "single turnover"-Bedingungen; R2: X = 8, Y = U; R3: X = A, Y = 9; R4: X = 8, Y = 9*

Die Positionen der Modifikationen wurden sorgfältig ausgewählt und 4 Basenpaare vom katalytischen Zentrum entfernt platziert. Befindet sich die Modifikation zu nahe am Zentrum, wird die korrekte Ausbildung der katalytisch aktiven Konformation beeinflusst (Werner & Uhlenbeck, 1995). Am Ende der zum Substrat komplementären Region besteht die Möglichkeit, dass aufgrund des artifiziiellen Nucleosids die Helix nicht mehr korrekt ausgebildet wird und somit der Effekt der Modifikation nur schlecht messbar ist.

Zur Messung des Ribozyms unter den gewünschten "multiple turnover"-Bedingungen musste das Hammerhead-Ribozym – unter Beibehaltung des zum HIV-Pol Gen komplementären Sequenzausschnittes – optimiert werden. Diese Veränderung fand unter Variation der Länge der Ribozym-Seitenarme und der Helix II statt. In erster Näherung ist die Sequenz von Helix II zwar für die katalytische Aktivität eines Hammerhead-Ribozyms nicht relevant, jedoch spielt unter Umständen die Stabilität des "tetraloop" eine Rolle. Zudem bedeutet eine Verringerung der Gesamtlänge des Ribozyms hinsichtlich späterer Anwendungen auch immer eine verbesserte Zellaufnahme und reduzierte Synthesekosten.

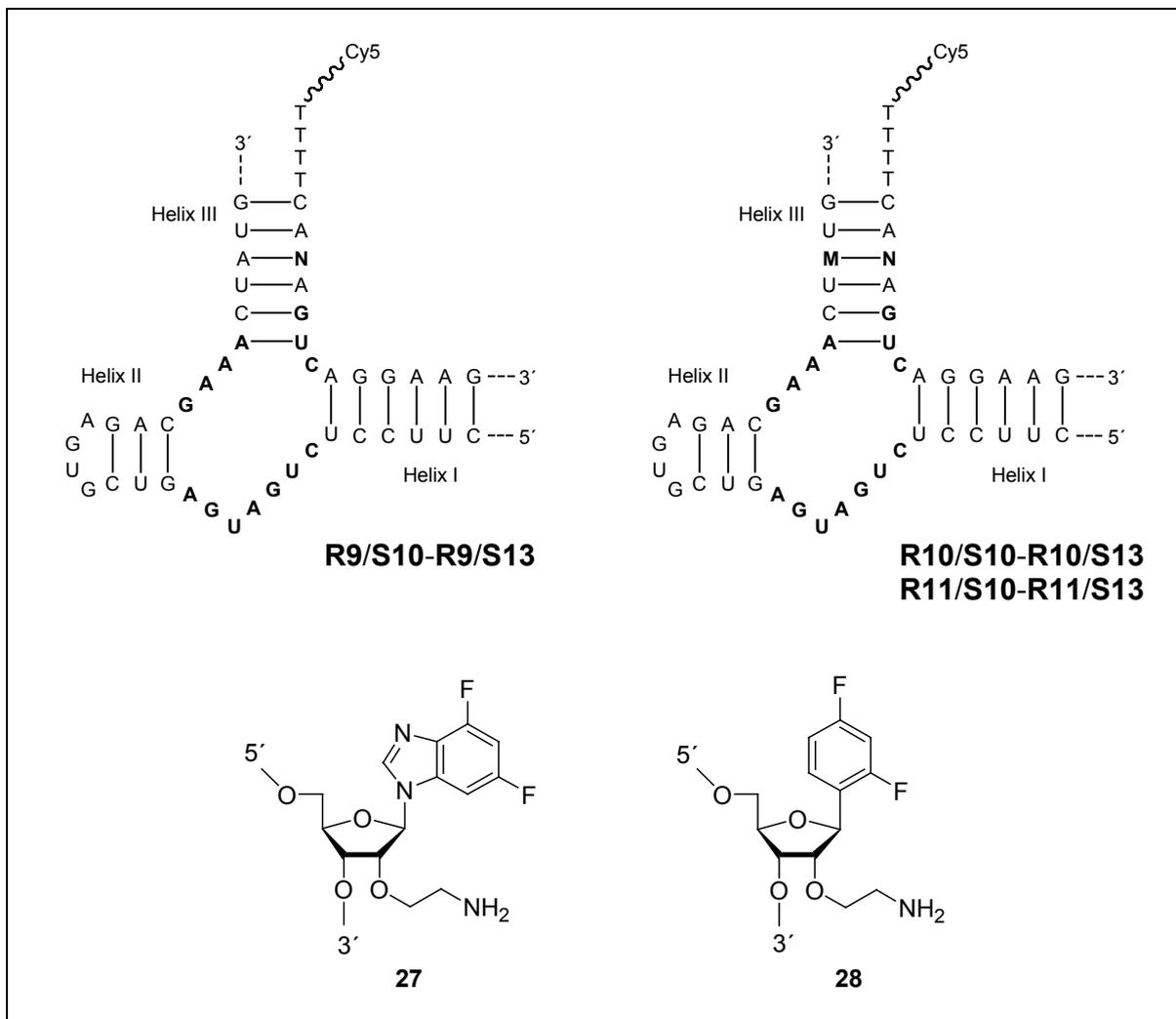


Abbildung 73: Sekundärstrukturen und Modifikationen der Hammerhead-Ribozyme für Messungen unter "multiple turnover"-Bedingungen; **R10: M = 27**; **R11: M = 28**; N = A, C, G, U.

Im Zuge der Optimierung wurden Hammerhead-Ribozyme getestet, die verkürzte Seitenarme besitzen (**R6**) bzw. eine kleinere Helix II (**R7**), bestehend aus zwei Basenpaaren mit stabilem "*tetra*loop". Die Kombination beider Veränderungen führte zu dem minimierten Ribozym **R8**. Resultierend aus diesen Ergebnissen ergab sich ein "optimiertes Ribozym" **R9**. Die entsprechenden Sequenzen sind in *Tabelle 9* aufgeführt. Die zugehörigen, verkürzten Substrate **S9** und **S10** wurden ebenfalls synthetisiert und Fluoreszenz markiert.

Die 2'-Aminoethyl modifizierten Nucleoside **27** und **28** wurden in das "optimierte" Hammerhead-Ribozym **R9** eingebaut. Die Stelle der Inkorporation ist in *Abbildung 73* mit **M** gekennzeichnet. Sowohl das unmodifizierte Ribozym **R9** als auch die beiden modifizierten Hammerhead-Ribozyme **R10** (**M** = **27**) und **R11** (**M** = **28**) wurden, um genomische Punktmutationen zu simulieren, gegen alle vier möglichen Substrate **S10-S13** getestet (**N** = A, C; G, U). Auf diese Weise wurden alle vier natürlichen Nucleoside gegenüber jeder der beiden Modifikationen hybridisiert. Für die Kontrolle der Spezifität und zur Analyse, in welchem Maß die katalytische Aktivität bei einer Punktmutation abnimmt, wurden mit dem unmodifizierten Ribozym auch alle Watson-Crick "match"- und "mismatch"-Fälle untersucht. Insgesamt wurden die kinetische Parameter von 12 unterschiedlichen Ribozym katalysierten Spaltungen ermittelt. Die Ribozym-Substrat-Komplexe sind in *Abbildung 73* dargestellt und die exakten Sequenzen mit Bezeichnung der Oligonucleotide in den *Tabelle 9* und *Tabelle 10* aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht und Sequenzen der synthetisierten Hammerhead-Ribozyme

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
R 1	5'- ACU UCC UCU GAU GAG UCC GUG AGG ACG AAA CUA UGG G -3'	unmodifiziertes Hammerhead-Ribozym
R 2	5'- ACU UCC UCU GAU GAG UCC GUG AGG ACG AAA CU <sup>8</sup> UGG G -3'	mit den 2'- unmodifizierten, fluorierten Nucleosiden <b>8</b> und/oder <b>9</b> modifizierte Ribozyme
R 3	5'- ACU <sup>9</sup> CC UCU GAU GAG UCC GUG AGG ACG AAA CUA UGG G -3'	
R 4	5'- ACU <sup>9</sup> CC UCU GAU GAG UCC GUG AGG ACG AAA CU <sup>8</sup> UGG G -3'	
R 5	5'- ACU GCC UCU GAU GAG UCC GUG AGG ACG AAA CUC UGG G -3'	Kontroll-Ribozym
R 6	5'- UCC UCU GAU GAG UCC GUG AGG ACG AAA CUA U -3'	Hammerhead-Ribozym "kurze Seitenarme"
R 7	5'- ACU UCC UCU GAU GAG UUU UUA CGA AAC UAU GGG -3'	Hammerhead-Ribozym "kleine Helix II"
R 8	5'- UCC UCU GAU GAG UGU GAA CGA AAC UAU -3'	Hammerhead-Ribozym "minimiert"
R 9	5'- CUU CCU CUG AUG AGU CGU GAG ACG AAA CUA UG -3'	Hammerhead-Ribozym "optimiert"
R 10	5'- CUU CCU CUG AUG AGU CGU GAG ACG AAA CU <sup>27</sup> UG -3'	mit den 2'-Aminoethyl substituierten, fluorierten Nucleosiden <b>27</b> bzw. <b>28</b> modifizierte Ribozyme
R 11	5'- CUU CCU CUG AUG AGU CGU GAG ACG AAA CU <sup>28</sup> UG -3'	

Tabelle 10: Übersicht und Sequenzen der synthetisierten Substratstränge

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
<b>S 8</b>	5'- Cy5 TTTT CCC AUA GUC AGG AAG U -3'	Substrat für die Ribozyme <b>R1 - R5</b> und <b>R7</b>
<b>S 9</b>	5'- Cy5 TTTT AUA GUC AGG A -3'	Substrat für die Ribozyme <b>R6</b> und <b>R8</b>
<b>S 10</b>	5'- Cy5 TTTT CAU AGU CAG GAA G -3'	Substrate für "optimierte" Ribozyme <b>R9 - R11</b> (N = A, C, G, U)
<b>S 11</b>	5'- Cy5 TTTT CAA AGU CAG GAA G -3'	
<b>S 12</b>	5'- Cy5 TTTT CAC AGU CAG GAA G -3'	
<b>S 13</b>	5'- Cy5 TTTT CAG AGU CAG GAA G -3'	
<b>S 14</b>	5'- Cy5 TTT TTT TTU CGU UAU -3'	Referenz (interner Standard)

### 9.1.3 Charakterisierung chemisch modifizierter Hammerhead Ribozyme mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die im vorangegangenen Abschnitt aufgeführten RNA-Sequenzen wurden nach den in Kapitel 8.1 dargestellten Methoden synthetisiert und isoliert. Im Fall der Hammerhead-Ribozyme musste jedoch ein effektives Aufreinigungsprotokoll entwickelt werden, welches salzfreie RNA-Stränge ohne zu große Ausbeuteverluste durch z. B. Adhäsion liefert.

Bei längeren Oligoribonucleotiden (Molekulargewicht > ca. 6000 g/mol) reicht die einfache Entsalzung der Probe mit Sephadex G25-Entsalzungssäulen nicht mehr aus.

Aufgrund der hohen negativen Ladung langer RNA-Stränge und der Möglichkeit zur Sekundärstrukturbildung kommt es zu einer erhöhten Anlagerung von Gegenionen wie  $\text{Na}^+$  (Huber, 1998). Dies stört in erheblichem Umfang die Charakterisierung des RNA-Stranges mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Zudem wird die katalytische Aktivität der Ribozyme bei der Analytik der Reaktionskinetiken beeinflusst. Auch nimmt bei hohen Molekulargewichten die Genauigkeit der Massenbestimmung ab (Faulstich, 1997), so dass auftretende Salzaddukte die Analytik zusätzlich erschweren würden. Dies ist bei einer exakten Messmethode wie der MALDI-Massenspektrometrie, die gewöhnlich die einfach geladenen Ionen der Biomoleküle generiert und detektiert, besonders störend (Hillenkamp, 1997). Der Einfluss des Salzgehaltes auf MALDI-Spektren von einzelsträngigen Oligodesoxynucleotiden ist in *Abbildung 74* dargestellt (Shaler, 1996). Bereits ab einer  $\text{Na}^+$ -Ionen-Konzentration von 25 mM (c) ist eine deutliche Verschlechterung des Spektrums festzustellen, während bei 250 mM  $\text{Na}^+$ -Ionen-Konzentration (d) keine Detektion mehr möglich ist.

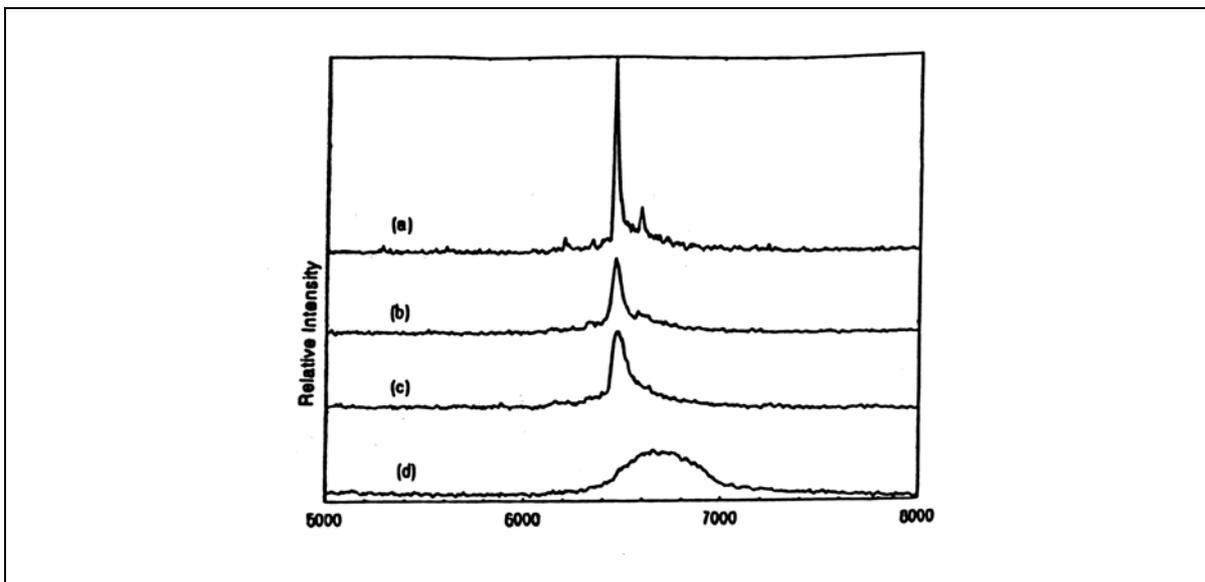


Abbildung 74: Einfluss des Salzgehaltes auf die Qualität von MALDI-Spektren (Shaler, 1996)

Um eine möglichst hohe Reinheit der Ribozyme zu erreichen, wurden verschiedene Entsalzungssysteme getestet. Neben den bereits erwähnten Sephadex-Entsalzungssäulen waren dies Microcon<sup>®</sup> Ultrazentrifugationsmembranen, Fällungen aus Ammoniumsalz-Lösungen und ZipTip<sup>®</sup>-Pipettenspitzen. Die Entsalzung über *Reversed Phase*(RP)-HPLC wie auch die Aufreinigung des Oligonucleotids mittels

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Elution des RNA-Stranges aus dem Gel ("*crush & soak*"-Methode) führten zu hohen Ausbeuteverlusten, so dass diese beiden Methoden nicht weiter berücksichtigt wurden.

Die Ethanol-Fällung des Oligoribonucleotids aus einer Ammoniumcitrat- bzw. Ammoniumacetat-Lösung führte zwar zu einer Detektion des Molpeaks, jedoch zu keinem zufriedenstellenden Resultat. Als weitere Möglichkeit zur Entsalzung von Oligonucleotid-Lösungen stehen die Microcon<sup>®</sup> Ultrazentrifugationsmembranen von Amicon zur Verfügung. Für die Anwendung bei Ribozymen wurden in dieser Arbeit die YM-3 Membranen verwendet, die für Moleküle mit einem Molekulargewicht <3000g/mol durchlässig sind. Auf diese Weise war es möglich die Probenlösung auf der Membran zu platzieren, die salzhaltige Lösung abzuzentrifugieren, mit sterilem Wasser nachzuspülen und aufzunehmen. Die auf diese Weise aufgereinigte Probe wurde zusätzlich über eine Sephadex G25-Säule entsalzt und führte zu einem etwas verbesserten Resultat.

Die ZipTip<sup>®</sup>-Pipettenspitzen beruhen auf der Adhäsion des Oligonucleotids an C<sub>18</sub>-Chromatographiematerial, welches in der Spitze einer sterilen Eppendorf-Pipettenspitze platziert ist. Die Anwendung von Eppendorf-Pipetten ermöglicht die Entsalzung auch kleiner Mengen an Oligonucleotid (ca. 0,2 OD) mittels einfacher Wasch- und Spülschritte. Nach der Equilibrierung des C<sub>18</sub>-Materials mit Acetonitril/H<sub>2</sub>O 1:1 und 200 mM TEAA-Lösung werden die ZipTips mit dem Probenmaterial beladen. Für die Vorbereitung einer MALDI-Messung wurden dafür idealerweise 5-10 µl einer RNA-Lösung der Konzentration 100pmol/µl verwendet. Nach Waschen des Oligonucleotids mit 200mM und anschließend 10 mM TEAA-Lösung wird der umgesalzte RNA-Strang mit ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 eluiert und zur Trockne eingengt. Die Entsalzung mittels ZipTip<sup>®</sup>-Pipettenspitzen führte zu einer deutlichen Verbesserung der MALDI-Spektren hinsichtlich des Salzgehaltes, jedoch konnten auch vermehrt entstandene Abbruchsequenzen detektiert werden, die eine erneute Aufreinigung des Oligonucleotids erfordert hätten.

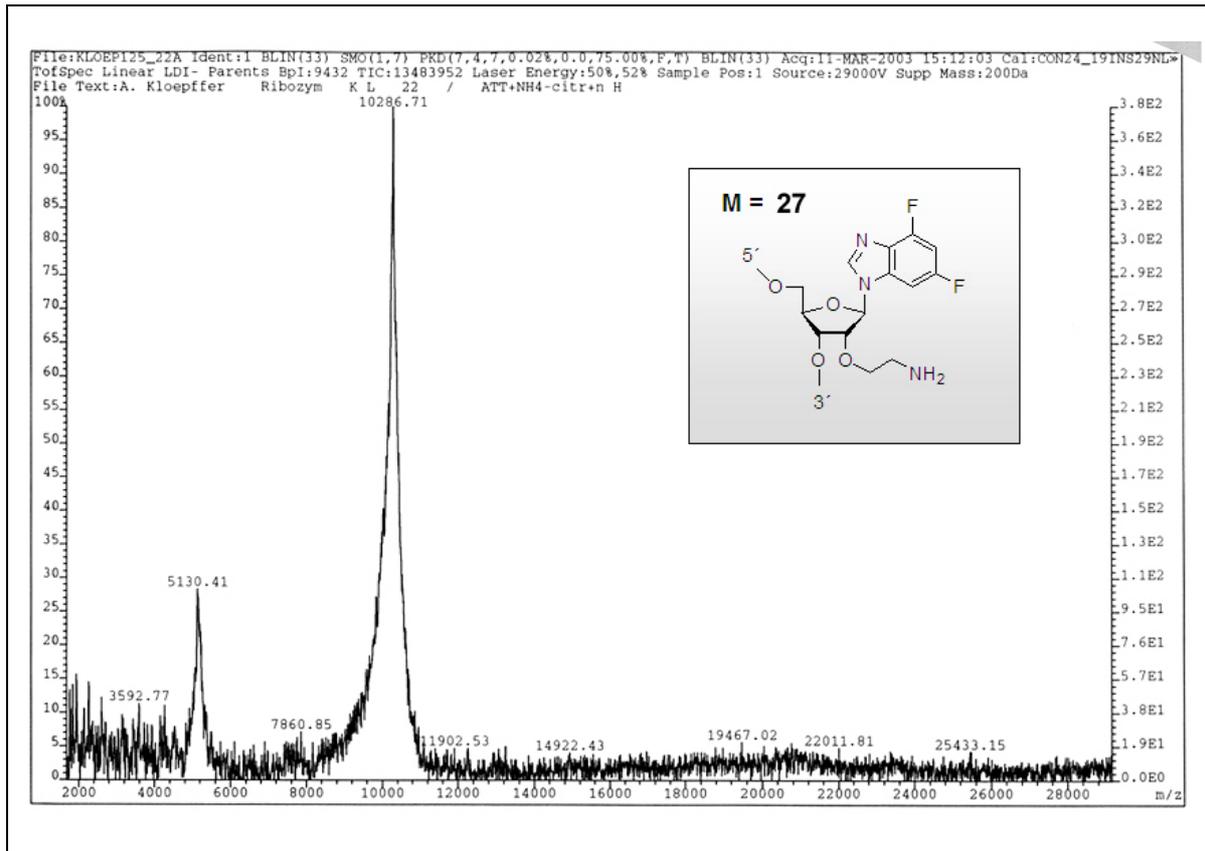


Abbildung 75: MALDI-Spektrum des Hammerhead-Ribozyms R10

Als geeignetste Methode zur Aufreinigung langer RNA-Stränge hat sich eine Kombination der Entsalzungsmöglichkeiten erwiesen. Wurde nach der Aufreinigung mittels Anionenaustauscher-HPLC der Ansatz geteilt und anschließend mit beiden Hälften die Entsalzung getrennt durchgeführt, musste zunächst nur die halbe Salzmenge aus der Lösung abgetrennt werden. Die Probe wurde daraufhin über die Ultrazentrifugationsmembran entsalzt und zweimal in 500 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die überstehende, RNA-haltige Lösung wurde dann über eine Sephadex G25-Säule entsalzt und deren reinste Fraktion (dies entspricht dem zweiten Milliliter des Eluats) wurde erneut über eine Sephadex-Säule aufgereinigt. Die mit diesem Aufreinigungsprotokoll erhaltenen Proben ergeben MALDI-Spektren von reinen Hammerhead-Ribozymen (Abbildung 75 und Abbildung 76).

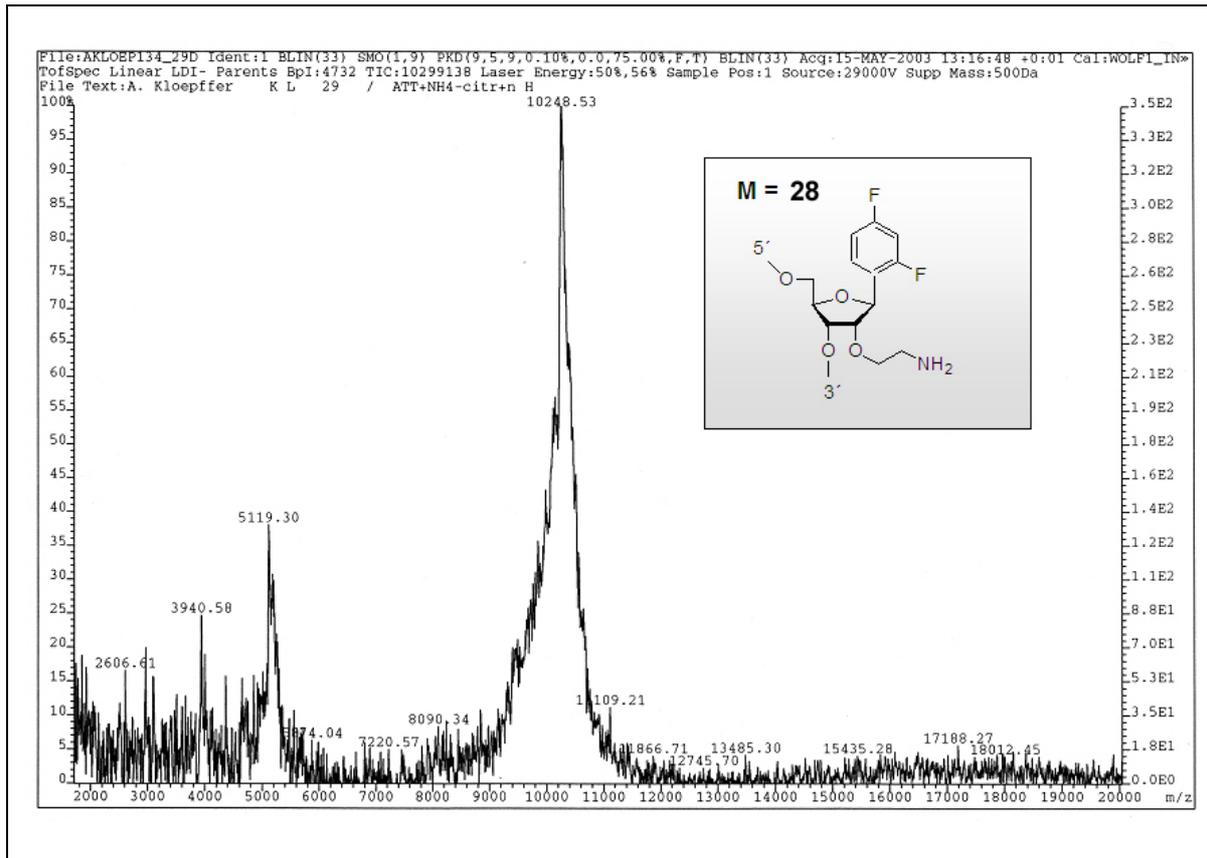


Abbildung 76: MALDI-Spektrum des Hammerhead-Ribozyms R11

Die erhaltenen Massen (10286,71 g/mol und 10248,53 g/mol) stimmen exakt mit den berechneten überein. Bei dem jeweils zweiten Signal handelt es sich um das doppelt geladene Ion  $[M-2H]^{2-}$ .

Als Matrices bei den Messungen der MALDI-Spektren wurden 2,4,6-Trihydroxyacetophenon / Ammoniumcitrat 2:1, 2,6-Azathymin / Ammoniumcitrat, 2,6-Azathymin / Ammoniumcitrat + Norhaman 1:1 oder 1-Hydroxyisochinolin verwendet.

### 9.1.4 Die Analytik Fluoreszenz markierter Substrate und Spaltprodukte

Die Analyse der Ribozym katalysierten Spaltungsreaktionen erfolgte an einem ALF™ Express System der Firma Amersham Biosciences. Die Detektion der Fluoreszenz markierten Substrate und Spaltprodukte erfolgt dabei über Laserdioden bei einer Emissionswellenlänge von 667 nm. Im folgenden Abschnitt wird die Fluoreszenzmarkierung der Oligonucleotide, die Analytik am ALF™ Express DNA Sequencer System und die mathematische Auswertung der gewonnenen Informationen im Hinblick auf die Michaelis-Menten Kinetik besprochen.

#### *Der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 und die Detektion der markierten Spaltprodukte von Ribozym katalysierten Reaktionen*

Das Cy5-Amidit ist ein Indodicarbocycanoamidit mit einem Absorptionsmaximum im roten Bereich des Wellenlängenspektrum ( $\lambda_{\text{ex}} = 643 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ ), dessen Struktur in *Abbildung 77* dargestellt ist. Cy5 ist einer der wenigen käuflichen Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Emission im fernen Infrarot-Bereich, so dass er in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug der Fluoreszenzdetektion in biologischen Anwendungen (Widengren & Schwille, 2000) und der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie (Gruber, 2000a) geworden ist. Die markierten Stränge können aufgrund der hohen Fluoreszenz-Quantenausbeute der Carbocyanin-Gruppe im ALF™ Express System bei  $\lambda_{\text{em}} = 667 \text{ nm}$  detektiert werden. Da die Anregungswellenlänge des Cy5-Farbstoffs im nahen Infrarot-Bereich liegt, können Messungen mit markierten Oligonucleotiden in Zellen leicht durchgeführt werden, da die Transmission durch das Zellmedium in diesem Bereich sehr hoch ist.

Das aktivierte Carboxylcyaninfluorophor Cy5 kann im Zyklus der Festphasensynthese kovalent an ein Oligonucleotid gebunden werden. Für die Kupplung des Farbstoffes an den DNA- bzw. RNA-Strang können die Standardreaktionsvolumina und -zeiten des Syntheseprotokolls verwendet werden. Die Markierung von Peptiden und Proteinen ist

über das käufliche Carbonsäurederivat ebenfalls möglich (Gruber, 2000b). Über die Länge der Methinkette zwischen den Indolen kann die  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Absorption reguliert werden. Neben Cy5 sind noch andere Varianten des Farbstoffes auf dem Markt erhältlich, z.B. Cy3 oder Cy7, um die beiden bekanntesten Vertreter dieser Klasse zu nennen.

Die Aufreinigung des Cy5-markierten Oligonucleotids kann aufgrund der hohen Photostabilität und der geringen pH-Sensibilität des Farbstoffes nach den beschriebenen Standardverfahren erfolgen.

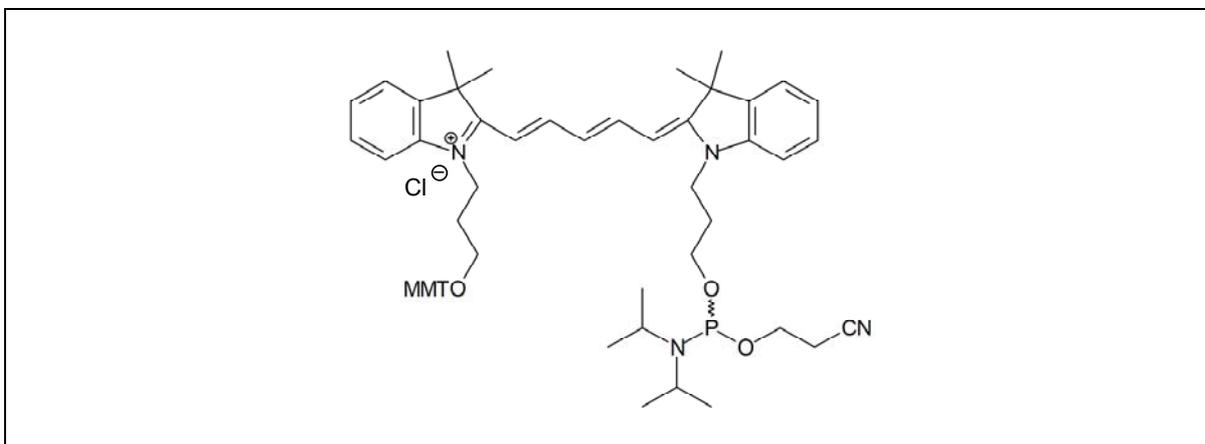
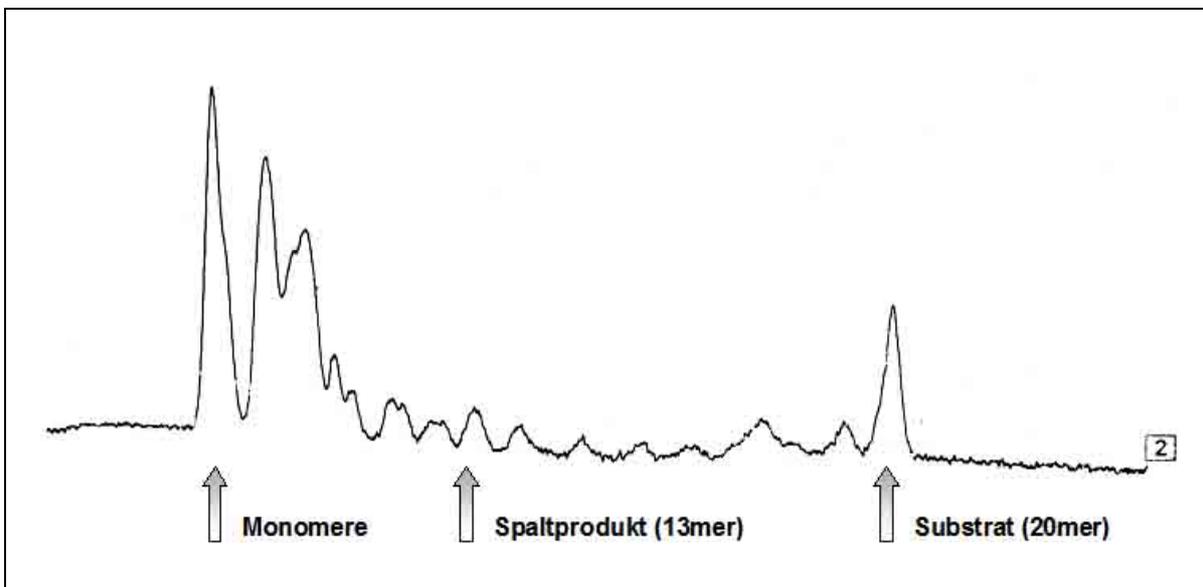


Abbildung 77: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Cy5

Die Auftrennung der Hydrolyseprodukte der katalytischen Reaktion von den nicht abreagierten Substratsträngen erfolgt mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese im ALF™ Express System. Es wurden 16%ige Gele unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) und 1x TBE-Puffer verwendet.

Um zu verhindern, dass der Fluoreszenz-Farbstoff in dem benachbarten doppelsträngigen Bereich (Helix III) des Ribozym-Substrat-Komplexes interkaliert, werden die Cy5-markierten Substrate mit einem Abstand ("Spacer") von vier Thymidinen synthetisiert. Außerdem ermöglicht dies die akkurate Auftrennung der Oligonucleotide am Gel, da größere RNA-Stränge nicht so schnell durch das Gel wandern. Der große Vorteil dieses Fluoreszenz basierten Assays liegt darin, dass nur die markierten RNA-Stränge sichtbar sind, d.h. weder das Hammerhead-Ribozym noch das zweite Spaltprodukt werden detektiert.

Zum Nachweis, dass es sich bei den detektierten Spaltprodukten und Substratsträngen tatsächlich um Oligonucleotide der gewünschten Länge handelt, kann mit dem jeweils eingesetzten Substratstrang eine Basenhydrolyse durchgeführt werden. Hierfür wird der Strang basisch hydrolysiert und nach der Hälfte der Reaktionszeit ist – statistisch gesehen – jedes mögliche Hydrolyseprodukt entstanden. Der Ansatz wird mit auf das "ALF-Gel" aufgegeben und alle möglichen Hydrolyseprodukte (Cy5-Substrat, Cy5-Substrat "n-1", Cy5-Substrat "n-2",...bis Cy5-Substrat "n-n+1") können detektiert werden. Ein Beispiel für eine solche Basenhydrolyse ist in *Abbildung 78* aufgezeigt. Die Retentionszeit der Bande des Spaltproduktes kann ausgehend vom Substrat durch einfaches Abzählen ermittelt werden.



*Abbildung 78: Basenhydrolyse eines Cy5-gelabelten Substratstranges S8*

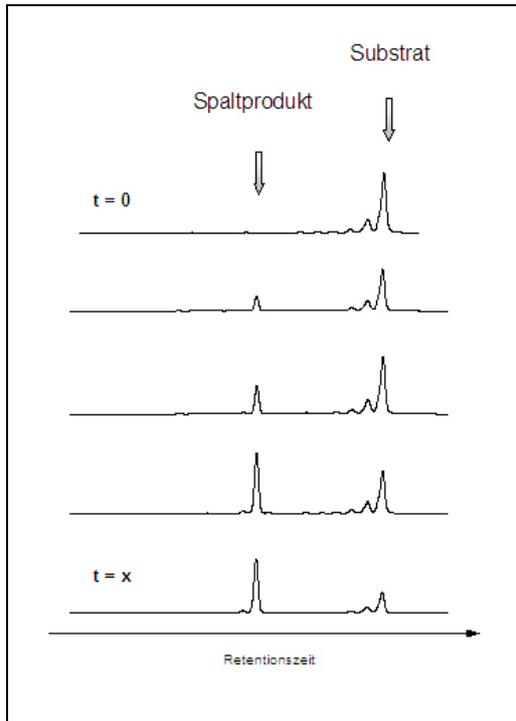


Abbildung 79: Detektion der Fluoreszenz markierten Spaltprodukte

In *Abbildung 79* ist eine Reaktion vom Zeitpunkt  $t = 0$  bis  $t = x$  dargestellt, wobei die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt wurde. Die Abnahme des Substratpeaks bei gleichzeitiger Zunahme des markierten Spaltprodukts ist deutlich zu erkennen. Das zweite Spaltprodukt, bei dem durch die Ribozym katalysierte Reaktion eine 5'-Hydroxygruppe entsteht, trägt keinen Fluoreszenzfarbstoff und wird folglich nicht detektiert. Da Ribozym katalysierte Reaktionen nur in den ersten 30% des Reaktionsumsatzes linear verlaufen, kann nur dieser Bereich für die kinetischen Analysen herangezogen werden.

#### *Mathematische Auswertung der kinetischen Daten*

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  kann durch die Änderung der Produktmenge mit der Zeit beschrieben werden (*Abbildung 80* oben). Um aus diesem Term die Michaelis-Menten Konstante  $K_M$  und die katalytische Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  zu bestimmen, muss eine Linearisierung der Gleichung erfolgen. Die Auflösung nach verschiedenen Parametern ermöglicht die graphische Auftragung nach der Methode von Lineweaver-Burk, Hanes oder Eadie-Hofstee. Die kinetischen Parameter können dann aus den Messdaten mittels linearer Regression ermittelt werden.

Die benötigten Messdaten erhält man aus der Quantifizierung des Gels im ALF™ Express System. Durch die Software gestützte Integration der detektierten Spaltprodukte und Substrate erhält man prozentual die Menge an Substrat  $[S]_t$  und Spaltprodukt  $[P]_t$  zum Zeitpunkt  $t=x$  der Probennahme gegenüber der ursprünglich vorhandenen Menge zur Zeit  $t=0$ .

$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]}$		
<b>Lineweaver-Burk</b>	<b>Hanes</b>	<b>Eadie-Hofstee</b>
$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$	$[S]_0/v = 1/V \cdot [S]_0 + K_m/V$	$v = -K_m \cdot \frac{V}{[S]} + V$

Abbildung 80: Definition der Reaktionsgeschwindigkeit als Änderung der Produktkonzentration in Abhängigkeit der Zeit (oben) und Linearisierung des Terms zur graphischen Darstellung nach Lineweaver-Burk (links), Hanes (Mitte) und Eadie-Hofstee (rechts)

V ist dabei als maximale Reaktionsgeschwindigkeit über  $V = k_{\text{cat}} \cdot [E]$  definiert. Wie in *Abbildung 81* dargestellt kann die Michaelis-Menten Konstante  $K_M$  aus der Steigung der linearen Gleichung ermittelt werden. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  erhält man bei der Lineweaver-Burk Auftragung aus dem Ordinatenabschnitt  $1/V$  (*Abbildung 81a*) bzw. aus  $V$  bei der Transformation nach Eadie-Hofstee (*Abbildung 81b*). Die Methode von Hanes ist in Kapitel 9.3.2 bei den Messungen unter "multiple turnover"-Bedingungen aufgeführt.

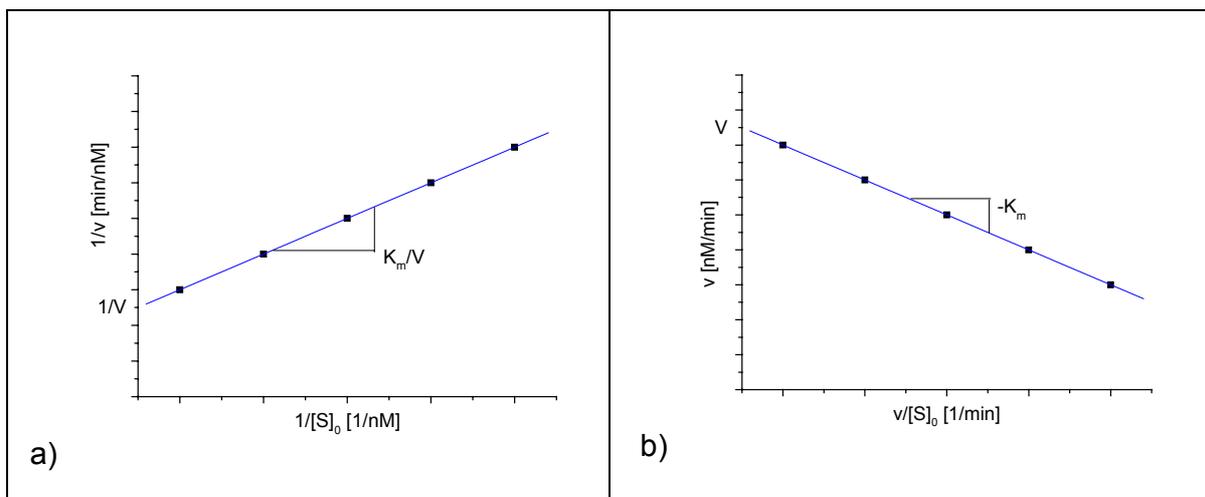


Abbildung 81: Auftragungsmethoden nach a) Lineweaver-Burk und b) Eadie-Hofstee; Bestimmung der kinetischen Parameter aus der graphischen Darstellung

## 9.2 Untersuchung des Einflusses der fluorierten, 2'-unmodifizierten Nucleoside auf die Ribozymaktivität

Zum Aufbau des Fluoreszenz basierten Testsystems zur Untersuchung Ribozym katalysierter Reaktionen wurden zunächst die mit 2'-unmodifizierten, fluorierten Nucleosidanaloga modifizierten Ribozyme **R2-R4** untersucht. Ziel dieser ersten Messungen war zum einen die Evaluierung des Einflusses der Nucleosidanaloga auf die Ribozymaktivität. Aber auch die Korrelation zwischen dem Einfluss auf die Stabilität von RNA-Duplexen ( $\Delta T_m$ ) und dem Einfluss auf die Ribozymaktivität wurde untersucht.

### 9.2.1 Kinetische Analyse unter "single turnover"-Bedingungen

Ausgehend von dem in Kapitel 4 vorgestellten Hammerhead-Ribozym LHHPol13, welches von Christian Klebba als potentes anti-HIV Ribozym identifiziert wurde, wurde dieses chemisch modifiziert und auf seine kinetischen Parameter hin untersucht. Die Bestimmung der Parameter  $k_2$  und  $K_M$  erfolgte unter "single turnover"-Bedingungen, da es sich aufgrund der *in vitro*-Untersuchungen gegen die virale mRNA um ein Ribozym mit langen Seitenarmen handelt.

In *Abbildung 82* sind die Sekundärstruktur des Hammerhead-Ribozyms und die durchgeführten Substitutionen aufgeführt. Es wurden sowohl die beiden mono modifizierten Ribozyme **R2** und **R3** untersucht als auch das disubstituierte Ribozym **R4**, um das katalytische Verhalten eines Ribozyms bei der Präsenz von zwei Punktmutationen zu analysieren. Das zweifach substituierte RNA-Enzym wurde mit je einem der Nucleosidanaloga **8** und **9** modifiziert. Zur Kontrolle des Assays und als Referenz für die modifizierten Ribozyme wurde auch das natürliche Ribozym **R1** und ein Watson-Crick "mismatch"-Kontrollribozym **R5** untersucht. Alle in *Abbildung 82* aufgeführten Ribozyme wurden gegen das Cy5-gelabelte Substrat **S8** hybridisiert.

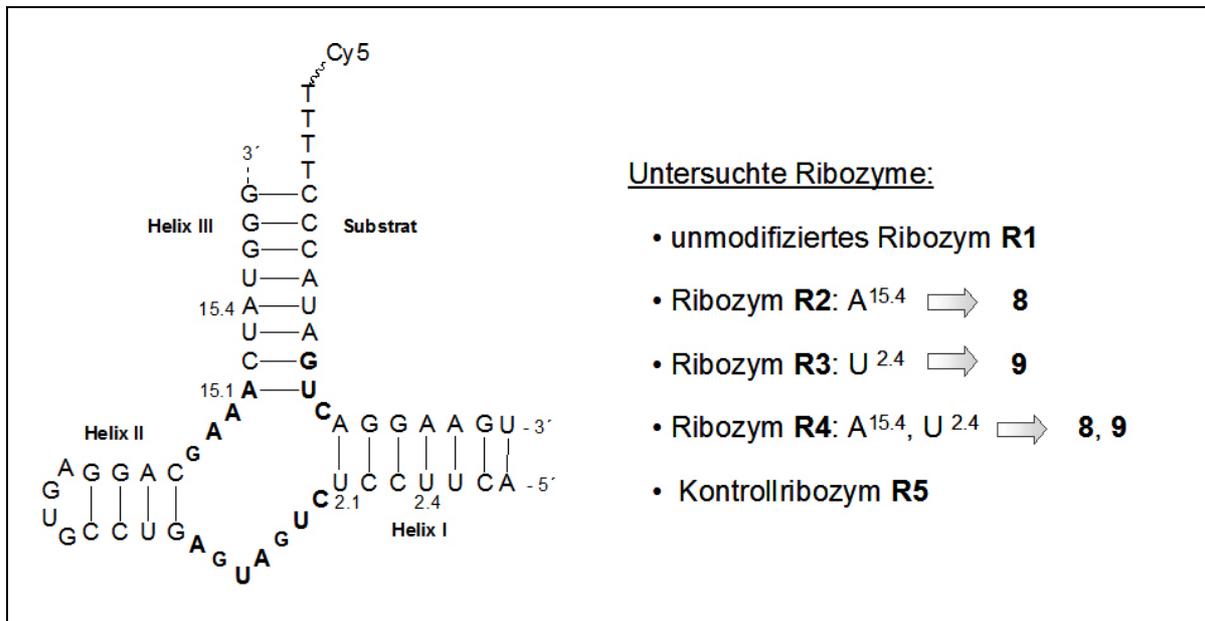


Abbildung 82: Unter "single-turnover"-Bedingungen untersuchte Ribozyme mit Angabe der durchgeführten Substitutionen

Die katalytische Aktivität der Ribozyme **R1-R5** wurde unter Ribozymüberschuss bei 37°C in 50mM TRIS-Puffer in Anwesenheit von 10 mM MgCl<sub>2</sub> gemessen. Das Ribozym-Substrat Verhältnis wurde dabei von ca. 150:1 bis 40:1 variiert. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 10 µl durchgeführt und nach definierten Zeitpunkten durch die Zugabe von Formamid unterbrochen. Eine 30 nM-Lösung an Substrat entspricht dabei einer Endkonzentration von 0,3 pmol Substrat pro Ansatz. Bei der Konzeption des Assays ist es wichtiger, dass am Beginn der Reaktion ein gut detektierbarer Umsatz stattfindet als dass die Reaktion unter diesen Bedingungen zu einem vollständigem Umsatz kommt. Dies war bei den beschriebenen Reaktionsbedingungen gegeben. Nach dem linearen Anstieg an Produktkonzentration lässt der Umsatz pro Zeiteinheit nach; es folgt eine langsame Annäherung an den vollständigen Umsatz. Daher müssen die Messpunkte im linearen Bereich, d.h. bei <30% Umsatz liegen. Aus diesem Grund wurden die Reaktionen unter "single turnover"-Bedingungen jeweils nach 1, 2, 3, 5 und 10 Minuten durch die Zugabe von Formamid und die Lagerung auf Eis gestoppt.

Zur Bestimmung des Endpunktes der Reaktion und zur Abbildung der relativen Reaktivität der Hammerhead-Ribozyme wurde zunächst die Produktbildung bei einer

festgelegten Ribozymkonzentration bestimmt und als Funktion der Zeit dargestellt (Abbildung 83).

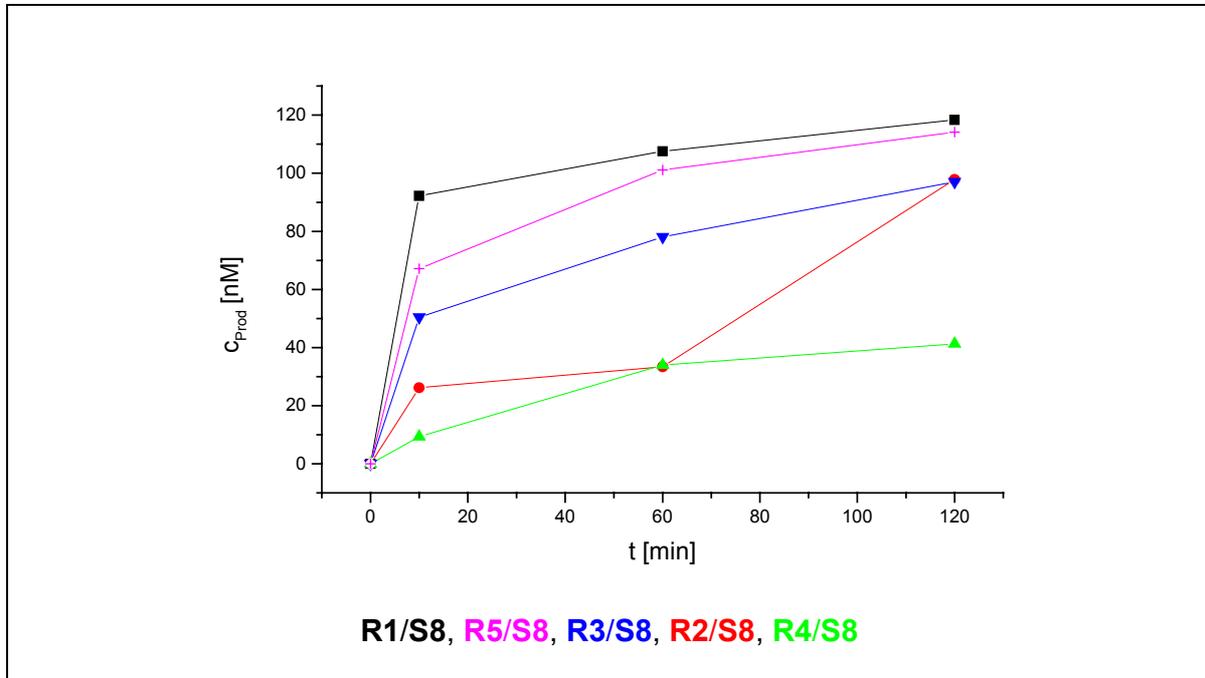


Abbildung 83: Produktbildung der verschiedenen Ribozym-Substrat Komplexe bei  $[E] = 10 \mu\text{M}$  und  $[S]_0 = 121 \text{ nM}$

Wie erwartet schneidet das unmodifizierte Hammerhead-Ribozym **R1** das Substrat am schnellsten. Die beiden monomodifizierten Ribozyme **R2** und **R3** zeigen gegenüber dem natürlichen Ribozym eine geringere katalytische Aktivität. Im Gegensatz zu den ermittelten  $T_m$ -Werten liegen die Werte für die Produktbildung jedoch unter dem des Watson-Crick "mismatch"-Kontrollribozyms **R5**. Das disubstituierte Ribozym **R4**, welches untersucht wurde, um den Einfluss von zwei "hot spots" in einer Sequenz zu ermitteln, zeigt nur einen geringen Produktumsatz.

Diese in *Abbildung 83* sich andeutenden Ribozymaktivitäten spiegeln sich auch in den daraufhin ermittelten kinetischen Parametern wider. Die Substitution des  $A^{15.4}$  und des  $U^{2.4}$  mit den Nucleosidanaloga **8** bzw. **9** resultiert in einer reduzierten katalytischen Aktivität. Die observierte Reaktionsgeschwindigkeit  $k_2$  für **R2** liegt bei  $2,24 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  und für **R3** bei  $2,91 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Die katalytische Aktivität wird durch die Einführung der fluorinierten Nucleoside beeinträchtigt. Dies bestätigt sich auch in der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  für das doppelt modifizierte Ribozym **R4** (*Tabelle 11*).

Tabelle 11: Kinetische Parameter der Hammerhead-Ribozyme **R1-R5** unter "single turnover"-Bedingungen

Ribozym	$K_M$ [nM]	$k_2$ [ $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ]	$k_2/K_M$ [ $10^{-5} \text{ min}^{-1} \text{ nM}^{-1}$ ]
<b>R1</b>	607	4,47	0,74
<b>R2</b>	156	2,24	1,44
<b>R3</b>	309	2,91	0,94
<b>R4</b>	50	0,63	1,26

Den geringsten  $K_M$ -Wert weist das doppelt modifizierte Ribozym **R4** auf. Die zweifache Modifikation bewirkt eine Instabilität des gebildeten Ribozym-Substrat Komplexes und führt somit zu einer Dissoziation des Substrates vor der Spaltung der Phosphordiesterbindung. Dies kommt in der Michaelis-Menten Konstante zum Ausdruck, die den Term für die Assoziation und Dissoziation des Substrates enthält. Die generell geringen Geschwindigkeitskonstanten sind für die Messung unter "single turnover"-Bedingungen charakteristisch. Die Werte für die modifizierten Hammerhead-Ribozyme liegen aber in dem zu erwartenden Bereich chemisch modifizierter Ribozyme (Santoro & Joyce, 1998; Mercure, 1998).

### 9.2.2 CD-Spektren von Ribozym-Substrat-Komplexen

Die CD-Spektroskopie ist eine geeignete Methode zur Untersuchung von RNA-Konformationen. Dies beschränkt sich nicht allein auf reine Duplexe wie die in Kapitel 8 dargestellten A-Helices, sondern lässt auch Analysen an größeren Komplexen zu (Horton & DeRose, 2000). *Abbildung 84* zeigt ein typisches CD-Spektrum eines Hammerhead-Ribozyms (**R1**). Neben dem Hauptmaximum bei 266nm mit positivem Cotton-Effekt ist ein Minimum bei ca. 240 nm sowie ein weiteres, kleineres Maximum bei ca. 225 nm zu beobachten. Die verschiedenen Messungen wurden zwischen 10°C und 25°C in Schritten von  $\Delta T=5^\circ\text{C}$  aufgenommen. In diesem Bereich ist eine Temperaturunabhängigkeit der Stabilität des Ribozyms zu erkennen.

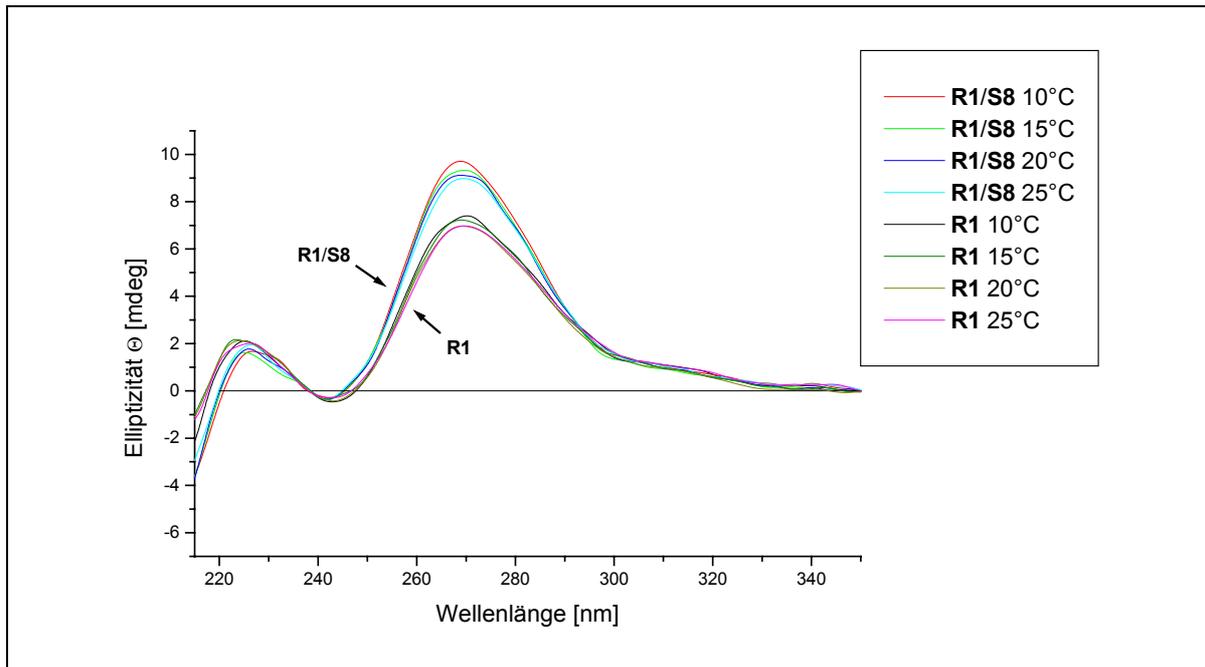


Abbildung 84: CD-Spektren des Ribozyms **R1** und des Ribozym-Substrat-Komplexes **R1/S8** bei verschiedenen Temperaturen

Bei Anlagerung des Substrates **S8** kommt es zu einer Erhöhung der Elliptizität im Hauptmaximum, da sich neben der Helix II auch Helix I und Helix III ausgebildet haben. Dies deutet auch auf eine höhere Stabilität des Ribozym-Substrat-Duplexes hin. Die Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes stört bei der Messung nicht. Auch hier ist aufgrund der Stabilität des Komplexes **R1/S8** keine Temperaturabhängigkeit zu beobachten.

Bei Betrachtung des Spektrums eines modifizierten Ribozym-Substrat-Komplexes (Abbildung 85) wird die Störung der Helixkonformationen sichtbar. Der Komplex **R2/S8** zeigt eine deutlich erniedrigte Elliptizität gegenüber dem unmodifizierten Ribozym-Komplex **R1/S8**. Ebenso sind alle vorhandenen Maxima und Minima nur sehr schwach ausgeprägt. Die Verschiebung des Hauptmaximums um einige Nanometer in Richtung längerer Wellenlängen spricht ebenfalls für die Störung der klassischen A-Helix-Struktur innerhalb des Ribozym-Substrat Komplexes.

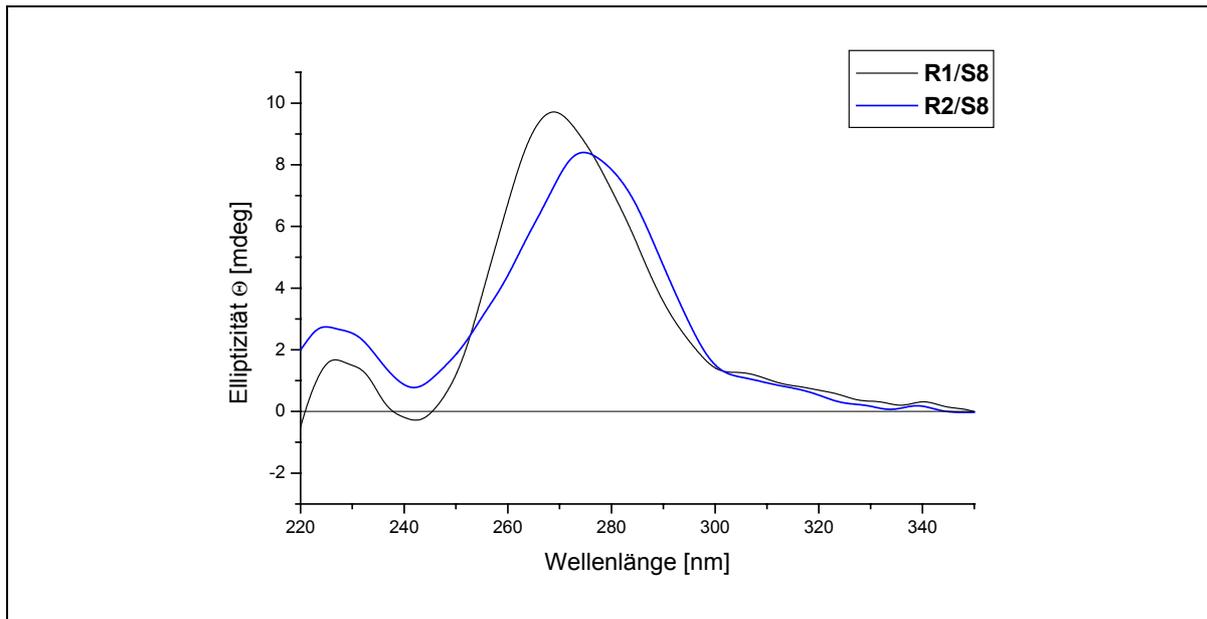


Abbildung 85: CD-Spektren der Ribozym-Substrat-Komplexe **R1/S8** und **R2/S8**

Die aufgenommenen CD-Spektren der Ribozym-Substrat-Komplexe korrelieren sehr gut mit den ermittelten thermodynamischen und kinetischen Daten und machen die Änderungen in den Helixkonformationen sichtbar. Die Temperatur abhängige Aufnahme von CD-Spektren liefert gute Informationen über die thermische Stabilität der gebildeten Ribozym-Substrat Komplexe.

### 9.3 Untersuchung des Einflusses der 2'-Aminoethyl substituierten, fluorierten Nucleosidanaloga **27** und **28** auf die Ribozymaktivität

Um den Einfluss der 2'-Aminoethyl modifizierten Nucleosidanaloga auf die thermodynamische Stabilität von RNA Duplexen mit ihrem Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften eines Ribozymes zu vergleichen, wurden die Verbindungen **27** und **28** ebenfalls in Hammerhead-Ribozyme eingebaut und untersucht. Die Sequenz des dafür verwendeten Ribozyms **R9** ist wiederum komplementär zu einem Ausschnitt aus dem HIV-Pol-Gen, jedoch wurde bei diesen Messungen ein für die kinetische Analyse optimiertes Hammerhead-Ribozym verwendet. Im diesem Kapitel werden die Versuche zur Optimierung des Ribozyms vorgestellt, die Untersuchung des ausgewählten Ribozyms dargestellt sowie seine durch chemische Modifikation mit **27** und **28** mögliche Toleranz gegenüber Punktmutationen getestet.

#### 9.3.1 Optimierung des anti-HIV Ribozyms **R1** in Bezug auf Größe und Effizienz

Das den bereits beschriebenen Messungen zugrunde liegende LHHPol13-Hammerhead-Ribozym wurde zur Messung unter "*multiple turnover*"-Bedingungen optimiert. Neben einer Verringerung der Anzahl an erforderlichen Nucleosiden, die eine preiswertere Synthese und eine verbesserte Zellaufnahme ermöglichen, wurde das Ribozym hinsichtlich seiner Aktivität optimiert. Ribozyme mit einer geringeren Anzahl an Substrat-komplementären Nucleobasen zeigen häufig *in vitro* eine höhere katalytische Aktivität (McCall, 2000). Die Minimierung der Ribozyme kann zu einer schnelleren Substratassoziation und Produktdissoziation führen. *In vivo* muss die Sequenzspezifität erhalten bleiben, um zu gewährleisten, dass keine unspezifischen Spaltungen an mRNAs stattfinden.

### Möglichkeiten der Optimierung von Hammerhead Ribozymen

Zur Optimierung von Hammerhead-Ribozymen gibt es zwei variable Parameter: die Variation der Länge der Ribozymarme und die Veränderung der Helix II, deren Sequenz unabhängig vom zu spaltenden Substratstrang ist (Tang & Breaker, 2000). Während die Struktur des katalytisch aktiven Zentrums von C<sup>3</sup> bis A<sup>9</sup> und G<sup>12</sup> bis A<sup>15</sup> notwendig ist, können zur Minimalisierung der Ribozymstruktur die Helices I, II und III verkürzt werden. Die strukturelle Diversität von Ribozymen hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von Miniribozymen, noch kleineren Minizymen und unter anderem auch zu DNAzymen geführt wie z.B. dem 8-17 oder 10-23 Desoxyribozym (Bonacchio, 2004; Sun, 2002).

Je länger die Ribozymarme sind, desto stabiler sind die im Ribozym-Substrat Komplex ausgebildeten Helices. Dabei werden Fehlpaarungen eher toleriert, jedoch verlangsamt sich auch die Dissoziation der Spaltprodukte vom Ribozym und somit die *off-rate* bei der kinetischen Betrachtung. Die ideale Länge der Helices I und III liegt bei 5-6 Basenpaaren (McCall, 2000). Ob symmetrische oder asymmetrische Ribozyme optimal sind, ist derzeit nicht schlüssig zu beantworten.

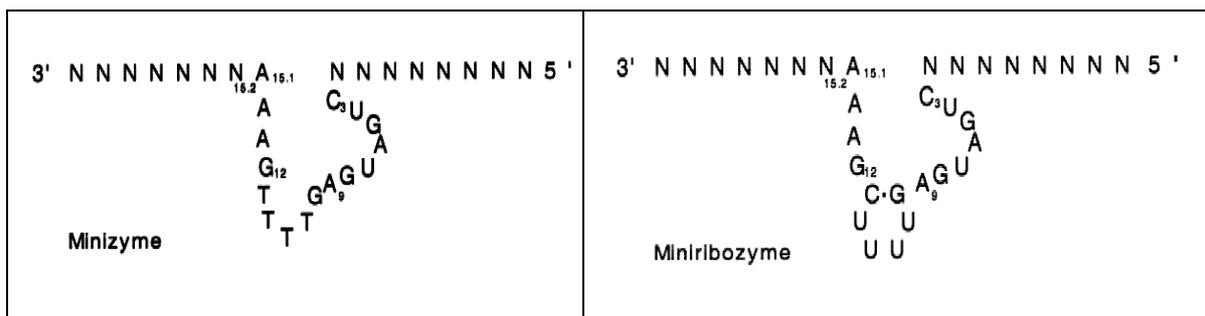


Abbildung 86: Auf das katalytische Motiv reduzierte Minizyme und Miniribozyme

Helix II hat sich als nicht essentiell herausgestellt (Hendry, 1994; Tuschl 1993) und zur Entwicklung von Minizymen geführt (Abbildung 86). Minizyme haben im Gegensatz zu Miniribozymen keine Watson-Crick-Basenpaarung in "Helix" II. Interessant ist die Beobachtung, dass Miniribozyme kurze Substrate wie z.B. 13mere (Hendry et al 1998) langsamer spalten als das natürliche Ribozym, längere Substrate wie z.B. 21mere

jedoch schneller. Dies macht Miniribozyme besonders attraktiv, um lange mRNA zu spalten. Die Schleife kann auch aus DNA-Bausteinen bestehen (Taylor 1992); dies erhöht die Stabilität gegen abbauende Enzyme und vereinfacht die Synthese. Die Anzahl der Basenpaare in der internen Helix II kann also ohne Verringerung der katalytischen Aktivität reduziert werden

#### *Variationen des anti-HIV Ribozyms in Größe und Sequenzlänge*

Um die katalytische Aktivität des Hammerhead-Ribozyms **R1** zu erhöhen, wurde es gezielt an verschiedenen Stellen verkleinert und auf seine Reaktivität hin getestet. In *Abbildung 87* sind das Ribozym **R6** mit kurzen Seitenarmen, **R7** mit verkleinerter Helix II und ein "minimiertes" Ribozym **R8** aufgeführt, welches beide Änderungen in sich vereint.

Zur Überprüfung der Reaktivität der neuen Ribozyme wurden diese mit den komplementären, Cy5-markierten Substraten **S8** bzw. **S9** inkubiert. Nach 15 Minuten Reaktionszeit und einer Ribozym- und Substratmenge von 20 pmol bzw. 0,8 pmol wurden sie wie bei den bereits beschriebenen Messungen am ALF-System analysiert. Die beiden Ribozyme mit verkürztem Seitenarm (**R6**) und verkleinerter Helix II (**R7**) zeigten bei diesem Assay eine gute katalytische Aktivität (*Abbildung 88*). Da ein effizientes Ribozym unter diesen Bedingungen jedoch einen nahezu vollständigen Umsatz des Substrats bewirken muss, wurde durch rationales Design das minimierte Ribozym **R8** entworfen. Wie in *Abbildung 88* dargestellt zeigt dieses jedoch keinen Umsatz.

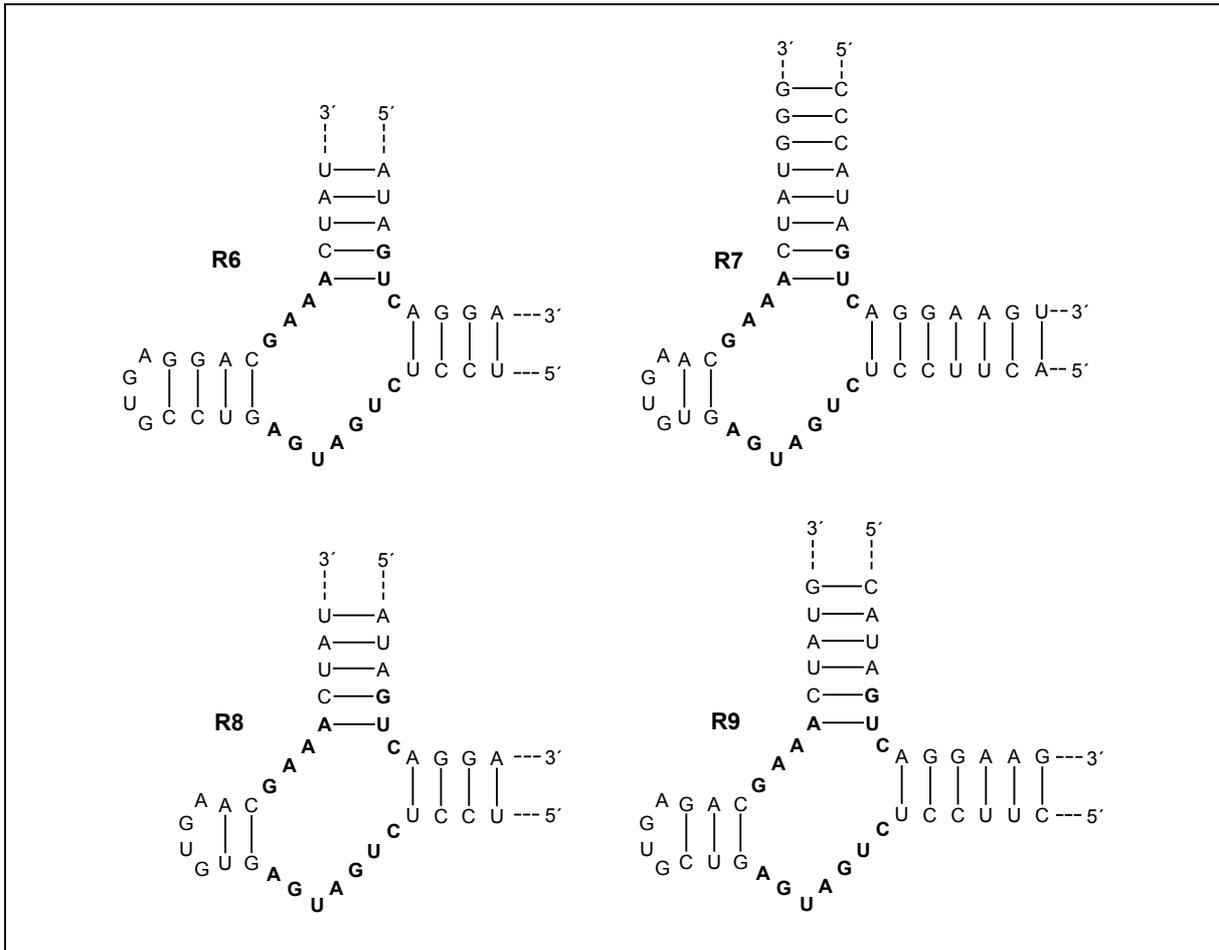


Abbildung 87: Sekundärstrukturen der Hammerhead-Ribozyme **R6-R9**

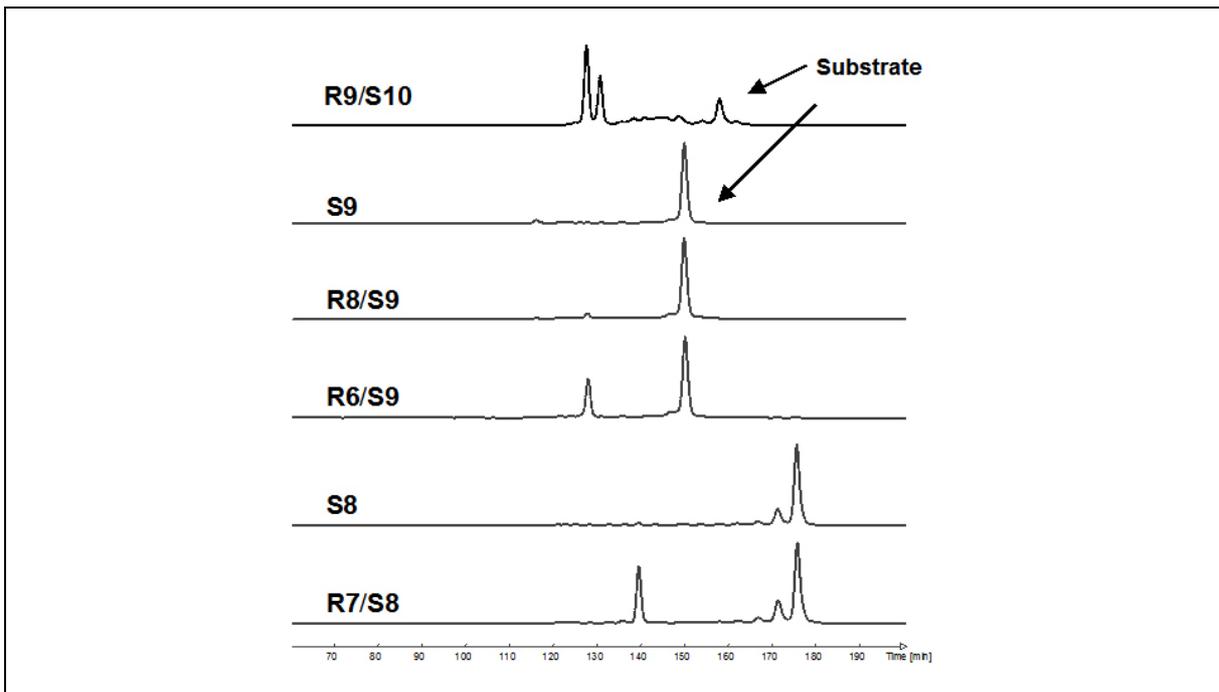
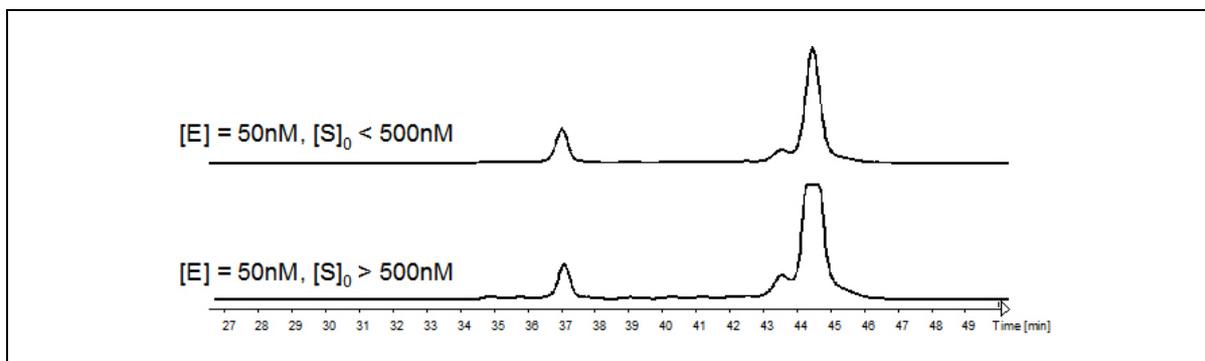


Abbildung 88: Katalytische Aktivität der minimierten Ribozyme

Mittels Temperatur abhängiger CD-Spektroskopie wurden die Ribozym-Substrat Komplexe untersucht, um die Ursache für diese Beobachtung zu analysieren. Es konnte festgestellt werden, dass aufgrund der geringen Anzahl an Watson-Crick Basenpaaren der Ribozym-Substrat Komplex bei 37°C nicht mehr stabil ist. Durch eine geringfügige Vergrößerung der helicalen Bereiche konnte schließlich ein "optimales" anti-HIV Hammerhead-Ribozym **R9** identifiziert werden, welches das Substrat **R10** unter den gegebenen Bedingungen fast vollständig spaltet (*Abbildung 88*, 1. Zeile). Bei 37°C wird bei diesem Ribozym-Substrat Komplex im CD-Spektrum nur ein marginaler Stabilitätsverlust beobachtet.

Das 37mer Hammerhead-Ribozym **R1** konnte durch gezielte Verkleinerung der helicalen Bereiche optimiert werden. Das neue 32 Nucleotide umfassende Ribozym **R9** wurde unter verschiedenen "multiple turnover"-Bedingungen getestet (*Abbildung 89*), bei denen das Substrat **S10** effizient gespalten wurde.



*Abbildung 89: ALF-Chromatogramm einer "steady state"-Substratspaltung mit **R9**. Aufgeführt sind zwei Beispiele des Umsatzes (oben:  $[E]/[S]_0 < 1:10$ , unten:  $[E]/[S]_0 > 1:10$ )*

### 9.3.2 Kinetische Analyse unter "multiple turnover"-Bedingungen

Um den Einfluss der 2'-Aminoethyl modifizierten, fluorinierten Nucleosidanaloga **27** und **28** auf die katalytische Aktivität von Ribozymen zu ermitteln und um Hammerhead-Ribozyme zu entwickeln, die in der Lage sind genomische Punktmutationen zu tolerieren, wurden die substituierten Ribozyme **R10** und **R11** synthetisiert. Diese wurden gegen die vier Substrate **S10-S13** getestet, die an Position 16.4 je eines der natürlichen Nucleoside tragen. Neben den kinetischen Parametern dieser acht Ribozym-Substrat Komplexe wurden auch die Daten der Watson-Crick "match"- (**R9/S10**) und "mismatch"-Fälle (**R9/S11-R9/S13**) ermittelt (*Abbildung 90*). Auf diese Weise wurde das Basenpaar an Position 15.4-16.4 des Ribozym-Substrat Komplexes zur Simulation von Punktmutationen permutiert und alle 12 Möglichkeiten wurden kinetisch analysiert.

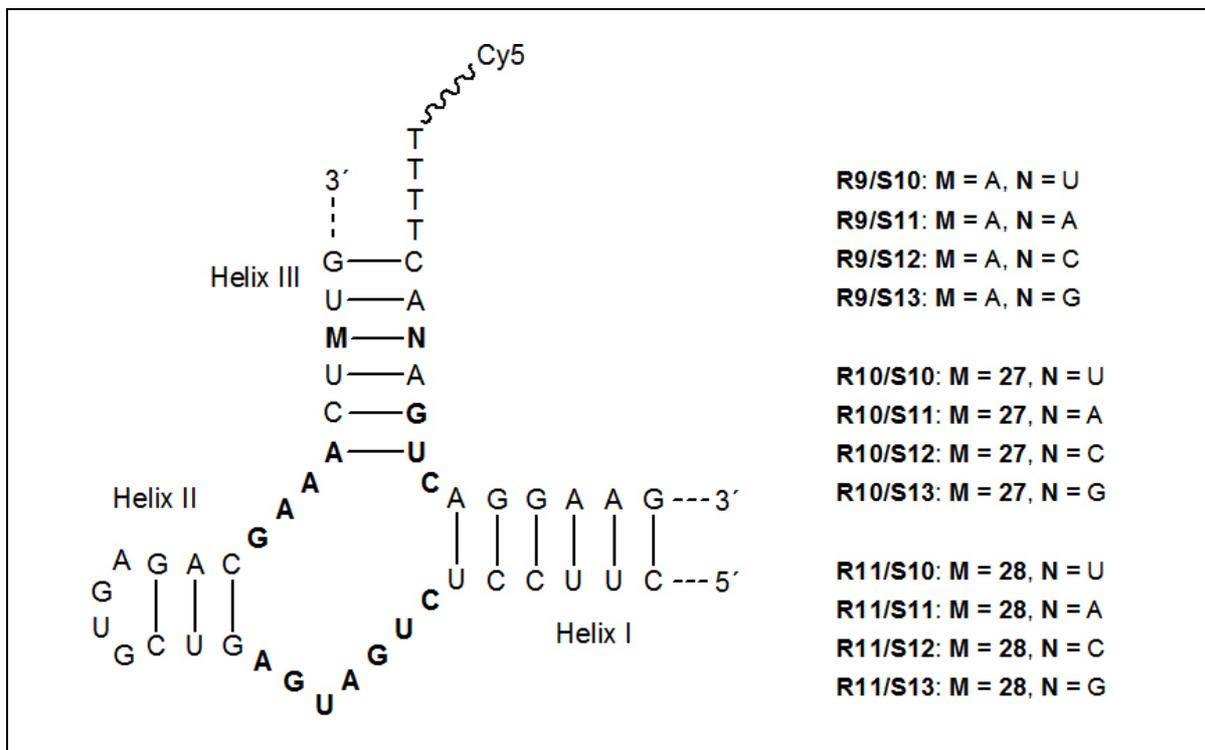


Abbildung 90: Auflistung aller 12 untersuchten Ribozym-Substrat Komplexe

Auch bei dieser Untersuchung wurden die Messbedingungen so gewählt, dass zu den Zeiten der Probennahme der Umsatz  $< 30\%$  beträgt, um zu gewährleisten, dass sich die Reaktion noch im linear verlaufenden Bereich befindet. Die Reaktionen wurden je nach Reaktivität des eingesetzten Hammerhead-Ribozyms nach 1, 2, 3, 5, 8, 10 und 15 Minuten bzw. nach 3, 5, 8, 10, 15, 20 und 25 Minuten gestoppt. Die Konzentrationen an Ribozym und Substrat und deren Verhältnisse sind in *Tabelle 12* aufgeführt. Da das Substrat in bis zu 50fachem Überschuss eingesetzt wurde, war zur Detektion der gelabelten Substrate am ALF<sup>TM</sup> Express System die Verwendung eines internen Standards oder eine Verdünnung der Probe notwendig. Der Cy5 markierte Strang **S14** hat sich als geeignete Referenz erwiesen, da dieser weder mit der Substrat- noch mit der Produktbande überlappt. Der interne Standard konnte jedoch nicht zur Bestimmung der kinetischen Parameter eingesetzt werden, da bei hohen Substratkonzentrationen die Menge an Spaltprodukt ebenfalls zu hoch war, um eine fehlerfreie Detektion zu gewährleisten. Die betreffenden Proben wurden daher vor der Beladung des Polyacrylamidgels des ALF<sup>TM</sup> Express System um den Faktor 1:10 bzw. 1:100 verdünnt.

*Tabelle 12: Eingesetzte Ribozym- und Substratkonzentrationen zur Ermittlung der kinetischen Parameter*

Ribozymkonzentration [nM]	Substratkonzentration [S] <sub>0</sub> [nM]	Verhältnis
50 bzw. 25	100	1:2 / 1:4
	200	1:4 / 1:8
	500	1:10 / 1:20
	750	1:15 / 1:30
	1000	1:20 / 1:40
	1250	1:25 / 1:50

Die Ribozym katalysierten Spaltungsreaktionen wurden bei 37°C in 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,0) mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Jede kinetische Analyse wurde mehrfach durchgeführt (3-5 mal) und die Michaelis-Menten Kinetik wurde in erster

Linie mittels der Lineartransformationemethode von Hanes analysiert. Die Kinetiken wurden im Anschluss ebenfalls durch die Methoden von Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee ausgewertet, wobei die aufgetretenen Unterschiede wie erwartet innerhalb der Fehlergrenzen der Methoden lagen.

Die Auswertung der am ALF<sup>TM</sup> Express System erhaltenen Daten erforderte zunächst die Bestimmung des Umsatzes jeder einzelnen Spaltreaktion. Dies ist über eine Auftragung der Produktkonzentration gegen die Reaktionszeit mit anschließender linearer Regression möglich (Abbildung 91).

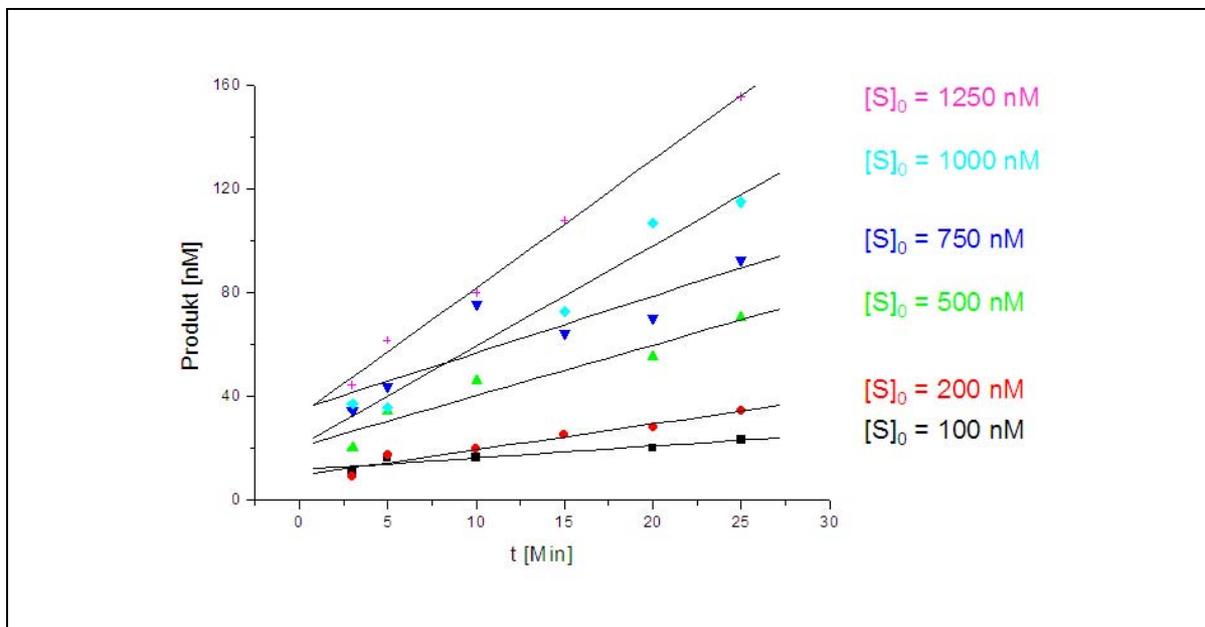


Abbildung 91: Bestimmung des Reaktionsumsatzes bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen

Die kinetischen Parameter können nach einer Lineartransformation erhalten werden. Die Gerade liefert über die Steigung  $1/V$  den Wert der katalytischen Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cat}}$  und über den Ordinatenabschnitt  $K_M/V$  die Michaelis-Menten Konstante (Abbildung 92).

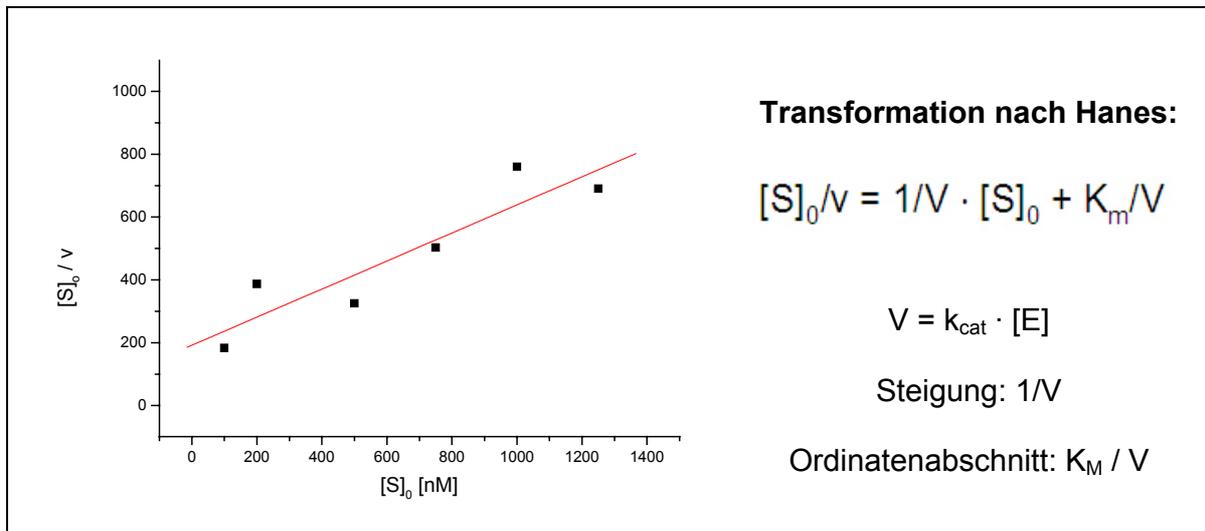


Abbildung 92: Auswertung der erhaltenen Daten nach der Methode von Hanes

Betrachtet man die Ergebnisse der unmodifizierten Ribozymsspaltungen können große Unterschiede in der katalytischen Aktivität zwischen dem Watson-Crick "match"-Fall **R9/S10** und den Watson-Crick "mismatch"-Fällen **R9/S11-R9/S13** beobachtet werden. Die katalytische Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cat}}$  ist bei der Reaktion mit **R9/S10** mit  $2,5 \text{ min}^{-1}$  deutlich höher als in den anderen drei Fällen ( $0,03\text{-}0,21 \text{ min}^{-1}$ ). Diese Ergebnisse gehen einher mit den bekannten Resultaten, dass die katalytische Aktivität von Hammerhead-Ribozymen in Anwesenheit von Punktmutationen drastisch abnimmt.

Die kinetische Analyse des modifizierten Ribozyms **R10** ergibt, dass alle vier synthetischen Substrate **S10-S13** etwa gleich gut und effizient gespalten werden (Tabelle 13). Die Geschwindigkeitskonstanten sind zwar geringer als im unmodifizierten Fall **R9/S10**, aber bei Betrachtung der vier modifizierten Basenpaare stellt man nur sehr geringe Unterschiede in der katalytischen Aktivität fest ( $k_{\text{cat}} = 0,19\text{-}0,39 \text{ min}^{-1}$ ). Zudem sind die Geschwindigkeitskonstanten dieses Ribozyms um bis zu Faktor 13 höher als die der Watson-Crick "mismatch"-Fälle **R9/S11-R9/S13**. Durch die Modifikation des Ribozyms mit dem 2'-Aminoethyl substituierten, 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosidanalogs **27** konnte ein Hammerhead-Ribozym entwickelt werden, welches Punktmutationen toleriert und kaum zwischen den vier möglichen Substraten unterscheidet. Interessanterweise weist der Ribozym-Substrat Komplex **R10-S12**, bei dem ein C gegenüber dem Difluorbenzimidazol steht, die

höchste Spaltungsgeschwindigkeit auf. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das 4,6-Difluorbenzimidazol als sterisches Mimetikum für Guanosin fungiert und daher die geringste Störung in dieser Helix III verursacht.

Tabelle 13: Kinetische Parameter der untersuchten, optimierten Hammerhead-Ribozyme, die jeweils gegen alle vier Substrate gerichtet wurden; **N** = A, C, G, U

Ribozym (M)	Substrat (N)	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_{\text{m}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$ [ $10^{-4} \text{min}^{-1} \text{nM}^{-1}$ ]
<b>R9</b> (M = A)	<b>S11 (A)</b>	0,21 ± 0,12	2,09 ± 1,4	1,1 ± 0,2
	<b>S12 (C)</b>	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,05	2,3 ± 0,2
	<b>S13 (G)</b>	0,14 ± 0,06	0,93 ± 0,4	2,1 ± 0,7
	<b>S10 (U)</b>	2,5 ± 0,8	2,2 ± 0,6	26 ± 16
<b>R10</b> (M = 27)	<b>S11 (A)</b>	0,19 ± 0,1	2,4 ± 1,3	1,1 ± 0,5
	<b>S12 (C)</b>	0,39 ± 0,12	2,03 ± 1,4	2,6 ± 1,3
	<b>S13 (G)</b>	0,22 ± 0,12	3,08 ± 2,3	1 ± 0,7
	<b>S10 (U)</b>	0,24 ± 0,1	0,93 ± 0,8	8,4 ± 4,1
<b>R11</b> (M = 28)	<b>S11 (A)</b>	0,21 ± 0,07	0,6 ± 0,37	5,3 ± 2,5
	<b>S12 (C)</b>	0,15 ± 0,05	0,66 ± 0,4	2,7 ± 1,1
	<b>S13 (G)</b>	0,14 ± 0,02	0,5 ± 0,1	2,9 ± 0,7
	<b>S10 (U)</b>	0,11 ± 0,02	1,0 ± 0,5	1,3 ± 0,6

Für das Hammerhead-Ribozym **R11** konnten nur geringe Verbesserungen gegenüber den Watson-Crick "mismatch"-Fällen festgestellt werden. Aufgrund der kleineren Michalis-Menten Konstanten bleibt die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  jedoch im Bereich der für die mit Ribozym **R10** ermittelten Werte. In Analogie zu den ermittelten  $T_{\text{m}}$ -Werten ist die Erhöhung der katalytischen Aktivität gegenüber den "mismatch"-Komplexen nicht so ausgeprägt wie für das Ribozym **R10**. Im Gegensatz zu dem geringen  $T_{\text{m}}$ -Wert, der für das Basenpaar **28-G** erhalten wurde, spiegeln die kinetischen Parameter keinen so großen Verlust der katalytischen Aktivität wider. Wie

schon bei dem modifizierten Hammerhead-Ribozym **R10** beobachtet werden konnte, zeigt auch hier der Ribozym-Substrat Komplex mit dem besten sterischen Mimetikum (**R11/S11**) die höchste katalytische Aktivität. Die Nucleobase 2,4-Difluorbenzol, die ein Analogon des Uridins darstellt, steht dabei gegenüber von Adenosin (**28-A**;  $k_{\text{cat}} = 0,21 \text{ min}^{-1}$ ).

Der Endpunkt aller untersuchten Spaltreaktionen ist etwa identisch. Die eingeführten Modifikationen **27** und **28** scheinen die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber dem natürlichen Ribozym-Substrat Komplex etwas zu verringern. Die Möglichkeit, dass die Modifikationen die Komplexe in einer inaktiven Konformation einfrieren und somit für die Katalyse nicht mehr zur Verfügung stehen, scheint daher unwahrscheinlich.

Die 2'-Aminoethyl modifizierten Verbindungen sollen in siRNAs eingebaut und gegen HIV-Punktmutationen getestet werden. Erste Versuche dazu wurden bereits durchgeführt. Die siRNA-Stränge sind dabei gegen das Pol-Gen in der Höhe des 7. GUC-Triplets gerichtet, um einen Aktivitätsvergleich mit den entsprechenden Ribozymen zu ermöglichen.

### 9.3.3 Schlussfolgerungen

Aus den kinetischen Analysen der modifizierten Hammerhead-Ribozyme unter "*multiple turnover*"-Bedingungen lassen sich folgende Erkenntnisse ableiten:

- Die katalytische Aktivität des unmodifizierten Ribozym **R9** hängt stark davon ab, ob das Substrat komplementär ist oder eine Punktmutation trägt. Die Unterschiede können mit dem vorliegenden Fluoreszenz basierten Assay gut nachgewiesen und quantifiziert werden.
- Das Ribozym **R10**, welches mit dem 2'-Aminoethyl substituierten, 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosidanalogon **27** modifiziert ist, ist in der Lage Punktmutationen zu tolerieren. Es weist bei Watson-Crick "mismatch"-Basenpaaren im Vergleich zum natürlichen Ribozym **R9** eine um Faktor 13 erhöhte katalytische Aktivität auf.

- Aufgrund der Resultate mit dem Ribozym **R2** kann die Erhöhung der katalytischen Aktivität im Vergleich zu den Ribozym-Substrat Komplexen mit Watson-Crick "mismatch"-Basenpaaren allein auf den Einfluss der 2'-Aminoethylgruppe zurückgeführt werden.
- In Übereinstimmung mit den thermodynamischen Studien an RNA 12mer Duplexen zeigt das Hammerhead-Ribozym **R12** eine geringere katalytische Aktivität.
- Beide modifizierten Ribozyme **R11** und **R12**, deren Modifikation ein Mimetikum für G bzw. U ist, sind bei den Substraten am aktivsten, in denen die Modifikation mit C bzw. A gepaart wird.
- Der Vergleich der thermodynamischen und kinetischen Parameter zeigt, dass die Ribozymaktivität stark von einer exakt gefalteten katalytischen Konformation abhängt und empfindlich auf Strukturänderungen in der Geometrie des Ribozym-Substrat Komplexes reagiert, die durch die Modifikationen hervorgerufen werden können. Neben der Basenstapelung, der Solvatation und den Wasserstoffbrücken spielen bei der katalytischen Aktivität vor allem auch der sterische Anspruch einer Modifikation und die Änderung der Gesamtkonformation eine entscheidende Rolle.

# 10

## Synthese und biologische Eigenschaften fluorierter Nucleosid-5'-Triphosphate

Zur Überprüfung, ob es sich bei den fluorierten Benzimidazol- und Benzol-Nucleosidanaloga **8** und **9** auch im biologischen Sinn um universelle Basen handelt, wurden diese in Polymerase katalysierten Reaktionen untersucht. Dabei wurden sowohl ihre Templateigenschaften überprüft als auch ihre Fähigkeit als Substrate für die T7 RNA Polymerase zu dienen. Die hierfür erforderliche chemische Synthese der nucleosidischen 5'-Triphosphate wurde nach der Methode von Yoshikawa durchgeführt (Yoshikawa, 1967).

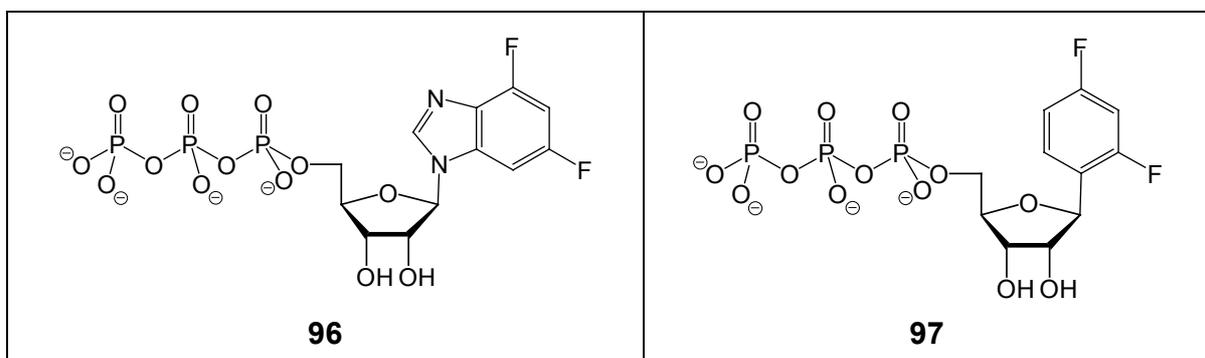


Abbildung 93: Nucleosidische 5'-Triphosphate **96** und **97**

## 10.1 Synthese und Aufreinigung der 5'-Triphosphate **96** und **97**

### 10.1.1 Synthese der Triphosphate **96** und **97** nach Yoshikawa

Die Synthese der nucleosidischen 5'-Triphosphate **96** und **97** erfolgte ausgehend von den fluorierten Nucleosidanaloga **8** und **9**. Die Synthese nach Yoshikawa wird in einem Reaktionsschritt durchgeführt ohne Einführung von acetalischen Schutzgruppen an den Positionen 2 und 3 der Zuckereinheit (*Abbildung 94*). Die hohe Regioselektivität der Reaktion rührt neben der Reaktivität der primären 5'-Hydroxyfunktion auch von der Bildung des hoch reaktiven, intermediären Komplexes **21**, der eine schnelle und effiziente Monophosphorylierung ermöglicht. Dieser Vilsmeier-Haack artige Komplex wird durch Verwendung des Lösungsmittels Trimethylphosphat ermöglicht. Dieses bildet mit Phosphoroxychlorid den Komplex **21** aus, welcher Mesomerie stabilisiert ist (siehe auch Kapitel 5) und zu dem monophosphorylierten Intermediat **98** führt.

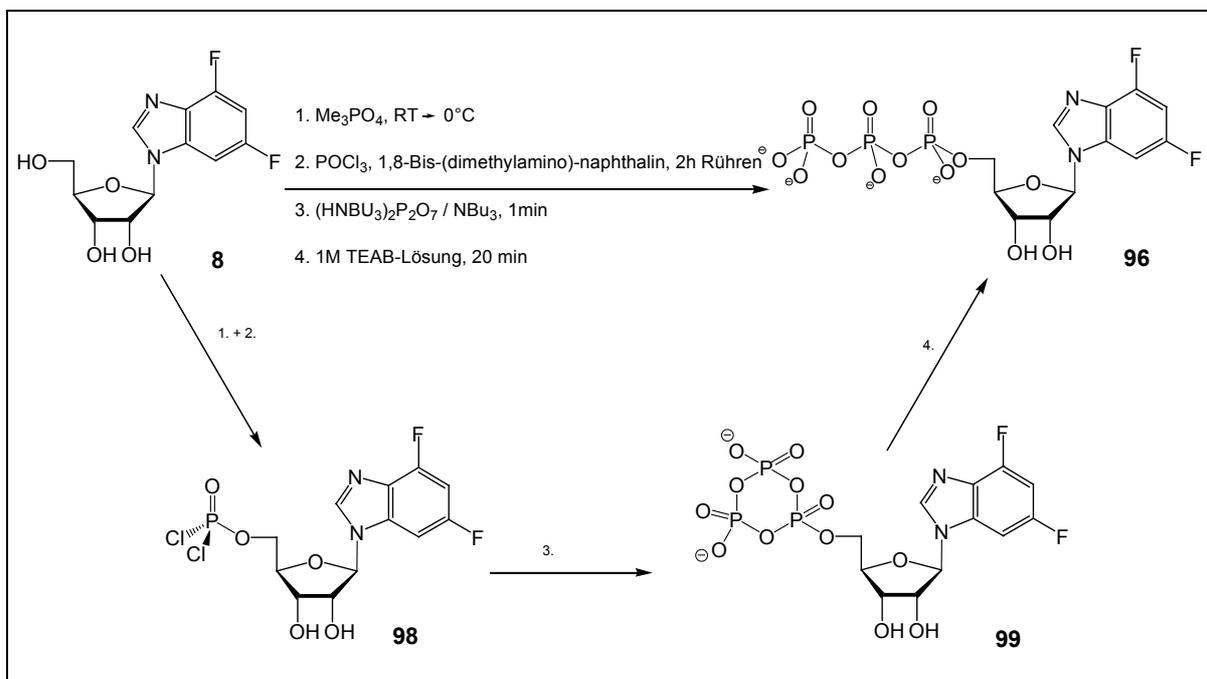


Abbildung 94: Synthese nucleosidischer Triphosphate nach der Methode von Yoshikawa am Beispiel des Triphosphats **96**

Dieses wird durch Zusatz einer 0,5 M Tributylammoniumpyrophosphat-Lösung in Tributylamin zu einem zunächst cyclisch vorliegendem Triphosphat umgesetzt **99**. Um die Zersetzung des Produktes zu verhindern wird die Reaktionslösung nur eine Minute bei Raumtemperatur gerührt. Diese Zeitspanne reicht jedoch aus, um einen guten Reaktionsumsatz zu erreichen. Die anschließende Hydrolyse zum linearen Triphosphat **96** erfolgt mittels Triethylammoniumbicarbonat-Lösung, welche zuvor durch Einleiten von CO<sub>2</sub> in Tributylamin hergestellt wurde. Nach Fällung der polaren Substanzen mit Methylenchlorid und Lyophilisierung des Rohproduktes sind bereits die charakteristischen Triphosphat-Signale im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum zu erkennen (*Abbildung 95*). Die Bezeichnung der Phosphoratome  $\alpha$ - $\gamma$  wurde in Kapitel 5 erläutert. Das Pyrophosphat bei ca. -10 ppm ist nur im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum zu detektieren.

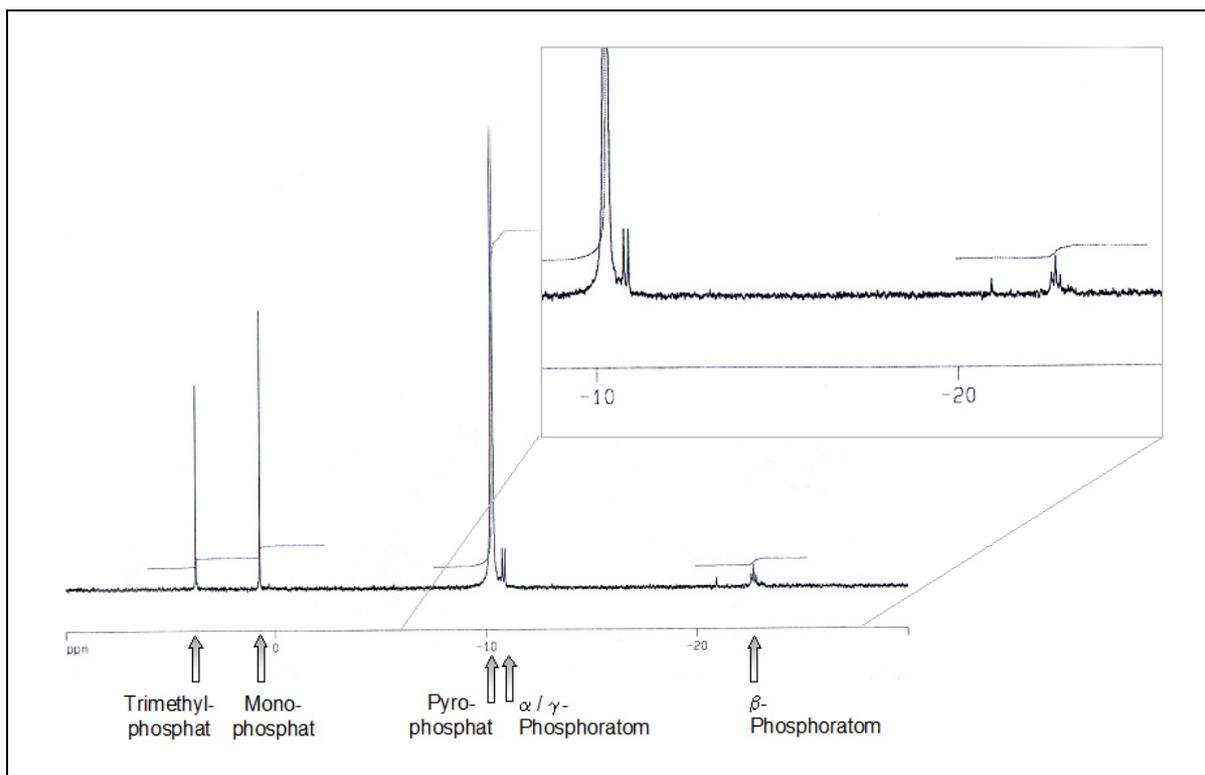


Abbildung 95: <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum des Rohproduktes der Synthese des Triphosphates **96**

### 10.1.2 *Aufreinigung der Triphosphate mittels FPLC, AE-HPLC und RP-HPLC*

Das Rohprodukt jeder Triphosphatsynthese enthält – wie in *Abbildung 95* zu sehen – mehrere polare und geladene Komponenten. Neben dem nicht umgesetzten Edukt, den Reaktanden und dem Produkt werden bei der Reaktion auch das Monophosphat, anorganische Polyphosphate und auch phosphatverbrückte Dinucleoside gebildet. Aufgrund der starken Wechselwirkungen und der daraus resultierenden Haftung der unterschiedlichen Komponenten an normalem Kieselgel kann das Rohprodukt nicht über diese Trennmatrix aufgetrennt werden. Die Anionenaustauscher-Chromatographie jedoch eignet sich gut zur Isolierung von Triphosphaten, da die negativ geladenen Moleküle hier in Abhängigkeit von ihrer Ladungszahl aufgetrennt werden. Die Aufreinigung und Isolierung der Triphosphate **96** und **97** erfolgte mit chromatographischen Methoden in drei Trennschritten. Zunächst wurden die Reagenzien und die entstandenen Nebenprodukte mittels FPLC abgetrennt. Aufgrund der Ladungsgleichheit der Triphosphate mit dem Pyrophosphat war jedoch eine zusätzliche Trennung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie nötig. Das Triphosphat wurde im Anschluss daran mittels "Reversed Phase"-HPLC von dem Formamid und den Phosphaten der eingesetzten Puffer-Lösungen isoliert.

Der erste Trennschritt wurde an der FPLC mit einem Gradienten aus 0,05 M bis 1 M wässriger TEAB-Lösung an einem Gerät der Firma Pharmacia durchgeführt. Auf die Detektion mit einem "Single Path UV Monitor UV-1" bei der für die natürlichen Nucleoside üblichen Wellenlänge von 280 nm konnte nicht zurückgegriffen werden. Wie die Wellenlängescans in *Abbildung 96* zeigen, sind die Absorptionsmaxima der fluorierten Nucleosidanaloga 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** und 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** verschoben und liegen bei ca. 260 nm bzw. 240 nm. Dies führte dazu, dass die Trennung über die FPLC-Säule (DEAE Sephadex A25-Material) an einem Gerät der Firma JASCO mit variablem Detektor bei jeweils hoher Absorption der zu isolierenden Verbindung durchgeführt wurde.

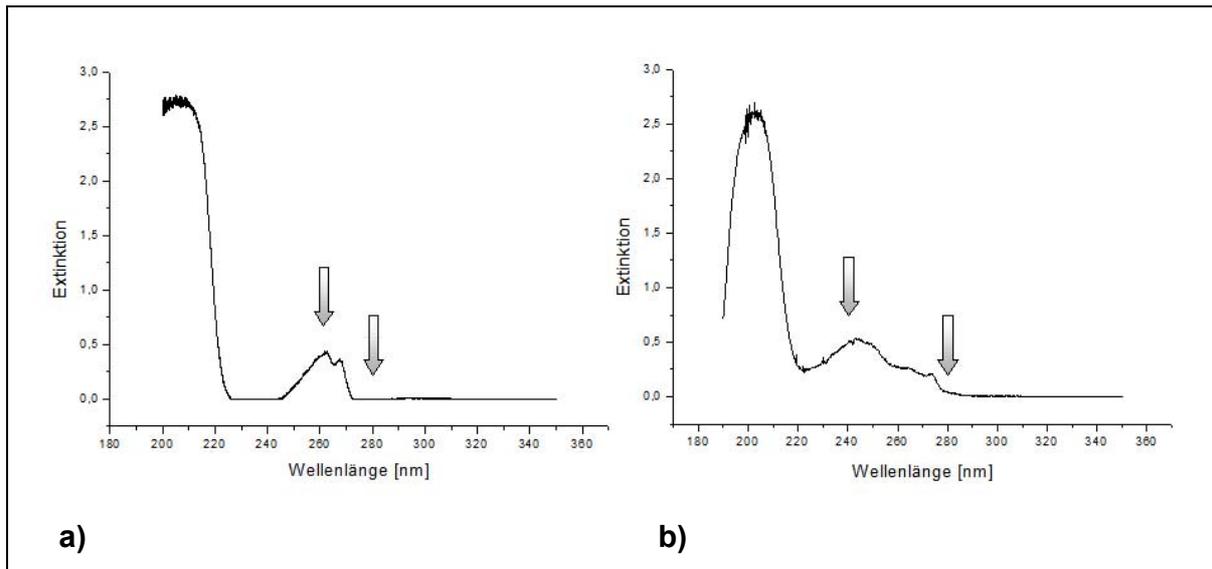


Abbildung 96: Wellenlängenabhängige Absorption; a) 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose 9, b) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose 8

Die Aufreinigung mittels FPLC (Puffer A: 0,05 M TEAB; Puffer B: 1 M TEAB) wurde mit einem Fluss von 1ml/min durchgeführt. Der pH-Wert der Puffer wurde auf 7,5 eingestellt, da ab pH 8 das Laufmittel nicht mehr ausreichend carbonathaltig ist (Wojczewski, 1999). Der Gradient lief 10 Minuten bei 100% A, stieg innerhalb von 90 Minuten auf 30% B und in weiteren 60 Minuten auf 100%B an.

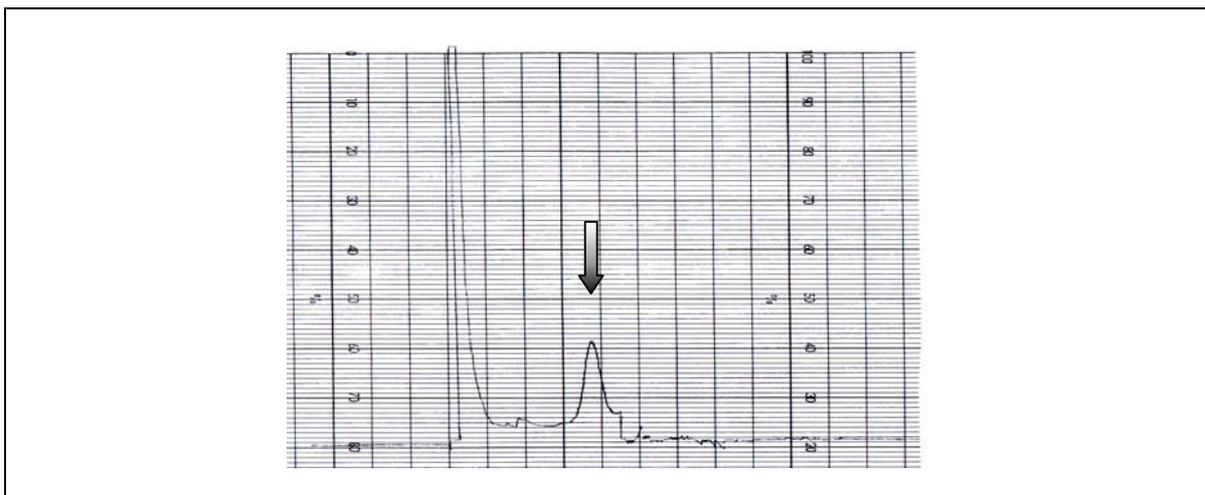
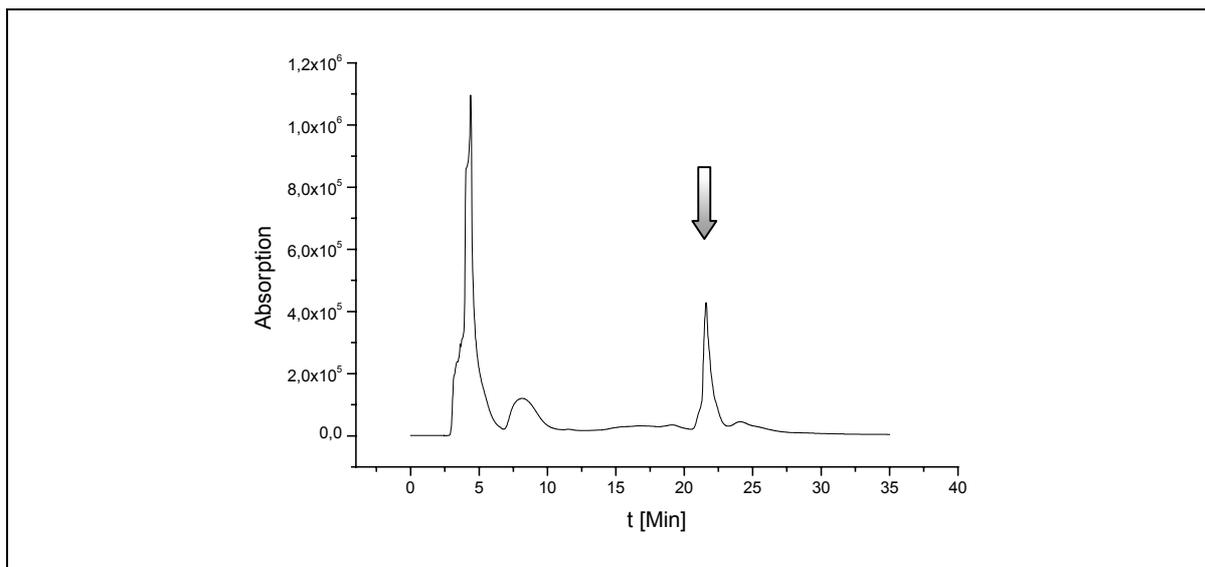


Abbildung 97: Anionenaustausch-FPLC der Synthese von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose-5'-triphosphat 97

Je langsamer der Gradient ansteigt und je länger die chromatographische Trennung durchgeführt wird, desto besser kann das im Reaktionsgemisch vorhandene Pyrophosphat schon in diesem Schritt abgetrennt werden (Schoetzau, 2000). Das resultierende Chromatogramm in *Abbildung 97* zeigt, dass das Triphosphat gut von den restlichen Substanzen abgetrennt werden kann.

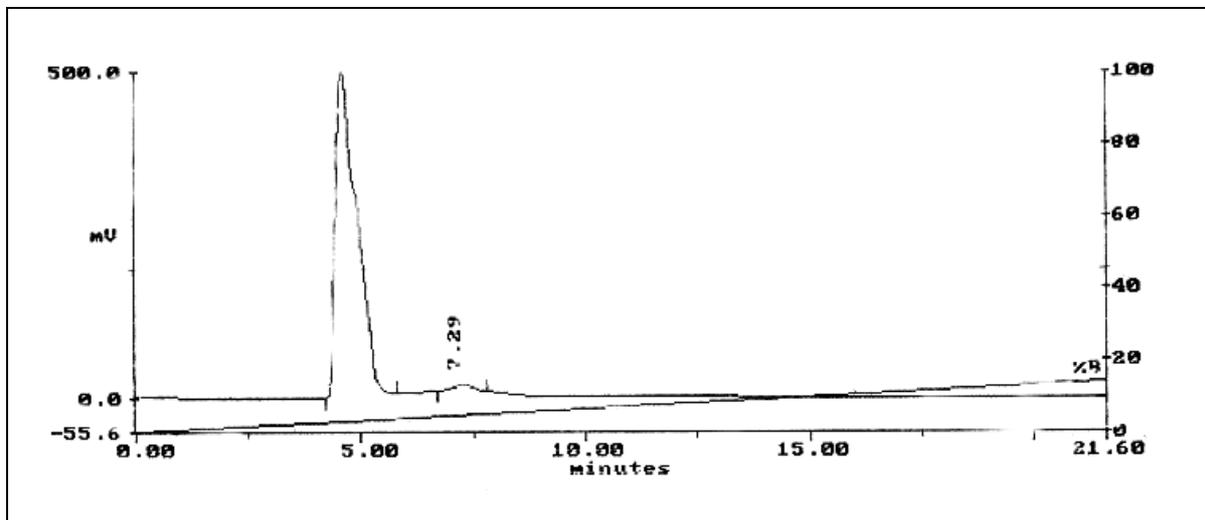
Nach Vereinigung der gesammelten Fraktionen wurden diese lyophilisiert. Dies ist im Vergleich zur Vakuumzentrifugation die Methode der Wahl, da das Triphosphat dabei nicht erhöhten Temperaturen ausgesetzt ist. Die Gefriertrocknung mit Ethanol wird bis zur Gewichtskonstanz durchgeführt, um überschüssiges Triethylammoniumcarbonat zu entfernen.

Je nach Polarität des Produktes wird das Pyrophosphat bei der FPLC nicht vollständig abgetrennt. Daher ist ein weiterer Trennschritt nötig, welcher mit einer SynchroPak AX300<sup>®</sup> Anionenaustauschersäule an einem HPLC-System durchgeführt wird. Als Laufmittel dient hierbei ein 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer mit 50% Formamid. Die Elution erfolgt durch einen steigenden Anteil an 1 M Ammoniumsulfat. Im Falle des 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose-5'-triphosphats **97** erfolgte die Elution bei einem Anteil von 28% an Puffer B (*Abbildung 98*).



*Abbildung 98: Aufreinigung des Triphosphats 97 mit einer Retentionszeit von 21,6 Minuten.*

Im Anschluss an die AE-HPLC-Trennung erfolgte die Entsalzung der lyophilisierten Fraktionen mittels Umkehrphasen-HPLC. Gleichzeitig wird dabei auch das bei der Gefriertrocknung zurückgebliebene Formamid aus der Probe entfernt. Die RP-HPLC wird mit einem Triethylammoniumacetat (TEAA)-Puffer durchgeführt. Nach Injektion der Probe auf die Nucleosil 300 Å C18-Säule wird das Triphosphat mit einer steigenden Konzentration an Acetonitril bei pH 5,5 rasch von der Säule eluiert (*Abbildung 99*). Es konnte auch gezeigt werden, dass das entsprechende Monophosphat eine um wenige Minuten längere Retentionszeit aufweist als das abgebildete Triphosphat.



*Abbildung 99: Chromatogramm eines RP-HPLC-Laufes zur Entsalzung der Triphosphate*

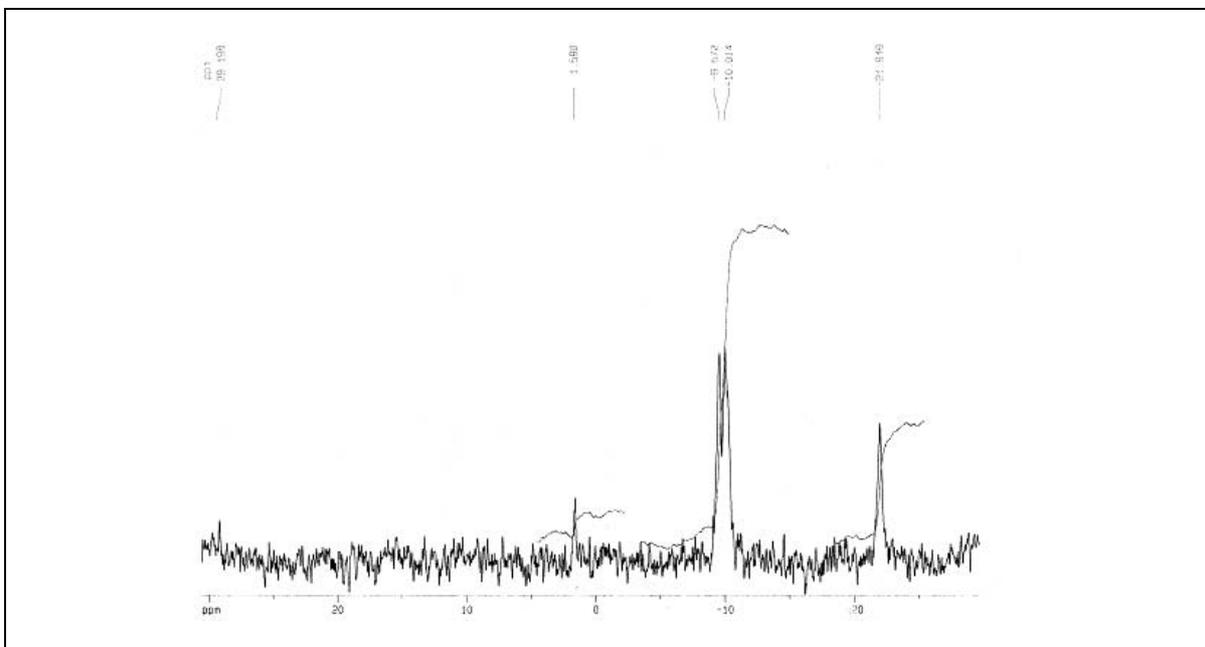
### 10.1.3 Analytik der synthetisierten Triphosphate **96** und **97**

Der Nachweis der synthetisierten Triphosphate erfolgte über  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie.

Zur Identifizierung im NMR werden die Phosphate – ausgehend vom Zuckerrest – mit  $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$  bezeichnet. Wie bereits in Kapitel 5 erläutert ergibt das  $\beta$ -Phosphoratom ein charakteristisches Signal bei ca.  $-22$  ppm. Während das  $\alpha$ -Phosphoratom unabhängig von den Messbedingungen ein konstantes Signal bei ca.  $-10$  ppm zeigt, wird bei dem

$\gamma$ -Phosphoratom eine große Schwankungsbreite von ca.  $-8$  ppm bis  $-11$  ppm beobachtet. Dieser Effekt ist vermutlich Ausdruck einer höheren pH-Sensitivität des endständigen Phosphats und resultiert oft in einer Signalüberlagerung des  $\alpha$ - und des  $\gamma$ -Phosphoratoms (Wojczewski, 1999). In *Abbildung 100* und *Abbildung 101* sind die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der in dieser Doktorarbeit synthetisierten Triphosphate **96** und **97** aufgeführt.

Der Nachweis der Triphosphate durch Massenspektrometrie gelingt für gewöhnlich nur mit reinen Proben; bereits kleine Verunreinigungen verhindern die Detektion des Molpeaks. Aufgrund der Labilität der Triphosphate können diese weiterhin durch die Ionisierungsenergie leicht zerstört werden. In *Abbildung 102* ist beispielhaft das Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose-5'-triphosphat **96** dargestellt. Der Hauptpeak korrespondiert gut mit der gesuchten Molmasse (527,23 g/mol), während der Peak bei 336,6 während der Messung entsteht und auf das fragmentierte Produkt (Monophosphat) hindeutet.



*Abbildung 100:*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose-5'-triphosphats **96**

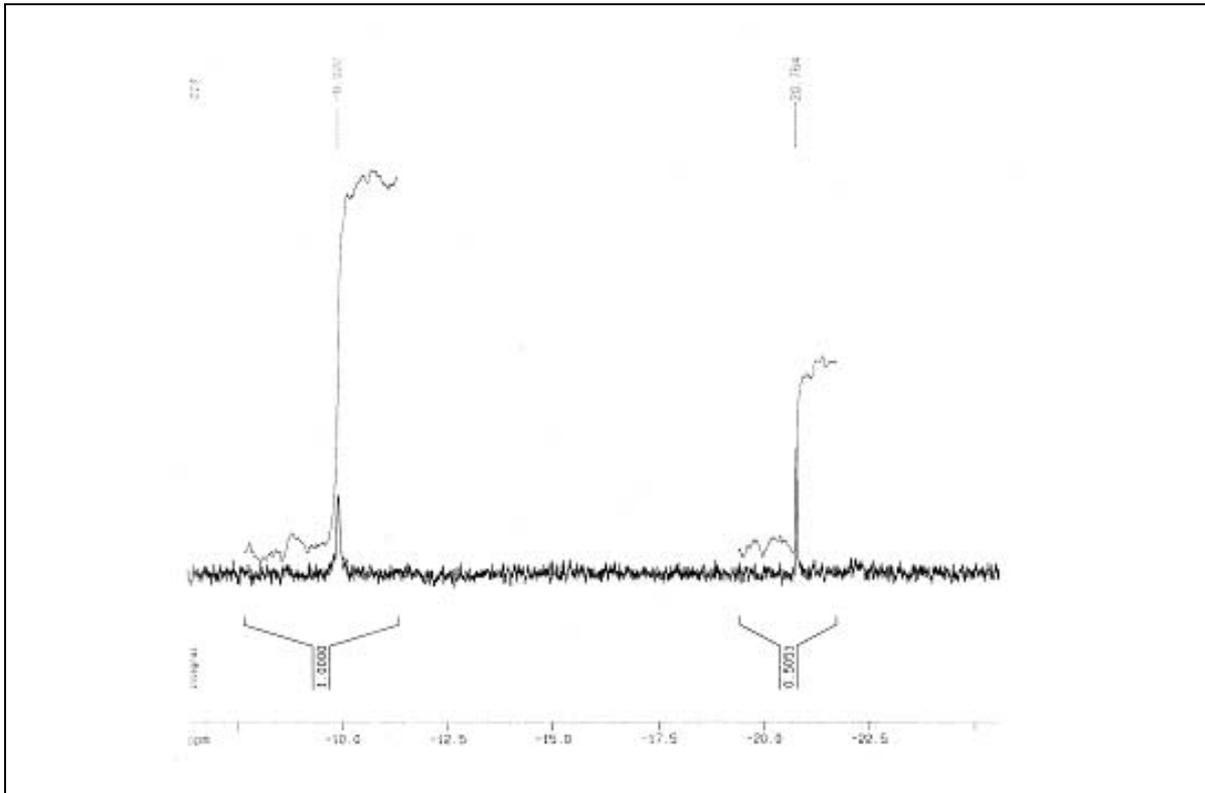


Abbildung 101:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose-5'-triphosphats **97**

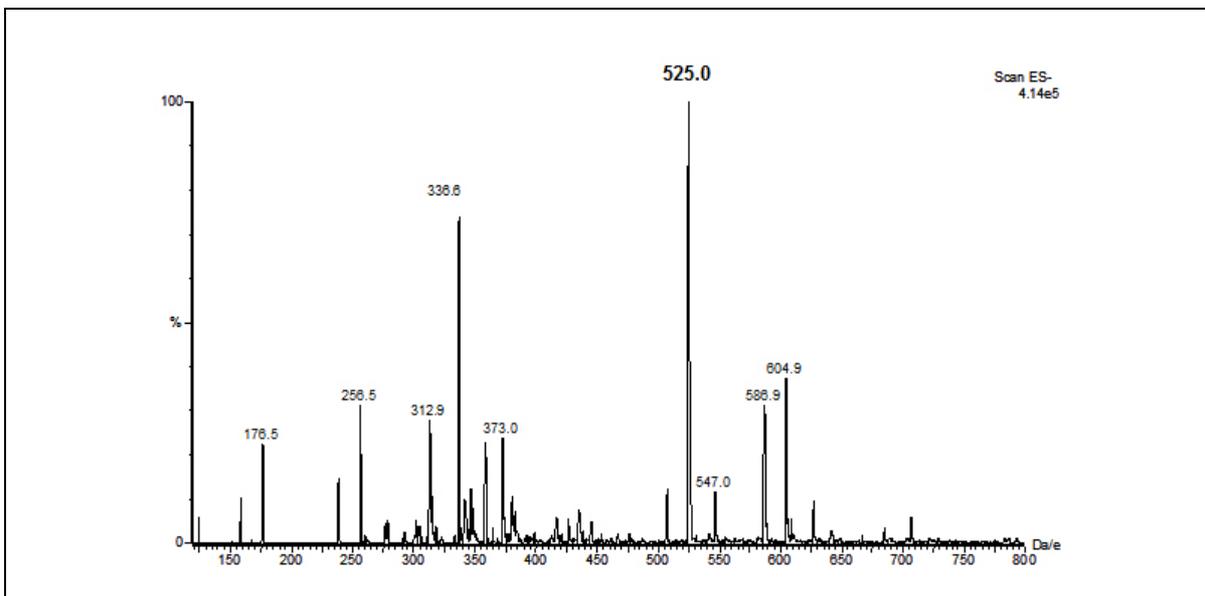


Abbildung 102: ESI(-)-Spektrum des Triphosphats **96**

## 10.2 Überprüfung der Templateigenschaften der universellen Basen 8 und 9 mittels reverser Transkription

Zur Evaluierung der Templateigenschaften der fluorierten Benzimidazol- und Benzolnucleosidanaloga **8** und **9** wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Assay entwickelt, bei dem mittels reverser Transkription der Einbau natürlicher Nucleoside gegenüber der fluorierten Nucleobase ermittelt werden kann.

Hierbei wurden die Phosphoramidite **63** und **64** mittels Festphasensynthese in einen RNA-Strang eingebaut. Dieses Templat wird mit einem DNA-"*Primer*" hybridisiert und bildet die doppelsträngige Erkennungssequenz für die Reverse Transkriptase. Diese startet die Transkription, also die Synthese eines DNA-Stranges, entlang des Templates und verknüpft dabei das erste Nucleosid des Transkripts mit dem 3'-Ende des Primers. Werden dem Enzym im Reaktionsgemisch alle vier natürlichen dNTPs zur Verfügung gestellt, so wird das vollständige DNA-Transkript mittels reverser Transkription hergestellt.

<b>S15/S16-Duplex</b>	5'- Cy5 GAC GCT CCG CGT GTT CTT C 3'- CUG CGA GGC GCA CAA GAA G <b>X</b> A CAG GCA CC -5'
<b>Reaktion 1</b>	5'- Cy5 GAC GCT CCG CGT GTT CTT C <b>A</b> 3'- CUG CGA GGC GCA CAA GAA G <b>X</b> A CAG GCA CC -5'
<b>Reaktion 2</b>	5'- Cy5 GAC GCT CCG CGT GTT CTT C <b>C</b> 3'- CUG CGA GGC GCA CAA GAA G <b>X</b> A CAG GCA CC -5'
<b>Reaktion 3</b>	5'- Cy5 GAC GCT CCG CGT GTT CTT C <b>G</b> 3'- CUG CGA GGC GCA CAA GAA G <b>X</b> A CAG GCA CC -5'
<b>Reaktion 4</b>	5'- Cy5 GAC GCT CCG CGT GTT CTT C <b>T</b> 3'- CUG CGA GGC GCA CAA GAA G <b>X</b> A CAG GCA CC -5'

Abbildung 103: Aufbau des "Reverse Transkriptase"-Assay zur Überprüfung der Templateigenschaften der fluorierten Nucleosidanaloga **8** und **9**; **X**, = U, **8**, **9**

Da im vorliegenden Fall nur der Einbau gegenüber dem artifiziellen Nucleosid von Interesse ist, wird der Polymerasereaktion nur jeweils ein dNTP in der Reaktionslösung zur Verfügung gestellt und die einzelnen Reaktionen werden separat in vier verschiedenen Gefäßen durchgeführt (*Abbildung 103*). Dies führt dazu, dass – wenn überhaupt – nur das erste Nucleosid von der Reversen Transkriptase eingebaut wird. Beim unmodifizierten Templat sollte aufgrund der Selektivität des Enzyms nur gegenüber dem jeweiligen Watson-Crick Basenpartner eine Verlängerung des Primers stattfinden (in *Abbildung 103*: Reaktion 1; X = U). Befindet sich eine der Modifikationen **8** oder **9** direkt am 3'-Ende des Primers, so sollte in allen vier Reaktionen eine Verlängerung zu beobachten sein, wenn es sich bei den untersuchten Nucleosiden auch in biologischen Systemen um universelle Nucleobasen handelt.

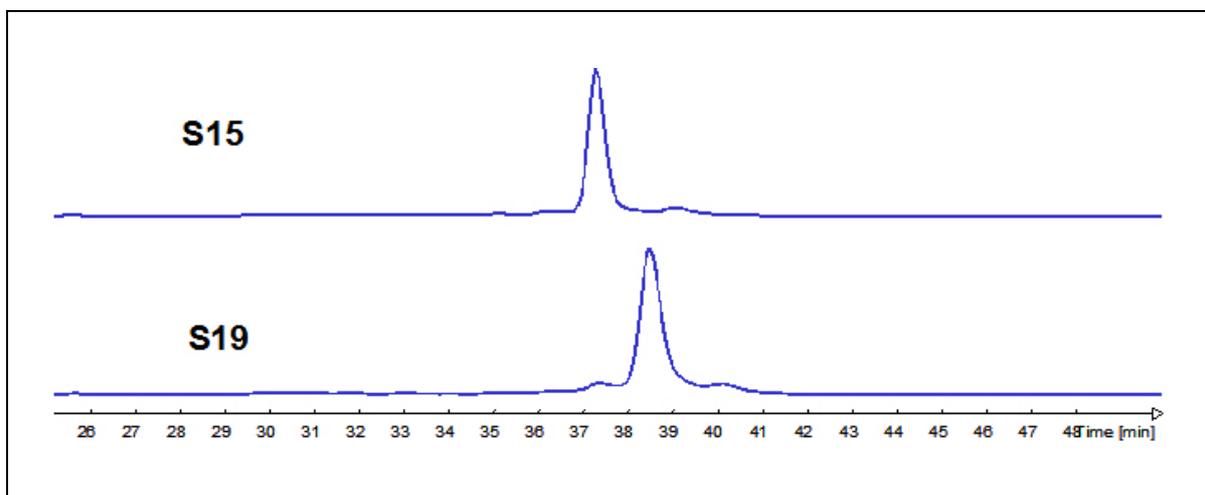
### Synthetisierte Stränge

Zur Durchführung des "Reverse Transkriptase"-Assays am ALF Express<sup>®</sup>-System war es nötig den DNA-"Primer" am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 zu markieren (siehe Kapitel 9.1). Neben den RNA-Templaten wurde auch ein um ein Nucleosid verlängerter Primer als Referenz synthetisiert.

Tabelle 14: Synthetisierte Primer und Template für den "Reverse Transkriptase"-Assay

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
<b>S 15</b>	5'- Cy5 GAC GCT CCG CGT GTT CTT C -3'	DNA-Primer
<b>S 16</b>	5'- CCA CGG ACA UGA AGA ACA CGC GGA GCG UC -3'	Unmodifiziertes Templat
<b>S 17</b>	5'- CCA CGG ACA <b>8</b> GA AGA ACA CGC GGA GCG UC -3'	Modifizierte Template
<b>S 18</b>	5'- CCA CGG ACA <b>9</b> GA AGA ACA CGC GGA GCG UC -3'	
<b>S 19</b>	5'- Cy5 GAC GCT CCG CGT GTT CTT CA -3'	Referenz ("Primer+1")

Zur Überprüfung, ob der Cy5 markierte Primer **S15** und das um ein Nucleotid verlängerte Produkt mittels Gelelektrophorese zu trennen sind, wurden die beiden Stränge **S15** und **S19** auf das Gel im ALF Express<sup>®</sup>-System geladen. Die Referenz **S19** diente dabei als "simuliertes Produkt". Wie in *Abbildung 104* zu sehen ist, weisen die Retentionszeiten der beiden DNA-Stränge einen ausreichend großen Unterschied auf, um auf dem Gel den Primer von dem Produkt unterscheiden zu können.



*Abbildung 104: ALF-Lauf zur Überprüfung der Trennung des Primers **S15** von einem um ein Nucleotid verlängerten Primer **S19***

Für die Verlängerung des Primers mit dNTPs wurde die SuperScript III<sup>®</sup> Reverse Transkriptase von Invitrogen verwendet. Diese optimierte M-MLV Reverse Transkriptase weist eine hohe thermische Stabilität auf (bis 55°C) und eine reduzierte RNase H-Aktivität auf. Dies ist wichtig, um den möglichen Abbau des Primer/Templat-Duplexes zu unterbinden.

Die Durchführung des Assays erfolgte mit einem "hot start". Zu den äquimolaren Mengen an RNA-Templet und DNA-Primer (21 pmol) wurde jeweils ein dNTP zugegeben. Dies lag in einer Endkonzentration von 10mM vor. Die Reaktion wurde in Tris/HCl-Puffer bei pH 8,3 mit 75 mM KCl und 3 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde 3 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen (1Min.) auf Eis wurde die Reverse Transkriptase (200 U) dazu pipettiert und die Reaktion für 65 Minuten bei 55°C inkubiert.

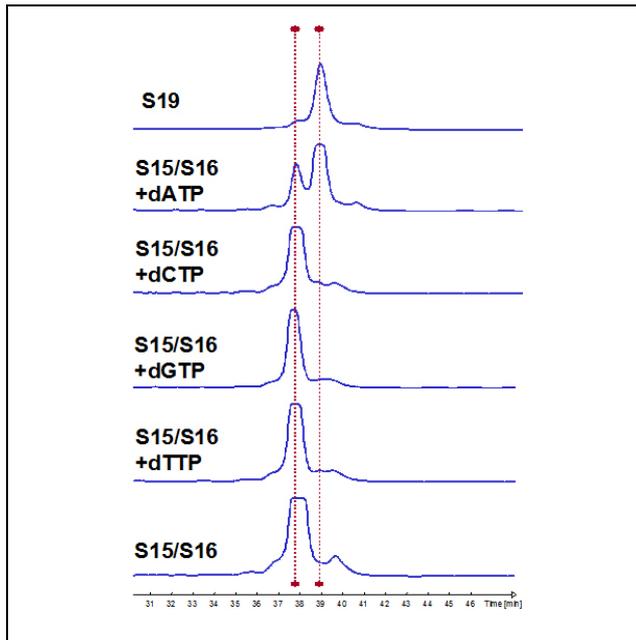


Abbildung 105: Assay zur Verlängerung Watson-Crick abhängigen Verlängerung des Primers um ein Nucleotid

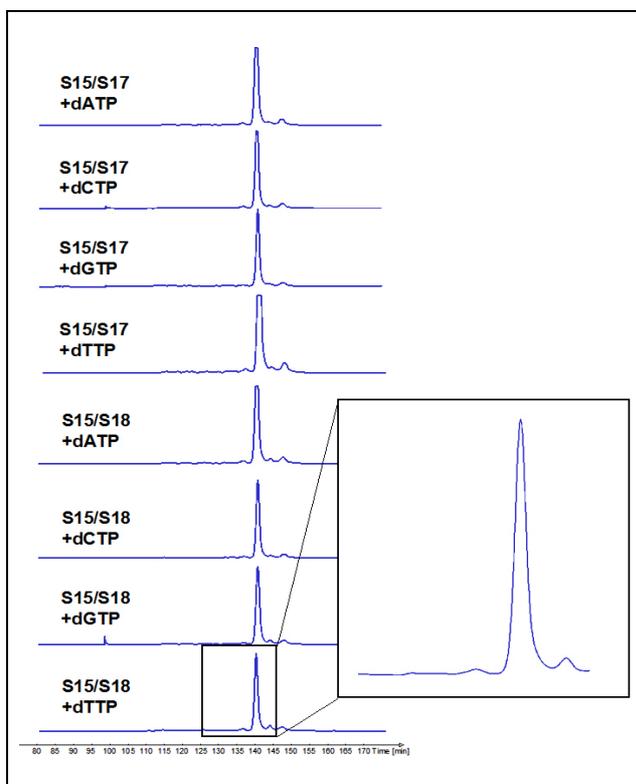


Abbildung 106: Überprüfung der Templateigenschaften der modifizierten Nucleoside 8 und 9

In *Abbildung 105* ist der ALF-Lauf des Assays mit dem unmodifizierten Templat **S16** aufgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die reverse Transkriptase zwischen der Watson-Crick Basenpaarung und den "mismatch"-Fällen differenziert. Nur bei Anwesenheit von dATP kam es zu einer Verlängerung des Primers. In den anderen drei Reaktionen konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Die Reaktionen mit den Primer/Templat-Duplexen **S15/S17** (Zeile 1-4) und **S15/S18** (Zeile 5-8) sind im folgenden abgebildet (*Abbildung 106*). Sowohl bei dem mit der Nucleobase 4,6-Difluorbenzimidazol modifizierten Templat **S17** als auch bei dem mit 2,4-Difluorbenzol modifizierten Templat **S18** ist die Bildung des verlängerten Primers zu beobachten. Der Reaktionsumsatz ist wesentlich geringer als bei der Bildung des natürlichen Watson-Crick Basenpaares am Duplex **S15/S16**; er liegt jedoch für alle acht Reaktionen bei 4-7% (siehe *Tabelle 15*). Da alle vier natürlichen Nucleoside prozentual etwa gleich gut gegenüber den artifiziellen Nucleosiden **8** und **9** eingebaut werden, kann man feststellen, dass es sich bei den Nucleosidanaloga

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** und 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** auch im biologischen Sinn um universelle Basen handelt.

Tabelle 15: Einbau an natürlichen dNTPs gegenüber den artifiziellen Nucleosiden **8** und **9**

Primer/Templat-Duplex	dNTP	Einbau (%)
<b>S 15/S17</b>	dATP	3,7 $\pm$ 0,2
	dCTP	4,2 $\pm$ 1,0
	dGTP	7,0 $\pm$ 2,0
	dTTP	4,6 $\pm$ 0,2
<b>S 15/S18</b>	dATP	5,3 $\pm$ 0,2
	dCTP	4,2 $\pm$ 0,9
	dGTP	6,7 $\pm$ 1,9
	dTTP	5,8 $\pm$ 1,3

Wie mit dem unmodifizierten Templat **S16** gezeigt werden konnte, kommt es auch bei verlängerten Reaktionszeiten zu keinem erhöhten Umsatz.

### 10.3 Einsatz der Triphosphate **96** und **97** als Substrate der T7 RNA Polymerase

Neben den Templateigenschaften der Nucleosidanaloga **8** und **9** wurde auch ihre Fähigkeit untersucht als Substrate für die T7 RNA-Polymerase zu fungieren. Dazu wurden wie in Kapitel 10.1 beschrieben die entsprechenden Triphosphate **96** und **97** synthetisiert.

Das verwendete Transkriptionssystem besteht aus einer DNA-abhängigen T7 RNA-Polymerase, einem DNA-Templat **S21** und einem Promoter **S20**, dessen Sequenz festgelegt ist. Als Templat wurde eine DNA-Sequenz gewählt, die für die TAR-RNA codiert, da dies ein gut zu transkribierendes System ist.

#### **S20/S21**

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TA  
3'- ATT ATG CTG AGT GAT AT CCG CGA TCG GCT GAC GGC TAG AGC GAC TGA CTG -5'

#### **S20/S21**; Reaktion mit CTP, GTP, UTP und dem Triphosphat **96**

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC GCU XGC CGX CUG CCG XUC UCG CUG XCU GXC  
3'- ATT ATG CTG AGT GAT AT CCG CGA TCG GCT GAC GGC TAG AGC GAC TGA CTG -5'

#### **S20/S21**; Reaktion mit ATP, CTP, GTP und dem Triphosphat **97**

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC GCY AGC CGA CYG CCG AYC YCG CYG ACY GAC  
3'- ATT ATG CTG AGT GAT AT CCG CGA TCG GCT GAC GGC TAG AGC GAC TGA CTG -5'

*Abbildung 107: Aufbau des "Polymerase"-Assays; der Duplex **S20/S21** dient als Erkennungssequenz und Templat für die T7 RNA-Polymerase; die Transkripte, die entstehen können, sind blau gekennzeichnet; **X** = **8** bzw. **96**; **Y** = **9** bzw. **97***

Die Polymerase benötigt die Sequenz 5'-GG-3' als Transkriptionsstart und verknüpft bei der Transkription den Promoter nicht mit dem entstehenden RNA-Strang. Daher kann keine Fluoreszenzmarkierung zur Analyse des Transkriptes am ALF Express®-

System durchgeführt werden. Da eine postsynthetische Markierung aufwendig ist und nicht immer quantitativ verläuft, wurde die Analyse der Transkription durch ein analytisches Polyacrylamid-Gel ("Minigel") mit anschließender Silberfärbung durchgeführt.

Die fluorierten Benzimidazol- und Benzol-Nucleosidanaloga **8** und **9**, auf denen die eingesetzten Triphosphate **96** und **97** beruhen, sind wie in Kapitel 7 näher erläutert sterische Mimetika für Guanosin bzw. für Uridin. Deshalb wurde bei der Untersuchung der Triphosphate Verbindung **96** anstelle von UTP in der Polymerase katalysierten Reaktion eingesetzt (*Abbildung 107*). Da das Guanosin-5'-triphosphat für den Transkriptionsstart essentiell ist und dessen Substitution wahrscheinlich zu einer Inhibierung der Transkription führen würde, wurde im Fall des 4,6-Difluorbenzimidazol das ATP substituiert. Dienen die beiden artifiziellen Triphosphate **96** und **97** als Substrate für die T7 RNA-Polymerase und ermöglicht die Polymerase die Kettenverlängerung nach Einbau der modifizierten Triphosphate, so sollten die beiden in *Abbildung 107* in blau dargestellten Transkripte entstehen.

Zur Synthese des modifizierten Transkripts wurden zunächst 100µg/ml der an doppelsträngigem Promoter/Templat-Komplex **S20/S21** hybridisiert. Dieser ist essentiell für die Anlagerung der Polymerase und den Transkriptionsstart. Die T7 RNA-Polymerase arbeitet optimal in einem 80 mM HEPES-KOH (pH 7,5)-Puffersystem mit 12 mM MgCl<sub>2</sub> und in Anwesenheit von 2mM Spermidin. Die Konzentration an Ribotriphosphat beträgt jeweils 3 mM. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Polymerase-Reaktion durch Zugabe von Formamid gestoppt.

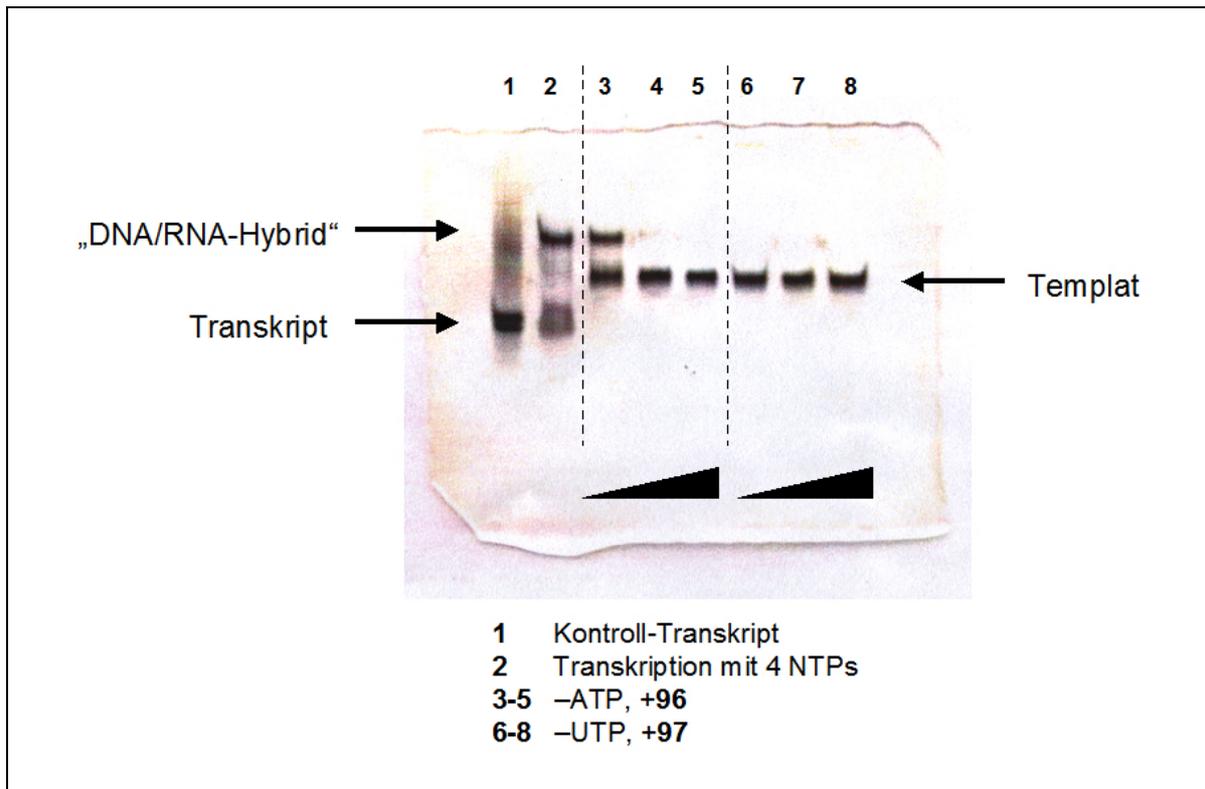


Abbildung 108: Analytisches PA-Gel mit den durchgeführten Transkriptionsansätzen; Spalten 3-5: 4,6-Difluorbenzimidazol modifiziertes Triphosphat **96**, Spalten 6-8: 2,4-Difluorbenzol modifiziertes Triphosphat **97**, jeweils in steigender Konzentration

Nach Durchführung der Transkriptionen wurden die Reaktionen durch Zugabe von Formamid gestoppt. Die Reaktionen mit Verbindung **96** wurden in ein-, fünf- und zehnfacher Konzentration an modifiziertem Triphosphat durchgeführt (Abbildung 108, Spalten 3-5); die Reaktionen mit Verbindung **97** wurden in ein-, zwei- und fünffacher Konzentration an modifiziertem Triphosphat durchgeführt (Spalten 6-8).

Wie in *Abbildung 108* zu erkennen ist, konnte kein einzelsträngiges RNA-Transkript nachgewiesen werden. Das mit 4,6-Difluorbenzimidazol modifizierte Triphosphat **96** wurde durch die Polymerase jedoch toleriert und in das Transkript eingebaut. Auf dem Gel ist das Transkript als Hybrid mit dem Templat **S21** zu sehen (Spalte 3). Aufgrund der identischen Laufhöhe mit dem unmodifizierten Transkript/Templat-Hybrid in Spalte 2 handelt es sich bei dem modifizierten DNA/RNA-Hybrid in Spalte 3 um das vollständige Produkt der Transkription. Dass die Transkription nicht vollständig abgelaufen ist, ist an dem Vorhandensein der Bande des nicht hybridisierten Templates zu erkennen. Aufgrund der nicht ganz umgesetzten Reaktion ist die

Konzentration an einzelsträngigem Transkript auf dem Gel vermutlich zu gering, um dieses mittels Silberfärbung nachzuweisen. Die Spalten 4 und 5 zeigen aufgrund der erhöhten Salzkonzentration im Reaktionsansatz kein Produkt. Die mit dem Triphosphat **97** durchgeführten Transkriptionen führten nicht zu dem Einbau des Triphosphates in den naszierenden RNA-Strang.

Die Bevorzugung der 4,6-Difluorbenzimidazol-Modifikation gegenüber dem 2,4-Difluorbenzol-Nucleosid korrespondiert mit den erhaltenen  $T_m$ -Werten der RNA 12mere (Kapitel 8), bei denen das Purinanalogon aufgrund höherer Beiträge zu den Basenstapelungswechselwirkungen den RNA-Duplex besser stabilisiert. Dass die Transkription mit dem Triphosphat **96** nicht so effizient verläuft wie bei den natürlichen Triphosphaten wurde durch eine Kooperation mit der Gruppe von Prof. Kuchta bestätigt. Bei Untersuchungen der humanen Primase war dieses Triphosphat der mit Abstand schwächste Inhibitor (Kuchta, 2004).

Zum Nachweis, dass es sich bei den Banden in Spalte 2 und 3 des Gels in *Abbildung 108* tatsächlich um das aus Templat **S21** und Transkript bestehende RNA/DNA-Hybrid handelt, wurde ein RNase H-Verdau durchgeführt.

Die Analyse des DNA-RNA-Hybrids, welches bei der Transkription mit T7 RNA Polymerase entstanden ist, wurde mit 10  $\mu$ l des Transkriptionsansatzes ein RNaseH-Verdau durchgeführt. Der enzymatische Verdau des Transkripts wurde mit 1 U bzw. 5 U RNase H durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach 30 bzw. 60 Minuten durch Zugabe von Formamid gestoppt.

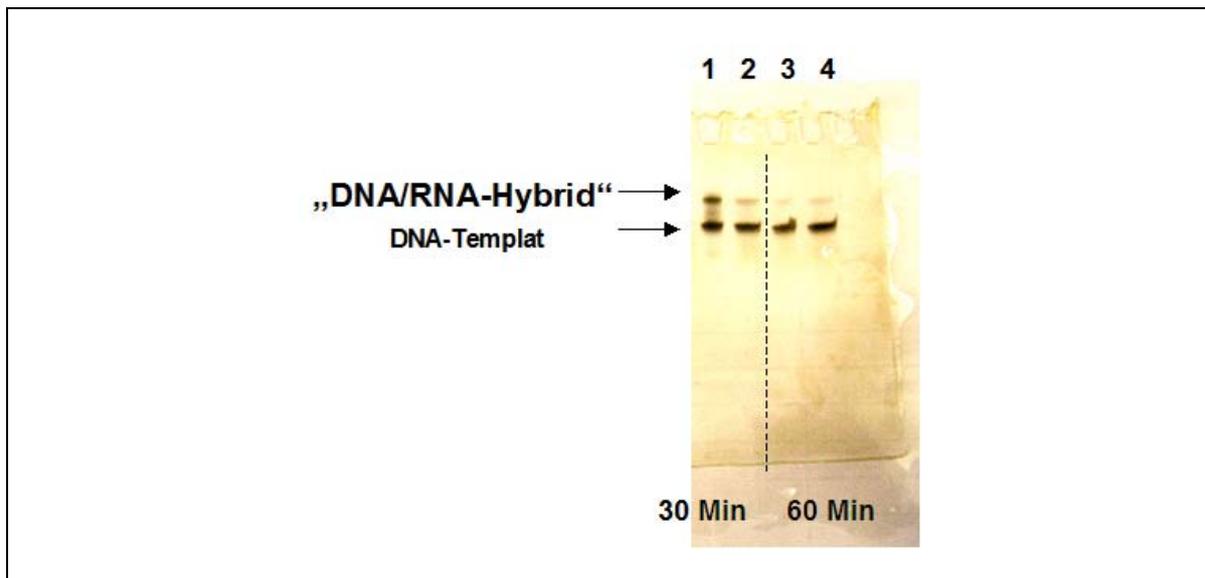


Abbildung 109: RNase H-Verdau des RNA/DNA-Hybrids aus dem Templat **21** und dem RNA-Transkript; Spalte 1 + 3: 1U RNase H; Spalte 2 + 4: 5U RNase H

Wie auf dem analytischen PA-Gel in *Abbildung 109* zu erkennen ist, konnte mittels RNase H-Verdau nachgewiesen werden, dass es sich in *Abbildung 108* um den vermuteten Templat/Transkript-Duplex handelt. Der Verdau des Hybrids wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an RNase H durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 30 Min. bzw. 60 Min. gestoppt. Sowohl bei 1 U Enzym (Spalten 1 und 3) als auch bei 5 U Enzym (Spalten 2 und 4) wurde die Degradation des Hybrids beobachtet, während das einzelsträngige DNA-Templat **S21** nicht verdaut wurde.



# 11

## Zusammenfassung & Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 2'-Aminoethyl modifizierte, fluorierte Nucleoside synthetisiert, um ihren Einfluss auf die Stabilität von RNA-Duplexen sowie auf die Kinetik von Hammerhead-Ribozym katalysierten Reaktionen zu untersuchen.

Bei den fluorierten Benzimidazol- und Benzol-Nucleosidanaloga **8** und **9** handelt es sich um universelle Basen, die bei der Basenpaarung nicht zwischen den vier natürlichen Nucleosiden unterscheiden. Die dabei auftretende Destabilisierung der RNA-Duplexe sollte durch Einführung einer unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegenden 2'-Aminoethyl-Gruppe umgangen werden. Die 2'-modifizierten Verbindungen **27** und **28** wurden synthetisiert und eingehend untersucht, um artifizielle Nucleoside zu entwickeln, die nach Einbau in katalytische Oligoribonucleotide wie dem Hammerhead-Ribozym in der Lage sind genomische HIV-Punktmutationen zu tolerieren.

Die Synthese der Nucleosidanaloga (*Abbildung 110*) erfolgte im Fall der *N*-glycosidisch verknüpften Verbindungen **8** und **27** über die Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion, welche mit dem zuvor in vier Schritten synthetisierten 4,6-Difluorbenzimidazol durchgeführt wurde. Die Darstellung der C-Nucleoside **9** und **28** wurde über eine Glycosilierungsreaktion mit 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- $\gamma$ -lacton durchgeführt.

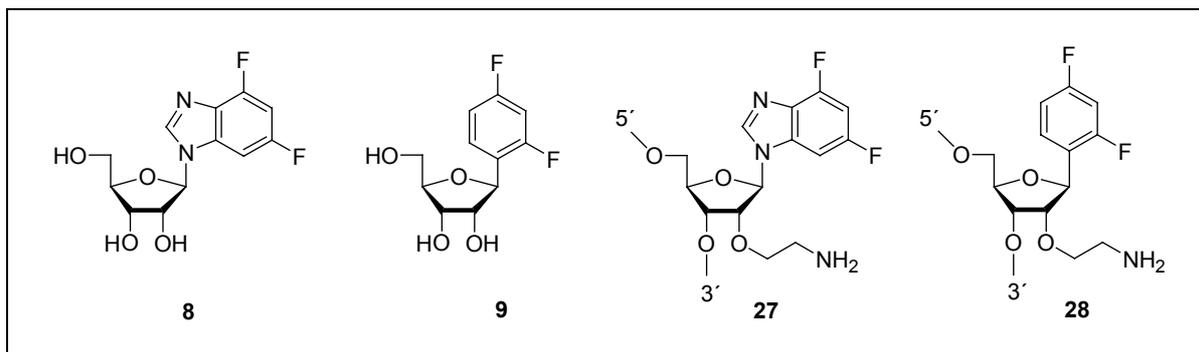


Abbildung 110: Synthetisierte Nucleoside

Die Einführung der 2'-Modifikation konnte nach simultaner Schützung der 3'- und 5'-Hydroxygruppe durch Alkylierung der 2'-Position mit Bromessigsäureethylester erreicht werden. Die anschließende Reduktion mit Lithiumborhydrid lieferte den primären Alkohol. Ausgehend von diesem zentralen Zwischenprodukt konnte in einer deutlich verkürzten Synthesestrategie die direkte Konvertierung des Alkohols unter "Mitsunobu"-Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Dabei wurde durch ein Phthalimid die geschützte Aminogruppe in einem Reaktionsschritt eingeführt (Abbildung 111). Die Phthalimid-Schutzgruppe ist dabei kompatibel mit der Schutzgruppenstrategie der Oligonucleotid-Festphasensynthese und kann postsynthetisch mit dem Entfernen der Basenschutzgruppen des RNA-Stranges abgespalten werden. Nach Umsetzung der Nucleoside zu den Phosphoramiditen konnten diese kupplungsfähigen Monomere in der RNA-Festphasensynthese eingesetzt und in RNA12mere und Hammerhead-Ribozyme eingebaut werden.

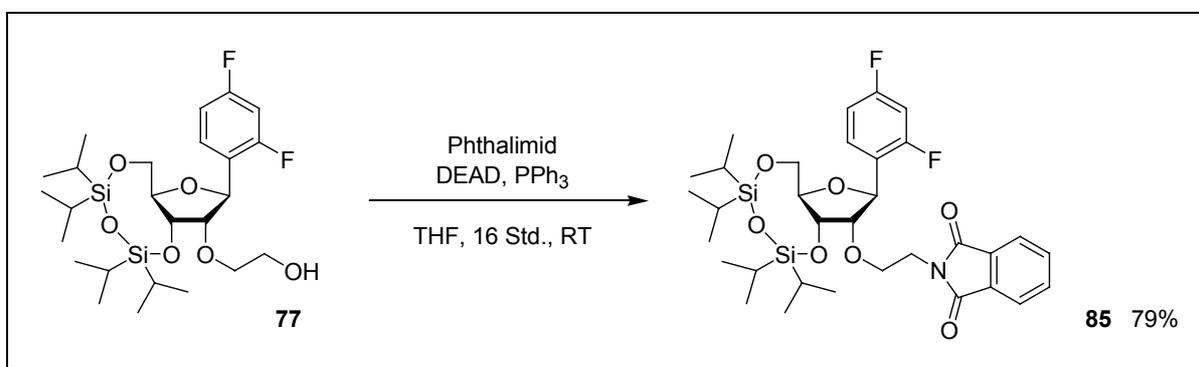
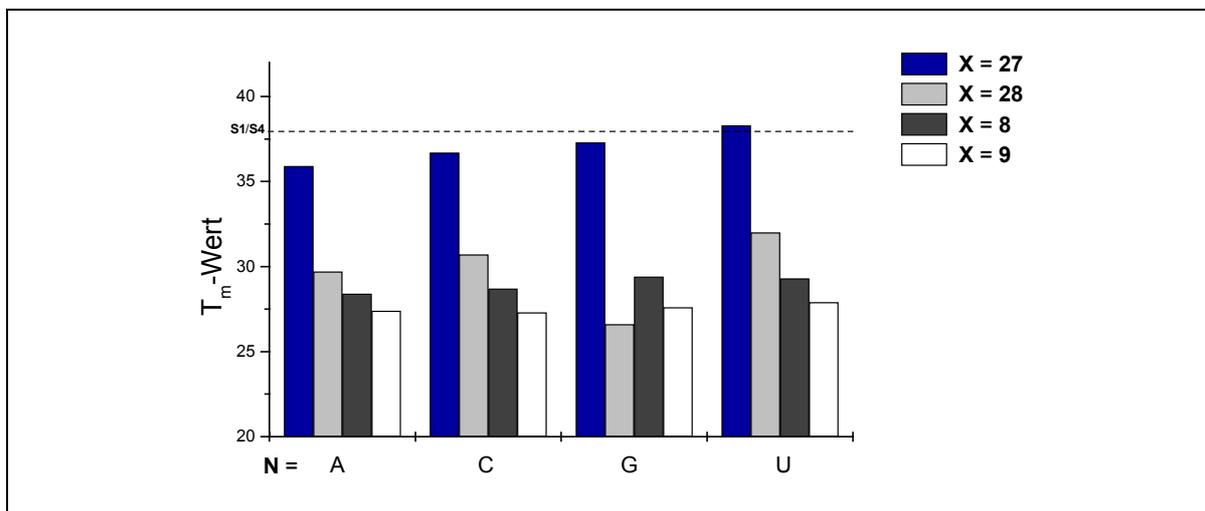


Abbildung 111: Mitsunobu-Reaktion zur direkten Einführung der Phthalimid-geschützten Aminogruppe

Um den Einfluss der aromatischen Fluorsubstituenten und der elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminogruppe auf die thermodynamische Stabilität von RNA-Duplexen zu untersuchen, wurden UV/VIS-spektroskopische Messungen an monomodifizierten RNA 12meren durchgeführt. Die Anwendung hydrophober, Fluor substituierter Nucleobasen mit  $\beta$ -Aminoethyl-modifizierter 2'-Position führte im Fall des 4,6-Difluorbenzimidazols **27** zu deutlich stabilisierten RNA-Duplexen (*Abbildung 112*).

Die mit **27** modifizierten Duplexe sind ähnlich stabil wie der unmodifizierte Watson-Crick-Duplex **S1/S4**. Bei Verbindung **27** handelt es sich um ein neues Nucleosid mit den Eigenschaften einer universellen Base. Da diese Modifikation nicht zwischen den natürlichen Nucleosiden unterscheidet, resultieren nahezu identische Schmelzkurven und  $T_m$ -Werte. Die Stabilisierung eines RNA-Duplex fällt geringer aus, wenn das Nucleosidanalogon **28** eingebaut ist. Es liegt jedoch in drei von vier Fällen noch eine Erhöhung der Stabilität um bis zu 4°C gegenüber den Watson-Crick "mismatch"-Basenpaaren und dem 2'-unmodifizierten, fluorierten Nucleosid **9** vor. Bei Verbindung **28** handelt es sich keine universelle Base, da die Basenpaarung mit Pyrimidinen der Paarung mit Purinen bevorzugt wird.



*Abbildung 112: Graphische Darstellung der Schmelzpunkte der RNA-Duplexe; modifizierter RNA-Strang 5'- CUU UUC XUU CUU -3', hybridisiert mit 5'- AAG AAN GAA AAG -3'*

Die UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen legten die Grundlage für die Entwicklung von chemisch modifizierten Hammerhead-Ribozymen, die in der Lage



Basenpaaren im Vergleich zum natürlichen Ribozym **R9** eine um Faktor 13 erhöhte katalytische Aktivität auf.

- Aufgrund der Resultate mit dem Ribozym **R2**, welches mit Verbindung **8** modifiziert ist, kann die Erhöhung der katalytischen Aktivität im Vergleich zu den Ribozym-Substrat Komplexen mit Watson-Crick "mismatch"-Basenpaaren allein auf den Einfluss der 2'-Aminoethylgruppe zurückgeführt werden. Somit konnte eine neue Generation chemisch modifizierter Hammerhead-Ribozyme entwickelt werden, die in der Lage ist genomische Punktmutationen zu tolerieren und kurze, synthetische Substrate effizienter zu spalten als die Watson-Crick "mismatch"-Varianten.
- In Übereinstimmung mit den thermodynamischen Studien an RNA 12mer Duplexen zeigt das Hammerhead-Ribozym **R12** eine geringere katalytische Aktivität.

Bei der Überprüfung, ob es sich bei den fluorierten Benzimidazol- und Benzol-Nucleosidanaloga **8** und **9** auch im biologischen Sinn um universelle Basen handelt, wurden diese in Polymerase-Reaktionen untersucht. Dabei wurden sowohl ihre Templateigenschaften überprüft als auch ihre Fähigkeit als Substrate für die T7 RNA Polymerase zu dienen. Die hierfür erforderliche chemische Synthese der nucleosidischen 5'-Triphosphate wurde nach der Methode von Yoshikawa durchgeführt.

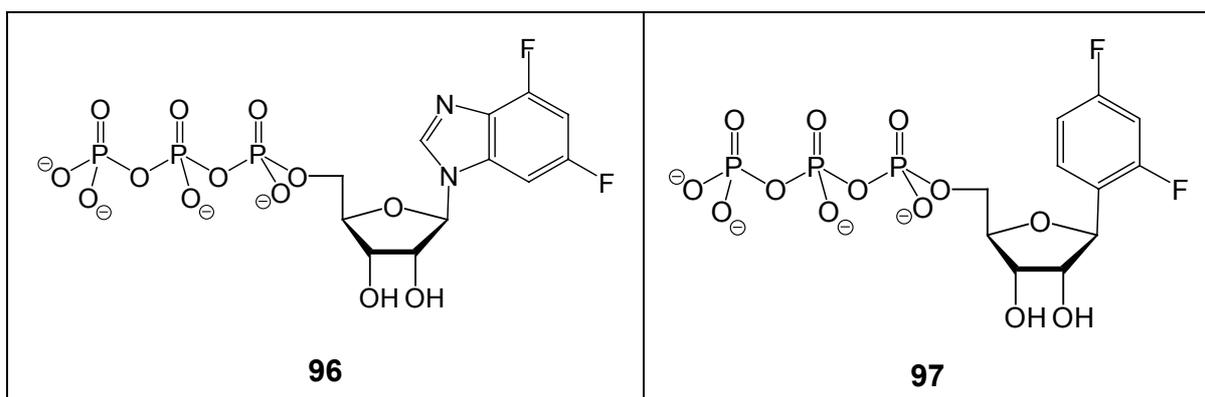


Abbildung 114: Nucleosidische 5'-Triphosphate **96** und **97**

Zur Untersuchung der Templateigenschaften wurde ein Assay entwickelt, bei dem mittels reverser Transkription der Einbau natürlicher Nucleoside gegenüber den fluorierten Nucleobasen ermittelt werden kann. Es zeigte sich, dass sowohl bei dem mit der Nucleobase 4,6-Difluorbenzimidazol modifizierten Templat **S17** als auch bei dem mit 2,4-Difluorbenzol modifizierten Templat **S18** die Verlängerung Primers zu beobachten ist. Gegenüber beiden Nucleobasen wurden alle vier natürlichen Nucleoside eingebaut. Der Reaktionsumsatz lag dabei bei 4-7%. Da alle vier natürlichen Nucleoside prozentual gleich gut gegenüber den artifiziellen Nucleosiden **8** und **9** eingebaut werden, handelt es sich bei den Nucleosidanaloga 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** und 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** auch im biologischen Sinn um universelle Basen.

Die Fähigkeit der Triphosphate **96** und **97** als Enzymsubstrate zu fungieren wurde mit einer T7 RNA-Polymerase untersucht. Das mit 4,6-Difluorbenzimidazol modifizierte Triphosphat **96** wurde von der Polymerase toleriert und in das Transkript eingebaut. Auf dem analytischen Polyacrylamid-Gel ist das Transkript als Hybrid mit dem Templat nachzuweisen. Aufgrund der identischen Laufhöhe mit dem unmodifizierten Transkript/Templat-Hybrid handelt es sich bei dem modifizierten DNA/RNA-Hybrid um das vollständige Transkriptionsprodukt mit fünfachtem Einbau des Triphosphats **96**. Der Nachweis des DNA/RNA-Hybrid erfolgte dabei mittels RNase H-Verdau. Die Bevorzugung der 4,6-Difluorbenzimidazol-Modifikation gegenüber dem 2,4-Difluorbenzol-Nucleosid korrespondiert mit den erhaltenen  $T_m$ -Werten der RNA-Duplexe, bei denen das Purinanalogon aufgrund höherer Beiträge zu den Basenstapelungswechselwirkungen den RNA-Duplex besser stabilisiert.

Aus den in dieser Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnissen eröffnen sich neue, interessante Arbeitsgebiete:

- Der Einsatz der artifiziellen Nucleoside **27** und **28** in der RNA Interferenz ist von großem Interesse, da auch diese Methodik vor dem Problem der genomischen Punktmutationen steht. Die Untersuchungen der anti-HIV siRNAs sind bereits begonnen worden und die modifizierten siRNA-Duplexe sollen neben der

Toleranz von Punktmutationen auch eine assymetrische Strangselektion zur Erhöhung der katalytischen Effizienz der siRNAs bewirken.

- Der Einbau der 2'-Aminoethylfunktion in natürliche Nucleoside ist bei der Entwicklung von Basenpaaren von Interesse, die eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber Watson-Crick-Basenpaarungen aufzeigen sollen.



# 12

## Experimenteller Teil

### 12.1 Allgemeines

#### 12.1.1 Analysemethoden für die chemische Synthese

##### *Eingesetzte Lösungsmittel*

Für die Chromatographie (DC, pDC und FC) wurden nachstehend aufgeführte Lösungsmittel eingesetzt und vor Verwendung wie folgt behandelt:

- Acetonitril; p.a.
- Chloroform; p.a.
- Dichlormethan: techn. Qualität, über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet und destilliert
- Ethylacetat; techn. Qualität, über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet und destilliert
- Isopropanol; techn. Qualität
- Methanol; techn. Qualität, über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet und destilliert
- *n*-Hexan; techn. Qualität, destilliert

### *Dünnschichtchromatographie (DC)*

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554; 0,2 mm Schichtdicke). Alle  $R_f$ -Werte wurden unter Kammerättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert; UV-inaktive Substanzen wurden mit einer Lösung von  $\text{CeSO}_4$  in  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$  beschichtet und bei ca. 300°C als blaue Flecken sichtbar gemacht. Bei 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-substituierten Verbindungen konnte der Nachweis mittels Hitze oder Salzsäuredämpfen infolge einer Orangefärbung erfolgen.

### *Präparative Dünnschichtchromatographie (pDC)*

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurde ein Chromatotron der Fa. Harrison Research (Modell 7924 T) verwendet. Als Trennmateriale diente gipshaltiges Kieselgel (Merck 60 PF<sub>254</sub>, Nr. 7749), welches in folgenden Schichtdicken auf die Glasplatten aufgetragen wurde: 1 mm, 2 mm und 4 mm. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte durch die mit Fluoreszenzindikator beschichtete stationäre Phase entsprechend bei 254 nm.

### *Präparative Säulenchromatographie ("Flash"-Chromatographie, FC)*

Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel (Korngröße 40-63µm) als stationäre Phase durchgeführt. Es standen Säulen verschiedener Durchmesser zur Verfügung (min. 2 cm, max. 15 cm). Die Trennungen wurden entweder isokratisch oder mit Stufengradienten durchgeführt. Die entsprechenden Details sind in Kapitel 12.2 bei den Synthesen der Einzelverbindungen beschrieben.

### *FPLC*

Die FPLC-Trennung wurde an einem Gerät der Firma JASCO mit einer PU-980 Pumpe und einem UV-970 Detektor durchgeführt. Die Trennung erfolgte mit dem

Säulenmaterial DEAE Sepharose (DEAE Sephadex A25, Pharmacia) auf einer Pharmacia-Säule (1 cm x 20 cm).

Puffer A: 0,05 M TEAB

Puffer B: 1 M TEAB

Flussrate: 1 ml/min

Programm: 10 Min 100%A, 0-30% B in 90 Min, 30-100% B in 60 Min

Detektion bei 260 nm bzw. 254 nm

### *Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)*

Die HPL-Chromatographie der nucleosidischen 5'-Triphosphate wurde auf einer Merck-Hitachi Anlage mit folgenden Komponenten durchgeführt: L6220 Intelligent Pump, Mixer, D6000 Interface, L4250 UV-VIS-Detektor und einem Shimadzu RF-535 Fluoreszenz Monitor.

#### a. Anionenaustauscher-HPLC

Säule: Synchronpak AX300, 6 µm, 250 x 4,6 mm

Puffer A: 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50% Formamid

Puffer B: 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  / 50% Formamid

Flussrate: 1 ml/min

Programm: 0-40% B in 35 Min

Detektion bei 260 nm bzw. 254 nm

#### b. Umkehrphasen(RP)-HPLC

Säule: Nucleosil 300A, C18, 5 µm, 250 x 4,6mm

Puffer A: 0,05 M TEAA, pH 5,5

Puffer B: 0,05 M TEAA, pH 5,5 / 50% Acetonitril

Flussrate: 1 ml/min

Programm: 100% A 10 Min; 0-40% B in 10 Min

Detektion bei 260 nm bzw. 254 nm

### *NMR-Spektroskopie*

Die NMR-Spektren wurden auf Geräten der Fa. Bruker aufgenommen. Es wurden die Geräte AM250, AMX400 und AMX600 verwendet. Die chemische Verschiebung  $\delta$  (ppm) wurde auf das jeweilige Lösungsmittelsignal geeicht. Für die  $^1\text{H}$ -Spektren wurden DMSO- $d_6$  (2.54 ppm),  $\text{CDCl}_3$  (7.27 ppm), MeOD (3.30 ppm) und Aceton- $d_6$  (2,03 ppm) verwendet. Für  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden ebenfalls DMSO- $d_6$  und  $\text{CDCl}_3$  verwendet, welche eine chemische Verschiebung von 39.5 ppm bzw. 77.0 ppm aufweisen. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen.

### *IR-Spektroskopie*

Die IR-Spektren wurden an einem IR-Spektrometer der Firma Perkin Elmer (1600 Series FTIR) gemessen. Auflösung:  $4\text{ cm}^{-1}$ , "scanning speed" 2 mm/Sek., "accumulation" = 4.

### *Massenspektrometrie*

Die Massenspektren wurden auf Geräten der Firmen VG Analytical und VG Biotec (Heute: Micromass) aufgenommen. Für die Elektrospray-Ionisation (ESI) stand eine VG Platform II mit Quadrupol-Analysator zur Verfügung. Die MALDI-Spektren ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation") wurden auf einem Flugzeit-Massenspektrometer (VG Tofspec) entweder im linearen oder im Reflektionmodus gemessen.

### *Elementaranalyse*

Die Elementaranalysen wurden an einem Gerät der Firma Foss-Heraeus (CHN-O-Rapid) durchgeführt.

### *Schmelzpunktbestimmung*

Die Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktbestimmungs-Apparatur der Firma Büchi (Modell Büchi 510) nach der Methode von Tottoli gemessen.

### *Weitere verwendete Geräte*

Zum Evaporieren von Lösungen empfindlicher Substanzen: SpeedVac Savant SC110

Zum Lyophilisieren von Lösungen empfindlicher Substanzen: Lyopille Christ LDC-1

Zur Einstellung des pH-Wertes von Pufferlösungen: pH-Meter Knick 761 Calimatic

## **12.1.2 Eingesetzte Pufferlösungen**

### *Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB)*

Vorschrift zur Herstellung eines 2 M TEAB-Puffers, pH 7,5:

556 ml Triethylamin wurden mit 1444 ml demin. Wasser gemischt. Unter starkem Rühren und Kühlung mit Eis-Salz-Gemisch wurde CO<sub>2</sub> eingeleitet. War die Homogenität des Gemisches erreicht, wurde der pH-Wert überprüft und so lange weiter CO<sub>2</sub> zugeleitet bis ein pH von 7,5 erreicht war. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Frisch angesetzter Puffer kann nicht für die Aufreinigung mittels FPLC verwendet werden, da er auf der Säule ausgasen würde und somit die Trennungseigenschaften stark beeinflussen würde. Zwei Tage nach Einleiten des Kohlendioxids kann der Puffer verwendet werden.

### *Pyrophosphat-Reaktionslösung*

Vorschrift zur Herstellung einer 0,5 M Stammlösung in *N, N*-Dimethylformamid:

100 g Ionenaustauscher (Dowex 50x8, Korngröße 200-400, H<sup>+</sup>) wurden in eine Säule ohne Fritte gefüllt und mit demin. Wasser gespült bis das Eluat pH-neutral war. Der Auslauf wurde hierbei mit Glaswolle so verstopft, dass das Lösungsmittel durchsickern

konnte, der Ionenaustausche jedoch in der Säule verweilte. 8,92 g (20 mmol) Natrium-pyrophosphat-Decahydrat wurden in 200 ml Wasser gelöst, auf die Säule aufgetragen und mit ca. 300 ml Wasser gewaschen, bis das Eluat pH 5 aufwies. Das Eluat tropfte dabei direkt in eine eisgekühlte Lösung aus 9,54 ml (40 mmol) Tributylamin in 80 ml Ethanol. Die Lösung trübte sich zunächst milchig, klarte aber mit zunehmender Elutionsdauer auf. Das Ethanol/H<sub>2</sub>O-Gemisch wurde am mit flüssigem Stickstoff gekühlten Rotationsverdampfer im Ölpumpenvakuum abgezogen. Das resultierende gelbe Öl wurde noch zweimal mit Ethanol coevaporiert und anschließend in 100 ml abs. *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Dieses wurde zunächst nochmals am N<sub>2</sub>-Rotationsverdampfer evaporiert. Die Apparatur wurde mit Argon geflutet und das resultierende Öl wurde erneut in 40 ml abs. *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen. Die Lösung wurde über Molekularsieb (4Å) bei 4°C gelagert.

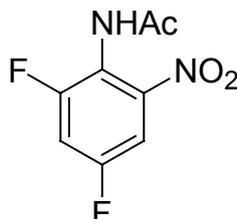
*Vorschrift zur Herstellung der Pyrophosphat-Reaktionslösung:*

Die Lösung muss direkt vor der Zugabe zum Reaktionsgemisch der Triphosphatsynthese (siehe Kapitel 12.2) angesetzt werden. 1,5 ml der 0,5 M Bis-(tri-*N*-butylammonium)pyrophosphat-Lösung in *N,N*-Dimethylformamid wurden mit 0,5 ml Tributylammonium versetzt und intensiv geschüttelt. Die benötigte Menge des Gemisches wurde mit einer Spritze entnommen und in die Reaktionslösung injiziert, da die Phasentrennung innerhalb weniger Minuten vonstatten geht.

## 12.2 Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen

### Übersicht

- Darstellung des 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosids **8** und der entsprechenden Phosphoramidite **63** und **65**.....208
- Darstellung des 2'-Aminoethyl modifizierten 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosids und des entsprechenden Phosphoramidits **92**.....226
- Darstellung des 2,4-Difluorbenzol-Nucleosids **9** und der entsprechenden Phosphoramidite **64** und **66**.....245
- Darstellung des 2'-Aminoethyl modifizierten 2,4-Difluorbenzol-Nucleosids und des entsprechenden Phosphoramidits **95**.....261
- Darstellung des 4,6-Difluorbenzimidazol- und des 2,4-Difluorbenzol-5'-Triphosphats **96** und **97**.....276

**2,4-Difluor-6-nitroacetanilid 32**

$C_8H_6F_2N_2O_3$  [216,14 g/mol]

11,62g 2,4-Difluoracetanilid **31** (67,9mmol) wurden in 13ml konzentrierter  $H_2SO_4$  und 4,4ml konz. Essigsäure suspendiert. Zu der braunen, zähflüssigen Suspension wurde unter Eisbadkühlung 8,8ml Nitriersäure (konz. Schwefelsäure/konz. Salpetersäure 1:1) so langsam zugetropft, dass die Reaktionstemperatur stets unter  $40^\circ C$  lag. Nach 60 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch auf 100g Eis gegossen, wobei ein gelber Feststoff ausfiel. Nach weiteren 30 Minuten Rühren wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Die Umkristallisation aus Ethanol lieferte das reine Produkt **32** als gelben Feststoff.

Ausbeute: 11,74g (54,3mmol; 80%)

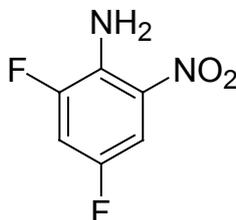
$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (250MHz, Aceton- $d_6$ )  
9.33 (b s, 1H, NH), 7.69 (m, 1H, H5), 7.56 (dt, 1H, J = 8.3 Hz, H3), 2.04 (s, 3H,  $CH_3$ )

$^{13}C$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $CDCl_3$ )  
168.0 (CO), 159.5 (dd,  $C_F$ ), 156.0 (dd,  $C_F$ ), 110.1 (t, C3), 108.2 (dd, C5), 23.2 ( $CH_3$ )

FT-IR (KBr): [ $cm^{-1}$ ] 1120,4 (C-F), 1548,6 ( $NO_2$ ), 1677,8 (CO)

Schmelzpunkt:  $125^\circ C$

ESI(+)-MS: m/z 233,9 ( $[M+NH_4]^+$ )

**2,4-Difluor-6-nitroanilin 33**

$C_6H_4F_2N_2O_2$  [174,10 g/mol]

21,2 g 2,4-Difluor-6-nitroacetanilid **32** (98mmol) werden unter Rühren und Eisbadkühlung in 20ml konz. Schwefelsäure gelöst. Die braune, zähflüssige Lösung wird zwei Stunden bei 95°C gerührt und anschließend auf 300g Eis gegossen. Es bildet sich ein gelber Niederschlag. Zur vollständigen Auskristallisation des Produktes 2,4-Difluor-6-nitroanilin **33** wird die Suspension weitere 45 Minuten unter Eisbadkühlung gerührt. Nach Filtration und Waschen mit Eiswasser wird der Feststoff getrocknet und aus H<sub>2</sub>O/Ethanol 20:3 umkristallisiert.

Ausbeute: 13,2g (76mmol, 78%)

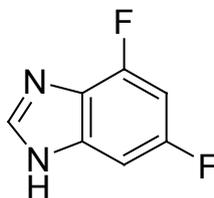
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (250MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)  
7.65 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, H5), 7.42 (dt, 1H, J = 8.1 Hz, H3), 6.83 (b s, 2H, NH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
153.2, 149.3 (dd, J = 44.8 Hz, J = 38.8 Hz, C2, C4), 132.33 (C6), 110.03 (m, J = 28.0 Hz, C3), 106.90, 106.47 (C1, C5)

FT-IR: [cm<sup>-1</sup>] 1260,3 (C-F), 1538,9 (NO<sub>2</sub>), 3419,2 (NH<sub>2</sub>)

Schmelzpunkt: 85°C (UK aus H<sub>2</sub>O/Ethanol 20:3)

ESI(-)-MS: m/z 173,0 ([M-H])

**4,6-Difluorbenzimidazol 35**

$C_7H_4F_2N_2$  [154,11 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenckkolben unter Schutzgas durchgeführt. 13g des gelben Feststoffes 2,4-Difluor-6-nitroanilin **33** (74,8mmol) wurden in Ethanol p.a. gelöst. Unter Argon-Gegenstrom wurden 1,12g Platin(IV)dioxid (5mmol) zugegeben. Nach Evakuieren der Apparatur wurde mit  $H_2$  geflutet und 3 Std. bei Raumtemperatur unter  $H_2$ -Atmosphäre gerührt. Nach Entfärbung der gelben Lösung wurde der Katalysator sorgfältig über Celite<sup>®</sup> Filter Gel abgesaugt. Nach Waschen des Filterkuchens mit Ethanol wurde dieses im Membranpumpenvakuum evaporiert. Die ölige Flüssigkeit wurde aufgrund ihrer Luftempfindlichkeit sofort in 650ml Ameisensäure aufgenommen und eine Stunde refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der leicht cremefarbene Feststoff wurde aufgrund seiner Reinheit und seiner schlechten Löslichkeit direkt im nächsten Schritt zum Nucleosid umgesetzt. Ein Teil des Produktes wurde zur Analyse sublimiert und als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 11,4g (73,9mmol; 99%)

DC:  $R_f = 0,3$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1)

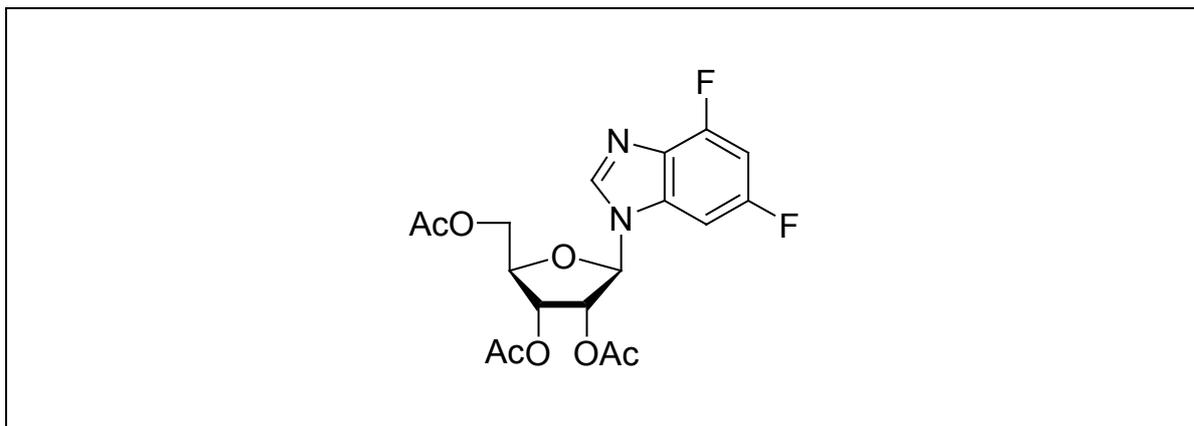
$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $DMSO-d_6$ )  
12.84 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H2), 7.25 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz, H7), 7.04 (dt, 1H,  $J = 10.8$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, H5)

$^{13}C$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $DMSO-d_6$ )  
159.3 (d, C4), 155.5 (d, C6), 143.4 (C2), 135.7 (C9), 127.5 (C8), 97.3 (t, C5), 94.2 (C7)

Schmelzpunkt: 231°C

ESI(+)-MS:  $m/z$  154,6 ( $[M+H]^+$ )

**2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **39****



$C_{18}H_{18}F_2N_2O_7$  [412,34 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenckkolben unter Schutzgas gemäß der Glycosilierungsprozedur nach Vorbrüggen durchgeführt (Vorbrüggen, 1981a). 11,54g gut getrocknetes 4,6-Difluorbenzimidazol **35** (75mmol) wurden in 255ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 27,5ml *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (112,4mmol) versetzt. Die bräunliche Suspension wird 15 Minuten Rückfluss gekocht, wobei das Edukt durch die Silylierung vollständig in Lösung geht. Die klare Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden 23,88g 1,2,3,5-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranose (75mmol, in 130ml abs. Acetonitril gelöst) und 13,5ml Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) zugetropft. Nach 3 Stunden Rückfluss kochen wurde die Reaktion durch Zugabe von wässr. ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $CH_2Cl_2$ /Methanol 95:5. Das gewünschte N1-Isomer (*fast*-Isomer) **39** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 25,2g (61,1mmol; 81%)

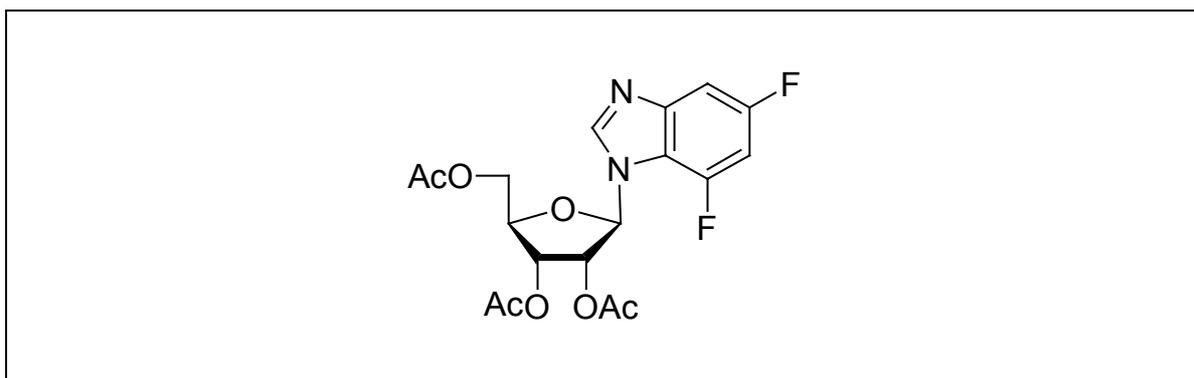
DC:  $R_f = 0.64$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95:5)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
8.57 (s, 1H, H2), 7.57 (dd, 1H,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ ,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ , H7), 7.19 (dt, 1H,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , H5), 6.33 (d, 1H,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ , H1'), 5.64 (t, 1H,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , 2'H), 5.43 (m, 1H, 3'H), 4.40 (m, 3H, H4', H5', H5''), 2.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
170.9, 170.4, 170.1 (CO), 160.5 (d, C4), 158.1 (d, C6), 144.5 (C2), 135.6 (C9), 129.7 (C8), 99.2 (t, C5), 96.1 (d, C7), 87.3 (C1'), 80.4 (C4'), 72.6 (C2'), 70.3 (C3'), 63.8 (C5'), 21.3, 21.2, 21.0 ( $\text{CH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  413,2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-3-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 38**



$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_7$  [412,34 g/mol]

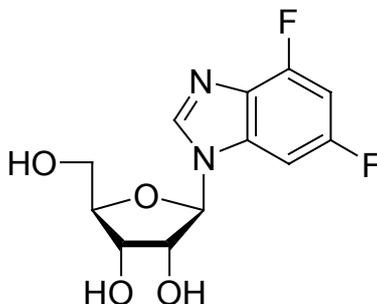
2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-3-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **38** wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **39** erhalten.

Ausbeute: 1,61g (3,9mmol; 5%)

DC:  $R_f = 0,63$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
8.57 (s, 1H, H2), 7.57 (dd, 1H, J = 8.9 Hz, J = 1.9 Hz, H7), 7.20 (dt, 1H, J = 10.7 Hz, H5), 6.33 (d, 1H, J = 6.21 Hz, H1'), 5.63 (t, 1H, J = 6.3 Hz, 2'H), 5.42 (q, 1H, J = 6.4 Hz, J = 4.3 Hz, 3'H), 4.38 (m, 3H, H4', H5', H5'), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

### 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8**



C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [286,23 g/mol]

#### Variante A:

16,22g 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **39** (39,3mmol) wurden in 97ml abs. Methanol gelöst. Nach Zugabe von 0,71ml Natriummethanolat-Lösung (5,4M in MeOH) wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe mehrerer Spatelspitzen eines schwach sauren Ionenaustauschers (Dowex 50wx8, Korngröße 200) wurde die Reaktionslösung neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Filtrat wurde sofort am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte durch Umkristallisation aus H<sub>2</sub>O. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

*Variante B:*

1,73g 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **39** (4,2mmol) wurden in 300ml mit NH<sub>3</sub> gesättigtem Methanol gelöst, welches durch Einleiten von Ammoniakgas bei -20°C hergestellt wurde. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Evaporieren des Lösungsmittels im Membranpumpenvakuum wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1) aufgereinigt und das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: *Variante A* 9,4g (32,8mmol; 83%)  
*Variante B* 0,76g (2,7mmol; 63%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1)

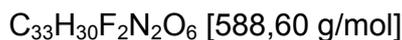
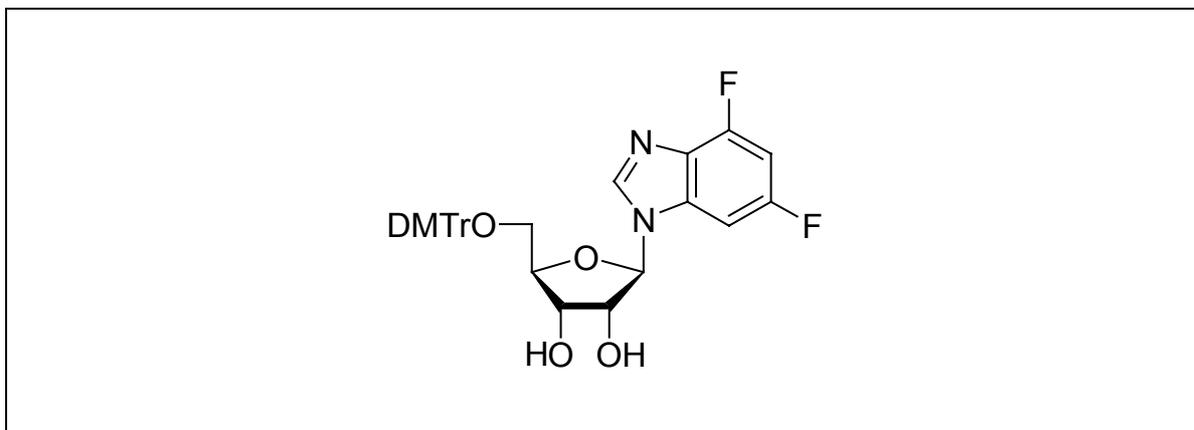
<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
8.51 (s, 1H, H2), 7.66 (dd, 1H, J = 6.1 Hz, H7), 7.15 (dt, 1H, J = 10.6 Hz, H5), 5.86 (d, 1H, J = 6.4 Hz, H1'), 5.49 (d, 1H, J = 6.5 Hz, 2'OH), 5.21 (m, 2H, 3'OH, 5'OH), 4.33 (q, 1H, J = 6.6 Hz, 2'H), 4.11 (q, 1H, 3'H), 3.99 (m, 1H, H4'), 3.66 (m, 2H, H5', H5'')

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
156.1 (d, C4), 150.4 (d, C6), 145.7 (C2), 134.9 (d, C9), 129.0 (C8), 97.6 (t, C5), 95.6 (d, C7), 89.1 (C1'), 85.8 (C4'), 73.6 (C2'), 70.0 (C3'), 61.1 (C5')

ESI(-)-MS: m/z 285,1 ([M-H])

EA: (ber.) C: 50,35%, H: 4,23%, N: 9,79%  
(exp.) C: 50,2%, H: 4,24%, N: 10,04%

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **48****



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenckkolben unter Schutzgas durchgeführt. 2g 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** (6,98mmol) wurden in 43ml abs. Pyridin (544mmol) gelöst. Nach Zugabe von 3,3ml Triethylamin (23,5mmol) und 3,08g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (9,08mmol) wurde die Reaktionslösung 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Methanol gestoppt. Nach Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer und Coevaporation mit Toluol wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit wässr. ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2). Das Produkt 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **48** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

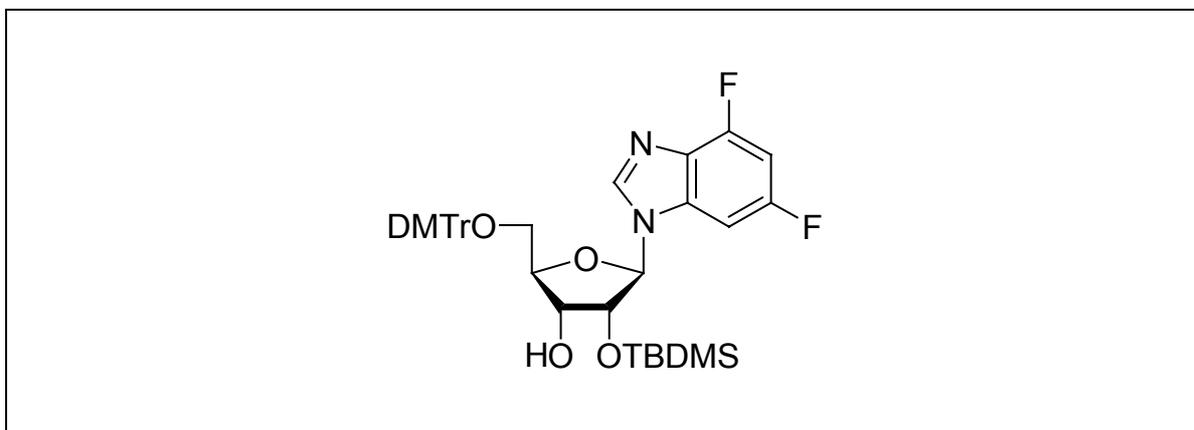
Ausbeute: 3,63g (6,2mmol; 89%)  
DC:  $R_f = 0,5$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz, DMSO- $d_6$ )  
 8.42 (s, 1H, H2), 7.46 (dd, 1H,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ , H7), 7.41-7.31 (m, 9H,  $H_{\text{arom.}}$ ),  
 7.14 (m, 1H, H5), 5.92 (d, 1H,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ , H1'), 5.66 (d, 1H,  $J = 5.9 \text{ Hz}$ ,  
 2'OH), 5.27 (d, 1H,  $J = 5.6 \text{ Hz}$ , 3'OH), 4.48 (q, 1H,  $J = 5.6 \text{ Hz}$ , 2'H), 4.20  
 (q, 1H,  $J = 5.2 \text{ Hz}$ , 3'H), 4.11 (q, 1H, 4'H), 3.72 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.22 (m,  
 2H, H5', H5'')

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO- $d_6$ )  
 158.6 (d, C4), 158.5 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 151.9 (d, C6), 150.1 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 145.2 (C2),  
 143.5 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 135.7 (d, C9), 130.1 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.2 (C8), 128.1, 124.3  
 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 113.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 98.3 (t, C5), 95.5 (d, C7), 89.6 (C1'), 86.1 (C4'),  
 84.0 (C2'), 73.7 (C3'), 70.4 (C5'), 55.4 (OCH<sub>3</sub>)

ESI(+)-MS:  $m/z$  589,2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-  
 1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 50**



$\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$  [702,86 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenckkolben unter Schutzgas und Lichtausschluss durchgeführt. 1g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **48** ( 1,7mmol) wurde in 16ml eines 1:1-Gemisches aus abs. Tetrahydrofuran / abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 0,34g Silbernitrat (2mmol) und 2,44ml *tert.*-Butyltrimethylsilylchlorid-Lösung (1M in THF) wird

die Suspension 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von wässr. ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. gestoppt. Nach Abtrennung des entstandenen Silberchlorids mittels Filtration wird mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Coevaporation mit Toluol zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte zunächst durch Säulenchromatographie ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/i$ -Propanol 99:1). Die Trennung des 2'-substituierten Isomers vom 3'-substituierten Nebenprodukt erfolgte über präp. HPLC (*MN Nucleoprep 100-20* von Machery-Nagel, *n*-Hexan/Isopropylacetat 3:2). Das gewünschte 2'-silylierte Produkt (*slow*-Isomer) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 462mg (0,66mmol; 39%)

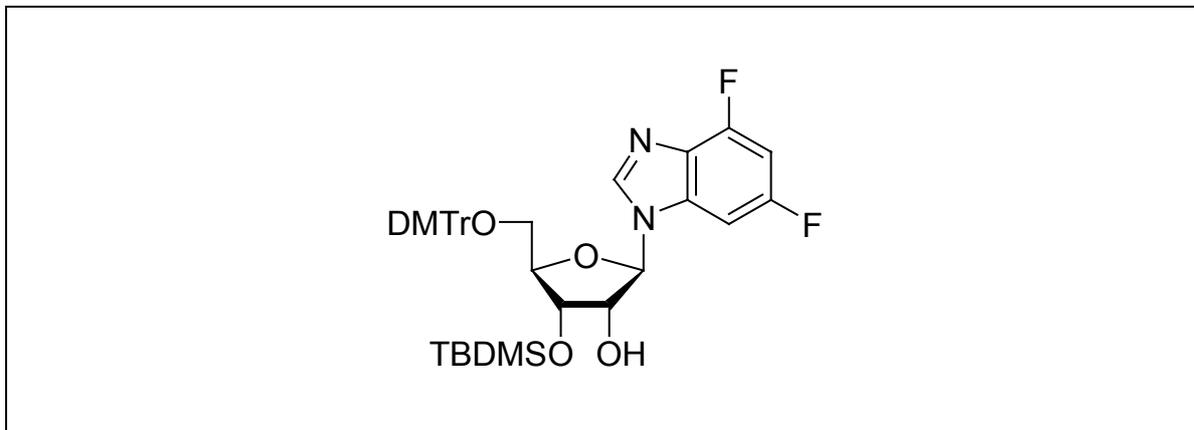
DC:  $R_f = 0,35$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/i$ -Propanol 99:1)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
8.56 (s, 1H, H2), 7.56 (dd, 1H,  $J = 6.5 \text{ Hz}$ , H7), 7.46 (m, 2H,  $H_{arom}$ ), 7.34 (d, 7H,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ), 7.2 (dt, 1H,  $J = 10.5 \text{ Hz}$ , H5), 6.95 (d, 4H,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ), 6.05 (d, 1H,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , H1'), 5.34 (d, 1H,  $J = 5.4 \text{ Hz}$ , 3'OH), 4.67 (t, 1H,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ , H2'), 4.25 (m, 2H, H3', H4'), 3.82 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.41 (m, 1H, H5'), 3.34 (dd, 1H, H5''), 0.81 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.00 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ), -0.15 (s, 3H, ,  $\text{SiCH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
158.7 ( $C_{arom.}$ ), 144.2 ( $C_{arom.}$ ), 141.3 (C2), 135.3 ( $C_{arom.}$ ), 130.1 (d, C9), 128.1 ( $C_{arom.}$ ), 127.9 (C8), 127.1 ( $C_{arom.}$ ), 113.3 ( $C_{arom.}$ ), 90.6 (C1'), 86.9 ( $C_{arom.}$ ), 84.6 (C4'), 74.6 (C2'), 71.8 (C3'), 62.6 (C5'), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 25.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.0 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), -5.0 ( $\text{SiCH}_3$ ), -5.1 ( $\text{SiCH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  703,6 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 51**



$C_{39}H_{44}F_2N_2O_6Si$  [702,86 g/mol]

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **51** entstand als zweites Hauptprodukt (*fast*-Isomer) bei der Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **50**.

Ausbeute: 560mg (0,8mmol; 47%)

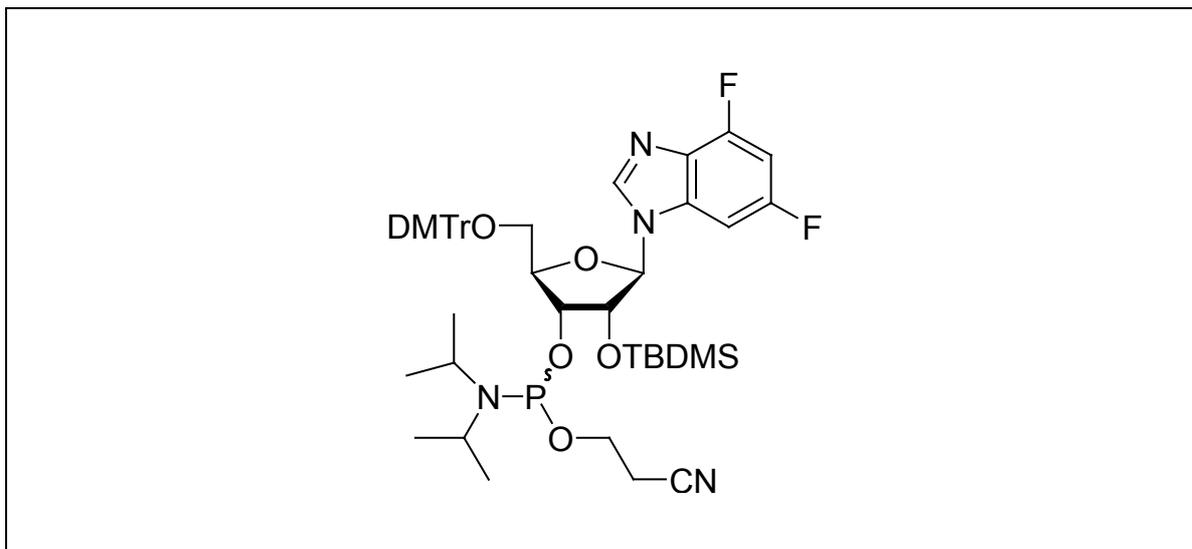
DC:  $R_f = 0,35$  ( $CH_2Cl_2/i$ -Propanol 99:1)

$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz, DMSO- $d_6$ )  
 8.47 (s, 1H, H2), 7.48 (dd, 1H,  $J = 6.5$  Hz, H7), 7.36-7.21 (m, 9H,  $H_{arom}$ ),  
 7.13 (dt, 1H,  $J = 2.2$  Hz,  $J = 8.5$  Hz, H5), 6.83 (d, 4H,  $J = 8.9$  Hz,  $H_{arom}$ ),  
 5.91 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz, H1'), 5.53 (d, 1H,  $J = 6.2$  Hz, 2'OH), 4.50 (q, 1H,  
 $J = 5.7$  Hz, H2'), 4.32 (t, 1H,  $J = 5.0$  Hz, H3'), 4.07 (m, 1H, H4'), 3.72 (s,  
 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.24 (m, 2H, H5', H5''), 0.81 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.06 (s, 3H,  
 SiCH<sub>3</sub>), 0.00 (s, 3H, , SiCH<sub>3</sub>)

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO- $d_6$ )  
 158.1 (d, C4), 157.1 ( $C_{arom.}$ ), 151.4 (dd, C6), 144.5 ( $C_{arom.}$ ), 143.3 (C2),  
 135.2 ( $C_{arom.}$ ), 134.9 (d, C9), 129.6 ( $C_{arom.}$ ), 129.1 (C8), 128.9, 128.0,  
 127.8, 127.6, 126.7 ( $C_{arom.}$ ), 113.1 ( $C_{arom.}$ ), 97.9 ( $\Psi t$ ,  $J = 7.1 \text{ Hz C5}$ ), 95.4  
 (d,  $J = 24.4 \text{ Hz, C7}$ ), 89.1 (C1'), 85.9 ( $C_{arom.}$ ), 84.0 (C4'), 72.7 (C2'),  
 71.6 (C3'), 62.7 (C5'), 55.0 (OCH<sub>3</sub>), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.34  
 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.52 (SiCH<sub>3</sub>), -5.17 (SiCH<sub>3</sub>)

ESI(+)-MS:  $m/z$  703,3 ( $[M+H]^+$ )

**3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenyl-  
 methyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-  
 benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 63**



$\text{C}_{48}\text{H}_{61}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{PSi}$  [902,40 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 0,14g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **50** (0,2mmol) in 7ml abs. Acetonitril wurden 266 $\mu$ l sym. Collidin (2mmol) und 8,4 $\mu$ l 1-Methylimidazol (0,1mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und 67 $\mu$ l 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit (0,3mmol; 1,5eq) wurden langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 25 Minuten bei 0°C gerührt und

durch Zugabe von ges. wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie (pDC) am Chromatotron mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$  99:1. Das Produkt **63** (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 162mg (0,18mmol; 89%)

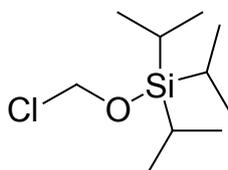
DC:  $R_f = 0,65$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99:1)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
8.07 (s, 1H, H2), 7.41 (m, 1H, H7), 7.32-7.181 (m, 9H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.15 (m, 1H, H5), 6.81 (m, 4H,  $H_{\text{arom}}$ ), 5.77 (d, 1H,  $J = 5.9$  Hz, H1'), 5.65 (m, 1H, H2'), 5.55 (m, 1H, H3'), 4.30 (m, 1H, H4'), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.60 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}-$ ), 3.45 (m, 2H, H5', H5''), 2.80, 2.56 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 1.24 (m, 14H, 2 *i*Pr), 0.73 (m, 9H,  $\text{SiCH}_3$ )

$^{31}\text{P-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
153.30, 150.01; Verhältnis 1:3,7

ESI(+)-MS:  $m/z$  903.8 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

### Triisopropylsilyloxymethylchlorid 58



$\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{ClOSi}$  [222,83 g/mol]

Eine Suspension von 4,5g *para*-Formaldehyd (150mmol) in 11,1ml Ethanthiol (150mmol) wird mit 3 Tropfen einer 10N Natriumhydroxid-Lösung versetzt und 5 Min.

bei Raumtemperatur gerührt bis eine klare gelbliche Lösung entsteht. Anschließend wird die Reaktionslösung eine Stunde bei 50°C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zugabe von 75ml abs. Dichlormethan, 20,4g Imidazol (300mmol) und 29ml Triisopropylchlorsilan (135mmol) wird die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mit 600ml n-Hexan verdünnt und mit 375ml 2N NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lsg. gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mehrfach extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das farblose Öl wurde in 375ml abs. Dichlormethan aufgenommen und mit 10ml SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt. Die Lösung färbt sich dabei orange und wird nach einer Stunde Rühren bei RT am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das resultierende gelbe Öl wird im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert (Kopftemperatur: 55°C). Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 20,57g (92,3mmol; 68%)

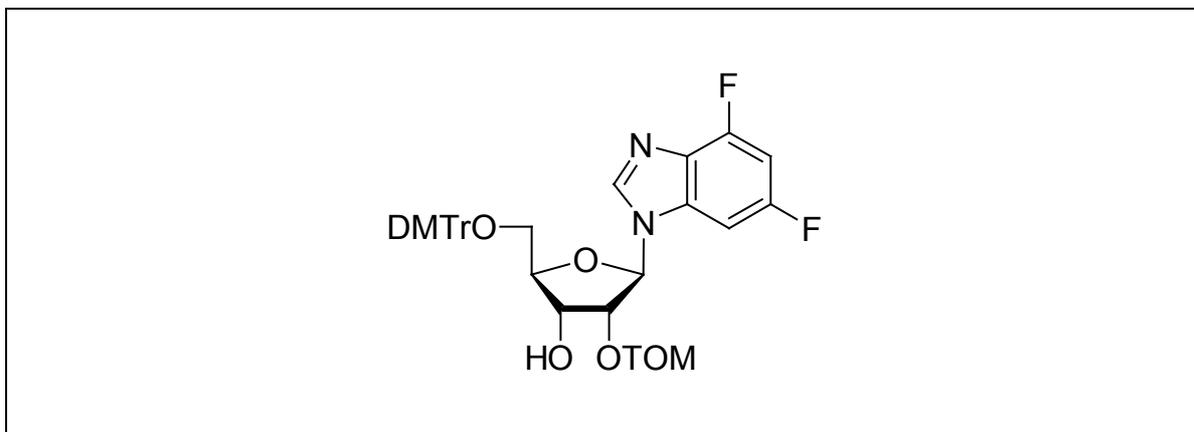
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (250MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
5.58 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-), 1.04 (m, 21H, CH<sub>3</sub>), Si(CH(CH<sub>3</sub>))

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (63MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
76.1 (-OCH<sub>2</sub>-), 17.5 (CH<sub>3</sub>), 11.7 (Si(CH(CH<sub>3</sub>)))

<sup>29</sup>Si-NMR: δ [ppm] (50MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
19.96 (-OSi(*iso*-Propyl)<sub>3</sub>)

n<sub>d</sub><sup>20</sup>: 1,46068 (Literaturwert: 1,46368)

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose 59**



$C_{43}H_{52}F_2N_2O_7Si$  [774,35 g/mol]

0,5g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **48** (0,85mmol) wurden in 8,5ml Dichlorethan gelöst und mit 1,5ml Diisopropylethylamin (8,8mmol, DIPEA) versetzt, wobei sich die zuvor gelbliche Lösung rot färbte. Nach Zugabe von 0,65g Dibutylzinndichlorid (2,2mmol) und zehn Minuten Rühren bei Raumtemperatur entfärbte sich die Lösung wieder. Anschließend wurden 0,5g Triisopropylsilyloxymethylchlorid **58** (2,3mmol; 2,5eq) zugetropft und weitere 3 Stunden bei 50°C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wurde die Reaktion durch Zugabe von wässr. ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. gestoppt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte zunächst durch Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2). Die Trennung des 2'-substituierten Isomers vom 3'-substituierten Nebenprodukt erfolgte über präp. HPLC (*MN Nucleoprep 50-10* von Machery-Nagel, [*n*-Hexan/Methylacetat 97:3]/ $CH_2Cl_2$  7:3). Das gewünschte 2'-silylierte Produkt (*fast*-Isomer) **59** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 110mg (0,14mmol; 17%)

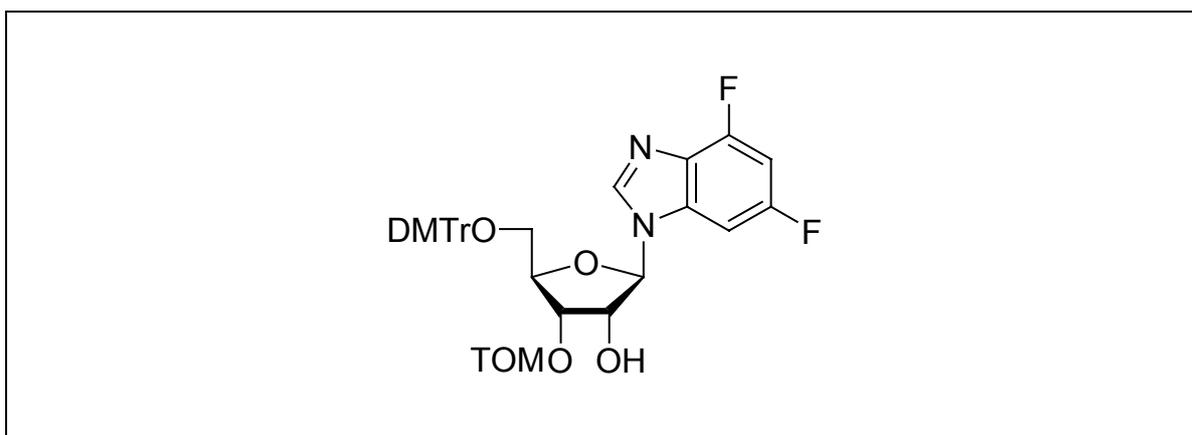
DC:  $R_f = 0,31$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz, DMSO- $d_6$ )  
 8.43 (s, 1H, H2), 7.38 (m, 1H, H7), 7.25 (m, 9H,  $H_{arom}$ ), 7.12 (dt, 1H,  $J = 10.5$  Hz, H5), 6.09 (d, 1H,  $J = 6.0$  Hz, H1'), 5.31 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz, 3'OH), 4.94 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.65 (t, 1H,  $J = 5.7$  Hz, H2'), 4.35 (q, 1H,  $J = 4.5$  Hz, H3'), 4.13 (m, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.26 (m, 2H, H5', H5''), 0.83 (m, 21H, *i*-Propyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO- $d_6$ )  
 158.0 (d, C4), 157.5 ( $C_{arom.}$ ), 153.0 (dd, C6), 144.6 ( $C_{arom.}$ ), 143.3 (C2), 135.2 ( $C_{arom.}$ ), 135.0 (d, C9), 129.6 ( $C_{arom.}$ ), 129.2 (C8), 129.0, 128.3, 127.8, 127.6, 126.7 ( $C_{arom.}$ ), 113.1 ( $C_{arom.}$ ), 97.9 (C5), 95.1 (d,  $J = 27.2$  Hz, C7), 88.43 (C1'), 87.3 ( $C_{arom.}$ ), 85.7 ( $C_{arom.}$ ), 84.1 (C4'), 77.0 (C2'), 68.3 (C3'), 63.3 (C5'), 54.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 17.4 ( $\text{SiCHCH}_3$ ), 11.1 ( $\text{SiCHCH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  775,7 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **61****



$\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}$  [774,35 g/mol]

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **61** entstand als Nebenprodukt (*slow*-Isomer) bei der Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-

triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **59** und wurde als weißer Schaum erhalten.

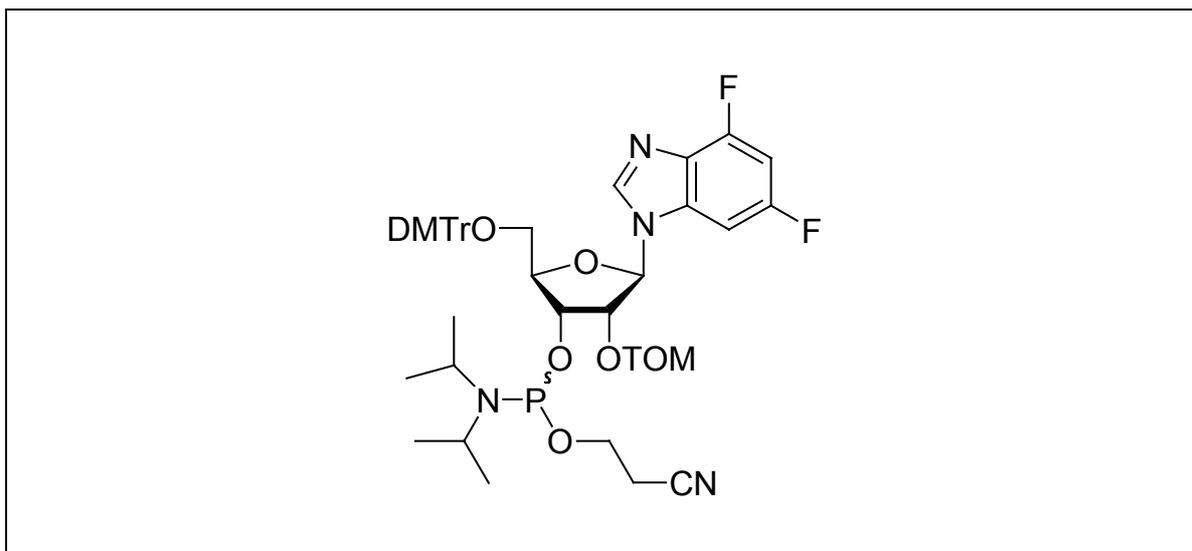
Ausbeute: 80mg (0,1mmol; 12%)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz, DMSO- $d_6$ )  
8.42 (s, 1H, H2), 7.48 (dd, 1H,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ , H7), 7.37-7.20 (m, 9H,  $H_{\text{arom}}$ ),  
7.14 (dt, 1H,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ ,  $J = 2.5 \text{ Hz}$ , H5), 6.81 (d, 4H,  $J = 6.0 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{arom}}$ ),  
5.94 (d, 1H,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , H1'), 5.70 (d, 1H,  $J = 6.2 \text{ Hz}$ , 2'OH), 4.99 (m,  
3H, H3', CH<sub>2</sub>), 4.68 (q, 1H,  $J = 5.2 \text{ Hz}$ , H2'), 4.30 (m, 3H, H4', H5',  
H5'), 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 0.95 (m, 21H, *i*-Propyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO- $d_6$ )  
158.0 (d, C4), 152.0 (dd, C6), 144.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 143.2 (C2), 135.2 ( $C_{\text{arom.}}$ ),  
135.1 (d, C9), 129.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.3 (C8), 127.7, 127.5, 126.6, 123.4  
( $C_{\text{arom.}}$ ), 113.0 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 88.8 (C1'), 85.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 82.2 (C4'), 74.4 (C2'),  
72.2 (C3'), 54.9 (OCH<sub>3</sub>), 17.6 (SiCHCH<sub>3</sub>), 11.3 (SiCHCH<sub>3</sub>)

ESI(+)-MS:  $m/z$  775,3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose 65**



$C_{52}H_{69}F_2N_4O_8PSi$  [975,18 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 80mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **59** (0,1 mmol) in 8,8ml abs. Acetonitril wurden 266μl sym. Collidin (0,75mmol) und 3,5μl 1-Methylimidazol (0,04mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und 28μl 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit (0,13mmol; 1,3eq) wurden langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 25 Minuten bei 0°C gerührt und durch Zugabe von ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie (pDC) am Chromatotron mit dem Elutionsmittel  $CH_2Cl_2$ /Methanol 99:1. Das Produkt **65** (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

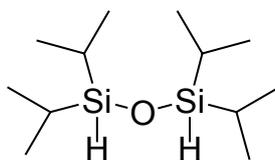
Ausbeute: 68mg (0,07mmol; 70%)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 8.13 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.43-7.19 (m, 10H, H<sub>5</sub>, H<sub>arom</sub>), 7.15 (m, 1H, H<sub>7</sub>), 6.74 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.01 (d, 1H, J = 6.2 Hz, H<sub>1'</sub>), 5.21 (m, 1H, H<sub>2'</sub>), 4.97 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 4.71-4.50 (m, 2H, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, ), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.63-3.36 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN-, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>), 2.61 (t, 1H, J = 4.0 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 1.26 (m, 14H, (iPr)<sub>2</sub>N), 0.92 (m, 21H, 2 (iPr)<sub>3</sub>Si)

$^{31}\text{P-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (162MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 152.38, 151.56; Verhältnis 1:2,2

ESI(+)-MS: m/z 974,4 ([M+H]<sup>+</sup>)

### 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan 70



$\text{C}_{12}\text{H}_{30}\text{OSi}_2$  [246,18 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 19,5g Magnesiumspäne (0,8mol) wurden mit 100ml abs. Diethylether überschichtet. Langsam wurden 78ml 2-Brompropan (0,8mol) in 150ml Diethylether dazugetropft. Nach Anspringen der Grignard-Reaktion (Bläschenbildung) und vorsichtiger Zugabe der restlichen Isopropylbromid-Lsg. wurde die Suspension 45 Minuten Rückfluss gekocht. Anschließend wurden 28ml Trichlorsilan (0,28mol in 350ml Diethylether) zugetropft und weitere vier Stunden refluxiert. Im Laufe der Reaktion entsteht ein weißer Niederschlag. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurden 300ml 10%ige Salzsäure zugegeben, wobei sich der Niederschlag komplett auflöst. Nach Waschen der etherhaltigen Phase und Extraktion der wässr. Phase mit Dichlormethan werden die vereinigten org. Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der ölige Rückstand wird 2½ Stunden bei 100°C über

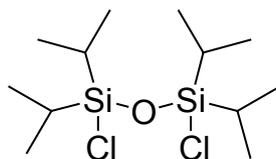
Molsieb gerührt und anschließend im Membranpumpenvakuum fraktioniert destilliert (105°C, 25mbar). Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 31g (0,12mol, 85%)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
4.22 (s, 2H, Si-H), 1.11 (m, 28H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$ )

$^{29}\text{Si-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
5.42 (s, SiH/Pr)

### 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **71**



$\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{OSi}_2$  [314,11 g/mol]

#### *Herstellung der $\text{Cl}_2$ -gesättigten $\text{CCl}_4$ -Lösung:*

Aus einer  $\text{Cl}_2$ -Gasflasche wurde das Chlor zur Trocknung zunächst durch eine mit konz. Schwefelsäure gefüllte Waschflasche geleitet und anschließend unter Rühren 30 Min. in 400ml Tetrachlorkohlenstoff geleitet. Die zuvor farblose Flüssigkeit färbte sich gelb. Überschüssiges Chlor wurde mit ges. Natriumhydroxid-Lsg. vernichtet.

#### *Chlorierung von 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxans:*

31g 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan **70** (0,12mol) wurden vorgelegt und  $\text{Cl}_2$ -gesättigte  $\text{CCl}_4$ -Lsg. wurde so lange zugetropft, bis die entstandene Gelbfärbung der Lösung nicht mehr verschwand (ca. 250ml). Nach Entfernen des Tetrachlorkohlenstoffs am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert (104°C). 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **71** wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 30,48g (96mmol; 81%)

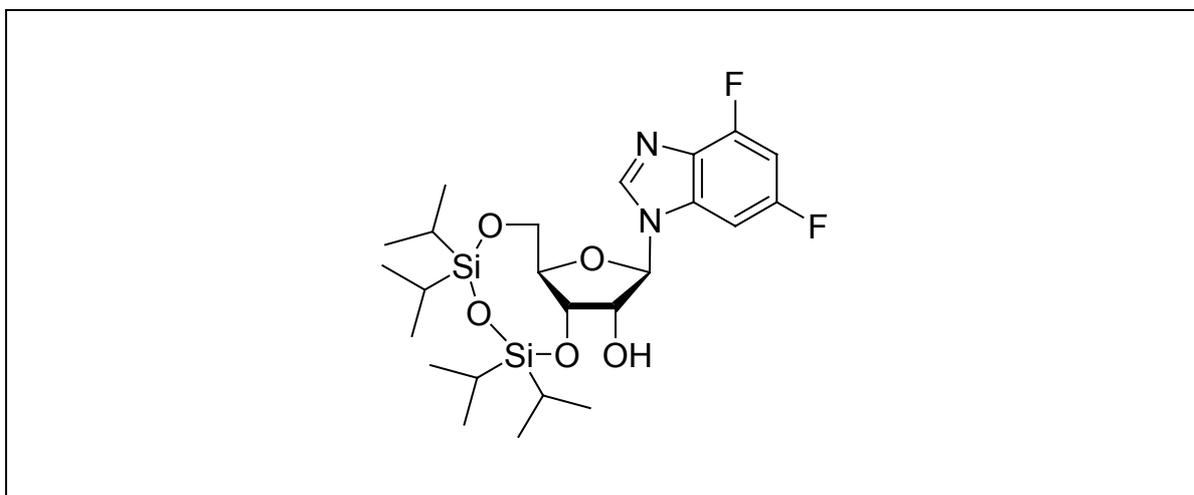
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
1.11 (m, 28H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
16.58 ( $\text{SiCHCH}_3$ ), 15.54 ( $\text{SiCHCH}_3$ )

$^{29}\text{Si-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
7.59 (s,  $\text{SiH/Pr}$ )

ESI(-)-MS: m/z 313,0 (M-H)

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 72**



$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}_2$  [528,74 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 4,1g 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** (14,3mmol) wurden in 42,6ml abs. Pyridin gelöst. 5g 1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxandichlorid **71** (15,7mmol, 1,1eq) wurden langsam in die Lösung getropft. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt; es bildete sich ein weißer Niederschlag aus. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Wasser gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

wurden mit Wasser gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$  95:5. Das Produkt **72** wurde als leicht gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 6,9g (13,2mmol; 92%)

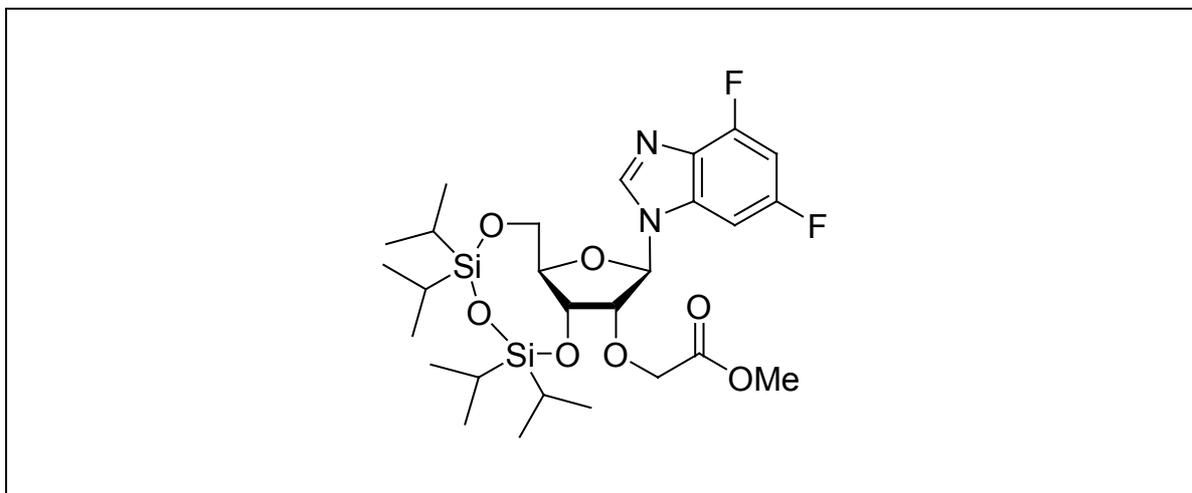
DC:  $R_f = 0,37$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
8.35 (s, 1H, H2), 7.41 (dd, 1H,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 8.8 \text{ Hz}$ , H7), 7.12 (dt, 1H,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 10.7 \text{ Hz}$ , H5), 5.91 (d, 1H,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ , H1'), 5.74 (d, 1H,  $J = 4.7 \text{ Hz}$ , 2'-OH), 4.34 (q, 1H,  $J = 2.7 \text{ Hz}$ ,  $J = 8.0 \text{ Hz}$ , H2'), 2.26 (t, 1H, H3'), 4.14 (m, 1H, H5'), 4.05 (m, 1H, H4'), 3.93 (m, 1H, H5''), 1.30-0.91 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si-*i*Pr)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
158.00 (dd,  $C_F$ ), 157.00 (dd,  $C_F$ ), 149.54 ( $C_2$ ), 134.53 ( $C_{arom}$ ), 129.01 ( $C_{arom}$ ), 97.91 (t,  $J = 22 \text{ Hz}$ ,  $C_5$ ), 94.78 (dd,  $J = 4 \text{ Hz}$ ,  $J = 28 \text{ Hz}$ ,  $C_7$ ), 90.24 ( $C_1'$ ), 81.46 ( $C_2'$ ), 73.37 ( $C_4'$ ), 69.18 ( $C_3'$ ), 60.53 ( $C_5'$ ), 17.03 (SiCH $\text{CH}_3$ ), 12.32 (SiCH $\text{CH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  529,3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(methoxycarbonylmethyl)-β-D-ribofuranose 74**



$C_{27}H_{42}F_2N_2O_7Si_2$  [600,25 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 10g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **72** (18,9mmol) in 100ml abs. Tetrahydrofuran werden 0,59g Natriumhydrid (25,4mmol, 1,3eq) zugegeben. Nach langsamer Zugabe von 5,14ml Bromessigsäuremethylester (55,9mmol, 3eq) wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt. Nach ca. drei Stunden wurden weitere 0,7eq. NaH und 1,5eq. Bromessigsäuremethylester zugegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in eine ges. NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und im Membranpumpenvakuum evaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $CH_2Cl_2$ /Methanol 98:2.

Ausbeute: 6,7g (11,1mmol; 59%)

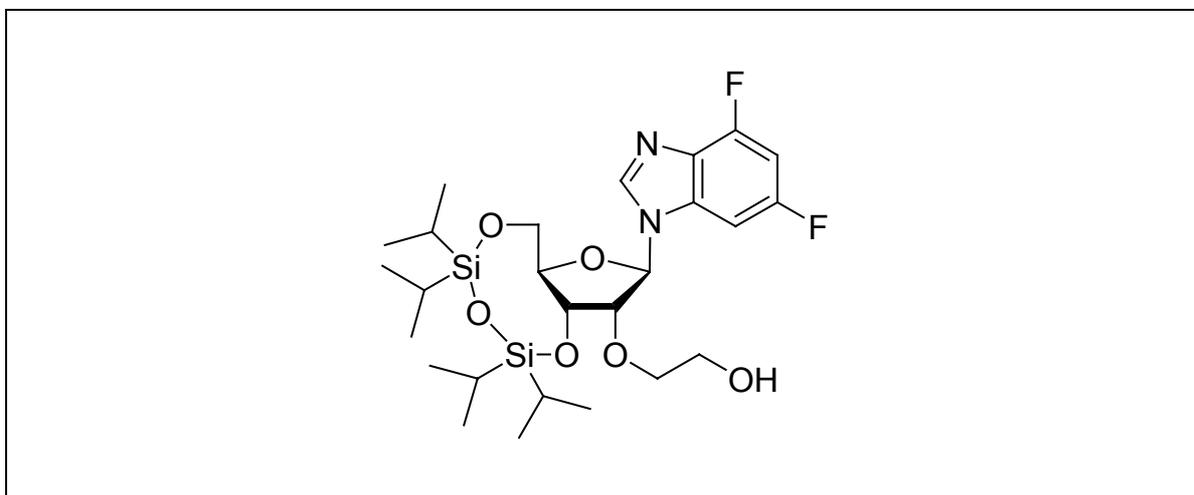
DC:  $R_f = 0,4$  ( $CH_2Cl_2$ /MeOH 98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz, DMSO- $d_6$ )  
 8.38 (s, 1H, H2), 7.45 (d, 1H,  $J = 1.9 \text{ Hz}$ , H7), 7.17 (t, 1H,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , H5), 6.12 (s, 1H, H1'), 4.59-4.46 (m, 3H, H2', H3',  $-\text{CH}_2-$ ), 4.39 (m, 1H,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.14 (m, 1H H5'), 4.05 (m, 1H, H4'), 3.95 (m, 1H, H5'), 3.60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.12-0,92 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si- $i\text{Pr}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 170.7 (CO), 161.3 (dd,  $J = 239 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 155.2 (dd,  $J = 242 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 141.0 ( $\text{C}_2$ ), 134.2 ( $\text{C}_{arom}$ ), 129.2 ( $\text{C}_{arom}$ ), 98.4 (t,  $J = 22 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_5$ ), 97.9 ( $\text{C}_7$ ), 93.7, 90.7 ( $\text{C}_\alpha$ ,  $\text{C}_1'$ ), 74.8, 69.9, 60.5 ( $\text{C}_2'$ ,  $\text{C}_3'$ ,  $\text{C}_5'$ ), 51.6 ( $\text{C}_4'$ ), 17.1 (SiCH $\text{CH}_3$ ), 13.5, 13.4, 13.3, 13.2 (SiCH $\text{CH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  601,5 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 76**



$\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}_2$  [572,25 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 6,68g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(methoxycarbonylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **74** (11,1mmol) wurden in 200ml THF/Methanol-Lösung (8:2) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 1,94g Lithiumborhydrid (89,4mmol, 8eq) wurde die Reaktionslösung 40

Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch die vorsichtige Zugabe von ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$  98:2. Das Produkt **76** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6,22g (10,9mmol; 98%)

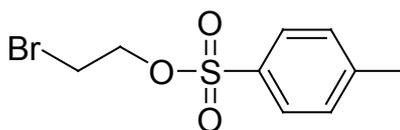
DC:  $R_f = 0,15$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
8.26 (s, 1H, H2), 6.95 (dd, 1H,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ ,  $J = 8.0 \text{ Hz}$ , H7), 6.83 (dt, 1H,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ ,  $J = 10.1 \text{ Hz}$ , H5), 5.91 (s, 1H, H1'), 4.55 (m, 1H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.30 (d, 1H,  $J = 13.4 \text{ Hz}$ ,  $-\beta\text{CH}_2-$ ), 4.20 (d, 1H,  $J = 9.3 \text{ Hz}$ ,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.06 (d, 1H,  $J = 10.9 \text{ Hz}$ ,  $-\beta\text{CH}_2-$ ), 3.95 (m, 3H, H2', H3', H4'), 3.81 (m, 2H, H5', H5''), 2.60 (b s, 1H, OH), 1.18-0,98 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si-*i*Pr)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
158.17 (dd,  $\text{C}_F$ ), 153.40 (dd,  $\text{C}_F$ ), 143.09 ( $\text{C}_2$ ), 135.39 ( $\text{C}_{arom}$ ), 129.83 ( $\text{C}_{arom}$ ), 98.76 (t,  $J = 28 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_5$ ), 95.35 (dd,  $J = 5 \text{ Hz}$ ,  $J = 28 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_7$ ), 89.60 ( $\text{C}_1'$ ), 82.16 ( $\text{C}_\alpha$ ), 73.81 ( $\text{C}_\beta$ ), 70.62 ( $\text{C}_2'$ ), 61.34 ( $\text{C}_4'$ ), 61.04 ( $\text{C}_5'$ ), 17.94 (SiCH $\text{CH}_3$ ), 13.02 (SiCH $\text{CH}_3$ )

ESI(-)-MS:  $m/z$  571,6 ([M-H])

### 2-Bromethyl-*para*-toluolsulfonsäureester 84



$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrO}_3\text{S}$  [279,15 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 32,4g *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (0,17mol) wurden in 22,5ml abs. Pyridin gelöst und 30 Minuten bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von 17,7g 2-Bromethanol (0,14mol) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 10 Minuten war die Bildung eines weißen Niederschlags zu beobachten. Das Reaktionsgemisch wurde weiter bei Raumtemperatur gerührt und durch die Zugabe von ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Methanol 98:2.

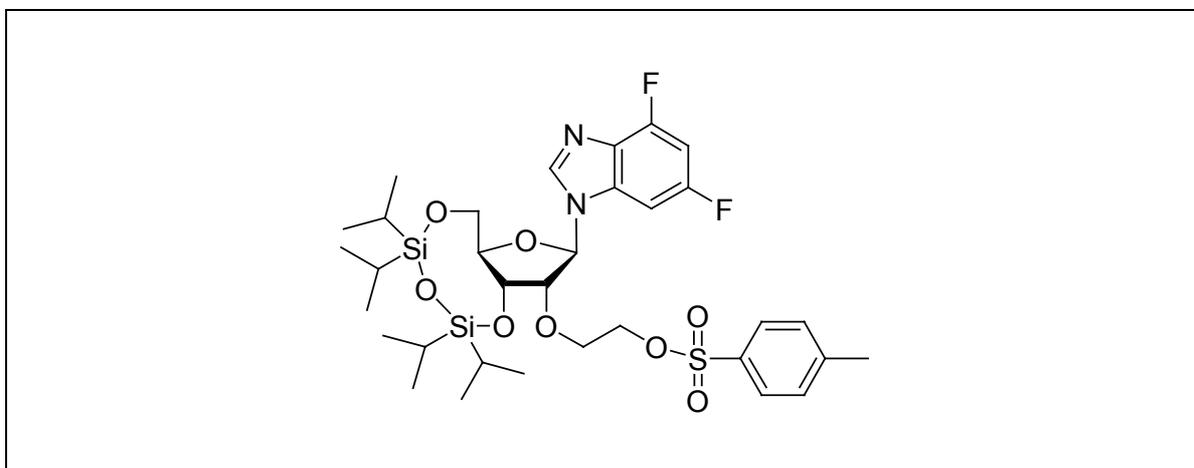
Ausbeute: 7,81g (28mmol; 20%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,85 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2)

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (250MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
7.78 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7.34 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 4.26 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.45 (t, 2H, J = 5.6 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

ESI(-)-MS: m/z 297,8 ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>)

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-[β-(para-toluolsulfonsäure)ethyl]-β-D-ribofuranose 78**



C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub> [726,98 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 6,22g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O- $\beta$ -hydroxyethyl- $\beta$ -D-ribofuranose **76** (10,9mmol) wurden in 240ml abs. Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 1,35g *N,N*-Dimethylaminopyridin (1,05mmol), 5ml Triethylamin und 6,53g *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (34,3mmol) wurde das Reaktionsgemisch 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die leicht gelbliche Lösung orange färbte. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Methanol 99:1. Das Produkt **78** wurde als hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 6,82g (9,4mmol; 86%)

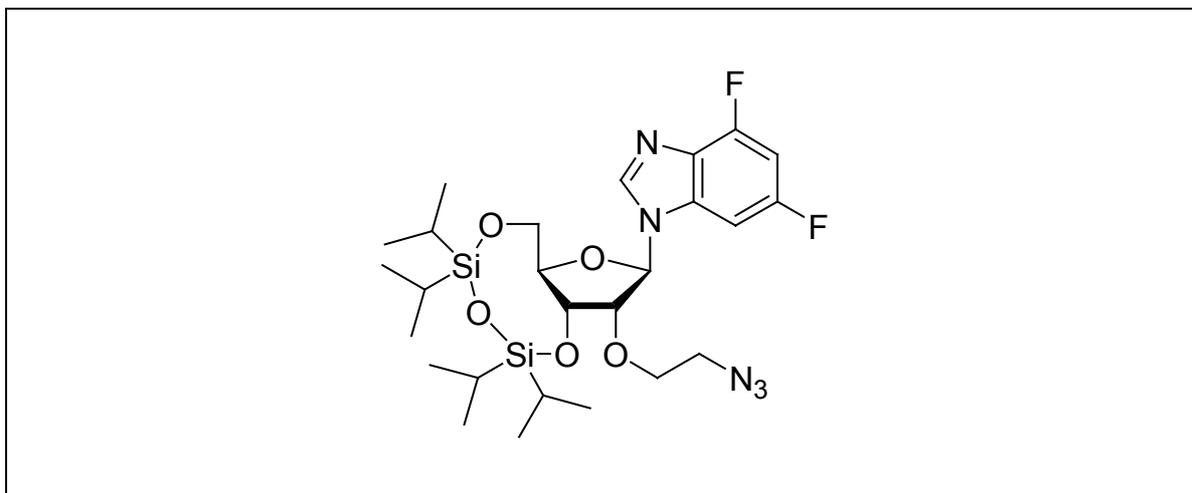
DC: R<sub>f</sub> = 0,7 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
8.18 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.90 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H<sub>tos</sub>), 7.30 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H<sub>tos</sub>), 6.87 (dd, 1H, J = 1.4 Hz, J = 2.2 Hz, H<sub>7</sub>), 6.80 (dt, 1H, J = 2.2 Hz, J = 10.1 Hz, H<sub>5</sub>), 5.74 (s, 1H, H<sub>1'</sub>), 4.45 (m, 1H, - $\alpha$ CH<sub>2</sub>-), 4.28 (m, 4H, - $\alpha$ CH<sub>2</sub>-, 2- $\beta$ CH<sub>2</sub>-, H<sub>2'</sub>), 4.05 (m, 2H, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>), 3.84 (m, 2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.09-0.94 (m, 28H, Si-CH<sub>3</sub>, Si-*i*Pr)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
159.55 (dd, J = 243 Hz, J = 17 Hz, C<sub>F</sub>), 153.51 (dd, J = 243 Hz, J = 23 Hz, C<sub>F</sub>), 144.95 (C<sub>tos</sub>), 140.79 (C<sub>2</sub>), 134.06 (C<sub>arom</sub>), 130.18 (C<sub>arom</sub>), 129.82 (C<sub>tos</sub>), 128.56 (C<sub>tos</sub>), 98.67 (t, J = 22 Hz, C<sub>5</sub>), 93.12 (dd, J = 23 Hz, J = 28 Hz, C<sub>7</sub>), 89.72 (C<sub>1'</sub>), 82.09 (C $\alpha$ ), 81.21 (C $\beta$ ), 70.15, 70.08, 69.47 (C<sub>2'</sub>, C<sub>3'</sub>, C<sub>4'</sub>), 59.38 (C<sub>5'</sub>), 21.56 (C<sub>tos</sub>), 17.21 (SiCHCH<sub>3</sub>), 12.90 (SiCHCH<sub>3</sub>)

ESI(+)-MS: m/z 741,4 ([M+2Li]<sup>+</sup>)

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -azidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 80**



Zu einer Lösung von 6,8g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-[ $\beta$ -(*para*-toluolsulfonsäure)ethyl]- $\beta$ -D-ribofuranose **78** (9,38mmol) in 20ml *N,N*-Dimethylformamid wurden 1,44g Natriumazid gegeben. Die Reaktionslösung wurde zunächst 4 Stunden bei 55°C und anschließend ü.N. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde direkt im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde ein Teil des Produktes durch Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2$ /Methanol 97:3) aufgereinigt.

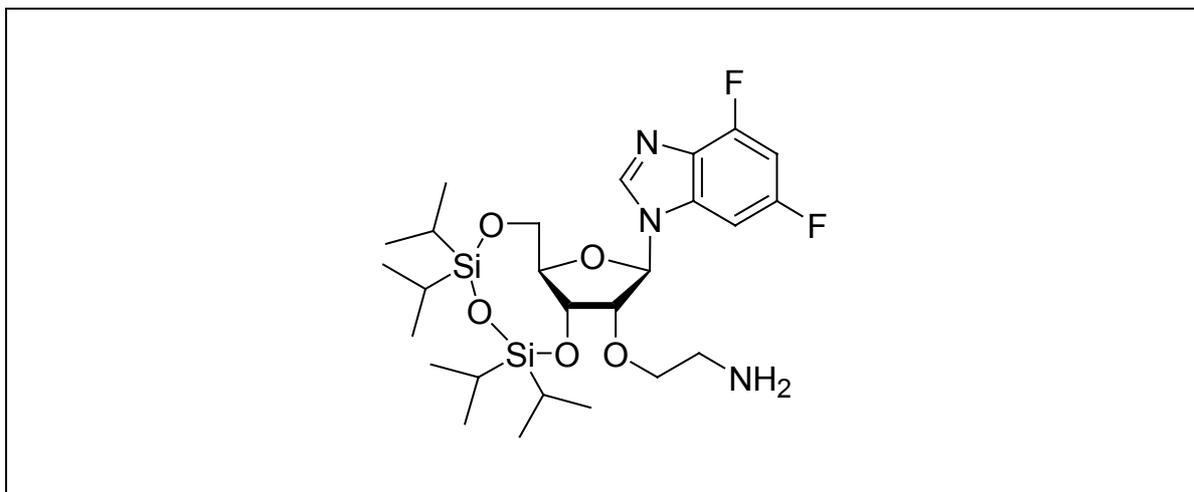
DC:  $R_f = 0,52$  ( $CH_2Cl_2$ /MeOH 97:3)

$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $CDCl_3$ )  
 8.44 (s, 1H, H2), 7.05 (dd, 1H,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 7.9$  Hz, H7), 6.89 (dt, 1H,  $J = 2.1$  Hz,  $J = 9.9$  Hz, H5), 5.92 (s, 1H, H1'), 4.53 (m, 1H,  $-\alpha CH_2-$ ), 4.29 (m, 2H, H2',  $-CH_2-$ ), 4.21 (m, 1H,  $-CH_2-$ ), 4.05 (m, 1H,  $-CH_2-$ ), 3.96 (m, 1H, H3'), 3.80 (m, 1H, H4'), 3.53 (m, 1H, H5'), 3.49 (m, 1H, H5''), 1.11-0.94 (m, 28H, Si- $CH_3$ , Si-*i*Pr)

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 159.99 (dd,  $J = 243 \text{ Hz}$ ,  $J = 11 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 154.00 (dd,  $\text{C}_F$ ), 141.36 ( $\text{C}_2$ ),  
 129.05 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 126.04 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 98.68 (t,  $J = 22 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_5$ ), 93.32 (d,  $\text{C}_7$ ),  
 89.90 ( $\text{C}1'$ ), 83.05 ( $\text{C}\alpha$ ), 81.25 ( $\text{C}2'$ ), 71.10, 70.08, 59.32 ( $\text{C}3'$ ,  $\text{C}4'$ ,  
 $\text{C}5'$ ), 50.81 ( $\text{C}\beta$ ), 16.77 ( $\text{SiCHCH}_3$ ), 12.73 ( $\text{SiCHCH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  598,3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -aminoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **82****



$\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_2$  [571,80 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -azidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **80** wurde in 50ml einer 1:1-Mischung aus abs. THF und abs. Methanol gelöst. Nach Zugabe von einer Spatelspitze des Hydrierungskatalysators Pd/C wurde der Kolben mit Wasserstoff geflutet und die Reaktionslösung vier Stunden bei Raumtemperatur unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt und die Lösungsmittel wurden im Membranpumpenvakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Methanol 9:1. Das Produkt **82** wurde als hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,39g (4,2mmol; 45% über 2 Reaktionsschritte)

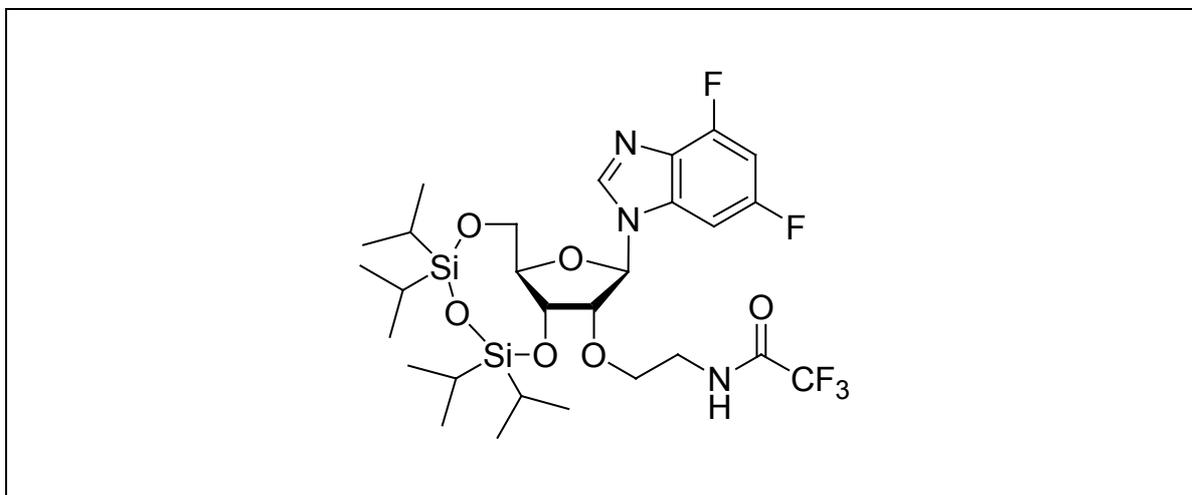
DC:  $R_f = 0,25$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

8.25 (s, 1H, H2), 6.93 (dd, 1H,  $J = 6.5 \text{ Hz}$ ,  $J = 8.1 \text{ Hz}$ , H7), 6.68 (dt, 1H,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ ,  $J = 10.2 \text{ Hz}$ , H5), 5.90 (s, 1H, H1'), 4.46 (m, 1H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.19 (m, 1H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.07 (m, 1H, H2'), 3.98 (m, 2H, H3', H4'), 3.87 (m, 1H, H5'), 3.72 (m, 1H, H5''), 2.97 (m, 2H,  $-\beta\text{CH}_2-$ ), 2.90 (bs, 2H,  $-\text{NH}_2-$ ), 1.05-0.92 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si- $i\text{Pr}$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  572,5 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamido-ethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 89**



$\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}_2$  [667,81 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 2g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -aminoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **82** (3,5mmol) wurden in 40ml abs. Pyridin gelöst und auf 0°C abgekühlt. 0,6ml Trifluoressigsäureanhydrid (4,2mmol) wurden langsam zur Reaktionslösung getropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels

im Membranpumpenvakuum und unter Coevaporation mit Toluol wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit einem Gradienten aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5. Das Produkt **89** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,6g (2,4mmol; 69%)

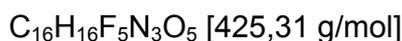
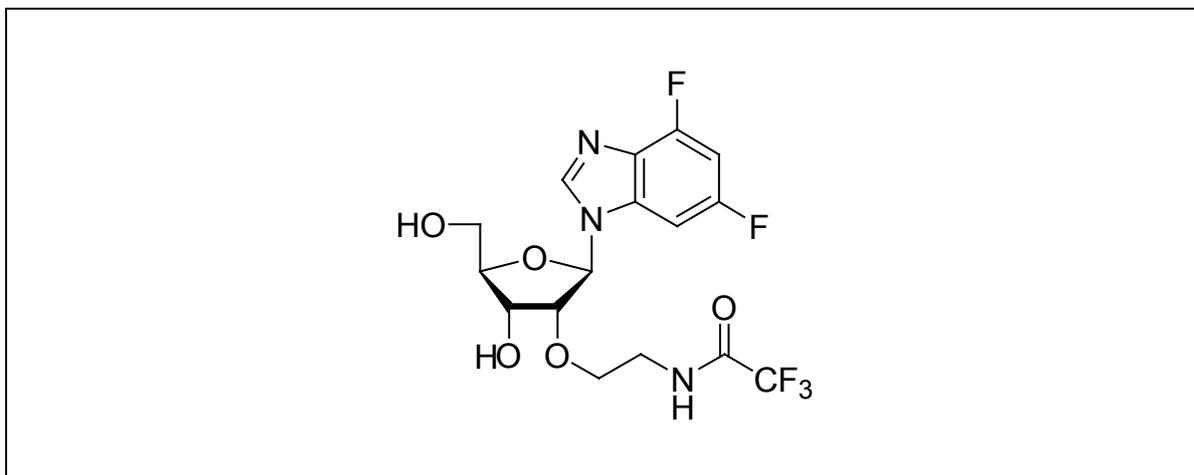
DC: R<sub>f</sub> = 0,8 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5)

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
8.41 (s, 1H, H2), 7.09 (*b* s, 1H, NH), 6.93 (dd, 1H, J = 6.1 Hz, J = 7.9 Hz, H7), 6.84 (dt, 1H, J = 2.1 Hz, J = 10.0 Hz, H5), 5.88 (s, 1H, H1'), 4.55 (m, 1H, -αCH<sub>2</sub>-), 4.29 (m, 1H, -αCH<sub>2</sub>-), 4.13-4.03 (m, 3H, H2', H3', H4'), 3.88 (m, 2H, H5', H5''), 3.65 (m, 2H, -βCH<sub>2</sub>-), 1.13-0.94 (m, 28H, Si-CH<sub>3</sub>, Si-*i*Pr)

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
158.36 (dd, C<sub>F</sub>), 157.47 (CO), 157.10 (CF<sub>3</sub>), 154.85 (dd, C<sub>F</sub>), 140.94 (C2), 131.00 (C<sub>arom</sub>), 115.84 (C<sub>arom</sub>), 98.96 (t, J = 29 Hz, C5), 93.1 (d, J = 27 Hz, C7), 89.73 (C1'), 82.65, 81.57 (C2', C3'), 69.79 (Cα), 69.38 (C5'), 59.36 (C4'), 40.02 (Cβ), 17.10 (SiCHCH<sub>3</sub>), 12.96 (SiCHCH<sub>3</sub>)

ESI(+)-MS: m/z 668,5 ([M+H]<sup>+</sup>)

**1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamido-ethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **90****



1,6g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamido-ethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **89** (2,4mmol) wurden in 100ml abs. THF gelöst. Zu der gelblichen Lösung wurden langsam 0,42ml Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (0,42mmol; 2,1eq; 1M in THF) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 5 Min. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Membranpumpenvakuum eingengt. Der ölige Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2  $\rightarrow$   $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1) aufgereinigt. Das Produkt **90** wurde als weißer Schaum erhalten.

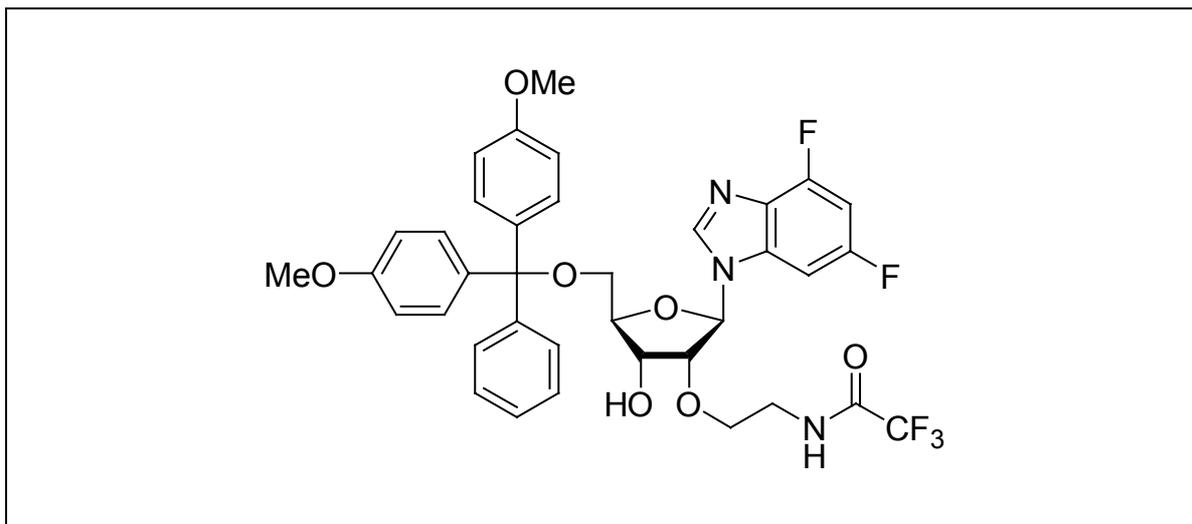
Ausbeute: 1,31g (3,1mmol; 88%)

DC:  $R_f = 0,25$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1)

$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $CDCl_3$ )  
 8.60 (s, 1H, H2), 8.08 (t, 1H, NH), 7.01 (dd, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H7), 6.75 (dt, 1H,  $J = 2.0$  Hz,  $J = 9.9$  Hz, H5), 5.87 (d, 1H,  $J = 4.1$  Hz, H1'), 4.58 (t, 1H,  $J = 5.0$  Hz, 5'-OH), 4.16 (m, 2H, 3'-OH,  $-\alpha CH_2-$ ), 3.90 (m, 2H, H2',  $-\alpha CH_2-$ ), 3.50 (m, 2H, H3', H4'), 3.18 (m, 2H, H5', H5''), 2.91 (m, 2H,  $-\beta CH_2-$ )

ESI(-)-MS:  $m/z$  424,1 ([M-H])

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamido-ethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **91****



$C_{37}H_{34}F_5N_3O_7$  [727,67 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,3g 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **90** (3,1mmol) wurden in 20ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 0,7ml Triethylamin (47,3 mmol) und 1,21g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (3,8mmol; 1,2eq) wurde die Reaktionslösung 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von wenigen Millilitern Methanol gestoppt. Nach Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer und Coevaporation mit Toluol wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2) aufgereinigt. Das Produkt **91** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,48g (2,03mmol; 66%)

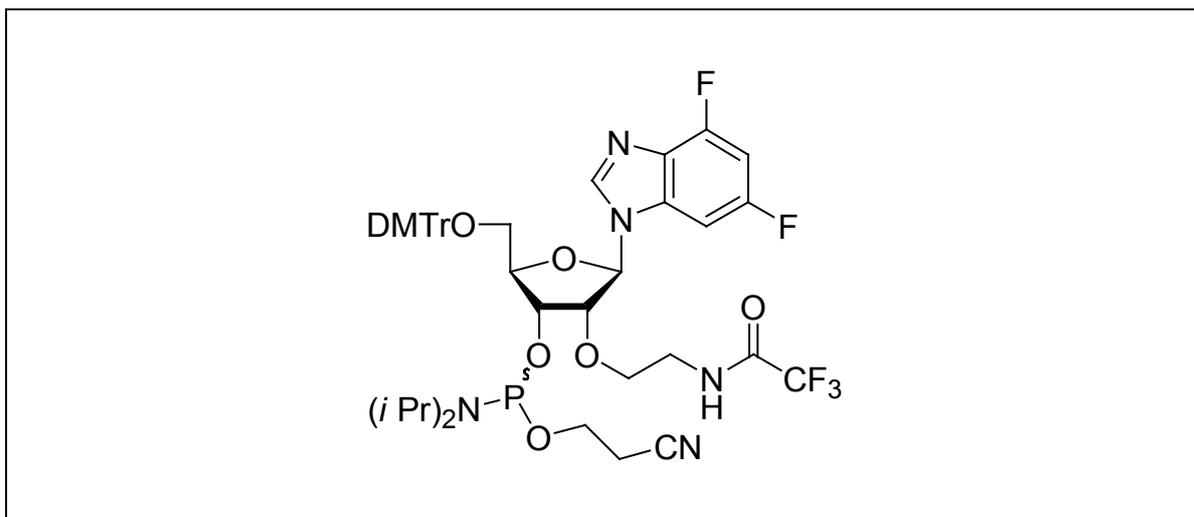
DC:  $R_f = 0,29$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  95:5)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
8.29 (t, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, H2), 7.44-7.19 (m, 10H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.08 (dd, 1H,  $J = 6.1 \text{ Hz}$ ,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , H7), 6.86-6.79 (m, 4H, H5,  $H_{\text{arom}}$ ), 5.93 (d, 1H,  $J = 5.6 \text{ Hz}$ , H1'), 4.53 (m, 1H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.33 (m, 2H, H2',  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.72 (m, 1H, H3'), 3.59 (m, 1H, H3'), 3.48 (m, 4H, H5', H5'', 2- $\beta\text{CH}_2-$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
158.90 ( $C_F$ ), 158.57 (CO), 158.52 ( $\text{CF}_3$ ), 157.00 (dd,  $C_F$ ), 141.23 (C2), 129.92, 129.08, 127.95, 127.89, 127.74, 127.72, 126.99 126.95( $C_{\text{arom}}$ ), 123.94 ( $C_{\text{arom}}$ ), 113.18, 113.06 ( $C_{\text{arom}}$ ), 98.92 (C5), 94.50 (C7), 88.12 (C1'), 84.64, 82.30 (C2', C3'), 69.71 (C4'), 68.75 ( $C_\alpha$ ), 63.04 ( $C_\beta$ ), 55.16 ( $\text{OCH}_3$ ), 40.02 (C5')

ESI(-)-MS:  $m/z$  726,8 ([M-H])

**3'-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamido-ethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 92**



$\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{F}_5\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$  [927,89 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 0,8g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -N-trifluoracetamido-ethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **91** (1,1mmol) in 45ml abs. Acetonitril wurden 1,4ml sym. Collidin (10,7mmol) und 45 $\mu$ l 1-Methylimidazol (0,56mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und 0,41ml 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit (1,84mmol; 1,74eq) wurden langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0°C gerührt und durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie am Chromatotron mit dem Elutionsmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Methanol 98:2. Das Produkt **92** wurde als Diastereomeregemisch als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,76g (0,82mmol; 75%)

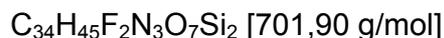
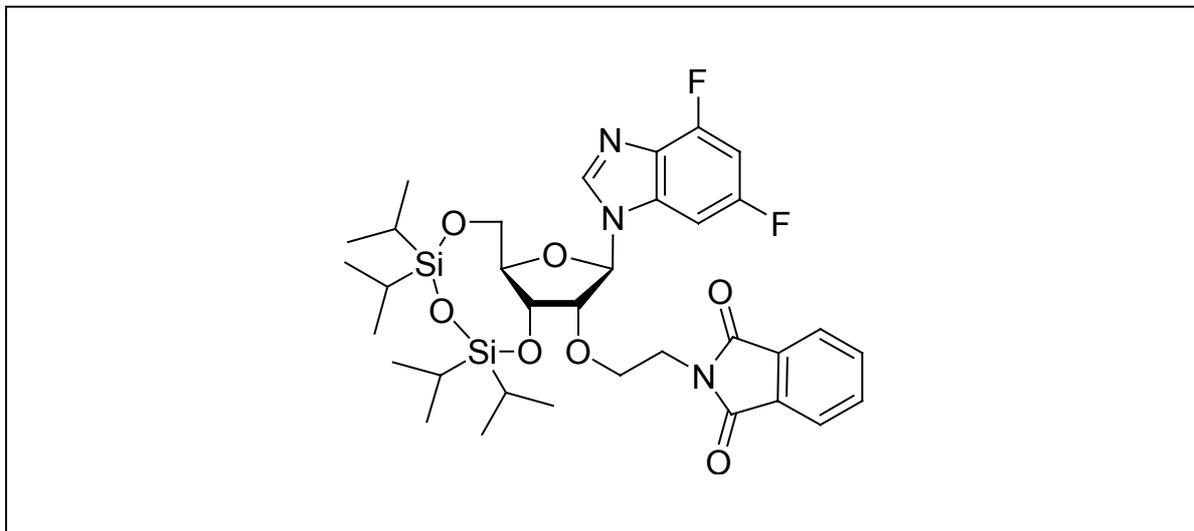
DC: R<sub>f</sub> = 0,45 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
8.05 (s, 1H, H2), 7.75 (bs, 1H, NH), 7.39-7.21 (m, 7H, H<sub>arom</sub>), 7.06 (m, 1H, H7), 6.87-6.76 (m, 7H, H5, H<sub>arom</sub>), 5.93 (d, 1H, J = 6.6 Hz, H1'), 4.38-4.12 (m, 4H, H2', H4', 2- $\alpha$ CH<sub>2</sub>-), 3.88 (t, 1H, J = 6.2 Hz, H3'), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.70 (m, 1H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN-), 3.63-3.37 (m, 6H, H5', H5'', 2- $\beta$ CH<sub>2</sub>-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), (t, 1H, J = 6.3 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 1.32-1.18 (m, 14H, 2 iPr)

<sup>31</sup>P-NMR:  $\delta$  [ppm] (161MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
138.73, 138.38; Verhältnis 1:1,4

ESI(+)-MS: m/z 928,5 ([M+H]<sup>+</sup>)

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **88****



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,14g des primären Alkohols 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **76** (1,99mmol) wurden in 60ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und 0,29g Phthalimid (1,99mmol) sowie 0,78g Triphenylphosphin (2,99mmol; 1,5eq) wurden zugegeben. 0,31ml Diethylazodicarboxylat (2,99mmol; 1,5 eq) wurden langsam zu der Reaktionslösung getropft. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2/MeOH$  95:5). Das Produkt **88** wurde als hell gelber Schaum erhalten.

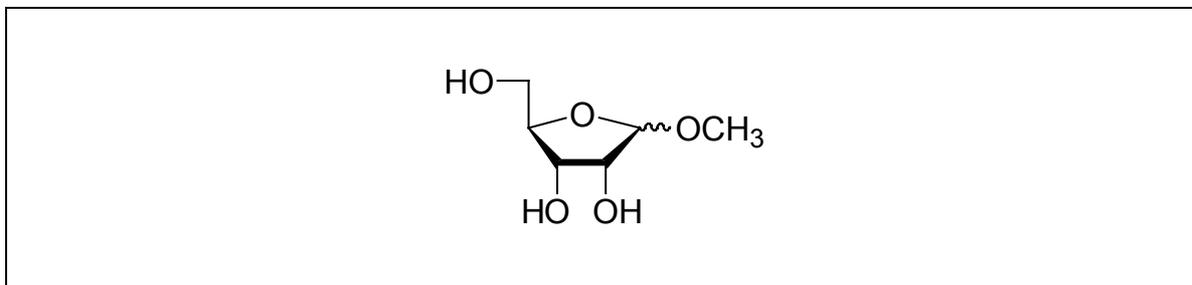
Ausbeute: 1,14g (1,61mmol; 81%)

DC:  $R_f = 0,5$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
8.19 (s, 1H, H2), 7.82 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phth.}}$ ), 7.69 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{phth.}}$ ), 6.97 (d, 1H,  $J = 6.4 \text{ Hz}$ , H7), 6.75 (t, 1H,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , H5), 5.78 (s, 1H, H1'), 4.48 (m, 1H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.23 (m, 1H, H3'), 4.12 (m, 3H, H4',  $2-\beta\text{CH}_2-$ ), 3.92 (m, 3H, H5', H5'', H2), 1.22-0.87 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si- $i\text{Pr}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
169.8, (CO), 168.2 (CO), 156.9 ( $\text{C}_F$ ), 141.1 ( $\text{C}_2$ ), 134.4 ( $\text{C}_{\text{phth}}$ ), 134.1 ( $\text{C}_{\text{phth}}$ ), 133.8 ( $\text{C}_{\text{phth}}$ ), 133.1 ( $\text{C}_{\text{phth}}$ ), 132.0 ( $\text{C}_{\text{phth}}$ ), 123.2 ( $\text{C}_{\text{phth}}$ ), 98.7 ( $\text{C}_5$ ), 93.4 ( $\text{C}_7$ ), 89.6 ( $\text{C}_2'$ ), 82.5 ( $\text{C}_5'$ ), 81.1 ( $\text{C}_1'$ ), 74.9 ( $\text{C}_3'$ ), 69.4 ( $\text{C}_\beta$ ), 59.4 ( $\text{C}_\alpha$ ), 38.2 ( $\text{C}_4'$ ), 17.2 (SiCH $\text{CH}_3$ ), 14.1, 13.4, 12.9, 12.8 (SiCH $\text{CH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  702,6 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**1-Methyl-D-ribofuranose 41**

11,37g  $\beta$ -D-Ribofuranose (75,5mmol) wurden in 150ml abs. Methanol gelöst und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Nach langsamer Zugabe von 0,7ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (13,15mmol) wurde die Reaktionslösung 24 Std. bei 4°C gerührt. Anschließend wurde zur Neutralisation der Ionenaustauscher Amberlite IRA-93 zugegeben. Nach Filtration wurde die neutralisierte Lösung im Membranpumpenvakuum eingengt. Das Produkt, welches beide C(1)-Epimere enthielt, wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt umgesetzt.

Ausbeute: quantitativer Umsatz lt. NMR

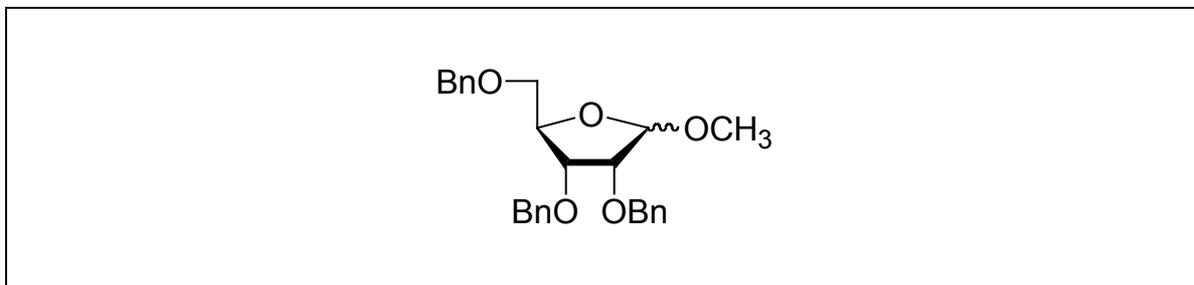
DC:  $R_f = 0,59$  und  $0,67$  ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  4:1)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
4.81 (m, 1H, 2-OH), 4.71 (d, 1H,  $J_{1,2} = 4.23 \text{ Hz}$ , H1), 4.61 (m, 2H, 5-OH, 3-OH), 3.79 (m, 1H, H2), 3.74 (m, 1H, H4), 3.70 (m, 1H, H3), 3.59 (m, 2H, H5, H5'), 3.21 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
108.13 (C1), 83.54 (C4), 74.21 (C2), 70.94 (C3), 63.17 (C5), 54.23 (CH<sub>3</sub>)

ESI(-)-MS:  $m/z$  163,0 ([M-H])

### 1-Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl-D-ribofuranose **42**



21,8g 1-Methyl-D-ribofuranose **41** (132,8mmol) wurden in 200ml abs. THF gelöst. Nach Zugabe von 99,45g gepulvertem Kaliumhydroxid (133mmol) und 139ml Benzylchlorid (1,21mol; 9eq) wurde die Suspension 40 Stunden Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das KOH abfiltriert und gründlich mit THF gewaschen. Nach Evaporieren des Tetrahydrofurans am Rotationsverdampfer wurden die restlichen flüchtigen Bestandteile im Ölpumpenvakuum abdestilliert (max. Badtemperatur 180°C). Der dunkelrote, ölige Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$  98:2. Das Epimerengemisch 1-Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl-D-ribofuranose **42** wurde als hell gelbes Öl erhalten.

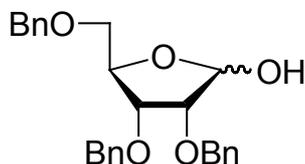
Ausbeute: 51,82g (120mmol; 90%)

DC:  $R_f = 0,65$  und  $0,7$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
 7.32 (m, 15H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 4.93 (s, 1H, H1), 4.67-4.44 (m, 6H,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.10 (m, 1H, H2), 3.98 (t, 1H,  $J = 4.6 \text{ Hz}$ , H3), 3.91 (m, 1H, H4), (m, 2H, H5), 3.22 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
 139.0 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 106.6 (C1), 80.8 (C4), 80.1 (C2), 79.0 (C3), 73.0 (C5), 72.2 ( $\text{CH}_2$ ), 55.2 ( $\text{CH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  452,4 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ )

**2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribofuranose 43**

21,8g des Epimerengemisches 1-Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl-D-ribofuranose **42** (50,2mmol) wurden in 310ml Dioxan gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit 130ml 0.1N Salzsäure versetzt und 24 Std. Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurde mit 13ml 1N NaOH-Lösung neutralisiert. Die Lösungsmittel wurden im Ölpumpenvakuum an einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Rotationsverdampfer evaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit H<sub>2</sub>O ausgeschüttelt. Nach Extraktion des Produktes und Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2) aufgereinigt. Das Produkt **43**, welches beide C1-Epimere enthielt, wurde als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 17,77g (42,2mmol; 84%)

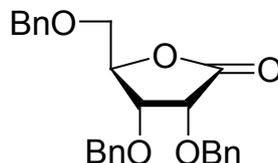
DC: R<sub>f</sub> = 0,45 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2)

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
7.34 (m, 15H, H<sub>arom.</sub>), 6.56 (d, 1H, J = 4.9 Hz, 1-OH), 5.22 (d, 1H, J = 5.5 Hz, H1), 4.66-4.45 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>-), 4.17 (q, 1H, H4), 4.01 (m, 1H, H3), 3.81 (m, 1H, H2), 3.48 (m, 2H, H5)

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
138.4, 138.3, 138.2 (C<sub>arom.</sub>), 128.2 (C<sub>arom.</sub>), 127.7, 127.5, 127.4, 127.3 (C<sub>arom.</sub>), 99.4 (C1), 80.5 (C4), 79.2 (C2), 78.1 (C3), 72.2 (C5), 71.2 (CH<sub>2</sub>)

ESI(+)-MS: m/z 438,3 ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>)

### 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo- $\gamma$ -lacton **44**



Zu einer Lösung von 17,77g 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribofuranose **43** (42,2mmol) in 64ml Dimethylsulfoxid wurden 36ml Acetanhydrid (380mmol) getropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und durch Gießen in Eiswasser gestoppt. Nach Extraktion wurden die vereinigten organischen Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2. Das Produkt 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo- $\gamma$ -lacton **44** wurde als gelber Feststoff erhalten.

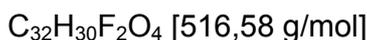
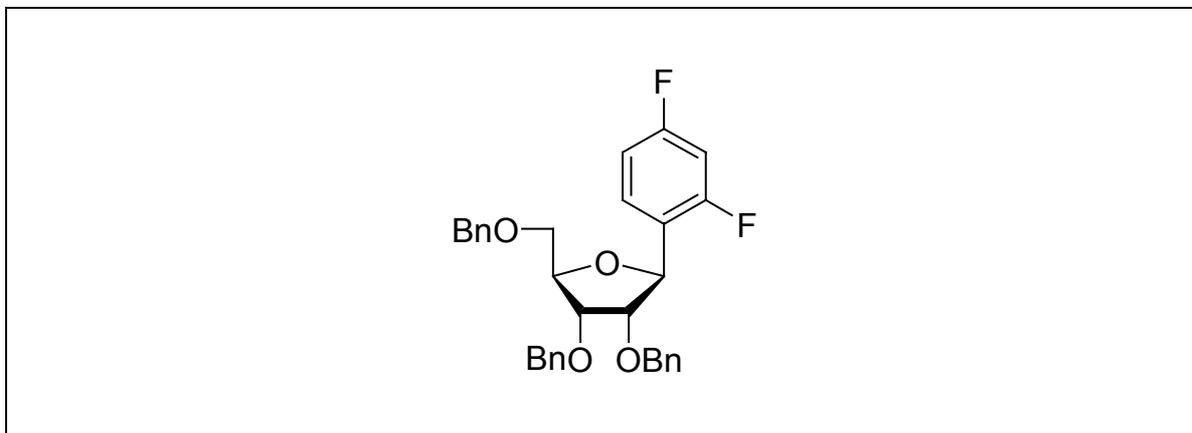
Ausbeute: 17,1g (40,9mmol; 97%)

DC:  $R_f = 0,88$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
 7.38-7.27 (m, 15H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 4.77-4.58 (m, 6H,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.49 ( $\Psi\text{t}$ , 2H,  $\text{H}2'$ ,  $\text{H}3'$ ), 4.3 ( $\Psi\text{d}$ , 1H,  $\text{H}4'$ ), 3.51 (m, 2H,  $\text{H}5'$ ,  $5''$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
 173.61 (C=O), 137.71 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.37 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.34 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.29 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 127.89 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 127.87 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 127.73 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 127.62 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 127.33 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 81.22 (C1), 75.31 (C4), 74.06 (C3), 72.51(C2), 71.77 ( $-\text{CH}_2-$ ), 71.10 (C5)

ESI(+)-MS:  $m/z$  436,2 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ )

**2',3',5'-Tri-O-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 47**

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben und unter Schutzgas durchgeführt. 2,2ml 2,4-Difluorbrombenzol (19,6mmol) wurden in 55ml abs. Diethylether vorgelegt und auf  $-78^\circ\text{C}$  abgekühlt. Anschließend wurden langsam 12ml *n*-Butyllithium (1,6M Lsg. in *n*-Hexan) zugetropft und 20 Min. gerührt. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurde eine Lösung von 5,44g 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo- $\gamma$ -lacton **44** (13mmol) in 50ml abs. Diethylether zugetropft. Die Reaktionslösung färbt sich dabei orange und wurde eine weitere Stunde bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt. Innerhalb einer Stunde wurde auf  $-50^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach Aufwärmen auf  $>0^\circ\text{C}$  wurde die Reaktion durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  gestoppt und mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das entstandene Lactol **46** wurde ohne weitere Aufreinigung dehydroxyliert. Nach Zugabe von 54ml abs. Dichlormethan wird die Reaktionslösung auf  $-78^\circ\text{C}$  abgekühlt. Es wurden 3,2ml Bortrifluorid-Etherat und 4,1ml Triethylsilan (27.86 mmol) zugetropft und eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt, wobei sich die Lösung rotbraun färbte. Über Nacht wurde die Lösung im Kühlraum langsam auf  $4^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach Stoppen der Reaktion mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung wurde mit Methylchlorid ausgeschüttelt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Laufmittel *n*-Hexan/Essigester 4:1. Das Produkt **47** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5,38g (10,41mmol; 80%)

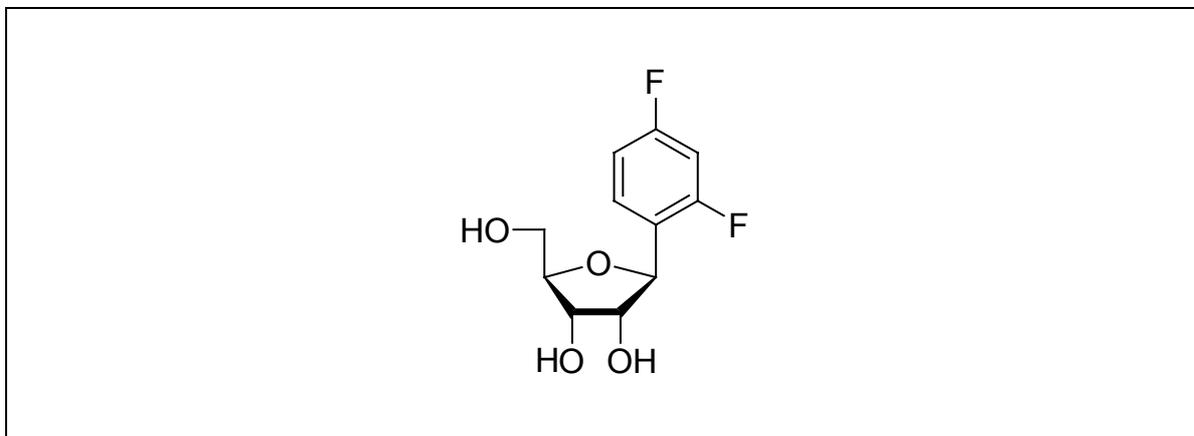
DC:  $R_f = 0,46$  (*n*-Hexan/Essigester 4:1)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz, DMSO- $d_6$ )  
 7.58 (q, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H6), 7.40-7.18 (m, 16H,  $H_{\text{arom.}}$ , H3), 6.94 (dt, 1H,  $J = 8.5$  Hz, H5), 5.16 (d, 1H,  $J = 4.5$  Hz, H1'), 4.63-4.47 (m, 6H,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.22 (q, 1H,  $J = 4.9$  Hz, H2'), 4.05 (m, 2H, H3', H4'), 3.67 (dq, 2H,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, H5', H5'')

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO- $d_6$ )  
 162.0 (d, C4), 159.4 (d, C2), 138.1 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 129.4 (C6), 128.2, 128.1, 127.5, 127.4 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 123.6 (C1), 111.4 (d, C5), 103.6 (t,  $J = 25$  Hz, C3), 82.1 (C1'), 80.7 (C4'), 76.8, 76.0 (C2', C3'), 72.4, 71.0 ( $\text{CH}_2$ ), 69.7 (C5')

ESI(+)-MS:  $m/z$  539,3 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )

### 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 9



$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_4$  [246,21 g/mol]

13,34g 2',3',5'-Tri-O-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **47** (25,8mmol) wurden in 267ml Ethanol p.a. suspendiert. Nach Zugabe von 133ml Cyclohexen und 2,67g 20%  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  wurde das Reaktionsgemisch zum Sieden erhitzt, wobei sich das Edukt vollständig löste. Nach 3 Stunden Rückfluss kochen wurde der Palladium-Katalysator über Celite<sup>®</sup> abfiltriert. Der Filterkuchen wurde gründlich mit Ethanol gewaschen und die Lösung wurde am Rotationsverdampfer evaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem

Elutionsmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1. Das Produkt 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose **9** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5,98g (24,29mmol; 94%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,38 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

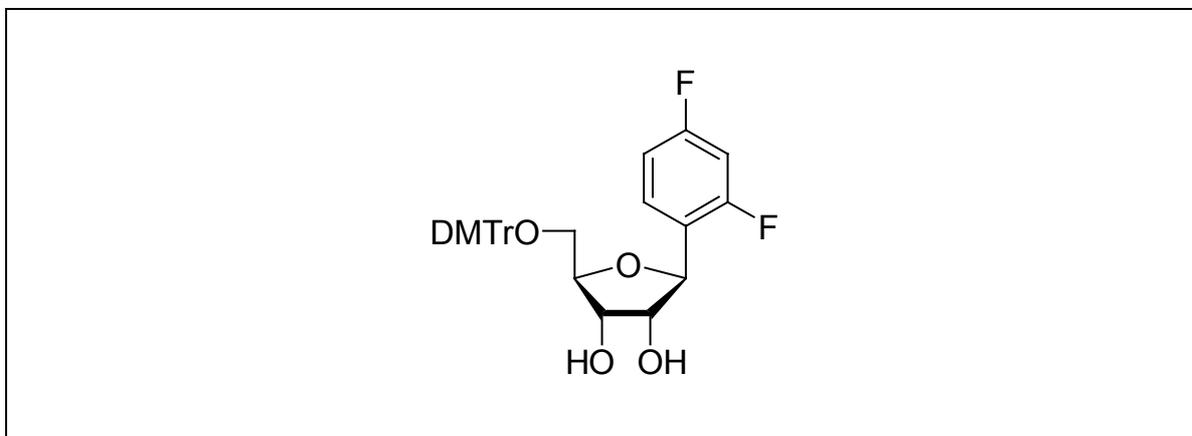
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
7.63 (q, 1H, J = 8.5 Hz, H6), 7.20 (m, 1H, H3), 7.10 (dt, 1H, J = 6.7 Hz, H5), 5.03 (d, 1H, J = 6.0 Hz, H1'), 4.90 (d, 1H, J = 4.9 Hz, 2'OH), 4.83 (m, 2H, 3'OH, 5'OH), 4.09 (q, 1H, J = 6.3 Hz, H2'), 3.85 (m, 2H, H3', H4'), 3.53 (m, 2H, H5', H5'')

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (63MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)  
163.2, 160.2 (dd, C2, C4), 130.6 (C6), 125.2 (C1), 111.7 (C5), 104.2 (C3), 85.6 (C1'), 78.9 (C4'), 78.0 (C2'), 72.1 (C3'), 62.9 (C5')

ESI(-)-MS: m/z 245,1 ([M-H])

EA: (ber.) C: 53,66%, H: 4,91%;  
(exp.) C: 53,53%, H: 5,01%

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose **49****



C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>F<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [548,57 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenckkolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,5g 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** (6,1mmol) wurden in 38ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 1,26ml Triethylamin (9mmol) und 2,45g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (7,2mmol) wurde die Reaktionslösung 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Methanol gestoppt. Nach Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer und Coevaporation mit Toluol wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit wässr. ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5). Das gewünschte Produkt 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **49** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,92g (5,32mmol; 87%)

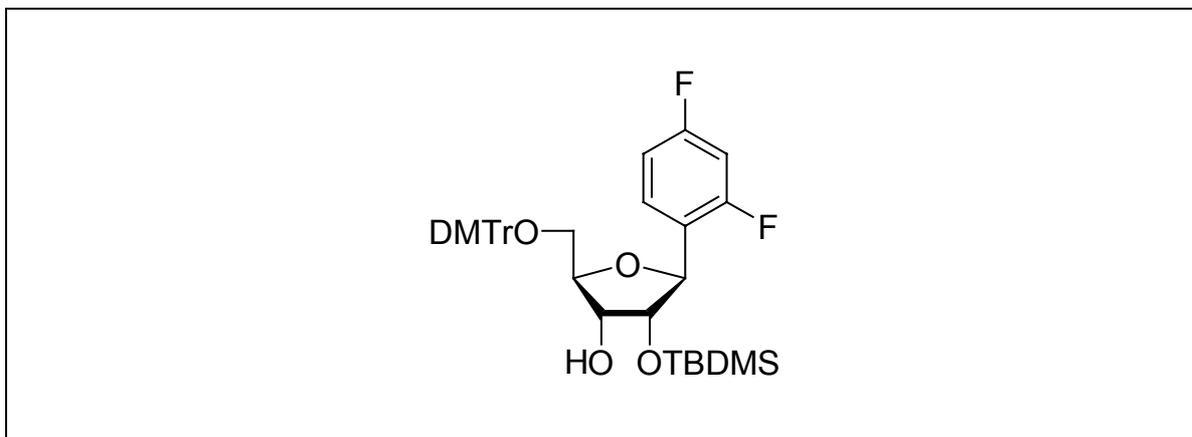
DC: R<sub>f</sub> = 0,6 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
7.55 (q, 1H, J = 7.2 Hz, H6), 7.43-7.22 (m, 10H, H<sub>arom.</sub>, H3), 6.95 (dt, 1H, J = 8.3 Hz, H5), 6.88 (d, 4H, H<sub>arom.</sub>, ortho), 5.18 (d, 1H, J = 5.4 Hz, 2'OH), 4.97 (d, 1H, J = 5.3 Hz, 3'OH), 4.90 (d, 1H, J = 3.8 Hz, H1'), 3.88 (m, 3H, H2', H3', H4'), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.21 (m, 2H, H5', H5'')

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
166.0, 160.5 (dd, C2, C4), 158.1 (C<sub>arom.</sub>), 145.5 (C<sub>arom.</sub>), 134.8 (C<sub>arom.</sub>), 129.8 (C<sub>arom.</sub>), 127.8 (C6), 126.5 (C5), 113.2 (C<sub>arom.</sub>), 85.0 (C1'), 81.5 (C4'), 78.5 (C2'), 76.3 (C3'), 70.8 (C5'), 54.8 (OCH<sub>3</sub>),

ESI(-)-MS: m/z 547,3 ([M-H])

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 51**



$C_{38}H_{44}F_2O_6Si$  [662,81 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenckkolben unter Schutzgas und Lichtausschluss durchgeführt. 2g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **49** (3,65mmol) wurden in 32ml eines 1:1-Gemisches aus abs. Tetrahydrofuran / abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 0,72g Silbernitrat (4,3mmol) und 4,97ml *tert.*-Butyltrimethylsilylchlorid-Lösung (1M in THF) wird die Suspension 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von wässr. ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. gestoppt. Nach Abtrennung des entstandenen Silberchlorids mittels Filtration wird mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer unter Coevaporation mit Toluol zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte zunächst durch Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/i$ -Propanol 99:1). Die Trennung des 2'-substituierten Isomers vom 3'-substituierten Nebenprodukt erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Machery-Nagel, *n*-Hexan/Isopropylacetat 3:2). Das gewünschte 2'-silylierte Produkt (*slow*-Isomer) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,87g (1,31mmol; 36%)

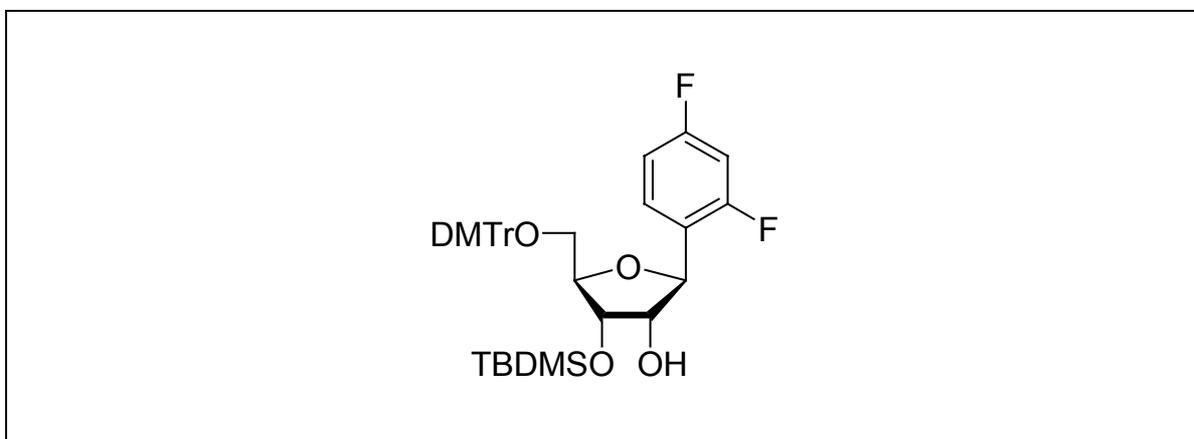
DC:  $R_f = 0,18$  ( $CH_2Cl_2$ )

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 7.75 (q, 1H,  $J = 5 \text{ Hz}$ , H6), 7.59 (m, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7.49-7.31 (m, 11H,  $H_{\text{arom.}}$ , H3, H5), 6.91 (m, 4H,  $H_{\text{arom., ortho}}$ ), 5.16 (d, 1H,  $J = 5.3 \text{ Hz}$ , H1'), 4.34 (m, 1H, H2'), 4.13 (m, 2H, H3', H4'), 3.89 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.64 (m, 1H, H5'), 3.28 (m, 1H, H5''), 0.95 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.1 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ), -0.5 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
 158.5 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 144.7 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 135.9 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 130.2, 129.1, 128.3 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 127.9 (C6), 126.9 (C5), 113.2 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 86.3 (C1'), 83.2 (C4'), 79.1 (C2'), 72.4 (C3'), 62.9 (C5'), 56.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 25.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.0 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ),

ESI(-)-MS:  $m/z$  661,3 ([M-H])

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 53**



$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{O}_6\text{Si}$  [662,81 g/mol]

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluor-phenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **51** entstand als Nebenprodukt (*fast*-Isomer) bei der Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluor-phenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **53**.

Ausbeute: 0,77g (1,16mmol; 32%)

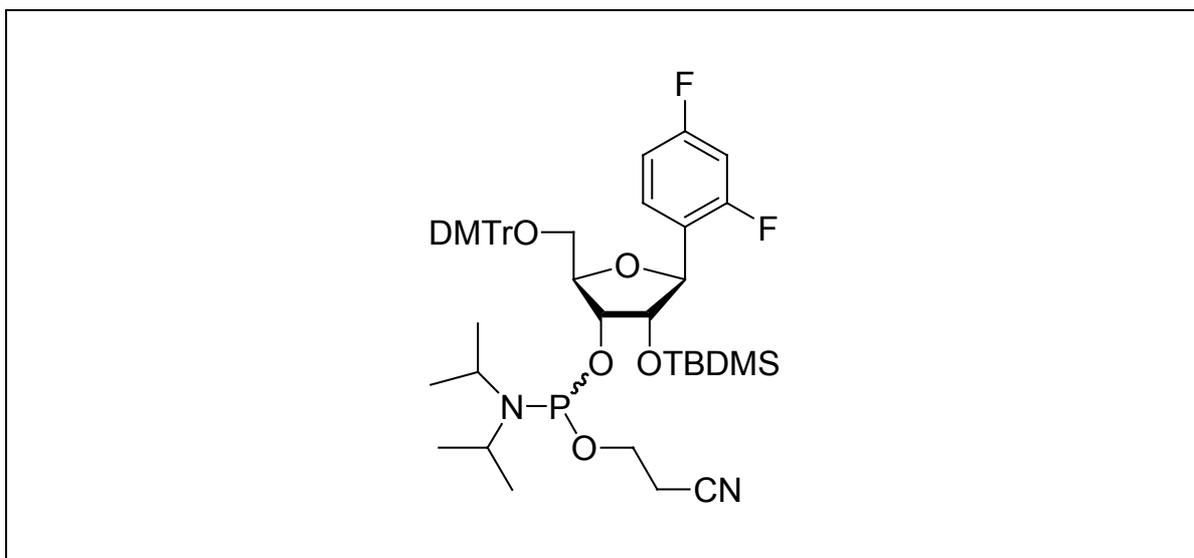
DC:  $R_f = 0,21$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
7.71 (q, 1H,  $J = 6.8$  Hz, H6), 7.53 (m, 2H,  $J = 7.0$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7.43-7.39 (m, 4H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7.28 (m, 3H,  $H_{\text{arom.}}$ , H3, H5), 6.79 (m, 6H,  $H_{\text{arom.}}$ , ortho), 5.13 (d, 1H,  $J = 6.0$  Hz, H1'), 4.28 (m, 1H, H2'), 4.18 (m, 2H, H3', H4'), 3.74 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.54 (m, 1H, H5'), 3.37 (m, 1H, H5''), 0.90 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.00 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ), -0.05 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
164.1, 162.5 (dd, C2, C4), 156.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 145.1 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 136.1 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 130.3, 129.7, 129.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.3 (C6), 126.9 (C5), 123.3 (d,  $J = 9.4$  Hz, C1), 113.2 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 111.7 (d,  $J = 21.4$  Hz, C6), 103.7 (t,  $J = 25.2$  Hz, C1), 86.4 (C1'), 83.9 (C4'), 79.0 (C2'), 72.4 (C3'), 63.9 (C5'), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 53.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 25.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.0 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  661,5 ([M-H])

**3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-  
dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-tert.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-  
difluorophenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 64**



$\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{PSi}$  [862,40 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 0,25g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **51** (0,38mmol) in 10ml abs. Acetonitril wurden 230 $\mu$ l sym. Collidin (0,65mmol) und 10 $\mu$ l 1-Methylimidazol (0,05mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und 65 $\mu$ l 2-Cyanethyl diisopropylchlorphosphoramidit (0,25mmol) wurden langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 Minuten bei 0°C gerührt und durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie (pDC) am Chromatotron mit dem Elutionsmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Methanol 98:2. Das Produkt **64** (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten

Ausbeute: 103mg (0,12mmol; 32%)

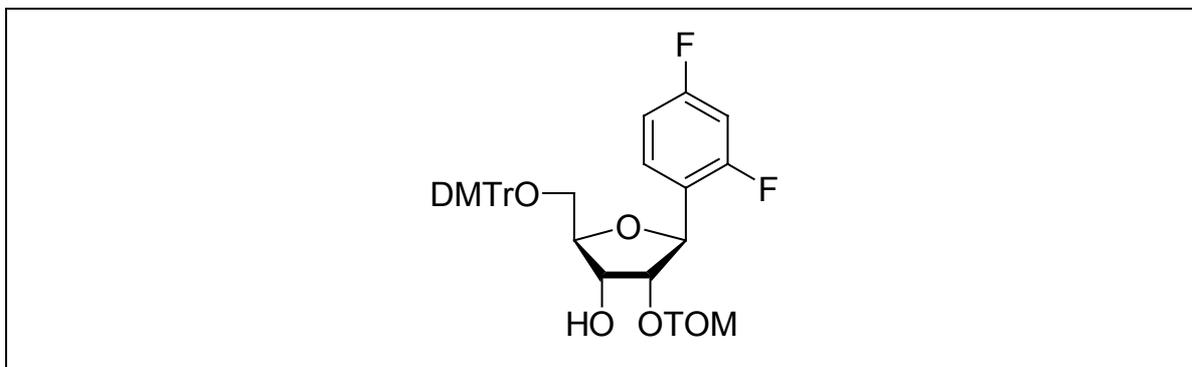
DC: R<sub>f</sub> = 0,52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (250MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
7.65 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 7.49 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.38 (m, 4H, H<sub>arom.</sub>), 7.22 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 6.83 (m, 6H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>arom., ortho</sub>), 5.15 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H<sub>1'</sub>), 4.26 (m, 1H, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>), 3.98 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 3.81 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.57 (m, 2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>5''</sub>), 3.26 (m, 1H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.66 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.28 (m, 1H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 1.27 (m, 14H, *iso*-Propyl), 0.97 (m, 21H, -CHCH<sub>3</sub>-, -CH<sub>3</sub>), 0.83 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.09 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), -0.05 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>)

<sup>31</sup>P-NMR:  $\delta$  [ppm] (162MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
151.5, 149.6; Verhältnis 1:3,8

ESI(+)-MS: m/z 863,8 ([M+H]<sup>+</sup>)

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **60****



$C_{42}H_{52}F_2O_7Si$  [734,94 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,5g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **49** (0,91mmol) wurden in 9,1ml Dichlorethan gelöst und mit 1,6ml Diisopropylethylamin (9,1mmol, DIPEA) versetzt. Nach Zugabe von 0,64g Dibutylzinnchlorid (2,1mmol; 2,3eq.) wird die Reaktionslösung 15 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0,53g Triisopropylsilyloxymethylchlorid **58** (2,37mmol; 2,6eq) zugetropft und die Reaktion wurde 3 Stunden bei 80°C gerührt. Nach ca. 30 Min. Refluxieren färbt sich die Lösung rot. Nach Abkühlen der Lösung wurde die Reaktion mit Dichlormethan verdünnt und durch Zugabe von wässr. ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. gestoppt. Nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurden die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung erfolgte zunächst durch Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2$ ). Die Trennung des 2'-substituierten Isomers vom 3'-substituierten Nebenprodukt erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 50-10 von Machery-Nagel, [*n*-Hexan/Methylacetat 97:3]/ $CH_2Cl_2$  7:3). Das gewünschte 2'-silylierte Produkt (*fast*-Isomer) **60** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,28g (0,38mmol; 42%)

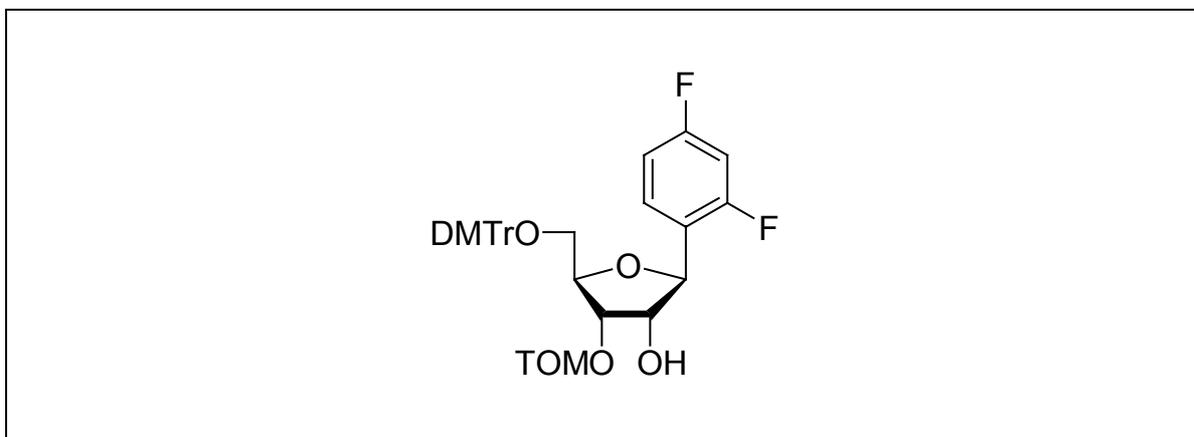
DC:  $R_f = 0,43$  (100%  $CH_2Cl_2$ )

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz, DMSO- $d_6$ )  
 7.53 (dd, 1H, H6), 7.42 (m, 2H,  $H_{arom.}$ ), 7.29 (m, 8H, H3,  $H_{arom.}$ ), 7.00 (dt, 1H, H5), 6.88 (d, 4H,  $H_{arom.}$ ), 5.04 (d, 1H,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ , H1'), 4.98 (d, 1H,  $J = 5.2 \text{ Hz}$ , 3'OH), 4.91 (dd, 2H,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ ,  $-\text{OCH}_2-\text{O}$ ), 4.10 (m, 1H, H4'), 3.99 (m, 2H, H2', H3'), 3.73 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.25 (m, 1H, H5'), 3.15 (m, 1H, H5''), 0.91 (m, 21H,  $-\text{CHCH}_3-$ ,  $-\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz, DMSO- $d_6$ )  
 158.1 ( $C_{arom.}$ ), 144.9 ( $C_{arom.}$ ), 135.5 ( $C_{arom.}$ ), 129.8 ( $C_{arom.}$ ), 127.8 (C6), 126.7 (C5), 113.1 ( $C_{arom.}$ ), 111.5 (C1), 103.5 (C3), 88.5 (C1'), 85.5 ( $C_{arom.}$ ), 81.0 (C4'), 78.0 (C2'), 75.5 ( $\text{CH}_2$ ), 63.5 (C3'), 54.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 48.6 (C5'), 17.6 ( $\text{SiCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 11.3 ( $\text{SiCH}(\text{CH}_3)_2$ )

ESI(-)-MS:  $m/z$  749,4 ([M-H])

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 62**



$\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{F}_2\text{O}_7\text{Si}$  [734,94 g/mol]

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **62** entstand als Nebenprodukt (*slow-Isomer*) bei der Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **60** und wurde als weißer Schaum

erhalten. Ein geringer Anteil wurde für analytische Zwecke aufgefangen und nach der Auftrennung mittels HPLC charakterisiert.

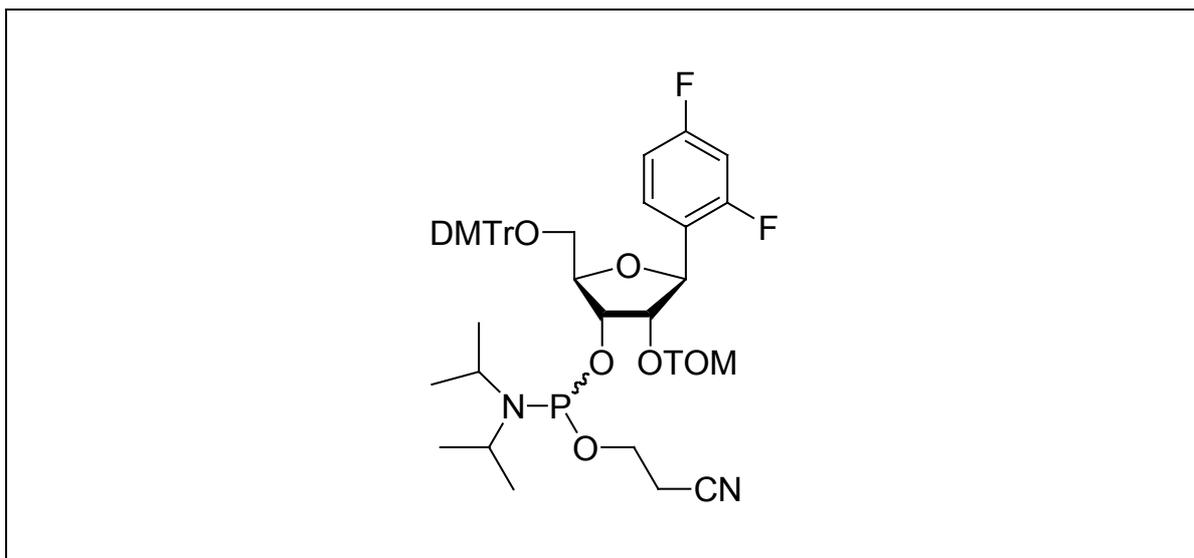
DC:  $R_f = 0,40$  (100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (250MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
7.57 (q, 1H,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , H6), 7.45 (m, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7.29 (m, 7H,  $H_{\text{arom.}}$ ),  
7.24 (m, 1H, H3), 7.00 (dt, 1H,  $J = 6.2 \text{ Hz}$ , H5), 6.88 (m, 4H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 5.23  
(d, 1H,  $J = 5.9 \text{ Hz}$ , H1'), 4.95 (d, 2H,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ ,  $-\text{OCH}_2\text{-O}$ ), 4.91 (d, 1H,  
 $J = 5.1 \text{ Hz}$ , 2'OH), 4.16 (m, 1H, H4'), 4.09 (m, 2H, H2', H3'), 3.74 (s,  
3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.30 (m, 1H, H5'), 3.17 (m, 1H, H5'),  
0.93 (m, 21H,  $-\text{CHCH}_3-$ ,  $-\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (63MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  
164.0, 160.0 (dd, C2, C4), 159.0 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 145.7 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 136.3 ( $C_{\text{arom.}}$ ),  
130.6 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 128.6 (C6), 128.5 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 127.5 (C5), 114.0 ( $C_{\text{arom.}}$ ),  
111.0 (C1), 104.6 (C3), 89.4 (C1'), 86.4 ( $C_{\text{arom.}}$ ), 82.0 (C4'), 78.9 (C2'),  
76.4 ( $\text{CH}_2$ ), 64.5 (C3'), 55.8 ( $\text{OCH}_3$ ), 18.4 ( $\text{SiCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 12.2  
( $\text{SiCH}(\text{CH}_3)_2$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  757,4( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )

**3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-  
dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(2,4-  
difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **66****



$C_{51}H_{69}F_2N_2O_8PSi$  [935,16 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 0,26g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **60** (0,35 mmol) in 15ml abs. Acetonitril wurden 0,48ml sym. Collidin (1,35mmol) und 15 $\mu$ l 1-Methylimidazol (0,07mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und 120 $\mu$ l 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit (0,46mmol; 1,3eq) wurden langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 Minuten bei 0°C und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt; durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie (pDC) am Chromatotron mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Essigester 5:1. Das Produkt **66** (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 200mg (0,21mmol; 60%)

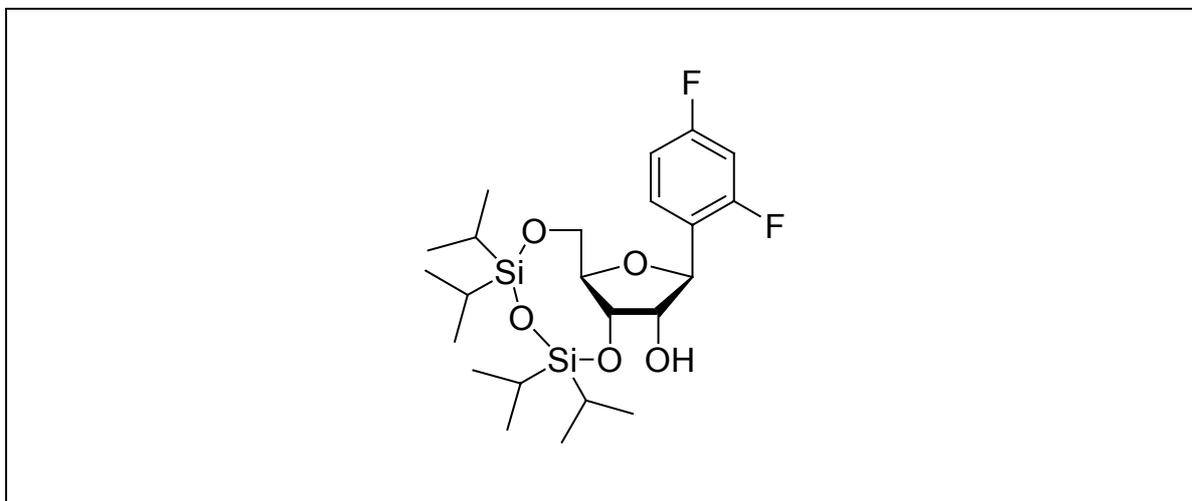
DC:  $R_f = 0,42$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
7.48 (m, 1H, H6), 7.35 (m, 4H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7.25 (m, 5H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7.21 (m, 1H, H3), 6.80 (m, 5H, H5,  $H_{\text{arom.}}$ ), 5.23 (d, 1H,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , H1'), 4.95 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2-\text{O}$ ), 4.39-4.22 (m, 3H, H2', H3', H4'), 3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.74 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.56 (m, 2H, H5', H5''), 3.26 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.30 (t, 1H,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 1.25 (m, 14H, *iso*-Propyl), 0.97 (m, 21H,  $-\text{CHCH}_3$ ,  $-\text{CH}_3$ )

$^{31}\text{P-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (162MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
151.1, 150.9; Verhältnis 1,3:1

ESI(+)-MS:  $m/z$  935,7 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 73**



$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{F}_2\text{O}_5\text{Si}_2$  [488,71 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 10,4g 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **9** (42,2mmol) wurden in 126ml abs. Pyridin gelöst. 14,8g 1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxandichlorid (46,6mmol, 1,1eq) wurden langsam in die Lösung getropft. Die Reaktionslösung wurde 16

Stunden bei Raumtemperatur gerührt; es bildete sich ein weißer Niederschlag aus. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Wasser gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$  97:3. Das Produkt **73** wurde als leicht gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 18,1g (37,0mmol; 88%)

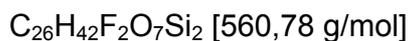
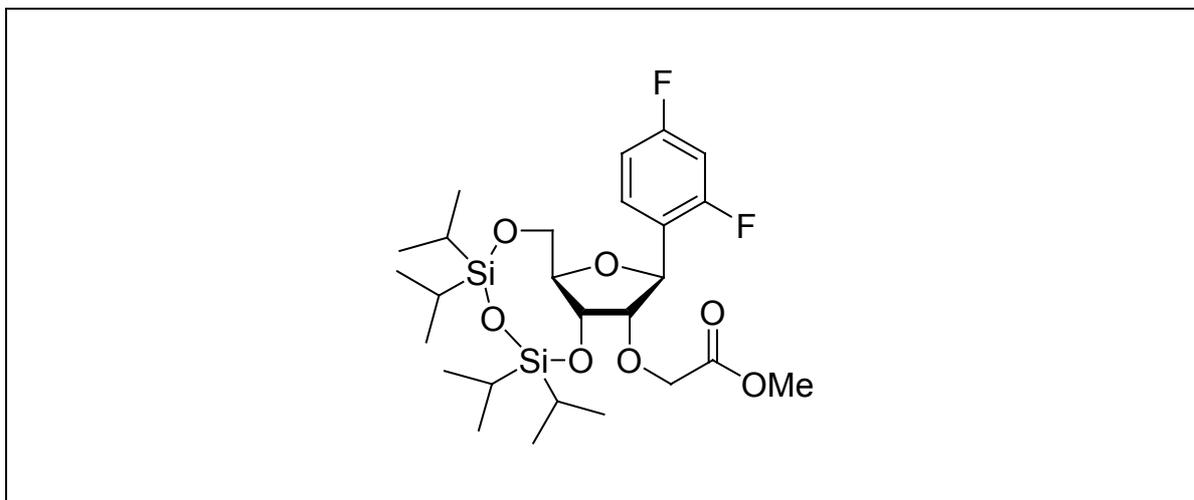
DC:  $R_f = 0,64$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
7.55 (q, 1H,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 14.7 \text{ Hz}$ , H6), 6.83 (m, 2H, H3, H5), 5.10 (d, 1H,  $J_{1,2} = 2.1 \text{ Hz}$ , H1'), 4.37 (dd,  $J_{1,2} = 2.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 7.7 \text{ Hz}$ , H2'), 4.13 (m, 2 H, H3', H4'), 4.03 (m, 2H, H5', H5''), 2.57 (bs, 1H, OH), 0.97-1.18 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si- $i\text{Pr}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
163.10 (dd,  $J = 235 \text{ Hz}$ ,  $J = 12 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 160.42 (dd,  $J = 236 \text{ Hz}$ ,  $J = 12 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 129.36 ( $\text{C}_6$ ), 123.95 ( $\text{C}_1$ ), 111.69 (d,  $J = 21 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_5$ ), 104.30 (t,  $J = 25 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_3$ ), 82.05 ( $\text{C}_5'$ ), 80.70 ( $\text{C}_3'$ ), 77.08 ( $\text{C}_1'$ ), 71.42 ( $\text{C}_2'$ ), 62.10 ( $\text{C}_4'$ ), 17.78 (SiCH $\text{CH}_3$ ), 13.92, 13.63, 13.34, 13.17 (SiCH $\text{CH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  506,4 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-methoxycarbonylmethyl-β-D-ribofuranose 75**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 8g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose **73** (14,3mmol) in 80ml abs. Tetrahydrofuran werden 0,43g Natriumhydrid (18,5mmol, 1,3eq) zugegeben. Nach langsamer Zugabe von 3,9ml Bromessigsäuremethylester (42,9mmol, 3eq) wurde das Reaktionsgemisch 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine ges. NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und im Membranpumpenvakuum evaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $CH_2Cl_2$ .

Ausbeute: 6,02g (10,7mmol; 66%)

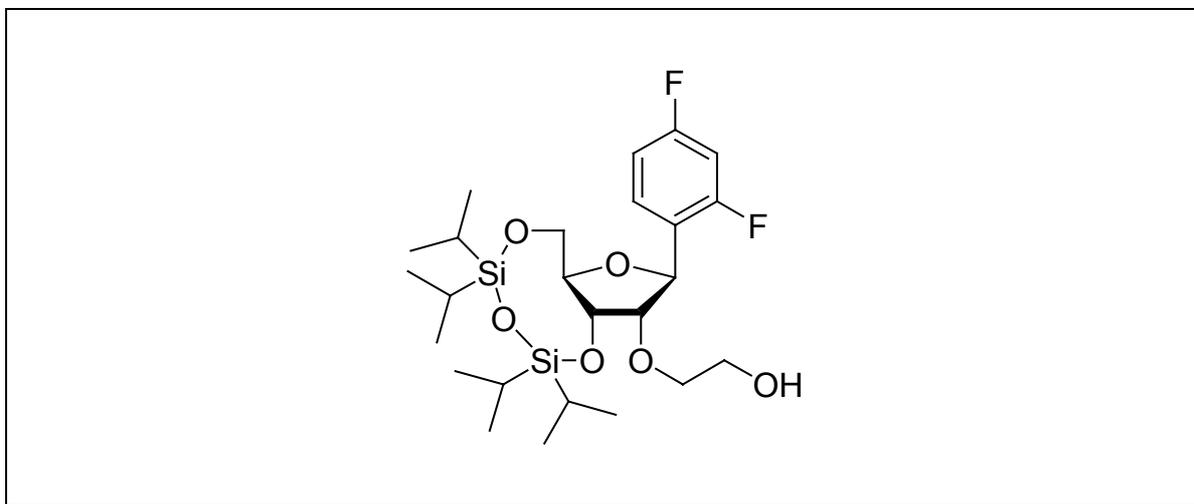
DC:  $R_f = 0,62$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz, DMSO- $d_6$ )  
 7.61 (q, 1H,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 15.5 \text{ Hz}$ , H6), 7.23 (t, 1H,  $J = 9.8 \text{ Hz}$ , H3),  
 7.01 (t, 1H,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ , H5), 5.10 (s, 1H, H1'), 4.40 (m, 2H, H2', H3'),  
 4.21 (m, 1H,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.13 (m, 1H,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.98-3.87 (m, 3H, H4', H5',  
 H5'), 3.61 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.04-0.91 (m, 28H,  $\text{Si-CH}_3$ ,  $\text{Si-}i\text{Pr}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO- $d_6$ )  
 131.18 ( $\text{C}_{arom}$ ), 128.09 ( $\text{C}_{arom}$ ), 111.48 (C3), 103.86 (C5), 83.81, 81.97,  
 80.51 ( $\text{C}_\alpha$ , C1'), 72.93, 72.07, 71.11 (C2', C3', C5'), 62.44 (C4'), 16.77  
 ( $\text{SiCHCH}_3$ ), 13.51 ( $\text{SiCHCH}_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  561,3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ),

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 77**



$\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{F}_2\text{O}_6\text{Si}_2$  [532,77 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 6g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-methoxycarbonylmethyl- $\beta$ -D-ribofuranose **75** (10,7mmol) wurden in 120ml THF gelöst. Nach Zugabe von 30ml abs. Methanol wurde die Reaktionslösung auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt. Nach Zugabe von 1,8g Lithiumborhydrid (83,1mmol, 8eq) wurde die Reaktionslösung 3 Stunden bei  $0^\circ\text{C}$  und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde

durch vorsichtige Zugabe von ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$  98:2. Das Produkt **77** wurde als weißer Feststoff erhalten

Ausbeute: 5,29g (9,9mmol; 93%)

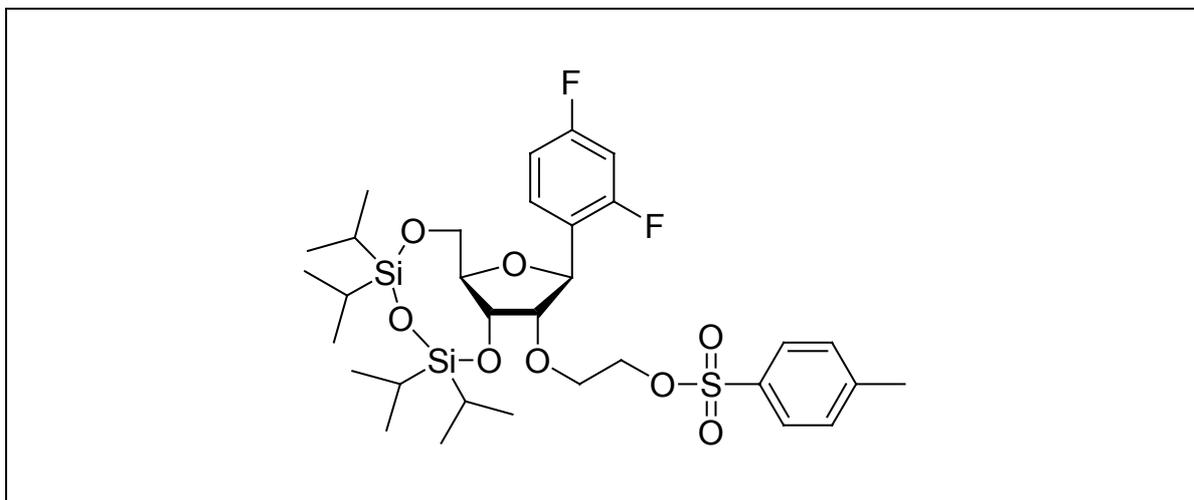
DC:  $R_f = 0,3$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
7.71 (q, 1H,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 8.4 \text{ Hz}$ , H6), 6.82 (m, 2H, H3, H5), 5.20 (s, 1H, H1'), 4.27 (m, 2H, H2',  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.05 (m, 1H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 3.96 (m, 2H, H3',  $-\beta\text{CH}_2-$ ), 3.83 (m, 1H,  $-\beta\text{CH}_2-$ ), 3.75 (m, 3H, H4', H5', H5''), 2.57 (b s, 1H, OH), 1.15-0.91 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si-*i*Pr)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
162.62 (dd,  $J = 235 \text{ Hz}$ ,  $J = 12 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 159.03 (dd,  $J = 234 \text{ Hz}$ ,  $J = 12 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 128.41 (C6), 124.165 (C1), 111.07 (d,  $J = 21 \text{ Hz}$ , C5), 103.50 (t,  $J = 21 \text{ Hz}$ , C3), 85.15 (C5'), 80.36 (C3'), 79.18 (C1'), 72.79 (C $\beta$ ), 69.63 (C2'), 61.65 (C4'), 59.93 (C $\alpha$ ), 17.21 (SiCHCH $_3$ ), 13.41, 13.00, 12.83, 12.65 (SiCHCH $_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  550,5 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-[β-(para-toluolsulfonsäure)ethyl]-β-D-ribofuranose **79****



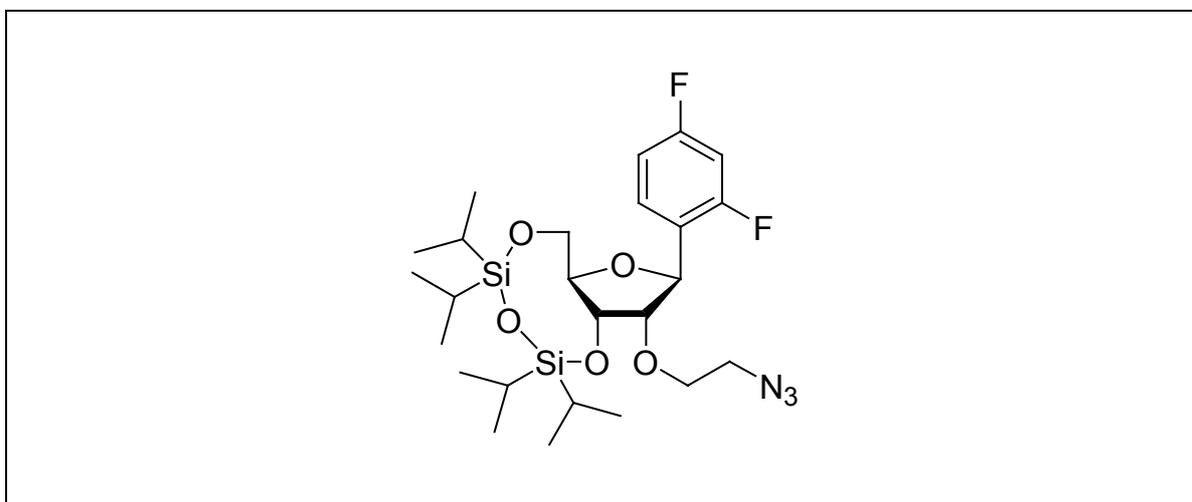
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,5g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-β-hydroxyethyl-β-D-ribofuranose **77** (0,94mmol) wurden in 21ml abs. Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0,13g *N,N*-Dimethylaminopyridin (0,1mmol), 0,46ml Triethylamin und 0,6g *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (3,3mmol) wurde das Reaktionsgemisch 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die klare, farblose Lösung gelb färbte. Die Reaktion wurde anschließend 5 Stunden bei 50°C gerührt. Durch die Zugabe von ges. wässr. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung wurde die Reaktion gestoppt und die Lösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gefolgt von einem weiteren Aufreinigungsschritt mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (pDC) am Chromatotron (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt **79** wurde als hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,38g (0,56mmol; 59%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,42 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
7.74 (d, 2H,  $J_{1,2} = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7.58 (q, 1H,  $J = 6.5 \text{ Hz}$ , H6), 7.26 (d, 2H,  $J_{1,2} = 6.9 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{arom.}}$ ), 6.73 (m, 2H, H3, H5), 4.94 (s, 1H, H1'), 4.18 (m, 2H, H2',  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.00 (m, 5H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ,  $-\beta\text{CH}_2-$ ,  $-\beta\text{CH}_2-$ , H3', H4'), 3.75 (m, 2H, H5', H5''), 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.02-0.81 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si-*i*Pr)

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -azidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 81**



$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_2$  [557,78 g/mol]

*Variante A – ausgehend von 79:*

Zu einer Lösung von 0,38g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-[ $\beta$ -(*para*-toluolsulfonsäure)ethyl]- $\beta$ -D-ribofuranose **79** (0,56mmol) in 5ml *N,N*-Dimethylformamid wurden 0,36g Natriumazid (5,6mmol; 10eq) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden bei 60°C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde direkt im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde ein Teil des Produktes durch Säulenchromatographie ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) aufgereinigt.

*Variante B – ausgehend von 77:*

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,46g des primären Alkohols 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **77** (0,86mmol) wurden in 30ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und 0,08g Natriumazid (1,23mmol) sowie 0,34g Triphenylphosphin (1,29mmol; 1,5eq) wurden zugegeben. 0,2ml Diethylazodicarboxylat (1,29mmol; 1,5eq) wurden langsam zu der Reaktionslösung getropft. Im Laufe der Reaktion färbt sich die Lösung orange. Nach 1 Stunde Rührens bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2) gefolgt von einem weiteren Aufreinigungsschritt mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (pDC) am Chromatotron (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2). Das Produkt **81** wurde als gelber Schaum erhalten.

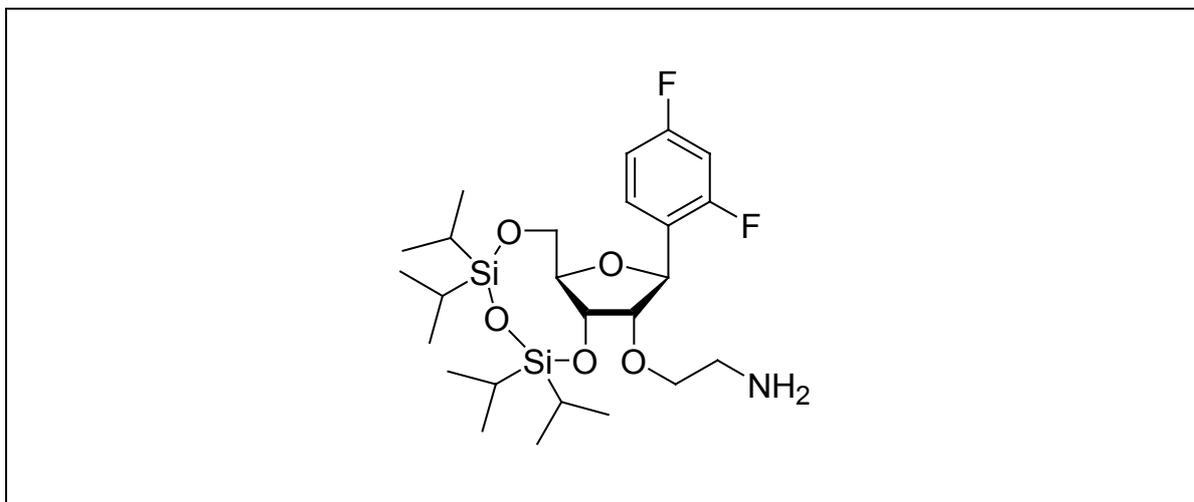
Ausbeute: *Variante B* 0,37g (0,67mmol; 78%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
7.46 (m, 1H, H6), 6.76 (m, 2H, H3, H5), 5.11 (s, 1H, H1'), 4.24 (m, 2H, - $\alpha$ CH<sub>2</sub>-), 3.90 (m, 2H, - $\beta$ CH<sub>2</sub>-), 3.85 (m, 3H, H2', H3', H4'), 3.66 (m, 2H, H5', H5''), 1.05-0.88 (m, 28H, Si-CH<sub>3</sub>, Si-*i*Pr)

ESI(-)-MS: m/z 557,2 ([M-H])

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -aminoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **83****



0,26g des Rohproduktes von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -azidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **81** (0,48mmol; dargestellt nach Variante A), wurde in 5ml abs. Methanol gelöst. Nach Zugabe von 0,27g  $SnCl_2$  (1,42mmol) wurde die Reaktion 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf wässr. ges.  $NaHCO_3$ -Lösung gegossen. Das Methanol wurde im Membranpumpenvakuum evaporiert und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die Suspension wurde über Hyflo Supercel<sup>®</sup> filtriert, um die Zinn organischen Bestandteile zu entfernen. Der Filterkuchen wurde gründlich mit  $CH_2Cl_2$  gewaschen und das Filtrat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit  $H_2O$  gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer Dünnschicht-Chromatographie (pDC) am Chromatotron ( $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2).

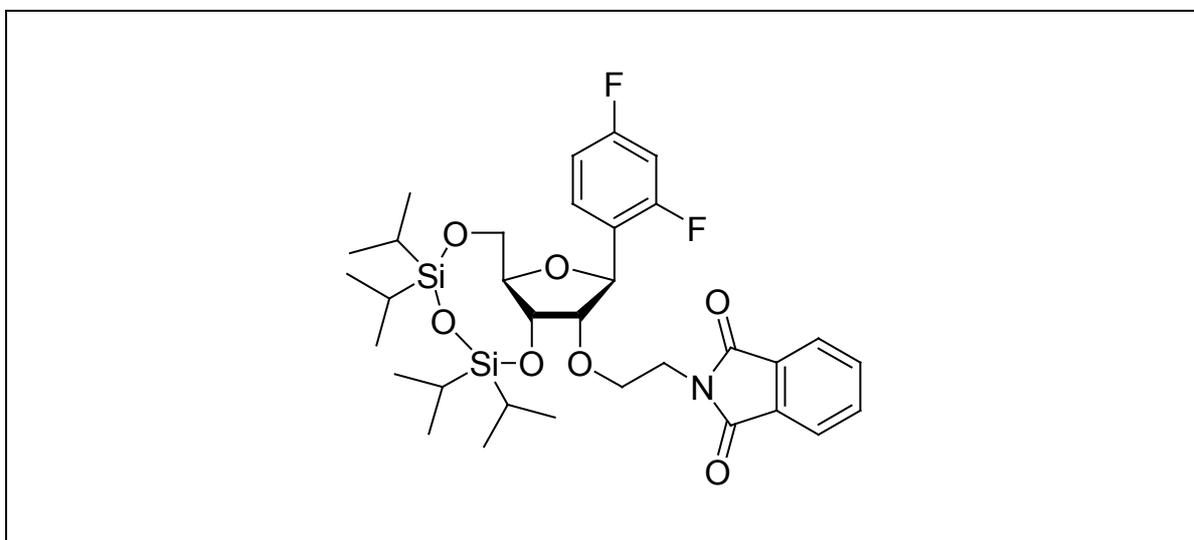
Ausbeute: 65mg (0,12mmol; 22% bezogen auf 2 Reaktionsschritte ausgehend von Substanz **79**)

DC:  $R_f = 0,16$  (100%  $CH_2Cl_2/MeOH$  98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 7.61 (q, 1H,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ , H6), 6.73 (m, 2H, H3, H5), 5.10 (s, 1H, H1'), 4.22 (m, 2H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 3.99 (m, 5H, H3', H4', H5', H5''), 2.83 (m, 2H,  $-\beta\text{CH}_2-$ ), 1.88 (b s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 1.17-0.74 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si- $i\text{Pr}$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  532,3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -N-phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose 85**



$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{F}_2\text{NO}_7\text{Si}_2$  [661,88 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1g des primären Alkohols 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -hydroxyethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **77** (1,88mmol) wurden in 66ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und 0,28g Phthalimid (1,88mmol) sowie 0,74g Triphenylphosphin (1,8mmol) wurden zugegeben. 0,44ml Diethylazodicarboxylat (1,8mmol) wurden langsam zu der Reaktionslösung getropft. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gestoppt und die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die

Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2). Das Produkt **85** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,99g (1,49mmol; 79%)

DC:  $R_f = 0,66$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2)

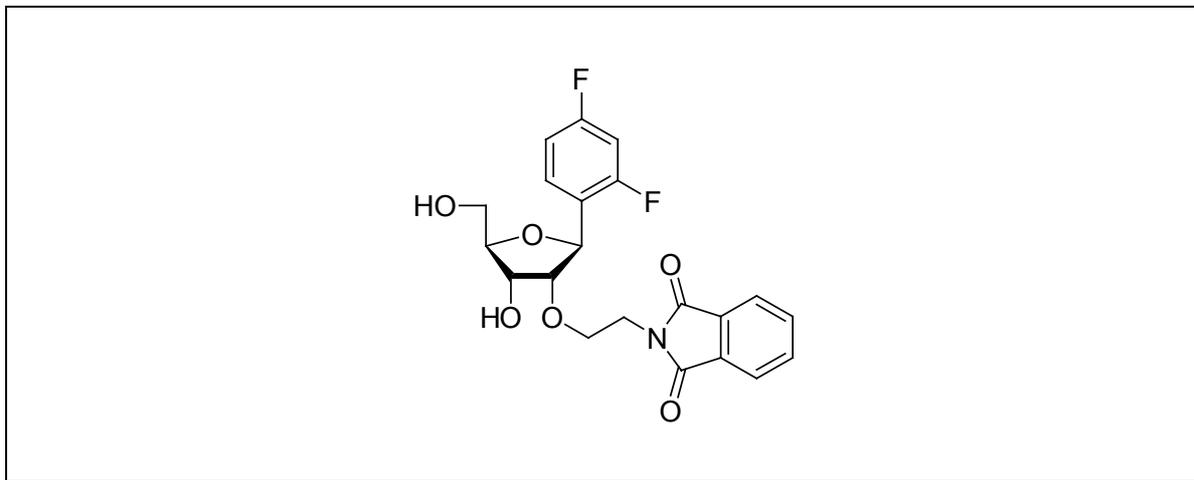
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
7.85 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{pht}}$ ), 7.72 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{pht}}$ ), 7.63 (q, 1H,  $J = 7.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 15.2 \text{ Hz}$ , H6), 6.78 (dt, 1H,  $J = 2.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 8.1 \text{ Hz}$ , H5), 6.68 (dt, 1H,  $J = 1.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,3} = 8.8 \text{ Hz}$ , H3), 5.07 (s, 1H, H1'), 4.20 (m, 2H, H3',  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.12 (m, 1H,  $-\alpha\text{CH}_2-$ ), 4.02-3.91 (m, 5H, H4', H5', H5'',  $-\beta\text{CH}_2-$ ), 3.69 (d, 1H,  $J_{1,2} = 4.1 \text{ Hz}$ , H2'), 1.15-0.92 (m, 28H, Si- $\text{CH}_3$ , Si- $i\text{Pr}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
168.21 (CO), 162.24 (dd,  $J = 235 \text{ Hz}$ ,  $J = 12 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 159.12 (dd,  $J = 235 \text{ Hz}$ ,  $J = 12 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_F$ ), 133.76 ( $\text{CH}_{\text{pht}}$ ), 132.17 ( $\text{C}_{\text{pht}}$ ), 128.56 (dd,  $J = 4 \text{ Hz}$ ,  $J = 9 \text{ Hz}$ , C6), 124.25 (C1), 123.16 ( $\text{CH}_{\text{pht}}$ ), 110.89 (d,  $J = 19 \text{ Hz}$ , C5), 103.38 (t,  $J = 26 \text{ Hz}$ , C3), 84.98 (C2'), 80.10 (C5'), 78.76 (C1'), 69.87 (C3'), 67.99 (C $\beta$ ), 59.96 (C $\alpha$ ), 38.21 (C4'), 17.30 (SiCHCH $_3$ ), 13.37, 13.00, 12.80, 12.50 (SiCHCH $_3$ )

ESI(+)-MS:  $m/z$  679,5 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ )

**1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-(β-N-phthalimidoethyl)-β-D-ribofuranose**

**93**



$C_{21}H_{19}F_2NO_6$  [419,38 g/mol]

1,5 g 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-(β-N-phthalimidoethyl)-β-D-ribofuranose **85** (2,27mmol) wurden in abs. THF gelöst. Zu der Lösung wurden langsam 4,76ml Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (4,76mmol; 2,1eq; 1M in THF) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 20 Min. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Membranpumpenvakuum eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) aufgereinigt. Das Produkt **93** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,93g (2,22mmol; 98%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5)

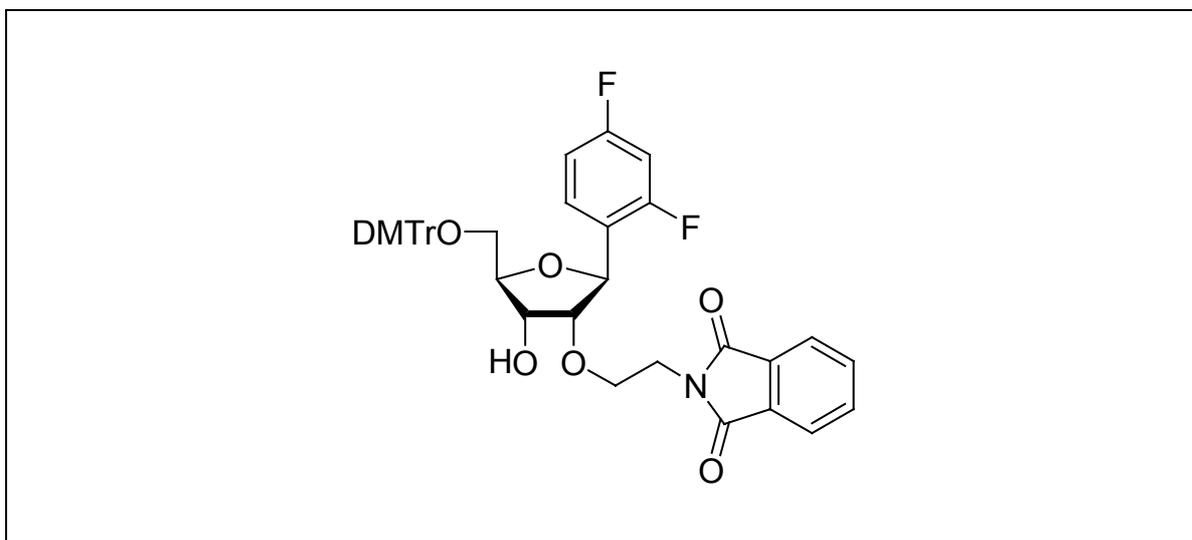
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
 7.80 (m, 4H, H<sub>phth</sub>), 7.52 (q, 1H, J = 6.8 Hz, J<sub>1,3</sub> = 15.4 Hz, H6), 6.88 (dt, 1H, J = 2.4 Hz, J<sub>1,3</sub> = 8.5 Hz, H5), 6.80 (dt, 1H, J = 1.3 Hz, J<sub>1,3</sub> = 9.5 Hz, H3), 4.89 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 5.65 Hz, H1'), 4.83 (m, 2H, 3'-OH, 5'-OH), 4.01 (q, 1H, J<sub>1,2</sub> = 5.2 Hz, J<sub>1,3</sub> = 4.9 Hz, H2'), 3.85 (m, 1H, -βCH<sub>2</sub>-), 3.75 (m,

2H, H3', - $\alpha$ CH<sub>2</sub>), 3.69-3.55 (m, 4H, - $\alpha$ CH<sub>2</sub>-, - $\beta$ CH<sub>2</sub>-, H4', H5'), 3.52 (m, 1H, H5'')

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
167.76 (CO), 161.0 (dd, C<sub>F</sub>), 158.80 (dd, C<sub>F</sub>), 134.29 (CH<sub>phth</sub>), 131.55 (C<sub>phth</sub>), 129.38 (dd, J = 4 Hz, J = 6 Hz, C6), 123.83 (C1), 123.72 (CH<sub>phth</sub>), 111.26 (d, J = 21 Hz, C5), 103.21 (t, J = 26 Hz, C3), 85.14 (C4'), 85.11 (C3'), 74.93 (C1'), 69.62 (C2'), 66.46 (C $\beta$ ), 61.41 (C5'), 37.55 (C $\alpha$ ), 17.29 (SiCHCH<sub>3</sub>), 13.64, 13.54, 12.97, 12.60 (SiCHCH<sub>3</sub>)

ESI(+)-MS: m/z 420,0 ([M+H]<sup>+</sup>)

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -N-phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **94****



C<sub>42</sub>H<sub>36</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>8</sub> [720,73 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,93g 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -N-phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **93** (2,2 mmol) wurden in 14ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 0,5ml Triethylamin (3,6 mmol) und 0,86g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (2,7mmol; 1,2eq) wurde die Reaktionslösung 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von wenigen Millilitern Methanol gestoppt. Nach Einengen

der Lösung am Rotationsverdampfer und Coevaporation mit Toluol wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) aufgereinigt. Das Produkt **94** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,20g (1,66mmol; 75%)

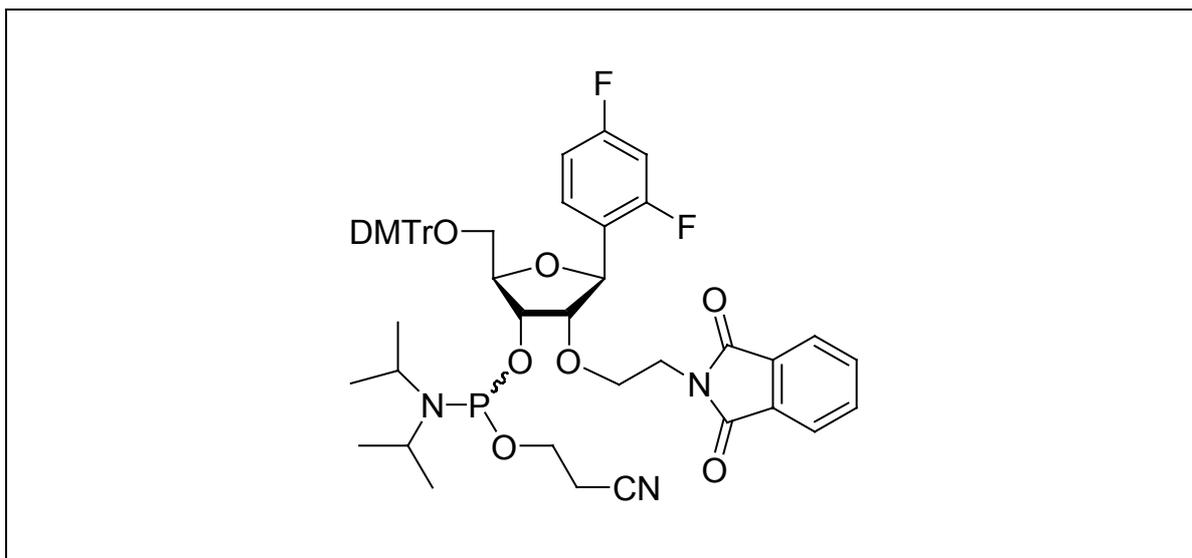
DC: R<sub>f</sub> = 0,85 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5)

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
7.75 (m, 2H, H<sub>phth</sub>), 7.60 (m, 2H, H<sub>phth</sub>), 7.50 (q, 1H, H<sub>6</sub>), 7.35 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 7.3-7.05 (m, 7H, H<sub>arom</sub>), 6.95 (t, 1H, H<sub>3</sub>), 6.70 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 6.58 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 5.06 (s, 1H, H<sub>1'</sub>), 4.05-3.93 (m, 3H, H<sub>2'</sub>, -CH<sub>2-</sub>), 3.90-3.79 (m, 3H, H<sub>3'</sub>, -CH<sub>2-</sub>), 3.67 (s, 6H, OMe), 3.59 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 3.35 (m, 1H, H<sub>5'</sub>), 3.24 (m, 1H, H<sub>5''</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  
168.74 (CO), 159.03, 158.97 (C<sub>F</sub>), 135.04 (CH<sub>phth</sub>), 132.30 (C<sub>phth</sub>), 128.55, 128.49, 128.40 (C<sub>arom.</sub>), 123.62 (CH<sub>phth</sub>), 113.85 (t, J = 27 Hz, C<sub>3</sub>), 76.11 (C<sub>1'</sub>), 70.27 (C<sub>2'</sub>), 66.92 (C<sub>β</sub>), 63.96 (C<sub>5'</sub>), 55.36 (C<sub>4'</sub>), 51.62 (C<sub>3'</sub>), 37.67 (C<sub>α</sub>), 17.07 (OMe)

ESI(+)-MS: m/z 744,2 ([M+Na]<sup>+</sup>)

**3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **95****



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 0,6g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-( $\beta$ -N-phthalimidoethyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **94** (0,83mmol) in 34ml abs. Acetonitril wurden 1,05ml sym. Collidin (8,0mmol) und 34 $\mu$ l 1-Methylimidazol (0,42mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und 0,31ml 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit (1,39mmol; 1,7eq) wurden langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 Minuten bei 0°C gerührt und durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan mehrfach extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie am Chromatotron mit dem Elutionsmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Methanol 98:2. Das Produkt **95** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,40g (0,44mmol; 53%)

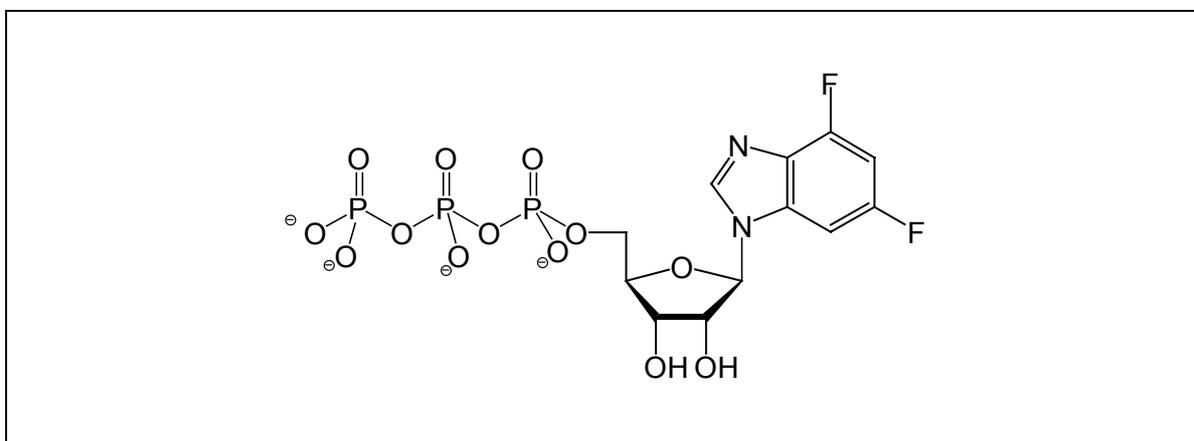
DC: R<sub>f</sub> = 0,79 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 7.80 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{pht}}$ ), 7.71 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{pht}}$ ), 7.50 (q, 1H, H6), 7.52-7.17 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.82 (m, 7H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.62 (dt, 1H,  $J = 2.0$  Hz,  $J_{1,3} = 8.4$  Hz, H3), 6.36 (dt, 1H,  $J = 0.7$  Hz,  $J_{1,3} = 10.4$  Hz, H5), 5.09 (d, 1H,  $J = 6.7$  Hz, H1'), 4.22 (m, 2H, H2', H3'), 4.0-3.87 (m, 3H, H4',  $-\text{CH}_2-$ ), 3.85 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.75 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}-$ ), 3.40 (m, 1H, H5'), 3.24 (m, 1H, H5''), 2.31 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 1.13 (m, 7H, *i*Pr), 0.98 (m, 7H, *i*Pr)

$^{31}\text{P-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
 150.81, 150.51; Verhältnis 1:2,4

ESI(+)-MS:  $m/z$  922,8 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose-5'-triphosphat 96**



$[\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_3]^{4-}$  [527,23 g/mol]

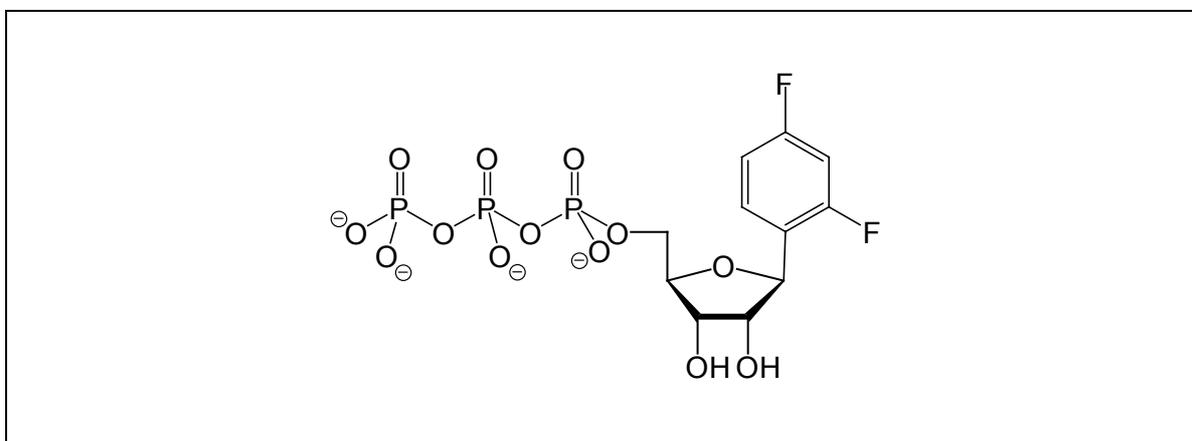
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,5g 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** (1,78mmol) wurden in 10ml Trimethylphosphat gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0°C abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 0,62g 1,8-Bis-(dimethylamino)-naphthalin und 210 $\mu$ l Phosphoroxychlorid. Anschließend wurde die Reaktion zwei Stunden bei 0°C gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde ein Gemisch aus 2,97ml Tributylamin und

9,72ml einer 0,5M Tributylammonium-pyrophosphat Lösung zugetropft, welches vor der Zugabe gut vermischt wurde. Die Reaktionslösung wurde eine Minute bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 81ml einer 1M Tributylammonium-bicarbonat-Lösung (pH7,5) gestoppt und die Lösung wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von Methylenchlorid wurde das Triphosphat ausgefällt und nach Abfiltrieren an der Lyophille getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte nach der in Kapitel 10 beschriebenen Prozedur zunächst über FPLC und anschließend über Anionenaustauscher-HPLC. Aufgrund der zahlreichen Trennschritte wurde die Gesamtausbeute an Produkt nicht bestimmt.

$^{31}\text{P}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
-9.57, -10.01 (m, 2P,  $\alpha$ -P,  $\gamma$ -P), -21.95 (m, 1P,  $\beta$ -P)

ESI(+)-MS: m/z 525,0 ( $[\text{M}+2\text{H}]^+$ )

### 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose-5'-triphosphat 97



$[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{O}_{13}\text{P}_3]^{4-}$  [487,24 g/mol]

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,5g 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- $\beta$ -D-ribofuranose **8** (1,78mmol) wurden in 13ml Trimethylphosphat gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0°C abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 0,65g 1,8-Bis-(dimethylamino)-naphthalin und 210 $\mu$ l Phosphoroxychlorid. Anschließend wurde die Reaktion zwei Stunden bei 0°C gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde ein Gemisch aus 2,97ml Tributylamin und

9,72ml einer 0,5M Tributylammonium-pyrophosphat Lösung zugetropft, welches vor der Zugabe gut vermischt wurde. Die Reaktionslösung wurde eine Minute bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 81ml einer 1M Tributylammonium-bicarbonat-Lösung (pH7,5) gestoppt und die Lösung wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von Methylenchlorid wurde das Triphosphat ausgefällt und nach Abfiltrieren an der Lyophille getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte nach der in Kapitel 10 beschriebenen Prozedur zunächst über FPLC und anschließend über Anionenaustauscher-HPLC. Aufgrund der zahlreichen Trennschritte wurde die Gesamtausbeute an Produkt nicht bestimmt.

$^{31}\text{P}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  
-9.57, -10.01 (m, 2P,  $\alpha$ -P,  $\gamma$ -P), -21.95 (m, 1P,  $\beta$ -P)

ESI(-)-MS: m/z 485,0 ([M-2H])

## 12.3 Oligonucleotidsynthese und enzymatische Assays

### 12.3.1 Eingesetzte Pufferlösungen

#### *Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)*

#### 1) Anionenaustauscher-HPLC (RNA-Aufreinigung)

Puffer A: DEPC-Wasser (pH 8,0)

Puffer B: 1M LiCl-Lösung; es wurden 42,39 g LiCl (1,0 mol) in 1000 ml DEPC-Wasser gelöst und mit LiOH oder HCl auf pH 8,0 eingestellt.

#### 2) "Reversed Phase"-HPLC (DNA-Aufreinigung)

0,1 M TEAA-Puffer: 140 ml (1,0 mol) Triethylamin wurden unter Eiskühlung mit 600 ml deionisiertem Wasser und 58 ml Essigsäure versetzt. Anschließend wurde mit deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt, der pH-Wert überprüft und mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH 7,0 eingestellt. Die so erhaltene Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:10 verdünnt und der pH-Wert überprüft.

#### *UV/VIS-Spektroskopie*

Phosphatpuffer: 100 ml des Natriumphosphatpuffers wurden durch Lösen von 207 mg *di*-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (0,577 mmol), 66 mg Natriumdihydrogenphosphat (0,423 mmol) und 818 mg Natriumchlorid (14,0 mmol) in 100 ml DEPC-Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

#### *DEPC-Wasser*

1 ml Diethylpyrocarbonat wurde zu 1000 ml deionisiertem Wasser gegeben und für 12h stehen gelassen. Die Lösung wurde danach 60 min bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit ges., wässriger steriler LiOH-Lösung auf pH 8,0 eingestellt

### *Circular-Dichroismus-Spektroskopie*

Zur Aufnahme der CD-Spektren der RNA 12mere wurde derselbe Puffer verwendet wie für die UV/VIS-spektroskopischen Messungen.

### *Ribozym katalysierte Spaltungsreaktionen*

Zur Durchführung der Ribozym katalysierten Spaltungen wurde ein  $Mg^{2+}$ -haltiger Puffer verwendet. Der 5x-Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 10 mM  $MgCl_2$ , 0,01% SDS. Zur Reaktion wurden bei 10  $\mu$ l Reaktionsvolumen 2  $\mu$ l des Puffers pipettiert.

### *Stopp-Puffer*

Zum Beenden der Ribozym katalysierten Spaltungsreaktionen wurde ein Stopp-Puffer aus Formamid mit 0,1% Dextranblau verwendet.

### *Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)*

Boratpuffer (TBE): 54,5 g Tris, 27,5 g Borsäure und 3,7 g EDTA-Dinatriumsalz wurden in einem Liter DEPC-Wasser gelöst. Zur Verwendung als Laufpuffer (1xTBE) wurde die Lösung 1:5 verdünnt.

### *Reverse Transkriptase-Assay*

Die Reverse Transkription wurde in 1x "*First Strand*"-Puffer durchgeführt, welcher aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75mM KCl und 3 mM  $MgCl_2$  besteht.

### *Transkriptionspuffer*

Der verwendete 5x Transkriptionspuffer wurde mit der T7 RNA Polymerase von Promega geliefert. Der Puffer setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 400 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 120 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin, 200 mM DTT.

### *Ladungspuffer*

Der RNA-Ladungspuffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht aus folgenden Komponenten: 50% Glycerol, 1mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau und 1mg/ml Ethidiumbromid

## **12.3.2 *Synthese, Aufreinigung und Analytik der Oligonucleotide***

Die Festphasensynthese der Oligonucleotide wurde wie in Kapitel 7 beschrieben durchgeführt. Während die RNA-Oligonucleotide *DMTr-off* synthetisiert wurden, wurde bei der DNA-Synthese die terminale Trityl-Schutzgruppe nicht abgespalten.

### *Aufreinigung der RNA-Oligonucleotide*

Als präparative Säule wurde eine Dionex NucleoPac™ PA100 Säule (250 × 9 mm) mit einer Flussrate von 5 ml/min. benutzt. Es wurden lineare Gradienten verwendet (Puffer A: DEPC-Wasser (pH 8,0); Puffer B: 1 M LiCl (pH 8,0)). Die Gradienten wurden so gewählt, dass das Oligoribonucleotid jeweils nach ca. 15-20 Minuten von der Säule eluiert wurde. Löste sich das Oligonucleotid nicht vollständig in DEPC-Wasser, wurden einige Tropfen 1-Methyl-2-pyrrolidinon zugegeben. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Entsalzung der Proben fand wie in Kapitel 7.1 und Kapitel 9.1 beschrieben statt.

### Verwendete Gradienten:

für die RNA 12mere: 0-70% Puffer B in A in 40 Min.

für Cy5-gelabelte Substrate: 0-60% Puffer B in A in 35 Min.

für Hammerhead-Ribozyme: 0-100% Puffer B in A in 35 Min.

### *Aufreinigung der DNA-Oligonucleotide*

Die entschützten Roholigonucleotide wurden mittels semipräparativer RP-HPLC aufgereinigt. Hierzu wurde eine DMTr-spezifische POROS-R3 Säule der Firma PerSeptive Biosystems eingesetzt. Die nach der Filtration erhaltenen Lösungen konnten dabei direkt auf die Säule aufgegeben werden. Es wurde jeweils ein linearer Gradient von 0-60% Acetonitril in TEAA-Puffer (pH 7,0) in 10 Minuten bei einer Flussrate von 5 ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte jeweils bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur an einer SpeedVac Anlage abdestilliert. Die DMTr-Schutzgruppe wurde bei Raumtemperatur durch Zugabe von 500  $\mu$ l 80%iger Essigsäure abgespalten. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Essigsäure im Vakuum abgezogen (SpeedVac). Die Abtrennung der abgespaltenen DMTr-Gruppe erfolgte mittels Fällung. Dafür wurde das Oligonucleotid in 1 ml 10 M Ammoniumacetat-Lösung gelöst und durch Zugabe von 3 ml Ethanol gefällt. Die Fällung wurde durch zweistündiges Kühlen auf  $-80^{\circ}\text{C}$  vervollständigt. Das ausgefallene Produkt wurde in einer Kühlzentrifuge bei 12500 rpm innerhalb von 10 min pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert.

### *OD-Bestimmung*

Das aufgereinigte und entsalzte Oligonucleotid wurde in 1ml dest. DEPC-Wasser gelöst. Es wurden 10  $\mu$ l entnommen und in einer 10 mm Quarzküvette mit dest. Wasser (Wasser mit DEPC behandelt) auf 1000  $\mu$ l aufgefüllt. Die Extinktion (engl.: *absorbance*) oder optische Dichte wurde bei 260 nm gemessen. Der am Gerät angezeigte Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert. Das Ergebnis ist die Ausbeute in  $\text{OD}_{260}$ -Einheiten. Diese lässt sich mittels des molaren Extinktions-

koeffizienten  $\varepsilon$  in die Konzentration umrechnen. Der molare Extinktionskoeffizient von Oligonucleotiden kann aus den bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nucleotide bestimmt werden.

Eine exakte Methode zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten berücksichtigt die Wechselwirkung der Chromophore mit ihren nächsten Nachbarn (Puglisi, 1989; Gray, 1995). Diese bewirkt, dass der Extinktionskoeffizient eines Dinucleotids nicht der Summe der Einzelnucleotide entspricht. Der Extinktionskoeffizient ergibt sich aus zweimal der Summe aller im Oligonucleotid vorkommenden Dimere minus der Summe aller Mononucleotide, ohne die beiden endständigen Nucleotide.

Die Konzentration der Oligonucleotid-Lösung kann somit aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz mittels der gemessenen OD-Zahl, der Schichtdicke  $d$  und des berechneten Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  berechnet werden:

$$c = OD_{260} / \varepsilon * d$$

Da die Extinktionskoeffizienten für die fluorierten Purin- und Pyrimidin-analogen Bausteine nicht bestimmt wurden, wurde in diesen Fällen mit den Werten für Guanosin bzw. Uridin gerechnet.

#### *Massenspektrometrie: MALDI-TOF MS*

Diese Methode wurde fast zeitgleich von Karas und Hillenkamp sowie Tanaka eingeführt (Karas, 1988; Tanaka, 1988). Bei dieser Methode wird das Oligonucleotid mit einer Matrix, die im  $10^4$  fachen Überschuss vorliegt, cokrystallisiert und anschließend mit einem IR- oder UV-Laserpuls im Hochvakuum des Spektrometers beschossen. Häufig verwendete Matrixsubstanzen für Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm sind 2,4,6-Trihydroxyacetophenon oder 3-Hydroxypicolinsäure. Als gepulste Desorptions-/Ionisationsmethode wird MALDI häufig mit einem Flugzeit-Massenspektrometer (TOF: *time of flight*) kombiniert, in dem alle Ionen in einem elektrischen Feld mit der gleichen Energie beschleunigt und gemäß ihres Masse-/Ladungsverhältnisses zeitgleich aufgetrennt werden. Diese Methode ist gegenüber der ESI-Massenspektrometrie weniger empfindlich gegenüber

angelagerten Salzen. Die in dieser Arbeit aufgenommenen Spektren wurden mit Matrix unterstützter Laserdesorption-/Ionisation- Massenspektrometrie (MALDI) auf einem Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) der Firma Fisons entweder im linearen oder im Reflectronmodus gemessen.

Die gemessenen Massen der Oligonucleotide sind in folgender Tabelle aufgeführt (*Tabelle 16*). Die gefundenen Massen stimmten im Allgemeinen sehr gut mit den berechneten Massen überein. Bei den Cy5-markierten Substraten **S8** und **S13** ist während der Messung der Fluoreszenzfarbstoff abgespalten worden. Da am PA-Gele im ALF-Express-System die Substrate einwandfrei detektiert wurden, war die Abspaltung des Cy5 messtechnisch bedingt.

*Tabelle 16: Übersicht der berechneten sowie durch MALDI-TOF-MS gemessenen Molekülmassen der synthetisierten Oligonucleotide; Salzaddukte: \* = Na<sup>+</sup>, # = NH<sub>4</sub><sup>+</sup>*

Oligonucleotid	Masse (Exp.)	Masse (ber.)
<b>S1</b>	3609,58	3609,11
<b>S2</b>	3691,55	3691,45
<b>S3</b>	3673,37 <sup>#</sup>	3654,19
<b>S4</b>	3937,33	3936,52
<b>S5</b>	3949,88	3912,50
<b>S6</b>	3949,40	3952,55
<b>S7</b>	3909,64	3913,51
<b>S8</b>	6477,00	6895,00
<b>R1</b>	11903,00	11895,22
<b>R2</b>	11921,37	11914,21
<b>R3</b>	11897,00 <sup>#</sup>	11882,34
<b>R4</b>	11939,00 <sup>*</sup>	11916,22
<b>R5</b>	11938,57 <sup>#</sup>	11910,00

<b>Oligonucleotid</b>	<b>Masse (Exp.)</b>	<b>Masse (ber.)</b>
<b>R6</b>	9922,75	9919,07
<b>R7</b>	10492,34	10493,35
<b>R8</b>	8619,26	8618,27
<b>R9</b>	10222,93	10225,24
<b>S9</b>	4956,10*	4935,04
<b>S10</b>	5929,76 <sup>#</sup>	5914,64
<b>R10</b>	10286,71	10287,30
<b>R11</b>	10248,53	10250,04
<b>S11</b>	5960,10*	5937,67
<b>S12</b>	5931,93 <sup>#</sup>	5913,64
<b>S13</b>	5441,78	5953,67
<b>S15</b>	6273,43 <sup>#</sup>	6254,77
<b>S16</b>	9367,25	9366,80
<b>S19</b>	6585,43 <sup>#</sup>	6567,99
<b>S17</b>	9369,86	9368,81
<b>S18</b>	9406,01	9408,83
<b>S20</b>	5135,04	5137,44

### 12.3.3 *UV/VIS-Spektroskopie der Oligonucleotide*

Die UV-Schmelzkurven wurden in einem Zweistrahl UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit Peltier-gesteuertem, thermostatisierbarem Küvettenhalter gemessen. Als Puffer diente ein Phosphat-Puffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat. Das verwendete Wasser war mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Dazu wurde eine 0,1 %ige Lösung angesetzt, über Nacht bei RT stehen gelassen und anschließend 60 Minuten autoklaviert. Zur Messung wurde eine Referenzküvette der Schichtdicke 1 cm mit 1 ml des Puffers gefüllt und in den Referenzstrahl gestellt. Die Probenküvette gleicher Schichtdicke wurde mit dem gleichen Puffer befüllt und nach Einbringen in den Strahlengang wurde ein Nullabgleich bei 350 nm durchgeführt. Nun wurde eine Konzentration von je 2  $\mu\text{M}$  der beiden Stränge, die den Duplex bilden in die Probenküvette pipettiert. Vor Beginn der Messung wurden die Küvetten mit Teflon-Deckeln fest verschlossen, um ein Verdampfen des Lösungsmittels während der Messung zu verhindern. Die Messung begann mit einer Denaturierung. Dazu wurden die Küvetten für 10 Min. auf 80°C erhitzt und anschließend mit 5°C/Min. renaturiert. Es wurde auf die Starttemperatur (5°C bzw. 10°C) abgekühlt und die Temperatur für 10 Minuten gehalten. Die nun folgende Aufnahme der Schmelzkurve bei 260 nm (Nullabgleich ebenfalls bei 260 nm) wurde mit einer Heizrate von 0,5°C/min. durchgeführt. Alle 30 Sekunden wurde ein Datenpunkt registriert. Als Temperatur wurde die Temperatur des Probenblocks des Spektrometers angegeben. Nach beendeter Messung wurden die Daten automatisch aufgezeichnet und die Probe auf 20°C abgekühlt. Alle Messungen wurden mindestens als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für alle Messungen unterhalb 20°C wurde die Küvettenkammer mit Stickstoff gespült, um Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenoberflächen zu vermeiden.

### 12.3.4 *CD-Spektroskopie der Oligonucleotide*

Die CD-Spektren wurden mit einem JASCO J-710 Spektropolarimeter aufgenommen, das mit einem thermostatisierten (Neslab RTE-100) Küvettenhalter ausgerüstet war.

Dazu wurde jeweils 1/5 der Probe, die zuvor in der UV-Spektroskopie untersucht worden war, eingesetzt. Zur Messung der Wellenlängen abhängigen Spektren wurden jeweils fünf Spektren im Bereich von 350 nm bis 210 nm akkumuliert. Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: Auflösung 0,2 nm, Abtastgeschwindigkeit ("*scan speed*") 50 nm/min., "*response*" 1 Sek. und Bandweite 1,0 nm. Von den so aufgenommenen Spektren wurde immer das bei gleicher Temperatur registrierte Spektrum des Puffers subtrahiert. Anschließend wurden die erhaltenen Kurven per Software geglättet ("*noise reduction*").

### 12.3.5 Analysen am ALF Express<sup>®</sup> DNA Sequencer

#### *ALF Express<sup>®</sup> DNA Sequencer*

Die kinetischen Analysen der Ribozym katalysierten Spaltungen wurden einem ALF<sup>™</sup> Express System der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 16%iges PAA-Gel (7M Harnstoff) geladen und bei 667nm detektiert. Das Trennung der Oligonucleotide auf dem Gel erfolgte bei max. 1500V und 60mA und bei konstant 30W bei 55°C. Das Detektionsintervall der Laserdioden betrug 2 Sek.

#### *Basenhydrolyse*

Zur Basenhydrolyse eines Cy5-markierten RNA-Stranges wurden 2ng des Oligonucleotids in 4µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 400µl 200mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (pH11) wurde die Reaktionslösung 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2µl 1M Essigsäure gestoppt und mit Formamid/Dextranblau versetzt.

### 12.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### *Polymerase-Assay*

Zur Synthese des modifizierten Transkripts wurden zunächst 100 µg/ml des Promoter/Templat-Komplex verwendet. Als Puffersystem diente 80 mM HEPES-KOH (pH 7,5) mit 12 mM MgCl<sub>2</sub> und in Anwesenheit von 2 mM Spermidin. Die Konzentration an Ribotriphosphat beträgt jeweils 3 mM. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Polymerase-Reaktion durch Zugabe von Formamid gestoppt.

#### *RNAseH-Verdau*

Zum Nachweis des DNA-RNA-Hybrids, welches bei der Transkription mit T7 RNA Polymerase entstanden ist, wurde mit 10 µl des Transkriptionsansatzes ein RNAseH-Verdau durchgeführt. Die RNAse H wurde 1:10 im Enzympuffer verdünnt. Der enzymatische Verdau des Transkripts wurde mit 1 U bzw. 5 U RNAse H durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach 30 bzw. 60 Minuten durch Zugabe von Formamid gestoppt.

#### *Analytisches PA-Gel*

Die analytischen Gele wurden aus einer 40%igen Acrylamid-Stammlösung, 5×TBE-Puffer, Harnstoff und DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt. Mit dieser Zusammensetzung erhielt man 16%ige Polyacrylamid-Gele. Nach vollständigem Lösen des Harnstoffes wurde die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und einer 10%igen, wässrigen APS-Lösung gestartet. Die Lösung wurde sofort blasenfrei zwischen zwei 10×10 cm große, sterile Glasplatten gegossen. Nach Auftragung der Proben lief das Gel bei 250V und 6A mit einer Laufzeit von einer Stunde in 1×TBE-Puffer.

- Boratpuffer (TBE): 54,5g Tris, 27,5g Borsäure und 3,7g EDTA-Dinatriumsalz wurden in einem Liter DEPC-Wasser gelöst. Zur Verwendung als Laufpuffer (1×TBE) wurde die Lösung 1:5 verdünnt.
- 40% Acrylamid-Stammlösung: 400 g Acrylamid und 20 g *N,N'*-Methylen-bis-acrylamid wurden in 580 ml bidest. Wasser gelöst.

Die Banden der Oilgonucleotide können mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Dabei wurde das Gel für 10 min in einer 20%igen Trichloressigsäure-Lösung geschwenkt und anschließend zweimal für je 5 min mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit einer 0,1%igen Silbernitratlösung für ca. 20 min behandelt, mit Wasser das Silbernitrat ausgewaschen und mit einer Entwickler-Lösung (3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 64 µl 37%iges Formaldehyd in 125 ml Wasser) bis zur gewünschten Schwarzfärbung der Banden entwickelt. Die Färbung wurde durch Einlegen des Gels in 1%ige Essigsäure gestoppt. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wurde das Gel in Folie eingewickelt.



# 13

## Literatur

**Altman, S.;** Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N. "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme" *Cell* **1983**, *35*, 849-857

**Amarzguioui, M.;** Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H. "Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA" *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (2), 589-595

**Amberg, S.** "Synthese und Eigenschaften unpolarer Rückgrat modifizierter DNA sowie deren Anwendung als Antisense-Oligonucleotide gegen Hepatitis C Virus RNA" *Dissertation* **2003**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Avery, O. T.;** MacLeod, C. M.; McCarthy, M. "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcus type III" *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158

**Bartel, D. P.** "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function" *Cell* **2004**, *116*, 281-297

**Bassi, G. S.;** Murchie, A. I. H.; Walter, F.; Clegg, R. M.; Lilley, D. M. J. "Ion-Induced Folding of the Hammerhead Ribozyme: A Fluorescence Resonance Energy Transfer Study" *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 7481-7489

**Batey, R. T.;** Rambo, R. T.; Doudna, J. A. "Tertiäre Motive bei Struktur und Faltung von RNA" *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2472-2491

**Batey, R. T.;** Williamson, J. R. "Effects of polyvalent cations on the folding of an rRNA three way junction and binding of ribosomal protein S15" *RNA*, **1998**, *4*, 984-997

**Bats, J. W.;** Parsch, J.; Engels, J. W. "1-Deoxy-1-(4-fluorophenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose, its hemihydrate, and 1-deoxy-1-(2,4-difluorophenyl)- $\beta$ -D-ribofuranose: Structural evidence for intermolecular C-H...F-C interactions" *Acta Cryst. C* **2000**, *56*, 201-205

**Beaucage, S. L.;** Caruthers, M.H. "Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis" *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862

**Beier, M.;** Pfeleiderer, W. "Phthaloyl Strategy: A New Concept of Oligonucleotide Synthesis" *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 633-644

**Beier, M.;** Pfeleiderer, W. "Pyridinium Salts - An Effective Class of Catalysts for Oligonucleotide Synthesis" *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 879-887

**Beigelman, L.;** McSwiggen, J. A.; Draper, K.G.; Gonzalez, C.; Jensen, K.; Karpeisky, A. M.; Modak, A. S.; Matulic-Adamic, J.; Di Renzo, A. B.; Haerberli, P.; Sweedler, D.; Tracz, D.; Grimm, S.; Wincott, F. E. " *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25702-25708

**Berger, M.;** Wu, Y.; Ogawa, A. K.; McMinn, D. L.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. "Universal Bases for hybridization, replication and chain termination" *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2911-2914

**Bergstrom, D. E.;** Zhang, P. M.; Toma, P. H.; Andrews, P. C. Nichols, R. "Synthesis, structure and biochemical applications of a universal nucleic acid-spacer – 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole" *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1993**, *206* (2), 308

**Bergstrom, D. E.;** Zhang, P. M.; Toma, P. H.; Andrews, P. C. Nichols, R. "Synthesis, structure and nucleic acid sequencing with a universal base: 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1201-1209

**Blackburn, G. M.;** Gait, M. J. "Nucleic Acids in Chemistry and Biology" *IRL Press* **1992**, ISBN 0-19-963121-2

**Blaese, R. M.;** Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, T.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F. "T lymphocyte directed gene transfer for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years" *Science* **1995**, *270*, 475-480

**Blake, R. D.;** Massoulié, J.; Fresco, J. R. "Polynucleotides. 8. A spectral approach to the equilibria between polyriboadenylate and polyribouridylate and their complexes" *J. Mol. Biol.* **1967**, *30* (2), 291-308

**Blommers, M. J. J.;** Natt, F.; Jahnke, W.; Cuenoud, B. "Dual Recognition of Double-Stranded DNA by 2'-Aminoethoxy-Modified Oligonucleotides: The Solution Structure of an Intramolecular Triplex Obtained by NMR Spectroscopy" *Biochemistry* **1998**, *37*, 17714-17725

**Bonacchio, M.;** Credali, A.; Peracchi, A. "Kinetic and thermodynamic characterization of the RNA-cleaving 8-17 deoxyribozyme" *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (3), 916-925

**Braithwaite, D. K.;** Ito, J. "Compilation , Alignment and phylogenetic relationships of DNA polymerases" *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 787-802

**Brantl, S.** "Antisense-RNA regulation and RNA interference" *Biochim. et Biophys. Acta* **2002**, *1575*, 15-25

**Broom, A. D.;** Robins, R. K. "The Direct Preparation of 2'-O-Methyladenosine from Adenosine 1." *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1145-1146

**Brotschi, C.;** Häberli, A.; Leumann, C. J. "Ein stabiler DNA-Duplex mit einem nichtwasserstoffverbrückenden, nichtformkomplementären Basenpaar: Interstrang-Stapelwechselwirkungen als stabilitätsbestimmender Faktor" *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3101-3103

**Brown, D. M.;** Todd, A. R. "Nucleosides, part X. Some observations on structure and chemical behaviour of nucleic acids" *J. Chem. Soc.* **1952**, 52-58

**Brückner, C.;** Holzinger, H.; Reissig, H. U. "Diastereoselective syntheses of highly substituted methyl tetrahydrofuran-3-carboxylates by reactions of lactols with silylated nucleophiles" *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2450-2456

**Burgess, K.;** Cook, D. "Syntheses of nucleoside triphosphates" *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047-2059

**Burgin Jr., A. B.;** Gonzalez, C.; Matulic-Adamic, J.; Karpeisky, A. M.; Usman, N.; McSwiggen, J. A.; Beigelman, L. "Chemically Modified Hammerhead Ribozymes with Improved Catalytic Rates" *Biochemistry* **1996**, *35*, 14090-14097

**Burlina, F.;** Favre, A.; Furrey, J.-L. "Chemical engineering of RNase resistant and catalytically active hammerhead ribozymes" *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1999-2010

**Caruthers, M. H.;** Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Dodds, D. R.; Fisher, E. F.; McBride, L. J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J.-Y. "Chemical synthesis of deoxynucleotides by the phosphoramidite method" *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313

**Caselmann, W. H.;** Eisenhardt, S.; Alt, M. "Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides as Potential Drugs against Hepatitis C" *Intervirology* **1997**, *40*, 394-399

**Cech, T. R.;** Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E. "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*" *Cell* **1982**, *31* (1), 147-57

**Chapman, K. B.;** Szostak, J. W. "In vitro selection of catalytic nucleic acids" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 618-622

**Chargaff, E.** "Structure and function of nucleic acids as cell constituents" *Fed. Proc.* **1951a**, *10*, 654-659

**Chargaff, E.** "Some recent studies on the composition and structure of nucleic acids" *Nature* **1951b**, *38* (S1), 41-59

**Chattopadhyaya, J.;** Nyils, A. "Synthesis of O<sup>2'</sup>-methyluridine, O<sup>2'</sup>-methylcytidine, N<sup>4</sup>, O<sup>2'</sup>-dimethylcytidine and N<sup>4</sup>, N<sup>4</sup>, O<sup>2'</sup>-trimethylcytidine from a common intermediate" *Acta Chem. Scand.* **1986**, *B40*, 826-830

**Chattopadhyaya, J.;** Velikyan, I.; Acharya, S.; Trifonova, A.; Földesi, A. "The pKa's of 2'-hydroxyl group in nucleosides and nucleotides" *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2893-2894

**Chiaramonte, M.;** Moore, C. L.; Kincaid, K.; Kuchta, R. D. "Facile Polymerization of dNTPs Bearing Unnatural Base Analogues by DNA Polymerase  $\alpha$  and Klenow Fragment (DNA Polymerase I)" *Biochemistry* **2003**, *42*, 10472-10481

**Chow, S.;** Wen, K.; Sanghvi, S.; Theodorakis, E. A. "Novel Synthesis of 2'-O-methylguanosine" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1631-1634

**Coe, P. L.;** Waring, A. J.; Yarwood, T. D. "The lithiation of fluorinated benzenes and its dependence on solvent and temperature" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 2729-2737

**Coffin, J. M.;** Hughes, S. H.; Varmus, H. E. "Retroviruses" *CSHL Press* **1997**, Cold Spring Harbor, NY

**Corey, D. R.;** Braasch, D. A. "Novel Antisense and Peptide Nucleic Acid Strategies for Controlling Gene Expression" *Biochemistry* **2002**, *41* (14), 4503-4510

**Couzin, J.** "Breakthrough of the Year: Small RNAs Make Big Splash" *Science* **2002**, *298*, 2296

**Crick, F. H. C.** "On protein synthesis" *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138-163

**Crooke, S. T.** "Molecular mechanisms of action of antisense drugs" *Biochim. et Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 31-44

**Crooke, S. T.** "Progress in Antisense Technology: the End of the Beginning" *Methods Enzymol.* **2000**, *313*, 2-45

**Cuenoud, B.;** Casset, F.; Hüsken, D.; Natt, F.; Wolf, R. M.; Altmann, K.-H.; Martin, P.; Moser, H. E. "Zweifache Erkennung von doppelsträngiger DNA durch 2'-Aminoethoxy-modifizierte Oligo-nucleotide" *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1350-1353

**Dahm, S. C.;** Derrick, W. B.; Uhlenbeck, O. C. "Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism" *Biochemistry* **1993**, *32*, 13040-13045

**De Mesmaeker, A.;** Häner, R.; Martin, P.; Moser, H. E. "Antisense Oligonucleotides" *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 366-374

**Desjardins, J. P.;** Sproat, B. S.; Beijer, B.; Blaschke, M.; Dunkel, M.; Gerdes, W.; Ludwig, J.; Reither, V.; Rupp, T.; Iversen, P. L. "Pharmacokinetics of a synthetic chemically modified hammerhead ribozyme against the rat cytochrome" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 1181-1190

**Doherty, E. A.;** Doudna, J. A. "Ribozyme Structures and Mechanisms" *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 597-615

**Doublié, S.;** Tabor, S.; Long, A.; Richardson, C.; Ellenberger, T. "Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2Å resolution" *Nature* **1998**, *391*, 251-258

**Draper, D. E.** "A guide to ions and RNA structure" *RNA* **2004**, *10*, 335-343

**Dunitz, J. D.** "Organic Fluorine: Odd Man Out" *ChemBioChem* **2004**, *5* (5), 614-621

**Eckstein, F.** "Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: What Is Their Origin and What Is Unique About Them?" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 117-121

**Eckstein, F.;** Bramlage, B. "The Hammerhead Ribozyme" *Biopolymers* **2001**, *52*, 147-154

**Edelhoch, H.;** Osborne, J. C. Jr. "The thermodynaminc basis of the stability of proteins, nucleic acids, and membranes" *Adv. Protein Chem.* **1976**, *30*, 183-250

**Edgell, W. F.** and Parts, L. "Synthesis of Alkyl and Substituted Alkyl Fluorides from *p*-Toluenesulfonic Acid Esters. The Preparation of *p*-Toluenesulfonic Acid Esters of Lower Alcohols" *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4899-4902

**Elbashir, S. M.;** Lendeckel, W.; Tuschl, T. "RNA interference and small interfering RNAs" *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188-200

**Engels, J. W.** "Krankheit – Fehler in der Informationsübertragung" *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39* (11), 1250-1254

**Engels, J. W.;** Parsch, J. "Nucleic Acid Drugs" *Molecular Biology in Medicinal Chemistry, Wiley-VCH*, Hrsg.: Dingermann, T.; Steinhilber, D.; Folkers, G.; Weinheim, **2004**, 153-178

**Engels, J. W.;** Uhlmann, E. "Pharmaceutical Aspects of Oligonucleotides" Taylor & Francis Inc. **2000**, 35-79

**Famulok, M.** "Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules " *Curr. Opin. Strut. Biol.* **1999**, 9, 324-329

**Fattal, E.;** Vauthier, C.; Aynie, I.; Nakada, Y.; Lambert, G.; Malvy, C.; Couvreur, P. "Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticels for the delivery of oligonucleotides" *J. Contr. Rel.* **1998**, 53, 137-143

**Faulstich, K.;** Wörner, K.-H.; Brill, H.; Engels, J. W. "A Sequencing Method for RNA Oligonucleotides Based on Mass Spectroscopy" *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4349-4353

**Felgner, P. L.;** Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. "Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 7413-7417

**Ferré-d'Ámaré, A. R.** "The Haipin Ribozyme" *Biopolymers* **2003**, 73, 71-78

**Finger, G. C.;** Reed, F. H.; Finnerty, J. L. "Aromatic fluorine compounds. V. 1,3,5-Trifluorobenzene" *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 153-155

**Fire, A.;** Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*" *Nature* **1998**, 391, 744-745

**Flint, J. S.;** Enquist, L. W.; Krug, R. M.; Racaniello, V.; Shalka, A. M. "Principles of Virology – Molecular Biology, Pathogenesis and Control" *American Society for Microbiology* **1999**

**Franklin, R. E.;** Gosling, R. G. "Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate" *Nature* **1953**, 171, 740-741

**Frantz, S.** "RNA Interference: Eight Steps to silence" *Nature Reviews Drug Dsccovery* **2004**, 3 (3), 204

**Frauendorf, A.;** Engels, J. W. "Automated synthesis, structure and biological activity of backbone modified Oligonucleotides. The Antisense Approach" *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier **1993**, Hrsg. Atta-ur-Rahman, 13, 257-294

**Furukawa, Y.;** Kobayashi, K.; Kanai, Y.; Honyo, M. "Synthesis of 2'-O-methyluridine, 2'-O-methylcytidine and their relating compounds" *Chem. Pharm. Bull.* **1965**, *13*, 1273-1278

**Furusawa, K.;** Sekine, M.; Limura, S. "Synthesis of a New Class of 2'-Phosphorylated Oligoribonucleotides Capable of Conversion to Oligoribonucleotides" *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3204 -3208

**Gallo, R.** "The early years of HIV/AIDS" *Science* **2002**, *298*, 1728-1730

**Gallo, R. C.;** Salahuddin, S. Z.; Popovic, M.; Shearer, G. M.; Kaplan, M.; Heynes, B. F.; Palker, T. J.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B. *et al.* "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risc for AIDS" *Science* **1984**, *224*, 500-503

**Gasparutto, D.;** Livache, T.; Bazin, H.; Dupla, A.M.; Guy, A.; Khorlin, A.; Molko, D.; Roget, A.; Teoule, R. "Chemical synthesis of a biologically active natural t-RNA with its minor bases" *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5152-5166

**Gessner, R. V.;** Frederick, C. A.; Quigley, G. J.; Rich, A.; Wang, A. W.-J. "The Molecular Structure of the Left-handed Z-DNA Double Helix at 1.0-Å Atomic Resolution" *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (14), 7921-7935

**Gewirtz, A. M.;** Sokol, D. L.; Ratajczak, M. Z. "Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects" *Blood* **1998**, *92*, 712-736

**GlaxoSmithKline,** "Informationen zum HI-Virus" [www.hiv-info.de](http://www.hiv-info.de), **2004**

**Gray, D. M.;** Hung, S. H.; Johnson, K. H. "Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes" *Methods Enzymology* **1995**, *246*, 19-34

**Gray, D. M.;** Ratliff, R. L.; Vaughan, M. R. "Circular dichroism spectroscopy of DNA" *Methods in Enzymology* **1992**, *211*, 389-406

**Griffey, R. H.;** Monia, B. P.; Cummins, L. L.; Freier, S.; Greig, M. J.; Guinosso, C. J.; Lesnik, E.; Manalili, S. M.; Mohan, V.; Owens, S.; Ross, B. R.; Sasmor, H.; Wancewicz, E.; Weiler, K.; Wheeler, P. D.; dan Cook, P. "2'-O-Aminopropyl Ribonucleotides:

A zwitterionic modification that enhances the exonuclease resistance and biological activity of antisense oligonucleotides" *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5100-5109

**Grillone, R. L.;** Lanz, R. "Fomivirsen" *Drugs of today* **2001**, *37*, 245-255

**Groetli, M.;** Beijer, B.; Sproat, B. "2'-O-(Carbamoylmethyl)oligoribonucleotides" *Tetrahedron* **1999**, *55* (14), 4299-4314

**Gruber, H. J.;** Kada, G.; Pragl, B.; Riener, C.; Hahn, C. D.; Harms, G. S.; Ahrer, W.; Dax, T. G.; Hohenthanner, K.; Knaus, H.-G. "Preparation of Thiol-Reactive Cy5 Derivatives from Commercial Cy5 Succinimidyl Ester" *Bioconjugate Chem.* **2000a**, *11*, 161-166

**Gruber, H. J.;** Hahn, C. D.; Kada, G.; Riener, C. K.; Harms, G. S.; Ahrer, W.; Dax, T. G.; Knaus, H.-G. "Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and C3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin" *Bioconjugate Chem.* **2000b**, *11*, 696-704

**Guckian, K. M.;** Schweitzer, B. A.; Ren, R. X.-F.; Sheils, C. J.; Paris, P. L.; Tahmassebi, D. C.; Kool, E. T. "Experimental measurement of aromatic stacking affinities in the context of duplex DNA" *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8182-8183

**Guckian, K. M.;** Schweitzer, B. A.; Ren, R. X.-F.; Sheils, C. J.; Tahmassebi, D. C.; Kool, E. T. "Factors contributing to aromatic stacking in water: evaluation in the context of DNA" *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2213-2222

**Hahn, R.C.** and Tompkins, J. "Homogeneous Nucleophile Exchange. 2. Silver-Free, Direct Synthesis of Primary Alkyl Sulfonates from Alkyl Halides" *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5783-5785

**Hakimelahi, G. H.;** Proba, Z. A.; Ogilvie, K. K. "New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleosides" *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1106-1113

**Hammann, C.;** Lilley, D. M. J. "Folding and Activity of the Hammerhead Ribozyme" *ChemBioChem* **2002**, *3*, 690-700

**Hanessian, S.;** Liak, T. J.; Vanasse, B. "Facile cleavage of benzyl ethers by catalytic transfer hydrogenation" *Synthesis* **1981**, 396-397

**Hannon, G.J.** "RNA Interference" *Nature* **2002**, 418, 244-251

**Hartmann, G.;** Endres, S. "Therapeutische Oligonucleotide" *Deutsches Ärzteblatt* **2003**, 100 (47), A3102-A3108

**Haseloff, J.;** Gerlach, W. L. "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities" *Nature* **1988**, 334 (6183), 585-591

**Hashimoto, H.;** Nelson, M.G.; Switzer, C. "Formation of chimeric duplexes between zwitterionic and natural DNA" *J. Org. Chem.* **1993a**, 58, 4194-4195

**Hashimoto, H.;** Nelson, M.G.; Switzer, C. "Zwitterionic DNA" *J. Am. Chem. Soc.* **1993b**, 115, 7128-7134

**Heath, P.;** Mann, J.; Walsh, E. B.; Wadsworth, A. H. "The preparation of dioxaprostacyclin analogues from D-(-)-ribose" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 2675-2679

**Heidenreich, O.;** Benseler, F.; Fahrenholz, A.; Eckstein, F. "High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates" *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2131-2138

**Heidenreich, O.;** Eckstein, F. "Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1" *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 1904-1909

**Heidenreich, O.;** Pieken, W.; Eckstein, F. "Chemically modified RNA: approaches and applications" *Faseb J.* **1993**, 7, 90-96

**Hendrix, C.;** Rosemeyer, H.; de Bouvere, B.; van Aerschot, A.; Seela, F.; Herdewijn, P. "1',5'-Anhydrohexitol oligonucleotides: hybridization and strand displacement with oligoribonucleotides, interaction with RNase H and HIV-reverse transcriptase" *Chemistry Eur. J.* **1997**, 3, 1513-1520

**Hendry, P.;** Lockett, T. J.; McCall, M. J. "Therapeutic Applications of Ribozymes" *Methods in Molecular Medicine* **1998**, Hrsg.: Scanlon, K. J.; Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 11, 1-15

**Hendry, P.;** McCall, M. J. "A comparison of the in vitro activity of DNA-armed and all-RNA hammerhead ribozymes" *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3928-3936

**Hendry, P.;** Moghaddam, M. J.; McCall, M. J.; Jennigs, P. A.; Ebel, S.; Brown, T. "Using linkers to investigate the spatial separation of the conserved nucleotides A<sub>9</sub> and G<sub>12</sub> in the hammerhead ribozyme" *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1219*, 405-412

**Henry, S. P.;** Templin, M. V.; Gillet, N.; Rojko, J. "Correlation of toxicology and pharmacokinetic properties of a phosphorothioate oligonucleotide designed to inhibit ICAM-1" *Toxicol. Pathol* **1999**, *27*, 95-100

**Herschlag, D.;** Cech, T. R. "DNA Cleavage Catalysed by the Ribozyme from Tetrahymena" *Nature* **1990**, *344*, 405-409

**Herschlag, D.;** Khosla, M.; Tsuchihashi, Z.; Karpel, R. L. "An RNA chaperone activity of non-specific RNA binding proteins in hammerhead ribozyme catalysis" *EMBO J.* **1994**, *13*, 2913-2924

**Hertel, K. J.;** Herschlag, D.; Uhlenbeck, O. C. "A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction" *Biochemistry* **1994**, *33*, 3374-3385

**Hertel, K. J.;** Pardi, A.; Uhlenbeck, O. C.; Koizumi, M.; Ohtsuka, E. *et al.* "Numbering System for the Hammerhead" *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3252

**Hillenkamp, F.;** Hahner, S.; Lüdemann, H.-C.; Kirpekar, F.; Nordhoff, E.; Roepstorff, P.; Galla, H.-J. "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI) of endonuclease digests of RNA" *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (10), 1957-1964

**Hjalt, T.;** Wagner, E. G. H. "The effect of loop size in antisense and target RNAs on the efficiency of antisense RNA control" *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (24), 6723-6732

**Holbrook, S. R.** "RNA structure and function" *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Hrsg.: Simons, R. W.; Grunberg-Manago, M.; Cold Spring Harbor, NY **1998**, 147-174

**Horton, T. E.;** DeRose, V. J. "Cobalt Hexamine Inhibition of the Hammerhead Ribozyme" *Biochemistry* **2000**, *39*, 11408-11416

**Huang, H.;** Chopra, R. "Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance" *Science* **1998**, *282*, 1669-1675

**Huber, C. G.;** Buchmeiser, M. R. "On-Line Cation Exchange for Suppression of Adduct Formation in Negative-Ion Electrospray Mass Spectrometry of Nucleic Acids" *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5288-5295

**Huber, C. G.;** Krajete, A. "Analysis of Nucleic Acids by Capillary ion-Pair Reversed-Phase HPLC Coupled to Negative-ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3730-3739

**Imbach, J. L.;** Chavis, C.; Dumont, F.; Wightman, R. H.; Zeigler, J. C. "Synthesis of 2',3'-differentiated ribonucleosides via glycosylation reactions with 2-O-Me or 2-O-TBDMS ribofuranose derivatives. 1. Pyrimidine series" *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 202-206

**Inoue, H.;** Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. "Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides" *Nucleic Acid Res.* **1987**, *15*, 6131-6148

**Jacob, F.;** Monod, J "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins" *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 318-356

**Jones, S. J.;** Reese, C. B. "Migration of *t*-butyldimethylsilyl protecting groups" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 2762-2764

**Kachalova, A. V.;** Zatsepin, T. S.; Romanova, E. A.; Stetsenko, D. A.; Gait, M. J. et al. "Synthesis of Modified Nucleotide Building Blocks Containing Electrophilic Groups in the 2'-Position". *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1693-1707

**Kamayaha, H.;** Skaguchi, T.; Murata, N.; Fujimoro, M.; Miura, H.; Ishikawa, K.; Shimizu, M.; Inou, H.; Nishimura, S.; Matsukage, A.; Masutani, C.; Hanaoka, F.; Ohtsuka, E. "In vitro replication study of modified bases in RAS sequences" *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2792-2795

**Kanaya, S.;** Ikehara, M. "Structure and function of ribonuclease H1 from *Escherichia coli*" *Nucleic Acids and Mol. Biol.* **1993**, *7*; Hrsg.: Eckstein, F.; Lilley, D.M.J.; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

**Karas, M.;** Hillenkamp, F. "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons" *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301

**Karplus, M.;** Dejaegere, A.; Liang, X. L. "Phosphate ester hydrolysis: calculation of gas-phase reaction paths and solvation effects" *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 1763-1770

**Keller, T. H.;** Häner, R. "A General Method for the Synthesis of 2'-O-Modified Ribonucleosides" *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 884-892

**Khati, M.;** Schuman, M.; Ibrahim, J.; Sattentau, Q.; Gordon, S.; James, W. "Neutralization of Infectivity of Diverse R5 Clinical Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by gp120-Binding 2'-F-RNA Aptamers" *J Virol.* **2003**, *77*, 12692-12698

**Khorana, H.G.** "Polynucleotide synthesis and the genetic code" *Fed. Proc.* **1965**, *24*, 1473-1487

**Khvorova, A.;** Lescoute, A.; Westhof, E.; Jayasena, S. D. "Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity" *Nature Structural Biology* **2003**, *10* (9), 708-712. Beigefügter Kommentar von David. M. J. Lilley: S. 872

**Kiefer, J. R.;** Mao, C.; Braman, J. C.; Beese, L. S. "Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal" *Nature* **1998**, *391* 304-307

**Kirk, K. L.;** Cohen, L. A. "The synthesis of some fluoronitrobenzimidazoles and their reactivities toward peptide nucleophiles" *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 384-389

**Klebba, C.** "Entwicklung und Charakterisierung von retroviral exprimierten anti-HIV Ribozymen" *Dissertation* **2000**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Klein, S. A.** "Entwicklung und Charakterisierung retroviral exprimierter anti-HIV Ribozyme" *Habilitation* **2002**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Klinck, R.;** Liquier, J.; Taillandier, E.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Guittet, E. "Structural characterization of an intramolecular RNA triple helix by NMR spectroscopy" *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233* (2), 544-553

**Klöpffer, A. E.** "Artifizielle Nucleobasen zur selektiven Erkennung von T-A-Basenpaar-Inversionen und ihr Einsatz in tripelhelicalen Nucleinsäuren" *Diplomarbeit* **2000**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Klussmann, S.;** Eulberg, D. "Spiegelmers: Biostable Aptamers" *ChemBioChem* **2003**, *4*, 979-983

**Knoll, R.;** Bald, R.; Fürste, J. P. "Complete identification of nonbridging phosphate oxygens involved in hammerhead cleavage" *RNA* **1997**, *3*, 132-140

**Koizumi, M.;** Ohtsuka, E. "Effects of phosphorothioate and 2-amino groups in hammerhead ribozymes on cleavage rates and Mg<sup>2+</sup> binding" *Biochemistry* **1991**, *30*, 5145-5150

**Kool, E. T.** "Replacing the Nucleobases in DNA with Designer Molecules" *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 936-943

**Kool, E. T.,** Morales, J. C.; Guckian, K. M. "Einsicht in Stabilität und Replikation der DNA durch Nachahmung ihrer Struktur und Funktion" *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1046-106

**Koole, L.;** Buck, H.; Kenters, J.; Schouten, A.. „Molecular Conformation of 2'-deoxy-3',5'-di-O-acetylguanosine. Crystal structure and high resolution proton nuclear magnetic resonance investigations“ *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 2634-2639

**Krohn, K.;** Heins, H.; Wielcknes, K. "Synthesis and cytotoxic activity of C-glycosidic nicotinamide riboside analogues" *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 511-517

**Kronenwett, R.;** Haas, R.; Sczakiel, G. "Kinetic selectivity of complementary nucleic acids: bcr-abl-directed antisense RNA and ribozymes" *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 632-644

**Kuimelis, R.G.;** McLaughlin, L. W. "Mechanisms of Ribozyme-Mediated RNA Cleavage" *Chemical Reviews* **1998**, *98* (3), 1027-1044

**Lander, E. S. et al.** "Initial sequencing and analysis of the human genome" *Nature* **2001**, *409*, 860-921

**Lee, N. S.;** Bertrand, A.; Rossi, J.J. "mRNA localization signals can enhance the intracellular effectiveness of hammerhead ribozymes" *RNA* **1999**, *5*, 1200-1209

**Legorburu, U.;** Reese, C. B.; Song, Q. "Conversion of Uridine into 2-O-(2-methoxyethyl)uridine and 2 -O-(methoxyethyl)cytidine" *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5635-5640

**Letsinger, R. L.;** Finnan, J. L.; Heaver, G. A.; Lunsford, W. B. "Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links" *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278-3279

**Letsinger, R. L.;** Lunsford, W. B. "Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates" *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655-3661

**Leumann, C. J.** "DNA Analogues: From Supramolecular Principles to Biological Properties" *Bioorg. & Med. Chem.* **2002**, *10*, 841-854

**Lilley, D. M. J.** "Origins of RNA Catalysis in the Hairpin Ribozyme" *ChemBioChem* **2001**, *2*, 729-733

**Lilley, D. M. J.** "RNA Folding and Catalysis in the Hammerhead and Hairpin Ribozyme" *Ribozyme Biochemistry and Biotechnology* **2000**, Hrsg.: Krupp, G.; Gaur, R. K., Eaton Publishing Natick, 279-295

**Lilley, D. M. J.** "The Varkud satellite ribozyme" *RNA* **2004**, *10*, 151-158

**Loakes, D.** "The applications of universal DNA base analogues" *Nucl. Acids Res.* **2001** *29* (12), 2437-2447

**Loakes, D.;** Brown, D. M. "5-Nitroindole as an Universal Base Analogue" *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4039-4043

**Loakes, D.;** Brown, D. M.; Linde, S.; Hill, F. "3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for dNA sequencing and PCR" *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (13), 2361-2366

**Loakes, D.;** Brown, D. M.; Salisbury, S. A.; McDougall, M. G.; Neagu, C.; Nampalli, S.; Kumar, S. "Synthesis and enzymatic incorporation of a novel, bicyclic pyrimidine nucleoside: A thymidine mimic" *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3387-3389

**Loke, S. L.;** Stein, C. A.; Zhang, X. H.; Mori, K.; Nakanishi, M.; Subasinghe, C. M.; Cohen, J. S.; Neckers, L. M. "Characterization of Oligonucleotide transport into living cells" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3474-3478

**Ludwig, J. N.;** Eckstein, F. "Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one" *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635

**Mariani, L.;** Citti, L.; Nevischi, S. Eckstein, F. "Ribozyme and free alkylated base: a dual approach for sensitizing Mex<sup>+</sup> cells to the alkylating antineoplastic drug" *Cancer Gene Therapy* **2000**, *7*, 905-909

**Markiewicz, W. T.** "Tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'- and 5'-Hydroxy Functions of Nucleosides" *J. Chem. Res.* **1979**, 24-25'(S) und 0181-0195 (M)

**Martin, F. H.;** Castro, F. H.; Aoul-ela, F.; Tinoco, I. "Base-pairing involving deoxyinosine – implications for probe design" *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 8927-8938

**Martin, P.** "Ein neuer Zugang zu 2'-O-(2-Methoxyethyl)ribonucleosiden ausgehend von D-Glucose" *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 204-209

**Massoulié, J.** "Associations of poly A and poly U in acid media. Irreversible phenomenon" *Eur. J. Biochem.* **1968**, *3* (4), 439-447

**Matray, T. J.;** Kool, E. T. "Selective and stable DNA base pairing without hydrogen bonding" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6191-6192

**McCall, M. J.;** Hendry, P.; Mir, A. M.; Conaty, J.; Brown, G.; Lockett, T. J. "Small, Efficient Hammerhead Ribozymes" *Molecular Biotechnology* **2000**, *14*, 5-17

**McKay, D. B.;** Wedekind, J. E. "Small Ribozymes" *RNA World* **1999**, Hrsg.: Gesteland, R. F.; Cech, T. R.; Atkins, J. F.; CSHL Press, Cold Spring Harbor, 265-286

**Mercure, S.;** Lafontaine, D.; Ananvoranich, S.; Perreault, J.-P. "Kinetic Analysis of  $\delta$  Ribozyme Cleavage" *Biochemistry* **1998**, *37*, 16975-16982

**Merrifield, R. B.** "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide" *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154

**Micura, R.** "Kurze interferierende RNA und ihre chemische Synthese" *Angew. Chem.* **2002**, *114* (13), 2369-2373

**Miller, P. S.** "Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents" *Biochemistry* **1991**, *9* (4), 358-362

**Millican, G. A.;** Mock, G. A.; Chauncey, M. A.; Patel, T. P.; Eaton, M. A. W.; Gunning, J.; Cutbush, S. D.; Neidle, S.; Mann, J. "Synthesis and biophysical studies of short oligodeoxynucleotides with novel modifications – a possible approach to the problem of mixed base oligodeoxynucleotide synthesis" *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 7435-7453

**Misquitta, L.;** Paterson, B. M. "Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96* (4), 1451-1456

**Moffatt, J. G.** "A general synthesis of nucleoside-5'-triphosphates" *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 599-565

**Mondal, S.** "RNA Interference- Towards RNA becoming a medicine" *Resonance* **2003**, 42-49

**Montagnier, L.** "A history of HIV discovery" *Science* **2002**, *298*, 1727-1728

**Moore, C. L.;** Zivkovic, A.; Engels, J. W.; Kuchta, R. "Human DNA Primase Uses Watson-Crick Hydrogen Bonding Groups to distinguish between Correct and Incorrect NTPs" *Biochemistry* **2004**, *in preparation*

**Morales, J. C.;** Kool, E. T. "The importance of terminal base pair hydrogen bonding in 3' end proofreading by the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I" *Biochemistry* **2000**, *39*, 2626-2632

**Neilson, T.;** Werstiuk, E. S. "Oligoribonucleotide synthesis. II. Preparation of 2'-O-tetrahydropyranyl derivatives of adenosine and cytidine necessary for insertion in stepwise synthesis" *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 493-499

**Nichols, R.;** Andrews, P. C.; Zhang, P. M.; Bergstrom, D. E. "Synthesis, structure and biochemical applications of a universal nucleic acid-spacer – 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole" *Nature* **1994**, *369*, 492-493

**Nirenberg, M. W.;** Matthei, J. H.; Jones, O. W.; Martin, R. G.; Barondes, S. H. "Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA" *Fed. Proc.* **1963**, 22, 55-61

**Nykänen, A.;** Haley, B.; Zamore, P. D. "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway" *Cell* **2001**, 107, 309-321

**O'Neill, B. M.;** Ratto, J. E.; Good, K. L.; Tahmassebi, D. C.; Helquist, S. A.; Morales, J. C.; Kool, E. T. "A Highly Effective Nonpolar Isostere of Deoxyguanosine: Synthesis, Structure, Stacking and Base Pairing" *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (17), 5869-5875

**Ochoa, S.** "Synthetic polynucleotides and the genetic code" *Fed. Proc.* **1963**, 22, 62-74

**Ogilvie, K. K.;** Beaucage, S. L.; Schifman, A. L.; Theriault, N. Y.; Sadana, K. L. "The synthesis of oligoribonucleotides. II. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry" *Can. J. Chem.* **1978**, 56, 2768-2780

**Ogilvie, K. K.;** Sadana, K. L.; Thompson, E. A. "The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides" *Tetrahedron Lett.* **1974**, 2861-63

**Ohtsuka, E.;** Matsuki, S.; Ikehara, M.; Takahashi, Y.; Matsubara, K. "An alternative approach to deoxynucleotides as hybridisation probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions" *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 2605-2608

**Olby, R.** "Quiet debut for the double helix" *Nature* **2003**, 421 (23), 402-405

**Olivanen, M.;** Kuusela, S.; Lönnberg, H. " Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the Phosphodiester Bonds of RNA by Brönsted Acids and Bases" *Chem. Rev.* **1998**, 98, 961-990

**Pankiewicz, K. W.** "Fluorinated Nucleosides" *Carbohydrate Res.* **2000**, 327, 87-105

**Paolella, G.;** Sproat, B. S.; Lamond, A. I. "Nuclease resistant ribozyme with high catalytic activity" *EMBO J.* **1992**, 11, 1913-1919

**Parrish, S.;** Fleenor, J.; Xu, S.; Mello, C.; Fire, A. " Functional Anatomy of a dsRNA Trigger: Differential Requirement for the Two Trigger Strands in RNA Interference" *Mol. Cell* **2000**, 6, 1077-1087

**Parsch, J.** "Synthese von Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazol-Nukleosiden und ihr Einfluß auf die Stabilität von RNA Duplexen" *Dissertation* **2001**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Parsch, J.;** Engels, J. W. "C-F...H-C Hydrogen Bonds in Ribonucleic Acids" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5664-5672

**Parsch, J.;** Engels, J. W. "Synthesis of Fluorobenzene and Benzimidazole Nucleic Acid Analogues and Their Influence on Stability of RNA Duplexes" *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1791-1808

**Parsch, U.** "6-Oxocytidin – ein Baustein für die pH-unabhängige Tripelhelixbildung" *Dissertation* **1999**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Pauling, L.;** Corey, R. B. "A proposed structure for the nucleic acids" *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1953a**, *39*, 84-97

**Pauling, L.;** Corey, R. B. "Structure of the nucleic acids" *Nature* **1953b**, *171*, 346

**Pearlman, W. M.** "Noble metal hydroxides on carbon nonpyrophoric dry catalysts" *Tetrahedron Lett.* **1967**, 1663-1664

**Perreault, D. M.;** Anslyn, E. V. "Unifying the Current Data on the Mechanism of Cleavage-Transesterification of RNA" *Angew. Chem. Intl. Ed.* **1997**, *36*, 432-450

**Peyman, A.;** Helsing, M.; Kretzschmar, G.; Mag, M.; Rytte, A.; Uhlmann, E. "Nuclease stability as dominant factor in the antiviral activity of oligonucleotides directed against HSV-1 E110" *Antiviral Res.* **1997**, *33* (2), 135-139

**Pieken, W. A.;** Olsen, D. B.; Aurup, H.; Eckstein, F. "Kinetic Characterization of Ribonuclease-Resistant 2'-Modified hammerhead ribozymes" *Science* **1991**, *253*, 314-317

**Pitsch, S.;** Weiss, P. A.; Wu, X.; Ackermann, D.; Honegger, T. "Fast and Reliable Automated Synthesis of RNA and Partially 2'-O-Protected Precursors ("Caged RNA") Based on Two Novel, Orthogonal 2'-O-Protecting Groups" *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1753-1761

**Pley, H. W.;** Flaherty, K.M.; McKay, D. B. "Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme" *Nature* **1994**, *372*, 68-74

**Prydz, H.;** Amarzguioui, M. **2004** *in preparation*

**Puglisi, E. V.;** Puglisi, J. D. "RNA structure and function" *CSHL Press*, Hrsg.: Simons, R. W.; Grunberg-Manago, M.; Cold Spring Harbor, NY **1998**, 117-146

**Puglisi, J. D.;** Tinoco, I. "Absorbance melting curves of RNA" *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325

**Puglisi, J. D.;** Tinoco, I. "Absorbance melting curves of RNA" *Methods Enzymology* **1989**, *180*, 304-325

**Reynolds, A.;** Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W. S.; Khvorova, A. "Rational siRNA design for RNA interference" *Nature Biotechnology* **2004**, *22* (3), 326-330

**Robertson, D. L.;** Joyce, G. F. "Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA" *Nature* **1990**, *344*, 467-468

**Robins, M. J.;** Naik, S. R.; Lee, A. S. K. "Nucleic acid related compounds. 12. Facile and high yield stannous chloride catalyzed monomethylation of the cis glycol system of nucleosides by diazomethane" *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1891-1899

**Rolf, D.;** Gray, G. R. "Reductive Cleavage of Glycosides" *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3539-3541

**Saenger, W.** "Principles of nucleic acid structure" Springer Verlag, New York, Berlin, **1984**

**Sakata, S.;** Yonei, S.; Yoshino, H. "Synthesis of 2-Substituted 6-Methyl-9- $\beta$ -D-ribofuranosylpurines" *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *36* (7), 2583-2585

**Salmi, P.;** Sproat, B. S.; Ludwig, J.; Hale, R.; Avery, N.; Kela, J.; Wahlestedt, C. "Dopamine D<sup>2</sup> receptor ribozyme inhibits quinpirole-induced stereotypy in rats" *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *388*, R1-2

**Santoro, S. W.;** Joyce, G. F. "Mechanism and Utility of an RNA-Cleaving DNA Enzyme" *Biochemistry* **1998**, *37*, 13330-13342

**Sarver, N.;** Cantin, E. M.; Chang, P. S.; Zaia, J. A.; Ladne, P. A.; Stephens, D. A.; Rossi, J. J. "Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents" *Science* **1990**, *247*, 1222-1225

**Scaringe, S. A.;** Wincott, F. E.; Caruthers, M. H. "Novel RNA Synthesis Method Using 5'-O-Silyl-2'-O-orthoester Protecting Groups" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11820-11821

**Schaller, H.;** Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H. G. "Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribonucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3'-phosphates" *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821-3827

**Scheffer, U.;** Göbel, M. "Fluorescence-Based On-Line Detection as an Analytical Tool in RNA Electrophoresis" *Methods in Molecular Biology* **2004**, Oligonucleotide Synthesis - Methods and Applications; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 261-272

**Scherr, M.;** Grez, M.; Ganser, A.; Engels, J. W. "Specific hammerhead ribozyme-mediated cleavage of mutant N-Ras mRNA in vitro and ex vivo. Oligoribonucleotides as therapeutic agents" *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14304-14313

**Schoetzau, T.;** Klingel, S.; Wartbichler, R.; Koert, U.; Engels, J. W. "Synthesis of a fluorescent derivative of 6-N-[N-(6-aminohexyl)-carbamoyl]-2',3'-dideoxyadenosine 5'-triphosphate for detection of nucleic acids" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 1411-1415

**Schoetzau, T.;** Koert, U.; Engels, J. W. "3'-C-Branched Thymidine 5'-Triphosphates: Synthesis, Application, and Coupling with Near-Infrared Oxazine Fluorescent Dye" *Synthesis* **2000**, 707-713

**Schwarz, D.S.;** Hutvagner, G.; Du, T.; Xu, Z.; Aronin, N.; Zamore, P.D. "Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex" *Cell* **2003**, *115*, 199-208

**Schweitzer, B.;** Kool, E. T. "Hydrophobic, non-hydrogen-bonding bases and base pairs in DNA" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *117*, 1863-1872

**Schweitzer, M.** "Synthese und Untersuchung chemisch modifizierter DNA am Beispiel der Oligonucleosid-Methylphosphonate" *Dissertation* **1998**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Scott, W. G.;** Finch, J. T.; Klug, A. "The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA cleavage" *Cell* **1995**, *81*, 991-1002

**Scott, W. G.;** Murray, J. B.; Arnold, J. R. P.; Stoddard, B. L.; Klug, A. "Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme" *Science* **1996**, *274*, 2065-2069

**Seela, F.;** Bourgeois, W.; Rosemeyer, H.; Wenzel, T. "Synthesis of 4-substituted 1H benzimidazole 2'-deoxynucleosides and utility of the 4-nitro compound as universal base" *Helv. Chim. Acta* **1995**, *79*, 488-498

**Seela, F.;** Wenzel, T. "Oligodeoxyribonucleotides containing 4-aminobenzimidazoles in place of adenine: solid-phase synthesis and base-pairing" *Helv. Chim. Acta* **1996**, *78*, 833-846

**Sekine, M.;** Wada, T.; Tobe, M.; Nagayama, T.; Furusawa, K. "Regioselective Protection of the 2'- Hydroxyl Group of *N*-Acyl-3',5'-*O*-di(*t*-butyl)silanediylnucleoside Derivatives by Use of *t*-BuMgCl and 2-(Trimethylsilyl)ethoxymethyl Chloride" *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1683-1684

**Séréni, D.;** Tubiana, R.; Lascoux, C.; Katlama, C.; Taulera, O.; Bourque, A.; Cohen, A.; Dvorchik, M. R. R.; Tournerie, C.; Gouyette, A.; Schechter, P. J. "Pharmacokinetics and tolerability of intravenous tecovirsen (Gem91), an antisense phosphorothioate oligonucleotide in HIV-positive subjects" *J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *39*, 47-54

**Shaler, T. A.;** Wickham, J. N.; Sannes, K. A.; Wu, K. J.; Becker, C. H. "Effect of Impurities on the Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectra of Single-Stranded Oligodeoxynucleotides" *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 576-579

**Shen, Z.;** Hagermann, P. J. "Conformation of the central, three-helix junction of the 5S ribosomal RNA of *Sulfolobus acidocaldarius*" *J. Mol. Biol.* **1994**, *241*, 415-430

**Sijen, T.;** Fleenor, J.; Simmer, F.; Thijssen, K.L.; Parrish, S.; Timmons, L.; Plasterk, R.H.; Fire, A. "On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing" *Cell* **2001**, 465-476

**Sinha, N. D.,** Davis, P., Usman, N., Pérez, J., Hodge, R., Kremsky, J., Casale, R. "Labile Exocyclic Amine Protection of Nucleosides in DNA, RNA and Oligonucleotide

Analog Synthesis Facilitating N-Deacylation, Minimizing Depurination and Chain Degradation" *Biochimie* **1993**, *75*, 13-23

**Sinha, N. D.**; Biernat, J.; Köster, H. "β-Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholino-monochloro phosphoramidites, new phosphitylating agents facilitating ease of de-protection and work-up of synthesized oligonucleotides" *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5843-5846

**Sioud, M.**; Sørensen, D. R. "A nuclease resistant protein kinase Cα ribozyme blocks glioma cell growth" *Nat. Biotech.* **1998**, *16*, 556-561

**Smith, M.**; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G. "Studies on polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C-3'- C-5'-interribonucleotide linkage. Synthesis of uridylyl-(3'- 5')-uridine and uridylyl-(3'- 5')-adenosine" *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440

**Sproat, B. S.**; Iribarren, A.; Beijer, B.; "New synthetic routes to protected purine 2'-O-methylriboside-3'-O-phosphoramidites using a novel alkylation procedure" *Nucleic Acid Res.* **1990**, *18*, 41-49

**Stawinski, J.**; Strömberg, R.; Thelin, M.; Westman, E. "Studies on the *t*-butyldimethylsilyl groups as 2'-O protection in oligonucleotide synthesis via H-phosphonate approach" *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9285-9298

**Stein, C. A.**; Tonkinson, J. L.; Yakubov, L. "Anti-sense inhibitors of gene expression?" *Pharmacology & Therapeutics* **1991**, *52* (3), 365-384

**Stephenson, M. L.**; Zamecnik, P. C. "Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*(1), 285-288

**Stryer, L.** "Biochemie" *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, New York, **1991**

**Stütz, A. M.**; Hoeck, J.; Natt, F.; Cuenoud, B.; Woisetschläger, M. "Inhibition of interleukin-4- and CD40-induced IgE germline gene promoter activity by 2'-aminoethoxy-modified triplex-forming oligonucleotides" *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11759

**Sullenger, B. A.;** Gilboa, E. "Emerging clinical applications of RNA" *Nature* **2002**, *418*, 252-258

**Summerton, J.** "Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H independent structural type" *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1489* (1), 141-158

**Sun, J.-S.;** Garestier, T.; Hélène, C. "Oligonucleotide directed triple helix formation" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 327

**Sun, L. Q.;** Cairns, M. J.; Saravolac, E. G.; Baker, A.; Gerlach, W. L. "Catalytic Nucleic Acids: From Lab to Applications" *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 325-347

**Sun, L. Q.;** Symonds, G. "Retroviral delivery of ribozymes" *Ribozymes in the Gene Therapy of Cancer* **1998**, Hrsg.: Scanlon, K. J.; Kashani-Sabet, M.; RG Landes, Austin, 87-100

**Sun, L.-Q.;** Dass, C. R.; Saravolac, E. G.; Li, Y. "Cellular Uptake, Distribution and Stability of 10-23 Deoxyribozymes" *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **2002**, *12*, 289-299

**Symons, R. H.** "Small catalytic RNAs" *Annu. Rev. Biochem* **1992**, *61*, 641-671

**Takahashi, Y.;** Kato, K.; Hayashizaki, Y.; Wakabayashi, T.; Ohtsuka, E.; Matsuki, S.; Ikehara, M.; Matsubara, K. "Molecular-cloning of the human cholecystokinin gene by use of a synthetic probe containing deoxyinosine" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 1931-1935

**Tanaka, K.;** Waki, H.; Iod, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. "Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153

**Tang, J.;** Breaker, R. R. "Structural Diversity of self-cleaving ribozymes" *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2000**, *97*, 5784-5789

**Taylor, N. R.;** Kaplan, B. E.; Swiderski, P.; Li, H.; Rossi, J. J. "Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozymes have enhanced in vitro catalytic efficiency and increased stability in vivo" *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4559-4565

- Tazawa, I.;** Tazawa, S. J.; Alderfer, J. I.; Tsó, P. O. P. "2'-O-alkyl polynucleotides. I. Novel procedure for the synthesis of 2'-O-alkyl nucleotides" *Biochemistry* **1972**, *11*, 4931-4937
- Teplova, M.;** Wallace, S. T.; Tereshko, V.; Minasov, G.; Symona, A. M.; Cook, P. D.; Manoharan, M.; Egli, M. " Structural origins of the exonuclease resistance of a zwitterionic RNA" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 14240-14245
- Thompson, J. B.;** Tuschl, T.; Eckstein, F. "The Hammerhead Ribozyme" *Catalytic RNA* **1996**, Hrsg.: Eckstein, F.; Lilley, D. M. J; Springer Verlag Berlin Heidelberg, 173-196
- Timpe, W.;** Dax, K.; Wolf, N.; Weidmann, H. "3-Desoxyhex-2-enono-1,4-lactone aus D-Hexofuran(osid)-urono-6,3-lactonen" *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 53-60
- Türk, C.;** Gold, L. "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase" *Science* **1990**, *249*, 505-510
- Tuschl, T.** "RNA Interference and Small Interfering RNA" *ChemBioChem* **2001**, *2*, 239-245
- Tuschl, T.** "RNA sets the standard" *Nature* **2003**, *421*, 220-221
- Tuschl, T.;** Eckstein, F. "Hammerhead Ribozymes: Importance of Stem-Loop II for Activity" *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1993**, *90*, 6991-6994
- Tuschl, T.;** Gohlke, C.; Jovin, T. M.; Westhof, E.; Eckstein, F. "A three-dimensional model for the hammerhead ribozyme based on fluorescence measurements" *Science* **1994**, *266*, 785-789
- Uhlenbeck, O. C.;** Milligan, J. F.; Groebe, D. R.; Witherell, G. W. "Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA Polymerase and synthetic DNA templates" *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15* (21), 8783-8798
- Uhlmann, E.;** Peyman, A. "Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle" *Chem. Rev.* **1990**, *90* (4), 543-584

- Uhlmann, E.;** Peyman, A.; Ryte, A.; Schmidt, A.; Buddecke, E. "Use of minimally modified antisense oligonucleotides for specific inhibition of gene expression" *Methods Enzymol.* **1999**, 313, 268-284
- Usman, N.;** Stinchcomb, D. T. "Design, Synthesis and function of therapeutic hammerhead ribozymes" *Nucleic Acids and Molecular Biology (Catalytic RNA)* **1996**, Vol. 10, 243-264
- Vallone, P. M.;** Benight, A. S. "Melting Studies of Short DNA Hairpins Containing the Universal Base 5-Nitroindole" *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 3589-3596
- van Aerschot, A.;** Marchand, A.; Schepers, G.; van den Eynde, W.; Rozenski, J.; Busson, R.; Herdewijn, P. "Methylated Hexitol Nucleic Acids, towards congeners with improved antisense potential" *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 22 (5-8), 1227-1229
- Vasquez, K. M.;** Wilson, J. "Triplex-directed modification of genes and gene activity". *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 4
- Venter, J. C. et al.** "The sequence of the human genome" *Science* **2001**, 291, 1304-1351
- Vinayak, R.;** Andrus, A.; Sinha, N. D.; Hampel, A. "Assay of Ribozyme-Substrate Cleavage by Anion Exchange High-Performance Liquid Chromatography" *Anal. Biochemistry* **1995**, 232, 204-209
- Voet, D.;** Voet, J. G. "Biochemie" *Wiley-VCH* **1994**, Weinheim
- Vollhardt, K. P. C.;** Schore, N. E. "Organische Chemie" " *Wiley-VCH* **1995**, 2. Auflage, Weinheim
- von Bredow, R.** "Vom Boten zum Boss", *Spiegel* **2003**, 190
- Von Laer, D.;** Egelhofer, M.; Brandenburg, G.; Martinius, H.; Schult-Dietrich, P.; Melikyan, G.; Kunert, R.; Baum, C.; Choi, I.; Alexandrov, A. "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides" *Journal of Virology* **2004**, 78 (2), 568-575

**Vorbrüggen, H.;** Bennua, B. "A new simplified nucleoside synthesis" *Chem. Ber.* **1981a**, *114*, 1279-1286

**Wang, A. H.-J.;** Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J.-L.; van Boom, J. H.; van der Marel, G.; Rich, A. "Molecular structure of left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution" *Nature* **1979**, *282*, 680-686

**Wargelius, A.;** Ellingsen, S.; Fjose, A. "Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263* (1), 156-161

**Watson, J. D.;** Crick, F. H. D. "Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid" *Nature* **1953b**, *171*, 964-967

**Watson, J. D.;** Crick, F. H. D. "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid" *Nature* **1953a**, *171*, 737-738

**Weber, M.** "Neue Techniken zum Gentransfer in Eukaryontenzellen" *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **2000**, *48*, 18-23

**Weintraub, H. M.** "Anti-Sense-DNA und -RNA: komplementäre Codes mit Sinn" *Spektrum der Wiss.* **1990**, *3*, 70-77

**Wengel, J.;** Koshkin, A. A.; Rajwanshi, V. K. "Novel convenient syntheses of LNA [2.2.1]bicyclo nucleosides" *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4381-4384

**Werner, M.;** Uhlenbeck, O. C. "The effect of base mismatches in the substrate recognition helices of hammerhead ribozymes on binding and catalysis" *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2092-2096

**Westman, E.;** Strömberg, R. "Removal of *t*-butyldimethylsilyl protection in RNA synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA·3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF)" *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2430-2431

**WHO**, World Health Organization, "Annual *AIDS epidemic update* report 2003", [www.who.int](http://www.who.int)

- Widengren, J.;** Schwille, P. "Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy" *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6416-6428
- Wilkins, M. H. C.;** Randall, J. T. "Crystallinity in sperm heads: molecular structure of nucleoprotein *in vivo*" *Biochim. et Biophys. Acta* **1952**, *10*, 192-193
- Wilkins, M. H. C.;** Seeds, W. E.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R. "Helical structure of crystalline deoxypentose nucleic acid" *Nature* **1953a**, *172*, 759-762
- Wilkins, M. H. C.;** Stokes, A. R.; Wilson, H. R. "Molecular structure of deoxypentose nucleic acids" *Nature* **1953b**, *171*, 738-740
- Williams, K. J.;** Loeb, L. A. "Retroviral reverse transcriptases: error frequencies and mutagenesis" *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1992**, *176*, 165-180
- Wills, J. W.;** Craven, R. C. "Form, function and use of retroviral gag proteins" *AIDS* **1991**, *5*, 639-654
- Wincott, F. E.;** DiRenzo, A.; Shaffer, C.; Grimm, S.; Tracz, D.; Workman, C.; Sweedler, D.; Gonzalez, C.; Scaringe, S.; Usman, N. "Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes" *Nucleic Acids Res.* **1995**, *26*; 8620-8624
- Wojczewski, C.** "Synthese 3'-modifizierter Nucleotide und Entwicklung neuer Methoden für die DNA-Sequenzanalytik" *Dissertation* **1999**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Woody, R. W.** "Circular Dichroism" *Methods in Enzymology* **1995**, *246(34)*, 34-70
- Wozniak, S. W. J.** "Antisense & Nucleic Acids" *Drug Rev.* **1997**, *7*
- Yoshikawa, M.;** Kato, T.; Takenishi, T. "A novel method of phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides" *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065-5068
- Young, A. R.** "RNA Polymerase II" *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 689-715
- Yu, M.;** Ojwang, J.; Yamada, O.; Hampel, A.; Rapaport, J.; Looney, D.; Wong-Staal, F. "A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1" *Proc. Natl. Sci. Acad.* **1993**, *90*, 6340-6344

**Zaman, G. J. R.;** Michiels, P. J. A.; van Boekel, C: A. A. "Targeting RNA: new opportunities to address drugless targets" *DDT* **2003**, 8 (7), 297-306

**Zamecnik, P. C.;** Stephenson, M. L. "Inhibition of Rous sarcoma virus RNA replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75(1), 280-284

**Zatsepin, T. S.;** Romanova, E. A.; Oretskaya, T. S. "Synthesis of 2'-O-alkyl-nucleosides" *Russ. Chem. Rev.* **2002**, 71 (6), 513-534

**Zhao, Q.;** Zhou, R.; Tamsamani, J. Zhang, Z.; Roskey, A.; Agrawal, S. "Cellular distribution of phosphorothioate oligonucleotide following intravenous administration in mice" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1998**, 8, 451-458

**Zhou, C.;** Bahner, I. C.; Larson, G. P.; Zaia, J. A.; Rossi, J. J.; Kohn, E. B. "Inhibition of HIV-1 in human T-lymphocytes by retrovirally transduced anti-tat and rev hammerhead ribozymes" *Gene* **1994**, 149, 33-39

**Zhou, D.-M.;** Taira, K. "The Hydrolysis of RNA: From Theoretical Calculations to the Hammerhead Ribozyme-Mediated Cleavage of RNA" *Chem. Rev.* **1998**, 98, 991-1026

**Zivkovic, A.;** Engels, J. W. "Synthesis of Modified RNA-Oligonucleotides for Structural Investigations" *Nucleosides, Nucleotides* **2003**, 22 (5-8), 1167-1170



# 14

## Anhang

**14.1 Abkürzungsverzeichnis**

**14.2 Publikations- und Vortragsliste, Posterliste, Lebenslauf**

## 14.1 Abkürzungsverzeichnis

### A

A	Adenosin
Å	Ångström
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
ADA	Adenosine Deaminase Defizienz
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
allg.	allgemein
anorg.	anorganisch
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat

### B

<i>b s</i>	breites Singulett
Bp	Basenpaar
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid

### C

°C	Grad Celsius
C	Aktivkohle
C	Cytosin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CCR5	Chemokine Rezeptor 5
CD	Circular Dichroismus
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMV	Cytomegalie-Virus

**D**

d	Duplett
<i>D. melano-</i> <i>gaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
d.h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert
DMAP	<i>N,N'</i> -Dimethylaminopyridin
DMTr	4, 4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Natürliches 2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol, "Clelands Reagenz"

**E**

[E]	Enzym- bzw. Ribozymkonzentration
E	Enzym
E. coli	Escherichia coli
EA	Elementaranalyse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI(-)-MS	Elektrospray-Ionisation im negativen Modus
ESI(+)-MS	Elektrospray-Ionisation im positiven Modus
et al.	et alii

**F**

Fa.	Firma
FC	<i>Flash</i> -Chromatographie
FDA	<i>Federal Food and Drug Administration</i>
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatographie</i>

**G**

G	Guanosin
g	Gramm
ges.	gesättigt

**H**

HCV	Hepatitis C Virus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
<i>i</i>	iso-

**I**

i.a.	im allgemeinen
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>

**J**

J [Hz]	Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie (in Hertz)
--------	--

**K**

K	Kelvin
K <sub>A</sub>	Assoziationskonstante
kat.	katalytisch
konz.	konzentriert

**L**

LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lsg.	Lösung
lt.	laut
LTR	<i>long terminal repeat</i>

**M**

m.t.	<i>multiple turnover</i>
max.	maximal
Me	Methyl
MeOH	Methanol
Min.	Minuten
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-)RNA

**N**

<i>n</i>	
NCR	<i>non coding region</i>
neg.	negativ
nm	Nanometer
NMR	
nt	Nucleotid

**O**

o.ä.	oder ähnliches
org.	Organisch

**P**

p.a.	pro analysi
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PAC	Phenoxyacetyl-
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDC	präparative Dünnschicht-chromatographie
pH	potentia hydrogenii
PKC	Proteinkinase C
polyA	polyAdenosin
pos.	positiv
PP <sub>i</sub>	anorg. Pyrophosphat
präp.	präparativ

Py Pyridin

## Q

q Quartett

## R

R<sub>f</sub> Retentionsfaktor

RNA Ribonucleinsäure

RNAi RNA Interferenz

RNAse Ribonuclease

RP reversed phase

RT Raumtemperatur

RTI Reverse Transkriptase-Inhibitor

## S

[S]<sub>0</sub> Anfangskonzentration an Substrat

s Singulett

s. siehe

s.t. *single turnover*

Sek. Sekunde

siRNA *small interfering RNA*

sog. sogenannt

Std. Stunden

## T

T Thymidin

T Temperatur

t Triplett

TAC *tert.*-Butylphenoxy-acetylchlorid

TBAF Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung

TBDMS *tert.*-Butyldimethylsilyl

TCA Trichloressigsäure

TEAA Triethylammoniumacetat-Puffer

TEAB	Triethylammoniumbicarbonat-Puffer
techn.	technisch
<i>tert.</i>	<i>tertiär</i>
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
T <sub>m</sub> -Wert	Schmelzpunkt eines Oligonucleotidduplexes [°C]
TOM	<u>T</u> riisopropylo <u>x</u> ym <u>e</u> thyl
tRNA	Transfer-RNA

**U**

μM	micromolar
U	Uridin
u.a.	unter anderem

**V**

VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
VS	Varkud Satellit RNA

**W**

wässr.	wässrig
--------	---------

**Z**

z. B.	zum Beispiel
-------	--------------

## 14.2

### Publikationen

- [1] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "Synthesis of 2'-Aminoalkyl Substituted Fluorinated Nucleobases and the Kinetic Properties of Chemically Modified Hammerhead Ribozymes" *ChemBioChem* **2004**, 5 (5), 707-716
- [2] **Klöpffer, A. E.**, Scheffer, U., Göbel, M., Engels, J. W. "Evaluation of fluorinated nucleoside-5'-triphosphates as universal bases in polymerase reactions" **2004**, *in preparation*
- [3] **Klöpffer, A. E.**, Scheffer, U., Göbel, M., Engels, J. W. "The synthesis of fluorinated, nucleoside-5'-triphosphates" *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, *in preparation*
- [4] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "The Effect of Universal Fluorinated Nucleobases on the Catalytic Activity of Ribozymes" *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 22 (5-8), 1347-1350
- [5] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "Universal Fluorinated Nucleobases: Their Effect on the Catalytic Activity of Ribozymes" *Collection Symposium Series* **2002**, 5, 348-351

### Vorträge

- [1] "The Development of Highly Efficient and Chemically Modified Hammerhead Ribozymes" XII Symposium on the Chemistry of Nucleic Acid Components, 03-08.09.2002, Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik.
- [2] "Universal Fluorinated Nucleobases: Their Effect on the Catalytic Activity of Ribozymes" European Science Foundation (ESF), Workshop "Impact of Nucleic Acid Chemistry on Gene Function Analysis", 4-6.04.2002, St. Goar, Deutschland.

- [3] "Ribozym katalysierte Spaltungen von RNA unter Einsatz universeller, Fluor modifizierter Nucleo-basen" Stipendiaten-Treffen des Fonds der Chemischen Industrie (FCI), 28.09.2001, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
- [4] "Wirkstoffdesign – vom Molekül zum Arzneimittel" Vortragsreihe der Max Planck-Gesellschaft, Vortrag am Lessing-Gymnasium, 11.02.2003, Frankfurt a.M., Deutschland.

## Poster

- [1] **Klöpffer, A. E.**, Scheffer, U., Göbel, M., Engels, J. W. "Evaluation of fluorinated nucleoside-5'-tri-phosphates as universal bases in polymerase reactions" XVIth International Roundtable Conference, 12-16.09.2004, Minneapolis, USA, *submitted*
- [2] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "2'-Aminoethyl Modified Nucleosides Enable Ribozymes to Tolerate Point Mutations" Konferenz des SFB 579: "RNA-Structure, Function and Ligand Interaction" 30.10.-1.11. 2003, Frankfurt a.M., Deutschland.
- [3] Zivkovic, A., **Klöpffer, A. E.**, Parsch, J., Engels, J. W. "Synthesis of Fluoro Substituted Nucleic Acid Analogues and Their Influence on Structure and Stability of RNA Duplexes" 5<sup>th</sup> Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, 31.8.-3.9.2003, Cambridge, UK.
- [4] **Klöpffer, A. E.**, Zivkovic, A., Parsch, J., Engels, J. W. "Fluorobenzene and -benzimidazoles as Universal Bases and Base Pairs in RNA" Symposium "Fluorine in Life Sciences" 6.-10.07.2003, Bürgenstock, Schweiz.
- [5] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "Chemical Modifications of Hammerhead Ribozymes for Targeting Point Mutations in the HIV Genome" 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society, 02.-06.07.2003, Wien, Österreich
- [6] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "The Influence of Chemical Modifications on the Catalytic Activity of Ribozymes" Workshop der Aventis [i]lab Initiative "Entering an Unexplored World: RNA Targeting", 23.-25.01.2003, Wiesbaden, Deutschland.
- [7] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "The Development of Highly Efficient and Chemically Modified Hammerhead Ribozymes" XVth International Roundtable "Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications", 10-14.09.2002, Leuven, Belgien

- [8] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "Universal Fluorinated Nucleobases: Their Effect on the Catalytic Activity of Ribozymes" European Science Foundation (ESF) Workshop "Impact of Nucleic Acid Chemistry on Gene Function Analysis", 4-6.04.2002, St. Goar, Deutschland.
- [9] **Klöpffer, A. E.**, Engels, J. W. "Universal Fluorinated Nucleobases: Their Effect on the Catalytic Activity of Ribozymes" Konferenz des SFB 579: "Ligand-RNA Interactions", 21.-22.03.2002, Frankfurt a.M., Deutschland

# Curriculum Vitae

Name Astrid Eva Klöpffer

Geburtsdatum / -ort 23. Dezember 1975 in Frankfurt a. M.

Staatsangehörigkeit Österreich

## Studium

seit Okt. 2000 Doktorarbeit (mit Promotionsstipendium des VCI)  
J. W. Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, AK Prof. Engels

*Thema: "Synthese 2'-Aminoalkyl substituierter fluorierter Nucleosidanaloga und ihr Einfluss auf die katalytische Aktivität von anti-HIV Hammerhead Ribozymen"*

Okt. 1995 – Juni 2000 Studium der Chemie  
Johann W. Goethe-Universität Frankfurt a.M.

Vorexamen November 1997  
Gesamtnote "sehr gut" (1,2)

Hauptexamen Juni 2000  
Gesamtnote "sehr gut" (1,1)

Diplomarbeit Nov. 1999 - Juni 2000  
*Thema: "Artifizielle Nucleobasen zur selektiven Erkennung von T·A-Basenpaar-Inversionen und ihr Einsatz in tripelhelicalen Nucleinsäuren"*

## Schule

1986 - 1995 St. Angela-Gymnasium, Königstein/Ts.  
Abschluss: Abitur im Juni 1995  
Gesamtnote: 1,7

1982 - 1986 Karl von Ibell-Grundschule, Frankfurt a.M.



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, 10. August 2004

.....  
(Astrid Eva Klöpffer)