

Synthese und Charakterisierung von immunmodulierenden Oligodesoxynukleotiden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Gerda Wittel
aus Frankfurt am Main

Februar 2009

Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2004 bis Februar 2009 am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. J. W. Engels angefertigt.

Allen Personen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben, gilt mein herzlicher Dank.

Prof. Engels danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die interessante Themenstellung, für sein offenes Ohr und seine hilfreichen Anregungen und die gute experimentelle Ausstattung. Vor allem aber danke ich ihm, dass er mir ermöglicht hat, am Graduiertenkolleg GK1172 „Erforschung, Entwicklung und Sicherheit von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln“ teilzunehmen, und dafür bereit war, selber viel Zeit zu investieren.

In Rahmen des Graduiertenkollegs gilt mein Dank meinen Co-Betreuern P. D. Köhl und Prof. Steinhilber sowie P. D. Mühl. Ganz herzlich möchte ich mich bei Sabine Lindner (AK Steinhilber), Sabine Hünecke (AK Köhl) und Malte Bachmann (AK Mühl) bedanken für die engagierte Zusammenarbeit und die Arbeit, die sie für mich freiwillig übernommen haben. Dabei hat Sabine Lindner Zellen ausgewählt, kultiviert, gezählt und mit meinen Oligodesoxynukleotiden inkubiert, Sabine Hünecke hat den Zellüberstand auf Zytokine geprüft mit Hilfe des *cytometrischen bead arrays*, Malte Bachmann hat periphere mononukleäre Blut-Zellen aus Eigenblut sowie Blutspenden seiner Kollegen isoliert, mit meinen Oligodesoxynukleotiden inkubiert und mit Hilfe eines *ELISA* auf ihren INF- α und IL-8-Gehalt hin gemessen. Ferner gilt mein Dank allen Teilnehmern des Graduiertenkollegs für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Interesse an meiner Arbeit und der freundschaftlichen Atmosphäre. Frau Dr. Held und Frau Koob danke ich für ihre organisatorische Arbeit, dem Arbeitskreis Köhl danke ich für die Raji-Zellen.

Meinen Arbeitskollegen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie ihrer Hilfsbereitschaft: Stefan Bernhardt, Dr. Jelena Bozilovic, Olga Frolow, Christian Grünewald, Jens Haas, Sigeng Han, Ismail Hassani, Angelika Keller, Taewoo Kwon, Nadja Nikolaus, Dalibor Odadzic, Nelly Piton, Radouane Rkini, Rainer Schmidt, Dr. Romualdas Smicius, Alma Sokozovic, Dr. Katharina Strube, Neda Tatarovic, Lena Wicke, Dr. Aleksandra Zivkovic. Dr. Romualdas Smicius danke ich ganz besonders für seine synthetischen Hilfestellungen, die entscheidend zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich Radouane Rkini, Lena Wicke, Alma Sokozovic, Dr. Jens Haas und Christian Grünewald für

ihre Kameradschaft. Dr. Jens Haas, Dr. Nicole Jung, Frau PD. Köhl, meiner Schwester und meinem Vater danke ich für die Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Dr. Uhlmann von *Coley Pharmaceutical GmbH* danke ich für die LC-MS-Analytik. Von ihm entstammt der Vorschlag, „pos“ als Testsequenz zu wählen. Frau Dr. Bahr, Frau Brill und Frau Prieß danke ich für die Aufnahme der Massenspektren. Frau Christof sei für die Durchführungen der Elementaranalysen gedankt. Dem Arbeitskreis Göbel danke ich für IR-Messungen. Stefan Bernhardt und Herrn Dr. Dörner danke ich für HPLC-Trennungen. Herrn Olbricht und Herrn Zimmermann danke ich für NMR-Hilfestellungen. Mein Dank gilt Herrn Dr. Bats für die Aufnahme von Kristallstrukturen.

Stefan Bernhardt, Dr. Haas und Marko Weimar danke ich für ihre Hilfe bei Computerproblemen. Diana Knapp danke ich für ihre Hilfe bei der Bedienung des *Top Spin*-Programms. Herrn Müller danke ich herzlich für seine engagierte Hilfe bei technischen Problemen.

Marcel Adler danke ich für die Vermittlung an Frau Dr. Waibler vom Paul-Ehrlich-Institut, ohne ihn wären die „CpG-Treffen“ nicht möglich gewesen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinem Vater für die Einführung in die Varianzanalyse. Herrn Ferebee danke ich für die Durchführung des *Wilcoxon* Tests.

Meinen Freunden, vor allem Alexandra Mosch, danke ich für unsere Freundschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich im Verlauf meines bisherigen Lebens in jeder Hinsicht unterstützt hat. Besonderer Dank gebührt meiner Schwester, Dr. Bärbel Wittel, meiner Mutter, Dipl.-Hdl. Christa Wittel und meinem Vater, Dr. Klaus Wittel.

1. Einleitung: Die Bedeutung von CpG-Oligodesoxynukleotiden für das Immunsystem	
1.1 Grundzüge des Immunsystems	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem - PRR und ihre PAMP	2
1.1.2 Das angeborene Immunsystem - zelluläre Abwehr	3
1.1.3 Das angeborene Immunsystem - humorale Abwehr	4
1.1.4 Das adaptive Immunsystem - zelluläre Abwehr	4
1.1.5 Das adaptive Immunsystem - humorale Abwehr	4
1.2 Entdeckung des CpG-Motivs	5
1.3 Erkennung von CpG-DNA durch TLR9	6
1.4 Signalwege von TLR	7
1.4.1 Andere TLR und ihre Liganden (TLR 3,7,8,9)	9
1.5 CpG-ODN Struktur-Wirkungsbeziehungen	11
1.5.1 Sequenzabhängigkeit	11
1.5.2 Klassen von CpG-ODN (A, B, C)	12
1.5.3 Modifizierte CpG-ODN (I: Cytosin-Modifikationen)	14
1.5.4 Modifizierte CpG-ODN (II: Guanin-Modifikationen)	16
1.5.5 Modifizierte CpG-ODN (III: abasische Stellen)	17
1.5.6 Modifizierte CpG-ODN (IV: Phosphat-Modifikationen PO/PS, PMe)	18
1.5.7 Modifizierte CpG-ODN (V: Zucker-Modifikationen drib/rib)	19
1.6 <i>Drug delivery</i>	19
1.7 Stabilität und Pharmakokinetik	20
1.8 Immunomere	20
1.9 Verzweigte CpG-ODN	21
1.10 Doppelsträngige und einzelsträngige CpG-ODN	22
1.11 Andere immunstimulierende DNA-Sequenzen	22
1.12 Inhibitorische Sequenzen	23
1.13 Medizinische Anwendungen von CpG-ODN	24
1.14 Nebenwirkungen von CpG-ODN	25
2. Aufgabenstellung	26

3. Ergebnisse und Diskussion

CHEMISCHER TEIL

3.1 Auswahl der synthetisierten 2'-Desoxycytidin-Analoga	28
3.2 Design der verzweigenden Phosphoramidite	29
3.3 Synthesestrategien für dC-Derivate und verzweigenden Phosphoramidite	32
3.3.1 Synthesestrategie I: Stereospezifische Glykosilierung und Umsetzung zum Phosphoramidit von dC-Analoga	33
3.3.1.1 Glykosylierung	34
3.3.1.2 Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe	37
3.3.1.3 Einführung der Dimethylformamidin-Schutzgruppe	38
3.3.1.4 Einführung der TIPDS-Schutzgruppe	38
3.3.1.5 Thioveresterungsversuche	39
3.3.2 Synthesestrategie II: Glykosilierung und Umsetzung zum Phosphoramidit von dC-Analoga	40
3.3.2.1 Synthese der 1-Chlor-3,5-di- <i>O</i> -toluoyl-2-desoxyribose	41
3.3.2.2 Synthese von 4,6-Diamino-2-thiopyrimidin und 6-Aminocytosin	42
3.3.2.3 Synthese von 5-Nitrocytosin	43
3.3.2.4 Glykosilierung von 5-Nitrocytosin mit 1-Chlor-3,5-di- <i>O</i> -toluoyl-2-desoxyribose	43
3.3.3 Synthesestrategie III: Modifizierung von 2'-Desoxycytidin an der Position 5	43
3.3.3.1 Einführung von 3',5'-Hydroxyl-Schutzgruppen	45
3.3.3.2 Iodierung	45
3.3.3.3 Sonogashira-Kupplung	46
3.3.4 Synthesestrategie IV: Synthese von verzweigenden Phosphoramiditen	46
3.3.4.1 Mechanismus der Sonogashira-Kupplung	48
3.3.4.2 Suzuki als alternative Kupplungsreaktion	49
3.3.4.3 Versuche der Suzuki-Kupplung von <i>O</i> -(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)- <i>p</i> -benzylether- <i>p</i> -boronsäure mit 5-Iod-2'-desoxyuridin	50
3.3.4.4 Dimethoxytritylierung	51
3.3.4.5 Phosphitylierung	51
3.4 Synthese von Oligodesoxynukleotiden	52
3.4.1 Synthese von Oligodesoxynukleotiden mit Phosphatrückgrad (PO-ODN)	52
3.4.2 Synthese von Oligodesoxynukleotiden mit Thiophosphatrückgrad	

(PS-ODN)	54
3.4.3 Synthese von symmetrisch verzweigten Oligodesoxynukleotide	56
3.4.4 Syntheseversuche asymmetrisch verzweigten ODN und Dentrimeren	59
3.5 Weitere Informationen zu den verwendeten Schutzgruppen	60
3.5.1 Acetyl/Benzoyl/Toluoyl	60
3.5.2 Dimethylformamidin	60
3.5.3 Dimethoxytriphenylmethyl	61
B I O L O G I S C H E R T E I L	
3.6 Auswahl der Zellen	62
3.7 <i>Cytometric Bead Assay</i>	64
3.8 <i>ELISA</i>	72
4. Zusammenfassung	87
5. Ausblick	92
6. Experimenteller Teil	
C H E M I S C H E R T E I L	
6.1 Analytische und präparative Methoden	93
6.1.1 NMR-Spektroskopie	93
6.1.2 Infrarot-Spektroskopie	93
6.1.3 Elementaranalyse	93
6.1.4 Massenspektroskopie	93
6.1.5 Schmelzpunkt-Bestimmung	94
6.1.6 Dünnschicht-Chromatographie	94
6.1.7 Präparative Säulenchromatographie	94
6.1.8 Oligodesoxynukleotid-Synthese-Automat	94
6.1.9 Semipräparative und analytische Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie	94
6.1.10 Röntgenstrukturanalyse	95
6.2 Liste der verwendeten Chemikalien	95
6.3 ODN-Synthese	97
6.3.1 Reagenzien für die ODN-Synthese	97
6.3.2 Handhabung	99

6.3.3 DMT On/Off	99
6.3.4 Besonderheiten für die PS-ODN-Synthese	100
6.3.5 Aufreinigung der ODN	100
6.3.6 Liste der synthetisierten ODN	101
6.3.7 Reinheit der ODN	109
6.4 Liste der synthetisierten Verbindungen	109
6.5 Darstellung und Charakterisierung der Einzelverbindungen	111
6.5.1 Synthese von 6-Oxocytidin-Derivaten	111
-Synthese von 6-Oxo-2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetyl-cytidin mit Hexamethyldisilazan	111
- Synthese von 6-Oxo-2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetyl-cytidin mit Bis- <i>N,O</i> -(trimethylsilyl)-acetamid	112
-Synthese von 6-Oxocytidin	113
-Synthese von 4- <i>N</i> -(Dimethylformamidin)-6-oxocytidin	114
-Synthese von 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra-(<i>iso</i> -propyl)-di-siloxan	115
-Synthese von 4- <i>N</i> -(Dimethylformamidin)-6-oxo-3',5'- <i>O</i> -[1'',1'',3'',3''-tetra-(<i>iso</i> -propyl)-di-siloxan-1,3-diyl]-cytidin	116
6.5.2 Synthese von 5-Nitro-2'-dC-Derivaten	117
-Synthese von 1-Methoxy-3,5-di- <i>O</i> -toluoyl-2-desoxyribose	117
-Synthese von 1-Chlor-3,5-di- <i>O</i> -toluoyl-2-desoxyribose	118
-Synthese von 5-Nitrocytosin	119
-Synthese von 5-Nitro-3',5'-di- <i>O</i> -toluoyl-2'-desoxycytidin	120
-Synthese von 2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-5-nitrocytidin	121
-Synthese von 5-Nitrocytidin	122
6.5.3 Synthese von 6-Aminocytosin	123
-Synthese von 4,6-Diamino-2-thiopyrimidin	123
-Synthese von 4,6-Diamino-2-(thiomethylencarboxyl)-pyrimidin	124
-Synthese von 6-Aminocytosin	125
6.5.4 Synthese von 4-<i>N</i>-Benzoyl-3',5'-di-<i>O</i>-(<i>tert</i>-butyldimethylsilyl)-5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin	126
-Synthese von 3',5'-Di- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin	126

-Synthese von 3',5'-Di- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin	127
-Synthese von 3',5'-Di- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin	128
-Synthese von 4- <i>N</i> -Benzoyl-3',5'-di- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin	129
-Synthese von 4- <i>N</i> -Benzoyl-3',5'-di- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin	131
6.5.5 Synthese von 4-<i>N</i>-(Dimethylformamidin)-5-iod-5'-<i>O</i>-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-<i>O</i>-[2-cyanoethoxy-<i>N,N</i>-di-(<i>iso</i>-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxycytidin	132
-Synthese von 3',5'-Di- <i>O</i> -acetyl-2'-desoxycytidin	132
-Synthese von 3',5'-Di- <i>O</i> -acetyl-5-iod-2'-desoxycytidin	133
-Synthese von 5-Iod-2'-desoxycytidin	134
-Synthese von 4- <i>N</i> -(Dimethylformamidin)-5-iod-2'-desoxycytidin	135
-Synthese von 4- <i>N</i> -(Dimethylformamidin)-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxycytidin	136
-Synthese von 3'- <i>O</i> -[2-Cyanoethoxy- <i>N,N</i> -di-(<i>iso</i> -propyl)-amino-phosphin]-4- <i>N</i> -(dimethylformamidin)-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxycytidin	137
6.5.6 Versuche der Sonogashira-Kupplung während der ODN-Synthese	138
6.5.7 Synthese von 5-[(TBDMS/DMT)OCH₂C≡C]-dU-Phosphoramidit	139
-Synthese von 5'- <i>O</i> -(Dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxyuridin	139
-Synthese von <i>O</i> -(Dimethoxytriphenylmethyl)-prop-2-in-ether	140
-Synthese von 5-[1''- <i>O</i> -(Dimethoxytriphenylmethyl)-prop-2''-in-ether]-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin	141
-Synthese von 3'- <i>O</i> -[2-Cyanoethoxy- <i>N,N</i> -di-(<i>iso</i> -propyl)-amino-phosphin]-5-[1''- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-prop-2''-in-ether]-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin	142
-Synthese von <i>O</i> -(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-prop-2-in-ether	143
-Synthese von <i>O</i> -(<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl)-prop-2-in-ether	143

6.5.8 Synthese von 5-[TBDMS/DMT)O(CH₂)₄C≡C]-dU-phosphoramidit	144
-Synthese von <i>O</i> -(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5-in-ether	144
-Synthese von 5'- <i>O</i> -(Dimethoxytriphenylmethyl)-5-(hex-5''-in-1''-ol)-2'-desoxyuridin	145
-Synthese von 5-[1''- <i>O</i> -(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin	146
-Synthese von 3'- <i>O</i> -[2-Cyanoethoxy- <i>N,N</i> -di-(<i>iso</i> -propyl)-amino-phosphin]-5-[1''- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin	147
-Synthese von (<i>O</i> - <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-hex-5-in-1-ether	148
-Synthese von 5-[1''- <i>O</i> -(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin	149
-Synthese von 5-[1''- <i>O</i> -(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-3'- <i>O</i> -[2-cyanoethoxy- <i>N,N</i> -di-(<i>iso</i> -propyl)-aminphosphin]-5'- <i>O</i> -(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin	151
6.5.9 Synthese von 5-(But-3''-in-1''-ol)-5'-<i>O</i>-(dimethoxytriphenylmethyl)-dU	152
6.5.10 Synthese von Benzylalkohol-Derivate	153
-Synthese von <i>p</i> -Brom- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-benzylether	153
-Synthese von <i>O</i> -(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-benzylether- <i>p</i> -boronsäure	154
6.5.11 Synthese von 5'-<i>O</i>-Benzoyl-thymidin-phosphoramidit	155
-Synthese von 5'- <i>O</i> -Benzoyl-thymidin	155
-Synthese von 5'- <i>O</i> -Benzoyl-3'- <i>O</i> -[2-cyanoethoxy- <i>N,N</i> -di-(<i>iso</i> -propyl)-aminphosphin]-thymidin	157
BIOLOGISCHER TEIL	
7.1 <i>Cytometric Bead Assay</i>	158
7.1.1 Kultivierung und Inkubierung von Raji-Zellen mit ODN für den <i>CBA</i>	158
7.1.2 Durchführung des <i>CBA</i>	159
7.2 IFN- α - <i>ELISA</i>	160
7.2.1 Isolierung und Inkubierung von <i>hPBMC</i> mit ODN für den <i>ELISA</i>	161

7.2.2 Durchführung für den 1. Vorversuch	161
7.2.3 Durchführung für den 2. Vorversuch	163
7.2.4 Durchführung für den Hauptversuch	165
8. Anhang	
8.1 Varianzanalysen	166
8.1.1 Varianzanalysen für den <i>CBA</i>	166
8.1.2 Varianzanalysen für die <i>ELISA</i> -Vorversuche	168
8.1.3 Varianzanalysen für den <i>ELISA</i> -Hauptversuch	171
8.2 <i>Wilcoxon</i> Test	198
8.3 ODN-Syntheseprotokoll	200
8.4 ¹ H-NMR-Spektren	201
8.5 Analytische HPLC-Spektren	203
8.6 Kristallstrukturen	206
8.7 Abkürzungsverzeichnis	231
8.8 Literaturverzeichnis	237

1. Einleitung: Die Bedeutung von CpG-Oligodesoxynukleotiden für das Immunsystem

Über Gesundheit oder Krankheit, Leben oder Tod entscheiden nicht nur unser Lebensstil und Umwelteinflüsse, sondern unsere Erbanlagen (DNA) und unser Immunsystem, die in einem engen Wechselspiel zueinander stehen. Die 2'-Desoxynukleinsäure (DNA) ist keine uninteressante, viel zu lange Sequenzabfolge von den vier Nukleotiden dA (2'-Desoxyadenosin), dC (2'-Desoxycytidin), dG (2'-Desoxyguanosin) und T (Thymidin), die hauptsächlich funktionslos, zum geringen Anteil als Bauplan für RNA und Proteine fungiert, sondern ist ein faszinierendes Informations- und Regulationssystem, das wir erst in Ansätzen begreifen.

Diese Arbeit soll einen Einblick in die Immunmodulation durch DNA am Beispiel von CpG-Oligodesoxynukleotiden vermitteln. CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) wurden hierfür synthetisiert und biologisch getestet. Um für die Grundlagenforschung und für medizinische Anwendungen interessant zu sein, wurden chemische Modifikationen an CpG-ODN eingeführt. Es sollte geprüft werden,

- ob die Testsequenz „pos“ (ein Vollthioat-CpG-ODN mit nur einem CpG-Motiv der Sequenz tgtcgt₁₅) immunstimulierend ist,
- ob die Immunstimulation vom CpG-Motiv abhängt,
- welche anderen CpG-haltigen Sequenzen eine Immunmodulation bewirken,
- ob sich die Immunstimulation von CpG-ODN durch zusätzliche funktionelle Gruppen am Cytosin steigern läßt,
- welche chemische Modifikationen hierfür geeignet und gut synthetisierbar sind,
- ob verzweigte CpG-ODN eine verstärkte Immunmodulation bewirken,
- welcher Klasse von CpG-ODN ein verzweigtes CpG-ODN ähnelt,
- ob die Immunstimulierung von verzweigten CpG-ODN vom CpG-Motiv abhängt,
- ob verzweigte CpG-ODN synthetisch gut zugänglich sind und
- welche Struktur-Wirkungs-Beziehungen sich aus all diesen Untersuchungen schließen lassen.

1.1 Grundzüge des Immunsystems

Der menschliche Körper ist ständigen Angriffen von Pathogenen ausgesetzt. Im Laufe der Evolution hat sich ein Immunsystem herausgebildet, dessen Aufgabe darin besteht, Fremdstoffe zu detektieren und unschädlich zu machen. Das Immunsystem verfolgt dabei zwei

Strategien: Zum einen identifiziert das angeborene (unspezifische) Immunsystem spezifische evolutionär konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (englisch: PAMP, *pathogene associated molecular patterns*) mit Hilfe von speziellen Mustererkennungsrezeptoren (englisch: PRR, *pattern recognition receptors*), diese leiten bei Kontakt mit PAMP eine sofortige Immunantwort ein. Zum anderen reagiert das adaptive (spezifische) Immunsystem auf evolutionäre Veränderungen in der Chemie des Pathogens, indem es in einem Selektionsprozess Antikörper gegen Fremdkörper bildet, dieser Prozess benötigt jedoch mehrere Tage.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem - PRR und ihre PAMP

Sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zytosol befinden sich PRR. Vertreter der Transmembranrezeptoren sind die sogenannten *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), die virale Nukleinsäuren und bakterielle Zellwandbestandteile erkennen (Medzhitov, 2007). Kohlehydrate sind die Liganden von *C-type lectin-(like) receptors* (CLR) (Ebner et al., 2004). Zu ihnen gehören z. B. Dectin-1, das β -Glycan aus Pilzen erkennt, Mannose Rezeptoren, Mannose-bindende Lectine und DC-SIGNR, die Mannose auf HIV, Leishmania und Mycobakterien detektiert. *Scavenger Receptors* (SR) binden modifizierte Lipoproteine (Krieger, 1997).

Als zytosolische Rezeptoren detektieren *NOD-like-Rezeptoren* (NLR) bakterielle Zellwandbestandteile wie z. B. β -Peptidoglykane, *DNA-dependent activator of interferone regulatory factors* (DAI) hat sich auf virale doppelsträngige DNA spezialisiert, *RIG-I-like* Rezeptoren, wobei RIG für *retinoic acid inducible gene* steht, und *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA-5), erkennen virale RNA (Medzhitov, 2007).

RIG-I-like Rezeptoren können virale RNA von körpereigener unterscheiden, da körpereigene RNA entweder einzelsträngig und mit einer 5'-Cap vorliegt (mRNA) oder Haarnadelstrukturen (tRNA, rRNA) ausbildet; virale einzelsträngige RNA dagegen trägt statt dem 5'-Cap ein 5'-Triphosphat und bildet keine Haarnadelstrukturen aus, doppelsträngige virale RNA enthält auch keine Haarnadelstrukturen. Die Unterscheidung von DAI zwischen Fremd-DNA und körpereigener beruht auf der Tatsache, dass körpereigene DNA im Nukleus vorliegt, nicht aber im Zytosol (Medzhitov, 2007). Zur Nomenklatur: Taniguchi führte DAI als neuen Namen für das Interferon induzierende Gen *Zbp1* ein, das das Protein DLM-1 kodiert, welches im Peritoneum (Bauchfell) tumoröser Mäusen exprimiert wird. DLM-1 wurde auch ZBP1 genannt, da es sich um ein Z-DNA Bindungsprotein handelt. Als Synonym für RIG-I wird auch DDX58 verwendet, für MDA-5 auch IFIH1 (Yoneyama & Fujita, 2007).

Eine Übersicht der PRR und ihrer PAMP ist in Abbildung 1 zu finden aufgeteilt in Transmembranrezeptoren und zytosolische Rezeptoren, in Abbildung 2 ist ihre Lokalisierung in der Zelle gezeigt.

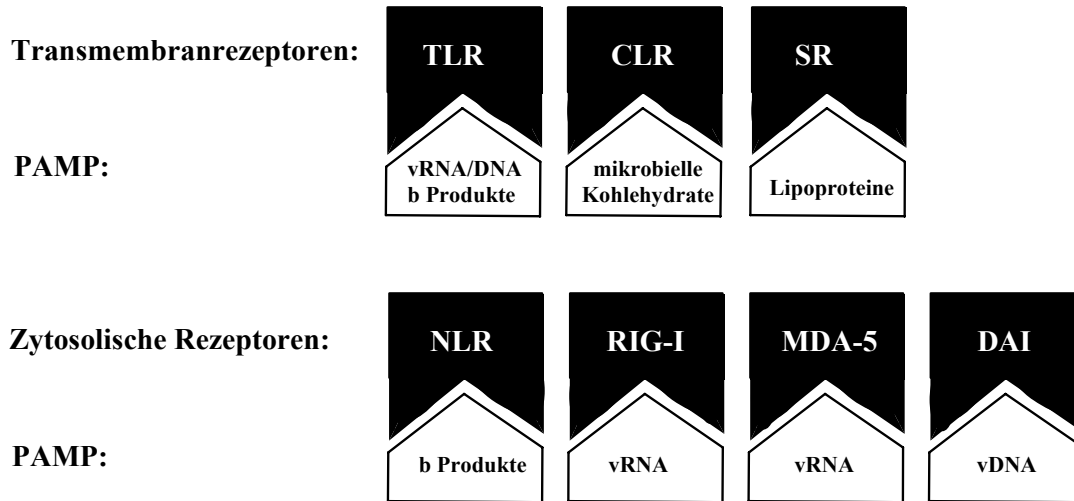


Abb.1: Rezeptoren und ihre PAMP; TLR=toll like receptors, v=virale, b=bakterielle, CLR=C-type lectin receptors bzw. C-type lectin-like receptors, SR=scavenger receptors, LDL=low density lipoprotein, NLR=Nuclear oligomerization domain like receptors, RIG-I= retinoic acid inducible gene I, MDA-5=melanoma differentiation associated gene 5, DAI=DNA-dependent activator of interferone regulatory factors

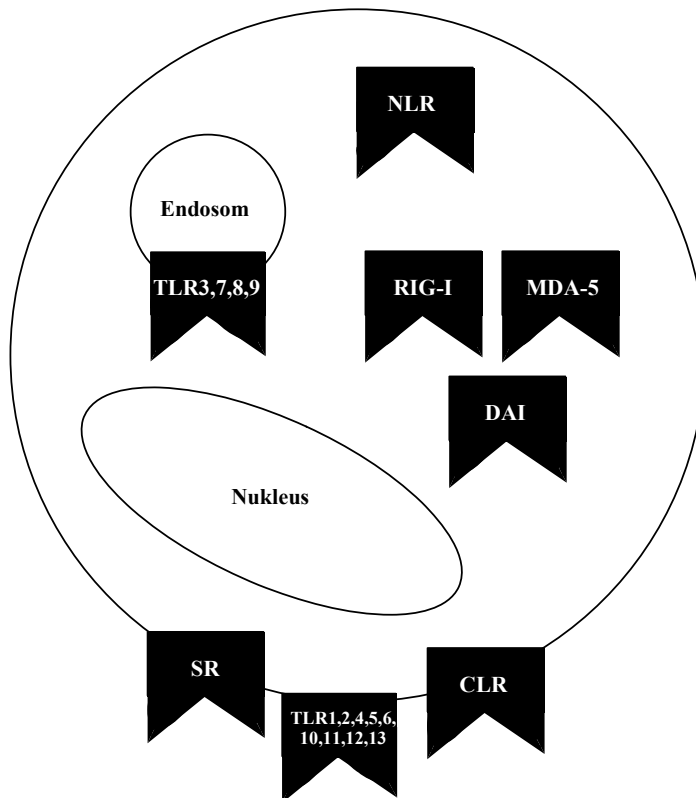


Abb.2: Rezeptoren und ihre Lokalisierung in einer Säugetierzelle des Immunsystems

1.1.2 Das angeborene Immunsystem - zelluläre Abwehr

Eingedrungene Pathogene treffen zuerst auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, die die Eindringlinge durch Phagozytose unschädlich machen. Natürliche Killerzellen werden von Interferonen angelockt und zerstören Viren und Bakterien sowie Tumorzellen, indem sie deren Zellmembran perforieren. Als weitere zelluläre Bestandteile

des angeborenen Immunsystems sind eosinophile und basophile Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten zu nennen (Faller, 2004).

1.1.2 Das angeborene Immunsystem - humorale Abwehr

Das Komplementsystem, die „akute Phase-Proteine“ und das Lysozym bildet die humorale Abwehr des angeborenen Immunsystems. Aktiviert wird das Komplementsystem von bakteriellen Zellwandbestandteilen oder durch bestimmte Antigen-Antikörper-Komplexe. Das Komplementsystem besteht aus ca. 20 Plasmaproteinen, die eine Enzymkaskade zur Vernichtung der bakteriellen Bestandteile initiieren. Am Ende dieser Enzymkaskade wird ein Membranangriffskomplex (Englisch: *membrane attack complex*) gebildet, mit dem Bakterien durchlöchert werden. Gleichzeitig hydrolysiert das Lysozym die angegriffenen Bakterienzellwände (Faller, 2004).

1.1.4 Das adaptive Immunsystem - zelluläre Abwehr

Das adaptive Immunsystem besteht aus B- und T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen. Lymphozyten machen 20-40% der farblosen Blutkörperchen aus. CD8⁺-T-Zellen, auch zytotoxische oder *killer-T-Zellen* genannt, bewirken die Zell-vermittelte Abwehr des adaptiven Immunsystems. Zytotoxische T-Zellen erkennen unnormale Zellen. Zum Beispiel kann eine virusinfizierte Zelle durch zytotoxische T-Zellen detektiert und zerstört werden. Unter Antigen-präsentierenden Zellen versteht man Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen. Ihnen ist gemeinsam, dass sie MHC II-vermittelt antigenische Peptide erkennen, prozessieren und T-Zellen präsentieren, die ihrerseits für weitere Aktivierung des Immunsystems sorgen (Elliott & Elliot, 2001; Goldsby et al., 2003).

1.1.5 Das adaptive Immunsystem - humorale Abwehr

Die humorale Abwehr des adaptiven Immunsystems besteht in der Antikörper-Sezernierung von B-Zellen. Zur Aktivierung von nativen B-Zellen zu Effektor-B-Zellen, den sogenannten Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, werden T-Helferzellen, CD4⁺-T-Zellen, benötigt. Neben der Aktivierung von B-Zellen aktivieren T-Helfer-Zellen auch zytotoxische T-Zellen, Makrophagen.

Antikörper sind Immunoglobuline, mit IgG als häufigster (80% des Gesamt Immunoglobulin-gehaltes im Blut) Vertreter der Immunoglobulinen (siehe auch Tabelle 1). Daneben gibt es IgA (10-15%, hauptsächlich monomer, aber auch als Dimer, Trimer und Tetramer vorkommend; es ist die vorherrschende Klasse an Immunoglobulinen in externen Sekreten wie Muttermilch, Tränen und Mukus), IgM (5-10%, wird an der Membranoberfläche von B-

Zellen gebildet und als Pentamer ins Blut sekretiert; IgM ist das zuerst gebildete Immunglobulin als Primärantwort auf ein Antigen; es ist 100 bis 1000 mal effektiver als IgG), IgD (0.2%) und IgE (hochwirksam in Konzentrationen von 0.3 µg/ml, bei anaphylaktischem Schock, Heuschnupfen oder Asthma gebildet). Vermutlich kann eine sezernierende Plasma-B-Zelle mehr als 2000 Antikörpermoleküle pro Sekunde freisetzen.

Tab. 1: Häufigkeit von Immunoglobuline

Immunoglobuline	%uale Menge im Blut
IgG	80
IgA	10 bis 15
IgM	5 bis 10
IgD	0.2
IgE	kleiner als 0.2

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität ist das adaptive Immunsystem nicht Keimbahn kodiert, sondern wird durch positive und negative Selektion ausgebildet und klonal expandiert. Die Selektion soll bewirken, dass die Lymphozyten einerseits nicht mit körpereigenen Stoffen reagieren, wodurch Autoimmunerkrankungen verhindert werden sollen, andererseits potentiell pathogene Antigene erkennen sollen. Eine weitere Besonderheit des adaptiven Immunsystems ist sein immunologisches Gedächtnis, dabei handelt es sich um Gedächtnis-B-Zellen (Englisch: *memory B cells*), deren Lebensdauer Jahre umfaßt, bei nativen B-Zellen dagegen nur Tage. (Goldsby et al., 2003)

1.2 Entdeckung des CpG- Motivs

Inspiriert von Anekdoten, dass eine Tumorregression aufgrund einer bakteriellen Infektion stattgefunden haben sollte, injizierte der New Yorker Chirurg William B. Coley 1891 Streptokokken in einen Patienten mit bösartigem, nicht operablem Tumor und konnte tatsächlich eine Tumorregression beobachten. Die nächsten 40 Jahre verabreichte Coley mehr als 1000 Tumorpatienten abgetötete Bakterien bzw. Bakterienextrakte, die sogenannten *Coley's toxins*. Neben viel Kritik brachte es ihm den Namen, „Vater der Immuntherapie“ ein. Anscheinend ist ein bakterieller Bestandteil in der Lage, das humane Immunsystem in einer Weise zu stimulieren, dass es bei bestimmten Krebsarten zur Tumorregression führt (McCarthy, 2006). Coleys Ansatz geriet in Vergessenheit bis Tokunaga 1984 herausfand, dass die DNA der Bacillen *Calmette-Guérin* (BCG) für die Antitumorwirkung verantwortlich ist (Tokunaga et al., 1984). Yamamoto zeigte Jahre später, dass Bakterien-DNA, nicht aber Wirbeltier-DNA, das Immunsystem von Säugetieren zu stimulieren vermag. (Yamamoto et al., 1992). 1995 konnte Krieg die Ursache für die Immunstimulation bakterieller DNA noch weiter ein-

schränken, er entdeckte ein immunstimulierendes CpG-Motiv. Er zeigte, dass synthetische Oligodesoxynukleotide, die ein CG-Dimer enthalten, das von zwei Purinen (Pu), bevorzugt GpA, am 5'-Ende und zwei Pyrimidinen (Py), bevorzugt TpC oder TpT, am 3'-Ende benachbart ist, eine immunstimulierende Wirkung auf Mäuse, Aktivierung von B-Zellen und Sekretion von IgM sowie Aktivierung von Natürliche Killerzellen, ausüben. Dieses Hexamer PuPuC GPyPy wurde „CpG-Motiv“ genannt nach seinem zentralen Cytidin-phosphat-Guanosin-Dimer. Eine besonders starke Stimulierung wurde mit der Sequenz GAC GTT erreicht, es wird optimales CpG-Maus-Motiv genannt (Krieg et al., 1995).

1.3 Erkennung von CpG-DNA durch TLR9

Wie kann die Immunstimulation von Säugetieren durch bakterielle DNA verstanden werden? Da DNA bei gesunden Zellen nur im Zellkern lokalisiert ist, wäre denkbar, dass Detektoren für DNA jenseits des Zellkerns ausgebildet werden. Diese würden defekte Zellen sowie Fremd-DNA, die in eine Zelle von außen eingedrungen ist, detektieren. Bei *Drosophila* wurde ein solcher Detektor gefunden, der sogenannte Toll-Rezeptor. In Wirbeltieren und Säugetieren wurden so ähnliche Rezeptoren gefunden, die *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Es gibt 13 verschiedene TLR, einer von ihnen, TLR9, detektiert CpG-DNA.

TLR9 ist ein Protein mit 1032 Aminosäuren (Hemmi, H. et al., 2000). Dieser Rezeptor vermag zwischen Fremd-DNA und körpereigenen DNA zu unterscheiden. Dafür müssen die Unterschiede im humanen und bakteriellen Genom erhalten: Während im bakteriellen Genom die Häufigkeit eines CpG-Dinukleotids der statistischen Häufigkeit von 1 : 16 entspricht, ist das CpG-Dimer im humanen Genom mit 1 : 60 unterrepräsentiert und zu 70-89% methyliert an der 5-Position von Desoxycytidin. Bakterielle DNA dagegen liegt überwiegend unmethyliert vor (Heckelsmiller, 2003).

Grund für das seltene Vorkommen von CpG-Dimeren im humanen Genom liegt in den Transaminasen, die die 4-Aminofunktion gegen ein Carbonylsauerstoffatom austauschen. Geschieht dies bei unmethylierten Desoxycytidinen, so werden sie in Desoxyuridinen umgewandelt, die als RNA-Nukleoside von DNA-Reparaturenzymen erkannt werden und wieder in Desoxycytidine umgewandelt werden. 5-Methyl-desoxycytidine dagegen werden von Transaminasen in Thymidine überführt, die als DNA-Bausteine nicht von den Reparaturenzymen detektiert werden können.

Ursächlich für die übermäßige Methylierung des humanen Genoms im Vergleich zum bakteriellen sind Cytosinmethyl-Transferasen, die beim Menschen deutlich aktiver und zahlreicher vorkommen als bei Bakterien. Sie katalysieren die S-Adenosylmethionin-vermittelte Methylierung wie in Abbildung 3 gezeigt:

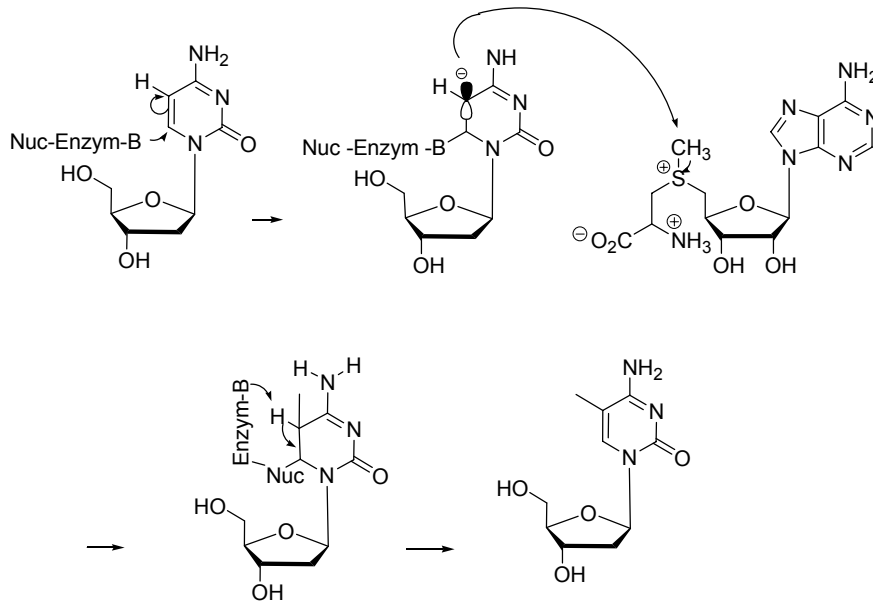


Abb.3: Mechanismus der Methylierung an der 5-Position von 2'-Desoxycytidin mit Hilfe von S-Adenosylmethionin und Cytosinmethyl-Transferasen (Enzym), die über nukleophile (Nuc) und basische (B) Gruppen verfügen

Der CpG-Signalweg ist äußerst komplex: Zunächst wird die CpG-DNA durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Anschließend muß die CpG-DNA zu ihrem Detektor, TLR9, gelangen. Ob hierbei noch andere Moleküle beteiligt sind, ist noch nicht geklärt. Bei Mäusen scheint dies der Fall zu sein: Das DNA-Bindeprotein *high mobility group box 1* (HMGB1), assoziiert mit TLR9 im endoplasmatischen Retikulum, woraufhin der HMGB1-TLR9-Komplex ins frühe Endosom transloziert. Dort findet die initiale Erkennung von CpG-DNA durch TLR9 statt, die durch die Anwesenheit von HMGB1 beschleunigt wird (Ivanov et al, 2007). Ob nur jeweils ein TLR9-Molekül mit einem CpG-Oligodesoxynukleotid-Molekül wechselwirkt, oder ob mehrere CpG-ODN-Moleküle an ein TLR9-Molekül binden, oder ob ein TLR9-Homo- oder Heterodimer an der Erkennung von CpG-DNA beteiligt ist, ist noch unbekannt. Jedenfalls ist die Bindung zwischen CpG-DNA und TLR9 entscheidend für die Auslösung einer Immunantwort, die von medizinischem Interesse ist. Im folgenden Kapitel wird die Signalkaskade allgemein für TLR und ihre Liganden erklärt.

1.4 Signalwege von TLR

TLR sind wie in Abbildung 4 angeordnet: Sie haben eine *leucin rich repeat* (LRR)-Domäne am N-Terminus, der entweder in den extrazellulären Raum zeigt (TLR1-6, 10, 11) oder ins Innere des Endosoms (TLR3, 7, 8 oder 9). Diese LRR-Domäne ist für die Wechselwirkung mit dem jeweiligen Liganden zuständig. Am intrazellulären C-Terminus befindet sich die Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Homologie Domäne, die Protein-Protein-Wechselwirkungen

zwischen den TLR-Proteinen und ihren downstream Signaltransduktions-Proteinen induziert (Basu & Fenton, 2004).

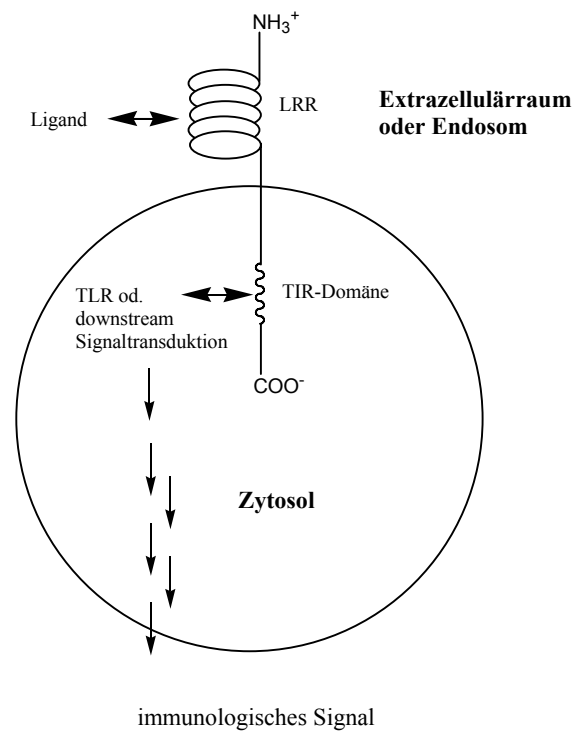


Abb.4: Aufbau eines TLR in einer Zelle mit den entscheidenden Wechselwirkungsdomänen

Generell kann der Signalweg von *Toll-like* Rezeptoren wie in der linken Darstellung der Abbildung 5 beschrieben werden: Nach Wechselwirkung des TLR mit seinem Liganden wird das Adaptormolekül MyD88, auch myeloides Differenzierungsgen 88 der primären Antwort genannt, rekrutiert. Anschließend erfolgt die Signalkaskade über verschiedene Enzyme und Faktoren. Am Ende der Signalkaskade wird $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ein wichtiger nuklearer Transkriptionsfaktor freigesetzt. Dieser transloziert in den Nukleus und aktiviert die Expression einiger Zytokine, die spezielle Immunzellen aktivieren, die Pathogene detektieren und beseitigen.

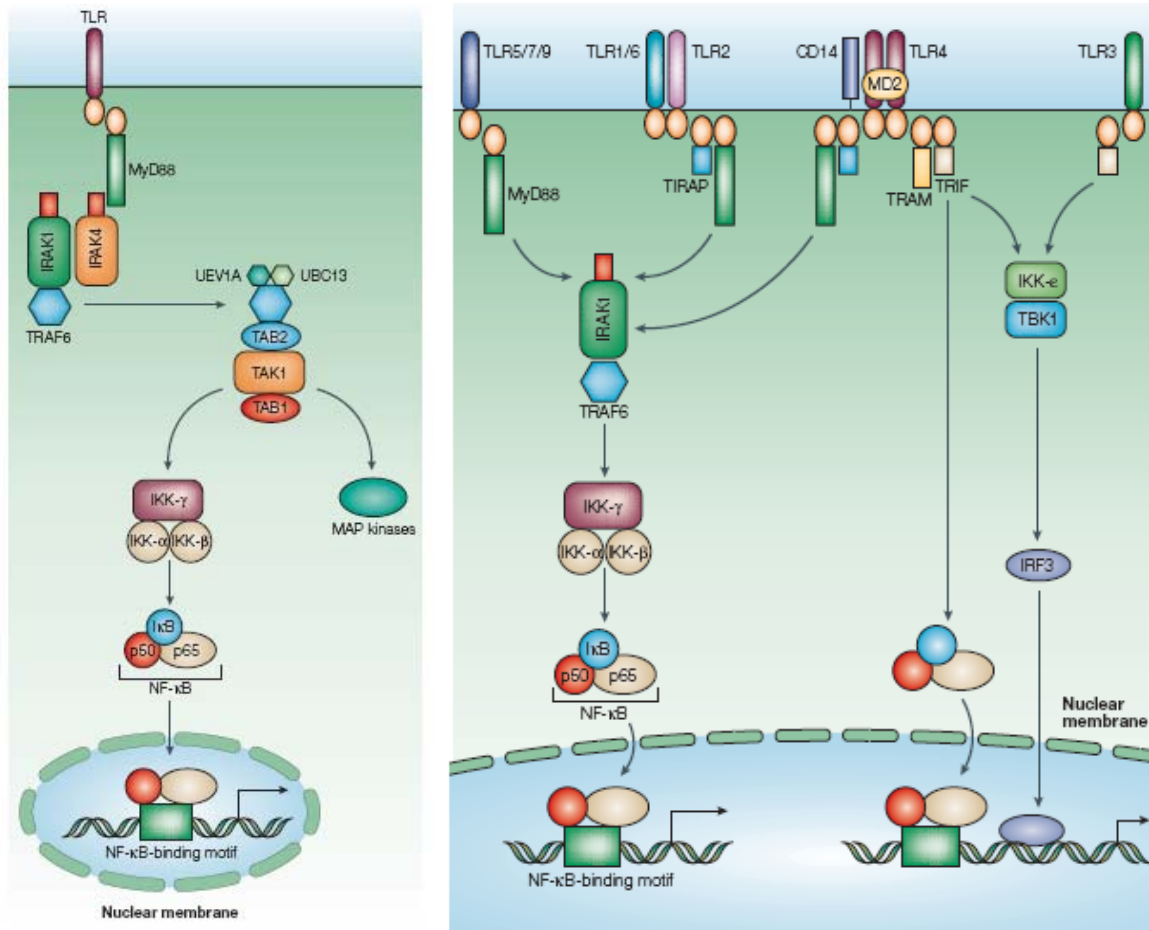


Abb.5: Signalkaskade von TLR; links allgemein, rechts TLR-spezifisch; IκB=Inhibitor of NFκB, IKK=inhibitor of NFκB kinase, IRAK=IL-1 receptor associated kinase, IRF=IFN regulatory factor, MAP=mitogen activated protein; MyD=myeloid differentiation primary response gene oder auch myeloid differentiation factor genannt, NFκB=Nuclear Factor κB, TRAF=Tumornecrosis factor receptor associated factor, TAB=TAK1 binding protein, TAK=tumor growth factor β activated protein kinase, TBK=TRAF family member associated NFκB activator binding kinase, TIRAB=Toll/IL-1-receptor domain containing adaptor protein, TRAM=TRIF related adaptor molecule, TRIF=Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor protein inducing IFN-β, UBC=ubiquitin conjugating enzyme, UEV1A=ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1 (Akira & Takeda, 2004)

Diese Darstellung ist vereinfacht, andere Signalkaskaden-Schemata umfassen weitere Adaptormoleküle und Kinasen, wie z. B. die JUN N-terminale Kinase, Mitogenaktivierte Proteinkinase MAPK/ERKK und p38 Kinasen und Transkriptionsfaktoren

1.4.1 Andere TLR und ihre Liganden (TLR 3, 7, 8, 9)

Die TLR sind evolutionär konserviert, genauso wie die konservierten mikrobiellen Bestandteile, die sie detektieren und worauf sie eine Immunabwehr einleiten. Säugetier-TLR bestehen aus extrazellulären Leucin-reichen Wiederholungen und einer zytoplasmischen TIR homologen Domäne (Hemmi et al., 2000).

Im Gegensatz zu Mäusen, die 13 TLR besitzen, wurden im Menschen nur TLR1 bis 10 gefunden und in periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) nachgewiesen (Hornung et al., 2002). Tabelle 2 zeigt welche Zellen welche TLR exprimieren.

Tab.2: Vorkommen von TLR in PBMC in Säugetieren; Mo=Monozyten, B=B-Zellen, T=T-Zellen, NK=Natürliche Killerzellen, Ma=Makrophagen, pDC=plasmazytoide Dendritische Zellen, fettgedruckt=starke TLR-Expression, in Klammern=schwache TLR-Expression (Akira & Takeda, 2004;*Yasuda et al., 2006; Chen et al., 2005)

TLR	Vorkommend in	Liganden	Ursprung der Liganden
1	allen PBMC mit Mo, B	Triacyl-lipopeptide	(Myko-)Bakterien
2	NK, T, B, Mo	verschiedene Zellwandbestandteile (Lipoproteine, Peptidoglycan, Glycolipide, Lipopolysaccharide, Porine, Zymosan, körpereigenes HSP70 u.a.	verschiedene Gram-positive Bakterien, Mykobakterien, Pilze
3	T, NK	dsRNA, Poly (Inosin : Cytidin)	Viren
4	B, NK, Mo	Lipopolysaccharide, Taxol, <i>fusion protein</i> , körpereigenes HSP60 u.70, u.a.	Gram-negative Bakterien, Taxol, Viren
5	Mo, T, NK	Flagellin	Bakterien
6	allen PBMC mit B, (Mo)	Diacyl-lipopeptide, <i>lipoteichoic acid</i> , Zymosan	Mycoplasma, Gram-positive Bakterien, Pilze
7	Mo, (B), (pDC)	Imidazoquinolin, Loxoribin, Bropirimin, U-reiche ssRNA	synthetische Verbindungen, Viren
8	(Mo)	Imidazoquinolin, U-reiche ssRNA	synthetische Verbindungen, Viren
9	Mo, T, NK, pDC, B, (Ma*)	CpG-DNA	Bakterien, Viren, ODN
10	pDC, B	nicht bekannt	nicht bekannt
11	nur in Mäusen	uropathogene Bakterien**	nicht bekannt
12	nur in Mäusen	nicht bekannt	nicht bekannt
13	nur in Mäusen	nicht bekannt	nicht bekannt

TLR3, 7, 8 und 9 haben gemeinsam, dass sie Nukleinsäuren detektieren und in PBMC im Gegensatz zu den anderen TLR nicht an der Zelloberfläche, sondern im endosomalen Kompartiment exprimiert werden. TLR7 (bei Mäusen) und TLR8 (beim Menschen) erkennen beide GU-reiche einzelsträngige RNA. Vermutlich können TLR7 bzw. TLR8 nicht zwischen Fremd-RNA und körpereigener unterscheiden, jedoch soll ihre Lokalisierung im Endosom verhindern, dass sie durch körpereigene RNA stimuliert werden, da mRNA im Zytosol vorkommend nach vollendeter Translation von Nukleasen abgebaut werden (Heil et al., 2004). TLR9 wird in endosomalen Kompartiment von B-Lymphozyten und pDC sowie in

geringen Mengen auch in Monozyten, in T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und an der Oberfläche von Lungen- und Darmepithelzellen exprimiert.

Eine TLR9-Stimulation führt zur Produktion von

- IL-12, das die IFN- γ -Produktion durch NK- und Th1-Zellen, die Differenzierung von Th1-Zellen und die Suppression von Th2-Zellen bewirkt,
- IFN- γ , das APC aktiviert, die Differenzierung zu Th1-Zellen fördert und MHC-I hochreguliert,
- IFN- α/β , die MHC-I hochregulieren und die Antigenprozessierung/-präsentierung fördern,
- IL-6, das die Differenzierung von B-Zellen, die Antikörper-Sekretion und den Klassenwechsel der Immunglobuline bewirkt,
- IL-1, das Adhäsionsmoleküle von Endothelzellen hochreguliert und die Produktion von IL-6 verstärkt,
- IL-10, das die IL-12- und IFN- γ -Produktion inhibiert,
- TNF- α , das die Expression von Adhäsionsmolekülen von Endothelzellen und von IL-6 verursacht und Makrophagen aktiviert, jedoch zum septischen Schock führen kann,
- MHC-I, das Antigene CD8⁺-Zellen präsentiert,
- CD40, das Co-stimulatorisch wirkt und die IL-12-Sekretion fördert,
- CD86, das ebenfalls Co-stimulatorisch ist
- CD69 ist Co-stimulatorisch (Kandimalla et al., 2003)

1.5 CpG-ODN Struktur-Wirkungsbeziehungen

CpG-ODN ist ein weitgefäbter Begriff. Die chemische Beschaffenheit eines CpG-ODN entscheidet über seine spezielle Wirkung auf den jeweiligen Organismus. In den folgenden Unterkapiteln wird dies näher ausgeführt.

1.5.1 Sequenzabhängigkeit

Das CpG-Motiv PuPuC GPyPy ist nicht allein ausschlaggebend für die immunologische Wirkung, für das „Fine-Tuning“ der Immunantwort sind die an das CpG-Motiv anschließenden Nukleoside verantwortlich: So zeigt z. B. der Vergleich zweier CpG-ODN mit **10 homologen Nukleosiden** eine unterschiedliche Zytokininduktion bei Mäusen: ODN 1668, ein bei Mäusen oft eingesetztes ODN, mit der Sequenz TCC **ATG ACG TTC** CTG ATG CT stimuliert die Produktion von IL-12, IL-6, IL-1 und TNF- α , während das ODN IL-12-p40 mit der Sequenz GCT **ATG ACG TTC** CAA GGG, das von der IL-12-p40-Genomsequenz von

Mäusen abgeleitet wurde, nur eine *in vivo* IL-12-Induktion, dagegen keine TNF- α -Produktion zeigt (Lipford et al., 1997).

Die Lokalisierung des CpG-Motivs in der Nähe des 5'-Endes bewirkt eine stärkere Stimulierung als in der Nähe des 3'-Endes (Agrawal & Kandimalla, 2002). Möglicherweise findet die Erkennung in 5'→3'- Richtung statt, dass nämlich CpG-Oligodeoxynukleotide über das 5'-Ende in das aktive Zentrum des TLR9 eindringen und sukzessiv über CpG-Motive Bindungen zum TLR9 ausbilden. Das 5'-Ende tcg tcg (Kleinbuchstaben stehen für Thiophosphat verbrückte Nukleotide, Großbuchstaben für Phosphat verbrückte) bewirkt eine stärkere B-Zell-Aktivierung als andere 5'-Enden bei Thiophosphat-CpG-ODN, jedoch bewirkt das 5'-Ende (tcg)_n mit n > 2 keine Steigerung der Aktivität (Hartmann & Krieg, 2000). Üblicherweise werden CpG-ODN der Längen 15-25 Nukleotide für die medizinische Forschung verwendet.

1.5.2 Klassen von CpG-ODN (A, B, C)

Drei verschiedene CpG-Klassen sind bislang bekannt. Wie in Tabelle 3 ersichtlich ist, wird die Klassifizierung durch die Anwesenheit von CpG-Dimeren/-Motiven, Poly-Guanosin-Enden, eines Palindroms, und durch die Natur des Phosphat-bzw. Thiophosphat-Rückgrats getroffen.

Tab. 3: Klassifizierung der CpG-ODN; Großbuchstaben=Phosphat verbrückte Nukleotide, Kleinbuchstaben=Thiophosphat verbrückte; kursiv=Palindrom; unterstrichen=das CpG-Dimer/ein CpG-Motiv: PuPuC GPyPy/gtc gtt/GTC GTT/gac gtt/GAC GTT, Pu=A/G; Py= C/T; /= oder

Klasse	Struktur	Paradebeispiel	Wirkung
A (D)	3',5'-g _n -Enden Palindrom PO-CpG-Motiv	pos2216 ggG GGA <u>CGA</u> : <u>TCG</u> <u>TCG</u> ggg gg	hohe Produktion von IFN- α / β / γ und NK-Aktivierung
B (K)	Vollthioat GTCGTT	pos2006 tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt	starke B-Zell-Stimulierung IL-6-Sekretion
C	Vollthioat Palindrom	pos2395 tcg tcg ttt tcg gcg c:gc gcc g	starke IFN- α -Produktion und starke B-Zell- Stimulierung

Klasse A-CpG-ODN müssen weder das klassische CpG-Motiv PuPuC GPyPy noch das optimale humane CpG-Motiv GTC GTT enthalten, für ihre immunologische Wirkung genügt die Anwesenheit eines CpG-Dimers innerhalb eines Palindroms und von poly-g-Enden. Das Palindrom bringt durch Hybridisierung der komplementären Sequenzabschnitte über Watson-

Crick-Basenpaarung die Poly-g-Enden in räumliche Nähe, so daß diese über Hoogsten-Basenpaarung hybridisieren können. Mindestens zwei solcher hybridisierten CpG-A-Moleküle werden für die Bildung von g-Tetraden benötigt, die essentiell für eine starke IFN- α -Induktion durch pDC sind. Die mit Hilfe der g-Tetraden gebildeten 20-100 nm großen Tertiärstrukturen sind ähnlich groß wie Viren (Kerkmann et al., 2005). Klasse A CpG-ODN enthalten ein chimäres Phosphat-/Thiophosphat-Rückgrat, wobei nur die Poly-g-Enden Thiophosphat-verbrückt sind zur Erhöhung der *in vivo*-Stabilität.

Dagegen enthalten Klasse B und C CpG-ODN keine poly-g-Enden und bestehen ausschließlich aus einem Thiophosphat-Rückgrat. Für ihre Wirkung ist die Anwesenheit des klassischen, des optimalen humanen CpG-Motivs (gtc gtt) oder des optimalen Maus-CpG-Motivs (gac gtt) erforderlich. Klasse C CpG-ODN enthalten zusätzlich ein Palindrom, Klasse B CpG-ODN besitzen stattdessen mehrere CpG-Motive.

Klasse A CpG-ODN induzieren eine starke Typ I Interferonantwort bestehend aus IFN- α und IFN- β in pDC, aber B-Zellen stimulieren sie nur schwach. Umgekehrt verhält es sich mit Klasse B CpG-ODN. IFN- α und IFN- β aktivieren NK-Zellen, die IFN- γ ausschütten. Die unterschiedliche Wirkung beider Klassen beruht darauf, dass Klasse A CpG-ODN zusätzlich zum TLR9-vermittelten Signalweg einen autocrinen und paracrinen IFN- α -Rückkopplungsmechanismus aktiviert, der für eine verstärkte und länger anhaltende IFN- α -Expression verantwortlich ist (Kerkmann et al., 2003). Auch wird vermutet, dass Klasse A CpG-ODN im frühen Endosom, während Klasse B CpG-ODN im späten Endosom stimulieren.

Klasse C CpG-ODN haben ein Wirkungsprofil, das zwischen dem der beiden anderen CpG-ODN-Klassen liegt. Wählt man eine Klasse A oder C CpG-ODN-Sequenz und zerstört das Palindrom, nimmt die IFN- α -Induktion ab. Das Palindrom alleine kann jedoch keine IFN- α -Stimulierung bewirken. Bei Klasse C CpG-ODN können innerhalb des Palindroms A gegen G und C gegen T ausgetauscht werden ohne Aktivitätseinbußen. Dies zeigt, dass keine spezielle Sequenz im Palindrom erforderlich ist. Bei Methylierung von C innerhalb des CpG-Motivs findet keine IFN- α -Produktion mehr statt, was die CpG-Abhängigkeit für die IFN- α -Induktion unterstreicht.

Klasse B CpG-ODN benötigen die geringste Konzentration zur NF κ B-Aktivierung gefolgt von Klasse C. Klasse A CpG-ODN aktivieren NF κ B erst bei hoher Konzentration (Vollmer et al., 2004).

Ursprünglich wurde der CpG-Effekt einzelsträngigen ODN zugeschrieben. Es gibt jedoch Hinweise auf die Ausbildung partieller doppelsträngiger Strukturen. So zeigten Schmelzkurvenanalysen eine partielle Duplexbildung und die NMR Analyse von GACGTT ließ auf eine antiparallele Duplexformation mit terminalen GT-Woobel Basenpaaren schließen. Bei Klasse A und C können die Palindrome entweder intramolekular oder intermolekular doppelsträngige Bereiche ausbilden (Dalpke & Heeg, 2004).

1.5.3 Modifizierte CpG-ODN (I: Cytosin-Modifikationen)

Es war keine Kristallstruktur eines *Toll-like* Rezeptors bekannt bis Bell et al. die Struktur der Extrazellulären Domäne von TLR3 aufgeklärt (Bell et al., 2006). Aufgrund des großen medizinischen Potentials von CpG-ODN sollten die molekularen Wechselwirkungen zwischen dem CpG-ODN und TLR9 weiter erforscht werden. Die allgemeine Vorgehensweise bestand in der Generierung von modifizierten CpG-ODN und deren immunologischer Vergleich mit den unmodifizierten CpG-ODN.

Cytosin ist die entscheidende Nukleobase innerhalb des CpG-Motivs. Der Ersatz von CpG durch GpG inhibiert den CpG-Effekt, zudem ist 5-Methyl-dC das immunologische Signal von Säugetieren, keinen CpG-Effekt auszulösen. Daher stehen 2'-Desoxycytidin-Analoga primär im Fokus des Interesses sowohl in der Literatur als auch für diese Doktorarbeit. Deshalb wurden synthetisch modifizierte dC-Phosphoramidite erzeugt, die entweder funktionelle Gruppen vertauschen, weglassen oder zusätzlich einführen. Diese dC-Analoga wurden in eine Testsequenz anstelle des dC des CpG-Motivs eingebaut - GAC GTT bei Mäusen, GTC GTT bei Menschen. Anschließend wurden biologische Tests durchgeführt, die die immunologische Wirkung daraufhin prüfen, ob eine funktionelle Gruppe verstärkte Wechselwirkungen mit dem TLR9 hervorrufen oder gar vereiteln.

Erste Arbeiten auf diesem Gebiet hatten begonnen, funktionelle Gruppen an unterschiedlichen Positionen von 2'-Desoxycytidin synthetisch einzuführen und ihren Effekt auf das Immunsystem zu untersuchen: An Lymphozyten aus der Milz von BALB/c-Mäusen führte Kandimalla (Kandimalla et al, 2003) einen Lymphozyten-Proliferations-Test mit folgenden dC-Modifikationen durch, die eine Immunstimulierung wie in Abbildung 6 gezeigt bewirkten:

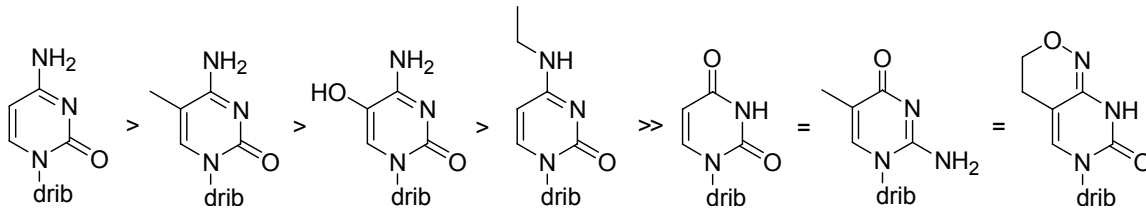


Abb.6: Einfluß der Substituenten von modifizierten dC (c*) auf den CpG-Effekt des ODN cta tet ga(c*) gtt ctc tgt gemessen anhand des Lymphozyten-Proliferations-Assays an BALB/c-Maus-Lymphozyten aus deren Milz (Kandimalla et al., 2003)

Dabei verwendete sie die Testsequenz ctatctgacggttctctgt, ein 18mer, das das optimale Mausmotiv gacgtt enthält, und ausschließlich aus Thiophosphaten besteht. Maus-Lymphozyten wurden mit 3 µg/ml dieses ODN inkubiert, was eine veränderte Proliferation bewirkte. Bei dem Lymphozyten-Proliferations-Assays wird radioaktiv-markiertes ³H-Thymidin der Zelle zur Verfügung gestellt. Vermehrt diese sich, wird sie es einbauen. Nach z. B. 44 Stunden durchlaufen die Zellen einen Zell-Sorter (FACS). Mit Hilfe eines Szintillators wird die Menge an radioaktiver Strahlung gemessen, die mit dem Umfang an Proliferation korreliert. An der Position 5 testete Kandimalla Methyl- und Hydroxyl-Substituenten und führte einen Ethanol-*Linker* ein, der Position 5 und 4 überbrückte. Position 4 wurde ethyliert. Er tauschte die 4-Aminofunktion gegen 4-Carbonyl aus, gleichzeitig wurde N3 aus einem Imin zu einem Amin. Die 2-Oxo und 4-Aminogruppe wurden in 5-Methyl-dC gegeneinander ausgetauscht (vgl. Abbildung 6). Alle seine dC-Analoga zeigten eine geringere Lymphozyten-Proliferation als dC. Die Aminofunktion in Position 4, die Iminofunktion in Position 3 und die Carbonylfunktion in Position 2 scheinen für den CpG-Effekt bei Mäusen essentiell zu sein (Kandimalla et al., 2001; Agrawal & Kandimalla, 2002).

Jurk und Kollegen (Jurk et al., 2006) führten anhand einer anderen Testsequenz tgtC Gt₁₅ ebenfalls eine Struktur-Wirkungsstudie durch. Dabei verwendeten sie einen Luciferase-Test, bei dem HEK293 (*human embryonic kidney*) Zellen mit mTLR9 oder hTLR9 sowie eines NFκB-Luciferase-Genkonstrukts transfektiert wurden. Nach 16 Stunden Inkubation mit den Test-Oligodesoxynukleotiden wurde die Luciferase Genaktivität photometrisch erfaßt.

Wie Abbildung 7 zeigt, bewirkten alle Cytosin-Modifikationen in Position 5 oder 4 eine drastische Senkung der immunologischen Aktivität. Der Ersatz von Cytosin durch ein Wasserstoff-Atom oder eine universelle Base bewirkt ein fast vollständiges Verschwinden der Aktivität, was daraufhindeutet, das Cytosin essentiell für die Erkennung durch hTLR9 verantwortlich ist.

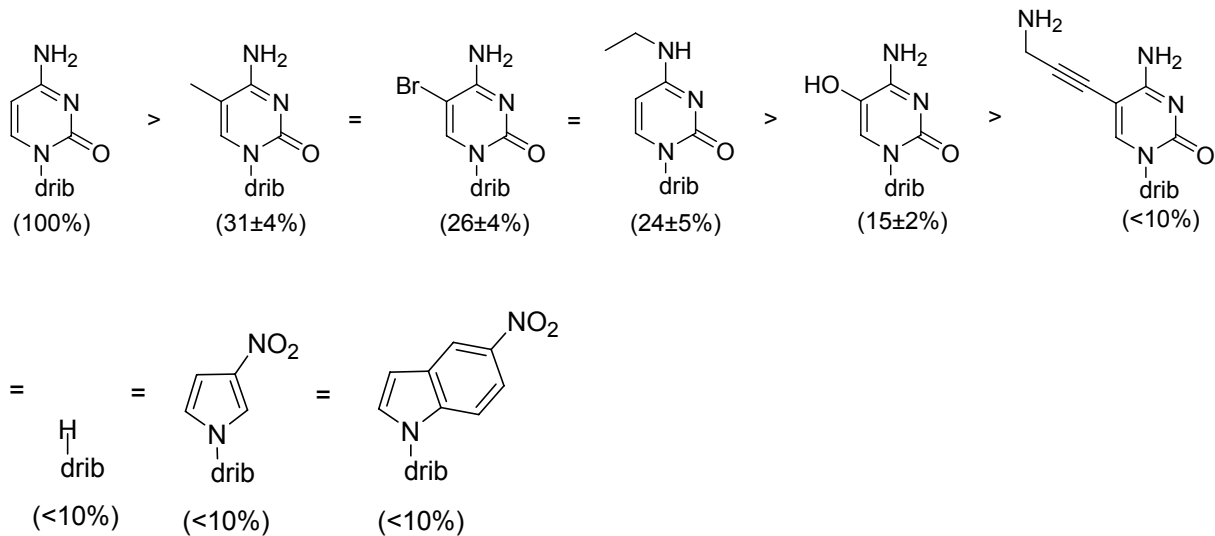
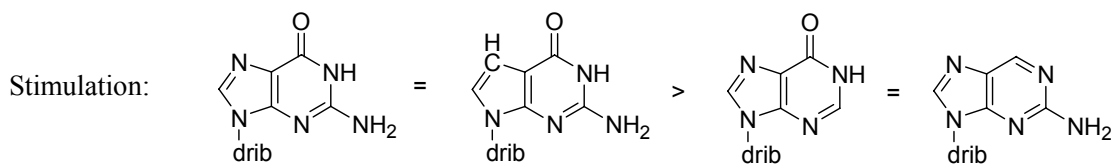


Abb.7: Grad der Expression von NFκB induziert durch die Stimulation von hTLR9 mit dem ODN tgt(C-Modifikation)Gt₁₅, (Jurk et al., 2006).

Die Ergebnisse des Luciferasetests mit mTLR9 dagegen zeigen eine andere Stimulations-Reihenfolge: 5-Bromcytosin behält einen erstaunlich hohen Aktivierungsgrad von 86±6, 5-Methylcytosin ist ähnlich in seiner Aktivität wie im humanen Test mit 23±12, alle übrigen Cytosin-Modifikationen zeigen eine Aktivierung kleiner 10% (Jurk et al., 2006).

1.5.4 Modifizierte CpG-ODN (II: Guanin-Modifikationen)

Welche funktionelle Gruppen des Guanins essentiell für den CpG-Effekt sind, untersuchte Kandimalla et al. an Mäusen (Kandimalla et al., 2003). Hierbei zeigte sich, dass N7 ohne Aktivitätsverlust gegen CH ausgetauscht werden kann und dass eine verminderte Aktivierung zu beobachten ist, wenn entweder die 2-Amino- oder die 6-Ketofunktion fehlt. Der CpG-Effekt wurde vollständig unterbunden, wenn die 2-Amino- und die 6-Ketofunktion vertauscht waren, wenn beide fehlten, wenn die 2-Aminofunktion durch eine Ketogruppe oder die 6-Ketogruppe durch eine 2-Aminofunktion oder durch eine Methoximfunktion ersetzt wurde (vgl. Abbildung 8). Daraus läßt sich die Beteiligung der 6-Keto und 2-Aminofunktion an der Immunerkennung ablesen.



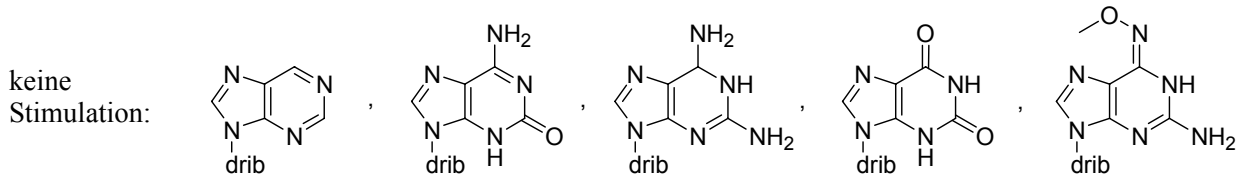


Abb.8: Einfluß verschiedener funktioneller Gruppen an Guanin auf die Immunstimulation von Mäusen, (Kandimalla et al., 2003)

Im Vergleich hierzu ermittelte Jurk et al. eine andere Reihenfolge im Stimulierungsgrad von Guanin-Modifikationen am mTLR9 (Jurk et al., 2006):

Guanin (100%) > 6-Oxopurin (28±12%) > 7-Deazaguanin (18±5%) = 6-Thioguanin (17±1%). Weniger als 10% stimuliert 2-Aminopurin, Purin und 8-Oxo-7,8-dihydroguanine. Ob 7-Deazaguanin oder 6-Oxopurin in Mäusen stärker stimuliert und ob 2-Aminopurin überhaupt stimuliert, ist anscheinend Sequenz- und Test-abhängig. Der analoge humane Luciferasetest zeigt eine andere Reihenfolge und teils deutlich höhere Aktivität der Guaninmodifikationen wie aus Abbildung 9 ersichtlich ist.

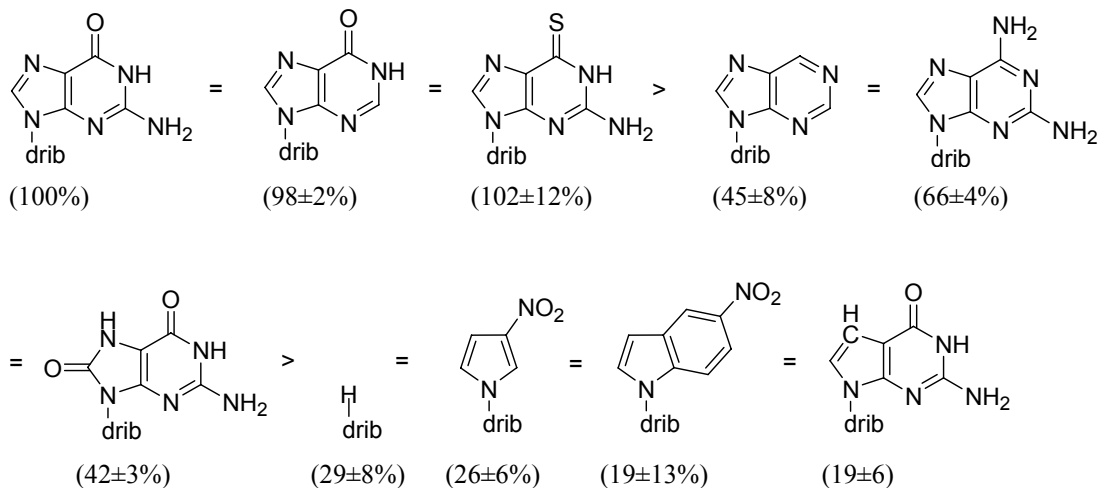


Abb. 9: Stimulierungsgrad Guanin-modifizierte ODN der Sequenz tgtC(G-Modifikation)t₁₅ gemessen anhand eines Luciferasetest mit hTLR9 exprimierenden HEK293-Zellen (Jurk et al., 2006)

1.5.5 Modifizierte CpG-ODN (III: abasische Stellen)

Der Austausch einer Nukleobase gegen ein Wasserstoffatom innerhalb des CpG-Motivs führt zum Verschwinden des CpG-Effekts, drei oder mehr Basen vom CpG-Motiv in 5'-Richtung entfernt dagegen bewirkt er eine verstärkte Immunstimulation. In 3'-Richtung jedoch ist kein nennenswerter Unterschied auszumachen (Agrawal & Kandimalla, 2002). Möglicherweise treffen sperrige Aminosäuren des TLR9 gerade auf die abasische Stelle drei oder mehr Basen vom CpG-Motiv in 5'-Richtung entfernt, was eine räumliche Annäherung des TLR9 ans CpG-ODN ermöglicht und dadurch zu einer verstärkten Wechselwirkung führt.

Eine gewisse TLR9 abhängige IFN- α -Induktion wurde für H-[5'-OPO₃-2'-desoxyriboseyl-3'-OPO₃]_n-H beobachtet, für H-[5'-OP(S)O₂-2'-desoxyriboseyl-3'-OP(S)O₂]_n-H dagegen nicht. Daher wurde postuliert, Poly-(3',5'-Di-phosphat-2'-desoxyribose) sei ein schwacher TLR9-Agonist und Poly-(3',5'-Di-thiophosphat-2'-desoxyribose) ein TLR9-Antagonist. Die Anwesenheit von Nukleobasen verstärkt die agonistische Wirkung des PO-Rückgrats, die durch CpG-Motive noch weiter gesteigert werden kann (Haas et al., 2008).

1.5.6 Modifizierte CpG-ODN (IV: Phosphat-Modifikationen PO/PS, PMe)

Generell erhöhen Thiophosphate die *in vitro*-Immunstimulierung um das 10-100-fache (Vollmer et al., 2004), was wohl auf ihre verbesserte Nukleaseresistenz zurückzuführen ist. Jedoch verhalten sich Thiophosphat-modifizierte CpG-ODN keinesfalls wie verstärkte Phosphat-CpG-ODN, was aufgrund ihrer erhöhten Stabilität erwartet werden könnte. Thiophosphat modifizierte Nukleinsäuren zeigen *Off-Targets*-Effekte, d. h. sie binden an verschiedene Proteine, auch aktivieren sie die RNase H (Engels & Uhlmann, 2000).

Das Design eines optimalen CpG-ODN ist schwierig und zeitaufwendig, da die Sequenzoptimierung für unterschiedliche immunologische Parameter (z. B. CD86 Expression auf B-Zellen, B-Zell-Proliferation, Zytokin-Produktion, Antikörpersekretion, etc.) unterschiedlich ausfallen können und getrennt für PO- und PS-CpG-ODN vorgenommen werden muss.

Mitunter werden PS-CpG-ODN gefunden, die nicht stimulieren z. B. tcg tcg ttc₁₂, während dieselben Sequenzen mit einem Phosphat-Rückgrat TCG TCG TTC₁₂ eine beachtliche Stimulierung verursachen (Hartmann, & Krieg, 2000). PO-CpG-ODN, die das optimale Mausmotiv enthalten, können im Gegensatz zu PS-CpG-ODN humane PBMC stimulieren. Eine stärkere Stimulierung findet logischerweise mit PO-CpG-Oligodesoxynukleotide statt, die das optimale humane CpG-Motiv besitzen. Ein 8mer CpG-Motiv, TCG TCG TT zeigt eine besonders starke Aktivität, ein Austausch einer dieser Nukleobasen verringert die Aktivität. PO-CpG-ODN mit einem solchen 5'-TCG TCG TT-Ende benötigen im Gegensatz zu PS-CpG-ODN keine weiteren CpG-Motive (Hartmann & Krieg, 2000). PS-CpG-ODN bedürfen des optimalen CpG-Motivs, dagegen können PO-CpG-ODN auch stimulieren, wenn das CpG-Motiv leicht verändert ist. Diese für PS-CpG-ODN höheren strukturellen Erfordernisse als für PO-CpG-ODN können mit der im letzten Kapitel aufgestellten Hypothese, Poly-(3',5'-Di-thiophosphat-2'-desoxyribose) wirke als ein TLR9-Antagonist und Poly-(3',5'-Di-phosphat-2'-desoxyribose) als ein TLR9-Agonist, erklärt werden: Der agonistische-Effekt überwiegt den antagonistischen des Thiophosphatrückgrats erst, wenn genügend stimulierende Strukturelemente in einem PS-ODN enthalten sind.

Der immunologische Einfluß von Methylphosphonat-modifiziertem CpG-ODN-Rückgrat (PMe-CpG-ODN) ist differenziert zu betrachten: Innerhalb des CpG-Motivs und bis zu drei Phosphatbrücken auf der 5'-Seite entfernt führt die Anwesenheit eines Methylphosphonats zur Unterdrückung der Immunantwort, was möglicherweise auf die Notwendigkeit einer negativen Ladung an der Phosphatbrücke hinweist. PMe an 5. oder 6. Stelle vom CpG-Motiv in 5'-Richtung verstärkt den immunologischen Effekt, möglicherweise wechselwirken an diesen Stellen ungeladene Aminosäuren des TLR9 mit dem PMe-CpG-ODN. Auf der dem CpG-Motiv anschließenden 3'-Seite hat die Gegenwart eines Methylphosphonats keine immunologische Auswirkung (Agrawal & Kandimalla, 2002).

1.5.7 Modifizierte CpG-ODN (V: Zucker-Modifikationen drib/rib)

Wird anstelle von 2'-Desoxyribose Ribose eingesetzt, so wird die Immunstimulierung von der Position beeinflusst: Innerhalb des CpG-Motivs und in seiner Nähe führt ein solcher Austausch zum Erliegen des CpG-Effekts, wohingegen auf der 3'-Seite kein Unterschied auszumachen ist, weit entfernt vom CpG-Motiv sowohl auf der 3'-als auch 5'-Seite ist sogar eine verstärkte Immunstimulierung zu verzeichnen (Agrawal & Kandimalla, 2002). Dagegen berichten Sen et al., dass die Sequenz (ribo-A)₆drib(AACGTT)(ribo-A)₆ in Mäusen bei bestimmten Konzentrationen teilweise zu einer stärkeren Interleukinantwort führt als die analoge vollständige DNA-Sequenz (Sen et al., 2004)

1.6 Drug delivery

Das CpG-ODN gelangt vermutlich in einer CpG-unabhängigen Weise durch Endozytose ins Endosom. Seine Lokalisation konnte mit Hilfe eines fluoreszierenden Fusionsproteins nachgewiesen werden. Im Endosom finden wegen des sauren Milieus eine strukturelle Veränderung des CpG-ODN und eine Reifung des Endosoms statt. Inhibitoren der endosomalen Reifung wie z. B. Chloroquin blockieren die CpG-Signalkaskade, von daher ist die endosomale Reifung für den CpG-Effekt wichtig. Verstärkt wird nun TLR9 exprimiert und ins späte Endosom überführt, wo die Immunerkennung stattfindet und die Signalkaskade in Gang gesetzt wird (Dalpke & Heeg, 2004).

Trotzdem ist die Aufnahme von CpG-ODN in die Zelle noch nicht endgültig geklärt: Während bei Mäusen die Beobachtung, dass nur gelöste CpG-ODN einen Effekt zeigen, festphasengebundene CpG-ODN dagegen nicht, vereinbar mit der oben beschriebenen Vorstellung der Zellaufnahme ist, konnte beim Menschen kein Unterschied in der B-Zell-Aktivierung zwischen gelösten und festphasengebundenen CpG-ODN gefunden werden (Liang et al., 1996). Möglicherweise erfolgt zusätzlich zur beschriebenen Zellaufnahme die B-Zell-

Aktivierung über Oberflächenrezeptoren, wobei Mac-1 und sogenannte *scavenger* Rezeptoren wurden vorgeschlagen (Dalpke & Heeg, 2004).

PS-ODN werden besser in die Zelle aufgenommen als PO-ODN, die wiederum besser endozytiert werden können als Methylphosphonate.

Die Anwesenheit von poly-Guanosinen erhöht die Aufnahmegeschwindigkeit von unmodifizierten ODN und dadurch ihre Aktivität. Für PS-ODN dagegen waren polyG-Stränge eher kontraproduktiv, möglicherweise interferieren sie mit der Signalkaskade und müssen entfernt werden, was bei polyG-(PS)-Strängen am 5'-Ende noch schlechter als am 3'-Ende durch die zytosolischen 3',5'-Exonukleasen erfolgt (Dalpke & Heeg, 2004).

Der Transport von CpG-ODN ins Endosom kann durch kationische Liposomen sowie durch Konjugation mit Cholesterol verbessert werden (Mutwiri et al., 2004).

1.7 Stabilität und Pharmakokinetik

Thiophosphate erhöhen die *in vivo* Stabilität drastisch: Während PO-ODN eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten besitzen, haben PS-ODN eine Halbwertszeit von etwa zwei Tagen im Gewebe (Krieg, 2007) und eine Halbwertszeit im Blut von 30-60 min (Mutwiri et al., 2004). Daher ist für eine maximale humane B-Zellen-Aktivierung für PS-CpG-ODN nur eine Konzentration von 0.6 µg/ml, für dagegen PO-CpG-ODN 30 µg/ml nötig (Hartmann & Krieg, 2000). ODN gelangen sehr schnell vom Applikationsort in den Blutkreislauf, bevor sich eine lokale ODN-Konzentration aufbauen kann, die lokale Immunzellen aktiviert. Dies limitiert die therapeutische Anwendung unmodifizierter ODN. PS-ODN haben eine Halbwertszeit von 30-60 min im Plasma in Mäusen. Die PS-ODN werden in verschiedene Gewebe verteilt, wo sie eine Halbwertszeit von 48 Stunden aufweisen. Nach intravenöser oder subkutaner Injektion sammeln sich ODN zuerst in Leber und Niere, mit geringeren Mengen in der Milz und im Knochenmark. PS-ODN werden hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen aufgenommen, gefolgt von B-Zellen und zu geringeren Mengen von T-Zellen. PS-ODN mit polyG-Enden zeigen eine verstärkte zelluläre Aufnahme.

1.8 Immunomere

Bei der Entwicklung von CpG-ODN wurde mitunter eine verbesserte Immunstimulierung erreicht, indem mehrere optimale CpG-Motive miteinander verknüpft worden sind. Neben der üblichen 5'-3'-Verknüpfung wäre auch eine 3'-3'- oder 5'-5'- Kombination über einen *Linker* denkbar. 3'-3'-verbundene CpG-ODN, auch Immunomere genannt, tragen zwei freie 5'-Enden (Yu et al., 2002). Sie zeigen eine stärkere Immunaktivität und ein differenziertes Zytokinprofil, während 5'-5'-verknüpfte CpG-ODN weder eine NFκB-Aktivierung noch eine

Zytokinsekretion verursachen. Diese Befunde legen nahe, dass TLR9 die CpG-ODN von den 5'-Enden her liest. Mehrere zugängliche 5'-Enden könnten eine schnellere Bindung und Dimerisierung von TLR9 fördern. Immunomere zeigen eine schnellere und erhöhte NF κ B-Aktivierung als gewöhnliche CpG-ODN in Mäusen (Kandimalla et al., 2003). PO-Immunomere sind resistenter gegenüber Nukleasen als gewöhnliche PO-CpG-ODN und teilweise vergleichbar mit PS-CpG-ODN. Nach zwei Tagen wurden je nach Sequenz 5-70% des vollständigen Immunomers gefunden, im Vergleich dazu waren 55% eines 18meren PS-CpG-ODN nach zwei Tagen noch nicht in Mäusen degradiert worden (Yu et al., 2002).

1.9 Verzweigte CpG-ODN

Als Weiterentwicklung von Immunomeren sind verzweigte CpG-ODN zu verstehen, sie enthalten mindestens drei Enden, wobei für die Immunaktivität solche mit zwei oder mehr 5'-Enden von Interesse sind (vgl. Kapitel 1.8). Sie stimulieren *hPBMC* dramatisch stärker bezüglich ihrer INF- α -Antwort (bis zu 5500 pg IFN- α /ml *hPBMC*) als lineare CpG-ODN (bis zu ca. 1000 pg IFN- α /ml *hPBMC*), Immunomere mit eingeschlossen, für IFN- γ dagegen liegen sie im selben Bereich wie lineare CpG-ODN.

An verzweigten CpG-ODN sind in der Literatur solche bekannt, die eine nicht-nukleosidischen Verzweigung enthalten, wie zum Beispiel (ODN-PS)₃-Glycerol oder (ODN-PS)-CH₂C(Glycerol-triethylen-glycol-*Linker*-PS-ODN)₃. Ihre immunologische Aktivität ist Sequenz- und *Linker*-abhängig. Die höchste IFN- α -Stimulierung von 42000 pg/ml wurde erreicht durch ein Polymer, das 186 mal die Sequenz tcg acg t kovalent über einen Glycerol-*Linker* gebunden hatte (Marshall et al., 2003). Dies suggeriert die These, je mehr CpG-haltige 5'-Enden in einem Molekül vorhanden sind, desto stärker werde die IFN- α -Stimulierung sein. Ein plausibler Grund für diese Hypothese wäre, wenn für die CpG-ODN \leftrightarrow TLR9-Erkennung eine Dimerisierung von zwei TLR9 notwendig wäre, oder wenn sogar ein *TLR-clustering*, erfolgen würde (Kerkmann, 2003). Dann würden benachbarte TLR9 über zwei 5'-...CpG-Motive eines verzweigten CpG-ODN gebunden und räumlich näher gebracht werden, ein weiteres ...CpG-3'-Motiv könnte zusätzlich die Bindung des Komplexes verstärken.

Daneben werden Synthesen von verzweigten nicht-CpG-ODN in der Literatur beschrieben mit Arabinose (Verzweigungsstelle an der 2'-Position) oder 4'-C-(Hydroxylmethyl)-thymidin (Verzweigungsstelle an der 4'-Position) als verzweigende Nukleoside (Brandenburg et al., 1995; Thrane et al., 1995). (OCH₂CH₂CH₂NHOCOCH₂)₄C wird als ein Beispiel einer anderen nicht-nukleosidischen Verzweigungsstelle aufgeführt (Ueno et al., 1999).

1.10 Doppelsträngige und einzelsträngige CpG-ODN

Doppelsträngige verzweigte ODN (s. Abbildung 10) wurden aus drei verschiedenen ODN hergestellt, die aufgrund ihrer zu den anderen zwei ODN komplementären Sequenzen Y-förmig hybridisierten (Nishikawa et al, 2008).

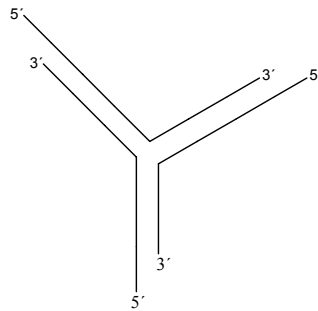


Abb.10: Doppelsträngig verzweigte ODN, auch Y-ODN genannt

Y-ODN zeigten eine 3 bis 6 fach höhere TNF- α - und IL-6-Induktion in Makrophagen verglichen mit linearer doppel- oder einzelsträngiger CpG-ODN, wobei die doppelsträngige CpG-ODN geringfügig stärker stimulierten als die einzelsträngige. Nicht nur CpG-haltige Y-ODN sind immunstimulierend, sondern auch CpG-freie, jedoch schwächer. Die höhere Aktivität der Y-ODN könnte mit ihrer besseren Zellaufnahme zusammenhängen, jedoch ist ihre Stabilität geringer als lineare dsDNA, die wiederum geringer als ssDNA ist (Nishikawa et al., 2008).

1.11 Andere immunstimulierende DNA-Sequenzen

5 bis 7 Nukleotide lange ODN, die die Sequenz TCG NN besitzen, wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht, können als minimales CpG-Motiv *hPBMC* zur IFN- α , IFN- γ -Produktion und B-Zellaktivierung stimulieren, vorausgesetzt sie werden an der Oberfläche von kationischen Polylactidglycol-Micropartikeln adsorbiert. Dies verstärkt die Zellaufnahme und erhöht eine multimere Präsentation der immunstimulierenden Sequenzen gegenüber TLR9 (Marshall et al., 2003).

Immunomere, die 2'-Desoxy-7-deazaguanosin anstelle von 2'-Desoxy-guanosin (CpR-Motiv) oder 1-(2-Oxo-7-deaza-8-methyl-purin)-2'-desoxy-ribofuranose anstelle von 2'-Desoxycytidin (YpG-Motiv) enthalten, zeigen eine stärkere IL-12 und geringere IL-6-Sekretion als gewöhnliche CpG-ODN (Kandimalla et al., 2003).

Eine gewisse stimulierende Wirkung konnte polyT-ODN zugeschrieben werden, so induzierte T₂₀ etwa ein Viertel der B-Zell-Proliferation an humanen B-Zellen wie durch Stimulierung mit

dem ODN DSP30 tcg tcg ctg tet ccg ctt ctt ctt gcc, während G₂₀ und C₂₀ um die Hälfte weniger stimulierte als T₂₀ und A₂₀ keine Stimulierung bewirkte (Liang et al., 1996).

Oligodesoxynukleotide, die das Motiv ATT TTT AC enthalten, sogenannte AT-ODN, bewirken eine NFκB-Aktivierung, B-Zell-Proliferation und verstärken die Th1-Antwort. Gefunden wurde dieses Motiv im *Lactobacillus gasseri*. Es unterdrückt das Wachstum der unerwünschten *Helicobacter pylori* und reduziert Magen-Darmentzündungen im Menschen. Diese Ergebnisse haben in Japan zur Entwicklung eines neuen Typs von probiotischem Yoghurt geführt (Shimosato et al., 2006). Im *Lactobacillus rhamnosus GG* wurde das immunstimulierende TTT CGT TT-Motiv gefunden, es zeigt eine mit CpG-ODN vergleichbare IL-6, IL-12-, IL-18-, IFN-γ- und TNF-α-Induktion (Iliev et al., 2005).

Es existieren repetitive und palindrome Sequenzen (REP), die IFN-α induzieren. Sie können einzel- oder doppelsträngig sein. Ihre Länge variiert zwischen 21 und 65 Nukleotiden. Charakteristisch für repetitive und palindrome Sequenzen sind GC-reiche Palindrome, ein 3'-CTA-Ende und die unmethylierte Sequenz (nicht C)CG (nicht G) (Magnusson et al., 2007).

Ein anderes immunstimulierendes Motiv, PyNT TTT GT, wurde gefunden, es kann mit der Formel Py(A/C/G/T)(T/A) (T/C/G)(T/C/G)(T/G) GT beschrieben werden. Von den eingeklammerten Positionen müssen mindestens zwei Thymidine sein. Dieses Motiv ist nur als einzelsträngige DNA, nicht als RNA aktiv (Rodriguez et al., 2006). Es ist in PS-pynt ttt gt-ODN stimulierender als in PO-PyNT TTT GT-ODN. Das CpG-ODN pos2006 (kommerziell ODN2006, CPG7909 und PF-3512676 genannt) tcg **tcg ttt** **tgt cgt ttt** **gtc gtt**, das als „Goldstandard“ der Klasse B CpG-ODN verwendet wird, enthält zwei aufeinanderfolgende **pynt ttt gt**-Motive.

1.12 Inhibitorische Sequenzen

Methylierung von Cytidinen innerhalb des CpG-Motivs führt zum Verlust des CpG-Effekts, Methylierung von Cytidinen außerhalb des CpG-Motivs dagegen bewirkt nur eine geringfügige Abschwächung des CpG-Effekts (Hartmann & Krieg, 2000).

ODN, die CpG-Motive enthalten, in denen C gegen G ausgetauscht ist, werden GpG-ODN genannt. Sie unterdrücken eine Th1-Aktivierung und sind von daher sehr interessant, um Th1-vermittelte Krankheiten wie z. B. experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis oder Multiplesklerose zu behandeln. GpG-ODN fördern die Proliferation von Th2-Zellen. In Anwesenheit eines GpG-ODN und eines CpG-ODN wird der CpG-Effekt um so mehr unterdrückt je höher die Konzentration an GpG-ODN ist. Die für den CpG-Effekt erforderliche Phosphorylierung des IκB zur Freisetzung von NFκB findet in Gegenwart von GpG-ODN nicht statt (Ho et al., 2003).

Andere inhibierende Oligodesoxynukleotid-Sequenzen existieren, z. B. wurden inhibierende Motive wie CCN (nicht C)(nicht C)N NGG GN oder CCN (nicht C)(nichtC)N GGG NN entdeckt. Sie verhindern die Proliferation und IL-6-, IL-12-Sekretion von CpG-stimulierten B-Zellen in Mäusen (Ashman et al., 2005). PolyG und GC reiche ODN wurden ebenfalls als suppressive ODN beschrieben (Yamada et al., 2002).

Die Sequenz TTA GGG kommt als *telomeric repeats* in Telomeren vor. Ihre suppressive Aktivität wird auf die Bildung von G-Tetraden zurückgeführt. Möglicherweise beschützen diese telomeren Wiederholungssequenzen vor einer chronischen Aktivierung des Immunsystems durch endogene CpG-Stimulierung. Sie blockieren die CpG-ODN-TLR9 Wechselwirkung (Gursel et al., 2003).

1.13 Medizinische Anwendungen von CpG-ODN

Obwohl es noch kein zugelassenes CpG-ODN-Medikament auf dem Markt gibt, gibt die Tatsache, dass viele klinische Studien (s. Tabelle 4) im Gange sind, Grund zur Hoffnung auf medizinische Anwendung von CpG-ODN in der Krebstherapie, bei allergischen Erkrankungen, bei Infektionen und als Vakzinadjuvant.

Tab. 4: CpG-ODN in klinischen Tests (Krieg, 2006; Krieg, 2007); NHL=Non-Hodgkins lymphoma, ADCC=antibody dependent cellular cytotoxicity, NSCLC=non-small-cell lung cancer, die offizielle Bezeichnung von pos2006 lautet PF-3512676 bzw. CPG 7909

CpG-ODN-Anwendung	CpG-ODN	Firma	gegen	angenommener Wirkmechanismus	Phase
Tumorthherapie Monotherapie Kombinationstherapie Vakzinadjuvant	Klasse B: pos2006	Pfizer/Coley	NHL	NK-/T-Zellen↑	I
	Klasse B: 1018+Rituximab	Dynavax	NHL	ADCC↑	I
	Klasse B: pos2006 + Chemother.	Pfizer/Coley	NSCLC	Antitumoraktivität↑	III
	HYB-2055+Chemother.	Idera	refraktärer solider Tumor	Antitumoraktivität↑	II
Vakzinadjuvant	Klasse B: pos2006	Pfizer/Coley/ GSH	Melanom	Th-Zellen↑ und CTL↑	I
Asthmathherapie Vakzinadjuvant	AVE 729	Sanofi-Aventis/Coley	Asthma	Th2↓, Asthmaanfall-auslösendes IgE↓,	I
	Klasse B: 1018	Dynavax	Asthma	Th1↑, Th2↓, IgE↓	II
	Klasse B: 1018 konjugiert mit einem Protein	Dynavax	Asthma, Allergien, atopische Dermatitis	Th1↑, Th2↓, IgE↓	III
Infektionen Monotherapie Impfstoff	Klasse C: 10101	Coley	Hepatitis B, Hepatitis B,	Th1-Zytokinen/-humorale+zellulären adaptiven Immunantwort↑	II
	Klasse B: 1018 ISS	Dynavax	Influenza, Anthrax u. a.	humorale+zellulären adaptiven Immunantwort↑	III
	Klasse B: pos2006	GlaxoSmithKline/ Coley	Hepatitis B, Influenza, Anthrax u. a.	humorale+zellulären adaptiven Immunantwort↑	I

1.14 Nebenwirkungen von CpG-ODN

Insgesamt sind wenige toxische Wirkungen von CpG-ODN bei wiederholter Gabe von CpG-ODN an Mäusen, Affen oder Menschen aufgetreten. Bei wiederholter Gabe von CpG-ODN wurde eine Veränderung in der Morphologie der lymphoiden Follikeln und Lymphadenopathie nach 7 Tagen an Mäusen beobachtet sowie eine stark verringerte primäre humorale Immunantwort und ein Immunoglobulinklassen Wechsel, nach 20 Tagen trat eine Lebernekrose und Blutungen im Bauch auf (Heikenwalder et al, 2004). Milzvergrößerung, Blutblättchenmangel, Komplementaktivierung, erhöhte Mengen an Leberenzymen wurden als Nebenwirkungen von PS-ODNs beschrieben (s. Agrawal, 1999). Jedoch ist die größte Sorge, dass die CpG-Immunistimulierung als solche eine gefährliche Nebenwirkung beinhaltet. Die Bildung von Antikörpern gegen körpereigene DNA durch B-Lymphozytenaktivierung wurde berichtet (Pisetsky, 2001). Bei Th1-basierten Autoimmunerkrankungen sollten CpG-ODN gemieden werden.

Die inhibitorischen ODN könnten bei Überdosieren mit CpG-ODN herangezogen werden, bis sich ein gesundes Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zytokinen eingestellt hat, sozusagen einer Art „Immuntitration“.

CpG-ODN der nächsten Generation sollen chemische Modifikationen enthalten, die zu einer verstärkten Wechselwirkung mit TLR9 führen und somit niedriger dosiert werden können, so dass weniger Nebenwirkungen auftreten. Die synthetischen Ansätze hierfür werden in den Kapiteln 2 und 3 vorgestellt.

2. Aufgabenstellung

CpG-Oligodesoxynukleotide sind von medizinischem Interesse hinsichtlich der Behandlung von (Auto-)immunerkrankungen wie z. B. Asthma, Heuschnupfen, Krebs und Infektionen. CpG-Oligodesoxynukleotide bestehen aus kurzen DNA-Strängen, die ein immunmodulierendes CpG-Motif der Sequenz d(5'-PurinPurinCytidin GuanosinPyrimidinPyrimidin-3') enthalten. Diese Sequenz ist charakteristisch für virale und bakterielle DNA und wird mit Hilfe des humanen *Toll-like* Rezeptor 9 als Fremd-DNA erkannt, woraufhin eine Immunabwehr initiiert wird.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten neue immunstimulierende CpG-Oligodesoxynukleotide synthetisiert und ihre immunmodulierende Wirkung nachgewiesen werden. Hierfür sollte erforscht werden, welche Modifikationen geeignet und synthetisch gut zugänglich sind. Zunächst sollten Cytosin-Modifikationen synthetisiert werden. Die modifizierten Cytosine sollten glykosyliert und zu Phosphoramiditen umgesetzt werden. Diese modifizierten dC-Phosphoramidite sollten in die Sequenz tgt cgt ttt ttt ttt ttt tt, das ein CpG-Motif enthält und ausschließlich aus Phosphorthioaten besteht, anstelle des fett markierten 2'-Desoxycytidins eingeführt werden. Ein geeigneter biologischer Test sollte gefunden und etabliert werden.

Als interessante Positionen für die Modifikationen wurden Position 6 und 5 gewählt. Position 6 von 2'-Desoxycytidin wurde für die Cytosin-Modifikationen in Erwägung gezogen, da der Einfluß funktioneller Gruppen in Position 6 auf die immunstimulierende Wirkung von CpG-Oligodesoxynukleotide bislang noch unerforscht ist. Elektronenakzeptoren und -donoren als Modifikationen sollten die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindung zwischen den modifizierten CpG-Oligodesoxynukleotiden und dem *Toll-like* Rezeptor 9 ermöglichen und dadurch zu einer stärkeren Wechselwirkung führen. 6-Oxocytosin, 6-Aminocytosin bzw. sein Vorläufermolekül 6-Amino-2-thiocytosin boten sich daher an.

Position 5 von dC ist von zentraler Bedeutung für die Immunerkennung von CpG-ODN, da diese Position ausschlaggebend für die Unterscheidung zwischen körpereigener und fremder DNA in Säugetieren ist. 5-Nitrocytosin als Wasserstoffbrücken- und Elektronen-Akzeptor wäre eine Untersuchung wert. Daneben wäre 5-Iodcytosin interessant, das durch das größere und dadurch besser polarisierbare Halogen womöglich zu einer stärkeren Stimulierung führt als 5-Bromcytosin, das unter den Cytosinmodifikationen noch zu den besseren zählt (vgl. Abb. 7). Neben polaren Gruppen sind auch unpolare funktionelle Gruppen mit einem delokalisierten π -System von Interesse, die womöglich Stacking-Wechselwirkungen zu aromatischen Seitenketten des *Toll-like* Rezeptor 9 ausbilden können. Phenylethin wäre eine solche

Modifikation. Sie könnte durch die Sonogashira-Kupplung von Phenylethin mit geschütztem 5-Iod-2'-desoxycytidin eingeführt werden. Weitere Derivatisierungen könnten ausgehend von 5-Iod-2'-desoxycytidin mit Hilfe der Sonogashira-Kupplung oder Suzuki-Kupplung erfolgen.

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit besteht in der Untersuchung des Einflusses von einer zusätzlichen nicht linearverknüpften 5'-...CpG-Sequenz auf die Immunstimulation von CpG-Oligodesoxynukleotiden. Dies könnte durch die Synthese von verzweigten CpG-ODN des Typs (5'-...CpG)₂-verzweigendes Nukleotid-...CpG-3' erfolgen. Dafür sollte ein effizienter Syntheseweg entwickelt werden.

Diese Untersuchung soll zum einen die Hypothese überprüfen, je mehr (5'...CpG)-Motive ein CpG-Oligodesoxynukleotid enthält, desto stärker stimuliere es. Zum anderen soll es klären, ob die Annahme zutrifft, ein verzweigtes CpG-Oligodesoxynukleotid der Klasse A induziere stärker Interferon- α als ein gewöhnliches lineares CpG-Oligodesoxynukleotid der Klasse A. Da ein verzweigtes Klasse A CpG-Oligodesoxynukleotid einen zusätzlichen „Arm“ enthält, der intermolekular hybridisieren könnte. Dies würde zu einer stärkeren Quervernetzung zwischen den CpG-ODN-Molekülen führen. Dadurch würde eine stabilere multimere Tertiärstruktur gebildet werden, die eine länger andauernde IFN- α -Induktion bewirken würde.

3. Ergebnisse und Diskussion

CHEMISCHER TEIL

3.1 Auswahl der synthetisierten 2'-Desoxycytidin-Analoga

2'-Desoxycytidin-Analoga für die Synthese modifizierter CpG-ODN sollten

- 1) neu in Hinblick auf CpG-Testung sein,
- 2) synthetisch gut zugänglich sein und
- 3) *in vivo* stabil sein, sowie
- 4) weitere Derivatisierungen ermöglichen und
- 5) eine zusätzliche funktionelle Gruppe enthalten, die womöglich eine stärkere Wechselwirkung mit TLR9 bewirkt.

Bei der Durchsicht der literaturbekannten CpG-ODN mit inkorporierten dC-Analoga fiel auf, dass Position 6 noch unerforscht ist. Punkt 5) wäre z. B. durch eine funktionelle Gruppe erfüllt, die Wasserstoffbrücken ausbilden kann, wie die Hydroxyl- oder Aminofunktionalität als H-Brückendonator.

6-Hydroxycytosin bzw. sein stabileres Tautomer 6-Oxocytosin ist kommerziell erhältlich. Somit wurde die Synthese dieses dC-Analogons zuerst getestet (s. Kapitel 3.3.1, 6.5.1). Es kann entweder als Vorteil oder als Nachteil angesehen werden, dass das 6-Keto-Tautomer das stabilere ist. So kann als Vorteil gesehen werden, dass durch die 6-Oxo-Funktionalität der H-Brückenakzeptor N3 in einen H-Brückendonator umgewandelt wird. Oder es kann als Nachteil betrachtet werden, dass dadurch zwei Faktoren gleichzeitig geändert werden und weitere Untersuchungen notwendig machen, um festzustellen, ob eine zusätzliche hydrophile Wechselwirkung an der Position 6 oder das geänderte H-Brückenverhalten des N3 für eine veränderte Interaktion mit TLR9 ursächlich ist. 6-Aminocytosin musste ausgehend von Thioharnstoff und Malonsäuredinitril in drei Reaktionsschritten synthetisiert werden (s. Kapitel 3.3.2.2).

Die bevorzugte Position für Modifikationen von dC ist Position 5. Diese Position hat den Vorteil, zugänglich für Modifikationen auf der Stufe des Nucleosids durch Iodierung und eventuell anschließender Übergangsmetall-katalysierten C-C-Bindungsknüpfungen zu sein (s. Kapitel 3.3.3). 5-Iod-dC war bislang noch nicht in der Literatur in diesem Zusammenhang untersucht worden. Zwar haben die Substituenten Methyl, Hydroxyl und Brom in Position 5 eine Verringerung der CpG-Aktivität bewirkt, die, sofern sie auf sterische Ursachen zurückzuführen wäre, eine weitere Derivatisierung an dieser Position sinnlos macht. Trifft das sterische

Argument nicht zu, könnte durch Einführung eines *Linkers*, der z. B. π -Stapelungs-Wechselwirkungen zu hydrophoben Seitenketten des TLR9 ermöglichte, eventuell eine verstärkte Wechselwirkung stattfinden. Deshalb wurden Phenylethin und Pyrenethin als *Linker* eingeführt.

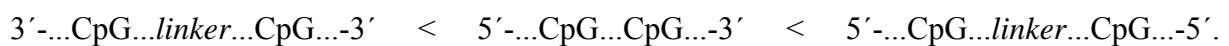
Im Vergleich der literaturbekannten Substituenten war der Stimulationsgrad des 5-Bromsubstituenten vergleichbar mit dem des 5-Methylsubstituenten, was zwar sehr wenig war (ca. 30% im Vergleich zu H) aber immerhin mehr als bei anderen Modifikationen (s. Abbildung 7). Möglicherweise könnte der 5-Iod-Substituent als das größere und polarisierbare Halogenid zu verstärkten Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit TLR9 führen.

Daneben wäre die Einführung einer H-Brückenakzeptor-Funktionalität, wie z. B. die Nitrogruppe interessant (s. Kapitel 3.3.2.3). Bislang waren an dieser Position nur hydrophobe oder H-Brückendonoren eingeführt worden.

3.2 Design der verzweigenden Phosphoramidite

Da bislang nur wenige verzweigte CpG-ODN in der Literatur beschrieben worden sind (Kapitel 1.9), und diese teilweise eine erhöhte Immunstimulierung im Vergleich zu unverzweigten bewirken, ist die weitere Erforschung von verzweigten CpG-ODN sowohl für eine potentielle medizinische Anwendung als auch für die Grundlagenforschung interessant. Zunächst wird erläutert, welche Überlegungen zu der Wahl der speziellen Sequenz der verzweigten CpG-ODN und anschließend zu den dafür notwendigen verzweigenden Phosphoramiditen geführt haben.

Verzweigte CpG-ODN sind eine logische Weiterentwicklung der Feststellung, daß die Immunstimulierung in folgender Reihenfolge steigt (vgl. Kapitel 1.9):



Verzweigte CpG-ODN würden bei Verwendung der üblichen käuflichen Phosphoramidite des Typs $(5' \dots \text{CpG} \dots)_2 \textit{linker} \dots \text{CpG} \dots \text{---} 3'$ sein, bei teilweiser Verwendung von invertierten Phosphoramiditen könnte der Typs $(5' \dots \text{CpG} \dots)_3 \textit{linker}$ synthetisiert werden.

Marshall und Kollegen beschreiben sogar den Typ $(5' \dots \text{CpG} \dots)_{186} \textit{linker}$ Polymer, das eine noch stärkere IFN- α -Induktion als ihre verwendeten Glycerol-verknüpften verzweigten CpG-ODN bewirken (Marshall et al., 2003). Daraus läßt sich die Hypothese herleiten, je mehr 5'-ständige CpG-Motive in einem Molekül enthalten sind, desto stärker werde die IFN- α -Induktion sein (vgl. Kapitel 1.9).

Die erhöhte IFN- α -Induktion könnte aber auch an dem Polymer-Konjugat liegen. Da eine Erhöhung der Immunstimulierung von CpG-ODN durch Komplexierung oder Konjugation mit Polymeren beobachtet wurde. Das Polymer bewirkt eine verlängerte Verweildauer des CpG-ODN im frühen Endosom von plasmacytoiden dendritischen Zellen, und dadurch eine verstärkte IFN- α -Induktion (Kerkmann et al., 2005).

Durch den Einsatz von verzweigten CpG-ODN mit drei hybridisierbaren Sequenzabschnitten könnte auf den Zusatz von Polymeren verzichtet werden. Da diese verzweigten CpG-ODN theoretisch intermolekular hybridisieren und auf diese Weise ein stark quervernetztes Polymer bilden könnten. Daher wurde die Sequenz des verzweigten Klasse A CpG-Oligodesoxynukleotids posVerzw., 5'-(g₄*GT CGT TT*₆)₂*linker-A*₆AA *CGA* Cg₄-3', gewählt. Es enthält drei komplementäre 12 Nukleotid lange Sequenzabschnitte (kursiv gedruckt). Zusätzlich enthält es zwei optimale humane CpG-Motive und ein weiteres CpG-Dimer.

Die Kombination der immunologischen Wirkungen der Klassen A und B CpG-ODN ist von medizinischem Interesse. Jedoch ist diese Kombination mit Klasse C CpG-ODN noch nicht optimal erfüllt. Da die IFN- α -Induktion für Klasse C CpG-ODN schwächer als für Klasse A CpG-ODN und die B-Zell-Aktivierung geringer als für Klasse B CpG-ODN ist. Wahrscheinlich ist eine synergetische Wirkung durch die Kombination aller drei CpG-ODN-Klassen in einem Molekül nicht realisierbar, da die unterschiedlichen Zytokin-Induktionen der verschiedenen CpG-ODN-Klassen an verschiedenen Orten im Endosom ausgelöst werden. Trotzdem wäre es von akademischem Interesse, ein verzweigtes CpG-ODN, das alle drei Klassen von CpG-ODN enthält, zu synthetisieren und zu prüfen, welche Wirkung überwiegt.

Die immunologische Wirkung von verzweigten CpG-ODN ist abhängig von der Länge und chemischen Beschaffenheit des *Linkers* (Marshall et al., 2003). Bisher noch nicht literaturbekannt sind verzweigende Phosphoramidite, deren Verzweigung an der Nukleobase erfolgt, solche wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisiert.

Aufbauend auf den Syntheserfolgen mit 5-Iod-2'-desoxycytidin und Sonogashira-Kupplungen wurde als verzweigendes Nukleotid ein 5-Pyrimidin-Derivat ausgewählt, an das ein Ethin-*Linker* angebracht wurde. Dieser *Linker* trägt eine terminale primäre Alkoholfunktion, welcher über Sonogashira-Kupplung eingeführt werden kann (s. Kapitel 3.3.4). 5-Iod-2'-desoxyuridin trägt im Gegensatz zu 5-Iod-2'-desoxycytidin keine nukleophile Gruppe an der Nukleobase, die geschützt werden müsste, und ist daher attraktiver als 5-Iod-2'-desoxy-

cytidin. Desweiteren ist 5-Iod-2'-desoxyuridin kommerziell erhältlich, auch dadurch können Syntheseschritte eingespart werden. Dieser Baustein muss lediglich mit dem Alkohol-*Linker* verknüpft werden vor Einführung der für die ODN-Synthese notwendigen Schutzgruppen. Verschiedene Reihenfolgen sind denkbar:

- a) 1. Sonogashira-Kupplung von 5-Iod-2'-desoxyuridin mit dem freien HOethin-*Linkers*,
2. Simultane Tritylierung des 5-Hydroxyethin-*Linker* und der 5'-OH-Funktion,
3. Phosphitylierung.

Diese Variante ist nicht geeignet zur Herstellung unsymmetrisch verzweigender Phosphoramidite.

- b) 1. Einführen einer 3',5'-Schutzgruppe z. B. Acetyl,
2. Sonogashira-Kupplung mit dem freiem Hydroxyethin-*Linker*,
3. Abspaltung der 3',5'-Schutzgruppe,
4. Simultane Tritylierung der 5'-und 5-Hydroxyethin-Funktion,
5. Phosphitylierung für symmetrisches Phosphoramidit.

Für unsymmetrisch verzweigende Phosphoramidite würde vor Abspaltung der 3',5'-Schutzgruppen der *Linker* mit TBDMS geschützt, dann erst würde die Abspaltung der 3',5'-Schutzgruppe erfolgen, anschließend die Tritylierung und die Phosphitylierung.

- c) 1. Schützen des Hydroxyethin-*Linkers*,
2. Tritylieren von 5-Iod-2'-desoxyuridin,
3. Kuppeln des geschützten Hydroxyethin-*Linkers* mit 5-Iod-5'-dimethoxytriphenylmethyl-2'-desoxyuridin,
4. Phosphitylierung

- d) 1. Tritylieren von 5-Iod-2'-desoxyuridin,
2. Kuppeln mit dem freiem Hydroxyethin-*Linker*,
3. Schützen der Hydroxyl-Funktionalität des *Linkers* und
4. Phosphitylierung

Die Variante a) ist wahrscheinlich die schnellste Methode, symmetrisch verzweigende Phosphoramidite herzustellen. Jedoch erfolgte die Reaktion nur in geringen Ausbeuten aufgrund der schlechten Löslichkeit von 5-Iod-2'-desoxyuridin in organischen Lösungsmitteln wie z. B. DMF. Die Ausbeute für 5-(Hex-5''-in-1''-ol)-2'-desoxyuridin betrug 16%, für 5-

(But-3''-in-1''-ol)-2'-desoxyuridin 44%. Auch die Verwendung von schon geschützten Ethinen erhöhte die Ausbeute der Sonogashira-Kupplung mit 5-Iod-2'-desoxyuridin nicht, sie betrug 28% für 5-[1''-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-propargylether]-2'-desoxyuridin und 43% für 5-[1''-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-propargylether]-2'-desoxyuridin.

Variante b) würde zwar durch Einführung einer 3',5'-Schutzgruppen die Löslichkeit des Nucleosids in organischen Lösungsmitteln verbessern und eine regiospezifische Silylierung für die Synthese unsymmetrisch verzweigender Phosphoramidite am Hydroxyethin-*Linker* ermöglichen, aber das Einführen und Abspalten der zusätzlichen 3',5'-Schutzgruppen würde die Synthese um zwei Reaktionsschritte verlängern. Für die Synthese des symmetrisch verzweigenden Phosphoramidits wäre dieser Syntheseweg zu umständlich.

Variante c) ist der bevorzugte Syntheseweg. Variante d) bietet zusätzlich die Möglichkeit einer konvergenten Syntheseroute: Die ersten zwei Reaktionsschritte sind diesselben für die Synthese symmetrisch und unsymmetrisch verzweigender Phosphoramidite.

Bezüglich der Sonogashira-Reaktion konnte festgestellt werden, dass im Vergleich mit geschützten Ethinen bessere Ausbeuten mit freien Ethinen erreicht werden konnten (Tabelle 5).

Tab. 5: Ausbeuten der Sonogashira-Kupplung

Produkt	Ausbeute
5'-O-DMT-dU-5-hexin-OH	53%
5'-O-DMT-dU-5-hexin-O-TBDMS	32%
5'-O-DMT-dU-5-butin-OH	62%
5'-O-DMT-dU-5-propin-O-DMT	46%

Die Einführung der Ethin-Schutzgruppen erfolgte i. d. R. in guten Ausbeuten, in über 70%iger Ausbeute für die DMT-Schutzgruppe, in sogar über 80% für die Silylschutzgruppe.

Die Gesamtausbeute für 5-[O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-3'-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5'-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **70** nach Syntheseweg c) betrug 13%; nach Syntheseroute d) 19%.

3.3 Synthesestrategien für dC-Derivate und verzweigenden Phosphoramidite

Für die Synthese von 2'-Desoxycytidin-Analoga stehen drei Synthesestrategien zur Verfügung: Die ersten beiden Synthesestrategien (s. Abbildung 11 und 16) bauen das Nucleosid durch Verknüpfung eines aktivierten Cytosinderivats mit einem geschützten Zucker auf, wobei bei Synthesestrategie I als Zucker Ribose und bei Synthesestrategie II als Zucker 2'-

Desoxyribose gewählt wurde. Die dritte Synthesestrategie (Abbildung 19) geht vom 2'-Desoxycytidin aus.

3.3.1 Synthesestrategie I: Stereospezifische Glykosilierung und Umsetzung zum Phosphoramidit von dC-Analoga

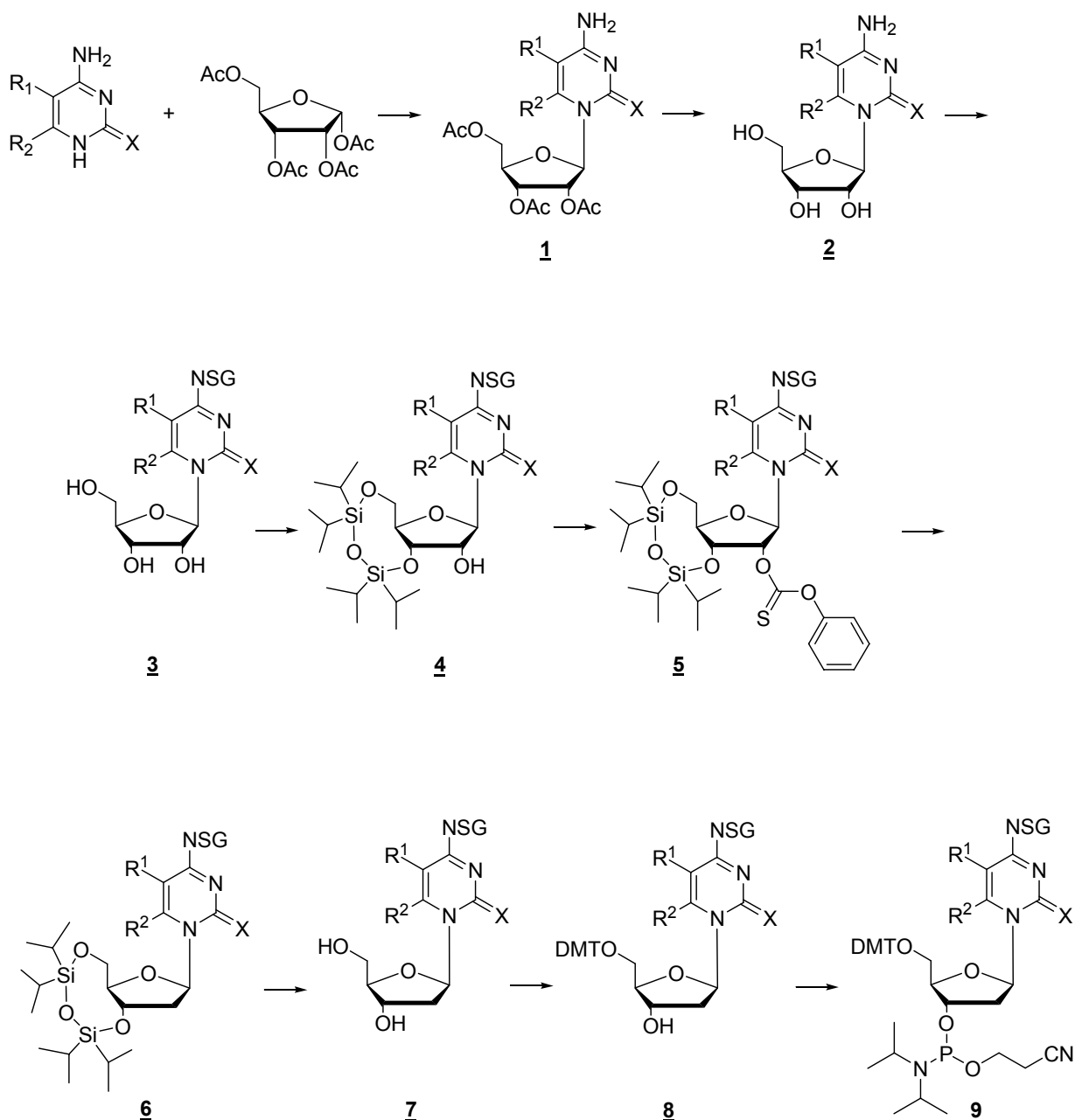


Abb.11: Allgemeine Synthesestrategie I für die Phosphoramiditsynthese von 2'-Desoxycytidin-Analoga
 SG=Schutzgruppe: Benzoyl oder Dimethylformamidin; R^1 =NO₂ oder H; R^2 =OH, NH₂ oder H; X=O, S

Die allgemeine Synthesestrategie I für die Phosphoramiditsynthese von Cytidinanaloga (Abbildung 11), besteht aus neun Reaktionsschritten: Den Schlüsselschritt bildet die Kupplung

eines Cytosin-Analogons mit peracetylierter Ribose, die sogenannten Vorbrüggen-Glykosylierung als ersten Reaktionsschritt (s. Kapitel 3.3.1.1). Anschließend erfolgt die basische Abspaltung der Acetyl-Funktionen am Zucker (s. Kapitel 3.3.1.2). Die nukleophile Aminogruppe in Position 4 muss nun geschützt werden. Zur Auswahl stehen hierfür die Benzoyl- oder die Dimethylformamidin-Schutzgruppe (s. Kapitel 3.3.1.3, 3.5.1, 3.5.2). Zur Entfernung der 2'-Hydroxyl-Funktion muss zunächst die 3'- und 5'-Hydroxyl-Gruppe geschützt werden, dafür ist die Markiewicz-Schutzgruppe **35** (1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra-(*iso*-propyl)-disiloxan; TIPDS) geeignet (s. Kapitel 3.3.1.4). Die 2'-Hydroxylfunktion soll durch Thioveresterung aktiviert (s. Kapitel 3.3.1, 3.3.1.5) und radikalisch mit Hilfe der Barton McCombie-Reaktion (Robins et al, 1983) entfernt werden. Anschließend muss die 3',5'-*O*-Silylgruppe abgespalten werden. Die für die Festphasen-DNA-Synthese übliche 5'-Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe (s. Kapitel 3.5.3) muss eingeführt und im letzten Schritt das Nucleosid phosphityliert werden (s. Kapitel 3.3.4.5) werden.

Vorteil dieser Synthesestrategie ist, dass die Glykosylierung stereospezifisch erfolgt. Somit fallen keine α und β -Isomeren an, die voneinander getrennt werden müssen, wie es in Synthesestrategie II (s. Abbildung 16) der Fall wäre.

Nachteil der Synthesestrategie I besteht in den vielen Reaktionsschritten, und in den synthetisch sehr anspruchsvollen Reaktionen, der Vorbrüggen-Glykosylierung und der Thio-carbonylveresterung. Nachfolgend werden einzelnen Reaktionsschritte der Synthesestrategie I diskutiert.

3.3.1.1 Glykosylierung

Grundsätzlich gibt es drei Glykosylierungsmethoden: Die Fusionsmethode, die Metallsalzmethode und die Hilbert-Johnson-Methode (Vorbrüggen), wobei letztere nur in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Fusionsmethode kann nur für niedrigschmelzende Nucleobasen verwendet werden. Hierbei wird die Nucleobase mit einer peracetylierten Ribose bei 150°C in Gegenwart einer Lewisäure fusioniert, jedoch liegen die Ausbeuten nur für wenige Derivate über 60%. Die Metallsalzmethode, bei der 1-Brom- oder 1-Chlor-2,3,5-tri-*O*-acetylribose mit dem Silber- oder Quecksilbersalz der geschützten Nucleobase reagieren, geht auf Königs-Knorr zurück. Das schwierige Abtrennen des schwerlöslichen, toxischen Quecksilbersalzes gepaart mit moderaten Ausbeuten sprechen nicht für diese Methode. Später wurde anstelle der Schwermetallsalze mit NaH das Natriumsalz der Nucleobasen generiert, das *via* S_N2 mit 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose das β -2'-Desoxynucleosid liefert. Die bewährteste Methode ist die Hilbert-Johnson-Methode, die auf die Reaktion von 2,4-Diethoxypyrimidin mit 1-Brom-2,3,5-tri-*O*-acetylribose zurückgeht. Silylgruppen anstelle der Ethoxyfunktionali-

täten bewirkten eine deutliche Verbesserung, da nun die sonst so schwerlösliche Nukleobase lipophiler wird. Dies verbessert ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, so dass eine homogene Reaktion ermöglicht wird. Die Silylgruppen erhöhen die Nucleophilie der Nucleobase. Diese Silyl-Hilbert-Johnson-Methode bzw. Vorbrüggen-Glykosylierungs-Methode (Vorbrüggen et al., 1981) kann mit Zusatz von Quecksilber- bzw. Silbersalzen oder mit Lewisäuren durchgeführt werden. Als Lewisäuren können Bortrifluorid-Et₂O, Aluminium-, Eisen-, Zinn-, Antimon-, Titan- oder Zinkchlorid verwendet werden. TMS-ClO₄ und TMS-OTf haben sich gut bewährt, schwächere Lewisäuren wie (TMS)₂SO₄ und TMSCl fördern nicht die Nucleosidbildung, da sie den Zucker nicht in sein Kation überführen (Vorbrüggen & Ruh-Pohlenz, 2001). Während der Silyl-Hilbert-Johnson-Nucleosid-Synthese finden drei Prozesse statt (Vorbrüggen & Höfle, 1981):

- Ein elektrophiles Zuckerkation bildet sich (siehe Abbildung 14).
- Ein σ -Komplex bildet sich zwischen der silylierten Nucleobase und dem Lewisäurekatalysator (Abbildung 12).
- Die silylierte Nucleobase reagiert mit dem elektrophilen Zuckerkation (siehe Abbildung 15).

Mit der peracetylierten Ribose wählte Vorbrüggen einen stabileren Zucker als 1-Chlor- oder Brom-2,3,5-tri-*O*-acetylribose, dessen 1-*O*-Acetyl-Gruppe durch Umsetzung mit einer Lewisäure als Friedel-Crafts-Katalysator (TMS-Tf, SnCl₄ oder Hg(OAc)₂) zur Abgangsgruppe aktiviert wurde. Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäureester ist als die schwächste der drei Lewisäuren zu bevorzugen, da sie zwar stark genug ist, die Bildung des Zuckerkations zu katalysieren, aber das Gleichgewicht zwischen dem σ -Komplex und der freien silylierten Nucleobase ist zugunsten der freien silylierten Nucleobase verschoben, mit Zinntetrachlorid dagegen zugunsten des σ -Komplexes, der nicht mit dem Zuckerkation reagiert (Vorbrüggen & Höfle, 1981).

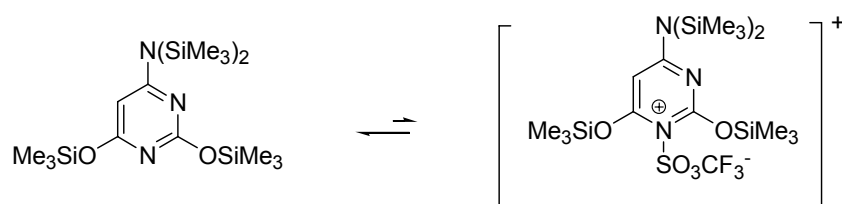


Abb.12: σ -Komplexbildung während der Vorbrüggen-Silylierung.

Am Beispiel von 6-Oxocytidin soll die Durchführung der Vorbrücken-Glykosylierung und ihr Mechanismus erläutert werden: Damit 6-Oxocytosin regioselektiv mit *N1* reagiert, sollten *O6*, *O2* und die 4-Amino-Gruppe geschützt werden. Als Schutzgruppe wurde Trimethylsilyl gewählt. Ein Grund hierfür war die geringe sterische Einflußnahme der TMS-Schutzgruppe auf die Glykosylierung. Zudem ist sie leicht abspaltbar, sie wird ohne einen zusätzlichen Abspaltungsschritt während der wässrigen Aufarbeitung von 6-Oxo-2',3',5'-tri-*O*-acetyl-cytidin entfernt. Zwei übliche Silylierungsmittel wurden getestet: zum einen Hexamethyldisilazan unter Ammoniumsulfat-Katalyse, zum anderen Bis-*N,O*-(trimethylsilyl)-acetamid. Die Reaktionsgleichung der Silylierung mit Hexamethyldisilazan als Silylierungsmittel und Ammoniumsulfat als Katalysator ist in Abbildung 13 abgebildet.

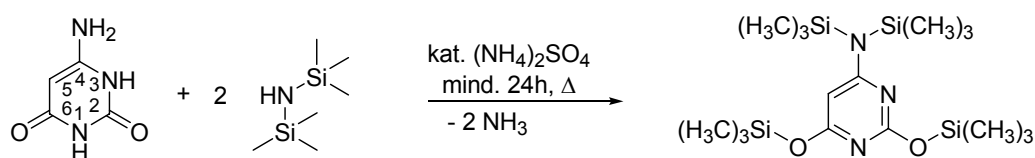


Abb. 13: Persilylierung von 6-Oxocytosin mit Hexamethyldisilazan

Das schwerlösliche 6-Oxocytosin ging nach 1.5 Stunden in Lösung, was auf eine erfolgte Silylierung hindeutete. Anschließend wurde mit peracetylierter Ribose 1-3 Tage bei RT glykosyliert, wobei die Lewisäure Trimethylsilyltrifluorsulfonsäure die 1'-*O*-Acetyl-Funktion als Abgangsgruppe aktiviert und ein Oxonium-Ion gebildet wird. Dessen positive Ladung wird durch die 2'-*O*-Acetyl-Funktion stabilisiert (Abbildung 14).

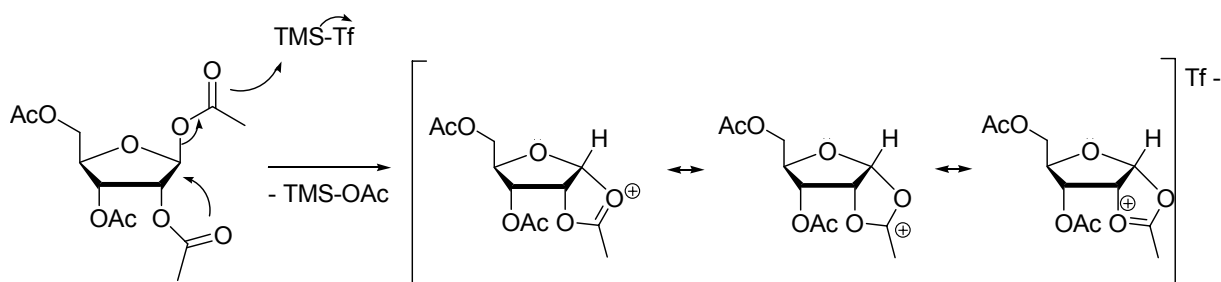


Abb.14: Mechanismus der Aktivierung des Zuckers für die Vorbrücken-Glykosylierung

Das gebildete Oxoniumkation kann nun von dem aktiviertem persilyliertem 6-Oxocytosin stereoselektiv („von oben“) von der *si*-Seite angegriffen werden, weil die 3'-*O*-Acetylgruppe den Zucker („von unten“) von der *re*-Seite abschirmt, so dass das gewünschte β -Isomer entsteht (Abbildung 15).

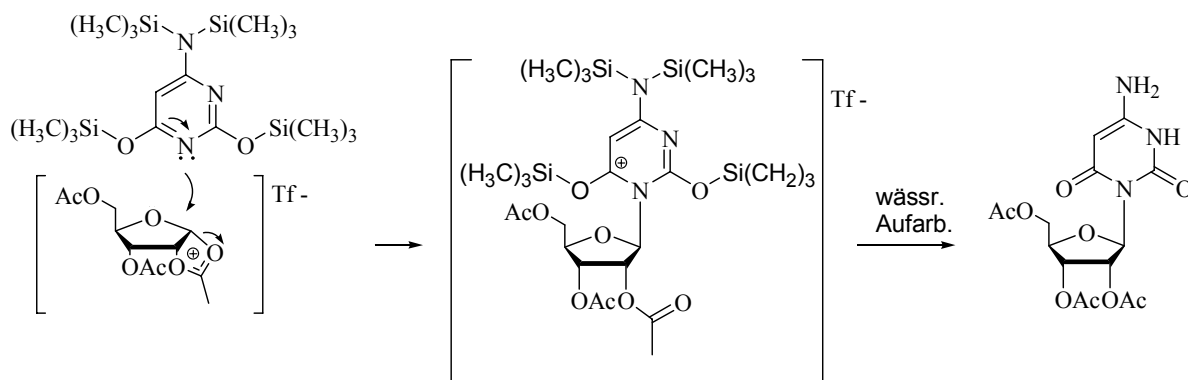


Abb.15: Stereospezifische Glykosylierung

Als Lösungsmittel für die Glykosylierung wurde Acetonitril oder Dichlorethan oder eine Kombination aus beiden benutzt. Es wurde stets eine große Menge an nicht reagiertem 6-Oxocytosin als feinpulvriger Niederschlag erhalten, der entweder die Filter bzw. Filternutschen verstopfte oder durch den Filter (Porengröße 4) mit durchging. Nur durch mehrere Lagen aus Celite und Filterpapier und ohne Anlegen von Vakuum konnte nach vielen Stunden überhaupt das Edukt abgetrennt werden. Ausbeuten von 15-32% konnten auf diese Weise erzielt werden. Auch mit Bis-*N,O*-(trimethylsilyl)-acetamid als Silylierungsmittel wurde eine Ausbeute in derselben Größenordnung von 25% erhalten.

Um zu testen, ob die Probleme nur spezifisch für 6-Oxocytosin sind, wurde die Vorbrüggen-Silylierung mit 5-Nitrocytosin untersucht. Möglicherweise wird die Glykosylierung sterisch erleichtert, wenn kein Substituent in der 6-Position vorhanden ist. Wie 6-Oxocytosin enthält 5-Nitrocytosin einen Elektronenakzeptor, was die Nukleophilie am *N1* im Gegensatz zum unmodifizierten Cytosin herabsetzt. Daher muss die Akzeptorfunctionalitäten (6-Carbonyl, 2-Carbonyl und 5-Nitro) durch Trimethylsilyl maskiert werden. Geschieht dieses nur teilweise, ist die Reaktivität des modifizierten Cytosin-Derivats zu niedrig, um nukleophil mit der peracetylierten Ribose zu reagieren, dies erklärt die geringen Ausbeuten. Die Vorbrüggen-Glykosylierung mit 5-Nitrocytosin fand zwar in besseren Ausbeuten als mit 6-Oxocytosin statt, aber war mit 43% Ausbeute immer noch nicht zufriedenstellend.

3.3.1.2 Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe

Als zweiter Reaktionsschritt der allgemeinen Synthesestrategie I (s. Abb. 11) wurden die 2',3',5'-*O*-Acetyl-Gruppen mit methanolischer NaOMe-Lösung innerhalb von nur einer Stunde Rühren bei RT abgespalten und anschließend mit Hilfe des Ionenaustauschers *DOWEX 50W X 8* neutralisiert. Das Produkt wurde aus Wasser kristallisiert und es wurden guten Ausbeuten von 80% für 6-Oxocytidin **33** und 83% für 5-Iod-2'-desoxycytidin **49**

erreicht. Alternativ kann mit ammoniakalischer Methanollösung bei RT entschützt werden, jedoch dauert die Abspaltung mit Ammoniak als die schwächere Base mit 24 h länger als mit der stärkeren Base NaOEt.

3.3.1.3 Einführung der Dimethylformamidin-Schutzgruppe

Im nächsten Schritt wurde die nukleophile 4-Amino-Funktion mit der Dimethylformamidin-Schutzgruppe blockiert. Dimethylformamidin läßt sich schnell unter 10 min Refluxieren (Parsch, U., 1999) und anschließend 20 min Rühren bei RT in akzeptablen Ausbeuten einführen. Die 4-Amino-Funktion von 6-Oxo-2'-desoxycytidin wurde mit der Dimethylaminoformamidin-Schutzgruppe geschützt unter Verwendung des Dimethylaminoformamidin-dimethoxyacetals. In Methanol wurde kurz refluxiert. 10 Minuten Refluxieren lieferte eine Ausbeute von 32%. Unter diesen Reaktionsbedingungen treten Folgereaktionen ein, wie eine 2',3'-Acetalbildung oder 3-Methylierung am 4-N-Dimethylaminoformamidin-6-oxocytidin-Molekül, wie früher gefunden wurde (Wittel, 2004). Daher wurde das Refluxieren auf fünf Minuten verkürzt und 20 min bei RT weiterreagieren gelassen. Diese Reaktionsbedingungen führten zu einer guten Ausbeute von 71%. 5-Iod-4-N-(dimethylformamidin)-2'-desoxycytidin dagegen konnte nach 10 min Refluxieren in einer Ausbeute von 86% erhalten werden.

3.3.1.4 Einführung der TIPDS-Schutzgruppe

Um die 3'- und 5'-OH-Funktionen in Anwesenheit einer freien 2'-OH-Gruppe regioselektiv zu schützen, entwickelte Markiewicz 1979 die 1,1,3,3-Tetra-(*iso*-propyl)-disiloxan-Schutzgruppe (TIPDS oder Markiewicz-Schutzgruppe), welche als Dichlorid eingeführt wird (Markiewicz, 1979). Die Ursache für die Regioselektivität liegt in der tausendfach schnelleren Reaktion von primären Alkoholen gegenüber sekundären. Daher reagiert zuerst die 5'-OH-Funktion. Aufgrund des großen Abstandes kann anschließend die 2'-Hydroxyl-Funktion nicht mit der TIPDS-Gruppe reagieren. Die 3'-Hydroxyl-Funktion dagegen liegt in ihrer Reichweite. 3',5'-TIPDS-geschützte Nukleoside können sich aber durch säurekatalysierte Isomerisierung zum 3',2'-TIPDS-geschützten Nukleosid umwandeln, welches thermodynamisch stabiler ist (7-Ring im Gegensatz um thermodynamisch ungünstigeren 8-Ring) (Van Boeckel & Van Boom, 1985; Verdegaal et al., 1980). Von daher ist bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung von TIPDS-geschützten Nukleosiden ein Zusatz von Triethylamin zur Neutralisierung des Kieselgels. Zudem sollte die Säulenchromatographie möglichst schnell durchgeführt werden.

Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit wurde TIPDS frisch hergestellt (in 66%iger Ausbeute) und mit 4-N-(Dimethylformamidin)-6-oxocytidin in Pyridin bei RT zur Reaktion gebracht.

Nach 1.5 Stunden war kein Edukt mehr detektierbar, dafür aber ein Nebenprodukt; die Aufarbeitung ergab eine Ausbeute von 13%. Vermutlich handelt es sich bei dem Nebenprodukt um 5'-[*O*-Di-(*iso*-propyl)-siloxy-di-(*iso*-propyl)-silyl-chlorid]-4-*N*-(dimethylformamidin)-6-oxocytidin.

Die TIPDS-Schutzgruppe ist säure- und hydrolysestabil und stabil gegenüber tertiären Aminen (Kocienski, 1994). Durch fluoridhaltige Reagenzien wie zum Beispiel Tetrabutylammoniumfluorid, Pyridin-HF oder Triethylamin-HF kann die TIPDS-Gruppe abgespalten werden.

3.3.1.5 Thioveresterungsversuche

Zur Aktivierung der 2'-OH-Funktion für die Desoxygenierung nach Barton-McCombie wurde die im Folgenden beschriebene Thioveresterung getestet:

Unter Argonatmosphäre wurde 4-*N*-(Dimethylformamidin)-3',5'-*O*-[1,1,3,3-tetra-(*iso*-propyl)-di-siloxan-1,3-diyl]-6-oxocytidin in abs. Acetonitril gelöst und mit 2 eq DMAP und 1.1 eq Phenoxythiocarbonylchlorid zur Reaktion gebracht. Nach 45 min bildete sich ein Niederschlag, Phenoxythiocarbonyl-*N*-Dimethylaminopyridin. Es wurde noch eine Stunde gerührt. Die säulenchromatographische Trennversuche waren erfolglos, da nur Mischfraktionen erhalten wurden. In keiner der Fraktionen konnte das Produkt detektiert werden, sondern nur Edukte und Phenoxythiocarbonyl-*N*-Dimethylaminopyridin bzw. Phenoxythiocarbonyl-*N*-methylimidazol.

Auch verlängerte Reaktionszeiten (bis zu drei Tagen) oder mehr Äquivalente Phenoxythiocarbonylchlorid und Base (DMAP oder Methylimidazol) führten nicht zum gewünschten Produkt. Anscheinend reagierte Phenylthiocarbonylchlorid nur mit der eingesetzten Base - DMAP oder Methylimidazol - was anhand der *ESI*-Massenspektroskopie detektiert wurde, die 2'-OH-Funktion dagegen reagierte nicht.

Nun stand zur Auswahl, entweder am Gelingen dieses Reaktionsschritts zu arbeiten, z. B. könnte die Reaktion bei erhöhter Temperatur, der Einsatz anderer Basen z. B. NaH und anderer Thiocarbonylverbindungen, z. B. Thiocarbonyl-diimidazol getestet werden oder aber eine andere Synthesestrategie zu wählen. Die Entscheidung fiel auf Letzteres, da die Vorläufer-Substanzen aufgebraucht waren und wahrscheinlich in mehreren Anläufen erneut synthetisiert werden müssten - mit jeweils sehr niedrigen Ausbeuten im ersten Reaktionsschritt - bis geeignete Versuchsbedingungen für die Thioveresterung gefunden wären. Dieser Zeit- und Kostenaufwandt erschien zu hoch. Synthesestrategie II (s. Abbildung 16) wurde gewählt, da sie den Reaktionsschritt der Thioveresterung nicht enthält.

3.3.2 Synthesestrategie II: Glykosylierung und Umsetzung zum Phosphoramidit von dC-Analoga

Für die in Abbildung 16 dargestellte Synthesestrategie II muss zunächst 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose in drei Reaktionsschritten hergestellt werden, dann erfolgte eine stereospezifische Kupplung mit einem aktivierten Cytosinderivat. Im Falle einer erfolgreichen Trennung des α/β -Anomerengemischs wäre nur noch die Einführung einer Hydrolyse-stabilen Aminoschutzgruppe, der 5'-DMT-Schutzgruppe sowie die Phosphitylierung vorzunehmen. Die Isomerentrennung ist essentiell für diese Synthese. Um diese besser zu ermöglichen, wurde nicht Acetyl als 3',5'-Hydroxyl-Schutzgruppen gewählt, sondern die sperrigere Toluoyl-Schutzgruppe, die möglichst zu einem unterschiedlichen chromatographischen Laufverhalten der beiden Stereoisomeren führen sollte, was jedoch nicht der Fall war.

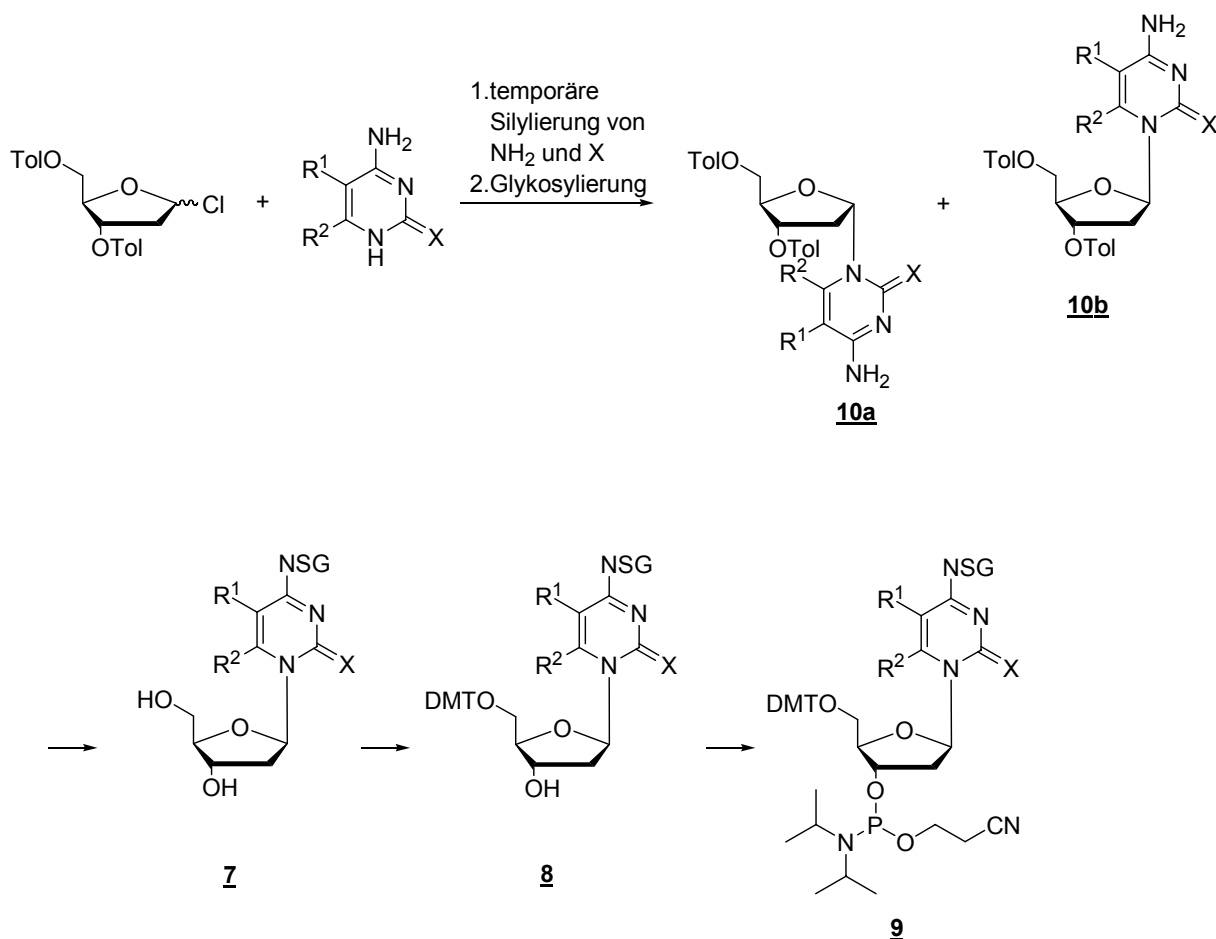


Abb.16: Allgemeine Synthesestrategie II für die Phosphoramiditsynthese von 2'-Desoxycytidinanaloga
SG=Schutzgruppe: Bz oder DMF; R¹=NO₂; R²=OH, NH₂ oder H; X=O oder S

Vorteil der Synthesestrategie II (Abbildung 16) ist, dass die gewünschte 2-Desoxyribose direkt synthetisiert wird, und nicht wie bei Synthesestrategie I ein Umweg über Ribose vorgenommen werden muss.

Jedoch muss 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose in drei Reaktionsschritten synthetisiert werden (s. Abbildung 17), wobei der letzte Reaktionsschritt, die Chlorierung präparativ anspruchsvoll ist, aber erfolgreich gemeistert werden konnte. Die Durchführung der einzelnen Reaktionsschritte wird im Folgenden erörtert.

3.3.2.1 Synthese der 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose

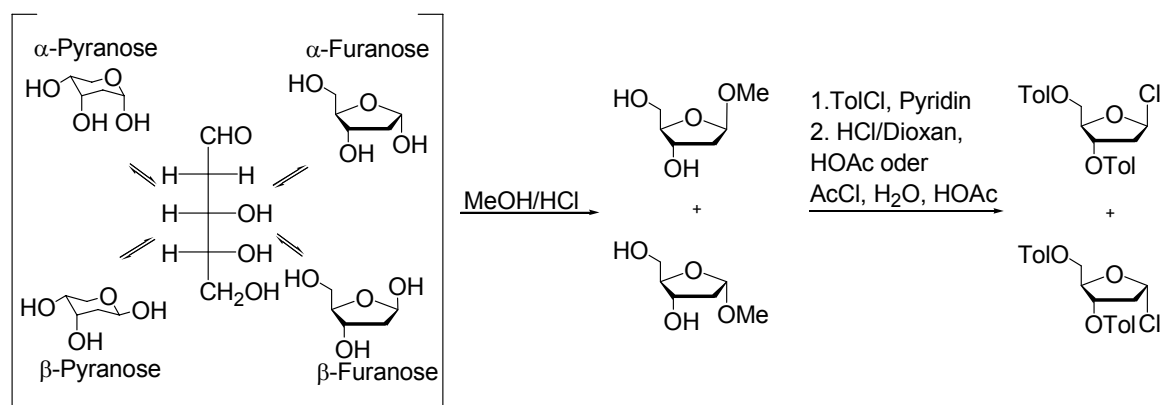


Abb. 17: Synthese von 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose

Die Stereochemie des anomeren Zentrums von 2-Desoxyribose lässt sich aufgrund der Mutarotation in Lösung nicht kontrollieren, die in einem Gleichgewicht zwischen der Furanose- und Pyranose-Form von 2'-Desoxyribose besteht, wobei jeweils α - und β -Anomere gebildet werden (Abbildung 17). Durch Acetalisierung kann das Gemisch auf ein α,β -Furanose-Gemisch beschränkt werden. Die Acetalisierung erfolgte bequem und schnell mit methanolischer Salzsäure bei RT innerhalb von 30 min. Toluoylschutzgruppen wurden mit Hilfe von Toluoylchlorid in Pyridin über Nacht mit sehr guten Ausbeute (92%) an den 3- und 5-Hydroxyl-Funktionen eingeführt. Anschließend wurde die Methoxyfunktion durch HCl - generiert durch Acetylchlorid mit Methanol - abgespalten und das anomere Zentrum chloriert. Zur weiteren Umsetzung mit einer Nukleobase wird das α -Anomer benötigt, um das gewünschte β -Nukleosid in einer S_N2 -Reaktion zu erhalten.

Die Chlorierung ist nicht trivial: Eine zu hohe Konzentration an HCl bewirkt Nebenreaktionen. 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose ist sehr hydrolyseempfindlich. Zwei Methoden der Chlorierung wurden getestet: Die Chlorierung mit kommerziell erhältlicher 4 molaren HCl-Dioxanlösung und in situ frisch hergestellte HCl-Gas aus Acetylchlorid und Wasser. Die Chlorierung ist eine schnelle Reaktion: Mit HCl-Dioxan fiel das gewünschte Produkt nach 30 min Rühren aus, mit der anderen Methode schon nach fünf Minuten. Die

Ausbeuten betragen 61% bzw. 50%. Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Synthese war, dass die Zugabe der Reagenzien schnell und ohne viel Rühren erfolgte, damit das entstehende HCl-Gas nicht ausgetrieben wurde. Um Ausbeuteverluste zu vermeiden, ist möglichst kalter Diethylether ($< 0^{\circ}\text{C}$) zum Herauswaschen von Essigsäureresten zu verwenden, da das Produkt bei RT in Diethylether löslich ist. Das Verhältnis von α - zu β -Isomer betrug 1 : 0.3 laut ^1H -NMR-Spektrum mit 6.41ppm für das tieffeldigere 1-Proton des α -Isomers und 6.35ppm für das 1-Proton des β -Isomers. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten (Chin et al., 1997).

3.3.2.2 Synthese von 4,6-Diamino-2-thiopyrimidin und 6-Aminocytosin

4,6-Diamino-2-thiol-pyrimidin wurde in einer modifizierten Traube-Synthese in 67% Ausbeute aus Thioharnstoff und Malonsäuredinitril unter basisch induzierter Zyklisierung (mit 1eq NaOEt) hergestellt. Diese Ausbeute steht in guter Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen 70%igen Ausbeute (Bendich et al., 1948). 4,6-Diamino-2-thiol-pyrimidin steht im tautomeren Gleichgewicht zu 4,6-Diamino-2-thiocarbonyl-pyrimidin. 4,6-Diamino-2-thiocarbonyl-pyrimidin kann in 6-Aminocytosin überführt werden. Dazu wird 6-Amino-2-thiol-pyrimidin zunächst mit Chloressigsäure in Wasser kurz zum Sieden erhitzt, die bei der nukleophilen Substitution freiwerdende Salzsäure wird mit einem Äquivalent Triethylamin abgefangen. Das Zwischenprodukt, 4,6-Diamino-2-thiomethylencarboxyl-pyrimidin konnte mit 76%iger Ausbeute isoliert werden. Nach einstündigem Refluxieren in verdünnter wässriger Schwefelsäure und anschließender Aufarbeitung wurde 6-Aminocytosin in 26%iger Ausbeute isoliert. In der Literatur wurde das Zwischenprodukt nicht isoliert, sondern direkt zum 6-Aminocytosin in einer Gesamtausbeute von 77% umgesetzt, was der in Rahmen dieser Arbeit erreichten Ausbeute an 4,6-Diamino-2-thiomethylencarboxyl-pyrimidin entspricht (Bendich et al., 1948). Die Literatur beschreibt eine alternative Überführung von 4,6-Diamino-2-thiol-pyrimidin in 6-Aminocytosin durch Oxidation mit Chromtrioxid in wässriger Essigsäure (Garcia-Munoz, 1997).

Der Mechanismus der Reaktion von 4,6-Diamino-2-thiomethylencarboxyl-pyrimidin zu 6-Aminocytosin ist nicht bekannt. Naheliegender ist, dass das Schwefelatom von 4,6-Diamino-2-thiomethylencarboxyl-pyrimidin protoniert und dadurch zur Abgangsgruppe aktiviert wird (s. Abbildung 18). Das Proton kann hierbei von einem H_3O^+ -Molekül oder von der Schwefelsäure stammen.

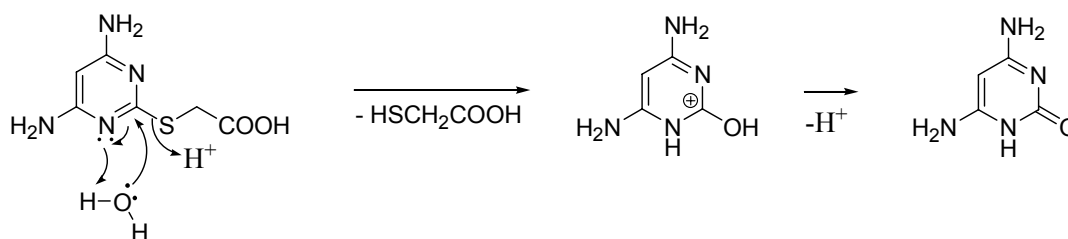


Abb. 18: Angenommener Mechanismus des S/O-Austauschs mit Wasser als Nukleophil

3.3.2.3 Synthese von 5-Nitrocytosin

Die Synthese von 5-Nitrocytosin erfolgte durch klassische Nitrierung mit Nitriersäure. 5-Nitrocytosin konnte in guten Ausbeuten von 71% isoliert werden.

3.3.2.4 Glykosylierung von 5-Nitrocytosin mit 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose

Zur Glykosylierung von 5-Nitrocytosin wurde ähnlich wie bei der Vorbrüggen-Glykosylierungsverfahren, nur das als Zucker 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose verwendet wurde. Damit die nukleophile Substitution regiospezifisch mit dem *N1*-Atom erfolgt, wurde im 10fachen Überschuß an Hexamethyldisilazan und Ammoniumsulfat als Katalysator 5-Nitrocytosin an den Positionen *O2* und *N4* silyliert. Jedoch konnten die Schwierigkeiten, die mit der Vorbrüggen-Glykosylierung verbunden waren, bei dieser Reaktion mit 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose, nicht überwunden werden. Es wurden 10% an 5-Nitro-3',5'-di-*O*-toluoyl-2'-desoxycytidin nach Umkristallisieren aus Ethylacetat isoliert. Anscheinend spielt die Sterik bei dieser Reaktion keine entscheidende Rolle, sonst hätte das in Position 5-substituierte 5-Nitrocytosin bessere Ausbeuten bei der Glykosylierung ergeben als ein in Position 6-substituiertes 6-Oxocytosin. Die elektronische Natur der Substituenten (Nitro bzw. Keto, beides Elektronenakzeptoren) könnte sich auf die Glykosylierung ungünstig auswirken, da sie die Nukleophilie am *N1*-Atom herabsetzt. Dagegen spricht die von Parsch berichtete 83%ige Ausbeute für 6-Oxo-2',3',5'-tri-*O*-acetyl-cytidin (Parsch, U. 1999). Aufgrund der schlechten Ausbeuten während der Glykosylierung und der Trennschwierigkeiten der α,β -Anomeren, was die Synthese sehr zeitaufwendig und kostspielig machte, wurde von der Synthesestrategie II Abstand genommen.

3.3.3 Synthesestrategie III: Modifizierung von 2'-Desoxycytidin an der Position 5

Synthetisch am besten bewährt hat sich eine Derivatisierung ausgehend von dem kommerziell erhältlichen 2'-Desoxycytidin-Hydrochlorid an der 5 Position durch Iodierung und anschließender weiteren Derivatisierung durch Übergangsmetall-vermittelten Kupplungsreaktionen (s. Abb. 19). Als Kupplungsreaktionen wurden die Sonogashira-

Kupplung (s. Abbildung 22) und die Suzuki-Kupplungen (s. Abbildung 23) in Erwägung gezogen. In den nachfolgenden Kapiteln werden einzelne Reaktionsschritte erläutert.

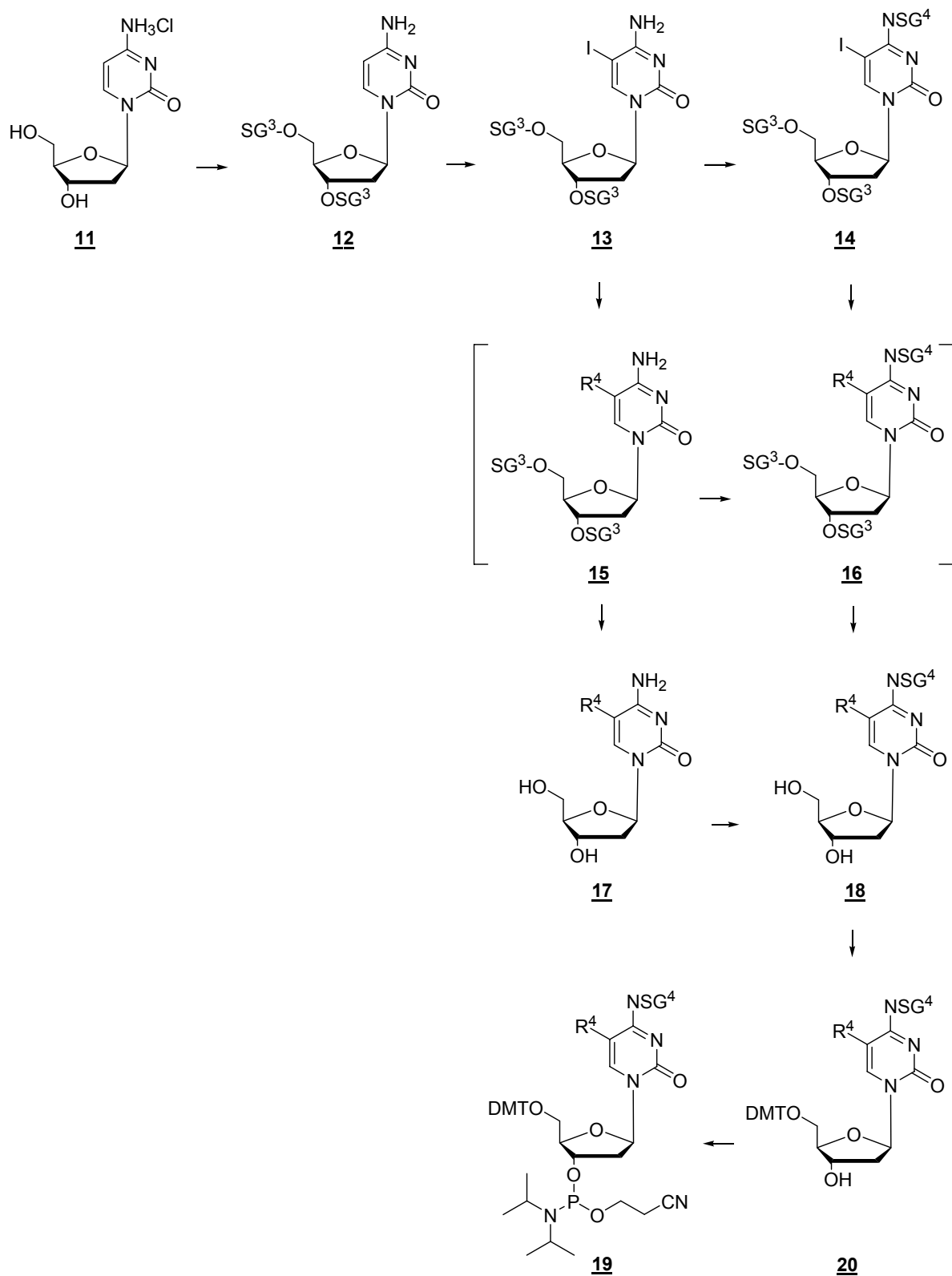


Abb. 19: Allgemeine Synthesestrategie III zur dC-Derivatisierung selektiv an der 5-Position
SG³=TBDMS oder Ac; SG⁴=DMF oder Bz; X=I, Ph-C≡C

3.3.3.1 Einführung von 3',5'-Hydroxyl-Schutzgruppen

3',5'-Hydroxyl-Schutzgruppen sind nicht unbedingt erforderlich, jedoch aufgrund der dadurch verbesserten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln der präparativ angenehmere Syntheseweg. Als Schutzgruppen wurden wiederum Acetyl (Chang & Welch, 1963) und alternativ TBDMS gewählt (Ogilvie, 1973). Beide Schutzgruppen konnten in guten bzw. sehr guten Ausbeuten eingeführt werden, Acetyl mit 82% und TBDMS mit 93%, beide ausgehend von ihrem Chlorid-Derivat in Gegenwart einer Base. Pyridin wurde für die Aktivierung von Acetylchlorid und Imidazol zur Aktivierung von TBDMSCl sowie für die Deprotonierung der Hydroxyl-Funktionen verwendet. Bei der Silylierung spielt die verwendete Base, Lösungsmittel und das Verhältnis von Base zu Nucleosid eine entscheidende Rolle für gute Ausbeuten. 4.4 eq TBDMSCl, 8.8 eq Imidazol und 1 eq Nucleosid in DMF hatten sich in Übereinstimmung mit der Literatur als optimal herausgestellt (Ogilvie, 1973).

3.3.3.2 Iodierung

Die regioselektive Iodierung in Position 5 wurde mit Hilfe von Iod, Iodsäure und Essigsäure in Tetrachlorkohlenstoff erreicht (Chang & Welch, 1963). Es handelt sich hierbei wohl um eine elektrophile aromatische Substitution, der 4-Amino-Substituent ist für die Regio-selektivität verantwortlich, er ist *ortho/para* dirigierend (Abbildung 20). Da die *para*-Position vom Zucker blockiert ist, bleibt nur die *ortho*-Position, Position 5, übrig. HIO_3 und HOAc werden vermutlich verwendet, um die Elektrophilie von Iod zu erhöhen, indem sie I_3^+ generieren:

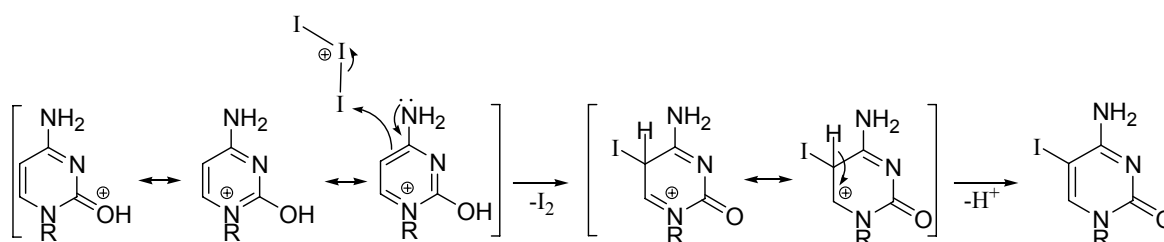
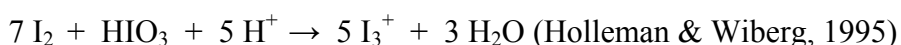


Abb. 20: Angenommener Mechanismus der Iodierung

Das krebserregende Tetrachlormethan kann nicht durch das weniger gesundheitsgefährdenden Methylenechlorid ersetzt werden, da CCl_4 zusätzlich zum acetylierten bzw. silylierten 2'-Desoxytydin und Iod auch Iodsäure löst, dies vermag Methylenechlorid nicht.

Gute Ausbeuten von 80% nach 16 h wurden bei der Iodierung von 3',5'-Di-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin erreicht bzw. 82% nach 4 Tagen für 3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxycytidin.

3.3.3.3 Sonogashira-Kupplung

Die Sonogashira-Kupplung eignet sich, um Ethine an Iodarenen einzuführen. Sein Mechanismus wird in Kapitel 3.3.4.1 erläutert. Es wurden Sonogashira-Kupplungs-Versuche unternommen, Phenylethin, Pyrenethin und Trimethylsilylethin während der ODN-Synthese an das endständige 5-Iod-dC-phosphoramidite **24** (mit $R^4=I$, $SG^4=DMF$, s. Abbildung 19) der Sequenz $^{5-I}cgt_{15}$ zu koppeln und anschließend die ODN-Synthese fortzuführen, um $tgt^{5-R}cgt_{15}$ zu erhalten (mit $R^4=$ Phenylethin, Pyrenethin und Trimethylsilylethin)(Reaktionsbedingungen s. Piton, 2006). Das gewünschte Produkt wurde unter anderem mittels MALDI-MS gefunden werden, jedoch konnte das Produkt nicht isoliert werden, sondern lag als Mischung mit Abbruchsequenzen vor.

Daher wurde die Sonogashira-Kupplung auf der Nukleosid-Stufe vorgenommen, was zu isolierbaren Produkten in guten Ausbeuten führte von z. B. 75% für 5-(Phenylethynyl)-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin.

3.3.4 Synthesestrategie IV: Synthese von verzweigenden Phosphoramiditen

Synthesestrategie IV (Abbildung 21) zeigt den synthetischen Zugang zu verzweigenden Phosphoramiditen, die inkorporiert in ODN nicht zu linearen ODN, sondern zu drei-„armigen“ ODN führen. Die Verzweigung entsteht aufgrund der Anwesenheit einer zusätzlichen geschützten primären Alkohol-Funktion an der Nukleobase. Verbindung **31** ist ein verzweigendes Phosphoramidit, da es zwei geschützte primäre Alkohol-Gruppen besitzt, die während der Festphasen-ODN-Synthese nach Abspaltung der Schutzgruppe zur Strangverlängerung zur Verfügung stehen und auf diese Weise, die Synthese von verzweigten ODN bewerkstelligen. Ist die *Linker*-Schutzgruppe DMT, so wird diese simultan mit der 5'-DMT-Schutzgruppe während der ODN-Synthese abgespalten. Infolgedessen findet an beiden freien OH-Funktionen die Strangverlängerung statt, dabei entsteht idealerweise ein symmetrisches ODN, es enthält zwei identische Nukleotidsequenzen.

Ist dagegen TBDMS die *Linker*-Schutzgruppe, so kann ein unsymmetrisch verzweigtes ODN synthetisiert werden. Dafür muss jedoch ein Terminator am 5'-Ende eingeführt werden und ein zusätzlicher Abspaltungsschritt von TBDMS muss vorgenommen werden. Zunächst wird ein lineares ODN synthetisiert, das am 5'-Ende den Terminator, 5'-*O*-Benzoyl-thymidin, trägt und in der Mitte des ODN das verzweigende Phosphoramidit **31** enthält. Das lineare ODN

kann auch als ein ODN mit zwei „Armen“ angesehen werden, mit dem verzweigenden Phosphoramidit als Verknüpfungspunkt. Anschließend wird TBDMS abgespalten. Nun wird die ODN-Synthese am *Linker* der Nukleobase fortgeführt, wodurch der dritte ODN-„Arm“ entsteht.

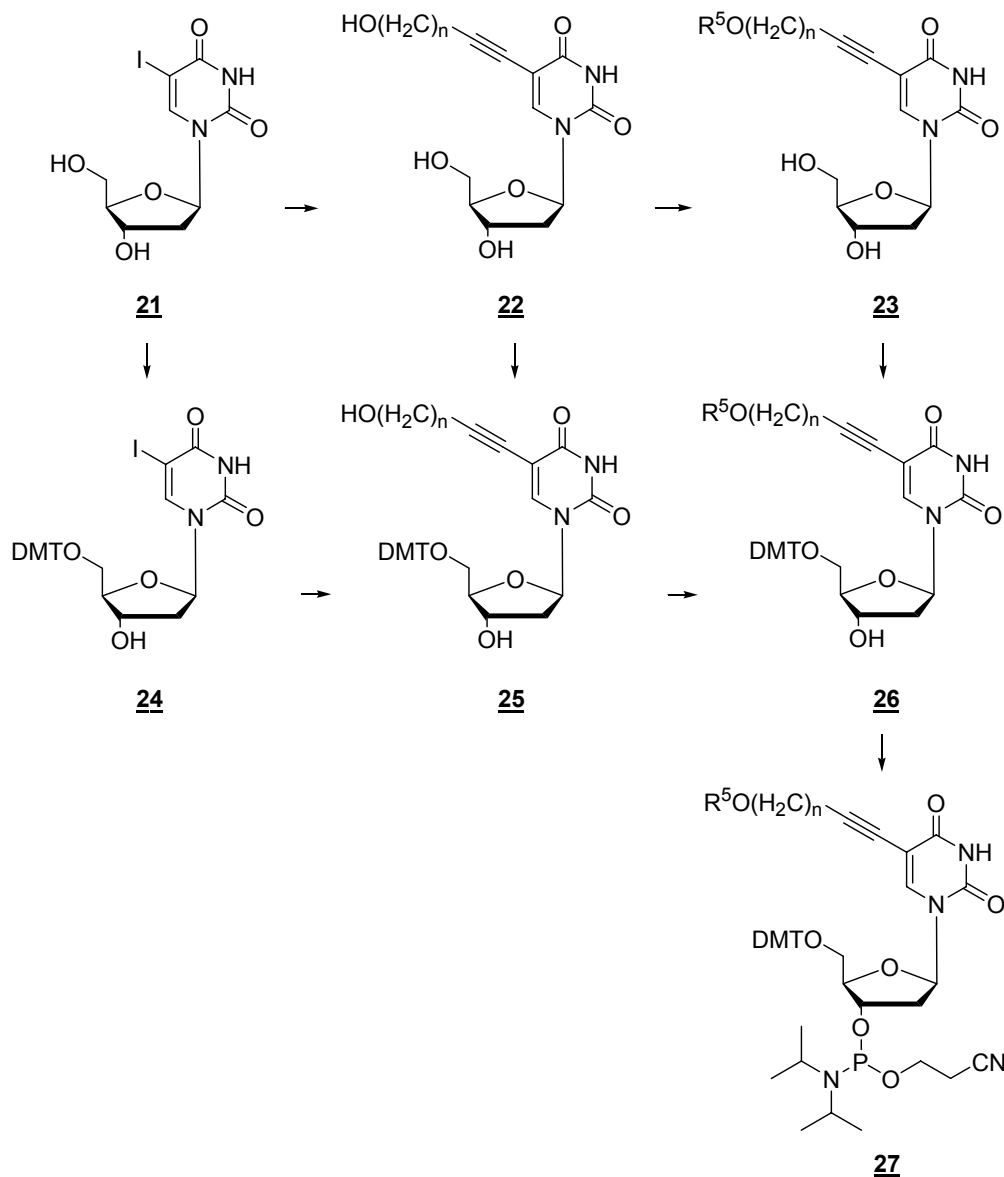


Abb.21: Synthesestrategie IV: Synthese von verzweigendem Phosphoramidit mit der Sonogashira-Kupplung von terminalen Hydroxyl-Ethinen mit 5-Iod-2'-desoxyuridin als Schlüsselschritt
 R^5 =DMT oder TBDMS; $n=1,2$ oder 4

Die beste Reihenfolge der möglichen Syntheseschritte der Synthesestrategie IV ist bereits in Kapitel 3.2 kurz diskutiert worden. In den anschließenden Kapiteln werden die Sonogashira-Kupplung, die Dimethoxytritylierung und die Phosphorylierung vorgestellt.

3.3.4.1 Mechanismus der Sonogashira-Kupplung

Die Sonogashira-Kupplung wurde 1975 entwickelt (Sonogashira et al., 1975). Sie ist eine Kupfer- und Palladium-katalysierte Kupplungsreaktion zwischen terminalen Ethinen und Iodalken oder Iodarenen. Vorläuferreaktion war die Stephens-Castro Kupplung, die Ethinarylen aus Arylhalogenide mit Ethincupraten unter harschen Bedingungen in Gegenwart von Palladium und Pyridin erzeugen. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte Sonogashira eine solche bei Raumtemperatur durchführen. Sie besteht aus der oxidativen Addition, der Transmetallierung, der *trans/cis*-Isomerisierung und der reduktiven Eliminierung (vgl. Abbildung 22).

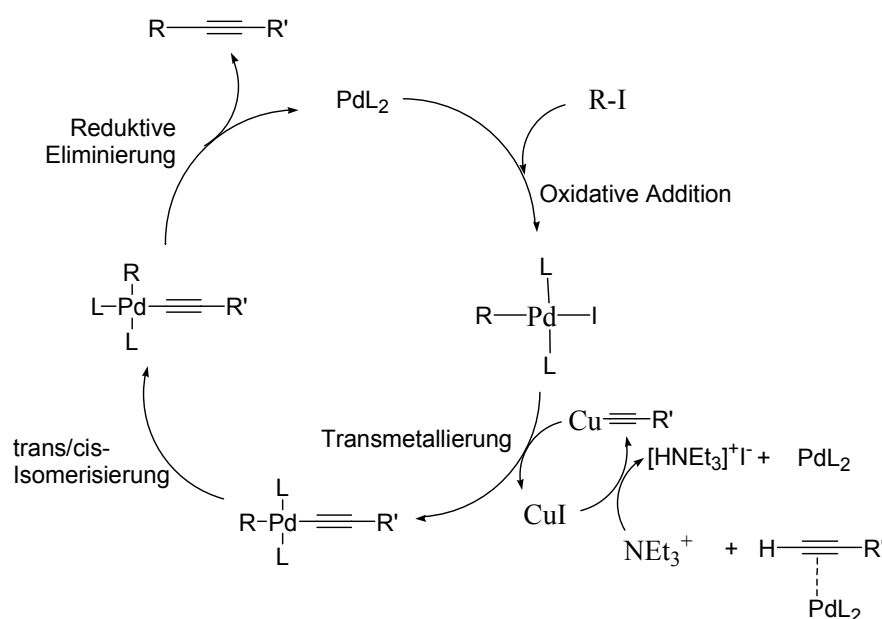


Abb.22: Allgemeiner Mechanismus der Sonogashira-Kupplung;
L=PPh₃, R=5'-DMT-dU oder 5',3'-Di-(TBDMS)dC; R'=Ph oder (CH₂)_nO(H, TBDMS oder DMT)

Zur Aktivierung des Alkins soll dieses deprotoniert werden. Ein terminales Ethin-Proton ist nicht acide genug, um von Triethylamin alleine deprotoniert zu werden. In Gegenwart von einem Palladiumkatalysator dagegen kann es deprotoniert werden. Kupferiodid wird üblicherweise als Co-Katalysator verwendet. Es bildet mit dem deprotoniertem Acetylid ein Cuprat. Neben der Rolle des Palladiumkatalysators zur Aktivierung des Ethins, aktiviert er die sp^2 -Kohlenstoff-Iod-Verbindung in einer oxidativen Additionsreaktion. Eine anschließende Transmetallierung, bei der der $\text{R-PdL}_2\text{-I}$ -Komplex Iodid gegen Ethin des Ethincuprats austauscht unter Regenerierung von Kupferiodid, bringt den zu kuppelnden Rest R mit dem Ethin über das Palladiumatom linear miteinander gebunden einander näher, nach *trans/cis*-Isomerisierung am planar-kooptinierten Palladium kann die Kupplung zwischen R und dem

Ethinids durch reduktive Eliminierung stattfinden. Hierbei wird der Palladiumkatalysator regeneriert.

Als Nebenreaktion findet in Anwesenheit von Sauerstoff die Homokupplung des Ethins statt (Glaserkupplung). Diese Nebenreaktion findet verstärkt bei elektronenreichen Aryliodiden oder Arylbromiden statt. Durch ein Verhältnis von 2 : 1 von Kupfer- zu Palladiumkatalysator kann die Homokupplung unterdrückt werden (Agrofoglio et al., 2003).

3.3.4.2 Suzuki als alternative Kupplungsreaktion

Als Alternative zur Sonogashira-Kupplung wurde die Suzuki-Kupplung in Erwägung gezogen (Abbildung 23).

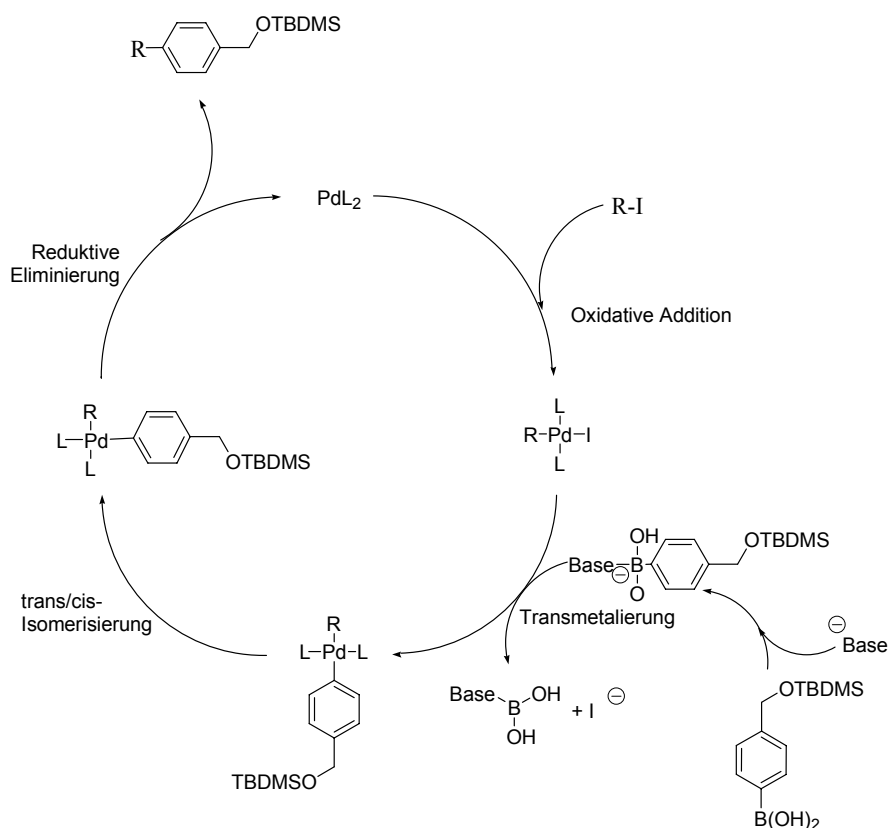


Abb. 23: Allgemeiner Mechanismus der Suzuki-Kupplung
 $L=PPh_3$; $R=5'$ -DMT-dU; $Base=NaOH$

Der *Linker* hierfür beinhaltet statt des terminalen sp -hybridisierten Ethin-Kohlenstoffatoms ein Boronsäure gebundenes sp^2 -hybridisiertes Kohlenstoffatom. Als Kupplungspartner kann ebenfalls 5-Iod-2'-desoxyuridin verwendet werden. Analog der Sonogashira-Kupplung finden bei der Suzuki-Kupplung folgende Reaktionsschritte statt: 1. Oxidative Addition, 2. Transmetallierung, 3. *trans/cis*-Isomerisierung und 4. reduktiver Eliminierung (vgl. Abbildung 23).

Die oxidative Addition kann zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden, daher ist die Wahl des Halogenids entscheidend. Iod ist der bevorzugte Substituent, da er schneller reagiert als Trifluormethylsulfonat gefolgt von Bromid und dem sehr langsam reagierenden Chlorid. Der Transmetallierungsschritt ist meistens der langsamste Schritt. Daher ist die Aktivierung der Boronsäure mit einer nukleophilen Base, i. d. R. NaOH, zu einem tetra-valenten nukleophileren Boratkomplex unbedingt erforderlich.

Obwohl auch eine Alkenylboronsäure (z. B. HOCH₂C=CHB(OH)₂) in Frage käme, da während der Suzuki-Kupplung die Stereochemie erhalten bleibt (Laue & Plagens, 1998), fiel die Wahl auf ein Arylbromid, nämlich *p*-Brom-benzylalkohol, der mit TBDMS geschützt boroniert werden sollte. Die Suzuki-Kupplung von 5-Iod-2'-desoxyuridin mit Arylboronsäuren ist bekannt, die Ausbeuten variieren jedoch von 28% bei Boronsäure-phenyl-*p*-Aldehyd (Okamoto et al, 2005) bis 79% bei Pyrenboronsäure (Amann et al., 2002).

3.3.4.3 Versuche zur Suzuki-Kupplung von *O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*p*-benzylether-*p*-boronsäure mit 5-Iod-2'-desoxyuridin

tert-Butyldimethylsilyloxy-*p*-benzylboronsäure wurde in drei Reaktionsschritten ausgehend von *p*-Brombenzylalkohol synthetisiert. Die Einführung der TBDMS-Schutzgruppe verlief schnell (innerhalb von 30 min bei RT in DMF) und in guter Ausbeute (89%) analog der Literaturstelle (Sessler et al., 1995). Anschließend wurde ein Brom-Lithiumaustausch mit *n*-BuLi in Hexan/THF bei -78°C innerhalb von einer Stunde durchgeführt und anschließend mit zwei Äquivalenten Methylborat bzw fünf Äquivalenten Di-(*iso*-propyl)-borat (eine Stunde bei -78°C, 16 Stunden bei RT) boroniert. Die Ausbeute betrug wie in der Literatur beschrieben 79% (Ashton et al., 2000). Nach wässriger Aufarbeitung wurde ein Gemisch aus dem gewünschten Produkt sowie seinem dimeren und trimeren Anhydrid in 44% bzw. 47% Ausbeute erhalten. Die spontane Anhydridbildung ist in der Literatur für Phenylboronsäure bereits beschrieben (Hawkins et al., 2002), sie macht sich analytisch vor allem durch einen überhöhten Schmelzpunkt bemerkbar.

In der Hoffnung, die Ausbeuten der Borierung zu verbessern, wurde *tert*-Butyldimethylsilyloxy-benzyl-*p*-bromid mit einem Äquivalent *iso*-Propylmagnesiumchlorid in THF bei 0°C in einer Austauschreaktion (Br gegen MgCl) zu *tert*-Butyldimethylsilyloxybenzyl-*p*-magnesiumchlorid zur Reaktion gebracht und anschließend mit fünf Äquivalenten Trimethylborat boriiert. Jedoch wurde nur eine 40%ige Ausbeute erhalten.

Die Suzuki-Kupplung wurde sowohl mit dem ungeschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin als auch mit dem 5'-DMT-geschütztem 5-Iod-2'-desoxyuridin getestet, wobei PPh₃/(PdOAc)₂ und Pd(PPh₃)₄ als Palladiumkatalysatoren, NaHCO₃, NaOH als Basen und Mischungen aus

THF/H₂O (Zheng et al., 2003), 2 THF : 1 CH₃OH : 2 H₂O (Amann et al, 2002) als Lösungsmittel verwendet wurden. Es konnte jedoch keine Umsetzung zum gewünschten Produkt bei RT beobachtet werden. Erst beim Refluxieren trat eine Reaktion ein, wobei die Edukte auch nach 20 h Refluxieren noch nicht vollständig umgesetzt waren, jedoch hatten schon Nebenreaktionen stattgefunden. Als einziges Kupplungsprodukt und beste Ausbeute wurde 5-(Hydroxylbenzyl)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin in 59%iger Ausbeute nach drei-stündigem Refluxieren und Rühren über Nacht bei RT in wässriger THF-Lösung mit 0.04 eq Pd(PPh₃)₄ und 2.1 eq NaHCO₃ erhalten. Das entstehende Hydroxylanion genügt anscheinend, um die TBDMS-Schutzgruppe abzuspalten.

3.3.4.4 Dimethoxytritylierung

Die Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe (DMT) konnte in guten bis sehr guten Ausbeuten eingeführt werden, z. B. wurden 5-[1''-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin mit 70% und 5'-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin mit 89% erhalten.

3.3.4.5 Phosphitylierung

Für die Synthese von Phosphoramiditen ist das Phosphitylierungs-Reagenz 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid gebräuchlich. 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid ist jedoch sehr feuchtigkeits- und oxidationsempfindlich, daher wurde die Phosphitylierung unter Schutzgasatmosphäre und in möglichst kurzer Zeit durchgeführt, die Phosphitylierung selber dauert nur wenige Stunden. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid nachzupipettieren, wenn 30 min nach seiner Zugabe noch nichtabreagiertes Nucleosid vorhanden war, anstatt weiter abzuwarten. Ein geringes Ausmaß an Hydrolyse war nicht zu vermeiden. Dabei bildet sich zunächst 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-hydroxyl-phosphin, das wie in Abbildung 24 gezeigt, durch anschließende Tautomerisierung ein H-Phosphonat bildet:

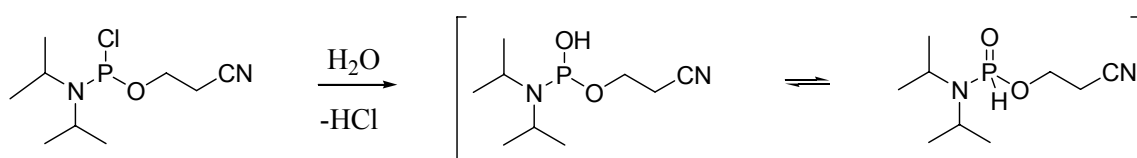


Abb.24: Hydrolyse des Phosphorylierers unter Bildung eines H-Phosphonats

Zusätzlich zur Bildung unerwünschter H-Phosphonate fällt Salzsäure an. Um eine Detritylierungen zu verhindern, wurde in einem Überschuß an Base, meist mit 5 eq Di-(*iso*-propyl)-

amin gearbeitet und die Zugabe des Phosphitylierers erfolgte tropfenweise unter heftigem Rühren.

Auch der Luftsauerstoff kann unerwünschte P(V)-Spezies erzeugen. Diese sind im ^{31}P -NMR-Spektrum bei chemischen Verschiebungen zwischen 0 und 20 ppm zu finden. Daher wurde die Aufreinigung möglichst schnell durchgeführt, in einer Stunde erfolgt die säulenchromatographische Aufreinigung inklusive des Trocknens des Produkts am Rotationsverdampfer.

Als Lösungsmittel werden bevorzugt niedrigsiedende eingesetzt, so dass sie nach vollendeter Reaktion ohne Erwärmen am Rotationsverdampfer entfernt werden können.

Moderate bis gute Phosphitylierungs-Ausbeuten wurden erzielt (s. Tabelle 6).

Tab.6: Phosphitylierungsausbeuten

Phosphitylierung mit	Ausbeuten [%]
5'-O-DMT-dU-5-C=C(CH ₂) ₄ ODMT	38
5'-O-Benzoyl-Thymidin	45
5'-O-DMT-dU-5-C=CCH ₂ ODMT	62
5'-O-DMT-dU-5-C=CCH ₂ OTBDMS	79

5-Iod-4-*N*-(dimethylformamidin)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxycytidin konnte nicht von seinen H-Phosphonaten getrennt werden, da ihr Laufverhalten auf Kieselgel zu ähnlich ist. Alternativ zu Chlor-2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin kann 2-Cyanoethoxy-bis-[*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino]-phosphin eingesetzt werden.

3.4 Synthese von Oligodesoxynukleinsäuren

3.4.1 Synthese von Oligodesoxynukleotiden mit Phosphatrückgrat (PO-ODN)

Für die Synthese von PO-Oligodesoxynukleotiden wurde die Phosphoramidit-Methode gewählt, die am häufigsten verwendete ODN-Synthesemethode. Sie erfolgt mit Hilfe eines Syntheseautomaten. Die Syntheschritte sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Synthese erfolgt in 3'-5'-Richtung, also umgekehrt zur DNA-Biosynthese. Das erste Phosphoramidit (enthält in der Abbildung 25 die Nukleobase B1) ist über einen Alkyl-succinimid-*Linker* an die feste Phase gebunden, die aus Glaskügelchen definierter Porengröße, sogenanntem *controlled pore glas*, besteht und sich innerhalb einer semipermeablen Säule befindet, die mit den jeweiligen Reagenzien durchspült wird. Die Standardphosphoramidite mit den Aminoschutzgruppen Benzoyl für dA und dC und *iso*-Buturyl für dG, sowie T, das keine Schutzgruppen an der Nukleobase benötigt, sind käuflich erhältlich, ebenso die anderen Reagenzien.

Als erster Schritt erfolgt die Abspaltung der DMT-Schutzgruppe des festphasengebundenen ersten Phosphoramidits (mit der Nucleobase B_0 , $R^n=0$) mit 3%iger Trichloressigsäure. Als nächstes findet die Kupplung mit dem zweiten Phosphoramidit (mit der Nucleobase B_{n+1}) statt, die einer nukleophilen Substitution der Di-(*iso*-propyl)-amino-Schutzgruppe durch die 5'-OH-Funktion entspricht (Abbildung 25).

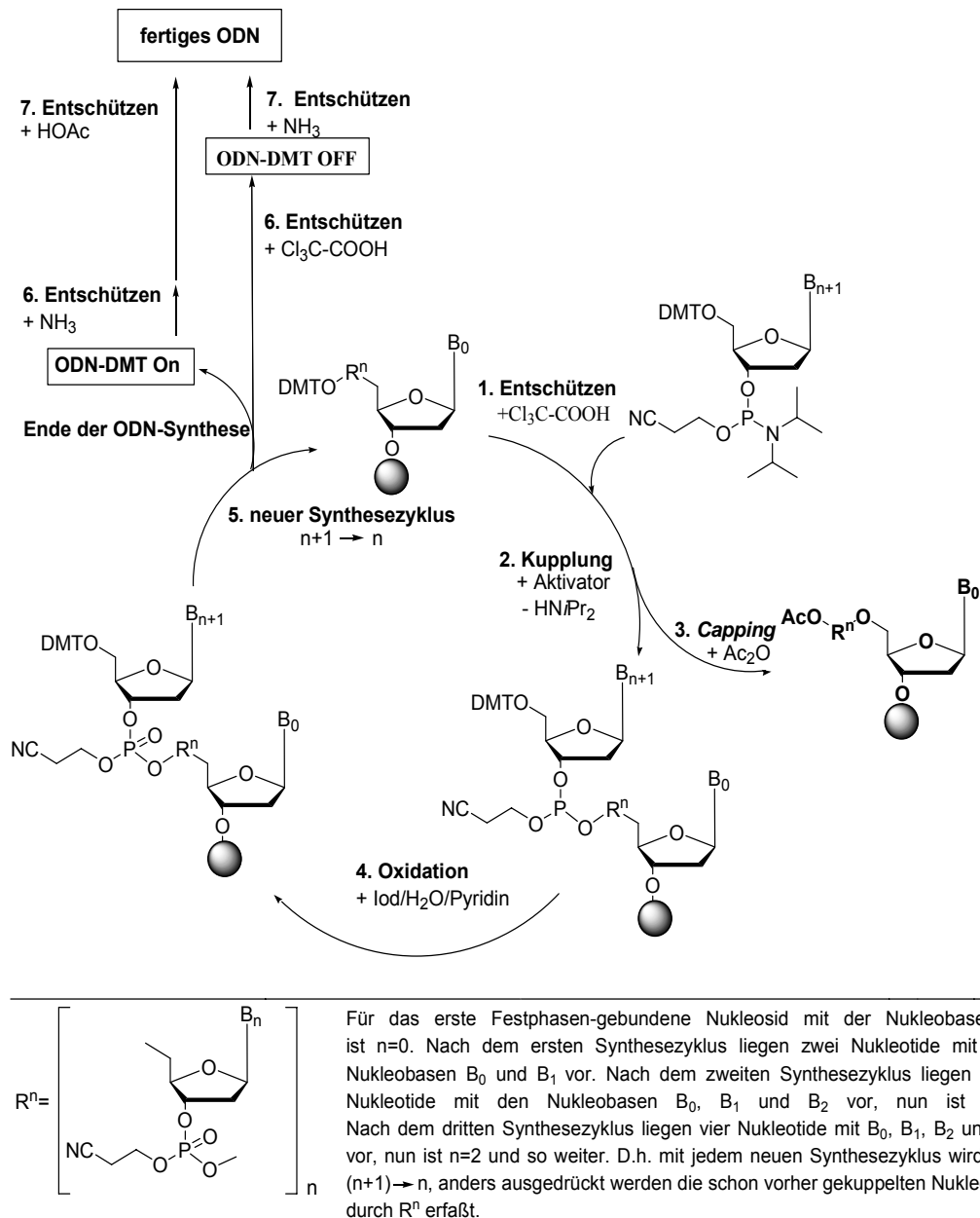


Abb. 25: Ein Synthesesyklus der PO-ODN-Synthese besteht aus der Abfolge: 1. Entschützung, 2. Kupplung /Aktivierung, 3. Maskierung nicht gekuppelter Bausteine, 3. Oxidation

Da Amine keine Abgangsgruppen sind, muss Di-(*iso*-propyl)-amin aktiviert werden. Dies läßt sich durch Übertragung eines Protons eines Aktivators, 4,5-Dicyanoimidazol oder Tetrazol erklären (s. Abbildung 26).

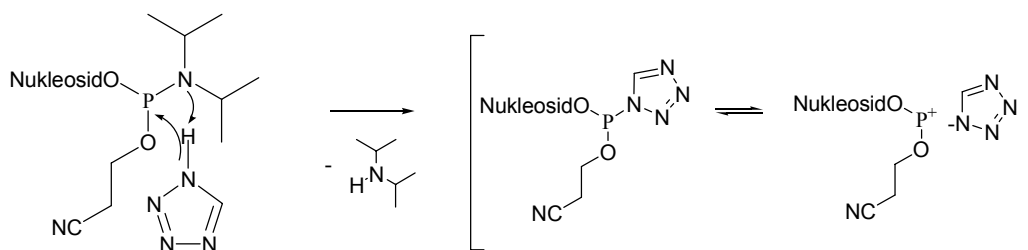


Abb. 26: Angenommener Mechanismus der Aktivierung (Dahl et al., 1987)

Für die Kupplung sollte mindestens eine Minute betragen. Für das Kuppeln von modifizierten Phosphoramiditen wird die Kupplung zwei Mal hintereinander durchgeführt ohne einen Demethoxytritylierungsschritt dazwischen zu schalten („double coupling“) und auf bis zu 20 min verlängert. Damit keine Nebenreaktionen von nicht gekuppelten Nukleotid stattfinden, wird ein „Capping“-Schritt an die Kupplung angeschlossen, bei dem die nicht-abreagierte 5'-OH-Funktion mit der Acetyl-Schutzgruppe maskiert wird unter Verwendung von Acetylanhydrid. Iod/H₂O/Pyridin oxidiert das Phosphits P(III) zum Phosphat P(V), wobei das Sauerstoffatom des Wassermoleküls auf das Phosphit übertragen wird, während Iod zum Iodid reduziert wird unter Bildung von [H-Pyridinium]⁺I⁻. Anschließend kann ein neuer Syntheseyklus stattfinden. Nach Einbau aller Nukleotide kann die letzte 5'-DMT-Schutzgruppe entweder abgespalten werden oder nicht. Dann wird die ODN-Säule vom Syntheseautomaten entfernt, die basenlabilen Schutzgruppen (Benzoyl, *iso*-Butyryl, Formamidin, Succinimid) werden nach 24 stündiger Inkubation mit konzentriertem Ammoniak abgespalten, wodurch ein freies (bzw. das nur noch 5'-DMT-geschützte) ODN entsteht, das über HPLC (bzw. halbstündiger Behandlung mit 80%iger Essigsäure zur Entfernung der 5'-DMT-Schutzgruppe, anschließender HPLC-Trennung und Fällung mit Ethanol aufgereinigt wird.

3.4.2 Synthese von Oligodesoxynukleotiden mit Thiophosphatrückgrat (PS-ODN)

Die in Rahmen dieser Arbeit hergestellten Oligodesoxynukleotide enthielten entweder nur teilweise Phosphate oder ausschließlich Thiophosphate, da ein unmodifiziertes Phosphatrückgrat in biologischen Systemen zu instabil ist (vgl. Kapitel 1.7). In Kapitel 3.4.2 wird gezeigt, wie die Thiophosphat-Modifikation durch geringfügige Änderungen im Syntheseyklus bequem eingeführt werden kann (s. Anhang, Tabelle 49).

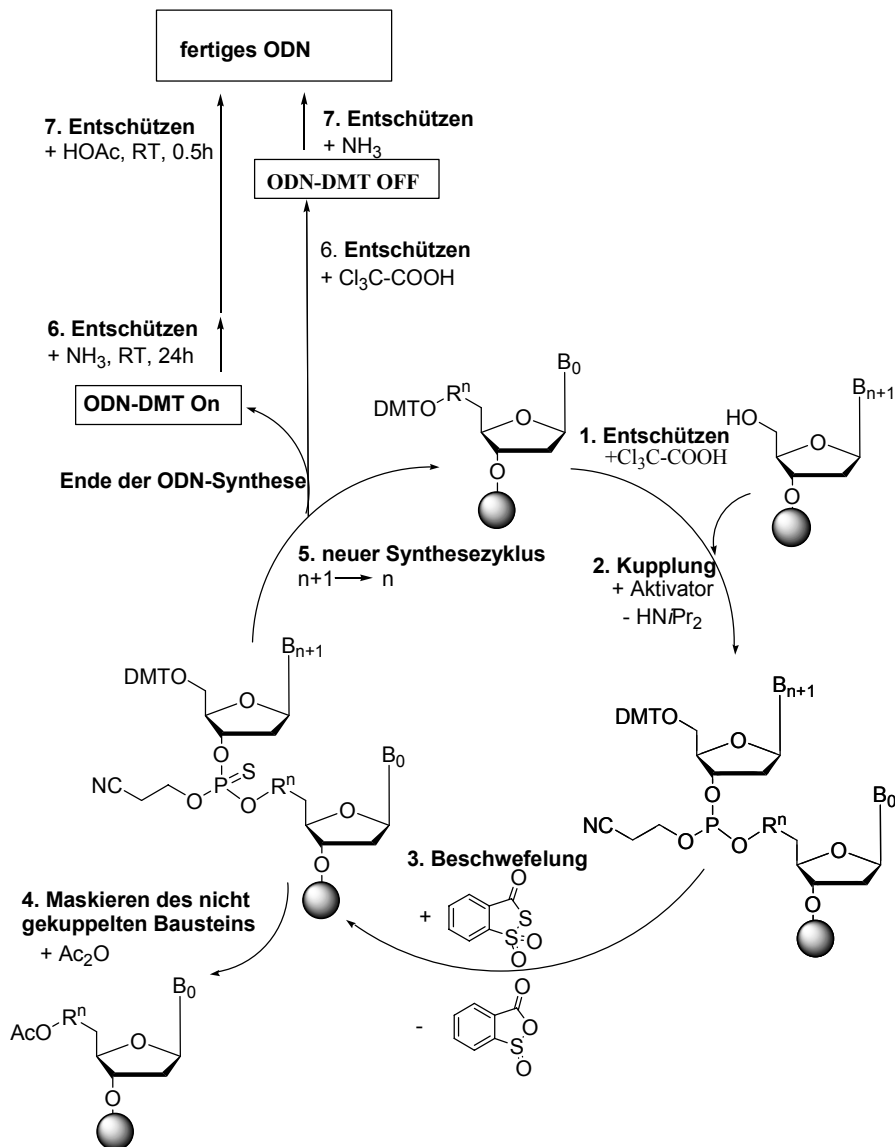


Abb. 27: PS-ODN-Synthesesyklus besteht aus der Abfolge: 1. Entschützen, 2. Kupplung /Aktivierung, 3. Beschwefelung, 4. Capping

Die Synthese von Vollthioaten und von chimären Oligodesoxynukleotiden war für unmodifizierte Nucleobasen erfolgreich, obwohl ihre Aufreinigung generell anspruchsvoll und nicht in jedem Fall möglich war. Für unmodifizierte Nucleobasen wurden lineare 20mere bis 24mere ODN i.d. R. in Reinheiten von 70-90% erhalten.

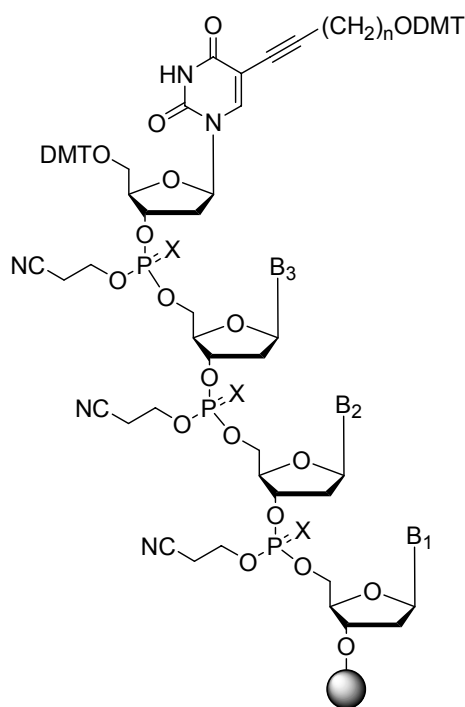
Bei modifizierten Nucleobasen kam es auf den Einzelfall an: Der Einbau des 5-Brom-modifizierten 2'-Desoxycytidin-Bausteins in die Sequenz pos2216 war nicht erfolgreich, für 5-Iod gelang es an einer Position (2216¹C-1: ggG GGA (¹C)GA: TCG TCG ggg gg) mit einer Reinheit von 80%, für 4,6-Difluorbenzimidazol konnte DFI-T (tgt cgt ttt ttt tt(DFI) tt) mit 63% Reinheit isoliert werden. Die Synthese von dWyosin- und 2-Butyl-dG-modifizierter ODN erfolgte in sehr schlechten Kupplungsausbeuten aufgrund der sehr geringen Lös-

lichkeit dieser Phosphoramidite in Acetonitril, jedoch konnte kein Molpeak mit Hilfe von MALDI-MS identifiziert werden.

Exemplarisch werden HPLC-Spektren von den verschiedenen Klassen in Kapitel 8.5 gezeigt.

3.4.3 Synthese von symmetrisch verzweigten Oligodesoxynukleotiden

1. Mit einfacher Konzentration erfolgt die Synthese der üblichen Phosphoramidite, mit verlängerten Kupplungszeiten und doppelter Kupplung wird das verzweigende Phosphoramidit eingebaut:



2. Mit doppelter Konzentration & doppelter Kupplung wird die Synthese an zwei Armen gleichzeitig fortgesetzt:

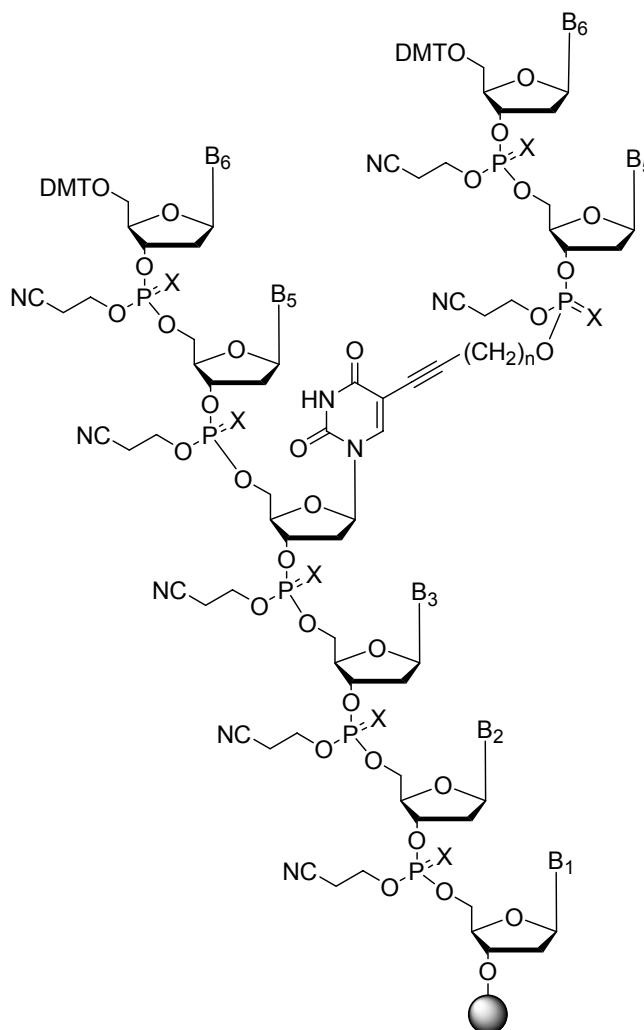
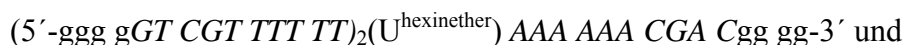


Abb. 28: Allgemeine Synthesestrategie für symmetrisch verzweigte ODN mit Hilfe von 5-(1-Dimethoxytriphenyl-alk-5-ynyl)-5'-O-dimethoxytriphenyl-3'-O-[2-cyanoethoxy-N,N-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyuridin mit $n=1,2$ oder 4 ; $X=O, S$

Die Synthese verzweigter ODN ist noch schwieriger, aber konnte für symmetrische ODN soweit optimiert werden, dass sogar für die Oligodesoxynukleotide



(5'-ggg gGT GCT TTT TT)₂(U^{hexinether}) AAA AAA GCA Cgg gg-3' 10 OD (das entspricht 0.024 µmol, 91% Kupplungsausbeute) und 19 OD (das entspricht 0.047 µmol, 93% Kupplungsausbeute) in einer Reinheit von 63% und 68% (Kapitel 6.3.6) isoliert wurden. Die ODN-Synthese erfolgte im 1 µmol-Maßstab. Die Kupplungsausbeuten (Tabelle 7) wurden folgendermaßen berechnet, wobei die aus den gemessenen optischen Dichten berechneten ODN-Mengen (in µmol), die maximal mögliche Ausbeute von 1 µmol und die Anzahl der Kupplungen, das sind die Anzahl an Nukleotide minus eins, berücksichtigt wurden:

Kupplungsausbeute*100[%]=berechnete ODN-Menge aus gemessener OD^{1/(Nukleotide-1)}:1 µmol
 Es wurden Ausbeuten von 0,3 mg bis 1,7 mg erhalten. Die Kupplungsausbeuten lagen zwischen 84% und 93%. Sie liegen damit unter den für reine PO-ODN erwarteten > 99%. Grund für die geringeren Ausbeuten ist, dass die Bestimmung der Kupplungsausbeuten erst nach der Isolierung der ODN vorgenommen wurde, so dass Verluste während des Aufreinigungsprozesses zu einer vermeindlich geringeren Kupplungsausbeute führen. Auch sollte bedacht werden, dass es sich bei diesen ODN um teilweise oder vollständig Thiophosphat-modifizierte ODN handelt, die jeweils ein Gemisch aus vielen Stereoisomeren bestehen (361 Stereoisomere für 20mere, 1764 für 43mere). Für die HPLC-Trennung kommt erschwerend hinzu, dass sie teilweise (pos2216, neg2216, pos2429, neg2429, posVerzw. und negVerzw.) Sekundärstrukturen ausbilden.

Tab. 7: ODN-Ausbeuten der in den biologischen Tests berücksichtigten ODN, X=dU-5-hexinether

ODN	Sequenz	mer	Ausbeute [mg]	Ausbeute [nmol]	Kupplungsausbeute [%]
pos2216	ggG GGA <u>CGA</u> : <u>TCG</u> <u>TCG</u> ggg gg	20	0,25	39	84,3
neg2216	ggG GGA <u>GCA</u> : <u>TGC</u> <u>TCg</u> ggg gG	20	1,44	225	92,5
pos	tgt cgt ttt ttt ttt ttt ttt tt	20	1,38	217	92,3
pos (bought)	tgt cgt ttt ttt ttt ttt ttt tt	20	1,65	260	93,2
neg	tgt gct ttt ttt ttt ttt ttt tt	20	0,98	155	90,7
neg (bought)	tgt gct ttt ttt ttt ttt ttt tt	20	1,21	190	91,6
MedC	tgt (^{Me} c)gt ttt ttt ttt ttt ttt tt	20	0,78	122	89,5
DFI-T	tgt cgt ttt ttt ttt ttt tt(DFI) tt	20	0,91	142	90,2
IdC	tgt (c)gt ttt ttt ttt ttt ttt tt	20	0,49	75	87,3
pos2006	tcg tcg ttt <u>tgt cgt ttt gtc gtt</u>	24	0,49	63	88,8
neg2006	tgc tgc ttt <u>tgt gct ttt gtc ctt</u>	24	0,35	45	87,5
pos2429	tcg tcg ttt <u>tcg gcg g:cc gcc g</u>	22	0,49	63	87,7
neg2429	tgc tgc ttt <u>tta ata a:tt att a</u>	22	0,29	41	87,0
posVerw.	(ggg <u>gGT CGT TTT TT</u>) ₂ X AAA AAA CGA Cgg gg	43	0,32	24	91,5
negVerzw.	(ggg <u>gGT GCT TTT TT</u>) ₂ X AAA AAA GCA Cgg gg	43	0,64	47	93,0

Bei der Synthese symmetrisch verzweigter Oligodesoxynukleinsäuren wurde zunächst der Strang 3'-ggg gCA GCA AAA AA-5' mit DMT-Schutzgruppe an dem letzten 5'-Adenosin synthetisiert. Anschließend wurde 5-[1''-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-1''-ether]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-[2-cyanoethoxy-N,N-di-(iso-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyuridin in das ODN inkorporiert. Unter Verwendung der doppelten Konzentration an Phosphoramidit-Lösungen wurden die zwei 5'-Enden gleichzeitig synthetisiert (s. Abb.28). Das Tritylprotokoll (Abbildung 29) liess auf gute Kupplungen schließen.

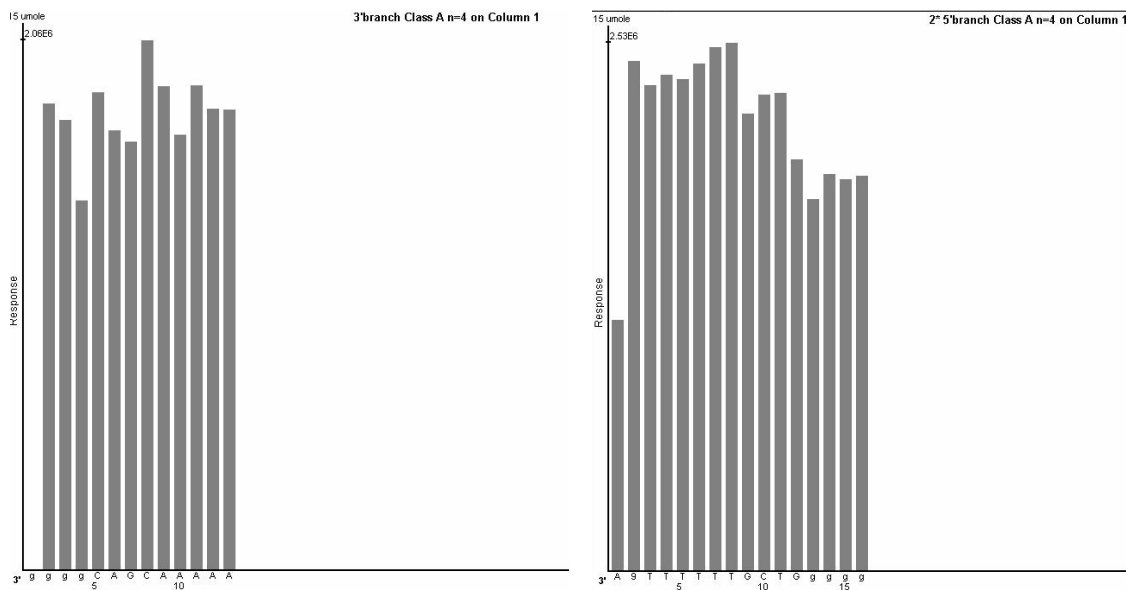
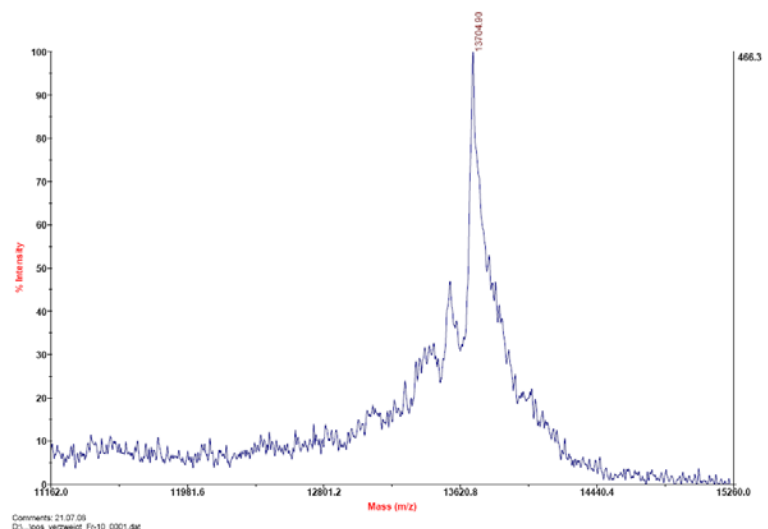


Abb. 29: Tritylmodus der Sequenz 5'-^{DMT}AAA AAA CGA Cgg gg-3' (links) und 5'-ggg gGT CGT TTT TT(U^{hexinether})-3' (rechts) für die Synthese des verzweigten ODN (5'-ggg gG T C G T T T T)₂(U^{hexinether}) AA AAA ACG ACg ggg-3'

Wie aus Abbildung 30 exemplarisch hervorgeht, war es gelungen, symmetrisch verzweigte ODN herzustellen und mit Hilfe von MALDI-MS zu detektieren.

Abb. 30: MALDI-MS-Spektrum von posVerzw. 5'-(ggg gGT CGT TT TTT)₂-(U^{hexinether}) AAA AAA CGA Cgg gg-3', berechnete Molmasse: 13702 g/mol, gefundene: 13705 g/mol

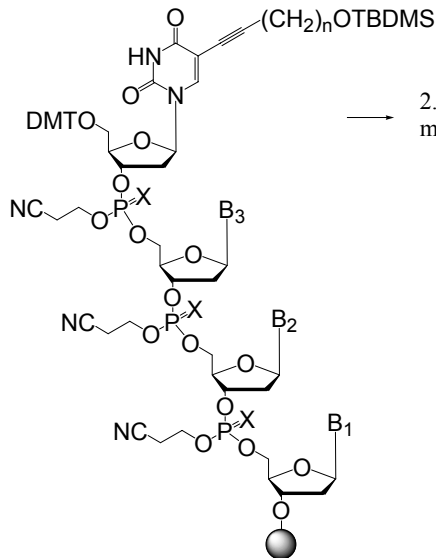
Exemplarisch sind in Kapitel 8.5 analytische HPLC-Spektren aufgeführt.



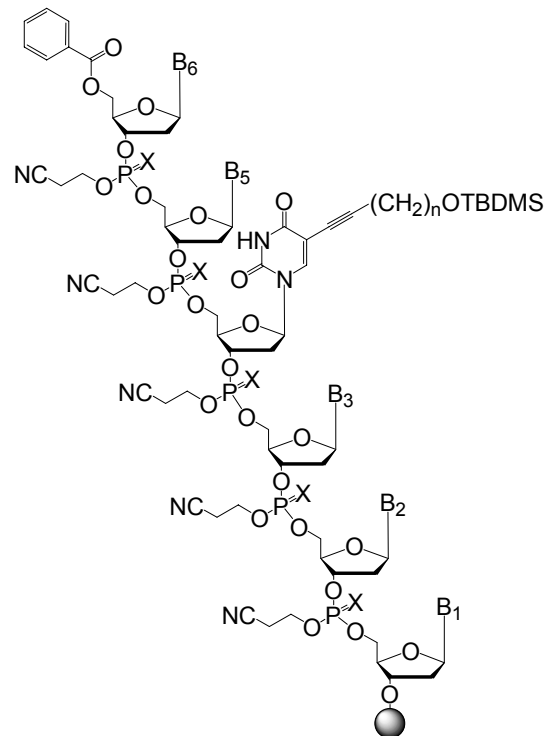
3.4.4 Syntheserversuche von asymmetrisch verzweigten ODN und Dentrimeren

Prinzipiell ist die Synthese asymmetrisch verzweigter Oligodesoxynukleotiden, wie in Abbildung 31 gezeigt, denkbar.

1. Übliche Synthesebedingungen, mit verlängerten Kupplungszeiten und doppelter Kupplung wird das verzweigende Phosphoramidit eingebaut, die Verzweigungsstelle ist mit TBDMS blockiert :



2. Fortsetzung der Synthese und Einbau des Terminators mit den üblichen Reaktionsbedingungen:



3. Die ODN-Säule wird vom Synthesizer entfernt, 0.5h mit 1M TBAF-THF-Lösung durchspült, mit MeCN gewaschen, im Vakuum getrocknet. Anschließend wird der ethinyl-verknüpfte ODN-Arm synthetisiert:

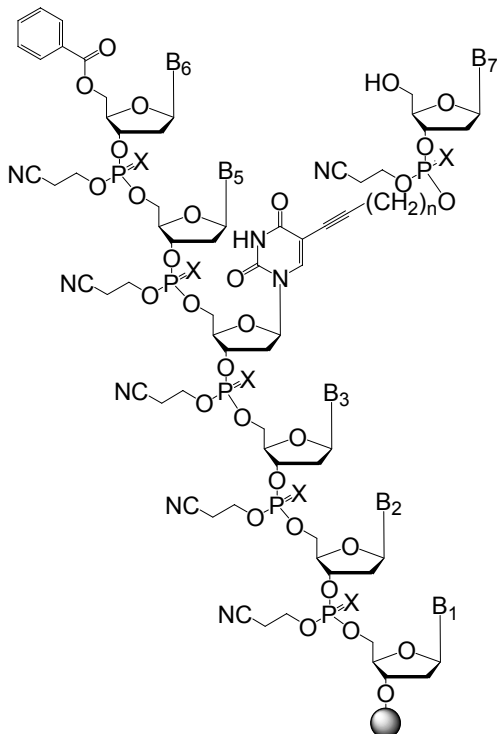


Abb. 31: Synthese asymmetrischer verzweigter ODN; X=O, S

Die Synthese asymmetrisch verzweigter ODN war unter den verwendeten Reaktionsbedingungen erfolglos. Grund dafür war, dass die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe von 5-[1''-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-1''-ol)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyuridin nicht mit einer 1 molaren TBAF-THF-Lösung innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur gelang.

3.5 Weitere Informationen zu den verwendeten Schutzgruppen

Um nur die jeweils gewünschte Reaktion zu ermöglichen und um Nebenreaktionen zu unterdrücken, müssen nukleophile funktionelle Gruppen wie die 2',3',5'-Hydroxyl- und 4-Aminofunktion vorübergehend durch Schutzgruppen maskiert werden. Welche Schutzgruppen hierfür in Erwägung gezogen wurden, wird in den anschließenden Unterkapiteln erläutert.

3.5.1 Acetyl/Benzoyl/Toluoyl

Die nukleophile Alkohol-Funktion läßt sich mit Carbonsäurechloriden, z. B. Acetylchlorid, Benzoylchlorid oder Toluoylchlorid in guten Ausbeuten schützen. Jedoch sollte die Zugabe des Carbonsäurechlorids durch langsames Zutropfen und unter heftigem Rühren der Reaktionslösung erfolgen.

Die Acetyl-/Benzoyl- und Toluoyl-Schutzgruppen werden unter basischen Bedingungen abgespaltet. Hierbei kam entweder mit Ammoniak gesättigte Methanollösung oder 5.4 M methanolische Natriummethanolat-Lösung zum Einsatz. Die Abspaltung der Acetyl-, Benzoyl- oder Toluoyl-Schutzgruppe erfolgte innerhalb einer bis zwei Stunden bei RT mit der stärkeren Base, NaOMe. Ammoniak als die schwächere Base benötigt dagegen 24 h bei RT.

Eingesetzt wurde die Acetyl-Schutzgruppe bei der Vorbrüggen-Silylierung (s. Synthesestrategie I). Die Toluoyl-Schutzgruppe wurde bei der stereounspezifischen Glykosylierung (s. Synthesestrategie II) eingesetzt. Die Benzoyl-Schutzgruppe wurde für die Synthese von 5-(Phenyl-ethinyl)-4-*N*-benzoyl-3',5'-(di-*O-tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin und für den Terminator 5'-Benzoyl-Thymidin verwendet.

3.5.2 Dimethylformamidin

Die Dimethylformamidin-Schutzgruppe wurde für zum Herabsetzen der Nukleophilie des N4-Atoms von 4-*N*-(dimethylformamidin)-6-oxocytidin und 5-Iod-2'-desoxycytidin verwendet.

Zemlicka führte diese Schutzgruppe 1963 für die Nukleoside erstmals ein (Zemlicka, 1963; Zemlicka & Holy, 1967) und hat sich bereits gut bewährt (Berressem & Engels, 1995).

Jedoch läßt sich die Dimethylformamidin-Schutzgruppe sowohl im Sauren als auch im Basischen abspalten. Dies macht die Zugabe von etwas Triethylamin beim Handhaben Di-

methylformamidin-geschützert Nucleoside während der Säulenchromatographie auf Kieselgel erforderlich. Als DNA-Schutzgruppe läßt sich die Dimethylformamidin-Schutzgruppe im Anschluß an die ODN-Synthese zusammen mit der Cyanoethoxy-Schutzgruppe und dem Festphasen-*Linker* mit konzentrierter wässriger Ammoniak-Lösung innerhalb von 24 Stunden bei RT abspalten (McBride et al., 1986; Vu et al., 1990).

3.5.3 Dimethoxytriphenylmethyl

Die Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe, kurz DMT genannt, wurde in den 60er Jahren entwickelt. Die Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe ist säurelabil. Sie wird standardmäßig bei der Phosphoramidit basierten ODN-Synthese eingesetzt. Bevor ein neues Phosphoramidit an das entstehende ODN gekuppelt werden kann, wird die DMT-Schutzgruppe mittels Trichloressigsäure abgespalten. Das freigesetzte DMT-Kation kann aufgrund seines ausgedehnten π -Systems mit Hilfe eines UV-Detektors bei 254nm detektiert werden. Anhand der gemessenen Intensität des DMT-Kations-Signals kann abgeschätzt werden, wie gut die darauffolgende Kupplung des Phosphoramidits mit dem entstehenden ODN stattgefunden hat. Ein weiterer Vorteil dieser Schutzgruppe ist ihre Lipophilie, die die Löslichkeit von Nucleosiden in organischen Lösungsmitteln erhöht.

Da es sich bei der Schützung von Alkoholen mit DMTCl um eine reversible Reaktion handelt, wird zur Vermeidung von Nebenreaktionen während der Festphasen-ODN-Synthese ein Überschuß an Säure zur quantitativen Abspaltung von DMT eingesetzt. Dies kann zur Depurinierungen führen. Daher sind viele Versuche unternommen worden, DMT durch eine andere Schutzgruppe zu ersetzen, was aber jeweils andere Probleme mit sich gebracht hat, so dass heutzutage DMT immer noch die bevorzugte 5'-Schutzgruppe für ODN-Synthesen ist (Dellinger et al, 2008). Eine Alternative hat sich jedoch für die RNA-Synthese etabliert, die sogenannte ACE-Chemie (Piton, 2006).

Eingeführt wird die DMT-Schutzgruppe anhand ihres Chlorids und unter basischen Bedingungen: Oft wird das Nucleosid in Pyridin mit DMTCl zur Reaktion gebracht oder aber das Nucleosid wird in einem organischen Lösungsmittel gelöst und mit Imidazol oder Dimethylaminopyridin versetzt. In schwierigen Fällen kann DMTCl zusätzlich durch Zugabe von Silbernitrat aktiviert werden. Dies war für 2'-Desoxycytidin- bzw. 2'-Desoxyuridin-Derivate jedoch nicht nötig. Sie reagieren mit DMTCl in Pyridin bei RT über Nacht in akzeptablen bis guten Ausbeuten.

BIOLOGISCHER TEIL

Biologische Tests wurden durchgeführt um festzustellen, welche der synthetisierten ODN überhaupt eine immunstimulierende Wirkung besitzen, wie stark diese Wirkung im Einzelnen ist und ob sich diese Wirkung auf die Anwesenheit des CpG-Motivs zurückführen läßt. Es sollte die These geprüft werden, verzweigte CpG-ODN stimulieren stärker das Immunsystem als unverzweigte CpG-ODN. Verzweigte CpG-ODN sollten mit CpG-ODN der Klasse A, B und C in ihrer Immunstimulation verglichen werden. Der Einfluß zusätzlicher funktioneller Gruppen am Cytosin von CpG-ODN auf die Immunstimulation sollte untersucht werden.

3.6 Auswahl der Zellen

Bei der Auswahl der Zellen wurden folgende Kriterien befolgt: Es sollte sich um humane Zellen handeln, da sich das humane Immunsystem stark von dem anderer Tiere unterscheidet und hinter dieser Arbeit der Wunsch nach einer medizinischen Anwendung von CpG-ODN am Menschen steht. Sie sollten TLR9 exprimieren, um CpG-ODN überhaupt detektieren zu können. Desweiteren sollten die Zellen gut kultivierbar sein und eine große Vitalität besitzen, außerdem wären Erfahrungswerte mit den jeweiligen Zellen von Vorteil. Humane Karzinomzellen bieten sich wegen ihrer leichten Kultivierbarkeit und Vitalität an. Zur Auswahl standen folgende TLR9⁺ humane Karzinom- Zelllinien (Tabelle 8):

Tab. 8: Humane TLR9 exprimierende Zelllinien; Ham'sF12=spezielles Zellnährmedium, s. Anhang, EMEM=Eagles minimal essential medium (s. Anhang), FBS=fetal bovine serum, RPMI1640=spezielles Nährmedium (s. Abkürzungsverzeichnis), ECACC=european collection of cell cultures, ATCC=american tissue cell cultures

Zelllinie	TLR	Vorkommen	Zytokinausschüttung bei CpG-ODN-Stimulierung	Kulturbed.	ECACC-Nr. ATCC-Nr.	Literaturstelle
T84	9	von Lungenmetastase eines Colonkarzinoms	IL-8, COX-2	Ham's F12+EMEM (1:1), 2mM Glutamin + 10%FBS	88021101 CCL248	Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1980, 77, 3464
HT-29/219	9	Epithels der Luftwege Colonkarzinom von 72J	IL-8	EMEM, 2mM Glutamine+ 1% NEAA+ 10%FBS	91072201 HTB38	Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1981 , 166, 107
CaCo-2	9	(m) Kaukasier		EMEM, 2mM Glutamine+ 1% NEAA+ 10%FBS	86010202 HTB37	Biotechnol. Prog., 2006 , 22, 186-198
A549	9	Lungenkarzinom	IL-8	GTSF-2(HyClone)+10%FBS	86012804 CCL185	Infect. Immun., 2005 , 1129-1140
Monozyten	2,4					
THP-1	9	akute monozyt. Leukämie		RPMI1640+20%FBS	88081201 TIB202	Int. J. Cancer, 1980 , 26, 2, 171-176
B-Lymphozyten						
Namal	9, 7	Burkitt-Lymphom von einem Afrikaner	TNF- α , IL-10, CD40, CD80, CD86	RPMI1640+2mM Glutamin+10%FBS	87060801 CRL1432	Antimicrob. Agents Chemother., 1979 , 15, 3, 420-427 http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=DAUDI
Daudi	9, 7	Burkitt-Lymphom von 16J Afrikaner (m)	TNF- α , IL-10, CD40, CD80, CD86	RPMI1640+2mM Glutamin+10%FBS	85011437 CCL213	Leukemia, 2005 , 159-161
Raji	9, 7	Burkitt-Lymphom von 11J Afrikaner (m)	TNF- α , IL-10, CD40, CD80, CD86	RPMI1640+2mM Glutamin+10%FBS	85011429 CCL86	

T84, CaCo-2, HT-29 und A549 exprimieren IL-8 nach Stimulierung mit E. Coli. Die meisten Monozyten zeigen eine stark ausgeprägte TLR2- und TLR4-Expression, jedoch nur eine geringe TLR9-Expression. An B-Lymphozyten sind Namalwa-Zellen sehr gut auf CpG-Stimulation untersucht. Sie reagieren mit TNF- α - und IL-10-Produktion sowie mit Expression von CD40, CD80 und CD86 auf Stimulierung mit CpG-ODN (Henault et al., 2005). Daudi und Raji-Zellen reagieren grundsätzlich wie Namalwa-Zellen, jedoch mit einer schwächeren Immunantwort auf CpG-ODN-Stimulierung, da ihre TLR9-Expression nur die Hälfte bzw. 2/3 der von Namalwa-Zellen beträgt. Neben TLR9 als Haupt-TLR exprimieren Namalwa-, Daudi- und Raji-Zellen zu geringem Ausmaß auch TLR7.

Die Möglichkeit, eine Literaturreferenz als Basis für die eigenen Tests heranziehen zu können, hat die Wahl der Zell-Linie entschieden. Namalwa-Zellen wurden 1967 von einem afrikanischen Kind mit Burkitt-Lymphom isoliert und seitdem kultiviert (http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=024&from=cel). Namalwa-Zellen dürfen nur in Sicherheitslaboren der Stufe II gehandhabt werden, da sie das Genom des Epstein-Barr-Virus enthalten (http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refld=87060801&collection=ecacc_gc). Ein solches Sicherheitslabor stand nicht zur Verfügung. Für Raji-Zellen war dagegen ein solcher Hinweis nicht gefunden worden, sie enthalten zwar auch das EBV-Genom, jedoch ist dieses deletiert, so dass keine Viren freigesetzt werden können (http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refld=85011429&collection=ecacc_gc).

Da Karzinomazellen entartete Zellen sind, die sich potentiell anders als gesunde Zellen verhalten, wurden zusätzlich noch humane peripheräre mononukleare Blutzellen (*hPBMC*) als gesunde Testzellen gewählt. Sie enthalten alle Zelltypen, die durch CpG-ODN stimuliert werden, nämlich B-, T-, NK-Zellen, Makrophagen und Monozyten und werden oft für immunologische Tests herangezogen.

Die verwendeten Raji-Zellen erwiesen sich als gut kultivierbare sehr vitale Zellen. Ihre Verdopplungszeit betrug 24 bis 36 Stunden, was sehr schnell ist (Abbildung 32).

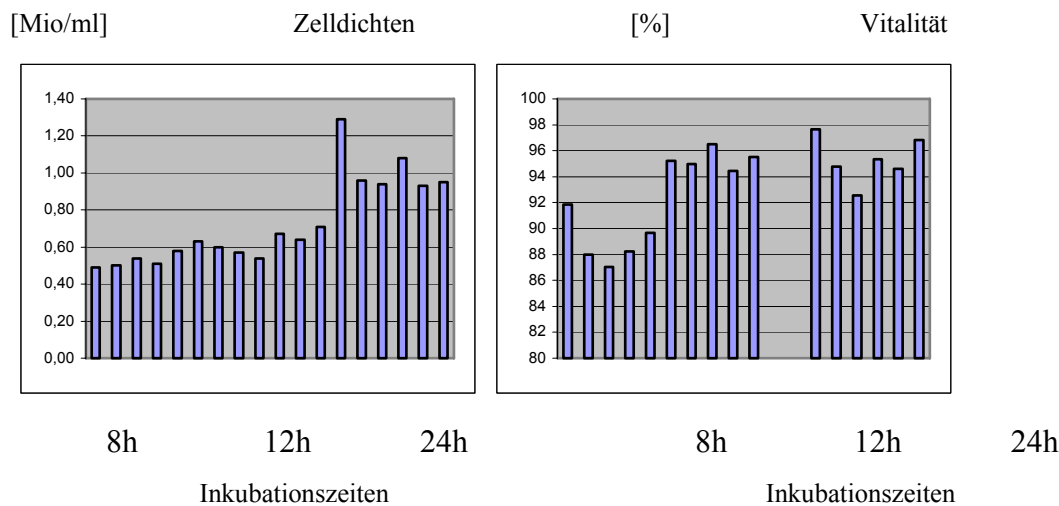


Abb. 32: Zellichten und Vitalität von Raji-Zellen

Die Kultivierung und Inkubierung der Raji-Zellen mit ODN (Kapitel 7.1.1), die Meßwerte des CBA (Kapitel 7.1.2) und ihre Diskussion (Kapitel 3.7) und die statistische Auswertung (Kapitel 8.1.1) sind in den angegebenen Kapiteln beschrieben.

Die Isolierung und Inkubierung von *hPBMC* mit ODN (Kapitel 7.2.1), die Durchführung und die Ergebnisse der IFN- α -ELISA (Kapitel 7.2.2-7.2.4) und ihre Diskussion (Kapitel 3.8) sowie ihre statistische Auswertung (Kapitel 8.1.2, 8.1.3) sind in den aufgeführten Kapiteln vermerkt.

3.7 Cytometric Bead Array

Der *cytometric bead array* (CBA) ist ein sogenannter *cytokine multiplex array*, der mehrere Zytokine gleichzeitig detektiert. Der zugrundeliegende Versuchsaufbau gleicht dem ELISA (Kapitel 3.8). De Jager et al. fand heraus, dass *cytokine multiplex arrays* vergleichbar sind mit ELISA desselben Herstellers in Bezug auf ihre Empfindlichkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit (De Jager et al., 2003).

Beim CBA sind die Antikörper an Kügelchen (*beads*) gebunden. Verschiedene *beads* binden an unterschiedliche Zytokine. Dabei kann die Unterscheidung der *beads* anhand von Durchflußzytometrie (*cytometric flow analysis*) getroffen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Fluoreszenzmarkern oder Dichte von Fluoreszenzmarkern (Albitar, 2007). Um nur die *beads* zu detektieren, die an das Zytokin gebunden haben, werden gelöste Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper zu der zu analysierenden Zytokin-Lösung gegeben. Das Signal für ein spezielles Zytokin wird mit Hilfe von zwei Lasern erfaßt: Ein roter Laser (635 nm) regt die zwei Fluoreszenzfarbstoffe (rot und nahes infrarot) des gelösten Antigens und des *bead*-gebundenen Antigens an, ein grüner Laser (532 nm) detektiert die ins Grün verschobene Emission des angeregten Konjugats bestehend aus *bead*-Zytokin-gelöster Antikörper (Varro et al., 2007). Abbildung 33 zeigt einen *cytometrischen bead array*, bei dem die Unter-

scheidung der verschiedenen Zytokine auf die unterschiedliche Beladungsdichte der *beads* mit jeweils *bead*-spezifischer Sorte von Antikörpern zurückzuführen ist, eine bestimmte Durchflußzytometrisch gemessene Intensität korrespondiert zu einem bestimmten Zytokin.

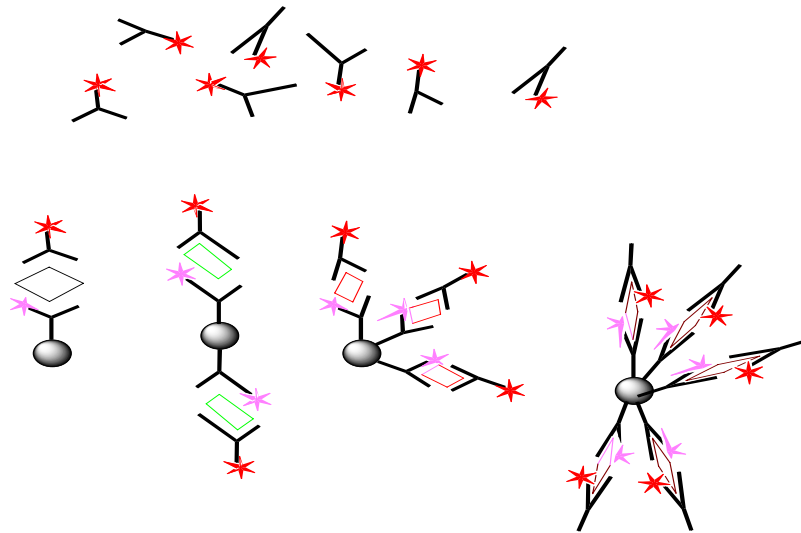


Abb. 33: Bei diesem Beispiel eines *CBA* wird die Unterscheidung verschiedener Zytokine aufgrund von unterschiedlichen Intensitäten der zytometrischen Durchfluß-Signale getroffen, da die *beads* mit einer unterschiedlichen Dichte an unterschiedlichen Antikörpern beladen sind. Die unterschiedlich gefärbten Vierecke stellen verschiedene Zytokine dar, die unterschiedlich geformten „Y“ die Antikörper, die Sternchen stehen für Fluoreszenzfarbstoffe.

Für den *CBA* wurde die von Dr. Uhlmann empfohlene Testsequenz pos gewählt, da sie eine übersichtliche Zusammensetzung mit nur einem CpG-Motiv ansonsten Thyminen enthält. Diese Sequenz sollte ermöglichen, den Einfluß modifizierter Nukleotid-Bausteine (5-Iodo-dC oder 4,6-Difluorbenzimidazol-2'-desoxyribose) auf die molekulare Erkennung (CpG-ODN ↔ TLR9), zu zeigen. Neg sollte keine Immunstimulation bewirken, da angenommen wurde, dass diese CpG-abhängig sei. Somit sollte Neg als eine Negativ-Kontrolle fungieren. Als Null-Wert wurde no ODN gewählt, das kein ODN enthält. Wohl aber wurden alle Aufreinigungsschritte, die für die ODN-Isolierung vorgenommen wurden durchgeführt: Behandlung mit *tert*-Butylamin, Acetonitril; konzentrierte Ammoniak-Lösung; Durchfluß durch die HPLC-Anlage; Essigsäure, wässrige NaCl-Lösung und Ethanol. Dies sollte detektieren, ob sich immunstimulierenden Verunreinigungen während der Aufreinigungspozedur eingeschlichen haben. Da die Immunerkennung im Menschen zwischen Methyl und Wasserstoff an der Position 5 des 2'-Desoxycytidins eines CpG-Motivs differenziert (methyliert → keine Immunantwort, unmethyliert → Immunantwort), sollte getestet werden, ob Raji-Zellen dies auch vermögen und von daher als Testzellen geeignet sind oder nicht. Pos2006 sollte aufgrund seiner drei optimalen CpG-Motive, 2 pynt ttt gt-Motive, seines 5'-(tcg)₂-Ende stärker immunstimulierend sein als pos. Den quantitativen Unterschied zur Immunantwort von pos sollte

erfaßt werden. Zum Erfassen des CpG-Effekts wurden neg2006 und neg herangezogen. Durch die Invertierung des CpG-Dimeres enthalten diese beiden Sequenzen zwar dieselbe Anzahl derselben Nukleotide wie pos2006 bzw. pos, aber kein CpG-Motiv mehr. Die geprüften ODN sind in Tabelle 9 nochmals aufgeführt:

Tab. 9: PS-ODN und Negativkontrolle („no ODN“) für CBA

ODN	Sequenz	mer	Anzahl CpG-Motive	Bemerkungen
pos	tgt cgt ttt ttt ttt ttt tt	20	1	poly T
neg	tgt gct ttt ttt ttt ttt tt	20	0	invertiertes CpG-Dimer
pos2006	tcg tgc ttt tgt cgt ttt gtc gtt	24	3	2 pyn ttt tgt-Motive, 5'-tcg-Ende
neg2006	tgc tgc ttt tgt gct ttt gtg ctt	24	0	invertierte CpG-Dimere
MedC	tgt ^{Me} cgt ttt ttt ttt ttt tt	20	0	an Position 5 des dC methyliert
no ODN		0	0	alle Aufreinigungsschritte in Abwesenheit von einem ODN sind durchgeführt worden

Der Zellüberstand der stimulierten Raji-Zellen wurde auf **IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α , TNF- β , IFN- γ , GM-CSF, G-CSF, MCP-1** anhand eines *cytometrischen bead arrays* geprüft. IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ wären die zu erwarteten TLR9 induzierten Th1-Zytokine, wobei laut Literaturreferenz ca. 10 pg/ml IFN- γ , 20 pg/ml IL-8, 60 pg/ml TNF- α , 455 pg/ml IL-6 und 3500 pg/ml IL-10 erwartet werden (Henault et al., 2005). Zur Terminologie und Wirkung der einzelnen Zytokine sowie welche Zellen die jeweiligen Zytokine produzieren gibt Tabelle 10 Aufschluß.

Tab. 10: Nomenklatur und Wirkung von Zytokinen: A=Astrozyten, DC=dendritische Zellen, En=Endothelzellen, Eo=Eosinophile, Ep=Epithelzellen, Fi=Fibroblasten, Gr=Granulozyten, He=Hepatozyten, Kn= Knochenmarksbindegewebs-Zellen, La=Langerhans-Zellen, Ly=Lymphozyten, Ma=Makrophagen, Mo= Monozyten, Mu=Muskelzellen, Ne=Neutrophile, NK=natürliche Killerzellen, Thy=Thymozyten, fettgedrucktes=die im CBA getesteten Zytokine

Zytokine u. a.	voller Name	Synonym	Wirkung	Vorkommen in Zellen	Lit.
IL-1	Interleukin 1	<i>lymphocyte-activating factor, mono-nuclear cell factor, endogenous pyrogen</i>	Endothel-Zellen-Adhäsionsmoleküle \uparrow , IL-6 \uparrow	Mo, Ma, DC, T, B, NK, Ep, Fi, glatte Mu	Goldby et al. 2003
IL-2	Interleukin 2	<i>T cell growth factor</i>	B-/NK-Zelldifferenzierung+ Wachstum	T-Zellen	Goldby et al. 2003
IL-3	Interleukin 3	<i>multi-colony-stimulating factor, hematopoietic cell growth factor, mast cell growth factor</i>	Lymphozyten-/ hämatopoetisches Zellwachstum, Koloniebildung von Granulozyten/Mastzellen/ Erythrozyten	aktivierte T, Mast, Eo	Goldby et al. 2003

IL-4	Interleukin 4	<i>B cell stimulatory factor 1</i>	Wachstum von B-/T-Zellen, Lymphozyten+Monozyten, Th2-Profil↑, IgE↑ im allerg. Geschehen; beeinflusst Endothelzellen+ Fibroblasten	Mast, T, Kn	Goldby et al. 2003
IL-6	Interleukin 6	<i>B cell stimulatory factor 2, hybridoma/plasmacytoma growth factor, hepatocyte-stimulating factor</i>	B-Zell-Aktivierung/-differenzierung, Antikörpersekretion, Immunglobulin-Klassenwechsel	T, B, Ma, Kn, Fi, En, A	Goldby et al. 2003
IL-7	Interleukin 7	<i>pre-B-cell growth factor, Lymphopoietin-1</i>	Wachstum von T-/B-Vorläuferzellen	Kn, Thy, Milz	Goldby et al. 2003
IL-8	Interleukin 8	<i>neutrophil-attractant/activating protein, neutrophil-activating factor, granulocyte chemotactic protein</i>	Neutrophile anlocken +aktivieren, Basophile anlocken, Indikator für bakterielle Infektion (LPS), beeinflusst die Blutgefäßbildung	Mo, Ly, Gr, Fi, En, He, u. a.	Goldby et al. 2003
IL-10	Interleukin 10	<i>cytokine synthesis inhibitory factor</i>	inhibiert IL-12-/IFN- γ	aktivierten CD8 ⁺ /CD4 ⁺	Goldby et al. 2003
IL-12	Interleukin 12	<i>NK cells stimulatory factor, cytotoxic lymphocyte maturation factor</i>	→Th1-Profil, Th2↓	Ma, DC	Goldby et al. 2003
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α	Cachetin	En-Adhäsionsmoleküle↑, IL-6↑, Ma-Aktiv., in hohen Konz.→ anaphyl. Schock	Mo, Ma, T, Fi	Goldby et al., 2003 ; Lipford et al., 1997
TNF-β	Tumornekrosefaktor- β	Lymphotoxin	Entzündungsbotenstoff, Wundheil., immunstimulierend, Gefäßbild.	B, aktiv. T	Goldby et al. 2003
INF-α	Interferon- α	<i>Leukocyt / fibroblast interferon</i>	induziert Resistenz in Zielzellen gegenüber Virusinfektion, inhib. Zellprolif., reguliert MHC-I-Expression	Ly, Ma	Goldby et al. 2003 ;
IFN-β	Interferon- β	<i>fibroblast interferon</i>	induziert Resistenz in Zielzellen gegenüber Virusinfektion, inhib. Zellprolif., reguliert MHC-I-Expression	Fi, En	Goldby et al. 2003
IFN-γ	Interferon- γ	Immuninterferon, <i>macrophage-activating factor, T cell interferon</i>	→Th1-Profil, Th2↓	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , NK	Goldby et al. 2003
G-CSF	granulocyte colony-		Neutrophilen-Wachstum/-Differenzierung	Kn, Ma	Goldby et al.

	stimulating factor				2003
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor		hämatopoetische Vorläuferzellen-Wachstum↑, Differenzierung↑ von Gr+Mo	T, Ma, Fi, En	Goldby et al. 2003
MCP-1	monocyte chemo-attractant protein-1	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	rekrutiert Mo zum Entzündungsort/Wunde	Osteoblasten	http://www.medterm.com/script/main/art.asp?articlekey=33740
MHC-I	major histocompatibility complex I	humane Lymphozyten-antigen I	Antigenpräsentation gegenüber zytotoxische T-Zellen	alle kernhaltige Zellen+ Thrombozyten	Goldby et al. 2003
CD40	cluster of differentiation 40	Bp50	B-Zellwachstum/-Differenzierung, Ig-Klassenwechsel, Zytokinausschüttung (IL-12↑) in Ma, DC; DC-Adhäsionsmoleküle↑	pro-B/plasma B, Ma, folliculäre DC, En, Keratinozyten	Goldby et al. 2003
CD69	cluster of differentiation 69	<i>activation inducer molecule</i> , EA1, MLR3, gp34/28, <i>very early activation</i>	aktiviert Ly, Mo, Th; Ca ²⁺ -Einfluß↑, Zytokine+ Rezeptoren↑, Protoonkogen-Expression von c-myc/c-fos, NK-vermittelte Zelllyse↑	aktiviert Leukozyten: T, B, NK, Th, Ne, Eo, La	Goldby et al. 2003
CD86	cluster of differentiation 86	B7.2	Haupt-T-Zell-Co-Stimulanz: ww mit CD28 (stimul.) + CTLA4 (inhib.)	DC, Gedächtnis B, Mo	Goldby et al. 2003

Für eine potentielle Anwendung bei allergischen Erkrankungen ist vermutlich eine erhöhte Konzentration vor allem an IL-12 und INF- γ erwünscht, da diese Zytokine die Expression von Th2-Zytokinen, die am allergischen Geschehen beteiligt sind, unterdrücken. Daneben erscheint eine Erhöhung der Konzentration von IL-7, CD40 und CD86 vorteilhaft.

Für eine potentielle Anwendung gegen Krebs könnte eine erhöhte Konzentration an IL-2, INF- α , INF- β , MHC-I und CD69 nützlich sein, da sie NK-Zellen und cytotoxische T-Zellen fördern, die Tumorzellen zerstören.

Für eine potentielle Anwendung gegen Infektionen erscheint eine erhöhte Konzentration an IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, INF- α , INF- β , TNF- α , TNF- β , MCP-1, CD40, CD69,

CD86, G-CSF und GM-CSF sinnvoll zu sein, da sie Lymphozyten u. a. Zellen aktivieren, die infizierten Zellen und den Infekt beseitigen.

Die Synthese der ODN wird in Kapitel 3.4 und 6.3 beschrieben, die Anzucht und Inkubierung der Raji-Zellen mit den ODN in Kapitel (7.1.1), die Durchführung und die Ergebnisse des CBA in Kapitel (7.1.2), die statistische Auswertung in Kapitel (8.1.1). In Abbildung 34 sind die CBA-Ergebnisse graphisch aufgetragen.

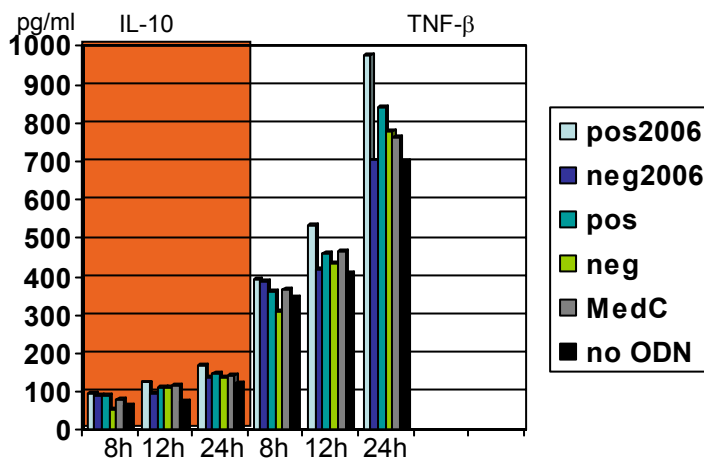


Abb. 34: CBA-Ergebnisse der zwei am stärksten stimulierten Zytokine

Erstaunlicherweise wurde nur für drei Zytokine eine leicht erhöhte Konzentration gefunden, nämlich für IL-10, TNF- α und TNF- β , wobei der Wert für TNF- α vernachlässigbar gering war. Für IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IFN- γ , GM-CSF, G-CSF, MCP-1 betragen die Konzentrationen null. Die erwarteten Zytokinausschüttung wurden nur für IL-10 (und TNF- α) erfüllt, mit jedoch drastisch niedrigeren Werten als in der Literatur beschrieben (Henault et al., 2005). IFN- γ , IL-8 und IL-6 wurden nicht ausgeschüttet.

Überraschenderweise haben auch nicht CpG-haltige-Sequenzen (neg2006, neg und MedC) eine Stimulierung von IL-10 und TNF- β verursacht. Sogar in Abwesenheit eines ODN (no ODN) war eine gewisse Stimulierung zu beobachten (Tabelle 10, Abbildung 36).

In Abbildung 35 wird von jeder Probe der Wert der Negativkontrolle abgezogen, wobei die höchste Stimulierung durch „pos2006 - no ODN“ für TNF- β nach 24 h zu verzeichnen ist, gefolgt von „pos - no ODN“. Jedoch muss betont werden, dass die induzierte Menge (< 300 pg/ml bzw. < 150 pg/ml TNF- β) sehr gering ist, für IL-10 ist sie mit kleiner 50 pg/ml ver-

nachlässigbar gering. Daher werden in den folgenden Betrachtungen IL-10 nicht weiter berücksichtigt.

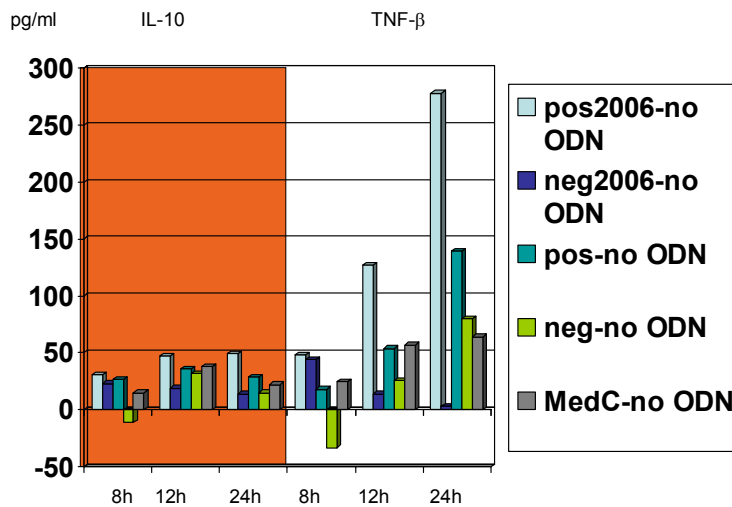


Abb. 35: Die Basisproliferation von IL-10 und TNF- β von Raji-Zellen ist dargestellt, indem die jeweiligen Meßwerte von der Leerprobe abgezogen wurde.

In Abbildung 36 ist der CpG-Effekt in Hellblau bzw. in dunkelblau dargestellt, indem die Differenzen aus den Zytokinkonzentrationen von pos2006 und neg2006 sowie aus denen von pos und neg gebildet wurden.

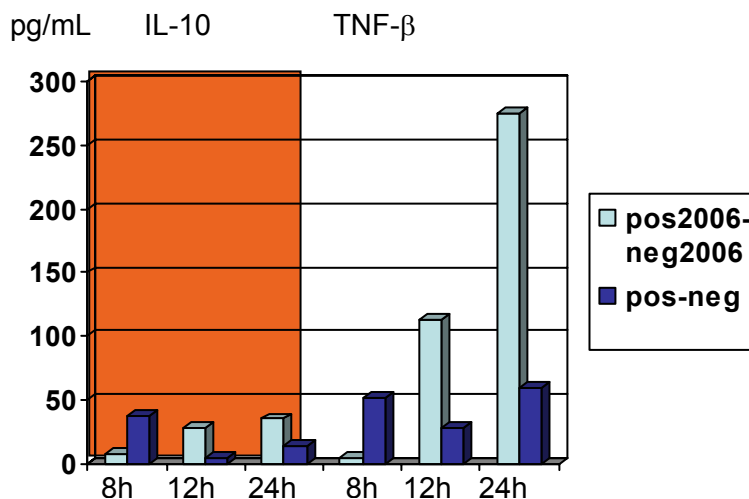


Abb. 36: Der CpG-Effekt soll graphisch ermittelt werden, indem die Werte der jeweiligen CpG-haltigen Sequenzen von ihren jeweiligen GpC-Sequenzen subtrahiert werden. Für IL-10 ist ein CpG-Effekt nicht erkennbar, ebensowenig für die Testsequenz $tgctgt_{15}$ (pos), nur für $tcg\ tcg\ ttt\ tgt\ cgt\ ttt\ gtc\ gtt$ (pos2006) kann bei dieser graphischen Darstellung ein CpG-Effekt gesehen werden.

Während die unterschiedliche IL-10- bzw. TNF- β -Induktion für pos/neg mit ≤ 50 pg/ml zu klein ist, um von einem CpG-Effekt zu sprechen, kann nach 12 h Inkubationsdauer für die

TNF- β -Induktion durch pos2006/neg2006 ein CpG-Effekt beobachtet werden, der jedoch mit ca. 100 (nach 12 h) bzw. 270 pg/ml (nach 24 h) nicht groß ist und dem Unterschied zwischen pos2006 und no ODN entspricht. Daher konnte auch für pos2006 kein CpG-Effekt nachgewiesen werden. Auch die statistische Auswertung (Kapitel 7.1.2, Tabelle 15) zeigt, dass dieser Test nicht in der Lage ist, zwischen der An- und Abwesenheit von ODN zu differenzieren. Die statistische Auswertung (gemittelt über alle drei Inkubationszeiten) suggeriert einen CpG-Effekt für pos, nicht aber für pos2006, während die Graphik eher für pos2006 als für pos einen gewissen CpG-Effekt hineininterpretieren läßt. Auch konnte statistisch für die TNF- β -Expression kein signifikanter Unterschied zwischen der An- und Abwesenheit von ODN nachgewiesen werden.

Als Fazit muss festgehalten werden, dass die verwendeten Raji-Zellen eine zu schwache Immunantwort lieferten, um als Testsystem geeignet zu sein. Denn ihre Immunantwort entspricht nicht dem Zytokinprofil gewöhnlicher gesunder humaner Immunzellen: Die erwarteten Zytokine sind nicht stimuliert worden. Stattdessen wurde eine TNF- β -Induktion gemessen. Die Raji-Zellen vermögen nicht zwischen der An- und Abwesenheit von ODN, zwischen methyliertem und unmethyliertem CpG-Motiv, zwischen einem CpG-Motiv und keinem zu differenzieren. Insgesamt bedeutet das, dass das Testsystem ungeeignet ist.

Möglicherweise waren die Erwartungen falsch, die aufgrund der Literaturwerte von Namalwa-Zellen getroffen worden sind, wobei 2/3 der Zytokinmengen der Namalwa-Zellen für Raji-Zellen angenommen worden sind, da die TLR9-Expression in Raji-Zellen 2/3 der TLR9-Expression in Namalwa-Zellen beträgt. Mögliche Ursachen für das Nichtauftreten des CpG-Effekts können sein, dass unsere Raji-Zellen deutlich weniger TLR9 als angenommen exprimierten oder dass die ODN nicht rein genug waren und dadurch nicht in der berechneten Konzentration, sondern in einer weitaus geringeren Konzentration tatsächlich eingesetzt worden waren, so dass der CpG-Effekt nicht zum Tragen kam. Demzufolge konnte fast nur eine sehr geringe Konzentration an dem Zytokin, das laut Hernault am stärksten induziert wird, IL-10, detektiert werden.

Zur Stimulation von TNF- β kann keine gute Erklärung gefunden werden, da die Literaturreferenz dieses Zytokin nicht untersucht hatte und auch in anderen Literaturstellen TNF- β nicht erwähnt wurde.

Die Schlußfolgerung aus diesem *CBA* ist, dass Raji-Zellen als Testsystem für den Nachweis von Immunstimulation durch CpG-ODN ungeeignet sind.

Aus finanziellen Überlegungen wurde zunächst von der Durchführung weiterer *cytometric bead assays* abgesehen und stattdessen die CpG-ODN inkubierten *hPBMC* auf nur ein Zytokin mit Hilfe eines *ELISA* getestet. Humane *PBMC* reagieren auf Stimulation mit CpG-ODN am stärksten mit IFN- α -Induktion. Daher wurde die IFN- α -Konzentration für den *ELISA* als Meßgröße genommen. Sehr viel geringer dagegen ist ihre IFN- γ - (Vollmer, 2004; Verthelyi, 2001), IL-10-, IFN- γ - oder IL-12-Induktion (Merlo et al, 2007).

3.8 *ELISA*

Der *Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)* ist eine weitverbreitete empfindliche immunologische Methode, um Proteine in Flüssigkeiten nachzuweisen. Sie wurde 1971 von Engvall und Perlman entwickelt (Engvall et al., 1971). Es gibt verschiedene Varianten des *ELISA*, auf die jedoch nicht näher eingegangen werden soll. (Lottspeich & Engels, 2006). Die untere Detektionsgrenze beträgt ca. 1 pg/ml. Der *ELISA* setzt sich aus einem antigenspezifischen monoklonalen Antikörper, einem Chromophore und einem Enzym zusammen. In Anwesenheit des gesuchten Antigens - in unserem Fall handelt es sich um IFN- α - bindet der monoklonale Antikörper an sein Antigen, was eine Farbreaktion ausgelöst. Photometrisch kann die Intensität des Farbstoffs gemessen werden, und mit Hilfe des Lambert Beerschen Gesetzes kann die Konzentration an Antigen berechnet werden. Das Enzym mit seiner katalytischen Wirkung sorgt für eine Verstärkung des Effekts, zwar bindet das Antigen stöchiometrisch an seinen Antikörper, aber das gekoppelte Enzym-Molekül kann viele Substrat-Moleküle umsetzen (Falbe & Regitz, 1998). Wird nur ein antigenspezifischer Antikörper verwendet, spricht man von einem „Immunohistochemischen Tests“, werden zwei oder mehr Antikörper verwendet, was gängiger ist, wird der Test „Sandwich“ oder „kompetitiver *Immunassay*“ genannt (Kingsmore, 2006).

Der in dieser Arbeit verwendete Sandwich-*ELISA* wird in Abbildung 37 dargestellt.

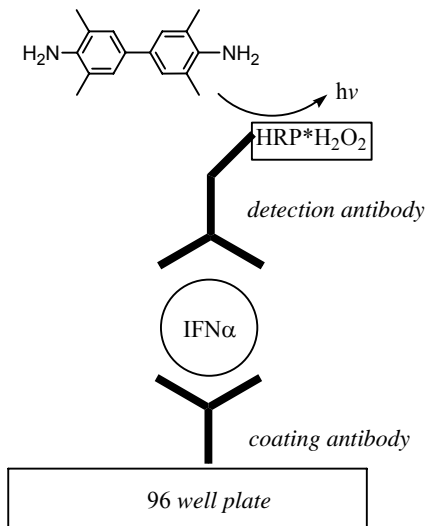


Abb. 37: Aufbau eines Sandwich-*ELISA*

Er enthält einen *coating*-Antikörper, der an eine feste Phase, oft in den Vertiefungen einer 96-well-Platte, gebunden ist. Nach einer Inkubationszeit mit der Antigenlösung wird die Platte gewaschen und ein weiterer Antikörper, der „Detektions“-Antikörper, wird zugegeben, der mit einem Enzym - meistens mit der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* (HRP)) - konjugiert ist. Beide Antikörper komplexieren das Antigen. Durch erneutes Waschen der Platte werden überschüssige Detektions-Antikörper ausgewaschen, anschließend wird das Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, und eine Farbreaktion tritt ein wie in Abbildung 38 beschrieben.

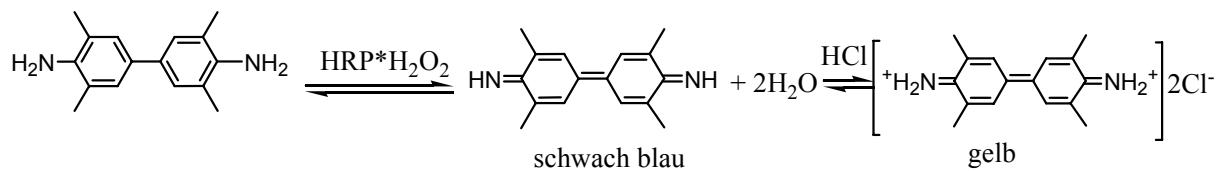


Abb. 38: Farbreaktion von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin mit der Meerrettichperoxidase ($\text{HRP} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$)

Für den $\text{INF-}\alpha$ -*ELISA* wurden *hP BMC* mit folgenden ODN und Positiv- sowie Negativkontrollen inkubiert (Tabelle 11).

Tab. 11: Verwendete ODN und Kontrollsubstanzen für INF- α -ELISA, v=verwendet, PBS=Phosphate Buffered Saline, PIC=Poly(inosin : cytidin), LPS=Lipopolysaccharid, PmB=Polymyxin B, DFI= 4,6-Difluorbenzimidazol, IdC=5-Iodo-2'-desoxycytidin, bought= von der Firma Biospring gekauft, pos2395 war von Dr. Bachmann zur Verfügung gestellt worden

ODN / Kontrollen	Sequenz	mer	CpG-Motive	hybridisierbare Bereiche	1. Vorversuch	2. Vorversuch	Hauptversuch
Negativkontrollen							
PBS					v	v	v
no ODN					v	v	v
Positivkontrollen							
PIC	Poly (inosin : cytidin)				v	v	v
LPS	Lipopolysaccharid				v	v	v
LPS	Lipopolysaccharid				v+PmB		
ODN							
pos	tgt cgt ttt ttt ttt tt	20	1	0	v+PmB	v	v
neg	tgt gct ttt ttt ttt tt	20	0	0	v+PmB	v	v
pos (bought)	tgt cgt ttt ttt ttt tt	20	1	0	v+PmB		
neg (bought)	tgt gct ttt ttt ttt tt	20	0	0	v+PmB		
pos2006	tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt	24	3	0	v+PmB	v	
neg2006	tgc tgc ttt tgt gct ttt gtg ctt	24	0	0	v+PmB	v	
pos2429	tcg tcg ttt tcg gcg g:cc gcc g	22	1	1		v	v
neg2429	tgc tgc ttt tta ata att: att a ta	24	0	1		v	v
pos2216	ggG GGA <u>CGA</u> :T <u>CG</u> T <u>CG</u> ggg gg	20	2 nicht optimale	1		v	v
neg2216	ggG GGA GCA :TGC TCg ggg gG	20	0	1			v
pos2395	tcg tcg ttt tcg gcg c:gc gcc g	22	1	1			
posVerzw.	(ggg gGT <u>CGT I TT</u> TT) ₂ U* AAA AAA <u>CGA</u> Cgg gg	43	2	2			v
negVerzw.	(ggg gGT <u>GCT TTT</u> TT) ₂ U* AAA AAA GCA Cgg gg	43	0	2			v
DFI-T	tgt cgt ttt ttt tt(DFI) tt	20	1	0			v
IdC	tgt (¹ c)gt ttt ttt ttt tt	20	1 modifiziertes	0			v

Die IFN- α -ELISA wurden aus folgenden Gründen durchgeführt:

1. Es sollte ein Testsystem etabliert werden, das aussagekräftige Ergebnisse liefert. Mit Hilfe von *hPBMC* und der IFN- α -Konzentration als Maß für die Immunstimulation eines CpG-ODN sollten verschiedene Inkubationsbedingungen getestet werden. Hierbei ging es nicht darum, den Einfluß verschiedener Donoren, ODN-Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Immunstimulation zu erforschen, sondern um mit größerer Sicherheit aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen.
2. Ziel der IFN- α -ELISA war es, eine Sequenz zu finden, die eine starke IFN- α -Induktion von mindestens 1000 pg/ml bewirkt.
3. Die These, die Anwesenheit eines oder besser mehrerer CpG-Motive sei entscheidend für eine starke Immunstimulierung, sollte geprüft werden, indem CpG-haltige Sequenzen mit ODN derselben Sequenz, dessen CpG-Dimere durch GpC ersetzt wurden, verglichen werden sollten. Auch sollten alle ODN mit den Negativkontrollen „PBS“ und „no ODN“ verglichen werden, die keine ODN enthalten, sondern nur *hPBMC*. Auch sollte sichergestellt werden, dass die gemessene IFN- α -Konzentration durch die Stimulation mit ODN verursacht wurde und nicht durch eine bakterielle Kontamina-

tion der *hPBMC*. Daher wurde im 1. Vorversuch Polymyxin B den ODN zugesetzt, das Lipopolysaccharid, einen Bestandteil von Bakterien, komplexiert.

4. Die These, verzweigte CpG-ODN stimulieren stärker als alle anderen Klassen von CpG-ODN, da sie zwei 5'-CpG-haltige Sequenzen und ein weiteres CpG-Motiv plus hybridisierbare Sequenzen enthalten, sollte überprüft werden.
5. Der Einfluß von modifizierten Bausteinen (IdC und DFI-T) auf die Immunstimulation sollte untersucht werden.
6. Zur Überprüfung der Qualität der eigens synthetisierten ODN wurden „pos“ und „neg“ mit gekauften ODN derselben Sequenzen verglichen.
7. Falls kein ODN eine Immunstimulation bewirken würde, sollten die Positivkontrollen PIC (=TLR3-Ligand) und LPS (=TLR4-Ligand) zeigen, ob das System wenigstens auf andere TLR-Liganden reagiert.
8. Um auszuschließen, dass eine immunstimulierende Verunreinigung während der Aufreinigungsprozesse der ODN aufgetreten ist, wurde „no ODN“ und „PBS“ miteinander verglichen.

Die Durchführung und die Ergebnisse der *ELISA* werden in Kapitel (7.2.2-7.2.4) beschrieben, ihre statistische Auswertung in Kapitel (8.1.2 und 8.1.3).

Bei der Stimulation von *hPBMC* wurde eine IFN- α -Konzentrationen von über 1100 pg/ml für pos2006 (Merlo et al., 2007) und 2300 pg/ml für pos2216 (Gosh et al., 2007) erwartet.

Die Ergebnisse des 1. Vorversuchs für eine Inkubationszeit von 16 h sind in Abbildung 39 und für 24 h in Abbildung 40 dargestellt:

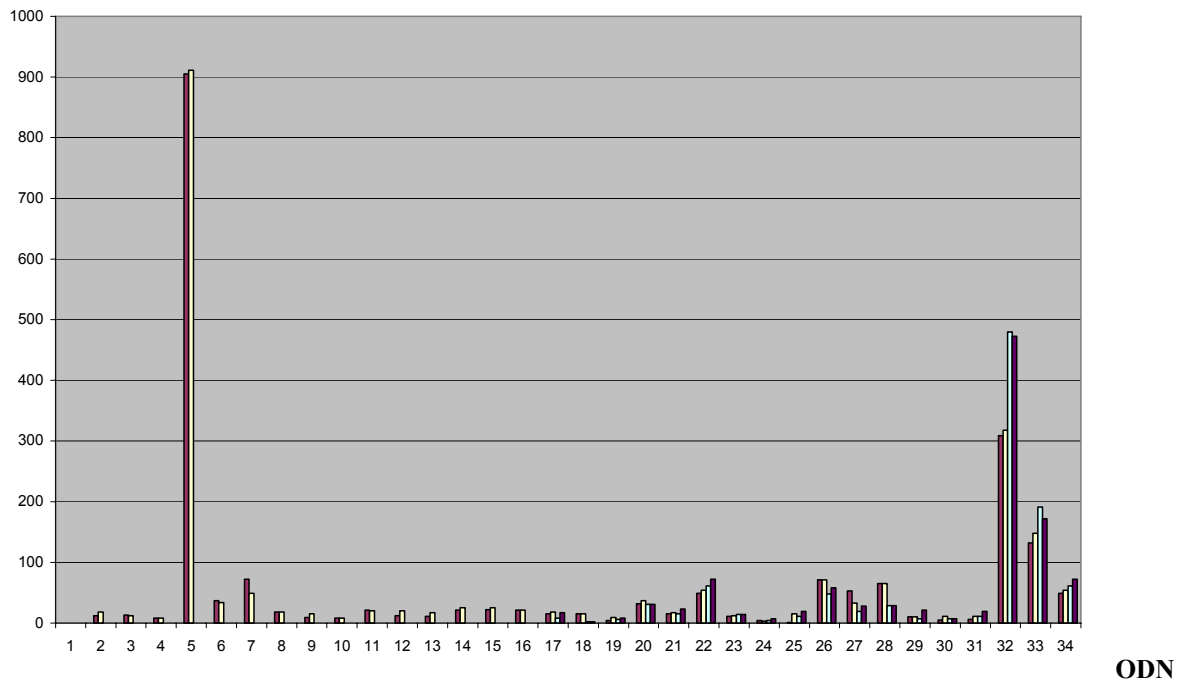
IFN- α -Konzentration [pg/ml]

Abb. 39: 16 h-Werte des 1. Vorversuch; jeweils Werte von 3 Donoren, rot=1. Messung, gelb= Meßwiederholung für 0.5 μ M ODN-Konz.; türkis=1. Messung, blau=Wiederholung für 1.5 μ M ODN-Konz., die Testsubstanzen sind durchnummeriert: 2-4)PBS, 5-7)PIC, 8-10)LPS, 11-13)LPS+PmB, 14-16)no ODN, 17-19)pos, 20-22)pos(bought), 23-25)neg, 26-28)neg(bought), 29-31)pos2006, 32-34)neg2006

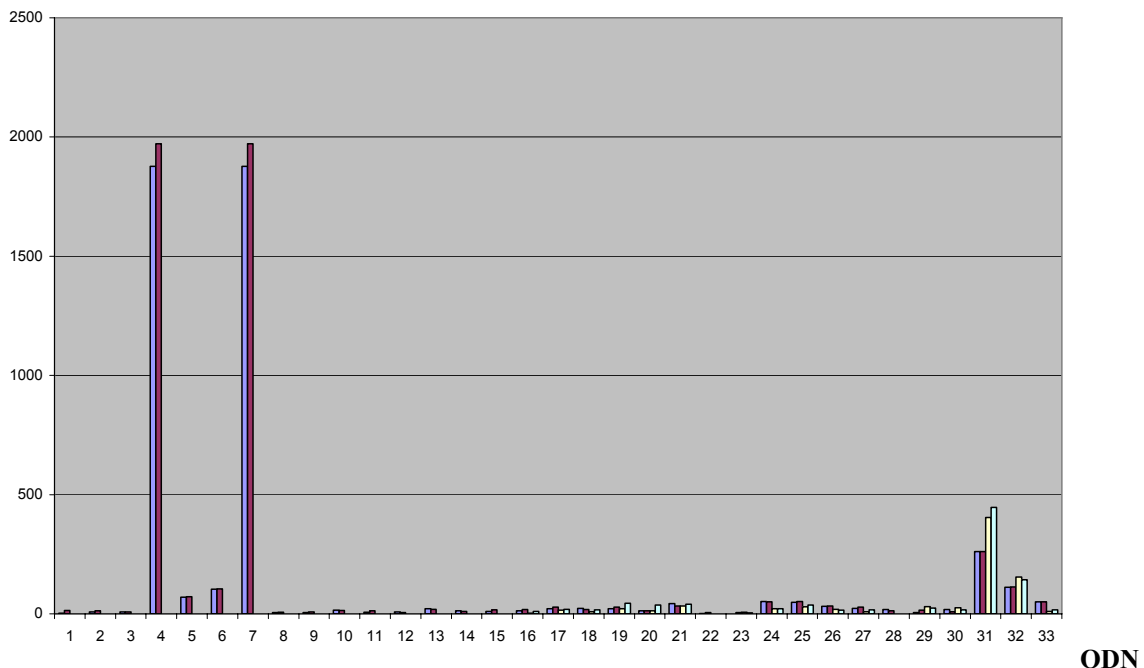
IFN- α -Konzentration [pg/ml]

Abb. 40: 24 h-Werte des 1. Vorversuch; jeweils Werte von 3 Donoren, blau=1. Messung, rot= Wiederholung für ODN-Konz. 0.5 μ M; ist in gelb und türkis abgebildet, gelb=1. Messung, türkis=Wiederholung für Konz. 1.5 μ M; 1-3)PBS, 4-6)PIC, 7-9)LPS, 10-12)LPS+PmB, 13-15)no ODN, 16-18)pos, 19-21)pos(bought), 22-24)neg, 25-27)neg(bought), 28-30)pos2006, 31-33)neg2006

Beim Vergleich beider Graphen (Abbildung 39 und 40) zeigt sich ein ähnliches Bild:

Die Negativkontrollen no ODN und PBS zeigen keine relevante Stimulation, was für das Meßsystem spricht. Donor 1 reagiert nach 24 h mit einer deutlichen IFN- α -Antwort auf die Positivkontrollen PIC und LPS, wobei schon nach 16 h etwa der halbe Wert für PIC erreicht wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zellen zumindestens auf andere TLR-Liganden reagieren. Die zwei anderen Donoren reagieren nur schwach auf PIC und LPS. Diese unterschiedlich starke Immunantwort je nach Donor ist bei primären Zellen ein gewöhnliches Phänomen und läßt sich durch die individuelle Immunkonstitution zur Testzeit erklären.

Zwar ergab eine statistische Auswertung einen signifikanten Unterschied zwischen den CpG-haltigen Sequenzen und den nicht CpG-haltigen ODN, jedoch muß die Größe der Meßwerte berücksichtigt werden: Alle Oligodesoxynukleotide zeigten keine bzw. nur eine geringfügige IFN- α -Induktion von und lagen dramatisch unter dem Erwartungswert von 1000 pg/ml. Anhand dieser Werte lassen sich keine ODN-spezifischen Effekte diskutieren. In einem weiteren Vorversuch sollen stärker immunstimulierende ODN-Sequenzen gefunden werden.

Die Meßergebnisse des 2. Vorversuchs werden für 30 h (Abbildung 41) und für 48 h (Abbildung 42) vorgestellt. Hierbei wurden zusätzlich zu den bereits getesteten Klasse B CpG-ODN pos und pos2006, das Klasse A-CpG-ODN pos2216 und zwei Klasse C CpG-ODN pos2429 und pos2395 auf ihre IFN- α -Stimulierung hin untersucht. Längere Inkubationszeiten als beim 1. Vorversuch wurden gewählt.

Der 2. Vorversuch (Abbildungen 41 und 42) zeigt ebenso wie der 1. Vorversuch, dass die Testsequenzen pos und pos2006 IFN- α nicht nennenswert stimulieren. Die pos2006-Werte stehen in Übereinstimmung mit denen von Jurk et al. gemessenen Konzentration (Jurk et al., 2004), sind aber sehr viel schwächer als die von Merlo et al. beschriebenen (Merlo et al., 2007).

Die Positivkontrolle PIC bewirkt eine deutlich geringere IFN- α -Antwort als im 1. Vorversuch, was auf die Immunverfassung der Donoren zurückzuführen ist. LPS zeigt im 2. Vorversuch keine Stimulation. Alle nicht CpG-haltigen ODN sowie no ODN zeigen keine Stimulierung (neg2006 und neg).

Eine sehr starke IFN- α -Induktion wird durch pos2216 verursacht von > 1000 pg/ml. Dies stimmt mit den Erwartungen überein. Die IFN- α -Stimulation nimmt in folgender Reihe ab: pos2216 > pos2395 > pos2429 > pos2006 > pos. Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur, dass Klasse A CpG-ODN stärker IFN- α -induzieren als Klasse C CpG-ODN und

diese stärker als Klasse B CpG-ODN. Dies kann zum einen auf die Natur des Phosphatrückgrats zurückzuführen sein, da Poly-(3',5'-Di-thiophosphat-2'-desoxyribose) als ein TLR9-Antagonisten und Poly-(2',5'-di-phosphat-2'-desoxyribose) als schwacher TLR9-Agonist eingestuft wurde (s. Kapitel 1.5.2). Zum anderen scheint die Ausbildung von doppelsträngigen Bereichen mit Hilfe der komplementären Sequenzen innerhalb Klasse A und C CpG-ODN die INF- α -Induktion zu erhöhen. Eine weitere Verstärkung der IFN- α -Induktion kann durch Guanosin-Tetradenformation bei Klasse A CpG-ODN erreicht werden. Einerseits verlängert diese Bildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen die Verweildauer im frühen Endosom, andererseits wurde für Klasse A CpG-ODN ein IFN- α -verstärkender Rückkopplungsmechanismus gefunden, dagegen nicht für Klasse B CpG-ODN.

IFN- α -Konzentration [pg /ml]

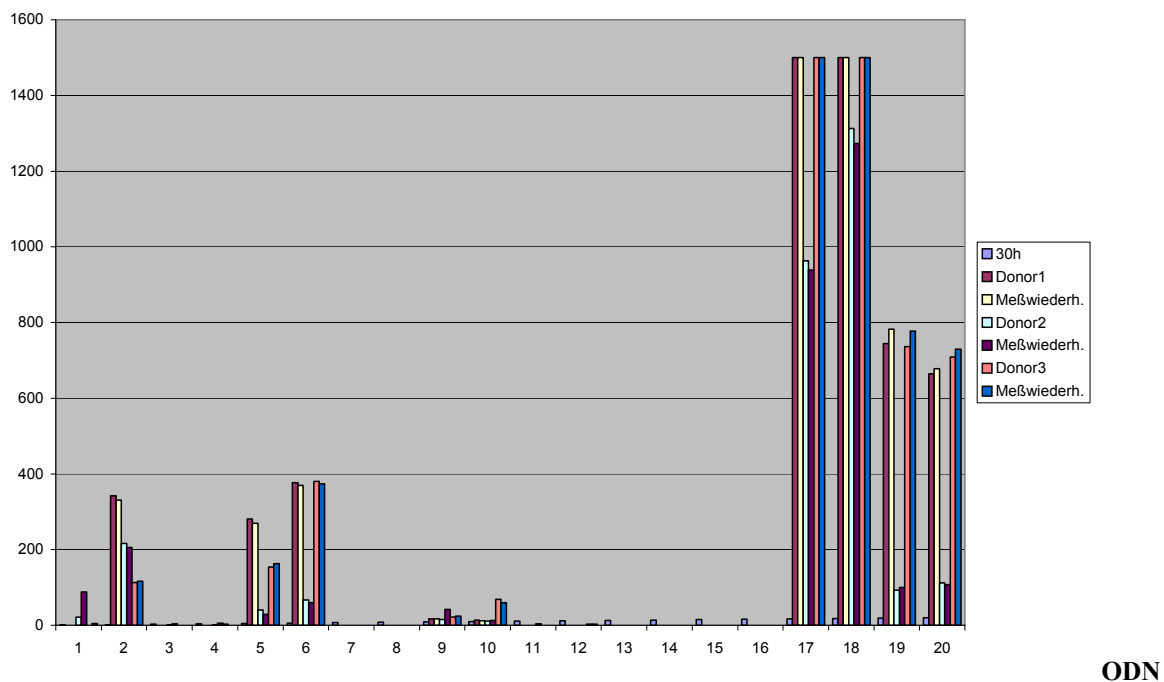


Abb. 41: 2. Vorversuch; jeweils 3 Donoren, 2 Konz. (0.5 μ M und 0.8 μ M), 30 h Inkubationszeit, 2 Meßwerte, die „1500“-Werte sind ungenau, sie lagen oberhalb des Detektionsmaximums, 1)PBS, 2)PIC 2.5 μ g/ml, 3)LPS 10 μ g/ml, 4)no ODN, 5)pos2429 0.5 μ M, 6)pos2429 0.8 μ M, 7)neg2429 0.5 μ M, 8)neg2429 0.8 μ M, 9)pos2006 0.5 μ M, 10)pos2006 0.8 μ M, 11)neg2006 0.5 μ M, 12)neg2006 0.8 μ M, 13)pos 0.5 μ M, 14)pos 0.8 μ M, 15)neg 0.5 μ M, 16)neg 0.8 μ M, 17)pos2216 0.5 μ M, 18)pos2216 0.8 μ M, 19)pos2395 0.5 μ M, 20)pos2395 0.8 μ M

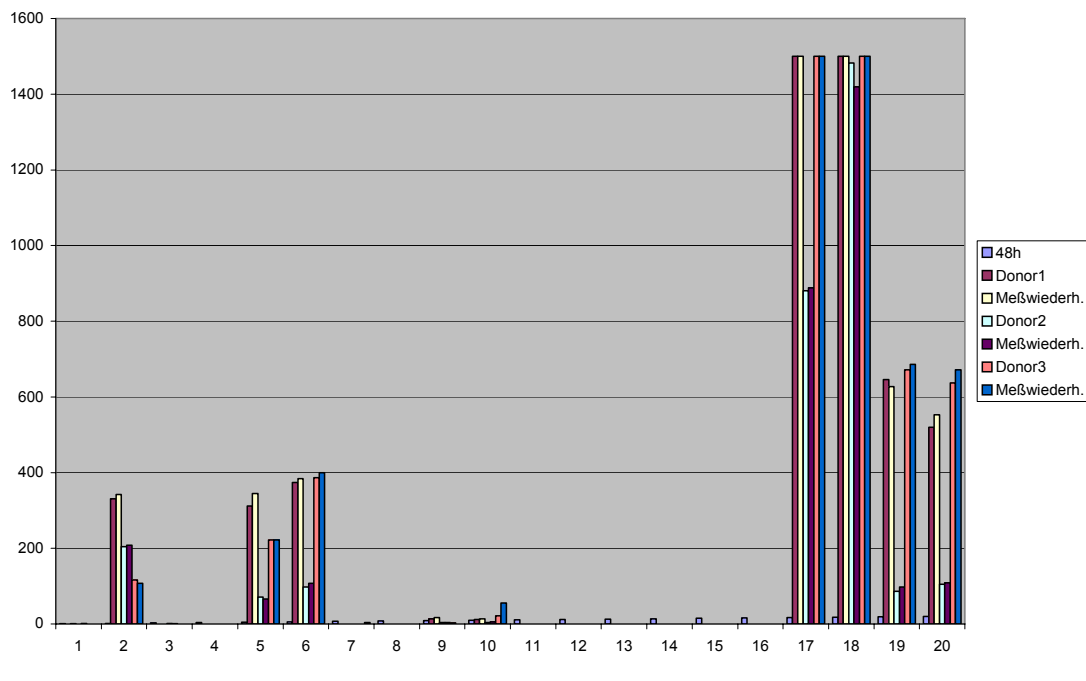
IFN- α -Konzentration [pg /ml]

Abb. 42: 2. Vorversuch; jeweils 3 Donoren, 2 Konz. (0.5 μ M und 0.8 μ M), 48 h Inkubationszeit, 2 Meßwerte, die „1500“-Werte sind ungenau, sie lagen oberhalb des Detektionsmaximums, 1)PBS, 2)PIC 2.5 μ g/ml, 3)LPS 10 μ g/ml, 4)no ODN, 5)pos2429 0.5 μ M, 6)pos2429 0.8 μ M, 7)neg2429 0.5 μ M, 8)neg2429 0.8 μ M, 9)pos2006 0.5 μ M, 10)pos2006 0.8 μ M, 11)neg2006 0.5 μ M, 12)neg2006 0.8 μ M, 13)pos 0.5 μ M, 14)pos 0.8 μ M, 15)neg 0.5 μ M, 16)neg 0.8 μ M, 17)pos2216 0.5 μ M, 18)pos2216 0.8 μ M, 19)pos2395 0.5 μ M, 20)pos2395 0.8 μ M

Stärkste Unterschiede in den IFN- α -Konzentrationen von den Meßparametern ODN, Donoren, ODN-Konzentrationen, Inkubationszeiten und Meßwiederholung liefern die ODN gefolgt von den Donoren. Der Test zeigt ein differenziertes Immunprofil für die unterschiedlichen ODN. Donor 2 reagiert sehr viel schwächer als die anderen beiden Donoren, vor allem auf Klasse C CpG-ODN. Die ODN-Konzentration von 0.8 μ M zeigt für pos2429 und pos2216 eine etwas stärkere Antwort als die von 0.5 μ M, für pos2395 dagegen verhält es sich andersherum. Die Inkubationszeit von 30 h bewirkt leicht höhere Werte als für 48 h, für pos2429 dagegen niedrigere. Die Meßwiederholung hat so gut wie keinen Einfluß auf die IFN- α -Konzentration.

Für den Hauptversuch wurden folgende Oligodesoxynukleotide ausgewählt:

Pos2216 (ggG GGA CGA: TCG TCG ggg gg) wurde verwendet, da es sich beim 2. Vorversuch als das am stärksten stimulierende ODN erwiesen hat. Neg2216 (ggG GGA GCA: TGC TCg ggg gG) enthält diesselbe Sequenz wie Pos2216 nur mit jeweils invertierten CpG-Dimeren, ob das dadurch entfernte CpG-Motiv genügt, um die Stimulation zu unterdrücken, sollte geprüft werden. Als verzweigtes CpG-ODN (posVerzw.) wurde die Sequenz

[5'-ggg gGT CGT TTT TT]₂(U^{hexinether}) AAA AAA CGA Cgg gg-3' gewählt, da sie einem Klasse A CpG-ODN ähnelt: Es enthält hybridisierbare Bereiche, die unterstrichenen, dabei können zwei „5'-Arme“ mit dem „3'-Arm“ hybridisieren. Auch besitzt posVerzw. zwei optimale CpG-Motive (unterstrichen), die von vier Thymidinen von der Verzweigungsstelle entfernt sind, ein Phosphat-Rückgrat (Großbuchstaben) mit zwei PO-CpG-Motiven und drei poly-G-(PS)-Enden (Kleinbuchstaben). Sein nicht-CpG-haltiges Pendant, nämlich negVerzw. ([5'-ggg gGT GCT TTT TT]₂(U^{hexinether}) AAA AAA GCA Cgg gg-3'), enthält ebenfalls dieselbe Sequenz nur anstelle der CpG-Dimere stehen GpC-Dimere. Möglicherweise sind die hybridisierbaren Bereiche unabhängig vom CpG-Motiv immunstimulierend, das sollte hiermit herausgefunden werden.

Desweiteren wurden erneut pos2429 (tcg tcg ttt tcg gcg g:cc gcc g) als Vertreter der Klasse C und seine nicht CpG-haltige GpC-haltige Sequenzen neg2429 (tgc tgc ttt tta ata a:t tat ta) mitvermessen, um sie mit dem verzweigten ODN vergleichen zu können. Neg2429 enthält anstelle des cg-reichen Palindroms (fettgedruckt) für c das andere Pyrimidin (t) und für g das andere Purin (a). Grund für den Einsatz des ta-reichen Palindroms für neg2429 ist, dass immunmodulierende Effekte, die auf cg-Dimere zurückgehen, ausgeschlossen werden sollten. Die beiden synthetisierten modifizierten ODN DFI-T und IdC wurden mitvermessen, obwohl keine starke IFN- α -Induktion erwartet wurde, da sich ihre Testsequenz pos mittlerweile als ungeeignet herausgestellt hat. Trotzdem mußten pos und neg als Vergleich zu den modifizierten Oligodesoxynukleotiden mit aufgeführt werden. Da der Versuchsaufbau nur eine gleichzeitige Vermessung von 20 Substanzen zuließ, konnten weitere ODN oder z. B. pos2216 mit einer zweiten Konzentration nicht mit vermessen werden.

Es wurden ähnliche Inkubationszeiten und ODN-Konzentrationen für den Hauptversuch wie bei den Vorversuchen gewählt (1. Vorversuch: 16 h, 24 h, 0.5 μ M, 1.5 μ M;
2. Vorversuch: 30 h, 48 h, 0.5 μ M, 0.8 μ M; Hauptversuch: 24 h, 48 h, 0.5 μ M und 1.5 μ M).

Die Ergebnisse des Hauptversuchs sind in Abbildungen 45-48 aufgeführt, hiebei werden die Ergebnisse nach 24 h Inkubationszeit (Abbildung 43), nach 48 h (Abbildung 44), alle Werte mit der ODN-Konzentration von 0.5 μ M (Abbildung 45), alle Werte für Donor 1, 2 und 3 (Abbildung 46).

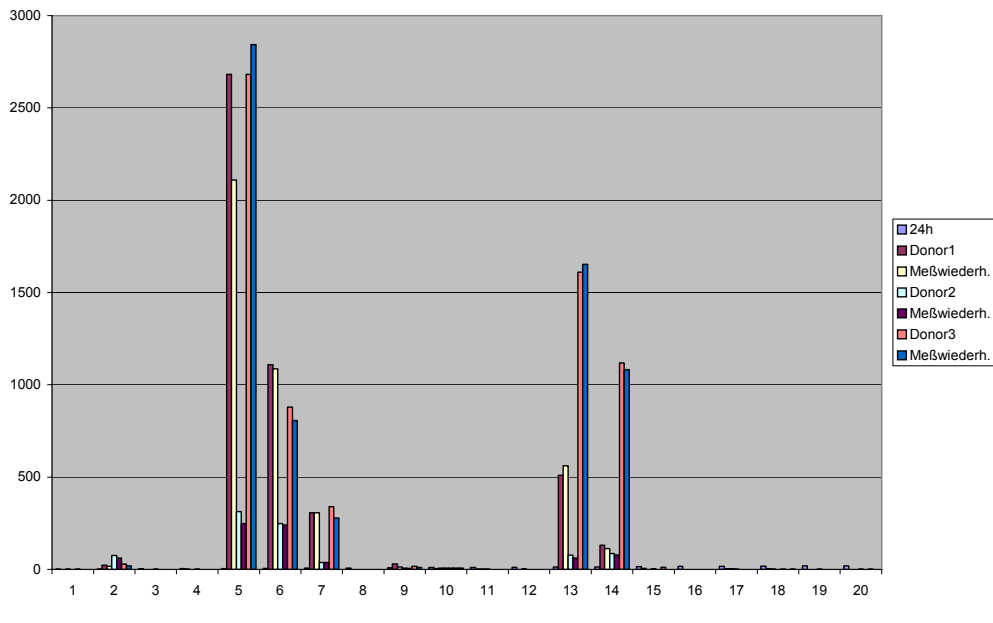
[pg/ml] IFN- α -Konzentration

Abb. 43: Ergebnisse des Hauptversuchs nach 24 h, 3 Donoren, PBS=*hPBMC* in *phosphate buffered saline*; PIC=Poly(Inosin:Cytosin), LPS=Lipopolysaccharid; no ODN=alle Aufreinigungsschritte wurden in Abwesenheit eines ODN durchgeführt; pos=*tgctgt₁₅*; neg=*tgctgt₁₅*; IdC=*tgt(^{5-Iod}c)gt₁₅*; DFI-T=*tgt cgt tt₁₀(4,6-Difluorbenzimidazol-2'-desoxyribosyl) tt*; pos2216=*ggG GGA CGA: TCG TCG ggg gg*; neg2216=*ggG GGA GCA: TGC TGC ggg gg*; pos2429=*tcg tcg ttt tcg gcg g:cc gcc g*; neg2429=*tgc tgc ttt tta ata att att a*; posVerzw.=*(g₄GT CGT TT₄)₂(U^{hexinether})₂A₄AA CGA Cg₄*; negVerzw.=*(g₄GT GCT TT₄)₂(U^{hexinether})₂A₄AA GCA Cg₄*, 1)PBS, 2)PIC 2.5 μ g/ml, 3)LPS 10 μ g/ml, 4)no ODN, 5)pos2216 0.5 μ M, 6)neg2216 0.5 μ M, 7)pos2429 0.5 μ M, 8)neg2429 0.5 μ M, 9)DFI-T 0.5 μ M, 10)DFI-T 1.5 μ M, 11)IdC 0.5 μ M, 12)IdC 1.5 μ M, 13)posVerzw. 0.5 μ M, 14)posVerzw. 1.5 μ M, 15)negVerzw. 0.5 μ M, 16)negVerzw. 1.5 μ M, 17)pos 0.5 μ M, 18)pos 1.5 μ M, 19)neg 0.5 μ M, 20)neg 1.5 μ M

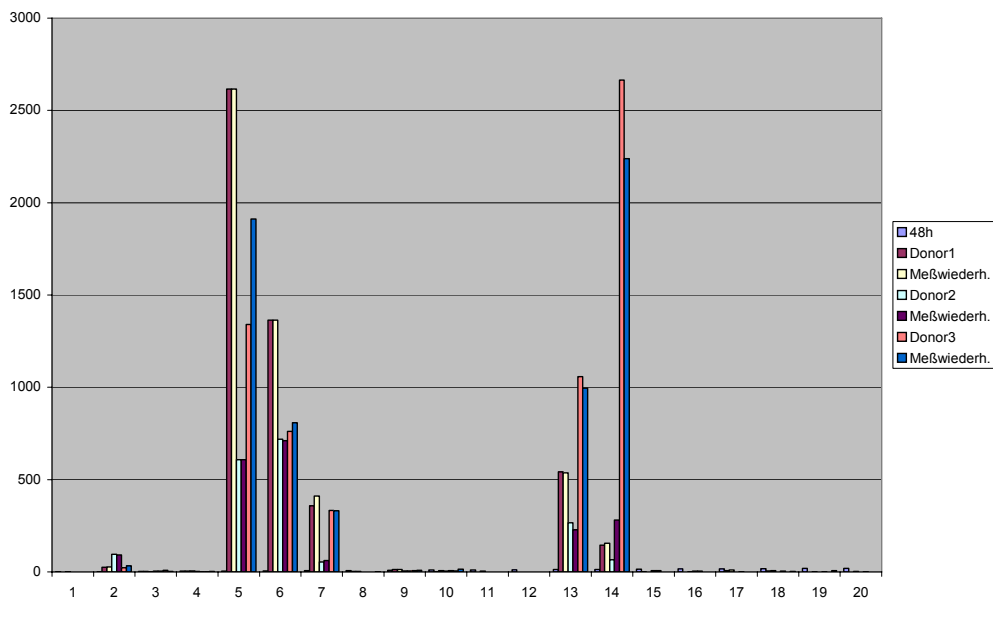
[pg/ml] IFN- α -Konzentration

Abb. 44: Ergebnisse des Hauptversuchs nach 48 h, 3 Donoren, 1)PBS, 2)PIC 2.5 μ g/ml, 3)LPS 10 μ g/ml, 4)no ODN, 5)pos2216 0.5 μ M, 6)neg2216 0.5 μ M, 7)pos2429 0.5 μ M, 8)neg2429 0.5 μ M, 9)DFI-T 0.5 μ M, 10)DFI-T 1.5 μ M, 11)IdC 0.5 μ M, 12)IdC 1.5 μ M, 13)posVerzw. 0.5 μ M, 14)posVerzw. 1.5 μ M, 15)negVerzw. 0.5 μ M, 16)negVerzw. 1.5 μ M, 17)pos 0.5 μ M, 18)pos 1.5 μ M, 19)neg 0.5 μ M, 20)neg 1.5 μ M

Die starke IFN- α -Induktion von pos2216 hat sich im Hauptversuch als reproduzierbar erwiesen (Abbildung 45 und 46). Ausgedehntere Verdünnungsreihen als die bei den Vorversuchen verwendeten ermöglichten nun eine genaue Quantifizierung von über 2500 pg/ml für pos2216. Dieselbe Größenordnung konnte mit posVerzw. von Donor 3 nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden und einer ODN-Konzentration von 1.5 μ M erreicht werden. Für alle anderen Versuchsbedingungen und ODN waren die IFN- α -Werte deutlich kleiner.

Die Positivkontrollen LPS zeigt wiederum keine Stimulation, PIC erneut eine, die aber im Vergleich zu den Klasse A, C und den verzweigten ODN sehr schwach ist. Die Negativkontrollen no ODN und PBS sind - wie erwartet - nicht IFN- α -induzierend.

Von den Testparametern (ODN, Donoren, Inkubationszeit, Konzentration und Meßwiederholung) variieren wiederum die Ergebnisse der verschiedenen ODN am stärksten gefolgt von denen der Donoren. Die Immunantworten der unterschiedlichen ODN lassen sich klar voneinander differenzieren. Die individuelle Immunantwort der Donoren variiert bis zu 2000 pg/ml (Abbildung 46). Mit längerer Inkubationszeit (48 h) konnten bei den meisten ODN stärkere IFN- α -Antworten erhalten werden, mit drei Ausnahmen: Donor 3 induziert nach 24 h fast doppelt soviel pos2216 als nach 48 h, etwa 1/3 mal mehr für posVerzw. bei einer ODN-Konzentration von 0.5 μ M und geringfügig mehr für neg2216. Bei den zwei Konzentrationen läßt sich kein klarer Trend ableiten, da zu wenige ODN mit beiden Konzentrationen eingesetzt werden konnten. Die Meßwiederholung zeigt bei den großen Werten manchmal eine starke Abweichung vom 1. Meßergebnis von bis zu 500 pg/ml, bei kleinen Werten < 1000 pg/ml dagegen wird die Abweichung verschwindend gering.

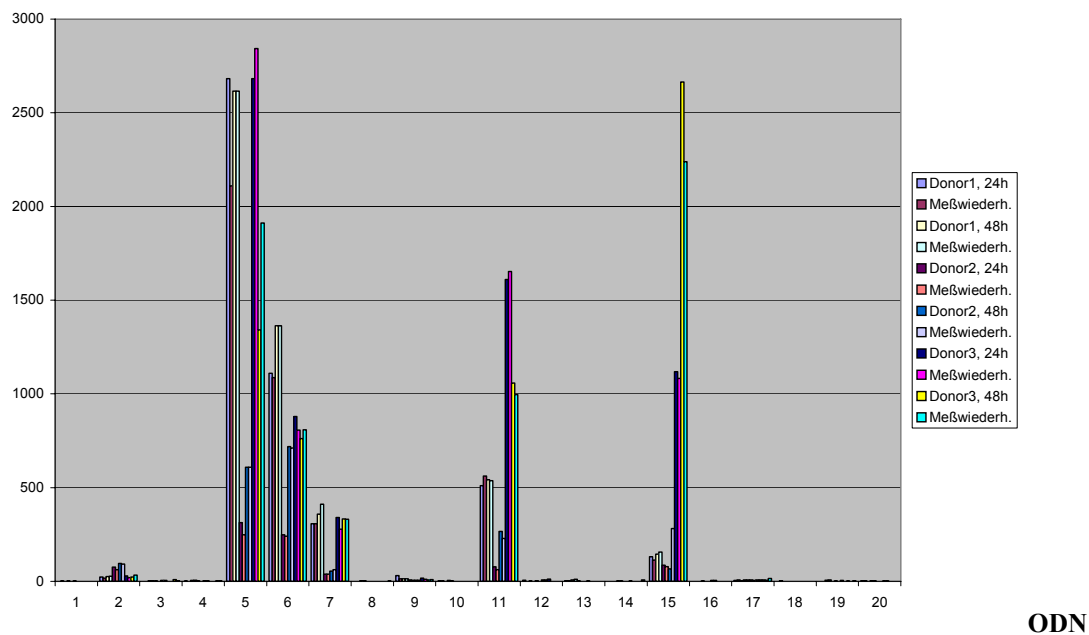
pg/ml] IFN- α -Konzentration

Abb. 45: Ergebnisse des Hauptversuchs; ODN-Konzentration=0.5 μ M, Inkubationszeiten=24h und 48h, 1)PBS, 2)PIC, 3)LPS, 4)no ODN, 5)pos2216 0.5 μ M, 6)neg2216 0.5 μ M, 7)pos2429 0.5 μ M, 8)neg2429 0.5 μ M, 9)DFI-T 0.5 μ M, 10)IdC 0.5 μ M, 11)posVerzw. 0.5 μ M, 12)negVerzw. 0.5 μ M, 13)pos 0.5 μ M, 14)neg 0.5 μ M, 15)posVerzw. 1.5 μ M, 16)negVerzw. 1.5 μ M, 17)DFI-T 1.5 μ M, 18)IdC 1.5 μ M, 19)pos 1.5 μ M, 20)neg 1.5 μ M

Dass das verzweigte CpG-ODN stark stimuliert (Abbildung 45), ist plausibel, da es wie ein Immunomer zwei optimale CpG-Motive enthält und einen zusätzlichen Strang besitzt, der für die Hybridisierung zur Verfügung steht. Auch sollte sein Klasse A-ähnlicher Aufbau für eine starke IFN- α -Induktion beitragen. Dagegen überrascht es, dass das verzweigte CpG-ODN schlechter IFN- α induziert als das Klasse A-CpG-ODN pos2216, da pos2216 nicht einmal ein optimales CpG-Motiv besitzt, posVerzw. dagegen sogar zwei.

Ebenfalls ist erstaunlich, dass neg2216 ebenfalls als starker IFN- α -Stimulator fungiert. Im Vergleich von neg2216 und posVerzw. bei einer Konzentration von 0.5 μ M, verursacht neg2216 die größeren IFN- α -Werte. Daraus kann geschlußfolgert werden, dass die Anwesenheit eines optimalen CpG-Motivs nicht essentiell für die Immunstimulation ist. Beim negVerzw. dagegen konnte trotz ähnlichen strukturellen Aufbaus wie „neg2216“, nämlich Vorhandenseins eines Palindroms sowie Poly-G-Enden mit gleicher Anzahl von Guanosinen, keine nennenswerte IFN- α -Konzentration gemessen werden. Möglicherweise findet bei „neg2216“ und „pos2216“ auch eine Immunerkennung am *hairpin* des Palindroms statt, eine solche wäre beim Verzweigten eine andere, da am *hairpin* des Palindroms noch ein dritter ODN-Strang bei „negVerzw.“ und „posVerzw.“ sitzt. Auch kann spekuliert werden, wieviele TLR9-Moleküle an die jeweiligen ODN binden, und an welches ODN sie besser binden

könnten unter Berücksichtigung der Sterik und attraktiven Wechselwirkungen mit CpG-Motiven. Auch hierfür sind weitere Struktur-Wirkungs-Untersuchungen notwendig.

Da jedoch pos2216 höhere Werte als neg2216 liefert, posVerzw. höhere als negVerzw. und pos2429 höhere als neg2429, ist klar ein Beitrag des CpG-Motivs zur Gesamtstimulierung zu erkennen.

Die modifizierten ODN, IdC und DFI-T zeigen, ebensowenig wie pos, keine IFN- α -Stimulierung. Da es sich zeitlich erst dann herausgestellt hatte, dass die Testsequenz pos nicht stimulierend ist, als IdC und DFI-T schon synthetisiert waren, wurde dieser nicht vielversprechende Test trotzdem durchgeführt. Mit einer nicht stimulierenden Testsequenz als Basis für die Modifikationen können keine sinnvollen Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungs-Beziehungen getroffen werden. Da pos2216 ebenfalls 20 Nukleotide lang und pos2429 mit 22 Nukleotiden ähnlich lang ist, kann die fehlende IFN- α -Induktion von pos und deren Derivate nicht an der Länge der ODN liegen. Längere ODN, wie posVerzw. mit 43 Nukleotiden (14+14+15) werden auch vom TLR9 toleriert. Anscheinend genügt für eine IFN- α -Stimulation nicht das Vorhandensein eines optimalen CpG-Dimeres. Ein chimäres Rückgrat mit einem PO-CpG-Motiv – nicht unbedingt ist ein optimales CpG-Motiv nötig - sowie die Möglichkeit zu hybridisieren, scheint essentiell für eine IFN- α -Induktion zu sein.

Die individuellen Immunprofile der drei Donoren werden in Abbildung 48 gegenübergestellt. Donor 1 ist oben abgebildet, Donor 2 in der Mitte und Donor 3 unten. Wiederum sind auf der x-Achse die unterschiedlichen ODN in derselben Reihenfolge wie in der vorhergehenden Abbildung angeordnet. Auf der y-Achse sind die mit dem IFN- α -ELISA gemessenen INF- α -Konzentrationen in pg/ml aufgetragen. Man beachte die unterschiedlichen Skalen: Während die Größenordnung der IFN- α -Konzentrationen für Donor 1 und 3 mit Werten bis >2500 pg/ml ähnlich hoch liegen, ist der maximale Meßwert von Donor 2 nur knapp über 700 pg/ml.

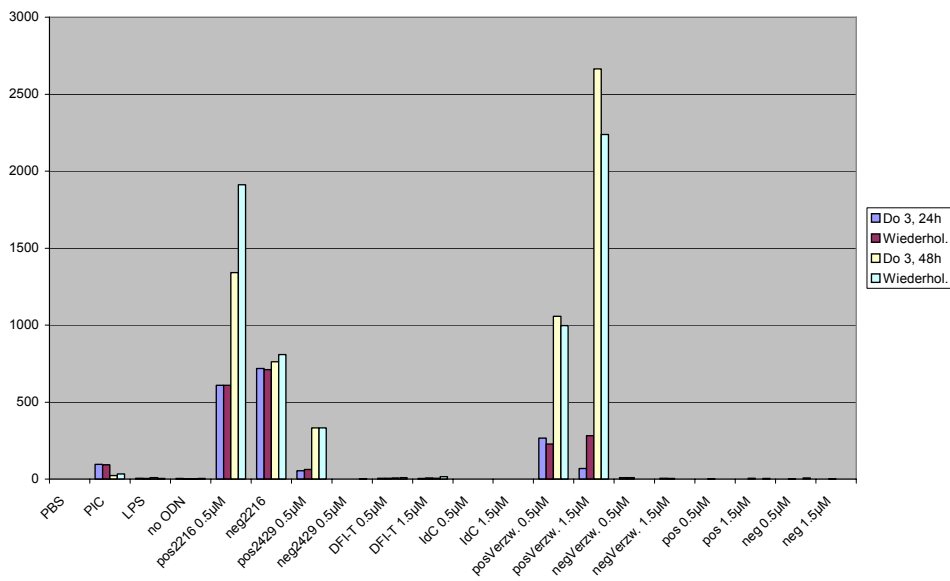
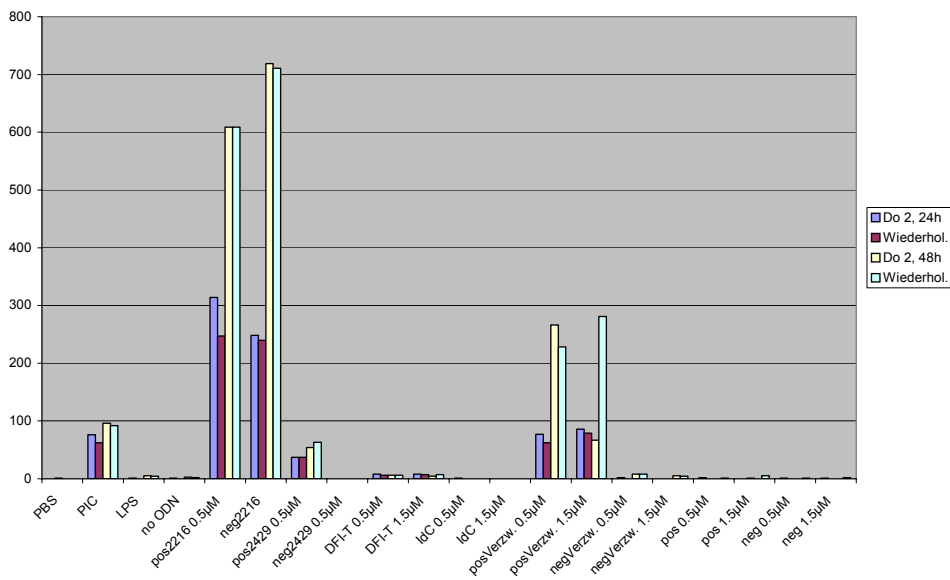
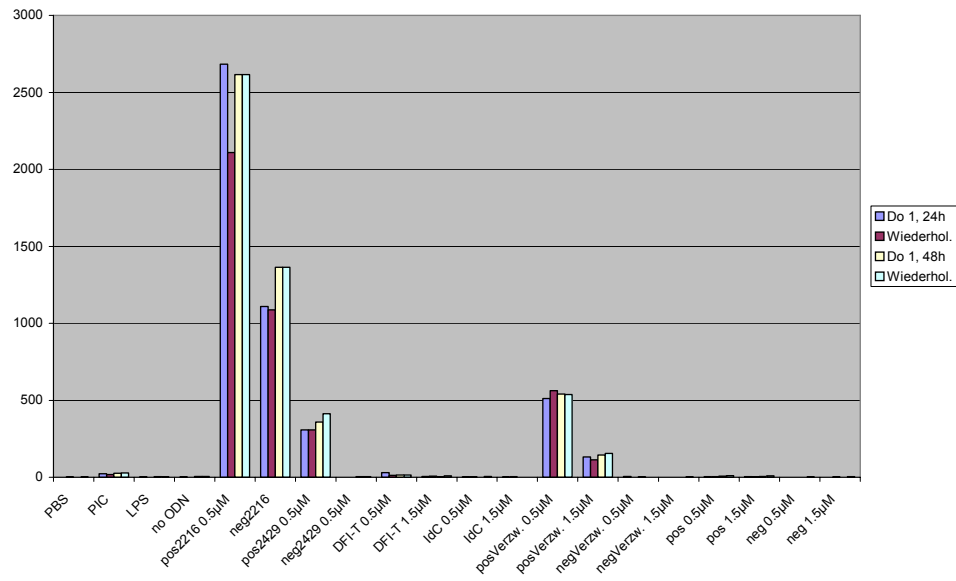


Abb. 46: Hauptversuch, Gegenüberstellung der Immunantworten der drei Donoren; ODN/IFN-α [pg/ml]

Die Reihenfolge des Stimulationsgrads ist Donor-abhängig:

Donor 1: pos2216 > neg2216 > posVerz. (0.5 µM) > pos2429 > posVerz. (1.5 µM) [24/48 h]

Donor 2: pos2216 > neg2216 > posVerz. (1.5 µM) > posVerz. (0.5 µM) ~ PIC > pos2429 [24 h]

neg2216 > pos2216 > posVerz. (0.5 µM) > posVerz. (1.5 µM) > pos2429 [48h]

Donor 3: pos2216 > posVerz. (0.5 µM) > posVerz. (1.5 µM) > neg2216 > pos2429 [24 h]

posVerz. (1.5 µM) > pos2216 > posVerz. (0.5 µM) > neg2216 > pos2429 [48 h]

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des 2. Vorversuchs und des Hauptversuchs konnte bis auf die erwähnte Ausnahme bei allen Donoren folgender Reihenfolge der Stärke der IFN- α -Induktion festgestellt werden:

Klasse A- > Verzweigte- > Klasse C- >> Klasse B-CpG-ODN.

Die oben getroffenen Aussagen wurden mit der Varianzanalyse in Form von Paarvergleichen überprüft und bestätigt. Tabelle 12 zeigt die Zusammenfassung (s. a. Kapitel 8.1.3).

Tab. 12: Übersicht aller Ergebnisse der Paarvergleiche des Hauptversuchs und ihre Auswertung
 pos2216=ggG GGA CGA: TCG TCG ggg gg, neg2216=ggG GGA GCA TGC TCg ggg gG,
 posVerzw.=(ggg gGT CGT TTT TT)₂(U^{hexinether}) AAA AAA CGA Cgg gg,
 negVerzw.=(ggg gGT GCT TTT TT)₂(U^{hexinether})- AAA AAA GCA Cgg gg ,
 no ODN=alle Aufreinigungsschritte in Abwesenheit eines ODN, IdC=tgt (¹c)gt ttt ttt ttt ttt tt mit
¹c=5-Iodo-2'-desoxycytidin, DFI-T=tgt cgt ttt ttt ttt tt(DFI) tt mit DFI=4,6-Difluorbenzimidazol-2'-desoxy-
 ribose. P=Irrtumswahrscheinlichkeit, F-Wert=Prüfgröße der Fischer-Verteilung, krit. F-Wert=ein Tabellenwert, der die Anzahl der Freiheitsgrade des betrachteten Parameters bei einem tolerierten Fehler von 5% berücksichtigt. Ist der Prüfwert F > der kritische F-Wert und ist der Prüfwert P < 5%, so kann mit 95%iger Sicherheit die Nullhypothese widerlegt werden, die besagt, die betrachteten ODN entstammten einer Gesamtheit.

Paarvergleiche	Prüfwert F	Prüfwert P [%]	krit. F-Wert	signifikanter Unterschied
pos2216/neg2216	158,60	0,00	4,75	ja
pos2429/neg2429	1192,70	0,00	4,75	ja
w., nur 1 Konz.	6363,80	0,00	4,75	ja
posVerzw./negVerz	1102,80	0,00	4,26	ja
pos/neg	23,80	0,01	4,26	ja
pos2216/no ODN	631,40	0,00	4,75	ja
neg2216/no ODN	13005,54	0,00	4,75	ja
pos2429/no ODN	1172,06	0,00	4,26	ja
neg2429/no ODN	15,36	0,20	4,75	ja
DFI-T/no ODN	40,95	0,00	4,75	ja
IdC/no ODN	5,76	3,35	4,26	ja
posVerzw./no ODN	6528,98	0,00	4,75	ja
negVerzw./no ODN	1,19	29,67	4,75	nein
pos/no ODN	0,62	44,80	4,26	nein
neg/no ODN	32,82	0,01	4,75	ja

Zusammenfassung

CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) sind von medizinischem Interesse aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung, die durch chemische Wechselwirkungen zwischen dem *Toll-like*-Rezeptor 9 und dem CpG-Oligodesoxynukleotid ausgelöst wird. Um die molekulare Grundlage dieser DNA-Protein-Erkennung näher zu erforschen und um neue modifizierte CpG-Oligodesoxynukleotide mit einem verbessertem Wirkungsprofil für medizinische Anwendungen zu synthetisieren, wurde diese Arbeit angefertigt.

Untersucht wurde, welche Synthesestrategie eine effiziente Syntheseroute zur Modifizierung von CpG-Oligodesoxynukleotiden ermöglicht. Als prinzipiell interessante Modifikationen wurden solche gewählt, die dem CpG-ODN-Liganden, *Toll-like*-Rezeptor 9, zusätzliche Wechselwirkungen eröffnen, wie die H-Brückenwechselwirkungen durch OH, NH₂, NO₂ oder π -Stacking-Wechselwirkungen, wie durch z. B. Phenyl oder Pyren.

Zunächst wurde in Erwägung gezogen, die bislang in der Literatur nicht für CpG-ODN untersuchte Position 6 von Cytidin mit OH oder NH₂ modifizieren. Hierfür wurde die allgemeine Synthesestrategie verwendet, bei der die Cytosin-Derivate stereoselektiv durch Vorbrücken-Glykosylierung mit peracetylierter Ribose zum Nukleosid umgesetzt werden. Anschließend erfolgte die Deacetylierung, die regiospezifische Einführung der Tetra-(*iso*-propyl)-disiloxan-Schutzgruppe an der 3',5'-Position. Danach sollte die 2'-OH-Funktion mit Thiophenylchlorid verestert und nach Barton McCombie desoxygeniert werden. Nach Dimethoxytriphenylmethylierung an der 5'-OH-Funktion sollte die Umsetzung zum Phosphoramidit erfolgen.

Hierfür wurde 6-Aminocytosin ausgehend von Thioharnstoff in drei Synthese-Schritten synthetisiert und das käufliche 6-Oxocytosin eingesetzt. Da es sich bei der Vorbrücken-Glykosylierung um eine hochsensible Reaktion handelt, wurden nur sehr geringe Ausbeuten erhalten, des weiteren war die Einführung der Phenoxythiocarbonylfunktion nicht gelungen. Daher wurde diese Synthesestrategie verworfen.

Als Alternative wurde eine kürzere Syntheseroute gewählt, die den Schritt der Einführung der Phenoxythiocarbonylfunktion mit anschließender 2'-Desoxygenierung einspart, jedoch einen stereounselektiven Glykosylierungsschritt enthält. Auch dieser Glykosylierungsschritt erwies sich als ineffizient: Nachdem 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose als Anomerengemisch in Ausbeuten von 56% über zwei Reaktionsschritten synthetisiert wurde, erfolgte die Glykosylierung nur in kleinen Ausbeuten. Zusätzlich mussten das α - vom β -Isomer getrennt werden. Möglicherweise erschwert ein Substituent in der 6-Position sterisch die Glykosylierung.

rung. Deshalb wurde auch mit 5-Nitrocytosin eine Glykosilierung versucht, die aber ähnliche Ausbeuten lieferten wie die in Position 6 modifizierten Cytosine.

Als effiziente Syntheseroute dagegen hatte sich die Derivatisierung von 2'-Desoxycytidin erwiesen, die die Iodierung an der Position 5 als Schlüsselschritt enthält. Unabhängig von den verwendeten 3',5'-Schutzgruppen - *tert*-Butyldimethylsilyl oder Acetyl - wurden gute Ausbeuten von ca. 80% im Iodierungsschritt erzielt. Ebenfalls gute bis sehr gute Ausbeuten wurden beim Einführen der Acetyl- und Dimethylformamidin-Schutzgruppe erreicht (82% bzw. 86%). Nach weiteren Umsetzungen wurde 4-*N*-Dimethylformamidin-5'-*O*-dimethoxytriphenylmethyl-5-iod-2'-desoxycytidin erhalten und für die ODN-Synthese eingesetzt. Das ODN der Sequenz tgt⁵¹cgt₁₅ konnte in 92%iger Reinheit isoliert werden.

Ausgehend von 3',5'-geschütztem 5-Iod-2'-desoxycytidin wurden an verschiedenen Stellen in der Syntheseroute Sonogashira-Kupplungen mit Pyren-, Phenyl- und Trimethylsilylethin unternommen. Während die Sonogashira-Kupplung während der Festphasen-DNA-Synthese nicht zu reinen Produkten führte, konnte 3',5'-*Di-O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5-phenylethin-2'-desoxycytidin in 75%iger Ausbeute erhalten werden.

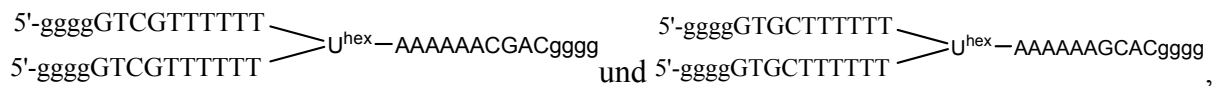
Aufbauend auf den Erfolgen mit 5-Iod-2'-desoxycytidin wurde ein „verzweigendes Nukleotid“ entworfen, das die Synthese verzweigter ODN des Typs (5'-...CpG...)2-*Linker*-...CpG...-3') in wenigen Syntheseschritten ermöglicht. Dieser Typ von verzweigten ODN ist eine Kombination aus herkömmlichen 5'...CpG...CpG-3'-CpG-Oligodesoxynukleotiden und sogenannten Immunomeren der Struktur 5'...CpG...-*Linker*-...CpG...-5'. Letztere zeigen ein anderes Zytokinprofil und bewirken teilweise eine verstärkte Zytokinexpression im Vergleich zu herkömmlichen CpG-Oligodesoxynukleotiden. Es wurde daher vermutet, dass der oben genannte Typ von verzweigten CpG-ODN eine verbesserte Immunstimulierung, d. h. eine breitere und stärkere Aktivierung des Immunsystems bewirkt als herkömmliche CpG-Oligodesoxynukleotide, was für medizinische Anwendungen interessant wäre.

Ausgehend von 5-Iod-2'-desoxyuridin wurden terminale Hydroxyl-ethin-*Linker* des Typs HC≡C(CH₂)_nOH mit n= 1, 2, 4 unter Sonogashira-Kupplungsbedingungen am Uracil einführt und weiter zum Phosphoramidit umgesetzt. Zur Synthese symmetrisch verzweigter ODN wurde DMT als *Linker*-Schutzgruppe verwendet, *tert*-Butyldimethylsilyl wurde für die Synthese asymmetrisch verzweigter ODN eingesetzt. In einer Gesamtausbeute von 34% über drei Reaktionsschritte, nämlich Dimethoxytritylierung, Sonogashira-Kupplung mit DMTOCH₂C≡CH und Phosphitylierung wurde 5-[1''-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-prop-

2''-in-ether]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyuridin synthetisiert. In 13% Gesamtausbeute über vier Reaktionsschritte wurde 5-[1''-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether)-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyuridin erhalten. In einer vergleichbarer Gesamtausbeute von 14% wurde 5-[1''-O-(*tert*-Butyldimethyl-silyl)-hex-5''-in-ether)-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyuridin in vier Schritten erhalten.

Als Terminator für die Synthese asymmetrisch verzweigter Oligodesoxynukleotide wurde Thymin an der 5'-Position benzyliert und anschließend phosphoryliert.

Eigens entworfen und synthetisiert wurden die symmetrisch verzweigten ODN



wobei Ersteres zwei optimale CpG-Motive enthält, während Letzteres zwar dieselbe Nukleotid-Zusammensetzung besitzt, aber kein CpG-Motive.

Für die Bestimmung der immunologischen Wirkung der synthetisierten Oligodesoxynukleotide wurden Raji-Zellen mit CpG-haltigen und nicht CpG-haltigen Oligodesoxynukleotiden inkubiert. Ein *cytometrischer bead array* wurde zur Charakterisierung der Immunantwort von Raji-Zellen auf eine CpG-ODN-Stimulation durchgeführt. Dieser Test ermöglicht die Konzentrationsbestimmung mehrerer Zytokine gleichzeitig, wobei die Konzentrationen der Zytokine IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, INF- β , INF- γ , MCP-1, TNF- α , TNF- β , G-CSF und GM-CSF gemessen wurden. Nur für TNF- α , IL-10 und TNF- β wurden Werte > 0 pg/ml detektiert, die zudem niedrig waren. Diese Raji-Zellen haben sich als ungeeignet erwiesen, da kein signifikanter Unterschied in den Meßergebnissen zwischen stimulierten und unstimulierten Raji-Zellen zu beobachten war.

Als alternative Zellen wurden humane periphere mononukleare Blutzellen gewählt, mit denen ein aussagekräftiges Testsystem etabliert wurde. Diese Zellen wurden mit verschiedenen Oligodesoxynukleotiden stimuliert und mit Hilfe eines *ELISA* wurde ihre Konzentration an IFN- α , einem Zytokin, das durch CpG-ODN am stärksten exprimiert wird, photometrisch bestimmt. Getestet wurden jeweils ein Vertreter aus den Klassen der A-, B- und C-CpG-Oligodesoxynukleotide mit zugehöriger nicht-CpG-haltigen Vergleichssequenz und die o. g. verzweigten ODN sowie zwei modifizierte CpG-ODN, einem mit 5-Iod-2'-desoxycytidin und einem mit 4,6-Difluorbenzimidazol-2'-desoxyribose modifiziertem.

Klasse B-CpG-ODN und die nicht CpG-haltigen ODN der Klasse B, C und des verzweigten CpG-ODN zeigten keine nennenswerte IFN- α -Stimulation. Ferner zeigten die mit 5-Iod-dC und 4,6-Difluorbenzimidazol-2'-desoxyribose modifizierten CpG-ODN keine IFN- α -Induktion.

Das CpG-ODN der Klasse A pos2216 (ggG GGA CGA: TCG TCG ggg gg) dagegen bewirkte die stärkste IFN- α -Produktion von den getesteten CpG-ODN.

Die Stärke der IFN- α -Induktion nahm in folgender Reihenfolge zu: Klasse C-CpG-ODN < verzweigtes CpG-ODN < nicht CpG-haltiges ODN Klasse A < Klasse A-CpG-ODN.

Aus den Testergebnissen können folgende Aussagen hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen getroffen werden: CpG-Motive sind IFN- α stimulierend. Aber **der stimulierende Einfluß von CpG-Motiven bezüglich der IFN- α -Induktion ist deutlich geringer als bislang angenommen**. Die TLR9-antagonistische Wirkung von Thiophosphaten überwog in der Sequenz tgt cgt ttt ttt ttt tt, die als Testsequenz für den Einfluß modifizierter Nukleobasen verwendet wurde, die agonistische Wirkung des optimalen CpG-Motivs (gtc gtt). Auch zeigte das verwendete Klasse B CpG-ODN, das drei optimale CpG-Motive enthält und ausschließlich Thiophosphat-verbrückt ist, nur eine geringe Stimulation. Jedoch ist erstaunlicherweise die Anwesenheit eines CpG-Dimers in einem Klasse A CpG-ODN nicht essentiell für die IFN- α -Induktion, da das nicht CpG-haltige ODN neg2216 am zweitstärksten IFN- α stimulierte.

In Übereinstimmung mit der Literatur wurde für das Klasse A CpG-Oligodesoxynukleotid pos2216 die stärkste IFN- α -Induktion gemessen, gefolgt von dem Klasse C CpG-ODN und Klasse B CpG-ODN mit der geringsten IFN- α Stimulation (Krieg, 2007). Dies kann folgendermaßen erklärt werden: Klasse A CpG-ODN bilden aufgrund ihrer Poly-Guanosin-Enden, die durch intra- und intramolekularer Hybridisierung der Palindrome räumlich näher gebracht werden, Tetraden aus. Dadurch entstehen Multimere, die zusätzlich zur CpG-ODN \leftrightarrow TLR9-vermittelten IFN- α -Induktion einen IFN- α -verstärkenden Rückkopplungsmechanismus aktivieren und eine längere Verweildauer im frühen Endosom besitzen als die monomeren Klasse B CpG-ODN. Klasse C CpG-ODN können zwar keine multimere Tertiärstrukturen bilden, da ihnen im Gegensatz zu Klasse A CpG-ODN Poly-g-Enden fehlen, aber Sekundärstrukturen durch intramolekulares und intermolekulares Hybridisieren der Palindrome, die entweder die Verweildauer im frühen Endosom erhöht, den IFN- α -verstärkenden Rückkopplungsmechanismus aktiviert oder zu einer verstärkten Wechselwirkung zwischen dem CpG-ODN und TLR9 führt. Der alleinige Einfluß des Palindroms auf

die IFN- α -Induktion ist jedoch deutlich schwächer als in Kombination mit Poly-g-Enden, wie aus dem Vergleich Klasse C mit Klasse A CpG-ODN hervorgeht. Zusätzlich verstärken die Phosphatbrücken innerhalb des chimäre Klasse A CpG-ODN die Stimulierung.

Das verzweigte CpG-ODN der Klasse A (posVerzw.) stimuliert zwar wie angenommen stärker IFN- α als Klasse C CpG-ODN, aber erstaunlicherweise tendentiell schwächer als das Klasse A CpG-ODN pos2216 und neg2216, deren CpG-Dimere invertiert sind. **Damit ist die These bezüglich IFN- α widerlegt, verzweigte CpG-Oligodesoxynukleotide mit zwei 5'-...GTCGTT-Sequenzen würden stärker stimulieren als herkömmliche Klasse A-CpG-ODN.** Ein möglicher Grund hierfür könnte ein *Retard*-Effekt sein: Im Vergleich zu linearen Klasse A CpG-ODN könnte posVerzw. einen stärker vernetzten multimeren Komplex bilden, aus dem Monomere langsamer dissoziieren und die TLR9-vermittelte Stimulierung auslösen. Aber es kann auch sein, dass das sterisch anspruchsvollere verzweigte CpG ODN nicht so gut in das aktive Zentrum des TLR9 paßt wie pos2216 und neg2216.

5. Ausblick

Obwohl die Immunstimulierung durch CpG-Oligodesoxynukleotide sich als äußerst komplex erwiesen hat und erst in Ansätzen verstanden wird, die Findung neuer modifizierter CpG-ODN noch nicht die erhoffte Ergebnisse gebracht haben, ist ihre weitere Erforschung ein spannendes und vielversprechendes Gebiet, man denke an die CpG-ODN in klinischen oder vorklinischen Tests als Kandidaten für Asthmamittel, Vakzinadjuvantien, Antiinfektiva oder Anti-Tumormittel.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte effiziente Methode zur Synthese verzweigter CpG-ODN sowie die Einführung von Ethin-Liganden mit Hilfe der Sonogashira-Kupplung kann für weitergehende Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-ODN eingesetzt werden. Hierbei sollte die durch diese Arbeit gefundene Erkenntnis, dass der Einfluß des optimalen CpG-Motivs GTCGTT am 5'-Ende auf die IFN- α -Stimulierung wesentlich geringer einzustufen ist als bislang angenommen wurde, berücksichtigt und für andere Zytokine überprüft werden.

Interessant wäre es, die Wirkdauer von dem synthetisierten verzweigten CpG-ODN (posVerzw.) im Vergleich zu linearen CpG-ODN zu prüfen, da es möglicherweise eine *Retard*-Wirkung besitzt, die für eine medizinische Anwendung von großem Interesse wäre.

Auch wäre es interessant, die Stimulierung von *hPBMC* durch verzweigte CpG-ODN mit Hilfe des *cytometric bead arrays* auf weitere Zytokininduktion hin zu untersuchen. Würden hierbei Zytokine stimuliert, die durch lineare CpG-ODN nicht induziert würden, würde dies den Aufwand rechtfertigen, der mit der Synthese verzweigter ODN verbunden ist, und für eine verstärkte Forschung und Entwicklung von verzweigten CpG-ODN sprechen.

6. Experimenteller Teil

CHEMISCHER TEIL

6.1 Analytische und präparative Methoden

6.1.1 NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurden Geräte der Firma *Bruker* verwendet, die mit 250 MHz, 300 MHz oder 400 MHz betrieben wurden. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben und wurde auf das jeweilige Lösungsmittel bezogen. Bei den ^1H -Spektren: DMSO- d_6 $\delta=2.54$ ppm; CDCl_3 $\delta=7.26$ ppm; bei den ^{13}C -Spektren: DMSO- d_6 $\delta=39.5$ ppm; CDCl_3 $\delta=77.16 \pm 0.06$ ppm. (Gottlieb et al., 1997) Die Kopplungskonstante J wurde in Hertz (Hz) angegeben. Für die Feinstruktur der Protonen-Signale wurde s für Singulett, d für Duplett, t für Triplet, q für Quartett und m für Multiplett geschrieben. Alle Messungen erfolgten bei 300K. Die Zuordnung der Signale in Protonen-NMR-Spektren wurde mit Hilfe von ^1H , ^1H -COSY-Spektren vorgenommen, die Zuordnung der ^{13}C -Signale wurde mittels HSQC-Spektren getroffen.

6.1.2 Infrarot-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit dem Gerät 1600 Series der Firma *Perkin-Elmer* aufgenommen. Die Signale wurden in Wellenzahl [cm^{-1}] angegeben. Die Messungen wurden mit Hilfe von KBr-Preßlingen durchgeführt.

6.1.3 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden mit dem Gerät *Heraeus CHN Rapid* erstellt.

6.1.4 Massenspektroskopie

MALDI-Spektren wurden am Gerät *Fisons VG TOF spec* aufgenommen unter Verwendung von 6-Aza-2-thio-thymin und Ammoniumcitrat als Matrix für Nukleoside. Die Massenspektren der ODN wurden mit dem MALDI-TOF Gerät *Voyager De-Pro* der Firma *Applied Biosystems* im linearen, positiven Ionenmodus aufgenommen. Als Matrix diente eine wässrige Mischung von 3-Hydroxylpicolinsäure (40 mg/ml) und 5 mg/ml Diammoniumhydrogencitrat. 2 μL der Matrix wurden mit 0.5 μL des Oligodesoxynukleotids direkt auf dem Probensteller

gemischt und in einem kalten Luftstrom getrocknet. Die ESI-Spektren wurden mit dem Gerät *Fisons VG Platform 2* gemessen.

6.1.5 Schmelzpunkt-Bestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät *510 der Firma Büchi* aufgenommen. Sofern die Schmelzpunkte der gemessenen Verbindungen bekannt sind, wurden die Referenzschmelzpunkte aus der Beilstein Crossfire-Datenbank mit angegeben.

6.1.6 Dünnschicht-Chromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator und einer Schichtdicke von 0.2µm von der Firma *Merck* verwendet. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit der UV-Lampe *022.9120* von der Firma *CAMAG*. Zur Anfärbung nicht UV-aktiver Substanzen wurde eine Iodkammer oder eine Schwefelsäure-Ninhydrin-Tauchlösung verwendet.

6.1.7 Präparative Säulenchromatographie

Für die präparative Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde das *Kieselgel 60* (0.04-0.063mm) der Firma *Merck* verwendet. Alle Elutionsmittel haben den Reinheitsgrad technischer Lösungsmittel, sie wurden vor Gebrauch destilliert.

6.1.8 Oligodesoxynukleotid-Synthese-Automat

Die Oligodesoxynukleotide wurden mit Hilfe des DNA-Synthesizers *Expedite™ Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *PerSeptive BioSystems* synthetisiert.

6.1.9 Semipräparative und analytische Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie

Die HPLC-Anlagen *Hitachi, Nr. L-4250* der Firma *Merck* und *UV-2075 Plus* der Firma *JASCO* wurden verwendet. Folgende semi-präparative HPLC-Säulen wurden getestet:

- *R3, 10*100mm u. 16*100, 1-13332-56, Applied Biosystems*
- *Jupiter 4µ Proteo 90Å, 250*15.00mm, 373358 u. 250*4.60mm, 4 micron, 329097-4, Phenomenex*
- *LiChrocart 250*10mm, RP-18e (5 µm), 044723, Purospher STAR, Merck*
- *DNA Pac TM PA-100(9*250), 1252, Dionex*

analytische HPLC-Säulen:

- *Jupiter 4 μ Proteo 90Å, 50*4.60mm, 4 micron, 191148-1, Phenomenex*
- *LichroCart 250*4mm, RP-18(5 μ m), 137192, Purospher STAR, Merck*
- *EcoCart 125*3mm, Lichrospher 100, RP-18, 5 μ m, 647440, Merck*

Die R3-Säule, unabhängig von ihrer Größe (10*100mm oder 16*100mm), hat keine gute Trennung gezeigt, gegebenenfalls war sie für eine Vortrennung geeignet. Das R3-Säulenmaterial besteht aus kreuzvernetzten Poly-(styrol-divinylbenzol)-Partikel. Eine RP-18e Säule war akzeptabel, am besten jedoch war die RP-C₁₂-Säule, *Jupiter 4 μ Proteo*, von der Firma *Phenomenex* in ihrer Trennleistung. Die Ionenaustauschersäule von der Firma *Dionex* besteht aus einem nicht porösen Polymer mit Aminfunktionen. Sie hat keine bessere Trennung als eine Umkehrphasensäule bewirkt, sie hat nur die Aufreinigung erschwert, da Natriumchlorat oder NaCl/NaOH/TRIS-Cl-Gradienten verwendet wurden, diese Salze mussten im Anschluß an die Trennung entfernt werden. Die *Jupiter 4 μ Proteo 50*4.6mm*-Säule wurde als analoge Säule zu der für die LC-MS bei *Coley Pharmaceutical GmbH* verwendete herangezogen, hat aber nicht überzeugt. Die kursiv gekennzeichneten Säulen haben sich als optimal erwiesen. Einige ODN wurden von *Coley Pharmaceutical GmbH* in Langenfeld per LC-MS analysiert. Als Säule wurde die *X-Bridge, C18, 2.5 μ m, 2.1*50mm* verwendet, als Puffer A: 385 mmol Hexafluoro-*iso*-propanol und 14.4 mmol Triethylamin, als Puffer B: Methanol, Flußrate 0.15 ml/min, ein 60 minütiger Gradient, der nicht bekanntgegeben wurde, wurde verwendet.

6.1.10 Röntgenstrukturanalyse

Die Kristallstrukturen wurden mit Hilfe des *Siemens SMART IK CCD area detector diffractometer* gemessen. Die Strukturbestimmung erfolgte mit dem Program SHELXS.

6.2 Liste der verwendeten Chemikalien

Acetonitril, C₂H₃N, 41.05 g/mol, d=0.782 g/ml, p. a. über Molsieb, $\geq 99.5\%$, H₂O $\leq 0.01\%$, *Fluka*, Nr. 00695

4,6-Aminouracil, C₄H₅N₃O₂, 127.10 g/mol, $> 98\%$, *Merck-Schuchardt*, Nr. 8.41698.0100

Ammoniumhydroxidlösung 33% NH₃, 35.05 g/mol, d=0.89 g/ml, *Riedel-deHaën*, Nr. 05002

Ammoniumsulfat, H₈N₂O₄S, 132.14 g/mol, $>99\%$, *Fluka*, Nr. 09982

Bis(dibenzylideneacetone)palladium, PdC₃₄H₂₈O₂, 577.42 g/mol, *Alfa Aesar*, Nr. 012764

Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid, C₃₆H₃₀Cl₂P₂Pd, 701.89 g/mol, $\geq 98.0\%$, *Fluka*, Nr.15253

- Borsäuretri-*iso*-propylester, $C_9H_{21}BO_3$, 188.1 g/mol, $d=0.815$ g/ml, 98%, *Aldrich*, Nr. 19,733-5
- 4-Brombenzylalkohol, C_7H_7BrO , 187.04 g/mol, $\geq 98\%$, *Fluka*, Nr. 16458
- 4-Brom-*m*-xylene, C_8H_9Br , 185.06 g/mol, $d=1.371$ g/ml, *Alfa Aesar*, Nr. A10212
- Butyllithium-Lösung, 1.6M in Hexan, C_4H_9Li , 64.1 g/mol, $d=0.680$ g/ml, *Fluka*, Nr. 20160
- 3-Butyn-1-ol, 98+%, C_4H_5O , 68.0 g/mol, *Alfa Aesar*, Nr. A11477
- DC Kieselgel 60 F254 Aluminiumplatten 20*20cm, *Merck*, Nr. 1.05554.0001
- Dichlorethan, $C_2H_4Cl_2$, 98.96 g/mol, $d=1.253$ g/ml, p. a. über Molsieb, $\geq 99.5\%$, $H_2O \leq 0.005\%$, *Fluka*, Nr. 03527
- Dichlormethan, CH_2Cl_2 , 84.93 g/mol, $d=1.325$ g/ml, p. a. über Molsieb, $H_2O \leq 0.005\%$, *Fluka*, Nr. 66749
- Dimethoxytriphenylmethylchlorid, $C_{21}H_{19}ClO_3$, 338.45 g/mol, 98%, *Alfa Aesar*, Nr. A11626
- N,N*-Dimethylformamid, C_3H_7NO , 73.10 g/mol, $d=0.948$ g/ml, p. a. über Molsieb, $H_2O \leq 0.005\%$, *Fluka*, Nr.40248
- Dowex 50 W X 8, p. a. H^+ -form, 200-400 *mesch*, *Fluka*, Nr. 44519
- Essigsäure, $C_2H_4O_2$, 60.05 g/mol, $d=1.05$ g/ml, $\geq 99.8\%$, *Riedel-deHaën*, Nr.33209
- Essigsäureanhydrid, $C_4H_6O_3$, 114.2 g/mol, 99%, *Grüssing*, Nr. 10298
- Ethanol, C_2H_6O , 64.07g/mol, $d=0.79$ g/ml, $\geq 99.8\%$, p. a., *ROTH*, Nr. 9065.3
- Hexamethyldisilazan, $C_6H_{19}NSi_2$, 161.40 g/mol, $d=0.774$ g/ml, $\geq 98.0\%$, *Fluka*, Nr. 52620
- 5-Hexyn-1-ol, $C_6H_{10}O$, 98.14 g/mol, $>95\%$, *TCI*, Nr. H0687
- 5-Iodo-2'-desoxyuridin, $C_9H_{11}N_2O_5I$, 354.1 g/mol, *Pharma Waldhof*, Nr. 10008302
- Magnesiumsulfat, MgO_4S , 120.37 g/mol, p. a. $\geq 98\%$, *Fluka*, Nr. 63136
- Methanol, CH_4O , 32.04g/mol, $d=0.79$ g/ml, p. a. über Molsieb, $\geq 99.5\%$ (GC), $H_2O \leq 0.01\%$, *Fluka*, Nr. 65542
- Natriumbicarbonat, $NaHCO_3$, 84.01 g/mol, Pulver, 99.0-100.5%, *Riedel-de-Haën*, Nr. 13433
- Natriumhydroxid, $HNaO$, 40.00 g/mol, $\geq 97.0\%$, p. a., *pellets*, *Fluka*, Nr. 71692
- Palladium(II)acetat, $PdC_4H_6O_4$, 224.49 g/mol, 99.9+%, *Sigma-Aldrich*, Nr. 52076
- Phosphortrichlorid, PCl_3 , 137.33 g/mol, $d=1.57$ g/ml, $\geq 99\%$, *Merck*, Nr. 8.22322.0500
- Phosphorpentoxid, P_2O_5 , 141.94 g/mol, *with moist indicator*, *Fluka*, Nr. 79610
- Piperidin, $C_5H_{11}N$, 85.15g/mol, $d=0.862$ g/ml, *purum*, 98%, *Fluka*, Nr. 80642
- Propargylalkohol, C_3H_4O , 56.06g/mol, $d=0.949$ g/ml, $\geq 99.0\%$, *Fluka*, Nr. 81820
- Pyridin, C_5H_5N , 79.10 g/mol, $d=0.983$ g/ml, p. a. über Molsieb, $\geq 99.8\%$, $H_2O \leq 0.005\%$, *Fluka*, Nr. 82704
- Salpetersäure, HNO_3 , 63.01 g/mol, $d=1.52$ g/ml, $\geq 99.5\%$, *Fluka*, Nr.84392
- Schwefelsäure, H_2SO_4 , 98.08 g/mol, $d=1.84$ g/ml, 95.0-97%, *Merck*, 1.00731.1000

Seesand, 60.09 g/mol, Spezifikation Z1317, *Grüssing*, Nr. 7337

Sephadex G-15, *GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Nr. 17002001

tert-Butyldimethylchlorsilan, C₆H₁₅ClSi, 150.7 g/mol, 97%, *Alfa Aesar*, Nr. A13064

tert-Butyldiphenylchlorsilan, C₁₆H₁₉ClSi, 274.87 g/mol, d=1.074 g/ml, ≥ 97%, *Fluka*, Nr. 19938

Tetrahydrofuran, C₄H₈O, 72.11 g/mol, d=0.89 g/ml, p. a. über Molsieb, ≥ 99.5% (GC), H₂O ≤ 0.005%, *Fluka*, Nr. 87371

Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat, C₄H₉F₃O₃SSi, 222.26 g/mol, d=1.23 g/ml, ≥ 98%, *Fluka*, Nr.91741

Toluol, C₇H₈, 92.14g/mol, d=0.867 g/ml, p. a. über Molsieb, ≥ 99.7% (GC), H₂O ≤ 0.005%, *Fluka*, Nr. 89677

Triethylamin, C₆H₁₅N, 101.19 g/mol, d=0.73 g/ml, ≥ 99% (GC), *Riedel-deHaën*, Nr. 16304

Triphenylphosphin, C₁₈H₁₅P, 262.30 g/mol, ≥ 98.5%, *Fluka*, Nr. 93090

6.3 ODN-Synthese

6.3.1 Reagenzien für die ODN-Synthese

Acetonitril, H₂O ≤ 30 ppm, *Proligo Biochemie GmbH*, Nr. L010250

Activator (0.45M Tetrazol in Acetonitril, ≤0.003% H₂O, *Biosolve*, Nr. 32407

Amidite Diluent (Acetonitril), H₂O ≤30 ppm, *Proligo Reagents*, Nr. L010250

3H-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid, C₇H₄O₃S₂, 200.23 g/mol, *Glen Research*, Nr. 40-4036-06

Cap A (THF, Essigsäureanhydrid), *Prologio Biochemie GmbH Hamburg*, Nr. L04025

Cap B (THF, Pyridin, 1-Methylimidazol), *Prologio Biochemie GmbH Hamburg*, Nr. L05025

4,5-Dicyanoimidazol in Acetonitril, 0.25M, *Prologio Biochemie GmbH Hamburg*, Nr. L080250

dA-β-CE-Phosphoramidit: 6*N*-Benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-(2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin-2'-desoxyadenosin, C₄₅H₄₂N₇O₅P, 797.9 g/mol, *Pharmacia Biotech*, Nr. 27-1730-06

dC- β-CE-Phosphoramidit: 4*N*-Benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxycytidin, C₃₇H₄₄N₅O₅P, 669.7 g/mol, *Pharmacia Biotech*, Nr. 27-1732-06

dG-β-CE-Phosphoramidit: 6*N*-Benzoyl-2*N*-(*iso*-butyryl)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-aminophosphin]-2'-desoxyguanosin, C₄₉H₅₄N₇O₇P, 883.0 g/mol, *Pharmacia Biotech*, Nr. 27-1734-06

T-β-CE-Phosphoramidit: 5'-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxythymidin, C₃₇H₄₃N₄O₆P, 670.7 g/mol, *Pharmacia Biotech*, Nr. 27-173606

Oxidizer Solutein (THF, Pyridin, Iod), *Prologio Biochemie GmbH Hamburg*, Nr. L060250

TCA Deblock (Trichloressigsäure), *Prologio Biochemie GmbH Hamburg*, Nr. L020250

Die Synthese der modifizierten Phosphoramidite wird in Kapitel 6.5 beschrieben. Zusätzlich wurden für die ODN-Synthese freundlicherweise überlassen bzw. gekauft:

5'-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-(2-cyanoethoxy-*N,N*-(*iso*-propyl)-amino-phosphin)-2'-desoxyribosyl-Wyosin (C₄₄H₅₂N₇O₇P, 821.9 g/mol von N. Tatarovic)

2-*N*-Butyl-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyguanosin (^{Bu}G) (C₄₄H₅₇N₇O₇P, 826.9 g/mol von Nedelka Tatarovic)

4,6-Difluorbenzimidazol-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-aminophosphin]-2'-desoxyribose (C₄₂H₄₇F₂N₄O₆P, 772.8 g/mol von Dr. J. Bozilovic)

8-Br-dG-β-CE-Phosphoramidit: 8-Bromo-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxyguanosin, C₄₃H₅₂N₈O₇PBr, 903.9 g/mol, *Glen Research*, Nr. 10-1027-90

8-Amino-dG-β-CE-Phosphoramidit: 8-Amino-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-aminophosphin]-2'-desoxyguanosin, C₄₉H₅₉N₁₀O₇P, 895.01 g/mol, *Glen Research*, Nr. 10-1079-90

5-Me-dC-β-CE-Phosphoramidit: 4*N*-Benzoyl-5'-*O*-dimethoxytriphenylmethyl-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5-methyl-2'-desoxycytidin, C₄₇H₅₄N₅O₈P, 847.9 g/mol, *Glen Research*, Nr. 10-1060-02

5-I-dC-β-CE-Phosphoramidit: 4*N*-Benzoyl-5'-*O*-dimethoxytriphenylmethyl-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5-iod-2'-desoxycytidin], C₄₆H₅₁IN₅O₈P, 959.83 g/mol, *Glen Research*, Nr. 10-1081-02

5-Br-dC-β-CE-Phosphoramidit: 4-*N*-Benzoyl-5-Brom-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-2'-desoxycytidin, C₄₆C₅₁BrN₅O₈P, 912.82 g/mol, *Glen Research*, 10-1080-02

Beschwefelungsreagenz: 0.5 molares Beaucage-Reagenz (3H-Benzo-1,2-dithiol-3-on-1,1-dioxid)-Acetonitril; eingesetzte Menge pro 1-2 Synthesetage: 1 g Beaucage-Reagenz in 100 ml Acetonitril; am 2. Synthesetag bildete sich manchmal ein Niederschlag, dann musste das Beschwefelungsreagenz frisch angesetzt werden.

Die Phosphoramidite wurden i. d. R. als 0.1molare Acetonitrillösungen eingesetzt, bei der Synthese symmetrisch verzweigter ODN wurden 0.2 molare Lösungen verwendet. Wurden modifizierte Syntheseprotokolle mit „*Double Couple*“ genommen, die vermehrt Substanz verbrauchen, verwendet, wurde pro Pumpimpuls 16 μL 0.1molare Phosphoramiditlösung entsprechend 1.6 mg Phosphoramidit veranschlagt.

6.3.2 Handhabung

Besondere Sorgfalt war geboten, um das Verstopfen der Leitungen im *Synthesizer* zu verhindern und um die Hydrolyse/Oxidation der Phosphoramidite zu vermeiden: Die Phosphoramidite mussten vollständig gelöst sein, bevor sie an den *Synthesizer* angebracht wurden, ansonsten wurden sie über einen Membranfilter abfiltriert. Die *Synthesizer*-Flaschen wurden vor Gebrauch über Nacht bei 100°C ausgeheizt und im Argonstrom abgekühlt. Vor einer ODN-Synthese wurde mindestens zweimal jede Position gespült, bei langsamem Durchfluß musste gründlich, d. h. durchaus eine Stunde lang gespült werden. Nach vollendeter Synthese wurde die ODN-Säule herausgenommen, das Beschwefelungsreagenz und die Phosphoramidite gegen Acetonitril ausgetauscht und mindestens 4mal jede Position gespült.

6.3.3 DMT On/Off

Zunächst wurden Synthesen mit „DMT On“ vorgenommen, d. h. dass das letzte Nukleotid die DMT-Schutzgruppe trägt. Das Argument hierfür war, dass die unpolare Schutzgruppe sollte die HPLC-Trennung verbessern sollte. Nachteil dieser Prozedur ist, dass nach der HPLC-Trennung die DMT-Schutzgruppe noch separat abgespalten werden muss, üblicherweise mit 80%iger Essigsäure 30 min bei RT. In den MALDI-MS-Spektren der „DMT On“-synthetisierten ODN wurde Depurinierung detektiert.

Bei „DMT Off“-ODN dagegen wurde die letzte DMT-Schutzgruppe innerhalb weniger Sekunden mit Trichloressigsäure entfernt. Die Aufreinigung wird dadurch einfacher und Depurinierungen waren in Massenspektren nicht vorhanden. Die HPLC-Trennung wurde durch das Fehlen der unpolaren Gruppe auch nicht verschlechtert, nur der Gradient musste leicht verändert werden. Nach dieser Erkenntnis wurden nur noch „DMT Off“-Synthesen durchgeführt.

6.3.4 Besonderheiten für die Synthese von PS-ODN

Zur Synthese von Thiophosphat-Oligodesoxynukleotiden konnten nicht die normalen Syntheseprotokolle von Phosphat-ODN verwendet werden. Bei der Synthese von Phosphat-ODN erfolgen die Reaktionsschritte in folgender Reihenfolge: 1. Abspaltung der DMT-Schutzgruppe, 2. Kupplung/Aktivierung, 3. *Capping*, 4. Oxidation. Bei der Thiophosphat-ODN-Synthese dagegen würde diese Reihenfolge zur partiellen Oxidation schon während des *Cappings* führen, so dass keine vollständige Beschwefelung im nächsten Schritt erfolgen könnte. Bis zu 5mal trat dieser unerwünschte Austausch von Schwefelatomen durch Sauerstoffatome auf. Daher wurden neue Syntheseprotokolle geschrieben, bei denen die Reihenfolge folgendermaßen aussah: 1. Abspaltung der DMT-Schutzgruppe, 2. Kupplung/ Aktivierung, 3. Beschwefelung, 4. *Capping*.

„*Double Couple*“, d. h. zweimal wird eine Phosphoramiditlösung auf die ODN-Säule gepumpt, dazwischen wird mit Acetonitril gewaschen, wurde bei modifizierten Phosphoramiditen eingesetzt. Dies zeigte sich als effektiver gegenüber einer verlängerten Einwirkzeit der Phosphoramiditlösung auf der ODN-Säule.

6.3.5 Aufreinigung der ODN

Bei Thymidin-reichen Sequenzen wurde vor Entfernung der Basen-labilen Schutzgruppen eine Vorbehandlung mit *tert*-Butylamin durchgeführt, die das ODN von der festen Phase abspaltet. Im Gegensatz zu der üblichen ammoniakalischen Abspaltung des ODN von der festen Phase kann *tert*-Butylamin die Bildung von Acrylnitril-Addukten am N3 von Thyminen als unerwünschte Nebenreaktion verhindern. *tert*-Butylamin fängt abgespaltenes Acrylnitril in einer Michaeladdition ab. Zur Vorbehandlung wurde das Festphasenmaterial, an dem die ODN-Synthese stattgefunden hatte mit 0.5 ml *tert*-Butylamin in 1.5 ml Acetonitril für 30 min bei RT inkubiert und anschließend der Überstand in einer Vakuum-Zentrifuge entfernt. Das ODN wurde vom festen Träger mit 3 ml konzentriertem Ammoniak innerhalb von 24 Stunden bei RT abgespalten. Der Überstand wurde über einen Membranfilter abfiltriert und zweimal mit 0.5 ml autoklaviertem Wasser nachgewaschen.

Abhängig vom Säulenmaterial der präpaativen HPLC-Säule wurde entweder bis zur Trockene eingengt und mit möglichst wenig autoklaviertem Wasser gewaschen oder auf 0.5 - 1 ml eingengt und dann direkt auf die HPLC-Säule aufgespritzt.

Sowohl die *Merck*- als auch die *JASCO*-HPLC-Apparatur wurde verwendet.

Zunächst wurden kurze Trennzeiten mit der *R3*-Säule verwendet, was jedoch zu keiner zufriedenstellenden Aufreinigung führte. Dabei wurde zuerst ein steiler Gradient von 0-50% MeCN

in 20 min gewählt, sukzessiv wurde dieser Gradient abgeflacht: 10-50% MeCN in 20 min, 10-45% MeCN in 20 min, 15-28% MeCN in 20 min. Die Trennzeit musste weiter erhöht werden zunächst auf 40 min, wobei zunächst mit Hilfe eines steilen Gradienten abgeschätzt wurde, in welchem Bereich das jeweilige ODN eluiert, dies erfolgte mit einem 0-45%igen MeCN-Gradienten, anschließend wurde auf 0-30% MeCN abgeflacht, was jedoch keine große Verbesserung in der Aufspaltung bewirkte. Abermals wurde die Trennzeit erhöht: Auf 50 min, 55 min, 60 min, 70 min und schließlich 75 min. In den meisten Fällen erwies sich sowohl für die präparative als auch analytische Trennung am geeignetsten sich die *Phenomenex*-Säulen und der Gradient 9-25% MeCN in 50 min mit einer Flußrate von 6 ml/min bzw. 1 ml/min.

Die in Frage kommenden Fraktionen wurden in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Die DMT-Schutzgruppe der „DMT-On“-Oligodesoxynukleotide wurden in 500 µl 80%iger Essigsäure 30 min bei RT abgespalten. 1/10 bis 1/5 der Menge wurde separiert. Anschließend wurden die ODN in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Mit maximal 1 ml wässriger 1 molarer NaCl-Lösung wurde versucht, 9/10 bzw. 4/5 der Gesamtmenge zu lösen. Bei Bedarf wurde im 40 °C warmen Wasserbad leicht erwärmt. 1/10 bzw. 1/5 der Gesamtmenge wurde in 100 µl wässriger 5molarer Ammoniumacetat-Lösung gelöst. Jeweils das dreifache Volumen an EtOH wurde zum Ausfällen des ODNs dazugegeben. Bei -20 °C über Nacht fand die Ausfällung statt. Der Überstand wurde abdekantiert, der Rest einrotiert. 9/10 bzw. 4/5 der Gesamtmenge wurde über *Sephadex*säulen zweimal entsalzt. Anschließend wurde bei 260 nm die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die Menge an wässriger ODN-Lösung, die 0.5 OD entspricht, wurde für die Aufnahme eines analytischen HPLC-Spektums verwendet. Von dem 1/10 bzw. 1/5 der Gesamtmenge wurde ein Massenspektrum aufgenommen. Grund für den Einsatz von unterschiedlichen Salzlösungen ist, dass für biologische Tests bevorzugt NaCl, da es auch im Körper vorkommt, verwendet wird. Für die *MALDI*-Analytik dagegen ist Ammoniumacetat vorzuziehen, weil es keine Addukte mit ODN bildet wie mit Natriumionen, und da es sich während der Messung in Essigsäure und Ammoniak spaltet, was während der *MALDI-TOF*-Messung ins Vakuum abdampft, bevor es sich ans ODN anlagern und detektiert werden könnte.

Bei „DMT-Off“-Oligodesoxynukleotiden wurden die Behandlung der ODN mit Essigsäure und die Ausfällung eingespart.

6.3.6 Liste der synthetisierten ODN

Hierbei werden CpG-Motive unterstrichen, Palindrome kursiv und mit einem Doppelpunkt markiert, Kleinbuchstaben sind Thiophosphate, Großbuchstaben Phosphate.

Als Analytik wurde MALDI-MS oder LC-MS verwendet. $M \pm 5$ ist das gewünschte Produkt, wobei M die Molmasse des ODN ist. Bei Proben, bei denen die Abbruchsequenzen von der gewünschten abtrennbar waren, wurde mit Hilfe der analytischen HPLC-Säule *LichroCart 250*4mm, RP-18(5 μ m), 137192, Purospher STAR, Merck* die Reinheit bestimmt.

Klasse A-ODN:

- pos2216: ggG GGA CGA: TCG TCG ggg gg 8.0 OD, 78% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6417,
gef.: 6421 (M+4H⁺),
6405 (M-Me+3H⁺), 6762
(M+3Na⁺+2Matrix)
- 2216^{Br}C_1: ggG GGA (^{Br}C)GA: TCG TCG ggg gg 91.5 OD, MS unrein
MALDI-MS: ber.: 6496,
gef.: (Abbrüche),
6488 (M-7), 6525 (M+Na⁺+Li⁺),
6504 (M+Li⁺+2H⁺)
- 2216^{Br}C_2: ggG GGA CGA: T(^{Br}C)G TCG ggg gg 14.7 OD, BrC hat nicht gekuppelt
MALDI-MS: ber.: 6496,
gef.: (Abbrüche)
- 2216^{Br}C_3: ggG GGA CGA: TCG T(^{Br}C)G ggg gg 16.7 OD, nicht trennbar
MALDI-MS: ber.: 6496,
gef.: (Abbrüche)
- 2216¹C_1: ggG GGA (¹C)GA: TCG TCG ggg gg 6.5 OD, 80% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6542,
gef.: 6543 (M-H⁺),
6415 (M-I), 6527.09 (M-Me),
6613 (M+3Na+2H⁺), 6872 (M+2
Matrix+3H₂O), 6395 (M-
Guanin+2H⁺)

- 2216¹C_2: ggG GGA CGA: T(¹C)G TCG ggg gg 6.3 OD, MS unrein
MALDI-MS: ber.: 6542,
gef.: 6548
(M+Li⁺-H⁺), 6603 (M+K⁺+Na⁺-H⁺), 3274 (M/2e⁻), (Abbrüche)
- 2216¹C_3: ggG GGA CGA: TCG T(¹C)G ggg gg 4.2 OD, MS unrein
MALDI-MS: ber.: 6542,
gef.: 6548 (M+Li⁺),
6322 (M-I+Li⁺)
- neg2216: ggG GGA GCA TGC TCg ggg gG 45.9 OD, 69% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6417,
gef.: 6438
(M+H₃O⁺)
- inh2216: ggG GGA GGA TGG TGG ggg gg 14.9 OD, MS unrein
MALDI-MS: ber.: 6537,
gef.: 6611
(M+3Na⁺+5H⁺), 6681 (M+Matrix+6H⁺), 6700 (M+Matrix+Na⁺+2H⁺),
6750 (M+Matrix+K⁺+2H₂O),
(Abbrüche)

Klasse B-ODN:

- pos: tgt cgt ttt ttt ttt tt 37.8 OD, 93% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6362,
gef.: 6361 (M-H⁺)
- pos (bought): tgt cgt ttt ttt ttt tt 45.2, 68% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6362,
gef.: 6362 (M⁺)
- neg: tgt gct ttt ttt ttt tt 26.7 OD, 75% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6362,

- gef.: 6362 (M^+)
- neg (bought): tgt gct ttt ttt ttt ttt tt 32.8, 75% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6362,
gef.: 6363 ($M+H^+$)

 - pos suppressiv: tgt ggt ttt ttt ttt ttt tt 8.4 OD, 54% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6402,
gef.: 6470
($M+3Na^+-H^+$)

 - „DFI-C“: tgt (DFI)gt ttt ttt ttt ttt tt 3.7 OD, nicht trennbar
MALDI-MS: ber.: 6404,
gef.: 6083 ($M-T+H^+$), 6402 ($M-2H^+$), 6424
($M+H_2O$), 6495 ($M+4Na^+$)

 - DFI-G: tgt c(DFI)t ttt ttt ttt ttt tt 2.9 OD, nicht trennbar
MALDI-MS: ber.: 6365,
gef.: 6043
($M-TPSO$), 6362 ($M-2H^+$)

 - DFI-T: tgt cgt ttt ttt ttt tt(DFI) tt 24.7 OD, M, 63% HPLC rein
MALDI-MS: ber.: 6389,
gef.: 6388 ($M-H^+$),
6410 ($M+H_2O+2H^+$), 6525 ($M+Matrix-3H^+$), 6690 ($M+2Matrix+H^++Na^+$)

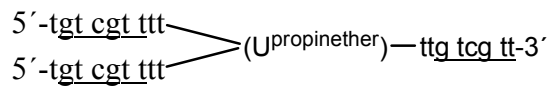
 - MedC: tgt (^{Me}c)gt ttt ttt ttt ttt tt 21.3 OD, 75% HPLC rein
MALDI-MS: ber.: 6376,
gef.: 5070
($gt_{15}+H_2O$), 6374 ($M+2H^+$),
6396 ($M+Na^+$), 6512 ($M+Matrix$)

- IdC: tgt (¹c)gt ttt ttt ttt tt 13.0 OD, 92% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6488,
gef.: 6362 (M-I),
6490 (M+ 2H⁺), 6627 (M+Matrix)
- BrdC: tgt (^{Br}c)gt ttt ttt ttt tt 7.1 OD, nicht trennbar
MALDI-MS: ber.: 6441,
gef.: 6513
(M+3Na⁺), 6537 (M+4Na⁺), 6650
(M+Matrix+ 3Na⁺)
- W-G: tgt c(W)t ttt ttt ttt tt 6.1 OD, kein Molpeak gefunden
MALDI-MS: ber.: 6400,
gef.: 6713 (M+2
Matrix+K⁺), 6697 (M+2Matrix+
Na⁺)
- BudG: tgt c(^{Bu}g)t ttt ttt ttt tt 2.1 OD, kein Molpeak gefunden
MALDI-MS: ber.: 6418,
gef.: (Abbrüche)
- BrdG: tgt c(^{Br}g)t ttt ttt ttt tt 5.6 OD, nicht trennbar
MALDI-MS: ber.: 6441,
gef.: 6088
(M-T(OPSO)-H₂O), 6512 (M+3
Na⁺+2H⁺), 6535 (M+4Na⁺+2H⁺),
6554 (M+5Na⁺-2H⁺), 6650 (M+
Matrix+3Na⁺+H⁺)
- ^{deaza}G: tgt c(^{deaza}g)t ttt ttt ttt tt 18.1 OD, ^{deaza}dG nicht gekuppelt
MALDI-MS: ber.: 6388,
gef.: 5073
(gt₁₅+2H⁺), 5055 (gt₁₅-Me+H⁺)

- 6-Oxo, 2'-OMe dC: tgt(^{6-Oxo, 2'OMe}c)gt ttt ttt ttt tt 3.0 OD, MS unrein
MALDI-MS: ber.: 6409,
gef.: 6411 (M+2H⁺)
und (Abbrüche)
 - PyacdC: tgt(^{Pyac}c)gt ttt ttt ttt tt 1.2 OD, MS unrein
MALDI-MS: ber.: 6589,
gef.: 6429 (M-G_{Base},
1*O statt S+Li⁺-H⁺) u. (Abbrüche)
 - PhacdC: tgt(^{Phac}c)gt ttt ttt ttt tt 1.8 OD, MS unrein
MALDI-MS: ber.: 6462,
gef.: 6359
(M-G_{Base}+ Na⁺+H⁺) u. (Abbrüche)
 - „pos2006“: tcg tcgt ttt gtc gtt ttg tcg tt 13.6 OD, 76% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6698,
gef.: 6699 (M+H⁺)
 - neg2006: tgc tgc ttt tgt gct ttt gtg ctt 9.4 OD, 86% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 6698,
gef.: 7670 (M+2H⁺)
- Klasse C-ODN:**
- pos2429: tcg tcg ttt tcg gcg g:cc gcc g 13.4 OD, 85% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.: 7048,
gef.: 7098 (M+H₂O+
2H⁺), 7114 (M+H₂O-2H⁺)
 - neg2429: tgc tgc ttt tta ata a:tt att a 8.9 OD, 82% HPLC-rein
MALDI-MS: ber.:7042,
gef.: 7040 (M-2H⁺)

Verzweigte CpG- ODN:

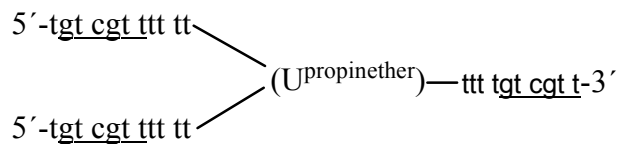
- branch-2:



3.8 OD, 10% LC-MS rein

LC-MS: ber.: 8714,gef.: 8715 (M+H⁺)

- branch-4:

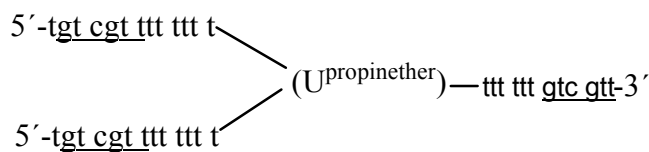


2.8 OD

MALDI-MS: ber.: 10600,

gef.: (Abbrüche)

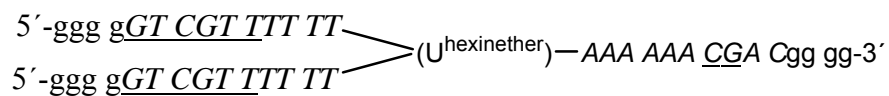
- branch-6:



1.7 OD, 12% LC-MS rein

LC-MS: ber.: 12556,gef.: 12559 (M+3H⁺)

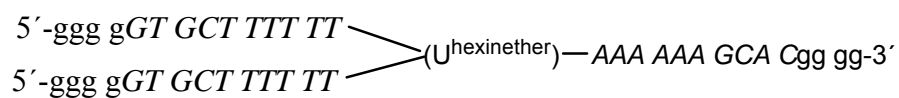
- posVerzw.:



10.0 OD, 63%-HPLC rein

MALDI-MS: ber.: 13702,gef.: 13701 (M-H⁺)

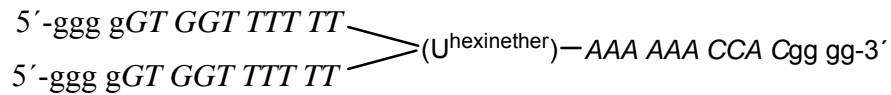
- negVerzw.:



19.7 OD, 68% HPLC rein

MALDI-MS: ber.: 13702,
gef.: 13786
(M+2Na⁺+K⁺-H⁺)

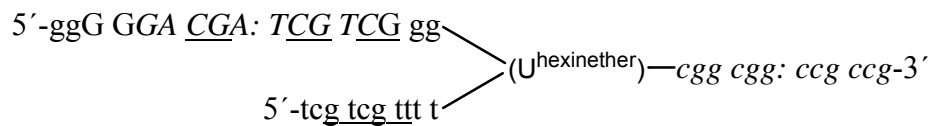
- branch suppressiv (n=4/komplementär):



2.1 OD

MALDI-MS: ber.: 13742,
gef.: 13758
(M+H₂O-2H⁺)

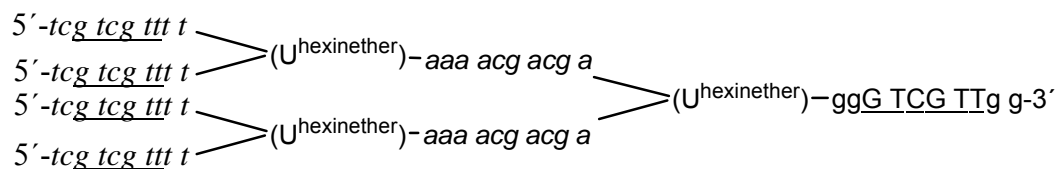
- branch 2429/2216:



0.4 OD

MALDI-MS: ber.: 11965,
gef.: (Abbrüche)

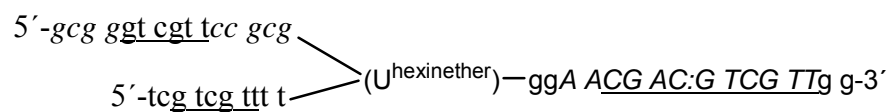
- dendri (n=2, komplementär):



20.0 OD

MALDI-MS: ber.: 23992,
gef.: (Abbrüche)

- ABC:



45.2 OD, MALDI-MS:
ber.:13316, gef.: (Abbrüche)

6.3.7 Reinheit der ODN

Die Aufreinigung der Oligodesoxynukleotide mit Hilfe der HPLC war eine gewaltige Herausforderung. Nach vielen Syntheseranläufen, Testung verschiedener HPLC-Säulen und Gradienten war es gelungen, teilweise gute bis sehr gute Reinheiten laut HPLC zu erreichen, insbesondere bei unmodifizierten linearen ODN. Um sicherzugehen, dass die eigens hergestellten ODN im Rahmen des auf dem Markt üblichen Reinheitsstandards lagen, wurde von der Firma *Biospring* die ODN pos (bought) und neg (bought) und mit den eigens hergestellten verglichen: Während das selbstsynthetisierte ODN „pos“ der Sequenz tgtcgt₁₅ eine HPLC-Reinheit von 92.7% aufwies, erreichte das gekaufte nur 68.0%, das gekaufte ODN „neg“ der Sequenz tgtgct₁₅ war mit 74.6% HPLC-Reinheit ähnlich rein wie das selbst synthetisierte mit 75.1%. Beispiele von analytischen HPLC-Spektren sind in Kapitel 8.6 zu finden.

6.4 Liste der synthetisierten Verbindungen

- 6-Oxo-2',3',5'-tri-*O*-acetyl-cytidin **28**
- 6-Oxocytidin **29**
- 4-*N*-(Dimethylformamidin)-6-oxocytidin **30**
- 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra-(*iso*-propyl)-di-siloxan **31**
- 4-*N*-(Dimethylformamidin)-6-oxo-3',5'-*O*-[1,1,3,3-tetra-(*iso*-propyl)-di-siloxan-1,3-diyl]-cytidin **32**
- 1-Methoxy-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose **33**
- 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose **34**
- 5-Nitrocytosin **35**
- 5-Nitro-3',5'-di-*O*-toluoyl-2'-desoxycytidin **36**
- 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-5-nitrocytidin **37**
- 5-Nitrocytidin **38**
- 4,6-Diamino-2-thiopyrimidin **39**
- 4,6-Diamino-2-(thiomethylencarboxyl)-pyrimidin **40**
- 6-Aminocytosin **41**
- 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin **42**
- 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin **43**
- 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin **44**
- 4-*N*-Benzoyl-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin **45**
- 4-*N*-Benzoyl-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin **46**

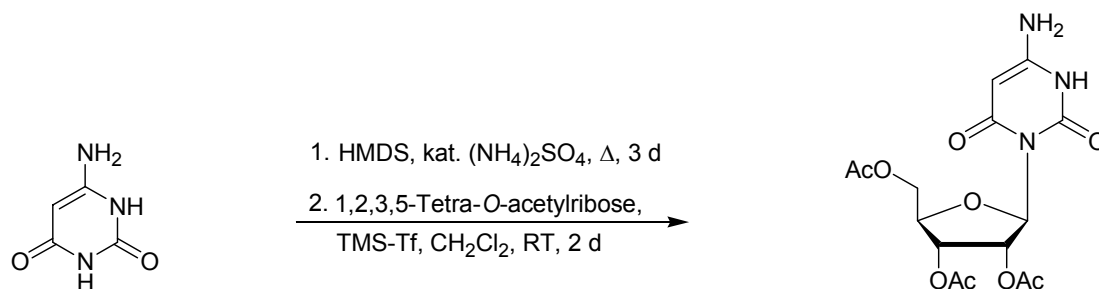
- 3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxycytidin **47**
- 3',5'-Di-*O*-acetyl-5-iod-2'-desoxycytidin **48**
- 5-Iod-2'-desoxycytidin **49**
- 4-*N*-(Dimethylformamidin)-5-iod-2'-desoxycytidin **50**
- 4-*N*-(Dimethylformamidin)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxycytidin **51**
- 3'-*O*-[2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-4-*N*-(dimethylformamidin)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxycytidin **52**
- 5'-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxyuridin **53**
- *O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-propargylether **54**
- 5-[*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-propargylether]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **55**
- 3'-*O*-[2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5-[*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-propargylether]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **56**
- *O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-propargylether **57**
- 1-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5-in-1-ether **58**
- 5'-*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-5-(hex-5-in-1-ether)-2'-desoxyuridin **59**
- 5-[*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **60**
- 3'-*O*-[2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5-[1''-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **61**
- 1-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5-in-1-ether **62**
- 5-[1''-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **63**
- 5-[1''-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-aminphosphin]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **64**
- 5-[1''-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **65**
- 5-(But-3''-in-1''-ol)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **66**
- *p*-Brom-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-benzylether **67**
- *O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-benzylether-*p*-boronsäure **68**
- 5'-*O*-Benzoyl-thymidin **69**
- 5'-*O*-Benzoyl-3'-*O*-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-thymidin **70**

6.5 Darstellung und Charakterisierung der Einzelverbindungen

Die Reaktionen wurden in getrockneten Apparaturen unter Argonatmosphäre unter Verwendung der Schlenk-Technik durchgeführt. Es wurde stets destilliertes Wasser verwendet.

6.5.1 Synthese von 6-Oxocytidin-Derivaten

Synthese von 6-Oxo-2', 3', 5'-tri-*O*-acetyl-cytidin (**28**) mit Hexamethyldisilazan



6-Oxocytosin wurde in einer Mischung aus Essigsäure und Wasser umkristallisiert und in der Trockenpistole bei 140°C im Vakuum über Nacht über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Reaktion fand in ausgeheizten Gefäßen unter Argonatmosphäre statt.

6.45 g (50.7 mmol, 1.1 eq) 6-Oxocytosin wurden in 100 ml (473.5 mmol, 9.8 eq) Hexamethyldisilazan suspendiert. Eine Spatelspitze Ammoniumsulfat wurde dazugegeben. Es wurde drei Tage refluxiert, nach zwei Stunden bildete sich eine hellgelbe Reaktionslösung. Im Vakuum wurde HMDS entfernt. Zurück blieb ein farbloser Feststoff, der in 100 ml abs. 1,2-Dichlorethan gelöst wurde. Zu dieser klaren gelben Lösung wurden 15.3 g (48.1 mmol, 1.0 eq) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose zugegeben. 9.2 ml (50.7 mmol, 1.1 eq) Trimethylsilyltriflat wurden dazugespritzt. Die Reaktionslösung wurde zwei Tage lang bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der beige-farbige Feststoff wurde in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Ein unlöslicher farbloser Feststoff (nicht abreagiertes 6-Oxocytosin) wurde durch Filtration entfernt. Anschließend wurde das Filtrat säulenchromatographisch getrennt (CH_2Cl_2 : CH_3OH , 9 : 1).

Ausbeute: 3.93 g (15.2 mmol, 32%)

R_f : 0.31 (CH_2Cl_2 : CH_3OH , 9 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 385.3

gef.: 386.0 ($\text{M}+\text{H}^+$), 408.0 ($\text{M}+\text{Na}^+-\text{H}^+$), 771.4 (Dimer), 793.4
(Dimer+ Na^+-H^+), 258 (3,5,2Ribose⁺), 127.9 (6-Oxocytosin⁺)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm), 250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$

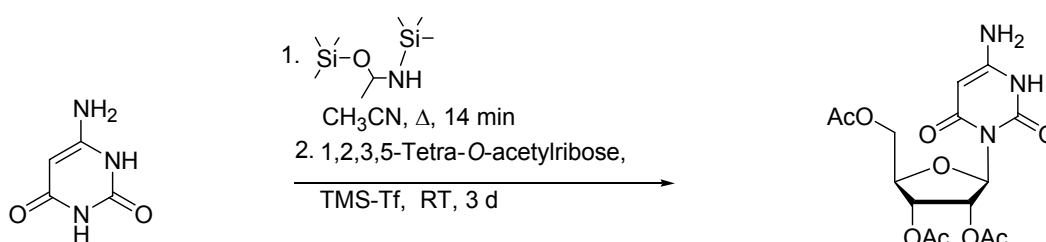
10.56 (br s, 1H, NH), 6.40 (br s, 2H, NH₂), 6.09 (br s, 1H, H1'), 5.57 (m, 1H, H2'), 5.40 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, H3'), 4.50 (s, 1H, H5), 4.26 (m, 1H, H4'), 4.23-3.93 (m, 2H, H5'), 2.00, 1.94, 1.85 (3*s, 9H, OAc)

¹³C-NMR:

δ (ppm), 63 MHz, DMSO-*d*₆

170.4 (C=O), 169.9 (C=O), 169.7 (C=O), 162.3 (C6), 154.7 (C4), 150.6 (C2), 85.0 (C1'), 78.1 (C4'), 74.0 (C5), 73.0 (C2'), 70.2 (C3'), 63.4 (C5'), 20.8 (CH₃), 20.7 (CH₃), 20.6 (CH₃)

Synthese von 6-Oxo-2',3',5'-tri-*O*-acetyl-cytidin (**28**) mit Bis-*N,O*-(trimethylsilyl)-acetamid



2.00 g (15.7 mmol) 6-Oxocytosin wurden bei 140°C, 4.37 g (13.7 mmol, 0.9 eq) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl-ribose wurden bei 40 °C zwei Tage in der Trockenpistole über Phosphorpentoxid getrocknet.

2.00 g (15.7 mmol) 6-Oxocytosin wurden in 50 ml abs. Acetonitril suspendiert. 40 ml (163.6 mmol, 10.4 eq) Bis-*N,O*-(trimethylsilyl)-acetamid wurden dazugegeben. Die beige Suspension wurde 15 min refluxiert, währenddessen bildete sich eine gelbe Lösung. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt. 4.37 g (13.7 mmol, 0.9 eq) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetylribose wurden in einem separaten Schlenkkolben in 30 ml abs. Acetonitril gelöst und zur Reaktionslösung über eine Spritze zugegeben. 2.8 ml (11.5 mmol, 0.7 eq) Trimethylsilyltriflat wurden langsam zugetropft. Die Reaktion wurde drei Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung und anschließend mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung extrahiert. Ein sehr feinpulvriger beiger Niederschlag von nicht reagiertem 6-Oxocytosin fiel aus und war schwer vom Produkt zu trennen - sowohl chromatographisch als auch durch Filtration.

Ausbeute: 1.60 g (4.0 mmol, 25%)

R_f: 0.23 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 9 : 1)

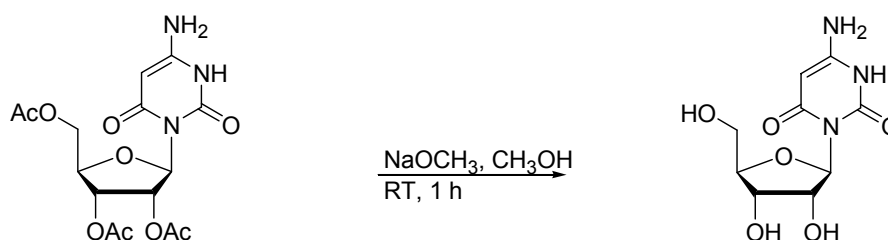
ESI-MS(+): ber.: 385.3

gef.: 386.0 (M+H⁺), 408.0 (P+Na⁺), 771.4 (Dimer), 258.8
((OAc)₃ribose⁺)

¹H-NMR: δ (ppm), 250 MHz, DMSO-*d*₆
10.67 (br s, 1H, NH), 6.52 (br s, 2H, NH₂), 6.22 (br s, 1H, H1'), 5.72-
5.69 (m, 1H, H2'), 5.53 (m, 1H, H3'), 4.62 (s, 1H, H5), 4.40-4.35 (m,
1H, H4'), 4.18-4.07 (m, 2H, H5'), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 3H,
OAc), 2.07 (s, 3H, OAc)

¹³C-NMR: δ (ppm), 63 MHz, DMSO-*d*₆
170.0 (C=O), 169.9 (C=O), 169.7 (C=O), 162.3 (C6), 154.7 (C4), 150.7
(C2), 78.1 (C4'), 74.0 (C5), 73.0 (C2'), 70.2 (C3'), 63.4 (C5'), 20.8
(CH₃), 20.7 (CH₃), 20.6 (CH₃)

Synthese von 6-Oxocytidin (**29**)



2.29 g (5.9 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-6-oxocytidin wurden in 7 ml Methanol gelöst. 1.2 ml (6.48 mmol, 1.1 eq) einer 5.4 M methanolischen NaOCH₃-Lösung wurden dazugegeben und eine Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde mit Hilfe des Ionenaustauschers *Dowex 50 W X 8* die Reaktionslösung neutralisiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das verbleibende gelbe Gel aus Wasser kristallisiert. Ein farbloser Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 1.23 g (4.7 mmol; 80%)

R_f: 0.26 (EtOAc : CH₃OH, 4 : 1)

ESI-MS(-): ber.: 259.2

gef.: 257.9 (M-H⁺), 517.2 (Dimer)

¹H-NMR: δ (ppm), 250 MHz, DMSO-*d*₆
10.42 (s, 1H, NH), 6.35 (s, 2H, NH₂), 6.02 (d, ³J = 3.8 Hz, 1H, H1'),
4.93 (d, ³J = 5.3 Hz, 1H, 2'-OH), 4.76 (m, 1H, 5'-OH), 4.61 (m, 1H, 3'-

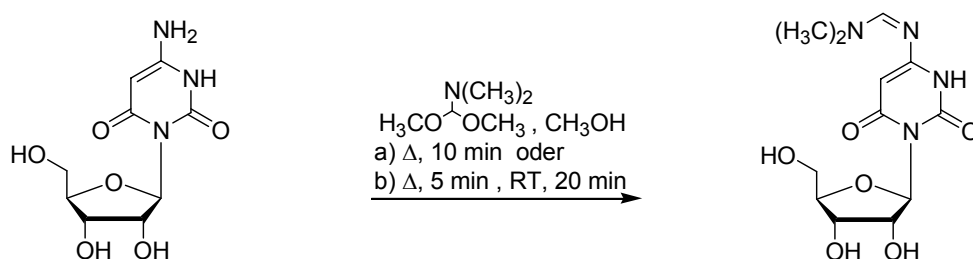
OH) 4.55 (s, 1H, H5), 4.50-4.43 (m, 2H, H2'), 4.07 (m, 1H, H3'), 3.69-3.54 (m, 1H, H4'), 3.43 (m, 2H, H5')

^{13}C -NMR:

δ (ppm); 63 MHz, DMSO- d_6

162.3 (C6), 154.0 (C4), 150.7 (C2), 86.7 (C1'), 84.0 (C4'), 74.0 (C5), 71.0 (C2'), 70.2 (C3'), 62.4 (C5')

Synthese von 4-*N*-(Dimethylformamidin)-6-oxocytidin (**30**)



6-Oxocytidin wurde über Nacht bei 40°C über P_2O_5 in der Trockenpistole getrocknet.

a) 3.93 g (15.2 mmol) 6-Oxocytidin wurden in 100 ml abs. Methanol suspendiert und mit 11 ml (76.0 mmol, 5 eq) Dimethylformamid-dimethoxyacetal 10 min refluxiert, dabei färbte sich die Reaktionslösung orange. Sie wurde auf RT abgekühlt, anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte (CH_2Cl_2 : CH_3OH : NEt_3 , 90 : 10 : 0.5 \rightarrow 60 : 10 : 0.35). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.53 g (4.9 mmol, 32%)

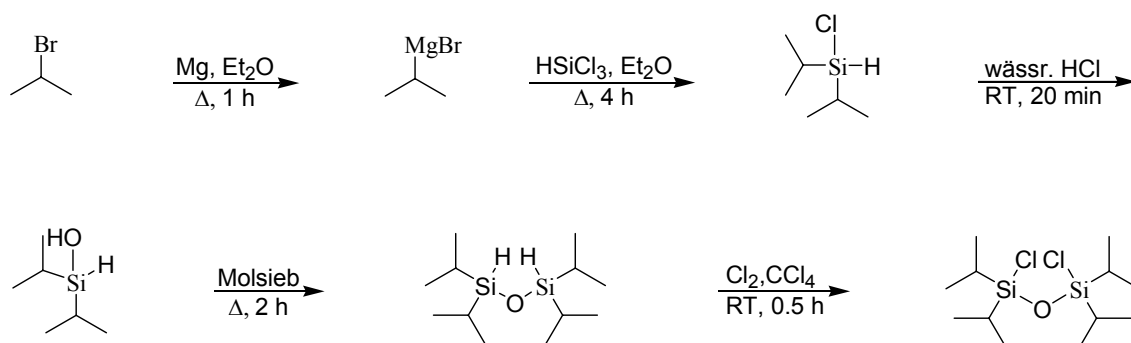
b) 5.3 g (20.4 mmol) 6-Oxocytidin wurden in 100 ml abs. Methanol suspendiert und refluxiert. Innerhalb von 5 min wurden 12 ml (84.0 mmol, 4 eq) Dimethylformamid-dimethoxyacetal zugegeben. 5 min wurde refluxiert, dabei bildete sich eine dunkelorangene Reaktionslösung. Anschließend wurde auf RT abgekühlt und noch 20 min bei RT gerührt. Es wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH_2Cl_2 : CH_3OH : NEt_3 , 90 : 10 : 0.5 \rightarrow 60 : 10 : 0.35) durchgeführt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.36 g (14.4 mmol, 71%)

R_f: 0.25 (CH_2Cl_2 : CH_3OH : NEt_3 , 60 : 10 : 0.35)

ESI-MS(-):	ber.: 314.3 gef.: 313.1 (M-H ⁺), 349.0 (M+Cl ⁻), 627.4 (Dimer-H ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 10.60 (br s, 1H, NH), 8.13 (s, 1H, NCHN(CH ₃) ₂), 6.03 (d, ³ J = 3.8 Hz, 1H, H1'), 5.05 (s, 1H, H5), 4.94 (m, 1H, 2'-OH), 4.77 (m, 1H, 3'-OH), 4.58 (m, 1H, 5'-OH), 4.46 (m, 1H, H2'), 4.08 (m, 1H, H3'), 3.64 (m, 1H, H4'), 3.42-3.31 (m, 2H, H5'), 3.16 (s, 3H, NCH ₃), 3.09 (s, 3H, NCH ₃)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 63 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 163.6 (C6), 159.2 (C4), 157.0 (N=C _H -N(CH ₃) ₂), 151.2 (C2), 87.0 (C1'), 84.2 (C4'), 81.0 (C5), 71.0 (C2'), 70.2 (C3'), 62.5 (C5'), 40.3 (NCH ₃), 34.3 (N(C _H 3))

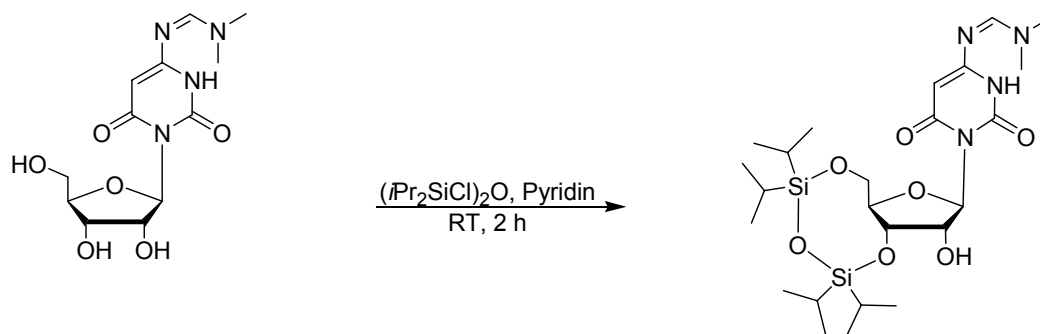
Synthese von 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra-(*iso*-propyl)-di-siloxan (**31**)



19.50 g (0.8 mol, 5.7 eq) Magnesium-Späne wurden in 100 ml abs. Diethylether vorgelegt. 78 ml (0.8 mol, 5.7 eq) 2-Bromopropan in 150 ml abs. Diethylether wurden langsam zugetropft. Ein farbloser Niederschlag (MgBrCl) bildete sich. Die Suspension färbte sich grau. Nach 1.5 h Refluxieren wurde auf RT abgekühlt und in zwei Portionen 28 ml (0.3 mol, 2 eq) Trichlorsilan in 350 ml abs. Diethylether zugetropft. Nach dem Abkühlen auf RT wurde langsam 300 ml 10%ige Salzsäure zugetropft. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂, die Etherphase mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die gelbe Flüssigkeit wurde drei Stunden über Molsieb refluxiert. Bei einem Siedepunkt von 103°C bei 17 mbar wurde das Produkt abdestilliert.

Ausbeute:	29.34 g (93.0 mol, 66%)
Sdp.:	17 mbar /103 °C (lit.: 110-112 °C bei Normaldruck)
ESI-MS(-):	ber.: 315.4 gef.: 313.0, 315.0, 315.9, 317.0 (M-H ⁺ u. Cl-Isotope)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, CDCl ₃ 1.16-0.99 (m, 28H, <i>i</i> Pr)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 63 MHz, CDCl ₃ 17.1 (CH ₃), 12.9 (CH), 12.8 (CH)

Synthese von 4-*N*-(Dimethylformamidin)-6-oxo-3',5'-*O*-(1'', 1'', 3'', 3''-tetra-(*iso*-propyl)-di-siloxan-1,3-diyl)-cytidin (32)



1.94 g (6.0 mmol) 4-*N*-(dimethylformamidin)-6-oxocytidin wurden in 40 ml abs. Pyridin gelöst. 2.2 ml (8.8 mmol, 1.1 eq) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra-(*iso*-propyl)-di-siloxan wurden bei 0°C zugespritzt, dabei bildete sich eine gelbe Lösung. Nach 30 min Rühren bei RT fiel ein farbloser Niederschlag aus. Nach 1.5 h war kein Edukt mehr dünnschichtchromatographisch detektierbar. Die Reaktion wurde nach zwei Stunden durch Zugabe von Methanol gequench und eingengt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung und wässriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es wurde mit Toluol koevaporiert. Der verbleibende farblose Feststoff wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂ : CH₃OH : NEt₃, 90 : 10 : 0.5).

Ausbeute:	0.43 g (0.8 mmol, 13%)
R _f :	0.67 (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH, 9 : 1)
ESI-MS(-):	ber.: 556.8

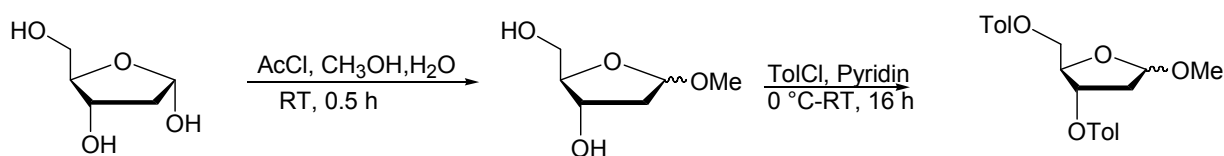
gef.: 555.3 (M-H⁺), 536.4 (M-OH), 500.3 (M-CHN(CH₃)₂), 313.1 (M-1,1,3,3-Tetra-(*iso*-propyl)-di-silazan), 277.2 (*i*Pr₂Si(OH)OSi(O⁻)Si*i*Pr₂)

¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, CDCl₃
 10.75 (br s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, N=CHN), 6.00 (br s, 1H, H1'), 5.07 (s, 1H, H5), 4.86 (m, 1H, H3'), 4.72 (d, ³J = 4.3 Hz, 1H, 2'-OH), 4.38 (m, 1H, 2'H), 3.89 (d, ³J = 4.1 Hz, 2H, 5'H), 3.68 (m, 1H, 4'H), 3.10 (s, 3H, NCH₃), 2.97 (s, 3H, NCH₃), 1.07 (m, 28H, *i*Pr)

¹³C-NMR: δ (ppm); 62.9 MHz, CDCl₃
 163.1 (C6), 159.2 (C4), 157.0 (N=CHN), 80.3 (C4'), 72.8 (C2'), 71.4 (C3'), 34.3 (NCH₃), 17.4(CH₃), 17.2(2*CH₃), 16.9 (2*CH₃), 12.7 (CH), 12.5 (CH), 12.2 (CH), 12.1 (CH).

6.5.2 Synthese von 5-Nitro-2'-dC-Derivate

Synthese von 1-Methoxy-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose (**33**)

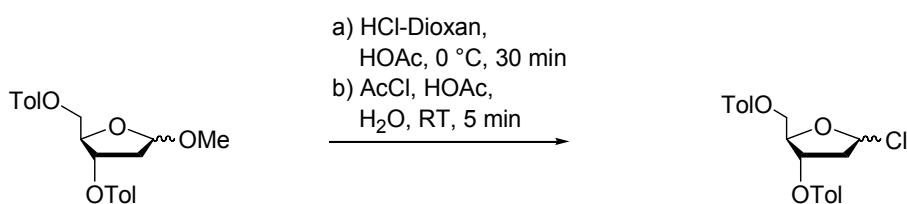


Über Nacht wurde 2-Desoxy-D-ribose im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

5 g (37.0 mmol) 2-Desoxy-D-ribose wurden in 245 ml abs. Methanol suspendiert. 9 ml einer 1.7%igen methanolischen HCl-Lösung, die frisch aus 0.85 ml Acetylchlorid und 50ml Methanol hergestellt wurde, wurde zum Reaktionsgemisch dazugegeben und bei RT 30 min gerührt. Mit NaHCO₃ wurde neutralisiert und zur Trockene eingengt. Anschließend wurde dreimal mit Pyridin koevaporiert. 30 ml abs. Pyridin wurde zugegeben. Bei 0 °C wurde 11 ml (81.0 mmol, 2.2 eq) *p*-Toluoylchlorid innerhalb von 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde mit Wasser gequench und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen, mit zwei normaler wässriger Salzsäure und gesättigter wässriger NaHCO₃ neutralisiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Toluol wurde im Vakuum entfernt. Ein zähflüssiges, braunes Öl wurde erhalten.

Ausbeute: 13.26 g (34.0 mmol, 92%)
 R_f: 0.81 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 95 : 5) 1-Methoxy-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose, 0.41 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 95 : 5) 1-*O*-Methoxy-2-desoxyribose (Färbereagenz: Schwefelsäure-Anisaldehyd-Tauchlösung)
 ESI-MS(+): ber.: 384.4
 gef.: 385.3 (M+H⁺), 401.9 (M+NH₄⁺), 352.9 (M-OCH₃)
¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, CDCl₃
 7.81-7.02 (m, 8H, H_{arom.}), 5.51 u. 5.32 (m, 1H, H1'),
 Anomerenverhältnis 0.7 : 0.6), 5.12 (m, 1H, H3'), 4.58-4.45 (m, 3H, H4' u. H5'), 3.31 (2*s, 3H, OCH₃), 2.45 (m, 2H, H2'), 2.30 (m, 6H, CH_{3Tol})

Synthese von 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose (**34**)



a) 13.26 g (34.0 mmol) 1-Methoxy-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose wurde in 16 ml (280 mmol, 8.2 eq) 100%iger Essigsäure gelöst. Unter Eiskühlung wurde 21 ml (84.0 mmol HCl, 2.5 eq HCl) einer 4 molaren HCl-Dioxan-Lösung zugespritzt. Nach einer halben Stunde fiel ein farbloser Niederschlag aus, der abfiltriert und mit kaltem Diethylether mehrmals gewaschen wurde.

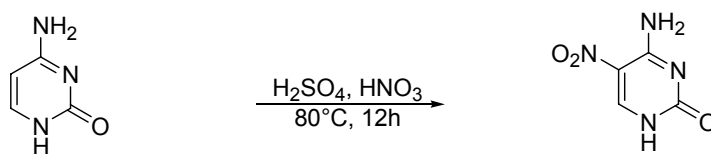
Ausbeute: 8.08 g (20.8 mmol, 61%)

b) 13.5 g (35.0 mmol) 1-Methoxy-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose wurde in 20 ml Essigsäure gelöst. Eine HCl-Essigsäurelösung wurde frisch hergestellt: 40.5 ml (0.7 mol, 20 eq) Essigsäure und 2 ml (0.1 mol, 3 eq) Wasser wurden auf Eis gestellt. 8.1 ml (0.1 mol, 3 eq) Acetylchlorid wurden ohne Rühren der Lösung zugegeben. Damit das freiwerdende HCl-Gas nicht aus der Reaktionslösung entweicht, wurde auf ständiges Rühren verzichtet. 31.5 ml (1.9 eq HCl) dieser Lösung wurde zur 2-Desoxyribose-Lösung dazugegeben. 2.5 ml (0.035 mol, 1 eq) Acetylchlorid wurden dazugegeben. Es bildete sich schnell ein farbloslich-rosa Niederschlag,

der abfiltriert wurde und mehrmals mit kaltem Diethylether gewaschen wurde, bis die rosa Farbe verschwunden war. Ein farbloses Pulver wurde erhalten.

Ausbeute:	6.77 g (17.4 mmol, 50%)
R _f :	0.88 (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH, 95 : 5)
ESI-MS(+):	ber.: 388.8 gef.: 389.3 (M+H ⁺), 432.1 (M+2Na ⁺), 462.1 (M+K ⁺ +2NH ₄ ⁺), 353.2 (M-Cl ⁻ +H ⁺), 796.4 (Dimer+NH ₄ ⁺ +4H ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 400 MHz, CD ₂ Cl ₂ 7.90-7.13 (m, 8H, H _{arom.}), 6.41 u. 6.35 (2*dd, ³ J = 24.0 u. 4.0 Hz, 1H, 1'H, Intensitätsverhältnis 1 : 0.3 der 2 Anomeren), 5.46 (m, 1H, H3'), 4.75 (m, 1H, H4'), 4.59-4.41 (m, 2H, H5'), 2.84-2.63 (m, 2H, H2'), 2.34 (d, ⁴ J = 8.0 Hz, 3H, CH ₃), 2.31 (d, ⁴ J = 8.0 Hz, 3H, CH ₃)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 101 MHz, CD ₂ Cl ₂ 181.9 (C=O), 166.6, 166.4, 166.3, 144.9, 144.8, 144.6, 144.5, 130.4, 130.1, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 127.4 u. 127.3 (C _{arom.}), 96.2 u. 96.0 (C1'), 85.2 u. 84.5 (C4'), 74.1 u. 74.0 (C3'), 64.6 u. 63.9 (C5'), 44.9 u. 44.8 (C2'), 21.8 (CH ₃)

Synthese von 5-Nitrocytosin (**35**)

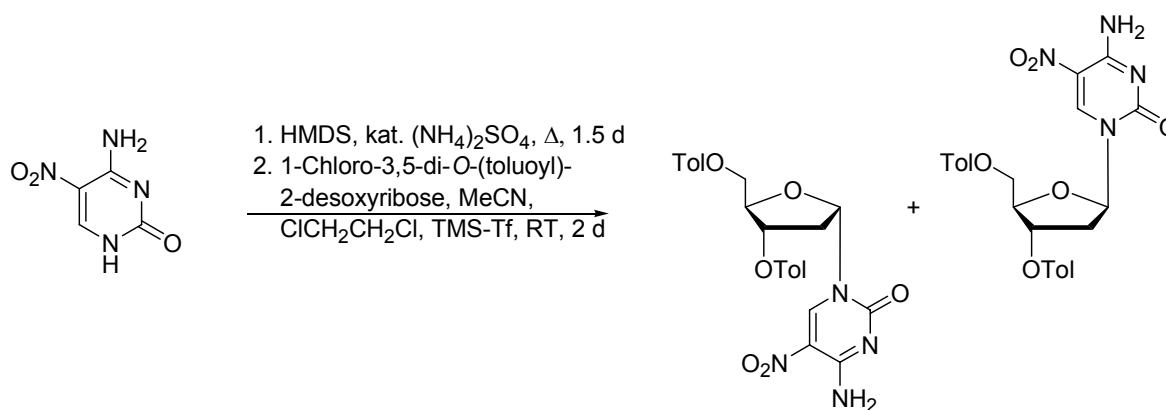


Cytosin wurde bei 60 °C über P₂O₅ in der Trockenpistole über Nacht getrocknet.

2.5 ml (300.0 mmol, 16.6 eq) 100%iger HNO₃ und 2.5 ml (46.0 mmol, 2.5 eq) 95-97%ige Schwefelsäure wurden vorgelegt. 2.82 g (18.1 mmol) Cytosin wurde portionsweise zugegeben. Die Suspension wurde 12 Stunden auf 80 °C erhitzt, dabei bildeten sich braune Dämpfe (nitrose Gase). Die gelbe Suspension wurde auf 100 g Eis gegeben und mit wässriger NaOH-Lösung neutralisiert. Bei pH 7 wurde das Produkt als farbloser Feststoff abfiltriert. Das Produkt ist vollständig löslich in heißem Ammoniak oder 37%iger wässriger Salzsäure bei RT.

Ausbeute:	1.99 g (12.8 mmol, 71%)		
Smp:	> 280 °C (Lit.: > 300 °C)		
IR:	(cm ⁻¹ , KBr)		
	3384 (NH), 3168 u. 3075 (CH _{arom.}), 2572, 2050, 1950, 1870, 1685, 1654 (C=O), 1602 (NH), 1512 (NO), 1437 (C=C _{arom.}), 1345 (NO), 1320, 1287, 1241, 1137, 1103, 956, 849, 784, 765, 712, 668, 656, 588		
¹ H-NMR:	δ (ppm); 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆		
	12.22-11.37 (br s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, H6), 8.40 (s, 2H, NH ₂)		
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆		
	157.0 (C4), 154.0 (C2), 134.8 (C6), 118.0 (C5)		
E. A.:	ber.: 30.78% C	2.58% H	35.89% N
	gef.: 30.50% C	2.82% H	35.92% N

Synthese von 5-Nitro-3',5'-di-*O*-toluoyl-2'-desoxycytidin (**36**)



5-Nitrocytosin wurden in der Trockenpistole über P₂O₅ bei 80°C getrocknet.

1.00 g (6.4 mmol) 5-Nitrocytosin wurden mit einer Spatelspitze Ammoniumsulfat in 13.4 ml (64.0 mmol, 10 eq) Hexamethyldisilazan suspendiert und 1.5 Tage refluxiert. Nach zwei Stunden Refluxieren bildete sich eine klare Reaktionslösung. Nach 1.5 Tagen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, dreimal wurde mit abs. Toluol koevaporiert. Zwei Tage wurde im Vakuum getrocknet, bis ein farblos-brauner Feststoff zurückblieb, der in 20 ml abs. Acetonitril und 20 ml abs. 1,2-Dichlorethan suspendiert wurde. 1.67 g (4.3 mmol, 0.7 eq) 1-Chlor-3,5-di-*O*-toluoyl-2-desoxyribose und 0.26 ml (1.4 mmol, 0.2 eq) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat wurden dazugegeben. Nach zwei Tagen wurde mit Methanol gequench und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc gelöst und mit

gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung, anschließend mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Nicht abreagiertes Edukt wurde durch Filtration abgetrennt.

Nach Säulenchromatographie (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 95 : 1 → CH₂Cl₂ : CH₃OH, 90 : 10) konnten 1.57 g Rohprodukt erhalten werden, die in 23 ml Ethylacetat suspendiert, 2 min auf 50 °C erwärmt und durch Filtration vom entstandenem Niederschlag abgetrennt wurden. Das Filtrat wurde einrotiert, in 4 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 4 ml Ethanol ohne Erhitzen ausgefällt. Nach Umkristallisation in Ethylacetat bildeten sich kleine Kristalle, mit EtOH : CH₃OH, 1 : 1 feine farblose Nadeln.

Ausbeute: 310 g (0.7 mmol, 10%)

MALDI-MS: ber.: 508.5

gef.: 514.99 (M+Li⁺), 478.73 (M-NH₂-CH₃+H⁺),
352.27 (tol₂drib-H⁺), 619.67 (M+4Na⁺+H₃O⁺)

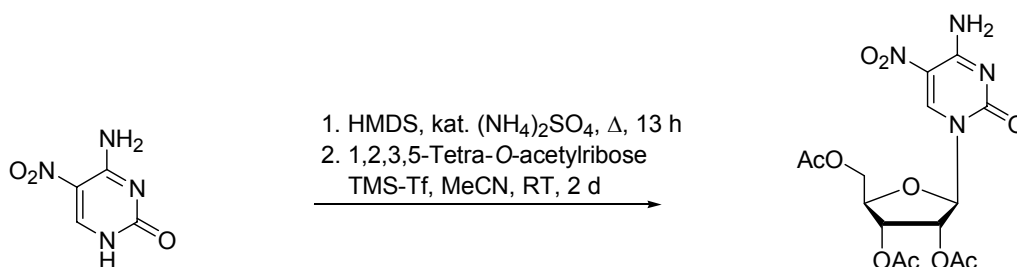
¹H-NMR: δ (ppm); 300 MHz, CDCl₃

9.08 u. 9.01 (2*br s, 1H, H6, Isomerenverhältnis 0.9 : 0.2), 7.87 u. 7.78 (2*s, 2H, NH₂), 7.74-7.07 (m, 8H, H_{arom.}), 6.25 u. 6.00 (2*dd, 1H, ³J = 9.0 u. 3.0 Hz, 1'H, Isomerenverhältnis 1 : 0.2), 5.56 (m, 1H, 4'H), 5.03 (m, 1H, 3'H), 4.50 (m, 2H, 5'H), 3.10 (m, 2H, 2'H), 2.32 (m, 6H, CH₃)

¹³C-NMR: δ (ppm); 75 MHz, CDCl₃

165.2 (C=O), 145.8 (C_{arom.}), 144.9 (C_{arom.}), 144.5 (C_{arom.}), 129.3 (C6),
126.4 (C_{arom.}), 124.8 (C5), 100.0 (C1'), 86.3 (C4'), 74.7 (C3'), 63.8 (C5'), 47.3 (C2'), 21.7(CH₃)

Synthese von 2',3',5'-Tri-O-acetyl-5-nitrocytidin (**37**)



Über Nacht wurde 5-Nitrocytosin bei 80°C über P₂O₅ in der Trockenpistole getrocknet.

1.39 g (8.9 mmol) 5-Nitrocytosin wurde mit einer Spatelspitze Ammoniumsulfat in 18.8 ml (89.0 mmol, 10 eq) Hexamethyldisilazan suspendiert und 8 h refluxiert. Nach 1.5 h bildete sich eine klare Lösung. Über Nacht wurde bei RT gerührt, am nächsten Tag wurde für 5 h

refluxiert. Hexamethyldisilazan wurde im Vakuum entfernt. Der verbleibende farblose Niederschlag wurde in 7 ml abs. Acetonitril suspendiert. 3.04 g (10.1 mmol, 1.1 eq) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetylribose, die über Nacht bei 45°C in der Trockenpistole über P₂O₅ getrocknet worden war, wurde zum Reaktionsgemisch dazugegeben. 1.6 ml (9.0 mmol, 1 eq) Trimethylsilyltriflat wurden zugespritzt, dabei bildete sich eine gelborangene Lösung, die 2 Tage bei RT gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der hellbraune Rückstand wurde in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, anschließend über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Kristallisieren aus Ethanol wurde ein feines, farbloses Pulver erhalten.

Ausbeute: 1.57 g (3.8 mmol, 43%)

Smp.: 107 °C

ESI-MS(+): ber.: 414.3

gef.: 414.9 (M+H⁺), 436.9 (M+Na⁺), 258.9 ((AcO)₃rib⁺)

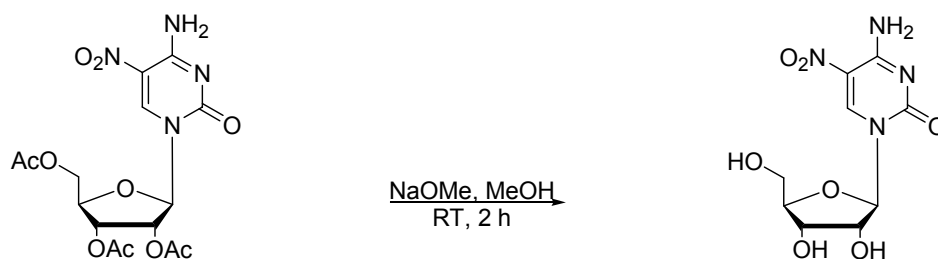
¹H-NMR: δ (ppm); 400 MHz, CDCl₃

9.22 (s, 1H, H6), 7.98 (s, 2H, NH₂), 6.12 (d, ³J = 3.4 Hz, 1H, H1'), 5.52 (dd, ³J = 5.3 u. 3.4 Hz, 1H, H2'), 5.34 (m, 1H, H3'), 4.50 (m, 1H, H4'), 4.46 (m, 2H, H5'), 2.23, 2.17, 2.11 (3*s, 9H, 3*OAc)

¹³C-NMR: δ (ppm); 150 MHz, CDCl₃

170.5, 169.5 u. 169.3 (CH₃CO₂), 157.3 (C4), 152.1 (C2), 145.4 (C6), 120.2 (C5), 89.2 (C1'), 80.0 (C2'), 74.0 (C3'), 68.9 (C4'), 61.9 (C5'), 20.7, 20.4 u. 20.4 (CH₃CO₂)

Synthese von 5-Nitrocytidin (**38**)



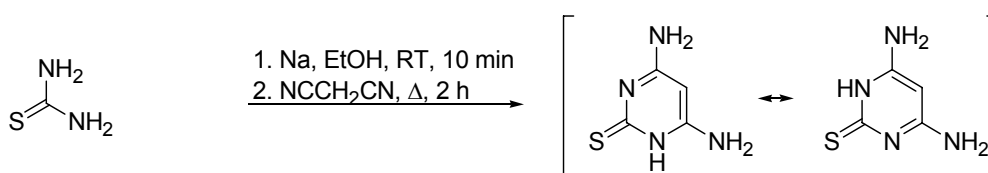
0.12 g (0.3 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-5-nitrocytidin wurden in 5 ml Methanol und 1 ml CH₂Cl₂ gelöst. 0.2 ml (1.1 mmol, 3.4 eq) 5.4 molare methanolische NaOCH₃-Lösung wurde

bei RT zugetropft und zwei Stunden gerührt. Mit dem Ionenaustauscher *DOWEX 50 W 8* wurde neutralisiert, dabei bildet sich ein beiger Feststoff, der aus Ethanol umkristallisiert anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt wurde (5 min 100% H₂O, 100% H₂O → H₂O : Methanol, 1 : 1 in 15 min → 100% CH₃OH in 10 min; *Nucleosil 300-7 C8*-Säule, *Macherey-Nagel*, Flußrate 7 ml/min).

Ausbeute:	34 mg (0.1 mmol, 37%)
Smp.:	ab 130 °C Zersetzung (Lit.: ab 120 °C Zersetzung)
R _f :	0.67 (CH ₃ OH : CH ₃ CN, 4 : 1)
ESI-MS(-):	ber.: 288.2 gef.: 287.1(M-H ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 400 MHz, CD ₃ OD 9.8 (s, 1H, H6), 7.7-7.1 (br s, 2H, NH ₂), 5.8 (br s, 1H, H1'), 4.1(m, 2H, H5'), 4.0 (m, 1H, H4'), 3.9 (m, 1H, H3'), 3.8 (m, 1H, H2')
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 62.9 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 167.3 (C=O), 143.0 (C5), 129.1 (C4), 128.0 (C6), 98.5 (C1'), 67.0 (C3'), 62.9 (C4'), 54.4 (C5'), 35.0 (C2')

6.5.3 Synthese von 6-Aminocytosin

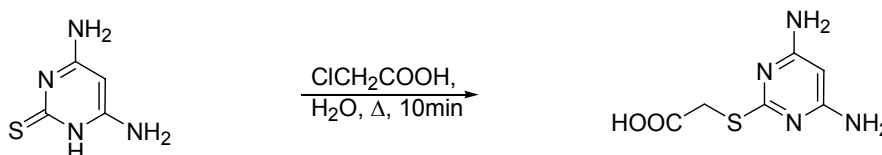
Synthese von 4,6-Diamino-2-thiopyrimidin (39)



Malonsäuredinitril (Sdp. 220 °C) wurde im Vakuum frisch destilliert. 9.45 g (0.4 mol, 1.1 eq) NaHCO₃ wurden in 300 ml abs. Ethanol vollständig gelöst. 30.05 g (0.4 mol, 1.0 eq) Thioharnstoff wurde dazugegeben. 25.08 g (0.4 mol) frisch destilliertes Malonsäuredinitril wurde dazugegeben. Die Suspension wurde zwei Stunden refluxiert, dabei bildete sich eine braune Lösung. Anschließend wurde sie auf RT abgekühlt, 50 ml destilliertes Wasser wurde dazugegeben. Mit Essigsäure wurde neutralisiert, dabei fiel ein brauner Niederschlag aus, der abgenutscht wurde und mit Wasser gewaschen wurde, wodurch dieser sich aufhellte. Der beige Feststoff wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute:	36.08 g (0.3 mol, 67%)
ESI-MS(+):	ber.: 142.2 gef.: 142.6 (M^+)
$^1\text{H-NMR}$:	δ (ppm); 250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ 11.66-11.16 (br s, 1H, NH), 7.32-7.00 u. 6.68 (2*s, 4H, 2*NH ₂ , Tautomerenverhältnis 11.5 : 0.4), 5.08 (s, 1H, H5)
$^{13}\text{C-NMR}$:	δ (ppm); 63 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ 177.2 (C2), 159.0 (C4 u. C6), 74.1 (C5)

Synthese von 4,6-Diamino-2-(thiomethylencarboxyl)-pyrimidin (**40**)

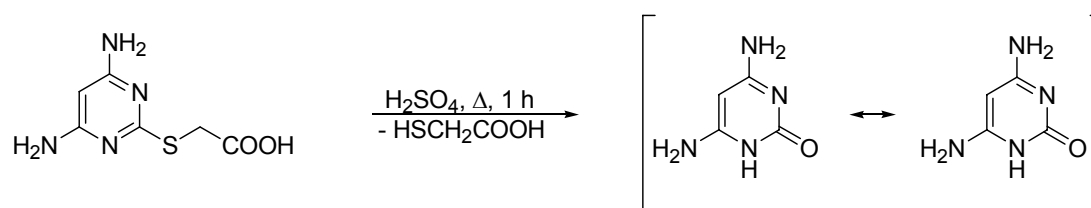


1.44 g (10.2 mmol) 4,6-Diamino-2-thiopyrimidin wurden in 10 ml Wasser suspendiert. 1.15 g (12.2 mmol, 1.2 eq) Chloressigsäure wurden zugegeben, dabei bildete sich eine klare Lösung, die 10 min zum Sieden erhitzt wurde. 1.4 ml (10.2 mmol, 1.0 eq) Triethylamin wurde zum Abfangen der freigesetzten Salzsäure dazugegeben. Die Reaktionslösung wurde eingengt und auf RT abgekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet. Die Rohausbeute betrug 2.116 g. Zum Umkristallisieren wurde das Rohprodukt in 10 ml Wasser suspendiert. 0.71 g (8.5 mmol, 1 eq bezogen auf die berechnete Menge an Produkt) NaHCO_3 wurden dazugegeben und zum Sieden erhitzt. Bei Zugabe von 50 ml Wasser bildete sich eine klare Lösung. Beim Abkühlen auf RT fiel das Edukt als farbloser Niederschlag aus und wurde abfiltriert. Anschließend wurde das Produkt durch Ansäuern des Filtrats mit 0.7 ml (8.5 mmol, 1 eq bezogen auf die berechnete Produktmenge) einer 37%igen Salzsäure als farbloses Pulver ausgefällt.

Ausbeute:	1.54 g (7.7 mol, 76%)
R_f :	0.37 ($\text{CH}_3\text{OH} : \text{EtOAc}$, 1 : 1), 0.28 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH}$, 1 : 1)
Smp.:	ab 240 °C Gelbfärbung, bis 280 °C Braunfärbung (lit.: 270-273 °C)
ESI-MS(-):	ber.: 200.2 gef.: 198.6 ($M\text{-H}^+$), 244.7 ($M+2\text{Na}^*-2\text{H}^+$), 398.7 (Dimer- H^+)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm); 250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$
 13.07-12.42 (br s, 1H, COOH), 6.16 (br s, 4H, 2^*NH_2), 5.19 (s, 1H, H5), 3.79 (s, 2H, CH_2),
 $^{13}\text{C-NMR}$: δ (ppm); 101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$
 170.8 (COOH), 167.2 (N=C-S), 165.3 (N(C=N)CH), 79.1 (C5), 32.3 (SCH₂)

Synthese von 6-Aminocytosin (41)

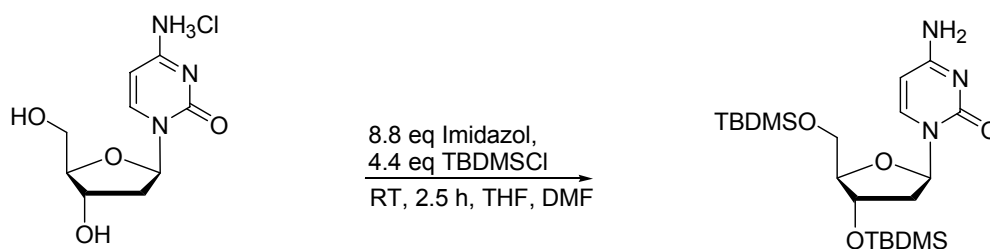


7.65 g (38.2 mmol) 4,6-Diamino-2-(thiomethylencarboxyl)-pyrimidin wurden in 75 ml Wasser zum Sieden erhitzt. Zu dieser Suspension wurden 9.5 ml (171.0 mmol, 4.5 eq) einer 18 molaren Schwefelsäure pipetiert, dabei bildete sich eine grünlich-bräunliche Lösung, die 1 Stunde refluxiert wurde. Die warme Lösung wurde über Aktivkohle vorsichtig abfiltriert. Beim Abkühlen auf RT fiel ein farbloser Niederschlag aus. Die farblosen Kristalle wurden abgenutscht und mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 2.27 g (10.1 mmol, 26%)
 ESI-MS(+): ber.: 126.1
 gef.: 126.8 (M+H⁺)
 $^1\text{H-NMR}$: δ (ppm); 400 MHz, Aceton- d_6
 10.02 u. 8.50 (2*br s, 1H, NH, Tautomerenverhältnis 3.7: 0.2), 3.56 (t, $^4J = 4.0$ Hz, 1H, H5)
 $^{13}\text{C-NMR}$: δ (ppm); 101 MHz, Aceton- d_6
 172.4 (C4), 167.4 (C2), 164.3 (C6), 160.0 (C5)

6.5.4 Synthese von 4-N-Benzoyl-3',5'-di-O-(tert-butylidimethylsilyl)- 5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin

Synthese von 3', 5'- Di-O-(tert-butylidimethylsilyl)-2'-desoxycytidin (42)



2.03 g (7.7 mmol) 2'-Desoxycytidin-hydrochlorid und 4.6 g (67.5 mmol, 8.8 eq) Imidazol wurden in einen ausgeheizten Schlenkkolben vorgelegt und unter Argonatmosphäre in 15 ml abs. Dimethylformamid gelöst. 33.5 ml (33.8 mmol, 4.4 eq) einer 1 molaren *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Tetrahydrofuran-Lösung wurden innerhalb von 15 min zugetropft. Nach 2.5 Stunden wurde die Reaktionslösung bis zur Trockene eingengt. Der feste Rückstand wurde in 100 ml gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung aufgenommen und mit 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mit 100 ml Wasser und 100 ml gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Rohausbeute: 3.26 g (7.1 mmol, 93%)

R_f: 0.64 (CHCl₃ : EtOH, 4 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 455.7

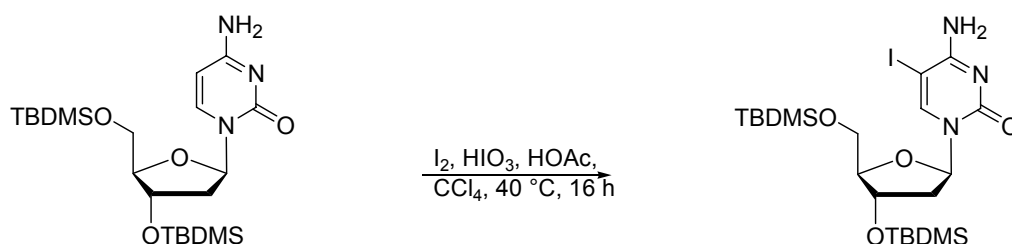
gef.: 456.4 (M+H⁺), 478.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR: δ (ppm); 300 MHz, CDCl₃

7.66 (d, ³J = 6.0 Hz, 1H, H6), 7.09 (br s, 2H, NH₂), 6.08 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, H1'), 5.65 (d, ³J = 6.0 Hz, 1H, H5), 4.28 (m, 1H, H3'), 3.74-3.61 (m, 3H, H4' u. H5'), 2.11-1.98 (m, 2H, H2'), 0.84 (s, 18H, C≡CH₃), 0.03 (s, 12H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ (ppm); 63 MHz, CDCl₃

165.7 (C4), 155.8 (C2), 141.2 (C6), 94.0 (C5'), 86.6 (C1'), 70.3 (C3'), 62.0 (C4'), 42.2 (C2'), 25.8 (C≡CH₃), 18.2 (C≡CH₃), -5.5 (SiCH₃), -4.6 (SiCH₃)

Synthese von 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- 5-iod-2'-desoxycytidin (43)

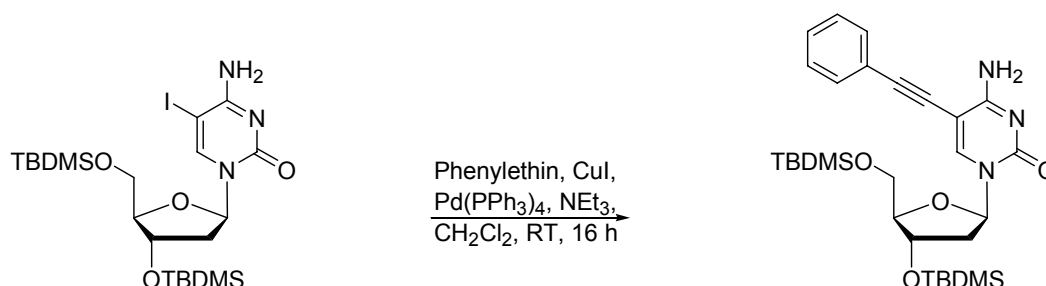
4.53 g (9.9 mmol) 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin wurden in 25 ml Essigsäure und 25 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und auf ca. 40°C erhitzt. 1.51 g (5.9 mmol, 0.6 eq) Iod und 1.57 g (8.9 mmol, 0.9 eq) Iodsäure wurden dazugegeben. Nach 16 Stunden wurde die Reaktionslösung bis zur Trockene eingengt. Der feste gelblich bis rötliche Rückstand wurde in 200 ml CH₂Cl₂ aufgenommen, die HIO₃ abfiltriert, die organische Phase mit 170 ml wässrige NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die roten Iodreste wurden durch Ausschütteln mit 150 ml einer gesättigten wässrigen Natriumthiosulfat-Lösung entfernt. Anschließend wurde die gelbe organische Phase mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, einrotiert und im Vakuum getrocknet. Es wurde aus einem Liter Essigsäureethylester umkristallisiert. Es bilden sich 3.93 g (6.8 mmol, 68%) fablose, glänzende, dünne Plättchen. Aus der Mutterlauge konnten des weiteren 655 mg (1.126 mmol, 11%) Produkt in Form eines farblosen Pulvers gewonnen werden.

Ausbeute:	4.59 g (7.9 mmol, 80%)
R _f :	0.61 (CHCl ₃ : CH ₃ OH, 9 : 1)
ESI-MS(+):	ber.: 581.6 gef.: 582.3 (M ⁺), 604.2 (M+Na ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 400 MHz, CDCl ₃ 9.00 (br s, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, H6), 6.16 (t, 1H, ³ J = 4.0 Hz, H1'), 5.58 (br s, 1H, NH), 4.28 (m, 1H, H3'), 3.92-3.67 (m, 3H, H5', H4'), 2.41-2.35 u. 1.92-1.86 (m, 2H, 2'H), 0.97 (s, 9H, CMe ₃), 0.91 (s, 9H, CMe ₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH ₃) ₂), 0.06 (s, 6H, Si(CH ₃) ₂),
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 63 MHz, CDCl ₃ 163.9 (C4), 154.8 (C2), 146.4 (C6), 88.2 (C5), 86.8 (C1'), 72.2 (C3'), 62.9 (C4'), 56.3 (C5'), 42.6 (C2'), 26.1 (C(CH ₃) ₃), 25.8 (C(CH ₃) ₃), 18.5 u. 18.0 (C(CH ₃) ₃), -4.6 (Si(CH ₃) ₂), -4.9 (Si(CH ₃) ₂), -5.1 (Si(CH ₃) ₂), -5.3 (Si(CH ₃) ₂)
Smp:	202-203°C (Zersetzung)

E. A.:	ber.: 43.36% C	6.93% H	7.22% N
	gef.: 43.14% C	6.88% H	7.06% N

Kristallstruktur: (s. Kapitel 8.5, Wittel et al., 2007) Interessanterweise zeigt die Kristallstrukturanalyse einen Einfachbindungscharakter für die N1-C2-Bindung, während C2-N3, N3-C4, C4-C5, C5-C6 und C6-N1 von den Bindungslängen zwischen denen einer Einfach- und Doppelbindung liegen.

Synthese von 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin (**44**)

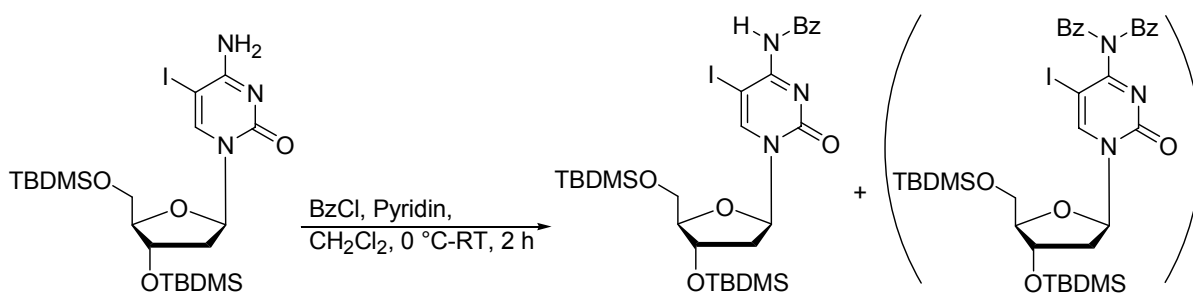


0.75 g (1.3 mmol) 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iodo-2'-desoxycytidin wurden in 31.5 ml CH₂Cl₂ und 13.5 ml (97.4 mmol, 74.9 eq) Triethylamin gelöst und 25 mal entgast. In einem separaten Kolben wurden 10.5 ml abs. CH₂Cl₂, 4.5 ml (32.5 mmol, 25.0 eq) Triethylamin und 0.57 ml (5.1 mmol, 3.9 eq) Phenylethin ebenfalls 25mal entgast und portionsweise innerhalb von vier Stunden zur Nucleosid-Lösung zugetropft. Nach der ersten Zugabe der Phenylethinlösung wurden 150 mg (0.13 mmol, 0.1 eq) Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium-(0) und 49.5 mg (0.3 mmol, 0.2 eq) CuI zur Nucleosid-Lösung zugegeben. Nach 4.5 Stunden wurde das Reaktionsgemisch bis zur Trockene eingedunstet, in 80 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Das Filtrat wurde mehrmals mit 5%iger wässriger Dinatrium-EDTA-Lösung ausgeschüttelt bis die hellblaue Farbe des Kupferions durch Komplexbildung mit EDTA verschwunden war, anschließend wurde die organische Phase mit Wasser und mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, und chromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 100 : 0 → 95 : 5). Feine farblose Nadeln ließen sich durch Kristallisation aus Methanol gewinnen.

Ausbeute:	0.54 g (1.0 mmol, 75%)
R _f :	0.48 (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH, 12 : 1)
ESI-MS(+):	ber.: 555.9

	gef.: 556.4 (M+H ⁺), 578.5 (M+Na ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, CDCl ₃ 8.11 (s, 1H, H6), 7.27-7.40 (m, 5H, H _{arom.}), 6.22 (t, 1H, ³ J = 6 Hz, H1'), 5.75 (br s, 1H, NH), 4.32 (m, 1H, H3'), 3.92-3.87 (m, 2H, H5'), 3.72 (m, 1H, H4'), 2.44-1.96 (m, 2H, H2'), 1.99 (2*s, 18H, C(CH ₃) ₃) 0.08 (2*s, 12H, Si(CH ₃) ₂),
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 63 MHz, CDCl ₃ 164.6 (C4), 154.4 (C2), 143.5 (C6), 131.4 (C _{ortho}), 128.8 (C _{para}), 128.5 (C _{meta}), 122.4 (C _{ipso}), 95.3 (C5), 90.8 (PhC≡C), 88.1 (C5'), 86.8 (C1'), 80.5 (PhC≡C), 71.5 (C3'), 62.6 (C4'), 42.7 (C2'), 26.0 (C(CH ₃) ₃), 25.8(C(CH ₃) ₃), 18.4 (C(CH ₃) ₃), 18.0 (C(CH ₃) ₃), -4.6 (Si(CH ₃) ₂), -4.9 (Si(CH ₃) ₂), -5.3 (Si(CH ₃) ₂), -5.4 (Si(CH ₃) ₂)
Smp:	204 °C
E. A.:	ber.: 62.66% C 8.16% H 7.56% N gef.: 62.38% C 7.96% H 7.35% N
Kristallstruktur:	(s. Kapitel 8.5) Die Bindungsabstände legen nahe, dass Phenylethincytosinyl ein vollständig delokalisiertes π System ist.

Synthese von 4-*N*-Benzoyl-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin (**45**)



1.56 g (2.7 mmol) 5-Iod-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin wurden in 20 ml abs. Pyridin und 5 ml abs. CH₂Cl₂ suspendiert. Bei 0° C wurden 0.5 ml (4.3 mmol, 1.6 eq) Benzoylchlorid langsam unter heftigem Rühren zugetropft. Zwei Stunden wurde bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Methanol gequench und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. In 25 ml CH₂Cl₂ wurde der gelbe Feststoff gelöst und mit 15 ml gesättigte wässrige NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit 30 ml Wasser, und mit 30 ml gesättigter wässriger NaCl-Lösung extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Der

Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt mit (EtOAc : CH₂Cl₂, 1 : 99). Ein farbloser bis gelblicher Feststoff wurde erhalten.

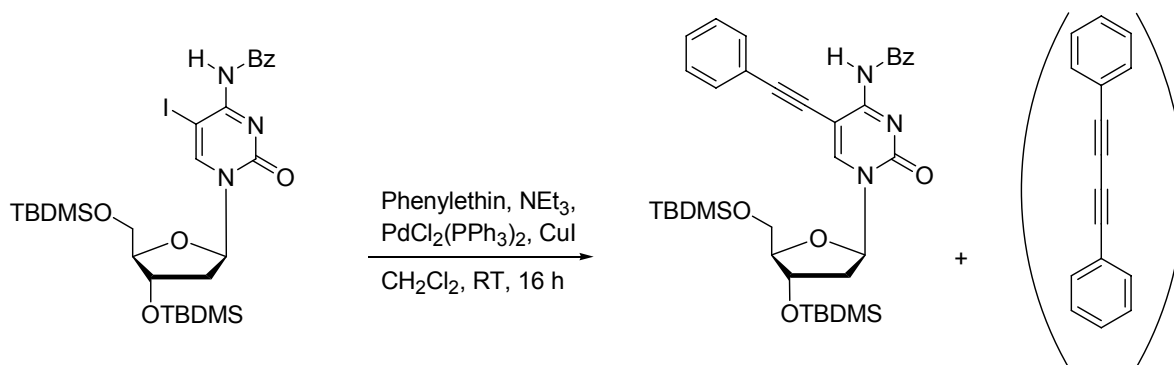
Ausbeute:	1.44 g (2.1 mmol, 79%)
R _f :	0.54 (Hexan : EtOAc, 1 : 1) monobenzoyliertes Nebenprodukt
ESI-MS(+):	ber.: 685.72 gef.: 686.3 (M ⁺), 708.3 (M+Na ⁺), 342.1 (5-Iod-4- <i>N</i> -benzoyl-cytosin+H ⁺), 441.3 (5-Iod-4- <i>N</i> -benzoyl-cytosin+HNEt ₃ ⁺), 787.4 (M+HNEt ₃ ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, CDCl ₃ 13.19 (br s, 1H, NH), 8.30-7.17 (m, 6H, H ₆ u. H _{arom.}), 6.20 (t, ³ J = 2.5 Hz, 1H, H1'), 4.32 (m, 1H, H3'), 3.93 (m, 1H, H4'), 3.85-3.66 (m, 2H, H5'), 2.33-1.89 (m, 2H, H2'), 0.84 (m, 18H, 2* <i>t</i> Bu), 0.05 (m, 12H, 2*Si(CH ₃) ₂)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 63 MHz, CDCl ₃ 156.9 (C ₄), 145.6 (C ₆), 136.7 (C _{arom.}), 132.8 (C _{arom.}), 130.3 (C _{arom.}), 128.3 (C _{arom.}), 88.7 (5'C), 86.5 (C1'), 72.7 (C3'), 63.1 (C4'), 42.3 (C2'), 26.2 (C(CH ₃) ₃), 25.8 (C(CH ₃) ₃), 18.6 (C(CH ₃) ₃), 18.0 (C(CH ₃) ₃), -4.6 (Si(CH ₃) ₂), -4.8 (Si(CH ₃) ₂), -5.1 (Si(CH ₃) ₂), -5.2 (Si(CH ₃) ₂)
E. A.:	ber.: 49.78% C 6.63% H 6.00% N gef.: 49.51% C 6.62% H 5.80% N

Nebenprodukt: 4-*N*-Dibenzoyl-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin

Ausbeute:	200 mg (0.3 mmol, 9%)
R _f :	0.37 (Hex : EtOAc, 1 : 1) dibenzoyliertes Produkt
ESI-MS(+):	ber.: 789.8 gef.: 790.4 (M+H ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, CDCl ₃ 8.42 (s, 1H, H ₆), 7.77-7.16 (m, 10H, H _{arom.}), 6.03 (t, ³ J = 5.00 Hz, 1H, H1'), 4.29 (m, 1H, H3'), 3.97 (m, 1H, H4'), 3.88-3.67 (m, 2H, H5'), 2.50-1.91 (m, 2H, H2'), 0.89-0.74 (m, 18H, <i>t</i> Bu), 0.04 (m, 12H, 2*Si(CH ₃) ₂)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 63 MHz, CDCl ₃

171.8 (C₄), 133.8 (C_{arom.}), 133.2 (C_{arom.}), 129.2 (C_{arom.}), 128.9 (C_{arom.}),
 26.2 (C(CH₃)₃), 25.7 (C(CH₃)₃), 18.6 (C(CH₃)₃), 18.0 (C(CH₃)₃), -4.5
 (Si(CH₃)₂), -4.9 (Si(CH₃)₂), -5.1 (Si(CH₃)₂), -5.2 (Si(CH₃)₂)

Synthese von 4-*N*-Benzoyl-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-(phenylethynyl)-2'-desoxycytidin (**46**)



0.51 g (0.7 mmol) 4-*N*-benzoyl-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin wurden in 128 ml abs. CH₂Cl₂ und 51 ml Triethylamin vorgelegt. 30 mal wurde entgast. 0.19 ml (1.7 mmol, 2.0 eq) Phenylethin, 10 mg (0.02 mmol, 0.02 eq) Di-chlor-di-(triphenylphosphin)-palladium-(II) und mit 3 mg (0.02 mol, 0.02 eq) CuI wurden zugegeben. Bei RT wurde über Nacht gerührt. Es hat sich ein farbloser wasserlöslicher Niederschlag gebildet, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mehrmals gegen 5%iger wässriger Dinatrium-EDTA-Lösung ausgeschüttelt bis die hellblaue Farbe des Kupferions durch Komplexierung mit EDTA verschwunden war. Anschließend wurde die organische Lösung mit Wasser und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan : EtOAc, 100 : 0 → 90 : 10).

Ausbeute: 0.21 g (0.3mmol, 45%)
 MALDI-MS: ber.: 660.0
 gef.: 661.74 (M+2H⁺), 699.75 (M+K⁺)
 ESI-MS(+): gef.: 660.1 (M+H⁺)
¹H-NMR: δ (ppm); 400 MHz, CDCl₃

8.67 (s, 1H, NH), 8.21-7.20 (m, 11H, H6 u. 2*Ph), 6.31 (t, $^3J = 8.0$ Hz, H1'), 4.35 (m, 1H, H3'), 3.97 (m, 1H, H4'), 3.75 (m, 2H, H5'), 2.50 (m, 2H, H2'), 0.97 (m, 18H, *t*Bu), 0.05 (m, 12H, Si(CH₃)₂)

Nebenprodukt: Di-(phenylethin)

Ausbeute: 126 mg (0.6 mmol, 44% bezogen auf Phenylethin)

R_f: 0.64 (Hex: EtOAc, 30 : 1)

¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, CDCl₃

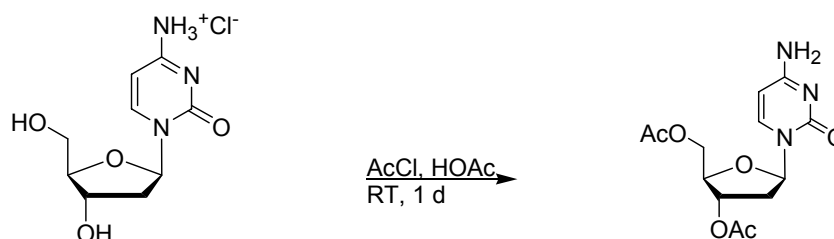
7.32 (m, 4H, H_{arom.,ortho}), 7.25 (m, 6H, H_{arom.,para u. meta})

¹³C-NMR: δ (ppm); 63 MHz, CDCl₃

132.5-243.6 (Ph_{ortho}), 129.2 (Ph_{para}), 128.4-128.5 (Ph_{meta}), 121.8 (Ph_{ipso}), 81.6 (Ph-C), 74.0 (Ph-C≡C)

6.5.5 Synthese von 4-N-(Dimethylformamidin)-5-iod-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-[2-cyanoethoxy-N,N-di-(iso-propyl)-amino-phosphin)-2'-desoxycytidin

Synthese von 3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxycytidin (47)



8.13 g (30.9 mmol) 2'-Desoxycytidin-hydrochlorid wurden in 75 ml Essigsäure suspendiert. 13 ml (185.0 mmol, 6.0 eq) Acetylchlorid wurde mit der Spritze zugegeben. Die Suspension wurde 24 h gerührt, es bildete sich eine klare Lösung. Die Lösung wurde bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt, der Niederschlag wurde aus viel Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 7.86 g (25.2 mmol, 82%)

R_f: 0.33 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 9 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 311.3

gef.: 311.7 (M⁺), 622.8 (Dimer)

¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, DMSO-*d*₆

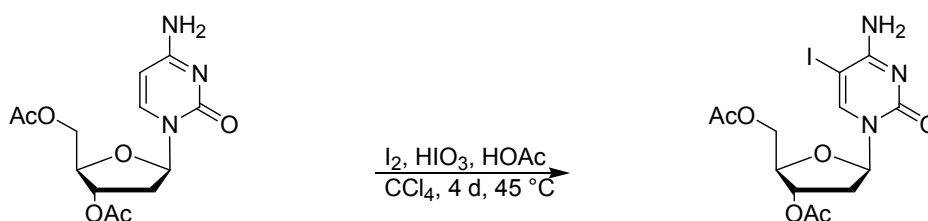
9.87 (s, 1H, NH), 8.70 (s, 1 H, NH), 7.97 (d, 1 H, $^3J = 7.5$ Hz, H6), 6.22 (d, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, H5), 6.07 (t, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, H1'), 5.19 (m, 1 H, H3'), 4.23 (m, 3 H, H5', H4'), 2.77-2.03(m, 2H, H2'), 1.90-1.74(m, 6 H, OAc)

^{13}C -NMR:

δ (ppm); 63 MHz, DMSO- d_6

170.1 (C=O), 170.0 (C=O), 159.6 (C2), 146.8 (C4), 144.4 (C6), 94.2 (C5), 86.2 (C1'), 81.9 (C4'), 73.6 (C3'), 63.5 (C5'), 36.5 (C2'), 20.7 (CH₃), 20.6 (CH₃)

Synthese von 3',5'-Di-*O*-acetyl-5-iod 2'-desoxycytidin (**48**)



6.7 mg (21.5 μmol) 3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxycytidin wurden in 0.05 ml 100%ige Essigsäure und 0.06 ml Tetrachlorkohlenstoff suspendiert. Dazu wurden 4.2 mg (12.9 μmol , 0.6 eq) Iod und 4.0 mg (19.4 μmol , 0.9 eq) Iodsäure zugegeben. Die rote Suspension wurde auf 45°C über Nacht erwärmt. Mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung, gesättigter wässriger Na₂S₂O₄-Lösung und gesättigter wässriger NaCl wurde extrahiert, über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgetrennt und das Produkt wurde aus Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 7.7 mg (17.6 μmol , 82%)

Smp: 182 °C

R_f: 0.23 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 20 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 437.2

gef.: 437.6 (M⁺), 459.6 (M+Na⁺)

^1H -NMR: δ (ppm); 400 MHz, CDCl₃

8.60 (br s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H, H6), 6.18 (t, $^3J = 8$ Hz, H1'), 5.55 (br s, 1H, NH), 5.14 (m, 1H, H3'), 4.27 (m, 3H, H5', H4'), 2.61 (m, 1H, H2'), 2.19-1.87 (m, 7H, OAc, H2')

^{13}C -NMR: δ (ppm); 101 MHz, CDCl₃

170.4 (C=O), 170.2 (C=O), 163.8 (C=O), 154.4 (C4), 146.0 (C6), 86.6 (C1'), 82.6 (C4'), 74.2 (C3'), 63.8 (C5'), 56.4 (C5), 39.1 (C2'), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃)

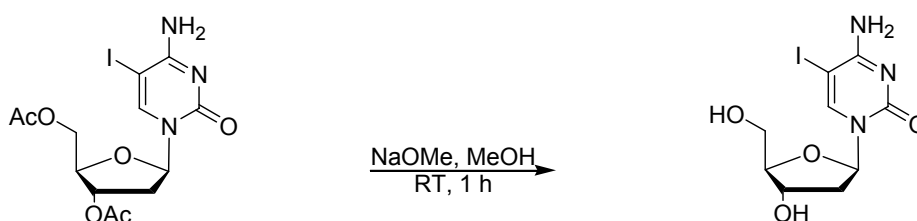
E. A.: ber.: 35.72% C 3.69% H 9.61% N

gef.: 35.54% C 3.79% H 9.46% N

IR: (cm⁻¹, KBr)

3444 u. 3330 (NH₂, C=N), 3075 (C=C, Ar-H), 2929 (CH₂, CH₃), 2365 (CO₂), 1741 (C=O), 1657 (C=O, C=N), 1572 (NH₂), 1480 (C=N), 1382 (OAc), 1236 (C-O), 1196 (C-O), 1109 (C-O), 1067 (C-O), 1024 (C-O), 950, 782, 660 u. 632

Synthese von 5-Iod-2'-desoxycytidin (**49**)



3.7 g (8.5 mmol) 3',5'-Di-*O*-acetyl-5-iod-2'-desoxycytidin wurde bei RT in 25 ml abs. Methanol gelöst. 8 ml einer 5.4 molaren NaOCH₃-CH₃OH-Lösung wurden zugegeben. Nach 1 h wurde die Reaktionslösung mit dem Ionenaustauscher *DOWEX 50W8-200* neutralisiert und mit CH₃OH nachgewaschen. Methanol wurde im Vakuum entfernt. Ein farbloser Feststoff wurde erhalten.

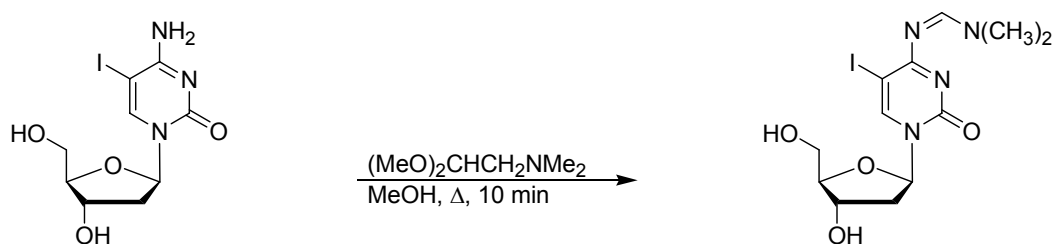
Ausbeute: 2.46 g (7.0 mmol, 82%)

R_f: 0.38 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 9 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 353.1
gef.: 353.6 (M⁺), 237.5 (Iodcytosin)

¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, CH₃OD
8.57 (s, 1H, H6), 6.20 (t, 1H, ³J = 6.2 Hz, H1'), 4.40 (m, 1H, H3'),
3.75(m, 3H, H5', H4'), 2.23 (m, 2H, H2')

¹³C-NMR: δ (ppm); 63 MHz, CH₃OD
164.2 (C4), 155.5 (C2), 147.5 (C6), 87.7 (C1'), 86.5 (C3'), 70.1 (C2'),
60.8 (C5), 55.4 (C4'), 41.0 (C5')

Synthese von 4-*N*-(Dimethylformamidin)-5-iod-2'-desoxycytidin (50)

2.43 g (6.9 mmol) 5-Iod-2'-desoxycytidin wurden in 60 ml abs. Methanol suspendiert und zum Sieden erhitzt. Unter Zugabe von 30 ml abs. CH₃OH bildete sich eine braune Lösung. Innerhalb von 1.5 min wurden 4.5 ml (11.3 mmol, 1.7 eq) *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal zugegeben. Nach fünf Minuten Refluxieren bildete sich ein farbloser Niederschlag, die Lösung darüber war gelb. Nach insgesamt 10 min Sieden unter Rückflußkühlung wurde das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und in den Kühlschrank gestellt. Ein feines farbloses Pulver bildete sich. Es wurde abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Rohprodukt wurde in Ethanol umkristallisiert.

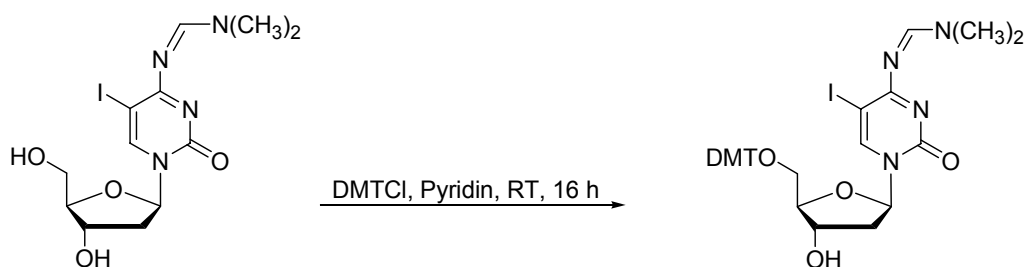
Ausbeute: 2.42 g (5.9 mmol, 86%)

R_f: 0.72 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 9 : 1)

¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, DMSO-*d*₆
 8.59 (s, 1H, N=CH), 8.47 (s, 1H, H6), 6.10 (t, 1H, ³J = 5.0 Hz, H1'),
 5.21 (d, 1H, ³J = 5.0 Hz, 3'-OH), 5.13 (t, 1H, ³J = 5.0 Hz, 5'-OH), 4.24
 (m, 1H, H3'), 3.82 (m, 1H, H4'), 3.69-3.51 (m, 2H, H5'), 3.21 (s, 3H,
 NCH₃), 3.13 (s, 3H, NCH₃), 2.10 (m, 2H, H2')

¹³C-NMR: δ (ppm); 63 MHz, DMSO-*d*₆
 168.0 (C4), 158.3 (C2), 154.1 (C6), 147.3 (C=N), 87.5 (C1'), 85.6
 (C3'), 69.8 (C2'), 68.7 (C5), 60.7 (C5' u. C4'), 34.9 (N(CH₃)₂)

Synthese von 4-*N*-(Dimethylformamidin)-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxycytidin (51**)**



0.14 g (0.3 mmol) 5-Iod-4-*N*-formamidin-2'-desoxycytidin wurden in 9 ml abs. Pyridin gelöst und auf -41°C abgekühlt. 138 mg (0.4 mmol, 1.4 eq) Dimethoxytriphenylmethylchlorid wurden in 6 ml abs. Pyridin gelöst. Jeweils zwei ml davon wurden innerhalb von 120 min bei -37°C zugegetropft. Nach Erwärmen auf RT hatte sich ein farbloser Niederschlag von Pyridinium-hydrochlorid gebildet. Nach 16 Stunden Rühren bei RT wurde es mit 10 ml CH_2Cl_2 verdünnt und mit 10 ml einer 5%igen wässrigen NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Ein farbloser Feststoff wurde abfiltriert, die wässrige Phase wurde zweimal mit 10 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ein gelber Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 42 mg (0.1 mmol, 20%)

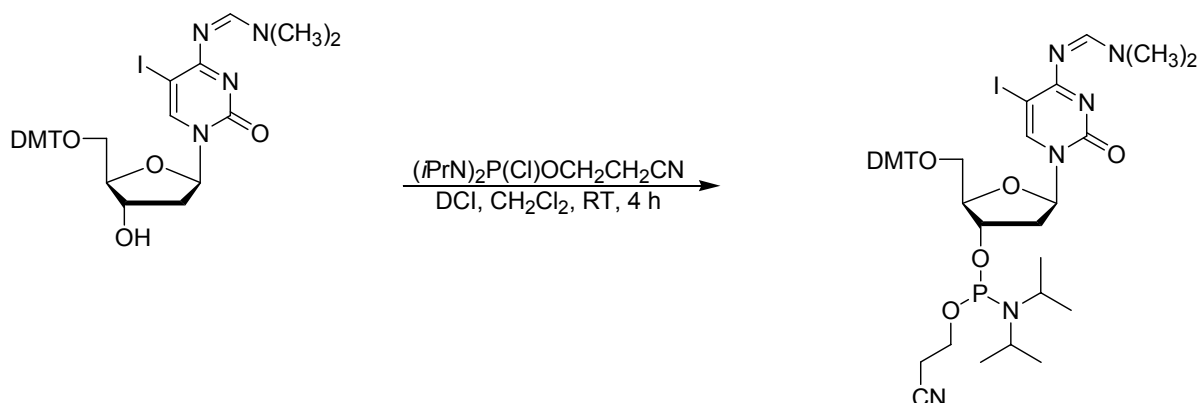
R_f : 0.17 (CH_2Cl_2 : CH_3OH : NEt_3 , 96 : 3 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 710.56
gef.: 711.1 (M^+), 733.3 ($\text{M}+\text{Na}^+-\text{H}^+$), 303.1 (DMT^+), 293.0 (*N,N*-Dimethylformamid-5-iodcytosin+ H^+), 254.9 (5-Iodcytosin+ NH_4^+)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm); 250 MHz, CDCl_3
8.63 (s, 1H, N=CH), 8.21 (s, 1H, H6), 6.78-7.39 (m, 13H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.29 (t, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, H1'), 4.42 (m, 1H, H3'), 4.09 (m, 1H, H4'), 3.61 (s, 6H, OCH_3), 3.21 (m, 2H, H5'), 3.12 (s, 3H, NCH_3), 3.08 (s, 3H, NCH_3), 2.71-2.62 (m, 1H, H2'), 2.19-2.02 (m, 1H, H2')

$^{13}\text{C-NMR}$: δ (ppm); 63 MHz, CDCl_3
168.9 (C4), 158.9 (C2), 155.7 (C=NH), 146.6 (C6), 144.6 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 135.8 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 135.7 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 130.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 128.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 126.9 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 113.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 87.0 u. 86.5 (C4' u. C1'), 72.4 (C3'), 69.5 (C5), 63.7 (C5'), 55.3 (OCH_3), 42.4 (2'C), 41.4 ($\text{N(CH}_3)_2$), 35.5 ($\text{N(CH}_3)_2$)

Synthese von 3'-O-[2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-4-*N*-(dimethylformamidin)-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxycytidin (52**)**



0.46 g (0.6 mmol) 4-*N*-Dimethylformamidin-5'-*O*-dimethoxytriphenylmethyl-5-iod-2'-desoxycytidin und 0.09 g (0.8 mmol, 1.3 eq) 4,5-Dicyano-imidazol wurden in 10 ml abs. CH₂Cl₂ suspendiert. Unter Eiskühlung wurden 0,23 ml (1.0 mmol, 1.7 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid langsam zugetropft. Bei RT wurde das Reaktionsgemisch vier Stunden lang gerührt. Nach vier Stunden wurde die Reaktion abgebrochen, um eine weitere Nebenprodukt-Bildung zu verhindern. Das Reaktionsgemisch wurde in 100 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 100 ml gesättigte wässrige NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit 100 ml gesättigter wässriger NaCl-Lösung extrahiert, über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgetrennt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Säulenchromatographisch konnte das Produkt nicht von dem Phosphitylierer und Nebenprodukt abgetrennt werden und folglich keine Ausbeute bestimmt werden. Rohausbeute 0.57g (0.626 mmol, >100%) Mittels Phosphor-NMR-Spektroskopie wurde ein Intensitätsverhältnis vom Produktpeak zum Nebenproduktpeak von 1.5 : 1 ermittelt.

R_f: 0.18 u. 0.20 (CH₂Cl₂ : CH₃OH : NEt₃, 95 : 4.5 : 0.5)

Produktdiastereomere

ESI-MS(+): ber.: 910.8

gef.: 911.3 (M⁺), 708.1 (5'-DMT-5-Iod-4-*N*-formamidin-dC), 619.2

((iPr₂P(OCH₂CH₂CN)₂O²⁺), 303.0 (DMT⁺), 809.5 (M-*i*Pr₂N), 293.1 (5-Iod-4-*N*-formamidin-cytosin+2H⁺)

¹H-NMR: δ (ppm); 300 MHz, CDCl₃

8.66 (2*s, 1H, N=CH, Diastereomere, Intensitätsverhältnis 1 : 1), 8.23 u. 8.18 (2*s, 1H, H6, Diastereomere, Intensitätsverhältnis 1 : 1), 7.68-7.39 (m, 13H, H_{arom.}), 6.25 (m, 1H, H1'), 4.45 (m, 1H, H3'), 4.10 (m, 2H, H4', N=(C-H)(CH₃)₂), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.14 (s, 3H, NCH₃), 3.11 (s, 3H, NCH₃), 2.54-2.69 (m, 4H, CH₂CN, H5'), 2.34 (m, 1H, H2'), 2.10 (m, 1H, H2'), 0.96-1.34 (m, 12H, ¹PrN)

³¹P-NMR: δ (ppm); 162 MHz, CDCl₃
148.30 u. 148.88 (Diastereomere, Intensität 10.9 : 11.3)

6.5.6 Versuche der Sonogashira-Kupplung während der ODN-Synthese

Das 5-Iod-2'-desoxycytidin modifizierte ODN ⁵¹cgt ttt ttt ttt tt wurde „DMT On“ synthetisiert. Die ODN-Säule wurde vom Synthesizer entfernt und 10 min im Vakuum getrocknet.

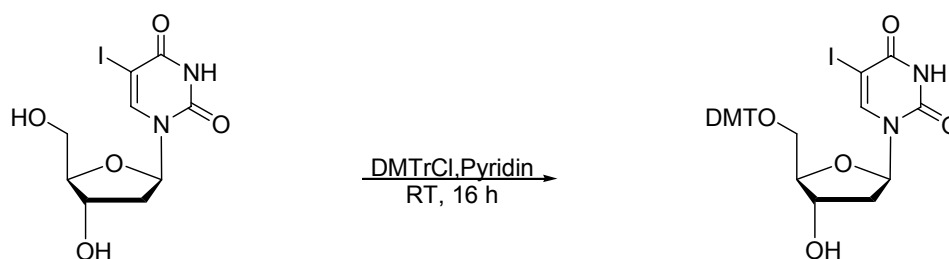
1.75 ml CH₂Cl₂ und 0.75 ml (5.4 mmol, 54000 eq) Triethylamin wurden mehrmals entgast. 1.3 µl (12 µmol, 12 eq) Phenylethin wurden zugegeben, anschließend wurden 3.5 mg (3.5 mmol, 35.0 eq) Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium-(0) und 9.5 mg (0.1 mmol, 50.0 eq) Kupferiodid wurden schnell dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf die ODN-Säule aufgetragen und mit Hilfe zweier Spritzen mehrmals durch die Säule gespült. Unter Lichtausschluß wurde es für 2.5 Stunden geschüttelt. Anschließend wurde zweimal mit 15 ml abs. Acetonitril gespült und die gesamte Prozedur wiederholt.

Die ODN-Säule wurde erneut in den Synthesizer eingebaut und die ODN-Synthese mit tgt DMT OFF beendet. Das CPG-Material der ODN-Säule wurde entnommen und mit 0.5 ml *tert*-Butylamin in 1.5 ml abs. Acetonitril 0.5 Stunden vorbehandelt. Nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge wurde es mit 1.5 ml konzentriertem Ammoniak und 0.5 ml abs. Methanol 24 Stunden bei RT behandelt. Nach dem Abfiltrieren durch einen Membranfilter wurde das Rohprodukt mit Hilfe der semipräparativen R3-Säule, 10*100mm von der Firma Applied Biosystems, mit dem Gradienten 10→50% Acetonitril in 40 min und einer Flußgeschwindigkeit von 6 ml/min getrennt. Für die analytische HPLC wurde die Säule *LichroCart 250*4mm, RP-183(5µm), 137192, Purospher STAR* von der Firma Merck verwendet derselbe Gradient wie für die präparative Trennung nur mit der Flußrate von 1 ml/min, jedoch wurde kein reines HPLC-Spektrum erhalten.

Ausbeute: 8.0 OD (46 nmol, 0.3 mg, 4.6%)
 MALDI: ber.: 6343
 gef.: 6357 (M+16) u. (Abbrüche)

6.5.7 Synthese von 5-[(TBDMS/DMT)OCH₂C≡C]-dU-Phosphoramidit

Synthese von 5'-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-5-iod-2'-desoxyuridin (**53**)

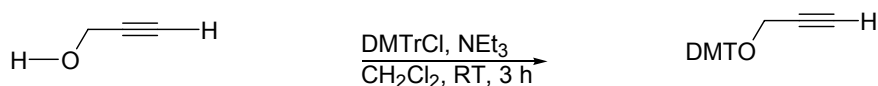


1.93 g (5.4 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin wurden in 15 ml abs. Pyridin suspendiert. 2.03 g (6.0 mmol, 1.1 eq) Dimethoxytriphenylmethylchlorid wurden hinzugegeben und 16 Stunden bei RT gerührt. Pyridin wurde im Vakuum entfernt. Der zurückbleibende gelbe Feststoff wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter wässriger NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂ : NEt₃, 99 : 1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.17 g (4.8 mmol, 89%)
 R_f: 0.39 (CH₂Cl₂ : NEt₃, 99 : 1)
 ESI-MS(-): ber.: 656.5
 gef.: 655.1 (M-H⁺), 691.4 (M+Cl⁻)
¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, CDCl₃
 10.11 (br s, 1H, NH), 8.21 (s, 1H, H6), 7.49-6.36 (m, 13H, H_{arom.}), 6.39 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H, H1'), 4.62 (br s, 1H, H3'), 4.20 (br s, 1H, H4'), 3.80 (s, 6H, OCH₃), 3.58 (br s, 1H, 3'-OH), 3.43 (s, 2H, H5'), 2.61-2.34 (m, 2H, H2')
¹³C-NMR: δ (ppm); 63 MHz, CDCl₃
 160.9 (C4), 158.7 (C_{arom.}), 137.9 (C_{arom.}), 135.5 (C_{arom.}), 130.2 (C_{arom.}), 128.3 (C_{arom.}), 128.2 (C_{arom.}), 127.1 (C_{arom.}), 125.4 (C_{arom.}), 113.5

(C_{arom.}), 140.5 (C2), 144.5 (C6), 87.1 (C4'), 85.9 (C1'), 72.6 (C5), 69.0 (C3'), 63.7 (C5'), 55.3 (OCH₃), 41.5 (C2')

Synthese von 1-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-prop-2-in-ether (54)



6.22 mg (1.8 mmol) Dimethoxytriphenylchlorid wurden in 26 ml abs. CH₂Cl₂ suspendiert. 0.36 ml (2.6 mmol, 1.5 eq) Triethylamin wurden zugegeben. Unter Eiskühlung wurden 0.1 ml (1.8 mmol, 1 eq) Propargylalkohol dazugetropft. Die Suspension wurde drei Stunden bei RT gerührt, anschließend mit Wasser gequench. Sie wurde mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan : EtOAc, 15 : 1 → 8 : 1).

Ausbeute: 0.48 g (1.4 mmol, 76%)

R_f: 0.58 (Hexan : EtOAc, 3 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 358.4

gef.: 381.1 (M+Na⁺)

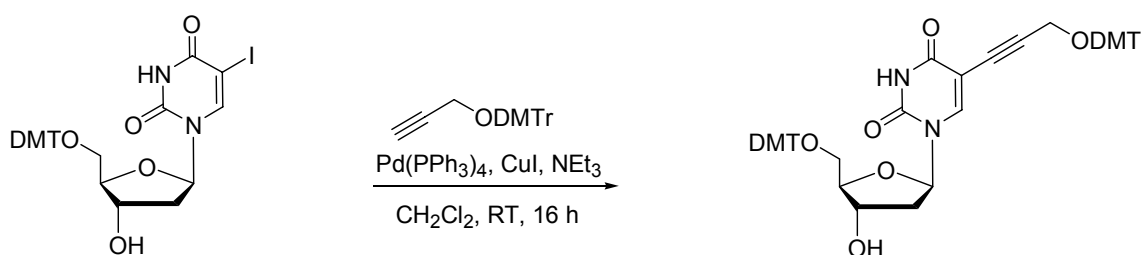
¹H-NMR: δ (ppm); 300 MHz, CDCl₃

9.41-6.73 (m, 13H, H_{arom.}), 3.70-3.66 (m, 8H, OCH₃ u. CH₂), 2.28 (s, 1H, C≡CH)

¹³C-NMR: δ (ppm); 63 MHz, CDCl₃

158.6 (C_{arom.}, para(CH₃OPh)), 144.4 (C_{arom.}, ipso(Ph)), 135.6 (C_{arom.}, ipso(CH₃OPh)), 130.0 (C_{arom.}, ortho(CH₃OPh)), 128.1 u. 126.9 (C_{arom.}, ortho(Ph)), 126.9 (C_{arom.}, para(Ph)), 113.6 u. 113.3 (C_{arom.}, meta(CH₃OPh)), 87.0 (C_{tert}), 80.6 (C≡CH), 73.3 (C≡CH), 55.3 (OCH₃), 52.7 (CH₂)

Synthese von 5-[1''-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-prop-2''-in-ether]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (**55**)



0.79 g (1.2 mmol) 5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-5-iodo-2'-desoxyuridin wurden in 10 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst, 0.48 g (1.3 mmol, 1.1 eq) O-(dimethoxytriphenylmethyl)-propargylalkohol wurden in 10 ml abs. CH₂Cl₂ und 0.17 ml (1.2 mmol, 1 eq) Triethylamin in einem separaten Schlenkkolben gelöst. Beide Kolben wurden mehrmals entgast. Zur Nukleosid-Lösung wurden 44.8 mg (0.2 mmol, 0.2 eq) CuI und 138 mg (0.1 mmol, 0.1 eq) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) schnell dazugeschüttet. Unter Argonatmosphäre wurde die Ethinlösung bei RT zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT 16 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde abfiltriert, mit CH₂Cl₂ und Wasser extrahiert, die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgetrennt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde säulenchromatographiert (EtOAc : Hexan : NEt₃, 66 : 33 : 0.5).

Ausbeute: 0.73 g (0.8 mmol, 61%)

R_f: 0.50 (CH₂Cl₂: CH₃OH, 98 : 2)

ESI-MS(+): ber.: 887.0

gef.: 909.8 (M+Na⁺)

¹H-NMR: δ (ppm); 400 MHz, CDCl₃

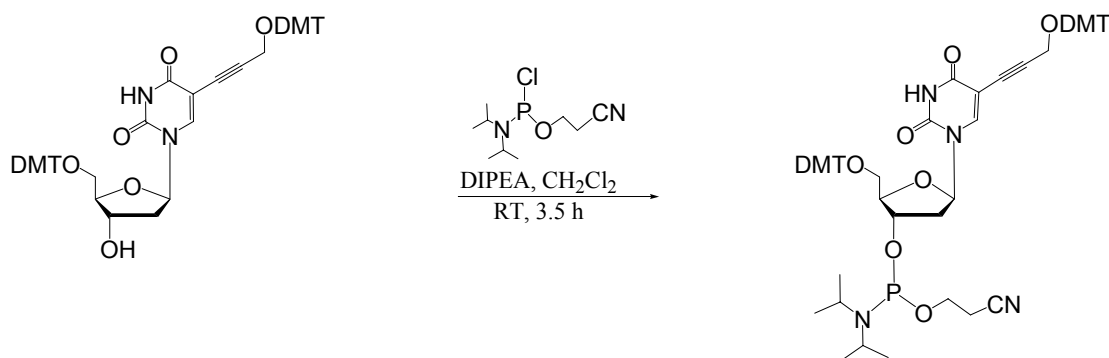
8.01 (s, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, H6), 7.51-6.79 (m, 26H, H_{arom.}), 6.33 (t, ³J = 8 Hz, 1H, H1'), 5.34 (br s, 1H, 3'-OH), 4.56 (m, 1H, H3'), 4.06 (m, 1H, H4'), 3.83-3.65 (m, 14H, OCH₃ u. CH₂C≡C), 3.48-3.34 (m, 2H, H5'), 2.68-2.30 (m, 2H, H2')

¹³C-NMR: δ (ppm); 101 MHz, CDCl₃

164.3 (C4), 158.5 (C_{arom., para}(CH₃OPh)), 149.4 (C2), 144.5 (C6), 135.4 (C_{arom., ipso}(Ph)), 132.1 (C_{arom., ipso}(CH₃OPh)), 130.0 (C_{arom., ortho}(CH₃OPh)), 128.0 (C_{arom., ortho}(Ph)), 126.8 (C_{arom., para}(Ph)), 113.3 (C_{arom., meta}(CH₃OPh)), 100.1 (C5), 87.0 (C≡CCH₂O), 87.1 (C_{tert}), 86.7 (C≡CCH₂O), 80.1 (C4'), 72.4

(C1'), 65.0 (C3'), 63.0 (C5'), 55.2 (OCH₃), 53.2 (C≡CCH₂O), 45.78 (C2')

Synthese von 3'-O-[2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5-[1''-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-prop-2''-in-ether]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (56**)**



218 mg (0.3 mmol) 5-[*O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-propargylalkohol]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin wurden in 7 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. 0.21 ml (1.2 mmol, 5 eq) Di-(*iso*-propyl)-ethyl-amin wurden dazugegeben und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 0.06 ml (0.3 mmol, 1.1 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid zugetropft. Nach zwei Stunden wurden erneut 0.02 ml (0.1 mmol, 0.4 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid zugegeben. Nach insgesamt 3.5 h wurde mit Methanol gequench und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgetrennt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc : Hexan : NEt₃, 66 : 33 : 0.5).

Ausbeute: 0.17 mg (0.2 mmol, 62%)

ESI-MS(+): ber.: 1087.2

gef.: 1109.5 (M+Na⁺)

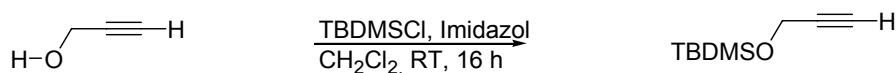
¹H-NMR: δ (ppm); 300 MHz, CDCl₃

7.97 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H6), 7.33-6.67 (m, 26H, H_{arom.}), 6.20 (m, 1H, H1'), 4.50 (m, 1H, H3'), 4.15 (m, 1H, H4'), 3.73-3.29 (m, 20H, NCH(CH₃)₂, POCH₂, OCH₃, H5', C≡C-CH₂), 2.56 (m, 2H, CH₂CN)
2.40 (m, 2H, H2'), 1.17 (s, 12H, CH₃_{iPr})

³¹P-NMR: δ (ppm); 162 MHz, CDCl₃

149.08 u. 148.70 (Diastereomeren, Intensität 1.2 : 1.0), 131.14
(Artefakt), 29.32 u. 14.38(P(V)-Spezies)

Synthese von 1-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-prop-2-in-ether (**57**)



354.5 mg (52.3 mmol, 3 eq) Imidazol wurden in 2 ml abs. CH₂Cl₂ und 1.86 ml einer 1 molaren *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-THF-Lösung (18.6 mmol, 1.1 eq) gelöst. 1 ml (16.9 mmol, 1 eq) Propargylalkohol wurden zugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Extraktion mit Wasser/CH₂Cl₂, die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet, und bei 407 mbar/40 °C destilliert. Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit isoliert.

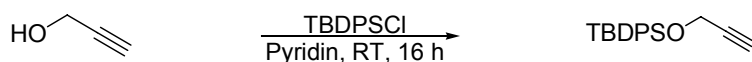
Ausbeute: 1.14 g (6.7 mmol, 39%)

Sdp.: 90 °C bei 100 mbar (lit.: 161-163 °C bei 1013 mbar)

¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, CDCl₃
4.48 (d, 2H, ⁴J = 2.5 Hz, CH₂), 2.73 (t, 1H, ⁴J = 2.5 Hz, C≡CH), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.19 (s, 6H, Si(CH₃)₂)

¹³C-NMR: δ (ppm); 63 MHz, CDCl₃
82.4 (C≡CH), 72.8 (C≡CH), 51.4 (CH₂), 25.6 (C(CH₃)₃), 18.2 (C(CH₃)₃), -5.1 (Si(CH₃)₂)

Synthese von 1-*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-prop-2-in-ether (**58**)



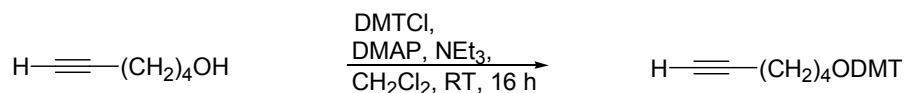
5.6 ml (21.9 mmol, 1.3 eq) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid wurden mit 3,5 ml (43.8 mmol, 2.6 eq) abs. Pyridin verdünnt. 1 ml (16.9 mmol, 1 eq) Propargylalkohol wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt, anschließend mit Methanol gequenchet. Die Reaktionslösung wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert und mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel

wurde im Vakuum abgetrennt. Das Rohprodukt wurde mittels Chromatographie an Kieselgel (Hexan : CH₂Cl₂, 10 : 1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als blassgelbe Flüssigkeit isoliert.

Ausbeute:	4.38 g (19.3 mmol, 88%)
ESI-MS(+):	ber.: 294.5 gef.: 295.0 (M+H ⁺)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, CDCl ₃ 7.66 (m, 4H, H _{arom.}), 7.34 (m, 6H, H _{arom.}), 4.23 (d, 2H, ⁴ J = 2.4 Hz, CH ₂), 2.36 (t, 1H, ⁴ J = 2.4 Hz, CH), 0.99 (s, 9H, C(CH ₃) ₃)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 101 MHz, CDCl ₃ 134.6 (C _{arom.}), 133.0 (C _{arom.}), 129.4 (C _{arom.}), 127.8 (C _{arom.}), 82.1 (C≡CH), 73.1 (C≡CH), 52.5 (CH ₂), 26.7 (C(CH ₃) ₃), 19.2 (C(CH ₃) ₃)

6.5.8 Synthese von 5-[(TBDMS/DMT)-O(CH₂)₄C≡C]-dU-Phosphoramidit

Synthese von *O*-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5-in-ether (**59**)

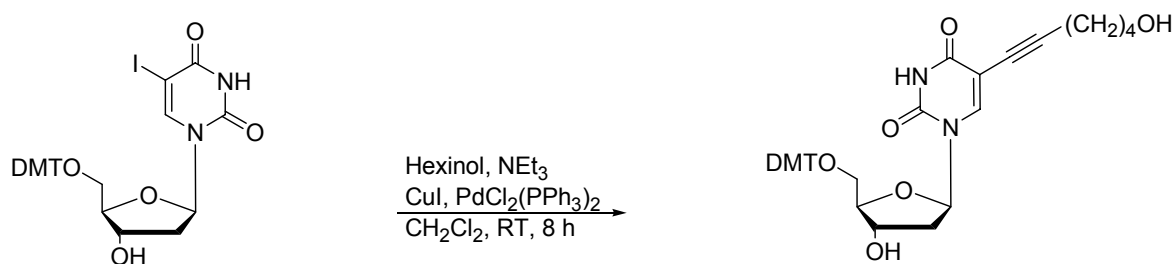


4.18 g (12.4 mmol, 1.5 eq) Dimethoxytriphenylmethylchlorid und 68 mg (0.6 mmol, 0.1 eq) Dimethylaminopyridin wurden in 11 ml abs. CH₂Cl₂ und 1.9 ml (13.7 mmol, 1.6 eq) Triethylamin gelöst, wobei sich eine bräunliche Reaktionslösung bildete. Es wurde eine Lösung aus 0.94 ml (8.4 mmol, 1 eq) 5-Hexin-1-ol in 2 ml abs. CH₂Cl₂ bei 0 °C mittels einer Spritze zugegeben, dabei bildete sich ein farbloser Nebel und die Reaktionsmischung färbte sich grünbraun. Bei RT wurde über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert, mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung und anschließend mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgetrennt. Das Produkt wurde als eine viskose farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute:	2.79 g (6.2 mmol, 73%)
¹ H-NMR:	δ (ppm), 250 MHz, CDCl ₃ 7.40-6.74 (m, 13H, DMT), 3.73 (s, 6H, OCH ₃), 3.02 (t, 2H, ³ J=6.1 Hz, OCH ₂), 2.15-2.09 (td, 2H, ³ J = 6.6 u. 2.7, CH ₂), 1.88 (t, 1H, ⁴ J = 2.6 Hz, C≡C-H), 1.70-1.54 (m, 4H, 2*CH ₂)

IR: cm^{-1} (KBr)
 3292 (CH_{Ethin}), 3058, 3000 ($=\text{CH}_{\text{arom}}$), 2951, 2867, 2835 (gesättigte CH_2), 2116 ($\text{C}\equiv\text{C}_{\text{Ethin}}$), 1609, 1582, 1510 ($\text{C}=\text{C}_{\text{Ringschwingungen}}$), 1461, 1445 (gesättigte Kohlenwasserstoffe), 1301 (COC), 640 (CH_{Ethin})

Synthese von 5'-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-5-(hex-5''-in-1''-ol)-2'-desoxyuridin (60)



1.31 g (2.0 mmol) 5-Iod-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin wurden in 14 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. Diese Lösung wurde 10 min mit Argon gespült. 0.3 ml (2.2 mmol, 1.1 eq) Triethylamin wurden dazugespritzt, wobei sich die gelbe Lösung dunkler färbte. 0.11 g (0.2 mmol, 0.1 eq) Bischlor-bis-(triphenylphosphin)-palladium-(II) wurden dazugeschüttet. Anschließend wurden 0.4 ml (3.6 mmol, 1.8 eq) Hex-5-in-1-ol dazugespritzt. 43 mg (0.26 mmol, 0.1 eq) Kupferiodid wurden dazugegeben. Nach 4 h hatte sich die Reaktionslösung orange gefärbt, nach 6 h braun, nach 7 h schwarz. Nach 8 h hatte das Edukt abreagiert. Die Reaktionslösung wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung, anschließend mit gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. 1.5 g braunes Rohprodukt wurden über Kieselgel chromatographiert (CH_2Cl_2 : NEt_3 , 99 : 1, Eluent: CH_2Cl_2 : EtOAc , 100 : 0 \rightarrow 0 : 100 in 25%-Schritten \rightarrow EtOAc : CH_3OH , 95 : 5 in 1%-Schritten). Das Produkt wurde als ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.66 g (1.1 mmol, 53%)

R_f : 0.40 (EtOAc)

ESI-MS(-): ber.: 626.7
 gef.: 625.7 (M-H^+), 323.0 (M-DMT)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm), 400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$
 11.60 (s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H, H6), 7.43-7.21 (m, 13H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.13 (t,

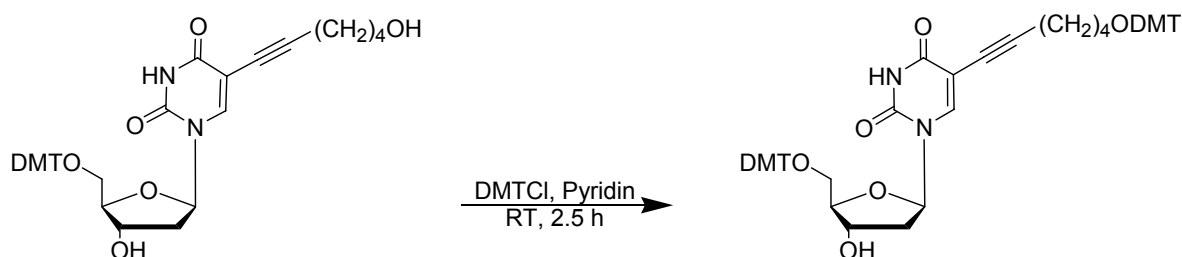
$^3J = 6.8$ Hz, 1H, H1'), 5.32 (d, 1H, $^3J = 4.5$ Hz, 3'-OH), 4.36 (t, 1H, $^3J = 5.1$ Hz, CH₂OH), 4.30 (br s, 1H, H3'), 3.93 (br s, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H, 2*OCH₃), 3.36 (m, 2H, HOCH₂), 3.32-3.11 (m, 2H, H5'), 2.31-3.20 (m, 2H, H2'), 2.15 (t, $^3J = 7.067$ Hz, CH₂C≡C), 1.49-1.40 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂C≡C)

¹³C-NMR:

δ (ppm), 101 MHz, DMSO-*d*₆

161.7 u. 158.1 (C=O), 149.3 (C6), 144.7, 144.3, 143.5, 135.6, 135.2, 134.9, 129.7, 129.6, 127.9, 127.5, 126.8, 113.3 u. 113.1 (C_{arom.}), 99.4 (C5), 93.4 (dU-C≡C), 85.9 (C4'), 84.8 (C1'), 72.20 (C3'), 70.4 (dU-C≡C), 63.6 (CH₂OH), 60.1 (C5'), 55.0 (OCH₃), 31.7 (CH₂CH₂OH), 24.7 (C≡C-CH₂CH₂), 18.6 (C≡C-CH₂), 20.5 (C2')

Synthese von 5-[1''-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (**61**)



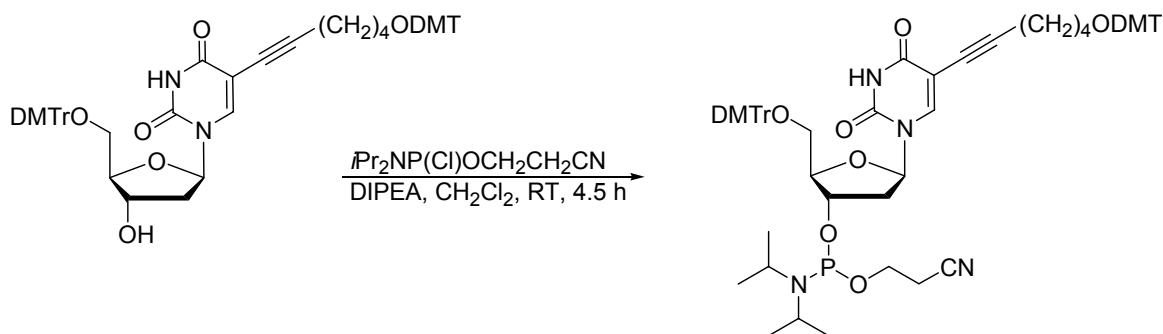
0.76 g (1.2 mmol) 5-(Hex-5''-in-1''-ol)-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin wurden in 7.5 ml (93.1 mmol, 76.5 eq) abs. Pyridin gelöst unter Bildung einer gelben, klaren Lösung. 0.25 g (0.7 mmol, 0.6 eq) Dimethoxytriphenylmethylchlorid wurden zugegeben, dabei färbte sich die Reaktionslösung rosa. Nach 1 h wurden 0.25 g (0.7 mmol, 0.6 eq) DMTCl zugegeben. Nach 2.5 h wurde Pyridin im Vakuum entfernt, der gelbe Rückstand wurde in CH₂Cl₂ gelöst und mit wässriger gesättigter NaHCO₃-Lösung, anschließend mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über NaSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgetrennt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (CH₂Cl₂ : EtOAc, 100 : 0 → 0 : 100 in 20%-Schritten à 400 ml, EtOAc : CH₃OH, 100 : 0 → 93 : 7 in 1%-Schritten à 200 ml). Das Produkt wurde als ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.79 g (0.9 mmol, 70%)

R_f: 0.45 (CH₂Cl₂ : EtOAc, 1 : 1)

ESI-MS(-):	ber.: 929.7 gef.: 928.3 (M-H ⁺), 963.9 (M+Cl ⁻)
¹ H-NMR:	δ (ppm), 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 11.60 (s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H, H6), 7.38-6.83 (m, 26H, H _{arom.}), 6.14 (t, 1H, ³ J = 6.5 Hz, H1'), 5.33 (d, 1H, ³ J = 4.3 Hz, 3'-OH), 4.31 (br s, 1H, H3'), 3.97 (m, 1H, H4'), 3.73 (2*s, 12H, OCH ₃), 3.32-3.12 (m, 2H, H5'), 2.86 (t, 2H, ³ J = 6.0 Hz, CH ₂ ODMT), 2.23 (m, 2H, H2'), 2.09 (t, 2H, ³ J = 6.8 Hz, CH ₂ C≡C), 1.56-1.47 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ ODMT), 1.33-1.20 (m, 2H, C≡C-CH ₂ CH ₂)
¹³ C-NMR:	δ (ppm), 101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 158.0 u. 149.3 (C=O), 144.7 (C6), 136.0, 135.3, 129.6, 129.5, 127.8, 127.6 (C _{arom.}), 113.1 (C5), 93.5 (C≡C-dU), 85.9 (C4'), 85.1 (C1'), 55.0 u. 54.9 (OCH ₃), 39.3 (C2'), 28.7 (OCH ₂ CH ₂) 24.9 (C≡CCH ₂ CH ₂ CH ₂), 20.8 (C≡CCH ₂ CH ₂), 18.6 (C≡C-CH ₂)

Synthese von 3'-O-[2-Cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5-[1''-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (62**)**

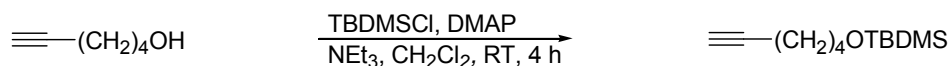


0.77 g (0.8 mmol) 5-[1''-O-(Dimethoxytriphenylmethyl)-hex-5''-in-ether]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin wurden in 14 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. 0.73 ml (4.2 mmol, 5 eq) *N,N*-Di(*iso*-propyl)-ethyl-amin wurden zugespritzt. Bei 0°C wurden 0.22 g (0.9 mmol, 1.5 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid zugetropft. Anschließend wurde auf RT aufgewärmt und zwei Stunden gerührt. Es wurden weitere 75 mg (0.3 mmol, 0.4 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid hinzugefügt. Nach zwei weiteren Stunden wurden erneut 69 mg (0.3 mmol, 0.4 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid dazugegeben. Nach insgesamt 4.5 h wurde die Reaktionslösung mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde mit wässriger ge-

sättigter NaHCO₃-Lösung, anschließend mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgetrennt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel (Säulenhöhe: 20 cm, Durchmesser: 3cm) chromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂ : NEt₃, 95 : 5, Eluent: CH₂Cl₂ : EtOAc 100 : 0 → 24 : 76 in 6%-Schritten à 200 ml). Das Produkt wurde als Diastereomeregemisch als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute:	0.36 g (0.3 mmol, 38%)
R _f :	0.37 u. 0.56 (Hexan : EtOAc, 1 : 1), 0.61 u. 0.78 (EtOAc : CH ₂ Cl ₂ , 1 : 3)
ESI-MS(-):	ber.: 1129.3 gef.: 1128.1 (M-H ⁺), 1164.4 (M*Cl ⁻)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 400 MHz, CDCl ₃ 7.96 (s, 1H, NH), 7.69 (s, 1H, H6), 7.33-6.71 (m, 26H, H _{arom.}), 6.21 (m, 1H, H1'), 4.50 (m, 1H, H3'), 4.12 (s, 1H, H4'), 3.69 u. 3.66 (s, 12H, OCH ₃), 3.62-3.40 (m, 4H, POCH ₂ u. CH), 3.38-3.18 (m, 2H, H5'), 2.79 (t, ³ J= 6.48 Hz, 2H, CH ₂ ODMT), 2.43 (m, 1H, H2'), 2.35 (t, ³ J= 6.52 Hz, 2H, CH ₂ CN), 2.21 (m, 1H, 2'H), 1.38 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1.20 (m, 2H, C≡C-CH ₂ CH ₂), 1.10 (m, 2H, C≡C-CH ₂), 1.09 (m, 12H, CH ₃)
³¹ P-NMR:	δ (ppm); 400 MHz, CDCl ₃ 149.03 u. 148.59 (Produkt als Diastereomeregemisch)

Synthese von 1-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5-in-ether (**63**)



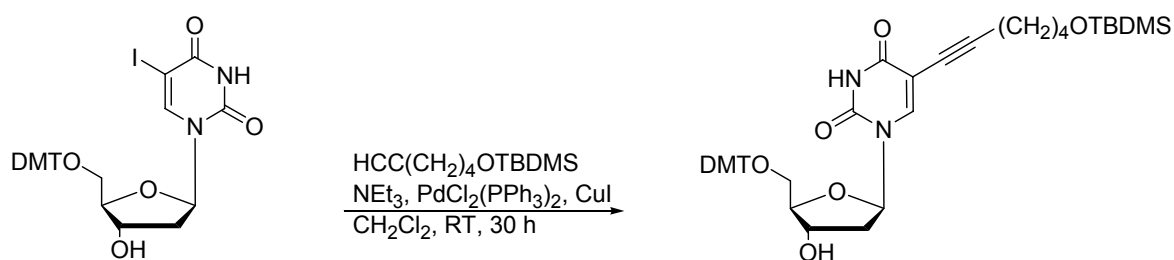
3.72 g (24.7 mmol, 1.1 eq) *tert*-Butyldimethylsilyl-chlorid wurden in 22 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. 3.75 ml (27 mmol, 1.2 eq) Triethylamin und 0.13 g (1.1 mmol, 0.1 eq) Dimethylaminopyridin wurden zugegeben. Unter Eiskühlung wurde eine Mischung aus 4.5 ml abs. CH₂Cl₂ und 2.5 ml (22.4 mmol, 1 eq) 5-Hexin-1-ol zugetropft. Nach 5 min fiel ein farbloser Niederschlag aus. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT erwärmt. Nach vier Stunden Rühren wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde über eine kurze

Kieselgelsäule chromatographisch aufgereinigt (CH_2Cl_2). Das Produkt wurde als eine farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute:	4.59 g (7.9 mmol, 80%)
R _f :	0.96 (CH_2Cl_2), 0.90 (Hexan : EtOAc, 3 : 1)
Brechungsindex:	n = 1.4458 (Lit.: 1.4457) bei 20 °C
¹ H-NMR:	δ (ppm); 400 MHz, CDCl_3 3.58 (t, ³ J = 5.9 Hz, 2H, OCH ₂), 2.17 (dt, ³ J = 6.8, ⁴ J = 2.6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1.89 (t, ⁴ J = 2.6 Hz, 1H, ≡CH), 1.56 (m, 4H, CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ O), 0.84 (s, 9H, <i>tert</i> -Bu), 0.00 (s, 6H, (CH ₃) ₂ Si)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 101 MHz, CDCl_3 84.5 (C≡CH), 68.3 (C≡CH), 62.6 (OCH ₂), 31.8 (OCH ₂ CH ₂), 26.0 (CH ₂ CH ₂ C≡CH), 25.0 (CH ₂ C≡CH), 18.3 u. 18.2 (Si(CH ₃) ₂)

Synthese von 5-[1'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (**64**)

- a) Durch Sonogashira-Kupplung von 5-Iod-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin mit *tert*-Butyldimethylsilyl-hexinol:

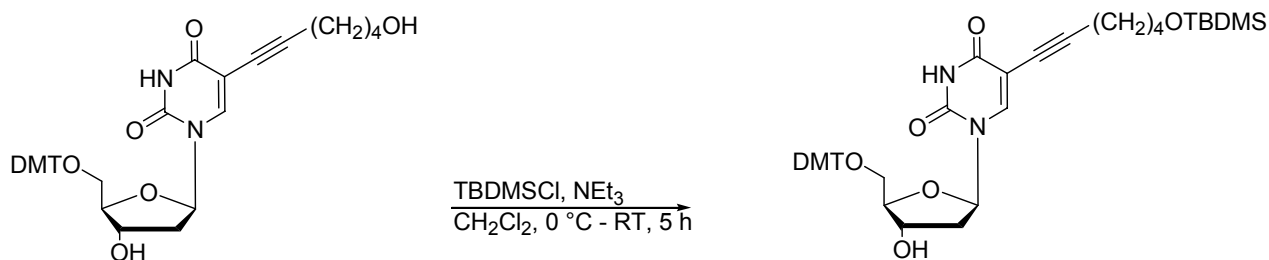


1.31 g (2.0 mmol) 5-Iod-5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin wurden in 14 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. 10 min wurde Argon durch diese Lösung gespült. 0.76 g (3.6 mmol, 1.8 eq) 6-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-1-in-6-ol und 0.3 ml (2.2 mmol, 1.1 eq) Triethylamin wurden unter leichter Verfärbung zugegeben. Bei Zugabe von 0.11 g (0.2 mmol, 0.1 eq) Dichlor-di-(triphenylphosphin)-palladium-(II) fiel ein Niederschlag aus. 37 mg (0.2 mmol, 0.1 eq) CuI wurden zugegeben. Nach 30 h wurde die Reaktionslösung mit CH_2Cl_2 extrahiert und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung und anschließend mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum

entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH_2Cl_2 : EtOAc, 95 : 5 \rightarrow 90 : 1 in 1%-Schritten à 200 ml). Ein hellgelber Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 0.48 g (0.6 mmol, 32%)

b) Durch Silylierung von 5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-5-(hex-5''-in-1''-ol)-2'-desoxyuridin mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid:



0.45 g (0.7 mmol) 5'-*O*-(dimethoxytriphenylmethyl)-5-(hex-5''-in-1''-ol)-2'-desoxyuridin wurden in 8 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und mit 0.13 ml (0.9 mmol, 1.3 eq) Triethylamin versetzt. In einem separaten Spitzkolben wurden 0.13 g (0.9 mmol, 1.2 eq) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in 2 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und bei 0°C in den Reaktionskolben Tropfen für Tropfen überführt und auf RT aufgewärmt. Innerhalb von drei Stunden wurden 0.8 ml (6.0 mmol, 8.3 eq) Triethylamin und 0.39 g (2.6 mmol, 3.6 eq) TBDMSCl portionsweise zugegeben und bei RT gerührt. Nach fünf Stunden wurde die Reaktionslösung mit CH_2Cl_2 extrahiert und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung und gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc : CH_2Cl_2 , 25 : 75 \rightarrow 0 : 100).

Ausbeute: 0.35 g (0.5 mmol, 66%)

R_f : 0.57 (EtOAc : CH_3OH , 99 : 1)

ESI-MS(+): ber.: 740.60

gef.: 741.7 ($\text{M}+\text{H}^+$), 742.6 ($\text{M}+2\text{H}^+$), 759.9 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$), 321.3 ($\text{M}-\text{DMTdrb}$), 303.1 (DMT^+)

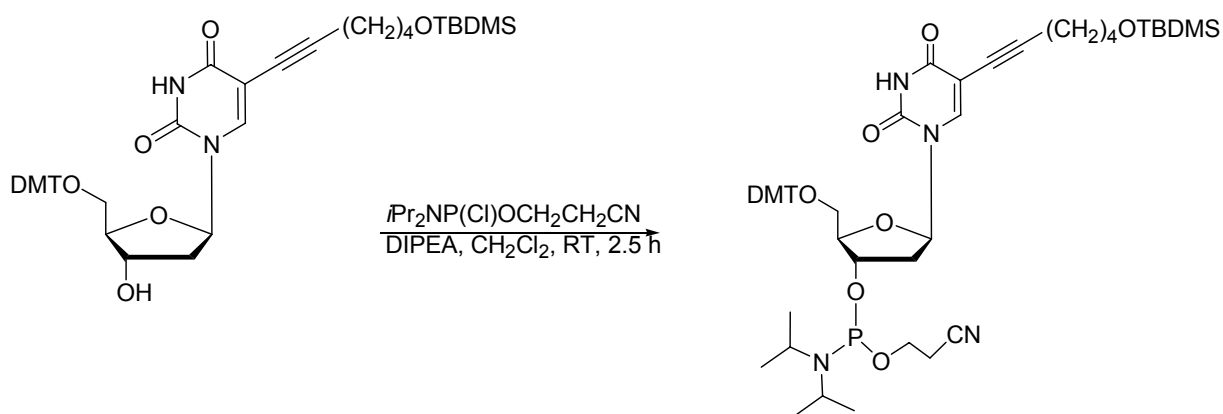
$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm); 400 MHz, CDCl_3

9.00 (2*br s, 1H, NH), 8.07 u. 7.96 (2*s, 1H, H6), 7.43-7.15 (m, 13H, H_{arom}), 6.21 (2*t, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, H1'), 4.49 (m, 1H, 3'-OH), 4.55 (m, 1H, H3'), 4.07 (m, 1H, H4'), 3.77 (2*s, 6H, 2* OCH_3), 3.63 (t, $^3J = 6.6$

Hz, 2H, H5'), 3.43 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, OCH₂(Hexinol)), 2.47 (m, 2H, H2'), 2.10 (m, 6H, 3*CH₂(Hexinol)), 0.89 u. 0.86 (2*s, 9H, *t*Bu), 0.06 u. 0.00 (2*s, 6H, Si(CH₃)₂) Die Intensitäten sprechen gegen ein zyklisiertes Nebenprodukt. Der doppelte Signalsatz von NH, H6, 1'H und 3'OH könnte auf Rotamere hinweisen, bei denen einmal der Hexinol-Linker zur DMT-Gruppe hinorient, zum anderen weit weg.

E. A.:	ber.: 68.08% C	7.07% H	3.78% N
	gef.: 68.02% C	6.90% H	3.77% N

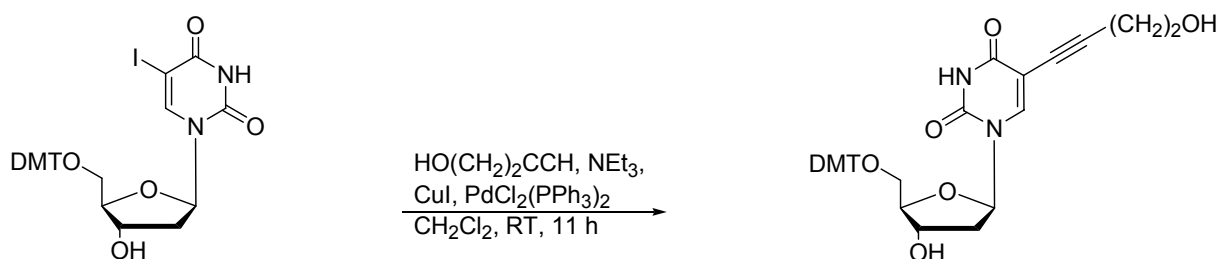
Synthese von 5-[1''-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-ether]-3'-O-[2-cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphin]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (65)



0.32 g (0.4 mmol) 5-[1''-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hex-5''-in-1''-ol]-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin wurden in 10 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. 0.37 ml (2.2 mmol, 5 eq) Di-(*iso*-propyl)-ethyl-amin wurden dazugegeben. 10 min wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet. 0.19 ml (0.9 mmol, 2 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid wurden innerhalb von 15 min zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei RT gerührt. Nach 30 min wurden 0.05 ml (0.4 mmol, 0.5 eq) Phosphitylierer nachgegeben. Nach 1h wurden erneut 0.05 ml (0.4 mmol, 0.5 eq) zugetropft. Nach 2.5 h wurde mit CH₃OH gequench. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Eine chromatographische Aufreinigung erfolgte (CH₂Cl₂ : NEt₃, 95 : 5, Eluent: CH₂Cl₂ : CH₃OH, 99 : 1 → 97 : 3). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff und als Diastereomeregemisch erhalten.

Ausbeute:	0.32 g (0.3 mmol, 79%)
R _f :	0.63 u. 0.53 (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH, 95 : 5)
ESI-MS(-):	ber.: 941.2 gef.: 940.2 (M-H ⁺), 976.2 (M+Cl ⁻)
¹ H-NMR:	δ (ppm); 300 MHz, CDCl ₃ 8.02 (s, 1H, H6), 7.98-7.20 (m, 13H, H _{arom.}), 6.83 (m, 1H, H1'), 4.46 (m, 1H, H3'), 4.15 (m, 1H, H4'), 3.78 (2*s, 6H, 2*OCH ₃), 3.56-3.38 (m, 6H, H5', 2*OCH ₂), 2.69-2.42 (m, 8H, 3*CH ₂ , CH _{iPr}), 1.37 (m, 2H, CH ₂ CN), 0.86 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 0.00 (s, 6H, Si(CH ₃) ₂)
³¹ P-NMR:	δ (ppm); 162 MHz, CDCl ₃ 149.03 u. 148.57 (Produkt als Diastereomerengemisch)

6.5.9 Synthese von 5-(But-3''-in-1''-ol)-5'-O-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (**66**)



1.31 g (2.0 mmol) 5-Iod-5'-(dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin wurden in 14 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und 15 min lang mit Argon durchgespült. 0.3 ml (2.2 mmol, 1.1 eq) Triethylamin wurden dazugegeben, dabei färbte sich die gelbe Reaktionslösung rötlich. 0.11g (0.2 mmol, 0.1 eq) Di-chlor-di-(triphenylphosphin)-palladium-(II) wurden hinzugegeben. 0.27 ml (3.6 mmol, 1.8 eq) But-3-in-1-ol wurden zugetropft. 41 mg (0.22 mmol, 0.11 eq) Kupferiodid wurden zugegeben. Nach 11 Stunden wurde die Reaktionslösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit gesättigter wässriger NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes (CH₂Cl₂ : EtOAc, 100 : 0 → 0 : 100 in 25%-Schritten, anschließend EtOAc : CH₃OH, 100 : 0 → 98 : 2 in 1%-Schritten).

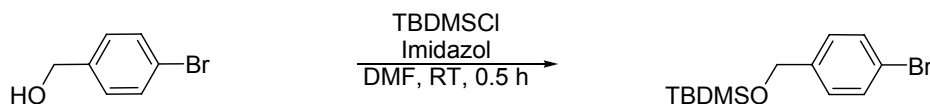
Ausbeute:	0.74 g (1.2 mmol, 62%)
ESI-MS(-):	597.5

¹H-NMR: δ (ppm); 400 MHz, DMSO-*d*₆
 11.60 (br s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H, H₆), 7.43-6.89 (m, 13H, H_{arom.}), 6.13 (t, ³J = 4.0 Hz, H1'), 5.33 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, 3'-OH), 4.77 (t, ³J = 4.0 Hz, 1H, Linker-OH), 4.19 (m, 1H, H3'), 3.96 (m, 1H, H4'), 3.75 (s, 6H, 2*OCH₃), 3.40-3.10 (m, 4H, H5' u. CH₂), 2.33-2.20 (m, 4H, H2' u. CH₂)

¹³C-NMR: δ (ppm); 101 MHz, DMSO-*d*₆
 161.5 (C₄), 158.1 (C₂), 150.0 (C₆), 144.7, 144.3, 143.5, 135.6, 135.2, 134.9, 130.0, 127.9, 127.5, 126.8, 126.5, 113.3 u. 113.1 (C_{arom.}), 98.1 (C₅), 88.8 (C_{4'}), 86.2 (C_{1'}), 85.0 (HO(CH₂)₂C≡C), 77.2 (HO(CH₂)₂C≡C), 70.4 (C_{3'}), 63.5 (CH₂OH), 55.0 (OCH₃), 54.9 (OCH₃), 52.6 (C_{5'}) 40.2-38.9 (C_{2'}, CH₂C≡C, DMSO)

6.5.10 Synthese von Benzylalkohol-Derivate

Synthese von *p*-Brom-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-benzylether (67)

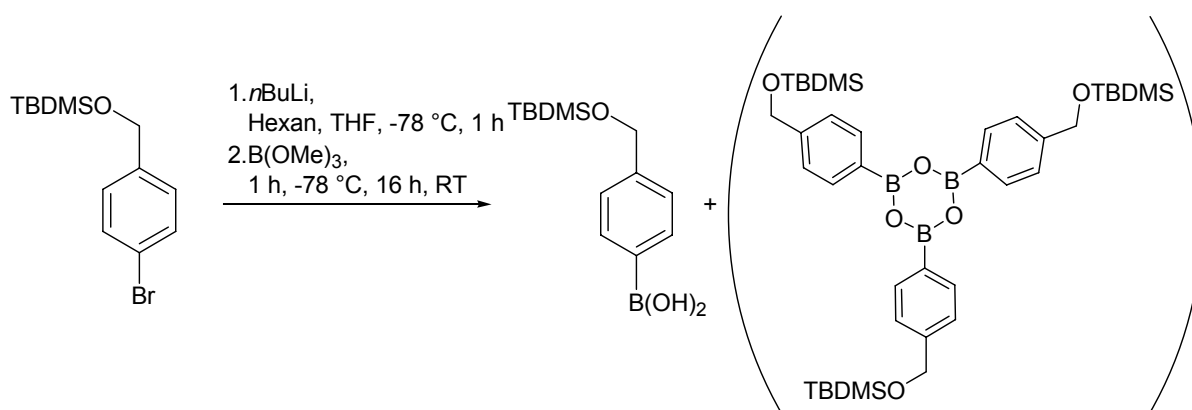


4.05 g (21.7 mmol) *p*-Brombenzylalkohol und 3.24 g (47.7 mmol, 2.2 eq) Imidazol wurden in 21.5 ml abs. Dimethylformamid gelöst. 3.61 g (23.97 mmol, 1.1 eq) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid wurden dazugegeben. Unter leichtem Erwärmen ging TBDMSCl in Lösung, und wurde bei RT 0.5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt, anschließend mit 20 ml Hexan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 20 ml Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Destillation wurde eine klare gelbe Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 5.83 g (19.4 mmol, 89%)
 R_f: 0.93 (CH₂Cl₂ : CH₃OH, 99 : 1)
 ESI(+): ber.: 301.3
 gef.: 319.8 (M+NH₄⁺)
¹H-NMR: δ (ppm); 250 MHz, CDCl₃
 7.64-7.01 (m, 4H, H_{arom.}), 4.59 (s, 2H, CH₂) 1.35 (2*s, 9H, C(CH₃)₃),
 0.07 (2*s, 6H, Si(CH₃)₂)

$^{13}\text{C-NMR}$:	δ (ppm); 63 MHz, CDCl_3
	140.5 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 131.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 127.8 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 120.7 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 77.6 (CH_2), 25.8 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 18.5 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), -5.3 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -5.2 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)
E. A.:	ber.: 51.82% C 7.03% H
	gef.: 52.02% C 7.16% H,

Synthese von *O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-benzylether-*p*-boronsäure (68)



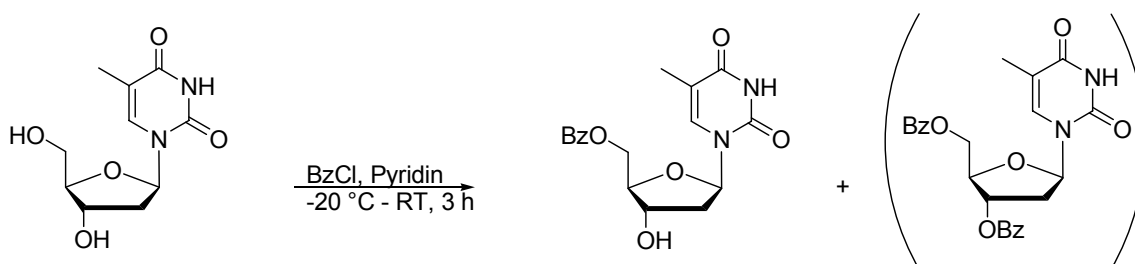
0.49 g (1.6 mmol) *p*-Brom-*tert*-butyldimethylsilylbenzylalkohol wurden in 3.2 ml THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. 1.4 ml (2.24 mmol, 1.4 eq) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Hexanlösung wurden dazugegeben und für eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt, wobei sich ein gelber Niederschlag bildete, der sich nach Zugabe von 0.36 ml (3.2 mmol, 2 eq) Trimethylborat auflöste. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde zwischen -100 und -50 °C gerührt, anschließend auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Es entstand ein farbloses Gel, das bei 0 °C mit 1.6 ml einer 5%igen wässrigen HCl-Lösung 10 min gerührt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 10 ml Wasser verdünnt und 5 mal mit 10 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ein farbloser Niederschlag, eine Mischung aus dem gewünschtem Produkt und dessen Boroxin, wurde erhalten.

Ausbeute:	0.25 g (0.7 mmol, 44%)
R _f :	0.18 (Hexan: EtOAc, 5 : 1)
ESI-MS(-):	ber.: 266.2 (Monomer), 496.4 (dimeres Anhydrid), 744.6 (Boroxin) gef.: 301.0 (Hauptpeak: M+Cl), 264.9 (M-2H ⁺),

Smp:	160 °C (lit.: 144 °C) der erhöhte Schmelzpunkt ist ein Indiz für die Anhydridbildung
¹ H-NMR:	δ (ppm); 300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 7.87-7.66 (m, 2.2H, H _{arom.} ortho zu CH ₂ O u. BOH), 7.24-7.17 (m, 2H, H _{arom.} ortho zu B), 4.65 (s, 2H, CH ₂), 0.79 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 0.10 (s, 6H, Si(CH ₃) ₂)
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 140.5 (C _{arom}), 131.2 (C _{arom}), 127.7 (C _{arom}), 121.0 (C _{arom}), 64.3(CH ₂), 25.9 (C(CH ₃) ₃), 18.4 (C(CH ₃) ₃), -5.3 (Si(CH ₃) ₂)
¹¹ B-NMR:	δ (ppm); 101 MHz, CDCl ₃ 31.96, 17.81

6.5.11 Synthese von 5'-O-Benzoyl-thymidin-phosphoramidit

Synthese von 5'-O-Benzoyl-thymidin (69)



1.21 g (5.0 mmol) Thymidin wurden in 15 ml abs. Pyridin gelöst und auf -20°C abgekühlt. 0.64 ml (5.5 mmol, 1.1 eq) Benzoylchlorid wurden mit 8 ml abs. Pyridin gelöst. Diese Benzoylchlorid-Lösung wurde tropfenweise innerhalb von 140 min zugegeben. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag (Pyridinium-Hydrochlorid). Nach drei Stunden wurde die Reaktionslösung auf RT aufgewärmt. Die Reaktion wurde mit 5 ml Methanol gequench und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂: Methanol, 15 : 1). Nach dem Umkristallisieren aus Ethanol konnte das Produkt als ein farbloser Feststoff isoliert werden.

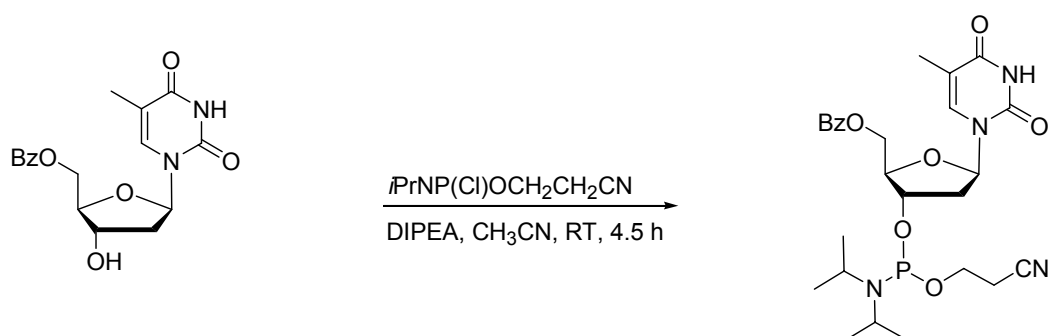
Ausbeute: 0.58 g (1.7 mmol, 33%)

R _f :	0.48 (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH, 9 : 1)		
Smp:	173°C (lit.173-174°C)		
ESI-MS(+):	ber.: 346.3 gef.: 346.8(M) , 693.3(Dimer)		
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 11.32 (br s, 1H, NH), 7.71 (s, 1H, H6), 8.00-7.39 (m, 5H, Ph), 6.22 (t, ³ J = 4.0 Hz, 1H, H1'), 5.49 (d, ³ J = 4.0 Hz, 1H, 3'-OH), 4.56 (m, 1H, H3'), 4.42 (dd, ³ J = 8.0 Hz, ⁴ J = 4.0 Hz, 2H, H5'), 4.05 (m, 1H, H4'), 2.29-2.14 (m, 2H, H2'), 1.60 (s, 3H, CH ₃)		
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 62.9 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 165.5 (C=O), 163.6 (C=O), 150.3 (C=O), 135.6 (Ph _{para} u. C6), 133.5 (Ph _{ipso}), 129.3 (Ph _{meta,ortho}), 129.2 (Ph _{meta,ortho}) u. 128.8 (Ph _{meta,ortho}), 109.7 (C5), 83.7 (C1'), 83.6 (C3'), 70.2 (C5'), 64.3 (C4'), 40.1-38.7 (C2' u. DMSO), 11.82 (CH ₃)		
Elementaranalyse:	ber.: 58.96% C	5.24% H	8.09% N
	gef.: 59.11% C	5.18% H	7.98% N

Nebenprodukt: 3',5'-Di-O-benzoyl-thymidin

Ausbeute:	1.12 g (2.5 mmol, 50%)		
R _f :	0.78 (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH, 9 : 1)		
ESI-MS(+):	ber.: 450.4 gef.: 451.0 (M+H ⁺), 468.38 (M+NH ₄ ⁺), 473.1 (M+Na ⁺),		
Smp:	171 °C (lit.: 171 °C)		
¹ H-NMR:	δ (ppm); 250 MHz, CDCl ₃ 8.75 (s, 1H, NH), 8.02-7.19 (m, 10H, H6 u. H _{arom.}), 6.39 (t, ³ J = 5.0 Hz, 1H, H1'), 5.58 (dt, ³ J = 6.7 Hz, 1.8 Hz, 1H, H3'), 4.75-4.63 (m, 2H, H5'), 4.51 (m, 1H, H4'), 2.66-2.60 (m, 2H, H2'), 2.27 (s, 3H, CH ₃)		
¹³ C-NMR:	δ (ppm); 63 MHz, CDCl ₃ 167.8 (C=O), 160.2 (C=O), 158.7 (C=O), 150.2 (C=O), 144.4, 135.5, 135.4, 132.5, 130.9, 130.2, 130.1, 128.8, 128.1 u. 127.1 (C _{arom.} u. C6), 113.4 (C5), 87.1 (C4'), 72.5 (C1'), 68.8 (C5'), 68.2 (C3'), 38.8 (C2'), 14.1 (CH ₃)		

Synthese von 5'-O-Benzoyl-3'-O-[2-cyanoethoxy-N,N-di-(iso-propyl)-amino-phosphin]-thymidin (**70**)



251 mg (0.7 mmol) 5'-Benzoylthymidin wurden in 7 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 0.62 ml (3.6 mmol, 5 eq) Di-(*iso*-propyl)-ethyl-amin versetzt. Unter Eiskühlung wurden 0.23 ml (1.1 mmol, 1.5 eq) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-di-(*iso*-propyl)-amino-phosphor-(III)-chlorid zugetropft. Nach wenigen Minuten färbte sich die Reaktionslösung gelb. Nach 4.5 Stunden wurde mit Methanol gequenchet. Die Reaktionslösung wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, mit 5%iger wässriger NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH_2Cl_2 : CH_3OH , 95 : 5 \rightarrow 91 : 9). Das Produkt wurde als Diastereomeren-gemisch in Form eines farblosen Harzes erhalten.

Ausbeute: 176 mg (0.3 mmol, 45%)

R_f : 0.44 u. 0.40 (CH_2Cl_2 : CH_3OH , 91 : 9)

ESI-MS(+): ber.: 546.6
gef.: 547.3($\text{M}+\text{H}^+$), 569.3($\text{M}+\text{Na}^+$)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm); 400 MHz, CDCl_3
9.19 (br s, 1H, NH), 7.97 (2*s, 1H, H6) 7.71-7.15 (m, 5H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.28 (m, 1H, H1'), 4.64-3.37 (m, 8H, H3', H4', H5', CH_2CN , CH_2OP), 2.76-2.56 (m, 2H, $\text{CH}_{i\text{Pr}}$), 2.55-2.44 (m, 1H, H2'), 2.16-2.14 (m, 1H, H2'), 1.58 (2*s, 3H, CH_3), 1.27-1.11 (m, 12H, $\text{CH}_{3i\text{PrN}}$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ (ppm); 400 MHz, CDCl_3
149.37 u. 149.19(Produkt als Diastereomeregemisch)

BIOLOGISCHER TEIL

7.1 Cytometric Bead Array**7.1.1 Kultivierung und Inkubierung von Raji-Zellen mit ODN für den CBA**

Für die immunmodulierende Charakterisierung der CpG-ODN mit Hilfe des *CBA* wurden Raji-Zellen als Zellsuspension in einem RPMI 1640-Medium bestehend aus L-Glutamin, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und Phenolrot bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das fötale Rinderserum (*FCS*) enthält wichtige Wachstumsfaktoren für die Zellen. Penicillin und Streptomycin beugen einem Bakterienbefall der Zellen vor. Ein Umschlag des Phenolrot-Indikators von rot nach gelb zeigt, dass das Nährmedium ausgetauscht werden muss. Eine Zelldichte von 0.2 bis 1 Million Zellen pro Milliliter wurde eingestellt (Tabelle 13).

Tab. 13: Raji-Zellwachstum

Inkubationszeit [h]	Zelldichte [Mio/ml]	Mittelwert [Mio/ml]	Standardabweichung [Mio/ml]	Vitalität [%]	Mittelwert [Mio/ml]	Standardabweichung [%]
0	0,41 0,4 0,42	0,41	0,01	90,3 n. best n. best	n. best.	n. best.
8	0,49 0,5 0,54 0,51 0,58 0,63	0,54	0,05	91,8 88 87 88,2 89,7 95,2	90	3,06
12	0,6 0,57 0,54 0,67 0,64 0,71	0,62	0,06	95 96,5 94,4 95,5 n. best n. best	95,36	0,87
24	1,29 0,96 0,94 1,08 0,93 0,95	1,03	0,14	97,7 94,8 92,6 95,4 94,6 96,8	95,31	1,8

In drei (für die drei verschiedenen Inkubationszeiten) *24 well plates* wurden in zwei (für die Doppelbestimmung)*6 (für die ODN-Lösungen) Vertiefungen jeweils 3 ml Zellsuspension à 3 Millionen Zellen vorgelegt. Die sechs Inkubations-Lösungen bestanden aus fünf ODN und einer Negativkontrolle (Tabelle 14):

Tab. 14: Für CBA verwendete Oligodesoxynukleotide

ODN und Kontrollen	Sequenz
pos	tgt cgt ttt ttt ttt tt
neg	tgt gct ttt ttt ttt tt
pos2006	tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc att
neg2006	tgc tgc ttt tgt gct ttt gtg ctt
MedC	tgt (^{Me} C)gt ttt ttt ttt tt
no-ODN	alle Aufreinigungsschritte in Abwesenheit von einem ODN sind durchgeführt worden

Pro ml Zellsuspension wurde 1 µl einer 300 µM-Stocklösung an jeweiligem CpG-ODN zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 300 nM erreicht wurde. Dabei wurde ausschließlich endotoxinfreies Wasser verwendet. Nach 8 h, 12 h und 24 h wurden für jeweils zwei mal allen sechs Proben einer 24 well Platte 200 µl der Zellsuspension entnommen. Nach 5 min Zentrifugation mit 1200 Umdrehungen pro Minute wurde von jeder Probe 150 µl zellfreier Überstand vorsichtig abgenommen und sofort bei -80°C eingefroren. Zusätzlich wurde aus jedem der 36 (3*2*6) Ansätze 100 µl Zellsuspension an den drei Zeitpunkten entnommen und mit Hilfe eines Mikroskops und einer Zählkammer sowie Zählmaschine gezählt und mit Trypanblau-Färbung auf ihre Vitalität hin untersucht. In eine tote Zelle kann Trypanblau eindringen, in eine lebendige dagegen nicht. Für diese Anfärbung wurde Zellsuspension und Farbstoff im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Nach Inkubierung der Zellen mit den ODN-Lösungen (Zeit 0 h) wurde die Zelldichten bestimmt: Sie betragen 0,41 Mio/ml für die 8 h-Platte, 0,40 Mio/ml für die 12 h-Platte und 0,42 Mio Raji-Zellen/ml für die 24 h-Platte. Die Anfangsvitalität betrug 90,3%. Tabelle 13 zeigt, dass die Verdopplungszeit der Raji-Zellen 24 h betrug und dass es sich um sehr vitale Zellen handeln mit einer Vitalität von über 90%. Des weiteren geht aus dieser Tabelle die Ungenauigkeit hervor, die bedingt ist durch die Inhomogenität der Zellsuspension mit einer Standardabweichung bis zu 140 000 Zellen.

Die eingefrorenen Proben wurden während des Transports unter Trockeneis gelagert, danach bei -80°C bis zur Durchführung des CBA.

7.1.2 Durchführung des CBA

Der CBA wurde an dem Gerät *BD FACS Array* der Firma *BD Bioscience* durchgeführt unter Verwendung eines Zytokinkits für die Zytokine IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF-α, TNF-β, IFN-γ, GM-CSF, G-CSF und MCP-1 von derselben Firma. Zur Bestimmung der jeweiligen Zytokin-Konzentration wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen

(1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128 und 1 : 256) Eichkurven erstellt. Dabei wurden die jeweils zugehörigen *Beads* 15 min mit 50 μ L Zytokinlösungen inkubiert, 100 μ L Waschpuffer gewaschen und mit 50 μ L des *PE-Capture* Antikörpers eine Stunde unter Lichtausschluß inkubiert. Nach Waschen mit 1ml Waschpuffer, wurde die *Bead*-Suspension zentrifugiert, der Flüssigkeitsüberstand abgenommen und 150 μ L Waschpuffer zugegeben und die *Beads* gemessen. Es wurden 200 *Beads* pro Zytokin eingesetzt. Analog wurde mit den Proben der wie in Kapitel 7.1 präparierten Raji Zellüberstände verfahren. Die *Beads* waren mit dem Farbstoff *APC-cy7*, der bei 755 ± 15 nm Licht emittiert, und dem Farbstoff *ACP*, der einen Emissionspeak bei 675 ± 15 nm besitzt, beladen. Die Farbstoffe wurden mit einem Helium/ Neon Laser bei 633 nm und 635 nm angeregt. Die Zytokine waren mit dem Farbstoff *PE* markiert, der durch einen Argon-Laser bei 488 nm angeregt wird und einen Emissionspeak bei 575 ± 15 nm enthält. Die Zuordnung der verschiedenen Zytokine war möglich aufgrund von unterschiedlichen Beladungsdichten der *Beads* und der *Capture* Antikörper mit den genannten Farbstoffen und erfolgte über die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten.

Die Ergebnisse des *CBA* sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tab. 15: Meßwerte des *CBA* in pg/ml, die > 0 sind

IL-10 positiv gefunden	nach 8 h	nach 12 h	nach 24 h
pos2006	97	125	171
neg2006	89	97	136
pos	93	114	151
neg	55	110	137
MedC	81	116	144
no ODN	66	78	122
TNF-α positiv gefunden	nach 8 h	nach 12 h	nach 24 h
pos2006	1	0	6
TNF-β positiv gefunden	nach 8 h	nach 12 h	nach 24 h
pos2006	392	534	978
neg2006	388	421	703
pos	362	461	839
neg	311	433	780
MedC	369	464	764
no ODN	344	407	700

7.2 IFN- α -ELISA

Der hier verwendete IFN- α -ELISA bedient sich des sogenannten *Sandwich*-Systems und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (*Bender MedSystems*, BMS216MST). Dabei wurden die INF- α -Konzentrationen mit Hilfe eines INF- α -Standards quantifiziert. Zu

Beginn wurde ein spezifischer Fangantikörper in einer 96-Loch-*Maxisorp ELISA*-Platte immobilisiert. Die Bindung des Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C in PBS. Durch Inkubation für zwei Stunden bei RT mit *Assay Buffer* (5g *Bovine Serum Albumin*, 0.5 ml *Tween20* auf 1l *PBS* aufgefüllt) wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Es folgte eine Inkubation für zwei Stunden mit Proteingemischen (verdünnte Zellkulturüberstände), wobei das Antigen durch den Fangantikörper gebunden und damit aufkonzentriert wurde. Zeitgleich wurde auch ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper, der gegen das gleiche Antigen gerichtet ist, zu den Proben gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit einem Waschpuffer (0.5ml *Tween 20* in 1 Liter *PBS*) erfolgte die Inkubation mit TMB. Die Peroxidase ist in der Lage, das Substrat TMB in einer Farbreaktion umzusetzen, wobei durch Zugabe von 2 N H_2SO_4 die Reaktion abgestoppt wurde. Diese Enzymaktivität ließ sich photometrisch mit Hilfe des *Microplate-Reader Sunrise* bestimmen und die Antigenkonzentration der Probe anhand einer Standardkurve ermitteln (schriftliche Mitteilung von Malte Bachmann).

7.2.1 Isolierung und Inkubierung von *hPBMC* mit ODN für den *ELISA*

Für die Bestimmung der IFN- α -Induktion der CpG-ODN anhand eines *ELISA* wurden drei erwachsenen, männlichen Donoren jeweils 40 ml Blut entnommen und daraus periphere mononukleäre Blut-Zellen (*hPBMC*) isoliert. Dafür wurden 120 ml *Histopaque* (enthält *Ficoll*, das üblicherweise zur Dichtezentrifugation verwendet wird) vorgelegt und auf 37°C temperiert. Die Blutproben wurden mit Heparin versetzt, um die Blutgerinnung zu verhindern, anschließend mit *phosphate buffered saline (PBS)* verdünnt, indem drei Volumenäquivalente Blut und fünf Volumenäquivalente *PBS* genommen wurden. Pro 8 Volumenteile verdünntes Blut wurden drei Volumenanteile *Histopaque* dazugegeben. Nach einer 30 minütigen Dichtezentrifugation bei 1400 rpm war eine Phasentrennung zu erkennen: Die unterste Schicht bildeten die roten Erythrozyten, die mittlere das farblose *Ficoll*, darüber befindet sich eine dünne Schicht flauschig aussehender *hPBMC*, die oberste Schicht enthält gelbes Serum. Die oberste Schicht wird weitgehend abgenommen, die *hPBMC* vorsichtig abpipettiert, wobei unvermeidbar etwas *Ficoll* und Serum mitgeschleppt wurde, daher wurde die Prozedur (Verdünnung mit *PBS* und anschließende Dichtezentrifugation) zweimal wiederholt. Die Konzentration der isolierten *PBMC* wurde auf $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml durch Zusatz des *RPMI 1640*-Mediums eingestellt.

7.2.2 Durchführung für den 1. Vorversuch

Für den 1. Vorversuch wurden jeweils 1 ml *hPBMC*-Zellsuspension mit 3 μ g (0.47 nmol pos, neg; 0.45 nmol pos2006, neg2006; also einer Konzentration von $\approx 0.5 \mu$ M) ODN bzw. 10 μ g

(1.57 nmol pos, neg; 1.49 nmol pos2006, neg2006; also einer Konzentration von ca. 1.5 μM) ODN für 16 h bzw. 24 h inkubiert. Die folgende ODN wurden verwendet (Tabelle 16):

Tab. 16: Verwendete ODN und Kontroll-Substanzen für den 1. Vorversuch

	Negativkontrollen	Positivkontrollen	CpG-ODN	GpC-ODN
Substanzen	PBS+PmB	PIC+PmB	pos+PmB	neg+PmB
	no ODN+PmB	LPS	pos(bought)+PmB	neg(bought)+PmB
		LPS+PmB	pos2006+PmB	neg2006+PmB

Allen Proben bis auf einer LPS-Probe wurden 3 mg Polymyxin B/ml zugesetzt. Die Meßergebnisse für den 1. Vorversuch sind in Tabelle 17 zu finden.

Tab. 17: Meßwerte des 1.Vorversuchs des α -ELISA

ODN	Donor	[pg/ml] 3 μg ODN, 16 h	Meß- wieder- holung	Mittel- wert	[pg/ml] 10 μg ODN, 16 h	Meß- wieder- holung	Mittel- wert
nur PBMC	1	12	18	15			
	2	13	12	12			
	3	8	8	8			
PIC	1	905	911	908			
	2	37	34	35			
	3	72	49	61			
LPS	1	18	18	18			
	2	9	15	12			
	3	8	8	8			
LPS+Polymyxin B	1	21	20	21			
	2	12	20	16			
	3	11	17	14			
no ODN	1	21	25	23			
	2	22	25	24			
	3	21	21	21			
pos	1	15	18	17	8	17	12
	2	15	15	15	2	2	2
	3	4	9	7	6	8	7
pos gekauft	1	32	37	35	31	31	31
	2	15	17	16	15	23	19
	3	49	54	51	61	72	66
neg	1	11	12	12	14	14	14
	2	4	3	3	4	7	5
	3	1	15	8	11	19	15
neg gekauft	1	71	71	71	48	58	53
	2	53	33	43	19	28	23
	3	65	65	65	29	29	29
pos2006	1	10	10	10	7	21	14
	2	5	11	8	7	7	7
	3	6	11	9	11	19	15
neg2006	1	309	318	313	480	473	477
	2	132	148	140	191	172	181
	3	49	54	51	61	72	66

ODN	Donor	[pg/ml] 3 µg ODN, 24 h	Meß- wieder- holung	Mittel- wert	[pg/ml] 10 µg ODN, 24 h	Meß- wieder- holung	Mittel- wert
nur PBMC	1	3	14	8			
	2	8	12	10			
	3	7	8	8			
PIC	1	1877	1971	1924			
	2	69	72	71			
	3	103	105	104			
LPS	1	4	16	10			
	2	5	6	6			
	3	5	7	6			
LPS+Polymyxin B	1	15	14	14			
	2	6	13	9			
	3	7	5	6			
no ODN	1	22	19	20			
	2	12	10	11			
	3	10	16	13			
pos	1	13	18	15	2	10	6
	2	21	28	24	15	19	17
	3	23	28	25	9	16	13
pos gekauft	1	21	28	25	21	44	33
	2	13	13	13	12	36	24
	3	43	33	38	33	40	36
neg	1	1	5	3	0	0	0
	2	0	5	2	6	4	5
	3	52	51	52	22	21	22
neg gekauft	1	48	52	50	29	36	32
	2	32	33	33	19	15	17
	3	23	28	25	9	16	13
pos2006	1	18	13	15	0	0	0
	2	5	15	10	30	24	27
	3	18	9	14	25	16	21
neg2006	1	261	261	261	404	446	425
	2	111	112	111	154	142	148
	3	50	51	50	10	16	13

7.2.3 Durchführung des 2.Vorversuchs

Für den 2. Vorversuch betrug die ODN-Konzentration 0.5 µM und 0.8 µM, die Inkubationszeiten 30 h und 48 h, die Meßwerte sind in Tabelle 19 aufgelistet. Die folgende ODN wurden dafür verwendet (Tabelle 18):

Tab. 18: Verwendete ODN und Kontroll-Substanzen für den 2. Vorversuch

	Negativkontr	Positivkonto	CpG-ODN	GpC-ODN
Substanzen	PBS	PIC	pos	neg
	no ODN	LPS	pos2006	neg2006
			pos2429	neg2429
			pos2395	
			pos2216	

Tabelle 19: Meßwert des 2. Vorversuchs

substance	Do1 30h	Meßwied.	Do2 30h	Meßwied.	Do3 30h	Meßwied.
PBS	0	0	22	88	0	5
PIC 2.5µg/ml	342	331	216	206	113	116
LPS 10µg/ml	0	0	2	4	0	0
no ODN	0	0	2	6	3	0
pos2429 0.5µM	281	270	40	29	154	163
pos2429 0.8µM	377	370	67	60	380	374
neg2429 0.5µM	0	0	0	0	0	0
neg2429 0.8µM	0	0	0	0	0	5
pos2006 0.5µM	17	17	15	42	22	24
pos2006 0.8µM	14	12	11	13	69	60
neg2006 0.5µM	0	0	0	4	0	0
neg2006 0.8µM	0	0	0	0	3	3
pos 0.5µM	0	0	0	0	0	0
pos 0.8µM	0	0	0	0	0	0
neg 0.5µM	0	0	0	0	0	0
neg 0.8µM	0	0	0	0	0	0
pos2216 0.5µM	>max	>max	963	939	>max	>max
pos2216 0.8µM	>max	>max	1313	1273	>max	>max
pos2395 0.5µM	744	782	93	100	736	777
pos2395 0.8µM	664	678	112	107	709	730

substance	Do1 48h	Meßwied.	Do2 48h	Meßwied.	Do3 48h	Meßwied.
PBS	0	1	0	2	0	0
PIC 2.5µg/ml	331	342	204	208	116	107
LPS 10µg/ml	0	0	2	1	0	0
no ODN	0	0	0	0	0	0
pos2429 0.5µM	312	345	71	66	222	222
pos2429 0.8µM	374	384	98	107	387	400
neg2429 0.5µM	0	0	0	0	0	4
neg2429 0.8µM	0	0	0	0	0	0
pos2006 0.5µM	14	17	4	4	3	0
pos2006 0.8µM	12	14	4	6	22	56
neg2006 0.5µM	0	0	0	0	0	0
neg2006 0.8µM	0	0	0	0	0	0
pos 0.5µM	0	0	0	0	0	0

pos 0.8µM	0	0	0	0	0	0
neg 0.5µM	0	0	0	0	0	0
neg 0.8µM	0	0	0	0	0	0
pos2216 0.5µM	>max	>max	881	888	>max	>max
pos2216 0.8µM	>max	>max	1482	1419	>max	>max
pos2395 0.5µM	646	627	86	98	672	686
pos2395 0.8µM	520	553	105	109	637	672

7.2.4 Durchführung für den Hauptversuch

Für den Hauptversuch wurden ODN-Konzentrationen von 0.5 µM und 1.5 µM sowie Inkubationszeiten von 24 h und 48 h verwendet. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 21 verzeichnet. Die folgende ODN und Kontrollen wurden eingesetzt (Tabelle 20):

Tab. 20: Verwendete ODN und Kontroll-Substanzen für den Hauptversuch

	Negativkontrollen	Positivkontrollen	CpG-ODN	GpC-ODN	modif. CpG-ODN
Substanzen	PBS	PIC	pos2006	neg2006	DFI-T
	no ODN	LPS	pos2429	neg2429	IdC
			pos2216	neg2216	
			posVerzw.	negVerzw.	

Tab. 21: Meßergebnisse Hauptversuch

Donoren	PBS	PIC	LPS	no ODN	pos2216 (0.5µM)	neg2216 (0.5µM)	pos2429 (0.5µM)	neg2429 (0.5µM)	pos (1.5µM)	neg (1.5µM)
1 (24h)	1	20	0	0	2395	1098	307	0	3	0
1 (48h)	1	27	3	5	2616	1364	386	4	7	1
2 (24h)	0	69	0	0	281	244	37	0	0	0
2 (48h)	0	94	4	2	608	715	58	0	2	0
3 (24h)	0	24	0	0	2762	843	309	0	0	0
3 (48h)	0	28	6	3	1625	785	333	1	0	0
Donoren	DFI-T (0.5µM)	IdC (0.5µM)	posVerzw. (0.5µM)	negVerzw. (0.5µM)	pos (0.5µM)	neg (0.5µM)	posVerzw. (1.5µM)	negVerzw. (1.5µM)	DFI-T (1.5µM)	IdC (1.5µM)
1 (24h)	22	2	536	1	3	0	122	0	6	2
1 (48h)	14	2	540	0	9	1	150	0	5	0
2 (24h)	7	0	70	0	1	0	82	0	8	0
2 (48h)	6	0	247	8	0	0	172	4	5	0
3 (24h)	14	0	1632	5	0	0	1100	0	13	0
3 (48h)	8	0	1027	0	0	2	2451	0	11	0

Bei den verwendeten *hPBMC* der drei Donoren lag keine bakterielle Infektion vor, da ihre IL-8-Konzentration (jeweils null) weniger als 20 ng/ml betrug (Tabelle 22).

Tab. 22: IL-8-ELISA-Ergebnisse

mit jeweils zwei Messungen wurden durchgeführt

Donor	IL-8-Konzentration [pg/ml]
1	3
	324
2	16
	414
3	6
	500

8. Anhang

8.1 Varianzanalysen

Eine statistische Auswertung wurde mit Hilfe des EXCEL-Programms ANOVA (*Analysis of Variance*) vom XP-Windows/MS-OFFICE vorgenommen, um der Versuchung zu widerstehen, einen CpG-Effekt sehen zu wollen, wo keiner besteht. Grundlage dieser statistischen Auswertung ist, dass geprüft wird, ob die Nullhypothese mit 95%iger Sicherheit für jeweils zwei Populationen widerlegt werden kann, d. h. dass ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Populationen bestehen. Die Nullhypothese besagt, dass die Daten einer Gesamtheit angehören. Dies wäre der Fall, wenn die Parameter (z. B. CpG-haltige ODN / nicht CpG-haltigen ODN) keinen Einfluß auf die Meßwerte (z. B. IFN- α -Konzentration) ausüben. Das Programm berechnet anhand der Fischer-Verteilung die Prüfgröße F, den kritischen F-Wert und den P-Wert, der der Irrtumswahrscheinlichkeit entspricht. Ist der P-Wert $< \alpha$ bzw. die Prüfgröße $F(\text{ODN}) >$ der kritische F-Wert, dann kann die Nullhypothese mit 95%iger Sicherheit widerlegt werden.

8.1.1 Varianzanalysen für den CBA

Für die statistische Auswertung des CBA wurde eine zweifaktorielle (ODN und Inkubationszeit) Varianzanalyse ohne Meßwiederholung für die in Tabelle 23 aufgeführten Paarvergleiche vorgenommen.

Tab. 23: Eingabewerte für 2 faktorielle ANOVA

Paarvergleiche für IL-10	nach 8 h	nach 12 h	nach 24 h
pos2006/no ODN	97	125	171
	66	78	122
neg2006/no ODN	89	97	136
	66	78	122
pos/no ODN	93	114	151
	66	78	122
neg/no ODN	55	110	137
	66	78	122
MedC/no ODN	369	464	764
	66	78	122
pos2006/neg2006	97	125	171
	89	97	136
pos/neg	93	114	151
	55	110	137

Paarvergleiche für TNF- β	nach 8 h	nach 12 h	nach 24 h
pos2006/no ODN	392	534	978
	344	407	700
neg2006/no ODN	388	421	703
	344	407	700
pos/no ODN	362	461	839
	344	407	700
neg/no ODN	311	433	780
	344	407	700
MedC/no ODN	369	464	764
	344	407	700
pos2006/neg2006	392	534	978
	388	421	703
pos/neg	362	461	839
	311	433	780

Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind in Tabelle 24 zusammengefaßt.

Tab. 24: Ausgabewerte der 2 faktoriellen ANOVA und ihre Interpretation

Frage	Population A	Population B	Prüfwert F(ODN)	krit. F-Wert	P-Wert [%]	Antwort
Ist die IL-10-Expression signifikant unterschiedlich bei An-/Abwesenheit von ODN?	pos2006	no-ODN	55,0	18,5	1,8	ja
	neg2006	no-ODN	51,4	18,5	1,9	ja
	pos	no-ODN	126,0	18,5	0,8	ja
	neg	no-ODN	0,9	18,5	44,0	nein
	MedC	no-ODN	13,5	18,5	6,7	nein
Ist die TNF- β -Expression signifikant unterschiedlich bei An-/Abwesenheit von ODN?	pos2006	no-ODN	5,0	18,5	15,5	nein
	neg2006	no-ODN	2,8	18,5	23,9	nein
	pos	no-ODN	3,8	18,5	18,9	nein
	neg	no-ODN	0,6	18,5	53,4	nein
	MedC	no-ODN	16,4	18,5	5,6	nein
Ist die IL-10-Expression signifikant unterschiedlich bei An-/Abwesenheit von dem CpG-Motiv?	pos2006	neg2006	8,6	18,5	10,0	nein
	pos	neg	3,4	18,5	21,0	nein
Ist die TNF- β -Expression signifikant unterschiedlich bei An-/Abwesenheit von dem CpG-Motiv?	pos2006	neg2006	2,8	18,5	23,9	nein
	pos	neg	25,9	18,5	3,9	ja

Eine Unterscheidung zwischen der An- und Abwesenheit eines ODNs kann für die CpG-ODN pos2006 und pos sowie für das nicht CpG-haltige ODN neg2006 nur für die IL-10-Expression mit 95%iger Sicherheit nachgewiesen werden. Für die TNF- β -Expression ist diese Unterscheidung statistisch nicht zu sehen. Nur für die TNF- β -Expression kann ein signifikanter Unterschied zwischen pos und neg belegt werden. Insgesamt läßt sich also weder der Einfluß eines ODN noch der eines CpG-Motivs statistisch durch diesen CBA-Test an diesen Raji-Zellen nachweisen.

8.1.2 Varianzanalysen für die *ELISA*-Vorversuche

Der Paarvergleich pos, pos2006/neg, neg2006 beim 1. Vorversuch wurde mit Hilfe einer zweifaktoriellen ANOVA mit einer Meßwiederholung durchgeführt (Tabelle 25). Dafür werden alle Werte berücksichtigt, nämlich die aller drei Donoren, der zwei Konzentrationen, der zwei Inkubationszeiten und der zwei Messungen (Messung und Wiederholung).

Tab. 25: Statistische Auswertung des 1. Vorversuchs des α -*ELISA*; pos(bought)=tgct₁₅, neg(bought)=tgct₁₅, pos2006=tcgtcgttttgcgttttgcgtt und neg2006=tgctgcttttgcgttttgcgtt
Eingabe:

	pos (bought) 10 µg, 24 h			pos (bought) 10 µg, 16 h			pos (bought) 3 µg, 24 h			pos (bought) 3 µg, 16 h		
	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3
positiv	21	12	33	31	15	61	21	13	43	32	15	49
Wiederh.	44	36	40	31	23	72	28	13	33	37	17	54
negativ	29	19	9	48	19	29	48	32	23	71	53	65
Wiederh.	36	15	16	58	28	29	52	33	28	71	33	65

	pos 10 µg, 24 h			pos 10 µg, 16 h			pos 3 µg, 24 h			pos 3 µg, 16 h		
	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3
positiv	2	15	9	8	2	6	13	21	23	15	15	4
Wiederh.	10	19	16	17	2	8	18	28	28	18	15	9
negativ	0	6	22	14	4	11	1	0	52	11	4	1
Wiederh.	0	4	21	14	7	19	5	5	51	12	3	15

	pos2006 3 µg, 16 h			pos2006 3 µg, 24 h			pos2006 10 µg, 16 h			pos2006 10 µg, 24 h		
	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3
positiv	10	5	6	18	5	18	7	7	11	0	30	25
Wiederh.	10	11	11	13	15	9	21	7	19	0	24	16
negativ	309	132	49	261	111	50	480	191	61	404	154	10
Wiederh.	318	148	54	261	112	51	473	172	72	446	142	16

Die negativen Sequenzen sind analog den positiven Sequenzen
nur mit invertierten CpG-Dimeren

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

Ausgabe:

ODN	pos (bought) 10 µg, 24 h			pos (bought) 10 µg, 16 h			pos (bought) 3 µg, 24 h			pos (bought) 3 µg, 16 h		
	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3	Do1	Do2	Do3
<i>positive</i>												
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	65	48	73	61	38	133	49	27	76	69	31	103
Mittelwert	33	24	36	31	19	66	25	13	38	35	16	51
Varianz	253	295	29	0	36	69	19	0	52	11	2	10
<i>negative</i>												
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	64	35	25	106	46	59	100	65	51	142	86	130
Mittelwert	32	17	13	53	23	29	50	33	25	71	43	65
Varianz	26	8	22	47	38	0	10	0	12	0	198	0
Gesamt												
Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Summe	130	82	98	167	84	191	149	92	126	211	118	233
Mittelwert	32	21	24	42	21	48	37	23	32	53	29	58
Varianz	93	116	208	181	31	481	228	124	73	441	318	67
ODN	pos 10 µg, 24 h			pos 10 µg, 16 h			pos 3 µg, 24 h			pos 3 µg, 16 h		
<i>positive</i>												
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	12	34	25	25	4	14	31	49	51	34	29	14
Mittelwert	6	17	13	12	2	7	15	24	25	17	15	7
Varianz	30	6	22	39	0	2	17	29	12	5	0	14
<i>negative</i>												
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	0	10	44	28	11	30	6	5	103	23	7	16
Mittelwert	0	5	22	14	5	15	3	2	52	12	3	8
Varianz	0	2	1	0	4	30	9	11	1	1	0	97
Gesamt												
Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Summe	12	44	69	53	15	44	37	53	154	57	36	30
Mittelwert	3	11	17	13	4	11	9	13	38	14	9	8
Varianz	21	50	37	14	4	34	61	175	236	11	42	37
	pos2006 3 µg, 16 h			pos2006 3 µg, 24 h			pos2006 10 µg, 16 h			pos2006 10 µg, 24 h		
<i>positive</i>												
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	19	15	17	31	20	27	28	13	30	0	54	41
Mittelwert	10	8	9	15	10	14	14	7	15	0	27	21
Varianz	0	16	14	17	50	40	110	0	30	0	17	44
<i>negative</i>												
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	627	281	103	522	222	101	953	362	133	850	296	26
Mittelwert	313	140	51	261	111	50	477	181	66	425	148	13
Varianz	41	130	10	0	1	1	27	188	69	877	74	18
Gesamt												
Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Summe	646	296	120	553	243	128	981	376	163	850	351	67
Mittelwert	161	74	30	138	61	32	245	94	41	212	88	17
Varianz	30771	5908	616	20108	3411	464	71385	10220	907	60482	4900	39

<i>positive ODN</i>	Gesamt
Anzahl	72
Summe	1391
Mittelwert	19
Varianz	205
<i>negative ODN</i>	
Anzahl	72
Summe	5669
Mittelwert	79
Varianz	13334

SU	<i>Quadrat- summen</i>	<i>Freiheitsgrade</i>	<i>Mittlere Quadratsumme</i>	<i>Prüfgröße F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
positive/negative	127057	1	127057	2820	0,00%	3,97
Spalten	451420	35	12898	286	0,00%	1,59
WW	506586	35	14474	321	0,00%	1,59
Fehler	3244	72	45			
Gesamt	1088307	143				

ANOVA-Ergebnisse: Da der P-Wert sehr viel kleiner als 5% ist, unterscheiden sich die positiven (CpG-haltigen ODN) von ihren negativen (GpC-ODN) signifikant. Jedoch sollte die Größe der Meßwerte berücksichtigt werden: Die Meßwerte des 1. Vorversuchs sind kleine Werte. Im Rahmen der statistischen Auswertung bedeutet „signifikant“ nicht zwangsläufig „groß“.

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse des 2. IFN- α -ELISA-Vorversuchs aufgelistet.

Tab. 26: Meßwerte des 2. Vorversuchs des α -ELISA

substance	Do1 30h	Meßwied.	Do2 30h	Meßwied.	Do3 30h	Meßwied.
PBS	0	0	22	88	0	5
PIC 2.5 μ g/ml	342	331	216	206	113	116
LPS 10 μ g/ml	0	0	2	4	0	0
no ODN	0	0	2	6	3	0
pos2429 0.5 μ M	281	270	40	29	154	163
pos2429 0.8 μ M	377	370	67	60	380	374
neg2429 0.5 μ M	0	0	0	0	0	0
neg2429 0.8 μ M	0	0	0	0	0	5
pos2006 0.5 μ M	17	17	15	42	22	24
pos2006 0.8 μ M	14	12	11	13	69	60
neg2006 0.5 μ M	0	0	0	4	0	0
neg2006 0.8 μ M	0	0	0	0	3	3
pos 0.5 μ M	0	0	0	0	0	0
pos 0.8 μ M	0	0	0	0	0	0
neg 0.5 μ M	0	0	0	0	0	0
neg 0.8 μ M	0	0	0	0	0	0
pos2216 0.5 μ M	>max	>max	963	939	>max	>max
pos2216 0.8 μ M	>max	>max	1313	1273	>max	>max
pos2395 0.5 μ M	744	782	93	100	736	777
pos2395 0.8 μ M	664	678	112	107	709	730

substance	Do1 48h	Meßwied.	Do2 48h	Meßwied.	Do3 48h	Meßwied.
PBS	0	1	0	2	0	0
PIC 2.5 μ g/ml	331	342	204	208	116	107
LPS 10 μ g/ml	0	0	2	1	0	0
no ODN	0	0	0	0	0	0
pos2429 0.5 μ M	312	345	71	66	222	222
pos2429 0.8 μ M	374	384	98	107	387	400
neg2429 0.5 μ M	0	0	0	0	0	4
neg2429 0.8 μ M	0	0	0	0	0	0
pos2006 0.5 μ M	14	17	4	4	3	0
pos2006 0.8 μ M	12	14	4	6	22	56
neg2006 0.5 μ M	0	0	0	0	0	0
neg2006 0.8 μ M	0	0	0	0	0	0
pos 0.5 μ M	0	0	0	0	0	0
pos 0.8 μ M	0	0	0	0	0	0
neg 0.5 μ M	0	0	0	0	0	0
neg 0.8 μ M	0	0	0	0	0	0
pos2216 0.5 μ M	>max	>max	881	888	>max	>max
pos2216 0.8 μ M	>max	>max	1482	1419	>max	>max
pos2395 0.5 μ M	646	627	86	98	672	686
pos2395 0.8 μ M	520	553	105	109	637	672

Bei dem zweiten Vorversuch wurde keine statistische Auswertung vorgenommen, weil die IFN- α -Werte für pos2216 außerhalb der Detektionsgrenze liegen. Bei diesem Vorversuch ging es darum, eine gut stimulierende CpG-ODN-Sequenz zu finden, was mit pos2216 gelungen war.

8.1.3 Varianzanalysen für den ELISA-Hauptversuch

Die Meßwerte des IFN- α -ELISA-Hauptversuchs, die für die Varianzanalysen (Tabellen 30-47) herangezogen werden, sind in Tabellen 27-29 aufgeführt.

Tab. 27: Meßwerte des Hauptversuchs für Donor 1: Ergebnisse des IFN- α -ELISA; 24 und 48 h Inkubationszeit; *hPBMC*; Rot=gemessene Absorptionswerte bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm, Blau=die berechneten Konzentrationen, Schwarz=berechnete Mittelwerte der IFN- α -Konzentration ohne Nachkommastellen

Kontroll-Substanzen (24 h)

Konzentration

PBS	0.05;0.052	[0;1.3596]	0			
PIC	0.076;0.07	[22.607;16.958]	20			2.5 μ g/ml
LPS	0.051;0.05	[0.63608;0]	0			10 ng/ml
no ODN	0.052;0.04	[1.3496;0]	0			
ODN	Konzentration 0.5 μ M (24 h)			1.5 μ M (24 h)		
pos2216	0.182;0.156	[2682.7;2109.4]	2395			
neg2216	0.161;0.159	[1109.4;1087.5]	1098			
pos2429	0.153;0.153	[306.61;306.61]	307			
neg2429	0.05;0.047	[0;0]	0			
DFI-T	0.084;0.066	[30.334;13.279]	22	0.056;0.059	[4.5324;7.0682]	6
IdC	0.053;0.052	[2.1204;1.3596]	2	0.051;0.054	[0.63608;2.9063]	2
posVerzw.	0.214;0.229	[510.48;561.87]	536	0.18;0.163	[131.91;113.14]	123
negVerzw.	0.057;0.047	[5.3665;0]	1	0.048;0.049	[0;0]	0
pos	0.055;0.054	[3.7115;2.9063]	3	0.18;0.163	[2.9063;2.1204]	3
neg	0.049;0.048	[0;0]	0	0.048;0.049	[0;0.63608]	0

Kontroll-Substanzen (48 h)

Konzentration

PBS	0.05;0.052	[0;1.3596]	1			
PIC	0.08;0.081	[26.446;27.413]	27			2.5 μ g/ml
LPS	0.055;0.053	[3.7115;2.1204]	3			10 ng/ml
no ODN	0.056;0.057	[4.5324;5.3665]	5			

ODN-Konz./Zeit 0.5 μ M(48 h)

1.5 μ M(48 h)

pos2216	0.179;0.0179	[2616;2616]	2616			
neg2216	0.184;0.184	[1363.6;1363.6]	1364			
pos2429	0.169;0.185	[359.18;412.44]	386			
neg2429	0.055;0.055	[3.7115;3.7115]	4			
DFI-T	0.067;0.067	[14.191;14.191]	14	0.053;0.06	[2.1204;7.9334]	5
IdC	0.05;0.056	[0;4.5324]	2	0.045;0.047	[0;0]	0
posVerzw.	0.223;0.222	[541.26;537.83]	540	0.192;0.201	[145.31;155.44]	150
negVerzw.	0.053;0.048	[2.1204;0]	0	0.038;0.052	[0;1.3596]	0
pos	0.059;0.063	[7.0682;10.576]	9	0.057;0.06	[5.3665;7.933]	7
neg	0.05;0.052	[0;1.3596]	1	0.048;0.054	[0;2.9063]	1

Tab. 28: Donor 2: Ergebnisse des IFN- α -ELISA für 24 bzw. 48 Stunden Inkubationszeit; Rot=gemessene Absorptionswerte bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm, Blau=die berechneten Konzentrationen, Schwarz=berechnete Mittelwerte der IFN- α -Konzentration ohne Nachkommastellen

Kontroll-Substanzen (24 h)

Konzentration

PBS	0.044;0.054	[0;0.88399]	0	
PIC	0.112;0.101	[75.768;62.426]	69	2.5 μ g/ml
LPS	0.047;0.043	[0.88399;0]	0	10 ng/ml
no ODN	0.047;0.047	[0.88399;0]	0	

ODN	Konzentration 0.5 μ M (24 h)		1.5 μ M (24 h)	
pos2216	0.061;0.058	[314;247.73]	281	
neg2216	0.151;0.148	[248.17;240.64]	244	
pos2429	0.058;0.058	[37.159;37.159]	37	
neg2429	0.044;0.043	[0;0]	0	
DFI-T	0.054;0.052	[8.0514;5.9311]	7	0.054;0.053 [8.0514;6.9865] 8
IdC	0.047;0.044	[0.88399;0]	0	0.046;0.045 [0;0] 0
posVerzw.	0.113;0.101	[76.989;62.426]	70	0.12;0.115 [85.561;79.432] 82
negVerzw.	0.049;0.043	[2.8401;0]	0	0.045;0.044 [0;0] 0
pos	0.048;0.046	[1.8461;0]	1	0.045;0.047 [0;0.88399] 0
neg	0.047;0.043	[0.88399;0]	0	0.047;0.046 [0.88399;0] 0

Kontroll-Substanzen (48 h)

Konzentration

PBS	0.043;0.045	[0;0]	0	
PIC	0.129;0.125	[95.656;91.715]	94	2.5 μ g/ml
LPS	0.051;0.05	[4.8867;3.8553]	4	10 ng/ml
no ODN	0.049;0.048	[2.8401;1.8461]	2	

ODN-Konz./Zeit	0.5 μ M(48 h)		1.5 μ M(48 h)	
pos2216	0.081;0.081	[608.48;608.48]	608	
neg2216	0.134;0.133	[719.24;711.26]	715	
pos2429	0.059;0.061	[53.943;62.8]	58	
neg2429	0.046;0.046	[0;0]	0	
DFI-T	0.052;0.052	[5.9311;5.9311]	6	0.05;0.053 [3.8553;6.9865] 5
IdC	0.046;0.046	[0;0]	0	0.043;0.056 [0;0] 0
posVerzw.	0.076;0.071	[266.19;228.42]	247	0.049;0.078 [67.027;281.38] 172
negVerzw.	0.045;0.045	[7.8239;7.8239]	8	0.043;0.042 [5.1027;3.7679] 4
pos	0.044;0.047	[0;0.88399]	0	0.045;0.051 [0;4.8867] 2
neg	0.043;0.047	[0;0.88399]	0	0.044;0.048 [0;1.8461] 0

Tab. 29: Donor 3: Ergebnisse des IFN- α -ELISA für 24 bzw. 48 Stunden Inkubationszeit; Rot=gemessene Absorptionswerte bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm, Blau=die berechneten Konzentrationen, Schwarz=berechnete Mittelwerte der IFN- α -Konzentration ohne Nachkommastellen

Kontroll-Substanzen (24 h)

Konzentration

PBS	0.043;0.042	[0;0]	0	
PIC	0.061;0.056	[28.421;20.39]	24	2.5 μ g/ml
LPS	0.041;0.041	[0;0]	0	10 ng/ml
no ODN	0.043;0.043	[0;0]	0	

ODN Konzentration 0.5 μ M (24 h) 1.5 μ M (24 h)

pos2216	0.06;0.061	[2682.4;2842.1]	2762	
neg2216	0.666;0.613	[879.07;807.51]	843	
pos2429	0.274;0.23	[340.5;278.11]	309	
neg2429	0.04;0.04	[0;0]	0	
DFI-T	0.054;0.05	[17.137;10.53]	14	0.051;0.052 [8.0514;6.9865] 13
IdC	0.044;0.042	[0;0]	0	0.04;0.044 [0;0] 0
posVerzw.	0.261;0.267	[1610.7;1653.1]	1632	0.192;0.187 [1118.3;1082.3] 1100
negVerzw.	0.051;0.042	[12.197;0]	5	0.043;0.044 [0;0] 0
pos	0.044;0.042	[0;0]	0	0.044;0.044 [0;0.88399] 0
neg	0.044;0.041	[0;0]	0	0.042;0.044 [0.88399;0] 0

Kontroll-Substanzen (48 h)

Konzentration

PBS	0.043;0.044	[0;0]	0	
PIC	0.057;0.064	[22.007;33.183]	28	2.5 μ g/ml
LPS	0.049;0.046	[8.8502;3.6947]	6	10 ng/ml
no ODN	0.045;0.046	[1.9081;3.6947]	3	

ODN-Konz./Zeit 0.5 μ M(48 h) 1.5 μ M(48 h)

pos2216	0.049;0.053	[1340.5;1911.2]	1624	
neg2216	0.091;0.094	[762.12;808.54]	785	
pos2429	0.269;0.268	[333.44;332.03]	333	
neg2429	0.044;0.045	[0;1.9081]	1	
DFI-T	0.048;0.049	[7.1543;8.8502]	8	0.047;0.053 [5.4382;15.499] 11
IdC	0.042;0.041	[0;0]	0	0.04;0.042 [0;0] 0
posVerzw.	0.110;0.106	[1058.3;995.52]	1027	0.368;0.318 [2664;2239.1] 2451
negVerzw.	0.038;0.038	[0;0]	0	0.036;0.039 [0;0] 0
pos	0.04;0.044	[0;0]	0	0.041;0.046 [0;3.6947] 0
neg	0.042;0.048	[0;7.1543]	2	0.039;0.044 [0;0] 0

Tab. 30: ANOVA des Hauptversuchs

Eingabe:

	pos2216, 0.5,24h	pos2216,0.5 ,48h	neg2216,0.5 ,24h	neg2216,0.5 ,48h	pos2429,0.5,2 4h	pos2429,0.5 ,48h	neg2429,0. 5,24h	neg2429,0.5 ,48h	posVerz,0. 5,24h
Donor1	2683	2616	1109	1364	307	359	0	4	510
	2109	2616	1088	1364	307	412	0	4	562
Donor2	314	608	248	719	37	54	0	0	77
	247	608	241	711	37	63	0	0	62
Donor3	2682	1341	762	879	341	333	0	0	1611
	2842	1911	809	808	278	332	0	2	1653

	posVerz,0.5,48 h	posVerz,1.5 ,24h	posVerz,1.5 ,48h	negVerz,0.5 ,24h	negVerz,0.5,4 8h	negVerz,1.5, 24h	negVerz,1.5 ,48h	DFI-T, 0.5,24h	DFI-T, 0.5,48h
Donor1	541	132	145	5	2	0	0	5	14
	538	113	155	0	0	0	1	7	14
Donor2	266	86	67	3	8	0	5	8	6
	228	79	281	0	2	0	4	6	6
Donor3	1058	1118	2664	12	0	0	0	17	7
	996	1082	2239	0	0	0	0	11	9

	DFI-T, 1.5,24h	DFI-T, 1.5,48h	ldC, 0.5,24h	ldC, 0.5,48h	ldC, 1.5,24h	ldC, 1.5,48h	pos, 0.5,24h	pos, 0.5,48h	pos, 1.5,24h
Donor1	30	2	2	0	1	0	4	7	3
	13	8	1	5	3	0	3	11	2
Donor2	8	4	1	0	0	0	2	0	0
	7	7	0	0	0	0	0	1	1
Donor3	12	5	0	0	0	0	0	0	0
	14	16	0	0	0	0	0	0	0

	pos, 1.5,48h	neg, 0.5,24h	neg, 0.5,48h	neg, 1.5,24h	neg, 1.5,48h
Donor1	5	0	0	0	0
	8	0	1	1	3
Donor2	0	1	0	1	0
	5	0	1	0	2
Donor3	0	0	0	0	0
	4	0	7	0	0

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung									
Ausgabe	pos2216,0.5,24h	pos2216,0.5,48h	neg2216,0.5,24h	neg2216,0.5,48h	pos2429,0.5,24h	pos2429,0.5,48h	neg2429,0.5,24h	neg2429,0.5,48h	posVerz,0.5,24h
<i>Donor1</i>									
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	4792,1	5232	2196,9	2727,2	613,22	771,62	0	7,42	1072,35
Mittelw.	2396,05	2616	1098,45	1363,6	306,61	385,81	0	3,71	536,175
Varianz	164336,44	0	239,805	0	0	1418,31	0	0	1320,47
<i>Donor2</i>									
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	560,7	1216,96	488,77	1430,5	74,319	116,74	0	0	139,416
Mittelw.	280,35	608,48	244,385	715,25	37,1595	58,37	0	0	69,708
Varianz	2264,645	0	28,6525	31,8402	5E-07	39,2498	0	0	106,055
<i>Donor3</i>									
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	5524,5	3251,7	1570,66	1686,58	618,61	665,47	0	1,91	3263,8
Mittelw.	2762,25	1625,85	785,33	843,29	309,305	332,735	0	0,955	1631,9
Varianz	12752,045	162849	1077,41	2560,42	1946,256	0,99405	0	1,82405	898,88
<i>Gesamt</i>									
Anzahl	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Summe	10877,3	9700,66	4256,33	5844,28	1306,149	1553,83	0	9,33	4475,57
Mittelw.	1812,8833	1616,78	709,388	974,047	217,6915	258,972	0	1,555	745,928
Varianz	1471886,2	838647	149615	94848,4	19945,79	24999,7	0	3,33363	514952

	posVerzw,0.5,48h	posVerzw,1,5,24h	posVerzw,1,5,48h	negVerzw,0,5,24h	negVerzw,0,5,48h	negVerzw,1,5,24h	negVerzw,1,5,48h	DFI-T,0,5,24h	DFI-T,0,5,48h
<i>Donor1</i>									
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	1079,09	245,05	300,75	5,37	2,12	0	1,36	11,6	28,38
Mittelw.	539,545	122,525	150,375	2,685	1,06	0	0,68	5,8	14,19
Varianz	5,88245	176,156	51,3084	14,4185	2,2472	0	0,9248	3,2258	0
<i>Donor2</i>									
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	494,61	164,99	348,407	2,84	9,6699	0	8,8706	13,98	11,86
Mittelw.	247,305	82,495	174,204	1,42	4,83495	0	4,4353	6,99	5,93
Varianz	713,28645	18,7885	22973,6	4,0328	17,86764	0	0,89085	2,2472	0
<i>Donor3</i>									
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	2053,82	2200,6	4903,1	12,2	0	0	0	27,67	16
Mittelw.	1026,91	1100,3	2451,55	6,1	0	0	0	13,835	8
Varianz	1970,6642	648	90270	74,42	0	0	0	21,8461	1,445
<i>Gesamt</i>									
Anzahl	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Summe	3627,52	2610,64	5552,26	20,41	11,7899	0	10,2306	53,25	56,24
Mittelw.	604,58667	435,107	925,376	3,40167	1,964983	0	1,7051	8,875	9,37333
Varianz	124633,01	265978	1420296	23,2629	9,189714	0	4,928	20,508	15,0661

	DFI-T, 1,5,24h	DFI-T, 1,5,48h	ldC, 0,5,24h	ldC, 0,5,48h	ldC, 1,5,24h	ldC, 1,5,48h	pos, 0,5,24h	pos, 0,5,48h	pos, 1,5,24h	pos, 1,5,48h	neg, 0,5,24h
<i>Donor1</i>											
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	43,61	10,05	3,48	4,53	3,55	0	6,62	17,65	5,03	13,3	0
Mittelwert	21,81	5,025	1,74	2,265	1,775	0	3,31	8,825	2,515	6,65	0
Varianz	145,4	16,88	0,2888	10,26045	2,576	0	0,32	6,16	0,312	3,277	0
<i>Donor2</i>											
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	15,04	10,85	0,88	0	0	0	1,85	0,884	0,884	4,89	0,88
Mittelwert	7,52	5,425	0,44	0	0	0	0,925	0,442	0,442	2,445	0,44
Varianz	0,562	4,898	0,3872	0	0	0	1,711	0,391	0,391	11,96	0,387
<i>Donor3</i>											
Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Summe	26,05	20,94	0	0	0	0	0	0	0	3,69	0
Mittelwert	13,03	10,47	0	0	0	0	0	0	0	1,845	0
Varianz	1,361	50,6	0	0	0	0	0	0	0	6,808	0
<i>Gesamt</i>											
Anzahl	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Summe	84,7	41,84	4,36	4,53	3,55	0	8,47	18,53	5,914	21,88	0,88
Mittelwert	14,12	6,973	0,72667	0,755	0,592	0	1,412	3,089	0,986	3,647	0,147
Varianz	70,98	21,84	0,79003	3,42015	1,355	0	2,74	21,09	1,583	9,892	0,129

	neg, 0,5,48h	neg, 1,5,24h	neg, 1,5,48h	
<i>Donor1</i>				
Anzahl	2	2	2	300
Summe	1,36	0,64	3	19199
Mittelwert	0,68	0,32	1	300
Varianz	0,925	0,205	4	435384
			2	3291
<i>Donor2</i>				
Anzahl	2	2	2	51
Summe	0,884	0,88	2	5122
Mittelwert	0,442	0,44	1	80
Varianz	0,391	0,387	2	29729
			0	32541
<i>Donor3</i>				
Anzahl	2	2	2	508
Summe	7,154	0	0	64
Mittelwert	3,577	0	0	25854
Varianz	25,59	0	0	404
			0	560697
			6	
<i>Gesamt</i>				
Anzahl	6	6	6	5
Summe	9,398	1,52	5	
Mittelwert	1,566	0,253	1	835
Varianz	7,818	0,16	2	

ANOVA

SU	SS	dF	MS	F	P-Wert	krit. F
Donoren	3501392	2	1750696	358,24	0,00000%	3,09
ODN	43497307	31	1403139	287,12	0,00000%	1,57
WW	20659568	62	333219	68,19	0,00000%	1,45
Fehler	469142	96	4886,9			
Gesamt	68127410	191				

SU=Streuungsursache

SS=Quadratsumme

MS=SS:dF; mittlere Quadratsumme=Varianz des betrachteten Parameters dividiert durch den zugehörigen Freiheitsgrad

krit.F=kritischer F-Wert ist ein Tabellenwert, der die Anzahl der Freiheitsgrade des betrachteten Parameters für einen Fehler von 5% berücksichtigt, der nicht nur vom EXCEL-Programm ausgegeben wird, sondern auch in Mathematikformelsammlungen zu finden ist (Bronstein et al., 1997)

WW=Wechselwirkung, beschreibt die Abweichung des Modells einfacher, voneinander unabhängiger Effekte

Als Ergebnis ist festzuhalten:

- Mindestens ein ODN unterscheidet sich signifikant von den anderen.
- Mindestens ein Donor liefert verschiedene Werte von den anderen

Beide „einfachen“ Effekte sind hochsignifikant, d. h. statistisch gesichert. Die Wechselwirkung Donor/ODN ist statistisch gesichert. Dies ist häufig der Fall, wenn die einfachen Effekte so hochsignifikant sind. Daher werden im Folgenden Paarvergleiche durchgeführt, die jeweils die CpG-positive Sequenz mit der negativen vergleicht. Im Falle eines CpG-Effekts herrscht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden, der am P-Wert abgelesen werden kann. Beträgt dieser weniger als 5%, ist ein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden.

Tab. 31: Paarvergleich pos2216/neg2216

Eingabe:

ODN	Do1 0.5 24h	Do1 0.5 48h	Do2 0.5 24h	Do2 0.5 48h	Do3 0.5 24h	Do3 0.5 48h
pos2216	2683	2616	314	608	2682	1341
	2109	2616	247	608	2842	1911
neg2216	1109	1364	248	719	879	762
	1088	1364	241	711	808	809

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

Ausgabe:

pos2216/neg2216	Do1 0.5 24h	Do1 0.5 48h	Do2 0.5 24h	Do2 0.5 48h	Do3 0.5 24h	Do3 0.5 48h	Gesamt	Stabw.
pos2216								1030
Anzahl	2	2	2	2	2	2		12
Summe	4792	5232	561	1217	5525	3252		20578
Mittelwert	2396	2616	280	608	2762	1626		10289
Varianz	164336	0	2265	0	12752	162849		342202
Stabw.	405	0	48	0	113	404		969
neg2216								361
Anzahl	2	2	2	2	2	2		12
Summe	2197	2727	489	1431	1687	1571		10101
Mittelwert	1098	1364	244	715	843	785		5050
Varianz	240	0	29	32	2560	1077		3938
Stabw.	15	0	5	6	51	33		
Gesamt								877
Anzahl	4	4	4	4	4	4		
Summe	6989	7959	1049	2647	7211	4822		
Mittelwert	1747	1990	262	662	1803	1206		
Varianz	616114	522835	1196	3811	1232573	290134		

ANOVA

Streuungsursache	SS	dF	MS	F	P-Wert	krit.F
pos2216/neg2216	4573953	1	4573952,63	158,57	0,00000%	4,7472
Inkubationsbed.	9674451	5	1934890,26	67,08	0,00000%	3,1059
Wechselwirkung	3079894	5	615978,71	21,35	0,00136%	3,1059
Fehler	346141	12	28845,04			
Gesamt	17674438	23				

Pos2216 und neg2216 sind signifikant verschieden.

Tab. 32: Paarvergleich pos2429/neg2429

Eingabe:								
ODN	Do1 0.5 24h	Do1 0.5 48h	Do2 0.5 24h	Do2 0.5 48h	Do3 0.5 24h	Do3 0.5 48h		
pos2429	307	359	37	54	341	333		
	307	412	37	63	278	332		
neg2429	0	4	0	0	0	0		
	0	4	0	0	0	2		
Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung								
Ausgabe:								
ODN	Do1 0.5 24h	Do1 0.5 48h	Do2 0.5 24h	Do2 0.5 48h	Do3 0.5 24h	Do3 0.5 48h	Gesamt	Stabw.
pos2429								144,55
Anzahl	2	2	2	2	2	2	12	
Summe	613	772	74	117	619	665	2860	
Mittelwert	307	386	37	58	309	333	238	
Varianz	0	1418	0	39	1946	1	20895	
(Stabw.)	0	38	0	6	44	1	145	
neg2429								1,4747
Anzahl	2	2	2	2	2	2	12	
Summe	0	7	0	0	0	2	9	
Mittelwert	0	4	0	0	0	1	1	
Varianz	0	0	0	0	0	2	2	
(Stabw.)	0	0	0	0	0	1	1	
Gesamt								157,21
Anzahl	4	4	4	4	4	4		
Summe	613	779	74	117	619	667		
Mittelwert	153	195	19	29	155	167		
Varianz	31337	49140	460	1149	32539	36694		
(Stabw.)	177	222	21	34	180	192		
ANOVA								
SU	SS	dF	MS	F	P-Wert	krit.F		
pos2429/neg2429	338592	1	338591,66	1192,70	0,00000%	4,75		
Inkubationsbed.	114503	5	22900,62	80,67	0,00000%	3,11		
WW	111954	5	22390,78	78,87	0,00000%	3,11		
Fehler	3407	12	283,89					
Gesamt	568455	23						

Ergebnis des Paarvergleichs zwischen pos2429 und neg2429 ist, dass sie sich signifikant voneinander unterscheiden.

Tab. 33: Paarvergleich posVerzw./negVerzw., nur eine Konzentration
Paarvergleich posVerzw./negVerzw.

Eingabe

konz1	posVerzw.	negVerzw.
Do1 24h	510	5
Wiederh.	562	0
Do1 48h	541	2
Wiederh.	538	0
Do2 24h	77	3
Wiederh.	62	0
Do2 48h	266	8
Wiederh.	228	8
Do3 24h	1611	12
Wiederh.	1653	0
Do3 48h	1058	0
Wiederh.	996	0

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	posVerzw.	negVerzw.	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1072	5	1077
Mittelwert	536	2,5	269,25
Varianz	1352	12,5	95328,91667
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1079	2	1081
Mittelwert	539,5	1	270,25
Varianz	4,5	2	96662,91667
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	139	3	142
Mittelwert	69,5	1,5	35,5
Varianz	112,5	4,5	1580,333333
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	494	16	510
Mittelwert	247	8	127,5
Varianz	722	0	19281
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	3264	12	3276
Mittelwert	1632	6	819
Varianz	882	72	881610
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	2054	0	2054
Mittelwert	1027	0	513,5
Varianz	1922	0	352217

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	12	12
Summe	8102	38
Mittelwert	675	3
Varianz	296317	17

SU	SS	dF	MS	F	P-Wert	krit. F-Wert
Stichprobe	1629145	5	325828,97	768,77	0,00000%	3,11
posVerzw./						
negVerzw.	2709504	1	2709504,00	6392,85	0,00000%	4,75
WW	1625451	5	325090,10	767,02	0,00000%	3,11
Fehler	5086	12	423,83			
Gesamt	5969185	23				

PosVerzw. und negVerzw. sind signifikant voneinander verschieden.

Tab. 34: Paarvergleich posVerzw./negVerzw. zwei Konzentrationen

posVerzw./negVerzw. 2 Konzentrationen

Paarvergleich posVerzw./negVerzw.

Eingabe

konz1	posVerzw.	negVerzw.
Do1 24h, 0.5 µM	510	5
Wiederh.	562	0
Do1 48h, 0.5 µM	541	2
Wiederh.	538	0
Do2 24h, 0.5 µM	77	3
Wiederh.	62	0
Do2 48h, 0.5 µM	266	8
Wiederh.	228	8
Do3 24h, 0.5 µM	1611	12
Wiederh.	1653	0
Do3 48h, 0.5 µM	1058	0
Wiederh.	996	0
Do1 24h, 1.5 µM	132	0
Wiederh.	113	0
Do1 48h, 1.5 µM	145	0
Wiederh.	155	1
Do2 24h, 1.5 µM	86	0
Wiederh.	79	0
Do2 48h, 1.5 µM	67	5
Wiederh.	281	4
Do3 24h, 1.5 µM	1118	0
Wiederh.	1082	0
Do3 48h, 1.5 µM	2664	0
Wiederh.	2239	0

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	posVerzw.	negVerzw.	Gesamt		posVerzw.	negVerzw.	Gesamt
<i>Do1 24h, 0.5 µM</i>				<i>Do1 24h, 1.5 µM</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	1072	5	1077	Summe	245	0	245
Mittelwert	536	2,5	269,25	Mittelwert	122,5	0	61,25
Varianz	1352	12,5	95328,92	Varianz	180,5	0	5062,25
<i>Do1 48h, 0.5 µM</i>				<i>Do1 48h, 1.5 µM</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	1079	2	1081	Summe	300	1	301
Mittelwert	539,5	1	270,25	Mittelwert	150	0,5	75,25
Varianz	4,5	2	96662,92	Varianz	50	0,5	7466,91667
<i>Do2 24h, 0.5 µM</i>				<i>Do2 24h, 1.5 µM</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	139	3	142	Summe	165	0	165
Mittelwert	69,5	1,5	35,5	Mittelwert	82,5	0	41,25
Varianz	112,5	4,5	1580,333	Varianz	24,5	0	2276,91667
<i>Do2 48h, 0.5 µM</i>				<i>Do2 48h, 1.5 µM</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	494	16	510	Summe	348	9	357
Mittelwert	247	8	127,5	Mittelwert	174	4,5	89,25
Varianz	722	0	19281	Varianz	22898	0,5	17209,5833
<i>Do3 24h, 0.5 µM</i>				<i>Do3 24h, 1.5 µM</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	3264	12	3276	Summe	2200	0	2200
Mittelwert	1632	6	819	Mittelwert	1100	0	550
Varianz	882	72	881610	Varianz	648	0	403549,333
<i>Do3 48h, 0.5 µM</i>				<i>Do3 48h, 1.5 µM</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	2054	0	2054	Summe	4903	0	4903
Mittelwert	1027	0	513,5	Mittelwert	2451,5	0	1225,75
Varianz	1922	0	352217	Varianz	90312,5	0	2033388,25

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	24	24
Summe	16263	48
Mittelwert	677,6	2,0
Varianz	539672,7	11,1

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	6143457,06	11	558496,10	112,45	0,0000%	2,22
posVerzw./negVerzw.	5477629,69	1	5477629,69	1102,87	0,0000%	4,26
WW	6150070,06	11	559097,28	112,57	0,0000%	2,22
Fehler	119200,50	24	4966,69			
Gesamt	17890357,31	47				

Auch unter Berücksichtigung beider Konzentrationen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen posVerzw. und negVerzw.

Tab. 35: Paarvergleich pos/neg

Eingabe

konz1	pos	neg
Do1 24h	4	0
Wiederh.	3	0
Do1 48h	7	0
Wiederh.	11	1
Do2 24h	1	1
Wiederh.	0	0
Do2 48h	0	0
Wiederh.	1	1
Do3 24h	0	0
Wiederh.	0	0
Do3 48h	0	0
Wiederh.	0	1
K2Do1 24h	3	0
Wiederh.	2	1
Do1 48h	5	0
Wiederh.	8	3
Do2 24h	0	1
Wiederh.	1	0
Do2 48h	0	0
Wiederh.	5	1
Do3 24h	0	1
Wiederh.	1	0
Do3 48h	0	0
Wiederh.	1	0

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	pos	neg	Gesamt				
<i>Konz.1 Do1 24h</i>				<i>Konz.2 Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	7	0	7	Summe	5	1	6
Mittelwert	4	0	2	Mittelwert	3	1	2
Varianz	1	0	4	Varianz	1	1	2
<i>Konz.1 Do1 48h</i>				<i>Konz.2 Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	18	1	19	Summe	13	3	16
Mittelwert	9	1	5	Mittelwert	7	2	4
Varianz	8	1	27	Varianz	5	5	11
<i>Konz.1 Do2 24h</i>				<i>Konz.2 Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	1	1	2	Summe	1	1	2
Mittelwert	1	1	1	Mittelwert	1	1	1
Varianz	1	1	0	Varianz	1	1	0
<i>Konz.1 Do2 48h</i>				<i>Konz.2 Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	1	1	2	Summe	5	1	6
Mittelwert	1	1	1	Mittelwert	3	1	2
Varianz	1	1	0	Varianz	13	1	6
<i>Konz.1 Do3 24h</i>				<i>Konz.2 Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	0	0	0	Summe	1	1	2
Mittelwert	0	0	0	Mittelwert	1	1	1
Varianz	0	0	0	Varianz	1	1	0
<i>Konz.1 Do3 48h</i>				<i>Konz.2 Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4	Anzahl	2	2	4
Summe	0	1	1	Summe	1	0	1
Mittelwert	0	1	0	Mittelwert	1	0	0
Varianz	0	1	0	Varianz	1	0	0

Gesamt		
Anzahl	24	24
Summe	53	11
Mittelwert	2	0
Varianz	9	1

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	104	11	9,42	6,11	0,011%	2,22
pos/neg	37	1	36,75	23,84	0,006%	4,26
WW	81	11	7,39	4,79	0,065%	2,22
Fehler	37	24	1,54			
Gesamt	259	47				

Zwischen pos und neg besteht ein signifikanter Unterschied.

Tab. 36: Paarvergleich pos2216/no ODN

Paarvergleich pos2216/no ODN

Eingabe

konz1	pos2216	no ODN
Do1 24h	2683	1
Wiederh.	2109	0
Do1 48h	2616	5
Wiederh.	2616	5
Do2 24h	314	1
Wiederh.	248	0
Do2 48h	608	3
Wiederh.	608	2
Do3 24h	2682	0
Wiederh.	2682	0
Do3 48h	1341	2
Wiederh.	1911	4

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	pos2216	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	4792	1	4793
Mittelwert	2396	0,5	1198
Varianz	164738	0,5	1967720
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	5232	10	5242
Mittelwert	2616	5	1311
Varianz	0	0	2272440
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	562	1	563
Mittelwert	281	1	141
Varianz	2178	1	26953
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1216	5	1221
Mittelwert	608	3	305
Varianz	0	1	122210
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	5364	0	5364
Mittelwert	2682	0	1341
Varianz	0	0	2397708
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	3252	6	3258
Mittelwert	1626	3	814,5
Varianz	162450	2	932193,6667

Gesamt		
Anzahl	12	12
Summe	20418	23
Mittelwert	1702	2
Varianz	1029812	4

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	5501801	5	1100360,14	40,09	0,000044205%	3,11
pos2216/no ODN	17331501	1	17331501,04	631,44	0,000000001%	4,75
WW	5496804	5	1099360,74	40,05	0,000044430%	3,11
Fehler	329370	12	27447,46			
Gesamt	28659475	23				

Zwischen pos2216 und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied

Tab. 37:

Paarvergleich neg2216/no ODN

Eingabe

konz1	neg2216	no ODN
Do1 24h	1109	1
Wiederh.	1088	0
Do1 48h	1364	5
Wiederh.	1364	5
Do2 24h	248	1
Wiederh.	241	0
Do2 48h	719	3
Wiederh.	711	2
Do3 24h	879	0
Wiederh.	808	0
Do3 48h	762	2
Wiederh.	809	4

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	neg2216	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	2197	1	2198
Mittelwert	1098,5	0,5	549,5
Varianz	220,5	0,5	401942
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	2728	10	2738
Mittelwert	1364	5	684,5
Varianz	0	0	615627
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	489	1	490
Mittelwert	244,5	0,5	122,5
Varianz	24,5	0,5	19853,7
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1430	5	1435
Mittelwert	715	2,5	358,75
Varianz	32	0,5	169230
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1687	0	1687
Mittelwert	843,5	0	421,75
Varianz	2520,5	0	238004
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1571	6	1577
Mittelwert	785,5	3	394,25
Varianz	1104,5	2	204471

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	12	12
Summe	10102	23
Mittelwert	841,8333	1,91667
Varianz	130283,1	3,7197

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	718533	5	143706,68	441,55	0,00000000003634570%	3,11
Spalten	4232760	1	4232760,04	13005,54	0,00000000000000001%	4,75
neg2216/no ODN	710716	5	142143,14	436,75	0,00000000003879459%	3,11
Fehler	3906	12	325,46			
Gesamt	5665915	23				

Zwischen neg2216 und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied.

Tab. 38:

Paarvergleich pos2429/no ODN

Eingabe

konz1	pos2429	no ODN
Do1 24h	307	1
Wiederh.	307	0
Do1 48h	359	5
Wiederh.	412	5
Do2 24h	37	1
Wiederh.	37	0
Do2 48h	54	3
Wiederh.	63	2
Do3 24h	341	0
Wiederh.	278	0
Do3 48h	333	2
Wiederh.	332	4

Ausgabe			
Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung			
	pos2429	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	614	1	615
Mittelwert	307	1	154
Varianz	0	1	31314
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	771	10	781
Mittelwert	386	5	195
Varianz	1405	0	48728
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	74	1	75
Mittelwert	37	1	19
Varianz	0	1	444
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	117	5	122
Mittelwert	59	3	31
Varianz	41	1	1059
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	619	0	619
Mittelwert	310	0	155
Varianz	1985	0	32592
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	665	6	671
Mittelwert	333	3	168
Varianz	1	2	36191

Gesamt		
Anzahl	12	12
Summe	2860	23
Mittelwert	238	2
Varianz	20890	4

SU	SS	dF	MS	F	P-Wert	krit. F-Wert
Stichprobe	114203,875	5	22840,78	79,83	0,00000087272%	3,11
pos2429/no ODN	335357,042	1	335357,04	1172,06	0,00000000002%	4,75
WW	112194,208	5	22438,84	78,42	0,00000096713%	3,11
Fehler	3433,5	12	286,13			
Gesamt	565188,625	23				

Zwischen pos2429 und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied.

Tab. 39:

Paarvergleich neg2429/no ODN

Eingabe

konz1	neg2429	no ODN
Do1 24h	0	1
Wiederh.	0	0
Do1 48h	4	5
Wiederh.	4	5
Do2 24h	0	1
Wiederh.	0	0
Do2 48h	0	3
Wiederh.	0	2
Do3 24h	0	0
Wiederh.	0	0
Do3 48h	0	2
Wiederh.	2	4

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	neg2429	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	1	1
Mittelwert	0	1	0
Varianz	0	1	0
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	8	10	18
Mittelwert	4	5	5
Varianz	0	0	0
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	1	1
Mittelwert	0	1	0
Varianz	0	1	0
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	5	5
Mittelwert	0	3	1
Varianz	0	1	2
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	0	0
Mittelwert	0	0	0
Varianz	0	0	0
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	2	6	8
Mittelwert	1	3	2
Varianz	2	2	3

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	12	12
Summe	10	23
Mittelwert	1	2
Varianz	3	4

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	58	5	11,68	25,47	0,0005%	3,11
neg2429/no ODN	7	1	7,04	15,36	0,2036%	4,75
Wechselwirkung	5	5	0,94	2,05	14,2401%	3,11
Fehler	6	12	0,46			
Gesamt	76	23				

Zwischen neg2429 und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied.

Tab. 40:

Paarvergleich posVerzw./no ODN

Eingabe

konz1	posVerzw.	no ODN
Do1 24h	510	1
Wiederh.	562	0
Do1 48h	541	5
Wiederh.	538	5
Do2 24h	77	1
Wiederh.	62	0
Do2 48h	266	3
Wiederh.	228	2
Do3 24h	1611	0
Wiederh.	1653	0
Do3 48h	1058	2
Wiederh.	996	4

	posVerzw.	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1072	1	1073
Mittelwert	536	1	268
Varianz	1352	1	96038
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1079	10	1089
Mittelwert	540	5	272
Varianz	5	0	95232
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	139	1	140
Mittelwert	70	1	35
Varianz	113	1	1625
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	494	5	499
Mittelwert	247	3	125
Varianz	722	1	20168
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	3264	0	3264
Mittelwert	1632	0	816
Varianz	882	0	888102
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	2054	6	2060
Mittelwert	1027	3	515
Varianz	1922	2	350167

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	12	12
Summe	8102	23
Mittelwert	675	2
Varianz	296317	4

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	1625136	5	325027,14	780,30	0,000000000000%	3,11
posVerzw./no ODN	2719593	1	2719593,38	6528,98	0,000000000000%	4,75
WW	1629398	5	325879,68	782,35	0,000000000000%	3,11
Fehler	4999	12	416,54			
Gesamt	5979126	23				

Zwischen posVerzw. und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied.

Tab. 41:

Paarvergleich negVerzw./no ODN

Eingabe

konz1	negVerzw.	no ODN
Do1 24h	5	1
Wiederh.	0	0
Do1 48h	2	5
Wiederh.	0	5
Do2 24h	3	1
Wiederh.	0	0
Do2 48h	8	3
Wiederh.	8	2
Do3 24h	12	0
Wiederh.	0	0
Do3 48h	0	2
Wiederh.	0	4

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	negVerzw.	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	5	1	6
Mittelwert	3	1	2
Varianz	13	1	6
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	2	10	12
Mittelwert	1	5	3
Varianz	2	0	6
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	3	1	4
Mittelwert	2	1	1
Varianz	5	1	2
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	16	5	21
Mittelwert	8	3	5
Varianz	0	1	10
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	12	0	12
Mittelwert	6	0	3
Varianz	72	0	36
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	6	6
Mittelwert	0	3	2
Varianz	0	2	4

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	12	12
Summe	38	23
Mittelwert	3	2
Varianz	17	4

SU	SS	dF	MS	F	P-Wert	krit. F-Wert
Stichprobe	49	5	9,84	1,25	34,60%	3,11
Spalten	9	1	9,38	1,19	29,67%	4,75
Wechselwirku	87	5	17,38	2,21	12,14%	3,11
Fehler	95	12	7,88			
Gesamt	240	23				

Zwischen negVerzw. und no ODN besteht kein signifikanter Unterschied.

Tab. 42:

Paarvergleich IdC/no ODN

Eingabe

konz1	IdC	no ODN
Do1 24h	2	1
Wiederh.	1	0
Do1 48h	0	5
Wiederh.	5	5
Do2 24h	1	1
Wiederh.	0	0
Do2 48h	0	3
Wiederh.	0	2
Do3 24h	0	0
Wiederh.	0	0
Do3 48h	0	2
Wiederh.	0	4

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung			
	IdC	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	3	1	4
Mittelwert	2	1	1
Varianz	1	1	1
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	5	10	15
Mittelwert	3	5	4
Varianz	13	0	6
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1	1	2
Mittelwert	1	1	1
Varianz	1	1	0
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	5	5
Mittelwert	0	3	1
Varianz	0	1	2
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	0	0
Mittelwert	0	0	0
Varianz	0	0	0
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	6	6
Mittelwert	0	3	2
Varianz	0	2	4

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	12	12
Summe	9	23
Mittelwert	1	2
Varianz	2	4

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	33,83	5	6,77	4,78	1,24%	3,11
Spalten	8,17	1	8,17	5,76	3,35%	4,75
Vechselwirkun	14,33	5	2,87	2,02	14,72%	3,11
Fehler	17,00	12	1,42			
Gesamt	73,33	23				

Zwischen IdC und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied.

Tab. 43:

Paarvergleich DFI-T/noODN

Eingabe

konz1	DFII-T	no ODN
Do1 24h	30	1
Wiederh.	13	0
Do1 48h	14	5
Wiederh.	14	5
Do2 24h	8	1
Wiederh.	6	0
Do2 48h	6	3
Wiederh.	6	2
Do3 24h	17	0
Wiederh.	11	0
Do3 48h	7	2
Wiederh.	9	4

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	DFII-T	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	43	1	44
Mittelwert	22	1	11
Varianz	145	1	195
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	28	10	38
Mittelwert	14	5	10
Varianz	0	0	27
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	14	1	15
Mittelwert	7	1	4
Varianz	2	1	15
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	12	5	17
Mittelwert	6	3	4
Varianz	0	1	4
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	28	0	28
Mittelwert	14	0	7
Varianz	18	0	71
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	16	6	22
Mittelwert	8	3	6
Varianz	2	2	10
<i>Gesamt</i>			
Anzahl	12	12	
Summe	141	23	
Mittelwert	12	2	
Varianz	47		

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	169,83	5	33,97	2,40	9,963%	3,11
Spalten	580,17	1	580,17	40,95	0,003%	4,75
Wechselwirkung	217,33	5	43,47	3,07	5,178%	3,11
Fehler	170,00	12	14,17			
Gesamt	1137,33	23				

Zwischen DFI-T und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied.

Tab. 44:

Paarvergleich pos/no ODN

Eingabe

konz1	pos	no ODN
Do1 24h	4	1
Wiederh.	3	0
Do1 48h	7	5
Wiederh.	11	5
Do2 24h	1	1
Wiederh.	0	0
Do2 48h	0	3
Wiederh.	1	2
Do3 24h	0	0
Wiederh.	0	0
Do3 48h	0	2
Wiederh.	0	4

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	pos	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	7	1	8
Mittelwert	4	1	2
Varianz	1	1	3
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	18	10	28
Mittelwert	9	5	7
Varianz	8	0	8
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1	1	2
Mittelwert	1	1	1
Varianz	1	1	0
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1	5	6
Mittelwert	1	3	2
Varianz	1	1	2
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	0	0
Mittelwert	0	0	0
Varianz	0	0	0
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	6	6
Mittelwert	0	3	2
Varianz	0	2	4

<i>Gesamt</i>		
Anzahl	12	12
Summe	27	23
Mittelwert	2	2
Varianz	12	4

<i>SU</i>	<i>(SS)</i>	<i>(df)</i>	<i>(MS)</i>	<i>(F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	127	5	25,37	23,42	0,001%	3,11
pos/no ODN	1	1	0,67	0,62	44,8%	4,75
Wechselwirku	37	5	7,47	6,89	0,3%	3,11
Fehler	13	12	1,08			
Gesamt	178	23				

Zwischen pos und no ODN besteht kein signifikanter Unterschied. Daher ist pos als Testsequenz ungeeignet.

Tab. 45:

Paarvergleich neg/no ODN

Eingabe

konz1	neg	no ODN
Do1 24h	0	1
Wiederh.	0	0
Do1 48h	0	5
Wiederh.	1	5
Do2 24h	1	1
Wiederh.	0	0
Do2 48h	0	3
Wiederh.	1	2
Do3 24h	0	0
Wiederh.	0	0
Do3 48h	0	2
Wiederh.	1	4

Ausgabe

Anova: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung

	neg	no ODN	Gesamt
<i>Do1 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	1	1
Mittelwert	0	1	0
Varianz	0	1	0
<i>Do1 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1	10	11
Mittelwert	1	5	3
Varianz	1	0	7
<i>Do2 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1	1	2
Mittelwert	1	1	1
Varianz	1	1	0
<i>Do2 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1	5	6
Mittelwert	1	3	2
Varianz	1	1	2
<i>Do3 24h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	0	0	0
Mittelwert	0	0	0
Varianz	0	0	0
<i>Do3 48h</i>			
Anzahl	2	2	4
Summe	1	6	7
Mittelwert	1	3	2
Varianz	1	2	3
<i>Gesamt</i>			
Anzahl	12	12	
Summe	4	23	
Mittelwert	0	2	
Varianz	0	4	

<i>SU</i>	<i>SS</i>	<i>dF</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Wert</i>	<i>krit. F-Wert</i>
Stichprobe	22,38	5	4,48	9,76	0,07%	3,11
neg/no ODN	15,04	1	15,04	32,82	0,01%	4,75
WW	15,71	5	3,14	6,85	0,31%	3,11
Fehler	5,50	12	0,46			
Gesamt	58,63	23				

Zwischen neg und no ODN besteht ein signifikanter Unterschied.

Varianzanalyse des Hauptversuchs - nur einfache Effekte

Eine Streuungserlegung ohne Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Parametern wurde vorgenommen für posVerzw., neg Verzw., pos, neg, DFI-T und IdC (Tabelle 47) unter Verwendung der in Tabelle 46 aufgeführten Werte.

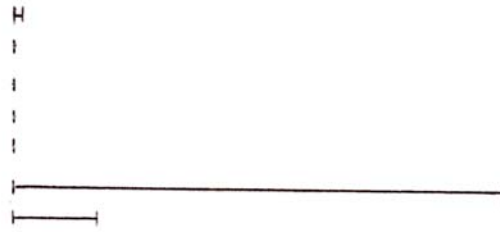
Tab. 46: Für die Varianzanalyse des Hauptversuchs- nur einfache Effekte

Alle Werte 6*3*2*2=144 Einzelwerte						
ODN	Donor	Zeit	Konz	INF α 1	INF α 2	Varianzen
IdC	1	24h	0,5 μ M	2,1	1,4	23452,2
IdC	1	24h	1,5 μ M	0,6	2,9	23439,3
IdC	1	48h	0,5 μ M	0,0	4,5	23235,3
IdC	1	48h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
IdC	2	24h	0,5 μ M	0,9	0,0	24018,8
IdC	2	24h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
IdC	2	48h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
IdC	2	48h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
IdC	3	24h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
IdC	3	24h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
IdC	3	48h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
IdC	3	48h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
neg	1	24h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
neg	1	24h	1,5 μ M	0,0	0,6	24071,2
neg	1	48h	0,5 μ M	0,0	1,4	23914,2
neg	1	48h	1,5 μ M	0,0	2,9	23579,8
neg	2	24h	0,5 μ M	0,9	0,0	24018,8
neg	2	24h	1,5 μ M	0,9	0,0	24018,8
neg	2	48h	0,5 μ M	0,0	0,9	24017,9
neg	2	48h	1,5 μ M	0,0	1,9	23808,0
neg	3	24h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
neg	3	24h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
neg	3	48h	0,5 μ M	0,0	7,2	22688,6
neg	3	48h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
negVerz.	1	24h	0,5 μ M	5,4	0,0	23058,8
negVerz.	1	24h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
negVerz.	1	48h	0,5 μ M	2,1	0,0	23749,6
negVerz.	1	48h	1,5 μ M	0,0	1,4	23914,2
negVerz.	2	24h	0,5 μ M	2,8	0,0	23594,8
negVerz.	2	24h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
negVerz.	2	48h	0,5 μ M	0,0	1,8	23808,8
negVerz.	2	48h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
negVerz.	3	24h	0,5 μ M	12,2	0,0	21675,8
negVerz.	3	24h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
negVerz.	3	48h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
negVerz.	3	48h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
pos	1	24h	0,5 μ M	3,7	2,9	22777,1
pos	1	24h	1,5 μ M	2,9	2,1	23117,7
pos	1	48h	0,5 μ M	7,1	10,6	20489,6
pos	1	48h	1,5 μ M	5,4	7,9	21376,7
pos	2	24h	0,5 μ M	1,9	0,0	23808,0
pos	2	24h	1,5 μ M	0,0	0,9	24017,9
pos	2	48h	0,5 μ M	0,0	0,9	24017,9
pos	2	48h	1,5 μ M	0,0	4,9	23159,5
pos	3	24h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
pos	3	24h	1,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
pos	3	48h	0,5 μ M	0,0	0,0	24211,6
pos	3	48h	1,5 μ M	0,0	3,7	23413,3
DFI-T	1	24h	0,5 μ M	30,3	13,3	15711,4
DFI-T	1	24h	1,5 μ M	4,5	7,1	21729,5
DFI-T	1	48h	0,5 μ M	14,2	14,2	18369,2
DFI-T	1	48h	1,5 μ M	2,1	7,9	22067,5
DFI-T	2	24h	0,5 μ M	8,1	5,9	21235,3
DFI-T	2	24h	1,5 μ M	8,1	7,0	21015,7
DFI-T	2	48h	0,5 μ M	5,9	5,9	21672,1
DFI-T	2	48h	1,5 μ M	3,9	7,0	21887,8
DFI-T	3	24h	0,5 μ M	17,1	10,5	18527,4
DFI-T	3	24h	1,5 μ M	12,2	13,9	18819,9
DFI-T	3	48h	0,5 μ M	7,2	8,9	20820,2
DFI-T	3	48h	1,5 μ M	5,4	15,5	19873,6
posVerz.	1	24h	0,5 μ M	510,5	561,9	364525,6
posVerz.	1	24h	1,5 μ M	131,9	113,1	488,6
posVerz.	1	48h	0,5 μ M	541,3	537,8	368978,3
posVerz.	1	48h	1,5 μ M	145,3	155,4	3307,3
posVerz.	2	24h	0,5 μ M	77,0	62,4	3357,2
posVerz.	2	24h	1,5 μ M	85,6	79,4	1534,7
posVerz.	2	48h	0,5 μ M	102,1	134,9	680,3
posVerz.	2	48h	1,5 μ M	112,9	134,9	625,1
posVerz.	3	24h	0,5 μ M	1610,7	1653,1	4633097,1
posVerz.	3	24h	1,5 μ M	1118,3	1082,3	1961931,4
posVerz.	3	48h	0,5 μ M	2207,2	2186,3	8709048,8
posVerz.	3	48h	1,5 μ M	1090,8	1063,2	1870456,6

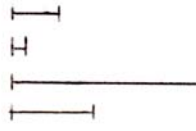
Tab. 47: Streuungserlegung nur einfache Effekte

Anzahl	144
Gesamtmittel	110,0
Gesamtstreuung	19298448
Standardabweichung	367,4

Parameter ODN	Mittelwerte
DFI-T	9,8
IdC	0,5
neg	0,7
negVerz	1,1
pos	2,3
posVerz	645,8
Gesamtmittel	110



Parameter Donor	Mittelwerte
1	59,6
2	17,9
3	252,6
Gesamtmittel	110



Parameter Zeit	Mittelwerte
24h	101
48h	119,1
Gesamtmittel	110



Parameter Konz.	Mittelwerte
0,5µM	144,4
1,5µM	75,6
Gesamtmittel	110



Parameter Wiederholung	Mittelwerte
1	109,7
2	110,3
Gesamtmittel	110



Parameter	Varianz	Freiheitsgrad	Mittlere Quadratsumme	F berechnet	F(f;133;5%)	P-Wert	Einfluss?
ODN	8267405	5	1653481	23,5	2,3	0,000%	Einfluss
Donor	1505545	2	752773	10,7	3,1	0,005%	Einfluss
Zeit	11832	1	11832	0,2	3,9	68,2%	unsicher
Konz	170185	1	170185	2,4	3,9	12,2%	unsicher
Wiederhol.	11,8	1	12	0,0002	3,9	99,0%	kein Einfluss
Rest	9343469	133	70252				
Gesamt	19298448	143					

Die Werte wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{Varianz}(X) = \text{Varianzanteil} * \sum_i [(\text{Mittelwert der Meßwerte } (X_i) - \text{Gesamtmittel})^2]$$

mit den Parameter X=ODN, Donor, Inkubationszeit („Zeit“), ODN-Konzentration („Konz“), oder Meßwiederholung („Wiederh.“).

Der Varianzanteil ist das Produkt aus allen anderen als dem betrachteten Parameter, z. B. ist der Varianzanteil(ODN)=3(für Donor)*2(für Zeit)*2(für Konz)*2(für Wiederh.).

Für X=ODN ist i die Meßwerte von IdC, neg, negVerzw., pos, DFI-T, posVerzw.; für X=Donor ist i die Meßwerte von Donor 1, Donor 2 und Donor 3; für X=Zeit ist i die Meßwerte für 24 h und 48 h; für X=Konz ist i die Meßwerte für 0.5 µM und 1.5 µM; für X=Wiederh. ist i die Werte für den ersten und zweiten Meßwert.

Freiheitsgrade(X)=Anzahl unterschiedlicher X-1, z. B. gibt es 6 unterschiedliche ODN, folglich ist der Freiheitsgrade(ODN)=5; Es gibt $6*3*2*2*2=144$ Einzelwerte. Den Freiheitsgrade(Rest)=Freiheitsgrade(Gesamt) - \sum_i Freiheitsgrade(X_i)

Freiheitsgrade(Gesamt)=Gesamtzahl der Einzelwerte - 1

Die Mittlere Quadratsumme(X)=Varianz(X) : Freiheitsgrade(X)

F berechnet=Mittlere Quadratsumme(X) : Mittlere Quadratsumme(Rest)

F(f;133;5%) gibt sogenannte Quantile der F-Verteilung an für die Reststreuung („Rest“) bei einem Signifikanzniveau von 95% Wahrscheinlichkeit, also einem tolerierten Fehler von 5%. Der Wert wird von EXCEL mit der Rechenoperation „FINV“ berechnet. Der Prüfwert P wird durch die Rechenoperation „FVERT“ berechnet.

Von einem Einfluß eines Parameters (z. B. ein ODN) auf das Meßergebnis kann gesprochen werden, wenn

- F berechnet größer ist als F(f,133,5%)
- der P-Wert kleiner ist als 5%

Kein Einfluß hat die Stichprobe eines Parameters auf das Meßergebnis, wenn

- F berechnet sehr viel kleiner ist als F(f,133,5%)
- der P-Wert > 95%

Unsicher ist die Aussage, ob die Stichprobe eines Parameters das Meßergebnis beeinflusst, wenn

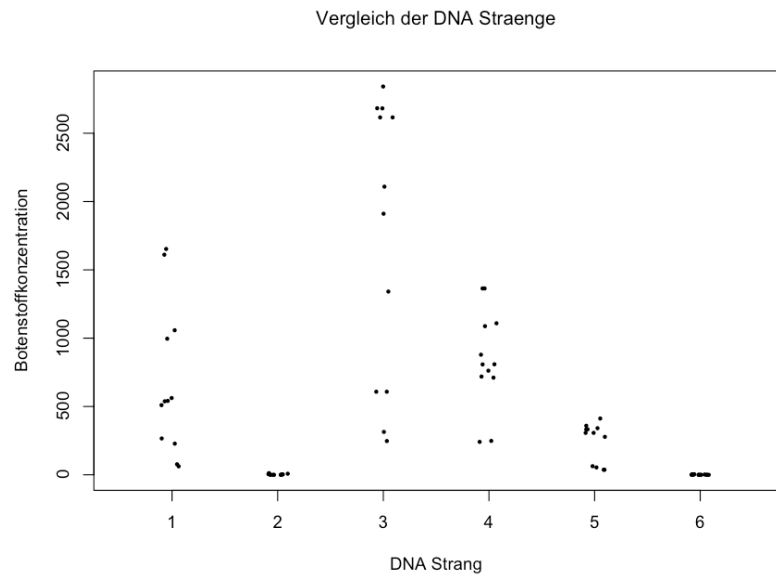
- F berechnet < F(f; 133; 5%)
- $0.05 < \text{P-Wert} < 0.95$

Das Ergebnis der manuell berechneten Varianzanalyse für pos, neg, posVerzw., negVerzw., IdC und DFI-T besagt, dass die Parameter ODN und Donor von Einfluß sind und dass die Meßwiederholung keinen Einfluß auf die Meßwerte ausüben.

8.2 Wilcoxon-Test

Wie die Varianzanalyse klären kann, ob ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Populationen besteht, kann auch der Wilcoxon-Test diese Frage beantworten. Im Unterschied zur Varianzanalyse, bei der angenommen wird, dass eine Normalverteilung der Meßwerte vorliegt, wird diese Annahme beim Wilcoxon-Test nicht gemacht. Die typische Vorgehensweise beim Wilcoxon-Test ist, dass Ränge gebildet werden, d. h. jedem Oligodesoxynukleotid wird eine Zahl zugeordnet, diese werden in aufsteigender Reihenfolge angeordnet: 1. = posVerzw., 2. = negVerzw., 3. = pos2216, 4. = neg2216, 5. = pos2429, 6. = neg2429. In Abbildung 47 sind die Meßwerte, mit denen der *Wilcoxon* Test durchgeführt wird, als Punkt abgebildet. Die Anzahl der Punkte erklärt sich aus den Meßwerten für sechs ODN, drei Donoren, zwei Meßwerte Inkubationszeiten und für eine ODN-Konzentrationen von 0.5 μM .

Abb. 47: Meßwerte des IFN- α -ELISA-Hauptversuchs von den CpG/GpC-ODN-Paaren, dessen CpG-ODN eine relevante IFN- α -Induktion bewirkt;

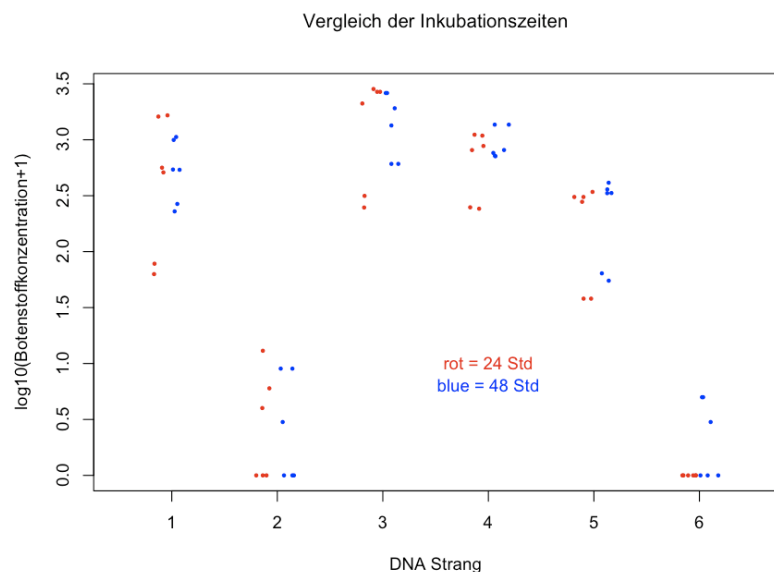


Dieselben Werte werden in

Abbildung 48 logarithmisch aufgetragen. Die Inkubationszeiten werden farblich differenziert.

Abb. 48: Logarithmische IFN- α -Konzentrationen/ODN

Aus Abbildung 48 geht hervor, dass der Einfluss der Zeit, falls vorhanden, sehr schwach ist. In keiner der Gruppen ist ihre Differenz statistisch signifikant



(Wilcoxon Test: alle $p > 0.05$).

Es ist also erlaubt, die Inkubationszeiten zusammenzulegen, was die Analyse vereinfacht. Jetzt wird jede der 6 Strangvarianten gegen alle anderen getestet. Das sind 15 Tests; um das multiple Testen zu berücksichtigen, werden alle p-Werte mit 15 multipliziert.

Tab. 48: Ergebnisse des Wilcoxon rank sum test with continuity correction (two sided)

1.posVerzw. 2.negVerzw.	$p = 3.2e-05$	$15p = 0.00048''$
1.posVerzw. 3.pos2216	$p = 0.01$	$15p = 0.15''$
1.posVerzw. 4.neg2216	$p = 0.21$	$15p = 3.2''$
1.posVerzw. 5.pos2429	$p = 0.026$	$15p = 0.39''$
1.posVerzw. 6.neg2429	$p = 2.2e-05$	$15p = 0.00033''$
2.negVerzw. 3.pos2216	$p = 3.1e-05$	$15p = 0.00047''$
2.negVerzw. 4.neg2216	$p = 3.2e-05$	$15p = 0.00047''$
2.negVerzw. 5.pos2429	$p = 3.1e-05$	$15p = 0.00047''$
2.negVerzw. 6.neg2429	$p = 0.14$	$15p = 2.2''$
3.pos2216 4.neg2216	$p = 0.1$	$15p = 1.5''$
3.pos2216 5.pos2429	$p = 0.00072$	$15p = 0.011''$
3.pos2216 6.neg2429	$p = 2.2e-05$	$15p = 0.00033''$
4.neg2216 5.pos2429	$p = 0.0013$	$15p = 0.02''$
4.neg2216 6.neg2429	$p = 2.2e-05$	$15p = 0.00033''$
5.pos2429 6.neg2429	$p = 2.2e-05$	$15p = 0.00033''$

sehr hoch signifikant ($15p < 0.001$):

(1.)posVerz / (2.)negVerz., (6.)neg2429
 (2.)negVerz. / (3.)pos2216, (4.)neg2216, (5.)pos2429
 (6.)neg2429 / (3.)pos2216, (4.)neg2216, (5.)pos2429

signifikant ($15p < 0.05$):

(5.)pos2429 / (3.)pos2216, (4.)neg2216

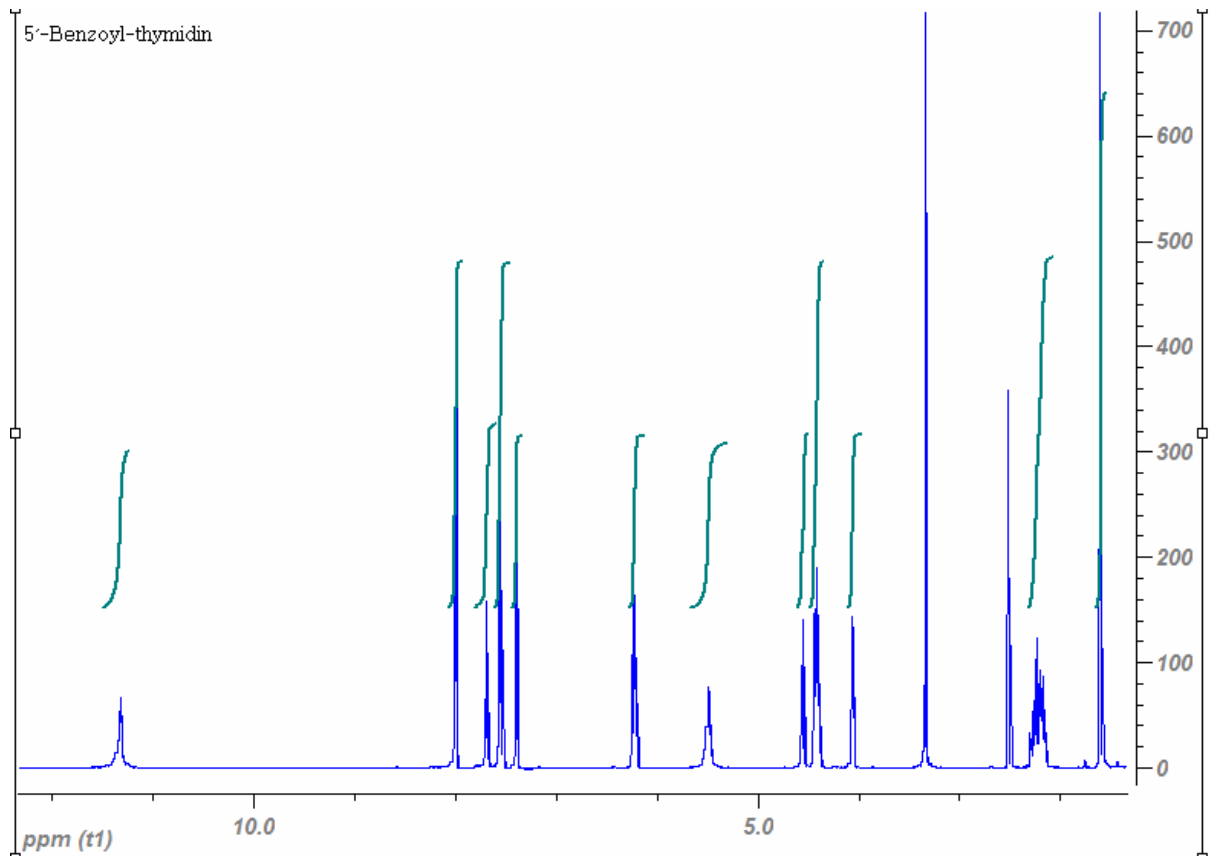
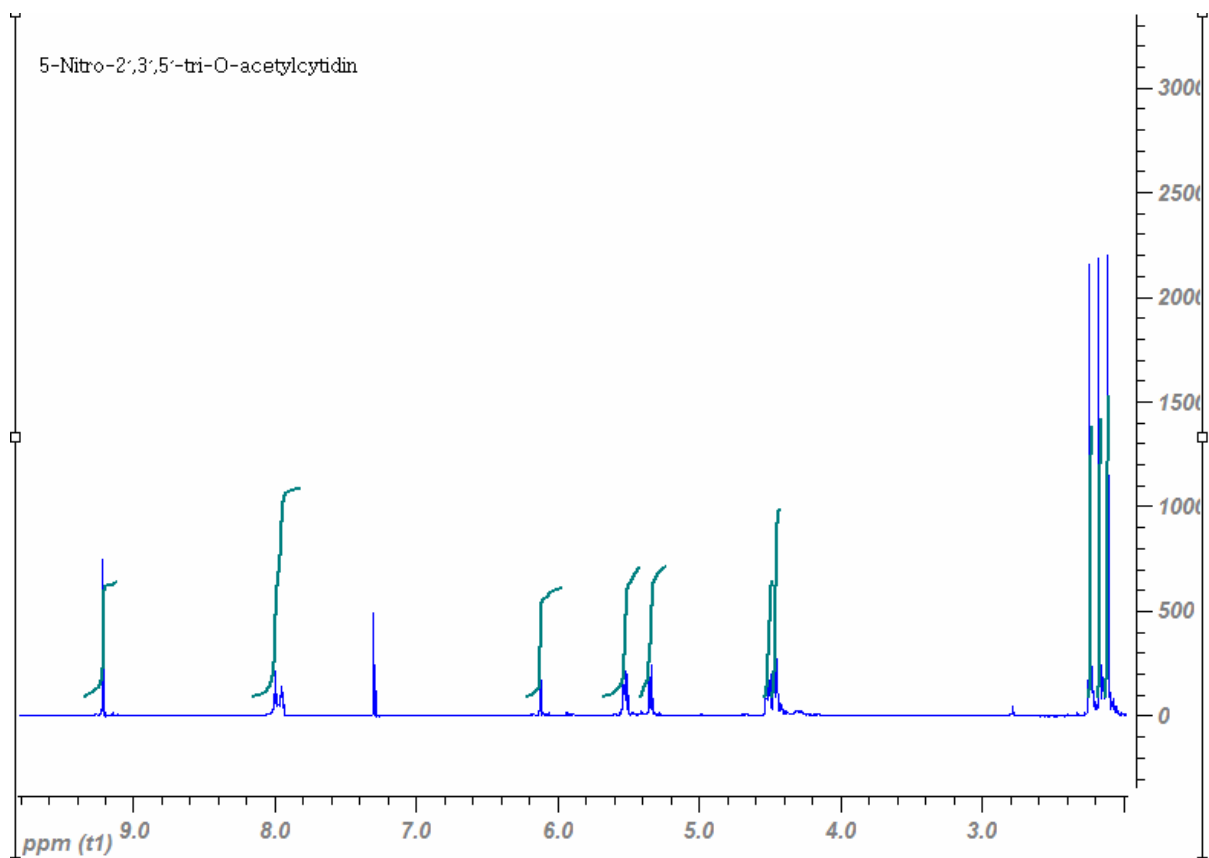
Ergebnis des Wilcoxon-Test ist, dass posVerzw. hochsignifikant sich von negVerzw. und neg2429, nicht aber von neg2216 unterscheidet. Neg2216 ist die einzige nicht CpG-haltige Sequenz, die stark IFN- α induziert. Auch hochsignifikant unterscheiden sich sowohl negVerzw. als auch neg2429 von pos2216, neg2216 und pos2429. Signifikant unterschiedlich sind die Paare pos2429/pos2216 und pos2429/neg2216.

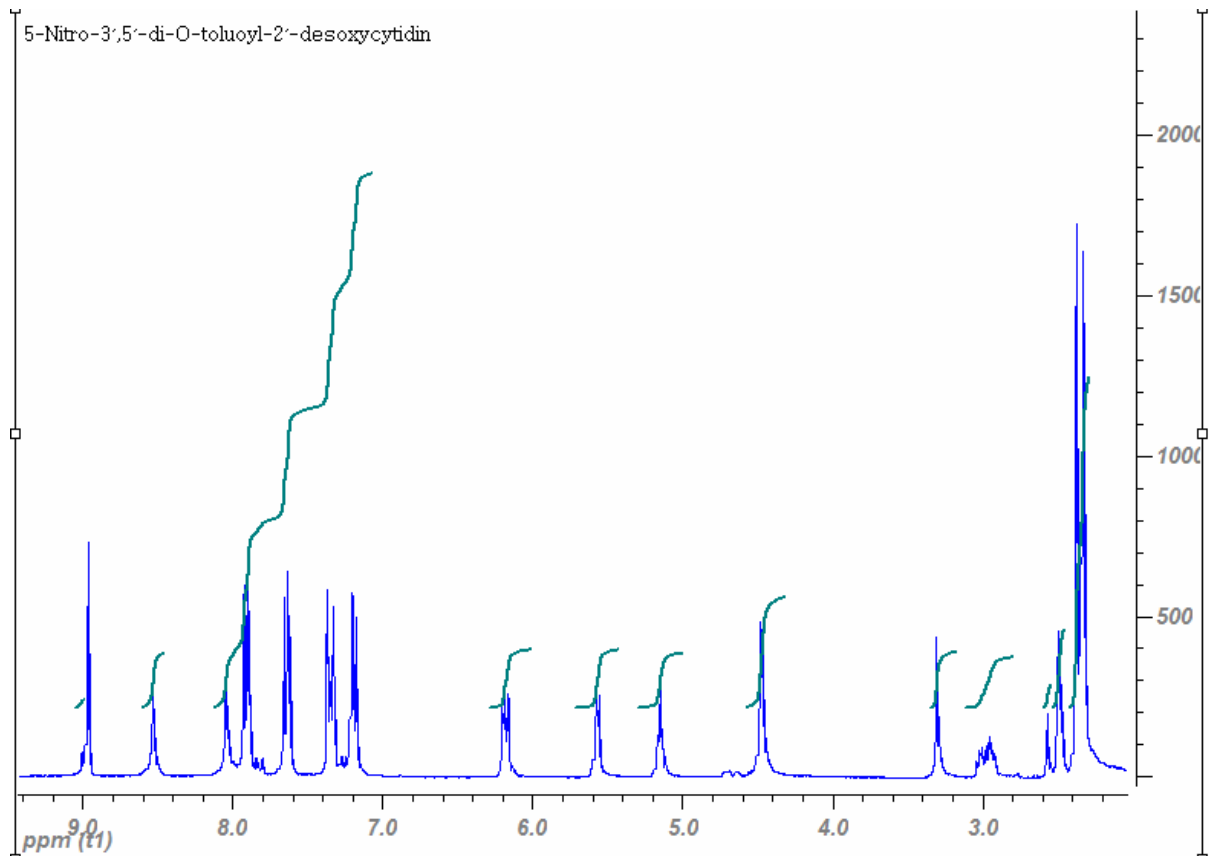
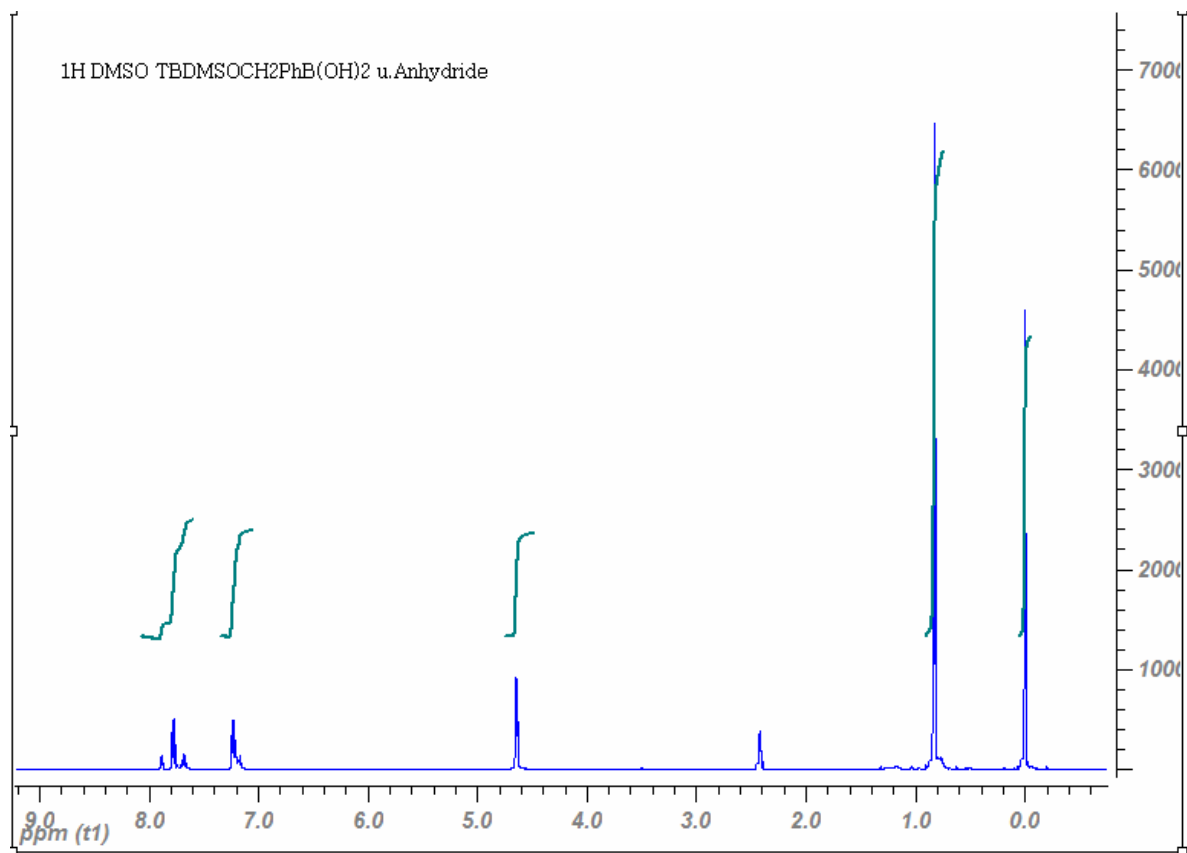
8.3 ODN-Syntheseprotokoll

In Tabelle 49 sind die verwendeten Syntheseprotokolle, die sich bewährt haben, aufgelistet.

Tab. 49: Syntheseprotokolle für PS/PO-ODN, Zeit „0“ bedeutet, minimale Zeit, die benötigt wird, die jeweilige Menge auf die ODN-Säule zu spülen, Wsh=Waschschritt mit CH₃CN, Dblk=deblock= Trichlor-essigsäure, Act=Activator=4,5-Dicyanoimidazol oder Tetrazol, Aux=Auxiliar=Beaucage-Reagenz zum Beschweifeln, Caps=Acetanhydrid

Syntheseprotokoll für Thiophosphate		Menge	Zeit	Syntheseprotokoll für Phosphate		Menge	Zeit
Description	[n*16µL]	[s]	Description	[n*16µL]	[s]		
Deblocking				Deblocking			
Index Fract. Coll. Default	Event out ON	1	0	Index Fract. Coll. Default	Event out ON	1	0
	Wait	0	1,5		Wait	0	1,5
	START data collection				START data collection		
Trityl Mon On/Off		1	1	Trityl Mon On/Off		1	1
Dbk	Dbk to column	10	0	Dbk	Dbk to column	10	0
Dbk	Deblock	50	60	Dbk	Deblock	50	60
	Flush system with Wsh A				Flush system with Wsh A		
Diverted Wsh A	STOP data collection	40	0	Diverted Wsh A	STOP data collection	40	0
Trityl Mon On/Off		0	1	Trityl Mon On/Off		0	1
Index Fract. Coll.	Event out OFF	2	0	Index Fract. Coll.	Event out OFF	2	0
Coupling				Coupling			
Wsh	Flush system with Wsh	5	0	Wsh	Flush system with Wsh	5	0
Act	Flush system with Act	5	0	Act	Flush system with Act	5	0
Phosphoramidite + Act	Monomer + Act to column	6	0	Phosphoramidite + Act	Monomer + Act to column	5	0
Phosphoramidite + Act	Couple Monomer	5	300	Phosphoramidite + Act	Couple Monomer	6	50
Act	Couple Monomer	7	300	Act	Couple Monomer	3	40
Act	Couple Monomer	3	0	Act	Couple Monomer	3	30
Wsh	Flush system with Wsh	8	0	Wsh	Flush system with Wsh	8	0
Oxidizing				Capping			
Aux	Aux to column	45	0	Wsh A	Flush system with Wsh A	20	0
Wsh A	Slow pulse to thioate	10	90	Caps	Caps to column	8	0
Wsh A	Flush system with Wsh A	15	0	Wsh A	Cap	6	15
				Wsh A	Flush system with Wsh A	14	0
Capping				Oxidizing			
Wsh A	Flush system with Wsh A	20	0	Ox	Ox to column	15	0
Caps	Caps to column	8	0	Wsh A	Flush system with Wsh A	15	0
Wsh A	Cap	6	15	Wsh A	End of cycle Wsh	30	0
Wsh A	Flush system with Wsh A	14	0				
Wsh A	End of cycle Wsh	30	0				

8.4 ^1H -NMR-SpektrenAbb. 49: ^1H -NMR-Spektrum von 5-*O*-Benzoyl-thymidinAbb. 50: ^1H -NMR-Spektrum von 5-Nitro-2',3',5'-tri-*O*-acetylcytidin

Abb. 51: ^1H -NMR-Spektrum von 5-Nitro-3',5'-di-*O*-toluoyl-2'-desoxycytidinAbb. 52: ^1H -NMR-Spektrum von *O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-benzyl-boronsäure und seine Anhydride

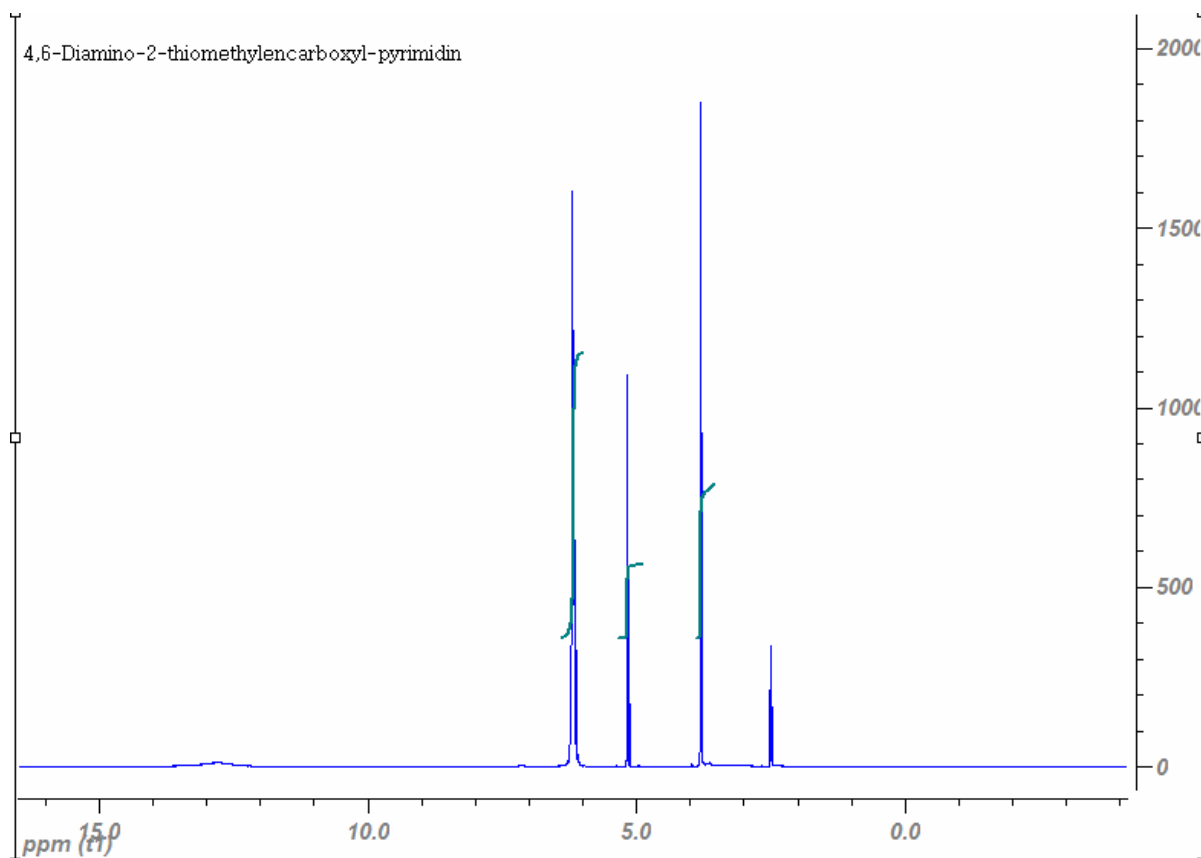


Abb. 53: ¹H-NMR-Spektrum von 4,6-Diamino-2-thiomethylencarboxyl-pyrimidin

8.5 Analytische HPLC-Spektren

Für die in Abbildung 54-58 gezeigten HPLC-Spektren wurde die Säule *Jupiter* 4 μ Proteo 90Å, 50*4.60 mm, 4 micron, 191148-1, *Phenomenex* bei einer Flußrate von 1 ml/min und einem Gradienten von Acetonitril/ entmineralisiertem Wasser/ 1M wässrige Triethylammoniumacetat-Lösung 9: 81: 10 → 25 : 65 :10 in 50 min verwendet.

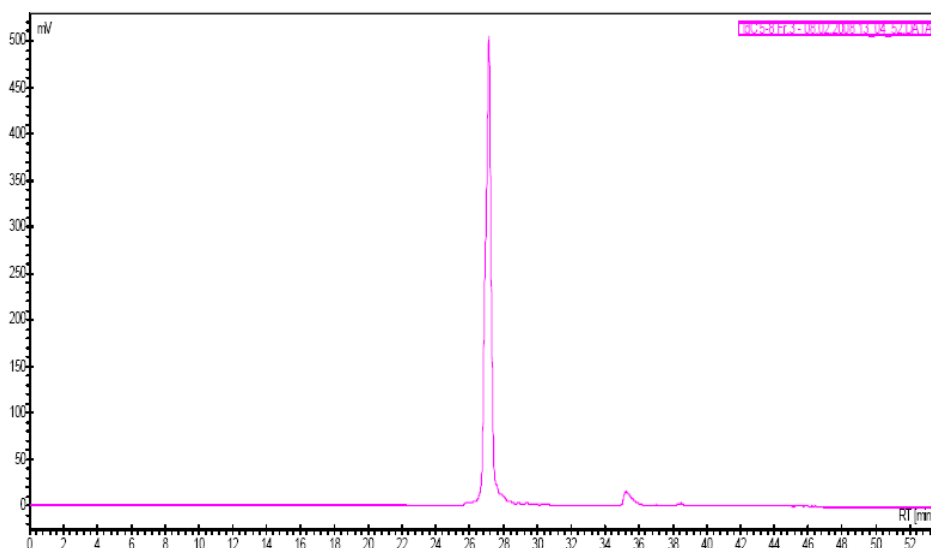


Abb. 54: Analytisches HPLC-Spektrum von IdC

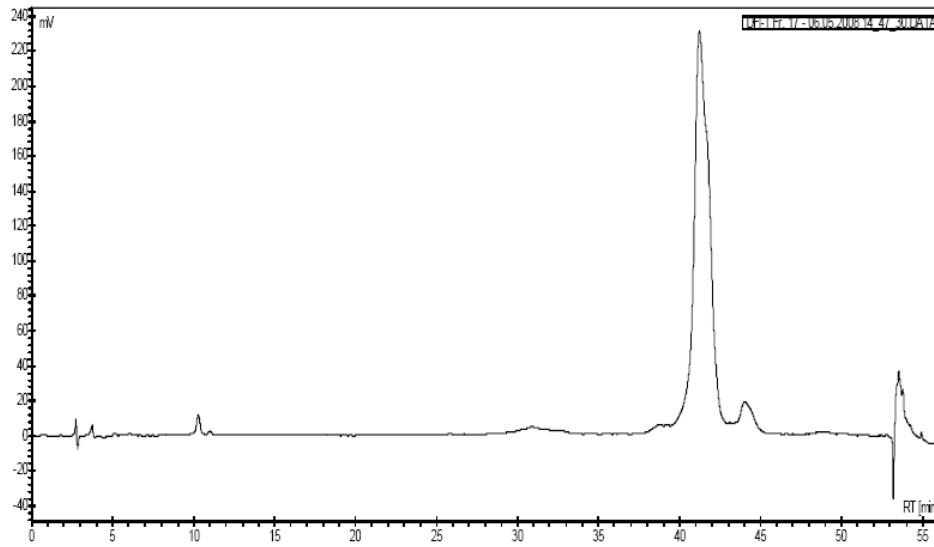


Abb. 55: Analytisches HPLC-Spektrum von DFI-T

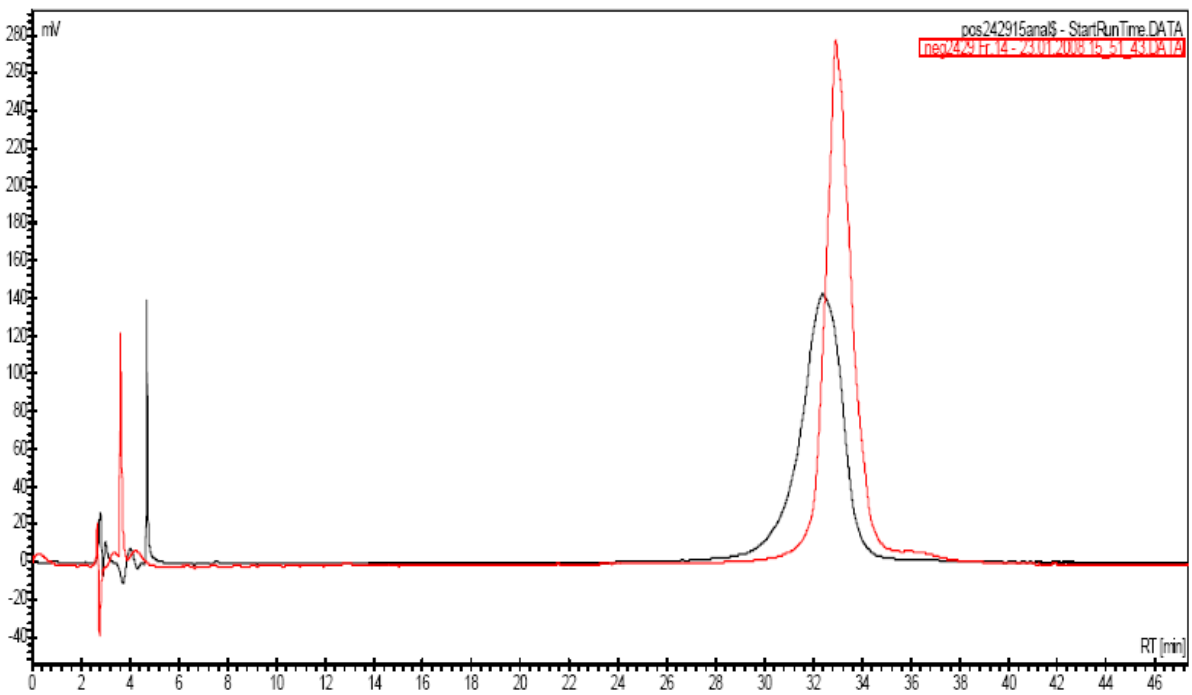


Abb. 56: Analytisches HPLC-Spektrum für pos2429 und neg2429

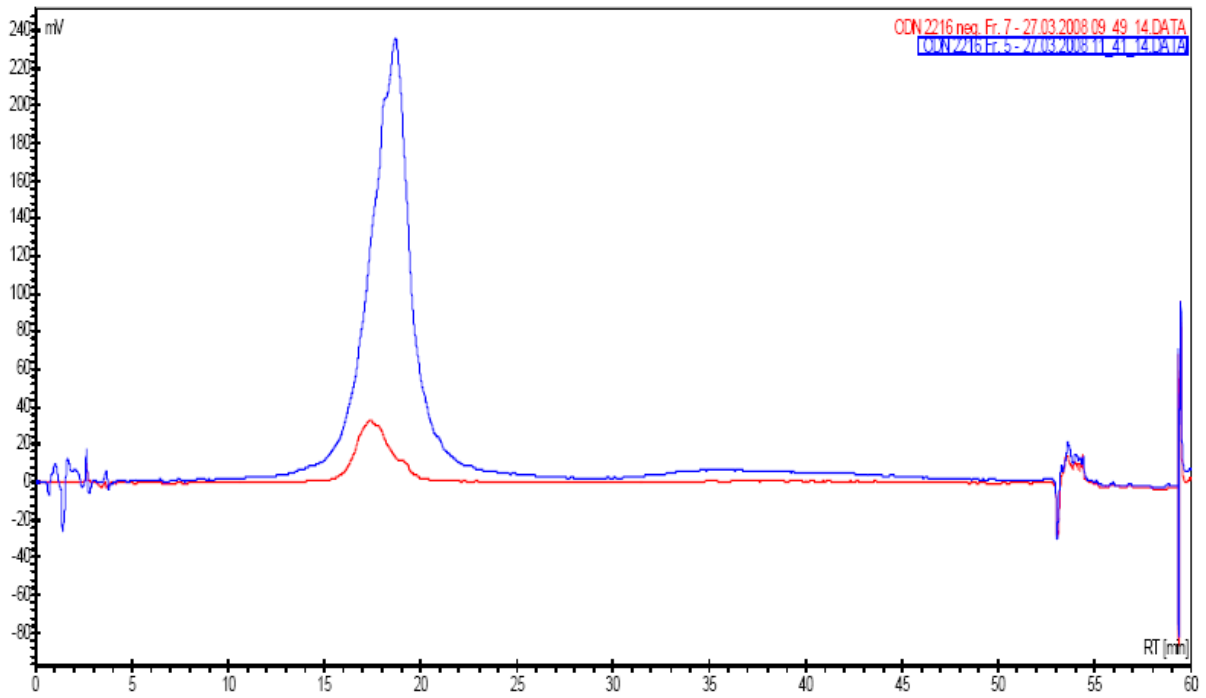


Abb. 57: Analytisches HPLC-Spektrum für pos2216 und neg2216

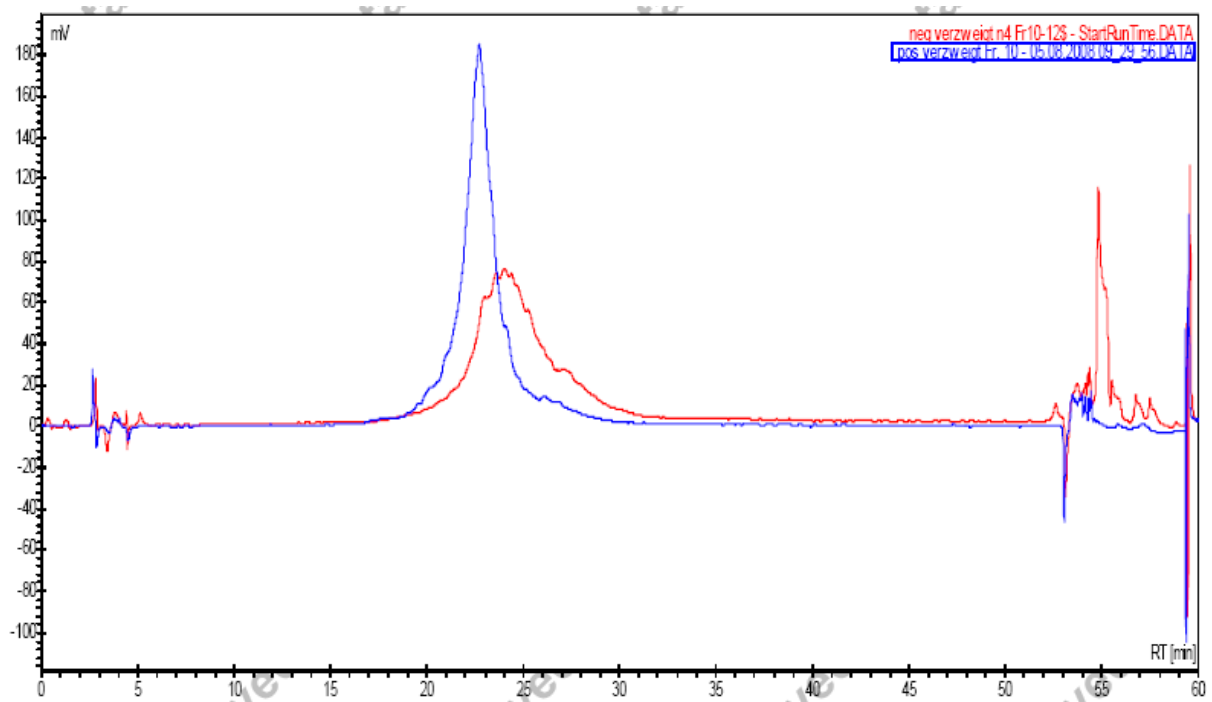


Abb. 58: Analytisches HPLC-Spektrum für posVerzw. und neg Verzw.

8.6 Kristallstrukturen

Table 26. Crystal data and structure refinement for gerda1.

Identification code	gerda1	
Empirical formula	$C_{21}H_{40}IN_3O_4Si_2$	
Formula weight	581.64	
Temperature	163(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Monoclinic, P 21	
Unit cell dimensions	a = 13.9645(11) Å	alpha = 90 deg.
	b = 12.1448(13) Å	beta = 97.134(9) deg.
	c = 16.906(3) Å	gamma = 90 deg.
Volume	2845.0(6) Å ³	
Z, Calculated density	4, 1.358 Mg/m ³	
Absorption coefficient	1.238 mm ⁻¹	
F(000)	1200	
Crystal size	0.60 x 0.44 x 0.10 mm	
Theta range for data collection	1.47 to 31.83 deg.	
Limiting indices	-20 ≤ h ≤ 20, -17 ≤ k ≤ 17, -24 ≤ l ≤ 24	
Reflections collected / unique	49202 / 17040 [R(int) = 0.0357]	
Completeness to theta = 31.83	91.3 %	
Absorption correction	Numerical	
Max. and min. transmission	0.882 and 0.519	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	17040 / 1 / 559	
Goodness-of-fit on F ²	1.036	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0451, wR2 = 0.0972	
R indices (all data)	R1 = 0.0592, wR2 = 0.1044	
Absolute structure parameter	-0.020(13)	
Largest diff. peak and hole	2.667 and -2.508 e.Å ⁻³	

CRYSTAL DATA OF $C_{21}H_{40}IN_3O_4Si_2$ AT -110 °C

A single crystal (colorless plate with dimensions 0.10 x 0.44 x 0.60 mm) was measured at a temperature of about -110 °C. Repeatedly measured reflections remained stable. A numerical absorption correction based on six indexed crystal faces gave a transmission factor between 0.519 and 0.882. Equivalent reflections were averaged. Friedel opposites were not averaged.

$R(I)_{\text{internal}} = 0.036$. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were geometrically positioned and were constrained. The *tert*-butyldimethylsilyl group containing atom Si1 has very large displacement parameters showing this group to be disordered. The structure was refined on F^2 values using program SHELXL-97. The final difference density was between -2.51 and $+2.67 \text{ e/\AA}^3$ near the slightly disordered atom Si1. The absolute configuration of the structure is confirmed by the value of the Flack x -parameter [$x = -0.02(1)$]. Some bond lengths and angles in the disordered *tert*-butyldimethylsilyl group have unrealistic values.

DISCUSSION OF THE STRUCTURE

The structure contains two independent molecules. The two molecules have slightly different conformations. The five-membered ring of one molecule has a conformation intermediate between a C2'-endo, C3'-exo twist and a C2'-endo envelope. The conformation of the other molecule approximately has a C3'-exo envelope conformation. A C3'-exo, C4'-endo twist conformation has been reported for the related 5-iodo-2'-deoxycytidine (Ghiassy, Low & Wilson, Acta Cryst., B37, 1981, 1921). The orientations of the silyl side chains also are different for the two molecules of the title compound. The orientation about the C4'-C5' bond is *gauche-gauche* for one molecule and *gauche-trans* for the second molecule. The base has an anti orientation about the glycosyl bond with O4'-C1'-N1-C2 torsion angles of $-131.1(3)$ and $-168.1(3)$ deg respectively. The molecules are connected by two intermolecular N-H...N and an intermolecular N-H...O hydrogen bonds. Each molecule also show an intramolecular N-H...I hydrogen bond. The crystal packing also show two intermolecular C-H...O and two intermolecular C-H... π (cytosine) interactions.

Tab. 50: Hydrogen bonds of 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-deoxycytidine

N - H ... A	N-H [Å]	H...A [Å]	N...A [Å]	N-H-A [°]	symmetry
N2 - H2C ... N6	0.88	2.16	3.027(4)	168	-x, y-1/2, 1-z
N2 - H2D ... I1	0.88	2.85	3.321(3)	115	x, y, z
N2 - H2D ... O1	0.88	2.39	3.210(4)	154	-x, 1/2+y, 1-z
N5 - H5C ... N3	0.88	2.06	2.924(5)	166	-x, 1/2+y, 1-z
N5 - H5D ... I2	0.88	2.84	3.309(4)	115	x, y, z

Table 51: Atomic coordinates ($\times 10^5$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^4$) for gerda1. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
I(1)	8160(2)	23649(2)	52715(2)	306(1)
I(2)	57323(2)	36020(3)	49782(2)	442(1)
Si(2)	12097(8)	-26850(13)	11106(7)	361(2)
Si(3)	82228(8)	45934(10)	31407(8)	332(3)
Si(4)	63027(9)	90134(10)	9278(7)	339(3)
Si(1)	29390(20)	15450(20)	31970(12)	957(9)
O(1)	7658(18)	-12480(20)	34398(15)	254(5)
C(1)	-1440(30)	-8390(30)	30790(20)	228(7)
N(4)	45800(20)	60950(30)	33424(19)	262(7)
C(6)	1060(30)	6630(30)	40580(20)	232(7)
O(5)	55700(19)	60430(20)	23116(16)	270(5)
O(6)	56990(20)	82120(20)	14790(18)	346(7)
C(42)	74910(60)	37390(70)	16530(40)	820(20)
O(7)	72750(20)	53820(30)	31670(20)	438(8)
N(6)	34700(20)	60040(30)	42950(20)	302(7)
N(1)	-5060(20)	-900(30)	36579(19)	213(6)
O(4)	-20010(20)	-8860(30)	34810(18)	343(6)
O(8)	32480(20)	71850(30)	32490(20)	451(9)
O(3)	20590(30)	5990(30)	30480(20)	514(9)
C(27)	51360(30)	53160(30)	37290(20)	250(7)
N(2)	-14680(20)	17240(30)	54150(20)	311(7)
C(7)	-1730(30)	13040(30)	46370(20)	236(7)
C(3)	8940(30)	-9360(30)	20620(20)	261(7)
C(22)	48280(30)	66410(40)	26030(20)	291(8)
O(2)	5430(20)	-18720(20)	16212(18)	335(6)
N(3)	-17410(20)	4460(30)	44290(20)	265(6)
C(8)	-11420(30)	11580(30)	48270(20)	240(7)
C(9)	-14580(30)	-1980(30)	38380(20)	237(7)
C(29)	40150(30)	52290(40)	46900(20)	317(8)
C(2)	470(30)	-2840(30)	23040(20)	261(7)
N(5)	37050(30)	48060(40)	53380(20)	430(10)
C(28)	48860(30)	48560(40)	44030(20)	284(8)
C(39)	78020(30)	33760(50)	25180(30)	462(12)
C(30)	37260(30)	64600(30)	36250(20)	287(8)
C(26)	71330(30)	65190(40)	30530(30)	378(10)
C(23)	51870(40)	78220(40)	27570(30)	376(10)
C(25)	64170(30)	67290(30)	23080(20)	272(8)
C(24)	60470(30)	79060(40)	22820(30)	310(8)
C(4)	14540(30)	-12640(30)	28670(20)	280(7)
C(33)	54430(40)	92890(40)	30(30)	449(11)
C(5)	23030(30)	-5350(40)	31500(30)	458(12)
C(13)	-4930(50)	-36390(50)	3700(40)	639(16)
C(12)	4080(50)	-30140(40)	1630(30)	497(13)
C(19)	16020(50)	30680(50)	29840(50)	780(20)
C(32)	74150(40)	82990(60)	7060(40)	699(19)

C(11)	23320(40)	-19600(60)	9160(50)	720(20)
C(16)	32940(50)	17730(50)	42600(40)	587(15)
C(36)	51420(60)	81950(50)	-4130(40)	740(20)
C(41)	86050(40)	25010(50)	25320(40)	587(15)
C(17)	41800(50)	10030(70)	27570(60)	950(30)
C(10)	15530(40)	-39600(50)	16810(40)	579(14)
C(35)	59390(60)	100120(60)	-5690(40)	724(19)
C(38)	91950(50)	53630(60)	27210(50)	780(20)
C(31)	66470(50)	103070(50)	14800(40)	658(17)
C(37)	86370(50)	41610(50)	41740(40)	616(17)
C(20)	34230(90)	35440(90)	26490(50)	1500(60)
C(14)	9500(60)	-37430(60)	-3770(40)	780(20)
C(34)	45430(40)	98700(60)	2130(40)	679(18)
C(40)	69390(50)	28430(60)	28550(50)	800(20)
C(18)	25310(50)	27370(60)	26340(50)	780(20)
C(21)	4500(100)	22920(120)	16940(50)	1960(80)
C(15)	1080(70)	-19250(60)	-2750(40)	770(20)

Table 52: Bond lengths [Å] and angles [°] for gerdal.

I(1)-C(7)	2.085(4)	O(6)-C(24)	1.432(5)
I(2)-C(28)	2.092(4)	C(42)-C(39)	1.538(8)
Si(2)-O(2)	1.670(3)	N(3)-C(9)	1.364(5)
Si(2)-C(10)	1.855(6)	C(29)-N(5)	1.331(5)
Si(2)-C(11)	1.862(6)	C(29)-C(28)	1.437(5)
Si(2)-C(12)	1.879(6)	C(39)-C(40)	1.538(8)
Si(3)-O(7)	1.639(3)	C(39)-C(41)	1.543(7)
Si(3)-C(37)	1.848(6)	C(26)-C(25)	1.529(6)
Si(3)-C(38)	1.861(6)	C(23)-C(24)	1.528(6)
Si(3)-C(39)	1.867(5)	C(25)-C(24)	1.519(6)
Si(4)-O(6)	1.650(3)	C(4)-C(5)	1.510(6)
Si(4)-C(32)	1.857(6)	C(33)-C(34)	1.522(8)
Si(4)-C(31)	1.859(6)	C(33)-C(35)	1.533(8)
Si(4)-C(33)	1.879(5)	C(33)-C(36)	1.538(8)
Si(1)-O(3)	1.679(4)	C(7)-C(8)	1.440(5)
Si(1)-C(18)	1.787(8)	C(3)-O(2)	1.414(4)
Si(1)-C(16)	1.825(6)	C(3)-C(2)	1.520(5)
Si(1)-C(17)	2.076(7)	C(3)-C(4)	1.535(5)
O(1)-C(1)	1.428(4)	C(22)-C(23)	1.532(6)
O(1)-C(4)	1.446(4)	N(3)-C(8)	1.327(5)
C(1)-N(1)	1.471(5)	O(3)-C(5)	1.424(7)
C(1)-C(2)	1.526(5)	C(27)-C(28)	1.352(6)
N(4)-C(27)	1.342(5)	N(2)-C(8)	1.336(5)
N(4)-C(30)	1.411(5)	O(8)-C(30)	1.232(5)
N(4)-C(22)	1.493(5)	C(13)-C(12)	1.546(9)
C(6)-C(7)	1.346(5)	C(12)-C(14)	1.538(7)
C(6)-N(1)	1.371(5)	C(12)-C(15)	1.548(9)
O(5)-C(22)	1.403(5)	C(19)-C(18)	1.545(10)
O(5)-C(25)	1.447(5)	C(20)-C(18)	1.582(10)

O(7)-C(26)	1.405(5)	N(6)-C(30)	1.348(5)
N(1)-C(9)	1.407(5)	N(6)-C(29)	1.337(6)
O(4)-C(9)	1.234(5)	C(32)-Si(4)-C(31)	109.0(3)
C(18)-C(21)	1.668(13)	O(6)-Si(4)-C(33)	104.9(2)
O(2)-Si(2)-C(10)	110.4(2)	C(32)-Si(4)-C(33)	112.3(3)
O(2)-Si(2)-C(11)	110.4(2)	C(31)-Si(4)-C(33)	111.4(3)
C(10)-Si(2)-C(11)	108.5(3)	O(3)-Si(1)-C(18)	107.2(3)
O(2)-Si(2)-C(12)	104.8(2)	O(3)-Si(1)-C(16)	110.9(3)
C(10)-Si(2)-C(12)	110.7(3)	C(18)-Si(1)-C(16)	115.6(4)
C(11)-Si(2)-C(12)	112.0(3)	O(3)-Si(1)-C(17)	110.9(3)
O(7)-Si(3)-C(37)	107.4(3)	C(18)-Si(1)-C(17)	106.9(4)
O(7)-Si(3)-C(38)	110.3(3)	C(16)-Si(1)-C(17)	105.3(4)
C(37)-Si(3)-C(38)	110.3(4)	C(1)-O(1)-C(4)	110.4(3)
O(7)-Si(3)-C(39)	106.2(2)	O(1)-C(1)-N(1)	106.9(3)
C(37)-Si(3)-C(39)	110.3(3)	O(1)-C(1)-C(2)	106.2(3)
C(38)-Si(3)-C(39)	112.1(3)	N(1)-C(1)-C(2)	114.2(3)
O(6)-Si(4)-C(32)	109.7(2)	C(27)-N(4)-C(30)	121.3(3)
O(6)-Si(4)-C(31)	109.5(2)	C(27)-N(4)-C(22)	122.8(3)
C(30)-N(4)-C(22)	115.9(3)	N(4)-C(22)-C(23)	112.2(4)
C(3)-O(2)-Si(2)	124.7(2)	N(4)-C(27)-C(28)	120.5(3)
C(6)-C(7)-C(8)	117.1(3)	C(22)-O(5)-C(25)	110.1(3)
C(24)-O(6)-Si(4)	123.4(3)	N(3)-C(8)-C(7)	121.2(3)
N(2)-C(8)-C(7)	121.3(3)	O(2)-C(3)-C(4)	111.3(3)
C(2)-C(3)-C(4)	103.0(3)	C(9)-N(1)-C(1)	119.9(3)
C(5)-O(3)-Si(1)	118.9(4)	C(26)-O(7)-Si(3)	132.2(3)
C(29)-N(6)-C(30)	121.0(3)	N(3)-C(9)-N(1)	118.2(3)
N(5)-C(29)-N(6)	117.4(4)	C(6)-C(7)-I(1)	119.9(3)
C(8)-C(7)-I(1)	122.8(3)	N(6)-C(29)-C(28)	120.5(4)
C(3)-C(2)-C(1)	103.0(3)	O(5)-C(22)-C(23)	107.6(3)
C(8)-N(3)-C(9)	121.6(3)	C(29)-C(28)-I(2)	121.7(3)
C(42)-C(39)-C(40)	109.3(6)	O(4)-C(9)-N(1)	119.8(3)
C(7)-C(6)-N(1)	121.7(3)	O(2)-C(3)-C(2)	109.3(3)
O(5)-C(22)-N(4)	108.8(3)	C(27)-C(28)-I(2)	120.2(3)
C(6)-N(1)-C(9)	120.2(3)	N(5)-C(29)-C(28)	122.1(4)
C(27)-C(28)-C(29)	118.1(4)	C(6)-N(1)-C(1)	119.7(3)
N(3)-C(8)-N(2)	117.5(3)	C(42)-C(39)-C(41)	109.3(5)
C(40)-C(39)-C(41)	107.8(5)	O(4)-C(9)-N(3)	122.0(3)
C(42)-C(39)-Si(3)	110.0(5)	C(5)-C(4)-C(3)	115.0(4)
C(34)-C(33)-C(35)	109.4(5)	C(13)-C(12)-C(15)	110.4(6)
C(34)-C(33)-C(36)	108.7(5)	C(13)-C(12)-Si(2)	109.1(4)
C(35)-C(33)-C(36)	109.0(5)	C(14)-C(12)-Si(2)	110.1(5)
C(34)-C(33)-Si(4)	104.4(4)	C(14)-C(12)-C(13)	109.0(5)
C(35)-C(33)-Si(4)	109.6(4)	C(14)-C(12)-C(15)	109.3(5)
C(40)-C(39)-Si(3)	109.3(4)	C(36)-C(33)-Si(4)	109.7(4)
C(41)-C(39)-Si(3)	111.1(4)	C(15)-C(12)-Si(2)	108.9(4)
O(8)-C(30)-N(6)	122.9(4)	C(19)-C(18)-C(20)	122.0(8)
O(8)-C(30)-N(4)	118.5(4)	C(19)-C(18)-C(21)	119.2(8)
N(6)-C(30)-N(4)	118.6(3)	C(19)-C(18)-Si(1)	103.5(5)
O(7)-C(26)-C(25)	110.1(4)	C(20)-C(18)-C(21)	100.2(7)
O(5)-C(25)-C(24)	105.4(3)	C(24)-C(23)-C(22)	103.6(3)
O(5)-C(25)-C(26)	10.6(3)	C(20)-C(18)-Si(1)	107.2(6)
C(21)-C(18)-Si(1)	103.0(7)	O(1)-C(4)-C(5)	109.9(3)
C(24)-C(25)-C(26)	111.5(4)	O(1)-C(4)-C(3)	106.4(3)

C(25)-C(24)-C(23)	102.0(3)	O(6)-C(24)-C(25)	110.2(4)
O(3)-C(5)-C(4)	111.2(4)	O(6)-C(24)-C(23)	108.6(3)

Table 53 : Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^4$) for gerda1. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2 \pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
I(1)	273(1)	299(1)	341(1)	-115(1)	19(1)	-5(1)
I(2)	277(1)	578(2)	479(2)	265(2)	75(1)	104(1)
Si(2)	363(5)	339(5)	412(6)	-97(6)	166(5)	6(6)
Si(3)	261(5)	327(6)	403(7)	37(5)	19(5)	13(4)
Si(4)	321(6)	346(6)	347(6)	77(5)	31(5)	-66(5)
Si(1)	1340(20)	986(16)	512(11)	8(10)	-20(12)	-842(16)
O(1)	269(12)	268(13)	227(12)	19(10)	39(9)	71(10)
C(1)	226(16)	195(16)	252(18)	-35(13)	-13(14)	-14(13)
N(4)	298(16)	274(16)	221(16)	10(13)	53(12)	-8(13)
C(6)	214(16)	207(16)	275(19)	14(14)	31(14)	9(13)
O(5)	266(12)	277(13)	276(13)	-27(10)	73(10)	-8(10)
O(6)	287(14)	375(16)	362(16)	133(12)	-15(12)	-60(12)
C(42)	1050(50)	870(50)	460(30)	-190(40)	-260(30)	270(50)
O(7)	315(15)	312(16)	690(20)	120(15)	74(15)	58(13)
N(6)	245(15)	319(17)	351(19)	0(14)	77(13)	32(13)
N(1)	180(13)	217(14)	245(16)	-10(12)	38(11)	-30(11)
O(4)	260(14)	367(15)	412(17)	-150(13)	79(12)	-77(12)
O(8)	295(14)	520(20)	560(20)	183(17)	131(13)	172(14)
O(3)	650(20)	440(20)	460(20)	-80(15)	80(17)	-267(18)
C(27)	215(16)	285(18)	249(19)	11(15)	26(14)	29(14)
N(2)	280(16)	322(17)	355(19)	-102(14)	140(14)	-12(14)
C(7)	283(17)	214(16)	215(17)	-45(13)	53(14)	5(13)
C(3)	283(18)	231(17)	287(19)	-46(14)	105(15)	-4(14)
C(22)	262(18)	360(20)	260(20)	49(16)	57(15)	18(16)
O(2)	319(14)	360(15)	341(16)	-150(12)	93(12)	-2(12)
N(3)	248(15)	262(16)	296(17)	-18(13)	78(13)	3(12)
C(8)	252(17)	224(16)	248(18)	-23(14)	41(14)	10(14)
C(9)	210(16)	241(17)	257(19)	10(14)	19(13)	11(13)
C(29)	243(18)	450(20)	270(20)	-15(17)	50(15)	-10(16)
C(2)	338(19)	269(18)	174(17)	-12(13)	27(14)	58(15)
N(5)	343(19)	570(20)	410(20)	188(19)	160(16)	111(18)
C(28)	201(16)	340(20)	310(20)	10(16)	13(14)	56(15)
C(39)	360(20)	570(30)	450(30)	-100(20)	10(20)	40(20)
C(30)	269(18)	305(19)	290(20)	-7(15)	31(15)	17(15)
C(26)	320(20)	310(20)	470(30)	59(18)	-66(19)	13(17)
C(23)	460(30)	262(19)	430(30)	48(18)	160(20)	86(18)
C(25)	233(17)	297(19)	290(20)	-8(15)	57(15)	-11(15)
C(24)	288(19)	350(20)	290(20)	43(16)	29(16)	-15(16)
C(4)	260(16)	330(20)	271(18)	4(16)	107(14)	29(15)
C(33)	550(30)	370(20)	410(30)	130(20)	-40(20)	-70(20)
C(5)	320(20)	530(30)	510(30)	-60(20)	20(20)	-110(20)

C(13)	600(30)	580(40)	700(40)	-170(30)	-80(30)	-100(30)
C(12)	700(40)	420(30)	390(30)	-140(20)	130(20)	70(20)
C(19)	500(30)	490(30)	1380(70)	290(40)	270(40)	200(30)
C(32)	510(30)	850(50)	780(40)	230(40)	230(30)	140(30)
C(11)	550(30)	670(40)	1050(50)	-300(40)	550(40)	-120(30)
C(16)	620(40)	560(30)	550(40)	-70(30)	-50(30)	-110(30)
C(36)	990(50)	580(40)	590(40)	-30(30)	-180(40)	-210(40)
C(41)	600(30)	540(40)	600(30)	-190(30)	-30(20)	220(30)
C(17)	560(40)	850(50)	1510(80)	-240(50)	370(50)	160(40)
C(10)	560(30)	570(30)	610(40)	0(30)	60(30)	180(30)
C(35)	920(50)	750(40)	500(40)	280(30)	60(30)	-110(40)
C(38)	610(40)	790(50)	1020(60)	-30(40)	460(40)	-50(40)
C(31)	820(40)	520(30)	610(40)	-50(30)	-10(30)	-280(30)
C(37)	830(40)	380(30)	550(30)	80(20)	-260(30)	-10(30)
C(20)	2250(130)	1180(80)	860(60)	520(60)	-640(70)	-1210(90)
C(14)	1170(60)	670(40)	550(40)	-310(30)	300(40)	130(40)
C(34)	550(30)	600(40)	840(50)	230(30)	-120(30)	50(30)
C(40)	590(40)	740(40)	1130(60)	-530(40)	300(40)	-190(30)
C(18)	590(40)	670(40)	1040(60)	-70(40)	-70(40)	-200(30)
C(21)	2930(170)	2060(130)	680(50)	530(70)	-690(80)	-1920(130)
C(15)	1200(60)	640(40)	470(40)	50(30)	20(40)	180(40)

Table 54: Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for gerda1.

	x	y	z	U(eq)
H(1A)	-605	-1464	2959	27
H(6A)	744	733	3923	28
H(42A)	7270	3096	1330	124
H(42B)	8040	4077	1437	124
H(42C)	6964	4274	1640	124
H(27A)	5710	5086	3529	30
H(2C)	-2061	1619	5526	47
H(2D)	-1091	2204	5692	47
H(3A)	1300	-469	1748	31
H(22A)	4247	6647	2192	35
H(2A)	-522	-339	1893	31
H(2B)	218	502	2391	31
H(5C)	3160	5038	5491	64
H(5D)	4045	4294	5614	64
H(26A)	7756	6879	2994	45
H(26B)	6881	6841	3524	45
H(23A)	4681	8363	2564	45
H(23B)	5390	7948	3332	45
H(25A)	6732	6573	1820	33
H(24A)	6546	8432	2532	37
H(4A)	1692	-2036	2824	34
H(5A)	2517	-683	3721	55
H(5B)	2846	-710	2846	55

H(13A)	-914	-3812	-121	96
H(13B)	-843	-3177	713	96
H(13C)	-292	-4323	650	96
H(19A)	1321	3723	2707	116
H(19B)	1758	3231	3553	116
H(19C)	1137	2461	2914	116
H(32A)	7842	8177	1204	105
H(32B)	7746	8753	346	105
H(32C)	7242	7588	453	105
H(11A)	2729	-1804	1423	108
H(11B)	2163	-1267	635	108
H(11C)	2695	-2428	586	108
H(16A)	2729	2000	4510	88
H(16B)	3786	2352	4333	88
H(16C)	3557	1090	4507	88
H(36A)	4692	8342	-894	111
H(36B)	4826	7727	-51	111
H(36C)	5715	7819	-561	111
H(41A)	8364	1868	2206	88
H(41B)	8797	2259	3082	88
H(41C)	9164	2819	2317	88
H(17A)	4430	350	3053	143
H(17B)	4668	1587	2818	143
H(17C)	4027	818	2191	143
H(10A)	1974	-3772	2170	87
H(10B)	1895	-4456	1356	87
H(10C)	970	-4325	1819	87
H(35A)	5491	10151	-1052	109
H(35B)	6513	9632	-712	109
H(35C)	6130	10713	-309	109
H(38A)	8967	5586	2172	117
H(38B)	9764	4890	2723	117
H(38C)	9366	6019	3045	117
H(31A)	7095	10136	1957	99
H(31B)	6068	10658	1637	99
H(31C)	6958	10808	1136	99
H(37A)	8857	4807	4494	92
H(37B)	9171	3637	4174	92
H(37C)	8103	3809	4403	92
H(20A)	3221	4218	2357	225
H(20B)	3935	3184	2397	225
H(20C)	3664	3728	3202	225
H(14A)	524	-3914	-868	117
H(14B)	1148	-4429	-98	117
H(14C)	1522	-3352	-511	117
H(34A)	4100	10003	-274	102
H(34B)	4725	10575	472	102
H(34C)	4224	9407	577	102
H(40A)	6721	2200	2531	121
H(40B)	6412	3378	2841	121
H(40C)	7135	2612	3406	121
H(21A)	2212	2889	1332	295
H(21B)	2001	1669	1624	295

H(21C)	3088	2056	1576	295
H(15A)	-314	-2088	-769	116
H(15B)	686	-1539	-403	116
H(15C)	-237	-1458	69	116

Table 55: Torsion angles [°] for gerda1.

C(4)-O(1)-C(1)-N(1)	-137.8(3)	C(1)-N(1)-C(9)-N(3)	174.3(3)
C(4)-O(1)-C(1)-C(2)	-15.5(4)	C(30)-N(6)-C(29)-N(5)	-178.9(4)
C(32)-Si(4)-O(6)-C(24)	66.8(4)	C(30)-N(6)-C(29)-C(28)	-0.6(6)
C(31)-Si(4)-O(6)-C(24)	-52.8(4)	O(2)-C(3)-C(2)-C(1)	86.1(4)
C(33)-Si(4)-O(6)-C(24)	-172.4(3)	C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	-32.3(4)
C(37)-Si(3)-O(7)-C(26)	109.0(5)	O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	30.1(4)
C(38)-Si(3)-O(7)-C(26)	-11.2(6)	N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	147.7(3)
C(39)-Si(3)-O(7)-C(26)	-132.9(5)	N(4)-C(27)-C(28)-C(29)	-0.3(6)
C(7)-C(6)-N(1)-C(9)	1.0(5)	N(4)-C(27)-C(28)-I(2)	177.8(3)
C(7)-C(6)-N(1)-C(1)	174.8(3)	N(5)-C(29)-C(28)-C(27)	178.6(4)
O(1)-C(1)-N(1)-C(6)	44.8(4)	N(6)-C(29)-C(28)-C(27)	0.5(6)
C(2)-C(1)-N(1)-C(6)	-72.5(4)	N(5)-C(29)-C(28)-I(2)	0.6(6)
O(1)-C(1)-N(1)-C(9)	-131.1(3)	N(6)-C(29)-C(28)-I(2)	-177.6(3)
C(2)-C(1)-N(1)-C(9)	111.7(4)	O(7)-Si(3)-C(39)-C(42)	65.7(4)
C(18)-Si(1)-O(3)-C(5)	155.5(5)	C(37)-Si(3)-C(39)-C(42)	-178.1(5)
C(16)-Si(1)-O(3)-C(5)	-77.5(5)	C(38)-Si(3)-C(39)-C(42)	-54.8(5)
C(17)-Si(1)-O(3)-C(5)	39.2(5)	O(7)-Si(3)-C(39)-C(40)	-54.3(5)
C(30)-N(4)-C(27)-C(28)	0.3(6)	C(37)-Si(3)-C(39)-C(40)	61.9(5)
C(22)-N(4)-C(27)-C(28)	179.2(4)	C(38)-Si(3)-C(39)-C(40)	-174.8(5)
N(1)-C(6)-C(7)-C(8)	0.7(5)	O(7)-Si(3)-C(39)-C(41)	-173.1(4)
N(1)-C(6)-C(7)-I(1)	176.2(3)	C(37)-Si(3)-C(39)-C(41)	-57.0(5)
C(25)-O(5)-C(22)-N(4)	-118.4(3)	C(38)-Si(3)-C(39)-C(41)	66.3(5)
C(25)-O(5)-C(22)-C(23)	3.5(4)	C(29)-N(6)-C(30)-O(8)	-179.2(4)
C(27)-N(4)-C(22)-O(5)	13.0(5)	C(29)-N(6)-C(30)-N(4)	0.6(6)
C(30)-N(4)-C(22)-O(5)	-168.1(3)	C(27)-N(4)-C(30)-O(8)	179.3(4)
C(27)-N(4)-C(22)-C(23)	-106.1(4)	C(22)-N(4)-C(30)-O(8)	0.3(5)
C(30)-N(4)-C(22)-C(23)	72.9(4)	C(27)-N(4)-C(30)-N(6)	-0.4(6)
C(2)-C(3)-O(2)-Si(2)	168.8(3)	C(22)-N(4)-C(30)-N(6)	-179.4(4)
C(4)-C(3)-O(2)-Si(2)	-78.1(4)	Si(3)-O(7)-C(26)-C(25)	114.8(4)
C(10)-Si(2)-O(2)-C(3)	101.1(4)	O(5)-C(22)-C(23)-C(24)	17.4(5)
C(11)-Si(2)-O(2)-C(3)	-18.9(4)	N(4)-C(22)-C(23)-C(24)	137.1(4)
C(12)-Si(2)-O(2)-C(3)	-139.7(3)	C(22)-O(5)-C(25)-C(24)	-23.3(4)
C(9)-N(3)-C(8)-N(2)	-177.6(4)	C(22)-O(5)-C(25)-C(26)	97.3(4)
C(9)-N(3)-C(8)-C(7)	1.8(6)	O(7)-C(26)-C(25)-O(5)	48.3(5)
C(6)-C(7)-C(8)-N(3)	-2.2(6)	O(7)-C(26)-C(25)-C(24)	165.2(4)
I(1)-C(7)-C(8)-N(3)	-177.5(3)	Si(4)-O(6)-C(24)-C(25)	-103.7(3)
C(6)-C(7)-C(8)-N(2)	177.2(4)	Si(4)-O(6)-C(24)-C(23)	145.3(3)
I(1)-C(7)-C(8)-N(2)	1.8(5)	O(5)-C(25)-C(24)-O(6)	-82.4(4)
C(8)-N(3)-C(9)-O(4)	177.7(4)	C(26)-C(25)-C(24)-O(6)	157.6(3)
C(8)-N(3)-C(9)-N(1)	0.1(5)	O(5)-C(25)-C(24)-C(23)	32.8(4)
C(6)-N(1)-C(9)-O(4)	-179.2(3)	C(26)-C(25)-C(24)-C(23)	-87.2(4)
C(1)-N(1)-C(9)-O(4)	-3.4(5)	C(22)-C(23)-C(24)-O(6)	86.3(4)
C(6)-N(1)-C(9)-N(3)	-1.5(5)	C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-30.1(4)

C(1)-O(1)-C(4)-C(5)	119.6(4)	O(2)-Si(2)-C(12)-C(14)	178.6(4)
C(1)-O(1)-C(4)-C(3)	-5.5(4)	C(10)-Si(2)-C(12)-C(14)	-62.3(5)
O(2)-C(3)-C(4)-O(1)	-93.0(3)	C(11)-Si(2)-C(12)-C(14)	59.0(5)
C(2)-C(3)-C(4)-O(1)	24.0(4)	O(2)-Si(2)-C(12)-C(13)	-61.8(4)
O(2)-C(3)-C(4)-C(5)	145.1(4)	C(10)-Si(2)-C(12)-C(13)	57.3(4)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-97.9(4)	C(11)-Si(2)-C(12)-C(13)	178.6(4)
O(6)-Si(4)-C(33)-C(34)	60.7(4)	C(10)-Si(2)-C(12)-C(15)	177.8(5)
C(32)-Si(4)-C(33)-C(34)	179.8(4)	C(11)-Si(2)-C(12)-C(15)	-60.9(5)
C(31)-Si(4)-C(33)-C(34)	-57.6(5)	O(3)-Si(1)-C(18)-C(19)	59.8(6)
O(6)-Si(4)-C(33)-C(35)	-178.7(4)	C(16)-Si(1)-C(18)-C(19)	-64.4(6)
C(32)-Si(4)-C(33)-C(35)	-59.6(5)	C(17)-Si(1)-C(18)-C(19)	178.8(5)
C(31)-Si(4)-C(33)-C(35)	63.0(5)	O(3)-Si(1)-C(18)-C(20)	-170.1(6)
O(6)-Si(4)-C(33)-C(36)	-59.1(5)	C(16)-Si(1)-C(18)-C(20)	65.8(8)
C(32)-Si(4)-C(33)-C(36)	60.0(5)	C(17)-Si(1)-C(18)-C(20)	-51.1(8)
C(31)-Si(4)-C(33)-C(36)	-177.4(5)	O(3)-Si(1)-C(18)-C(21)	-65.0(6)
Si(1)-O(3)-C(5)-C(4)	-171.1(3)	C(16)-Si(1)-C(18)-C(21)	170.8(5)
O(1)-C(4)-C(5)-O(3)	-75.2(5)	C(17)-Si(1)-C(18)-C(21)	54.0(6)
C(3)-C(4)-C(5)-O(3)	44.8(5)	O(2)-Si(2)-C(12)-C(15)	58.7(5)

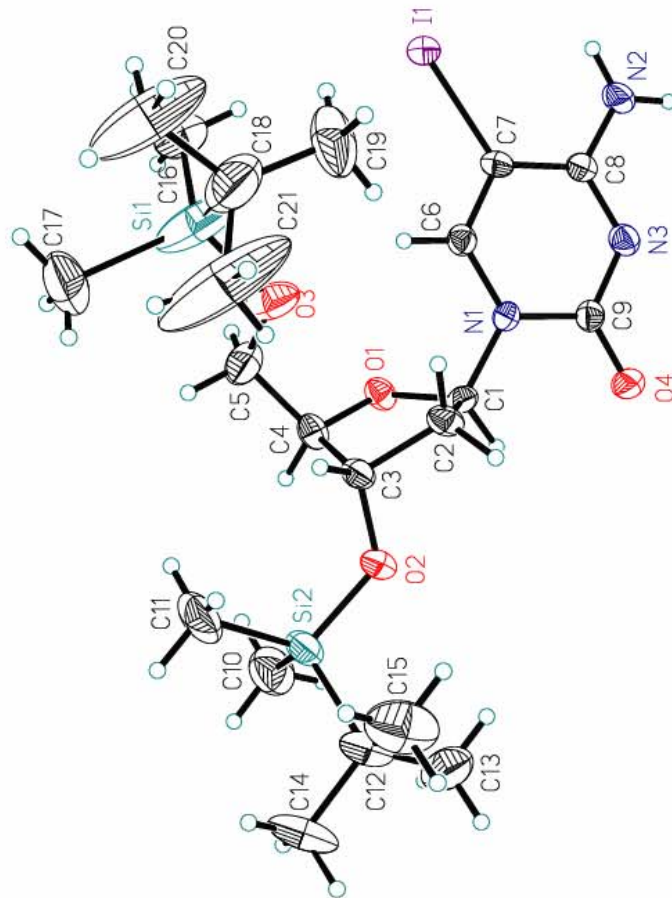


Abb. 61: Eines der 5-Iod-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin-Konformere

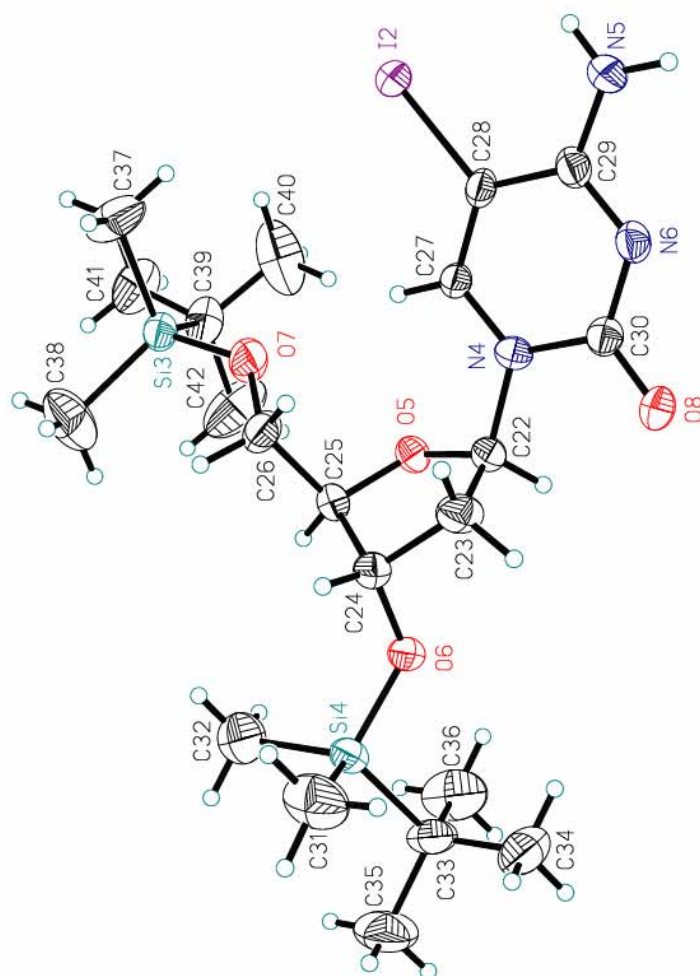


Abb. 62: Das andere Konformer von 5-Iodo-3',5'-di(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin

Crystal data and structure refinement for gerda2.

Identification code	gerda2
Empirical formula	C ₃₀ H ₄₉ N ₃ O ₅ Si ₂
Formula weight	587.90
Temperature	162(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	Triclinic, P 1
Unit cell dimensions	a = 7.4612(12) Å alpha = 103.505(12) deg. b = 13.303(3) Å beta = 92.008(10) deg. c = 17.904(2) Å gamma = 100.486(15) deg.
Volume	1693.5(5) Å ³
Z, Calculated density	2, 1.153 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.144 mm ⁻¹
F(000)	636
Crystal size	0.9 x 0.2 x 0.2 mm
Theta range for data collection	1.61 to 29.94 deg.
Limiting indices	-9<=h<=10, -17<=k<=17, -24<=l<=24
Reflections collected / unique	27208 / 16276 [R(int) = 0.0664]
Completeness to theta = 29.94	88.6 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	16276 / 3 / 752
Goodness-of-fit on F ²	1.029
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0810, wR2 = 0.1899
R indices (all data)	R1 = 0.1163, wR2 = 0.2160
Absolute structure parameter	-0.14(14)
Largest diff. peak and hole	1.854 and -1.070 e.Å ⁻³

CRYSTAL DATA OF C₂₉H₄₅N₃O₄Si₂* CH₃OH AT -111 °C

A single crystal (colorless rod with dimensions 0.20 x 0.20 x 0.90 mm) was measured at a temperature of about -111 °C. Repeatedly measured reflections remained stable. No absorption correction was made. Equivalent reflections were averaged. Friedel opposites were not averaged. R(I)internal = 0.066. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms attached to C atoms were geometrically positioned and were constrained. The H atoms attached to N2, N5 and O10 were taken from a difference synthesis and were refined. The *tert*-butyldimethyl-silyl group containing atom Si4 has rather large displacement parameters showing this group to be slightly disordered. One of the two methanol solvate groups also was found to be disordered. Thus methanol atom O9 was refined with a split atom model. The H atoms of the disordered methanol group could not be located. The structure was refined on F² values using program SHELXL-97. The final difference density was between -1.07 and +1.85 e/Å³ near the slightly disordered atom Si4. The absolute configuration of the structure is confirmed by the value of the Flack x-parameter [x = -0.1(1)].

DISCUSSION OF THE STRUCTURE

The structure contains two independent molecules. The two molecules have different conformations. The five-membered ring of one molecule has a conformation intermediate between a C2'-endo,C3'-exo twist and a C3'-exo envelope. The conformation of the other molecule has a C2'-endo envelope conformation. The orientations of the silyl side chains also are different for the two molecules of the title compound. The orientation about the C4'-C5' bond is gauche, trans for one molecule and gauche, gauche for the second molecule.

The base has an anti orientation about the glycosyl bond with O4'-C1'-N1-C2 torsion angles of -154.5(3) and -149.9(3) deg respectively. Each NH₂ group is involved in an intermolecular N-H...N(cytosine) hydrogen bond and a N-H...O(methanol) hydrogen bond. The methanol molecule donates a hydrogen bond to a O(cytosine) atom.

The crystal packing also shows two very weak intermolecular C-H... π (cytosine) interactions and a very weak intermolecular C-H...O interaction.

Tabel 56: Hydrogen bonds of 3',5'-Di-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5-phenylethin-2'-deoxycytidine

D - H ... A	D-H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	D-H-A [°]	symmetry
N2 - H2C ... O9	0.96(4)	2.10(4)	2.923(8)	143(3)	x+1, y, z
N2 - H2D ... N6	0.89(5)	2.08(5)	2.950(5)	166(4)	x+1, y, z
N5 - H5C ... O10	0.84(4)	2.24(4)	2.889(6)	134(4)	x, y, z
N5 - H5D ... N3	0.82(5)	2.24(5)	3.047(5)	165(5)	x-1, y, z
O10- H10A... O1	0.75(7)	2.08(7)	2.815(5)	168(7)	x-1, y, z

Table 57: Atomic coordinates ($\times 10^5$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{Å}^2 \times 10^4$) for gerda2. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor.

	x	y	z	U(eq)
Si(1)	-21175(16)	50229(10)	38900(7)	346(3)
Si(3)	118180(16)	102756(10)	100545(7)	342(3)
Si(2)	33950(20)	91582(13)	34046(9)	537(4)
Si(4)	70870(30)	60070(16)	105037(10)	766(6)
O(8)	45860(40)	89810(20)	77096(19)	353(7)
O(6)	100700(40)	95520(20)	94634(18)	367(7)
O(1)	50330(40)	59660(20)	62115(18)	355(7)
O(2)	-2760(40)	56280(20)	44692(18)	352(7)
C(7)	73490(60)	88400(30)	59900(20)	259(8)
N(1)	50270(50)	73130(30)	56395(19)	259(7)
O(4)	32410(40)	70810(20)	44844(15)	278(6)
N(3)	74580(50)	73510(30)	65446(19)	268(7)

C(36)	26430(60)	60560(30)	79340(20)	264(8)
N(6)	22180(50)	75750(30)	74700(20)	269(7)
O(5)	79990(40)	73700(20)	84089(16)	318(6)
C(6)	57800(60)	83020(30)	55830(20)	271(8)
C(38)	39070(60)	80830(30)	77510(20)	263(8)
N(5)	-1030(50)	61290(30)	72250(20)	255(7)
N(4)	50250(40)	75480(30)	81180(19)	251(7)
O(3)	29870(40)	90700(20)	42906(19)	370(7)
N(2)	97890(50)	87840(30)	68810(20)	303(8)
C(8)	82010(50)	83100(30)	64800(20)	254(8)
C(35)	43500(50)	65580(30)	82110(20)	250(8)
O(7)	73560(50)	65050(30)	97270(20)	500(9)
C(49)	109830(70)	113190(40)	107820(30)	446(12)
C(37)	15640(50)	65970(30)	75380(20)	246(8)
C(9)	58300(50)	68320(30)	61520(20)	257(8)
C(10)	82160(60)	98570(30)	59030(30)	302(9)
C(39)	18410(60)	50350(30)	80360(20)	290(9)
C(11)	89730(60)	106920(30)	58260(30)	323(9)
C(17)	91070(80)	125950(40)	60130(30)	467(12)
C(40)	9910(60)	42110(40)	80850(30)	331(9)
C(1)	33420(60)	66970(30)	51580(20)	266(8)
C(41)	-630(70)	32100(30)	81520(30)	350(10)
C(32)	88570(60)	86700(30)	95940(20)	310(9)
C(33)	92640(60)	76430(30)	90850(20)	306(9)
C(16)	98840(100)	135490(40)	58660(40)	608(17)
C(30)	68580(50)	81240(30)	84540(20)	266(8)
C(18)	-32050(80)	59980(50)	35420(30)	519(13)
C(20)	-12930(70)	40910(40)	30680(30)	441(12)
C(22)	-29550(110)	34140(60)	25310(40)	800(20)
C(12)	97940(60)	116960(30)	56970(30)	304(9)
C(3)	2470(50)	67100(30)	48460(20)	295(9)
C(2)	15700(60)	68150(40)	55360(20)	322(9)
C(50)	102000(110)	120650(50)	103820(40)	696(19)
C(27)	61560(120)	102420(70)	27220(40)	830(20)
C(19)	-37400(80)	42920(50)	44340(40)	551(14)
C(21)	0(100)	47400(60)	26190(40)	679(18)
C(34)	90900(70)	67180(40)	94500(30)	402(11)
C(42)	7180(80)	23270(40)	80740(30)	469(12)
C(26)	56860(100)	99720(60)	34880(40)	679(18)
C(5)	14760(60)	84880(40)	45690(30)	355(10)
C(47)	134910(70)	108580(50)	94500(40)	540(14)
C(44)	-21990(100)	13180(50)	82550(40)	669(19)
C(15)	113660(100)	136040(40)	54100(40)	646(18)
C(13)	112390(70)	117590(40)	52310(30)	454(12)
C(23)	-2350(90)	33770(50)	33840(40)	570(15)
C(14)	120200(90)	127280(50)	50970(40)	624(16)
C(52)	94930(90)	108220(50)	112300(30)	576(15)
C(46)	-18890(70)	31440(40)	82880(30)	503(13)
C(28)	58480(110)	110040(50)	41210(40)	711(19)
C(24)	30800(200)	79010(80)	27150(40)	1730(70)
C(43)	-3750(100)	13780(40)	81210(30)	564(16)
C(56)	37310(110)	64670(90)	104460(60)	1080(40)
C(54)	83100(130)	48300(80)	104450(50)	940(30)

C(48)	128870(80)	94060(50)	105560(30)	525(14)
C(51)	126030(100)	119530(60)	113620(40)	740(20)
C(25)	16690(130)	98580(110)	30400(60)	1280(40)
C(53)	80130(120)	70430(60)	113660(40)	830(20)
C(45)	-29670(90)	21860(60)	83320(40)	694(19)
C(4)	14530(60)	73050(30)	43580(20)	293(9)
C(58)	42240(140)	51080(100)	112250(60)	1230(40)
C(29)	70590(110)	93530(90)	37350(50)	1040(30)
C(55)	46770(110)	54740(70)	104820(50)	830(20)
C(57)	42570(150)	44370(70)	97470(60)	1220(40)
O(10)	-36070(50)	47260(30)	70890(30)	527(10)
C(60)	-48470(80)	37880(40)	68420(40)	555(14)
C(31)	69120(60)	86640(30)	93020(20)	317(9)
O(9)	30690(80)	104450(60)	71830(50)	510(30)
O(9')	31380(120)	98380(80)	65920(60)	480(40)
C(59)	40730(80)	107750(40)	65580(30)	532(13)

Table 58: Bond lengths [Å] and angles [°] for gerda2.

Si(1)-O(2)	1.649(3)	C(36)-C(37)	1.442(6)
Si(1)-C(19)	1.858(6)	N(6)-C(38)	1.336(5)
Si(1)-C(18)	1.859(6)	N(6)-C(37)	1.339(5)
Si(1)-C(20)	1.889(5)	O(5)-C(30)	1.420(5)
Si(3)-O(6)	1.649(3)	O(5)-C(33)	1.442(5)
Si(3)-C(47)	1.861(6)	C(38)-N(4)	1.424(5)
Si(3)-C(49)	1.882(5)	N(5)-C(37)	1.325(5)
Si(3)-C(48)	1.885(6)	N(4)-C(35)	1.373(5)
Si(2)-O(3)	1.652(3)	N(4)-C(30)	1.471(5)
Si(2)-C(24)	1.802(9)	O(3)-C(5)	1.422(6)
Si(2)-C(26)	1.830(7)	N(2)-C(8)	1.332(5)
Si(2)-C(25)	1.901(8)	O(7)-C(34)	1.407(6)
Si(4)-O(7)	1.677(4)	C(49)-C(50)	1.534(8)
Si(4)-C(55)	1.804(9)	C(49)-C(52)	1.535(8)
Si(4)-C(53)	1.829(7)	C(49)-C(51)	1.543(8)
Si(4)-C(54)	1.935(8)	C(10)-C(11)	1.193(6)
O(8)-C(38)	1.231(5)	C(39)-C(40)	1.186(6)
O(6)-C(32)	1.416(5)	C(11)-C(12)	1.438(6)
O(1)-C(9)	1.227(5)	C(17)-C(16)	1.383(8)
O(2)-C(3)	1.415(5)	C(17)-C(12)	1.393(7)
C(7)-C(6)	1.344(6)	C(40)-C(41)	1.452(6)
C(7)-C(10)	1.434(6)	C(1)-C(2)	1.523(6)
C(7)-C(8)	1.443(6)	C(41)-C(42)	1.383(7)
N(1)-C(6)	1.361(5)	C(41)-C(46)	1.383(8)
N(1)-C(9)	1.409(5)	C(32)-C(31)	1.523(6)
N(1)-C(1)	1.488(5)	C(32)-C(33)	1.541(6)
O(4)-C(1)	1.421(5)	C(33)-C(34)	1.511(7)
O(4)-C(4)	1.440(5)	C(16)-C(15)	1.399(10)
N(3)-C(8)	1.329(5)	C(30)-C(31)	1.517(6)
N(3)-C(9)	1.361(5)	C(20)-C(23)	1.529(8)
C(36)-C(35)	1.343(6)	C(20)-C(22)	1.542(8)
C(36)-C(39)	1.437(6)	C(20)-C(21)	1.549(8)

C(12)-C(13)	1.389(7)	C(35)-C(36)-C(39)	123.3(4)
C(3)-C(2)	1.519(6)	C(35)-C(36)-C(37)	117.4(4)
C(3)-C(4)	1.523(6)	C(39)-C(36)-C(37)	119.2(4)
C(27)-C(26)	1.535(9)	C(38)-N(6)-C(37)	121.6(4)
C(42)-C(43)	1.395(8)	C(30)-O(5)-C(33)	110.4(3)
C(26)-C(29)	1.539(11)	C(7)-C(6)-N(1)	121.5(4)
C(26)-C(28)	1.545(9)	O(8)-C(38)-N(6)	124.8(4)
C(5)-C(4)	1.527(6)	O(8)-C(38)-N(4)	117.1(4)
C(44)-C(45)	1.361(11)	N(6)-C(38)-N(4)	118.2(3)
C(44)-C(43)	1.381(10)	C(35)-N(4)-C(38)	120.6(3)
C(15)-C(14)	1.352(9)	C(35)-N(4)-C(30)	121.1(3)
C(13)-C(14)	1.393(7)	C(38)-N(4)-C(30)	118.0(3)
C(46)-C(45)	1.399(8)	C(5)-O(3)-Si(2)	130.5(3)
C(56)-C(55)	1.620(11)	N(3)-C(8)-N(2)	118.0(4)
C(58)-C(55)	1.547(10)	N(3)-C(8)-C(7)	122.2(4)
C(55)-C(57)	1.644(13)	N(2)-C(8)-C(7)	119.8(4)
O(10)-C(60)	1.379(7)	C(36)-C(35)-N(4)	120.8(4)
O(9)-C(59)	1.475(9)	C(34)-O(7)-Si(4)	120.8(3)
O(9')-C(59)	1.329(10)	C(50)-C(49)-C(52)	108.8(5)
O(2)-Si(1)-C(19)	108.4(2)	C(50)-C(49)-C(51)	109.5(5)
O(2)-Si(1)-C(18)	110.2(2)	C(52)-C(49)-C(51)	108.3(5)
C(19)-Si(1)-C(18)	109.9(3)	C(50)-C(49)-Si(3)	110.5(4)
O(2)-Si(1)-C(20)	105.5(2)	C(52)-C(49)-Si(3)	111.0(4)
C(19)-Si(1)-C(20)	111.2(3)	C(51)-C(49)-Si(3)	108.7(4)
C(18)-Si(1)-C(20)	111.4(2)	N(5)-C(37)-N(6)	118.3(4)
O(6)-Si(3)-C(47)	106.7(2)	N(5)-C(37)-C(36)	120.4(4)
O(6)-Si(3)-C(49)	109.0(2)	N(6)-C(37)-C(36)	121.3(4)
C(47)-Si(3)-C(49)	111.9(3)	O(1)-C(9)-N(3)	123.9(4)
O(6)-Si(3)-C(48)	109.3(2)	O(1)-C(9)-N(1)	118.1(4)
C(47)-Si(3)-C(48)	109.8(3)	N(3)-C(9)-N(1)	118.0(3)
C(49)-Si(3)-C(48)	110.1(3)	C(11)-C(10)-C(7)	178.4(5)
O(3)-Si(2)-C(24)	113.8(3)	C(40)-C(39)-C(36)	172.3(5)
O(3)-Si(2)-C(26)	105.4(2)	C(10)-C(11)-C(12)	176.4(5)
C(24)-Si(2)-C(26)	114.9(5)	C(16)-C(17)-C(12)	119.6(5)
O(3)-Si(2)-C(25)	109.1(3)	C(39)-C(40)-C(41)	179.2(5)
C(24)-Si(2)-C(25)	104.3(7)	O(4)-C(1)-N(1)	107.6(3)
C(26)-Si(2)-C(25)	109.3(5)	O(4)-C(1)-C(2)	106.1(3)
O(7)-Si(4)-C(55)	106.2(3)	N(1)-C(1)-C(2)	114.5(3)
O(7)-Si(4)-C(53)	109.0(3)	C(42)-C(41)-C(46)	120.0(5)
C(55)-Si(4)-C(53)	114.6(4)	C(42)-C(41)-C(40)	121.3(5)
O(7)-Si(4)-C(54)	111.8(3)	C(46)-C(41)-C(40)	118.7(4)
C(55)-Si(4)-C(54)	105.9(4)	O(6)-C(32)-C(31)	110.1(4)
C(53)-Si(4)-C(54)	109.3(4)	O(6)-C(32)-C(33)	110.1(3)
C(32)-O(6)-Si(3)	125.8(3)	C(31)-C(32)-C(33)	102.9(3)
C(3)-O(2)-Si(1)	128.6(3)	O(5)-C(33)-C(34)	109.2(4)
C(6)-C(7)-C(10)	122.2(4)	O(5)-C(33)-C(32)	106.1(3)
C(6)-C(7)-C(8)	116.5(4)	C(34)-C(33)-C(32)	115.9(4)
C(10)-C(7)-C(8)	121.2(4)	C(17)-C(16)-C(15)	119.7(5)
C(6)-N(1)-C(9)	121.0(3)	O(5)-C(30)-N(4)	107.3(3)
C(6)-N(1)-C(1)	121.4(3)	O(5)-C(30)-C(31)	105.8(3)
C(9)-N(1)-C(1)	117.6(3)	N(4)-C(30)-C(31)	113.4(3)
C(1)-O(4)-C(4)	110.3(3)	C(23)-C(20)-C(22)	109.7(5)
C(8)-N(3)-C(9)	120.6(3)	C(23)-C(20)-C(21)	108.7(5)

C(22)-C(20)-C(21)	110.2(5)	O(3)-C(5)-C(4)	112.3(4)
C(23)-C(20)-Si(1)	109.9(4)	C(45)-C(44)-C(43)	120.3(5)
C(22)-C(20)-Si(1)	109.2(4)	C(14)-C(15)-C(16)	120.6(5)
C(21)-C(20)-Si(1)	109.1(4)	C(12)-C(13)-C(14)	119.6(5)
C(13)-C(12)-C(17)	119.9(4)	C(15)-C(14)-C(13)	120.4(6)
C(13)-C(12)-C(11)	119.5(4)	C(41)-C(46)-C(45)	120.5(6)
C(17)-C(12)-C(11)	120.5(4)	C(44)-C(43)-C(42)	120.9(6)
O(2)-C(3)-C(2)	108.3(4)	C(44)-C(45)-C(46)	119.5(6)
O(2)-C(3)-C(4)	110.9(3)	O(4)-C(4)-C(3)	104.7(3)
C(2)-C(3)-C(4)	101.3(3)	O(4)-C(4)-C(5)	111.8(3)
C(3)-C(2)-C(1)	101.9(3)	C(3)-C(4)-C(5)	113.0(4)
O(7)-C(34)-C(33)	111.1(4)	C(58)-C(55)-C(56)	110.0(8)
C(41)-C(42)-C(43)	118.8(6)	C(58)-C(55)-C(57)	108.5(7)
C(27)-C(26)-C(29)	110.2(7)	C(56)-C(55)-C(57)	118.4(7)
C(27)-C(26)-C(28)	109.2(6)	C(58)-C(55)-Si(4)	111.0(6)
C(29)-C(26)-C(28)	107.4(7)	C(56)-C(55)-Si(4)	103.3(5)
C(27)-C(26)-Si(2)	111.2(5)	C(57)-C(55)-Si(4)	105.4(7)
C(29)-C(26)-Si(2)	107.9(5)	C(30)-C(31)-C(32)	102.4(3)
C(28)-C(26)-Si(2)	110.9(5)		

Table 59 : Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^4$) for gerda2. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2 \pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Si(1)	304(6)	413(7)	279(6)	39(5)	-4(5)	33(5)
Si(3)	283(6)	389(7)	322(6)	61(5)	2(5)	22(5)
Si(2)	703(11)	525(9)	316(7)	133(6)	3(7)	-81(8)
Si(4)	1092(16)	675(12)	381(9)	165(8)	-21(9)	-243(11)
O(8)	311(16)	278(15)	477(19)	165(14)	-68(14)	-1(13)
O(6)	396(18)	342(16)	314(17)	67(13)	-48(13)	-22(13)
O(1)	434(18)	313(16)	319(16)	161(13)	-68(13)	-12(13)
O(2)	365(17)	321(16)	331(17)	53(13)	-43(13)	15(13)
C(7)	290(20)	253(19)	280(20)	112(16)	60(16)	92(16)
N(1)	285(18)	233(16)	259(17)	66(13)	-8(13)	54(13)
O(4)	285(14)	391(16)	200(13)	117(12)	20(11)	112(12)
N(3)	309(18)	276(17)	217(16)	70(13)	-38(13)	56(14)
C(36)	330(20)	212(18)	237(19)	68(15)	11(16)	18(16)
N(6)	287(18)	266(17)	247(17)	60(13)	12(14)	42(14)
O(5)	302(15)	388(16)	248(14)	9(12)	-17(11)	124(13)
C(6)	340(20)	250(20)	254(19)	107(16)	11(16)	91(16)
C(38)	300(20)	260(20)	225(19)	52(16)	0(16)	72(16)
N(5)	260(18)	230(17)	281(18)	86(14)	-6(14)	39(15)
N(4)	212(16)	271(17)	271(17)	84(14)	9(13)	28(13)
O(3)	457(19)	314(16)	349(16)	128(13)	7(14)	46(14)
N(2)	305(19)	239(17)	370(20)	97(15)	-74(15)	63(15)
C(8)	270(20)	280(20)	210(18)	39(15)	38(15)	88(16)
C(35)	280(20)	261(19)	238(19)	119(15)	-16(15)	67(15)
O(7)	560(20)	550(20)	375(19)	165(16)	14(16)	-4(17)
C(49)	470(30)	450(30)	410(30)	80(20)	0(20)	100(20)
C(37)	320(20)	244(19)	176(17)	44(15)	41(15)	51(16)

C(9)	280(20)	280(20)	224(18)	100(16)	0(15)	55(16)
C(10)	290(20)	300(20)	350(20)	128(18)	26(17)	88(17)
C(39)	270(20)	330(20)	280(20)	100(17)	-5(16)	48(17)
C(11)	300(20)	370(20)	310(20)	107(19)	4(17)	59(18)
C(17)	660(30)	340(20)	390(30)	90(20)	70(20)	60(20)
C(40)	370(20)	320(20)	300(20)	120(18)	-35(18)	40(18)
C(1)	320(20)	257(19)	221(18)	67(15)	-15(16)	50(16)
C(41)	470(30)	290(20)	290(20)	136(17)	-39(19)	-4(19)
C(32)	300(20)	360(20)	243(19)	47(17)	17(16)	16(17)
C(33)	250(20)	390(20)	280(20)	74(18)	2(16)	63(17)
C(16)	1030(50)	240(20)	500(30)	30(20)	-30(30)	110(30)
C(30)	240(19)	280(20)	280(20)	82(16)	-11(16)	46(16)
C(18)	430(30)	690(40)	390(30)	40(30)	-60(20)	120(30)
C(20)	490(30)	480(30)	300(20)	-20(20)	-50(20)	100(20)
C(22)	930(50)	800(50)	510(40)	-230(30)	-300(40)	300(40)
C(12)	320(20)	245(19)	350(20)	108(17)	-53(17)	37(16)
C(3)	240(20)	350(20)	260(20)	17(17)	-8(16)	39(16)
C(2)	340(20)	380(20)	238(19)	89(17)	29(16)	31(18)
C(50)	1060(60)	610(40)	540(40)	140(30)	170(40)	450(40)
C(27)	1000(60)	900(50)	560(40)	350(40)	130(40)	-100(40)
C(19)	420(30)	590(30)	580(40)	110(30)	120(30)	-40(30)
C(21)	960(50)	750(40)	470(30)	200(30)	350(30)	400(40)
C(34)	410(30)	420(30)	390(30)	110(20)	-10(20)	110(20)
C(42)	620(30)	350(30)	420(30)	110(20)	0(20)	50(20)
C(26)	820(50)	710(40)	490(30)	210(30)	140(30)	20(40)
C(5)	360(20)	410(20)	340(20)	121(19)	22(19)	140(19)
C(47)	370(30)	650(40)	570(30)	150(30)	120(20)	20(30)
C(44)	830(50)	480(30)	580(40)	250(30)	-190(30)	-300(30)
C(15)	970(50)	290(30)	610(40)	180(30)	40(30)	-120(30)
C(13)	470(30)	440(30)	510(30)	220(20)	100(20)	80(20)
C(23)	690(40)	520(30)	510(30)	60(30)	50(30)	220(30)
C(14)	620(40)	590(40)	680(40)	310(30)	160(30)	-70(30)
C(52)	640(40)	620(40)	440(30)	30(30)	190(30)	150(30)
C(46)	430(30)	470(30)	630(40)	270(30)	-10(30)	-30(20)
C(28)	860(50)	560(40)	580(40)	90(30)	30(30)	-150(30)
C(24)	2900(160)	1170(70)	350(40)	-140(40)	300(60)	-1170(100)
C(43)	890(50)	300(30)	460(30)	110(20)	-70(30)	10(30)
C(56)	860(50)	1850(90)	1250(70)	1190(70)	690(50)	940(60)
C(54)	1070(60)	1280(70)	890(60)	590(50)	250(50)	830(60)
C(48)	390(30)	670(40)	530(30)	90(30)	-40(20)	210(30)
C(51)	820(50)	650(40)	520(40)	-180(30)	-60(30)	-20(40)
C(25)	1000(70)	2310(130)	1100(70)	1150(90)	140(60)	790(80)
C(53)	1140(60)	800(50)	350(30)	70(30)	-120(30)	-140(40)
C(45)	550(40)	720(40)	840(50)	450(40)	-20(30)	-130(30)
C(4)	290(20)	350(20)	244(19)	76(17)	-11(16)	93(17)
C(58)	1080(70)	1820(110)	850(60)	820(70)	100(50)	-220(70)
C(29)	740(50)	1770(100)	880(60)	760(70)	160(40)	410(60)
C(55)	840(50)	1000(60)	780(50)	520(50)	90(40)	130(40)
C(57)	1610(90)	740(50)	1060(70)	490(50)	-820(70)	-520(60)
O(10)	430(20)	420(20)	780(30)	310(20)	-138(19)	25(16)
C(60)	480(30)	420(30)	770(40)	180(30)	-40(30)	50(20)
C(31)	290(20)	320(20)	310(20)	10(17)	4(17)	75(17)
O(9)	300(30)	480(40)	810(70)	330(40)	20(30)	40(30)

O(9')	450(50)	540(70)	520(70)	320(60)	20(40)	50(40)
C(59)	590(30)	440(30)	560(30)	160(30)	50(30)	50(30)

Table 60: Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for gerda2.

	x	y	z	U(eq)
H(6A)	5182	8618	5248	32
H(35A)	5099	6223	8473	30
H(17A)	8110	12554	6328	56
H(1A)	3423	5935	5010	32
H(32A)	8930	8661	10151	37
H(33A)	10534	7793	8923	37
H(16A)	9414	14164	6074	73
H(30A)	7346	8650	8157	32
H(18A)	-2343	6379	3256	78
H(18B)	-3540	6499	3984	78
H(18C)	-4305	5631	3204	78
H(22A)	-2534	2927	2105	121
H(22B)	-3620	3874	2325	121
H(22C)	-3767	3011	2822	121
H(3A)	-835	7036	4997	35
H(2A)	1184	6253	5808	39
H(2B)	1691	7512	5904	39
H(50A)	9768	12602	10768	104
H(50B)	9177	11662	10012	104
H(50C)	11155	12408	10111	104
H(27A)	7387	10678	2783	124
H(27B)	5269	10632	2568	124
H(27C)	6113	9591	2324	124
H(19A)	-3158	3780	4615	83
H(19B)	-4840	3922	4096	83
H(19C)	-4079	4790	4876	83
H(21A)	431	4261	2191	102
H(21B)	1050	5167	2966	102
H(21C)	-662	5204	2416	102
H(34A)	9283	6088	9064	48
H(34B)	10046	6875	9881	48
H(42A)	1976	2367	7989	56
H(5A)	326	8618	4351	43
H(5B)	1528	8740	5137	43
H(47A)	12931	11313	9193	81
H(47B)	13844	10292	9062	81
H(47C)	14578	11276	9777	81
H(44A)	-2919	669	8294	80
H(15A)	11919	14262	5320	77
H(13A)	11692	11145	5005	54
H(23A)	182	2893	2955	86
H(23B)	-1034	2971	3678	86
H(23C)	824	3810	3722	86
H(14A)	13018	12775	4783	75

H(52A)	9090	11380	11608	86
H(52B)	9988	10355	11497	86
H(52C)	8452	10415	10871	86
H(46A)	-2415	3755	8353	60
H(28A)	7085	11425	4158	107
H(28B)	5605	10835	4617	107
H(28C)	4956	11406	3991	107
H(24A)	3946	7493	2856	259
H(24B)	3283	8012	2200	259
H(24C)	1825	7514	2715	259
H(43A)	142	765	8060	68
H(56A)	2399	6252	10429	162
H(56B)	4057	6708	9982	162
H(56C)	4164	7042	10904	162
H(54A)	7810	4271	9986	141
H(54B)	8117	4559	10906	141
H(54C)	9623	5064	10414	141
H(48A)	13321	8867	10173	79
H(48B)	11976	9064	10846	79
H(48C)	13921	9835	10912	79
H(51A)	12181	12494	11748	111
H(51B)	13557	12291	11088	111
H(51C)	13101	11476	11618	111
H(25A)	1747	10555	3390	192
H(25B)	434	9441	3019	192
H(25C)	1937	9941	2523	192
H(53A)	7400	7641	11396	124
H(53B)	9329	7275	11340	124
H(53C)	7807	6768	11825	124
H(45A)	-4227	2141	8414	83
H(4A)	1011	7009	3802	35
H(58A)	2910	4824	11201	185
H(58B)	4566	5708	11674	185
H(58C)	4908	4559	11270	185
H(29A)	8299	9774	3786	155
H(29B)	6988	8690	3344	155
H(29C)	6764	9199	4230	155
H(57A)	2956	4112	9701	182
H(57B)	4993	3926	9829	182
H(57C)	4570	4654	9274	182
H(60A)	-4692	3325	7182	83
H(60B)	-4637	3445	6314	83
H(60C)	-6092	3928	6854	83
H(31A)	6002	8262	9566	38
H(31B)	6685	9390	9375	38
H(5C)	-690(60)	5580(30)	7320(20)	13(10)
H(2C)	10490(50)	9460(30)	6870(20)	11(9)
H(2D)	10350(60)	8380(40)	7100(30)	22(11)
H(5D)	-920(70)	6390(40)	7070(30)	30(13)
H(10A)	-3950(80)	5120(50)	6910(40)	49(18)

Table 61: Torsion angles [°] for gerda2.

C(47)-Si(3)-O(6)-C(32)	153.7(4)	C(37)-C(36)-C(35)-N(4)	0.2(6)
C(49)-Si(3)-O(6)-C(32)	-85.3(4)	C(38)-N(4)-C(35)-C(36)	2.3(6)
C(48)-Si(3)-O(6)-C(32)	35.1(4)	C(30)-N(4)-C(35)-C(36)	176.8(4)
C(19)-Si(1)-O(2)-C(3)	-103.9(4)	C(55)-Si(4)-O(7)-C(34)	-162.4(5)
C(18)-Si(1)-O(2)-C(3)	16.4(4)	C(53)-Si(4)-O(7)-C(34)	73.7(5)
C(20)-Si(1)-O(2)-C(3)	136.8(4)	C(35)-C(36)-C(37)-N(6)	-2.0(6)
C(10)-C(7)-C(6)-N(1)	176.3(4)	C(39)-C(36)-C(37)-N(6)	176.1(4)
C(8)-C(7)-C(6)-N(1)	0.8(6)	C(8)-N(3)-C(9)-O(1)	-176.8(4)
C(9)-N(1)-C(6)-C(7)	2.6(6)	C(8)-N(3)-C(9)-N(1)	4.2(6)
C(1)-N(1)-C(6)-C(7)	-176.8(4)	C(6)-N(1)-C(9)-O(1)	175.8(4)
C(37)-N(6)-C(38)-O(8)	-179.8(4)	C(1)-N(1)-C(9)-O(1)	-4.8(6)
C(37)-N(6)-C(38)-N(4)	1.2(6)	C(6)-N(1)-C(9)-N(3)	-5.1(6)
O(8)-C(38)-N(4)-C(35)	177.8(4)	C(1)-N(1)-C(9)-N(3)	174.3(3)
N(6)-C(38)-N(4)-C(35)	-3.1(6)	C(6)-C(7)-C(10)-C(11)	-120(17)
O(8)-C(38)-N(4)-C(30)	3.2(5)	C(8)-C(7)-C(10)-C(11)	55(18)
N(6)-C(38)-N(4)-C(30)	-177.7(3)	C(35)-C(36)-C(39)-C(40)	171(3)
C(24)-Si(2)-O(3)-C(5)	-49.0(7)	C(37)-C(36)-C(39)-C(40)	-7(4)
C(26)-Si(2)-O(3)-C(5)	-175.8(4)	C(47)-Si(3)-C(49)-C(51)	-65.5(5)
C(25)-Si(2)-O(3)-C(5)	67.0(6)	C(48)-Si(3)-C(49)-C(51)	56.9(5)
C(9)-N(3)-C(8)-N(2)	179.5(4)	C(38)-N(6)-C(37)-N(5)	-178.0(4)
C(9)-N(3)-C(8)-C(7)	-0.8(6)	C(38)-N(6)-C(37)-C(36)	1.3(6)
C(6)-C(7)-C(8)-N(3)	-1.8(6)	C(35)-C(36)-C(37)-N(5)	177.3(4)
C(10)-C(7)-C(8)-N(3)	-177.3(4)	C(39)-C(36)-C(37)-N(5)	-4.6(6)
C(6)-C(7)-C(8)-N(2)	177.9(4)	C(47)-Si(3)-C(49)-C(52)	175.5(4)
C(10)-C(7)-C(8)-N(2)	2.4(6)	C(48)-Si(3)-C(49)-C(52)	-62.1(5)
C(39)-C(36)-C(35)-N(4)	-177.9(4)	O(6)-Si(3)-C(49)-C(51)	176.8(4)
O(6)-Si(3)-C(49)-C(50)	-63.0(5)	C(48)-Si(3)-C(49)-C(50)	177.1(4)
C(7)-C(10)-C(11)-C(12)	120(17)	O(6)-Si(3)-C(49)-C(52)	57.7(4)
C(36)-C(39)-C(40)-C(41)	-64(42)	C(47)-Si(3)-C(49)-C(50)	54.7(5)
C(4)-O(4)-C(1)-N(1)	-130.3(3)	C(54)-Si(4)-O(7)-C(34)	-47.2(5)
C(4)-O(4)-C(1)-C(2)	-7.3(4)	C(33)-O(5)-C(30)-C(31)	-21.3(4)
C(6)-N(1)-C(1)-O(4)	24.9(5)	C(35)-N(4)-C(30)-O(5)	35.4(5)
C(9)-N(1)-C(1)-O(4)	-154.5(3)	C(38)-N(4)-C(30)-O(5)	-149.9(3)
C(6)-N(1)-C(1)-C(2)	-92.7(4)	C(35)-N(4)-C(30)-C(31)	-81.1(5)
C(9)-N(1)-C(1)-C(2)	87.8(4)	C(38)-N(4)-C(30)-C(31)	93.5(4)
C(39)-C(40)-C(41)-C(42)	-148(41)	O(2)-Si(1)-C(20)-C(23)	54.6(4)
C(39)-C(40)-C(41)-C(46)	33(41)	C(19)-Si(1)-C(20)-C(23)	-62.8(5)
Si(3)-O(6)-C(32)-C(31)	141.4(3)	C(18)-Si(1)-C(20)-C(23)	174.2(4)
Si(3)-O(6)-C(32)-C(33)	-105.8(4)	O(2)-Si(1)-C(20)-C(22)	174.9(4)
C(30)-O(5)-C(33)-C(34)	125.5(4)	C(19)-Si(1)-C(20)-C(22)	57.6(5)
C(30)-O(5)-C(33)-C(32)	-0.1(4)	C(18)-Si(1)-C(20)-C(22)	-65.4(5)
O(6)-C(32)-C(33)-O(5)	-96.2(4)	O(2)-Si(1)-C(20)-C(21)	-64.6(4)
C(31)-C(32)-C(33)-O(5)	21.1(4)	C(19)-Si(1)-C(20)-C(21)	178.1(4)
O(6)-C(32)-C(33)-C(34)	142.4(4)	C(18)-Si(1)-C(20)-C(21)	55.1(5)
C(31)-C(32)-C(33)-C(34)	-100.3(4)	O(3)-Si(2)-C(26)-C(27)	-172.6(5)
C(12)-C(17)-C(16)-C(15)	-0.8(9)	C(24)-Si(2)-C(26)-C(27)	61.3(8)
C(33)-O(5)-C(30)-N(4)	-142.7(3)	C(25)-Si(2)-C(26)-C(27)	-55.5(7)
		O(3)-Si(2)-C(26)-C(29)	66.4(6)
		C(24)-Si(2)-C(26)-C(29)	-59.7(7)
		C(25)-Si(2)-C(26)-C(29)	-176.5(6)
		O(3)-Si(2)-C(26)-C(28)	-51.0(5)

C(24)-Si(2)-C(26)-C(28)	-177.1(6)	Si(2)-O(3)-C(5)-C(4)	72.0(5)
C(25)-Si(2)-C(26)-C(28)	66.2(6)	C(17)-C(16)-C(15)-C(14)	1.5(10)
C(16)-C(17)-C(12)-C(13)	-0.7(8)	Si(4)-O(7)-C(34)-C(33)	-148.6(3)
O(5)-C(33)-C(34)-O(7)	-65.1(5)	C(40)-C(41)-C(46)-C(45)	177.9(5)
C(45)-C(44)-C(43)-C(42)	1.0(9)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-0.8(9)
C(42)-C(41)-C(46)-C(45)	-1.3(8)	C(40)-C(41)-C(42)-C(43)	-178.1(5)
C(17)-C(12)-C(13)-C(14)	1.5(8)	C(41)-C(42)-C(43)-C(44)	-1.0(8)
C(32)-C(33)-C(34)-O(7)	54.7(5)	C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	-38.6(4)
O(4)-C(1)-C(2)-C(3)	29.2(4)	C(46)-C(41)-C(42)-C(43)	1.1(8)
Si(1)-O(2)-C(3)-C(2)	157.7(3)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	179.1(5)
C(16)-C(15)-C(14)-C(13)	-0.8(10)	Si(1)-O(2)-C(3)-C(4)	-91.9(4)
O(2)-C(3)-C(2)-C(1)	78.1(4)	C(16)-C(17)-C(12)-C(11)	-178.3(5)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-101(8)	O(7)-Si(4)-C(55)-C(58)	-173.3(7)
C(10)-C(11)-C(12)-C(17)	77(8)	C(53)-Si(4)-C(55)-C(58)	-52.9(9)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	147.7(3)	C(54)-Si(4)-C(55)-C(58)	67.6(8)
C(43)-C(44)-C(45)-C(46)	-1.2(10)	O(7)-Si(4)-C(55)-C(56)	-55.4(6)
C(41)-C(46)-C(45)-C(44)	1.4(10)	C(53)-Si(4)-C(55)-C(56)	65.0(6)
C(1)-O(4)-C(4)-C(3)	-17.7(4)	C(54)-Si(4)-C(55)-C(56)	-174.5(5)
C(1)-O(4)-C(4)-C(5)	105.0(4)	O(7)-Si(4)-C(55)-C(57)	69.5(5)
O(2)-C(3)-C(4)-O(4)	-79.6(4)	C(53)-Si(4)-C(55)-C(57)	-170.2(5)
C(2)-C(3)-C(4)-O(4)	35.1(4)	C(54)-Si(4)-C(55)-C(57)	-49.6(6)
O(2)-C(3)-C(4)-C(5)	158.5(3)	O(5)-C(30)-C(31)-C(32)	33.8(4)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-86.7(4)	N(4)-C(30)-C(31)-C(32)	51.1(3)
O(3)-C(5)-C(4)-O(4)	44.2(5)	O(6)-C(32)-C(31)-C(30)	84.6(4)
O(3)-C(5)-C(4)-C(3)	162.0(3)	C(33)-C(32)-C(31)-C(30)	-32.7(4)

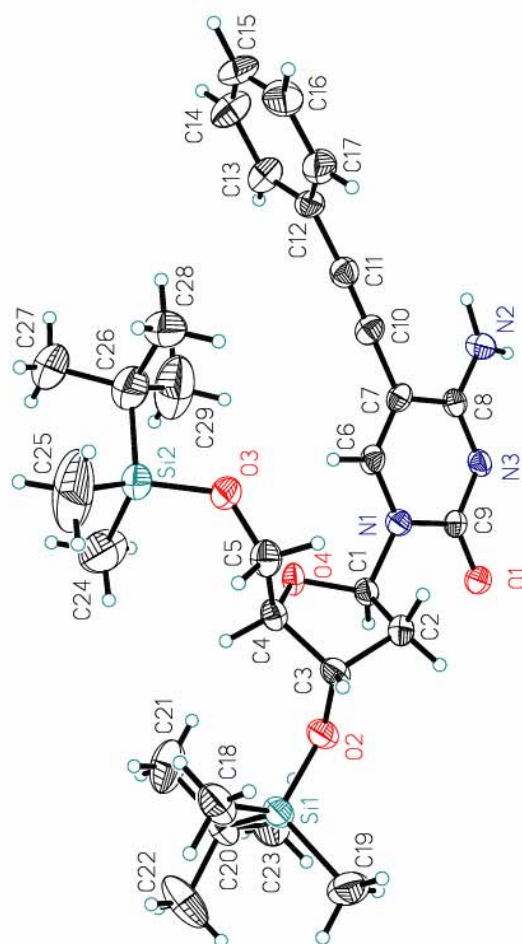


Abb. 62: Eines der Konformeren von 5-(Phenylethynyl)-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin

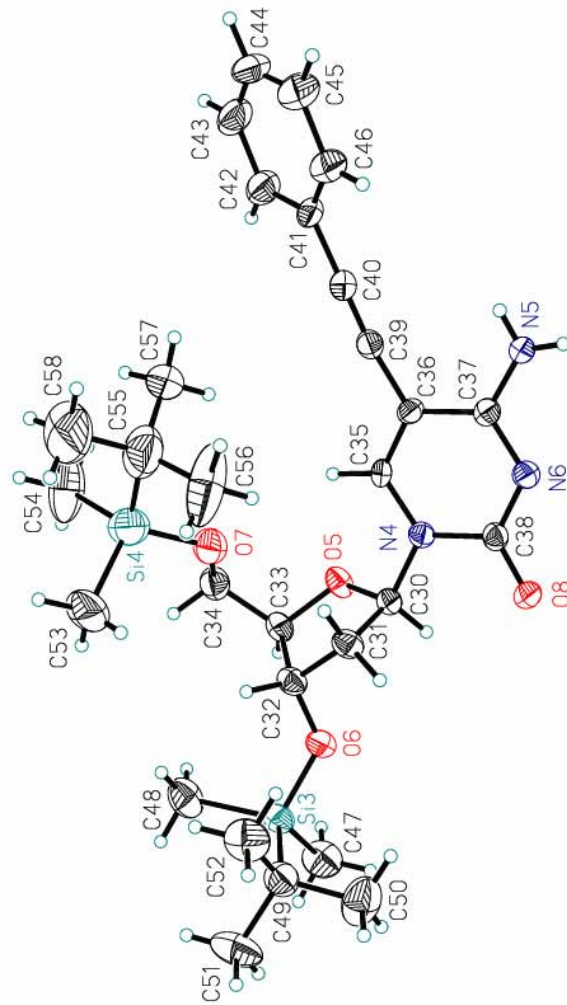
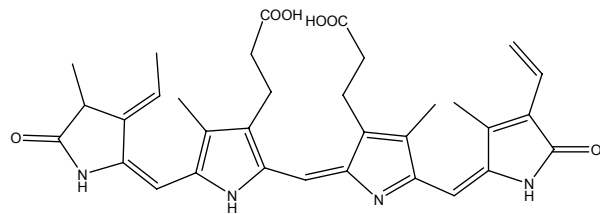


Abb. 63: Das andere Konformer von 5-(Phenylethynyl)-3',5'-di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin

8.7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AG	Abgangsgruppe
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin, ein Pigment, das bei Blau- und Rotalgen an der Photosynthese beteiligt ist. Es ist ein 80 kDa Protein mit einem Phycocyanin ähnlichem Farbstoff:



(Phycocyanin)

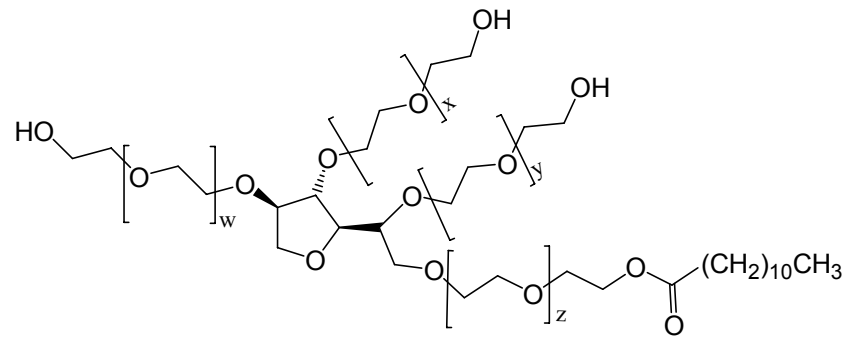
	APC kann mit einem roten Laser (633 nm) angeregt werden. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 650 nm, sein Emissionsmaximum bei 660 nm.
APC-Cy7	APC-Cy7 kann mit einem roten Laser (633 nm) angeregt werden. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 650 nm, sein Emissionsmaximum bei 785 nm.
ATCC	<i>american type culture collection</i>
BALB/c	Ein Albino Mäusestamm, der seit 1923 gezüchtet wurde mit mehr als 200 Generationen. Diese Labormäuse werden häufig eingesetzt, sie eignen sich besonders gut zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern
Bz	Benzoyl
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLR	<i>C-type lectin-(like) receptors</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> , Korrelationsspektroskopie
CpG	5'-(2'-Desoxycytidin)-3'-phosphat-(2' desoxyguanosin)
Cy-7	ein Fluoreszenzfarbstoff, er bei 767 nm Licht emittiert
d	Dichte; 2'-desoxy; Tag (<i>day</i>); Duplett
Δ	Refluxieren

δ	Chemische Verschiebung
<i>DAI</i>	<i>DNA-dependent activator of interferone regulatory factors</i>
df	Freiheitsgrade
DFI	4,6-Difluorimidazol-2'-desoxyribosyl
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	2'-Desoxynukleinsäure
DOWEX 50W-8	Ein Ionenaustauscher, der aus einer Styroldivinylbenzolmatrix mit Sulfonsäure-Gruppen besteht
dsmz	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E. A.	Elementaranalyse
<i>ECACC</i>	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EtOAc	Essigsäureethylester
<i>ELISA</i>	<i>enzyme linked immunosorbend array</i>
<i>ESI-MS</i>	<i>electrone spray ionisation mass spectroscopy</i>
<i>FACS</i>	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , zytometrischer Zellsortierer
<i>FCS</i>	<i>fetal calf serum</i> , fötales Rinderserum
Ficoll	ist ein neutrales, hochverzweigtes Polysaccharid, das Bestandteil des Histopaques ist
G	Guanosin
g	Gramm
<i>G-CSF</i>	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
<i>GM-CSF</i>	<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
<i>h</i>	Stunden, humaner
<i>HEK</i>	<i>human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzelle
Histopaque	eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, die auf eine Dichte von 1,077±0,001g/ml eingestellt ist und der Isolierung mononukleärer Zellen dient
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
<i>HRP</i>	<i>horseradish peroxidase</i> , Merrettischperoxidase

<i>HSP</i>	<i>heat shock protein</i> , ein Proteinfaltungshelfer
<i>HSQC</i>	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin, Antikörper
<i>IκB</i>	<i>inhibitor of NFκB</i>
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
L	Liter, Ligand
<i>LC-MS</i>	<i>liquid chromatography-mass spectroscopy</i>
lit.	Literaturreferenz
LPS	Lipopolysaccharid, Bestandteil von Bakterienzellwänden
<i>LRR</i>	<i>Leucin-reiche Wiederholungen</i>
m	milli, von einer Maus stammend, Multiplett, <i>messenger</i>
μ	mikro
Ma	Makrophagen
<i>MALDI</i>	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
<i>MAP</i>	<i>mitogen activated protein</i>
<i>MAPK</i>	<i>mitogen activated protein kinase</i>
<i>MCP</i>	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
<i>MDA</i>	<i>melanoma differentiation associated gene</i>
min	Minuten
Mio	Millionen
<i>MHC</i>	<i>major histocompatibility complex</i>
MHz	Megahertz
MS	Massenspektroskopie, mittlere Quadratsumme
<i>MyD</i>	<i>myeloid differentiation factor</i>
n	Brechungsindex
<i>NFκB</i>	nuklearer Faktor κB
<i>NHL</i>	<i>non-Hodgkin-Lymphom</i>

<i>NSCLC</i>	<i>non-small cell lung carcinoma</i>
NK	Natürliche Killer-Zelle
<i>NLR</i>	<i>NOD-like-rezeptors</i>
NOD	nukleotid Bindungsdomäne
Nuc	Nukleophil
ODN	Oligodesoxynukleotid
<i>PAMP</i>	<i>pathogene associated molecular pattern</i> , Fremdkörperassoziertes molekulares Muster
<i>PBMC</i>	periphere mononukleare Blutzellen: Blutzellen mit rundem Zellkern: T-, B-, NK-Zellen, Monozyten
<i>PBS</i>	<i>phosphate buffered saline</i> , ein Puffer bestehend aus 8.00g NaCl, 0.20g KCl, 2,85g Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O und 0.20g KH ₂ PO ₄
<i>pDC</i>	plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin, ein akzessorisches Pigment von Blau- und Rotalgen, das als roter Fluoreszenzfarbstoff dient, der Farbstoff ist abgeleitet von Phycocyanin. Es kann mit einem blauen Laser (488 nm) angeregt werden. Seine Absorptionsmaxima liegen bei 496 und 564 nm, sein Emissionsmaximum bei 578 nm.
pg	10 ⁻¹² g
PIC	Poly (Inosin : Cytidin)
PO	Phosphat verbrückt
<i>ppm</i>	<i>parts per million</i>
<i>PRR</i>	<i>pattern recognition receptor</i>
PS	Thiophosphat verbrückt
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
RPMI 1640	ist ein Zellkulturmedium bestehend aus einem Hydrogencarbonat-Puffer, Glukose, Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und Phenolrot als Indikator.
q	Quartett
r	ribosomal
<i>RIG</i>	<i>retinoic acid inducible gene</i>
<i>RP</i>	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase, alkyliertes Kieselgel
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
s	Singulett, Sekunde
SG	Schutzgruppe
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
S _N	nukleophile Substitution
SR	<i>scavenger receptor</i>
SS	Quadratsumme
SU	Streuungsursache
T	Thymidin
t	Triplett, <i>transfer</i>
TAB	TAK1 Bindungsprotein
TAK	<i>tumor growth factor β activated protein kinase</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBK	<i>TRAF family associated NFκB activator binding kinase</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIPDS	1,1,3,3-Tetra-(<i>iso</i> -propyl)-di-siloxan, Markiewicz-Schutzgruppe
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAB	Toll/IR-1 receptor domain containing adaptor protein inducing IFN-β
Th	T-Helfer
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMS-Tf	Trimethylsilyltrifluormethansäureester
TNF	Tumornekrosefaktor
Tol	Toluoyl, CH ₃ -C ₆ H ₄ -C=O
TRAF	Tumornekrosefaktor Rezeptor assoziierter Faktor
TRAM	<i>TRIF related adapter molecule</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, (HOCH ₂) ₃ CNH ₂
Tween 20	Poly-(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester, ein nichtionisches Tensid der Struktur mit w+x+y+z=20



Auch bekannt als E432, es wird als Feststoffstabilisator, Emulgator, Lösungsvermittler und in der Molekularbiologie zum Waschen eingesetzt.

U

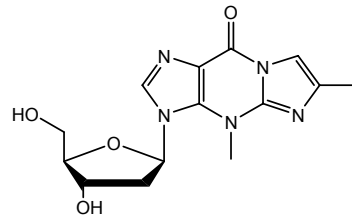
Uridin

UBC

Ubiquitin konjugiertes Enzym

UEVIA

Ubiquitin konjugiertes Enzyme E2 Variante 1



2'-Desoxyuridine

z. B.

zum Beispiel

ZBP

Z-DNA Bindungsprotein

8.8 Literaturverzeichnis

Agrawal, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1489, 1, 53-68, Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides

Agrawal, S., Kandimalla, E. R., *TRENDS in Molecular Medicine*, **2002**, 8, 3, 114-120

Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y., *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 1875-1916, Palladium-Assisted Routes to Nucleosides

Akira, S.; Takeda, K., *Nature Reviews Immunology*, **2004**, 4, 7, 499-511, Toll-like receptor signaling

Albitar, M., *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, **2007**, Humana Press

Amann, N.; Pandurski, E.; Fiebig, T.; Wagenknecht, H.-A., *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 16, 3084-3087, Ein Modellnucleosid für die Elektroneninjektion in die DNA: 5-Pyrenyl-2'-desoxyribose

Andresen, G.; Gundersen, L.-L.; Lundmark, M.; Rise, F.; Sundell, S., *Tetrahedron*, **1995**, 51, 12, 2655-3664, Regioselective Addition of Grignard Reagents to a 2-Oxopurinium Salt

Ashman, R. R.; Goeken, J. A.; Drahos, J.; Lenert, P., *International Immunology*, **2005**, 17, 4, 411-420, Sequence requirements for oligodeoxyribonucleotide inhibitory activity

Ashton, P. R. et al., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 19, 3558-3574, Molecular Meccano, Part 61. A Photochemically Driven Molecular-Level Abacus

Basu, S.; Fenton, M. J., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **2004**, 286, L887-L892, Toll-like receptors: function and roles in lung disease

Bell, J. K.; Botos, I.; Hall, P. R.; Askins, J.; Shiloach, J.; Davies, D. R.; Segal, D. M., *Journal of Endotoxin Research*, **2006**, 12, 6, 375-378, The molecular structure of the TLR3 extracellular domain

Bendich, A.; Tinker, J. F.; Brown, G. B., *Journal of the American Chemical Society*, **1948**, 70, 3109-3113, A Synthesis of *Iso*-guanine Labeled with Isotopic Nitrogen

Berressem, R.; Engels, J. W., *Nucleic Acids Research*, **1995**, 23, 17, 3465-3472, 6-Oxocytidine - A novel protonated C-base analogue for stable triple helix formation

Beutler, B., *Nature*, **2004**, 430, 257-263, Interferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling

Brandenburg, G.; Petersen, G. V.; Rasmussen, K.; Wengel, J., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1995**, 5, 8, 791-794, Branched oligodeoxynucleotides: A new synthetic strategy and formation of strong intra- and intermolecular triple helical complexes

Broenštejn, I. N.; Semendjajew, K. A.; Musiol, G.; Mühlig, H., *Taschenbuch der Mathematik*, **1997**, 3. Auflage, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt a. M.

Chang, P. K.; Welch, A. D., *J. Med. Chem*, **1963**, 122, 428-430, Iodination of 2'-Deoxycytidine and Related Substances

Chen, W.; Lee, R. K.; Patel, G. B., *Expert Opin. Ther. Patents*, **2005**, 15, 7, 789-799, Therapeutic potential of microbes and microbial products in the management of human allergic asthma

Chin, T.-M.; Huang, L.-K.; Kan, L.-S., *Journal of the Chinese Chemical Society*, **1997**, 44, 413-416, Improved Syntheses of Halofuranose Derivatives with the Desired α -Configuration

Dahl, B. H.; Nielsen, J.; Dahl, O., *Nucleic Acids Res.*, **1978**, 15, 1729-1743, Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophile catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents

Dalpke, A. H.; Heeg, K., *International Journal of Medical Microbiology*, **2004**, 294, 345-354, CpG-DNA as immune response modifier

De Jager, W.; Te Velthuis, H.; Prakken, B. J.; Kuis, W.; Rijkers, G. T., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2003**, 10,1,133-139, Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells

Dellinger, D. J.; Dellinger, G. F.; Caruthers, M. H., *US Patent Nr.20080206850*, **2008**, Methods and compositions for dna synthesis

Ebuer, S.; Ehammer, Z.; Holzmann, S.; Schwingshackl, P.; Forstner, M.; Stoitzer, P.; Huemer, G. M.; Fritsch, P.; Romani, N., *Int. Immunol.*, 2004, 16, 6, 877-887, Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin

Elliott, W. H.; Elliot, D. C., *Biochemistry and Molecular Biology*, **2001**, 2nd Edition, Oxford University Press, New York

Engels, J. W.; Uhlmann, E., Chemistry of oligonucleotides. In: *Pharmaceutical aspects of oligonucleotides*, Cowreur, P.; Malvy, C.; Taylor & Francis, London, **2000**, 35-78

Engels, J. W.; Uhlmann, E., Chemistry of oligonucleotides. In: *Pharmaceutical aspects of oligonucleotides*, Cowreur, P.; Malvy, C.; Taylor & Francis, London, **2000**, 35-78

Falbe, J.; Regitz, M., *RÖMPP kompakt - Basislexikon Chemie*, **1998**, Thieme Verlag, Stuttgart

Faller, A., *Der Körper des Menschen*, **2004**, Thieme Verlag, Stuttgart

Garcia-Munoz, G.; Ochoa, C.; Stud, M., *J. Heterocyclic Chem.*, **1977**, 14, 431-433, Oxidation Reactions of 3,4,5-Triamino-1,2,6-thiadiazine-1,1-Dioxide. Preparation of 3,5-Diamino-4H-1,2,6-thiadiazin-4-one 1,1-Dioxide

Goldsby, R. A.; Kindt, T. J.; Osborne, B. A.; Kuby, J., *Immunology*, **2003**, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, New York

Gosh, T. J.; Mickelson, D. J.; Solberg, J. C.; Lipson, K. E.; Inglefield, J. R.; Alkan, S. S., *Int. Immunopharmacol.*, **2007**, 7, 1111-1121 TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF- α

Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 21, 7512-7515,
NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities

Gursel, I.; Gursel, M.; Yamada, H.; Ishii, K. J.; Takeshita, F.; Klinman, D. M., *The Journal of Immunology*, **2003**, 171, 1393-1400, Repetitive Elements in Mammalian Telomeres Suppress Bacterial DNA-Induced Immune Activation

Hartmann, G.; Krieg, A. M., *Journal of Immunology*, **2000**, 164, 944-952, Mechanism and Function of a Newly Identified CpG DNA Motif in Human Primary B Cells

Haas, T.; Metzger, J.; Schmitz, F.; Heit, A.; Müller, T.; Latz, E.; Wagner, H., *Immunity*, **2008**, 28, 315-323, The DNA Sugar Backbone 2'-Deoxyribose Determines Toll-like Receptor 9 Activation

Hawkins, B. C.; Keller, P. A.; Pyne, S. G., *Tetr. Lett.*, **2002**, 43, 3, 507-510, Reductive ring opening reactions of diphenyldihydrofullerenylpyrroles

Heckelsmiller, K., *Dissertation*, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians Universität, München, **2003**, CpG-Oligonukleotid-basierte Immuntherapie von experimentellen Kolontumoren: Synergistischer Effekt von Dendritischen Zellen und CpG-Oligonukleotiden

Heikenwalder, M.; Polymenidou, M.; Junt, T.; Sigurdson, C.; Wagner, H.; Akira, S.; Zinkernagel, R.; Aguzzi, A., *Nature Medicine*, **2004**, 10, 2, 187-192, Lymphoid destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration

Heil, F.; Hemmi, H.; Hochrein, H.; Ampenberger, F.; Kirschning, C.; Akira, S.; Lipford, G.; Wagner, H.; Bauer, S., *Science*, **2004**, 303, 1526-1529, Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8

Hemmi, H. et al.; *Nature*, **2000**, 408, 740-745, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA

Henault, M.; Lee, L. N.; Evans, G. F.; Zuckerman, S. H., *Journal of Immunological Methods*, **2005**, 300, 93-99, The human Burkitt lymphoma cell line Namalwa represents a homogenous cell system characterized by high levels of Toll-like receptor 9 and activation by CpG oligonucleotides

Ho, P. P.; Fontoura, P.; Ruiz, P. J.; Steinman, L.; Garren, H., *The Journal of Immunology*, **2003**, 171, 4920-4926, An Immunomodulatory GpG Oligonucleotide for the Treatment of Autoimmunity via the Innate and Adaptive Immune System

Holleman, A. F.; Wiberg, E., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, **1995**, Walter de Gruyter, Berlin

Hornung, V.; Rothenfusser, S.; Britsch, S.; Krug, A.; Jahrsdörfer, B.; Giese, T.; Endres, S.; Hartmann, G., *The Journal of Immunology*, **2002**, 168, 4531-4537, Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides

Iliev, I. D.; Kitazawa, H.; Shimosato, T.; Katoh, S.; Morita, H.; He, F.; Hosoda, M.; Saito, T., *Cellular Microbiology*, **2005**, 7, 3, 403-414, Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern

Ivanov, S. et al., *Blood*, **2007**, 110, 6, 4531-4537, A novel role for HMB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA

Jurk, M.; Schulte, B.; Kritzler, A.; Noll, B.; Uhlmann, E.; Wader, T.; Schetter, C.; Krieg, A. M.; Vollmer, J., *Immunobiology*, **2004**, 209, 141-154, C-Class CpG ODN: sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level

Jurk, M.; Kritzler, A.; Debelak, H.; Vollmer, J.; Krieg, A. M.; Uhlmann, E., *Chem. Med. Chem.*, **2006**, 1, 9, 1007-1014, Structure-Activity Relationship Studies on the Immune Stimulatory Effects of Base-Modified CpG Toll-Like Receptor 9 Agonists

Kandimalla, E. R.; Bhagat, L.; Wang, D.; Yu, D.; Zhu, F.-G.; Tang, J.; Wang, H.; Huang, P.; Zhang, R.; Agrawal, S., *Nucleic Acids Research*, **2003**, 31, 9, 2393-2400, Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles

Kandimalla, E. R. et al., *PNAS*, **2003**, 100, 24, 14303-14308, A dinucleotide motif in oligonucleotides shows potent immunomodulatory activity and overrides species-specific recognition observed with CpG motif

- Kandimalla, E. R.; Zhu, F.-G.; Bhagat, L.; Yu, D.; Agrawal, S., *Biochemical Society Transactions*, **2003**, 31, 3, 654-658, Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs
- Kingsmore, S. F., *Nature Reviews Drug Discovery*, **2006**, 5, 310-320, Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays
- Kerkmann, M.; Rothenfusser, S.; Hornung, V.; Towarowski, A.; Waeper, M.; Sarris, A.; Giese, T.; Endres, S.; Hartmann, G., *J. Immunol.*, **2003**, 170, 4465-4474, Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells
- Kerkmann, M. et al, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 9, 8086-8093, Spontaneous Formation of Nucleic Acid-based Nanoparticles I Responsible for High Interferon- α Induction by CpG-A in plasmacytoid Dendritic Cells
- Kocienski, P. J., *Protecting Groups*, **1994**, Thieme Verlag, Stuttgart
- Krieg, A. M., *Nature Reviews*, **2006**, 471-484, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation
- Krieg, A. M., *The Journal of Clinical Investigation*, **2007**, 117, 5, 1184-1194, Development of TLR9 agonists for cancer therapy
- Krieg, A. M.; Yi, A.-K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M., *Nature*, **1995**, 374, 546-549, CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation
- Krieger, M., *Curr. Opin Lipidol.*, **1997**, 8, 5, 275- 280 (Abstract), The other side of Scavenger receptors: pattern recognition for host defense
- Laue, T.; Plagens, A., *Namen-und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*, **1998**, Teubner Verlag, Stuttgart
- Liang, H.; Nishioka, Y.; Reich, C. F.; Pisetsky, D. S.; Lipsky, P. E., *J. Clin. Invest.*, **1996**, 98, 5, 1119-1129, Activation of Human B Cells by Phosphorothioate Oligodesoxynucleotides

Lipford, G. B.; Sparwasser, T.; Bauer, M.; Zimmermann, S.; Koch, E.-S.; Heeg, K.; Wagner, H., *Eur. J. Immunol.*, **1997**, 27, 3420-3426, Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines

Lottenspeich, F.; Engels, J. W., *Bioanalytik*, **2006**, 2.Auflage, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München

Magnusson, M.; Tobes, R.; Sancho, J.; Pareja, E., *Journal of Immunology*, **2007**, 179, 31-35, Cutting Edge : Natural DNA Repetitive Extragenic Sequences from Fram-Negative Pathogens Strongly Stimulate TLR9

Markiewicz, W.T., *Journal of Chemical Research (Miniprint)*, **1979**, 0182-0190, Tetraiso-propylidisiloxane-1,3-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'- and 5'-Hydroxyl Functions of Nucleosides

Marshall, J. D.; Hessel, E. M.; Gregorio, J.; Abbate, C.; Priscilla, Y.; Chu, M.; Nest, G. V.; Coffman, R. L.; Fearon, K. L., *Nucleic Acids Research*, **2003**, 31, 17, 5122-5133, Novel chimeric immunomodulatory compounds containing short CpG oligodeoxyribonucleotides have differential activities in human cells

McBride, J.; Kierzek, R.; Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H., *Journal of the American Chemical Society*, **1986**, 108, 2040-2048, Amidine Protecting Groups for Oligonucleotide Synthesis

McCarthy, E. F., *Iowa Orthop. J.*, **2006**, 26, 154-158, The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas

Medzhitov, R., *Nature*, **2007**, 449, 819-826, Recognition of microorganisms and activation of the immune response

Merlo, A.; Calcaterra, C.; Menard, S.; Balsari, A., *Journal of Leukocyte Biology*, **2007**, 82, 509-518, Cross-talk between Toll-like receptors 5 and 9 on activation of human immune responses

Mutwiri, G. K.; Nichani, A. K.; Babiuk, S.; Babiuk, L. A., *Journal of Controlled Release*, **2004**, 97, 1-17, Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides

Nishikawa, M.; Matono, M.; Rattanakit, S.; Matsuoka, N.; Takakura, Y., *Immunology*, **2008**, 124, 247-255, Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation

Ogilvie, K. K., *Can. J. Chem.*, **1973**, 51, 3799-3807, The *tert*-Butyldimethylsilyl Group as a Protecting Group in Deoxynucleosides

Okamoto, A.; Inasaki, T.; Saito, I., *Tetr. Lett.*, **2005**, 46, 791-795, Synthesis and ESR studies of nitronyl nitroxide-tethered oligodesoxynucleotides

Parsch, U. *Doktorarbeit*, Frankfurt, **1999**, 6-Oxocytidin – ein Baustein für die pH-unabhängige Tripelhelix-Bildung

Pisetsky, D. S.; Wenk, K. S.; Reich, C. F., *Clinical Immunology*, **2001**, 100, 157-163, The role of CpG sequences in the induction of anti DNA antibodies

Piton, N., *Dissertation*, **2006**, Frankfurt a.M., Fachbereich Biochemie, Chemie u. Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Robins, M. J.; Wilson, J. S.; Hansske, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4059-4065, Nucleic Acid Related Compounds. 42. A General Procedure for the Efficient Deoxygenation of Secondary Alcohols. Regiospecific and Stereoselective Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleotides

Rodriguez, J. M.; Elías, F.; Fló, J.; López, R. A.; Zorzopulos, J.; Montaner, A. D., *Oligonucleotides*, **2006**, 16, 275-285, Immunostimulatory PyNTTTTGT Oligodeoxynucleotides: Structural Properties and Refinement of the Active Motif

Sen, G.; Flora, M.; Chattopadhyay, G.; Klinman, D. M.; Lees, A.; Mond, J. J.; Snapper, C. M., *Cellular Immunology*, **2004**, 232, 1-2, 64-74, The critical DNA flanking sequences of a

CpG oligodeoxynucleotide, but not the 6 base CpG motif, can be replaced with RNA without quantitative or qualitative changes in Toll-like receptor 9-mediated activity

Sessler, J. L.; Wang, B.; Harriman, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 2, 706-714,
Photoinduced energy transfer is associated, but noncovalently-linked photosynthetic model systems

Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N.; *Tetrahedron Letters*, **1975**, 50, 4467-4470, A
convenient Synthesis of Ethines: Catalytic Substitution of acetylenic Hydrogen with
Bromalkenes, Iodarenes, and Bromopyridines

Thrane, H.; Fensholdt, J.; Regner, M.; Wengel, J., *Tetrahedron*, **1995**, 51, 37, 10389-10402,
Novel Linear and Branched Oligodeoxynucleotide Analogues Containing 4'-C-
(Hydroxymethyl)-thymidine

Tokunaga et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1984**, 72, 4, 955-962, Antitumoractivity of
deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical
characterization, and antitumor activity

Ueno, Y.; Takeba, M.; Mikawa, M.; Matsuda, A., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 1211-1217,
Nucleosides and Nucleotides. 182. Synthesis of Branched Oligodeoxynucleotides with
Pentaerythritol at the Branch Point and Their Thermal Stabilization of Triplex Formation

Van Boeckel, C. A. A.; Van Boom, J. H., *Tetrahedron Letters*, **1985**, 41, 4545-4557,
Synthesis of phosphatidyl- α -glucosylglycerol containing a dioleoyl phosphatidyl moiety.
Application of the tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl (TIPDS) protecting group in sugar
chemistry

Varro, R.; Chen, R.; Sepulveda, H.; Apar, J., *Methods in Molecular Biology*, **2007**, 378, 125-
152, Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols; Bead-Based Multianalyte Flow
Immunoassays; The Cytometric Bead Array System

Verdegaal, C. H. M.; Jansse, P. L.; de Rooij, J. F. M. ; van Boom, J. H., *Tetrahedron Letters*,
1980, 21, 1571-1574, Acid-catalysed isomerization of the tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl
group, simultaneous protection of two secondary alcoholic functions

Verthelyi, D.; Ishii, K. J.; Gursel, M.; Takeshita, F.; Klinman, D. M., *The Journal of Immunology*, **2001**, 166, 2372-2377, Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs

Vollmer, J. et al., *Eur. J. Immunol.*, **2004**, 34, 251-262, Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities

Vollmer, J.; Weeratna, R. D.; Jurk, M.; Samulowitz, U.; McCluskie, M. J.; Payette, P.; Davis, H. L.; Schetter, C.; Krieg, A., M., *Immunology*, **2004**, 113, 212-223, Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation

Vollmer, J.; Rankin, R.; Hartmann, H.; Jurk, M.; Samulowitz, U.; Wader, T.; Janosch, A.; Schetter, C.; Krieg, A. M., *Antimicrobial Agents & Chemother.*, **2004**, 2314-2317, Immunopharmacology of CpG Oligodeoxynucleotides and Ribavirin

Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C., *Handbook of Nucleoside Synthesis*, **2001**, John Wiley & Sons Inc., USA

Vu, H.; McCollum, C.; Jacobson, K.; Theisen, P.; Vinayak, R.; Spiess, E.; Andrus, A., *Tetr. Lett.*, **1990**, 31, 50, 7269-7272, Fast Oligonucleotide Deprotection Phosphoramidite Chemistry For DNA Synthesis

Wittel, G., *Diplomarbeit*, Frankfurt, **2004**, Beiträge zur Synthese von 6-Oxocytidinphosphoramidit als Baustein für CpG-Oligodesoxynukleotide

Wittel, G.; Bats, J. W.; Engels, J. W., *Acta Cryst.*, **2007**, E63, o2657-o2659, 3',5'-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-deoxycytidine

Yamada, H.; Gursel, I.; Takeshita, F.; Conover, J.; Ishii, K. J.; Gursel, M.; Takeshita, S.; Klinman, D. M., *The Journal of Immunology*, **2002**, 169, 5590-5594, Effect of Suppressive DNA on CpG-Induced Immune Activation

Yamamoto, S.; Yamamoto, T.; Kuramoto, E.; Yano, O.; Kataoken, T.; Tokunaga, T., *Microbiol. Immunol.*, **1992**, 36, 9, 985-997, DNA from bacteria, but not from vertebrates induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth

Yasuda, K.; Wagner, H.; Takakura, Y., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **2006**, 23, 2, 89-109, Role of Immunostimulatory DNA and TLR9 in Gene Therapy

Yoneyama, M.; Fujita, T., *Nature Immunology*, **2007**, 8, 9, 907-908, Cytoplasmic double-stranded DNA sensor

Yu, D.; Kandimalla, E. R.; Bhagat, L.; Tang, J.-Y.; Cong, Y.; Tang, J.; Agrawal, S., *Nucleic Acids Research*, **2002**, 30, 20, 4460-4469, 'Immunomers' - novel 3'-3'-linked CpG oligodeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents

Yu, D.; Zhu, F.-G.; Bhagat, L.; Wang, H.; Kandimalla, E. R.; Zhang, R.; Agrawal, S., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**, 297, 83-90, Potent CpG oligonucleotides containing phosphodiester linkages: in vitro and in vivo immunostimulatory properties

Zemlicka, J., *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **1963**, 28, 1060-1062, Reactions of Dimethylformamide Acetals with some Heterocyclic Systems

Zemlicka, J.; Holy, A., *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **1967**, 32, 3159-3168, Preparation of *N*-Dimethylaminomethylene Derivatives - A New Method of a Selective Substitution of Nucleoside Amino Groups

Zheng, N.; Armstrong, J. D. III; Lynch, J.; Hartner, F. W.; Volante, R. P., *Tetr. Asym*, **2003**, 14, 3435-3446, A convergent asymmetric synthesis of a growth hormone secretagogue

http://www.lonza.com/group/en/products_services/products/catalog_new.ParSys.0007.File=0.1tmp?path=eshop/instructions/Research%20Products/Media_and_seraclassical_Media_Sera_and_Reagents/EMEM.pdf

Lonza

Lonza Walkersville, Inc.
www.lonza.com
blotechserv@lonza.com
Tech Service: 800-621-0390
Document # TS 06-174-1 06/07
Walkersville, MD 21793-0127 USA
© 2007 Lonza Walkersville, Inc.

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)

Product Use

Eagle's M Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) was developed in 1959 for cultivation of HeLa and L cells. Amino acid concentrations conform closely to the protein composition of human cells. Higher concentrations of nutrients permit longer periods between feedings. EMEM has vitamin concentrations 2-5X greater than BME and higher amino acid concentrations than BME. EMEM is suitable for culturing a broad spectrum of mammalian cells.

Formula

<http://www.lonzabioscience.com/Content/Documents/Bioscience/Minimum%20Essential%20Media.pdf>

EMEM Liquid

06-174	with Earle's BSS, with nonessential Amino Acids and L-glutamine, without Calcium
12-125	with Earle's BSS, without L-glutamine
12-127	with Hank's BSS, without L-glutamine
12-136	with 25 mM HEPES buffer without L-glutamine, with Earle's BSS
12-137	with Hank's BSS, with 25 mM HEPES buffer, without L-glutamine
12-611	with Earle's BSS, with L-glutamine
12-662	with Earle's BSS, with nonessential Amino Acids and Sodium Pyruvate, without L-glutamine
12-668	2X with Earle's BSS, without L-glutamine or Phenol Red (virus plaquing medium)
12-684	10X With Earle's BSS, without sodium bicarbonate (NaHCO ₃) or L-glutamine

12-736 Cell culture maintenance medium with Earle's BSS, with nonessential Amino Acids, L-glutamine, HEPES buffer, 10µg/ml Gentamicin, 50 units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2.5 µg/ml Fungizone and 2% heat-inactivated fetal bovine serum

EMEM Powder

15-611 With Earle's BSS, with L-glutamine

Quick Reference Chart

	L-Glutamine	HEPES	Phenol Red	Sodium Pyruvate
06-174	+	-	+	-
12-125	-	-	+	-
12-127	-	-	+	-
12-136	-	+	+	-
12-137	-	+	+	-
12-611	+	-	+	-
12-662	-	-	+	+
12-668	-	-	-	-
12-684	-	-	+	-
12-736	+	+	+	-
15-611	+	-	+	-

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/Biology/Pages/M/Media.html>

The Nutrient Requirements of Cells

Index to this page

- [Ham's Medium](#)
- [Bristol's Medium](#)

Introduction

In order to keep running, all living things need an unceasing supply of energy and materials. One useful way to discover the nutritional needs of cells is to attempt to culture them in the laboratory. We shall examine the ingredients needed in the medium for culturing

- the bacterium *E. coli*
- human cells
- a unicellular green alga

As these lists show, mammalian cells are far more fussy than is *E. coli*. At first, this may seem perfectly reasonable: *E. coli* cells seem simple and mammalian cells seem complex.

But actually, little difference exists between them in the range and complexity of the macromolecules of which they are built. Both must make carbohydrates, proteins, DNA, and RNA from which they assemble cell membranes, ribosomes, and so on.

In a sense, *E. coli* appears to be **more** complex. It is able to manufacture molecules as complex as those of the mammalian cell, but using a far more limited range of starting materials.

E. coli is able

- to supply all its energy needs from the potential energy stored in glucose and
- manufactures all of its organic molecules using the carbon atoms in glucose.
- NH_4Cl and MgSO_4 supply the nitrogen and sulfur atoms needed to synthesize proteins.
- Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 supply the phosphorus atoms needed for nucleic acid synthesis (as well as being needed for the functioning of many proteins).
- These ingredients also supply the Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , and Cl^- needed by the cell.
- CaCl_2 supplies the needed Ca^{2+} ions.

All these ingredients are dissolved in water and are taken up from this solution.

Ham's Medium

The list of ingredients needed to grow human cells in culture is far longer.

This list includes:

- all 20 of the amino acids from which proteins are synthesized;
- a purine

Glucose	5 g
Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
NH_4Cl	1 g
NaCl	0.5 g
MgSO_4	0.12 g
CaCl_2	0.01 g

L-Arginine	211 mg	Biotin	0.024 mg
L-Histidine	21 mg	Calcium pantothenate	0.7 mg
L-Lysine	29.3 mg	Choline chloride	0.69 mg


- (hypoxanthine) and a pyrimidine (thymidine) for the synthesis of nucleotides, and their polymers DNA and RNA;
- 2 precursors (choline and inositol) needed to synthesize some of the phospholipids in the cell;
 - 8 vitamins, all of which serve as parts of coenzymes;
 - the coenzyme lipoic acid;
 - glucose as a source of energy and carbon atoms;
 - the inorganic ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , and CO_3^{2-} (E. coli may need some of these as well but in such tiny amounts that it can acquire them as impurities in the other ingredients of its medium.)

L-Methionine	4.48 mg	i-inositol	0.54 mg
L-Phenylalanine	4.96 mg	Niacinamide	0.6 mg
L-Tryptophan	0.6 mg	Pyridoxine hydrochloride	0.2 mg
L-Tyrosine	1.81 mg	Riboflavin	0.37 mg
L-Alanine	8.91 mg	Thymidine	0.7 mg
Glycine	7.51 mg	Cyanocobalamin	1.3 mg
L-Serine	10.5 mg	Sodium pyruvate	110 mg
L-Threonine	3.57 mg	Lipoic acid	0.2 mg
L-Aspartic acid	13.3 mg	CaCl_2	44 mg
L-Glutamic acid	14.7 mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	153 mg
L-Asparagine	15 mg	Glucose	1.1 g
L-Glutamine	146.2 mg	NaCl	7.4 g
L-Isoleucine	2.6 mg	KCl	285 mg
L-Leucine	13.1 mg	Na_2HPO_4	290 mg
L-Proline	11.5 mg	KH_2PO_4	83 mg
L-Valine	3.5 mg	Phenol red	1.2 mg
L-Cysteine	31.5 mg	FeSO_4	0.83 mg
Thiamine hydrochloride	1 mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025 mg
Hypoxanthine	4 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.028 mg
Folic acid	1.3 mg	NaHCO_3	1.2 g

Even when all these ingredients have been mixed together, most mammalian cells still fail to grow unless some blood serum (e.g., from a human or a calf) is added. Just what metabolic need is met by this supplement is uncertain, but trace amounts of hormones in the serum are probably important.

Why does a mammalian cell require such a complex broth compared to E. coli? It is the price of multicellularity. A mammal is made up of hundreds of different cell types, each specialized to perform one or a few functions. All the many other functions of life - including the synthesis of many of the organic molecules it needs, it delegates to other cells. The extracellular fluid, derived from the blood, supplies it with these. Ham's tissue culture medium is an attempt to recreate this extracellular fluid.

<http://www.medterms.com/sricpt/main/art.asp?articlekey=33740>

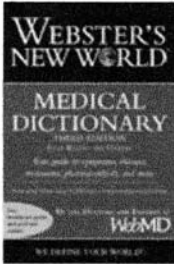


We Bring Doctors' Knowledge to You

Home | Picture Slideshows | Diseases & Conditions | Symptoms & Signs | Procedures & Tests | Medications

home > mcp1 definition

MedicineNet Authored
Webster's New World Medical Dictionary
Learn more »



MedTerms Medical Word of the Day

Definition of MCP1

FONT
A /


MCP1: Monocyte chemotactic protein-1, a member of the small inducible gene (SIG) family, plays a role in the recruitment of monocytes to sites of injury and infection. The gene for MCP1 is on chromosome 17 in region 17q11.2-q12.

MCP1 has been found in the joints of people with rheumatoid arthritis where may se recruit macrophages and perpetuate the inflammation in the joints. MPC1 has also t found elevated in the urine of people with lupus as a sign warning of inflammation o kidney.

MCP1 has also been called small inducible cytokine A2 (SCYA2) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF).

Last Editorial Review: 6/30/2004

http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=24&term=namalwa



Identification

Patent and Safe Deposit

Microorganism

Search

Advanced Search

- » Cell Line Index
- » Prices
- » Ordering Procedure
- » Patent Deposit
- » Safe Deposit
- » Scientific Services

- » Quality Control
- » Background Information
- » Publications

- » Head of Department
- » Staff
- » FAQ
- » Download

- » False Leukemia Cell Lines
- » Mycoplasma Contamination
- » SMRV Contamination
- » .

NAMALWA

Cell line: NAMALWA

Cell type: human Burkitt lymphoma

DSMZ no.: ACC 24

Origin: established from the tumor mass of an African child with Burkitt I 1967; cells express MYC mRNA

References: Nadkarni et al., Cancer 23: 64-79 (1969), PubMed ID [4178827](#)

Depositor: Dr. J. Minowada, Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan

DSMZ Cell Culture Data

Morphology: lymphoblastoid, single cells or small clusters in suspension

Medium: 90% RPMI 1640 + 10% FBS

Subculture: maintain at $0.5-1.5 \times 10^6$ cells/ml; split 1:2 to 1:3 every 2-3 day 1×10^6 cells/ml

Incubation: at 37 °C with 5% CO₂

Doubling time: about 20-30 hours

Harvest: maximum density at about 2.0×10^6 cells/ml or higher

Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 5×10^6

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma: contamination was eliminated with Ciprobay (ciprofloxacin), then microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays

Immunology: CD3 -, CD10 +, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 -, cyCD CD138 (+), HLA-DR +, sm/cyIgM +, sm/cyIgG -, sm/cykappa -,

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA prc

Species: confirmed as human with IEF of AST, NP

Cytogenetics: human hypodiploid karyotype with 4% polyploidy - 44(43-46)<2i +7, -10, -13, -21, +3mar, ins(1;?)p11;?), ins(3)(q11q29), der(1 del(8)(p22), der(14)t(14;?)p11;?), der(15)t(15;21)(p11;q11) - ring or fragment present in 8% of cells - NAMALWA marker chr

Molec. Genetics:

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV +, HBV -, HCV - HTLV-I/II -, SMRV +

[Imprint](#)

[Conditions](#)

© 2004 DSMZ GmbH
All rights reserved

<http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011429&collection=eacc.gc>

General Cell Collection Detail

General Cell Collection: Namalwa

Catalogue No.:	87060801
Cell Line Name:	Namalwa
Keywords:	Human Burkitt's Lymphoma
Cell Line Description:	Secretes small amounts of an IgM monoclonal antibody of unknown specificity. It has been shown to be sensitive to interferon. The cells contain the EBV genome and should be handled under laboratory conditions.
Species:	Human
Tissue:	blood
Morphology:	Lymphoblast
Growth Mode:	Suspension
Subculture Routine:	Maintain cultures between 3-9x10 ⁵ cells/ml; 5% CO ₂ ; 37°C. A maximum density of 1x10 ⁶ cells/ml is recommended.
Culture Medium:	RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 10% Foetal Bovine Serum (FBS).
Karyotype:	Modal no. 44; hypodiploid
Products:	Immunoglobulin M (IgM), lambda
Depositor:	Obtained from ATCC
Originator:	No
Country:	USA
References:	Int J Cancer 1972;10:44; Int J Cancer 1973;12:396; Antimicro Agents Chemother 1979;1:100
Additional Bibliography:	Not specified
Patents:	This material is cited in a US and/or other Patent and may not be used to infringe patent rights.
Research Council Deposit:	No
Release Conditions:	No

The HPA Culture Collections represent deposits of cultures from world-wide sources. While every effort is made to ensure that the cultures are accurate, HPA Culture Collections cannot be held responsible for any inaccuracies in the data supplied. The data is attributed to the establishment of the cell culture and not for any specific property of the cell line, therefore further reference should be made to the original culture characteristics. Passage numbers where given act only as a guide and HPA Culture Collections does not guarantee the passage number received by the customer.

Cultures supplied by HPA Culture Collections are for research purposes only. Enquiries regarding the commercial use of the cell line. Some cell lines have additional special release conditions such as the requirement for a material transfer agreement prior to the supply of the cell line. Please view the [Terms & Conditions of Supply](#) for more information.

<http://www.hpa.cultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refld=85011429&collection=eacc.gc>

General Cell Collection: RAJI

Catalogue No.:	85011429
Cell Line Name:	RAJI
Keywords:	Human Negroid Burkitt's lymphoma
Cell Line Description:	Established in 1963 from Burkitt's lymphoma in an 11 year old Negro male. Growth is in and as macroscopically visible clumps containing many hundreds of cells. Resistant to Barr Virus (EBV) genome and is positive for EBNA. RAJI is sometimes referred to as a deletions attributed to preventing the formation of virus particles.
Species:	Human
Tissue:	lymph
Morphology:	Lymphoblastoid
Growth Mode:	Suspension
Subculture Routine:	Maintain cultures between 3-9x100,000 cells/ml; 5% CO ₂ ; 37°C.
Culture Medium:	RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 10% Foetal Bovine Serum (FBS).
Karyotype:	2n = 46, diploid
Depositor:	Prof H Harris/Dr R Sutherland, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford
Originator:	No
Country:	UK
References:	Lancet 1964;1:238; J Nat Cancer Inst 1966;37:547; Trans NY Acad Sci 1966;29:61
Additional Bibliography:	Not specified
Patents:	None specified by Depositor
Research Council Deposit:	No
Release Conditions:	No

The HPA Culture Collections represent deposits of cultures from world-wide sources. While every effort is made to ensure that the data supplied are accurate, HPA Culture Collections cannot be held responsible for any inaccuracies in the data supplied attributed to the establishment of the cell culture and not for any specific property of the cell line, therefore further reference to culture characteristics. Passage numbers where given act only as a guide and HPA Culture Collections does not guarantee the passage number received by the customer.

Cultures supplied by HPA Culture Collections are for research purposes only. Enquiries regarding the commercial use of the cell line. Some cell lines have additional special release conditions such as the requirement for a material transfer agreement prior to the supply of the cell line. Please view the [Terms & Conditions of Supply](#) for more information.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfen angefertigt habe.

Frankfurt, den 25.2.2009

Gerda Wittel

(Gerda Wittel)