



# **Licht-induzierbare AntimiRs und wellenlängenselektive Entschützung von DNA**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Florian Schäfer**  
aus Salmünster

Frankfurt am Main, 2013

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

Erster Gutacher: Prof. Dr. Alexander Heckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Joachim W. Engels

Datum der Disputation: 03.12.2013

*meiner Familie*

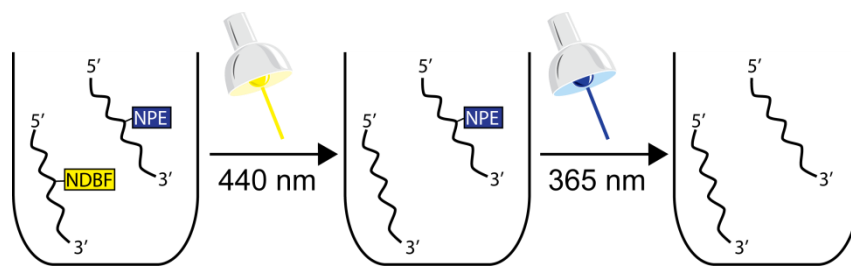


## Zusammenfassung

Die Idee photolabile Schutzgruppen zur temporären Inaktivierung von Biomolekülen zu verwenden, um deren Funktion dann in einem biologischen System präzise orts- und zeitaufgelöst wieder zu aktivieren und so biologische Prozesse genau steuern zu können, wurde erstmals Ende der 1970er Jahre von J. W. Engels und von J. F. Hoffman verfolgt. Seit diesen ersten Arbeiten im Bereich des „Cagings“ wurde in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielzahl von Arbeiten auf diesem Gebiet veröffentlicht und mit nahezu alle wichtigen Klassen von Biomolekülen wurden Caging-Experimente durchgeführt. Das Caging von Nukleinsäuren ist noch ein recht neues Feld. Es gab aber aufgrund der Beteiligung von Nukleinsäuren an vielen zentralen zellulären Prozessen im letzten Jahrzehnt ein enorm gesteigertes Interesse an lichtinduzierbaren Nukleinsäuren, vornehmlich zur lichtgesteuertem Genregulation. Der Arbeitskreis von Prof. Heckel befasst sich unter anderem mit dem Caging von Nukleinsäuren, wobei die zentrale Strategie im Anbringen der photolabilen Schutzgruppen an den Nukleobasen besteht. Dies hat den Hintergrund, dass auf diese Art und Weise die Wechselwirkung mit anderen Strängen durch Störung der Watson-Crick-Basenpaarung verhindert werden kann. Die Watson-Crick-Basenpaarung ist das zentrale Element für die Funktionalität nahezu aller Nukleinsäure-vermittelter Prozesse. In den vergangenen Jahren konnte mit dieser Strategie unter anderem erfolgreich die Aktivität von siRNAs und Aptameren mit Licht kontrolliert werden. Alle vier Projekte, welche in dieser Arbeit verfolgt wurden, befassten sich mit dem Caging von Nukleinsäuren.

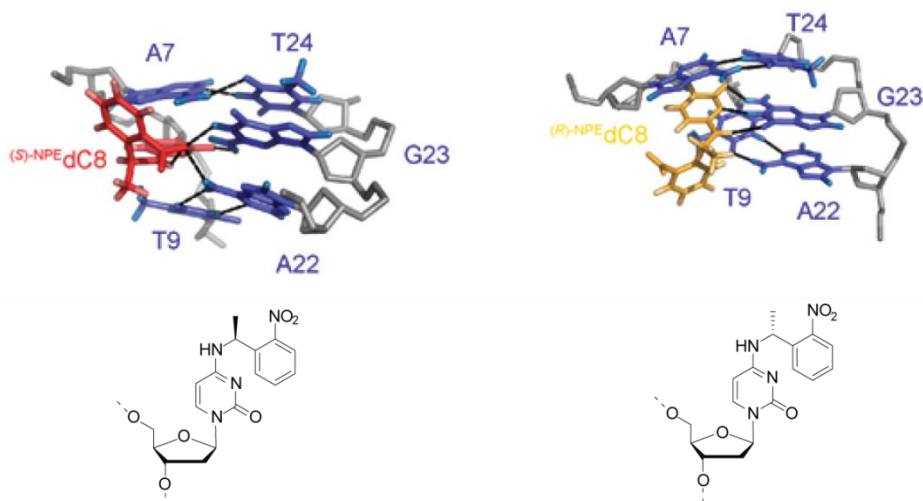
Im ersten Projekt gelang es erfolgreich, die zuerst von Ellis-Davies beschriebene Nitrodibenzofuran-Schutzgruppe (NDBF) zur photolabilen Schützung von Nukleinsäuren zu etablieren. Nach der Synthese der entsprechenden photolabilen Desoxycytidin- und Desoxyadenosin-Phosphoramidite wurden NDBF-geschützte Oligonukleotide hergestellt, die im Vergleich zu den zuvor verwendeten 1-(2-Nitrophenyl)ethyl-geschützten Oligonukleotiden (NPE) über wesentlich verbesserte photochemische Eigenschaften verfügen. NDBF-geschützte Oligonukleotide lassen sich, aufgrund eines erhöhten Extinktionskoeffizienten etwa 12-mal so effizient mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm entschützen und können darüber hinaus auch noch mit sichtbarem Licht entschützt werden. Zudem führt die Verwendung der NDBF-Schutzgruppe gegenüber der NPE-Schutzgruppe zu einer erheblich höheren Destabilisierung eines DNA-Duplex, wie an einem Test-Duplex demonstriert werden konnte. In einer Mischung aus einem NPE-geschützten Oligonukleotid und einem NDBF-geschützten Oligonukleotid gelang

es zu zeigen, dass die NDBF-Schutzgruppe sich bei 440 nm wellenlängenselektiv in Anwesenheit einer NPE-Schutzgruppe abspalten lässt.



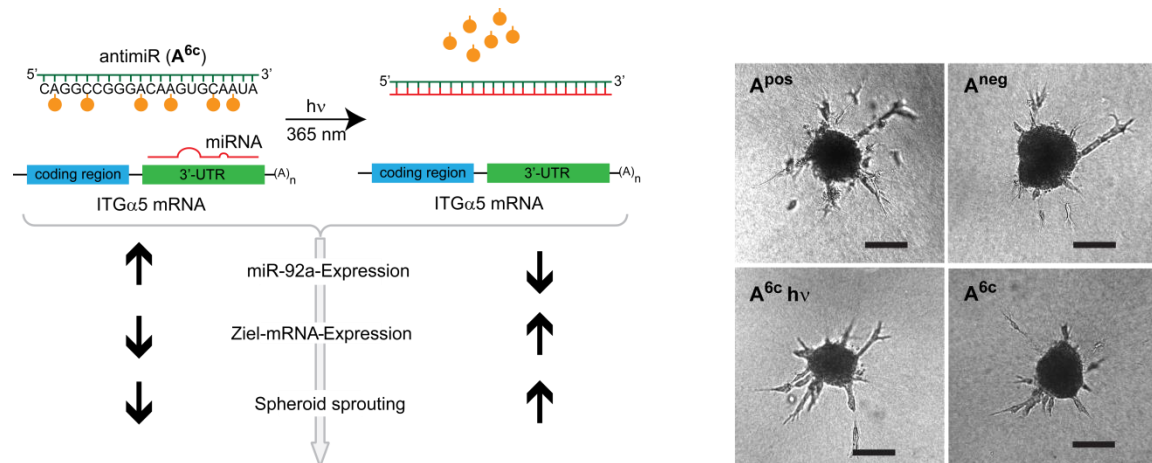
Dies ermöglicht es, photolabil geschützte Systeme zu konstruieren, die über ein einfaches irreversibles An- bzw. Ausschalten der Funktion von Nukleinsäuren hinausgehen könnten. Final konnte in ersten Experimenten zudem gezeigt werden, dass die NDBF-Schutzgruppe prinzipiell für die Abspaltung per Zweiphotonentechnik geeignet ist, was eine Entschützung in biologischen Systemen mit wesentlich verbesserter örtlicher Auflösung ermöglicht.

Im zweiten Projekt dieser Arbeit, welches in Kollaboration mit Hannah Steinert und Dr. Henry A. Jonker vom Arbeitskreis von Prof. Schwalbe durchgeführt wurde, war es das Ziel, den strukturellen Einfluss einer photolabilen NPE-Schutzgruppe auf die Struktur und die Einzelbasenpaarstabilität eines DNA-Duplex zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden in Relation zu Schmelzpunktuntersuchungen gesetzt, welche eine Aussage über die globale Destabilisierung eines DNA-Duplex durch den Einbau einer photolabilen Schutzgruppe erlauben. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die absolute Konfiguration der chiralen NPE-Schutzgruppe eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Destabilisierung des Duplex spielt. Eine an einem Desoxycytidin angebrachte *S*-NPE-Schutzgruppe vermochte es, den DNA-Duplex wesentlich stärker zu destabilisieren als eine *R*-NPE-Schutzgruppe, wie anhand von Schmelzpunktstudien bewiesen wurde.



Aus Iminprotonenaustausch-Experimenten ergab sich, dass der Einfluss des *S*-NPE auch auf die Einzelbasenpaarstabilitäten deutlich höher ist und auf die direkt benachbarten Basenpaare beschränkt bleibt. Mithilfe einer modellhaften Strukturrechnung gelang es schließlich zu zeigen, dass es durch den Einbau der *S*-NPE-Schutzgruppe zu einer Störung der Basenstapelung und der Helixgeometrie im Bereich der Modifikation kommt, die wesentlich ausgeprägter als im Fall der *R*-NPE-Schutzgruppe ist.

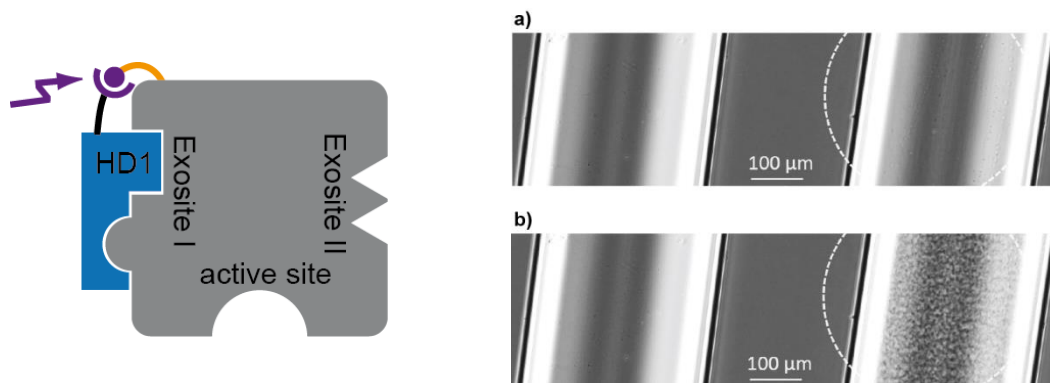
Im dritten, zentralen Projekt dieser Doktorarbeit wurden sogenannte lichtinduzierbare AntimiRs entwickelt. Es handelt sich hierbei um modifizierte photolabil geschützte RNA-Oligonukleotide, die in der Lage sind, nach Lichtaktivierung in humanen Primärzellen die Aktivität von miRNAs zu unterdrücken. Für dieses Projekt wurden zunächst photolabil geschützte 2'-*OMe*-RNA-Amidite synthetisiert, die anschließend in 21mer-Oligonukleotide, sogenannte AntimiRs, eingebaut wurden, welche zur Erhöhung der Stabilität zusätzlich mit Phosphorthioaten an den Enden ausgestattet wurden. Nach erfolgreicher Synthese der zur endogenen microRNA-92a komplementären, photolabil geschützten RNA-Oligonukleotide wurden diese in Zusammenarbeit mit Dr. Jasmin Wagner aus dem Arbeitskreis von Prof. Dimmeler in primäre humane Endothelzellen transfiziert.



Es konnte auf drei verschiedenen Ebenen erfolgreich gezeigt werden, dass sich die AntimiRs durch Bestrahlung in Zellen aktivieren lassen und dass die unbestrahlten photolabil geschützten AntimiRs keinerlei Effekte auf die Zellen haben. Zunächst wurde mithilfe eines Real Time PCR Ansatzes demonstriert, dass sich das miR-92a-Expressionslevel erfolgreich durch die Lichtaktivierung der AntimiRs reduzieren lässt. Überdies gelang es das Expressionslevel von ITG $\alpha$ 5, einer Ziel-mRNA von miR-92a durch Bestrahlung der AntimiR-transfizierten Zellen zu erhöhen. Mithilfe eines *in vitro* Angiogenese-Modells, dem sogenannten „spheroid sprouting

assay“, wurde schließlich gezeigt, dass die synthetisierten AntimiRs in der Lage sind, durch lichtinduzierte Hemmung der miR-92a, die Angiogenese-Aktivität in Endothelzellen zu verbessern. Dies könnte zukünftig für eine verbesserte lokale Applikation AntimiR-basierter Therapeutika dienen, was beispielsweise Anwendung für die Stimulation der Angiogenese nach Hautverletzungen finden könnte.

Im vierten Projekt wurde in Kollaboration mit Falk Rohrbach aus der Gruppe von Prof. Mayer an der Universität Bonn ein auf Aptameren beruhendes neues Caging-Prinzip für Proteine („Aptacaging“) entwickelt, welches ein effizientes Caging einzelner Proteindomänen ermöglicht. Als Modellsystem wurde das HD1-Aptamer, welches an Exosite I von Thrombin bindet, gewählt. Durch Funktionalisierung des Aptamers mit einem photospaltbaren und einem terminalen Aminolinker wurde unter Zuhilfenahme eines bifunktionalen Crosslinkers ein kovalenter Aptamer-Thrombin-Komplex synthetisiert. Solange der photospaltbare Linker intakt ist, bleibt das Thrombin inaktiv. Durch Bestrahlung wird der Linker gespalten und das Aptamer kann vom Thrombin wegdiffundieren und so aktives Thrombin freisetzen. Anhand von Live-Clotting-Experimenten in Glaskapillaren konnte in Lösungen aus Fibrinogen und dem Thrombin-Komplex demonstriert werden, dass sich so die Gerinnung mit örtlicher und zeitlicher Präzision aktivieren lässt.



Durch Verwendung eines verbesserten mit der Zweiphotonentechnik spaltbaren Linkers sollte sich so zukünftig ein Aptamer-basiertes Reagenz entwickeln lassen, das es erlaubt, die Blutgerinnung lokal zu induzieren, was beispielsweise zur Hemmung der Blutversorgung von Tumoren eingesetzt werden könnte.

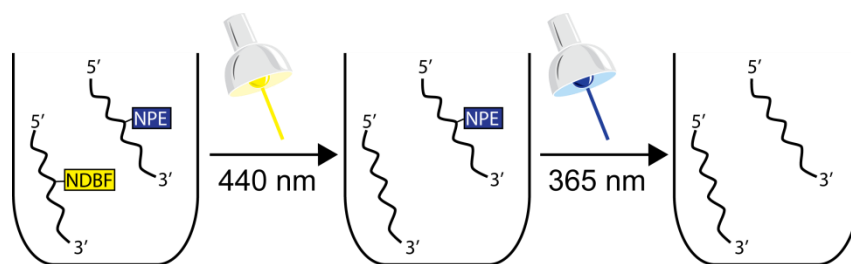


## Summary

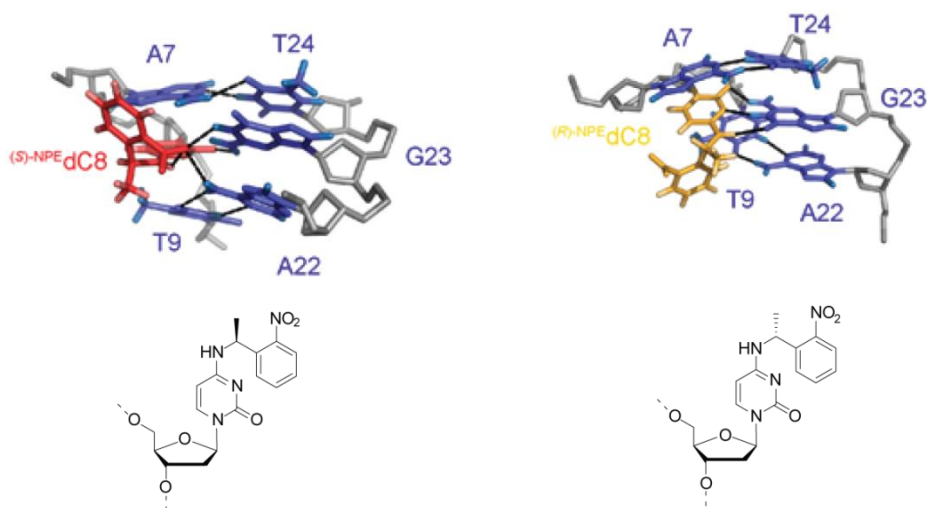
The idea to use photolabile protecting groups to temporarily block and later on reactivate the function of biologically active molecules spatiotemporally controlled by light was initially described by Engels and Schlaeger in 1977 and by J. F. Hoffman et al. in 1978. Based on Hoffman's idea this method is still today referred to as "caging". A multitude of studies concerning light-controlled activation of almost all classes of biomolecules have been published in the last decades since this pioneering work in the field of caging. The caging of nucleic acids is a relatively new development which has gathered much attention in the last ten years due to the fact that nucleic acids are key players in many important cellular processes. Most of the studies published dealt with the light-control of gene regulation. Research in the group of Prof. Heckel is mainly concerned with the caging of nucleic acids. The central idea is to install photolabile protecting groups on the nucleobases to disturb Watson-Crick base pairing which is a prerequisite for functionality of almost all cellular processes in which nucleic acids are involved. In the past few years it was successfully demonstrated that the function of siRNAs or aptamers can be controlled by light using this strategy. All projects conducted in the PhD thesis at hand dealt with this caging approach.

In the first project the nitrodibenzofuran photolabile protecting group first described by Ellis-Davies et al. was successfully adapted to the caging of nucleic acids. The project included the synthesis of a NDBF-protected deoxycytidine and a NDBF-protected deoxyadenosine which were incorporated into NDBF-protected DNA oligonucleotides. A comparison with the formerly used 1-(2-Nitrophenyl)ethyl-protected oligonucleotides (NPE) revealed that NDBF-protected oligonucleotides can be deprotected 12 times more efficiently due to their increased extinction coefficient at 365 nm. Moreover it was possible to perform the deprotection with visible light. Besides these improved photochemical properties incorporation of the NDBF group into oligonucleotides also led to a significantly stronger destabilization of DNA double strands than incorporation of a NPE group. This was shown on a 15mer DNA duplex. Finally it was demonstrated that it is possible to selectively deprotect NDBF-caged moieties in oligonucleotides in presence of NPE-protected oligonucleotides at a wavelength of 440 nm.

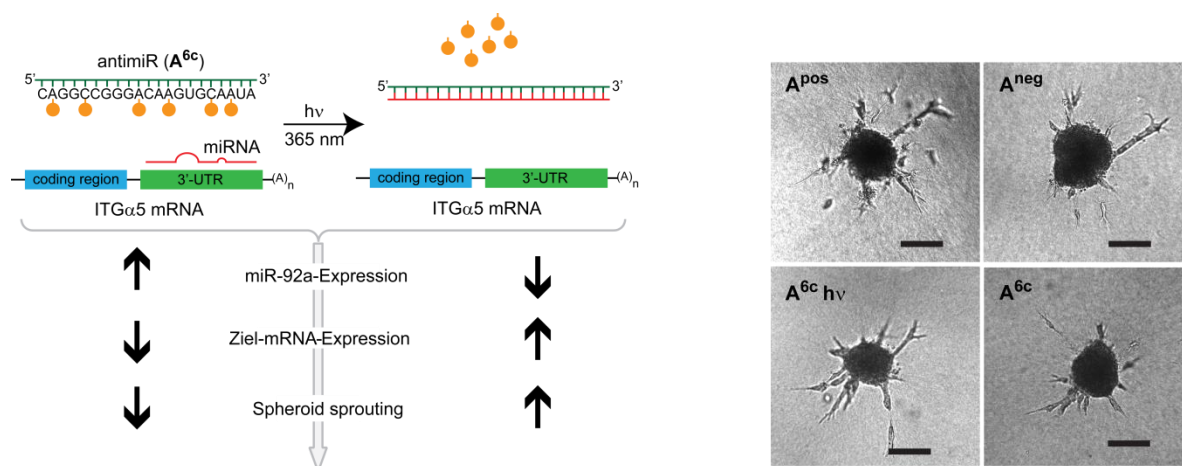
This should allow building more complicated caged constructs that go beyond the principle of irreversible activation or deactivation of nucleic acid function. In preliminary experiments it was possible to show that NDBF-protected oligonucleotides can be deprotected by two-photon irradiation, possibly allowing a spatially well-defined deprotection in biological systems.



In the second project the influence of incorporating a NPE group into DNA duplexes on duplex structure and the stability of single base pairs was examined by NMR. These data were compared with the results of UV melting experiments which allow the quantification of the effect on global duplex stability. This project was performed in collaboration with Hannah Steinert and Dr. Henry A. Jonker of the Schwalbe group. The results demonstrated that the absolute configuration of the chiral NPE group significantly influences the extent to which the global duplex stability is decreased. The *S*-NPE group destabilizes the duplex much more than the *R*-NPE group. Single base pair stability determination by NMR revealed that only the NPE-modified base pair and the base pairs directly next to it are influenced by the incorporation of the photolabile protecting group and that the extent of destabilization is again higher in case of the *S*-NPE enantiomer. To elucidate the structural origin of this destabilization a model-like structure calculation was performed. The structure model showed that incorporation of the *S*-NPE group into the duplex leads to a more pronounced disruption of base stacking and helical geometry than incorporation of the *R*-NPE group.



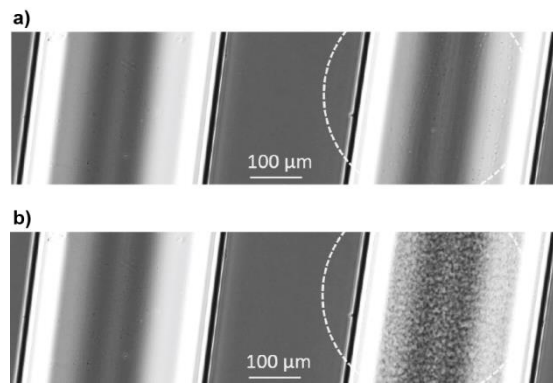
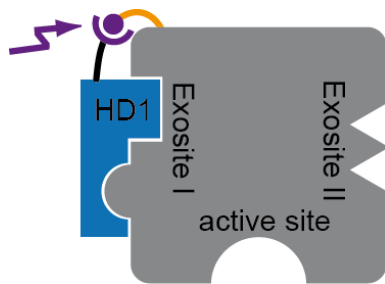
In the third and central project of this PhD thesis so-called light-inducible anti-miRs were developed. These are modified, caged RNA oligonucleotides that are able to suppress microRNA (miR) activity in human endothelial cells after irradiation with light. For this purpose caged 2'-OMe RNA phosphoramidites were synthesized and incorporated into 2'-OMe RNA oligonucleotides, so-called caged anti-miRs, which were additionally modified with phosphorothioates to increase their stability against nucleases. After successful synthesis these 2'-OMe RNA oligonucleotides were transfected into primary human endothelial cells in collaboration with Dr. Jasmin Wagner (Prof. Dimmeler, Universitätsklinik Frankfurt).



It was demonstrated on three different levels that anti-miRs can be activated by light in these cells and that light-inducible anti-miRs do not have any effect on the cells in the absence of irradiation. First, based upon a real time PCR assay, it was shown that the miR-92a expression level can be reduced by light activation of caged anti-miRs. Moreover it was possible to increase the level of one target mRNA of miR-92a, ITGα5, via irradiation of anti-miR-transfected cells. Using an *in vitro* angiogenesis model, the so-called spheroid sprouting assay, angiogenesis was augmented via inhibition of antiangiogenic miR-92a, as shown via an increased sprouting capacity of irradiated anti-miR-transfected cells. This could give rise to an improved local delivery of anti-miR-based therapeutics and could be applied to improve angiogenesis for dermal wound healing.

In the fourth project a new concept for caging of proteins based on aptamers (“aptacaging”) was developed together with Falk Rohrbach (Prof. Mayer, University Bonn). As a model system the HD1 aptamer which binds to Exosite I of thrombin was chosen. Via functionalization of the aptamer with a photocleavable linker and a terminal amino linker a covalent protein-aptamer complex could be synthesized. After cleavage of the linker by UV light the aptamer can diffuse away from thrombin thereby releasing the active protein. Based on live clotting experiments in

glass capillaries containing a solution of the complex and fibrinogen it was shown that clotting can be activated with high spatiotemporal resolution.



Using a two-photon-scissile linker an improved aptamer-based reagent should be able to locally induce blood clotting. This could for example be applied to block the blood supply of tumors.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Summary</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Caging.....	1
1.1.1 <i>Ortho</i> -Nitrobenzylartige Schutzgruppen.....	3
1.1.2 Andere photolabile Schutzgruppen.....	6
1.1.3 Zweiphotonenaktivierung .....	8
1.1.4 Orthogonales Uncaging.....	10
1.1.5 Caging von Nukleinsäuren.....	13
1.1.5.1 Caging von Oligonukleotiden zur lichtgesteuerten Genregulation .....	16
1.2 Festphasensynthese von Oligonukleotiden .....	20
1.3 MicroRNA .....	28
1.3.1 Nicht-kodierende RNA .....	28
1.3.2 MiRNA-Biogenese.....	29
1.3.3 Mechanismus der Genregulation durch miRNAs .....	33
1.3.4 MiRNA-Zielgene .....	38
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>41</b>
<b>3 Allgemeiner Teil</b> .....	<b>44</b>
3.1 Wellenlängenselektives Entschützen .....	44
3.1.1 Einleitung.....	44
3.1.2 Synthese der Nitrodibenzofuranschutzgruppe (NDBF-NH <sub>2</sub> ).....	46
3.1.3 Synthese der NDBF-geschützten Nukleoside .....	48
3.1.3.1 Synthese des NDBF-geschützten Desoxycytidinderivats .....	48
3.1.3.2 Synthese des NDBF-geschützten Desoxyadenosinderivats .....	49
3.1.4 Charakterisierung NDBF-modifizierter Oligonukleotide .....	51
3.1.5 Wellenlängenselektives Entschützen .....	58
3.1.6 Vorversuche zur Zweiphotonenentschätzung .....	60
3.1.7 Zusammenfassung & Ausblick .....	62

3.2	NMR-Studien NPE-geschützter DNA-Duplexe .....	64
3.2.1	Einleitung .....	64
3.2.2	Auswahl des Doppelstrangs .....	65
3.2.3	Spektren-Auswertung & Diastereomerentrennung.....	66
3.2.4	UV-Spektroskopie der verschiedenen Diastereomere .....	69
3.2.5	Iminoprotonenaustausch-Experimente .....	72
3.2.6	CD-Spektroskopie der Duplexe.....	77
3.2.7	Strukturrechnung .....	78
3.2.8	Zusammenfassung & Ausblick.....	80
3.3	Licht-induzierbare AntimiRs.....	82
3.3.1	Strategien zur Kontrolle der miRNA-Aktivität .....	82
3.3.1.1	Modifikationsmotive von AntimiRs.....	83
3.3.1.2	Therapeutische Anwendungen von AntimiRs.....	85
3.3.2	Projektbeschreibung .....	85
3.3.2.1	Projektziele .....	85
3.3.2.2	Angiogenese & miR-92a .....	86
3.3.3	Mismatch-Studien.....	88
3.3.4	Synthese der gecageten 2'-OMe-modifizierten Amidite .....	91
3.3.4.1	Synthese des 2'-OMe-Adenosinamidits .....	92
3.3.4.2	Synthese des 2'-OMe-Cytidinderivats.....	92
3.3.4.3	Synthese des 2'-OMe-Guanosinderivats .....	93
3.3.4.4	Synthese eines NPE-geschützten 2'-OMe-Uridinderivats.....	94
3.3.5	Synthese der gecageten AntimiRs .....	95
3.3.6	Zellkulturstudien.....	98
3.3.6.1	Geplante Experimente .....	98
3.3.6.2	Auswirkungen lichtinduzierbarer AntimiRs auf die miR-92a-Expression.....	99
3.3.6.3	Auswirkungen lichtinduzierbarer AntimiRs auf die Zielgen-Expression.....	101
3.3.6.4	Dosisabhängigkeit des Effekts lichtinduzierbarer AntimiRs.....	103
3.3.6.5	<i>In vitro</i> Angiogenese-Studien mittels „spheroid sprouting“ .....	104
3.3.7	Zusammenfassung & Ausblick.....	106
3.4	Aptacaging.....	107
3.4.1	Caging von Proteinen .....	107
3.4.2	Aptamere und deren therapeutische Bedeutung .....	107

3.4.3	Thrombin und Blutgerinnung.....	108
3.4.4	Vorarbeiten und Projektziele .....	111
3.4.5	Synthese des fHD1 .....	114
3.4.6	Western Blot und Hirudin Assay .....	117
3.4.7	Gerinnungsstudien und Live Clotting Experimente.....	121
3.4.8	Zusammenfassung & Ausblick .....	124
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>126</b>
4.1	Chemische Synthesen .....	126
4.1.1	Materialien & Reagenzien .....	126
4.1.2	Verwendete Geräte zur Analytik.....	126
4.1.3	Synthesevorschriften.....	127
4.1.3.1	Synthese der NDBF-geschützten dC- und dA-Derivate .....	127
4.1.3.2	Synthese der NPE-geschützten 2'-OMe RNA-Amidite.....	139
4.1.3.3	Synthese des S-NPE-geschützten Desoxycytidin-Amidits .....	159
4.2	Oligonukleotidsynthese.....	163
4.2.1	Festphasensynthese .....	163
4.2.2	Abspaltung & Aufreinigung.....	163
4.2.2.1	Abspaltung vom Festphasenmaterial & Entschützung.....	163
4.2.2.2	Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC).....	164
4.2.3	Analytik von Oligonukleotiden.....	164
4.2.3.1	Schmelzpunktbestimmung .....	164
4.3	Projektbezogene Methoden & Analytik.....	165
4.3.1	Wellenlängenselektives Entschützen .....	165
4.3.1.1	ESI-MS-Daten der synthetisierten Oligonukleotide .....	165
4.3.1.2	UV-Vis-Spektren .....	165
4.3.1.3	Quantenausbeuten .....	166
4.3.1.4	Wellenlängenselektives Entschützen .....	167
4.3.1.5	Zweiphotonen-Experimente.....	168
4.3.2	NMR-Iminoprotonen Experimente .....	168
4.3.2.1	HPLC-Aufreinigung.....	168
4.3.2.2	ESI-MS-Daten.....	168
4.3.2.3	Probenvorbereitung für NMR-Experimente .....	168
4.3.2.4	Zuordnung der Iminoprotonenresonanzen .....	169



4.3.2.5	Inversion recovery Experimente.....	169
4.3.2.6	CD-Spektroskopie .....	171
4.3.2.7	Strukturmodell der modifizierten Duplexe.....	171
4.3.3	Licht-induzierbare AntimiRs.....	172
4.3.3.1	HPLC und Ethanol-Fällung HPLC-gereinigter AntimiRs.....	172
4.3.3.2	ESI-MS-Daten der Mismatch-AntimiRs .....	172
4.3.3.3	Zellkultur .....	173
4.3.3.4	Transfektion und Bestrahlung .....	173
4.3.3.5	RNA-Isolation und quantitative Real Time PCR .....	173
4.3.3.6	Spheroid assay .....	175
4.3.3.7	Statistik & Signifikanztests .....	176
4.3.4	Aptacaging.....	176
4.3.4.1	Synthese der modifizierten Aptamere .....	176
4.3.4.2	Filterbindungsstudien .....	177
4.3.4.3	Aptacaging-Crosslink-Reaktion .....	177
4.3.4.4	Thrombin-Aktivitäts Assay .....	178
4.3.4.5	Hirudin Assay .....	178
4.3.4.6	Koagulationsassay .....	178
4.3.4.7	Western Blot.....	178
4.3.4.8	Live-Clotting Experimente.....	179
<b>5</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>180</b>
5.1	HPLC-Spektren & Photolysekinetiken.....	180
5.2	Literaturverzeichnis.....	183
5.3	Abkürzungsverzeichnis .....	191
<b>6</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>196</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>198</b>



---

# Einleitung

## 1.1 Caging

Eine Herausforderung bei der Synthese komplexer Moleküle besteht für den organischen Chemiker darin, selektiv bestimmte funktionelle Gruppen in Anwesenheit anderer reaktiver Einheiten zur Reaktion zu bringen.<sup>[1]</sup> Ein wichtiges Werkzeug hierfür stellt die Verwendung von Schutzgruppen dar. Diese ermöglichen es, die Reaktivität bestimmter Gruppen temporär zu maskieren. Nach einer möglichst selektiven und quantitativen Entschützung sollte die funktionelle Gruppe wieder freigesetzt werden können. Sind verschiedene Schutzgruppen in einem Molekül vorhanden, wie z.B. bei der DNA-Festphasensynthese, so sollten diese Schutzgruppen möglichst orthogonal zueinander sein. Das bedeutet, dass verschiedene Schutzgruppen unabhängig voneinander bei verschiedenen Reaktionsbedingungen abspaltbar sein sollten. Klassische Schutzgruppen lassen sich durch Veränderungen des pH-Wertes (basisch oder sauer) bzw. durch Zugabe von chemischen Abspaltungsreagenzien (z.B. Fluorid-Ionen, Oxidations- oder Reduktionsmittel) entfernen. Photolabile Schutzgruppen sind im Allgemeinen eine gute Wahl hinsichtlich der Orthogonalität, da klassische Schutzgruppen sich nicht photolysieren lassen. Als „Reagenz“ dienen hierbei Photonen einer bestimmten Wellenlänge. Ein Einsatzgebiet solcher photolabiler Schutzgruppen stellt die Herstellung von DNA-Chips dar. Die Verwendung von photolithographischen Methoden erlaubt es sogenannte high-density Arrays zu erstellen, da dieser Prozess gut miniaturisiert werden kann.<sup>[2]</sup> Engels und Schlaeger nutzten im Jahr 1977 erstmals photolabile Schutzgruppen, um die Aktivität von Biomolekülen temporär zu inaktivieren. Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) lässt sich aufgrund seiner Ladung nur schwer durch die Zellmembran ins Innere einer Zelle bringen. Im Rahmen der Synthese einer Serie von verschiedenen cAMP-Triestern, von denen man sich eine verbesserte Membranpenetration erhoffte, wurde unter anderem auch ein photoaktivierbares Derivat hergestellt.<sup>[3]</sup> Im Jahr 1978 verwendeten J. F. Hoffman et al. photolabil geschütztes Adenosintriphosphat (ATP), um die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zu untersuchen. Nach Bestrahlung mit UV-Licht wurde ATP in Erythrozyten-Ghosts freigesetzt und die Funktion der ATP-abhängigen Pumpe wiederhergestellt (s. Abschnitt 1.1.1).

Für derartige temporär durch eine photolabile Schutzgruppe blockierte und durch Belichtung wieder aktivierbare Biomoleküle wurde von Hoffman der Begriff „caged compounds“ geprägt.<sup>[4]</sup> Im Vergleich zu anderen externen Stimuli zur räumlichen und zeitlichen Steuerung biologischer

Vorgänge hat Licht einige Vorteile. Im zellulären Umfeld ist Licht ein orthogonales Signal, da es nur wenige von Licht initiierte zelluläre Prozesse gibt. Verwendet man Licht der richtigen Wellenlänge, so ist es unschädlich für die Zelle. Daher besteht der Bedarf nach Schutzgruppen, die sich mit möglichst langwelligem und somit energiearmem Licht abspalten lassen. Über die Länge der Bestrahlung bzw. die verwendete Intensität des Lichts lässt sich gut die Menge des freigesetzten Biomoleküls steuern. Zudem lässt sich Licht gut fokussieren, was eine räumlich definierte Aktivierung möglich macht. Viele Modellorganismen, wie Zebrafische (*D. rerio*) oder Fadenwürmer (*C. elegans*), sind zudem zumindest in bestimmten Entwicklungsstadien transparent und somit gut geeignet, lichtgesteuerte biologische Prozesse zu untersuchen.<sup>[5]</sup> In komplexeren Organismen, wie dem Menschen, sind Anwendungen in den oberen Hautschichten sowie im Auge grundsätzlich denkbar. Die erreichbare Eindringtiefe in das Gewebe hängt zudem von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab, was man sich bei der sogenannten Zweiphotonenentschützung zu Nutze macht (s. Abschnitt 1.1.3).

Das Prinzip des Cagings wurde schon für viele verschiedene Substanzklassen von kleinen Molekülen, Neurotransmittern, Zuckern bis hin zu Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren angewendet. Einige Beispiele werden in den folgenden Kapiteln behandelt, für eine ausführliche Zusammenfassung sei auf die entsprechenden Übersichtsartikel verwiesen.<sup>[6,7,8,9]</sup>

An eine gute photolabile Schutzgruppe zur Verwendung in Biomolekülen werden diverse Anforderungen gestellt:

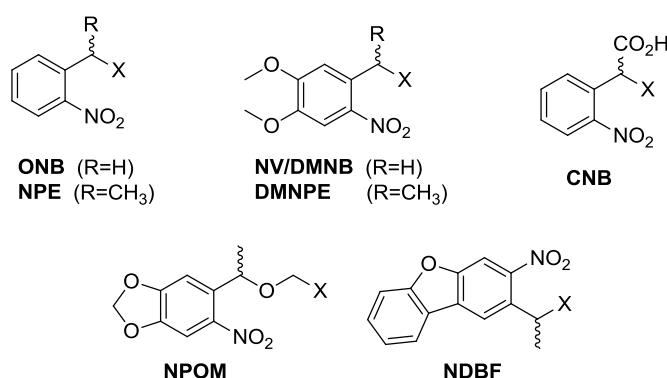
- a) Die Photoreaktion sollte sauber und mit hoher Quantenausbeute ( $\phi$ ) verlaufen.
- b) Der Chromophor sollte einen hohen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) bei Wellenlängen oberhalb von 300 nm haben und möglichst langwellig absorbieren, um eine Schädigung durch das eingestrahlte Licht zu vermeiden und möglichst kurze Bestrahlungszeiten zu ermöglichen.
- c) Die Nebenprodukte der Photoreaktion sollten möglichst nicht bei der gleichen Wellenlänge absorbieren, um eine Konkurrenz zur Photoreaktion zu vermeiden.
- d) Die Nebenprodukte sollten nicht toxisch sein.
- e) Die Freisetzung des aktiven Moleküls sollte schneller erfolgen als der untersuchte Prozess.
- f) Das photolabil geschützte inaktive Molekül sollte ausreichend in Wasser löslich sein.
- g) Vor der Entschützung sollte das Molekül vollständig inaktiv sein.

Es gibt keine photolabile Schutzgruppe, die alle diese Anforderungen vollständig erfüllt, daher muss je nach zu untersuchendem System das am besten für diese Fragestellung geeignete System

gewählt werden.<sup>[10]</sup> Im folgenden Abschnitt sollen nun verschiedene Typen von photolabilen Schutzgruppen und deren Eigenschaften und Anwendungen vorgestellt werden.

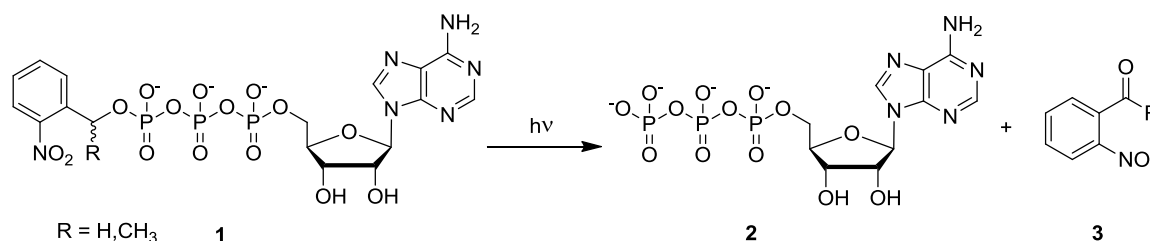
### 1.1.1 *Ortho*-Nitrobenzylartige Schutzgruppen

*Ortho*-Nitrobenzylartige Schutzgruppen sind die bei weitem am häufigsten verwendeten photolabilen Schutzgruppen. Es gibt eine Reihe von unterschiedlich substituierten Derivaten, die sich hinsichtlich ihrer Quantenausbeute ( $\phi$ ) bzw. dem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) und somit der Photolyseeffizienz ( $\epsilon\phi$ ) unterscheiden. In der unteren Abbildung ist eine Auswahl verschiedenartiger *o*-Nitrobenzylschutzgruppen gezeigt.



**Abbildung 1:** Übersicht verschiedener *o*-Nitrobenzylschutzgruppen. X steht jeweils für das Molekül, welches nach Photolyse freigesetzt wird. Die Verknüpfung erfolgt meist über Alkohole, Amine, Thiole oder Carbonsäuren.

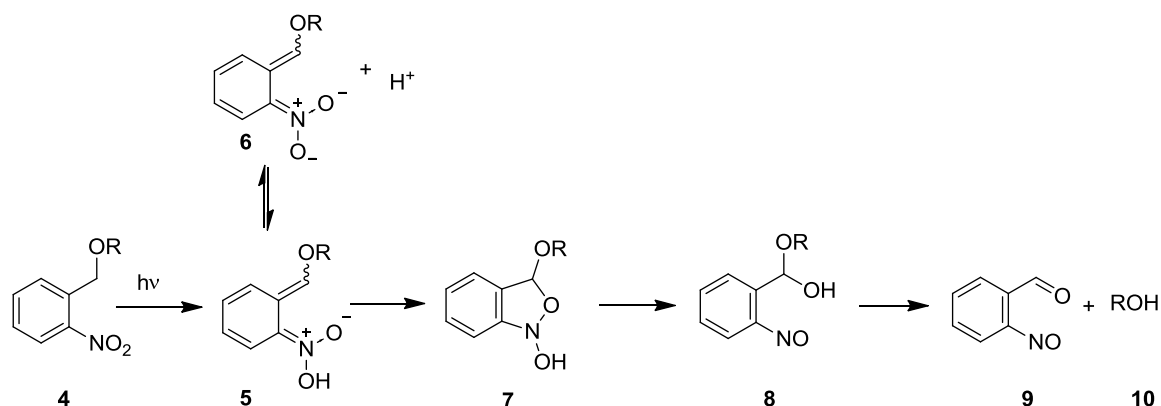
Die *ortho*-Nitrobenzylschutzgruppe (**ONB**) sowie das 1-(2-Nitrophenylethyl)-Analogon (**NPE**) wurden bereits in der Arbeit von Hoffman verwendet. Hierbei stellte sich heraus, dass die zusätzliche Methylgruppe zu einer schnelleren Photolyse führte. Zudem entsteht bei der Photolyse das etwas weniger reaktive Nitrosoketon im Vergleich zum Nitrosoaldehyd bei der **ONB**-Schutzgruppe (s. Abbildung 2).<sup>[4]</sup>



**Abbildung 2:** Von Kaplan et al.<sup>[4]</sup> verwendete photoaktivierbare ATP-Derivate. Durch UV-Belichtung ( $\lambda = 340$  nm) wird ATP freigesetzt. Als Nebenprodukt entsteht entweder ein Nitrosoaldehyd (**ONB**) oder ein Nitrosoketon (**NPE**).

Durch das Anbringen zusätzlicher Substituenten können die Absorptionseigenschaften der photolabilen Schutzgruppe moduliert werden. So weist zum Beispiel die **DMNPE**-Schutzgruppe durch ihre zwei Methoxy-Substituenten eine deutliche Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu höheren Wellenlängen auf, jedoch ist die Quantenausbeute deutlich schlechter als bei der **NPE**-Gruppe.<sup>[11]</sup> Dies zeigt, dass eine Vorhersage der Qualität photolabiler Schutzgruppen nicht trivial ist. Von Ellis-Davies et al. wurde 2006 die Nitrodibenzofuran-Schutzgruppe (**NDBF**) eingeführt, die über deutlich bessere Entschützungseigenschaften verfügt.<sup>[12]</sup> Dies wird in Kapitel 3.1 noch genauer diskutiert, da diese photolabile Schutzgruppe auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Der Abspaltmechanismus von 2-Nitrobenzylderivaten **4** ist recht gut untersucht und verläuft folgendermaßen. Durch Absorption eines Photons entsteht mittels einer 1,5-Protonenumlagerung das sogenannte aci-Nitro-Tautomer **5**, welches seinerseits im Gleichgewicht mit der deprotonierten Form **6** steht. Die Geschwindigkeitskonstante liegt hierbei bei  $\approx 10^{-12} \text{ s}^{-1}$ . Aus der protonierten Form kann durch Angriff eines Sauerstoffatoms ein Benzisoxazolidin **7** gebildet werden, was dann wieder in ein Halbacetal **8** zerfällt. Unter Bildung des Nitrosoaromaten **9** wird dann die abzuspaltende Gruppe **10** eliminiert.<sup>[13]</sup>



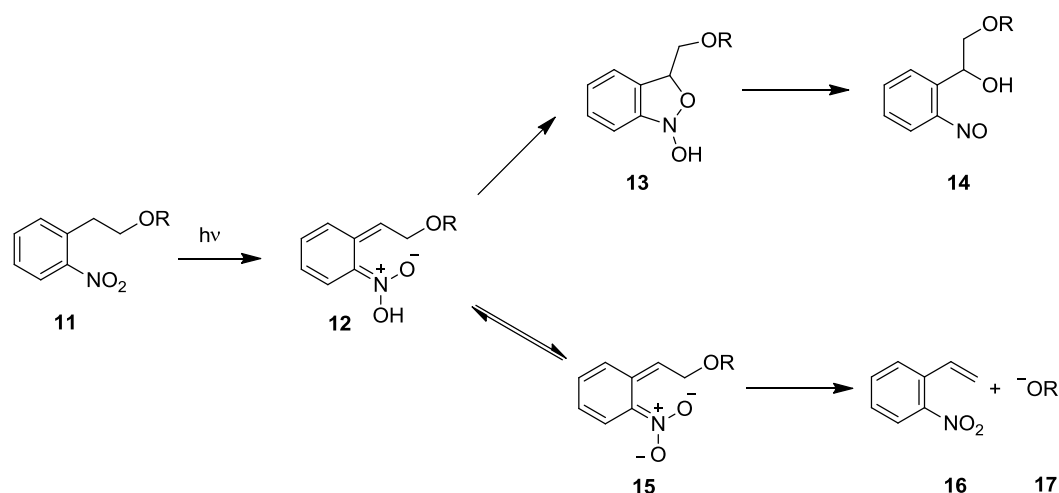
**Abbildung 3:** Photolysemechanismus von *o*-Nitrobenzylgruppen.<sup>[14]</sup>

Eine Variante stellen die sogenannte 2-(2-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Schutzgruppen dar, die von Pfeleiderer et al. entwickelt wurden.<sup>[15]</sup> In dieser Studie wurden verschiedene photolabil geschützte Thymidinnukleoside untersucht, wobei sich die 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonylgruppe (NPPOC) als effektivste herausstellte (Halbwertszeit:  $t_{1/2} = 0,7 \text{ min.}$ ). Auch hier konnte also durch den Einbau einer Methylgruppe am  $\alpha\text{-CH}_2$  eine verbesserte Abspalteffizienz erreicht werden (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Halbwertszeit verschiedener photolabil geschützter Thymidinderivate nach Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) in Methanol/Wasser 1:1.<sup>[15]</sup>

R =	$t_{1/2}$ [min]
	7,3
	2,6
	2,5
	0,7

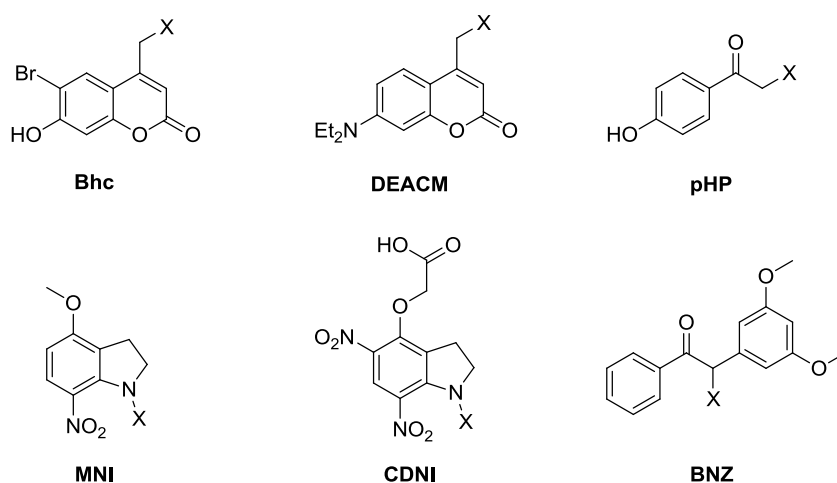
Der Mechanismus der Photolyse wurde im Jahr 2001 genauer untersucht. Er unterscheidet sich vom Mechanismus von *o*-Nitrobenzylschutzgruppen darin, dass die Bildung eines cyclischen Benzisoxazolidins **13**, entstanden aus der protonierten aci-Nitro Spezies **12**, nicht zum gewünschten Photolyseprodukt **17** führt, sondern dass es aus der cyclischen Form zum Zerfall in einen Nitrosoaromaten **14** kommt, der noch die abzuspaltende Gruppe trägt. Die Photolyse erfolgt aus der deprotonierten aci-Nitro-Spezies **15** mittels  $\beta$ -Eliminierung, wobei ein Nitrostyren-Derivat **16** als Nebenprodukt anfällt (s. Abbildung 4). Die Effizienz der Abspaltung hängt davon ab, wie leicht sich die aci-Nitro-Spezies **12** wieder deprotonieren lässt. Somit kann die Produktausbeute durch Steigerung des pH-Werts erhöht werden.<sup>[16]</sup>



**Abbildung 4:** Photolysemechanismus von NPP-Derivaten nach Pfeleiderer et al.<sup>[16]</sup> Die Effizienz der Photolyse hängt auch von der Qualität der Abgangsgruppe R ab.

### 1.1.2 Andere photolabile Schutzgruppen

Neben den nitrobenzylartigen Schutzgruppen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurde eine Reihe weiterer photolabiler Schutzgruppen entwickelt. Eine Auswahl anderer photolabiler Schutzgruppen soll hier ebenfalls kurz beschrieben werden. Für eine detaillierte Abhandlung über die verschiedenen Typen photolabiler Schutzgruppen sei auf den Übersichtsartikel von Wirz et al. verwiesen.<sup>[17]</sup>

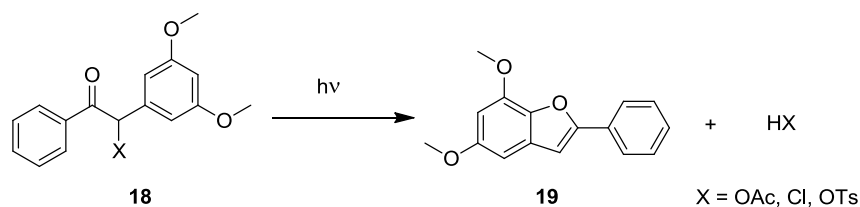


**Abbildung 5:** Übersicht verschiedener photolabiler Schutzgruppen. X bezeichnet jeweils die Abgangsgruppe.

Die Benzoin-Schutzgruppe (**BNZ**) wurde am Beispiel des Dimethoxybenzoin **18** von Wilson et al. eingehend untersucht. Als Abgangsgruppen wurden Carboxylate, Tosylate und Halogenide verwendet, die unter Bildung des 2-Phenyl-5,7-dimethoxybenzofurans **19** freigesetzt werden (s. Abbildung 6).<sup>[18]</sup> Zur Entschützung wurde in diesen ersten Arbeiten Licht der Wellenlänge



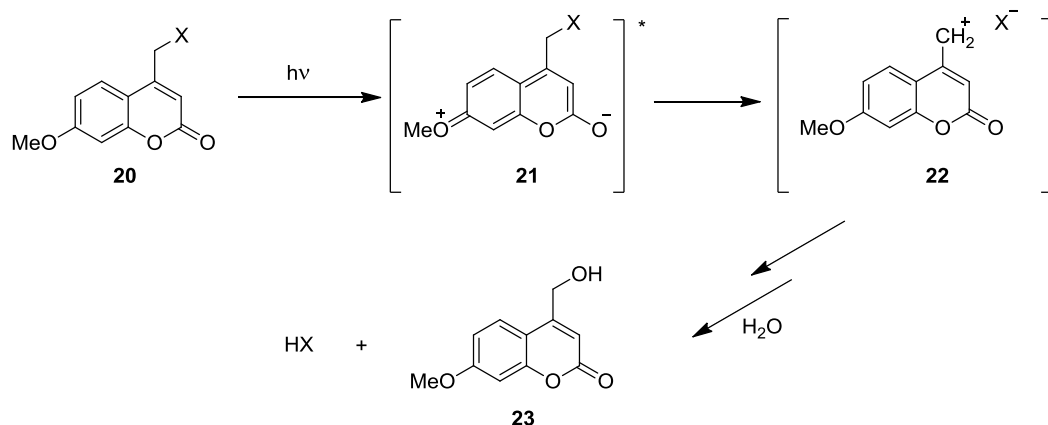
255 nm verwendet. Später konnte gezeigt werden, dass sich auch Phosphate (cAMP) und Neurotransmitter wie Glutamat und GABA freisetzen lassen. Dies geschah bei einer für biologische Systeme wesentlich geeigneteren Wellenlänge von 350 nm. Es konnten ähnliche Effizienzen wie für CNB-geschütztes Glutamat beobachtet werden.<sup>[19]</sup> Überdies lassen sich auch sekundäre Amine aus Dimethoxybenzoincarbamaten freisetzen.<sup>[20]</sup>



**Abbildung 6:** Photolyse von Dimethoxybenzoin-Derivaten.<sup>[18]</sup> Neben den abgebildeten Abgangsgruppen können auch Phosphate, Aminosäuren oder Carbamate entschützt werden.

Die *para*-Hydroxyphenacylschutzgruppe (**pHP**) wurde von Givens et al. eingeführt. Die Vorteile dieser Schutzgruppe liegen in ihrer z.B. im Vergleich zur Benzoin-Schutzgruppe guten Wasserlöslichkeit, der recht hohen Quantenausbeuten ( $\phi = 0,37$  für pHP-geschütztes ATP) und einer sauberen Photoreaktion. Durch eine hypochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums bei der Entschützung ist eine konkurrierende Absorption der Photolyseprodukte ausgeschlossen, was zu einer guten Gesamtausbeute der Entschützung führt.<sup>[21]</sup> Erwähnenswert ist die Tatsache, dass die Quantenausbeute der Entschützung mit der Acidität der konjugierten Säure der Abgangsgruppe korreliert. Das bedeutet, dass sich konjugierte Basen starker Säuren wie z.B. Sulfate oder Phosphate wesentlich besser abspalten lassen als z.B. Alkoholate.<sup>[17]</sup>

Givens et al. berichteten im Jahr 1984 erstmals über die Photolyse von 4-Methylcumarinyl geschützten Phosphatestern und legten hiermit die Grundlage für eine weitere Klasse photolabiler Schutzgruppen.<sup>[22]</sup> Neben den Phosphatestern lassen sich auch Sulfonate, Carboxylate und Phosphate gut photolytisch freisetzen. Darüber hinaus ist es auch möglich schlechtere Abgangsgruppen wie Thiole, Phenole, Alkohole und Amine zu photolysieren. Letztere lassen sich effizienter freisetzen, wenn sie über einen Carbonat- oder Carbamatlinker an das Cumarin gebunden sind. Dies führt jedoch dazu, dass die Decarboxylierung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Diese Reaktion ist im Allgemeinen sehr viel langsamer als die eigentliche Photolysereaktion.<sup>[17]</sup> Der Abspaltungsmechanismus wurde an 7-Alkoxy-substituierten Cumarinen **20** untersucht. Die Abspaltung erfolgt, nach Anregung in den tiefst liegenden angeregten Singulett-Zustand **21**, mittels einer heterolytischen Spaltung der C-X-Bindung (s. Abbildung 7), wobei das entstehende Cumarinylmethyl-Kation **22** entweder mit dem Solvens oder einem anderen vorhandenen Nukleophil zu einem neuen stabilen Coumarylmethyl-Produkt **23** abreagiert.<sup>[23]</sup>



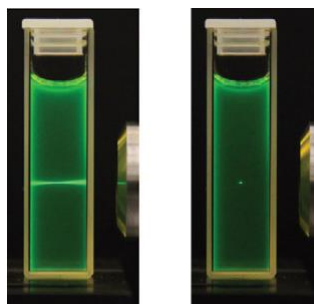
**Abbildung 7:** Photolysemechanismus von 7-Alkoxy-substituierten Coumarinderivaten in wässrigem Medium. X steht für Phosphate, Carboxylate oder Sulfonate. <sup>[23]</sup>

Bei den zwei in Abbildung 5 gezeigten Coumarinen handelt es sich um zwei besonders wichtige Vertreter dieser Gruppe. Das Diethylaminocoumarin (**DEACM**) hat sein Absorptionsmaximum durch die Einführung des starken Donors an der Position 7 bei Wellenlängen von 390–400 nm. Es besitzt einen hohen Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge von bis zu  $20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und die erreichbaren Photolyse-Quantenausbeuten sind recht hoch ( $\phi = 0,3$ ). Das 6-Brom-7-hydroxycoumarin (**Bhc**) zeichnet sich seinerseits durch einen hohen Zweiphotonenwirkungsquerschnitt ( $\delta_u$ ) aus (s. Abschnitt 1.1.3), der zumindest den nitrobenzylartigen Schutzgruppen der älteren Generation deutlich überlegen ist.<sup>[24]</sup> Die Technik des Zweiphotonen-Uncagings ist eine relativ neue Entwicklung, die das Potential hat, die Caging-Technologie zu einer wesentlich breiteren Anwendbarkeit zu führen.

### 1.1.3 Zweiphotonenaktivierung

Bereits 1931 wurde von Maria Göppert-Mayer theoretisch vorhergesagt, dass es möglich sein müsse, ein Atom durch die gleichzeitige Absorption (innerhalb 1 fs) von zwei energiegleichen Photonen in einen angeregten Zustand zu versetzen, welcher auf „normalem“ Weg durch die Absorption eines Photons der halben Wellenlänge und somit doppelter Energie erreicht werden kann. Die experimentelle Überprüfung dieser Theorie war jedoch erst mit der Entwicklung leistungsstarker Laser möglich.<sup>[7]</sup> Anfang der 1990er Jahre entwickelten Denk et al. auf diesem Effekt aufbauend die Zweiphotonenlaser-Scanning-Mikroskopie.<sup>[25]</sup> Im Jahr 1994 wurde die Zweiphotonenanregung erstmals zur photolytischen Freisetzung eines Neurotransmitters genutzt.<sup>[26]</sup> Sie hat gegenüber gewöhnlichen Einphotonenexperimenten einige Vorteile. Um die simultane Absorption zweier Photonen zu ermöglichen, benötigt man hohe Lichtintensitäten, da die Anregungswahrscheinlichkeit nicht wie beim Einphotonenprozess linear, sondern vielmehr quadratisch von der Lichtintensität abhängt. Deshalb werden für Zweiphotonenexperimente im Allgemeinen gepulste IR-Laser mit einer kurzen Pulsdauer (100 fs) und hoher Pulsfrequenz (80

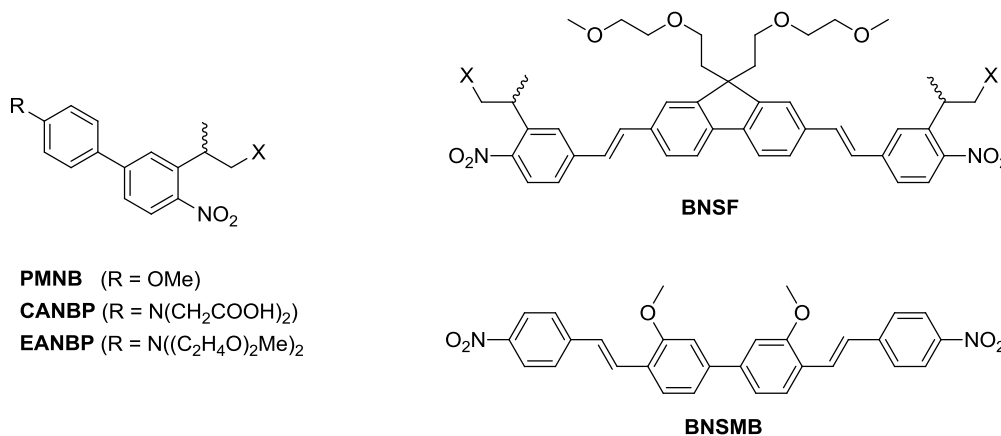
MHz) verwendet. Die benötigten Intensitäten werden nur im Fokus des Laserstrahls erreicht. Während man somit bei der Einphotonenanregung ein doppelkegelförmiges Anregungsprofil erhält, kann man mit Zweiphotonenanregung eine dreidimensionale Auflösung erreichen (s. Abbildung 8).<sup>[5]</sup>



**Abbildung 8:** Ortsauflösung der Zweiphotonentechnik. Die Anregung einer Fluoreszenzlösung mit einem UV-Laserstrahl ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) führt zu einem zylinderförmigen Fluoreszenzprofil (links). Hingegen lässt sich durch Zweiphotonenbestrahlung (rechts) mit einer Wellenlänge von  $730 \text{ nm}$  ein punktförmiges Anregungsprofil erhalten, weil nur im Fokus die Energiedichte für den nichtlinearen Zweiphotoneneffekt hoch genug ist. (Entnommen aus Brieke et al.)<sup>[5]</sup>

Mit der entsprechenden Fokussierung des Laserstrahls lassen sich Fokaltolumina bis zu  $1 \mu\text{m}^3$  adressieren.<sup>[7]</sup> Neben der besseren Auflösung existieren noch weitere Vorteile im Vergleich zur Einphotonenanregung. Zellen sind für das verwendete nahe IR-Licht transparent, das bedeutet, es kommt zu keiner Absorption durch zelleigene Moleküle. Außerdem ist auch die Streuung des Lichts deutlich geringer, sodass sich deutlich höhere Eindringtiefen erreichen lassen, was besonders für Anwendungen in biologischen Geweben wichtig ist (s. Abschnitt 3.3.7).<sup>[17]</sup> Die Effektivität einer photolabilen Schutzgruppe hinsichtlich einer Zweiphotonenentschützung lässt sich mit dem sogenannten Zweiphotonenwirkungsquerschnitt ( $\delta_u$ ) beschreiben. Dieser ist das Produkt ( $\delta_u = \delta_a \phi$ ) aus der Wahrscheinlichkeit einer Absorption, dem Zweiphotoneneinfangquerschnitt ( $\delta_a$ ) und der Quantenausbeute ( $\phi$ ). Ähnlich wie beim Einphotonenprozess ist die Effizienz des Zweiphotonenuncaging stark von der verwendeten Wellenlänge abhängig, da auch der Zweiphotoneneinfangquerschnitt, genau wie der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ), stark wellenlängenabhängig ist. Eine geeignete photolabile Schutzgruppe sollte ein  $\delta_u$  von mindestens  $0,1 \text{ Göppert-Mayer (GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1})$  haben.<sup>[24]</sup> Wie schon angedeutet, sind die für Einphotonenuncaging oft verwendeten klassischen *o*-Nitrobenzylschutzgruppen für Zweiphotonenexperimente nicht gut geeignet, da sie je nach Substituenten nur  $\delta_u$ -Werte von  $0,01$ - $0,035 \text{ GM}$  erreichen. Der Wirkungsquerschnitt kann jedoch durch Zugabe von Sensitizern<sup>[27]</sup> oder durch Anbringen eines geeigneten Chromophors<sup>[28]</sup> verbessert werden. Wie bereits erwähnt, ist das **Bhc** eine wesentlich bessere photolabile Schutzgruppe für Zweiphotonenexperimente mit einem  $\delta_u$  von bis zu  $1,0 \text{ GM}$ .<sup>[24]</sup> In den letzten

Jahren wurden aber auch neuere *o*-Nitrobenzylschutzgruppen entwickelt, die gut für Zweiphotonenexperimente geeignet sind wie die NDBF-Gruppe<sup>[12]</sup> ( $\delta_u = 0,6$  GM) und eine Serie von NPP-Derivaten, die von Goeldner et al. entwickelt wurden (s. Abbildung 9).



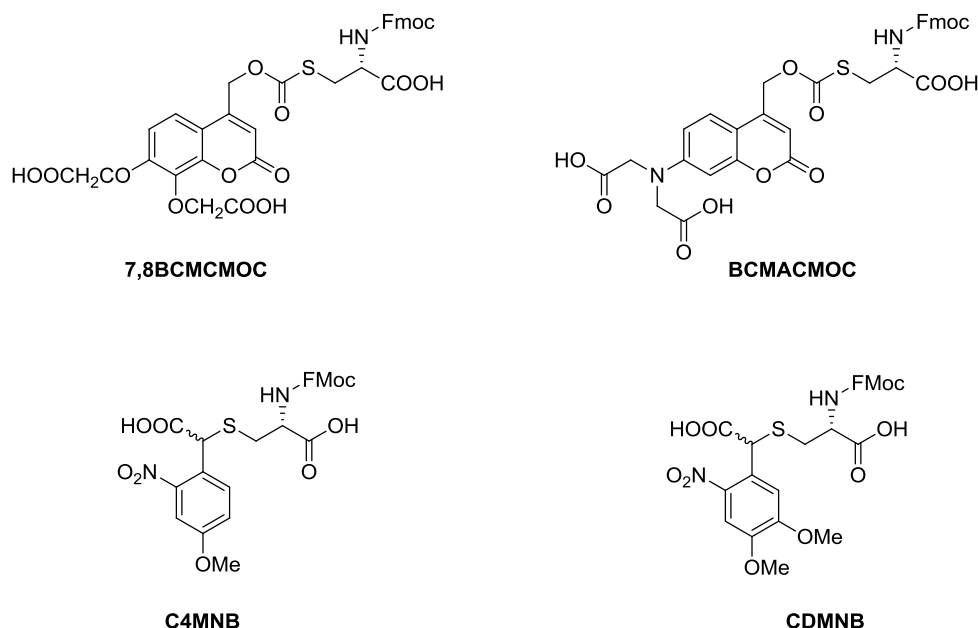
**Abbildung 9:** Übersicht verschiedener von Goeldner et al. eingeführter photolabiler Schutzgruppen mit verbessertem Zweiphotonenwirkungsquerschnitt  $\delta_u$ .<sup>[29–31]</sup> Als Designprinzipien wurden ein verlängertes  $\pi$ -System mit dipolarem Donor-Akzeptor System (**PMNB**, **CANBP**, **EANBP**) oder ein quadropolares Donor-Akzeptor-System (**BNSMB**, **BNSF**) verwendet. X steht jeweils für eine zu photolisierende Gruppe wie Glutamat oder GABA.

Dem Design der letzteren lag die Strategie zugrunde, dass eine Verlängerung des  $\pi$ -Systems oder eine dipolare oder quadropolare Anordnung von Donor- und Akzeptorgruppen an einem linearen  $\pi$ -System zu einem erhöhten Zweiphotoneneinfangquerschnitt führen sollte.<sup>[29]</sup> Aufbauend darauf wurden verschiedene gecagete Glutamat- und  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Derivate (GABA) entwickelt, zunächst die 3-(2-propyl)-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl-Schutzgruppe (**PMNB**) mit einem verbesserten  $\delta_u$  von 0,45 GM<sup>[30]</sup> und in der Folge die **BNSMB**- und **BNSF**-Gruppe<sup>[29]</sup> sowie schließlich das **CANBP** und **EANBP**. Das **EANBP**-geschützte GABA erreichte einen  $\delta_u$ -Wert von 11 GM, welches der beste bisher gemessene Wert für eine photolabile Schutzgruppe ist.<sup>[31]</sup>

#### 1.1.4 Orthogonales Uncaging

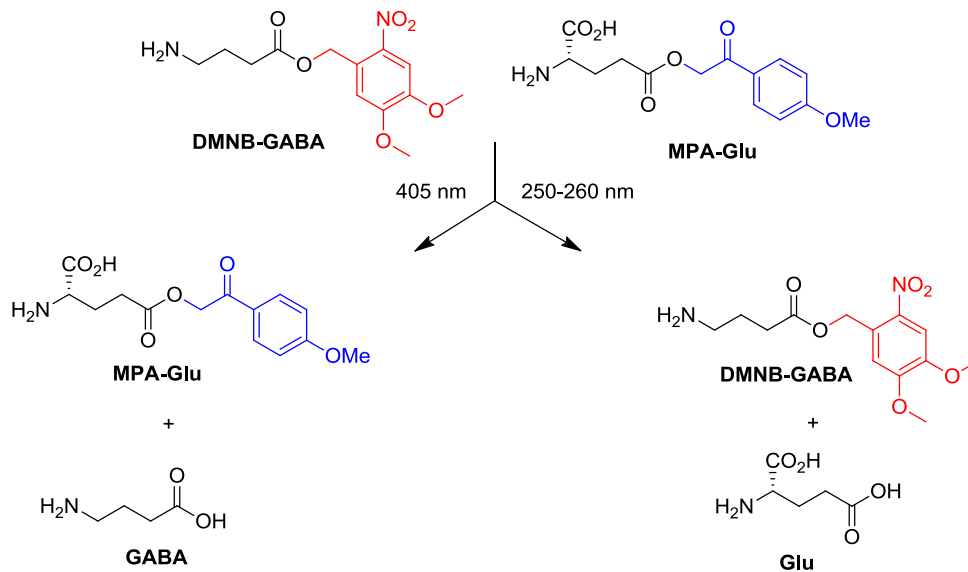
Ein Vorteil des Uncagings ist, dass man relativ gut ein binäres An/Aus-Verhalten zwischen geschütztem und entschütztem Biomolekül erhalten kann. Die Aktivität lässt sich nach dem Uncaging meist gut wieder vollständig herstellen. Ein Nachteil der photolabilen Schutzgruppen ist die Tatsache, dass es sich um einen irreversiblen Prozess handelt. Das bedeutet, dass man nur einmal vom inaktiven in den aktiven Zustand schalten kann. Wäre es möglich, mehrere unabhängig voneinander adressierbare photolabile Schutzgruppen in ein Molekül einzubringen, so könnte man noch wesentlich komplexere lichtsichtbare Systeme entwickeln, die über ein einfaches An- oder Ausschalten mit Licht hinausgehen würden.<sup>[5]</sup> Für das Prinzip mehrerer

unabhängig adressierbarer photolabiler Schutzgruppen wurde von Bochet et al. in Anlehnung an die chemische Orthogonalität von Schutzgruppen der Begriff chromatische Orthogonalität geprägt. Die photolabilen Schutzgruppen wurden in seinen Studien nicht im Sinne des Cagings, also zur temporären Maskierung von Biomolekülen verwendet, sondern als Alternative zu „klassischen“ orthogonalen Schutzgruppen in der Synthese.<sup>[32]</sup> Von Bochet wurde ein Chromophorpaar aus Derivaten des Nitroveratryls (**NV**) und des Benzoin (**BNZ**) (s. Kapitel 1.1.1 und 1.1.2) verwendet. Erstere wurden bei 420 nm abgespalten, letztere bei 254 nm. Durch gaschromatographische Untersuchungen an entsprechend photolabil geschützten Estern in Acetonitril konnten Selektivitäten von 10:90 bei 254 nm und 85:15 bei 420 nm erzielt werden.<sup>[32]</sup> Für biologische Anwendungen ist das verwendete UV-Licht von 254 nm zum Abspalten der Benzoin-Schutzgruppe jedoch nicht geeignet. Als Anwendung für das orthogonale Uncaging wurde beispielhaft die Festphasensynthese von Peptiden aufgezeigt, die damit ohne stark saure oder basische Reagenzien auskam. Hierbei wurde ein photospaltbarer Linker auf Basis eines *tert*-Butylketons (abspaltbar bei 305 nm) sowie NVOC-geschützte Aminosäuren (abspaltbar bei 360 nm) verwendet. So konnte Leu-Enkephalin, ein Pentapeptid ohne Verwendung von Säuren oder Basen in einer Ausbeute von 55 % hergestellt werden.<sup>[33]</sup> Das orthogonal adressierbare System aus Benzoin und Nitroveratryl-Schutzgruppen wurde von del Campo und Jonas für die ortsspezifische Modifikation von Glas- und Quarzoberflächen mit photoaktivierbaren Silanen verwendet. Nach Photoaktivierung ließen sich orts aufgelöst verschiedene Kolloidpartikel auf der Oberfläche assemblieren.<sup>[34]</sup> Eine zumindest sequenzielle Adressierbarkeit wurde auch mit dem Chromophorpaar **DEACM** und **NV** erreicht. Bei 412 nm ließ sich **DEACM** selektiv abspalten. Im nachfolgenden photolytischen Schritt bei 345 nm werden sowohl **NV** als auch **DEACM** abgespalten.<sup>[35]</sup> In einer Zusammenarbeit von Bochet und del Campo wurden verschiedene Nitrobenzyl-, Cumarin-, 7-Nitroindolin- und pHP-Derivate verwendet, um Oberflächen zu derivatisieren. Mit verschiedenen Kombinationen dieser Derivate konnten zwei, drei und sogar vier sequentielle wellenlängenselektive Entschützungen vorgenommen werden.<sup>[36]</sup> Die erste Anwendung des wellenlängenselektiven Uncagings in einem biologischen Kontext gelang der Gruppe von Hagen. Sie entwickelte gut wasserlösliche an der Thiolgruppe photolabil geschützte Cystein-Derivate, die sequenziell wellenlängenselektiv abgespalten werden können. Es wurden Derivate von Cumarinen und der CNB-Schutzgruppe verwendet (s. Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Von Hagen et al. verwendete photolabil geschützte Cystein-Derivate. Die Coumarin-Derivate **BCMCMOC** ( $\lambda_{\text{irr}} \geq 402 \text{ nm}$ ) und **7,8BCMCMOC** ( $\lambda_{\text{irr}} \geq 325 \text{ nm}$ ) lassen sich sequentiell wellenlängenselektiv spalten. In ähnlicher Weise lassen sich auch **BCMCMOC** ( $\lambda_{\text{irr}} \geq 430 \text{ nm}$ ) und **C4MNB** ( $\lambda_{\text{irr}} \geq 325 \text{ nm}$ ) sequentiell wellenlängenselektiv spalten.<sup>[37]</sup>

Die an den Cystein-Monomeren festgestellten Selektivitäten konnten abschließend erfolgreich in einem Modellpeptid mit zwei Cysteinen verwendet werden.<sup>[37]</sup> Die Anwendbarkeit des orthogonalen Uncagings wurde auch für Neurotransmitter gezeigt. Eine Mischung aus 4-Methoxyphenacyl-geschütztem Glutamat (**MPA-Glu**) und 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl-geschütztem GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) konnte erfolgreich zur selektiven Aktivierung bzw. Deaktivierung von Neuronen eingesetzt werden.<sup>[38]</sup> Bereits zuvor verwirklichte die Gruppe von Ellis-Davies an einem ähnlichen System die Kombination von Zweiphotonenentschützung und Wellenlängenselektivität. Es wurde ein 7-(Dicarboxymethyl)-aminocumarin geschütztes GABA-Molekül synthetisiert, welches sich mit Licht von 830 nm mithilfe der Zweiphotonentechnik entschützen lässt. In Kombination mit CDNI-geschütztem Glutamat, welches sich bei 720 nm entschützen lässt, wurde so ein System bimodaler Kontrolle von neuronalen Membranen generiert.<sup>[39]</sup> Eine Weiterentwicklung dieses Systems gelang erst kürzlich mit der Einführung des sogenannten DEAC450. Hierbei handelt es sich um ein Derivat des 7-Diethylaminocumarins, welches sich durch Verlängerung des  $\pi$ -Systems bei Wellenlängen bis zu 900 nm mittels Zweiphotonentechnik entschützen lässt. Die Entschützung bei dieser Wellenlänge ist 60-fach effizienter als bei 720 nm, sodass eine erheblich bessere Selektivität gegenüber Nitroaromaten-basierenden Schutzgruppen erreicht werden kann als zuvor.<sup>[40]</sup>

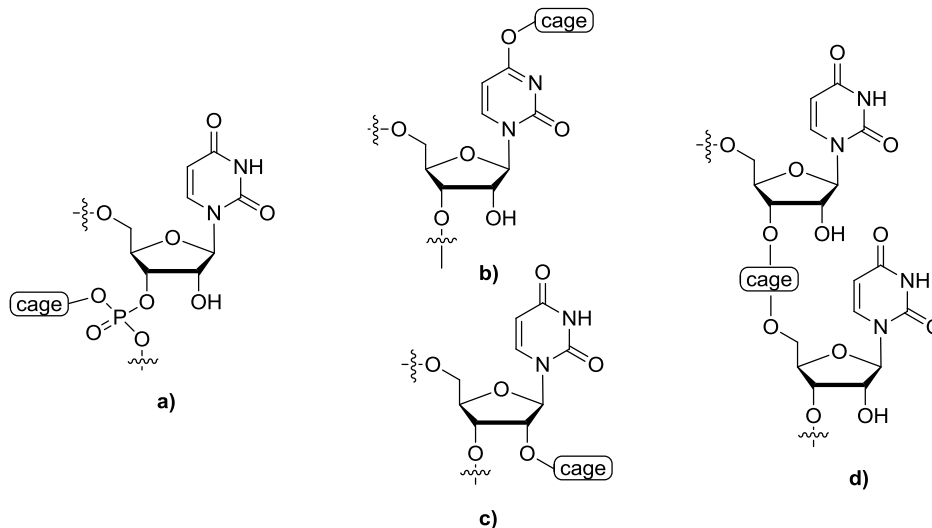


**Abbildung 11:** Aktivierung bzw. Deaktivierung neuronaler Aktivität durch wellenlängenselektive Freisetzung von **GABA** bzw. Glutamat (**Glu**) nach Conway et al. **DMNB-GABA** lässt sich durch Bestrahlung bei 405 nm freisetzen, **MPA-Glu** durch Bestrahlung bei 250-260 nm. Die Chromophore sind jeweils rot bzw. blau sind markiert.<sup>[38]</sup>

### 1.1.5 Caging von Nukleinsäuren

Wie bereits zu Beginn angedeutet, wurde das Prinzip des Cagings schon auf viele unterschiedliche Klassen von Biomolekülen angewendet. Während der Fokus der Anwendungen in der Vergangenheit auf der photolabilen Schützung kleiner Biomoleküle wie z.B. Neurotransmittern oder anderen für die Signaltransduktion zuständigen Molekülen lag, ist das Caging von Oligonukleotiden noch ein recht neues Feld. Beim Caging von Nukleinsäuren werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Der eine beruht auf einer statistischen Modifikation des Phosphatrückgrats, bei dem kein strukturell definiertes photolabil geschütztes Molekül vorliegt (s. Abbildung 12a). Der andere nutzt die selektive Einführung der photolabilen Schutzgruppen mittels entsprechend modifizierter Amidite, die in der Festphasensynthese an der gewünschten Position eingebaut werden (s. auch Kapitel 1.2). Bei der letzteren Methode sind wiederum drei verschiedene Strategien erprobt worden. Die photolabile Schutzgruppe kann entweder, sofern es sich um RNA-Oligonukleotide handelt, an der 2'-OH-Gruppe (s. Abbildung 12c), als photospaltbarer Linker zwischen zwei Nukleotiden (s. Abbildung 12d) oder an der Nukleobase zur Störung der Watson-Crick-Basenpaarung angebracht werden (s. Abbildung 12b).<sup>[5]</sup>

Ein Vorteil der selektiven Einführung gegenüber der statistischen Methode ist, dass selektiv gewünschte Positionen, die für die Funktionalität des Oligonukleotids maßgeblich sind, blockiert werden können.



**Abbildung 12:** Überblick verschiedener Strategien zum Caging von Oligonukleotiden am Beispiel eines Uridinnukleotids. Die statistische Rückgratmodifikation **a)** erfolgt durch Zugabe der Schutzgruppe als Diazo-Spezies zum gewünschten Oligonukleotid. Wird der Cage an der Nukleobase **b)**, an der 2'-OH-Gruppe **c)** oder als spaltbarer Linker zwischen zwei Nukleotiden **d)** angebracht, werden modifizierte Phosphoramidite für die DNA/RNA-Festphasensynthese verwendet.

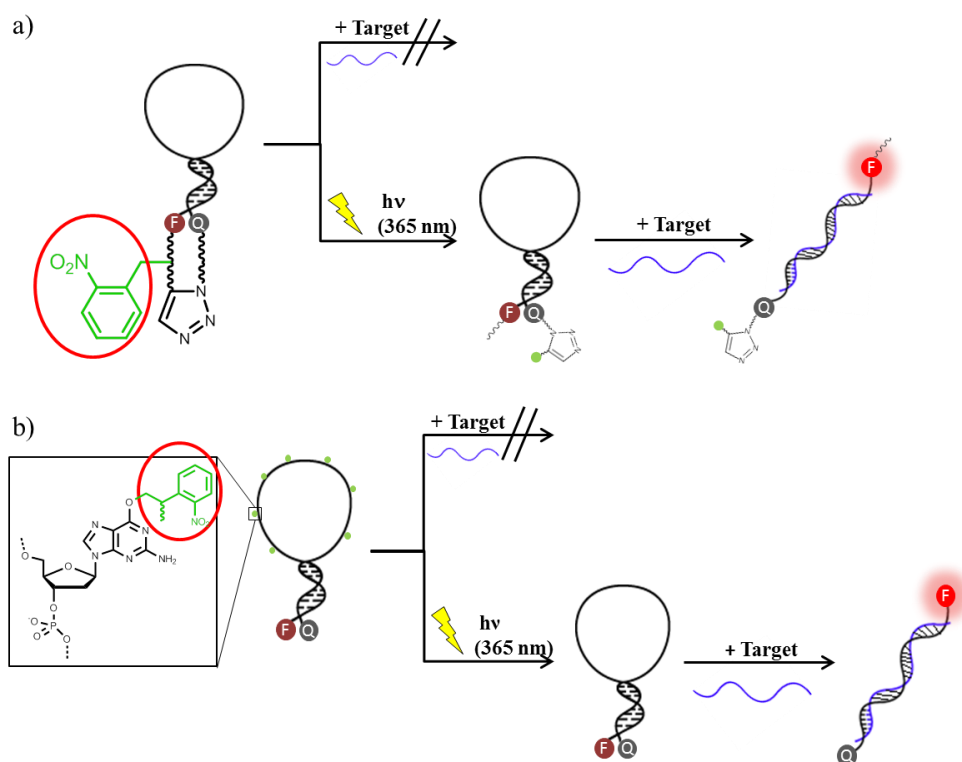
Die meisten bisher veröffentlichten Arbeiten zu photolabil geschützten Oligonukleotiden beschäftigten sich mit lichtgesteuerter Genregulation. Neben dieser Anwendung wurden jedoch auch einige andere Einsatzgebiete demonstriert. Die Gruppe von Komiyama verwendete NPP-geschütztes Thymidin in Primern für PCR-Ansätze. Die Polymerase wurde dadurch bei der Synthese des Gegenstrangs beim Einbau des gegenüberliegenden Adenosin-Nukleotids gestoppt. Dadurch konnten Produkte mit sogenannten „sticky ends“ erhalten werden, die direkt ohne Restriktionsverdau ligiert werden konnten.<sup>[41]</sup>

Eine weitere interessante Anwendung wurde von Metzker et al. vorgestellt. Hierbei wurden Adenosintriphosphate, die an der exozyklischen Aminofunktion photolabil geschützt waren, für einen Echtzeitsequenzierungsansatz verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Verwendung sogenannter reversibler Terminatoren. Hierbei kann die Polymerase immer zunächst nur ein Nucleosidtriphosphat einbauen, die weitere Primerverlängerung ist durch Blockierung einer wichtigen funktionellen Gruppe, in diesem Fall der Nucleobase mit einer photolabilen Schutzgruppe, temporär nicht möglich. Jeder Nucleobase wird durch Anbringen eines Fluorophors eine Farbe zugeordnet, sodass man anhand der eingebauten Farbe erkennen kann, welches Nucleotid eingebaut wurde. Nach Abspalten des reversiblen Terminators, hier also nach Belichtung, erfolgt eine weitere Verlängerung um eine Base usw.<sup>[42]</sup>

„Molecular Beacons“ sind ein wichtiges Instrument zur Detektion von mRNA in Zellen. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide mit einer Stamm-Schleifen-Struktur, die an den beiden Enden mit einem Fluorophor bzw. einem Quencher-molekül modifiziert sind. Ist keine Ziel-mRNA vorhanden, so sorgt der FRET-Effekt dafür, dass keine oder nur geringe Fluoreszenz zu



beobachten ist. Bindet die Zielsequenz in der Schleifenregion, so wird der Stamm geöffnet und Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt, was sich in einem Anstieg der Fluoreszenz bemerkbar macht.<sup>[43]</sup> Heckel et al. und Tan et al. entwickelten beide unterschiedliche Konzepte, um Molecular Beacons mit Licht aktivierbar zu machen. Dies hat den Vorteil, dass durch die Beacons erst dann ein Fluoreszenzsignal generiert wird, wenn die Ziel-mRNA vorhanden ist und die entsprechende Stelle mit fokussiertem UV-Licht eines Lasers bestrahlt wurde. Man erhält so eine deutlich niedrigere Hintergrundfluoreszenz, was ein Beobachten des mRNA-Transports in der Zelle erheblich vereinfacht.<sup>[5]</sup> Das Konzept von Heckel et al. beruhte darauf, dass die Nucleobasen der Schleifenregion mit photolabilen Schutzgruppen versehen wurden, wodurch eine Bindung an die Ziel-mRNA erst nach Bestrahlung erfolgen konnte (s. Abbildung 13b).<sup>[44]</sup> Tan et al. versahen den Stamm mit einem photospaltbaren Linker, sodass die Stammregion erst nach Bestrahlung geöffnet werden konnte, also erst nach Bestrahlung ein Fluoreszenzsignal detektierbar ist (s. Abbildung 13a).<sup>[45]</sup>



**Abbildung 13:** Prinzip lichtaktivierbarer Molecular Beacons. **a)** Design nach Tan et al.<sup>[45]</sup> Fluorophor und Quencher im Stamm des Beacons werden mit einem lichtspaltbaren Linker auf *o*-Nitrobenzylbasis kovalent verknüpft. Der Beacon kann erst geöffnet werden und somit Fluoreszenz bei Bindung einer Ziel-mRNA anzeigen, wenn vorher mit UV-Licht bestrahlt wurde. **b)** Design nach Heckel et al.<sup>[44]</sup> Einige Nucleobasen in der Schleifenregion sind mit photolabilen Schutzgruppen ausgestattet, um die Basenpaarung mit der Ziel-mRNA zu stören. Der Beacon kann erst binden, wenn die photolabilen Schutzgruppen mit UV-Licht abgespalten worden sind. Nur dann wird ein Fluoreszenzsignal generiert.

Die Gruppen von Schwalbe und Silverman nutzten gecagete Oligonukleotide in mehreren Studien zur Untersuchung der RNA-Faltung mittels NMR-Spektroskopie<sup>[46,47]</sup> bzw. mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).<sup>[48]</sup> Unter anderem wurde die Liganden-induzierte RNA-Faltung an einem Riboswitch aus *bacillus subtilis* untersucht sowie die Kinetiken von Konformationsübergängen bistabiler 20mer RNA-Oligonukleotide.<sup>[49,50]</sup>

### 1.1.5.1 Caging von Oligonukleotiden zur lichtgesteuerten Genregulation

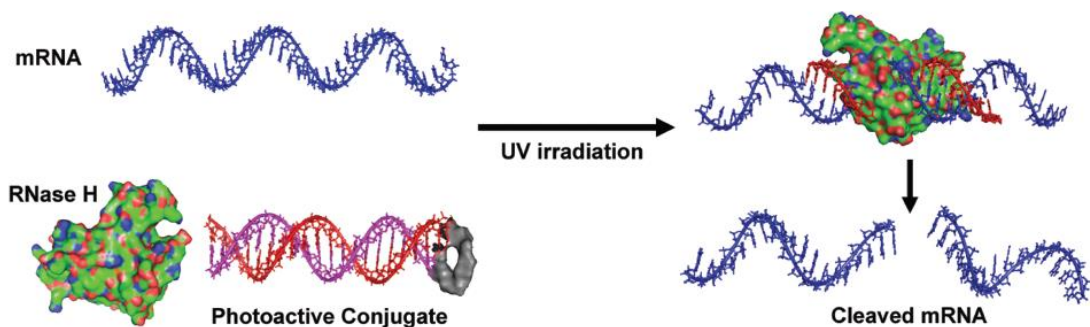
Um die Genregulation mithilfe photolabil geschützter Oligonukleotide lichtsteuerbar zu machen, wurden in den letzten Jahren viele verschiedene Strategien entwickelt, die sich unterschiedliche zelluläre Mechanismen zunutze machen.

Zur lichtgesteuerten Regulation der Transkription existieren drei verschiedene Ansätze. Deiters et al. verwendeten dafür photolabil geschützte Köder-Moleküle, sogenannte „DNA-Decoys“, um die NF- $\kappa$ B regulierte Transkription durch Bestrahlung zu inaktivieren. In Anwesenheit des geschützten Decoys kann sich NF- $\kappa$ B an seine Bindestelle in der DNA anlagern und dadurch die Transkription initiieren. Wird das Decoy-Oligonukleotid jedoch bestrahlt und somit entschützt, bindet NF- $\kappa$ B an dieses und wird so von seiner Bindestelle an der zu transkribierenden DNA entfernt, was zu einem Stoppen der Transkription führt.<sup>[51]</sup> Heckel et al. gelang die lichtgesteuerte Regulation der Transkription durch Verwendung einer photolabil geschützten T7-Promotorsequenz. Diese von der T7-RNA-Polymerase spezifisch benötigte Sequenz wurde an mehreren Thymidin-Nucleotiden mit photolabilen Schutzgruppen versehen, sodass sich vorübergehend keine Watson-Crick Basenpaarungen mit einem Templatstrang bilden konnten. Da die T7-RNA-Polymerase aber einen intakten Doppelstrang als Erkennungssequenz benötigt, konnte die Transkription nicht stattfinden. Nach Bestrahlung mit UV-Licht wurde der intakte Promotor regeneriert und das Transkriptionsprodukt konnte erhalten werden. Hierbei gelang es, ein binäres An/Aus-Verhalten zu realisieren, d.h. nach Bestrahlung war die Menge an Transkriptionsprodukt gleich hoch wie bei der Verwendung der nativen Sequenz.<sup>[52]</sup> In einer weiteren Arbeit zur lichtgesteuerten Transkription verwendeten Deiters et al. sogenannte Triplexformende Oligonukleotide (TFOs). Diese lagern sich mittels Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindung an die Promotorregion der DNA an und verhindern so eine Bindung von Transkriptionsfaktoren. Mithilfe von gecageten TFOs konnte so die Transkription von Cyclin D1 in MBA-MD-231 Zellen lichtschtbar gemacht werden.<sup>[53]</sup>

Dmochowski et al. verwendeten sogenannte „RNA bandages“, zwei kurze durch einen photospaltbaren Linker kovalent verbundene Antisense-Oligonukleotide, um die *in vitro* Translation einer GFP-mRNA mit Licht zu kontrollieren. Diese „RNA bandages“ wurden so konstruiert, dass sich ein hoher Unterschied zwischen der Affinität der einzelnen Oligonukleotidstränge und dem durch den Linker verbundenen Gesamtstrang zur

komplementären mRNA ergab. Dies führte dazu, dass die Affinität zur Ziel-mRNA nach der Photospaltung des Linkers nicht mehr ausreichte, um die Translation zu verhindern. Vor der Bestrahlung führte die Bindung des Antisense-Moleküls an die mRNA jedoch zu einer Reduktion des Translationslevels auf 30 %, wie anhand der GFP-Fluoreszenz des Translationsprodukts gezeigt werden konnte.<sup>[54]</sup>

In etlichen Studien zur lichtgesteuerten Genregulation wurde ein klassischer Antisense-Ansatz verfolgt. Hierbei kommt es zu einer Hybridisierung eines Oligonukleotids an die mRNA, was entweder zur Blockierung derselben oder zu einer Spaltung der mRNA durch RNase H führt. Die Gruppe von Dmochowski synthetisierte ein photoaktivierbares Antisense-Reagenz gegen *c-myb*-RNA. Hierbei handelte es sich um ein Desoxyoligonukleotid, welches am 3'-Ende über einen photospaltbaren Linker mit einem teilweise komplementären Sense-Strang verbunden war (s. Abbildung 14).



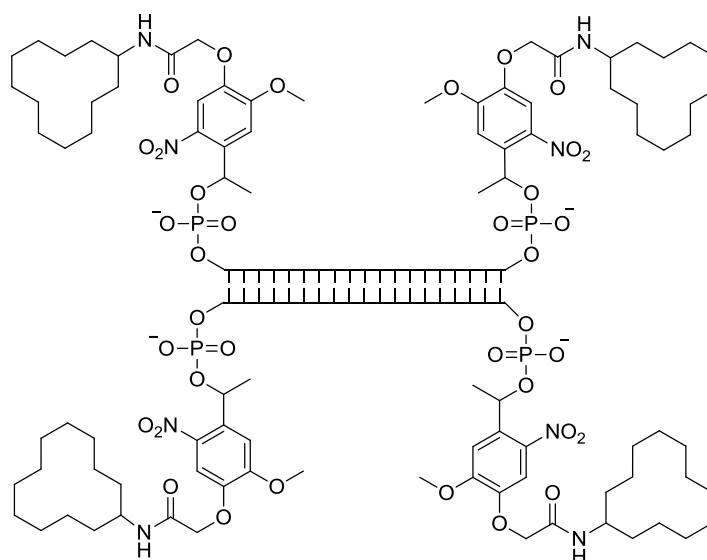
**Abbildung 14:** Prinzip eines photoaktivierbaren Antisense-Reagenzes nach Dmochowski. Das Antisense-Oligonukleotid (rot) wird über einen photospaltbaren Linker (grau) mit einem teilweise komplementären Sense-Strang verbunden und ist so inaktiv. Nach Bestrahlung wird der Linker gespalten und der komplementäre Sense-Strang kann wegdiffundieren. Das Antisense-Oligonukleotid ist nun aktiv und kann mRNA vermittelt durch RNase H spalten. (Entnommen aus X.Tang et al.)<sup>[55]</sup>

Nach Photolyse wurde der photospaltbare Linker und somit der Sense-Strang abgespalten. Dadurch konnte das Oligonukleotid an die *c-myb* mRNA binden. Dies führte zu einem per Real Time PCR detektierbaren Abbau der mRNA und der Photoregulation des Proteinlevels in humanen Leukämiezellen.<sup>[55]</sup> In einer weiteren Studie wurde mit einer vergleichbaren Strategie ein Antisense-Reagenz auf Basis negativ geladener PNA hergestellt, welches in Zebrafischembryonen die Chordin-Expression lichtgesteuert regulierte.<sup>[56]</sup> Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch Deiters et al., die photolabil geschützte Morpholinos, ein ungeladenes Oligonukleotidderivat, verwendeten, um in Zebrafisch-Embryonen die Chordin-Expression lichtgesteuert zu regulieren. Eine Störung in der Expression des Chordin-Gens führt zu einer ausgeprägten Fehlbildung des Zebrafischembryos. Deiters et al. gelang es zu zeigen, dass nach Injektion des photolabil geschützten Morpholinos diese Fehlbildung nur dann auftritt, wenn die Embryos zusätzlich mit UV-Licht bestrahlt wurden.

Ein klassisches Antisense-Reagenz, beruhend auf Desoxynukleotiden mit Phosphorothioaten, wurde von Deiters et al. mit NPOM-gekageten Thymidinen versehen und in Maus-Fibroblasten transfiziert. Hiermit konnte die Expression eines Luciferase-Gens, welches nach Transfektion eines bakteriellen Vektors in die Fibroblasten eingebracht worden war, mithilfe von Licht örtlich aufgelöst gesteuert werden.<sup>[57]</sup>

Eine weitere interessante Möglichkeit lichtgesteuerter Genregulation besteht in der Verwendung lichtaktivierbarer siRNAs. Die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet beruhten alle auf der Methode des statistischen Cagings, bei dem ein unmodifiziertes Oligonukleotid mit einer Diazo-Spezies der photolabilen Schutzgruppe umgesetzt wird. Friedman et al. verwendeten dazu ein Hydrazon der DMNPE-Schutzgruppe, setzten dieses mit  $MnO_2$  um und versetzten nach Filtration dieses Reaktionsgemisch *in situ* mit der gelösten siRNA so, dass die photolabile Schutzgruppe in 100-fachem Überschuss vorlag. Mit dieser Methode wurden siRNA-Duplexe erhalten, die im Schnitt 1,4 photolabile Schutzgruppen enthielten. Hierbei gelang es zwar, die Aktivität der siRNA gegen eine GFP-mRNA in HeLa-Zellen nach Bestrahlung wieder vollständig herzustellen, jedoch verfügte die geschützte siRNA noch über eine hohe Restaktivität.<sup>[58]</sup>

In einer weiteren Studie wurde die photolabile Schutzgruppe selektiv an das 5'-Phosphatende des Antisense-Strangs der siRNA angebracht. Im Widerspruch zur damaligen Annahme, dass eine Modifikation am 5'-Phosphat zu einer kompletten Inaktivierung der RNA-Interferenz führt, konnte auch hier kein vollständiges An/Aus-Verhalten beobachtet werden. Dieses Problem wurde in einer späteren Arbeit dadurch gelöst, dass eine sterisch anspruchsvollere Cyclododecyl-DMNPE Schutzgruppe (CD-DMNPE) entwickelt wurde, welche die Wechselwirkungen zwischen siRNA-Duplex und den an der RNA-Interferenz beteiligten Proteinen besser verhindert (s. Abbildung 15). Durch Verwendung eines RNA-Duplexes ohne Überhänge und mit vier terminalen Phosphaten, die alle mit einer CD-DMNPE Gruppe modifiziert waren, konnte so ein komplett binäres An/Aus-Verhalten erzielt werden.<sup>[59]</sup>



24

**Abbildung 15:** Schematische Darstellung eines CD-DMNPE geschützten siRNA-Duplexes **24** nach Friedman et al.. Die Einführung des sterisch anspruchsvollen Cyclododecylrings führt dazu, dass die siRNA in der geschützten Form vollständig inaktiv ist. Die Schutzgruppe wird an den terminalen Phosphaten als Diazoderivat eingeführt.<sup>[59]</sup>

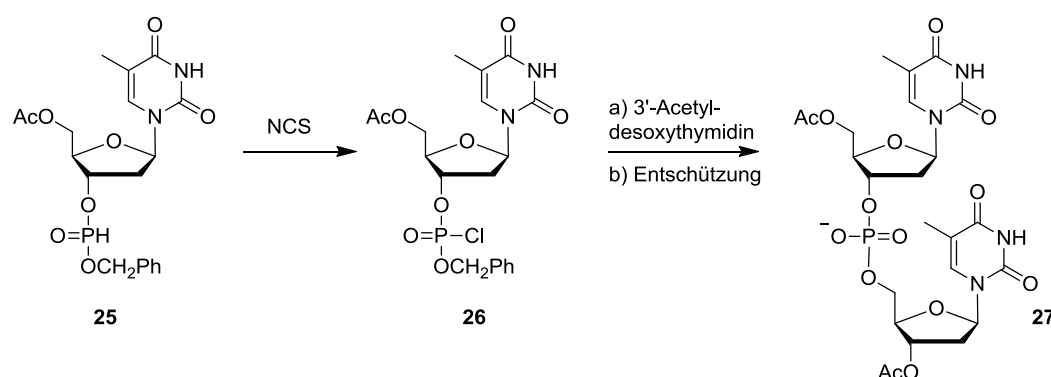
Monroe et al. verwendeten in einer *in vivo* Studie 2'-F modifizierte siRNAs gegen GFP die statistisch mit der DMNPE-Schutzgruppe geschützt wurden. In Zebrafischen konnte so eine Lichtschaltbarkeit der siRNA-Aktivität nachgewiesen werden.<sup>[60]</sup>

Einen anderen Ansatz zur Lichtregulation der RNA-Interferenz verfolgten Heckel et al. Basierend auf der Tatsache, dass die mRNA immer zwischen dem 10. und 11. Nukleotid, gezählt vom 5'-Ende der siRNA her, geschnitten wird, wurden verschiedene siRNAs synthetisiert, die in genau diesem Bereich mit photolabil geschützten Nukleobasen versehen waren. Dadurch wurde die Basenpaarung mit dem Nachbarnukleotid in der mRNA gestört und es war keine RNAi-Aktivität in einem GFP-Reporterassay mehr nachweisbar. Nach Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) wurde wieder die gleiche RNAi-Effizienz erreicht wie mit einem unmodifizierten siRNA-Duplex. Es wurde angenommen, dass der Grund für die Störung der RNAi-Aktivität in der Inhibierung der Slicer-Aktivität, also dem Schneiden der mRNA, liegt. Dies wurde damit untermauert, dass bei einer Störung eines vorherigen Schrittes auch Störungen im Sense-Strang des siRNA-Duplexes zu ähnlichen Effekten hätten führen müssen.<sup>[61]</sup>

Eine neue Entwicklung der letzten Jahre ist die lichtgesteuerte Regulation der miRNA-Aktivität. Dieser Ansatz wurde auch in dieser Arbeit verfolgt und soll daher im Allgemeinen Teil besprochen werden.

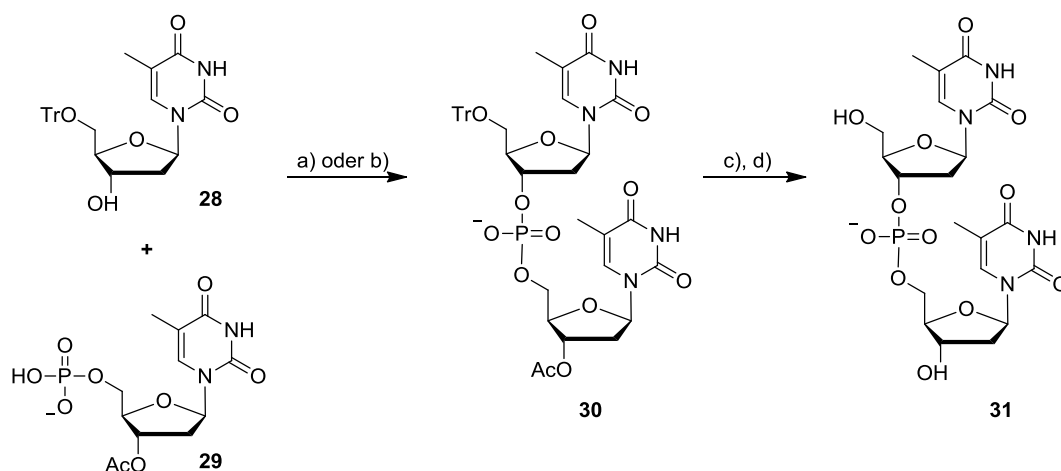
## 1.2 Festphasensynthese von Oligonukleotiden

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Studien und auch Fortschritte in anderen Bereichen der Nukleinsäureforschung, wie z.B. die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR), wurde erst durch die Entwicklung der chemischen Festphasensynthese von Oligonukleotiden ermöglicht. In den letzten Jahrzehnten wurden hierbei sowohl hinsichtlich der Ausbeuten, der erzielbaren Längen der Oligonukleotide sowie der Möglichkeit Modifikationen einzubringen, enorme Fortschritte erzielt. Im Jahr 1955 berichteten Todd und Michelson als erstes über die Synthese eines Thymidindinukleotids mit der natürlichen 3'→5'-Internukleotidverknüpfung. Hierzu wurde das 5'-*O*-Acetyl geschützte Thymidin-Phosphonat **25** mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS) zum Phosphorchloridat **26** aktiviert und dann mit 3'-*O*-Acetylthymidin zum geschützten Dinukleotid umgesetzt aus dem nach Entfernen der Benzylschutzgruppen das am Phosphat entschützte Dinukleotid **27** erhalten wurde (s. Abbildung 16). Die verwendeten Benzylschutzgruppen erwiesen sich aber in der Folge als ungeeignete Schutzgruppen für die Darstellung längerer Oligonukleotide.<sup>[62]</sup>



**Abbildung 16:** Synthese eines geschützten Thymidindinukleotids nach Todd et al. mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS) als Aktivierungsreagenz.<sup>[62]</sup>

Im folgenden Jahrzehnt verfolgte man dann zunächst die sogenannte Phosphordiester-Strategie, entwickelt von H. G. Khorana. Hierbei wurde der verknüpfende Phosphordiester überhaupt nicht mehr mit Schutzgruppen versehen. Das 3'-OH des einen Nukleosids **28** wurde hierbei in Anwesenheit eines Aktivators wie *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (*p*-TsCl) oder Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) mit einem 5'-Phosphat des anderen Nukleosids **29** zur Reaktion gebracht, wobei direkt der Phosphordiester **30** erhalten wurde, an dem nur noch die Schutzgruppen am 5'- und am 3'-Ende entfernt werden mussten, um das fertige Dinukleotid **31** zu erhalten (s. Abbildung 17).

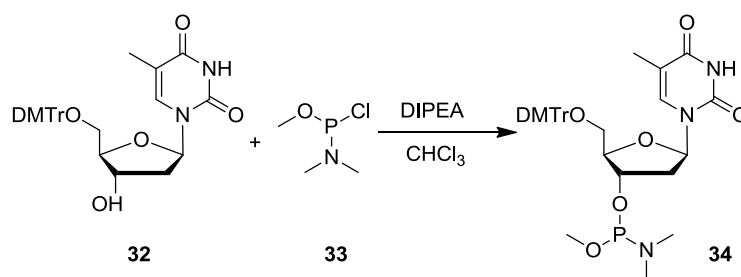


**Abbildung 17:** Synthese eines Thymidindinucleotids nach Khorana et al.<sup>[63]</sup> a) TsCl, Pyridin; b) DCC, Pyridin; c) AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1 v/v); d) NaOH, H<sub>2</sub>O.

Die Phosphordiester-Strategie hat sich jedoch nicht durchgesetzt, da nur Ausbeuten im Bereich von 50-70 % für die Bildung eines Dinucleotids erreicht werden konnten. Aufgrund der Anwesenheit geladener Phosphordiesterbindungen kommt es bei dieser Strategie zu Nebenreaktionen. Im Zuge der Entwicklung der Phosphordiester-Strategie wurden jedoch schon Schutzgruppen benutzt, die bis heute Verwendung finden, wie die säurelabile Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) für das 5'-OH und basenlabile Schutzgruppen wie die Benzoylschutzgruppe für Adenosin und die *Isobutyryl*-Schutzgruppe für Guanosin.<sup>[52,53]</sup>

Einen weiteren wichtigen Fortschritt in der Entwicklung der Oligonucleotidsynthese erreichten Letsinger et al. 1976 mit der Erkenntnis, dass dreiwertige Phosphorspezies wesentlich reaktivere Acylierungsreagenzien sind als fünfwertige Phosphorspezies. So ließ sich die 3'-OH-Gruppe eines geschützten Thymidinderivats schon bei -78°C mit Phosphordichloridit umsetzen, was dann mit einem 3'-geschützten Thymidinderivat zum Dinucleosidphosphit abreagierte. Diese Spezies wurde *in situ* zum gewünschten Phosphatriester umgesetzt. Ein Nachteil dieser Methode bestand jedoch darin, dass aufgrund der Reaktivität der gebildeten Phosphitspezies neben der gewünschten 3'→5'- auch eine 3'→3'- und eine 5'→5'-Internucleotidverknüpfung erhalten wurde.<sup>[66]</sup>

Aufbauend auf der Phosphittriestermethode wurde von Beaucage et al. Anfang der 1980er Jahre die auch heute noch verwendete Phosphoramidit-Methode entwickelt. Diese Methode erlaubte eine Handhabung der Reagenzien bei Raumtemperatur und an Luft, was eine erhebliche Vereinfachung zu den sehr reaktiven und nur bei tiefer Temperatur stabilen Phosphorchloriditen darstellte. Außerdem entstanden bei der Reaktion der Phosphoramidite mit 3'-geschützten Thymidinen keinerlei symmetrische Dimere. Zu Beginn wurde dabei das Chlor(dimethylamin)-methoxyphosphin **33** zur Synthese des Phosphoramidits **34** aus dem 5'-O-DMTr geschützten Nucleosid **32** verwendet (s. Abbildung 18).<sup>[67]</sup>



**Abbildung 18:** Synthese eines Thymidinphosphoramidits mithilfe von Chlor(dimethylamin)-methoxyphosphin **33** ausgehend von 5'-*O*-Dimethoxytritylthymidin **32** nach Beaucage et al.<sup>[67]</sup>

Später stellte sich heraus, dass die Diisopropylaminderivate stabiler als die Dimethylaminderivate sind<sup>[68]</sup> und dass die 2-Cyanoethylphosphoramidite besser als die entsprechenden Methylester geeignet sind, da sich die Cyanoethyl-Schutzgruppe zusammen mit den Basenschutzgruppen mit Ammoniak abspalten lässt.<sup>[69]</sup>

Aufbauend auf der Entwicklung der Festphasensynthese von Peptiden durch Merrifield<sup>[70]</sup> wurde in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts auch die Festphasensynthese von Oligonukleotiden unter anderem von Mateucci und Caruthers intensiv erforscht. Die ersten Versuche einer festphasengebundenen Oligonukleotidsynthese wurden jedoch schon im Jahr 1966 von Letsinger und Mahadevan unternommen.<sup>[71]</sup> Sie verwendeten dafür ein sogenanntes „popcorn“-Copolymer aus Styrol, Vinylbenzoesäure und *p*-Divinylbenzol, welches mittels eines Säurechlorids entweder an die exocyclische Aminofunktion eines Cytidins, an das 3'-OH oder an das 5'-OH des Startnukleosids gebunden wurde. Hierbei wurde noch die recht ineffiziente Phosphordiester- bzw. Phosphortriester-Methode verwendet. Im Vergleich zur Synthese in Lösung hat die aufeinanderfolgende Kondensation der Einzelbausteine an einen festen Träger einige entscheidende Vorteile. Vor allem gestaltet sich die Aufreinigung von Oligomeren wesentlich einfacher, da die zeitaufwändigen Aufarbeitungsschritte, wie sie bei einer Synthese in Lösung benötigt werden, entfallen. Überschüssige Reagenzien werden einfach durch entsprechende Waschschritte mit dem verwendeten Lösemittel von der festen Phase entfernt.<sup>[72]</sup>

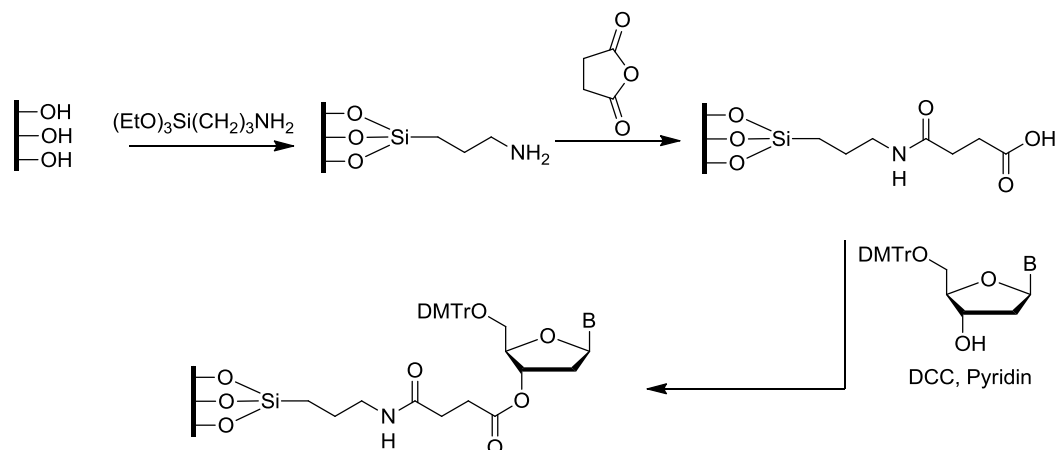
An den festen Träger werden bestimmte Anforderungen gestellt:

1. Möglichst unlöslich und inert im verwendeten Lösemittel,
2. Vorhandensein von funktionellen Gruppen, die eine kovalente Anbindung des zu synthetisierenden Produkts erlauben,
3. keine Störung der chemischen Reaktion durch die Struktur der polymeren Matrix (z.B. durch verhinderte oder verlangsamte Diffusion der reagierenden Moleküle).

Die zunächst verwendeten polymeren Träger erfüllten diese Anforderungen nur unzureichend, sodass sich die Verwendung des sogenannten Controlled Pore Glass (CPG) durchgesetzt hat.



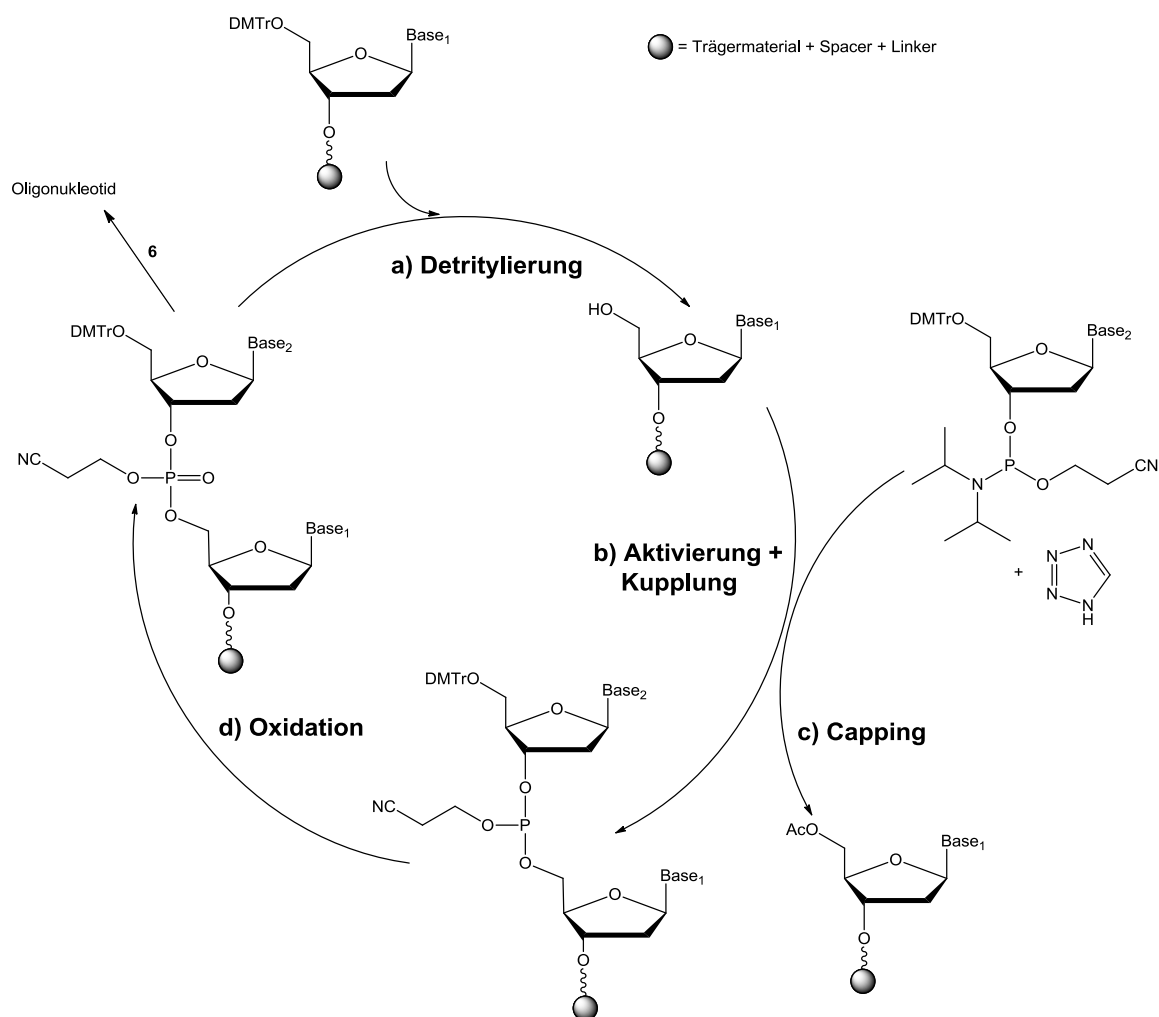
Hierbei handelt es sich um funktionalisierte sphärische Glaskügelchen. Die Größe der Poren, die das CPG-Material enthält, spielt für die zu erzielende Länge der Oligonukleotide aufgrund der verringerten Diffusion ab einer bestimmten Oligonukleotidlänge eine wichtige Rolle. Das Startnukleosid wird kovalent über einen Spacer an die feste Phase gebunden. Zur entsprechenden Funktionalisierung des CPG-Materials werden besonders Alkylamine verwendet, an die beispielsweise eine Succinyl-Gruppe gekuppelt wird. Über eine basisch abspaltbare Esterbindung wird dann das Startnukleosid über die 3'-OH-Gruppe an die feste Phase gebunden (s. Abbildung 19).<sup>[73]</sup>



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung des Reaktionsweges zur Beladung eines CPG-Trägermaterials mit einem geschützten Desoxynukleosid nach Beaucage et al.<sup>[72]</sup> Auf der Glasoberfläche befindliche Hydroxygruppen werden zunächst mithilfe eines Silylethers aminoalkyliert. Die freie Aminogruppe wird dann mit Bernsteinsäureanhydrid acyliert und anschließend über die freie Säuregruppe mit dem 3'-OH des Nukleosids verestert.

Es zeigte sich im Zuge verschiedener Studien, dass die Länge des Spacers bedeutsam für die Syntheseausbeuten ist. Daher wird heute zumeist ein Träger mit verlängertem Linker, das sogenannte LCAA-CPG Material, verwendet. LCAA steht hierbei für „long chain amino alkyl“. Neben diesem CPG-Material werden auch Trägermaterialien auf Polystyrolbasis verwendet, die mit Aminomethylgruppen funktionalisiert werden.<sup>[63]</sup>

Aufbauend auf dem Phosphoramiditverfahren, der Entwicklung der geeigneten Trägermaterialien und der sorgfältigen Entwicklung der Schutzgruppenstrategie ist es möglich, die Oligonukleotidsynthese zu automatisieren. Heute stehen dafür Synthesizer verschiedener Firmen zur Verfügung, an denen in unterschiedlichsten Ansatzgrößen gleichzeitig mehrere Synthesen ablaufen können. Die automatisierte Festphasensynthese läuft beginnend vom ersten, am festen Träger gebundenen Nukleosid von 3'- in 5'-Richtung, also entgegen der Syntheserichtung von Polymerasen in der Natur, ab. Die Oligonukleotidkette wird schrittweise um ein Nukleotid verlängert, wobei für jede Addition ein Zyklus von vier aufeinanderfolgenden Reaktionen abläuft, wie in Abbildung 20 gezeigt.


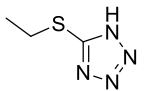
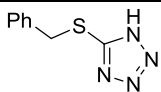
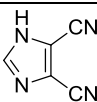


**Abbildung 20:** Schematische Darstellung der Oligonukleotidfestphasensynthese. Es wird jeweils ein Zyklus von vier Schritten durchlaufen. Im Einzelnen werden folgende Reagenzien verwendet. a) 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan; b) 1*H*-Tetrazol, Acetonitril; c) Acetanhydrid, 2,6-Lutidin, 1-Methylimidazol, THF; d) I<sub>2</sub>/Pyridin/H<sub>2</sub>O/THF.

Im ersten Schritt erfolgt die Abspaltung der säurelabilen DMTr-Schutzgruppe mit 3 %iger Trichloressigsäure in Dichlormethan. Im zweiten Schritt wird das zu kuppelnde Phosphoramidit zunächst mit 1*H*-Tetrazol oder anderen Tetrazolderivaten aktiviert und dann mit dem 5'-OH des festphasengebundenen Nucleosids zur Reaktion gebracht, wobei die neue Phosphittriesterebindung gebildet wird. Das Tetrazol fungiert bei der Aktivierung als nukleophiler und saurer Katalysator. Es protoniert den Diisopropylaminrest, der so zu einer besseren Abgangsgruppe wird. Es gibt aber zusätzlich mechanistische Hinweise, dass das Tetrazolidion als Nukleophil fungieren kann und zunächst am Phosphor angreift. Dabei wird Diisopropylamin abgespalten und ein Tetrazoylphosphonit gebildet. Erst im nächsten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff der 5'-OH-Gruppe am Phosphoratom unter Rückgewinnung des Tetrazols.<sup>[62,63]</sup> Neben 1*H*-Tetrazol wird in letzter Zeit, besonders für die RNA-Festphasensynthese, vermehrt auch 5-Ethylthio-1*H*-Tetrazol

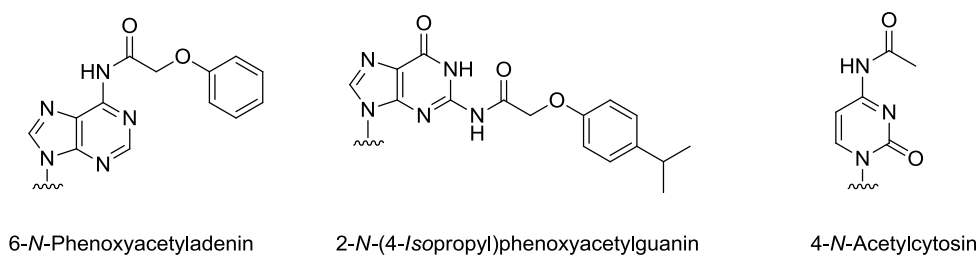
oder 5-Benzylthio-1*H*-Tetrazol verwendet. Der Vorteil dieser beiden Aktivatoren liegt in ihrer erhöhten Acidität sowie in der verbesserten Löslichkeit, sodass sich im Fall von RNA-Phosphoramiditen bessere Kopplungsausbeuten erhalten lassen.<sup>[64,65]</sup> Als Alternative zu Tetrazol-basierten Aktivatoren wird auch 4,5-Dicyanoimidazol als Aktivator verwendet, welches über eine deutlich geringere Acidität aber eine erhöhte Nukleophilie verfügt. Der Nachteil der Tetrazolaktivatoren ist, dass deren Acidität ausreicht, um die Monomere zu einem sehr kleinen Teil zu detritylieren. Dies führt zur Bildung einer kleinen Menge von Dimeren, sodass sich n+1-Produkte als Verunreinigung ergeben. Bei Synthesen in großem Maßstab sind diese nur sehr schwer von dem gewünschten Produkt abzutrennen.<sup>[78]</sup> Im Fall des Dicyanoimidazols wurde eine solche Dimerbildung nicht beobachtet.<sup>[79]</sup>

**Tabelle 2:** Übersicht verschiedener Aktivatoren, die für die Festphasensynthese verwendet werden.

Aktivator	Struktur	pK <sub>A</sub>
1 <i>H</i> -Tetrazol		4,9
5-Ethylthio-1 <i>H</i> -tetrazol		4,3
5-Benzylthio-1 <i>H</i> -tetrazol		4,1
4,5-Dicyanoimidazol		5,2

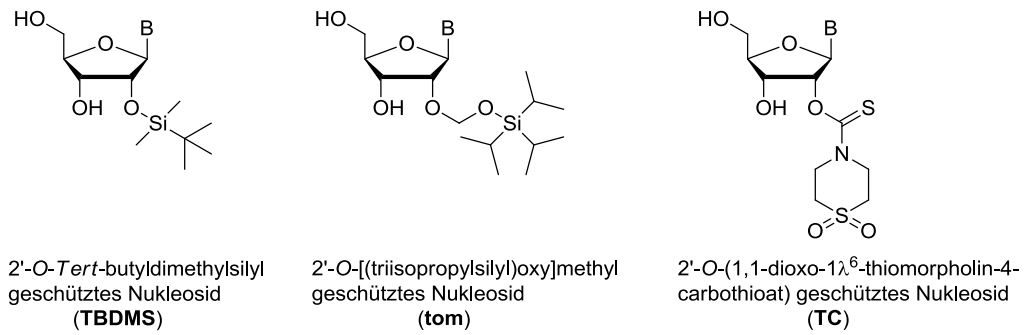
Im dritten Schritt erfolgt das sogenannte Capping. Dies soll verhindern, dass es zur Anhäufung von ungewünschten n-1-Oligomeren kommt. Diese können entstehen, wenn nicht abreagierte 5'-Hydroxygruppen an der festen Phase verbleiben. Um dies zu verhindern, werden diese mit Acetanhydrid acetyliert und stehen so im nächsten Zyklus nicht mehr als Reaktionspartner zur Verfügung. Im vierten Schritt erfolgt dann die Oxidation des Phosphittriesters zum Phosphattriester mittels Iod in einem Pyridin/Wasser/THF-Gemisch. Der Zyklus wird nun solange wiederholt, bis die gewünschte Oligonukleotidlänge erreicht ist. Im Anschluss daran erfolgt die Abspaltung von der festen Phase durch basische Hydrolyse z.B. mit konzentriertem wässrigem Ammoniak. Hierbei werden gleichzeitig die β-Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphor und die Schutzgruppen der Nukleobasen abgespalten. Letztere bestimmen, wie lange und bei welcher Temperatur das Festphasenmaterial mit dem Abspaltreagenz inkubiert werden muss. Standardmäßig liegen Adenosin und Cytidin bezoyliert vor und Guanosin trägt eine *Isobutyryl*-

Gruppe. Um diese Schutzgruppen vollständig abzuspalten sind jedoch entweder erhöhte Temperaturen von 55°C oder 65°C oder lange Reaktionszeiten bei Raumtemperatur nötig. Etliche sensible Modifikationen sind unter diesen Bedingungen jedoch nicht stabil.<sup>[80]</sup> Daher wurden von Schulhof et al. die sogenannten „ultramilden“ Schutzgruppen (s. Abbildung 21) entwickelt.<sup>[81]</sup> Diese lassen sich entweder innerhalb von zwei Stunden bei Raumtemperatur mit konzentriertem Ammoniak oder mit Kaliumcarbonat in Methanol innerhalb von vier Stunden bei Raumtemperatur vollständig entschützen. Bei der Synthese mit diesen Amiditen muss beachtet werden, dass für die Capping-Reaktion nicht Acetanhydrid, sondern Phenoxyessigsäureanhydrid verwendet wird, da es sonst zu Umacylierungen kommen kann.<sup>[82]</sup>



**Abbildung 21:** Ultramild geschützte Nucleobasen nach Schulhof et al.<sup>[81]</sup>

Die Synthese von Oligoribonukleotiden ist durch das Vorhandensein der zusätzlichen 2'-OH-Gruppe komplexer. Um Nebenreaktionen oder eine Spaltung der RNA während der basischen Abspaltung von der festen Phase zu vermeiden, muss eine zusätzliche orthogonale Schutzgruppe eingeführt werden, die sowohl unter basischen wie auch unter sauren und oxidativen Bedingungen stabil ist. Unter diesen Umständen lassen sich prinzipiell die gleichen Synthesebedingungen wie bei der DNA-Festphasensynthese verwenden. Es haben sich im Laufe der Zeit hauptsächlich zwei Strategien der Schützung etabliert, die auf der Verwendung von fluoridlabilen Silylschutzgruppen beruhen, die sogenannte TBDMS-Strategie<sup>[83]</sup> und die tom-Strategie. Während erstere auf kurze RNA-Oligonukleotide beschränkt ist (< 40 Nucleotide) erlaubt letztere die Synthese von längeren RNA-Oligonukleotiden. Dies liegt an verbesserten Kopplungsausbeuten, vermutlich aufgrund des geringeren sterischen Anspruchs der tom-Schutzgruppe im Vergleich zur TBDMS-Schutzgruppe.<sup>[84]</sup> Eine neue Entwicklung ist die sogenannte TC-Strategie, welche eine vereinfachte Aufarbeitung in einem Schritt und verkürzte Kopplungszeiten im Vergleich zur TBDMS-Chemie ermöglicht.<sup>[85]</sup>



**Abbildung 22:** 2'-*O*-geschützte Nucleoside für die RNA-Festphasensynthese, von links nach rechts: TBDMS-Strategie, tom-Strategie, TC-Strategie. B steht für eine der vier RNA-Nucleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil.

## 1.3 MicroRNA

### 1.3.1 Nicht-kodierende RNA

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass es sich nur bei ca. 1,2 % des Transkriptoms um Protein-kodierende RNA handelt.<sup>[86]</sup> Die restliche RNA wird unter dem Begriff nicht-kodierende RNA zusammengefasst. Diese nicht-kodierenden RNAs lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen: „housekeeping RNAs“, lange nicht-kodierende RNAs und kurze nicht-kodierende RNAs. Während die Funktion der housekeeping RNAs, wie der transfer-RNA (tRNA), der ribosomalen RNA (rRNA) und der „small nuclear RNA“ (snRNA) schon länger bekannt sind, wurden die anderen Klassen nicht-kodierender RNA erst im letzten Jahrzehnt charakterisiert. Lange nicht-kodierende RNAs sind typischerweise länger als 200 Nukleotide und üben ihre Funktion im Allgemeinen ohne weitere aufwändige Prozessierungsschritte aus. Sie verbleiben normalerweise im Kern in der Nähe des Transkriptionsortes und beeinflussen die Transkription. Kurze nicht-kodierende RNAs, zu denen man die sogenannten „Piwi-interacting RNAs“ (piRNAs), die „small interfering RNAs“ (siRNAs), microRNAs (miRNAs) und einige bakterielle regulatorische RNAs zählt, werden hingegen zumeist durch verschiedene Prozessierungsschritte aus längeren RNA-Vorläufermolekülen hergestellt.<sup>[87]</sup>

Im Jahr 1993 beobachteten die Gruppen von Ruvkun und Ambros bei Arbeiten an der postembryonalen Entwicklung in *C. elegans*, dass die zeitlich gesteuerte Expression des LIN-14-Proteins vom *lin-4*-Gen reguliert wird. Interessanterweise kodiert das *lin-4* Gen nicht für ein Protein, sondern beim Genprodukt handelt es sich um zwei kurze RNAs von 61 und 22 Nukleotiden Länge. Überdies zeigte sich, dass diese RNAs teilweise komplementär zur 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der *lin-14*-mRNA sind. Aufgrund der Tatsache, dass sich die LIN-14-Proteinmenge invers proportional zur Menge der *lin-4*-RNA verhält, folgerten Ambros et al., dass es sich hierbei um eine post-transkriptionelle Regulation handeln müsse, die über eine RNA-RNA Interaktion zustande kommt.<sup>[76,77]</sup> Erst sieben Jahre später wurde eine weitere kleine RNA gefunden, die sogenannte *let-7*-RNA, die auf ähnliche Weise die zeitliche Entwicklung vom späten Larvenstadium zum Erwachsenenstadium in *C. elegans* kontrolliert. Zugleich fand man heraus, dass diese Regulation auch in vielen anderen Organismen stattfindet, wie zum Beispiel bei Zebrafischen und bei *Drosophila melanogaster*. *Lin-4* und *let-7* wurden zunächst als „small temporal RNAs“ (stRNAs) bezeichnet.<sup>[90]</sup> Im Jahr 2001 wurde in einer Reihe von Studien gezeigt, dass *lin-4* und *let-7* zu einer ganzen Klasse kleiner regulatorischer RNAs gehört, die man jetzt als microRNAs (miRNAs) bezeichnete. Tuschl et al. zeigten, dass miRNAs auch in humanen Zellen (HeLa-Zellen) und anderen Säugetierzellen zu finden sind und dass die Sequenz einiger miRNAs in verschiedensten Spezies konserviert ist, es sich also um einen wichtigen regulatorischen Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation handeln muss.<sup>[79,80,81]</sup> Aufbauend auf

diesen Studien kam es in den folgenden Jahren zu einem nahezu exponentiellen Wachstum der Veröffentlichungen auf dem Gebiet der miRNA. Diese beschäftigten sich in erster Linie mit der Biogenese, dem Mechanismus der regulatorischen Wirkung sowie dem Zusammenhang zwischen miRNA-Expression und verschiedenen Krankheiten.

### 1.3.2 MiRNA-Biogenese

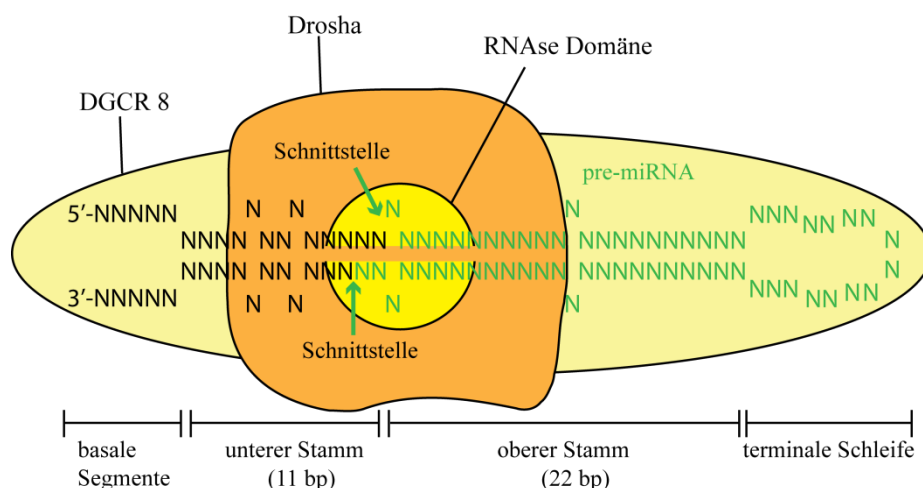
Die Biogenese von miRNAs lässt sich in vier Schritte unterteilen:

1. Synthese des Primärtranskripts
2. Prozessierung des Primärtranskripts in pre-miRNA mittels Drosha/DGCR8
3. Export der pre-miRNA aus dem Kern ins Cytosol
4. Prozessierung der pre-miRNA in die reife miRNA mittels Dicer

MiRNA-Gene lassen sich im Genom in drei verschiedenen Regionen finden. Der Hauptteil der miRNA-Gene befindet sich in eigenen miRNA-spezifischen Transkriptionseinheiten, ein kleinerer Teil in Introns nicht-kodierender Transkriptionseinheiten und ein dritter Teil in Introns proteinkodierender Transkriptionseinheiten. Die Transkription von miRNAs wird von der RNA Polymerase II durchgeführt, die auch proteinkodierende Gene transkribiert. Dies wurde unter anderem aus der Beobachtung geschlossen, dass die Primärtranskripte sowohl über eine Polyadenylierung als auch über eine Cap-Struktur verfügen. Außerdem zeigte sich, dass die miRNA-Expression empfindlich gegenüber RNA Polymerase II-spezifischen Inhibitoren ist.<sup>[94]</sup> Das Primärtranskript bezeichnet man auch als pri-miRNA („primary miRNA“). Es kann einige tausend Basen lang sein und enthält Stamm-Schleifen Regionen, aus denen mithilfe von Drosha, einer RNase III Endonuklease, die haarnadelförmige pre-miRNA („precursor miRNA“) herausgeschnitten wird. Einige miRNAs sind in Clustern organisiert, das heißt, dass aus einem Primärtranskript mehrere verschiedene miRNAs entstehen können.<sup>[95]</sup> Die pre-miRNAs sind meist ca. 60-70 Nukleotide lang und besitzen die für RNase III Endonukleasen-Produkte typischen Strukturmerkmale, ein 5'-Phosphat und einen 2 Nukleotide langen Überhang am 3'-Ende. Die Beobachtung, dass aus Primärtranskripten *in vitro* mithilfe von gereinigtem rekombinantem Drosha alleine keine effiziente Prozessierung zu pre-miRNAs möglich ist, führte zu der Erkenntnis, dass weitere Proteine beteiligt sein müssen.<sup>[96]</sup>

Drosha formt zusammen mit seinem Kofaktor DGCR8 („DiGeorge syndrome critical region gene8“) einen 650 kDa großen Proteinkomplex, den man auch als Mikroprozessor bezeichnet. Einblicke in mechanistische Details der Spaltung von pri-miRNA durch den Mikroprozessor wurden in erster Linie durch eine Studie von V. Narry Kim aus dem Jahr 2006 gewonnen. Die Spezifität der Prozessierung von pri-miRNAs rührt danach nicht aus einer spezifischen Sequenz,

sondern ist vielmehr abhängig von bestimmten Strukturmerkmalen. Pri-miRNAs enthalten Stamm-Schleifen-Regionen, die von nicht strukturierten, also einzelsträngigen oder auch basalen Segmenten flankiert sind. Die Stamm-Region, die nicht über eine vollständig perfekte Basenpaarung verfügt, lässt sich in einen unteren (~11 bp) und einen oberen Stamm (~22 bp) aufteilen. Die Stammregion ist dementsprechend immer ungefähr 3 helikale Windungen lang. Am Ende des oberen Stamms befindet sich die terminale Schleife, am Ende des unteren Stamms die einzelsträngigen, basalen Segmente. Die Spaltung durch Drosha erfolgt immer so, dass etwa 11 bp entfernt vom Übergang von einzelsträngiger zu doppelsträngiger Region geschnitten wird, sodass der obere Stamm und die Schleifenregion die pre-miRNA bilden (s. Abbildung 23). Hierbei ist vermutlich DGCR8 für die Substraterkennung zuständig, in dem es sowohl am Übergang zwischen doppelsträngiger und einzelsträngiger Region als auch an der gesamten Stammregion bindet. Erst danach wird Drosha rekrutiert und an die Spaltstelle geleitet, um mit seinen beiden RNase III Domänen die endonukleolytische Funktion auszuüben. Mutationsstudien zeigten, dass DGCR8 als Abstandsmesser fungiert, da bei einem verkürzten unteren Stamm auch die Spaltstelle entsprechend weiter entfernt von den basalen Segmenten ist.<sup>[97]</sup>



**Abbildung 23:** Schematische Darstellung der Struktur von pri-miRNAs nach Kim et al.<sup>[97]</sup> mit basalen Segmenten, unterem und oberem Stamm sowie der terminalen Schleife. DGCR8 fungiert als molekularer Abstandsmesser und rekrutiert dann Drosha. Die pri-miRNA wird dann an den mit Pfeilen markierten Stellen zur pre-miRNA prozessiert, wobei das typische Muster eines RNase III-Substrats mit einem 2 Nukleotide langen 3'-Überhang und terminalem 5'-Phosphat entsteht.

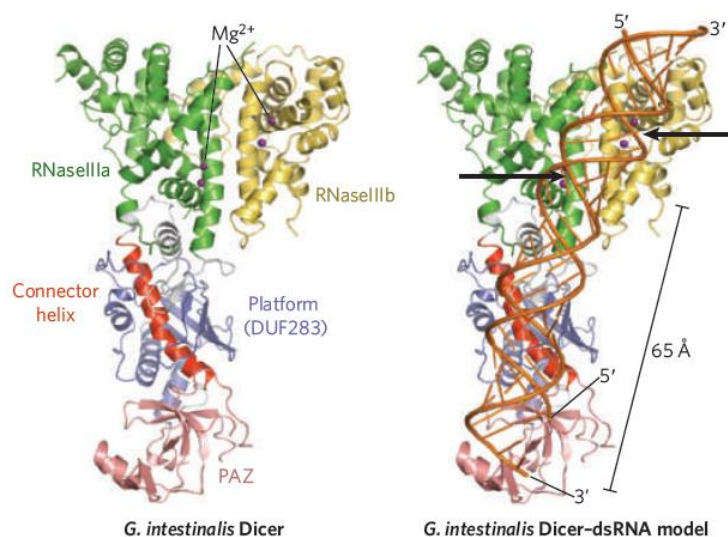
Nicht alle pre-miRNAs entstehen durch Prozessierung mithilfe des Mikroprozessor-Komplexes. Die Arbeitsgruppe von D. P. Bartel machte im Jahr 2007 die Entdeckung, dass miRNAs, die aus Introns entstanden sind, nach dem Entzweigen der lassoartigen Struktur und Faltung die strukturellen Voraussetzungen einer pre-miRNA erfüllen. Diese werden auch als Mirtrons bezeichnet.<sup>[98]</sup> Aus beiden Prozessen entstandene pre-miRNA wird im nächsten Schritt, außer bei pflanzlichen miRNAs, aus dem Kern exportiert. Dieser Export wird von Exportin-5 unter



Mitwirkung von Ran-GTP bewerkstelligt. Exportin-5 hat in diesem Prozess zusätzlich die Funktion, dass nur korrekt prozessierte pre-miRNAs ins Cytoplasma gelangen, da nur diese mit hoher Affinität an Exportin-5 assoziiert sind. Kutay et al. konnten zeigen, dass dies wichtig für den Erhalt der richtigen miRNA-Sequenz durch Dicer im Cytoplasma ist, da auch Substrate mit einer verlängerten Stammregion oder solche, die nicht über einen 3'-Überhang verfügen, von Dicer prozessiert werden. Exportin übernimmt also neben dem Transport eine wichtige Rolle dahingehend, zu kontrollieren, dass nur korrekt von Drosha prozessierte pre-miRNA in das Cytoplasma gelangt. Die Wichtigkeit des Exports zeigte sich auch darin, dass in Zellen, bei denen mithilfe von siRNA die Exportfunktion inhibiert wurde, die Expression von reifer miRNA um 40-60 % reduziert war.<sup>[99]</sup> Die ins Cytoplasma transportierte pre-miRNA wird im nächsten Schritt nun von Dicer einer weiteren endonukleolytischen Prozessierung unterzogen. Dabei entstehen ~22 nt lange RNA-Duplexe, die nun an beiden 3'-Enden über 2 nt Überhänge und Phosphate an beiden 5'-Enden verfügen. Dicer lässt sich also auch der Klasse der RNase III Endonukleasen zuordnen. Bei Dicer handelt es sich um ein hochkonserviertes Protein, das in fast allen eukaryotischen Organismen zu finden ist. Während in einigen Organismen mehrere Gene für Dicer-artige Proteine zu finden sind, ist bei Säugetieren nur eine solche Kopie vorhanden. In Mäusen führt daher das Entfernen dieses Gens bereits im frühen Entwicklungsstadium zum Tod.<sup>[94]</sup> Das Dicer-Protein ist Teil eines Multiprotein-Komplexes des sogenannten „RISC loading complex“ (RLC), der sowohl für die Prozessierung zur reifen miRNA als auch für die Bildung des sogenannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC) verantwortlich ist. Letzterer führt, nach Entlassen des Gegenstrangs, die reife einzelsträngige miRNA zu ihrer Ziel-mRNA. Neben Dicer enthält der RLC noch das doppelsträngige RNA bindende Protein TBRP („Tar RNA binding protein“) sowie PACT („protein activator of PKR“) und Argonaut-2 (Ago-2), welches die Effekte des RISC auf die Ziel-mRNA vermittelt. Für die Wirkung von Dicer sind TBRP und PACT nicht essentiell, sie verbessern lediglich dessen Effizienz.<sup>[100]</sup>

Dicer selbst ist ein Multidomänenprotein, welches über zwei RNase III-Domänen und über eine dsRBD (doppelsträngige RNA-bindende Domäne) am Carboxyterminus verfügt. Weiterhin gibt es eine DEXD/H box-Domäne am Aminoterminus, eine Domäne bislang unbekannter Funktion (DUF283) sowie die PAZ-Domäne, die spezifisch am 3'-Ende einzelsträngiger RNA bindet. Aus der Kristallstruktur des Dicer von *Giardia intestinalis*, welcher nur über die PAZ-, DUF283-, sowie RNase III-Domänen verfügt, ließen sich Rückschlüsse auf die Funktionsweise von Dicer-Proteinen ziehen. Das Protein hat eine axtförmige Struktur, wobei die RNase III-Domänen die Klängen bilden und die PAZ-Domäne die Basis des Griffes. Im aktiven Zentrum jeder RNase III-Domäne befinden sich vier hochkonservierte saure Aminosäuren, die zwei Metallkationen koordinieren, was suggeriert, dass diese beiden Kationen im Spaltungsmechanismus eine Rolle spielen müssen. Die aktive Tasche der PAZ-Domäne ist genauso weit vom aktiven Zentrum der RNase III-Domänen entfernt, dass der Abstand dieser beiden dem zwischen dem 3'-Ende und der

entsprechenden Spaltstelle im RNA-Substrat entspricht (s. Abbildung 24). Der Abstand zwischen beiden Domänen wird von der Länge der sogenannten Verbindungshelix bestimmt. Dicer-Mutanten, die nicht über eine PAZ-Domäne verfügen, sind nicht in der Lage RNA-Produkte gleichbleibender Länge zu produzieren. Die Tatsache, dass die Länge der Verbindungshelix nicht konserviert ist, erklärt, warum in unterschiedlichen Spezies die Dicer-Produkte unterschiedliche Längen haben.<sup>[101]</sup>



**Abbildung 24:** Kristallstruktur von Dicer aus *G. intestinalis* (links). Modell mit gebundener dsRNA (rechts), welches den Abstand im Protein zwischen PAZ-Domäne am 3'-Ende und der Schnittstelle zeigt. Dieser Abstand entspricht der Länge einer 25 bp langen dsRNA. Dies ist die Länge der siRNA-Fragmente, die *G. intestinalis in vitro* produziert. Die Positionen, an denen die RNA geschnitten wird, sind mit Pfeilen markiert. (Entnommen aus Doudna et al.)<sup>[101]</sup>

Aus der Beobachtung, dass miRNAs nur in manchen Entwicklungsstadien oder spezifisch nur in bestimmten Geweben exprimiert werden, lässt sich schlussfolgern, dass deren Expression bzw. Biogenese streng reguliert sein muss. Auf Transkriptionsebene, einem Hauptkontrollpunkt der miRNA-Expression, wirken ähnliche Kontrollmechanismen wie bei proteinkodierenden Genen, da, wie bereits erwähnt, auch miRNAs hauptsächlich von der RNA Polymerase II transkribiert werden. Wichtige Transkriptionsfaktoren sind zum Beispiel c-Myc oder p53 sowie andere zelltypspezifische Transkriptionsfaktoren. Die Transkription von pri-miRNAs kann auch im Zuge einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren reguliert werden. Außerdem tragen epigenetische Kontrollmechanismen, wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen, zur Kontrolle der miRNA-Transkription bei.<sup>[100]</sup> Neben diesen nicht miRNA-spezifischen Mechanismen werden auch die Schlüsselenzyme der miRNA-Biogenese reguliert. Die Menge reifer miRNA lässt sich unter anderem durch die Expressionshöhe von Drosha und Dicer und die Kontrolle der relativen Level der Enzyme des Mikroprozessor-Komplexes sowie assoziierter Helikasen steuern. Zusätzlich gibt es einige Proteine, die an der Schleifenregion von pri-miRNA oder pre-miRNA

binden und so entweder zu einer erhöhten oder einem erniedrigter Menge an reifer miRNA führen. HnRNP („heterogeneous ribonucleoprotein particle“) und KSRP („KH-type splicing regulatory protein“) sind zwei Proteine, welche die Bindung von Drosha an die Stammregion erleichtern und KH-type splicing regulatory protein somit zu einer verbesserten Prozessierung zu reifer miRNA führen. Lin-28 vermindert die Biogenese von reifer *let-7* miRNA, indem es entweder die Bindung von Drosha/DGCR8 an die pri-miRNA stört oder zu einer Restrukturierung der pri-miRNA führt, die eine Prozessierung verhindert. Außerdem bindet Lin-28 auch im Cytoplasma an *let-7* pre-miRNA und kann TUT4 („terminal uridyltransferase 4“) rekrutieren. Dieses Enzym führt zu einer Polyuridylierung am 3'-Ende der pre-miRNA und dadurch zum Abbau derselben. Ein dritter Weg der Regulation der miRNA-Biogenese besteht in der Modifikation der pri-miRNA selbst durch das sogenannte Editieren von Adenosin zu Inosin. Dies wird von den ADARs bewerkstelligt („Adenosine deaminases acting on RNA“). Die Editierung kann sowohl zu einer Inhibition der Dicer-Prozessierung, der Drosha-Prozessierung und anschließendem Abbau der pri-miRNA führen als auch zu einer verbesserten Prozessierung. Überdies kann das Editieren auch zur Folge haben, dass eine völlig andere Ziel-mRNA inhibiert wird.<sup>[102]</sup>

### 1.3.3 Mechanismus der Genregulation durch miRNAs

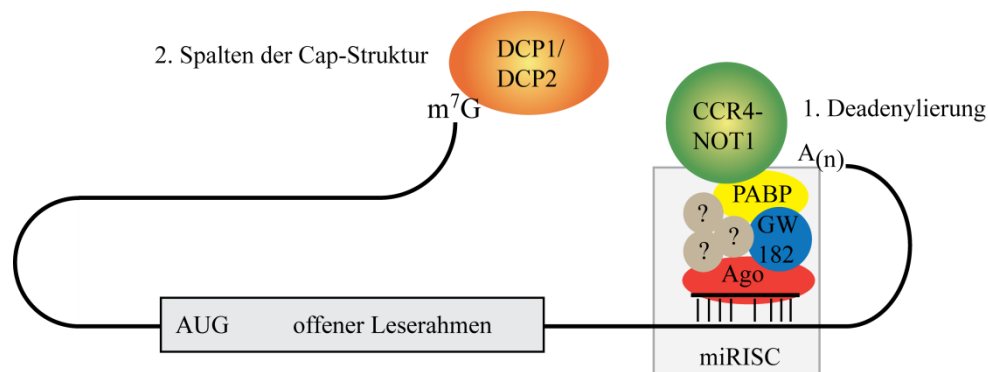
Nachdem die pre-miRNA von Dicer geschnitten wurde, muss der entstandene Doppelstrang entwunden und der richtige Strang ausgewählt werden. Erkenntnisse zu den ablaufenden Prozessen wurden zunächst aus der Aufklärung des siRNA-Mechanismus gewonnen, weswegen nun kurz auf siRNAs eingegangen werden soll. SiRNAs werden aus langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) generiert, die in Säugetierzellen normalerweise nicht im Cytosol vorkommt. Daher wurde zunächst angenommen, dass die RNA-Interferenz ein zellulärer Abwehrmechanismus gegen Viren oder Transposons ist, die diese dsRNA produzieren.<sup>[103]</sup> Mittlerweile wurden jedoch auch endo-siRNAs entdeckt, die z.B. in Mausoozyten mittels RNA-Interferenz regulatorisch wirken.<sup>[104]</sup> Aus langer doppelsträngiger RNA werden mittels Dicer in oben beschriebener Weise 21-23 nt lange doppelsträngige siRNAs produziert, die dann in den RISC-Komplex aufgenommen werden. Dort wird ein Strang, der sogenannte Führungsstrang („guide strand“), ausgewählt, der dann mRNAs perfekter oder nahezu perfekter Komplementarität bindet und so die Spaltung der mRNA genau gegenüber der mittleren Nukleotide 10 und 11 der siRNA einleitet.

Ähnlich wie bei siRNAs wird auch bei miRNAs zunächst der Führungsstrang aus dem miRNA:miRNA\*-Duplex ausgewählt und verbleibt im sogenannten miRISC („miRNA induced silencing complex“) gebunden an ein Argonaut-Protein (Ago), wohingegen der Begleitstrang („passenger strand“, miRNA\*) aus dem RISC entfernt und schnell abgebaut wird, weswegen er oft beispielsweise mit Northern Blotting nicht mehr detektiert werden kann.<sup>[95]</sup> Welcher Strang als

Führungsstrang ausgewählt wird, hängt dabei, wie bei siRNAs, davon ab, welches Ende das thermodynamisch instabilere ist und so leichter entwunden werden kann. In Fällen, in denen kein deutlicher Unterschied zwischen beiden Enden besteht, werden beide miRNA-Stränge in den RISC eingebaut.<sup>[105]</sup> Argonaut-Proteine sind die Effektorproteine sowohl für siRNAs als auch für miRNAs. Es gibt unterschiedliche Varianten von Argonaut-Proteinen und deren Anzahl ist von Spezies zu Spezies sehr unterschiedlich. Man unterscheidet zwei verschiedene Klassen von Argonaut-Proteinen, den PIWI-Stamm und den AGO-Stamm. Ersterer ist für piRNA-vermittelte Prozesse verantwortlich, die in Keimzellen stattfinden, und soll hier nicht näher diskutiert werden.<sup>[101]</sup> An Proteine des AGO-Stamms binden sowohl miRNAs als auch siRNAs. Nicht alle Ago-Proteine haben die sogenannte Slicer-Aktivität, die bei siRNAs für die Spaltung der mRNA sorgt. Solche Argonaut-Proteine bedürfen einer perfekten Komplementarität zwischen siRNA und mRNA im Bereich der Schnittstelle. Ist eine miRNA ebenfalls nahezu vollständig komplementär zu ihrer Ziel-mRNA, kann es auch hier zu einem Schnitt der mRNA kommen. Meist ist dies jedoch in tierischen Zellen nicht der Fall, sodass Ago dafür sorgt, dass es zur Inhibition der Translation kommt (s. unten). Die Zuordnung von miRNAs oder siRNAs zu verschiedenen Ago-Proteinen erfolgt im Fall von *D. melanogaster* anhand der Komplementarität von Führungs- und Begleitstrang. Eine hohe Komplementarität zwischen beiden führt zur Assoziation mit Ago-2, einem Protein mit Slicer-Aktivität. Demgegenüber hat eine niedrige Komplementarität, wie dies meist bei miRNA-miRNA\*-Duplexen der Fall ist, die Rekrutierung von Ago-1 zur Folge, sodass es zur Inhibition der Translation kommt.<sup>[106]</sup> Der Mensch hat, wie andere Säugetiere auch, vier Subtypen von Ago-Proteinen, von denen nur Ago-2 eine Slicer-Aktivität besitzt. Argonaut-Proteine besitzen drei verschiedene Domänen: Die PAZ-Domäne, die Piwi-Domäne und die Mid-Domäne. Die PAZ-Domäne ist, wie schon zuvor bei Dicer erläutert, für die Bindung des 3'-Endes des Führungsstrangs verantwortlich. Die Mid-Domäne sorgt für die Bindung des terminalen 5'-Phosphats des Führungsstrangs. Die Piwi-Domäne gleicht in ihrer Struktur einer RNaseH-Domäne, welche RNA in RNA-DNA Hybriden schneidet. Daraus wurde gefolgert, dass die Slicer-Aktivität im Falle von siRNAs bzw. hochkomplementären miRNAs von dieser Domäne ausgehen muss. Ein Motiv aus zwei Asparaginsäure- und einem Histidinrest in dieser Domäne ist für die katalytische Aktivität unabdingbar, um die für die Katalyse benötigten zwei Metallkationen koordinieren zu können.<sup>[101]</sup> MiRNAs paaren üblicherweise nicht mit perfekter Komplementarität mit ihrer Ziel-mRNA, weswegen meistens kein zentraler Schnitt der mRNA erfolgt. Die Erkennung der Ziel-mRNA erfolgt hauptsächlich durch die sogenannte seed-Region, wie aus einer Kristallstruktur des Argonaut-Proteins von *Thermus Thermophilus* mit einer gebundenen 5'-phosphorylierten einzelsträngigen 21mer DNA hervorgeht. Die seed-Region bezeichnet die Nukleotide 2-7 vom 5'-Ende einer miRNA. Die perfekte Komplementarität dieser Region zur Ziel-mRNA ist im Allgemeinen das Minimalkriterium bei der Suche nach potenziell von miRNAs regulierten mRNAs (s. Abschnitt 1.3.4). Im Gegensatz hierzu haben siRNAs wie

beriets oben erwähnt meist eine perfekte Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA und führen somit zur Spaltung der mRNA. Anhand der Kristallstruktur aus *Thermus Thermophilus* konnte demonstriert werden, dass die Nukleotide 2-10 durchgängig gestapelt sind und die Nukleotide 2-6 in Helixform präformiert frei zugänglich sind, sodass diese eine Nukleationszone für die Bindung der Ziel-mRNA darstellen.<sup>[107]</sup>

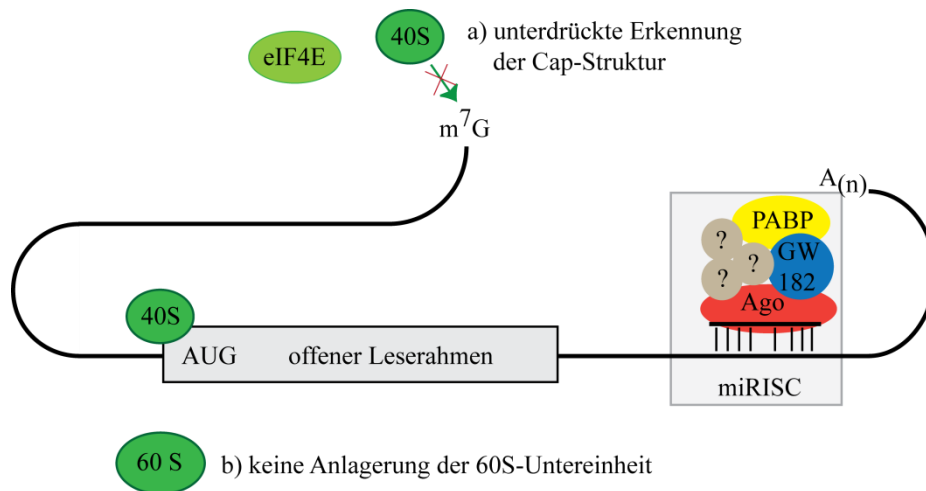
Der RISC kann mit der gebunden reifen miRNA zusammen nun verschiedene Wege der posttranskriptionellen Genregulation beschreiten, indem die miRNA an komplementäre Sequenzen im Bereich der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA bindet. Es sei hier noch erwähnt, dass mittlerweile auch über miRNAs berichtet wurde, die an codierende Regionen der mRNA<sup>[108]</sup> bzw. an die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) binden.<sup>[109]</sup> Grundsätzlich lässt sich zwischen Mechanismen, die zum mRNA-Abbau führen, und solchen, die zu einer Inhibition der Translation führen, unterscheiden. Die mRNA kann von Ago-2 geschnitten werden, sofern eine ausreichend hohe Komplementarität zwischen miRNA und mRNA vorliegt. Dies ist jedoch, wie bereits oben erwähnt, nur selten bei tierischen miRNAs der Fall, bei pflanzlichen miRNAs ist die Komplementarität jedoch im Allgemeinen wesentlich höher. Ein zweiter Weg des mRNA-Abbaus führt über die Rekrutierung von Enzymen, die zunächst für eine Deadenylierung und anschließend für den Abbau der 5'-Cap-Struktur sorgen. Man geht davon aus, dass dieser Abbau in den sogenannten P-Bodies stattfindet. Hierbei handelt es sich um abgegrenzte Bereiche im Cytoplasma, in denen man Argonaut-Proteine und Proteine, die am Abbau von RNA beteiligt sind, vorfindet. Ein genaueres Bild des miRNA-vermittelten mRNA-Abbaus ergab sich durch Arbeiten an *Drosophila melanogaster*. Ago-1 gebundene miRNAs finden zunächst ihre Ziel-mRNAs mittels unvollständiger Basenpaarung. Als nächstes assoziiert Ago-1 mit GW 182 oder seinen Paralogen TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C („trinucleotide repeat containing proteins“). Bei GW 182, benannt nach dem Vorhandensein vieler Glycin-Tryptophan-Wiederholungen, handelt es sich um ein Protein, welches an die Piwi-Domäne von Ago binden kann. Die Anlagerung von GW 182 stellt eine Art Markierung zum Abbau dar. In der Folge werden durch GW 182 in den P-Bodies die deadenylierenden und die Cap-Struktur entfernenden Enzyme CCR4-NOT1 und DCP1/DCP2 gebunden. Wahrscheinlich kommt es dabei erst zur Deadenylierung, dann zum Abbau der Cap-Struktur und zum exonukleolytischen Abbau, da es in Zellen, in denen die DCP1/DCP2-Aktivität gestört wird, zu einer Regeneration der mRNA-Level kommt (s. Abbildung 25).<sup>[110]</sup>



**Abbildung 25:** schematische Darstellung eines RISC-gebundenen miRNA-mRNA-Duplexes, der zum Abbau der mRNA führt. Im ersten Schritt wird der CCR4-NOT1-Deadenylasekomplex von GW 182 rekrutiert. Es kommt zu einer Deadenylierung am 3'-Ende und darauffolgend nach Bindung von DCP1/DCP2 an die Cap-Struktur zu einem Abbau derselben. Anschließend wird die mRNA schnell von Exonukleasen vom 5'-Ende her abgebaut. Die mit einem Fragezeichen versehenen grauen Kreise stellen mögliche weitere bislang noch unbekannte Proteine dar, die am Prozess des mRNA-Abbaus bzw. der Translationsinhibition beteiligt sind. PABP = Poly(A)-Bindepotein. (Modifiziert nach Fabian et al.)<sup>[111]</sup>

Schon die ersten Arbeiten zu miRNAs zeigten, dass oftmals eine deutlich signifikantere Auswirkung von miRNAs auf Proteinebene festzustellen ist, als dies durch die Regulation des mRNA-Niveaus zu erwarten wäre. Daraus wurde geschlossen, dass es Mechanismen geben muss, die zu einer Inhibition der Translation führen, ohne dass die mRNA abgebaut wird.<sup>[89]</sup>

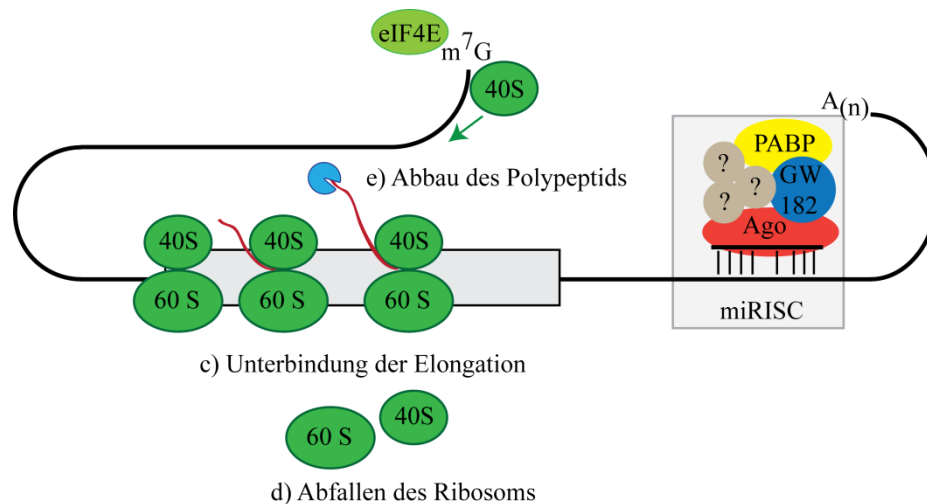
Wie genau diese Translationsinhibition durch miRNAs abläuft, ist bis heute nicht abschließend geklärt und weiterhin Gegenstand intensiver Debatten. Die Translation kann vermutlich in verschiedenen Phasen inhibiert werden. Viele Arbeiten deuten auf eine Inhibition des Initiationsprozesses hin, es gibt aber auch Hinweise auf eine Regulation der Elongationsphase bzw. auf einen kotranslationalen Abbau der entstehenden Polypeptidkette.<sup>[112]</sup> Zur Initiation der Translation muss zunächst die Cap-Struktur vom Initiationsfaktor eIF4E erkannt werden, sodass dann die kleine Untereinheit (40S) des Ribosoms, beginnend vom 5'-Ende, nach dem Startcodon suchen kann. Die Initiation wird durch Anlagerung der großen Untereinheit (60S) beendet und die Elongationsphase beginnt.<sup>[113]</sup> Sowohl aus Studien transfizierter Zelllinien als auch aus Experimenten mit Zellextrakten gibt es Hinweise darauf, dass der miRISC besonders mit dem ersten Schritt, also der Erkennung der Cap-Struktur und der darauf folgenden Rekrutierung der kleinen Untereinheit des Ribosoms interferiert (s. Abbildung 26).<sup>[111]</sup> Unter anderem konnte gezeigt werden, dass mRNAs, die keiner m<sup>7</sup>G-Cap-Struktur zur Translation bedürfen, von miRNAs nicht bzw. weniger effizient inhibiert werden.<sup>[114]</sup> Einige Studien an Zellextrakten weisen zudem darauf hin, dass die Initiation auch dadurch blockiert werden könnte, dass die Anlagerung der großen an die kleine Untereinheit verhindert wird (s. Abbildung 26).<sup>[115]</sup>



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung zweier Mechanismen der Inhibition der Translationsinitiation durch den miRISC. a) Unterdrückung der Erkennung der Cap-Struktur durch eIF4E, wodurch die kleine Untereinheit des Ribosoms (40S) nicht rekrutiert werden kann. Möglicherweise konkurriert Ago mit eIF4E um die Bindung an die Cap-Struktur. b) Unterdrückung der Anlagerung der 60S-Untereinheit an die 40S-Untereinheit, was die Ausbildung des 80S-Komplexes verhindert. PABP = Poly(A)-Bindeprotein. (Modifiziert nach Fabian et al.)<sup>[111]</sup>

Hinweise auf eine Inhibition der Translation nach dem Initiationsprozess wurden zuerst aus der Beobachtung gewonnen, dass mRNAs, die von miRNAs reguliert werden, an Polysomen gebunden bleiben, obwohl eine starke Reduktion des Proteinlevels vorliegt.<sup>[116]</sup> Außerdem wurde von Petersen et al. im Widerspruch zu anderen Studien beobachtet, dass auch mRNAs mit einer sogenannten „Internal Ribosomal Entry Site“ (IRES), also ohne Cap-Struktur, von miRNAs reguliert werden können.<sup>[117]</sup> Wie die Regulation nach der Translationsinitiation mechanistisch ablaufen könnte, ist unbekannt. Man geht von drei möglichen Szenarien aus. Es könnte entweder zu einer Unterbindung bzw. Verlangsamung der Elongation kommen, das Ribosom könnte vor Beendigung der Translation abfallen oder der miRISC könnte Proteasen rekrutieren, die das entstehende Polypeptid schnell abbauen (s. Abbildung 27).<sup>[113]</sup>

Es wurden jedoch auch einige miRNAs gefunden, bei denen eine hohe Korrelation zwischen mRNA- und Proteinlevel besteht.<sup>[118]</sup> Spätere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass es ein Zusammenspiel zwischen beiden Mechanismen, Translationsinhibition und mRNA-Destabilisierung mit darauf folgendem mRNA-Abbau, geben muss. Untersuchungen an *D. melanogaster* S2-Zellen und Zebrafischembyos deuten darauf hin, dass miRNAs zuerst die Translation von mRNAs verhindern und in einem zweiten Schritt der mRNA-Abbau, beginnend mit der Deadenylierung, eingeleitet wird.<sup>[107,108]</sup>



**Abbildung 27:** Schematische Darstellung verschiedener Wege der Translationsinhibition durch den miRISC nach der Initiation. (Modifiziert nach Fabian et al.)<sup>[111]</sup>

### 1.3.4 MiRNA-Zielgene

Während miRNAs in Pflanzen meist über eine hohe Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA verfügen und sich somit Vorhersagen über regulierte Gene leicht treffen lassen, ist bei tierischen miRNAs die Komplementarität meist nicht sehr ausgeprägt. Dies macht es deutlich schwieriger, Ziele von miRNAs ausfindig zu machen. Es wurden daher schon früh computergestützte Algorithmen entwickelt, um eine Vorhersage möglicher Ziel-mRNAs machen zu können. Hierbei kommen verschiedene Kriterien zum Einsatz, die über die Sequenzkomplementarität hinausgehen.<sup>[121]</sup> Mittlerweile sind etliche solcher Vorhersageprogramme frei zugänglich, die sich in den verwendeten Kriterien unterscheiden. Das wichtigste Kriterium bei der Zielvorhersage ist die konservierte Komplementarität zur sogenannten seed-Region der miRNA, diese umfasst die Nukleotide 2-7 vom 5'-Ende der miRNA. Oftmals findet man noch eine Basenpaarung eines Adenosins der mRNA mit dem ersten Nukleotid der miRNA von 5'-Ende, häufig ein U, man spricht dann von einer 7mer-A1-site. Eine andere Variante ist die sogenannte 7mer-m8-site, bei der zusätzlich auch das achte Nukleotid der miRNA eine Basenpaarung eingeht oder eine Paarung aller acht Basen, wobei letztgenannte den größten Effekt auf das Proteinlevel des Zielgens hat. Alleine das Vorhandensein einer solchen konservierten Region in der 3'-untranslatierten Region der mRNA erlaubt bei Wirbeltieren eine gute Vorhersage darüber, ob es sich bei dieser mRNA um ein Ziel der entsprechenden miRNA handelt. Um genauere Aussagen über die Effektivität der Repression der mRNA durch miRNAs treffen zu können, sind jedoch noch einige andere Kriterien zu beachten. Unter anderem ist es von Bedeutung, in welchem lokalen Kontext der mRNA die miRNA-Bindestelle liegt. Grimson et al. konnten einige weitere Kriterien für eine effektive Repression der mRNA aufstellen<sup>[122]</sup>.



1. Die Bindestelle für die miRNA sollte mindestens 15 nt weit entfernt vom Stop-Codon der mRNA sein.
2. Eine Bindestelle an den Enden des 3'-UTR ist wesentlich effektiver als eine Bindestelle in der Mitte des 3'-UTR, was besonders auf lange UTRs zutrifft.
3. Der lokale Gehalt an A- und U-Nukleotiden um die Bindestelle herum sollte möglichst hoch sein.
4. miRNA-Bindestellen einer anderen oder der gleichen miRNA in der Nähe der ersten führen zu einer erhöhten Effektivität.
5. Die Anwesenheit von zusätzlichen Basenpaarungen, besonders im Bereich der Nukleotide 13-16, sofern es sich um mindestens 4 aufeinanderfolgende Basenpaarungen handelt, führt zu einer erhöhten Effektivität.

Die Erklärung für das erste Kriterium fanden die Autoren darin, dass eine Bindestelle, die näher an der kodierenden Region liegt, signifikant durch die Translationsmaschinerie behindert würde. Eine effektive Repression kann jedoch nur stattfinden, wenn die miRNA über einen längeren Zeitraum an der mRNA gebunden bleibt. Die 15 Nukleotide Entfernung vom Stop-Codon entsprechen genau der Stelle, an der die mRNA in das Ribosom eintritt. Dies erklärt auch, warum im Allgemeinen miRNAs nicht in der kodierenden Region oder dem 5'-UTR binden. SiRNAs hingegen, welche die mRNA schneiden und wesentlich fester an diese binden, können auch an diesen Stellen eine gute Effizienz aufweisen. Eine mechanistische Begründung für das zweite Kriterium könnte entweder in der Zugänglichkeit der Bindestelle oder in der Entfernung zur Translationsmaschinerie liegen. In langen UTRs kann es bei einer Bindestelle mitten in der UTR vermutlich nicht mehr zu einer Wechselwirkung des miRISC mit den Translationsproteinen kommen und somit nicht mehr zu einer Störung derselben.<sup>[122]</sup> Hat eine mRNA mehrere Bindungsstellen für eine miRNA bzw. mehrere Bindungsstellen für verschiedene miRNAs, so wirkt sich dies im Allgemeinen multiplikativ auf den Effekt aus, d.h. miRNAs verhalten sich nicht kooperativ. Nichtsdestotrotz kann auch aus einem multiplikativen Effekt eine erheblich verminderte Proteinmenge resultieren.<sup>[121]</sup> Eine Ausnahme von dieser multiplikativen Verstärkung ergibt sich, wenn die miRNA-Bindestellen innerhalb von mehr als acht aber weniger als 40 Nukleotiden der mRNA liegen. Man beobachtet dann einen Effekt, der wesentlich größer ist, als durch Multiplikation der Einzeleffekte zu erwarten wäre.<sup>[110,111]</sup>

Die Anzahl humaner miRNAs wird mittlerweile auf ungefähr 1000 geschätzt. Bedenkt man, dass jede miRNA potentiell 200-500 verschiedene mRNAs regulieren kann, so wird verständlich, warum man davon ausgeht, dass etwa ein Drittel aller menschlichen Gene von miRNAs reguliert werden. Wie bereits oben erwähnt, können oftmals verschiedene miRNAs an einer mRNA in einer kooperativen oder multiplikativen Art und Weise wirken.<sup>[112,75]</sup> Untersuchungen, die sich mit

der Frage beschäftigten, wie stark sich die Regulation durch miRNAs auf die Proteinexpression auswirkt, kamen zu dem Ergebnis, dass meistens geringfügige Effekte, bezogen auf einzelne Proteine, auftreten, aber dass hunderte von Proteinen betroffen sind.<sup>[125]</sup>

## 2 Zielsetzung

Nukleinsäuren sind als Träger und Übermittler der genetischen Information von zentraler Bedeutung für alle zellulären Prozesse. Die Aufdeckung der Mechanismen der Genexpression, Genregulation und anderer von Nukleinsäuren vermittelter Prozesse wurde entscheidend dadurch begünstigt, dass in den letzten Jahrzehnten enorme methodische Fortschritte im Bereich der Nukleinsäureforschung erzielt wurden. Als prominente Beispiele seien hier die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR) durch K. Mullis und die Sequenzierung nach Sanger erwähnt.<sup>[126,127]</sup> Ein weiterer Meilenstein wurde durch die Entdeckung der RNA-Interferenz von Fire und Mello erzielt.<sup>[128]</sup> Von entscheidender Bedeutung für viele Studien im Bereich der Nukleinsäureforschung ist die einfache und kostengünstige Verfügbarkeit synthetischer Oligonukleotide, wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt. Der Vorteil solcher chemisch-synthetisch erzeugter Oligonukleotide liegt darin, dass sich Modifikationen wie Fluorophore, Spin-Label oder Affinitätstags wie Biotin oder Cholesterin anbringen lassen, was eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten im oben genannten Sinn eröffnet.

Eine weitere interessante chemische Modifikationsmöglichkeit ist das Anbringen photolabiler Schutzgruppen an Oligonukleotide. Dies ermöglicht es, bei geeigneter Wahl der zu funktionalisierenden Position, die Aktivität von Nukleinsäuren mit Licht schaltbar zu machen. Hierdurch wird es möglich, biologische Prozesse mit präziser räumlicher und zeitlicher Auflösung zu studieren.<sup>[5]</sup> Der Arbeitskreis Heckel konnte bereits zeigen, dass durch das Anbringen von photolabilen Schutzgruppen an den Nukleobasen siRNAs<sup>[61]</sup>, Molecular Beacons<sup>[44]</sup> oder auch Aptamere<sup>[129]</sup> durch Licht aktiviert werden können. In allen diesen Studien wurden die Nitrobenzyl-Schutzgruppen NPE und NPP verwendet (s. Kapitel 1.1). Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, erfüllt keine photolabile Schutzgruppe alle gewünschten Eigenschaften, weswegen ein wesentlicher Teil der Forschung im Arbeitskreis Heckel sich mit der Etablierung von neuen, für Oligonukleotide geeigneten photolabilen Schutzgruppen sowie deren struktureller und quantitativer Charakterisierung befasst. Ein anderer wesentlicher Aspekt ist die Anwendung der Caging-Technologie auf neue biologische Fragestellungen. Beide Aspekte sind Teil dieser Doktorarbeit und die durchgeführten Projekte lassen sich daher in diese beiden Gebiete unterteilen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren, wie bereits erwähnt, nur die beiden oben genannten Nitrobenzyl-Schutzgruppen als photolabile Schutzgruppen für Nukleobasen im Arbeitskreis Heckel etabliert. Darüber hinaus waren die photolabilen Schutzgruppen bis dahin nur über Schmelzpunktstudien per UV-Spektroskopie mit ihrem Komplementärstrang vergleichend analysiert worden.<sup>[130]</sup> Eine

verlässliche photochemische Charakterisierungsmethode war noch nicht entwickelt. Im ersten Teilprojekt sollten daher zunächst eine neue photolabile Schutzgruppe, die von Ellis-Davies entwickelte NDBF-Schutzgruppe, zur Schützung von Nukleobasen etabliert werden. In vorangegangenen Studien hatte sich gezeigt, dass eine an Desoxyguanosin oder Thymidin angebrachte NDBF-Schutzgruppe unter den basischen Abspaltbedingungen der Festphasensynthese nicht stabil ist.<sup>[131]</sup> Daher sollte untersucht werden, ob sich die NDBF-Schutzgruppe stabil an ein Desoxycytidin und Desoxyadenosin anbringen lässt. Im nächsten Schritt sollte dann ein Oligonukleotid als Benchmark-Sequenz etabliert werden, anhand dessen eine standardisierte photochemische Charakterisierung (Quantenausbeute, Extinktionskoeffizienten, Photolyseeffizienz) aller verschiedenen photolabilen Schutzgruppen vorgenommen werden kann. Weiterhin sollte die NDBF-Schutzgruppe auf die Möglichkeit der orthogonalen Entschützung in Anwesenheit einer NPE-Schutzgruppe sowie die Möglichkeit einer Zweiphotonenentschützung hin untersucht werden.

Um über die UV-Spektroskopie hinaus Informationen über den Einfluss photolabiler Schutzgruppen auf einen DNA-Duplex zu bekommen, wurden im zweiten Teilprojekt in Zusammenarbeit mit Hannah Steinert und Dr. Henry A. Jonker aus dem Arbeitskreis von Prof. Schwalbe photolabil geschützte DNA-Duplexe per NMR-Spektroskopie untersucht. Hierbei sollten Informationen darüber gewonnen werden, wie sich das Einbringen einer photolabilen Schutzgruppe auf die Stabilität benachbarter Basenpaarungen auswirkt und welchen strukturellen Einfluss eine solche photolabile Schutzgruppe hat. Dies sollte in Relation zu der bereits etablierten Methode der UV-Spektroskopie gesetzt werden.

Ziel des dritten und vierten Teilprojekts dieser Arbeit war es, die Caging-Technologie um neue biologische Anwendungen erweitert werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte das Prinzip des Cagings auf die Kontrolle der miRNA-Aktivität angewendet werden. Ziel war es, ein mit Licht aktivierbares miRNA-Antisense-Reagenz, ein sogenanntes lichtaktivierbares AntimiR, zu entwickeln. Dieses sollte dann in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dimmeler in Endothelzellen zur lichtgesteuerten Kontrolle der miR-92a-Aktivität, einer miRNA, die in diesem Zelltyp antiangiogen wirkt, verwendet werden. Es sollte gezeigt werden, dass sich sowohl die miRNA-Expression als auch ein miRNA-Zielgen auf diese Weise mit Licht steuern lassen. Schlussendlich sollte mit einem geeigneten Assay bewiesen werden, dass sich auf diese Weise die Angiogenese in Endothelzellen mit Licht steuern lässt.

Im letzten Projekt sollte in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Mayer an der Universität Bonn ein auf dem Aptamer HD1 und dem Protein Thrombin beruhendes Reagenz zur lichtgesteuerten Aktivierung der Blutgerinnung entwickelt werden. Hierzu war es Ziel, das Thrombin-bindende Aptamer HD1 zu modifizieren, damit es über einen photospaltbaren Linker kovalent an die Proteinoberfläche gebunden werden kann. Dies sollte so geschehen, dass die

---

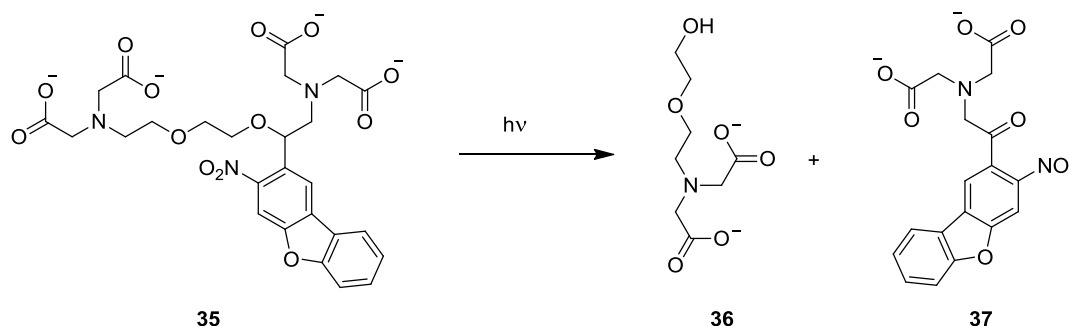
Anknüpfung templatisiert verläuft, eine kovalente Verknüpfung also erst nach Positionierung des Aptamers an der Exosite I erfolgt. Mithilfe dieses Reagenzes sollte es möglich sein, im Körper gezielt an Stellen, die für UV-Licht durchlässig sind, eine Thrombookklusion durchzuführen. Dies könnte zum Beispiel Anwendung in der Verhinderung der Metastasierung von Tumoren bei deren chirurgischer Entfernung finden.

## 3 Allgemeiner Teil

### 3.1 Wellenlängenselektives Entschützen<sup>[132]</sup>

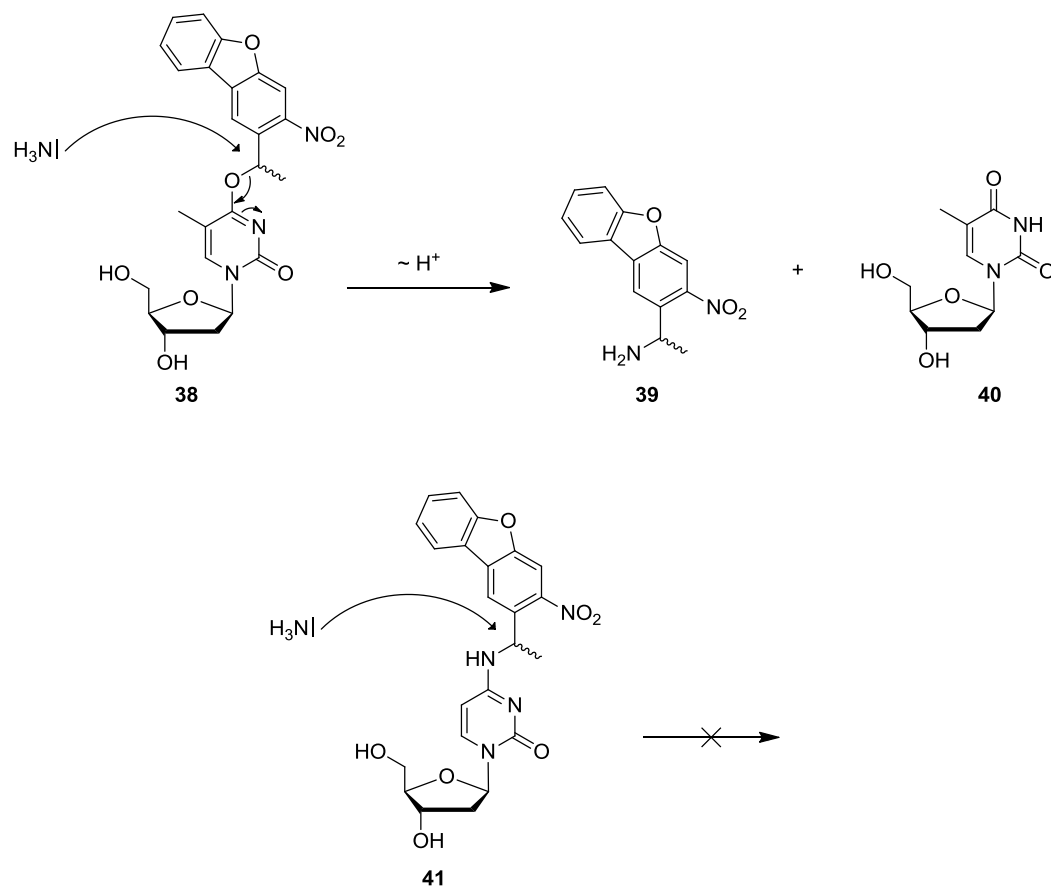
#### 3.1.1 Einleitung

Zu Beginn dieser Arbeit waren im Arbeitskreis Heckel nur NPP- und NPE-geschützte Oligonukleotide etabliert. Diese lassen sich mit UV-Licht von 365 nm abspalten. In einigen Studien zeigte sich, dass sich eine vollständige Reaktivierung nach der Bestrahlung als schwierig erweist. Außerdem liegt das Absorptionsmaximum dieser photolabilen Schutzgruppen nicht bei der Abspaltungswellenlänge, sondern in Bereichen, die in Nukleinsäuren zu Photoschädigungen führen können. Dies macht es nötig, eine Wellenlänge zu verwenden, bei der die Abspaltung nicht sehr effizient vonstattengeht. Bei sensiblen Anwendungen, in denen möglichst kurze Bestrahlungszeiten bzw. möglichst geringe Lichtintensitäten benötigt werden, könnte dies nachteilig sein. Aus diesem Grund ist es Teil der Forschung im Arbeitskreis Heckel, neue photolabile Schutzgruppen für Oligonukleotide zu etablieren. Die Anforderungen an die photolabile Schutzgruppe, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, werden im Fall photolabil geschützter Oligonukleotide noch einmal zusätzlich erhöht. Dies liegt daran, dass das photolabil geschützte Monomer bzw. das photolabil geschützte Oligonukleotid im Laufe der Festphasensynthese unter etlichen verschiedenen Bedingungen stabil sein muss, d.h. es muss kompatibel mit sauren, basischen und oxidativen Reagenzien sein. Um hochaufgelöst in Zellen Oligonukleotide aktivieren zu können, wäre es zudem wünschenswert, über eine photolabile Schutzgruppe zu verfügen, die sich mit der Zweiphotonentechnik abspalten lässt, da hierbei die Anregungsvolumina deutlich geringer und die Eindringtiefe des Lichts deutlich höher ist (s. Kapitel 1.1.3). Im Zuge dieser Überlegungen erschien die von Ellis-Davies eingeführte Nitrodibenzofuran-Schutzgruppe ein geeigneter Kandidat zu sein. Ellis-Davies et al. berichteten im Jahr 2006 über einen NDBF-geschützten Calciumchelator (NDBF-EGTA), der nach Photolyse Calcium-Ionen freisetzt (s. Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Photolyse von NDBF-EGTA **35** zu den Spaltprodukten **36** und **37**, die eine ca. 140.000-fach niedrigere  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität haben als Verbindung **35**.<sup>[12]</sup>

Dies gelang mit einer 16-160fach erhöhten Effizienz gegenüber zuvor verwendeten photolabilen Schutzgruppen. Die Quantenausbeute betrug 0,7 und die photochemische Effizienz ( $\epsilon\phi$ ) bei einer Wellenlänge von 330 nm  $12880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Überdies wurde ein guter Zweiphotonenwirkungsquerschnitt von 0,6 GM erzielt.<sup>[12]</sup> Die Tatsache, dass dieser Chromophor auf der bereits für Oligonukleotide verwendeten Nitrobenzylstruktur beruht, führte zum Versuch, die NDBF-Schutzgruppe auch für photolabil geschützte Oligonukleotide zu verwenden. In ersten Vorarbeiten von Dr. Timo Mack und Dr. Maximilian Buff wurde versucht, NDBF-geschütztes Desoxyguanosin und Thymidin herzustellen. Die Synthese der Phosphoramidite gelang zwar, jedoch konnte nach Einbau in ein Oligonukleotid und basischer Abspaltung vom Trägermaterial kein bzw. nur geringe Mengen des gewünschten Produkts erhalten werden. Dies lag zum einen daran, dass die Kopplungsausbeuten der modifizierten Amidite in der Festphasensynthese schlecht waren, zum anderen, dass die entsprechend modifizierten Nukleotide nicht stabil gegenüber basischen Abspaltbedingungen waren und somit nach der Abspaltung als Hauptprodukt ein unmodifiziertes Oligonukleotid erhalten wurde.<sup>[131,133]</sup> In der Folge wurde daher im Zuge dieser Arbeit versucht, ein  $N^4$ -modifiziertes NDBF-Derivat von Desoxycytidin bzw. ein  $N^6$ -modifiziertes Derivat von Desoxyadenosin zu synthetisieren und die erhaltenen Monomerbausteine mittels Phosphoramiditchemie in Oligonukleotide einzubauen. Diese beiden Nukleobasen sollten wesentlich schlechtere Abgangsgruppen darstellen und so eine basische Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe von der Nukleobase erschweren (s. Abbildung 29).

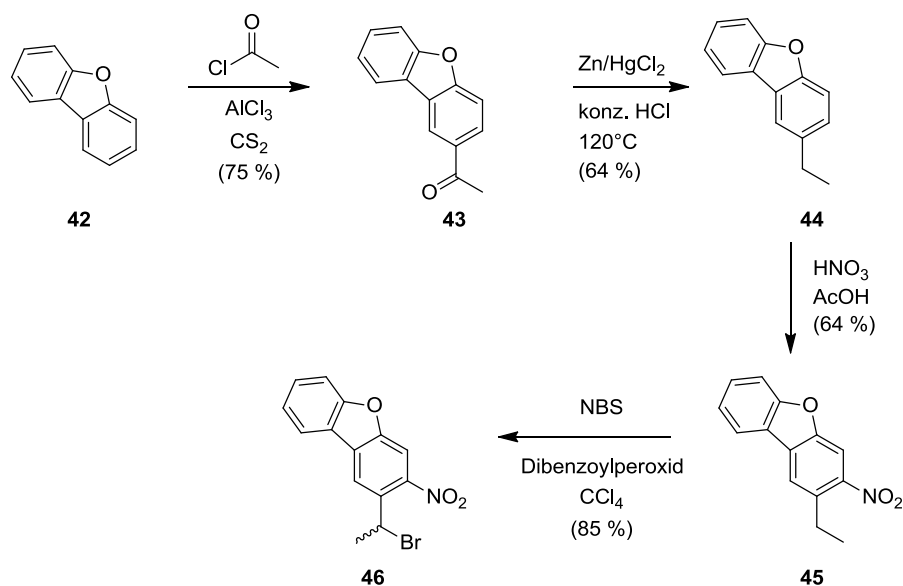


**Abbildung 29:** Vermuteter Mechanismus der unerwünschten Schutzgruppen-Abspaltung bei basischer Behandlung eines mit der NDBF-Gruppe O<sup>4</sup>-geschützten Thymidins **38** zum NDBF-NH<sub>2</sub> **39** und Thymidin **40**. Im Fall eines photolabil geschützten Desoxycytidins **41** müsste eine basische Spaltung aufgrund der schlechteren Abgangsgruppenqualität erschwert sein.

### 3.1.2 Synthese der Nitrodibenzofuranschutzgruppe (NDBF-NH<sub>2</sub>)

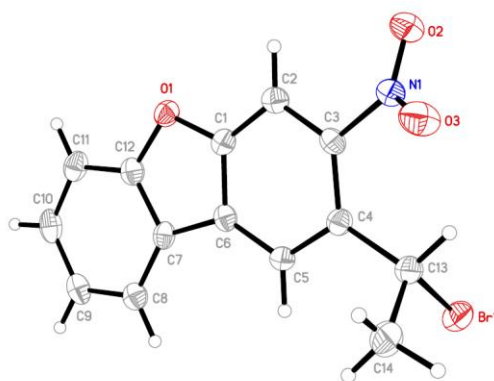
Sowohl das 1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethanamin (**48**, NDBF-NH<sub>2</sub>) als auch das von Dr. Timo Mack verwendete 1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethanol (NDBF-OH) lassen sich aus dem gleichen Vorläufermolekül 1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan (**46**, NDBF-Br) herstellen. Die Synthese von NDBF-Br wurde, aufbauend auf dem von Dr. Timo Mack beschriebenen Weg, von Dr. K. B. Joshi durchgeführt.<sup>[131]</sup> Ausgehend von Nitrodibenzofuran wurde zunächst mit Acetylchlorid und Aluminiumchlorid als Katalysator in CS<sub>2</sub> an der 2-Position acetyliert. Es folgte eine CLEMMENSEN-REDUKTION zum 2-Ethylidibenzofuran **44** und eine Nitrierung zum 2-Ethyl-3-nitrodibenzofuran **45**. Die Reaktionssequenz wurde durch eine WOHL-ZIEGLER-BROMIERUNG mit NBS in Tetrachlorkohlenstoff mit Dibenzoylperoxid als Radikalstarter komplettiert (s. Abbildung 30).





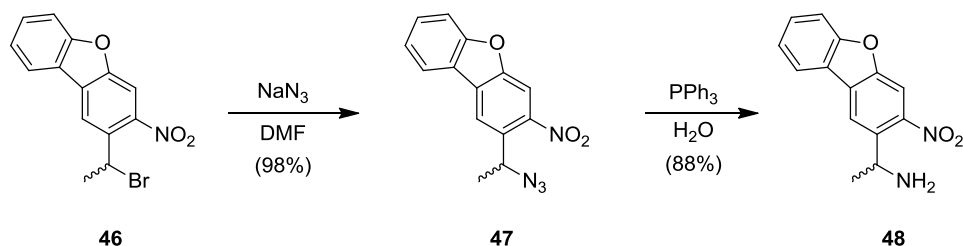
**Abbildung 30:** Übersicht der vierstufigen Synthese zum 1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan **46** ausgehend von Dibenzofuran **42**.

Bis zu dieser Stufe wurde mit einem Gemisch aus Regioisomeren gearbeitet, da schon in der Acetylierung eine Verunreinigung mit dem an der 3-Position acetylierten Dibenzofuran entsteht. Es gelang jedoch, eine Kristallstruktur von 1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan zu erhalten und somit die Konstitution des Hauptprodukts der Regioisomerentrennung zu bestimmen.



**Abbildung 31:** ORTEP-Diagramm der Kristallstruktur des Hauptregioisomers 1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan, welches aus der in Abbildung 26 dargestellten Reaktionsfolge resultiert. Die Kristallisation wurde von Dr. K. B. Joshi durchgeführt.

Das NDBF- $\text{NH}_2$  wurde, ausgehend vom Vorläufer **46**, in zwei Schritten hergestellt. Hierzu wurde **46** mit  $\text{NaN}_3$  in DMF zum Azidderivat **47** umgesetzt. Anschließend erfolgte die Reduktion zum Amin **48** mittels STAUDINGER-REAKTION, welches bezogen auf **46** in einer Ausbeute von 86 % erhalten werden konnte (s. Abbildung 32).

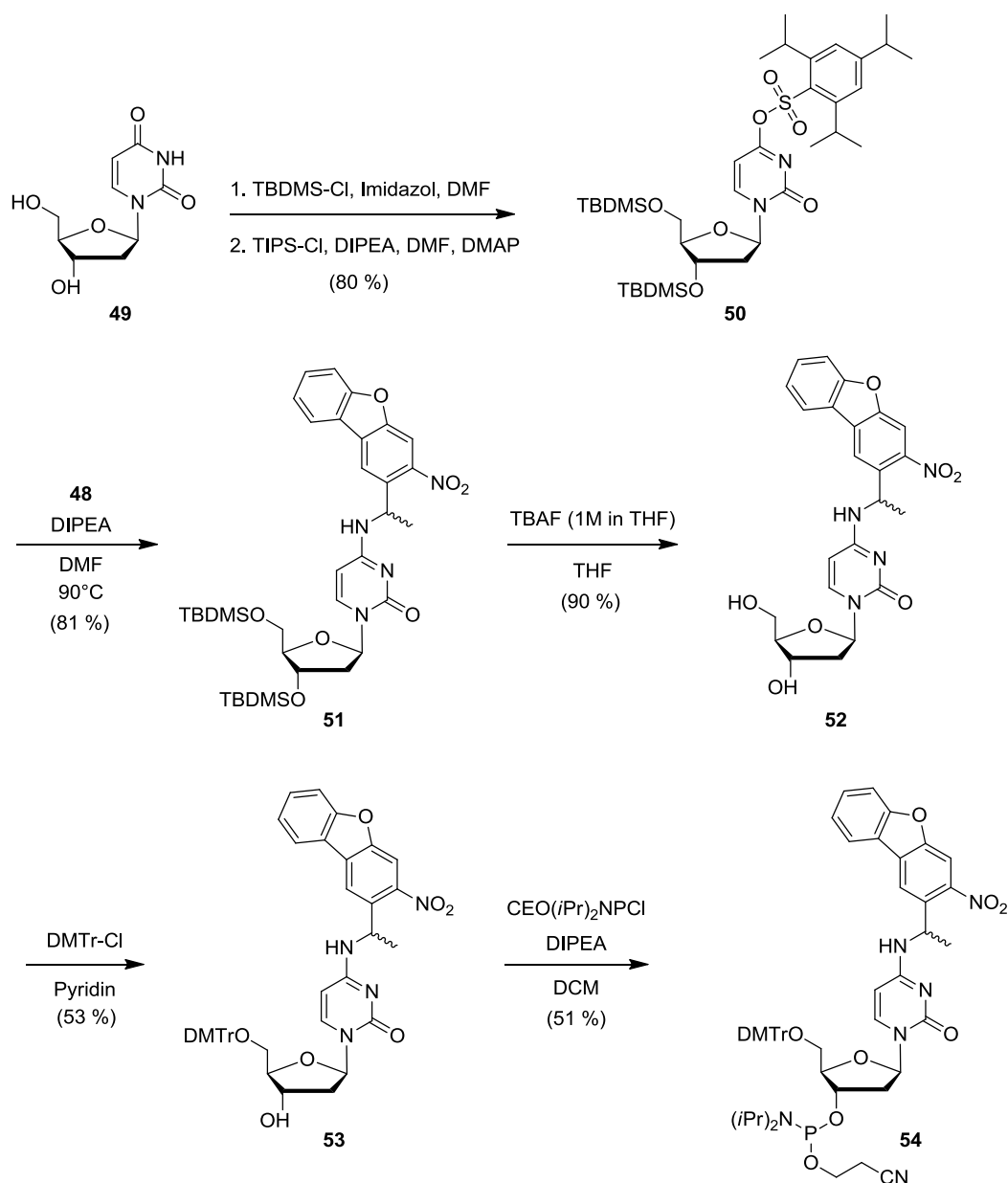


**Abbildung 32:** Syntheseweg zum 1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethanamin (NDBF-NH<sub>2</sub>) ausgehend vom Vorläufer **46**.

### 3.1.3 Synthese der NDBF-geschützten Nukleoside

#### 3.1.3.1 Synthese des NDBF-geschützten Desoxycytidinderivats

Um für die Festphasensynthese geeignete NDBF-geschützte Amidite zu erhalten, musste nun das NDBF-NH<sub>2</sub> an die entsprechend aktivierten Nukleoside angebracht werden. Das Desoxycytidin-Derivat wurde, analog zu einer Vorschrift von Silverman et al.<sup>[48]</sup>, ausgehend von Desoxyuridin, zunächst mit Triisopropylsulfonsäurechlorid (TIPS-Cl) am O<sup>4</sup> aktiviert. Durch das Anbringen der Sulfonsäuregruppe erhält man eine gute Abgangsgruppe, sodass das NDBF-NH<sub>2</sub> im nächsten Schritt im Sinne einer nukleophilen aromatischen Substitution eingeführt werden kann. Insgesamt wurden ausgehend vom Desoxyuridin sechs Reaktionsschritte benötigt, um zum voll geschützten Phosphoramidit zu gelangen, welches dann in der Festphasensynthese verwendet werden konnte (s. Abbildung 33). Zunächst wurden die OH-Gruppen des Zuckers mit TBDMS-Gruppen geschützt, dann wurde das Desoxyuridinderivat mit Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid am O<sup>4</sup> zu **50** aktiviert. Es folgte der Schlüsselschritt der Synthese, das Anbringen der NDBF-Schutzgruppe. Diese Reaktion verlief unter Zugabe von DIPEA in DMF bei 90 °C. Nach 18 Std. ließen sich 81 % des gewünschten Produkts **51** isolieren. Danach mussten noch die OH-Gruppen entschützt und das 5'-OH mit DMTr-Cl umgesetzt werden, bevor die Phosphoramiditierung zum gewünschten Produkt **54** erfolgte. Die Synthese lieferte eine Gesamtausbeute von 16 %, ausgehend vom Desoxyuridin.

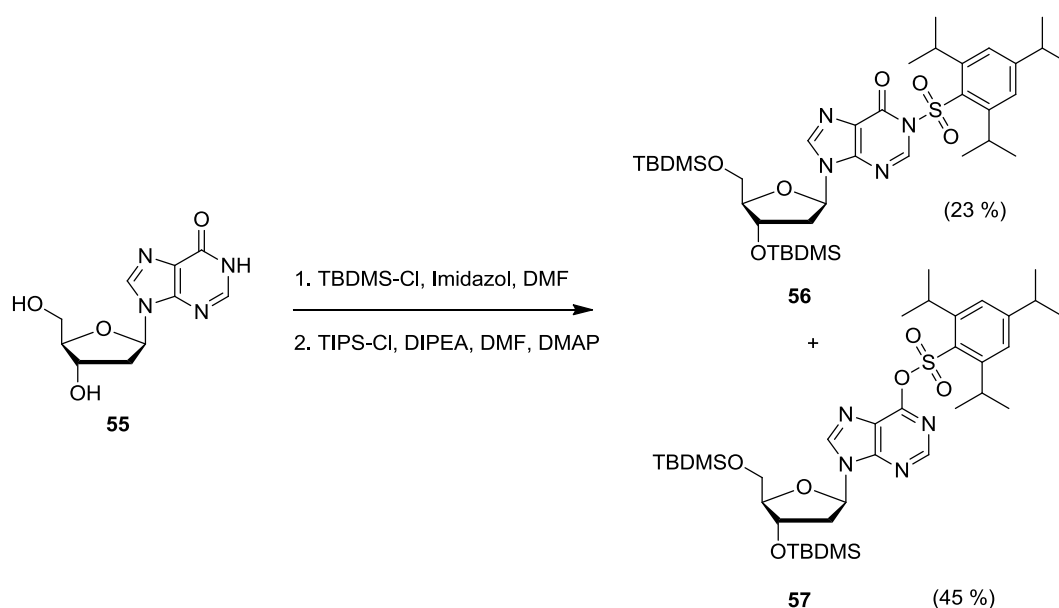


**Abbildung 33:** Syntheseweg zum NDBF-geschützten Desoxycytidin-Phosphoramidit **54**.

### 3.1.3.2 Synthese des NDBF-geschützten Desoxyadenosinderivats

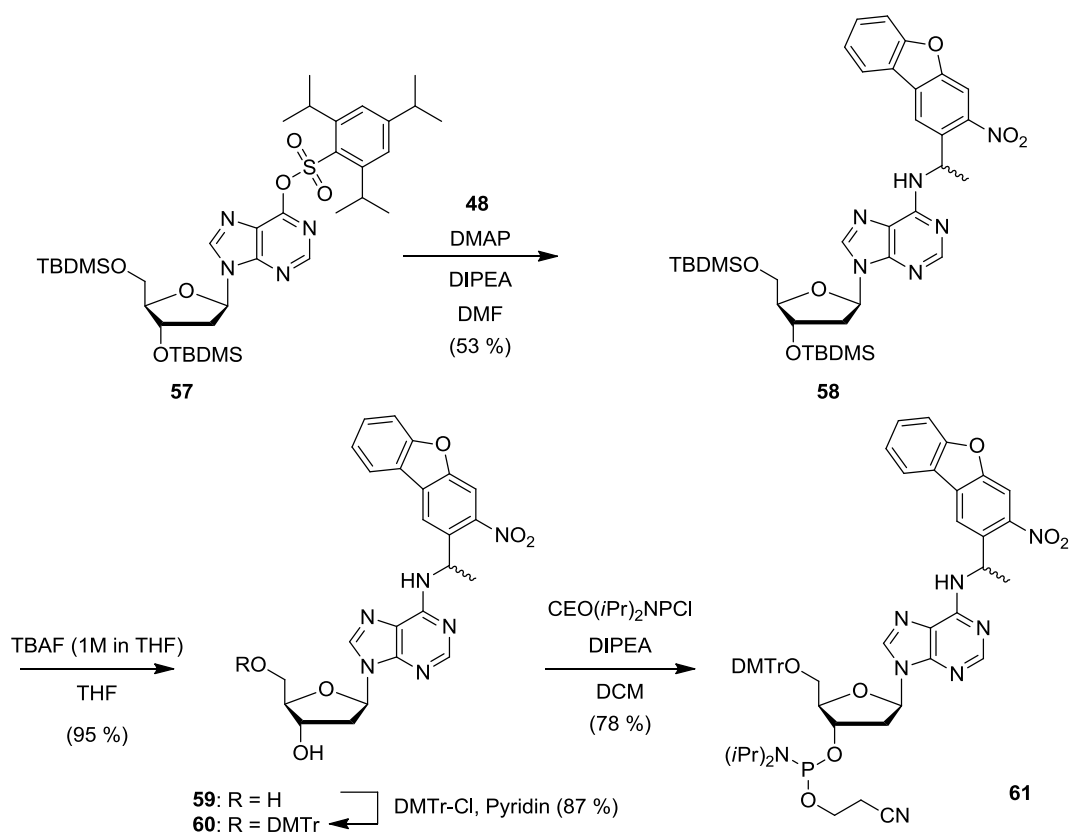
Ähnlich wie zuvor beschrieben, wurde auch beim Desoxyadenosinderivat die Route über eine Sulfonsäureaktivierung beschritten. Als Ausgangsprodukt wurde bei dieser Synthese Desoxyinosin verwendet. Auch hier wurden die beiden OH-Gruppen des Zuckers zunächst mit TBDMS-Schutzgruppen versehen, anschließend wurde eine Sulfonsäuregruppe am O<sup>6</sup> der Nukleobase angebracht. Während die TBDMS-Schätzung in quantitativen Ausbeuten verlief, wurde bei der Umsetzung mit Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Synthese nur eine moderate Ausbeute von 45 % erzielt, da hierbei neben dem

gewünschten *O*-sulfonylierten Regioisomer auch immer eine *N*-Sulfonylierung beobachtet wird (s. Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Reaktionssequenz von Desoxyinosin **55** zum *O*<sup>6</sup>-aktivierten Nucleosid **57**. Als Nebenprodukt wird das *N*-sulfonylierte Nucleosid **56** erhalten.

Um zum vollgeschützten Phosphoramidit zu gelangen, wurden vier weitere synthetische Schritte benötigt. Zunächst wurde das *O*<sup>6</sup>-sulfonylierte Nucleosid **57** mit NDBF-NH<sub>2</sub> unter DMAP-Katalyse zum NDBF-geschützten Desoxyadenosinderivat **58** umgesetzt. Hierzu waren lange Reaktionszeiten von ungefähr 7 Tagen und eine Reaktionstemperatur von 90 °C vonnöten, um zu einer akzeptablen Ausbeute von 53 % zu gelangen. Es folgten die Abspaltung der Silylschutzgruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid, die Schützung der 5'-Position mit Dimethoxytritylchlorid und die Phosphitylierung der 3'-Position mit Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit und Diisopropylethylamin in wasserfreiem Dichlormethan. Ausgehend vom *O*<sup>6</sup>-sulfonylierten Desoxyinosinderivat konnte das Phosphoramidit **61** mit einer Ausbeute von 34 % erhalten werden.



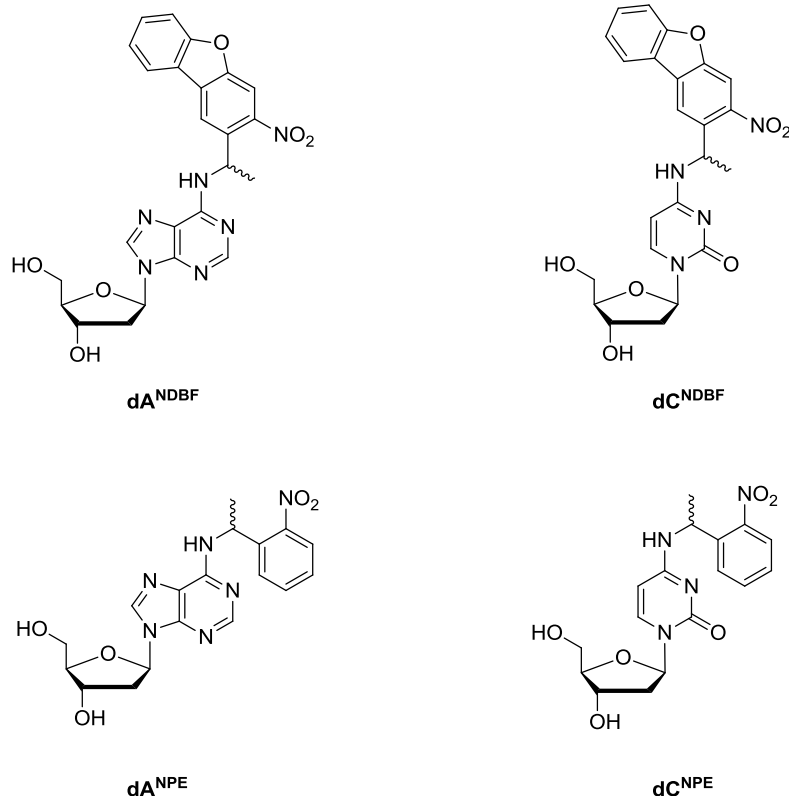
**Abbildung 35:** Syntheseweg zum NDBF-geschützten Desoxyadenosin-Phosphoramidit **61**.

### 3.1.4 Charakterisierung NDBF-modifizierter Oligonukleotide

Um zu testen, ob sich die synthetisierten Phosphoramidite mittels Festphasensynthese in ein DNA-Oligonukleotid einbauen lassen und ob die Schutzgruppe stabil gegenüber der basischen Abspaltung ist, wurde eine 15mer Testsequenz, im Folgenden als Benchmark-Sequenz bezeichnet, synthetisiert. Diese war bereits zuvor für vergleichende UV-spektroskopische Studien im Arbeitskreis Heckel verwendet worden.<sup>[130]</sup> Es wurden vier Oligonukleotide synthetisiert, die alle je ein photolabil geschütztes Nukleotid in der Mitte trugen, zwei mit den neuen  $dC^{\text{NDBF}}$ - und  $dA^{\text{NDBF}}$ -geschützten Nukleotiden und zu Vergleichszwecken zwei NPE-geschützte Oligonukleotide, die ein  $dA^{\text{NPE}}$  bzw.  $dC^{\text{NPE}}$  beinhaltenen (s. Abbildung 36). Die benötigten Phosphoramidite für die NPE-geschützten Oligonukleotide wurden analog zu bereits publizierten Vorschriften synthetisiert.<sup>[134,135]</sup>

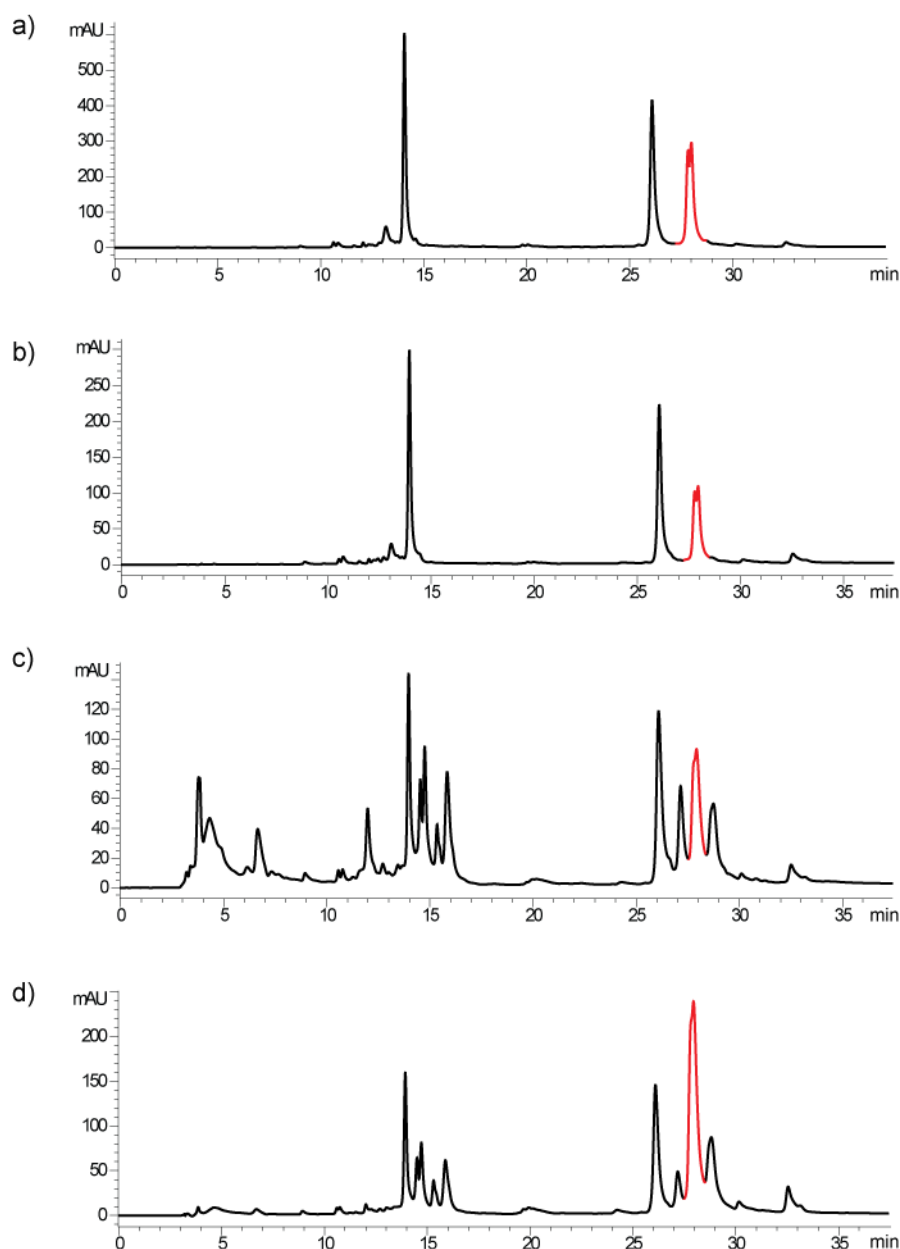
5'- GCA TAA AXA AAG GTG -3'

X =



**Abbildung 36:** Übersicht der verwendeten photolabil geschützten Nucleoside und der Basenabfolge der Benchmark-Sequenz. An der mit **X** markierten Position wurden die unten abgebildeten photolabil geschützten Nucleoside eingebaut.

Bei allen durchgeführten Synthesen mit den NDBF-geschützten Amiditen konnte für diese zwar nicht die gleiche Kopplungsausbeute wie für gekaufte Amidite erzielt werden, jedoch waren die synthetisierten Oligonucleotide, wie erwartet, stabil gegenüber der basischen Abspaltung mit  $\text{NH}_3$ . Als beste Bedingung erwies sich die Verwendung von konzentrierter Ammoniak-Lösung bei Raumtemperatur für 16 Std. (s. Abbildung 37a). Die Oligonucleotide wurden, wie üblich, im „DMTr-On“ Modus synthetisiert. Nach der Abspaltung von der festen Phase wurde per RP-HPLC aufgereinigt, danach wurde mit 80 %iger wässriger Essigsäurelösung detrityliert und erneut per RP-HPLC aufgereinigt. Auf diese Weise ließen sich aus einer Synthese im 200 nmol-Maßstab zwischen 40 und 45 nmol an sauberem NDBF-geschützten Oligonucleotid erhalten. Im Vergleich hierzu lagen die Ausbeuten bei den einfach NPE-modifizierten Oligonucleotiden bei bis zu 90 nmol.

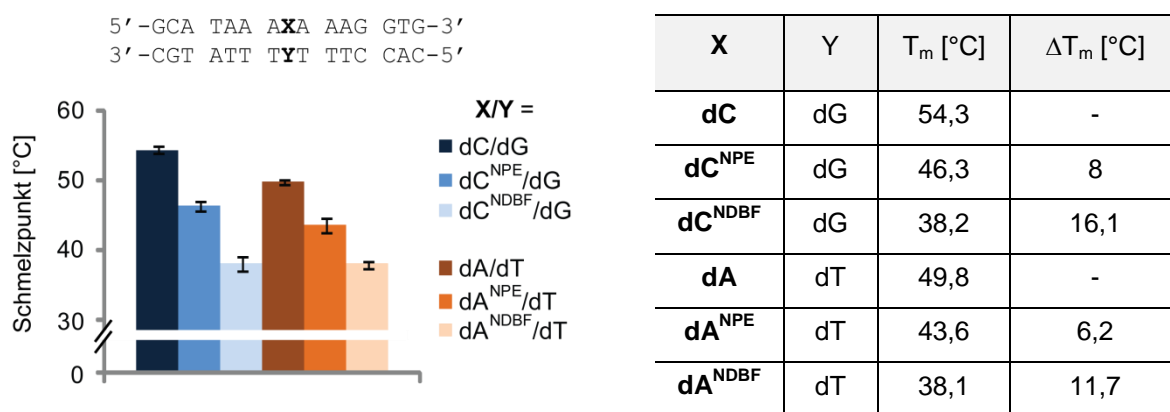


**Abbildung 37:** HPLC-Spektren der  $dC^{NDBF}$  enthaltenden Benchmark-Sequenz nach Abspaltung von der festen Phase unter verschiedenen Bedingungen: a)  $NH_3$ , 16 Std., RT; b)  $NH_3$ , 4 Std.,  $65^\circ C$ ; c)  $MeNH_2$ -Lsg. (8M in Ethanol), 4 Std., RT; d)  $MeNH_2/NH_3$  1:1, 16 Std., RT. Der Peak, der dem gewünschten Produkt entspricht, ist jeweils rot markiert. Das Produkt enthält noch die DMTr-Schutzgruppe am 5'-Ende. Der Doppelpeak entsteht, da ein Diastereomergemisch der photolabilen Schutzgruppe verwendet wurde. Es wurde ein Puffersystem aus Triethylammoniumacetat (0,1 M, pH 7) und Acetonitril verwendet. Gradient 5-40 % Acetonitril in 35 Minuten (Flussrate: 1 mL/min).

Nach der Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide wurden zunächst Schmelzpunktstudien durchgeführt, um den Einfluss der verschiedenen photolabilen Schutzgruppen auf die Stabilität von DNA-Duplexen untersuchen zu können. Grundsätzlich lassen sich für die Anwendung gecagerter Oligonukleotide zwei Grenzfälle unterscheiden. In Fällen, bei denen die Integrität eines ganz bestimmten Basenpaares benötigt wird, wie dies z.B. bei siRNAs der Fall ist, genügt es ein photolabil geschütztes Nukleotid an ebendieser Stelle

anzubringen, um die Funktion vollständig auszuschalten.<sup>[61]</sup> Hierbei sollte es im Prinzip nicht so wichtig sein, wie stark die Destabilisierung des Gesamtduplexes ist, solange die Basenpaarung nur hinreichend gestört ist. Der andere Grenzfall liegt vor, wenn es darum geht eine Wechselwirkung über einen großen Bereich effektiv zu stören, wie dies z.B. bei Molecular Beacons der Fall ist. Hierbei werden etliche photolabile Schutzgruppen benötigt, um die Bindung an die Ziel-mRNA vollständig zu vermeiden.<sup>[44]</sup> In diesen Fällen ist es grundsätzlich von Interesse photolabile Schutzgruppen zu verwenden, die möglichst stark destabilisierend wirken, um die Anzahl benötigter gecageter Nukleotide und somit den synthetischen Aufwand und die Komplexität der Aufreinigung möglichst gering zu halten.

Wie aus Abbildung 38 deutlich wird, führt der Einbau eines  $dC^{NDBF}$  zu einer Destabilisierung des Duplex um 16,1 °C. Das  $dC^{NDBF}$  destabilisiert somit doppelt so stark wie ein  $dC^{NPE}$ , was sich möglicherweise durch den stärkeren räumlichen Anspruch des größeren aromatischen Systems erklären lässt.



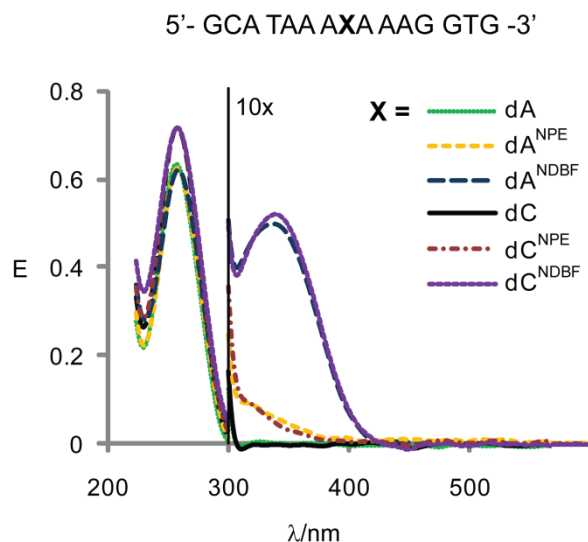
**Abbildung 38:** Schmelzpunkte der 15mer Duplexe aus der Benchmark-Sequenz mit dem entsprechenden unmodifizierten Gegenstrang. Beide Oligonukleotide wurden in 1 μM Konzentration in PBS-Puffer (pH 7,4) gemessen. Der Schmelzpunkt ist der Mittelwert aus sechs aufeinanderfolgenden Messungen mit der Standardabweichung als Fehler. Die ΔT<sub>m</sub>-Werte beziehen sich jeweils auf den Duplex mit der entsprechenden unmodifizierten Base.

Der gleiche Trend wurde für das  $dA^{NDBF}$  und das  $dA^{NPE}$  beobachtet. Hierbei ist der absolute Effekt allerdings in beiden Fällen kleiner. Dies könnte darauf beruhen, dass in diesem Fall mit A-T ein weniger starkes Basenpaar gestört wird als das C-G-Basenpaar.

Im nächsten Schritt wurde ein Verfahren zur photochemischen Charakterisierung photolabil geschützter Oligonukleotide entwickelt, das in der Folge standardisiert für alle neuen photolabil geschützten Nukleoside im Arbeitskreis Heckel anwendbar sein sollte. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist ein wichtiges Kriterium für die Qualität einer photolabilen Schutzgruppe die Effizienz, mit der sie sich wieder entfernen lässt. Dies hängt zum einen davon ab, wie gut das Licht der gewünschten Wellenlänge absorbiert wird, also vom Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ . Zum

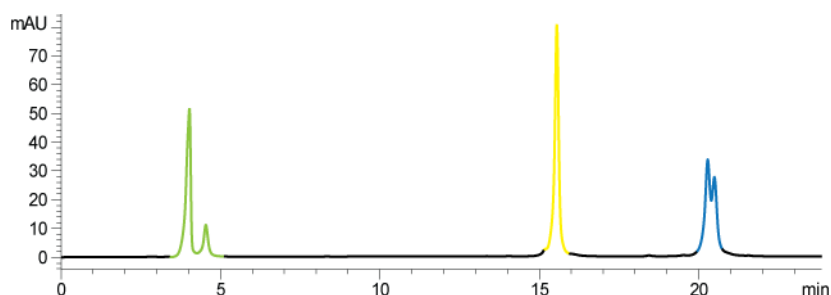


anderen ist es entscheidend, dass ein möglichst hoher Anteil des absorbierten Lichts für die gewünschte chemische Reaktion, in diesem Fall also die Abspaltung der Schutzgruppe, verwendet wird. Die durch Absorption eines Photons gewonnene Energie kann durch etliche andere Prozesse als durch eine Bindungsspaltung wieder vom entsprechenden Molekül abgegeben werden. Die Quantenausbeute ( $\phi$ ) gibt an, welcher Anteil des absorbierten Lichts für die Photolyse verwendet wird. Während man Absorptionseigenschaften von Molekülen recht gut vorhersagen kann, ist dies für Quantenausbeuten nicht so leicht möglich.<sup>[7]</sup> Quantenausbeuten lassen sich jedoch gut experimentell ermitteln. Zunächst wurden, um die Absorptionseigenschaften der verschiedenen photolabilen Schutzgruppen miteinander vergleichen zu können, UV-Vis-Spektren aufgenommen. Es wurde für die Bestimmung der Konzentration, wie auch zuvor im Arbeitskreis Heckel üblich, angenommen, dass die photolabilen Schutzgruppen im Vergleich zu den Nucleobasen nur geringfügig bei 260 nm absorbieren, die Extinktion bei 260 nm also unabhängig von der gewählten photolabilen Schutzgruppe ist und nur von der Abfolge der Nucleobasen abhängt. Bei gleicher Konzentration müssen somit alle Stränge gleicher Sequenz die gleiche Absorption bei 260 nm aufweisen. Es wurden jeweils zwei Lösungen hergestellt, eine mit 40  $\mu$ M DNA-Konzentration für die Messung des Bereichs oberhalb von 300 nm und eine mit 4  $\mu$ M DNA-Konzentration für den Bereich zwischen 200 und 300 nm, sodass die Absorptionswerte im gut messbaren Bereich zwischen 0,1 und 0,8 lagen (s. Abbildung 39). In der unteren Abbildung sind die so gemessenen Spektren abgebildet. Während unmodifizierte DNA bei Wellenlängen oberhalb von 300-310 nm praktisch kein Licht mehr absorbiert, geht der Extinktionsbereich der NPE-modifizierten Oligonukleotide bis nahe 400 nm. Auffällig ist die Tatsache, dass der Extinktionskoeffizient (s. auch Tabelle 3) der NPE-geschützten Oligonukleotide bei der normalerweise zur Entschützung verwendeten Wellenlänge von 365 nm nur sehr gering ist, was bedeutet, dass die Abspaltung hier, wie bereits zuvor angedeutet, nicht mit optimaler Effizienz verläuft. Die NDBF-geschützten Oligonukleotide weisen ein Maximum bei ca. 330 nm und eine immer noch deutlich erhöhte Absorption bei 365 nm auf. Außerdem ist eine signifikante Absorption auch oberhalb von 400 nm zu erkennen, was die Möglichkeit einer Entschützung mit sichtbarem Licht ermöglichen sollte. In ersten Bestrahlungsexperimenten ( $\lambda = 365$  nm) zeigt sich bereits, dass die Entschützung der NDBF-geschützten Oligonukleotide wesentlich schneller abläuft als die der NPE-geschützten Oligonukleotide und dass sich NDBF-geschützte Oligonukleotide auch noch mit Wellenlängen oberhalb von 400 nm, also mit sichtbarem Licht effektiv entschützen lassen.



**Abbildung 39:** UV-Vis Spektren verschiedener photolabil geschützter und unmodifizierter Benchmark-Sequenzen. Die Messung oberhalb von 300 nm wurde mit einer 10-fach höher konzentrierten Lösung (40 $\mu$ M in PBS, pH 7,4) durchgeführt als die Messung unterhalb von 300 nm (4 $\mu$ M in PBS, pH 7,4).

Um zu quantitativen Aussagen gelangen zu können, wurden nun im nächsten Schritt die Quantenausbeuten der vier Stränge bei 365 nm mithilfe der Dimethoxynitrobenzol-Actinometrie bestimmt.<sup>[136,137]</sup> Zunächst wurde mithilfe der bekannten Quantenausbeute von Dimethoxynitrobenzol (DMNB) die von der verwendeten LED gelieferte Photonenzahl bestimmt. Multipliziert mit der relativen Absorption der photolabilen Schutzgruppe, ergibt sich die Anzahl der absorbierten Photonen (genaue Berechnung s. Abschnitt 4.3.1.2). Nach Bestimmung der Photonenzahl wurden die Oligonukleotide in PBS gelöst und mit einem internen Standard aus Uracil/Uridin versetzt. Die Lösungen wurden für verschiedene Zeitpunkte bestrahlt und per HPLC analysiert, wobei bei der Quantifizierung auf den internen Standard normiert wurde.



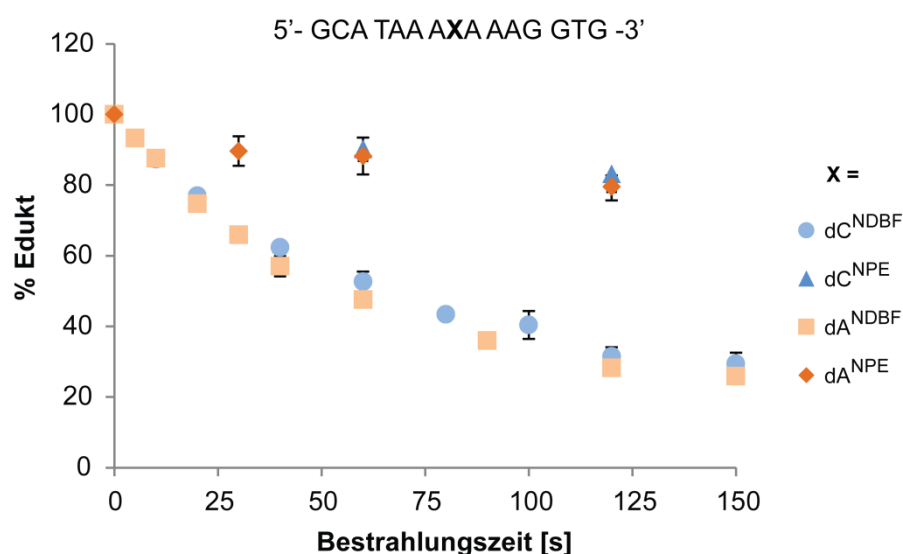
**Abbildung 40:** Exemplarisches HPLC-Spektrum zur Bestimmung der Quantenausbeute für die Benchmark-Sequenz mit dC<sup>NDBF</sup>. Das gezeigte HPLC-Spektrum stellt die Situation nach 80-sekündiger Bestrahlung dar. Grün markiert ist das Signal des internen Standards, gelb markiert das Signal des entschützten Oligonukleotids und hellblau das Signal des photolabil geschützten Oligonukleotids. Jeder Messpunkt wurde dreifach bestimmt. Es wurde ein Puffersystem aus Triethylammoniumacetat (0,1 M, pH 7) und Acetonitril mit einem verkürzten Gradienten von 5-26,3 % Acetonitril in 22 Minuten (Fluss: 1 mL/min).

Aus der Abnahme des Edukts lässt sich nun mit Hilfe der folgenden Formel die Quantenausbeute bestimmen.

$$\Phi = \frac{\Delta n_s}{n_p \cdot A_{\text{rel}}}$$

**Formel 1:** Formel zur Bestimmung der Quantenausbeute.  $\Phi$ : Quantenausbeute;  $\Delta n_s$ : Abnahme des Edukts;  $n_p$ : Anzahl Photonen;  $A_{\text{rel}}$ : rel. Absorption

Die Abnahme des Edukts lässt sich durch Bestimmung der Anfangssteigung aus der Auftragung des verbleibenden Startmaterials gegen die Bestrahlungszeit bestimmen (s. Abbildung 41)



**Abbildung 41:** Auftragung der Photolysekinetiken der verschiedenen photolabil geschützten Benchmark-Sequenzen in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit. Es wurden jeweils 13  $\mu\text{L}$  einer 20  $\mu\text{M}$  Lösung des Oligonukleotids und internem Standard (Uracil/Uridin) in 1x PBS (pH 7,4) in einer Küvette mit einer UV-LED für verschiedene Zeitpunkte bestrahlt. Die Mischung wurde anschließend per RP-HPLC analysiert. Durch exponentiellen Fit der obigen Auftragung und Differentiation wird aus der Anfangssteigung die Abnahme des Edukts  $\Delta n_s$  bestimmt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei Messungen.

In der unteren Tabelle sind die photochemischen Eigenschaften der verschiedenen Stränge dargestellt. Die Quantenausbeuten aller vier Schutzgruppen bewegen sich in einer ähnlichen Dimension. Im Fall des in das Oligonukleotid eingebauten geschützten Desoxyadenosins ist die Quantenausbeute im Rahmen des Fehlers von ca. 0.01-0.02 gleich für NPE und NDBF gleich, im Fall des geschützten Desoxycytidins verfügt die NPE-Gruppe über eine etwas bessere Quantenausbeute. Aus den UV-Vis-Spektren ist zu entnehmen, dass die NDBF-Schutzgruppe jedoch einen wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten bei 365 nm besitzt, der im Fall des  $\text{dA}^{\text{NDBF}}$  etwa 14-mal höher ist als beim  $\text{dA}^{\text{NPE}}$ . Das Oligonukleotid mit einem  $\text{dC}^{\text{NDBF}}$  hat sogar einen 19-mal höheren Extinktionskoeffizienten als das entsprechende NPE-geschützte

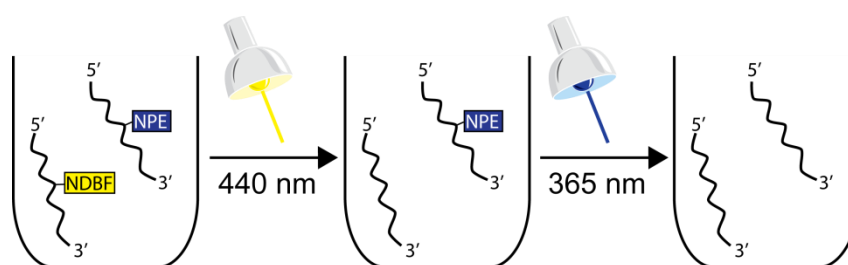
Oligonukleotid. Wie bereits zuvor erwähnt, ist das Maß für die Effizienz einer photolabilen Schutzgruppe das Produkt  $\epsilon\phi$  aus Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute. Vergleicht man die Werte, so ergibt sich, dass sich Oligonukleotide mit einer NDBF-Schutzgruppe etwa 12-mal so effizient entschützen lassen wie Oligonukleotide mit einer NPE-Schutzgruppe.

**Tabelle 3:** Übersicht der photochemischen Eigenschaften der vier verschiedenen photolabil geschützten Benchmark-Sequenzen: 5'- GCA TAA AXA AAG GTG -3'.

X	$\Phi$	$\epsilon$ (365 nm) [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\epsilon\Phi$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
dA <sup>NPE</sup>	0,14	684	97
dA <sup>NDBF</sup>	0,13	9801	1171
dC <sup>NPE</sup>	0,17	492	82
dC <sup>NDBF</sup>	0,10	9208	971

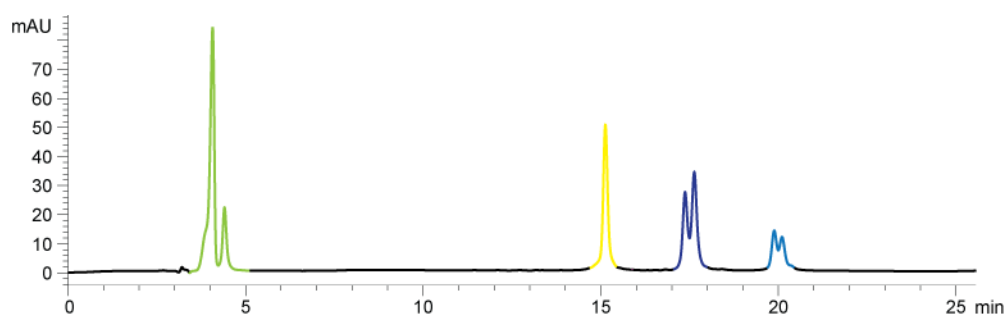
### 3.1.5 Wellenlängenselektives Entschützen

Wie in der Einleitung in Abschnitt 1.1.4 bereits erwähnt, ist ein Nachteil der Caging-Technologie die irreversible Natur dieses Prozesses. Man kann nur einmal von einem inaktiven in einen aktiven Zustand schalten. Wesentlich komplexere Anwendungen für gecagete Oligonukleotide ließen sich realisieren, wenn es gelänge, diese an mehreren funktionellen Stellen mit selektiv adressierbaren photolabilen Schutzgruppen zu versehen, die sich unabhängig voneinander in sequenzieller Art und Weise abspalten ließen. Während dieses Prinzip des wellenlängenselektiven Entschützens, wie in der Einleitung beschrieben, schon für verschiedene Klassen von gecageten Molekülen angewendet wurde, war dies zu Beginn dieser Arbeit für Oligonukleotide noch nicht gezeigt worden. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob es auch bei Oligonukleotiden prinzipiell möglich ist, ein System zu verwirklichen, bei dem sich eine photolabile Schutzgruppe in Anwesenheit einer weiteren entfernen lässt, ohne dass diese ebenfalls abgespalten wird (s. Abbildung 42). Bereits in den UV-Vis-Studien hatte sich angedeutet, dass sich NDBF-geschützte Oligonukleotide möglicherweise auch durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht entschützen lassen können. Erste Versuche bei 420 nm zeigten, dass dies in der Tat möglich ist. In einem Testversuch wurden je 200 pmol des dC<sup>NDBF</sup>- und des dC<sup>NPE</sup>-Oligonukleotids in einer Lösung bei 420 nm bestrahlt und anschließend per HPLC analysiert. Nach 5-minütiger Bestrahlung bei 420 nm war eine vollständige Entschützung des NDBF-geschützten Oligonukleotids erkennbar, wohingegen das NPE-geschützte Oligonukleotid nur zu ca. 20 % entschützt war.



**Abbildung 42:** Prinzip des Experiments zur wellenlängenselektiven Entschützung. Das NDBF-geschützte und das NPE-geschützte Oligonukleotid wurden in einer Lösung mit einer LED der Wellenlänge 440 nm bestrahlt, wodurch das NDBF abgespalten wird. Anschließend kann mit einer LED der Wellenlänge 365 nm bestrahlt werden, wobei die verbleibende NPE-Schutzgruppe abgespalten werden würde.

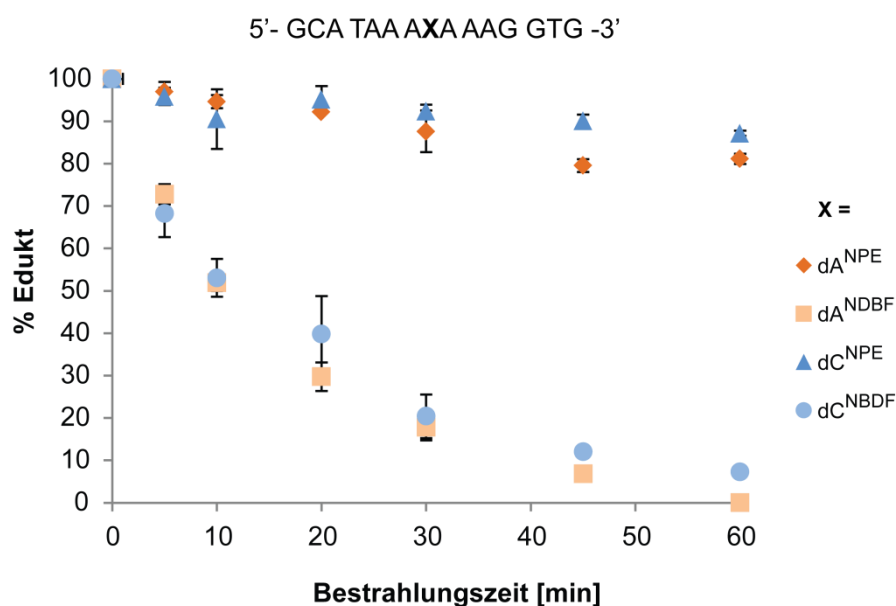
Als nächstes wurde nun versucht, ob sich bei noch höheren Wellenlängen eine bessere Selektivität erhalten lässt. Aus der Betrachtung der UV-Vis-Spektren erschien es als möglich, dass man NDBF-geschützte Oligonukleotide noch deutlich über 420 nm entschützen können sollte, wohingegen NPE-geschützte Oligonukleotide bei diesen Wellenlängen praktisch kein Licht mehr absorbieren sollten. Für eine quantitative Analyse der erreichbaren Selektivitäten wurde nun ein Gemisch der entsprechenden NPE-geschützten und der NDBF-geschützten Benchmark-Sequenz bei einer Wellenlänge von 440 nm bestrahlt. Wie bei der Bestimmung der Quantenausbeute wurde die Abnahme der Edukte aus den Eduktintegralen von HPLC-Spektren bestimmt. In der unteren Abbildung ist ein repräsentatives HPLC-Spektrum gezeigt, welches verdeutlicht, dass die beiden Oligonukleotide, bedingt durch die verschiedene Polarität der beiden Schutzgruppen, über einen hinreichend großen Unterschied in ihrer Retentionszeit verfügen, um sie als vollständig voneinander unterscheidbare Signale quantifizieren zu können.



**Abbildung 43:** Exemplarisches HPLC-Spektrum zur Quantifizierung der wellenlängenselektiven Entschützung einer Mischung aus  $dC^{NDBF}$ - und  $dC^{NPE}$ -Benchmark-Sequenz. In grüner Farbe dargestellt ist das Signal des internen Standards, gelb das der entschützten Oligonukleotide, dunkelblau das der NPE-geschützten Sequenz und hellblau das der NDBF-geschützten Sequenz.

Wie aus Abbildung 44 zu entnehmen ist, lassen sich bei längerer Bestrahlungszeit gute Selektivitäten im Bereich einer Größenordnung erhalten, was es prinzipiell ermöglichen sollte, ein selektiv nacheinander adressierbares System zu generieren, sofern zunächst die NDBF-Gruppe abgespalten wird.

Bei niedrigeren Wellenlängen werden, wie aus der Quantenausbeutebestimmung und den UV-Vis-Spektren ersichtlich, beide Schutzgruppen abgespalten. Es lässt sich somit kein komplett orthogonales System verwirklichen. Hierzu bedürfte es zweier komplett unterschiedlicher Schutzgruppen, deren Absorptionsbanden weiter auseinanderliegen müssten. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind die bis jetzt verfügbaren vollständig orthogonalen Systeme für Oligonukleotide jedoch nicht geeignet, da entweder schädliches UV-Licht verwendet werden müsste oder die Schutzgruppen nicht stabil gegenüber den Bedingungen der Festphasensynthese wären bzw. sind.



**Abbildung 44:** Wellenlängenselektives Entschützen von NDBF-Gruppen in Gegenwart von NPE-Gruppen. Es wurde jeweils eine Mischung von einer NPE- und einer NDBF-geschützten Benchmark-Sequenz (je 2  $\mu$ M, gleiche geschützte Nukleobase) in PBS (pH 7,4) mit einer LED bei 440 nm (30 mW) bestrahlt. Die Mischung wurde anschließend per RP-HPLC analysiert. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert von drei Messungen. Der Fehlerbalken wurde aus der Standardabweichung erhalten. Nach 60 Minuten sind die NDBF-geschützten Oligonukleotide nahezu vollständig entschützt. Die maximale Selektivität liegt im Bereich von 10:1 bis 12:1.

### 3.1.6 Vorversuche zur Zweiphotonenentschützung

Aus den Arbeiten von Ellis-Davies geht hervor, dass es sich beim NDBF auch um eine mit der Zweiphotonentechnik abspaltbare Schutzgruppe handelt, die einen  $\delta_u$ -Wert von 0,6 GM erreichte.<sup>[12]</sup> Daher sollte geklärt werden, ob auch NDBF-geschützte Oligonukleotide für die Entschützung mit Zweiphotonenlasern geeignet sind. Neben den bereits in Abschnitt 1.1.3 beschriebenen Vorteilen der Zweiphotonentechnik wäre die Verfügbarkeit einer solchen Schutzgruppe auch hinsichtlich einer zusätzlichen Ebene wellenlängenselektiver Entschützung von Interesse, da viele andere photolabile Schutzgruppen sich praktisch nicht mit der Zweiphotonentechnik abspalten lassen. Es wurden daher erste Vorversuche unternommen, um

zunächst zu zeigen, dass sich NDBF-geschützte Oligonukleotide mit einem Zweiphotonenlaser entschützen lassen. Hierzu wurde eine 20  $\mu\text{M}$  Lösung der  $\text{dC}^{\text{NDBF}}$ -Benchmark-Sequenz in PBS bei einer Wellenlänge von 710 nm mit einer Leistung von 1,2 W bestrahlt. Als Vergleich wurden gleich konzentrierte Lösungen der Benchmark-Sequenz mit  $\text{dC}^{\text{NPE}}$  oder  $\text{dG}^{\text{NPP}}$  bestrahlt. Die Messungen wurden analog zum Vorgehen bei der Quantenausbeute per RP-HPLC quantifiziert. Während die  $\text{dC}^{\text{NPE}}$ - und  $\text{dG}^{\text{NPP}}$ -Benchmark-Sequenz nach einstündiger Bestrahlung keinerlei Entschützung zeigten, war nach 10-minütiger Bestrahlung die  $\text{dC}^{\text{NDBF}}$ -Benchmark-Sequenz bereits zu 10 %, nach 60 Minuten dann zu 40 % entschützt. Die Effektivität einer Zweiphotonen-Schutzgruppe wird über deren Zweiphotonenwirkungsquerschnitt  $\delta_u$  beschrieben (s. Abschnitt 1.1.3). Zur Bestimmung dieses Wertes wird im Allgemeinen die Photolyserate bestimmt und mit einer Substanz mit bekanntem  $\delta_u$  unter gleichen Bestrahlungsbedingungen verglichen. Die Photolyserate kann nun entweder durch Fluoreszenzmessungen oder über HPLC bestimmt werden.<sup>[138,139,29]</sup> Im Fall der photolabil geschützten Oligonukleotide wird kein Fluoreszenzsignal bei der Entschützung generiert, sodass nur eine Analyse über HPLC möglich ist. Es wurden erste Tests durchgeführt, bei denen MNI-Glutamat, eine Substanz mit einem  $\delta_u$  von 0,06 GM bei 730 nm, als Referenzsubstanz verwendet wurde.<sup>[140]</sup> In Analogie zu Furuta et al. sollte sich nun der Zweiphotonenwirkungsquerschnitt gemäß folgender Formel bestimmen lassen.<sup>[139]</sup>

$$\delta_u = \frac{N_P \cdot \delta_{uR} \cdot c_R}{N_R \cdot c_P}$$

**Formel 2:** Formel zur Bestimmung des Zweiphotonenwirkungsquerschnitts, modifiziert nach Furuta et al.<sup>[139]</sup>  $\delta_u$  = Zweiphotonenwirkungsquerschnitt Probe,  $N_P$  = Photolyserate Probe,  $c_R$  = Konzentration Referenz,  $N_R$  = Photolyserate Referenz,  $c_P$  = Konzentration Probe.

MNI-Glutamat und die  $\text{dC}^{\text{NDBF}}$ -geschützte Benchmark-Sequenz wurden beide auf diese Weise in Küvetten mit 100  $\mu\text{L}$  Volumen für verschiedene Zeitpunkte bei 730 nm mit einem fokussierten Zweiphotonenlaser zusammen mit Dr. Radhan Ramadass im Arbeitskreis von Prof. Wachtveitl bei 1W Leistung bestrahlt und jeder Punkt wurde dreifach bestimmt. Ein Aliquot wurde nach der Bestrahlung entnommen und per HPLC analysiert. Es ergaben sich Photolysekinetiken (s. Anhang), aus denen mithilfe linearer Regression die Anfangssteigung ermittelt wurde. Mithilfe der Konzentrationen konnte so ein Umsatz in pmol/s bestimmt werden. Einsetzen in Formel 2 führte zu folgenden Werten:

$$\delta_u = \frac{0,012 \frac{\text{pmol}}{\text{s}} \cdot 0,06\text{GM} \cdot 500 \mu\text{M}}{0,8675 \frac{\text{pmol}}{\text{s}} \cdot 2\mu\text{M}} = 0,21 \text{ GM}$$

Dieser Wert kann jedoch aus mehreren Gründen nur als grobe Abschätzung des tatsächlichen Zweiphotonenwirkungsquerschnitt  $\delta_u$  angesehen werden. Um zu beweisen, dass es sich bei der beobachteten Entschützung tatsächlich um einen Zweiphotoneneffekt handelt, muss zunächst noch bewiesen werden, dass der photolytische Umsatz quadratisch von der Leistung des eingestrahlten Lichts abhängt. Es ist sonst nicht auszuschließen, dass die Abspaltung auf thermischen Effekten beruht, wenn man bedenkt, mit welchen IR-Licht-Intensitäten die Lösungen bestrahlt werden. Aufgrund des örtlich begrenzten Zweiphotoneneffekts, die Entschützung findet nur in einem Bruchteil des Küvettenvolumens statt, ist die Detektionsmethode per HPLC ebenfalls nur bedingt geeignet. Bei kurzen Bestrahlungszeiten ist der Umsatz zu gering, um per HPLC detektierbar zu sein. Bestrahlt man jedoch länger, kommt es zu einer Überlagerung des quadratischen Effekts mit Diffusionseffekten. Da es sich beim Referenzmolekül jedoch um ein wesentlich kleineres Molekül handelt als ein Oligonukleotid lässt sich nicht annehmen, dass die Diffusionsbeiträge etwa gleich groß sind. Mit der gewählten Methode war es somit nicht möglich, im Bereich zwischen 100 und 1000 mW eine quadratische Abhängigkeit der Entschützung von der Lichtintensität zu zeigen. Daher wurden weitere Messungen an diesem System nicht mehr vorgenommen. Ein geeigneter Assay sollte besser auf Fluoreszenz beruhen, weil sich hierbei, aufgrund der hohen Sensitivität der Fluoreszenzdetektion, auch wesentlich kleinere Mengen an entschütztem Oligonukleotid nachweisen lassen würden. Da dies mit den vorliegenden Oligonukleotiden jedoch nicht möglich war, war die Entwicklung eines solchen Assays nicht mehr Teil dieser Arbeit. Eine geeignete Methode wird zurzeit von Manuela Fichte erarbeitet.

### 3.1.7 Zusammenfassung & Ausblick

In diesem Projekt konnte erfolgreich die von Ellis-Davies eingeführte NDBF-Gruppe zur photolabilen Schützung von Desoxycytidin- und Desoxyadenosinresten in Oligonukleotiden angewendet werden. Es gelang durch Schützung des N<sup>4</sup> des Desoxycytidins bzw. des N<sup>6</sup> des Desoxyadenosins erfolgreich die Schutzgruppe in Oligonukleotide so einzubauen, dass sie gegenüber der basischen Entschützung hinreichend stabil ist. Die entsprechenden Oligonukleotide mit einem dA<sup>NDBF</sup> bzw. dC<sup>NDBF</sup> konnten auf diese Weise in akzeptablen Ausbeuten isoliert werden. Anhand einer standardisierten Sequenz, der sogenannten Benchmark-Sequenz, wurden die NDBF-geschützten Oligonukleotide mit NPE-geschützten Oligonukleotiden verglichen. NDBF-geschützte Oligonukleotide sind in der Lage, einen DNA-Duplex deutlich stärker zu destabilisieren als NPE-geschützte Oligonukleotide, wie anhand von Schmelzpunktstudien gezeigt werden konnte. Darüber hinaus wurde eine Methode entwickelt, um die photolabil geschützten Oligonukleotide hinsichtlich ihrer photochemischen Eigenschaften vergleichen zu können. Es wurden UV-Vis-Spektren der photolabil geschützten Oligonukleotide gemessen, die zeigten, dass bei der standardmäßig zur Entschützung verwendeten Wellenlänge von 365 nm die



NDBF-modifizierte Oligonukleotide über einen wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten verfügen als NPE-modifizierte Oligonukleotide. Mithilfe der DMNB-Actinometrie wurden in einem HPLC-basierten Ansatz zusätzlich die Quantenausbeuten der Entschützung der modifizierten Oligonukleotide bestimmt. Diese bewegten sich alle in der gleichen Größenordnung, wobei sowohl für die Benchmark-Sequenz mit modifizierten Desoxyadenosinen als auch für die Benchmark-Sequenz mit modifizierten Desoxycytidinen die Quantenausbeuten für die NPE-modifizierten Varianten etwas höher waren. Für die Effizienz der Entschützung ist jedoch das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient ( $\epsilon\phi$ ) entscheidend. Eine Analyse dieses Parameters ergab, dass sich NDBF-geschützte Oligonukleotide etwa 12-mal so effizient entschützen lassen wie NPE-geschützte Oligonukleotide. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich NDBF-geschützte Oligonukleotide auch mit sichtbarem, also langwelligerem Licht als UV-Licht entschützen lassen. Um photoschaltbare Systeme, die auf dem Caging-Ansatz beruhen, in komplexeren Systemen einsetzen zu können als solchen, die nur auf dem einmaligen irreversiblen Anschalten beruhen, ist es wünschenswert, über photolabile Schutzgruppen zu verfügen, die sich unabhängig voneinander oder zumindest sequentiell mit Licht verschiedener Wellenlängen entschützen lassen. Das hier vorgestellte System konnte einen ersten wichtigen Beitrag zu diesem Ansatz des orthogonalen Entschützens von Oligonukleotiden leisten. Mit sichtbarem Licht der Wellenlänge 440 nm gelang es, mit einer Selektivität im Bereich einer Größenordnung die NDBF-Schutzgruppe in Anwesenheit einer NPE-Schutzgruppe in Oligonukleotiden abzuspalten, ohne dass diese ebenfalls signifikant entschützt wird. Zumindest für eine sequentielle Entschützung von Oligonukleotiden ist das System aus NDBF und NPE also geeignet. Als ein erster Schritt in diese Richtung müsste jedoch zunächst noch gezeigt werden, dass auch in einem Oligonukleotid, welches beide Schutzgruppen in einem Strang enthält, eine sequentielle Entschützung mit gleicher Selektivität möglich ist.

In ersten Testversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass NDBF-geschützte Oligonukleotide auch mit der Zweiphotonentechnik entschützt werden können. Dies eröffnet die Möglichkeit einer wesentlich besseren Ortsauflösung der Aktivierung sowie für potentielle *in vivo* Anwendungen von gecageten Oligonukleotiden eine wesentlich höhere Eindringtiefe des Lichts, sodass auch beispielsweise Areale in tieferen Hautschichten entschützt werden könnten (s. auch Abschnitt 3.3.7 und 3.4.7). Als nächster Schritt muss jedoch dafür zunächst ein Assay entwickelt werden, der es ermöglicht den Beweis zu erbringen, dass es sich bei der Entschützung tatsächlich um einen Zweiphotoneneffekt handelt.

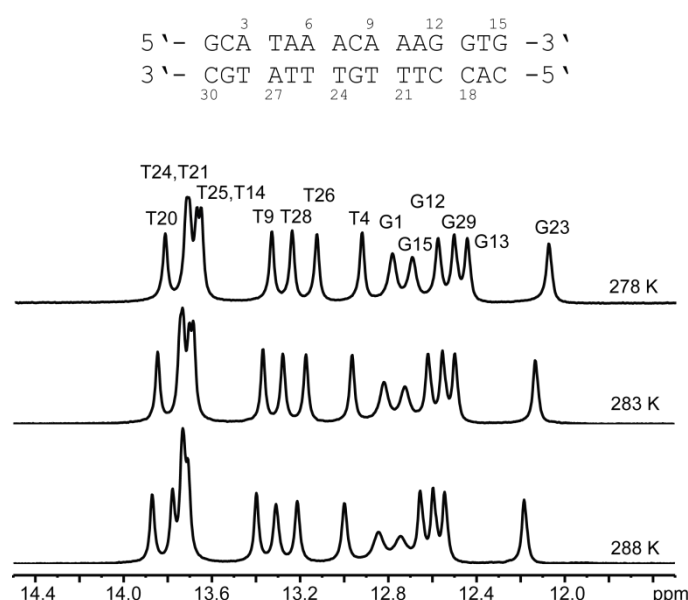
## 3.2 NMR-Studien NPE-geschützter DNA-Duplexe

### 3.2.1 Einleitung

In Abschnitt 3.1.4 wurde bereits beschrieben, dass man beim Caging von Oligonukleotiden zwei Grenzfälle unterscheiden kann. Entweder wird eine Destabilisierung eines längeren Duplex angestrebt oder die selektive Inhibierung der spezifischen Wechselwirkung einer Nukleobase. Zu Beginn dieses Projekts war die Auswirkung einer photolabilen Schutzgruppe lediglich durch UV-Spektroskopie untersucht worden. Hieraus lassen sich jedoch nur Rückschlüsse auf die globale Stabilität eines modifizierten Duplex im Vergleich zum unmodifizierten ziehen.<sup>[130]</sup> Es lässt sich keinerlei strukturelle Information gewinnen und beim Einbau nur einer photolabilen Schutzgruppe ist es ebenfalls nicht möglich, Aussagen über die Reichweite der Destabilisierung zu treffen. Es wäre daher wünschenswert, über eine Methode zu verfügen, die es ermöglicht, die Auswirkungen einer photolabilen Schutzgruppe auf die Stabilitäten der einzelnen Basenpaare zu quantifizieren. Des Weiteren wäre es von Interesse, die strukturelle Grundlage für die Destabilisierung durch eine photolabile Schutzgruppe zu finden bzw. Informationen darüber zu gewinnen, welche Veränderungen der Helixstruktur durch die photolabile Schutzgruppe hervorgerufen werden. Eine Methode zur Bestimmung der Einzelbasenpaarstabilitäten mithilfe der Temperaturabhängigkeit der Iminoprotonenaustauschraten ist im Arbeitskreis von Prof. Schwalbe etabliert. Mithilfe dieser Methode sollten die Auswirkungen einer photolabilen Schutzgruppe auf einzelne Basenpaare anhand der freien Dissoziationenthalpien in einem DNA-Duplex quantifiziert werden. Hieraus sollten Schlussfolgerungen gezogen werden, auf wie viele Basenpaarungen sich die photolabile Schutzgruppe auswirkt, die Reichweite der Destabilisierung sollte so bestimmt werden. Schlussendlich müsste es mittels NMR ebenfalls möglich sein, ein Strukturmodell zu entwerfen, das möglicherweise eine Erklärung für den destabilisierenden Einfluss der photolabilen Schutzgruppe liefern kann. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Hannah Steinert aus diesem Arbeitskreis durchgeführt. Die Messung, Zuordnung und Auswertung sämtlicher NMR-Spektren sowie die Berechnung der daraus erhaltenen thermodynamischen Parameter wurde von ihr vorgenommen. Die Strukturmodellierung wurde von Hannah Steinert und Dr. Henry A. Jonker durchgeführt. Die eigenen experimentellen Arbeiten in diesem Projekt umfassten die Synthese der benötigten Phosphoramidite und deren Einbau in Oligonukleotide, die Aufreinigung der erhaltenen Oligonukleotide sowie UV-spektroskopische Messungen und die Berechnung der daraus resultierenden thermodynamischen Parameter.

### 3.2.2 Auswahl des Doppelstrangs

Um die Auswirkungen des Einbaus einer photolabilen Schutzgruppe auf die Struktur eines DNA-Duplex und die Stabilitäten der einzelnen Basenpaare bestimmen zu können, musste zunächst eine geeignete Sequenz gefunden werden. Es sollte erst an einer unmodifizierten Sequenz gearbeitet werden, um herauszufinden, ob sich alle Iminprotonenresonanzen der entsprechenden Basensequenz zuordnen lassen. Um eine Vergleichbarkeit mit vorherigen Schmelzpunktstudien<sup>[130]</sup> zu haben, fiel die Wahl zunächst auf die unmodifizierte Benchmark-Sequenz (s. Abschnitt 3.1) mit einem zentralen C-G-Basenpaar. Es stellte sich jedoch bereits zu Beginn heraus, dass sich bei dieser Sequenz gerade die zentralen Basenpaare, in Nachbarschaft zu der Stelle, an der später die photolabile Schutzgruppe eingebaut werden sollte, nicht eindeutig zuordnen ließen (s. Abbildung 45).



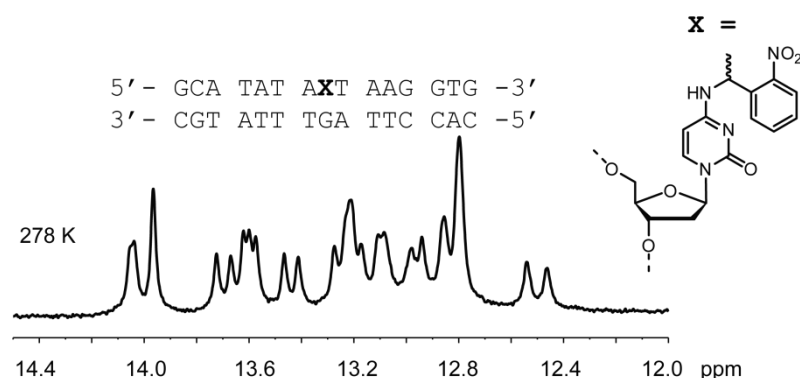
**Abbildung 45:**  $^1\text{H}$ -1D NMR Spektren (900 MHz) des Duplex aus der Benchmark-Sequenz und des entsprechenden Gegenstrangs bei verschiedenen Temperaturen. Es ist zu sehen, dass bereits bei 278 K die Signale für T24, T21, T25 und T14 nicht getrennt voneinander aufgelöst werden können. Die Spektren wurden von Hannah Steinert gemessen und ausgewertet.

Daher wurde die Basenabfolge der Sequenz so geändert, dass die symmetrische Verteilung der Basen im Zentrum aufgehoben wurde. Mit der so veränderten Sequenz gelang eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Basen. Die Zuordnung der Resonanzen erfolgte mithilfe von  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren („Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy“). NOESY-Spektren beruhen auf dem sogenannten Kern-Overhauser-Effekt (NOE) und zeigen im Gegensatz zu H,H-COSY-Spektren nicht skalare, über Bindung vermittelte Kopplungen, sondern durch den Raum vermittelte Kopplungen benachbarter Protonen an.<sup>[141]</sup> Die Intensität des NOE ist abhängig vom Abstand der gemessenen Kerne und für Protonen bis ca. 5 Å beobachtbar. Neben den skalaren Kopplungen ist der NOE ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der Struktur von

Biomolekülen.<sup>[142]</sup> In Kapitel 3.2.3 ist die prinzipielle Vorgehensweise erläutert, um eine Zuordnung der einzelnen Iminoprotonenresonanzen zu treffen. Aufbauend auf der modifizierten Sequenz wurde ein photolabil geschützter Strang synthetisiert, der an der achten Position ein  $dC^{NPE}$  trug (s. Abbildung 46). Das benötigte modifizierte Phosphoramidit wurde wieder nach bereits publizierten Vorschriften synthetisiert.<sup>[134]</sup>

### 3.2.3 Spektren-Auswertung & Diastereomerentrennung

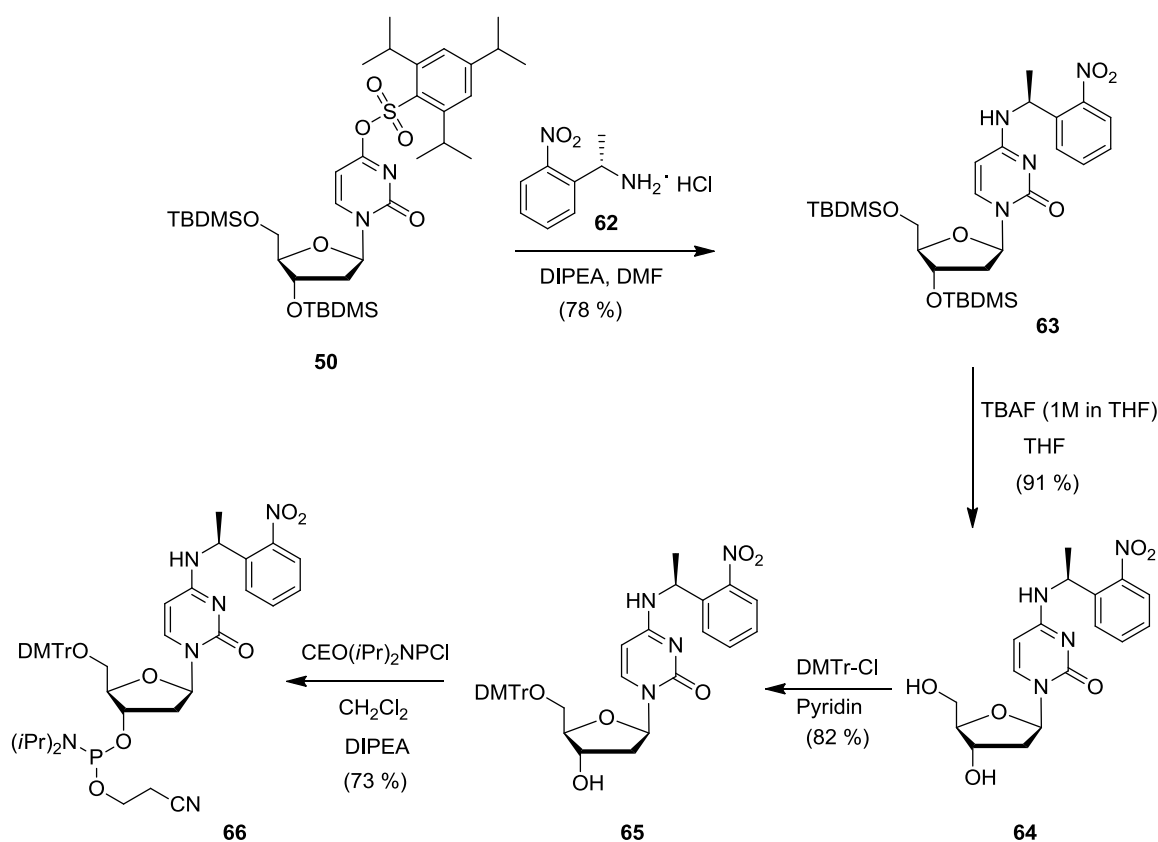
Die NPE-Schutzgruppe verfügt über ein Chiralitätszentrum am benzylichen Kohlenstoff (s. Abbildung 46). Bis zu dieser Studie war es im Arbeitskreis Heckel üblich, immer mit Diastereomergemischen der resultierenden Oligonukleotide zu arbeiten, da die Stereoinformation im Aktivierungsschritt bei der Bestrahlung ohnehin verlorengeht. Im Zuge der Monomersynthese werden so zwar bei der NMR-Analytik meist keine definierten Multipletts erhalten, die Spektren bleiben jedoch trotzdem auswertbar. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum des für diese Studie synthetisierten DNA-Duplexes erwies sich die Auswertung jedoch als zu schwierig, da durch das Diastereomergemisch mehr als 15 Signale im Iminoprotonenbereich erhalten wurden, sodass dieser sich nicht mehr den entsprechenden Nukleotiden zuordnen ließ (s. Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Ausschnitt der Iminoprotonenregion aus dem NMR-Spektrum (600 MHz) des  $dC^{NPE}$ -modifizierten Duplex. Es sind aufgrund der beiden enthaltenen Diastereomere ca. 20 Signale zu sehen. Eine Zuordnung der Verschiebungen zu bestimmten Nukleotiden mittels  $^1H$ - $^1H$ -NOESY-Spektren ist nicht möglich. Gemessen von Hannah Steinert.

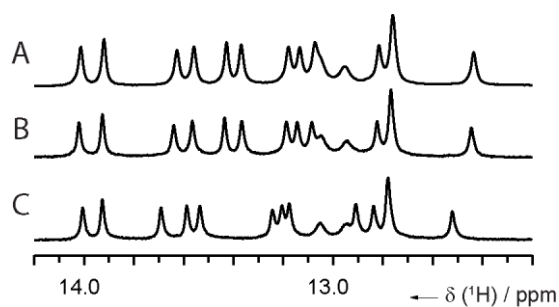
Daher musste eine Auftrennung der beiden Diastereomere zunächst auf der Ebene des fertigen Oligonukleotids vorgenommen werden. Diese Aufreinigung wurde von Elke Stirnal aus dem Arbeitskreis Schwalbe durchgeführt. Im Anschluss daran wurde ein  $dC^{S-NPE}$ -Monomer-Baustein stereospezifisch synthetisiert und in ein Oligonukleotid gleicher Sequenz eingebaut. Die Synthese erfolgte, ausgehend vom bereits zuvor verwendeten Nukleosid **50**, welches mit dem kommerziell erhältlichen Hydrochlorid-Salz von (*S*)-1-(2-Nitrophenyl)ethylamin **62** in DMF zu **63** umgesetzt wurde. Ausgehend hiervon erfolgte die Synthese des Phosphoramidits **66** in drei Schritten. Zunächst wurden die Silylgruppen mit TBAF entschützt, dann die 5'-OH-Gruppe mit DMTr-Cl

geschützt. Es folgte die Amiditierung zu **66**. Das Phosphoramidit konnte, ausgehend von **50**, in einer Ausbeute von 42 % erhalten werden.



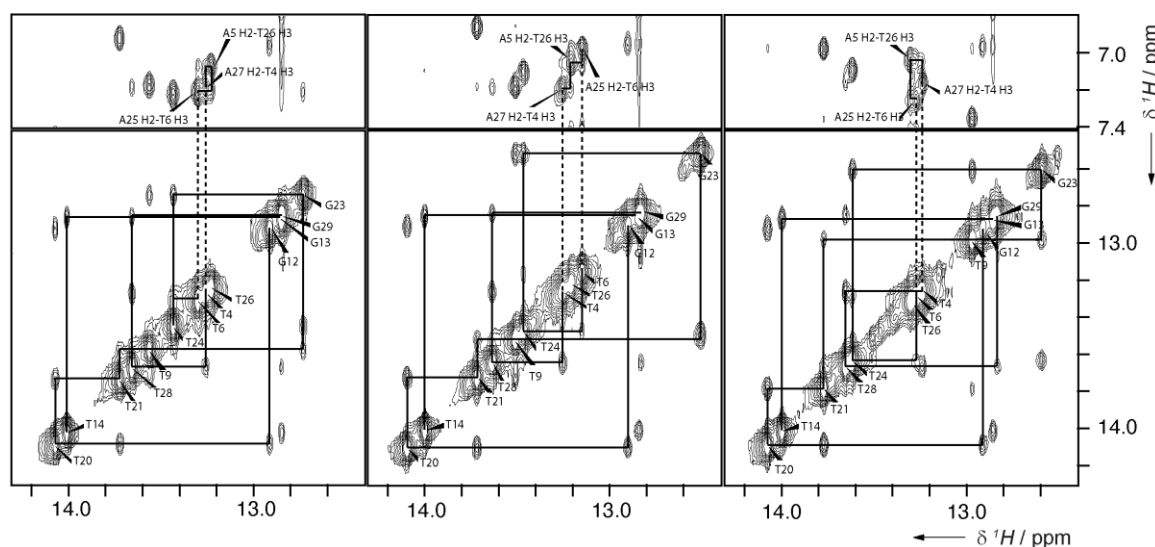
**Abbildung 47:** Synthese des dC<sup>S-NPE</sup>-geschützten Phosphoramidits **66** zur Herstellung eines enantiomerenreinen, photolabil geschützten Oligonukleotids. Das (*S*)-1-(2-Nitrophenyl)ethylamin Hydrochlorid **62** ist kommerziell erhältlich.

Das synthetisierte Amidit **66** wurde nun zur Synthese des enantiomerenreinen Oligonukleotids verwendet. Durch Vergleich mit den NMR-Spektren, die sich aus der Diastereomertrennung mittels HPLC ergaben, konnte so die absolute Konfiguration der NPE-Gruppe in den zuvor aufgetrennten Oligonukleotiddiastereomeren bestimmt werden (s. Abbildung 48).



**Abbildung 48:** Iminoprotonenregion der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des stereospezifisch synthetisierten Duplex mit dC<sup>S-NPE</sup> (A) und der beiden Duplexe mit den per HPLC aufgetrennten Oligonukleotid-Diastereomeren <sup>S-NPE</sup>dC8 (B) und <sup>R-NPE</sup>dC8 (C). Gemessen von Hannah Steinert.

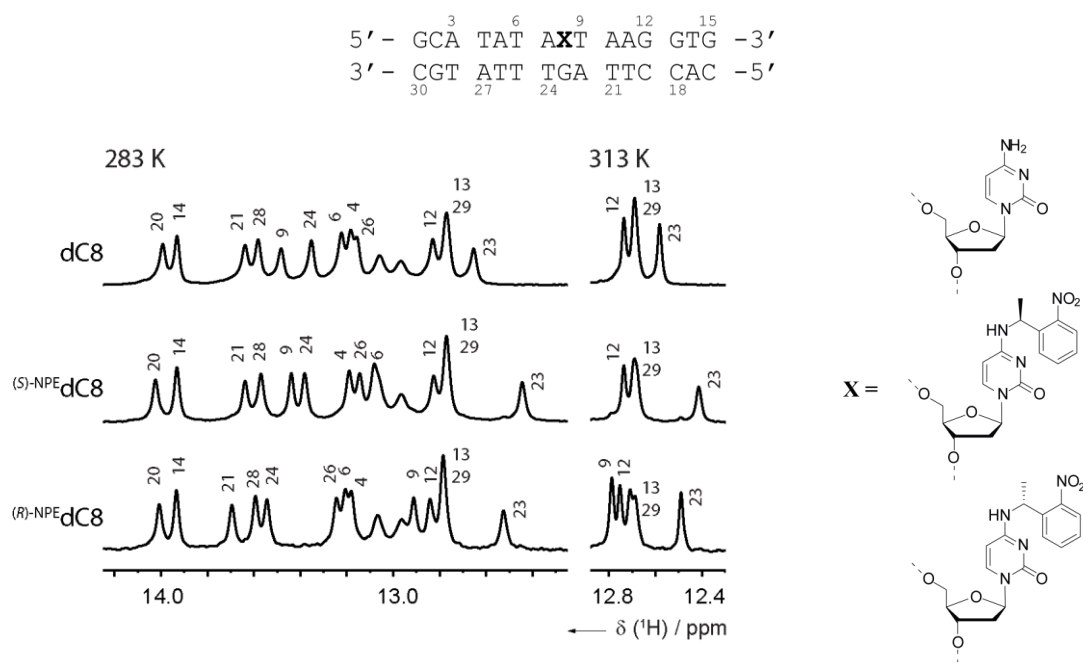
Aus den  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren des unmodifizierten Duplex sowie der beiden Diastereomere ließen sich die Iminoprotonen den einzelnen Nukleotiden zuordnen. Die äußeren Nukleotide G1 und G15 lassen sich nicht per NOESY detektieren, da nur fest in Wasserstoffbrückenbindungen fixierte, nicht schnell austauschende Iminoprotonen im NMR-Spektrum sichtbar sind. Außerdem sind die Verschiebungen der jeweiligen Iminoprotonen immer gut separiert, alle Thymidin-H3-Iminoprotonen kommen bei 13-15 ppm zur Resonanz, die Desoxyguanosin-H1-Protonen bei Werten unterhalb 13 ppm. Die sequenzielle Zuordnung lässt sich dann, beginnend vom T14 oder vom G29 aus, treffen. Diese beiden Nukleotide haben immer nur einen Kreuzpeak im Iminoprotonbereich des NOESY, da sie immer nur zu einem unterhalb bzw. oberhalb liegenden Iminoproton koppeln. Nach Identifizierung des nächsten Nukleotids kann man nun sequentiell immer den nächsten Kopplungspartner zuordnen. In Abbildung 49 ist das entsprechende Vorgehen dargestellt. Die drei Thymidine T4, T25 und T26 lassen sich auf diese Weise nicht zuordnen, da die Signale nicht weit genug auseinanderliegen. Daher wurden die Kreuzpeaks der entsprechenden Thymidine mit dem H2 der basengepaarten Adenosine identifiziert. Es ergibt sich immer ein intensiver Kreuzpeak zum benachbarten Adenosin und ein schwächerer zum darüber und/oder darunterliegenden Adenosin.



**Abbildung 49:**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY 2D-Spektren des unmodifizierten Duplex (links), des modifizierten Duplex mit  $d\text{C}^{\text{S-NPE}}$  (mitte) und  $d\text{C}^{\text{R-NPE}}$  (rechts). Gemessen und ausgewertet von Hannah Steinert.

Aus Abbildung 50 geht hervor, dass der Einbau der photolabilen Schutzgruppe zu einer signifikanten Hochfeld-Verschiebung des Iminoprotons G23 führt. Die Tatsache, dass das Signal detektiert werden kann, spricht jedoch dafür, dass das photolabil geschützte  $d\text{C}^{\text{NPE}}$ -Nukleotid bei beiden Diastereomeren eine Watson-Crick-Basenpaarung ausbildet, der Einbau einer photolabilen Schutzgruppe dies also nicht verhindert. Weitere deutliche Unterschiede sind nur noch bei den Nukleotiden T24 und T9 zu erkennen, also den der modifizierten Base direkt benachbarten. Beim

*S*-NPE-Diastereomer ist die Änderung der chemischen Verschiebung gering, während für das *R*-NPE-Diastereomer das T9 deutlich hochfeldverschoben, das T24 deutlich tieffeldverschoben ist. Die anderen Nukleotide weisen keine signifikante Veränderung der chemischen Verschiebung auf. Dies deutet bereits darauf hin, dass der Einfluss der photolabilen Schutzgruppe auf die direkt benachbarten Nucleobasen beschränkt sein könnte.



**Abbildung 50:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektren des Iminprotonenbereichs mit Zuordnung der Signale. Unmodifizierter Duplex dC8 (oben),  $\text{dC}^{\text{S-NPE}}$ -modifizierter Duplex  $^{\text{S-NPE}}\text{dC8}$  (mitte),  $\text{dC}^{\text{R-NPE}}$ -modifizierter Duplex  $^{\text{R-NPE}}\text{dC8}$  (unten). Der linke Teil zeigt die Spektren bei 283 K, der rechte Teil den Ausschnitt um das zentrale Basenpaar C8:G23 bei 313 K. Ganz rechts sind die Strukturen der Nucleoside, die sich an der Stelle X im Duplex befinden, abgebildet. Gemessen und ausgewertet von Hannah Steinert

### 3.2.4 UV-Spektroskopie der verschiedenen Diastereomere

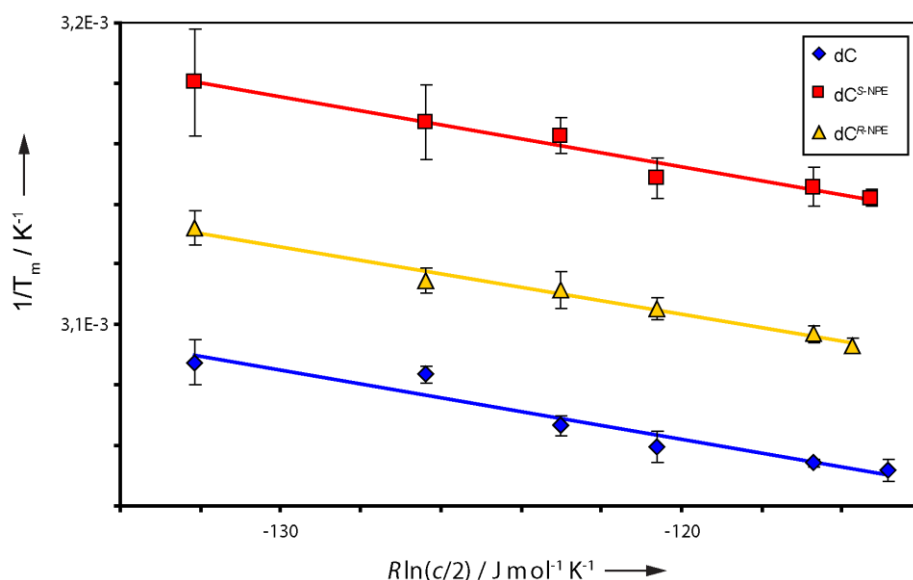
Nach der Trennung und Zuordnung der einzelnen Diastereomere und einer ersten NMR-spektroskopischen Analyse wurden nun parallel zu der von Hannah Steinert durchgeführten Bestimmung der Iminprotonenaustauschraten UV-spektroskopische Schmelzpunktuntersuchungen vorgenommen. Es sollte festgestellt werden, inwiefern sich die absolute Konfiguration der NPE-Gruppe auf die Stabilität des Gesamtduplex auswirkt. Es wurde der gleiche Puffer wie für die NMR-Untersuchungen verwendet und eine Konzentrationsreihe mit je sechs verschiedenen Konzentrationen pro Duplex zwischen 0,25 und 2  $\mu\text{M}$  Konzentration verwendet, um aus den Ergebnissen thermodynamische Daten zu extrahieren. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Schmelzpunktstudien für eine 1  $\mu\text{M}$  Duplexkonzentration gezeigt. In Einklang mit vorherigen Studien konnte für beide NPE-Enantiomere eine deutliche Destabilisierung festgestellt werden.<sup>[130]</sup> Überdies scheint sich die absolute Konfiguration signifikant auf die

Destabilisierung des Duplex auszuwirken. Während der Einbau eines  $dC^{R-NPE}$  zu einer Erniedrigung des Schmelzpunktes um  $4,8^\circ\text{C}$  führt, destabilisiert das  $dC^{S-NPE}$  deutlich stärker mit einem  $\Delta T_m$  von  $9,2^\circ\text{C}$  (s. Tabelle 4). Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelzpunkte lassen sich nach Mergny et al. thermodynamische Parameter wie  $\Delta H^0$  und  $\Delta S^0$  bestimmen. Für eine bimolekulare Assoziation, wie im vorliegenden Fall, sollte die Erhöhung der Konzentration zu einer Bevorzugung der Assoziationsreaktion führen. Dies schlägt sich in der Erhöhung des Schmelzpunktes nieder. Unter der Annahme, dass die Enthalpie temperaturunabhängig ist, also  $\Delta c_p = 0$  ist, lässt sich folgende Abhängigkeit des Schmelzpunktes von der Konzentration formulieren.<sup>[143]</sup>

$$\frac{1}{T_m} = \frac{\Delta S_{un}}{\Delta H_{un}} - \frac{R \cdot \ln\left(\frac{c_d}{2}\right)}{\Delta H_{un}}$$

**Formel 3:** Formel zur Bestimmung der Enthalpie- und Entropiewerte der Entwindung eines DNA-Duplex aus der Konzentrationsabhängigkeit des Schmelzpunktes.  $T_m$  = Schmelzpunkt;  $\Delta S_{un}$  = Entwindungsentropie;  $\Delta H_{un}$  = Entwindungsenthalpie;  $R$  = universelle Gaskonstante;  $c_d$  = Duplexkonzentration.

Durch Auftragung von  $1/T_m$  gegen  $R \cdot \ln(c_d/2)$  sollte man dementsprechend eine Gerade mit der Steigung  $-1/\Delta H_{un}$  erhalten. Aus dem Achsenabschnitt lässt sich zusätzlich die Entwindungsentropie bestimmen. In der unteren Abbildung sind die erhaltenen Geraden gezeigt.



**Abbildung 51:** Auftragung der Konzentrationsabhängigkeit des Schmelzpunktes der drei verschiedenen untersuchten DNA-Duplexe gemäß Formel 3. Aus der Steigung und dem Achsenabschnitt der linearen Fits wurden, wie oben beschrieben,  $\Delta H_{un}$  und  $\Delta S_{un}$  bestimmt.

Aus den erhaltenen Werten lässt sich mithilfe der Gibbs-Gleichung zusätzlich noch die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G_{un}$  bestimmen. Dieser Wert wurde mithilfe der folgenden Formel für eine



Duplexkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  bestimmt. Bei dieser Konzentration wurden auch die oben genannten Schmelzpunktdifferenzen gemessen.

$$\Delta G_{\text{un}} = \Delta H_{\text{un}} - T \cdot \Delta S_{\text{un}} + RT \ln c_d$$

**Formel 4:** Gibbs-Gleichung zur Bestimmung der freien Reaktionsenthalpie der Duplexentwindung in Abhängigkeit der Duplexkonzentration  $c_d$ . Der Wert wurde zu Vergleichszwecken (s. unten) bei 293 K bestimmt.

In der unteren Tabelle sind alle wichtigen aus den Schmelzpunktmessungen ermittelten Daten zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Übersicht der aus den Schmelzpunktmessungen erhaltenen thermodynamischen Parameter. Der Fehler des Schmelzpunkts beträgt  $\pm 0,7^\circ\text{C}$ , die Fehler der Enthalpie  $\Delta H_{\text{un}}$  und der Entropie  $\Delta S_{\text{un}}$  liegen bei ca. 14 %.

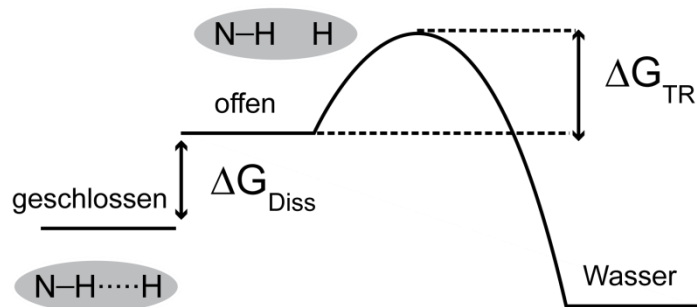
DNA	$T_m$ (1 $\mu\text{M}$ ) [ $^\circ\text{C}$ ]	$\Delta H_{\text{un}}$ [kJ/mol]	$\Delta S_{\text{un}}$ [J/mol·K]	$\Delta G_{\text{un}}$ (1 $\mu\text{M}$ ) [kJ/mol]
<b>dC8</b>	53,7	436	1214	46
<sup>S-NPE</sup> <b>dC8</b>	44,5	432	1242	34
<sup>R-NPE</sup> <b>dC8</b>	48,9	446	1265	42

Nach Searle et al. lässt sich bei einem DNA-Duplex die Enthalpie  $\Delta H_{\text{un}}$  hauptsächlich dem Beitrag der Basenstapelung („base stacking“) zuordnen. Das heißt, dass hohe  $\Delta H_{\text{un}}$ -Werte für eine große Stabilisierung des Duplex durch Basenpaarstapelung sprechen. Dem entgegengesetzt ist die Entropie  $\Delta S_{\text{un}}$ . Beim Schmelzen eines Duplex findet ein Übergang von einer hoch geordneten in eine weniger geordnete Struktur statt. Es werden Rotationsfreiheitsgrade gewonnen, da die Helixstruktur im Gegensatz zu einem ungeordneten Einzelstrang („random coil“) wesentlich starrere Torsionswinkel vorgibt. Eine weniger geordnete Struktur führt damit zu einem Energiegewinn aufgrund einer höheren Entropie. Zusammengenommen wird dies als Enthalpie-Entropie-Kompensation bezeichnet. Ein höheres  $\Delta H_{\text{un}}$  führt immer auch zu einem erhöhten  $\Delta S_{\text{un}}$ .<sup>[144]</sup> Dies gilt sowohl für natürliche Duplexe als auch für solche, die unnatürliche, z.B. alkylierte Basen enthalten.<sup>[145]</sup> Man geht davon aus, dass diese Kompensation wichtig ist, um eine Reversibilität zwischen helikaler und nicht-helikaler Struktur aufrechtzuerhalten, da das lokale Schmelzen einzelner Bereiche für viele biologische Prozesse wie z.B. die Transkription wichtig ist.<sup>[144]</sup> Überraschenderweise ist im Rahmen des Fehlers kein signifikanter Unterschied der Werte für Enthalpie und Entropie zwischen den modifizierten und unmodifizierten Duplexen zu erkennen, sodass aus den Schmelzpunktstudien alleine keine Rückschlüsse auf die strukturelle Basis der durch die photolabile Schutzgruppe hervorgerufenen Destabilisierung gezogen werden

können. In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass die erhaltenen Resultate in Widerspruch zu bereits zuvor publizierten Resultaten von Rodrigues-Correia et al. stehen. Hier wurden ähnliche Duplexe untersucht und zwischen unmodifizierten und einfach photolabil geschützten DNA-Duplexen zwar geringe, aber doch signifikante Unterschiede für die Enthalpie und Entropie der Duplexentwindung festgestellt. Es wurde ebenfalls eine signifikante Enthalpie-Entropie-Kompensation festgestellt.<sup>[130]</sup> Es ist zu erwähnen, dass diese Messungen in einem anderen Puffersystem durchgeführt wurden. Möglicherweise sind die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten auch zu fehlerbehaftet, da die Korrelationskoeffizienten der linearen Fits nicht immer optimal waren. Von Mergny et al. wird in einer ausführlichen Diskussion dargestellt, warum die aus Schmelzpunktmessungen erhaltenen Daten oft fehlerbehaftet sind. Es werden zum einen, wie oben beschrieben, einige vereinfachende Annahmen gemacht, zum anderen sollten Schmelzpunkte möglichst über einen hohen Konzentrationsbereich gemessen werden. Dies ist jedoch aufgrund der hohen Absorption von DNA nicht uneingeschränkt möglich.<sup>[143]</sup> Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die hier durchgeführten Messungen nur eine grobe Orientierung geben und nicht die strukturelle Ursache für die Destabilisierung von Duplexen durch den Einbau von photolabilen Schutzgruppen klären konnten.

### 3.2.5 Iminoprotonenaustausch-Experimente

Damit biologische Vorgänge wie z.B. DNA-Reparaturmechanismen ablaufen können, muss es möglich sein, Basenpaare gezielt zu öffnen. NMR-Iminoprotonenaustausch-Experimente sind bestens geeignet, um diese Prozesse auf der Ebene des einzelnen Basenpaars untersuchen zu können. Dementsprechend sind in der Vergangenheit bereits etliche Studien veröffentlicht worden, die diese Methode verwenden. In den meisten Studien wurden Dissoziationskonstanten der Einzelbasenpaare aus Titrationsexperimenten bei einer Temperatur mit verschiedenen Katalysatorkonzentrationen bestimmt.<sup>[146-148]</sup> Nachteilig ist hierbei, dass sich keine Enthalpie- und Entropiewerte daraus ermitteln lassen. Dies gelingt nur, wenn die Austauschraten zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen bestimmt werden. Die Entwicklung dieser Methode ist in einer Veröffentlichung von Rinnenthal et al. beschrieben. Experimentell geht man grundsätzlich so vor, dass mit einer geeigneten Pulssequenz die Magnetisierung von Wasser selektiv invertiert und dann der Magnetisierungstransfer des Wassers auf die Iminoprotonen in Abhängigkeit der Mischzeit und der Temperatur verfolgt wird.<sup>[149]</sup> Der Austausch eines basengepaarten Iminoprotons läuft in zwei Schritten ab. Zunächst wird das Basenpaar geöffnet, erst dann erfolgt der Austausch des Iminoprotons mit dem Lösungsmittel oder anderen Protonenakzeptoren im Puffersystem aus der offenen Konformation wie in Abbildung 52 gezeigt.



**Abbildung 52:** schematische Darstellung des Iminoprotonenaustauschs unter  $EX_2$ -Bedingungen. (Modifiziert nach Rinnenthal et al.)<sup>[149]</sup>

Es lassen sich nun zwei Grenzfälle unterscheiden: Im ersten Grenzfall führt jede Basenpaaröffnung zu einem Austausch ( $EX_1$ -Bedingungen); im zweiten ist der Protonenaustausch so langsam, dass nicht jede Öffnung sofort zum Austausch führt ( $EX_2$ -Bedingungen). Die durchgeführten Experimente finden unter  $EX_2$ -Bedingungen statt, sodass sich die Austauschzeit  $\tau_{ex}$  additiv aus der Lebenszeit des Basenpaares  $\tau_0$  und der Austauschzeit des offenen Basenpaares  $\tau_{ex,open}$  zusammensetzt. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ex}$  ist reziprok zur Austauschzeit. Nach Gueron et al. ergibt sich somit für  $k_{ex}$  unter  $EX_2$ -Bedingungen, bei denen die Lebenszeit des Basenpaares  $\tau_0$  gegenüber der Austauschzeit aus der offenen Konformation  $\tau_{ex,open}$  vernachlässigbar klein ist.<sup>[150]</sup>

$$k_{ex} \cong \frac{1}{\left(\tau_{ex,open} \cdot \left(1 + \frac{1}{K_{Diss}}\right)\right)} \quad (1)$$

Drückt man die Gleichgewichtskonstante  $K_{diss}$  als Funktion der Freien Enthalpie  $\Delta G_{diss}$  aus und berücksichtigt die Eyring-Gleichung aus der Theorie des Übergangszustands, nach der gilt

$$k_{ex,open} = \kappa \cdot \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot K_{TR} \quad (2) \text{ sowie } K_{TR} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (3),$$

so lässt sich die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ex}$  unter Berücksichtigung von (1), (2) und (3) unter Annahme, dass  $\kappa = 1$ , mit folgender Formel ausdrücken:

$$k_{ex} = \frac{1}{\tau_{ex,open} \left(1 + \frac{1}{K_{Diss}}\right)} = \frac{1}{\frac{h}{k_B T} \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_{TR}}{RT}\right) \left(1 + \exp\left(\frac{\Delta G_{Diss}}{RT}\right)\right)} + d$$

**Formel 5:** Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{ex}$  von der freien Enthalpie des Übergangszustands des Austauschs in der offenen Konformation  $\Delta G_{TR}$  und von der freien Enthalpie der Basenpaaröffnung  $\Delta G_{Diss}$ .  $k_B$  = Boltzmann-Konstante,  $h$  = Planck-Konstante,  $T$  = Temperatur,  $d$  = zusätzlicher Term aufgrund von Kreuzrelaxationseffekten.

Der zusätzliche Term  $d$  in Formel 5 berücksichtigt dipolare Kreuzrelaxationseffekte, die ein Artefakt der „inversion recovery“ Messmethode sind. Es kommt hierbei immer zu einem Magnetisierungstransfer zwischen Iminoprotonen und den anderen Protonen des Oligonukleotids. Man würde dementsprechend Austauschraten erhalten, die höher sind als die tatsächlich aus dem Austausch resultierenden.<sup>[149]</sup> Die Austauschraten  $k_{ex}$  wurden aus inversion recovery Experimenten bestimmt, die im Temperaturbereich zwischen 278 und 323 K durchgeführt wurden, indem man bei verschiedenen Mischzeiten die normalisierten Iminoprotonensignale misst und den Wert dann gegen die Mischzeit aufträgt. Die erhaltene Auftragung lässt sich dann nach folgender Gleichung fitten.

$$\frac{I_n(t)}{I_n(0)} - 1 = \left( \frac{I_w(0)}{\langle I_n(0) \rangle} - 1 \right) \cdot k_{ex} \frac{\exp(-R_{1n}t) - \exp(-R_{1w}t)}{-R_{1n} + R_{1w}}$$

**Formel 6:** Fitgleichung zur Bestimmung der Iminoprotonenaustauschrate.  $I_n(t)$ ,  $I_n(0)$  = Intensität des Iminoprotons zur Mischzeit  $\tau_m = t$  und  $\tau_m = 0$ ;  $I_w(0)$ ,  $\langle I_n(0) \rangle$  = Intensität des Wassersignals bzw. des Iminoprotonensignals, normalisiert auf die Anzahl der Protonen dieser Spezies;  $R_{1n}$  und  $R_{1w}$  = longitudinale Relaxationsrate des Iminoprotons bzw. von Wasser.

Die beobachteten Austauschraten setzen sich immer aus einem intrinsischen Katalysemechanismus und einem externen Katalysemechanismus zusammen. Ersterer wird durch das N1 von Adenosin bzw. das N3 von Cytidin bewirkt. Es handelt sich hierbei zwar um schlechte Protonenakzeptoren, die lokale Konzentration im Duplex ist aber hoch, da eine räumliche Nähe besteht. Die externe Katalyse wird durch Wasser oder einen geeigneten Protonenakzeptor im Puffer, z.B. Phosphat, bewirkt.<sup>[150]</sup> Aufgrund des Zusammenspiels von externer und intrinsischer Katalyse müssen die Austauschraten bei zwei verschiedenen Katalysatorkonzentrationen bestimmt werden (100 und 5 mM  $K_xH_yPO_4$ ). Aus der Differenz  $\Delta k_{ex}$  der beiden lassen sich dann gemäß der unteren Formel durch Fitten der Austauschdaten gegen die Temperatur die thermodynamischen Parameter  $\Delta H_{Diss}$  und  $\Delta S_{Diss}$  bestimmen.

$$\Delta k_{ex} = \frac{1}{\frac{h}{k_B T} \cdot \exp\left(\frac{\Delta H_{TR} - \Delta S_{TR}}{RT}\right) \left(1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{Diss} - \Delta S_{Diss}}{RT}\right)\right)}$$

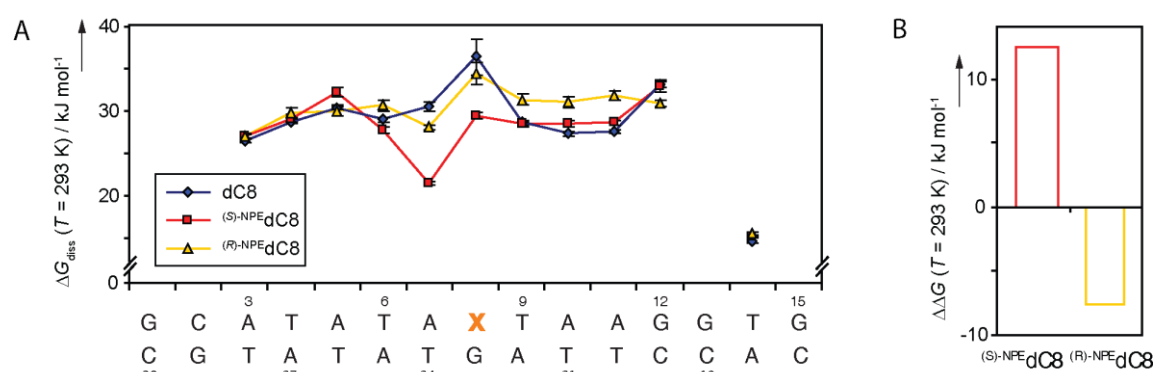
**Formel 7:** Fit-Formel zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter  $\Delta H_{Diss}$  und  $\Delta S_{Diss}$  aus der Temperaturabhängigkeit der Austauschrate.  $\Delta H_{TR}$  und  $\Delta S_{TR}$  = thermodynamische Parameter für den Austausch aus der offenen Konformation (s. Abbildung 52) mit Wasser. Die beiden Parameter wurden unter Berücksichtigung der veränderten Masse aus den Austauschraten von Mononukleosidtriphosphaten bestimmt.

Aus den Daten, die aus dem Fit erhalten werden, lässt sich nun mithilfe der Gibbs-Gleichung die Stabilität jedes einzelnen Basenpaars ( $\Delta G_{\text{Diss}}$ ) bei verschiedenen Temperaturen bestimmen. Es gilt:

$$\Delta G_{\text{Diss}} = \Delta H_{\text{Diss}} - T \cdot \Delta S_{\text{Diss}}$$

**Formel 8:** Gibbs-Gleichung zur Bestimmung der Einzelbasenpaarstabilitäten  $\Delta G_{\text{Diss}}$ . Die thermodynamischen Parameter  $\Delta H_{\text{Diss}}$  und  $\Delta S_{\text{Diss}}$  wurden aus der temperaturabhängigen Messung der Iminoprotonenaustauschraten erhalten (s. Formel 7).

In Abbildung 53A ist eine Übersicht der Einzelbasenpaarstabilitäten der drei verschiedenen Duplexe dargestellt. Die genauen Einzelwerte aller drei Duplexe sind im Experimentellen Teil zu finden (Tabellen 10, 11 und 12), die Differenzen zwischen modifiziertem und unmodifiziertem Strang in Tabelle 5.



**Abbildung 53:** A) Einzelbasenpaarstabilitäten des unmodifizierten Duplex dC8 (blau), des modifizierten Duplex <sup>S-NPE</sup>dC8 (rot) und des modifizierten Duplex <sup>R-NPE</sup>dC8 (gelb). Der Wert für  $\Delta G_{\text{Diss}}$  wurde aus den thermodynamischen Parametern  $\Delta H_{\text{Diss}}$  und  $\Delta S_{\text{Diss}}$  bei einer Temperatur von 293 K bestimmt. Für die äußeren Basenpaare lassen sich aufgrund des zu schnellen Austauschs keine Raten bestimmen. Bei den mit Stern versehenen Basen kommt es bei dem mit dC<sup>R-NPE</sup> modifizierten Duplex bei erhöhten Temperaturen zu überlappenden Iminoprotonenresonanzen; B) Differenz der Gesamtdestabilisierung der beiden modifizierten Duplexe <sup>S-NPE</sup>dC8 (rot) und <sup>R-NPE</sup>dC8 (gelb) im Vergleich zum unmodifizierten Duplex erhalten aus der Summe der Einzelbasenpaarstabilitäten bei 293 K. Ein positiver Wert bedeutet, dass der modifizierte Duplex instabiler als der unmodifizierte ist. Gemessen und ausgewertet von Hannah Steinert

Aus Abbildung 53A geht hervor, dass sich die Einzelbasenpaarstabilitäten besonders im mittleren Bereich deutlich unterscheiden, also im Bereich der Modifikation. Für den Fall des unmodifizierten Duplex bewegen sich die Werte zwischen 14,2 kJ/mol für das T14·A17, 30,5 kJ/mol für das A7·T24 und 36,4 kJ/mol für das C8·G23. Erwartungsgemäß ist sowohl das zentrale C8·G23 als auch das G12·C19 stabiler als die umgebenden AT-Basenpaare. Im Fall <sup>R-NPE</sup>dC8 kommt es zu einer leichten Erniedrigung von  $\Delta G_{\text{Diss}}$  beim A7·T24 (28,1 kJ/mol) und C8·G23 (34,4 kJ/mol). Erstaunlicherweise sind die Werte für T9·A22, A10·T21 und A11·T20 jedoch höher als im unmodifizierten Fall. Alle anderen Basenpaare unterscheiden sich nur minimal vom

unmodifizierten Fall. Der Einbau einer *S*-NPE-Gruppe führt zu einer deutlich stärkeren Destabilisierung der zentralen Basenpaare, wobei auch hier der destabilisierende Effekt auf das A7·T24 (21,5 kJ/mol) und das C8·G23 (29,5 kJ/mol) beschränkt bleibt. Überraschend ist, dass die Destabilisierung des A7·T24 ( $\Delta\Delta G_{\text{Diss}} = 9$  kJ/mol) sogar stärker ist als die des C8·G23 ( $\Delta\Delta G_{\text{Diss}} = 6,9$  kJ/mol), obwohl letzteres der direkte Watson-Crick Partner des modifizierten Cytidins ist (s. Tabelle 5). Es lässt sich also in Übereinstimmung mit den Daten des globalen Schmelzens aus Abschnitt 3.2.4 erneut feststellen, dass die absolute Konfiguration der photolabilen Schutzgruppen einen signifikanten Einfluss darauf hat, wie groß die resultierende Störung des Duplex ist. Mit beiden Messmethoden konnte eine deutlich stärkere destabilisierende Wirkung des *S*-NPE-Diastereomers festgestellt werden.

Summiert man die Differenz aller Einzelbasenpaarstabilitäten (s. Abbildung 53B und Formel 9) so stellt man fest, dass sich im Fall von <sup>*S*-NPE</sup>dC8 eine Gesamtdestabilisierung ergibt ( $\Delta\Delta G_{\text{Diss}} = 12,4$  kJ/mol). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem starken Absinken der Schmelztemperatur.

$$\Delta\Delta G_{\text{Diss}} = \sum(\Delta G_{\text{Diss},i}(\text{unmodifiziert}) - \Delta G_{\text{Diss},i}(\text{NPE} - \text{modifiziert}))$$

**Formel 9:** Bestimmung der Differenz der Einzelbasenpaarstabilitäten zwischen unmodifiziertem und modifiziertem Duplex (s. Abbildung 53b).

Für <sup>*R*-NPE</sup>dC8 Fall ist dies nicht so, es ergibt sich in Summe sogar eine leichte Stabilisierung ( $\Delta\Delta G_{\text{Diss}} = -7,6$  kJ/mol) bei der Messtemperatur von 293 K, die deutlich unter dem Schmelzpunkt liegt. Die Stabilisierung der Basenpaare T9·A22, A10·T21 und A11·T20 wird nicht durch die Destabilisierung der Paare A7·T24, C8·G23 und G12·C19 kompensiert.

Die Gesamtdestabilisierung des Duplex lässt sich also nicht anhand der Differenz der Einzelbasenpaarstabilitäten erklären.

Um Aussagen über die strukturelle Ursache treffen zu können, die der unterschiedlichen Destabilisierung durch die verschiedenen NPE-geschützten Nukleoside zugrunde liegt, sollte nun im nächsten Schritt ein Strukturmodell die beiden modifizierten Duplexe errechnet werden.

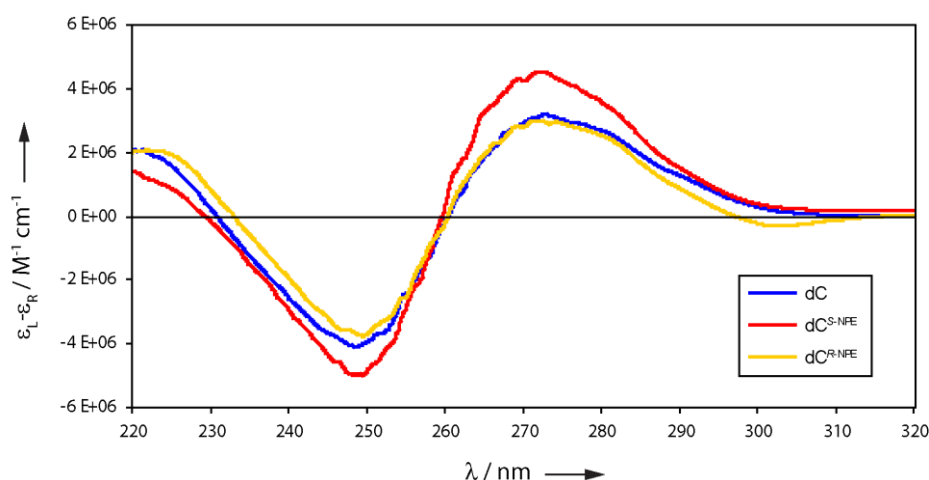
**Tabelle 5:** Differenz der Einzelbasenpaarstabilitäten zwischen modifiziertem und unmodifiziertem Duplex. Ein negativer Wert bedeutet, dass das Basenpaar des modifizierten Duplex stabiler ist, ein positiver Wert, dass das Basenpaar des unmodifizierten Duplex stabiler ist. Ausgewertet von Hannah Steinert

Basenpaar	$\Delta\Delta G_{\text{Diss}}$ [kJ/mol] (T = 293 K)	
	<i>S</i> -NPE dC8	<i>R</i> -NPE dC8
<b>A3·T28</b>	-0,6	-0,6
<b>T4·A27</b>	-0,3	-1,1
<b>A5·T26</b>	-1,8	0,4
<b>T6·A25</b>	1,2	-1,7
<b>A7·T24</b>	9,0	2,4
<b>C8·G23</b>	6,9	2,1
<b>T9·A22</b>	0,2	-2,7
<b>A10·T21</b>	-1,2	-3,7
<b>A11·T20</b>	-1,1	-4,2
<b>G12·C19</b>	0,3	2,3
<b>T14·A17</b>	-0,4	-0,9

### 3.2.6 CD-Spektroskopie der Duplexe

Die Strukturrechnung wird vereinfacht, wenn man bekannte Parameter für die verschiedenen Diederwinkel der Zucker, des Phosphatrückgrats und der Nukleobasen voraussetzen kann. Um zu überprüfen, ob dieses Vorgehen statthaft ist und tatsächlich eine B-Form-Helix im Fall der modifizierten Duplexe vorliegt, eignet sich die Methode der CD-Spektroskopie. Hierbei wird die Wechselwirkung chiraler Moleküle mit zirkular polarisiertem Licht untersucht. Man misst die unterschiedliche Absorption links- und rechtszirkular polarisierten Lichts. Aufgetragen gegen die Wellenlänge, ergibt sich so ein CD-Spektrum, das im Fall von Nukleinsäureduplexen charakteristisch für die vorliegende Sekundärstruktur, z.B. A-Helix, B-Helix oder auch G-Quadruplex, ist. Der chirale Zuckeranteil der Nukleinsäuremoleküle induziert den Circular dichroismus in die UV-Absorptionsbande der Nukleobasen.<sup>[151]</sup> Für B-Helices ist ein Maximum bei 270 nm und ein Minimum bei ca. 250 nm zu erwarten.<sup>[152]</sup> In Abbildung 54 sind die CD-Spektren der drei Duplexe abgebildet. Anhand dieser Spektren lässt sich schlussfolgern, dass

es durch den Einbau der photolabilen Schutzgruppe nicht zu einer Störung der B-helikalen Geometrie kommt.

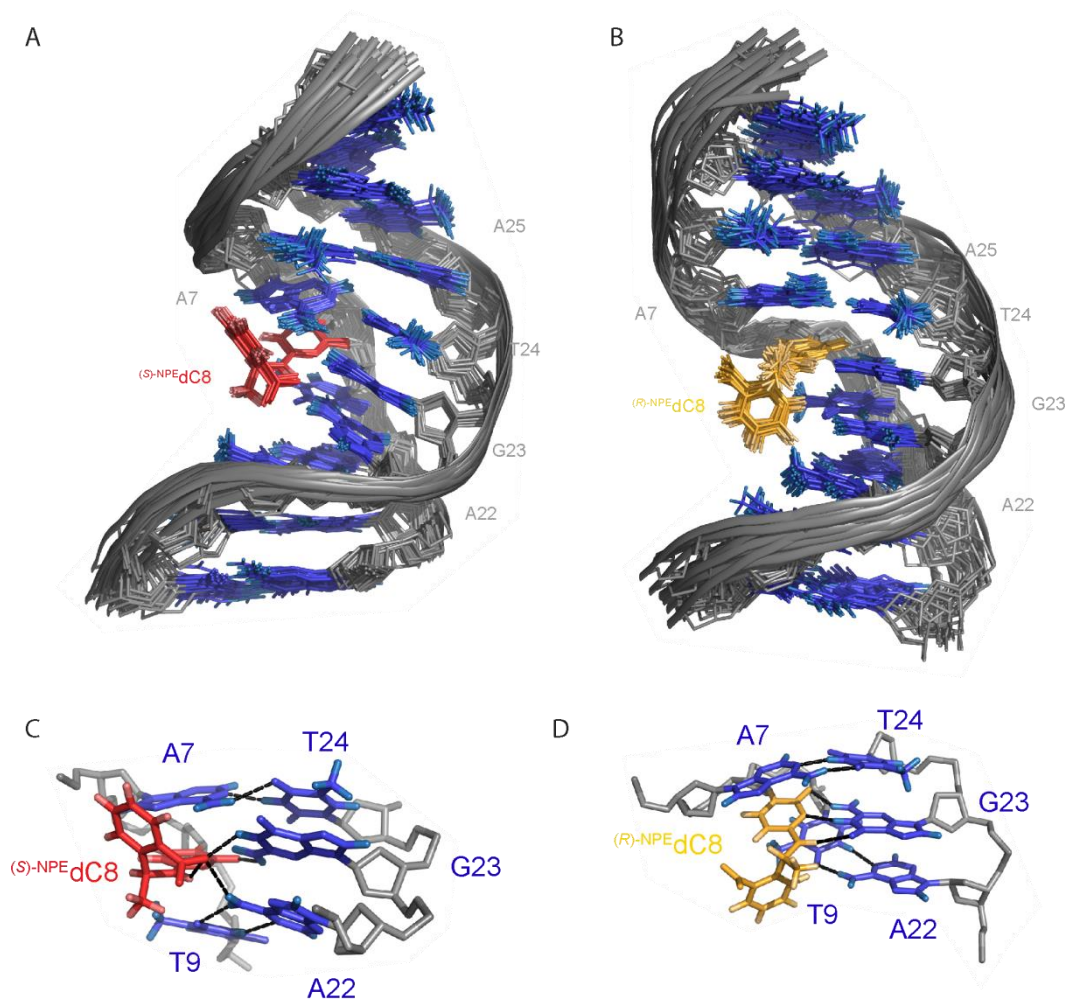


**Abbildung 54:** CD-Spektren der drei untersuchten Duplexe. Es wird die Differenz der Absorption links- und rechtszirkular polarisierten Lichts ( $\epsilon_L - \epsilon_R$ ) gegen die Wellenlänge aufgetragen. Der S-NPE-modifizierte Duplex (rot) sowie der R-NPE-modifizierte Duplex (gelb) weisen das gleiche Minimum und das gleiche Maximum wie der unmodifizierte Duplex (blau) auf. Es ist daher davon auszugehen, dass keine Störung der B-helikalen Struktur vorliegt. Gemessen von Hannah Steinert.

### 3.2.7 Strukturrechnung

Um der strukturellen Ursache der unterschiedlichen Destabilisierung durch die verschiedenen Enantiomere der photolabilen Schutzgruppe auf den DNA-Duplex auf den Grund zu gehen, wurde abschließend eine Strukturrechnung basierend auf NOE-Daten durchgeführt. Es handelt sich hierbei jedoch nur um ein Strukturmodell, da lediglich homonukleare NMR-Daten verwendet wurden. Es mussten deshalb nicht experimentell ermittelte Geometrie einschränkungen für die Berechnung verwendet werden, um ein Bündel konvergierender Strukturen zu erhalten. Für eine genaue Strukturberechnung müssten auch Daten von Heterokernen herangezogen werden, wofür dann eine Markierung mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  nötig wäre. Aufgrund der Bestätigung der B-helikalen Struktur aller Duplexe per CD-Spektroskopie wurden daher bezüglich der Diederwinkel des Rückgrats, der Zucker- und der Basenverknüpfung und der Basenpaarplanarität sowie der Watson-Crick-Basenpaarungen die Werte für die B-Helix als Geometrie beschränkung vorausgesetzt. Nur die mittleren drei Basenpaare wurden von dieser Geometrie beschränkung ausgenommen. Die Strukturmodelle in Abbildung 55 zeigen eindeutig die unterschiedliche Orientierung der beiden Schutzgruppen-Enantiomeren im Duplex. Die stark destabilisierende S-NPE-Gruppe ist nach oben in Richtung des 5'-Endes und damit zwischen der modifizierten Base und der 5'-benachbarten Base lokalisiert (s. Abbildung 55A).





**Abbildung 55:** NOE-basiertes Strukturmodell der NPE-modifizierten Duplexe. A) Innere neun Basenpaare von  $^S\text{-NPE-dC8}$  (rmsd = 0,637 Å). Das modifizierte Nukelotid ist in roter Farbe dargestellt. B) gleiche Darstellung für  $^R\text{-NPE-dC8}$  (rmsd: 0,712 Å). Das modifizierte Nukelotid ist in gelber Farbe dargestellt. C) Detailansicht der zentralen Region von  $^S\text{-NPE-dC8}$  aus der Struktur mit der niedrigsten Energie und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen. D) gleiche Ansicht wie in C) für  $^R\text{-NPE-dC8}$ . Berechnet und modelliert von Dr. Henry A. Jonker basierend auf den Messwerten von Hannah Steinert.

Die weniger stark destabilisierende *R*-NPE-Gruppe hingegen ist in Richtung des 3'-Endes des Strangs gerichtet (s. Abbildung 55B). Für den Duplex mit der *S*-NPE-Gruppe ergibt sich zwischen den Iminoprotonenaustauschraten und dem Strukturmodell der Zusammenhang, dass das A7-T24, welches am deutlichsten destabilisiert ist, genau an der Stelle liegt, wohin der aromatische Ring der NPE-Gruppe orientiert ist, sodass es zu einer sterischen Behinderung des entsprechenden A-T-Basenpaares kommt. Weiterhin ist auffällig, dass die Basen C8 und G23 zueinander hin verschoben sind. Überdies sind die Basenpaare A7-T24 und C8-G23 nicht planar bezüglich der Helixachse sondern abgewinkelt, sodass in diesem Bereich keine optimale Basenstapelung vorliegt. Dies sollte sich in einem verminderten enthalpischen Beitrag der freien Energie der Basenpaaröffnung bemerkbar machen. Dies ist für  $^S\text{-NPE-dC8}$  auch tatsächlich der Fall (s. Tabelle 11 in Abschnitt 4.3.2 im Experimentellen Teil). Eine Erklärung für die starke Destabilisierung

durch das *S*-NPE besonders für das A7·T24 lässt sich entsprechend aus dem Strukturmodell gewinnen. Aus der Detailansicht der mittleren Region der beiden Duplexe wird deutlich, dass im Fall des <sup>*S*-NPE</sup>dC8 ein verändertes Wasserstoffbrücken-Netzwerk besteht. Die Nitro-Gruppe ist so orientiert, dass sie potentiell drei Watson-Crick Basenpaare ausbilden kann. Der Sauerstoff kann als Wasserstoffbrückenakzeptor für das Amino-Proton des modifizierten Cytidins und des Iminoprotons des G23 dienen. Es lassen sich in der Struktur nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen für das C8·G23 erkennen, was die verminderte Stabilität erklären könnte, die im Bereich eines normalen A-T-Basenpaars liegt (s. Abbildung 55C). Für den Fall des <sup>*R*-NPE</sup>dC8 sind alle inneren Basenpaare in normalen Watson-Crick-Basenpaarungen eingebunden, die photolabile Schutzgruppe ist hier in Richtung des 5'-benachbarten Zuckers gerichtet, sodass sich keinerlei Möglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen des Nitro-Sauerstoffs ergeben (s. Abbildung 55D). Die geringere Störung der inneren Basenpaare ist somit in guter Übereinstimmung mit der geringeren Destabilisierung des Gesamtduplex bezüglich des Schmelzpunkts und der geringeren Destabilisierung der Einzelbasenpaare.

### 3.2.8 Zusammenfassung & Ausblick

In diesem Projekt ist es gelungen, eine neue Methode zur Charakterisierung des Einflusses von photolabilen Schutzgruppen auf Nukleinsäureduplexe zu etablieren. Es wurde zudem erstmals untersucht, wie sich die absolute Konfiguration der chiralen photolabilen Schutzgruppe NPE auf die Duplexstabilität auswirkt. Dabei konnte zunächst per UV-Spektroskopie festgestellt werden, dass sich der Duplex mit einer *S*-NPE-Schutzgruppe signifikant besser destabilisieren lässt als mit einer *R*-NPE-Schutzgruppe. Um der Ursache dafür auf den Grund zu gehen, wurden Iminoprotonenaustauschexperimente durchgeführt, die zeigten, dass die Basenpaarung durch den Einbau der photolabilen Schutzgruppe nicht verhindert wird. Weiterhin zeigte sich, dass der Einfluss der photolabilen Schutzgruppe auf die benachbarten Basenpaare beschränkt ist. Es wurde zudem festgestellt, dass der Einfluss der *R*-NPE-Schutzgruppe auch auf die Einzelbasenpaarstabilitäten geringer ist als der Einfluss der *S*-NPE-Schutzgruppe. Nachdem per CD-Spektroskopie gezeigt werden konnte, dass die B-helikale Struktur durch den Einbau einer photolabilen Schutzgruppe nicht gestört wird, wurde mithilfe eines Strukturmodells versucht, die Ursache für die Destabilisierung zu finden. Es zeigte sich hierbei, dass ein möglicher Grund für die starke Destabilisierung durch die *S*-NPE-Gruppe darin liegen könnte, dass der Aromat in Richtung des 5'-benachbarten Basenpaars gerichtet ist und es zu einer sterischen Kollision mit der darüber liegenden Base kommt. Zudem ist die Planarität im mittleren Bereich gestört, was vermutlich einen negativen Einfluss auf die duplexstabilisierende Wirkung der Basenstapelung hat.

---

Für zukünftige und weitergehende Studien wäre es von Interesse, ein verfeinertes Strukturmodell der Duplexe zu generieren, z.B. NMR-spektroskopisch durch Verwendung einer isotopenmarkierten Sequenz oder durch eine Kristallstrukturanalyse der modifizierten Duplexe. Die Aussagen bezüglich des strukturellen Einflusses der photolabilen Schutzgruppen könnten so auf einer noch etwas solideren Datenbasis verifiziert werden. Um herauszufinden, ob der Einfluss der absoluten Konfiguration der Schutzgruppe universell gilt und nicht nur für die hier untersuchte Struktur, könnten zudem Studien an anderen Sequenzen mit der gleichen Schutzgruppe durchgeführt werden. Zudem wäre es interessant, die hier verwendete Methode auch auf Duplexe mit anderen photolabilen Schutzgruppen anzuwenden. In Abschnitt 3.1 wurde gezeigt, dass die NDBF-Schutzgruppe in der Lage ist, Duplexe wesentlich effektiver zu destabilisieren als die NPE-Schutzgruppe, was anhand eines deutlich erniedrigten Schmelzpunkts gezeigt wurde (s. Abschnitt 3.1.4). Es wäre daher interessant herauszufinden, welche strukturellen Ursachen dieser stärkeren Destabilisierung zugrunde liegen und ob der destabilisierende Einfluss möglicherweise auch mehr als die benachbarten Basenpaare umfasst.

### 3.3 Licht-induzierbare AntimiRs<sup>[153]</sup>

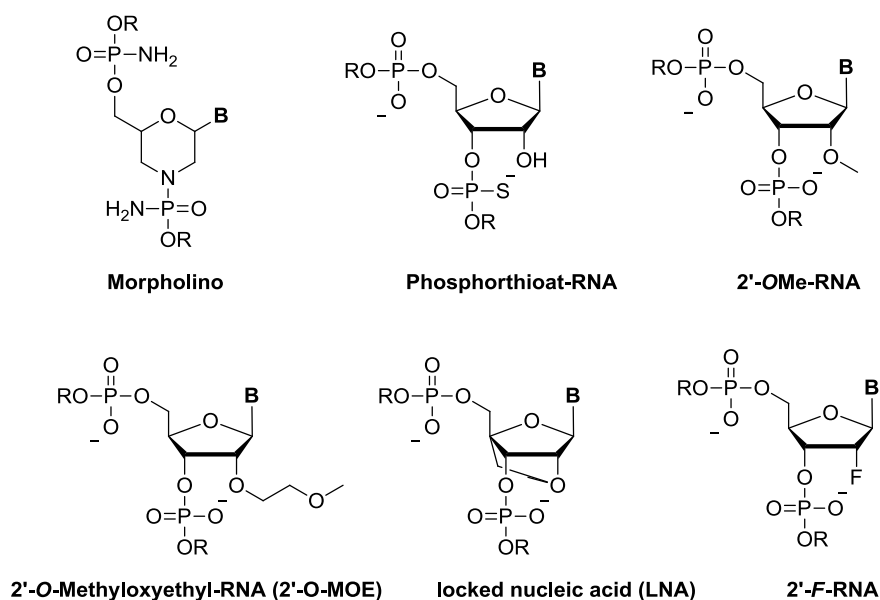
#### 3.3.1 Strategien zur Kontrolle der miRNA-Aktivität

Bereits früh nach der Erkenntnis, dass es sich bei miRNAs nicht nur um ein spezifisches Regulationsinstrument in *C. elegans* handelt, sondern dass sie auch beim Menschen von enormer Bedeutung für die Genregulation sind, wurde an Instrumenten zur Regulation der miRNA-Aktivität gearbeitet. Grundsätzlich lässt sich zwischen zwei Ansätzen zur externen Regulation der miRNA-Aktivität unterscheiden, der Überexpression von endogener miRNA sowie der Repression von miRNAs. In vielen Fällen sind Krankheiten wie Krebs mit verminderter Expression spezifischer miRNAs verbunden, sodass es von Interesse ist, das zelluläre Niveau ebendieser miRNAs durch synthetische miRNAs wiederherzustellen. Dies kann entweder transient, also durch Einbringen von siRNA-artigen RNA-Duplexen, geschehen, welche die endogene miRNA imitieren („miRNA mimic“), oder langfristig durch einen transgenen Ansatz, bei dem die miRNA aus viralen Vektoren exprimiert wird. Von diesen werden haarnadelartige RNA-Strukturen in der Zelle erzeugt, die der pre-miRNA ähneln und dann von Dicer zu reifer miRNA prozessiert werden.<sup>[154]</sup> Letzter Ansatz ist jedoch nicht unproblematisch, da es leicht zu toxischen Effekten aufgrund von einer Übersättigung der endogenen Prozessierungsmaschinerie kommen kann.<sup>[155]</sup> Der zweite generelle Ansatz beruht auf der Repression der endogenen miRNA-Aktivität durch Antisense-Reagenzien, „miRNA sponges“ oder maskierende Antisense-Oligodesoxynukleotide. Letztere interagieren mit der 3'-untranslatierten Region der Ziel-mRNA und verhindern so die Bindung der miRNA an eine spezifische Ziel-mRNA.<sup>[156]</sup> Bei den miRNA sponges handelt es sich um miRNA-Inhibitoren, die transient in Zellen durch Transfektion von entsprechenden Plasmiden exprimiert werden. Sie enthalten mehrfach hintereinander einen sieben Nukleotide langen „seed match“ und sind so in der Lage, ganze miRNA-Familien mit der gleichen Seed-Region zu inhibieren. Die Sequenzen der Bindestellen werden dabei so gewählt, dass in der zentralen Region keine perfekte Komplementarität zur miRNA besteht, damit es nicht zu einer durch Ago-2 vermittelten RNAi-ähnlichen Spaltung der miRNA sponges kommt. Überdies ist es notwendig, dass starke Promotoren verwendet werden, damit die Konzentration der RNA sponges ausreichend hoch für eine effektive miRNA-Inhibition ist.<sup>[157]</sup> Für Funktionsverluststudien und auch therapeutische Zwecke stellen zweifellos die sogenannten AntimiRs, die häufig auch einfach als miRNA Antisense-Oligonukleotide (ASO) bezeichnet werden, die interessanteste Klasse von miRNA-Inhibitoren dar.<sup>[154]</sup> Es handelt sich hierbei um einzelsträngige, chemisch synthetisch hergestellte, modifizierte Oligonukleotide unterschiedlicher Länge, die in ihrer Sequenz komplementär zu der zu untersuchenden miRNA sind. Viele Erkenntnisse zum Design-Prinzip und den verwendeten Modifikationsmustern wurden aus der klassischen Antisense-Forschung übernommen.<sup>[87]</sup> Die Modifikationen werden sowohl an der 2'-

OH-Gruppe als auch am Phosphatrückgrat vorgenommen und sollen im Folgenden eingehend vorgestellt werden.

### 3.3.1.1 Modifikationsmotive von AntimiRs

Unmodifizierte DNA- und noch wesentlich ausgeprägter RNA-Oligonukleotide mit normalem Phosphordiester-Rückgrat sind zur Verwendung in Zellkulturstudien und für *in vivo* Anwendungen ungeeignet, da sie sehr schnell von Nukleasen verdaut werden und somit eine geringe Halbwertszeit im Serum besitzen.<sup>[158]</sup> Zudem ist die Affinität von DNA zu RNA nicht besonders hoch. Daher wurden verschiedenste Modifikationen für eine erhöhte Stabilität und Affinität gegenüber RNA getestet.



**Abbildung 56:** Übersicht verschiedener Modifikationen zur verbesserten Stabilität und Affinität von AntimiRs. **B** steht für eine beliebige Nucleobase.

Der erste Meilenstein in der AntimiR-Forschung wurde durch eine Arbeit von der Gruppe von M. Stoffel gesetzt. Diese entwickelte die sogenannten Antagomirs, miRNA-Antisense-Reagenzien zur Repression von miRNAs *in vivo*. Es handelt sich hierbei um Antisense-Oligonukleotide, die aus 2'-OMe-modifizierten Nucleotiden aufgebaut sind. Am 5'-Ende verfügen sie über zwei, am 3'-Ende über vier Phosphorthioat-Verknüpfungen. Zusätzlich ist am 3'-Ende ein Cholesterinrest zur verbesserten zellulären Aufnahme angebracht. Stoffel et al. konnten zeigen, dass Antagomirs, welche intravenös appliziert werden, die miRNA-Level in nahezu allen Geweben außer dem Gehirn senken, dass der Effekt langanhaltend ist und dass etliche Ziel-mRNAs durch die miRNA-Repression hochreguliert werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass der Cholesterinspiegel von Mäusen, die mit Antagomir-122 gegen die

leberspezifische miR-122 behandelt worden waren, im Vergleich zu Kontrolltieren um 40 % gesenkt wurde.<sup>[159]</sup> Diese Resultate zeigen, dass Antagomirs ein großes therapeutisches Potential aufweisen. In einer Folgestudie wurde die Wirkungsweise der Antagomirs eingehender untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Phosphorthioate für die Wirkung unverzichtbar sind. Ein Antagomir ohne Thioate konnte das Expressionslevel der miR-122 in der Leber von Mäusen nicht beeinflussen. Ein vollständiger Austausch der Phosphordiester gegen Thioate wiederum verringerte die Effizienz der Antagomirs. In Mismatch-Studien zeigte sich, dass vier oder sequenzabhängig auch weniger Fehlpaarungen zwischen miRNA und Antagomir ausreichten um den Effekt vollständig aufzuheben. Aus der Untersuchung präformierter Duplexe aus einer modifizierten miR-122 und dem entsprechenden Antagomir wurde zudem gefolgert, dass es zu einem Abbau der miRNAs durch die Antagomirs kommen muss, der aber weder über einen RNAi-ähnlichen Mechanismus noch durch einen Exonukleaseverdau zustande kommt.<sup>[160]</sup> Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Abbau der miRNA wurde 2010 in einer Publikation von Ameres et al. gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass Ago-1 gebundene miRNA in *Drosophila* gekürzt und umgebaut wird, wenn sie in Duplexen mit RNA hoher Komplementarität vorliegt. Diese hohe Komplementarität ist für normale mRNA-miRNA-Duplexe normalerweise nicht gegeben. Das gleiche Phänomen wurde für miRNA in HeLa-Zellen beobachtet, die mit Antagomirs transfiziert worden waren.<sup>[161]</sup>

Eine weitere wichtige Klasse von miRNA Antisense-Oligonukleotiden für *in vivo* Anwendungen sind die 2'-O-MOE modifizierte ASOs (s. Abbildung 56), die sogar ein wenig effektiver als 2'-OME-modifizierte AntimiRs miR-122 inhibieren. Verglichen wurden in der Studie von Esau et al. jeweils ASOs, bei denen die Phosphordiester entweder vollständig oder gar nicht gegen Thioate ausgetauscht waren.<sup>[162]</sup> Die dritte und mittlerweile wahrscheinlich wichtigste Klasse von AntimiRs sind solche, die mit LNA modifiziert sind. Die LNA-Modifikation verfügt über eine Verbrückung des 2'-OH mit dem 4'-C über eine Methylen-Brücke. Dies sorgt dafür, dass der Zucker in der 3'-endo-Konformation fixiert ist. LNA bindet hochaffin sowohl an DNA als auch an RNA und hat eine hohe Stabilität gegenüber Nukleasen.<sup>[163]</sup> Die erste wichtige Arbeit zu LNA-modifizierten AntimiRs wurde von Elmén et al. veröffentlicht. Auch hier wurde die leberspezifische miR-122 als Ziel ausgewählt. Es wurden *in vivo* Studien mit westlichen Grünmeerkatzen durchgeführt, die systemisch ein unkonjugiertes AntimiR, bestehend aus LNA- und DNA-Nukleotiden mit vollständigem Thioatrückgrat, verabreicht bekamen. Aufgrund der hohen Affinität von LNA genügte ein 15 Nukleotide langes Oligonukleotid mit 8 LNA-Basen für eine effiziente Repression der miRNA, wie an einem Luciferase-Assay gezeigt werden konnte. Ähnlich wie zuvor bei den oben genannten Studien konnte eine effektive Senkung des Cholesterinspiegels festgestellt werden und die Repression von Ziel-mRNA durch miR-122 wurde aufgehoben. Im Vergleich zu Antagomirs konnte ein verbessertes Dosis-Wirkungsprofil erreicht werden.<sup>[164]</sup> LNA-DNA-AntimiRs führen im Gegensatz zu Antagomirs jedoch nicht zu

einem Abbau der miRNA, sondern halten sie nur in einem stabilen Duplex, sodass die Wirkung der miRNA nicht entfaltet werden kann.<sup>[165]</sup>

Um ganze miRNA-Familien mit gleicher Seed-Region gleichzeitig regulieren zu können, wurden die sogenannten „tiny LNAs“ entwickelt. Hierbei handelt es sich um kurze 8mer Oligonukleotide, die vollständig aus LNA bestehen und ein Thioat-Rückgrat besitzen. Die Sequenz ist immer perfekt komplementär zur seed-Region der entsprechenden miRNA. Sie werden ebenso unkonjugiert verabreicht und effektiv in viele Gewebe aufgenommen, ohne dabei Auswirkungen auf komplementäre mRNAs zu haben.<sup>[166]</sup>

### 3.3.1.2 *Therapeutische Anwendungen von AntimiRs*

Wie bereits erwähnt, sind AntimiRs therapeutisch interessante Moleküle, sodass sich einige Firmen um die Entwicklung von Medikamenten auf Basis von AntimiRs bemühen. Am weitesten fortgeschritten (klinische Phase IIa) ist die Entwicklung von Miravirsen, einem 15 Nukleotide langen LNA-DNA-AntimiR, welches gegen die leberspezifische miR-122 gerichtet ist und zur Behandlung von Hepatitis C eingesetzt wird. MiR-122 stabilisiert die virale Hepatitis C RNA, indem sie mit ihr einen stabilen Duplex bildet und so die Viren-RNA vor nukleolytischem Verdau oder einer Immunantwort schützt.<sup>[167]</sup>

Sowohl Antagomirs als auch DNA-LNA-AntimiRs werden nach intravenöser, intraperitonealer oder auch subkutaner Applikation in vielen Geweben aufgenommen, am besten in der Leber. Es ist daher nicht verwunderlich, dass ein AntimiR-Therapeutikum gegen eine leberspezifische miRNA sich bereits in der klinischen Phase befindet. Eine weitere Möglichkeit, AntimiRs für therapeutische Zwecke zu nutzen, besteht in der lokalen Applikation an der benötigten Stelle. Hierfür eignen sich besonders das Auge (direkte Injektion) oder auch die Lunge (Aerosol). Die gezielte Lieferung an bestimmte Gewebe lässt sich möglicherweise durch Konjugation eines Restes, der z.B. zellspezifische Rezeptoren anspricht, verwirklichen. Denkbar sind hier Antikörper-Fusionsproteine, bestehend aus einem RNA-bindenden Anteil und einem Antikörper-Anteil, der an bestimmte Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet. Ein weiterer Ansatz ist die Verknüpfung des AntimiRs mit einem gegen spezifische Zelloberflächenrezeptoren selektierten Aptamer. Dies wurde bereits mit einer siRNA an einem Prostatakrebsmodell gezeigt.<sup>[87]</sup>

## 3.3.2 *Projektbeschreibung*

### 3.3.2.1 *Projektziele*

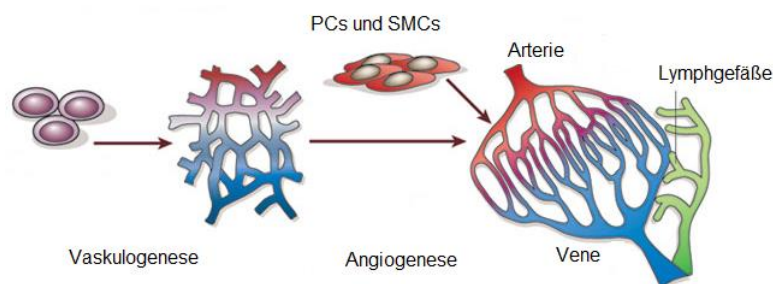
Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass es sich bei AntimiRs um ein potentes Mittel zur Unterdrückung der miRNA-Aktivität handelt. Sowohl hinsichtlich der Aufklärung der Funktion der jeweiligen miRNA in Funktionsverluststrategien als auch für therapeutische Zwecke sind

AntimiRs somit ein überaus nützliches Instrument. Wie oben beschrieben, führt eine systemische Applikation jedoch zu einer Unterdrückung der miRNA-Aktivität in fast allen Geweben. Zudem ist der Effekt eines AntimiRs lang anhaltend und nicht zeitlich steuerbar.<sup>[159]</sup> MiRNAs sind jedoch sowohl gewebs- als auch zeitspezifisch reguliert, d.h. sie üben ihren Effekt oft nur in ganz bestimmten Entwicklungsschritten oder in spezifischen zellulären Kontexten aus. Zudem sind viele miRNAs ubiquitär und nicht gewebspezifisch exprimiert, wie miR-122.<sup>[95]</sup> Die gleiche miRNA kann je nach zellulärem Umfeld unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Effekte haben. Dies alles macht es verständlich, dass es wünschenswert wäre, die Aktivität von miRNAs durch ortsaufgelöst aktivierbare AntimiRs in einem genauen zeitlichen und örtlichen Rahmen steuern zu können. Wie in der Einleitung beschrieben, eignet sich Licht als externes Auslösesignal hervorragend. Im Laufe dieses Projekts wurden daher auch von anderen Gruppen Strategien zur lichtgesteuerten Regulation der miRNA-Aktivität vorgestellt.<sup>[168–170]</sup> Ziel dieses Projekts war die Synthese von lichtaktivierbaren AntimiRs, basierend auf der Antagomir-Architektur. Es sollte ein System realisiert werden, welches in Abwesenheit von Licht keinerlei Auswirkung auf die miRNA-Aktivität und die daraus resultierenden Effekte auf regulierte Gene hat. Nach einer geeigneten Bestrahlungszeit sollte das AntimiR soweit aktiviert werden, dass es ähnliche Effekte auf die miRNA-Aktivität hat wie ein nicht photolabil geschütztes AntimiR. Die Lichtinduzierbarkeit sollte sowohl auf Ebene der miRNA als auch auf Ebene der Zielgene gezeigt werden und zudem an einem sichtbaren lichtregulierbaren Phänotyp visualisiert werden. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jasmin Wagner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dimmeler im Institut für kardiovaskuläre Regeneration durchgeführt. Als Modellsystem wurde die antiangiogene miR-92a in humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) gewählt.

### 3.3.2.2 *Angiogenese & miR-92a*

Angiogenese bezeichnet die Neuentstehung von Blutgefäßen, ausgehend von bereits bestehenden Gefäßen. Dies grenzt sie von der sogenannten Vaskulogenese ab, welche die Neuentstehung von Blutgefäßen aus Vorläuferzellen des Gefäßendothels bezeichnet. Bei der Embryogenese wird bereits während der Vaskulogenese, der Entstehung eines primitiven Gefäßnetzwerks, zwischen arteriellen und venösen Gefäßen differenziert. Während der Angiogenese-Phase wird dieses Netzwerk in ein verzweigtes System von Gefäßen unterschiedlicher Größen ausdifferenziert. Außerdem werden die entstandenen endothelialen Gefäße mit stabilisierenden Perizyten (PC) und glatten Muskelzellen (SMCs) umkleidet, die zudem dafür sorgen, dass die Stärke der Durchblutung geregelt werden kann (s. Abbildung 57).





**Abbildung 57:** Prinzip der Entstehung des vaskulären Systems. Im ersten Schritt, der sogenannten Vaskulogenese wird aus endothelialen Vorläufern ein primitives vaskuläres Netzwerk, welches sich jedoch schon in arterielle und venöse Gefäße differenziert. Angiogenese beschreibt die Neuentstehung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden. Es entsteht ein verzweigtes System von Gefäßen unterschiedlicher Größe. Zudem werden die entstandenen Gefäße zur Stabilisierung mit Perizyten (PCs) und glatten Muskelzellen (SMCs) ausgekleidet. Lymphgefäße entstehen durch Transdifferenzierung aus Venen. (Modifiziert nach Carmeliet).<sup>[171]</sup>

Die Angiogenese ist nach der Embryogenese im Laufe der menschlichen Entwicklung noch beim Organwachstum von Bedeutung, beim gesunden erwachsenen Menschen jedoch ist sie weitgehend stillgelegt und findet nur noch in den Eierstöcken und bei einer Schwangerschaft in der Plazenta statt. Nichtsdestotrotz kann die Angiogenese in Endothelzellen durch entsprechende physiologische Signale wie Sauerstoffmangel wieder aktiviert werden.<sup>[171]</sup> Sie spielt für die Wundheilung und nach einer Ischämie eine bedeutende Rolle. Der Prozess der Angiogenese ist normalerweise streng reguliert. Er wird selektiv von einem externen Stimulus initiiert und nur für die benötigte Zeit aufrechterhalten. Nach etablierter Durchblutung des neuen Gefäßes wird die Proliferation der Endothelzellen wieder eingestellt. Der Prozess der Angiogenese lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. In der Initiationsphase kommt es, z.B. nach Hypoxie, zur erhöhten Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGFA („Vascular Endothelial Cell Growth Factor A“), die zunächst zu einer Destabilisierung des Blutgefäßes und dann zur Proliferation von Endothelzellen und Aussprossung in nicht vaskuläre Regionen führt. Matrix-Metallproteinasen helfen dabei, die extrazelluläre Matrix umzustrukturieren. Wenn im neuen Gefäß die Durchblutung etabliert ist, kommt es zur Senkung der VEGF-Level und zur Einleitung der Auflösungsphase (resolution phase). Durch Expression weiterer Wachstumsfaktoren und Angiopoeitine werden die neuen Gefäße mithilfe von glatten Muskelzellen stabilisiert. Auch Tumore nutzen die Angiogenese für die Blutversorgung. Die Auflösungsphase wird von ihnen umgangen, indem sie permanent Wachstumsfaktoren sekretieren, sodass die Angiogenese persistiert. In Anbetracht der Wichtigkeit der Angiogenese für das Tumorwachstum ist es somit nicht verwunderlich, dass ein unterstützender therapeutischer Ansatz bei Krebsbehandlungen in der Hemmung der Angiogenese durch Antikörper gegen VEGF besteht. Im Gegensatz dazu ist

eine therapeutische Stimulation der Angiogenese wünschenswert, um z.B. nach einem Herzinfarkt den Blutfluss in das betroffene ischämische Gewebe wiederherzustellen.<sup>[172]</sup>

miR-92a ist eine der miRNAs des miR-17~92 Clusters, zu dem die miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 und miR-92a gehören. Der miR-17~92 Cluster ist in Endothelzellen stark exprimiert, wobei miR-92a besonders häufig vorkommt. Die Gruppe von Prof. Dimmeler konnte demonstrieren, dass diese miRNA in Endothelzellen antiangiogen wirkt. Durch eine Überexpression von miR-92a mithilfe eines entsprechenden Vorläufers (pre-miR-92a) gelang es, die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* zu inhibieren. Überdies konnte an einem Mausmodell gezeigt werden, dass die systemische Applikation eines Antagomirs gegen miR-92a zu einem erhöhten Blutgefäßwachstum und einer Erholung von geschädigtem Gewebe nach einer Ischämie bzw. einem Herzinfarkt führt. Zusammengefasst ergab sich aus dieser Studie, dass miR-92a ein interessantes therapeutisches Ziel für die Behandlung nach Ischämien oder Herzinfarkt darstellt.<sup>[173]</sup> MiR-92a ist zugleich ein gutes Beispiel dafür, wie unterschiedlich der Effekt einer miRNA, je nach zellulärem Umfeld, sein kann. Neben der Wirkung in Endothelzellen wurde diese miRNA noch in etlichen anderen Zelltypen untersucht. Unter anderem reguliert die miR-92a in Makrophagen die durch Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) vermittelte Entzündungsreaktion herunter<sup>[174]</sup>, verhindert die peritoneale Ausbreitung von Eierstockkrebs<sup>[175]</sup> und gilt als Marker für die Metastaseneigung und die Überlebensrate bei Darmkrebs<sup>[176]</sup>, wobei eine erhöhte miR-92a-Expression mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert.

### 3.3.3 Mismatch-Studien

Für siRNAs konnte eine Lichtaktivierung in der Gruppe von Prof. Heckel bereits erfolgreich an einem Modellsystem gezeigt werden. Es war hierzu lediglich notwendig, das Nukleosid des Führungsstrangs mit einer photolabilen Gruppe zu schützen, welches gegenüber der Spaltstelle der mRNA liegt.<sup>[61]</sup> Für lichtaktivierbare AntimiRs stellte sich aufgrund des nicht aufgeklärten Mechanismus zunächst die Frage, welche Positionen im herzustellenden gecageten AntimiR mit photolabilen Schutzgruppen versehen werden müssen, um dieses komplett zu inaktivieren. Aus der Arbeit von Krützfeldt war bekannt, dass vier Fehlpaarungen (mismatches) zwischen miRNA und AntimiR jegliche Aktivität des AntimiRs unterdrücken.<sup>[160]</sup> In einer ausführlichen Studie mithilfe eines Luciferase-Assay in HeLa-Zellen konnte von Robertson et al. gezeigt werden, dass besonders Fehlpaarungen im Bereich der seed-Region und im Bereich der Nukleotide 15-16, gezählt vom 5'-Ende der miRNA zu einer deutlich verminderten Aktivität der miRNA-Inhibitoren führt.<sup>[177]</sup> Um einen ersten Eindruck zu gewinnen wie sich Fehlpaarungen im untersuchten System auswirken und damit Rückschlüsse auf die Anzahl der benötigten photolabilen Schutzgruppen ziehen zu können, wurden einige AntimiRs mit einer bis drei Fehlpaarungen in unterschiedlicher Position im Strang synthetisiert. Ein AntimiR wurde von der Fa. VBC Biotech bestellt. Die

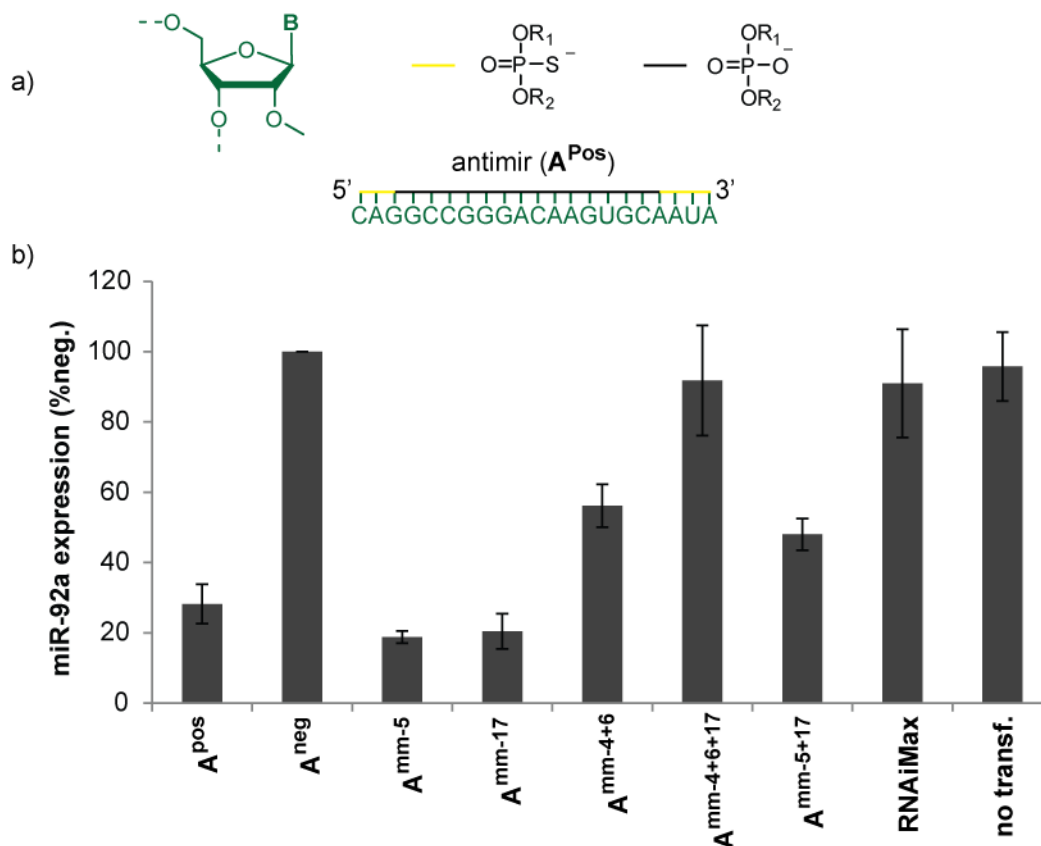
Sequenzen wurden so gewählt, dass Fehlpaarungen immer zwischen gleichen Nucleobasen vorlagen (s. Tabelle 6), da aus einer vorherigen Studie bekannt war, dass diese Fehlpaarungen Oligonukleotidduplexe besonders stark destabilisieren.<sup>[130]</sup> Die gewählten Modifikationen des Strangs wurden, wie bereits zuvor erwähnt, in Analogie zur Antagomirstruktur gewählt, das heißt, es wurden 2'-OMe-modifizierte Nucleotide verwendet und die Enden der AntimiRs wurden mit zwei Phosphorthioat-Verknüpfungen am 5'-Ende und drei am 3'-Ende versehen (s. Abbildung 58a). Da nur in Zellkultur gearbeitet werden sollte und nicht am *in vivo* Modell, wurde auf den Cholesterinrest verzichtet, der in erster Linie der verbesserten zellulären Aufnahme dient. In Zellkulturstudien wird mit Transfektionsreagenzien gearbeitet, sodass der Cholesterinrest nicht benötigt wird.

**Tabelle 6:** Sequenzen der miR-92a sowie der getesteten AntimiRs mit Fehlpaarungen. Die Positionsangabe der Fehlpaarung bezieht sich auf das entsprechende Nucleotid in der miRNA, gezählt vom 5'-Ende. Normale RNA-Basen sind kursiv gehalten. 2'-OMe-modifizierte Basen sind in Normalschrift dargestellt. Positionen in den AntimiRs, an denen Fehlpaarungen zur miR-92a bestehen, sind türkis markiert. Die seed-Region der miR-92a ist rot dargestellt. **A<sup>pos</sup>** ist die Positivkontrolle, die eine perfekte Komplementarität zu miR-92a aufweist, **A<sup>neg</sup>** ist die Negativkontrolle, die keine Komplementarität zu jeglicher endogenen miRNA oder mRNA aufweist.

<b>miR-92a</b>	3' – GUC CGG CCC UGU UCA CGU UAU – 5'
<b>A<sup>pos</sup></b>	5' – CAG GCC GGG ACA AGU GCA AUA – 3'
<b>A<sup>mm-5</sup></b>	5' – CAG GCC GGG ACA AGU GGA AUA – 3'
<b>A<sup>mm-17</sup></b>	5' – CAG GGC GGG ACA AGU GCA AUA – 3'
<b>A<sup>mm-5+17</sup></b>	5' – CAG GGC GGG ACA AGU GGA AUA – 3'
<b>A<sup>mm-4+6</sup></b>	5' – CAG GCC GGG ACA AGU CCU AUA – 3'
<b>A<sup>mm-4+6+17</sup></b>	5' – CAG GGC GGG ACA AGU CCU AUA – 3'
<b>A<sup>neg</sup></b>	5' – AAG GCA AGC UGA CCC UGA AGU U – 3'

Wie bereits in Abschnitt 3.3.1.1 beschrieben, ist mittlerweile bekannt, dass AntimiRs, die auf einer LNA/DNA-Architektur bzw. einer 2'-O-MOE-Architektur beruhen, etwas effizienter sind als 2'-OMe-modifizierte antagomirähnliche Architekturen. Nichtsdestotrotz wurde die antagomirähnliche Architektur gewählt. Dies hat im Wesentlichen chemisch-synthetische Gründe, da erstens 2'-OMe modifizierte Amidite im Gegensatz zu den anderen beiden Modifikation bei verschiedensten Anbietern relativ kostengünstig und ohne Patentschutz kommerziell erhältlich sind und zweitens die Synthese der photolabil geschützten Amidite wesentlich weniger Einzelschritte erfordert als die Synthese photolabil geschützter LNA. Um zu testen, wie stark die Inhibition der miR-92a durch Einbau von Fehlpaarungen in ein AntimiR gestört wird, wurden die in Tabelle 6 gezeigten AntimiRs mithilfe von Lipofectamin RNAimax in HUVECs transfiziert.

28 Stunden nach der Transfektion wurde das miR-92a-Expressionslevel mithilfe eines TaqMan microRNA Assay (Fa. Applied Biosystems) überprüft. Das prinzipielle Vorgehen soll hier erläutert werden, Details zum Assay sind im Experimentellen Teil beschrieben. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde entweder mit Trizol-Reagenz manuell oder mit einem Qiagen miRNeasy Kit isoliert. Mithilfe eines spezifischen Stamm-Schleife-Primers wurde die miR-92a durch eine Reverse Transkriptase in eine verlängerte cDNA umgeschrieben, um dann im nächsten Schritt eine Amplifizierung unter Verwendung von spezifischen Primern und TaqMan-Sonden per Real Time PCR zu ermöglichen. Die Quantifizierung erfolgte unter Zuhilfenahme eines internen Standards (RNU48) als relatives miR-92a-Expressionslevel. Als Negativkontrolle wurde eine Sequenz verwendet, die weder an endogene mRNA noch endogene miRNA bindet. In Abbildung 58 b ist zu erkennen, dass diese Negativkontrolle in der Tat das Expressionslevel der miR-92a nicht beeinflusst.



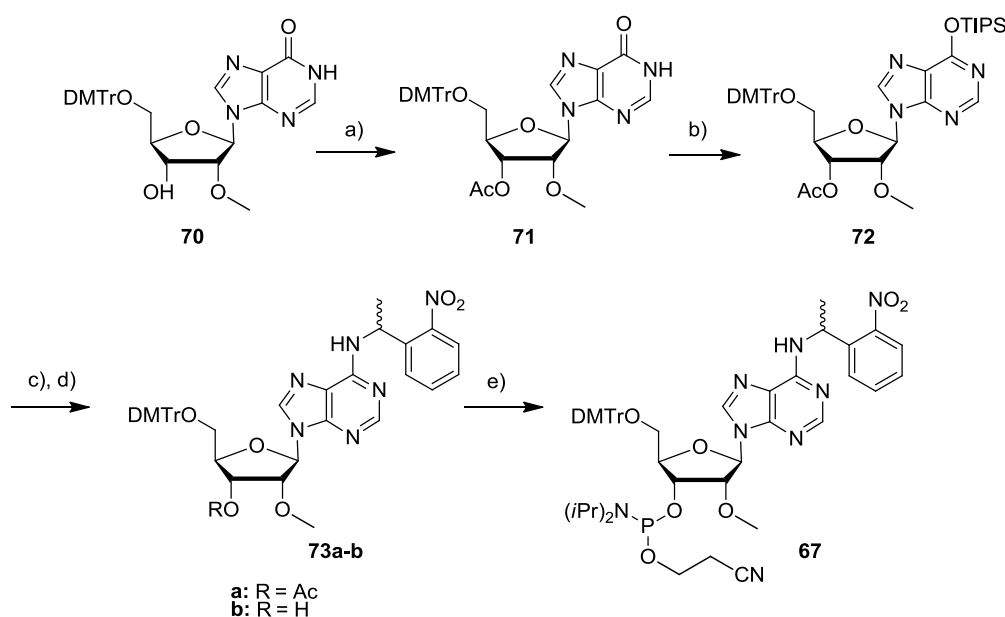
**Abbildung 58:** Ergebnisse der Mismatch-Studien. a) Architektur der synthetisierten AntimiRs. Es wurden ausschließlich 2'-OMe-modifizierte Basen (grün dargestellt) verwendet. An den Enden wurden insgesamt fünf Phosphorothioat-Verknüpfungen verwendet (gelbe Striche). Im mittleren Bereich wiesen die AntimiRs normale Phosphordiester-Verknüpfungen auf (schwarze Striche). Dargestellt ist die Sequenz der Positivkontrolle A<sup>pos</sup>; b) miR-92a-Expression von HUVEC-Zellen nach Transfektion mit verschiedenen fehlgepaarten AntimiRs (50 nM). RNAiMax = Transfektion ohne AntimiR, no transf. = nur Mediumwechsel, kein AntimiR und kein Transfektionsreagenz. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Trizol-Reagenz 28 h nach Transfektion aus den Zellen isoliert. Nach reverser Transkription wurde die miR-92a-Expression mithilfe eines TaqMan Assays quantifiziert. Als interner Standard wurde RNU48 verwendet. Die Fehlerbalken resultieren aus dem Standardfehler (SEM) dreier unabhängiger Messungen.



mehr selbst durchgeführt werden musste. Alle Amidite konnten so in fünf oder sechs Syntheseschritten und guten Gesamtausbeuten erhalten werden.

### 3.3.4.1 Synthese des 2'-OMe-Adenosinamidits

Die Synthese des Adenosinamidits wurde ausgehend vom DMTr-geschützten 2'-O-Methylinosin **70** durchgeführt (s. Abbildung 60). Zunächst wurde mit Acetanhydrid unter DMAP-Katalyse das 3'-OH acetyliert. Die Reaktion erfolgte in quantitativer Ausbeute zu **71**. Es folgte eine Aktivierung des O<sup>6</sup> mit Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid zu **72**. Analog zur Synthese NDBF-geschützten Desoxyadenosins wurden auch hier das gewünschte O-sulfonylierte und als Nebenprodukt das N-sulfonylierte Regioisomer erhalten. Im nächsten Schritt wurde nun mit einer nukleophilen aromatischen Substitution die NPE-Schutzgruppe eingeführt (**73a**). Nach Entschützung des 3'-OH mit ethanolischem Methylamin wurde **73 b** in guter Ausbeute (72 %) zum Amidit **67** umgesetzt. Ausgehend von **70** wurde das Amidit somit in einer Gesamtausbeute von 21 % erhalten.

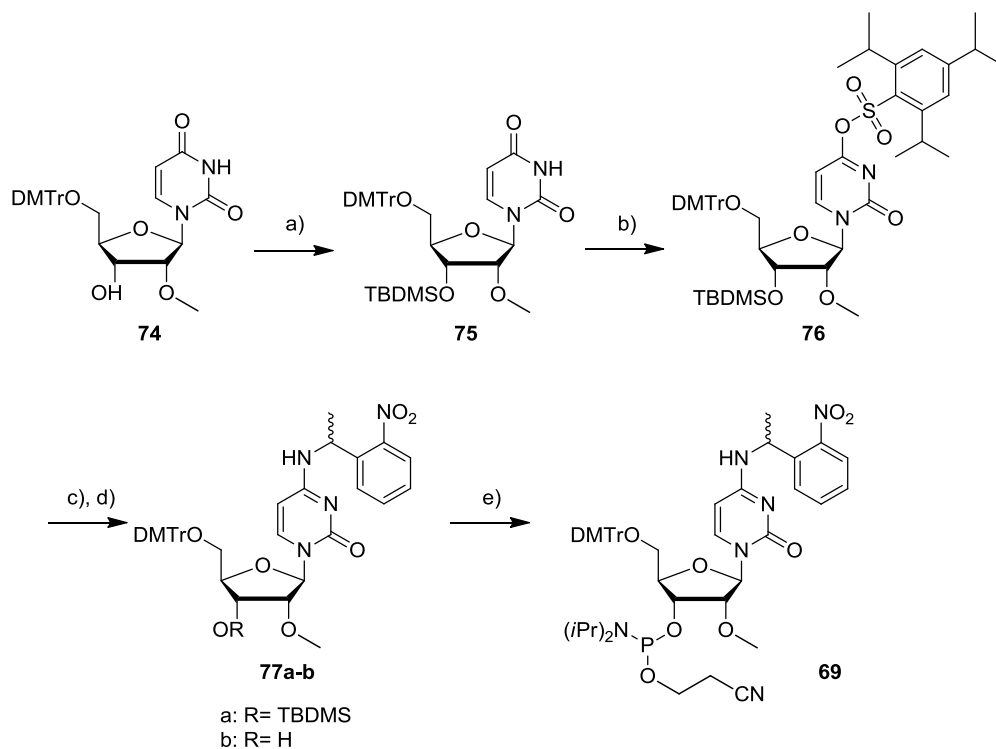


**Abbildung 60:** Synthese des Adenosin-Amidits **67**. a) Essigsäureanhydrid, Pyridin, DMAP, (quantitativ); b) Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (TIPS-Cl), DMAP, Diisopropylethylamin, DCM, (45 % + 43 % N-sulfonyliertes Regioisomer); c) 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin, DMAP, DMF, (72 %); d) MeNH<sub>2</sub> (8M in Ethanol), (92 %), e) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, Diisopropylethylamin, DCM, (72 %).

### 3.3.4.2 Synthese des 2'-OMe-Cytidinderivats

Die Synthese des Cytidinphosphoramidits startete vom DMTr-geschützten 2'-O-Methyluridin. Zunächst wurde das 3'-OH mit TBDMS-Cl geschützt. Das TBDMS-geschützte Nucleosid **75** wurde nachfolgend in quantitativer Ausbeute am O<sup>4</sup> sulfonyliert zu **76**. Der Umsetzung mit NPE-

NH<sub>2</sub> folgte die Entschützung des 3'-OH mit TBAF-Lösung zu **77b** in einer Ausbeute von 78 % in zwei Stufen. Die Umsetzung von **77b** mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminchlorphosphin lieferte das Amidit **69** in einer guten Gesamtausbeute von 33 %.

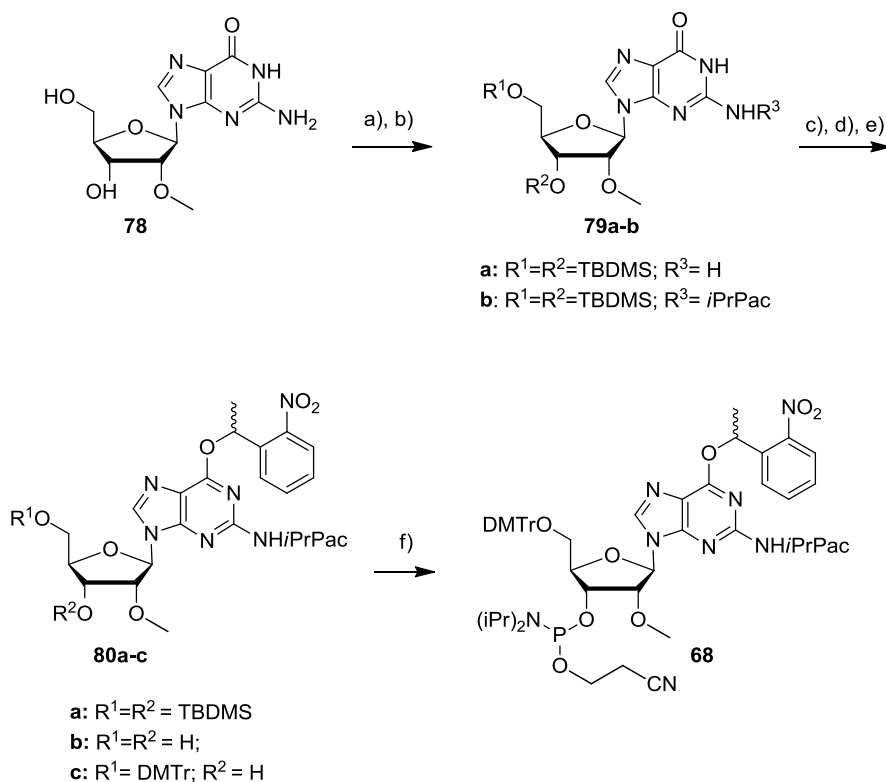


**Abbildung 61:** Synthese des 2'-OMe-Cytidinphosphoramidits. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, (95 %); b) TIPS-Cl, DMAP, Diisopropylethylamin, DCM (quantitativ); c) 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin, DMF, (82 %); d) TBAF (1M in THF), THF, (95 %); e) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit, Diisopropylethylamin, DCM, (45 %).

### 3.3.4.3 Synthese des 2'-OMe-Guanosinderivats

Für die Synthese des Guanosinderivats war aufgrund der benötigten Schutzgruppe für das exozyklische Amin ein zusätzlicher synthetischer Schritt erforderlich. Für die Schützung der exozyklischen Aminofunktion sind die Dimethylformamidin- und die Isopropylphenoxyacetylenschutzgruppe mit einer milden Abspaltung von der festen Phase nach Beendigung der DNA-Festphasensynthese geeignet. Es boten sich zwei käufliche Vorläufermoleküle an, die bei *Carbosynth* erhältlich waren, das mit einer Isobutyrylschutzgruppe 5'-DMTr-geschützte 2'-*O*-Methylguanosin und das ungeschützte 2'-*O*-Methylguanosin **78**. Die Isobutyrylschutzgruppe benötigt entweder sehr lange Entschütungszeiten oder erhöhte Temperaturen, damit sie bei der basischen Abspaltung des Oligonukleotids mit NH<sub>3</sub> von der festen Phase vollständig entfernt wird. Diese Schutzgruppe sollte daher nicht zum Einsatz kommen, da nicht bekannt war, inwiefern die photolabilen Schutzgruppen gegenüber einer verlängerten basischen Behandlung und besonders gegenüber erhöhten Temperaturen stabil sind.

Daher wurde das 2'-*O*-Methylguanodin als Ausgangsverbindung gewählt. Als Schutzgruppe wurde die *Isopropylphenoxyacetyl*gruppe (*iPrPac*) gewählt, die sich besonders leicht nach der Festphasensynthese abspalten lässt und, falls benötigt, auch eine ultramilde Abspaltung ermöglichen würde. Ausgehend von **78** konnte so in sechs Syntheseschritten das gewünschte Amidit erhalten werden.



**Abbildung 62:** Synthese des NPE-geschützten 2'-*OMe*-Guanosinphosphoramidits. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF (88 %); b) *iPrPac*-Cl, Pyridin (73 %); c) DEAD, 1-(2-Nitrophenyl)ethanol, PPh<sub>3</sub>, THF (64 %); d) TBAF (1M in THF), THF (77 %); e) DMTr-Cl, Pyridin (83 %); 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Diisopropylethylamin, DCM (84 %).

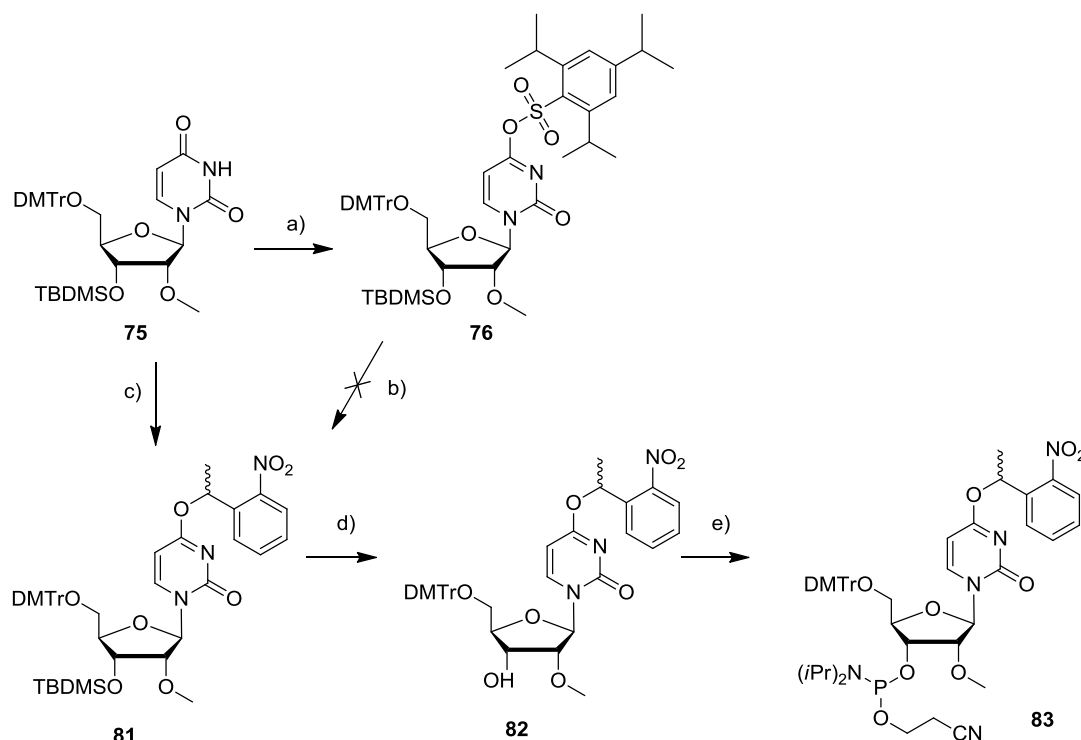
Zunächst wurden die beiden OH-Gruppen TBDMS-geschützt. Anschließend wurde die *iPrPac*-Schutzgruppe durch Reaktion von **78** mit dem entsprechenden Säurechlorid in Pyridin angebracht. In einer Mitsunobu-Reaktion wurde das O<sup>6</sup> mit der NPE-Gruppe photolabil geschützt. Es folgte die Standardsequenz aus TBAF-Entschützung, DMTr-Schützung des 5'-OH und Amiditierung zum Phosphoramidit **68**. Es wurde eine Gesamtausbeute von 22 % erhalten.

#### 3.3.4.4 Synthese eines NPE-geschützten 2'-*OMe*-Uridinderivats

An dieser Stelle soll noch kurz auf die Synthese des NPE-geschützten Uridinderivats eingegangen werden. Um über den vollen Satz aller vier photolabil geschützten Basen zu verfügen, wurde dieses Amidit noch zusätzlich synthetisiert. Erst im Laufe des Projekts zeigte sich, dass für die Zellkulturstudien letztlich dieser Baustein nicht benötigt wurde. Die Synthese wurde, ausgehend vom bereits eingeführten Vorläufermolekül **75**, gestartet.



Die Methode der Sulfonsäureaktivierung mit anschließender nukleophiler aromatischer Substitution scheiterte, vermutlich aufgrund der zu niedrigen Nukleophilie des 1-(2-Nitrophenyl)ethanols. Zur Einführung der NPE-Gruppe musste daher auch hier eine Mitsunobu-Reaktion durchgeführt werden. Diese lieferte ein Gemisch aus zwei Regioisomeren, d.h. es wurde sowohl am O<sup>4</sup>- als auch am N<sup>3</sup> alkyliert. Dies deutet darauf hin, dass in dieser Reaktion die Nukleobase als Nukleophil fungiert, da die Reaktion am N<sup>3</sup> sonst nicht erklärbar wäre. Das gewünschte Regioisomer **81** ließ sich jedoch durch säulenchromatographische Trennung der Regioisomeren isolieren.

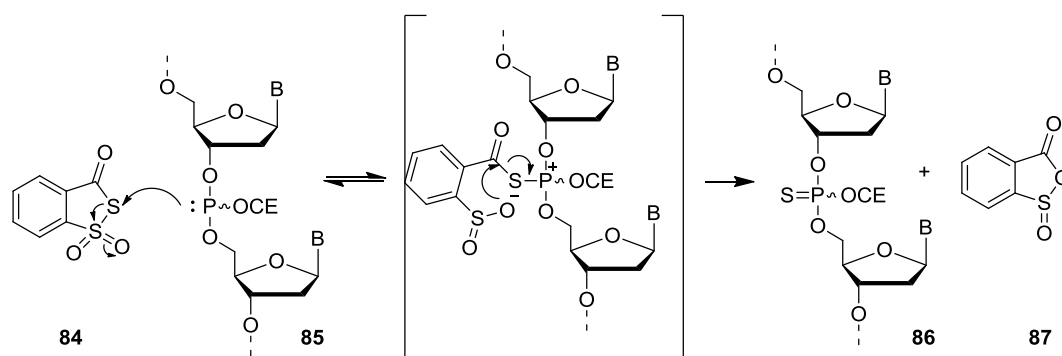


**Abbildung 63:** Synthese des 2'-OMe-Uridinphosphoramidits. a) TIPS-Cl, DMAP, Diisopropylethylamin, DCM (quantitativ); b) 1-(2-Nitrophenyl)ethanol, DMAP, DIPEA, Acetonitril; c) 1-(2-Nitrophenyl)ethanol, PPh<sub>3</sub>, DEAD, THF (48 %); d) TBAF (1M in THF), THF (70 %); e) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, Diisopropylethylamin, DCM (76 %).

### 3.3.5 Synthese der gecageten AntimiRs

Die erhaltenen Amidite wurden nun für die Festphasensynthese des gecageten Antimirs **A<sup>3c</sup>** verwendet, welches über drei photolabile Schutzgruppen an den durch die Mismatch-Studien festgelegten Stellen verfügen sollte. Gleichzeitig wurde eine photolabil geschützte Version der Negativkontrolle **A<sup>neg c</sup>** synthetisiert, um in ersten Tests zeigen zu können, dass die Bestrahlung der Zellen bzw. die Nebenprodukte der Photospaltung sich nicht auf die miR-92-Expression auswirken. Die nicht photolabil geschützten 2'-OMe Phosphoramidite und die mit einem 2'-OMe-Nukleosid beladenen Träger wurden kommerziell erworben. 2'-OMe-Amidite benötigen im Vergleich zu TBDMS-geschützten RNA-Amiditen eine kürzere Kopplungszeit von 6 Minuten.

Alle Phosphorthioat-Verknüpfungen wurden durch Verwendung des sogenannten Beaucage Reagenz (s. Abbildung 64) erhalten. Hierfür musste ein modifizierter Syntheszyklus verwendet werden, bei dem die Reihenfolge von Capping und Oxidationsschritt vertauscht sind. Die Behandlung des neu entstandenen Phosphortriesters mit dem Capping-Reagenz kann nämlich zu einer partiellen Oxidation führen, sodass man ein Gemisch aus Phosphordiester und Phosphorthioat erhalten würde.<sup>[179]</sup>



**Abbildung 64:** Mechanismus der Reaktion des Beaucage Reagenz mit einem Didesoxynucleosidphosphortriester zum Didesoxynucleosidphosphorthioat **86** und dem Nebenprodukt **87**.

Als nicht einfach erwies sich die Kopplung der NPE-modifizierten Amidite. Unter normalen Bedingungen waren die Kopplungsausbeuten sehr schlecht, sodass aus einer ersten Testsynthese des AntimiRs **A<sup>3c</sup>** im 200 nmol-Maßstab nur eine Gesamtausbeute von 150 pmol erhalten werden konnte. Durch eine Verlängerung der Kopplungszeit konnte keine Verbesserung erreicht werden. Erst nach erneuter säulenchromatographischer Aufreinigung der Amidite und der Verwendung des acideren 5-Benzylthio-1H-tetrazol anstelle von 5-Ethylthio-1H-tetrazol (s. Tabelle 2 in Abschnitt 1.2) konnte eine brauchbare Gesamtausbeute von 39 nmol erzielt werden. Nach der Aufreinigung per RP-HPLC wurde zusätzlich eine EtOH-Fällung durchgeführt, die das Oligonucleotid als Natriumsalz liefert, da restliches Triethylamin aus dem TEAA-Puffer toxisch für Zellen sein kann.<sup>[180]</sup> Erste Zellkulturstudien zeigten, dass die miR-92a-Expression sich tatsächlich durch Transfektion des gecageten AntimiRs mit Licht regulieren lässt, es konnte jedoch kein eindeutiges An/Aus-Verhalten erzielt werden. **A<sup>3c</sup>** wies eine Restaktivität, auch vor Bestrahlung, auf (s. Abschnitt 3.3.6.2). Daher wurden weitere gecagete AntimiRs mit fünf und mit sechs photolabilen Schutzgruppen synthetisiert. Die Verteilung der photolabilen Schutzgruppen wurde dabei nach zwei Kriterien vorgenommen. Aufgrund der Tatsache, dass sich keine ausgeprägte Präferenz für eine bestimmte Region in den Mismatch-Studien ergeben hatte, wurde davon ausgegangen, dass die photolabilen Schutzgruppen möglichst gleichmäßig über den gesamten Strang so verteilt werden müssen, dass sich eine maximale Destabilisierung des resultierenden miRNA-AntimiR-Duplex ergibt. Der zweite Aspekt betrifft die Kopplungsausbeuten, die beim photolabil geschützten 2'-OMe-Guanosin zumeist relativ schlecht

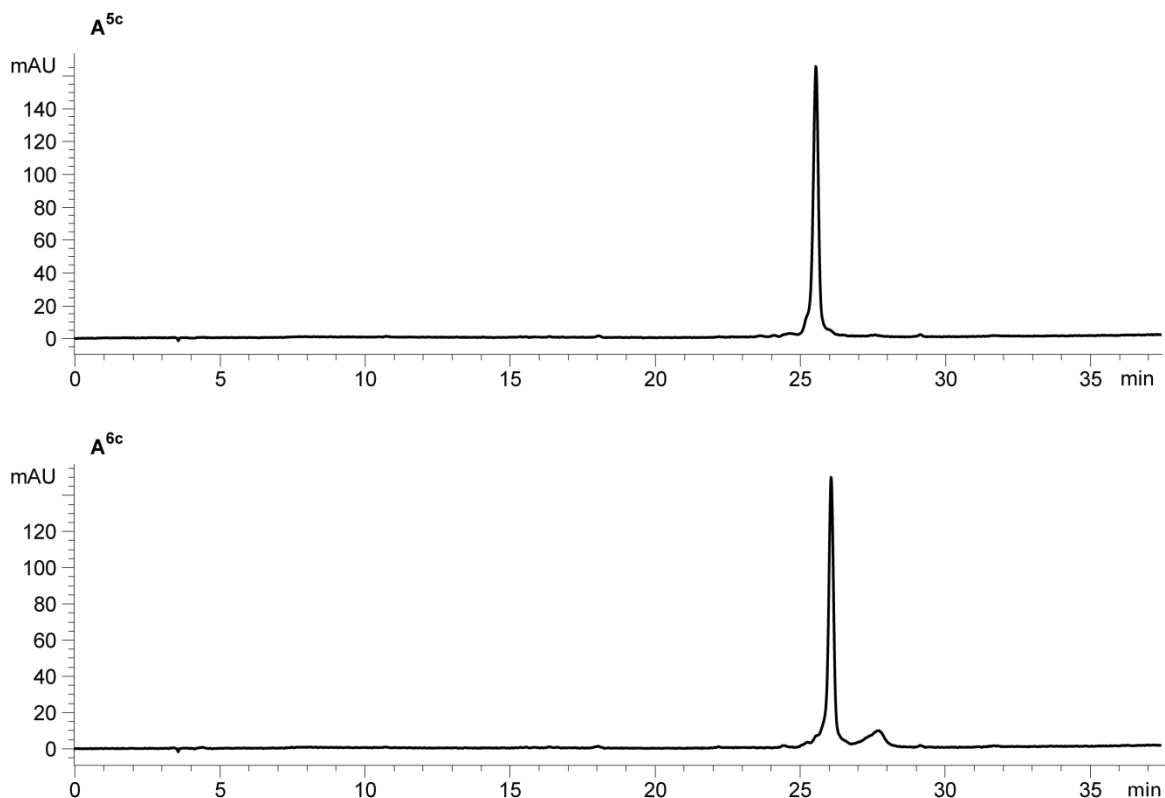
waren. Daher wurde entschieden, nur photolabil geschütztes 2'-*OMe*-Adenosin und -cytidin zu verwenden. Die Sequenzen aller für die Zellkulturstudien synthetisierten Oligonukleotide mit den entsprechenden ESI-MS-Daten sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7:** Übersicht der für die Zellkultur-Studien verwendeten AntimiR-Sequenzen mit dem entsprechenden Kürzel. Zusätzlich sind die berechnete Masse der Oligonukleotide sowie die per ESI-MS bestimmte Masse angegeben. Die photolabil geschützten Nukleotide sind orange eingefärbt dargestellt.

Kürzel	Sequenz	Masse ber. [Da]	Masse erh. [Da]
A <sup>pos</sup>	5' - CAG GCC GGG ACA AGU GCA AUA -3'	7168,2	7168,7
A <sup>3c</sup>	5' - CAG G <sup>cc</sup> GGG ACA AGU G <sup>ca</sup> AUA -3'	7615,4	7615,9
A <sup>5c</sup>	5' - C <sup>ag</sup> G <sup>cc</sup> GGG A <sup>ca</sup> A <sup>gu</sup> G <sup>ca</sup> AUA -3'	7913,5	7913,8
A <sup>6c</sup>	5' - C <sup>ag</sup> G <sup>cc</sup> GGG A <sup>ca</sup> A <sup>gu</sup> G <sup>ca</sup> AUA -3'	8062,5	8062,8
A <sup>negc</sup>	5' - AAG G <sup>ca</sup> AGC UGA CCC U <sup>ga</sup> A <sup>gu</sup> U -3'	7896,4	7896,6
A <sup>neg</sup>	5' - AAG GCA AGC UGA CCC UGA AGU U -3'	7449,2	7449,8

Bei den gecageten AntimiRs handelt es sich um hochfunktionalisierte Moleküle. Dies und die Tatsache, dass aufgrund der Thioate, die ein zusätzliches Chiralitätszentrum am Phosphor aufweisen und aufgrund des verwendeten Diastereomerenmischs der photolabilen Schutzgruppe immer ein komplexes Gemisch verschiedenster Diastereomere vorliegt, erschwert die Aufreinigung der Oligonukleotide per HPLC. Zudem sind diese Oligonukleotide im Vergleich zu unmodifizierten Oligonukleotiden recht unpolar, sodass die sonst verwendeten Standardgradienten für die Aufreinigung der AntimiRs unbrauchbar sind. Die Aufreinigung wurde außerdem noch dadurch erschwert, dass selbst unter optimalen Bedingungen für die photolabil geschützten Amidite keine mit den unmodifizierten 2'-*OMe* Amiditen vergleichbaren Ausbeuten erzielt werden konnten. Dies führte dazu, dass nie eine bessere Gesamtausbeute als ca. 50 %, laut Tritylmonitor, gleichbedeutend mit einer durchschnittlichen Ausbeute von nur 96-97 % pro Kopplungsschritt, erhalten werden konnte. Es wurden verschiedene Sequenzen mit unterschiedlichen, photolabil geschützten Amiditen, u.a. auch photolabil geschütztem 2'-*OMe* Uridin, getestet, die zwischen vier und sieben photolabile Schutzgruppen enthielten. Mit der standardisierten Aufreinigungsmethode für die ungegageten AntimiRs konnte jedoch für keines dieser hoch modifizierten Oligonukleotide das gewünschte Produkt isoliert werden. Die erfolgreiche Aufreinigung der AntimiRs A<sup>5c</sup> und A<sup>6c</sup> gelang daher erst nachdem, wie schon in der Dissertation von Vera Mikat beschrieben, eine verbesserte HPLC-Säule mit modifizierten Gradienten zum Einsatz kam. Es wurde eine sogenannte Eclipse XDB-Säule (xdb = xtra densely bond) von *Agilent* verwendet, die aus einem C-18 Material besteht, das besonders dicht modifiziert ist. Um die Anzahl der unmodifizierten Silanolgruppen an der Oberfläche möglichst

gering zu halten, wird der sogenannte end-capping Schritt, die Silanisierung unmodifizierter Silanole, zweimal durchgeführt.<sup>[181]</sup> Dies führte dazu, dass im Vergleich zu normalen C-18 Säulen eine deutlich verbesserte Trennung erzielt wurde. So konnten bei gleichbleibend effizienter Synthese erfolgreich die sauberen Produkt  $A^{5c}$  und  $A^{6c}$  (s. Abbildung 65) in Gesamtausbeuten von 20 bzw. 49 nmol nach Ethanol-Präzipitation erhalten werden.



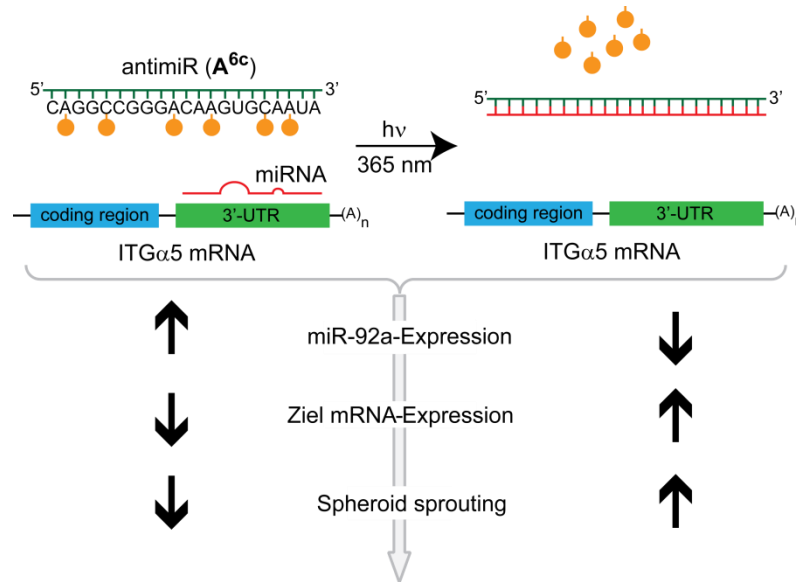
**Abbildung 65:** analytische HPLC-Spektren der aufgereinigten AntimiRs  $A^{5c}$  (oben) und  $A^{6c}$  (unten). Es wurde ein Puffersystem aus Triethylammoniumacetat (0,1 M, pH 7) und Acetonitril verwendet. Gradient: 5-50 % Acetonitril in 35 Minuten (Nucleosil 100-5 C18 Säule, Flussrate 1 mL/min).

### 3.3.6 Zellkulturstudien

#### 3.3.6.1 Geplante Experimente

Wie bereits in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben, sollten die Effekte der lichtinduzierbaren AntimiRs auf mehreren Ebenen im zellulären Umfeld demonstriert werden. Abbildung 66 zeigt eine Übersicht an, auf welchen Ebenen eine Regulation durch die lichtinduzierbaren AntimiRs beobachtet wurde und welche Effekte jeweils zu erwarten waren. In Anwesenheit der photolabilen Schutzgruppen sollte auf Ebene der miR-92a keine Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle festzustellen sein, nach Bestrahlung kann dann das AntimiR an miR-92a binden. Es wurde erwartet, dass es anschließend zu einem Abbau bzw. einer Komplexbildung der miR-92a

kommt, die zu einer verminderten Expressionshöhe, detektierbar durch einen TaqMan Assay, führen sollte. Auf Ebene der Ziel-mRNA müsste die Aktivierung der AntimiRs zu einer Derepression derselben führen, da die miRNA sie nun nicht mehr reprimieren kann. Da miR-92a antiangiogen wirkt, sollte eine verminderte miR-92a-Expression gleichzeitig zu einer vermehrten Angiogenese-Aktivität in Endothelzellen führen (s. Abbildung 66).



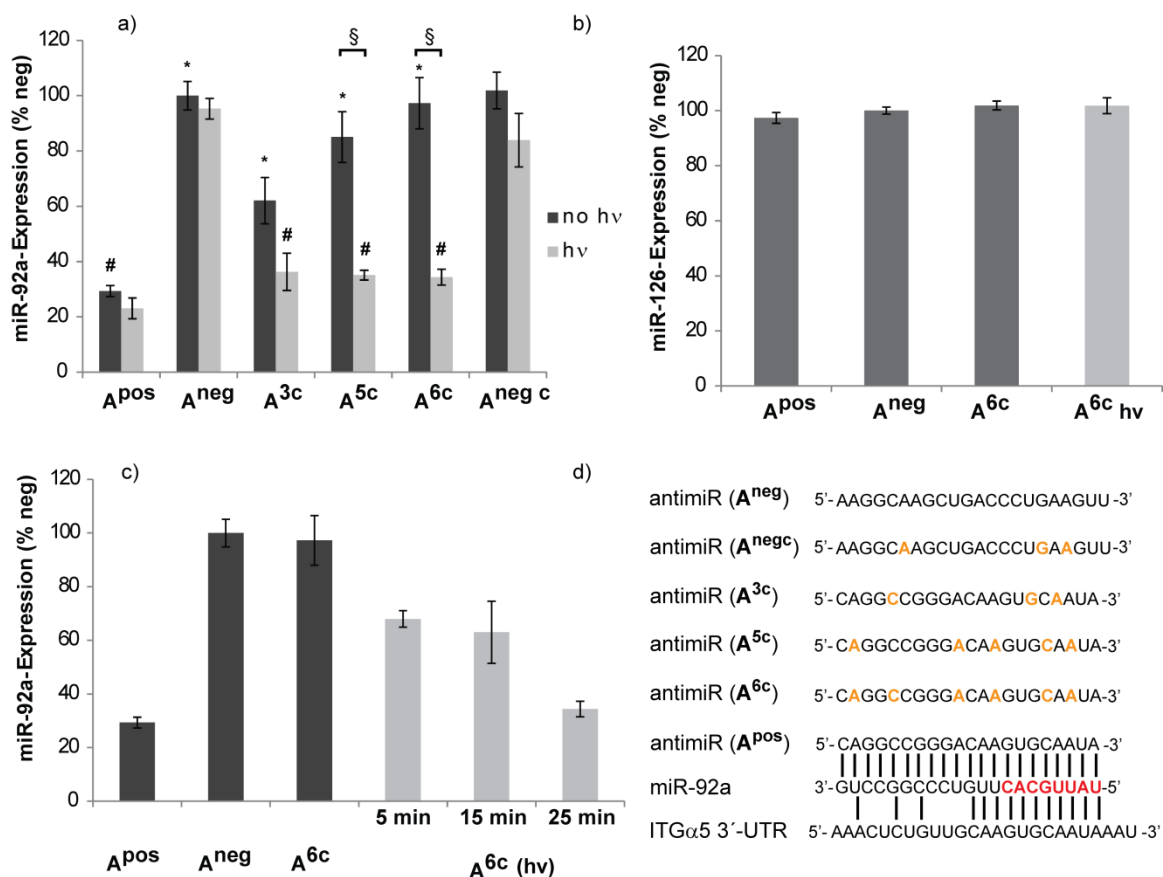
**Abbildung 66:** Funktionsprinzip lichtinduzierbarer AntimiRs. Vor Bestrahlung bindet die miR-92a an die 3'-untranslatierte Region der Ziel-mRNA. Das photolabil geschützte AntimiR hat keinen Effekt auf die miRNA- und die mRNA-Expression. Nach Bestrahlung bindet das AntimiR an die miR-92a, die mRNA wird dereprimiert. Die Effekte der Lichtinduktion wurden auf drei verschiedenen Ebenen beobachtet. Nach Bestrahlung sollte eine erniedrigte miR-92a-Expression, eine erhöhte mRNA-Expression und ein positiver Effekt auf die Angiogenese festzustellen sein.

### 3.3.6.2 Auswirkungen lichtinduzierbarer AntimiRs auf die miR-92a-Expression

In Voruntersuchungen wurde zunächst geklärt, wie lange die Bestrahlungszeit gewählt werden muss, um eine vollständige Abspaltung aller photolabilen Schutzgruppen zu gewährleisten. Hierfür wurden jeweils 136 pmol des Antimirs A<sup>6c</sup> in 200 µL PBS-Puffer für verschiedene Zeitpunkte in einer 12-Well-Platte bestrahlt. Als Bestrahlungsquelle diente ein Transilluminator ( $\lambda = 365$  nm) mit homogener Intensitätsverteilung über die gesamte Fläche. Dies sollte sicherstellen, dass alle Zellen die gleiche Bestrahlungsdosis erhielten. Nach der Bestrahlung wurde ein Aliquot der Lösungen per HPLC analysiert und es zeigte sich, dass nach 25 Minuten Bestrahlungszeit eine vollständige Entschützung stattgefunden hatte. Daher wurde diese Bestrahlungszeit für die folgenden Zellkulturexperimente gewählt.

Zunächst wurde getestet, inwieweit sich die endogene miR-92a-Expression in HUVECs durch Transfektion der lichtinduzierbaren AntimiRs beeinflussen lässt. Nach einigen Optimierungsversuchen wurde hierfür immer im 6-well-Format mit jeweils 130.000 Zellen/well

gearbeitet. 24 Std. nach dem Ausbringen der Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von 40-60 % mit 10 nM Konzentration der verschiedenen AntimiRs transfiziert. Genaue Details der Transfektionsbedingungen sind im Experimentellen Teil zu finden. Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gegen PBS ausgetauscht und die Zellen entweder für 25 Minuten bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Nach weiteren 48 Std. wurde die Gesamt-RNA aus den HUVECs isoliert und auf die miR-92a-Expression getestet, wie in Abschnitt 3.3.3 und detailliert im Experimentellen Teil beschrieben.



**Abbildung 67:** Einfluss der Transfektion verschiedener AntimiRs auf die miR-92a bzw. miR-126 Expression. a) Einfluss der AntimiR-Transfektion auf die miR-92a-Expression ohne (dunkelgraue Balken) oder mit 25-minütiger Bestrahlung (hellgraue Balken). Die miR-92a-Expression ist relativ zu A<sup>neg</sup> angegeben und auf RNU 48 als internen Standard normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus vier unabhängigen Einzelmessungen dar und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Signifikanz wurde mit dem Studentschen t-Test ermittelt. #p < 0,01 bezogen auf A<sup>neg</sup>, \*p < 0,05 bezogen auf A<sup>pos</sup>, §p < 0,05; b) Einfluss der Transfektion verschiedener AntimiRs auf die miR-126 Expression mit (hellgraue Balken) oder ohne Bestrahlung (dunkelgraue Balken), N = 4; c) Effekt verschiedener Bestrahlungszeiten auf die miR-92a-Expression von A<sup>6c</sup> transfizierten Zellen (hellgrau), verglichen mit A<sup>pos</sup>, A<sup>neg</sup> oder A<sup>6c</sup> transfizierten Zellen ohne Bestrahlung (dunkelgrau), N = 4; d) Sequenzen der verwendeten AntimiRs, der miR-92a und des Ausschnitts der ITGα5 mRNA, an die miR-92a bindet. Die seed-Region der miR-92a ist rot dargestellt, die photolabil geschützten Nukleotide sind orange eingefärbt.

In Abbildung 67a sind die Effekte der Transfektion verschiedener AntimiRs auf die miR-92a-Expression abgebildet. Die Restaktivität der geageten AntimiRs ist abhängig von der Zahl der

photolabilen Schutzgruppen. Das AntimiR mit drei photolabilen Schutzgruppen  $A^{3c}$  weist noch eine signifikante Restaktivität auf, die miR-92a-Expression liegt auch im unbestrahlten Fall nur bei 60 % des Kontrollniveaus. Demgegenüber weist  $A^{5c}$  nur noch eine geringe und  $A^{6c}$  keinerlei signifikante Restaktivität auf. Sechs photolabile Schutzgruppen werden also benötigt, um die Aktivität des AntimiRs vollständig auszuschalten. Nach 25-minütiger Bestrahlung gelang es im Rahmen des experimentellen Fehlers, alle AntimiRs wieder vollständig zu reaktivieren. Die miR-92a-Expression konnte auf das gleiche Level wie das der nicht photolabil geschützten Positivkontrolle  $A^{pos}$  gesenkt werden. Um sicherzustellen, dass die Bestrahlung selbst bzw. die Photolysenebenprodukte keinerlei Effekte auf die miR-92a-Expression haben, wurden zusätzlich auch  $A^{pos}$ ,  $A^{neg}$  und  $A^{neg c}$  bestrahlt. Bei keinem der drei AntimiRs ließ sich ein signifikanter Effekt der Bestrahlung auf die miR-92a-Expression nachweisen. Darüber hinaus waren auch keinerlei morphologische Unterschiede der bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen zum Ende der Assayzeit vor der Zellyse zu erkennen.

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob es sich bei dem beobachteten Effekt der lichtinduzierten Repression der miRNA-Expression um einen sequenzspezifischen Effekt handelt. Daher wurde untersucht, ob sich auch die Expressionshöhe der nicht sequenzverwandten miR-126 durch die Transfektion mit verschiedenen AntimiRs und die Bestrahlung ändert. In Abbildung 67b ist zu sehen, dass dies nicht der Fall ist. Sowohl Zellen die mit der Positivkontrolle  $A^{pos}$  transfiziert wurden, als auch das gecagete AntimiR  $A^{6c}$  vor und nach Bestrahlung veränderten die miR-126-Expression, verglichen mit der Negativkontrolle, nicht. Dieses Experiment zeigt, dass es sich bei dem beobachteten Effekt der Lichtinduzierbarkeit der miR-92a-Expression um einen sequenzspezifischen Effekt handelt und dass weder die Gesamt-miRNA-Expression (z.B. durch Inhibierung von wichtigen Prozessionsenzymen) gestört wird, noch dass der Effekt auf der Bestrahlung selbst bzw. der Transfektion der Zellen beruht.

Wie oben beschrieben, wurde in Vorexperimenten eine benötigte Bestrahlungszeit von 25 Minuten ermittelt. Zur Verifizierung dieses Befundes wurden verschiedene Bestrahlungszeiten zusätzlich auf Ebene der miR-Expression untersucht. Wie aus Abbildung 67c hervorgeht, führt bereits eine 5-minütige Bestrahlung zu einer partiellen Aktivierung des AntimiRs  $A^{6c}$  und einer damit verbundenen Reduktion des miR-92a-Levels auf ca. zwei Drittel des Kontrollniveaus. Mit zunehmender Bestrahlungszeit kann ein verbesserter Effekt bis zur vollständigen Aktivierung nach 25 Minuten erreicht werden. Dies macht deutlich, dass der Effekt der AntimiRs auf die miR-92a-Expression durch die Lichtdosis kontrolliert werden kann.

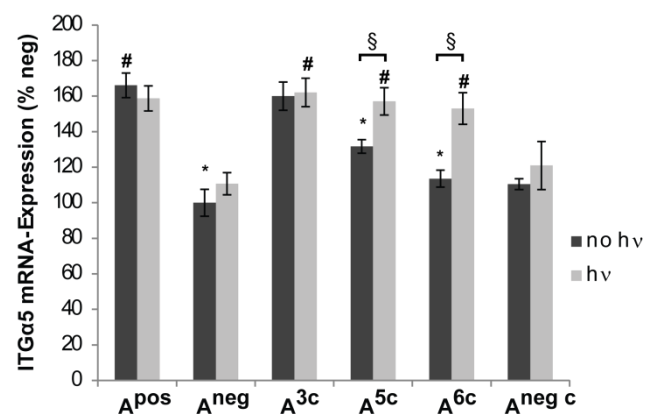
### 3.3.6.3 *Auswirkungen lichtinduzierbarer AntimiRs auf die Zielgen-Expression*

Im nächsten Schritt wurden nun Auswirkungen der verschiedenen AntimiRs auf die Zielgen-Expression per SYBR Green Real Time PCR untersucht. Als Zielgen wurde Integrin  $\alpha 5$  (ITG $\alpha 5$ ),

ein bekanntes Ziel der miR-92a, gewählt. ITG $\alpha$ 5 ist ein Zelloberflächenrezeptor und fungiert als Mediator von Wechselwirkungen zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix.<sup>[182]</sup> Für die Angiogenese spielt es eine bedeutende Rolle, da Integrin  $\alpha$ 5 ein wichtiger Faktor für die Zelladhäsion und -migration ist, die für die Angiogenese benötigt werden.<sup>[183]</sup> In Übereinstimmung damit steht der experimentelle Befund, dass Integrin  $\alpha$ 5-Knockoutmäuse schwere Störungen bei der vaskulären Entwicklung aufweisen.<sup>[182]</sup>

Wie aus Abbildung 68 hervorgeht, führt die Transfektion des aktiven AntimiRs A<sup>pos</sup> zu einer 1,6-fach erhöhten Expression der ITG $\alpha$ 5 mRNA durch die Inhibition der miR-92a im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Effekte von miRNAs auf die mRNA-Expression sind, wie bereits in der Einleitung beschrieben, meist eher subtil und nicht so ausgeprägt wie bei siRNAs. Konsequenterweise sind auch die erzielten Effekte durch die Inhibition ebendieser miRNAs nicht sehr hoch. Zudem muss bedacht werden, dass die Messung der mRNA-Level nur jene Mechanismen der miRNA-Aktivität berücksichtigt, die zu einem Abbau derselben führen. Ein bedeutender Teil der mRNAs wird nur translationell gehemmt, nicht jedoch abgebaut. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass eine miRNA sehr viele endogene Ziele hat, was ebenfalls dazu führt, dass der Effekt auf eine bestimmte mRNA nur gering ist.<sup>[125]</sup>

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.6.2 hatte nur A<sup>3c</sup> auch ohne Bestrahlung noch eine signifikante Restaktivität und führte somit zu einer signifikanten Erhöhung der ITG $\alpha$ 5-Expression. Im Gegensatz dazu wurde bei A<sup>5c</sup> nur eine geringfügige Erhöhung des mRNA-Levels festgestellt und A<sup>6c</sup> war ohne Bestrahlung vollständig inaktiv, sodass sich im Vergleich zu A<sup>neg</sup> keinerlei Derepression der ITG $\alpha$ 5 mRNA feststellen ließ.



**Abbildung 68:** Auswirkungen der Transfektion verschiedener AntimiRs (10 nM) auf die ITG $\alpha$ 5 mRNA-Expression ohne (dunkelgraue Balken) oder mit 25-minütiger Bestrahlung (hellgraue Balken). Alle Werte sind relativ zu A<sup>neg</sup> angegeben. Als interner Standard wurde P0 verwendet. Die Werte stellen den Mittelwert aus vier unabhängigen Einzelmessungen dar, der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde mit dem Studentschen t-Test ermittelt. # p < 0,01 bezogen auf A<sup>neg</sup>, \*p < 0,05 bezogen auf A<sup>pos</sup>, § p < 0,05.

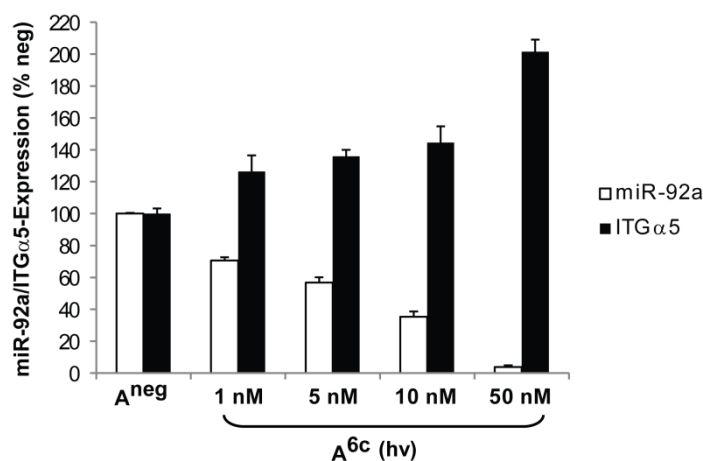


Durch Bestrahlung von Zellen, die mit  $A^{5c}$  oder  $A^{6c}$  transfiziert wurden, kam es jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der  $ITG\alpha 5$  mRNA-Expression, vergleichbar mit Kontrollen, die mit  $A^{pos}$  transfiziert wurden.

Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass sich die Expression von einem physiologisch bedeutsamen miRNA-Zielgen unter Verwendung der lichtinduzierbaren AntimiRs durch ein externes Auslösesignal steuern lässt. Die Werte der  $ITG\alpha 5$  mRNA-Expression von  $A^{pos}$ ,  $A^{neg}$  und  $A^{neg c}$  untermauern den Befund aus Abschnitt 3.3.6.2, dass die Bestrahlung selbst bzw. die freigesetzten Photolysenebenprodukte für die Zellen nicht toxisch sind und neben der miR-Expression auch nicht die miRNA-Zielgen-Expression beeinflussen.

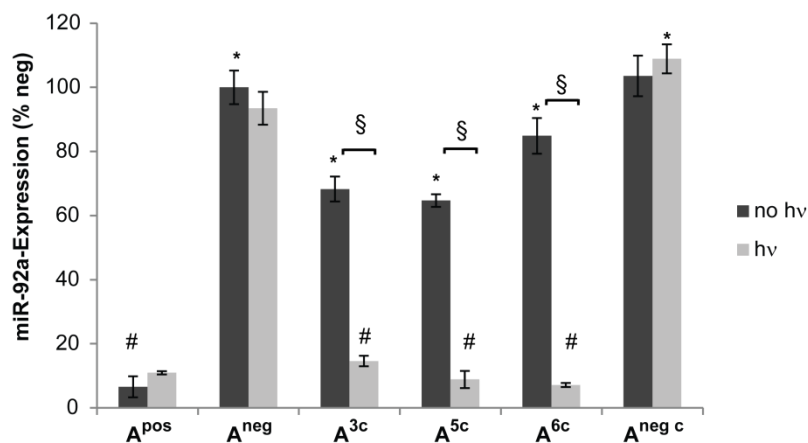
### 3.3.6.4 Dosisabhängigkeit des Effekts lichtinduzierbarer AntimiRs

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob bei einer erhöhten AntimiR-Konzentration noch deutlichere Effekte auf Ebene der miR-92a- bzw.  $ITG\alpha 5$ -Expression erzielt werden können. Dafür wurden HUVECs mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $A^{6c}$  transfiziert und bestrahlt. Als Kontrolle wurden HUVECs mit  $A^{neg}$  transfiziert. In Abbildung 69 lässt sich erkennen, dass eine eindeutige Dosisabhängigkeit der bestrahlten AntimiRs besteht, mit einem maximalen Effekt bei 50 nM Konzentration. Erwartungsgemäß wurde eine deutlich reziproke Korrelation zwischen der miR-92a-Expression und der  $ITG\alpha 5$ -Expression beobachtet. Bei 50 nM Konzentration sind die Effekte am deutlichsten, die miR-92a-Expression lässt sich nahezu vollständig herunterregulieren. Selbst bei 1 nM Konzentration ist noch ein deutlicher Effekt zu beobachten, es kommt zu einer Herunterregulierung der miR-92a-Expression auf ca. 70 % des Kontrolllevels.



**Abbildung 69:** Dosisabhängige Wirkung des lichtinduzierbaren AntimiRs  $A^{6c}$  nach Bestrahlung, relativ zu  $A^{neg}$  (10 nM). Die schwarzen Balken stehen für die  $ITG\alpha 5$ -Expressionshöhe, die weißen Balken für die miR-92a-Expressionshöhe. Für miR-92a wurde RNU 48, für  $ITG\alpha 5$  wurde P0 als interner Standard verwendet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts aus vier unabhängigen Messungen dar.

Bereits zu Beginn war das Experiment aus Abschnitt 3.3.6.2 in ähnlicher Art und Weise mit 50 nM Konzentration durchgeführt worden, jedoch wurden die Zellen hier bereits 24 Stunden nach Bestrahlung lysiert, da ein signifikanter Effekt auf miR-Ebene schon nach dieser Zeit detektierbar ist. Hierbei zeigte sich, dass, ebenso wie in Abbildung 69 erkennbar, zwar der Effekt der AntimiRs nach Bestrahlung höher ist, dass alle lichtinduzierbaren AntimiRs aber auch bereits vor Bestrahlung eine signifikante Restaktivität aufweisen, sodass nicht das gewünschte 100%ige An/Aus-Schaltverhalten erzielt werden konnte. In Abbildung 70 ist gezeigt, dass selbst das AntimiR mit sechs photolabilen Schutzgruppen  $A^{6c}$  bereits ohne Bestrahlung zu einer verminderten miR-92a-Expression von nur 85 % des Kontrollniveaus führte. Entsprechend höher war die Restaktivität von  $A^{5c}$  und  $A^{3c}$ . Daher wurden auch die folgenden *in vitro* Angiogenese-Experimente alle mit 10 nM AntimiR-Konzentration durchgeführt.

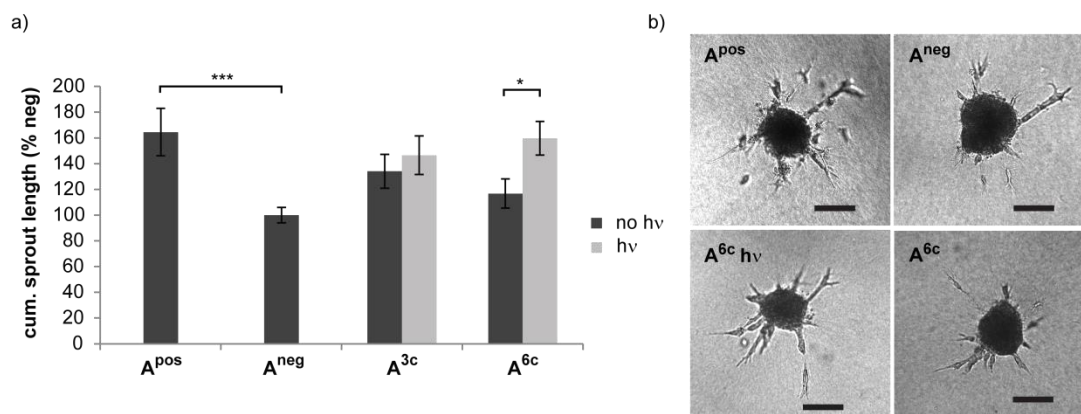


**Abbildung 70:** Einfluss der Transfektion verschiedener AntimiRs in 50 nM Konzentration auf die miR-92a-Expression ohne (dunkelgraue Balken) oder mit 25-minütiger Bestrahlung (hellgraue Balken). Die Gesamt-RNA wurde 24 Std. nach Bestrahlung aus HUVECs isoliert. Die miR-92a-Expression ist relativ zu  $A^{neg}$  angegeben und auf RNU 48 als internen Standard normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus vier unabhängigen Einzelmessungen dar und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde mit dem Studentschen t-Test ermittelt. \* $p < 0,01$  bezogen auf  $A^{pos}$ , # $p < 0,01$  bezogen auf  $A^{neg}$ , § $p < 0,01$ .

### 3.3.6.5 *In vitro* Angiogenese-Studien mittels „spheroid sprouting“

In Abschnitt 3.3.2.2 wurde bereits besprochen, dass miR-92a in Endothelzellen antiangiogen wirkt. Um herauszufinden, ob die AntimiRs einen mit Licht induzierbaren sichtbaren biologischen Effekt hervorrufen können, sollte daher die Angiogenese-Aktivität von HUVECs nach Transfektion der AntimiRs überprüft werden. Ein etablierter *in vitro* Assay zur Überprüfung der Angiogenese-Aktivität ist der sogenannte „spheroid sprouting assay“. Hierbei kommt es durch Ausbringen von Endothelzellen in nichtadhärenten Rundboden-Platten zur Aggregation der Zellen und schließlich wird aus allen ausgebrachten Zellen ein Spheroid homogener Größe erzeugt, der aus einer Oberflächenschicht von polarisierten Endothelzellen und einem Kern

unorganisierter Zellen besteht.<sup>[184]</sup> Die Spherode werden in eine Kollagen-Matrix ausgebracht, woraufhin sie ausgehend nur von den Oberflächenzellen kapillarähnliche Aussprossungen bilden, die ein Maß für die Angiogenese-Aktivität darstellen. Die Gesamtlänge aller Aussprossungen („cumulative sprout length“) lässt sich unter dem Mikroskop mithilfe von digitaler Bildbearbeitungssoftware bestimmen.<sup>[185]</sup>



**Abbildung 71:** Effekt lichtinduzierbarer AntimiRs auf die Angiogenese in Endothelzell-Spheroiden. a) Länge aller Aussprossungen aus Spheroiden nach Transfektion mit verschiedenen AntimiRs ohne (dunkelgraue Balken) oder mit Bestrahlung (hellgraue Balken). Es wurde der Mittelwert aus zehn Spheroiden pro Bedingung gebildet. Die Werte sind relativ zur Länge aller Aussprossungen von  $A^{neg}$ -transfizierten Zellen angegeben. Aus den transfizierten Zellen wurden 24 Std. nach Bestrahlung Spherode präpariert. Die Aussprossung wurde 72 Std nach der Transfektion bestimmt. Vor der Messung wurden die Spherode mit Formaldehyd fixiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts aus fünf unabhängigen Messungen. Die Signifikanz wurde mit dem *Anova Bonferroni's multiple comparison test* überprüft. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; b) repräsentative Spheroidbilder für die Bedingungen  $A^{pos}$  (links oben),  $A^{neg}$  (rechts oben),  $A^{6c}$  (bestrahlt, links unten) und  $A^{6c}$  (unbestrahlt, rechts unten). Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m Länge. Die Präparation der Spherode wurde von A. Knau durchgeführt, die Auswertung wurde selbst vorgenommen.

Aus Abbildung 71a geht hervor, dass, in Einklang mit der antiangiogenen Funktion von miR-92a in Endothelzellen deren Inhibition mit  $A^{pos}$  zu einer erhöhten Angiogenese-Aktivität führt. Die Länge der Aussprossung ist ca. 1,6-fach höher als bei  $A^{neg}$ -transfizierten Kontrollzellen. Die Transfektion von  $A^{3c}$  führte bereits ohne Bestrahlung zu einer Erhöhung der Angiogenese-Aktivität. Dies ist in Übereinstimmung mit der unvollständigen Inhibition der AntimiR-Aktivität bezogen auf die miR-92a Level, wie in Abschnitt 3.3.6.2 gezeigt. Das AntimiR mit sechs photolabilen Schutzgruppen  $A^{6c}$  hingegen hatte ohne Bestrahlung keinerlei Auswirkungen auf die Aussprossung, verglichen mit der Negativkontrolle. Die Bestrahlung von Zellen, die mit  $A^{6c}$  transfiziert wurden, führte jedoch zu einer Erhöhung der Angiogenese-Aktivität auf Werte, die mit der Positivkontrolle  $A^{pos}$  erhalten wurden. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die *in vitro* Angiogenese in Endothelzellen mithilfe der lichtinduzierbaren AntimiRs gegen miR-92a reguliert werden kann.

### 3.3.7 Zusammenfassung & Ausblick

In diesem Projekt gelang es erstmals, die miR-Aktivität in humanen Primärzellen mithilfe von Licht als externem Auslösesignal durch die Verwendung gecagerter AntimiRs zu kontrollieren. Es konnte gezeigt werden, dass für eine vollständige Inaktivierung der AntimiR-Aktivität fünf bis sechs photolabile Schutzgruppen benötigt werden. Es ist zudem festzustellen, dass die verwendeten photolabil geschützten Oligonukleotide auch über einen längeren Zeitraum in Zellkultur stabil bleiben und die photolabilen Schutzgruppen nicht von Reparaturenzymen entfernt werden, zumindest nicht, bevor es zu einem Abbau des gesamten Antisense-Oligonukleotids kommt. Durch Bestrahlung konnten die AntimiRs vollständig reaktiviert werden, sodass sie die gleiche Aktivität wie eine Positivkontrolle aufwiesen. Dies wurde erfolgreich auf drei Ebenen, der miR-92a-Expression, der Expression des endogenen Zielgens ITG $\alpha$ 5 auf mRNA-Ebene und anhand eines *in vitro* Angiogenese-Assays, gezeigt. Es konnte somit erstmals eine physiologisch relevante von miRNAs regulierte Funktion in menschlichen Zellen mit lichtinduzierbaren AntimiRs gesteuert werden. Dies impliziert, dass licht-induzierbare AntimiRs eine therapeutische Funktion erfüllen könnten. Wie bereits in Abschnitt 3.3.1.2 beschrieben, wurde die therapeutische Anwendbarkeit von AntimiRs bereits in mehreren Maus-Modellen und vorklinischen Studien an anderen Tieren demonstriert.<sup>[186–188]</sup> Überdies wurde, wie bereits erwähnt, erst kürzlich eine klinische Studie vorgestellt, welche die sichere und effiziente Verwendung eines AntimiRs gegen die leberspezifische miR-122 im Menschen beweist.<sup>[167]</sup> Bei allen derartigen Studien wurde die miRNA jedoch systemisch inhibiert. In Anbetracht der Tatsache, dass die systemische Inhibition zu ungewollten Nebeneffekten in verschiedenen Geweben führen könnte, stellt die hier vorgestellte Methode eine Möglichkeit dar, die AntimiR-Wirkung in einer orts aufgelösten Art und Weise nur am gewünschten Zielort zu entfalten. Speziell für die miR-92a könnte dies zum Beispiel von Interesse für die Stimulation der Angiogenese in Wundheilungsprozessen nach Hautverletzungen sein. Das hier gezeigte System kann dafür als ein erstes Modell dienen, welches in einem Wundheilungsmodell so Anwendung finden könnte. Für eine breitere Anwendbarkeit müssten allerdings photolabile Schutzgruppen verwendet werden, die eine Zweiphotonenentschützung erlauben, um so eine höhere Eindringtiefe in das Gewebe zu ermöglichen. Mit der Zweiphotonentechnik ließen sich so Eindringtiefen von ca. 1 mm erreichen, was eine Applikation in Wundheilungsprozessen ermöglichen sollte.<sup>[189]</sup>

## 3.4 Aptacaging<sup>[190]</sup>

### 3.4.1 Caging von Proteinen

Die lichtgesteuerte Kontrolle von Proteinaktivitäten durch photolabile Schutzgruppen bzw. von Proteinwechselwirkungen mit Licht ist ein komplexes und vielschichtiges Problem. In einigen Fällen ist es ausreichend, bestimmte Aminosäuren im aktiven Zentrum mit photolabilen Schutzgruppen zu versehen, um die Proteinaktivität vollständig auszuschalten, in anderen Fällen erstrecken sich die zu blockierenden Wechselwirkungen über eine große Fläche, z.B. wenn es sich um Bereiche im Protein handelt, die für regulatorische Wechselwirkungen verantwortlich sind.<sup>[190]</sup> Für den ersten Fall wird sowohl eine genaue Kenntnis der Proteinstruktur bzw. der für die Funktion essentiellen Aminosäuren benötigt, als auch ein Verfahren, das es ermöglicht, die gecageten Aminosäuren selektiv an der gewünschten Stelle einzubringen. Die automatisierte Festphasensynthese ist jedoch nicht zur Herstellung größerer Proteine geeignet, sodass man sich der Methode des translationellen Einbaus nicht natürlicher, gecageter Aminosäuren bedient. Hierfür muss ein tRNA/tRNA-Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paar generiert werden, welches selektiv die gecagete Aminosäure einbaut.<sup>[191,192]</sup> Deiters et al. konnten auf diese Weise ein gecagetes Tyrosin genetisch codieren, welches, eingebaut in das aktive Zentrum einer T7RNA-Polymerase, die lichtgesteuerte Regulation der Transkription von T7-Promotorregulierten Genen in HEK-Zellen ermöglichte.<sup>[193]</sup> Weiterhin gelang die Generierung einer lichtinduzierbaren Zink-Finger-Nuklease.<sup>[194]</sup> Ein anderer Ansatz beim Caging von Proteinen ist die Einführung zufällig verteilter photolabiler Schutzgruppen mithilfe des statistischen Cagings. Auf diese Art und Weise wurden beispielsweise lichtaktivierbare Antikörper und lichtaktivierbares Hämoglobin hergestellt. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, wie bereits in der Einleitung für Nukleinsäuren beschrieben, dass die resultierenden Proteine entweder vor der Bestrahlung nicht vollständig inaktiv sind oder dass sich keine vollständige Reaktivierung nach Bestrahlung erhalten lässt.<sup>[195,196]</sup> Ziel dieses Projekts war es daher, eine alternative Methode zum Caging von Proteinen an einem Modellsystem zu etablieren, die keine genauen Kenntnisse der Proteinstruktur erfordert. Sie sollte zudem ein verlässliches An/Aus-Verhalten generieren und es ermöglichen, auch großflächige Areale, über die ein Protein zu anderen Makromolekülen wechselwirkt, lichtschtbar zu machen.

### 3.4.2 Aptamere und deren therapeutische Bedeutung

Aptamere sind einzelsträngige Nukleinsäuren, die eine definierte dreidimensionale Struktur ausbilden und mit hoher Affinität an ihre Zielmoleküle binden. Die Zielmoleküle von Aptameren können recht unterschiedlicher Natur sein und umfassen Metallionen, kleine organische Moleküle

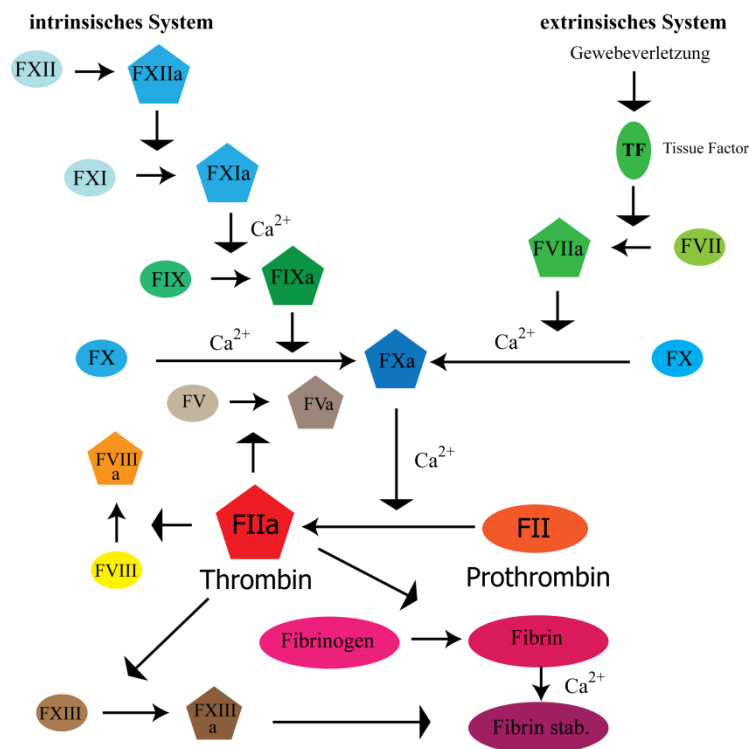
bis hin zu Proteinen und ganzen Zelltypen.<sup>[197]</sup> Aptamere werden durch einen *in vitro* Selektionsprozess (SELEX = „Selective Enrichment of Ligands by Exponential Amplification“) gewonnen und meist aus einem Pool von  $10^{13}$ - $10^{15}$  Oligonukleotiden ausgewählt, die alle aus einer randomisierten Region von 20-100 nt bestehen, welche auf beiden Seiten von einer Region festgelegter Sequenz umgeben ist. Diese wird für die Erkennung in enzymatischen Reaktionen benötigt.<sup>[198]</sup> Das SELEX-Verfahren wurde erstmals im Jahr 1990, unabhängig voneinander, von drei Gruppen für die Selektion eines RNA-Aptamers gegen organische Farbstoffe<sup>[199]</sup>, die Selektion eines RNA-Aptamers, das an die Bakteriophagen T4 DNA Polymerase bindet<sup>[200]</sup> und für die Selektion eines Ribozyms, dass, ausgehend von einem bestehenden Ribozym, so verändert wurde, dass es DNA anstelle von RNA schneidet<sup>[201]</sup>, angewendet. Eine SELEX für ein DNA-Aptamer gegen ein Protein besteht im Prinzip aus einem sich wiederholenden Zyklus von drei Schritten. Zunächst wird die Oligonukleotidbibliothek mit dem Zielprotein inkubiert, es folgt ein Chromatographieschritt, in dem zunächst z.B. per Affinitätschromatographie alle nicht gebundenen Sequenzen abgetrennt werden. Die gebundenen Sequenzen werden anschließend eluiert und per PCR vervielfältigt. Der Pool ist nun kleiner und reichert sich mit jeder folgenden Runde immer mehr mit Sequenzen an, die gut an das Zielmolekül binden, indem die Stringenz der Waschschriffe zunehmend erhöht wird. Am Ende eines solchen Prozesses kann es dann gelingen, Sequenzen mit hoher Bindungsaffinität im nano- oder sogar picomolaren Bereich zu gewinnen.<sup>[197]</sup> Unter geeigneten Selektionsbedingungen lassen sich auch Aptamere generieren, die nur gegen einzelne Proteindomänen gerichtet sind und somit beispielsweise eine regulatorische Funktion inhibieren können, ohne das aktive Zentrum zu beeinflussen.<sup>[198]</sup> Die Tatsache, dass Aptamere an Proteine hochaffin binden und diese zumeist in ihrer Funktion inhibieren, macht sie potentiell zu einer interessanten Klasse therapeutischer Moleküle. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften von Nukleinsäuren gibt es jedoch, wie für alle anderen Klassen therapeutischer Oligonukleotide, einige Einschränkungen. Beispielsweise ist die Zellmembrangängigkeit und die Stabilität im Serum eingeschränkt, weswegen oftmals Aptamere gegen extrazelluläre Proteine ausgewählt wurden. Bis jetzt wurde nur ein Aptamer als Medikament zugelassen und zwar Macugen, welches zur Behandlung der feuchten altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt wird und gegen VEGF gerichtet ist.<sup>[202]</sup>

### 3.4.3 Thrombin und Blutgerinnung

Im Jahr 1992 wurde von Bock et al. das erste DNA-Aptamer vorgestellt. Es ist gegen  $\alpha$ -Thrombin gerichtet, ein Schlüsselenzym der Blutgerinnung.<sup>[203]</sup> Die Blutgerinnung (Hämostase) ist ein extrem komplexer Prozess, an dem über 100 Proteine beteiligt sind.<sup>[204]</sup> Es soll hier nur ein ganz grober Überblick über die Grundlagen dieses Prozesses und die Rolle, die das Thrombins dabei spielt, gegeben werden. Die Hämostase lässt sich grundsätzlich in eine primäre und eine

sekundäre Phase einteilen. In der primären Phase sind die Thrombozyten der entscheidende Faktor. Im intakten Zustand sind Blutgefäße von Endothelzellen umschlossen. Wird die Integrität dieser Endothelzellschicht durch eine Verletzung unterbrochen, werden subendotheliale Strukturen freigelegt. In der Folge kommt es zu einer Bindung der Rezeptoren auf den Thrombozyten an diese Strukturen, wie z.B. Kollagen. Durch die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel kommt es zu einer Formveränderung der Thrombozyten und es werden etliche an der Gerinnung beteiligte Stoffe aus den Thrombozyten freigesetzt. Unter anderem wird Fibrinogen und Faktor V freigesetzt, die im späteren Verlauf noch eine wichtige Rolle spielen. Zum Ende der primären Phase der Hämostase wird ein Thrombozytenthrombus gebildet, der von Fibrinogenbrücken zusammengehalten wird, in dieser Form aber noch recht labil ist. Die sekundäre Phase der Hämostase lässt sich in einen extrinsischen, durch Gewebsverletzungen induzierten Aktivierungsweg und einen intrinsischen Aktivierungsweg unterteilen. Der intrinsische Weg wird durch Kontaktaktivierung mit Substanzen wie Präkallikrein beschriftet. Der intrinsische Weg wird von Faktor XIIa initiiert. Beim extrinsischen Aktivierungsweg kommt es, ausgehend vom sogenannten „Tissue Factor“ (auch als Gewebsthromboplastin bezeichnet), zu einer sequentiellen Aktivierung verschiedener Gerinnungsfaktoren, ausgehend vom Faktor VIIa, wobei der zentrale Schritt in der Aktivierung von Thrombin aus Prothrombin liegt (s. Abbildung 72). Die entscheidende vom Thrombin katalysierte Reaktion ist die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen. Aus Fibrin kann sich jetzt ein polymeres Netzwerk bilden, was zur Stabilisierung des Thrombozytenthrombus führt.<sup>[204]</sup>

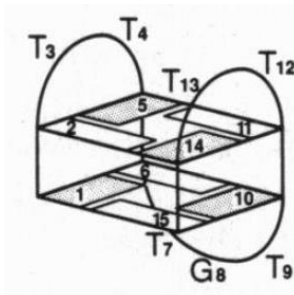
Thrombin ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 37 kDa und besteht aus einer leichten (5,5 kDa) und einer schweren Kette (31,5 kDa), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Neben seinem aktiven Zentrum („active site“) verfügt es über zwei zusätzliche regulatorische Bereiche, die sogenannten Exosites I und II, die über etliche positiv geladene Aminosäuren verfügen. Thrombin besitzt neben der Aufgabe Fibrinogen zu Fibrin zu spalten noch zahlreiche weitere Aufgaben in der Blutgerinnung und ist befähigt noch mindestens zwölf weitere Substrate zu spalten (s. Abbildung 72). Zudem muss sichergestellt werden, dass Thrombin einerseits zur richtigen Zeit aktiviert wird, um Blutungen zu stoppen, aber andererseits nur für eine sehr begrenzte Zeit aktiv ist, weil es sonst zu gefährlichen Thrombosen kommen kann.<sup>[205]</sup> Die meisten Substrate von Thrombin binden sowohl an das aktive Zentrum als auch an mindestens eine der Exosites. Beispielsweise verläuft die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin über eine Bindung an das aktive Zentrum und die Exosite I. Die Inaktivierung von Thrombin mithilfe der durch Heparin unterstützten Antithrombin-Bindung wird über das aktive Zentrum und Exosite II vermittelt.



**Abbildung 72:** Aktivierung von Thrombin aus extrinsischem und intrinsischem Weg und Aufgaben des Thrombins in der Blutgerinnung. Thrombin wird mithilfe vom Faktor Va-Xa-Komplex aus Prothrombin hergestellt. Neben der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin wirkt Thrombin zusätzlich prokoagulatorisch durch Aktivierung des Faktors XIII, der für eine Quervernetzung des Fibrins sorgt und so zu einer Stabilisierung des Fibrinpolymers führt. Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus stimuliert Thrombin seine eigene Herstellung, indem es die Kofaktoren V und VIII aktiviert. Die breiten Pfeile indizieren eine Einwirkung eines Faktors auf die Aktivierung eines anderen, die schmalen Pfeile die Umwandlung eines inaktiven in einen aktiven Faktor bzw. die Modifikation des Fibrin-Polymers (Abbildung modifiziert nach Oldenburg und Hartfelder).<sup>[204]</sup>

Das oben genannte DNA-Aptamer, welches gegen Thrombin selektiert wurde, hat die palindromische Sequenz 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' und wird als HD1 bezeichnet. Es bindet mit einer Affinität von  $\approx 100$  nM an die Exosite I von Thrombin. Es inaktiviert somit die prokoagulatorische Wirkung des Thrombins. Dies konnte an einer deutlich verlangsamten Gerinnungszeit sowohl in Fibrinogenlösungen als auch in mit Citrat antikoaguliertem menschlichem Plasma demonstriert werden.<sup>[203]</sup> Die Struktur von HD1 wurde 1993 per NMR-Spektroskopie gelöst. Es handelt sich um eine doppellagige G-Quadruplexstruktur, deren zwei Tetraden über zwei TT-Schleifen und eine TGT-Schleife verbunden sind (s. Abbildung 73).<sup>[206]</sup> Später konnte durch Röntgenstrukturanalysen des an Thrombin gebundenen Aptamers gezeigt werden, dass die Bindung des HD1 an Thrombin entweder über die TT-Schleifen oder die TGT-Schleife erfolgt. Aus den Kristallstrukturdaten ließ sich nicht eindeutig klären, welcher Bindungsmodus vorliegt.<sup>[207]</sup>

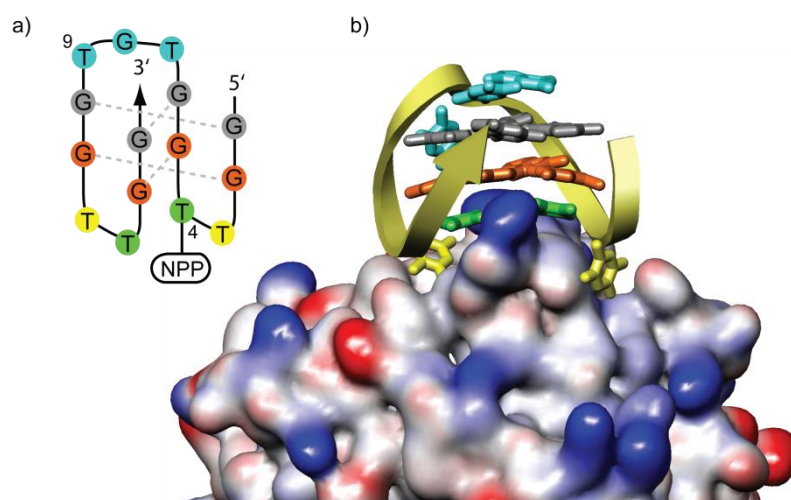




**Abbildung 73:** G-Quadruplexstruktur des HD1-Aptamers. Entnommen aus Macaya et al.<sup>[206]</sup>

### 3.4.4 Vorarbeiten und Projektziele

Von Heckel und Mayer wurde das HD1-Thrombin System verwendet, um in einer „proof-of-principle“-Studie zu zeigen, dass sich die Aptamer-Protein-Wechselwirkung und somit die Proteinaktivität mit Licht steuern lässt. Hierzu wurden Varianten des HD1 synthetisiert, die entweder am T9 oder am T4 (s. Abbildung 74a) mit einer NPP-Schutzgruppe versehen waren. Es zeigte sich, dass durch Anbringen der photolabilen Schutzgruppe am T4 die Aktivität des Aptamers vollständig ausgeschaltet werden kann. Dies bestätigte, dass das HD1 über die TT-Schleifen an Thrombin bindet (s. Abbildung 74b).

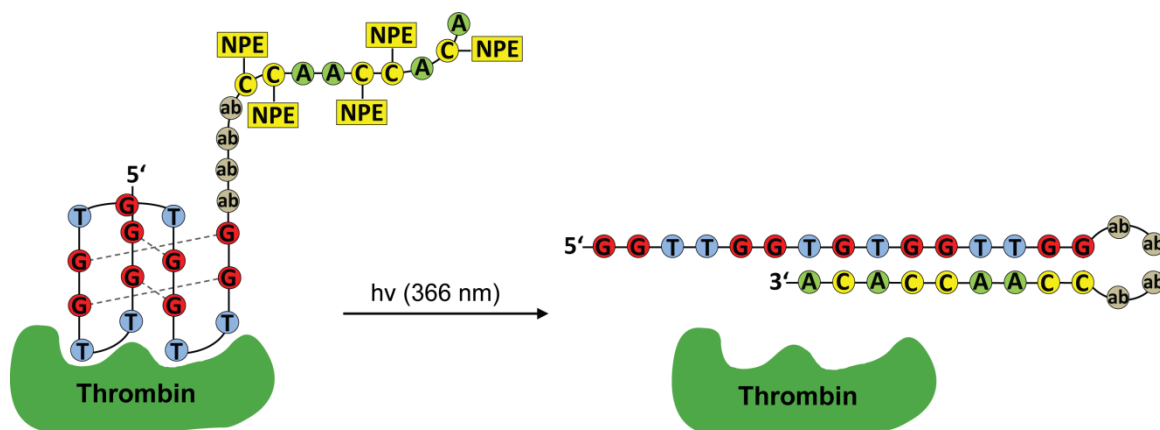


**Abbildung 74:** Prinzip der Wechselwirkung von HD1 mit Thrombin. a) Darstellung der doppelsträngigen antiparallelen G-Quadruplexstruktur von HD1. Die NPP-Schutzgruppe, angebracht am T4, führte zu einer vollständigen Inhibition der Aptameraktivität. b) Cartoon-Darstellung von HD1, gebunden an Thrombin (PDB code: 1HAO). Thrombin ist in Oberflächendarstellung gezeigt. Negativ geladene Bereiche sind rot dargestellt, positiv geladene blau. Thrombin bindet nach diesem Modell über die beiden TT-Schleifen. Dies ist in Übereinstimmung mit dem experimentellen Befund, dass nur ein Aptamer mit der NPP-Gruppe an T4, nicht jedoch eines mit der NPP-Gruppe an T9, inaktiv ist. (Modifiziert nach Buff et al.)<sup>[208]</sup>

Überdies gelang es nach Bestrahlung die Aktivität des Thrombins wiederherzustellen, jedoch war eine 100 %ige Aktivierung nicht möglich. Das Aptamer blieb nach der Bestrahlung in seiner Aktivität hinter dem unmodifizierten Aptamer zurück. Erst bei erhöhten pH-Werten konnte das

Aptamer vollständig reaktiviert werden, was dementsprechend auf eine unvollständige Photolyse der NPP-Gruppe bei neutralen pH-Werten zurückgeführt wurde.<sup>[178]</sup>

In einer weiteren Studie wurde ein HD1-Aptamer mit einer integrierten durch Licht einschaltbaren Antisense-Sequenz synthetisiert, die über eine vier Nukleotide lange Schleife an das Aptamer angehängt wurde. Dadurch wurde es möglich, die Thrombinaktivität durch Licht wieder einschaltbar zu machen, sodass nun ein Antikoagulans mit einem integrierten lichtschtbaren Antidot zur Verfügung stand. Dieses Aptamerkonstrukt, welches die Antisense-Erweiterung am 5'-Ende trug, hatte jedoch im Vergleich zum unmodifizierten HD1 eine verminderte Aktivität.<sup>[209]</sup> Später konnte von Dr. Maximilian Buff gezeigt werden, dass sich bereits das Anbringen der vier Schleifennukleotide negativ auf die Aktivität auswirkt und dass das Anbringen der Antisense-Erweiterung am 3'-Ende die Aktivität nicht negativ beeinflusst. Ein Aptamer mit einer Schleife aus vier abasischen Nukleotiden und einer neun Nukleotide langen Antisense-Sequenz mit fünf photolablen Schutzgruppen (s. Abbildung 75) konnte ein nahezu binäres An-/Aus-Verhalten erzielen und war nach Bestrahlung sogar noch etwas aktiver als das in klinischen Studien befindliche gegen Thrombin gerichtete Aptamer NU172.<sup>[208]</sup>

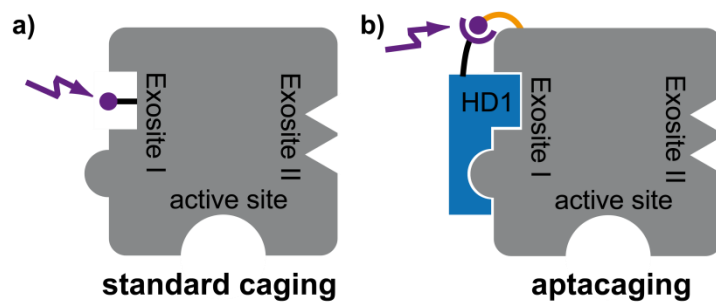


**Abbildung 75:** Funktionsprinzip des ausschaltbaren HD1-Aptamers mit 3'-Antisense-Region zur lichtinduzierten Aktivierung von Thrombin. ab = „abasic site“.

Ein solches Aptamer mit eingebauter Antidotaktivität könnte prinzipiell von therapeutischem Interesse sein, da hierdurch ein maskiertes Thrombin in den Blutkreislauf einbringbar wäre, welches dann nur an den gewünschten Stellen durch Bestrahlung aktiviert werden könnte.

Die Bindung zwischen Aptamer und Thrombin beruht allerdings lediglich auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Es könnte daher zu einer vorzeitigen Aktivierung des Thrombins kommen, wenn die lokale Konzentration des Komplexes nach einer systemischen Applikation unter den  $K_D$ -Wert fällt, was zu unerwünschten Thrombosen führen würde.<sup>[190]</sup> Um dies zu verhindern, sollte in dieser Studie ein Komplex zwischen Thrombin und HD1-Aptamer entwickelt werden, bei dem das Aptamer über einen photospaltbaren Linker kovalent an ein Lysin des Thrombins

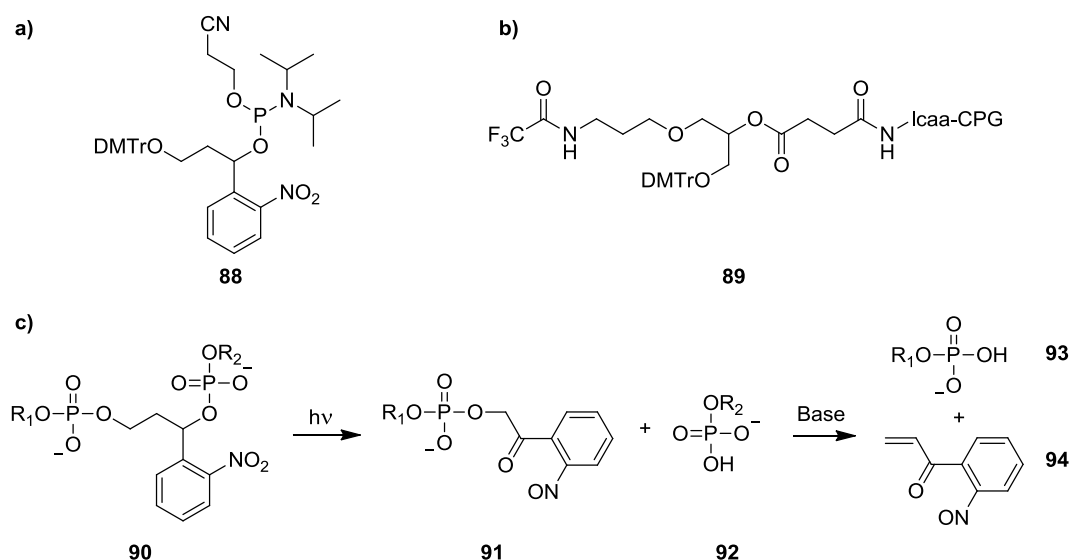
geknüpft werden sollte. Dieser kovalent verknüpfte Komplex sollte in der Lage sein, ein frühzeitiges Wegdiffundieren des Aptamers vom Thrombin und somit eine ungewünschte Aktivierung desselben zu verhindern. Der Komplex sollte so gestaltet sein, dass die Verknüpfung von Thrombin und HD1 aptamertemplatisiert verläuft, dass also die kovalente Verknüpfung erst nach der nichtkovalenten Bindung an die Exosite I stattfindet. Dies würde verhindern, dass es zu einer unspezifischen Reaktion mit einem Lysinrest kommt, ohne dass die Exosite I von dem Aptamer blockiert wurde. Dieses Projekt wurde von Dr. Timo Mack übernommen, der in seiner Dissertation bereits erste Untersuchungen zur Synthese eines solchen kovalent verknüpften Komplexes durchführte. Eine Verknüpfung über einen sogenannten „traceless“-Linker, bei dem nach Photospaltung keine Reste am Thrombin verbleiben, gelang dabei jedoch nicht, sodass ein Linker verwendet werden musste, der sich nicht ohne Rückstände am Protein abspalten lässt. Mit einer an das 5'-Ende angebrachten Antisense-Sequenz und einem bifunktionalen Linker gelang es grundsätzlich, ein kovalentes Thrombin-Aptamer-Reagenz herzustellen, jedoch ließ sich nach Bestrahlung keine vollständige Reaktivierung des Thrombins erhalten, was auf die Tatsache zurückgeführt wurde, dass sich keine einheitlichen 1:1-Komplexe herstellen ließen.<sup>[131]</sup> Aufbauend auf diesen Studien und der Erkenntnis, dass eine Modifikation des Aptamers am 5'-Ende zu einer erniedrigten Aktivität führt, eine Modifikation am 3'-Ende jedoch nicht<sup>[135]</sup>, war es Ziel dieses Projekts, ein optimiertes, modifiziertes Aptamer zur kovalenten Anknüpfung an Thrombin zu synthetisieren. Von Falk Rohrbach aus der Gruppe von Prof. Mayer an der Universität Bonn wurde dieses modifizierte Aptamer dann verwendet, um es über einen geeigneten bifunktionalen Linker mit Thrombin zu verknüpfen. Es sollte anschließend mittels Western Blot gezeigt werden, dass 1:1-Komplexe erhalten werden, die sich photolysieren lassen. Auf funktioneller Ebene sollte ein Hirudin-Assay und ein Blutgerinnungsassay von Falk Rohrbach konzipiert und durchgeführt werden. In einem finalen Experiment sollte schließlich an einem Modellsystem in Glaskapillaren die lichtinduzierte Blutgerinnung unter dem Mikroskop visualisiert werden. Letzteres Experiment wurde neben der Synthese des modifizierten HD1 im Rahmen der eigenen experimentellen Arbeiten in Zusammenarbeit mit Falk Rohrbach und Manuela Fichte durchgeführt, die restlichen experimentellen Arbeiten wurden von Falk Rohrbach und zum Teil von Franziska Pfeiffer an der Universität Bonn vorgenommen. Dieser Thrombin-Aptamer-Komplex sollte als Beispiel für ein neues Caging-Konzept („Aptacaging“) für Proteine dienen, bei dem mithilfe von Aptameren das effektive Caging von großen flächigen Proteindomänen gelingt, ohne dass zwingenderweise strukturelle Informationen über das Protein vorliegen müssen, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben (s. Abbildung 76b).



**Abbildung 76:** Vergleich zwischen a) normalem Caging (standard caging) und b) Aptacaging zur Maskierung von Proteindomänen. Aptacages sind, bildlich gesprochen, wie Gipsabdrücke der Proteindomäne zu verstehen, da aufgrund des Herstellungsverfahrens per SELEX keine strukturellen Informationen über das Protein vorhanden sein müssen, um ein effektives Caging zu erhalten. Zusätzlich dient das Aptamer als Templat für die Reaktion des photolabilen Linkers mit der Proteinoberfläche.

### 3.4.5 Synthese des fHD1

Um HD1 kovalent mit Thrombin verbinden zu können, wurde ein bifunktionaler Crosslinker verwendet, der einerseits mit freien Lysinen an der Thrombinoberfläche reagieren sollte und andererseits in einer spezifischen Art und Weise mit einem entsprechend modifizierten Aptamer. Als Crosslinker wurde ein wasserlösliches Derivat eines bifunktionellen NHS-Esters verwendet. NHS-Ester reagieren recht spezifisch mit Aminogruppen. Daher wurde am Aptamer ebenfalls eine Aminofunktion benötigt. Um die Aktivität nicht zu stören, sollte diese an das 3'-Ende angebracht werden. Darüber hinaus wurde ein geeigneter photospaltbarer Linker benötigt, der dazu führen sollte, dass die kovalente Verknüpfung zwischen Aptamer und Protein nach Bestrahlung gespalten wird. Als zusätzliche Herausforderung galt es, nach Photospaltung ein möglichst wenig modifiziertes Protein zurückzuerhalten. Im vorherigen Abschnitt wurde jedoch bereits angedeutet, dass Versuche einer „traceless“-Verknüpfung nicht erfolgreich waren. Aufgrund der Tatsache, dass für die durchzuführenden Studien relativ große Mengen des Aptamers benötigt wurden, wurde ein Design verwendet, das ausschließlich auf kommerziell erhältliche Phosphoramidite und Trägermaterialien zurückgreift. In Abbildung 77a ist das Design des Aptermoleküls fHD1 dargestellt. Der schwarz dargestellte photospaltbare Linker beruht auf der *o*-Nitrobenzyl-Photochemie und ist kommerziell als Phosphoramidit erhältlich. Er wurde zuerst von Ordoukhanian et al. verwendet.<sup>[210]</sup> Das Photolyseprinzip ist in Abbildung 77c beschrieben.

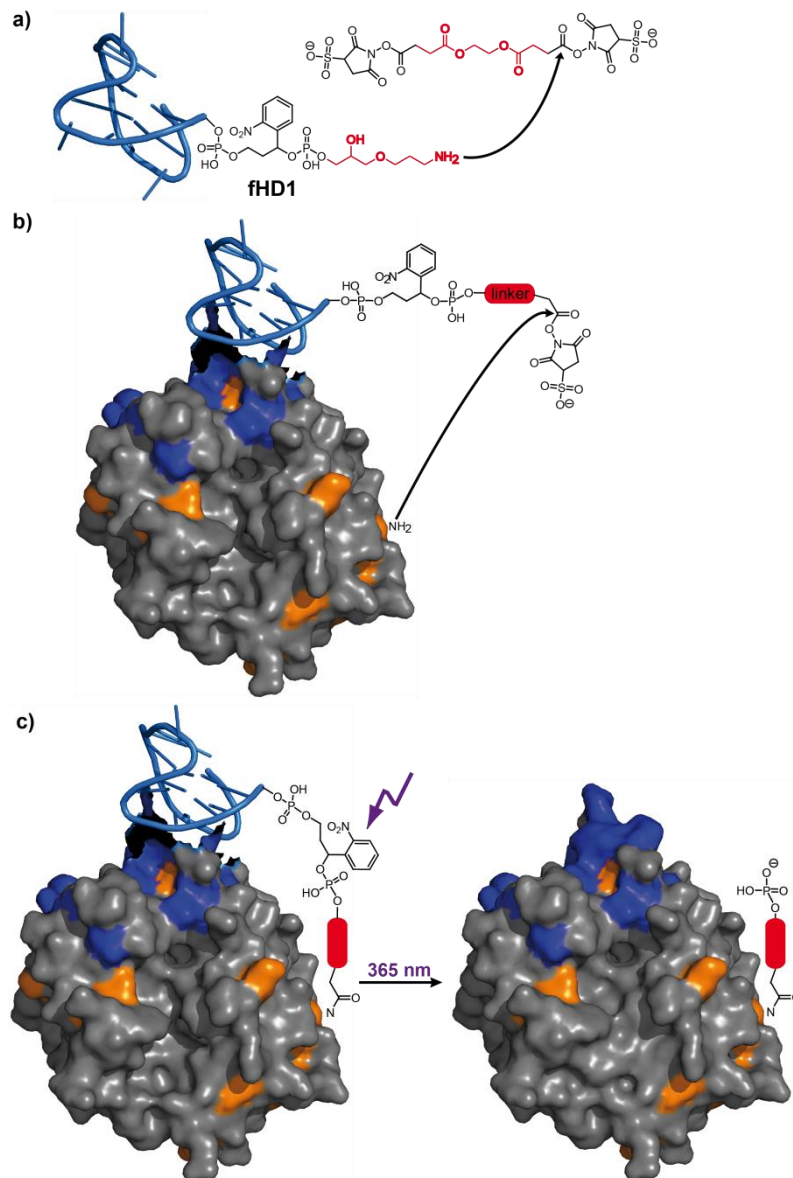


**Abbildung 77:** a) Struktur des Phosphoramidits zur Einführung eines photospaltbaren Linkers in Oligonukleotide; b) Struktur des an ein CPG-Festphasenmaterial gebundenen C6 Amino-Linkers; c) Photolyseprinzip des photospaltbaren Linkers, eingebaut in ein Oligonukleotid. R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> stehen für beliebige Oligonukleotid-Reste. Um quantitativ zwei Oligonukleotidphosphate ohne Reste des Linkers zu erhalten, muss nach der Photospaltung mit einer Base eine  $\beta$ -Eliminierung durchgeführt werden.

Das Prinzip der Aptacaging-Reaktion zur Generierung eines kovalenten Thrombin-Aptamer-Komplexes ist in Abbildung 78a und 78b gezeigt. Rot dargestellt ist in Abbildung 78a der verwendete C6 Amino-Linker, der als modifiziertes Festphasenmaterial mit einer basenlabilen TFA-geschützten primären Aminogruppe ebenfalls kommerziell verfügbar ist (s. **89** in Abbildung 77b). Die basenlabile TFA-Schutzgruppe wird im Zuge der Ammoniak-Entschützung zusammen mit den Nucleobasen-Schutzgruppen abgespalten.

Nach der Synthese und Aufreinigung des Aptamers wurde dieses mit sulfo-Ethylenglycol-bissuccinimidylsuccinat (sulfo-EGS) zur Reaktion gebracht. Durch Anbringen von zwei Sulfonatgruppen wird dieser bifunktionale NHS-Ester wasserlöslich. Dies ist wichtig, da das Aptamer nur in Wasser nicht aber in organischen Lösungsmitteln in den verwendeten Konzentrationen gut löslich ist. Bei der Reaktion von NHS-Estern mit Aminen ist besonders die korrekte Einstellung des pH-Werts wichtig. Bei zu niedrigen pH-Werten liegen Amine vollständig protoniert vor und sind zu unreaktiv, bei zu hohen pH-Werten überwiegt in wässrigen Medien die Hydrolyse der NHS-Ester, die dann schneller abläuft als die gewünschte Reaktion. Im hier beschriebenen Fall wurde mit einem 0,03 M Hydrogencarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 8,2 gearbeitet, der 30 % DMSO enthält. Die Reaktionszeiten wurden kurz gehalten, damit es einerseits zur gewünschten Reaktion des Aptamers mit einem der NHS-Ester kommt und andererseits der verbleibende NHS-Ester nicht hydrolysiert wird. Sofort nach der Reaktion wurde die Reaktionsmischung über MikroSpin-Säulchen aufgearbeitet und das Reaktionsgemisch mit Thrombin versetzt, wobei es zu einer nichtkovalenten Wechselwirkung zwischen Thrombin und Aptamer kommt, gefolgt von der Reaktion des verbleibenden NHS-Esters am fHD1 mit einem

nahegelegenen Lysin-Rest des Thrombins (s. Abbildung 78b). Bestrahlt man nun den fertigen kovalenten Thrombin-Aptamer-Komplex mit Licht, so tritt eine Bindungsspaltung wie in Abbildung 77c gezeigt auf. Am Thrombin verbleibt der C6 Amino-Linker mit einer Phosphatgruppe (s. Abbildung 78c)



**Abbildung 78:** Darstellung und Spaltung des kovalenten Thrombin-Aptamer-Komplexes. a) Reaktion von fHD1 mit dem bivalenten NHS-Ester; b) Reaktion des aktivierten fHD1 mit Thrombin; c) Durch Bestrahlung wird der Linker gespalten und das aktive Thrombin freigesetzt. (PDB:4DII); Die Exosite I ist blau markiert, Lysin-Reste orange. Die Synthese des Aptamers wurde im Rahmen der eigenen experimentellen Arbeiten durchgeführt, die Synthese des Thrombin-Aptamer-Komplexes wurde von Falk Rohrbach vorgenommen.

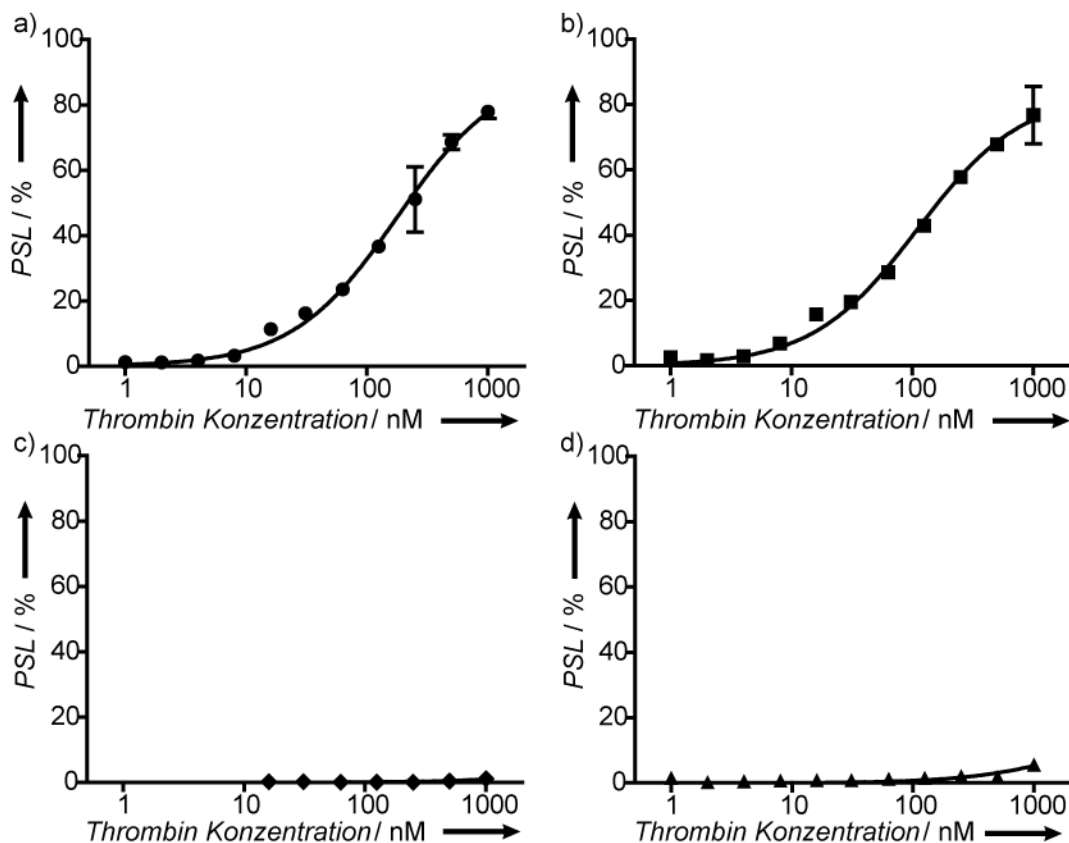
An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, dass auch noch andere Aptamere synthetisiert wurden, die entsprechend der nichtkovalenten ausschaltbaren HD1-Aptamere, wie oben beschrieben, über eine gecagete Antisense-Region verfügen. Es zeigte sich jedoch im Laufe der

Studien, dass die Antisense-Region nicht benötigt wird. Dies liegt daran, dass in den funktionellen Assays (s. Abschnitt 3.4.6 und 3.4.7) mit Konzentrationen an Thrombin-Aptamer-Komplex gearbeitet wurde, die deutlich unter dem  $K_D$ -Wert des nichtkovalenten Komplexes liegen. Dies führt dazu, dass das Aptamer nach Spaltung der kovalenten Verknüpfung aufgrund der niedrigen Konzentration spontan wegdiffundiert und es nicht zur Bildung eines nichtkovalenten Komplexes kommt. Eine Antisense-Erweiterung zur Inaktivierung des Aptamers nach Bestrahlung ist somit nicht notwendig.

### 3.4.6 Western Blot und Hirudin Assay

In den folgenden, ausschließlich von Falk Rohrbach konzipierten und durchgeführten Experimenten sollte nun per Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Western Blot zunächst gezeigt werden, dass sich ein definierter 1:1 Komplex bildet und dass sich aus diesem durch Bestrahlung wieder Thrombin freisetzen lässt. In denaturierenden, reduzierenden Gelen wird die Disulfidbrücke zwischen schwerer und leichter Kette des Thrombins gespalten, sodass beim freien Thrombin zwei Banden bei 6 kDa und bei 31,5 kDa entstehen. Die Visualisierung erfolgte über einen Antikörper, der gegen die schwere Kette gerichtet ist. Der kovalente Thrombin-Aptamer-Komplex hat ein Gewicht von 37 kDa und ist im Western Blot oberhalb der Bande des freien Thrombins zu sehen. In Abbildung 80a ist ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Die Bahnen 1-4 zeigen Thrombin, welches mit fHD1 versetzt wurde in An- und Abwesenheit von EGS-Reagenz und UV-Licht. Die Banden 5-8 resultieren aus der Reaktion von Thrombin mit der Mutante fHD1-T4A, die eine deutlich niedrigere Affinität zu Thrombin besitzt. Wie der Name schon andeutet, wurde hier das für die nichtkovalente Wechselwirkung zum Thrombin essentielle T4 im Aptamer gegen Desoxyadenosin ausgetauscht. In Filterbindungsstudien zeigte sich, dass der  $K_D$ -Wert für die nichtkovalente Wechselwirkung zwischen fHD1 und Thrombin bei etwa 100 nM, also im Bereich des unmodifizierten HD1, liegt, wohingegen sowohl fHD1-T4A als auch HD1-T4A im Messbereich bis 1000 nM Thrombin keinerlei Affinität zu diesem haben (s. Abbildung 79). Die Banden 9-12 in Abbildung 80a entsprechen Kontrollreaktionen, die ohne Zugabe jeglichen Aptamers durchgeführt wurden.

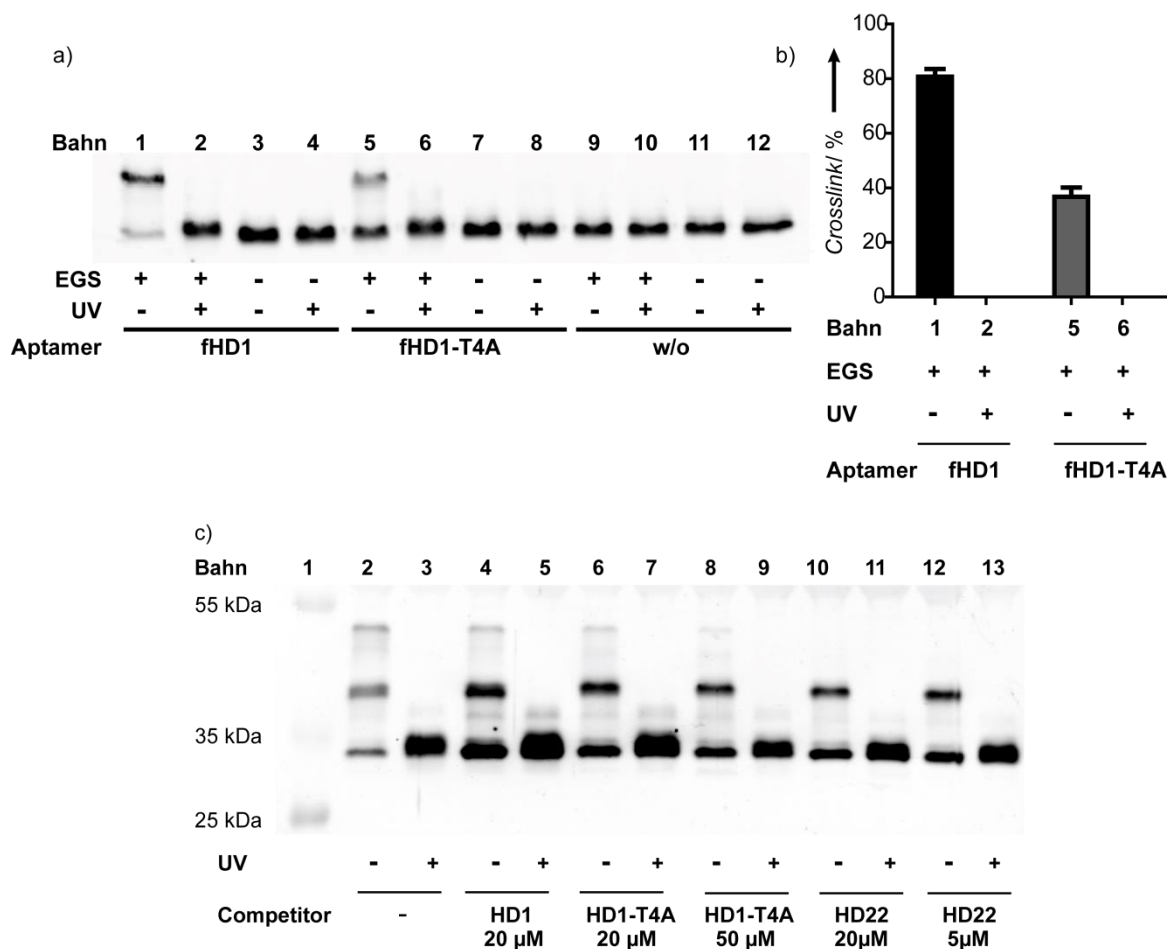
Zusammengefasst ergibt sich aus den Western Blots folgendes Bild: Sowohl die Reaktion von fHD1 als auch die Reaktion von fHD1-T4A mit Thrombin in Anwesenheit von EGS führen zur Bildung eines kovalenten Komplexes (Bahnen 1 und 5), der sich durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 365$  nm) wieder spalten lässt (Bahnen 2 und 6). An den verbleibenden Banden für Thrombin in Bahn 1 und 5 ist zu sehen, dass die Reaktion in beiden Fällen nicht vollständig ist. Abbildung 80b zeigt, dass im Fall von fHD1 eine Crosslink-Ausbeute von ca. 80 % erreicht werden konnte, wohingegen bei der Mutante fHD1-T4A nur eine ca. 40 %ige Ausbeute erhalten wurde.



**Abbildung 79:** Filterbindungsstudien von verschiedenen Aptameren mit Thrombin. Die PSL-Werte („photostimulated luminescence“) bilden den Anteil von radioaktiv markiertem Aptamer ab, welches an Thrombin bei verschiedenen Konzentrationen nichtkovalent bindet. a) HD1; b) fHD1; c) HD1-T4A; d) fHD1-T4A. Gemessen und ausgewertet von Falk Rohrbach

In allen Kontrollen ohne Aptamer bzw. ohne EGS konnte keine Bande bei 37 kDa erhalten werden, es kam hier nicht zur kovalenten Komplexbildung (Bahnen 3, 4, 7-12). Es wurde kürzlich gezeigt, dass HD1 auch mit der Exosite II interagiert, jedoch deutlich schwächer als mit Exosite I.<sup>[211]</sup> In den Western Blots trat aufgrund des hohen Überschusses an fHD1, der verwendet werden musste, um eine effiziente Komplexbildung zu erhalten, daher immer eine dritte Bande auf (s. Abbildung 80c, Bahnen 2, 4, 6 und 8). Diese ist auf die Bildung des ternären Komplexes aus Thrombin und zwei an Exosite I und II gebundenen fHD1-Molekülen zurückzuführen. Bei Bestrahlung konnte auch aus den ternären Komplexen das freie Thrombin erhalten werden (Bahnen 3, 5, 7 und 9). Das Auftreten des ternären Komplexes konnte jedoch erfolgreich verhindert werden, wenn das mit hoher Affinität an Exosite II bindende Aptamer HD 22 zur Crosslink-Reaktion zugegeben wurde (Bahnen 10 & 12).

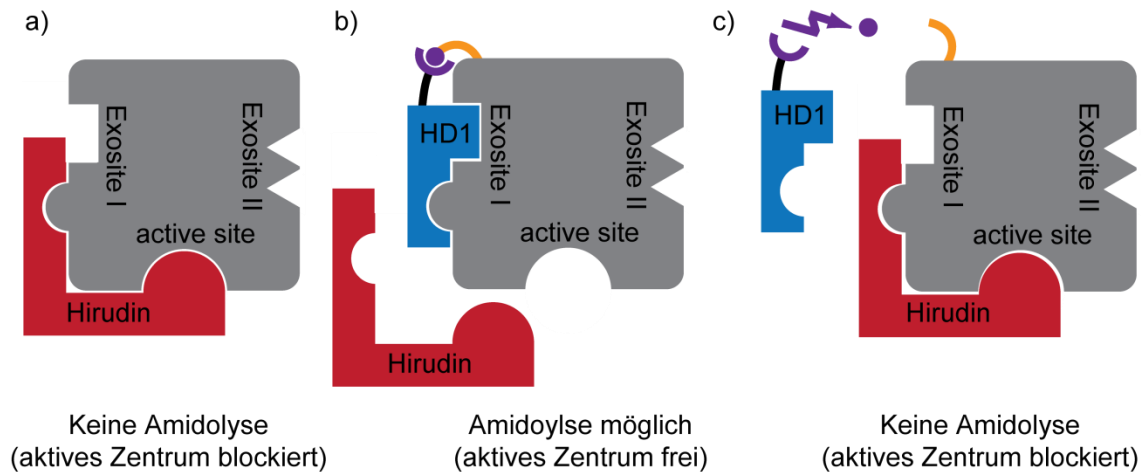




**Abbildung 80:** Western Blot Analyse des Thrombin-Aptacagings. a) Ergebnisse der Durchführung der Aptacaging-Crosslink-Reaktion in Anwesenheit von fHD1 (Bahn 1-4), fHD1-T4A (Bahn 5-8) und ohne Aptamer (Bahn 9-12). Mit + und – indiziert ist, ob jeweils EGS zur Reaktionsmischung zugegeben wurde und ob nach der Reaktion bestrahlt wurde ( $\lambda = 365$  nm) oder nicht (UV); b) Effizienz der Aptacaging-Crosslink-Reaktion, bewertet anhand der Bandenintensität der oberen Banden im Vergleich zur Thrombinbande in Bahn 1 und 5 aus a). Es wurden zwei unabhängige Western Blots zur Quantifizierung herangezogen; c) Western Blot Auswertung der Aptacaging-Crosslink-Reaktion in Anwesenheit verschiedener Kompetitoren. Bahn 1 enthält einen Größenmarker. Die oberste Bande in Bahn 2, 4, 6 und 8 entspricht dem ternären Komplex, der bei Zugabe von HD22 als Kompetitor nicht auftritt (Bahn 10 & 12). Durch Bestrahlung kann sowohl der 1:1-Komplex als auch der ternäre Komplex gespalten werden (Bahn 3, 5, 7, 9, 11 und 13). Durchgeführt und ausgewertet von Falk Rohrbach.

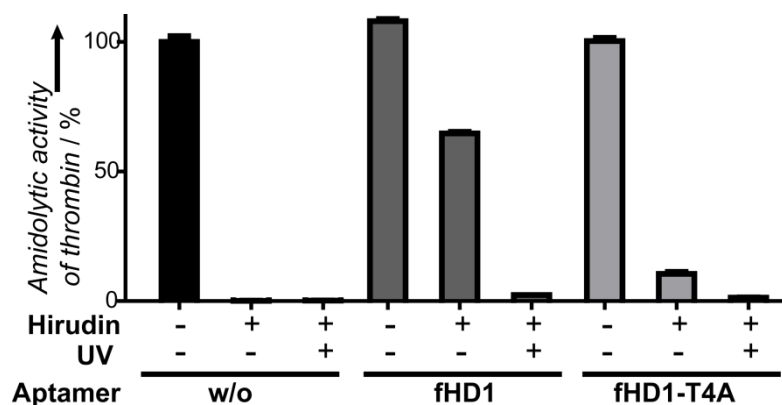
Wie aus dem Western Blot in Abbildung 80a hervorgeht, führte die Aptacaging-Reaktion nicht zu einer vollständigen Reaktion des Thrombins, sodass immer noch eine geringe Menge unmodifizierten Thrombins verblieb. Ein Aufreinigungsversuch mit HD1-modifizierten magnetischen Beads, die das verbliebene unmodifizierte Thrombin aus der Lösung entfernen sollten, führte jedoch nicht zum Erfolg. Dies legt nahe, dass es sich beim verbliebenen Thrombin um inaktiviertes oder denaturiertes Thrombin handeln muss, was sich auch in den späteren Koagulationsstudien bestätigte.

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob durch die Bildung des kovalenten fHD1-Thrombin-Komplexes die Exosite I tatsächlich erfolgreich maskiert wurde. Hierzu wurde ein amidolytischer Assay mit einem Peptid, welches nach Spaltung durch Thrombin eine erhöhte Fluoreszenz aufweist, und dem Thrombin-Inhibitor Hirudin durchgeführt. Hirudin ist ein Polypeptid aus 65 Aminosäuren, das im Speichel von Blutegeln vorkommt und mit einer außerordentlich hohen Affinität ( $K_D \approx 1 \text{ pM}$ ), sowohl an die Exosite I als auch an das aktive Zentrum, bindet. Es stellt somit ein hochpotentes Antikoagulans dar.<sup>[212]</sup>



**Abbildung 81:** Funktionsprinzip des Hirudin-Assays. Die amidolytische Aktivität des Thrombins ist in Anwesenheit von Hirudin blockiert (a), im kovalenten Komplex kann Hirudin nicht binden, sodass das aktive Zentrum frei bleibt (b), nach der Photolyse kann Hirudin wieder binden und inhibiert so die amidolytische Aktivität im aktiven Zentrum (c).

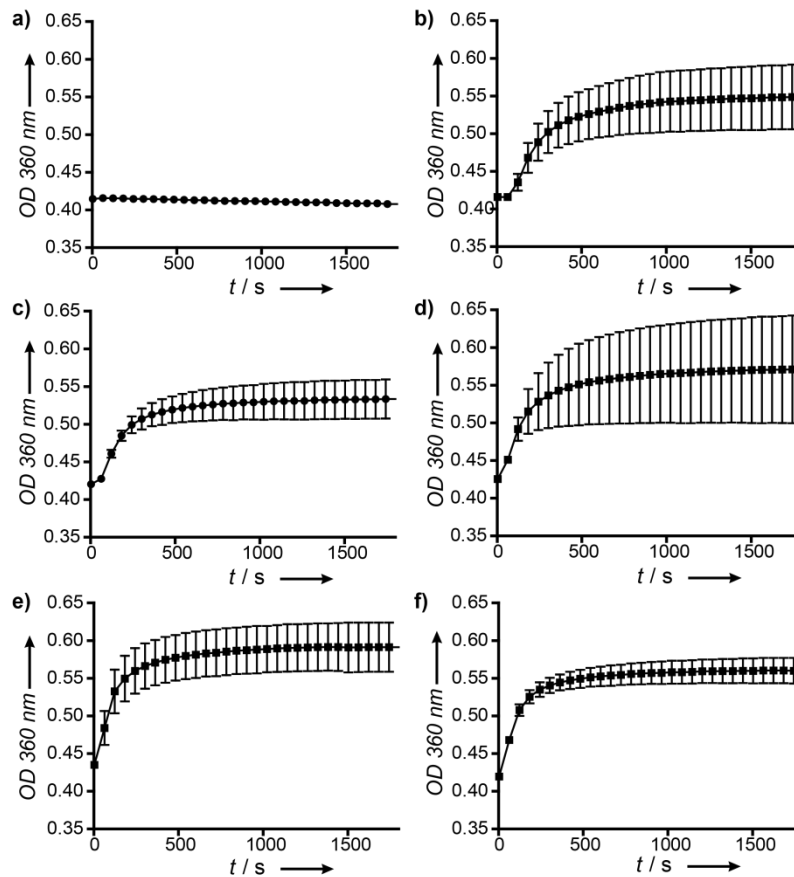
In Anwesenheit von Hirudin (s. Abbildung 81a) ist sowohl die Exosite I als auch das aktive Zentrum blockiert, Thrombin hat keine amidolytische Aktivität. Im kovalenten Thrombin-Aptamer-Komplex ist die Exosite I blockiert, sodass Hirudin nicht binden kann und eine Amidolyse am freien aktiven Zentrum möglich ist (s. Abbildung 81b). Nach der Photolyse des kovalenten Komplexes (s. Abbildung 81c) wird das Aptamer freigesetzt und Hirudin kann wieder binden, sodass die Amidolyse-Aktivität blockiert ist. In Abbildung 82 ist eine Übersicht der Ergebnisse des Hirudin-Assays zu sehen. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, führte der kovalente Komplex zwischen fHD1 und Thrombin in Anwesenheit von Hirudin zu einer deutlich erhöhten amidolytischen Aktivität des Thrombins im Vergleich zur Kontrolle mit unmodifiziertem Thrombin und Hirudin. Wurde die Mutante fHD1-T4A für die Aptacaging-Reaktion verwendet, war die Erhöhung der amidolytischen Aktivität des Komplexes deutlich geringer. Nach Photolyse beider Komplexe kann Hirudin wieder an Thrombin binden und so die amidolytische Aktivität vollständig blockieren. Dies impliziert, dass im kovalenten Komplex zwischen fHD1 und Thrombin tatsächlich die Exosite I blockiert ist und dies bei der Mutanten fHD1-T4A nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil der Fall ist.



**Abbildung 82:** Amidolytische Aktivität des Thrombins nach Aptacaging-Crosslink-Reaktion mit fHD1, fHD1-T4A und ohne Aptamer. Die Anwesenheit von Hirudin bzw. eine Bestrahlung mit UV-Licht sind mit + und – indiziert. Es wurde die Erhöhung der Fluoreszenz durch Spaltung des fluoreszenten Peptids über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen. Die Werte sind auf die Bedingung kein Aptamer, kein Hirudin und ohne Bestrahlung (1. Balken) normiert. Durchgeführt und ausgewertet von Falk Rohrbach

### 3.4.7 Gerinnungsstudien und Live Clotting Experimente

Nachdem erfolgreich gezeigt wurde, dass sich ein kovalenter 1:1-Komplex von Thrombin und fHD1 herstellen lässt, in welchem das Aptamer effizient die Exosite I von Thrombin blockiert und dass sich aus diesem Komplex Thrombin durch Bestrahlung freisetzen lässt, sollte nun noch demonstriert werden, dass dieses freigesetzte Thrombin noch koagulatorische Aktivität besitzt. Hierzu wurde ein Blutkoagulationsassay durchgeführt, basierend auf der Tatsache, dass sich bei Bildung eines Thrombus in Humanplasma dessen UV-Absorption erhöht. Dies bedeutet, dass sich die beginnende Blutgerinnung nach Freisetzung von Thrombin empfindlich mittels UV-Spektrometrie verfolgen lässt. Der fHD1-Thrombin-Komplex wurde entweder drei Minuten mithilfe einer UV-LED bestrahlt ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) oder ohne Bestrahlung zu menschlichem Blutplasma gegeben und die Absorption bei 360 nm wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten verfolgt. Das schwache Anregungslicht zur Beobachtung der Absorption führte nicht zur Spaltung des photospaltbaren Linkers. In Abbildung 83 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments gezeigt. Im kovalenten Komplex mit fHD1 ist die Exosite I maskiert, sodass Fibrinogen nicht am Thrombin binden kann. Es kam über den gesamten Messzeitraum nicht zur Koagulation (s. Abbildung 83a). Wurde der Komplex vor Zugabe zum Plasma bestrahlt, so wird der Linker gespalten und das fHD1 kann von der Exosite I wegdiffundieren, es kommt zur Blutgerinnung (s. Abbildung 83b). Im Gegensatz dazu ist bei der nichtbindenden Mutante fHD1-T4A kein Unterschied zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Probe zu erkennen (s. Abbildung 83c und d). Die T4A-Mutante vermag es nicht, die Bindung von Fibrinogen an Exosite I zu unterbinden. Gleiches gilt für die Kontrollen in Abbildung 83e und f, bei denen weder Aptamer noch Crosslinker zugesetzt wurden.

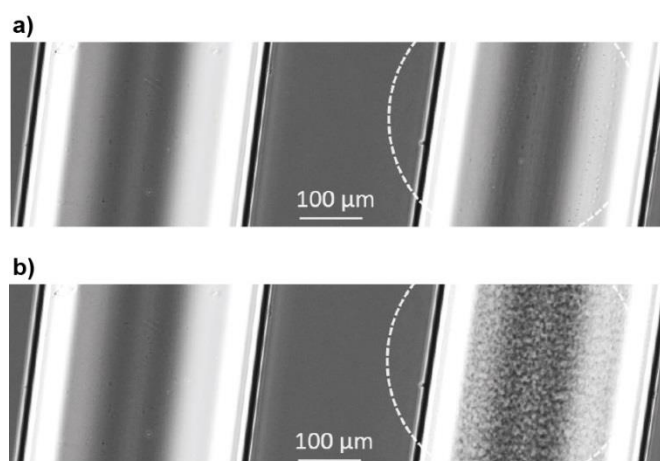


**Abbildung 83:** Plasma-Koagulations-Assay verschiedener Aptacaging-Reaktionen von Thrombin. Die Absorption des Plasmas bei 360 nm wurde für 30 Minuten gemessen. Die Bildung eines Clots wird durch einen Anstieg in der Absorption angezeigt. a) fHD1-Thrombin-Komplex ohne Bestrahlung; b) fHD1-Thrombin-Komplex mit Bestrahlung; c) fHD1-T4A-Thrombin Komplex ohne Bestrahlung; d) fHD1-T4A-Thrombin-Komplex mit Bestrahlung; e) Thrombin ohne Aptamer und ohne EGS-Crosslinker ohne Bestrahlung; f) Thrombin ohne Aptamer und ohne EGS-Crosslinker mit Bestrahlung. Die Bestrahlung des Thrombin-Aptamer-Komplexes wurde immer vor dessen Zugabe zum Plasma durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die intraexperimentelle Varianz. Durchgeführt von Falk Rohrbach.

Um die prinzipielle Anwendbarkeit des kovalenten Thrombin-Aptamer-Komplex in einem therapeutischen Sinn zum lokalen Induzieren von Blutgerinnung zu demonstrieren, musste noch gezeigt werden, dass sich der Komplex auch *in situ* im Plasma entschützen lässt und so ortsaufgelöst zur Entstehung eines Blutgerinnsels führen kann. Als Modell für die Blutgerinnung in Kapillargefäßen wurden rechteckige Glaskapillaren verwendet, die dann unter dem Mikroskop belichtet wurden. Im Durchlichtbild sollte dann die einsetzende Gerinnung sichtbar gemacht werden. Dieses Experiment wurde so durchgeführt, dass mithilfe einer Blende und einer 120 W Hg-Lampe immer nur eine von zwei Kapillaren belichtet wurde, die beide mit einer Mischung aus dem fHD1-Thrombin-Komplex und humanem Plasma gefüllt waren. Es wurde zwischen einer und sechs Minuten mit dieser Lampe belichtet und danach wurden die Lösungen für weitere 25 Minuten unter dem Mikroskop beobachtet. Wie aus Abbildung 83 bereits hervorgeht, absorbiert Blutplasma im Bereich von 360 nm, der Wellenlänge, die zur Entschützung des photospaltbaren Linkers verwendet wurde. Es gelang aus diesem Grund nicht reproduzierbar, Gerinnung nur in

der bestrahlten Kapillare zu erzeugen. Auch die Verwendung eines Objektivs mit verbesserter Durchlässigkeit für UV-Licht brachte keine signifikante Verbesserung. In einigen Fällen gelang es, Gerinnung im beobachteten Zeitraum nur in der belichteten Kapillare zu erzeugen, in anderen Fällen wurde überhaupt keine Gerinnung beobachtet. Es wurde vermutet, dass nicht genügend Thrombin freigesetzt werden kann, daher wurde die Konzentration des fHD1-Thrombin-Komplexes erhöht. Bei erhöhten Konzentrationen kam es jedoch zu einer Gerinnung in beiden Kapillaren auch ohne Belichtung. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass, wie oben bereits erwähnt, aufgrund der unvollständigen Aptacaging-Reaktion immer noch ein geringer Anteil an freiem Thrombin in der Lösung vorhanden ist, der dann möglicherweise ab einer gewissen Konzentration doch zur Gerinnung führt, auch wenn dies zuvor nicht im Koagulationsassay beobachtet wurde. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass es zum Teil zu einer Kontaktaktivierung des im Plasma verbliebenen Prothrombins an der Glasoberfläche kommt. Weiterhin ist denkbar, dass durch die Aktivierung der Faktoren V oder VIII durch das verbliebene freie Thrombin Prothrombin aus dem Plasma aktiviert wird.

Aufgrund dieser Probleme wurde das System etwas vereinfacht und die Blutgerinnung in einer Lösung aus Fibrinogen und dem fHD1-Thrombin-Komplex verfolgt. Es wurde hierbei mit äußerst geringen Konzentrationen des Thrombin-Aptamer-Komplexes (0,1 µg/mL) gearbeitet, bei der in den Plasmaexperimenten keinerlei Gerinnung induziert werden konnte. In Fibrinogenlösungen gelang es hierdurch in allen Experimenten eine vorzeitige Aktivierung der Gerinnung ohne Bestrahlung der Probe zu verhindern. Wurde hingegen eine Minute bestrahlt, konnte reproduzierbar nur in der belichteten Kapillare Gerinnung erzeugt werden (s. Abbildung 84). Somit wurde der Beweis erbracht, dass bei geeigneten Bedingungen eine orts aufgelöste Aktivierung von Thrombin durch Bestrahlung des fHD1-Thrombin-Komplexes möglich ist.



**Abbildung 84:** Mikroskopbilder der Bildung eines Fibrin-Clots in Glaskapillaren a) vor Bestrahlung, b) nach Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ). Es wurde nur die rechte Kapillare in der Region, die durch den gestrichelten weißen Kreis dargestellt ist, belichtet. Beide Kapillaren wurden mit Fibrinogen (8 mg/mL) und fHD1-Thrombin-Komplex (0,1 µg/mL) befüllt. Die Bestrahlungszeit war eine Minute. Das Bild in b) wurde 28 Minuten nach der einminütigen Bestrahlung aufgenommen.

### 3.4.8 Zusammenfassung & Ausblick

In diesem Projekt ist es gelungen, eine neuartige Methode des Cagings von Proteinen zu etablieren. Die Methode beruht auf der selektiven Erkennung von Proteindomänen durch Aptamere, die mit einem geeigneten photospaltbaren Linker kovalent am Protein verankert werden. Es gelang so, effektiv Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu inhibieren und mit Licht wieder zu aktivieren. Dies wurde am Beispiel des Thrombins und seines Substrats Fibrinogen mit dem an Exosite I bindenden Aptamer HD1 gezeigt. Im Prinzip sollte es sich hierbei um ein universell anwendbares Verfahren für alle Proteine handeln, gegen die sich entsprechende Aptamere selektieren lassen. Für die Proteinfunktion ist es jedoch wichtig zu beachten, dass zumindest bei dem hier verwendeten Design immer ein Rest am Protein zurückbleibt. Es muss im Einzelfall untersucht werden, ob diese verbleibenden Reste nicht die Proteinfunktion beeinträchtigen. Im untersuchten System war dies nicht der Fall, weil der Crosslink mit einem weit vom aktiven Zentrum entfernten Lysin erfolgte. Nach erfolgreicher Synthese des fHD1-Thrombin-Komplexes konnte anhand von Western Blots die Bildung eines 1:1-Komplexes demonstriert werden, sofern ein Kompetitor-Aptamer für Exosite II zur Reaktionsmischung zugegeben wurde. Diese 1:1-Komplexe ließen sich mit UV-Licht wieder spalten, sodass wieder die Thrombin-Bande erhalten wurde. Es gelang nicht, die Effizienz der Crosslink-Reaktion auf über 80 % zu erhöhen bzw. das noch freie Thrombin effizient abzutrennen. Dies machte sich jedoch in den nachfolgenden Gerinnungsstudien nicht negativ bemerkbar, da das verbleibende, unmodifizierte Thrombin nicht zu einer vorzeitigen Koagulation führte. In den Koagulationsstudien war es möglich, durch Freisetzung von Thrombin aus dem Komplex, lichtinduziert Koagulation in menschlichem Pool-Plasma zu erzeugen. Dies gelang jedoch nur, wenn der Komplex bereits vor der Zugabe zum Plasma bestrahlt wurde. In einem finalen Experiment sollte die Koagulation in Glaskapillaren durch *in situ* Entschützung des Komplexes in Plasma unter dem Mikroskop visualisiert werden. Vermutlich aufgrund der hohen Absorption des Plasmas gelang es jedoch nicht reproduzierbar, die Gerinnung nur im bestrahlten Gebiet zu erzeugen. An einem vereinfachten Modellsystem ohne Plasma mit einer Lösung, die nur Fibrinogen und Thrombin-Komplex enthielt, konnte dann erfolgreich eine *in situ* Entschützung innerhalb der Lösung mit darauffolgender Koagulation unter dem Mikroskop beobachtet werden. Um das System möglicherweise auf eine therapeutisch relevante Applikation zu erweitern, müssten zukünftig vermutlich photospaltbare Linker verwendet werden, die sich mit der Zweiphotonentechnik entschützen lassen. Eine Anwendung ist beispielsweise in der Tumorthherapie denkbar, um den Tumor durch Thromboembolisation von der Blutversorgung abzuschneiden oder vor der Entfernung eines von einem Tumor befallenen Organs präoperativ eine hämatogene Metastasierung zu verhindern.<sup>[131]</sup> Durch Verwendung der Zweiphotonentechnik ließe sich eine erhöhte Eindringtiefe erzielen. Zudem würde sich die Entschützung in Blut mit

UV-Licht noch etwas schwieriger als in Plasma gestalten, da Hämoglobin eine recht breite Absorption über den gesamten sichtbaren Bereich des Lichts hat. Daher wird eine Entschätzung in Blut wahrscheinlich nur mit IR-Licht, das nicht von zelleigenen Molekülen absorbiert wird, möglich sein.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Chemische Synthesen

#### 4.1.1 Materialien & Reagenzien

##### Chemikalien & Reagenzien:

Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Acros*, *TCI*, *ChemGenes* und *Carbosynth* erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für die präparative Säulenchromatographie wurden Lösungsmittel in technischer Qualität, für die Aufreinigung von Phosphoramiditen der Qualität *pro analysi* verwendet. Für die Synthesen wurden im Allgemeinen wasserfreie Lösungsmittel über Molsieb gelagert von der Fa. *Fluka* verwendet. *S*-1-(2-Nitrophenyl)ethylamin Hydrochlorid wurde von der Firma *Cambrex*, 3-Aminodibenzofuran Hydrochlorid von der Firma *Alinda* erworben.

##### Dünnschichtchromatographie:

Zur Reaktionskontrolle und Analytik wurden dünnschichtchromatographische Untersuchungen auf Kieselgelplatten 60 mit Fluoreszenzindikator der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Als Anfärbereagenzien standen folgende Lösungen zur Verfügung: Anisaldehydreagenz (10 mL *p*-Anisaldehyd, 5 mL Eisessig, 420 mL Ethanol und 15 mL konz. Schwefelsäure), Ninhydrinreagenz (0,6 g Ninhydrin, 2 mL Eisessig, 13 mL Wasser und 420 mL *n*-Butanol).

##### Präparative Säulenchromatographie:

Die synthetisierten Verbindungen wurden säulenchromatographisch mit Glassäulen verschiedener Größe mithilfe von Kieselgel 60 als stationärer Phase aufgereinigt. Das Kieselgel der Korngröße 0,04-0,063  $\mu\text{m}$  wurde von der Firma *Macherey-Nagel GmbH&Co-Kg* bezogen.

#### 4.1.2 Verwendete Geräte zur Analytik

##### NMR-Spektroskopie:

Die Messungen der NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma Bruker durchgeführt:

- Bruker AM 250: (250 MHz  $^1\text{H}$ -NMR und 62.9 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR)
- Bruker AV 300: (300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR, 75.5 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR u. 121.5 MHz  $^{31}\text{P}$ -NMR)



- Bruker AV 400: (400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR, 100.6 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR u. 162 MHz  $^{31}\text{P}$ -NMR)
- Bruker DPX 250: (250 MHz  $^1\text{H}$ -NMR und 62.9 Mhz  $^{13}\text{C}$ -NMR)

Zur Zuordnung der Signale wurden zusätzlich die folgenden 2D-NMR-Experimente durchgeführt:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^{13}\text{C}$ -HSQC,  $^{13}\text{C}$ -HMBC. Alle Messungen erfolgten bei 300 K. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu den Signalen der jeweiligen Lösemittel  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$ ,  $\delta = 7.26$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta = 77.16$ ),  $\text{DMSO-d}_6$  ( $^1\text{H}$ ,  $\delta = 2.50$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta = 39.52$ ) und  $\text{Aceton-d}_6$  ( $^1\text{H}$ ,  $\delta = 2.05$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta = 29.84$ ) in ppm angegeben. Die Verschiebung der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signale ist gegen einen externen Standard von 85%iger Phosphorsäure angegeben. Die Multiplizitäten wurden wie folgt bezeichnet: s= Singulett, d= Duplett, t= Triplett, q= quartett, sep = septett, m= Multiplett, bs = breites Singulett.

#### Massenspektrometrie:

Zur Messung hochaufgelöster Massen wurde ein MALDI Orbitrap XL der Firma *Thermo* verwendet. Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet.

#### Elementaranalyse:

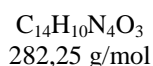
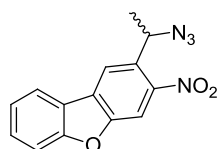
Elementaranalysen wurden an einem Vario Micro Cube der *Elementar Analysesysteme GmbH* durchgeführt. Die Angabe der Elementarzusammensetzung erfolgte in Prozent.

### 4.1.3 Synthesevorschriften

#### 4.1.3.1 *Synthese der NDBF-geschützten dC- und dA-Derivate*

1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan wurde analog zu einer Vorschrift von Ellis-Davies et al. hergestellt.<sup>[12]</sup>

#### **1-Azido-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan (47)**



780 mg (2,4 mmol) 1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan wurden unter Argonatmosphäre in 8 mL trockenem DMF gelöst. Hierzu wurden 474 mg (7,3 mmol, 3 eq.)  $\text{NaN}_3$  gegeben und die Reaktionsmischung wurde für zwei Std. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und

nacheinander mit Wasser und mit ges. wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, dann wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 15:1 v/v). Es wurde ein gelb-oranger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 672 mg (2,38 mmol, 98 %)

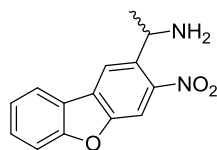
**R<sub>f</sub>:** 0,67 (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.25 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.20 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.08-8.05 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.67-7.57 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.49-7.42 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.54 (q, J = 6.6 Hz, 1H, CH), 1.69 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 158.6, 154.2, 133.4, 132.4, 129.9, 129.6, 124.1, 122.6, 122.1, 120.1, 112.5, 109.0, 57.0, 22.9 ppm.

**Elementaranalyse:** Berechnet: C: 59,57 % H: 3,57 % N: 19,85 %  
Gefunden: C: 59,5 % H: 3,73 % N: 20,0 %

### 1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethanamin (48)



$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$   
256,26 g/mol

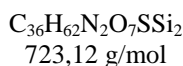
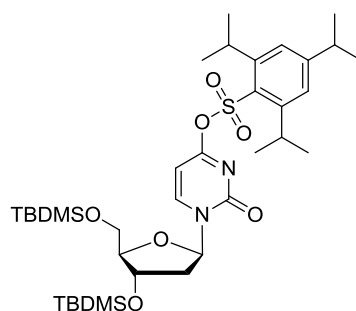
1,5 g (5,3 mmol) 1-Azido-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan wurden in 20 mL einer 1:1 v/v Mischung aus THF und Acetonitril suspendiert. Nach Zugabe von 1,4 g (5,3 mmol) Triphenylphosphin wurde die Mischung 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt bis sich die anfangs trübe Lösung aufklärte. Anschließend wurde für 90 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mL Wasser gestoppt. Die Suspension wurde für eine Stunde gerührt bis eine klare Lösung entstand, dann wurde mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mit ges. wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, dann wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 19:1 v/v). Es wurde ein gelblicher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1,2 g (4,68 mmol, 88 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,39 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 8.67 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.29-8.25 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.81-7.78 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.68-7.62 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.47 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 4.46 (q, J = 6.5 Hz, 1H, CH), 2.39 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 1.41 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-4-O-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-2'-desoxyuridin  
(50)**



3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyuridin<sup>[213]</sup> (900 mg, 1,97 mmol) und DMAP (24 mg, 0,20 mmol, 0,1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 13,5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt, anschließend wurden 1,7 mL Diisopropylethylamin (9,85 mmol, 5 eq.) und 1,08 g Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (3,55 mmol, 1,8 eq.) zugegeben. Nach 10 Minuten wurde das Eisbad entfernt und die Lösung noch zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 96:4→95:5 v/v). Es wurde ein farbloser Nucleosidschaum erhalten.

**Ausbeute:** 1,24g (1,71mmol, 87 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,49(Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v)

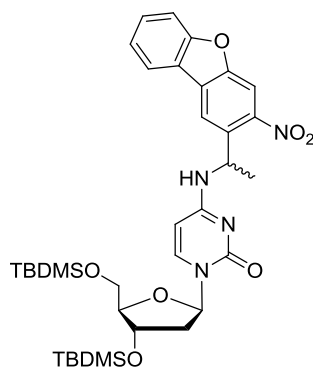
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 8.49 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, H<sub>ar</sub>), 7.38 (s, 2 H, H<sub>ar</sub>), 6.16 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, H5), 6.04 - 6.07 (m, 1H, 1'-H), 4.51 - 4.53 (m, 1 H, 3'-H), 4.29 (sep, J = 6.9 Hz, 2 H, 2x i-Pr-CH), 4.00 - 4.02 (m, 1 H, 4'-H), 3.97 (m, 1H, 5'-H), 3.88 (m, 1H, 5'-H), 3.00 (sep, J = 6.9 Hz, 1 H, i-Pr-CH), 2.42 - 2.47 (m, 1 H, 2'-H), 2.19 - 2.26 (m, 1 H, 2'-H), 1.26 - 1.29 (m, 18 H, i-Pr-CH<sub>3</sub>), 0.93 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 6 H, 2x SiCH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 6 H, 2x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>): 167.8, 155.5, 154.0, 151.9, 147.8, 132.1, 125.0, 94.4, 89.0, 88.3, 72.0, 63.1, 42.5, 34.9, 34.9, 31.6, 30.3, 26.3, 26.1, 24.8, 24.7, 23.7, 18.9, 18.5, -4.5, -4.7, -5.3 ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{36}H_{63}N_2O_7SSi_2$   $[M+H]^+$  723,38888, gefunden 723,39034 ( $\Delta m$  0,00146, Fehler 2,0 ppm).

**3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-4-N-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxycytidin**

(51)



$C_{35}H_{50}N_4O_7Si_2$   
694,97 g/mol

3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-4-O-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid)-2'-desoxyuridin (1,02 g, 1,41 mmol) und 1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethanamin (470 mg, 1,83 mmol, 1,3 eq.), wurden unter Argonatmosphäre in 15 mL trockenem DMF gelöst. 640  $\mu$ L (3,6 mmol, 2,6 eq.) Diisopropylethylamin wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde bei 90°C über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde mit Wasser und mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und die organische Phase über  $MgSO_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 3:1). Ein amorpher gelber Feststoff wurde erhalten.

**Ausbeute:** 790 mg (1,14 mmol, 81 %)

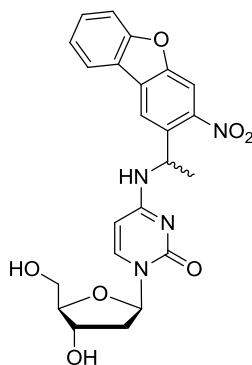
**R<sub>f</sub>:** 0,2 (Dichlormethan/Ethylacetat 3:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.41-8.37 (m, 3H, H<sub>ar</sub>, NH), 8.22-8.19 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.82-7.80 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.72-7.60 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.52-7.48 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.06-6.00 (m, 1H, 1'-H), 5.83 (dd, J = 7.5 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.64-5.57 (m, 1H, CH), 4.34-4.27 (m, 1H, 3'-H), 3.77-3.71 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.68-3.64 (m, 1H, 5'-H), 2.16-1.90 (m, 2H, 2'-H), 1.61-1.58 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.87-0.82 (18H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.05-0.01 (12H, SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 162.3, 157.5, 154.4, 152.9, 147.2, 139.9, 134.9, 134.8, 131.5, 131.3, 129.6, 128.8, 128.6, 127.9, 123.9, 122.1, 121.9, 119.7, 119.6, 112.2, 108.2, 108.1, 94.3, 86.5, 86.4, 84.7, 71.3, 71.1, 62.3, 62.1, 45.3, 45.2, 40.4, 25.7, 25.6, 25.6, 25.6, 22.0, 22.0, 17.8, 17.6, 17.6, -4.8, -4.9, -5.0, -5.1 ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{35}H_{51}N_4O_7Si_2$   $[M+H]^+$  695,32908, gefunden 695,32956 ( $\Delta m$  0,00048, Fehler: 0,7 ppm).

**4-*N*-(1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxycytidin (52)**



$C_{23}H_{22}N_4O_7$   
466,44 g/mol

3'-5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-4-*N*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxycytidin (546 mg, 0,79 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in 15 mL trockenem THF gelöst. Hierzu wurden 2,4 mL (2,4 mmol, 3 eq.) TBAF-Lösung (1 M in THF) zugegeben und die Lösung wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 97:3→95:5→9:1 v/v). Das Produkt wurde in Form eines gelblichen Schaums erhalten.

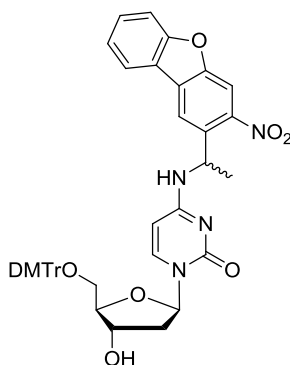
**Ausbeute:** 328 mg (0,70 mmol, 90 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,25 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 8.44-8.37 (m, 3H, NH, H<sub>ar</sub>), 8.23-8.19 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.82-7.76 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.68-7.62 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.52-7.47 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.10-6.02 (m, 1H, 1'-H), 5.85 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.66-5.56 (m, 1H, CH), 5.18-5.14 (m, 1H, 3'-OH), 4.94 (dd,  $J$  = 5.1 Hz,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, 5'-OH), 4.20-4.06 (m, 1H, 3'-H), 3.75-3.72 (m, 1H, 4'-H), 3.55-3.48 (m, 2H, 5'-H), 2.13-1.80 (m, 2H, 2'-H), 1.61-1.58 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.4 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 162.4, 162.3, 157.5, 154.6, 152.9, 147.1, 140.3, 135.0, 134.9, 129.7, 127.9, 124.0, 122.1, 121.9, 119.7, 119.6, 112.2, 108.2, 94.4, 87.2, 85.0, 84.9, 70.4, 70.3, 61.3, 45.3, 45.2, 40.3, 22.1, 22.0 ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{23}H_{22}N_4O_7Na$   $[M+Na]^+$  489,1380, gefunden 489,1370 ( $\Delta m$  0,001, Fehler: 2 ppm).

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-4-N-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxycytidin (53)**

C<sub>44</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>  
768,81 g/mol

328 mg 4-N-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxycytidin (0,7 mmol) wurden zweimal mit je 10 mL Pyridin coevaporiert. Der Rückstand wurde dann unter Argonatmosphäre in 8 mL trockenem Pyridin gelöst und mit 310 mg (0,91 mmol, 1,3 eq.) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäurelösung und mit ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 97:3→95:5 v/v). Die Säule wurde mit dem angegebenen Lösungsmittel und 0,5 % NEt<sub>3</sub> gepackt. Als Produkt wurde ein farbloser Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 309 mg (0,40 mmol, 57 %)

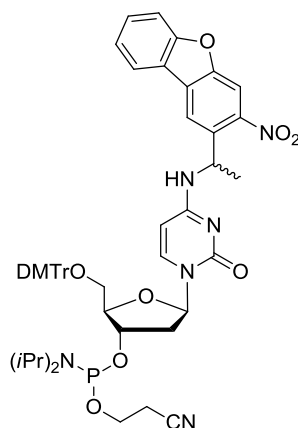
**R<sub>f</sub>:** 0,38 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.41-8.37 (m, 3H, H<sub>ar</sub>, NH), 8.22-8.17 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.82-7.78 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.68-7.62 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.52-7.46 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.37-7.35 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.32-7.27 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.25-7.20 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.90-6.87 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.11-6.03 (m, 1H, 1'-H), 5.72-5.68 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.66-5.59 (m, 1H, CH), 5.27-5.23 (m, 1H, 3'-OH), 4.28-4.16 (m, 1H, 3'-H), 3.86-3.81 (m, 1H, 4'-H), 3.74-3.73 (bs, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.18-3.17 (m, 2H, 5'-H), 2.20-1.90 (m, 2H, 2'-H), 1.61-1.59 (m, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62,9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 162.3, 158.1, 157.5, 154.4, 152.9, 147.2, 144.7, 144.6, 139.9, 135.4, 135.2, 134.8, 129.7, 127.9, 127.8, 127.6, 126.7, 124.0, 122.1, 121.9, 119.7, 119.6, 113.2, 112.2, 108.1, 94.3, 94.3, 85.7, 85.7, 85.1, 84.8, 84.6, 70.0, 69.8, 63.3, 63.1, 55.0, 45.7, 45.2, 40.5, 22.0 ppm.

**MALDI-HRMS:** m/z berechnet für  $C_{44}H_{40}N_4O_9Na$   $[M+Na]^+$  791,26875, gefunden 791,26876 ( $\Delta m$  0,00001, error 0,01 ppm).

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4-N-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxycytidin (54)**



$C_{53}H_{57}N_6O_{10}P$   
969,03 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-4-N-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxycytidin (150 mg, 0,195 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in 6 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Hierzu wurden nacheinander 170  $\mu$ L (0,98 mmol, 5 eq.) Diisopropylethylamin und 100  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit (0,39 mmol, 2 eq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann mit 15 mL Dichlormethan verdünnt und mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 2:1 v/v) Die Säule wurde mit dem angegebenen Lösungsmittel und 0,5 %  $NEt_3$  gepackt. Als Produkt wurde ein farbloser Schaum erhalten.

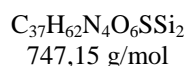
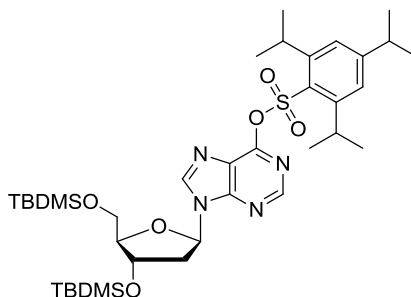
**Ausbeute:** 95 mg (0,10 mmol, 51 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,22 (Cyclohexan/Aceton 2:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.42-8.37 (m, 3H, NH, H<sub>ar</sub>), 8.23-8.19 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.83-7.80 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.70-7.62 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.46 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.38-7.33 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.32-7.17 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.90-6.85 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.14-6.02 (m, 1H, 1'-H), 5.74-5.67 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.65-5.58 (m, 1H, CH), 4.53-4.38 (m, 1H, 3'-H), 4.01-3.91 (m, 1H, 4'-H), 3.74-3.73 (bs, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.62-3.43 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, CH*i-Pr*), 3.26-3.18 (m, 2H, 5'-H), 2.76-2.60 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.33-2.00 (m, 2H, 2'-H), 1.6 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.12-0.93 (m, 12H, *i-Pr*-CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>31</sup>P-NMR (162.0 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 147.64, 147.62, 147.30, 147.26 ppm.

**3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-6-O-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-2'-desoxyinosin**  
(57)



3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyinosin<sup>[208]</sup> (18,9 g, 39,3 mmol) und *N,N*-dimethylaminopyridin (482 mg, 3,9 mmol, 0,1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 200 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und Diisopropylethylamin (33,8 ml, 197,0 mmol, 5 eq.) sowie 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (21,4 g, 71,0 mmol, 1,8 eq.) wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde noch für 10 Minuten bei 0 °C dann für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bis per DC-Kontrolle kein Edukt mehr detektiert werden konnte. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 99:1→95:5 →93:7 →9:1 v/v). Das Produkt wurde in Form eines gelblichen Nukleosidschaums erhalten.

**Ausbeute:** 13,2 g (17,6 mmol, 45 %) + 6,7 g 1-*N*-sulfonyliertes Isomer (23 %)

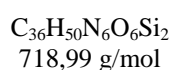
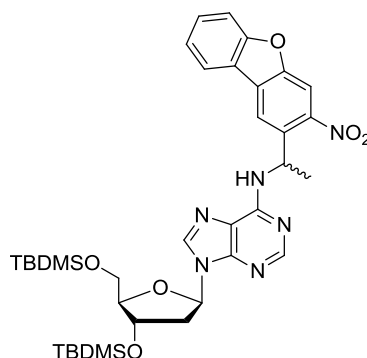
**R<sub>f</sub>:** 0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v); 1-*N*-sulfonyliertes Isomer: 0,15

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.77 (s, 1H, H2), 8.55 (s, 1H, H8), 7.34 (s, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.39-6.43 (m, 1H, 1'-H), 4.67-4.72 (m, 1H, 4'-H), 4.10-4.24 (m, 2H, i-Pr-CH), 3.83-3.86 (m, 1H, 4'-H), 3.73-3.78 (m, 1H, 5'-H), 3.61-3.66 (m, 1H, 5'-H), 2.92-3.01 (m, 2H, 2'-H, i-Pr-CH), 2.34-2.42 (m, 1H, 2'-H), 1.19-1.23 (m, 18H, i-Pr-CH<sub>3</sub>), 0.74, 0.87 (18H, 4x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0.11, -0.05, 0.1 (12H, 4x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 154.5, 153.7, 153.6, 150.8, 150.2, 145.8, 130.7, 124.1, 122.7, 87.0, 83.9, 71.2, 62.0, 33.4, 29.2, 25.6, 25.6, 24.1, 23.2, 17.8, 17.7, -4.8, -5.0, -5.7, -5.7 ppm.



**3'-5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-6-*N*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl))ethyl-2'-desoxyadenosin (58)**



3'-5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-6-*O*-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-2'-desoxyinosin (762 mg, 1,02 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 4 mL trockenem DMF gelöst. 1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethanamin (340 mg, 1,3 mmol, 1,3 eq) gelöst in 8 mL trockenem DMF wurden hinzugegeben. Anschließend wurden noch 460  $\mu\text{L}$  Diisopropylethylamin (2,65 mmol, 2,6 eq.) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (482 mg, 3,9 mmol, 0,3 eq.) hinzugefügt und die Lösung wurde für eine Woche bei 90 °C gerührt. Da kein vollständiger Umsatz erfolgte, wurden weitere 0,3 eq. DMAP hinzugefügt und für weitere 5 Tage bei 90 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Es wurde nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v). Als Produkt wurde ein gelber Nukleosidschaum erhalten.

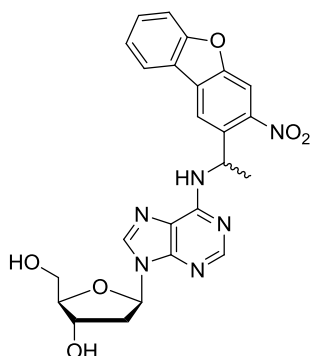
**Ausbeute:** 390 mg (0,54 mmol, 53 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,11 (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 8.64-8.56 (m, 2H, H<sub>ar</sub>, NH), 8.31-8.27 (m, 2H, H8, H2), 8.08-8.01 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.76-7.72 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.64-7.57 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.48-7.42 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.31-6.21 (m, 1H, 1'-H), 5.94-5.80 (m, 1H, CH), 4.66-4.56 (m, 1H, 3'-H), 3.80-3.65 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.64-3.52 (m, 1H, 5'-H), 2.96-2.78 (m, 1H, 2'-H), 2.29-2.16 (m, 1H, 2'-H), 1.75 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.85-0.62 (18H, 4x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.06 - -0.17 (12H, 4x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 157.4, 152.7, 152.7, 151.0, 147.7, 139.5, 129.5, 127.8, 123.9, 121.9, 121.7, 119.9, 119.8, 112.1, 107.5, 86.9, 86.7, 71.8, 71.3, 62.4, 62.1, 33.4, 29.1, 25.6, 25.4, 17.7, 17.6, -4.9, -5.0, -5.7, -5.8 ppm.

**6-*N*-(1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxyadenosin (59)**



$C_{24}H_{22}N_6O_6$   
490,47 g/mol

3'-5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-6-*N*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxyadenosin (390 mg, 0,54 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in 13 mL trockenem THF gelöst. Hierzu wurden 1,63 mL (1,63 mmol, 3 eq.) TBAF-Lösung (1 M in THF) gegeben und die Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 96:4→94:6 v/v). Ein gelblicher Schaum wurde erhalten.

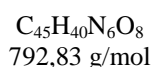
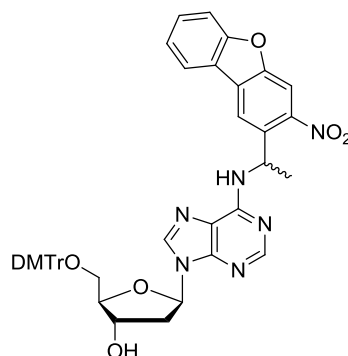
**Ausbeute:** 252 mg (0,51 mmol, 95 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,28 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.63-8.58 (m, 2H, H<sub>ar</sub>, NH), 8.38 (bs, 1H, H<sub>2</sub>), 8.28 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.18-8.04 (m, 2H, H<sub>ar</sub>, H<sub>8</sub>), 7.76-7.72 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.63-7.59 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.47-7.43 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.33-6.27 (m, 1H, 1'-H), 5.94-5.86 (m, 1H, CH), 5.28-5.25 (m, 1H, 3'-OH), 5.15-5.09 (m, 1H, 5'-OH), 4.4-4.35 (m, 1H, 3'-H), 3.86-3.82 (m, 1H, 4'-H), 3.61-3.54 (m, 1H, 5'-H), 3.51-3.45 (m, 1H, 5'-H), 2.71-2.62 (m, 1H, 2'-H), 2.25-2.17 (m, 1H, 2'-H), 1.75 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 157.4, 152.7, 152.0, 147.7, 139.6, 135.8, 129.5, 127.8, 124.0, 121.9, 121.7, 119.9, 112.1, 107.6, 87.8, 83.8, 70.9, 70.8, 61.8, 44.9, 39.5, 21.8 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 491,16738, gefunden 491,16694 (Δ*m* = 0,00044, Fehler 0,9 ppm).

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-N-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxyadenosin (60)**

6-*N*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl)-2'-desoxyadenosin (144 mg, 0,29 mmol) wurde zweimal mit je 10 mL Pyridin coevaporiert und dann unter Argonatmosphäre in 9 mL trockenem Pyridin gelöst. Zur Lösung wurden 129 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (0,38 mmol, 1,3 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Dichlormethan gelöst. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichloromethan/Methanol 98:2→96:4 v/v). Die Säule wurde mit dem angegebenen Laufmittel unter Zusatz von 0,5 % NEt<sub>3</sub> gepackt. Als Produkt wurde ein gelblicher Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 200 mg (0,25 mmol, 87 %)

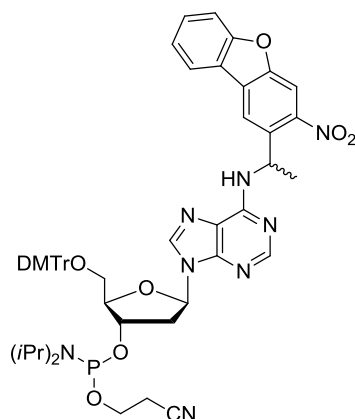
**R<sub>f</sub>:** 0,45 (Cyclohexan/Aceton 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.62-8.59 (m, 2H, H<sub>ar</sub>, NH), 8.32 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>ar</sub>), 8.09-7.98 (m, 2H, H<sub>ar</sub>, H<sub>8</sub>), 7.78-7.76 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.65-7.60 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.49-7.44 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.29-7.27 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.19-7.16 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.80-6.75 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.35-6.28 (m, 1H, 1'-H), 5.93-5.86 (m, 1H, CH), 5.33-5.31 (m, 1H, 3'-OH), 4.49-4.38 (m, 1H, 3'-H), 3.97-3.92 (m, 1H, 4'-H), 3.71 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.16-3.11 (m, 2H, 5'-H), 2.87-2.77 (m, 1H, 2'-H), 2.32-2.23 (m, 1H, 2'-H), 1.76 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 158.0, 157.9, 157.2, 152.8, 152.0, 144.8, 144.7, 135.7, 135.4, 135.3, 129.6, 129.6, 129.5, 127.8, 127.6, 123.9, 121.9, 121.7, 113.0, 112.1, 85.7, 85.3, 85.2, 83.3, 70.6, 64.0, 59.7, 54.9, 39.2, 20.7, 14.0 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>45</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 793,2980, gefunden 793,29765 (Δ*m* = 0,00035, Fehler 0,44 ppm).

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-*N*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl))ethyl-2'-desoxyadenosin (61)**



$C_{54}H_{57}N_8O_9P$   
993,05 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-*N*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl))ethyl-2'-desoxyadenosin (101 mg, 0,127 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 6 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Hierzu wurden 110  $\mu$ L Diisopropylethylamin (0,635 mmol, 5 eq.) hinzugefügt und die Mischung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, dann wurden 60  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (0,255 mmol, 2 eq.) hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann mit 30 mL Dichlormethan verdünnt, mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 2:1 v/v). Die Säule wurde mit dem angegebenen Laufmittel unter Zusatz von 0,5 %  $NEt_3$  gepackt. Als Produkt wurde ein gelblicher Schaum erhalten.

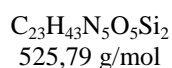
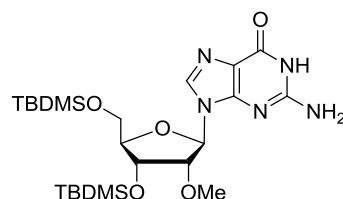
**Ausbeute:** 90 mg (0,09 mmol, 78 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,25 (Cyclohexan/Aceton 2:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 8.61-8.59 (m, 2H,  $H_{ar}$ , NH), 8.33-8.29 (m, 2H, H2,  $H_{ar}$ ), 8.07-7.94 (m, 2H, H8,  $H_{ar}$ ), 7.77-7.75 (m, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.63-7.59 (m, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.46-7.43 (m, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.31-7.24 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.19-7.02 (m, 7H,  $H_{ar}$ ), 6.79-6.73 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 6.36-6.31 (m, 1H, 1'-H), 5.92-5.85 (m, 1H, CH), 4.82-4.67 (m, 1H, 3'-H), 4.12-4.03 (m, 1H, 4'-H), 3.84-3.61 (m, 8H,  $OCH_3$ ,  $OCH_2CH_2CN$ ), 3.58-3.44 (m, 2H, i-Pr-CH), 3.25-3.11 (m, 2H, 5'-H), 3.04-2.95 (m, 1H, 2'-H), 2.74 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CN$ ), 2.66-2.63 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H,  $OCH_2CH_2CN$ ), 2.45-2.37 (m, 1H, 2'-H), 1.76-1.74 (m, 3H,  $CH_3$ ), 1.14-1.00 (m, 12H, i-Pr- $CH_3$ ) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162.0 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 147.6, 147.0, 147.0 ppm.

## 4.1.3.2 Synthese der NPE-geschützten 2'-OMe RNA-Amidite

3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-O-methylguanosin (79a)

9,52 g 2'-O-Methylguanosin (32 mmol) wurden zusammen mit 14,39 g Imidazol (211,4 mmol, 6,6 eq.) unter Argonatmosphäre in 80 mL DMF gelöst. Anschließend wurde TBDMS-Cl (18,35 g, 121,7 mmol, 3,8 eq.) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 mL Ethanol beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 99:1→98:2→97:3→95:5 v/v). Ein farbloser Nukleosidschaum wurde erhalten.

**Ausbeute:** 14,86 g (28,2 mmol, 88 %)

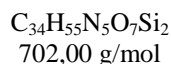
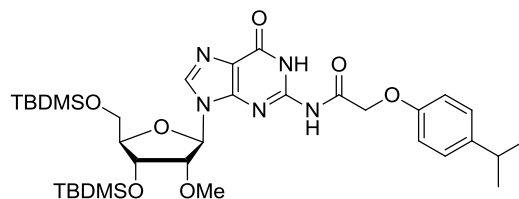
**R<sub>f</sub>:** 0,44 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10.63 (s, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, H8), 6.49 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.79 (d, J = 6.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.39 (dd, J = 4.4 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.24 (dd, J = 5.8 Hz, J = 4.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.91-3.88 (m, 1H, 4'-H), 3.80 (dd, J = 11.4 Hz, J = 5.3 Hz, 1H, 5'-H), 3.68 (dd, J = 11.4 Hz, J = 4.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.31 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 0.90, 0.89 (18H, 4x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11, 0.07 (12H, 4x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 156.6, 153.8, 151.2, 134.7, 116.6, 85.0, 84.0, 82.0, 70.0, 62.3, 57.6, 47.6, 25.7, 25.6, 17.9, 17.7, -4.9, .5.0 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 526,28755, gefunden 526,28859 (Δ*m* = 0,00109, Fehler 2,07 ppm).

**3'-5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2-*N*-(4-isopropylphenoxyacetyl)-2'-*O*-methylguanosin  
(79b)**



656 mg 3'-5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-*O*-methylguanosin (1,25 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 8 mL Pyridin gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Im Anschluss wurden 490 mg *Isopropylphenoxyacetylchlorid* (2,3 mmol, 1,8 eq.) in einer Spritze abgemessen und zur Reaktionslösung getropft, wobei sich sofort ein orangefarbener Niederschlag bildete. Es wurde für zwei Stunden bei 0 °C, dann noch für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Da keine vollständige Umsetzung erfolgt war, wurden weitere 0,3 eq. *Isopropylphenoxyacetylchlorid* bei 0 °C zugegeben und für weitere 4 ½ Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bis kein Edukt mehr per Dünnschichtchromatographie nachweisbar war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol beendet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1 v/v). Es wurde ein bräunlicher Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 638 mg (0,91 mmol, 73 %)

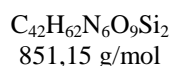
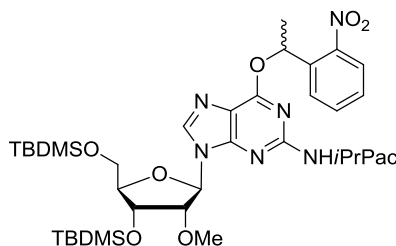
**R<sub>f</sub>:** 0,29 (Cyclohexan/Aceton 3:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 11.79 (bs, 2H, 2x NH), 8.25 (s, 1H, H8), 7.16 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.88 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 5.90 (d, J = 5.7 Hz, 1H, 1'-H), 4.83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.45-4.42 (m, 1H, 3'-H), 4.34-4.30 (m, 1H, 2'-H), 3.96-3.93 (m, 1H, 4'-H), 3.84 (dd, J = 11.3 Hz, J = 5.3 Hz, 1H, 5'-H), 3.71 (dd, J = 11.3 Hz, J = 3.8 Hz, 1H, 5'-H), 3.35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.89-2.78 (m, 1H, CH), 1.16 (d, J = 6.9 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.90, 0.89 (18H, 2x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.12, 0.07 (12H, SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 171.0, 155.7, 154.9, 148.5, 147.5, 141.3, 137.2, 127.2, 120.4, 114.4, 85.4, 94.5, 82.1, 70.0, 66.5, 62.3, 57.8, 32.6, 22.8, 25.6, 24.0, 18.0, 17.8, -4.8, -5.0 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 702,37128, gefunden 702,37360 (Δ*m* = 0,00232, Fehler 3,3 ppm).

**3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-O-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methylguanosin (80a)**



3'-5'-O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-2'-O-methylguanosin (293 mg, 0,42 mmol) und 165 mg Triphenylphosphin (0,63 mmol, 1,5 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem THF gelöst. Anschließend wurden 140 mg (0,84 mmol, 2eq.) 1-(2-Nitrophenyl)ethanol<sup>[4]</sup> in einer Spritze abgemessen und zur Reaktionslösung gegeben. Hierauf wurden 290  $\mu$ L DEAD (40 % in Toluol, 0,63 mmol, 1,5 eq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung und ges. wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1  $\rightarrow$  3:1 v/v). Das Produkt wurde als Diastereomerenmischung in Form eines gelben Schaums erhalten.

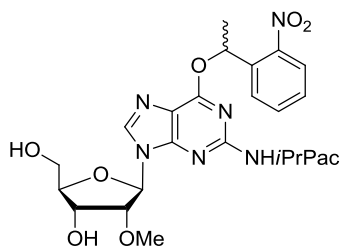
**Ausbeute:** 229 mg (0,27 mmol, 64 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,28 (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 10.19 (s, 1H, NH), 8.44 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.03-7.99 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.84-7.71 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.52 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.87-6.81 (m, 3H, H<sub>ar</sub>, CH), 5.98 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.82 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.52-4.465 (m, 2H, 2'-H, 3'-H), 3.90-3.84 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.70-3.67 (m, 1H, 5'-H), 3.31 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.88-2.77 (m, 1H, CH), 1.81 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.17 (d, J = 6.9 Hz, 6H, 2x CH<sub>3</sub>), 0.86, 0.85, 0.84 (18H, 4x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.08, 0.02 (12H, 4x SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 166.9, 159.0, 155.9, 152.8, 151.3, 151.2, 147.8, 141.5, 141.0, 140.9, 137.0, 134.1, 129.0, 127.2, 127.0, 124.3, 117.6, 117.6, 114.3, 85.5, 85.0, 81.3, 70.4, 69.7, 67.2, 62.1, 57.7, 32.6, 25.7, 25.6, 24.1, 21.7, 17.9, 17.7, -4.9, -5.1, -5.6 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für  $C_{42}H_{62}N_6O_9Si_2Na$  [M+Na]<sup>+</sup> 873,40090, gefunden 873,39994 ( $\Delta m$  = 0,0001, Fehler 1,1 ppm).

**2-*N*-(4-Isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-*O*-methylguanosin (80b)**

C<sub>39</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>  
622,63 g/mol

2,48 g 3'-5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2-*N*-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-*O*-methylguanosin (2,90 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 50 mL THF gelöst. Anschließend wurden 990  $\mu$ L Essigsäure (17,4 mmol, 6 eq.) und dann 8,7 mL TBAF in THF (8,7 mmol, 3 eq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 99:1→97:3→95:5). Als Produkt wurde ein hellgelber Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 1,39 g (2,23 mmol, 77 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,71 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

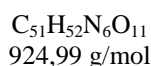
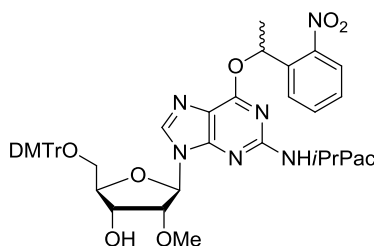
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 10.27-10.25 (m, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, H8), 8.03-8.00 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.83-7.80 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.77-7.73 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.57-7.52 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.15 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.90-6.83 (m, 3H, H<sub>ar</sub>, CH), 6.00 (d, J = 5.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.25-5.24 (m, 1H, 3'-OH), 5.05-5.04 (m, 1H, 5'-OH), 4.86-4.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.35-4.32 (m, 2H, 3'-H, 2'-H), 3.94-3.93 (m, 1H, 4'-H), 3.68-3.53 (m, 2H, 5'-H), 3.32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.89-2.78 (m, 1H, CH), 1.80 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.17 (d, J = 6.9 Hz, 6H, 2x CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 167.2, 158.9, 155.8, 153.0, 153.0, 151.4, 147.6, 147.6, 140.9, 137.0, 137.0, 134.1, 129.0, 127.2, 127.1, 124.3, 117.4, 117.4, 114.3, 86.0, 86.0, 85.2, 82.6, 82.5, 70.4, 70.4, 68.5, 68.4, 67.3, 61.0, 57.5, 32.5, 24.0, 21.7, 21.7 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 623,24778, gefunden 623,24600 ( $\Delta m$  = 0,00178, Fehler 2,85 ppm).



**5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-O-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methylguanosin (80c)**



1,27 g (2,04 mmol) 2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-O-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methylguanosin wurden unter Argonatmosphäre in 60 mL Pyridin gelöst. Hierzu wurden 900 mg (2,65 mmol, 1,3 eq.) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid gegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur zwei Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan gelöst, nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 2:1 v/v). Als Produkt wurde ein gelber Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 1,56 g (1,69 mmol, 83 %)

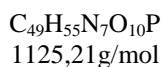
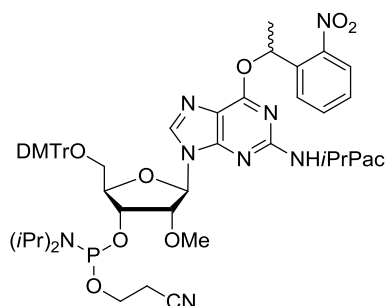
**R<sub>f</sub>:** 0,2 (Dichlormethan/Methanol 98:2 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10.18 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.05-8.02 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.85-7.82 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.76-7.72 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.57-7.53 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.31-7.29 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.20-7.11 (m, 9H, H<sub>ar</sub>), 6.85-6.76 (m, 7H, H<sub>ar</sub>, CH), 6.05 (d, J = 4.5 Hz, 1H, 1'-H), 5.22 (d, J = 6.2 Hz, 1H, 3'-OH), 4.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.43-4.41 (m, 1H, 2'-H), 4.39-4.35 (m, 1H, 3'-H), 4.06-4.02 (m, 1H, 4'-H), 3.70, 3.69 (2s, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>), 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.34-3.30 (m, 1H, 5'-H), 3.15-3.12 (m, 1H, 5'-H), 2.87-2.80 (m, 1H, CH), 1.81 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.17 (d, J = 6.9 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 166.9, 159.0, 158.0, 157.9, 155.8, 152.8, 151.3, 149.6, 148.3, 147.6, 144.7, 141.6, 140.9, 138.1, 137.0, 135.8, 135.2, 134.1, 129.8, 129.5, 129.0, 127.6, 127.6, 127.2, 127.1, 126.5, 124.3, 123.8, 122.2, 117.6, 114.3, 113.0, 85.9, 85.7, 85.4, 83.8, 81.8, 70.4, 69.0, 67.3, 64.0, 57.7, 54.9, 54.9, 32.5, 24.0, 21.7 ppm

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 947,35863 gefunden 947,36128 (Δ*m* = 0,00265, Fehler 2,8 ppm).

**3'-*O*-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*N*-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-*O*-methylguanosin (68)**



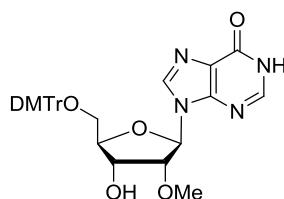
5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*N*-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-*O*-methylguanosin (100 mg, 0,11 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 3,5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Hierzu wurden 95  $\mu$ L Diisopropylethylamin (0,54 mmol, 5 eq.) gegeben und es wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend fügte man 50  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (0,216 mmol, 2 eq.) hinzu und ließ für 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1→2:1 v/v). Als Produkt wurde ein gelber Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 86 mg (0,09 mmol, 84 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,44 (Cyclohexan/Aceton 2:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.17-10.15 (m, 1H, NH), 8.40-8.39 (m, 1H, H8), 8.05-8.03 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.84-7.82 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.77-7.73 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.57-7.53 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.33-7.28 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.22-7.09 (m, 9H, H<sub>ar</sub>), 6.85-6.75 (m, 7H, H<sub>ar</sub>, CH), 6.05-6.01 (m, 1H, 1'-H), 4.80-4.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.69-4.66 (m, 1H, 2'-H), 4.51-4.44 (m, 1H, 3'-H), 4.21-4.13 (m, 1H, 4'-H), 3.76-3.67 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, 2x OCH<sub>3</sub>), 3.58-3.49 (m, 2H, 2x CH), 3.40-3.37 (m, 1H, 5'-H), 3.32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.26-3.18 (m, 1H, 5'-H), 2.85-2.82 (m, 1H, 1x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.74-2.71 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.84 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21-1.07 (m, 15H, CH<sub>3</sub>), 0.97-0.95 (m, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (121.4 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 149.6, 149.5 ppm.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methylinosin (70)**

$C_{32}H_{32}N_4O_7$   
584,62 g/mol

2'-O-Methylinosin (986 mg, 3,49 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in 40 mL Pyridin gelöst. Hierzu wurden 1,42 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (4,19 mmol, 1,2 eq.) gegeben und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan gelöst. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5% iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 97:3→95:5 v/v). Die Säule wurde mit dem angegebenen Lösungsmittel unter Zusatz von 0,5 %  $NEt_3$  gepackt. Es wurde ein farbloser Nukleosidschaum erhalten.

**Ausbeute:** 2,03 g (3,47 mmol, 99 %)

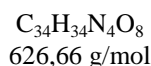
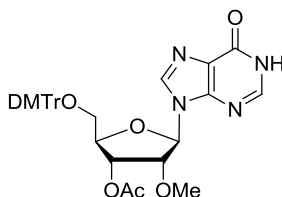
**R<sub>f</sub>:** 0,35 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.39 (bs, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, H2), 8.01 (s, 1H, H8), 7.37-7.35 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.28-7.18 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.86-6.81 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.03 (d, J = 4.3 Hz, 1H, 1'-H), 5.29 (d, J = 5.8 Hz, 1H, 3'-OH), 4.39-4.33 (m, 2H, 2'-H, 3'-H), 4.08-4.05 (m, 1H, 4'-H), 3.73 (s, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>), 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.27-3.18 (m, 2H, 2x 5'-H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 158.0, 156.5, 148.0, 144.7, 138.7, 135.5, 135.4, 129.7, 127.7, 127.7, 126.6, 124.6, 113.1, 85.7, 85.5, 83.6, 82.1, 68.9, 63.6, 57.7, 55.0 ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{32}H_{31}N_4O_7$  [M-H]<sup>-</sup> 583,2198 gefunden 583,2192 ( $\Delta m$  = 0,0006, Fehler 1 ppm).

**3'-*O*-Acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-*O*-methylinosin (71)**



14,2 g 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-*O*-methylinosin (24,3 mmol) wurden unter Argonatmosphäre zusammen mit 314 mg DMAP (2,43 mmol, 0,1 eq.) in 75 mL trockenem Pyridin gelöst. Hierzu wurden portionsweise 7,6 mL Essigsäureanhydrid (80,2 mmol, 3,3 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 mL Methanol beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Es wurde nacheinander mit 5% iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der entstandene gelbe Nukleosidschaum am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung für die nächste Reaktion verwendet werden.

**Ausbeute:** quantitativ

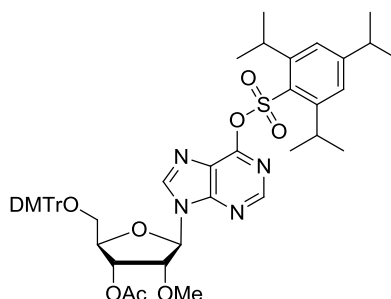
**R<sub>f</sub>:** 0,33 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>): δ = 11,19 (bs, 1H, NH), 8.12 (s, 1H, H2), 8.00 (s, 1H, H8), 7.50-7.46 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.36-7.22 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.88-6.85 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.08 (d, J = 6.3 Hz, 1H, 1'-H), 5.56 (dd, J = 5.2 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, 3'-H), 4.87-4.83 (m, 1H, 2'-H), 4.36-4.31 (m, 1H, 4'-H), 3.72 (s, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>), 3.46 (d, J = 4.5 Hz, 2H, 2x 5'-H), 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 169.5, 158.1, 156.4, 148.1, 145.9, 144.6, 139.0, 135.3, 135.3, 129.7, 127.8, 127.6, 126.7, 124.8, 113.1, 85.7, 85.5, 81.5, 79.8, 70.6, 63.3, 58.2, 55.0, 20.6 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 627,24498 gefunden 627,24467 (Δ*m* = 0,00031, Fehler 0,5 ppm).

**3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-O-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-2'-O-methylinosin (72)**



$C_{49}H_{56}N_4O_{10}S$   
893,06 g/mol

2,10 g 3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-methylinosin und 41 mg DMAP (0,35 mmol, 0,1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 30 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur wurden erst 2,9 mL Diisopropylethylamin (16,8 mmol, 5 eq.) und dann 1,83 g (6,04 mmol, 1,8 eq.) Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid zur Reaktionsmischung gegeben. Nach zehn Minuten wurde das Eisbad entfernt und die Lösung noch für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit Dichlormethan verdünnt und zweimal mit ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert, dann wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der ölige Rückstand per Säulenchromatographie aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1→4:1→2:1 v/v). Das Produkt sowie das N-sulfonylierte Isomer wurden als farblose Schäume erhalten.

**Ausbeute:** 1,36 g (1,52 mmol, 45 %) + 1,28 g 1-N-sulfonyliertes Isomer (43 %)

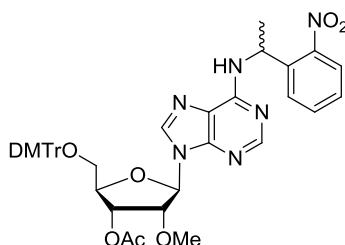
**R<sub>f</sub>:** 0,77 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.82 (s, 1H, H2), 8.44 (s, 1H, H8), 7.37 (s, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.32-7.31 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.21-7.10 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.83-6.80 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.17 (d, J = 5.9 Hz, 1H, 1'-H), 5.49 (dd, J = 5.2 Hz, J = 4.1 Hz, 1H, 3'-H), 4.94-4.91 (m, 1H, 2'-H), 4.30-4.27 (m, 1H, 4'-H), 4.24-4.13 (m, 2H, CH), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.37-3.35 (m, 1H, 5'-H), 3.31-3.27 (m, 1H, 5'-H), 3.26 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.00-2.94 (m, 1H, CH), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.20 (m, 18 H, 6x CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 158.1, 158.1, 157.8, 156.2, 148.3, 148.0, 147.4, 146.8, 146.1, 144.6, 141.4, 140.2, 139.0, 135.3, 135.3, 129.7, 129.6, 128.9, 127.7, 127.6, 127.6, 126.7,

124.4, 121.4, 113.1, 112.7, 85.8, 85.7, 81.5, 79.9, 70.6, 63.2, 58.2, 55.0, 55.0, 33.2, 28.0, 24.7, 23.7, 20.5 ppm.

**3'-*O*-Acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-*N*-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-*O*-methyladenosin  
(73a)**



$C_{42}H_{42}N_6O_9$   
774,82 g/mol

1,32 g 3'-*O*-Acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-*O*-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-2'-*O*-methylinosin (1,47 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 20 mL trockenem DMF gelöst. 426 mg (2,36 mmol, 1,6 eq.) 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin<sup>[215]</sup> wurden in einer Spritze abgemessen und zur Reaktionslösung gegeben. Es wurde für einen Tag bei Raumtemperatur, dann für einen Tag bei 90 °C Ölbadtemperatur gerührt. Da keine vollständige Umsetzung erfolgte, wurden 18 mg DMAP (0,15 mmol, 0,1 eq.) zugegeben und erneut über Nacht bei Raumtemperatur und dann weiter 5 Std. bei 90 °C gerührt. Da immer noch keine vollständige Umsetzung erfolgt war, wurden weitere 0,5 eq. DMAP zugegeben und 5 Std. bei 90 °C und dann für 60 Std. bei Raumtemperatur gerührt, bis eine vollständige Umsetzung zu erkennen war. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan gelöst. Es wurde nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2 v/v). Es wurde ein farbloser Nukleosidschaum erhalten.

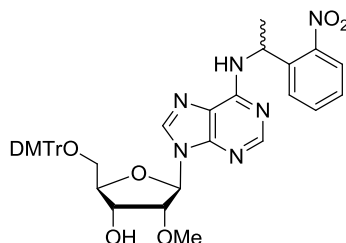
**Ausbeute:** 823 mg (1,06 mmol, 72 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,63 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.74-8.73 (m, 1H, NH), 8.36 (bs, 1H, H<sub>2</sub>), 7.96-7.92 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.89-7.85 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.67-7.63 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.44-7.40 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.38-7.33 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.27-7.15 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.86-6.80 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.02-5.96 (m, 1H, 1'-H), 5.80-5.74 (m, 1H, CH), 5.46-5.44 (m, 1H, 3'-H), 4.92-4.85 (m, 1H, 2'-H), 4.22-4.20 (m, 1H, 4'-H), 3.73-3.71 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.37-2.35 (m, 2H, 2x 5'-H), 3.21 (bs, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.65 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 158.1, 158.1, 158.1, 152.3, 152.2, 148.8, 144.7, 144.6, 140.1, 135.5, 135.3, 135.2, 133.4, 129.7, 129.7, 129.6, 127.8, 127.7, 127.6, 127.4, 126.7, 123.6, 113.1, 85.7, 85.7, 81.3, 79.5, 70.8, 70.7, 63.3, 58.1, 55.0, 20.7, 20.6$  ppm.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-N-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methyladenosin (73b)**



$\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_8$   
732,80 g/mol

2,77 g (3.57 mmol) 3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-N-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methyladenosin wurden unter Argonatmosphäre mit 30 mL  $\text{MeNH}_2$ -Lsg. (8 M in EtOH, 240 mmol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Methylamin und Ethanol wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1→1:1→1:2→1:4). Es wurde ein gelber Nukleosidschaum erhalten.

**Ausbeute:** 2,41 g (3,29 mmol, 92 %)

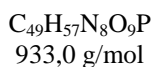
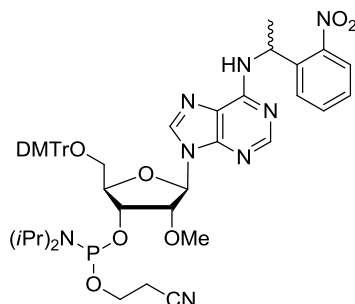
**R<sub>f</sub>:** 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 8.73\text{-}8.67$  (m, 1H, NH), 8.35-8.31 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 8.10-7.99 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.89-7.86 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.69-7.63 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.46-7.34 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.25-7.21 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.87-6.80 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.05-6.00 (m, 1H, 1'-H), 5.82-5.74 (m, 1H, CH), 5.27 (bs, 1H, 3'-OH), 4.46-4.41 (m 2H, 3'-H, 4'-H), 3.74-3.73 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.34 (bs, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.26-3.20 (m, 2H, 2x 5'-H), 1.66 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75,5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 158.0, 158.0, 154.3, 153.2, 152.3, 152.2, 152.0, 150.0, 148.8, 144.8, 140.4, 139.9, 139.6, 135.5, 135.5, 135.3, 133.5, 129.8, 129.6, 127.7, 127.7, 127.6, 126.6, 123.6, 119.7, 113.1, 85.6, 85.5, 83.5, 81.8, 69.0, 63.5, 57.7, 57.7, 55.0, 44.7, 30.7, 21.4$  ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  733,29804, gefunden 733,29694 ( $\Delta m = 0,0011$ , Fehler 1,5 ppm).

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-N-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methyladenosin (67)**



122 mg (0,167 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-N-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methyladenosin wurden unter Argonatmosphäre in 4 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Hierzu wurden 145  $\mu$ L Diisopropylethylamin (0,83 mmol, 5 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 75  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (0,33 mmol, 2 eq.) hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1→2:1). Die Säule wurde mit dem angegebenen Laufmittel unter Zusatz von 0,5 %  $NEt_3$  gepackt. Als Produkt wurde ein gelblicher Schaum erhalten.

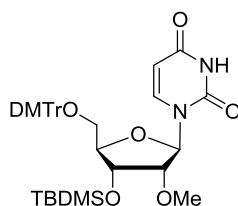
**Ausbeute:** 112 mg (0,12 mmol, 72 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,65 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.69-8.68 (m, 1H, NH), 8.37-8.33 (m, 1H, H2), 7.98-7.92 (m, 1H, H8), 7.87-7.84 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.67-7.62 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.45-7.37 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.35-7.29 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.23-7.17 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.84-6.79 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.03-6.02 (m, 1H, 1'-H), 5.78-5.72 (m, 1H, CH), 4.69-4.60 (m, 2H, 3'-H, 2'-H), 4.19-4.08 (m, 1H, 4'-H), 3.83-3.77 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.72-3.70 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.64-3.48 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, CH), 2.78-2.75 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.62-2.58 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.32-3.19 (m, 5H, OCH<sub>3</sub>, 2x 5'-H), 1.64 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.22-1.00 (m, 12H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (121.4 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 149.4, 149.2 ppm.



**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-O-methyluridin (75)**

$C_{37}H_{46}N_2O_8Si$   
674,86 g/mol

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methyluridin (0,89 mmol) wurden zusammen mit 152 mg Imidazol (2,23 mmol, 1,5 eq.) unter Argonatmosphäre in 8 mL trockenem DMF gelöst. Hierzu wurden 250 mg TBDMS-Cl (1,66 mmol, 1,86 eq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 45 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mL Ethanol beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan gelöst und die organische Phase nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über  $MgSO_4$  und Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v). Es wurde ein farbloser Nukleosidschaum erhalten.

**Ausbeute:** 569 mg (0,84 mmol, 95 %)

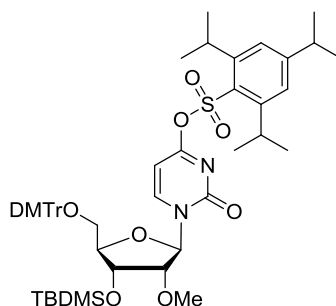
**R<sub>f</sub>:** 0,24 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 11.39 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.38-7.30 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.27-7.22 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.91-6.88 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.79 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, 1'-H), 5.29 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 4.33-4.30 (m, 1H, 3'-H), 3.93-3.89 (m, 1H, 4'-H), 3.86-3.84 (m, 1H, 2'-H), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.42-3.38 (m, 4H, 5'-H, OCH<sub>3</sub>), 3.21-3.17 (m, 1H, 5'-H), 0.76 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.03 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), -0.05 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 163.0, 158.2, 150.2, 144.4, 140.4, 135.2, 135.0, 129.8, 129.8, 127.8, 127.8, 126.8, 113.2, 101.4, 87.7, 86.0, 82.2, 82.2, 69.5, 61.8, 57.7, 55.0, 25.5, 17.6, -4.7, -5.3 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für  $C_{37}H_{46}N_2O_8Na$  [M+Na]<sup>+</sup> 697,29156, gefunden 697,29297 ( $\Delta m$  = 0,0014, Fehler 2 ppm).

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-(*tert*butyldimethylsilyl)-4-O-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-2'-O-methyluridin (76)**



$C_{52}H_{68}N_2O_{10}SSi$   
941,25 g/mol

296 mg (0,44 mmol) **75** wurden zusammen mit 5 mg DMAP (0,04 mmol, 0,1 eq.) unter Argonatmosphäre in 4 mL Dichlormethan gelöst. Es wurden 380  $\mu$ L (2,19 mmol, 5 eq.) Diisopropylethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung auf 0°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 240 mg Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (0,792 mmol, 1,8 eq.) zugegeben und anschließend 15 Minuten bei 0°C und dann 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert und die organische Phase über  $MgSO_4$  getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1→5:1→4:1 v/v). Es wurde ein farbloser Nukleosidschaum erhalten.

**Ausbeute:** 414mg (quantitativ)

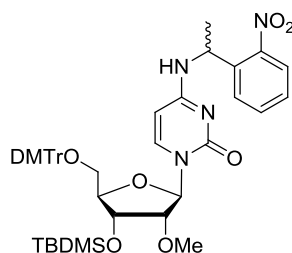
**R<sub>f</sub>:** 0,61 (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $CD_3CN$ ):  $\delta$  = 8.58 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.40-7.38 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.35 (s, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.32-7.25 (m, 7H,  $H_{ar}$ ), 6.87-6.85 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 5.76-5.75 (m, 1H, 1'-H), 5.64 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H,  $H_{ar}$ ), 4.36-4.33 (m, 1H, 3'-H), 4.20 (sep,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, CH), 4.06-4.02 (m, 1H, 4'-H), 3.77 (s, 6H,  $OCH_3$ ), 3.73-3.72 (m, 1H, 2'-H), 3.57 (dd,  $J$  = 11.3 Hz,  $J$  = 2 Hz, 1H, 5'-H), 3.53 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.33 (dd,  $J$  = 11.3 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 1H, 5'-H), 2.97 (sep,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, CH), 1.29-1.24 (m, 18H, 6x  $CH_3$ ), 0.77 (s, 9H,  $SiC(CH_3)_3$ ), 0.03 (s, 3H,  $SiCH_3$ ), -0.06 (s, 3H,  $SiCH_3$ ) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 168.0, 160.0, 159.9, 156.2, 154.5, 152.0, 148.5, 145.5, 136.3, 136.2, 131.9, 131.3, 131.3, 129.2, 129.0, 128.2, 125.4, 114.2, 95.3, 90.8, 87.7, 84.2, 83.5, 69.8, 61.7, 58.9, 56.0, 35.0, 30.5, 26.0, 24.7, 23.7, 18.6, -4.2, -4.9 ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{52}H_{68}N_2O_{10}SiNa$   $[M+Na]^+$  963,42561, gefunden 963,42242 ( $\Delta m$  = 0,0032, Fehler 3,3 ppm).

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-(tertbutyldimethylsilyl)-4-N-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methylcytidin (77a)**



C<sub>45</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>Si  
823,04 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurde **76** (5,68 g, 6 mmol) in 80 mL wasserfreiem DMF gelöst. Hierzu wurden 1,74 g (9,65 mmol, 1,6 eq.) 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin gegeben und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Da keine vollständige Umsetzung erfolgt war, wurde für 5 Std. auf 75°C erhitzt und danach für weitere 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Es wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 2:1→1:1 v/v). Als Produkt wurde ein hellgelber Nukleosidschaum erhalten.

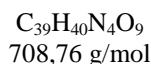
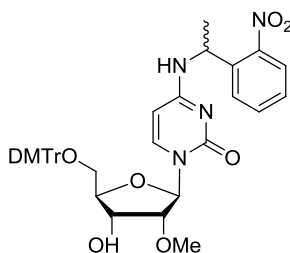
**Ausbeute:** 4,03 g (4,89 mmol, 82 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,29 (Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.43-8.40 (m, 1H, NH), 7.96-7.89 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.77-7.59 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.46 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.38-7.30 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.28-7.21 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.99-6.81 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.77-5.71 (m, 1H, 1'-H), 5.61-5.58 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.48-5.54 (m, 1H, CH), 4.31-4.25 (m, 1H, 3'-H), 3.91-3.88 (m, 1H, 4'-H), 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.62-3.59 (m, 1H, 2'-H), 3.46-3.43 (m, 1H, 5'-H), 3.41-3.37 (m, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.14-3.10 (m, 1H, 5'-H), 1.51-1.47 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.72-0.71 (m, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0.01 - -0.12 (m, 6H, SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 162.4, 158.2, 154.3, 154.2, 148.2, 148.1, 144.4, 140.2, 140.0, 139.8, 139.7, 135.2, 135.1, 135.0, 133.7, 129.8, 129.7, 128.0o, 127.8, 127.7, 127.4, 126.7, 124.1, 113.2, 113.2, 94.1, 88.4, 85.9, 83.1, 82.8, 81.4, 69.3, 69.1, 57.6, 55.0, 45.1, 25.5, 21.7, 17.6, -4.8, -5.4 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>45</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>SiNa [M+Na]<sup>+</sup> 845,35523, gefunden 845,35158 (Δ*m* = 0,00365, Fehler 4,3 ppm).

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-4-N-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methylcytidin (77b)**

**77a** (3,83 g, 4,65 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in 80 mL trockenem THF gelöst. Hierzu wurden 13,9 mL einer TBAF-Lösung (1 M in THF, 13,9 mmol) getropft und die Reaktionsmischung wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 99:1→98:2→97:3→96:4 v/v). Als Produkt wurde ein leicht bräunlicher Nucleosidschaum erhalten.

**Ausbeute:** 3,13 g (4,42 mmol, 95 %)

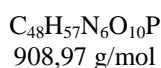
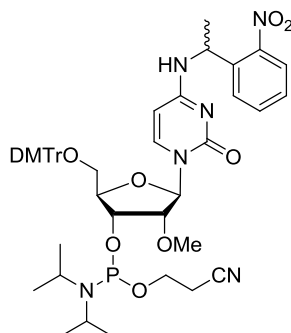
**R<sub>f</sub>:** 0,28 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.42 (d, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 7.95-7.91 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.81-7.60 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.46 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.40-7.31 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.27-7.25 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.92-6.90 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.78-5.73 (m, 1H, 1'-H), 5.62-5.58 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.55-5.48 (m, 1H, CH), 5.11-5.07 (m, 1H, 3'-OH), 4.21-4.12 (m, 1H, 3'-H), 3.92-3.91 (m, 1H, 4'-H), 3.75 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.61-3.56 (m, 1H, 2'-H), 3.43-3.39 (m, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.26-3.25 (m, 2H, 5'-H), 1.51-1.48 (m, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 162.4, 158.1, 154.3, 154.3, 148.2, 148.1, 144.7, 14.0, 139.8, 139.7, 135.4, 135.4, 135.2, 135.2, 133.7, 133.6, 129.7, 128.0, 128.0, 127.9, 127.7, 127.5, 127.4, 126.8, 124.1, 124.1, 113.2, 94.2, 94.1, 87.7, 87.5, 85.8, 83.4, 83.1, 81.7, 81.6, 68.3, 68.2, 62.2, 62.1, 57.7, 57.7, 55.0, 45.1, 45.0, 21.9, 21.7 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>39</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>K [M+K]<sup>+</sup> 747,24269, gefunden 747,24227 (Δ*m* = 0,00042, Fehler 0,6 ppm).

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4-N-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methylcytidin (69)**



350 mg (0,49 mmol) **77b** wurden unter Argonatmosphäre in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Hierzu wurden 430  $\mu$ L (2,47 mmol, 5 eq.) Diisopropylethylamin gegeben und die Reaktionsmischung fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 130  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (0,59 mmol, 2 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1→2:1→1:1 v/v). Es wurde ein farbloser Schaum erhalten.

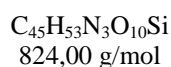
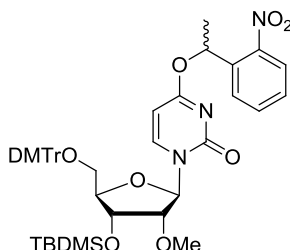
**Ausbeute:** 202 mg (0,22 mmol, 45 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,50 (Cyclohexan/Aceton 2:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 8.43-8.42 (m, 1H, NH), 7.95-7.87 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.81-7.68 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.65-7.59 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.46 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.40-7.31 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.29-7.21 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.92-6.87 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.83-5.74 (m, 1H, 1'-H), 5.61-5.44 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.51-5.46 (m, 1H, CH), 4.44-4.28 (m, 1H, 3'-H), 4.07-4.03 (m, 1H, 4'-H), 3.79-3.68 (m, 8H, OCH<sub>3</sub>, 2'-H, 1x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.60-3.47 (m, 3H, 2x CH, 1x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.42-3.36 (m, 4H, OCH<sub>3</sub>, 1x 5'-H), 3.27-3.20 (m, 1H, 1x 5'-H), 2.77-2.74 (m, 1H, 1x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.60-2.55 (m, 1H, 1x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 1.50-1.49 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14-0.92 (m, 12H, 4x CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (121.4 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 149.2, 149.0, 149.0 ppm.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-(tertbutyldimethylsilyl)-4-O-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methyluridin (81)**



1g (1,48 mmol) **75** und 582 mg Triphenylphosphin (2,22 mmol, 1,5 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 20 mL trockenem THF gelöst. Dazu wurden nacheinander 371 mg 1-(2-Nitrophenyl)ethanol und 1,02 mL DEAD (40 % in Toluol, 2,22 mmol, 1,5 eq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung und ges. wässriger  $NaCl$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1→4:1 v/v). Das Produkt und das N-alkylierte Regioisomer wurden als gelbe bis bräunliche Schäume erhalten.

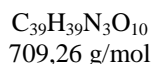
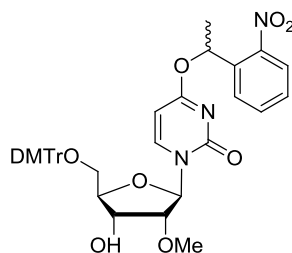
**Ausbeute:** 592 mg (0,72 mmol, 48 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,68 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 8.27 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.00-7.98 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.74-7.71 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.54 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.37-7.32 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.28-7.20 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.91-6.88 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.46 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH), 5.73-5.72 (m, 1H, 1'-H), 5.65 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 4.33-4.29 (m, 1H, 3'-H), 3.97-3.94 (m, 1H, 4'-H), 3.74-3.73 (m, 7H, OCH<sub>3</sub>, 2'-H), 3.47-3.40 (m, 4H, 5'-H, OCH<sub>3</sub>), 3.21-3.18 (m, 1H, 5'-H), 1.68 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.73 (bs, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.00 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), -0,09 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 169.6, 158.2, 158.2, 153.7, 147.6, 144.3, 136.8, 135.0, 134.8, 134.0, 129.8, 129.7, 129.6, 128.9, 127.8, 127.8, 127.3, 126.9, 124.2, 113.2, 113.2, 94.2, 89.0, 86.0, 82.7, 81.7, 69.3, 68.9, 61.1, 57.7, 55.0, 25.4, 21.5, 17.5, -4.8, -5.4 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für  $C_{45}H_{53}N_3O_{10}SiNa$  [M+Na]<sup>+</sup> 846,33924, gefunden 846,34119 ( $\Delta m$  = 0,00195, Fehler 2,3 ppm).

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-4-O-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methyluridin (82)**

527 mg (0,64 mmol) **81** wurden unter Argonatmosphäre in 10 mL trockenem THF gelöst. Hierzu wurden 1,92 mL einer TBAF-Lösung (1,92 mmol, 1 M in THF, 3 eq.) zugegeben und die Mischung vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bis eine vollständige Umsetzung erfolgt war. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1→3:2→1:1 v/v). Es wurde ein farbloser Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 318 mg (0,72 mmol, 70 %)

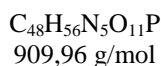
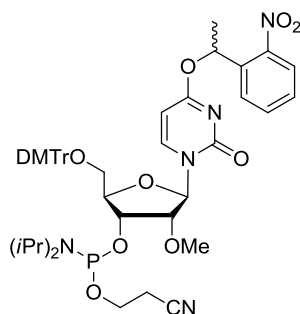
**R<sub>f</sub>:** 0,36 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.15-8.11 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.03-7.98 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.81-7.71 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.61-7.54 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.39-7.30 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.26-7.24 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.91-6.89 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.49-6.45 (m, 1H, CH), 5.77-5.73 (m, 1H, 1'-H), 5.68-5.66 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.19-5.14 (m, 1H, 3'-OH), 4.21-4.17 (m, 1H, 3'-H), 4.00-3.96 (m, 1H, 4'-H), 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.70-3.66 (m, 1H, 2'-H), 3.46-3.42 (m, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.34-3.26 (m, 2H, 5'-H), 1.69-1.65 (m, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 169.6, 169.6, 158.2, 153.9, 153.8, 147.6, 147.5, 144.6, 144.6, 144.3, 144.2, 136.8, 136.6, 135.4, 135.4, 135.0, 134.0, 129.8, 129.8, 129.0, 129.0, 128.9, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 126.8, 124.3, 124.2, 113.3, 112.8, 94.3, 88.4, 85.9, 83.2, 83.0, 82.0, 69.4, 69.3, 68.1, 68.0, 57.9, 57.8, 55.0, 62.0, 61.9, 21.6, 21.5 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>39</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>K [M+K]<sup>+</sup> 748,22670, gefunden 748,22752 (Δ*m* = 0,0008, Fehler 1,1 ppm).

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4-O-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-O-methyluridin (83)**



160 mg (0,225 mmol) **82** wurden unter Argonatmosphäre in 5,5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Hierzu wurden 195  $\mu$ L Diisopropylethylamin (1,13 mmol, 5 eq.) und nach fünf Minuten Rühren bei Raumtemperatur 100  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (0,45 mmol, 2 eq.) zugetropft. Die Lösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit ges. wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde erneut mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1  $\rightarrow$  2:1 v/v). Es wurde ein farbloser Nukleosidschaum erhalten.

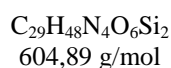
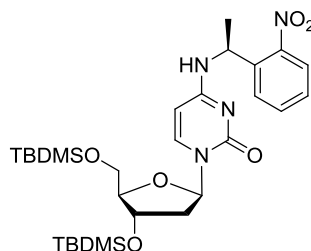
**Ausbeute:** 155 mg (0,17 mmol, 76 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,38 (Cyclohexan/Aceton 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 8.22-8.12 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 8.03-7.98 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.81-7.71 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.61-7.54 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.40-7.20 (m, 9H, H<sub>ar</sub>), 6.92-6.87 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.48-6.44 (m, 1H, CH), 5.81-5.73 (m, 1H, 1'-H), 5.70-5.60 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 4.47-4.27 (m, 1H, 3'-H), 4.13-4.09 (m, 1H, 4'-H), 3.90-3.84 (m, 1H, 2'-H), 3.75-3.74 (m, 7H, 2x OCH<sub>3</sub>, 1x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.63-3.47 (m, 3H, 1x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, 2x CH), 3.40-3.29 (m, 5H, OCH<sub>3</sub>, 2x 5'-H), 2.79-2.56 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 1.68-1.65 (m, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.24-0.92 (m, 12H, 4x CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (121.4 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 149.5, 149.4, 148.9, 148.8 ppm.



4.1.3.3 Synthese des *S*-NPE-geschützten Desoxycytidin-Amidits3',5'-*O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-4-*N*-((*S*)-1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxycytidin (**63**)

Zu einer Lösung von 2,5 g (3,46 mmol) **50** in 35 mL trockenem DMF wurden unter Argonatmosphäre 1,8 mL (10 mmol, 3eq.) Diisopropylethylamin gegeben. (*S*)-1-(2-Nitrophenyl)ethylamin Hydrochlorid (911 mg, 4,49 mmol) **62** wurde in einer Mischung aus 5 mL DMF und 0,79 mL Diisopropylethylamin (4,49 mmol) gelöst. Diese Mischung wurde zur Lösung von **50** mit einer Spritze zugetropft. Es wurde für 18 Std. bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 4:1→1:2 v/v). Als Produkt wurde ein blassgelber, amorpher Feststoff erhalten.

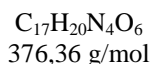
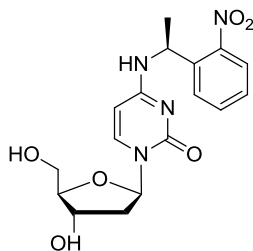
**Ausbeute:** 1,64 g (2,71 mmol, 78 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,28 (Dichlormethan/Ethylacetat 2:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>): δ = 7.96-7.89 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.82-7.73 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.70-7.64 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.57-7.45 (m, 2H, CH, NH), 6.21 (dd,  $J_1 = J_2 = 6.3$  Hz, 1H, 1'-H), 5.84 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.76-5.70 (m, 1H, CH), 4.49-4.44 (m, 1H, 3'-H), 3.89-3.84 (m, 3H, 4'-H, 5'-H), 2.26-2.17 (m, 1H, 2'-H), 2.01-1.96 (m, 1H, 2'-H), 1.58 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.89-0.92 (2s, 18H, 2x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.09-0.11 (12H, SiCH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 163.8, 155.6, 149.8, 141.0, 134.6, 128.7, 125.1, 94.8, 88.2, 86.3, 72.6, 63.5, 46.6, 42.2, 26.3, 26.1, 22.3, 18.9, 18.5, -4.5, -4.7, -5.3, -5.3 ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>K [M+K]<sup>+</sup> 643,27440, gefunden 643,27424 (Δm = 0,0002, Fehler 0,2 ppm).

**4-N-((S)-1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxycytidin (64)**

1,62 g (2,68 mmol) **63** wurden unter Argonatmosphäre in 25 mL trockenem THF gelöst. 8 mL TBAF Lösung (8 mmol, 1 M in THF, 3 eq.) wurden hinzugefügt und die Lösung wurde für 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 95:5→9:1). Es wurde ein farbloser Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 919 g (2,44 mmol, 91 %)

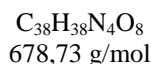
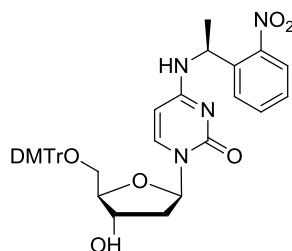
**R<sub>f</sub>:** 0,25 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.40 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.93-7.91 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.73-7.70 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.65-7.63 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.51-7.47 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.07 (dd, *J*<sub>1</sub> = *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.53-5.46 (m, 1H, CH), 5.16 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, 3'-OH), 4.94 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, 5'-OH), 4.17-4.14 (m, 1H, 3'-H), 3.76-3.73 (m, 1H, 4'-H), 3.57-3.49 (m, 2H, 5'-H), 2.06-2.00 (m, 1H, 2'-H), 1.88-1.82 (m, 1H, 2'-H), 1.48 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 162.4, 154.6, 148.1, 140.4, 139.8, 133.7, 128.9, 127.5, 124.1, 94.3, 87.2, 84.9, 70.4, 61.4, 44.9, 40.2, 21.8 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 377,14556, gefunden 377,14549 (Δ*m* = 0,00007, Fehler 0,2 ppm).

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-4-N-((S)-1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxycytidin (65)**



**64** (886 mg, 2,35 mmol) wurde zweimal mit je 20 mL Pyridin coevaporiert. Der Rückstand wurde unter Argonatmosphäre in 40 mL trockenem Pyridin gelöst. 1,04 g (3,06 mmol, 1,3 eq.) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol beendet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit 5 %iger wässriger Zitronensäure-Lösung und ges. wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 99:1→96:4 v/v). Ein leicht violetter Schaum wurde erhalten.

**Ausbeute:** 1,31 g (1,93 mmol, 82 %)

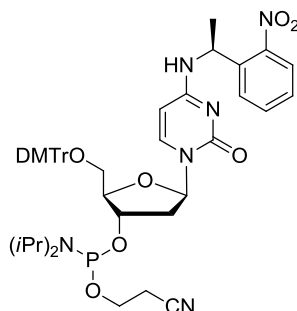
**R<sub>f</sub>:** 0,22 (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.37 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, NH) 7.94-7.92 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.77-7.71 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.65-7.61 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.48 (m, 1H, CH), 7.38-7.36 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.32-7.29 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.26-7.23 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.90-6.88 (m, 4H, H<sub>ar</sub>) 6.10 (dd,  $J_1 = J_2 = 6.3$  Hz, 1H, 1'-H), 5.67 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.54-5.48 (m, 1H, CH), 5.25 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, 3'-OH), 4.23-4.18 (m, 1H, 3'-H), 3.87-3.84 (m, 1H, 4'-H), 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.19-3.18 (m, 2H, 5'-H), 2.15-2.10 (m, 1H, 2'-H), 1.99-1.92 (m, 1H, 2'-H), 1.49 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 163.3, 158.1, 154.4, 148.1, 144.7, 140.0, 139.7, 135.4, 135.3, 133.7, 129.7, 128.0, 127.8, 127.7, 127.5, 126.7, 124.1, 113.2, 94.2, 85.7, 85.2, 84.6, 70.0, 63.4, 55.0, 44.9, 40.1, 21.8 ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{38}H_{38}N_4O_8K$   $[M+K]^+$  717,23212, gefunden 717,23259 ( $\Delta m$  = 0,0005, Fehler 0,7 ppm).

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4-*N*-((*S*)-1-(2-nitrophenyl)ethyl-2'-desoxycytidin (66)**



C<sub>47</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P  
878,95 g/mol

201 mg (0,296 mmol) **65** wurden unter Argonatmosphäre in 8 mL trockenem Dichloromethan gelöst. Nacheinander wurden 260 µL (1,48 mmol, 5 eq.) Diisopropylethylamin und 130 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (0,59 mmol, 2 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt, dann mit 15 mL Dichlormethan verdünnt und mit ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 2:1→3:2). Die Säule wurde mit dem angegebenen Lösungsmittel unter Zusatz von 0,5 % NEt<sub>3</sub> gepackt. Ein farbloser Schaum wurde erhalten.

**Ausbeute:** 190 mg (0,216 mmol, 73 %)

**R<sub>f</sub>:** 0,44 (Cyclohexan/Aceton 1:1 v/v)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>): δ = 7.94-7.90 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.79-7.66 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.46 (m, 3H, NH, H<sub>ar</sub>), 7.40-7.21 (m, 8H, H<sub>ar</sub>), 6.93-6.88 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.23 (dd, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 6 Hz, 1H, 1'-H), 5.76-5.70 (m, 1H, CH), 5.66 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 4.70-4.60 (m, 1H, 3'-H), 4.17-4.12 (m, 1H, 4'-H), 3.80 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.75-3.58 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, CH), 3.43-3.35 (m, 2H, 5'-H), 2.64-2.60 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.46-2.37 (m, 1H, 2'-H), 2.22-2.11 (m, 1H, 2'-H), 1.57 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.14 (m, 12H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (101.3 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>): δ = 148.3 ppm.

## 4.2 Oligonukleotidsynthese

### 4.2.1 Festphasensynthese

RNA und DNA-Oligonukleotide wurden an einem ABI 392 RNA/DNA Synthesizer der Firma *Applied Biosystems* synthetisiert. Unmodifizierte Oligonukleotide wurden teilweise von *IBA GmbH* bzw. der Firma *Metabion* HPLC-gereinigt bezogen. Ein AntimiR-Oligonukleotid für die Mismatch-Studien wurde von *VBCBiotech* in Wien erworben. Für die Synthese wurden Reagenzien der Firmen *SAFC*, *Linktech*, *ChemGenes*, *Mallinckrodt Baker Inc.* und *Applied Biosystems* verwendet. Als Festphasenmaterial dienten ABI LV200 Polystyrol- bzw. 1000 Å CPG-Säulen der Firma *Applied Biosystems* sowie spezielle Säulen der Firmen *Linktech* (2'-OMe-CPG Säulen) und *ChemGenes* (3'-Amino Modifier C-6 CPG). Es wurden folgende Reagenzien zur Synthese verwendet: Detritylierung: 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan, Aktivierung: 0,25 M 5-Ethylthiotetrazol in Acetonitril oder 0,3 M 5-Benzylthiotetrazol in Acetonitril, Capping: CapA: 10 % Essigsäureanhydrid in THF, CapB: Methylimidazol in THF, Oxidation: 0,02 M Iod in Pyridin/THF/Wasser, Beschwefelungsreagenz für Thioate: 0,5 M Beaucage Reagenz in Acetonitril. Die Synthesen wurden alle im „DMTr-On“-Modus durchgeführt, um die anschließende Aufreinigung per RP-HPLC zu erleichtern. Die exozyklischen Aminogruppen waren in der Regel mit einer Benzoyl- (Adenosin), einer Acetyl- (Cytidin) und einer Dimethylformamidin-Schutzgruppe (Guanosin) versehen. Alle eingesetzten Phosphoramidite wurden als 0,1 M Lösung in Acetonitril eingesetzt. Für die selbst hergestellten modifizierten Phosphoramidite wurden in der Regel die gleichen Synthesesyklen verwendet wie für die gekauften. Im Fall der selbst hergestellten modifizierten 2'-OMe Amidite wurde die Kopplungszeit von sechs auf 15 Minuten verlängert.

### 4.2.2 Abspaltung & Aufreinigung

#### 4.2.2.1 Abspaltung vom Festphasenmaterial & Entschützung

Zur Abspaltung der Oligonukleotide von der festen Phase und Entfernung aller basenlabilen Schutzgruppen wurde das Festphasenmaterial in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µL NH<sub>3</sub> (33 % wässrige Lösung) versetzt. Bei Synthesen in größerem Maßstab als 200 nmol wurde die NH<sub>3</sub>-Menge entsprechend angepasst. In der Regel wurde das Festphasenmaterial entweder für 16 Std. über Nacht bei Raumtemperatur oder für 4 Std. bei 65°C im Thermoschüttler mit der Abspaltungslösung inkubiert. Nach der Entschützung wurde die Ammoniak-Lösung in der Vakuumzentrifuge (*Fa. Eppendorf*) entfernt, das Oligonukleotid in MilliQ-Wasser aufgenommen und per RP-HPLC aufgetrennt. Die gesammelten Produktfraktionen wurden anschließend wieder

in der Vakuumzentrifuge eingeengt. Darauf wurde die DMTr-Schutzgruppe am 5'-Ende mithilfe von Essigsäure (80 % aq.) abgespalten. Dazu wurde die Probe mit 125 µL Essigsäure (200 nmol Synthese) versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte nach Einengen der Essigsäure eine erneute Aufreinigung per RP-HPLC.

#### 4.2.2.2 Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC)

Alle HPLC-Experimente wurden an drei verschiedenen Geräten der 1200er Serie der Firma Agilent durchgeführt. Zur Aufreinigung der Oligonukleotide wurde immer ein Gemisch aus Acetonitril und 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA) mit einem pH-Wert von 7,0 verwendet. Es wurden verschiedene Gradienten zur Aufreinigung verwendet. Die Umkehrphasen-HPLC trennt Oligonukleotide nach Polarität und vermag daher nicht unterschiedlich lange unmodifizierte Oligonukleotide aufzutrennen. Daher eignet sie sich nur zur Aufreinigung modifizierter Oligonukleotide bzw. wenn man die Oligonukleotide im sogenannten DMTr-On Modus synthetisiert. Hierbei verbleibt die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids, was zu einer erniedrigten Polarität und somit zu einer höheren Retentionszeit führt. Dies ermöglicht es, das Volllängenprodukt von den Abbruchsequenzen abzutrennen. Nach der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe erfolgt eine weitere Aufreinigung per RP-HPLC. Bei photolabil geschützten Sequenzen können so Sequenzen, die nicht alle photolabilen Schutzgruppen tragen, von dem gewünschten Produkt abgetrennt werden. Dies ist nötig, da nicht alle photolabilen Schutzgruppen vollständig gegenüber den basischen Bedingungen der Abspaltungsreaktion stabil sind.

#### 4.2.3 Analytik von Oligonukleotiden

Nach Eindampfen der produkthaltigen Oligonukleotid-Fractionen wurden diese in einer definierten Menge MilliQ-Wasser gelöst und die Konzentration UV-spektroskopisch entweder an einem Evolution 300 UV-Vis-Spektrophotometer oder an einer NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific Inc.*) bestimmt. Die Identität der Oligonukleotide wurde per HPLC-MS an einem micrOTOF-Q-Gerät der Firma *Bruker* mit einem HPLC-System 1200 der Firma *Agilent* bestätigt. Zum Teil wurde zur Massenbestimmung von Oligonukleotiden auch ein MALDI-MS an einem Voyager DE-PRO-Gerät der Firma *Applied Biosystems* gemessen. Als Matrix wurde 3-Hydroxypicolinsäure eingesetzt.

##### 4.2.3.1 Schmelzpunktbestimmung

Für die Bestimmung der Schmelzpunkte wurde das Evolution 300 Spektrophotometer mit einer 1 mL Küvette mit Innentemperaturfühler verwendet. Es wurden je 3 Heiz- und Kühlcyclen zur Auswertung herangezogen. Im Allgemeinen wurde zwischen 15 und 75 °C mit einem

Temperaturanstieg von 1 °C/min gemessen. Für die Bestimmung der Schmelzpunkte der Oligonukleotid-Duplexe aus Abschnitt 3.1 wurden Lösungen mit 1 µM des modifizierten Strangs und 1 µM des Gegenstrangs in 1x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) verwendet. Für die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Schmelzpunkte wurde ein Puffer aus 122 mM KCl, 100 mM K<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,8) mit einer Gesamtkonzentration an K<sup>+</sup> von 250 mM verwendet. Die Schmelzpunkte wurden durch Bestimmung des Wendepunkts aus der Auftragung der Absorption gegen die Temperatur ermittelt. Zur Auswertung wurden die Rohdaten mit MS Origin bearbeitet.

## 4.3 Projektbezogene Methoden & Analytik

### 4.3.1 Wellenlängenselektives Entschützen

#### 4.3.1.1 ESI-MS-Daten der synthetisierten Oligonukleotide

**Tabelle 8:** Sequenzen und ESI-MS-Daten der synthetisierten photolabil geschützten Benchmrk-Sequenzen.

Sequenz	Masse ber. [Da]	Masse erh. [Da]
5'-GCA TAA AC <sup>NDBF</sup> A AAG GTG-3'	4870,9	4871,0
5'-GCA TAA AA <sup>NDBF</sup> A AAG GTG-3'	4894,9	4895,0
5'-GCA TAA AA <sup>NPE</sup> A AAG GTG-3'	4804,9	4805,0
5'-GCA TAA AC <sup>NPE</sup> A AAG GTG-3'	4780,9	4781,0

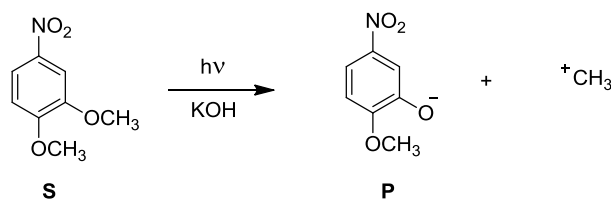
Die unmodifizierten Gegenstränge für die Schmelzpunktstudien wurden von Metabion HPLC-gereinigt bestellt.

#### 4.3.1.2 UV-Vis-Spektren

UV-Vis-Spektren zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten aus Abschnitt 3.1 wurden ebenfalls am Evolution 300 Spektrophotometer aufgenommen. Es wurde eine 4 µM Lösung für den Wellenlängenbereich zwischen 200 und 300 nm und eine 40 µM Lösung für den Wellenlängenbereich zwischen 300 und 600 nm verwendet (jeweils in 1x PBS, pH 7,4). Die erhaltenen Spektren wurden digital geglättet („smoothing: very high“).

### 4.3.1.3 Quantenausbeuten

Zur Bestimmung der Quantenausbeuten wurde eine LED ( $\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$ , 20 mW) mit Küvettenhalter von *Thorlabs* verwendet. Die Quantenausbeuten aus Abschnitt 3.1 wurden mithilfe der DMNB-Actinometrie nach Zhang et al. bestimmt.<sup>[136]</sup> Es wurde hierfür eine ca. 100  $\mu\text{M}$  Lösung von Dimethoxynitrobenzol ( $\phi = 0,116$ ) in 0,5 M wässriger KOH hergestellt, die endgültige Konzentration wurde UV-spektrometrisch bestimmt.



**Abbildung 85:** Reaktionsgleichung der Photolyse von Dimethoxynitrobenzol (S) in wässriger KOH ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ).

Es wurde nun für definierte Zeitpunkte bestrahlt und jeweils die Absorption gemessen. Für Messungen in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke gilt:

$$A(t) = c_S(t) \cdot \varepsilon_S + c_P(t) \cdot \varepsilon_P$$

**Formel 10:** Formel zur Bestimmung der Absorption einer bestrahlten DMNB-Lösung.  $C_S(t)$  = Konzentration Edukt;  $\varepsilon_S$  = Extinktionskoeffizient Edukt;  $c_P$  = Konzentration Produkt;  $\varepsilon_P$  = Extinktionskoeffizient Produkt.

Beschreibt man  $c_P(t)$  als Funktion von der Ausgangskonzentration  $c_S(t_0)$  und löst nach  $c_S(t)$  auf, so erhält man:

$$c_S(t) = \frac{A(t) - c_P(t) \cdot \varepsilon_P}{\varepsilon_S - \varepsilon_P}$$

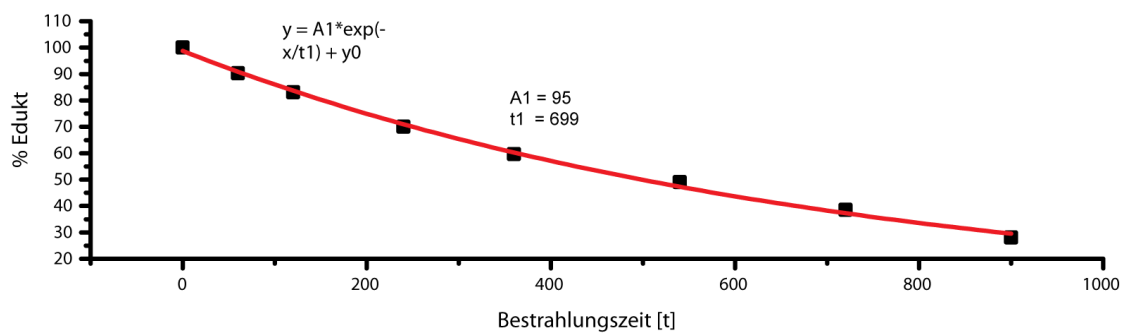
**Formel 11:** Bestimmung der Konzentration des Ausgangsmaterials zum Zeitpunkt t in Abhängigkeit der Absorption.

Mit den bekannten Extinktionskoeffizienten des Edukts **S** ( $5680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und des Produkts **P** ( $2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) lässt sich somit die verbleibende Konzentration des Startmaterials für jede Bestrahlungszeit t bestimmen. Aus einer Auftragung der Konzentration des Startmaterials gegen die Bestrahlungszeit lässt sich durch einen exponentiellen Fit aus der Anfangssteigung der photolytische Umsatz in pmol/s bestimmen. Mithilfe der bekannten Quantenausbeute und Formel 1 lässt sich daraus die Zahl der Photonen errechnen, die von der LED emittiert werden.



$$n_p = \frac{\Delta n_s}{\phi \cdot A_{\text{rel}}}$$

Zur Bestimmung der Quantenausbeuten der modifizierten Oligonukleotide wurden jeweils 13  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit 20  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid und einem internen Standard aus Uracil und Uridin in 1x PBS bestrahlt. Es wurden jeweils mindestens neun verschiedene Bestrahlungszeiten gewählt. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt. Die verbleibende Menge Startmaterial wurde per RP-HPLC durch Vergleich der Integrale des Startmaterials zwischen bestrahlter und unbestrahlter Probe bestimmt. Es wurde jeweils auf den internen Standard normiert, um den Pipettierfehler zu minimieren. Der Umsatz in  $\text{pmol/s}$  wurde mithilfe eines exponentiellen Fits aus der Anfangssteigung der unten dargestellten Auftragung bestimmt.



**Abbildung 86:** exponentieller Fit zur Bestimmung des Umsatzes in  $\%/s$  ( $\text{pmol/s}$ ) des mit  $\text{dC}^{\text{NPE}}$  modifizierten Oligonukleotids.

Die Anfangssteigung wird durch Differenzieren der Fitformel und Einsetzen von  $x = 0$  erhalten. Aus dem erhaltenen Wert wurde mithilfe von Formel 1 die Quantenausbeute ermittelt.

#### 4.3.1.4 Wellenlängenselektives Entschützen

Zum wellenlängenselektiven Entschützen wurde ein speziell angefertigtes Multi-LED-Gerät mit LEDs der *Fa. Roithner Lasertechnik* verwendet. Es wurde eine LED bei 440 nm (30 mW) benutzt. Für das wellenlängenselektive Entschützen wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  einer Mischung aus einem NPE- und einem NDBF-geschützten Oligonukleotid (je 2  $\mu\text{M}$  Konzentration) mit internem Standard in 1x PBS bestrahlt. Die Bestrahlung wurde in Probenröhrchen der *Fa. Roth* durchgeführt. Es wurden mindestens sieben verschiedene Bestrahlungszeiten gewählt und jede Messung wurde dreimal durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte analog zu der in Abschnitt 4.3.1.1 beschriebenen Methode.

#### 4.3.1.5 Zweiphotonen-Experimente

Zweiphotonen-Experimente wurden an zwei verschiedenen Setups durchgeführt. Die ersten Experimente wurden an einem MaiTai BB Laser von *Newport-Spectraphysics* mit einem einstellbaren Wellenlängenbereich von 710-990 nm (100fs Pulsdauer, 80 MHz Repetitionsrate, 1,5 W Maximalleistung) vorgenommen. Die Versuche zur Quantifizierung des Zweiphotonenwirkungsquerschnitts wurden im AK Wachtveitl an einem Tsunami HP Femtosekundenlaser von *Newport-Spectraphysics* durchgeführt.

### 4.3.2 NMR-Iminoprotonen Experimente

#### 4.3.2.1 HPLC-Aufreinigung

Die Abspaltung von der festen Phase und Detritylierung erfolgte gemäß Standardprotokoll aus Abschnitt 4.2.2. Zur Aufreinigung per RP-HPLC wurden zwei verschiedene große Nucleosil 100-5 C18 Säulen verwendet (4,6 x 250 mm und 20 x 250 mm). Es wurde ein Eluentensystem aus 0,1 M Triethylammoniumacetat pH 7 und Acetonitril benutzt. Es wurde ein linearer Gradient von 5% bis 40% Acetonitril in 35 Minuten für die kleine Nucleosil-Säule verwendet (Fluss: 1 mL/min). Für die große Nucleosil-Säule wurde ein linearer Gradient von 5 % bis 54,1 % Acetonitril in 38 Minuten (Fluss: 5 mL/min) benutzt.

#### 4.3.2.2 ESI-MS-Daten

**Tabelle 9:** Sequenzen und ESI-MS-Daten der synthetisierten Oligonukleotide.

Sequenz	Masse ber. [Da]	Masse erh. [Da]
5'-GCA TAT ACT AAG GTG-3'	4613,8	4614,1
5'-GCA TAT AC <sup>S-NPE</sup> T AAG GTG-3'	4762,9	4763,1
5'-GCA TAA AC <sup>S/R-NPE</sup> A AAG GTG-3'	4762,9	4763,1
5'-CAC CTT AGT ATA TGC-3'	4524,8	4525,0

#### 4.3.2.3 Probenvorbereitung für NMR-Experimente

Die Duplexe wurden gebildet, indem die jeweiligen Einzelstränge im verwendeten Puffer auf 90 °C erwärmt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Überschüssige Einzelstränge wurden durch Zentrifugation über Vivaspin 2-3000 Da Größenausschluss-Säulen („molecular weight cutoff 3000 Da“) abgetrennt. Für die Iminoprotonenaustauschexperimente und die

Schmelzpunktexperimente wurden ein Puffer mit niedriger Katalysatorkonzentration (244 mM KCl, 5 mM  $K_xH_yPO_4$ , pH 6,8) und ein Puffer mit hoher Katalysatorkonzentration (122 mM KCl, 100 mM  $K_xH_yPO_4$ , pH 6,8) verwendet. Die KCl-Konzentration wurde so gewählt, dass die Gesamtkonzentration an  $K^+$  250 mM betrug. Die NMR-Experimente für die Resonanzzuordnung wurden in einem Nidrigsalz-Puffer durchgeführt (30 mM KCl, 15 mM  $K_xH_yPO_4$ , pH 6,3).

#### 4.3.2.4 Zuordnung der Iminoprotonenresonanzen

2D 111 Echo NOESY ( $\tau_m = 150$  ms) Spektren wurden an einem 600 MHz Bruker NMR Spektrometer mit einer 5 mm HCN z-Gradient Sonde aufgenommen. Die Iminoprotonen von T4, T26 und T6 wurden mit Hilfe der Thymidin H3-Desoxyadenosin H2 Kreuzpeaks zugeordnet.

#### 4.3.2.5 Inversion recovery Experimente

Die Inversion recovery Experimente wurden wie von Steinert et al. beschrieben durchgeführt.<sup>[216]</sup> Es wurde eine 1D-Pulssequenz mit einem Inversion recovery Element und einer „hard watergate“ Wasserunterdrückung verwendet. Das Experiment wurde bei Temperaturen zwischen 278 und 323 K durchgeführt und für jede Temperatur wurden 19 verschiedene Mischzeiten von 10 ms bis 6 s verwendet. Pro Experiment wurden acht bis 128 Scans und 16000 Punkte verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mit TopSpin 2.1 analysiert. Die Analyse der Austauschraten wurde durchgeführt, wie von Rinnenthal et al. beschrieben.<sup>[149]</sup> Die normalisierten Signalintensitäten der Iminoprotonen wurden gegen die Mischzeit aufgetragen und gemäß Formel 6 gefittet (s. Abschnitt 3.2.5). Aus der Temperaturabhängigkeit der Austauschraten bei verschiedenen Katalysatorkonzentrationen wurden gemäß Formel 7 die thermodynamischen Parameter bestimmt (s. Tabellen 10, 11 und 12)

**Tabelle 10:**  $\Delta H_{\text{diss}}$ ,  $\Delta S_{\text{diss}}$  and  $\Delta G_{\text{diss}}$  ( $T = 293 \text{ K}$ ) für die Basenpaaröffnung der einzelnen Nucleobasen des unmodifizierten Duplex.  $\Delta\Delta H_{\text{diss}}$ ,  $\Delta\Delta S_{\text{diss}}$  and  $\Delta\Delta G_{\text{diss}}$  ( $T = 293 \text{ K}$ ) stellen die Fehler der Einzelwerte dar.

	$\Delta H_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta H_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{\text{diss}}$ [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta S_{\text{diss}}$ [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ] ( $T = 293 \text{ K}$ )	$\Delta\Delta G_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ] ( $T = 293 \text{ K}$ )
T28	112	4	291	20	26,5	0,3
T4	107	4	269	20	28,7	0,3
T26	114	3	286	8	30,4	0,4
T6	89	4	207	20	29,0	0,4
T24	89	5	199	20	30,5	0,6
G23	84	20	162	60	36,4	3,0
T9	75	3	157	90	28,7	0,3
T21	74	3	158	8	27,3	0,3
T20	78	3	172	8	27,6	0,2
G12	132	4	336	20	33,2	0,5
T14	70	4	189	20	14,7	0,3

**Tabelle 11:**  $\Delta H_{\text{diss}}$ ,  $\Delta S_{\text{diss}}$  and  $\Delta G_{\text{diss}}$  ( $T = 293 \text{ K}$ ) für die Basenpaaröffnung der einzelnen Nucleobasen des S-NPE-modifizierten Duplex.  $\Delta\Delta H_{\text{diss}}$ ,  $\Delta\Delta S_{\text{diss}}$  and  $\Delta\Delta G_{\text{diss}}$  ( $T = 293 \text{ K}$ ) stellen die Fehler der Einzelwerte dar.

	$\Delta H_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta H_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{\text{diss}}$ [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta S_{\text{diss}}$ [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ] ( $T = 293 \text{ K}$ )	$\Delta\Delta G_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ] ( $T = 293 \text{ K}$ )
T28	123	3	326	10	27,1	0,2
T4	112	5	282	20	29,0	0,3
T26	156	10	423	30	32,2	0,6
T6	87	6	202	20	27,8	0,4
T24	55	3	116	10	21,5	0,2
G23	91	7	211	30	29,5	0,4
T9	77	6	167	20	28,5	0,4
T21	81	6	179	20	28,5	0,4
T20	77	6	166	20	28,7	0,3
G12	120	20	298	50	32,9	0,7
T14	84	4	234	20	15,1	0,2

**Tabelle 12:**  $\Delta H_{\text{diss}}$ ,  $\Delta S_{\text{diss}}$  and  $\Delta G_{\text{diss}}$  ( $T = 293 \text{ K}$ ) für die Basenpaaröffnung der einzelnen Nucleobasen des R-NPE-modifizierten Duplex.  $\Delta\Delta H_{\text{diss}}$ ,  $\Delta\Delta S_{\text{diss}}$  and  $\Delta\Delta G_{\text{diss}}$  ( $T = 293 \text{ K}$ ) stellen die Fehler der Einzelwerte dar.

	$\Delta H_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta H_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_{\text{diss}}$ [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta S_{\text{diss}}$ [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ] ( $T = 293 \text{ K}$ )	$\Delta\Delta G_{\text{diss}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ] ( $T = 293 \text{ K}$ )
T28	108	5	278	20	27,1	0,3
T4	113	4	282	20	29,8	0,4
T26	102	4	245	20	30,0	0,6
T6	106	9	256	30	30,7	0,6
T24	88	4	203	10	28,1	0,4
G23	93	20	199	40	34,4	2,0
T9	84	7	181	30	31,3	0,7
T21	93	4	212	20	31,0	0,7
T20	99	4	228	20	31,8	0,6
G12	85	4	186	20	30,9	0,4
T14	53	2	126	5	15,6	0,2

#### 4.3.2.6 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren der Duplexe wurden in einem Puffer mit 30 mM KCl, 15 mM K<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,3) an einem JASCO Spektropolarimeter J-810 gemessen. Es wurden folgende Parameter eingestellt: spektrale Breite 220 bis 320 nm, Scan-Geschwindigkeit: 50 nm/min, Bandbreite 1 nm, Temperatur 283 K. Die Duplexkonzentrationen betragen 100  $\mu\text{M}$ . Die Integrität der NPE-modifizierten Duplexe nach der CD-Spektroskopie wurde per NMR-Spektroskopie bestätigt.

#### 4.3.2.7 Strukturmodell der modifizierten Duplexe

Für die Strukturrechnung wurden NOE-basierte Abstandsdaten verwendet und mithilfe von <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>-Kopplungen validiert. Neben den experimentell bestimmten Parametern wurden nicht-experimentelle Geometriebeschränkungen beruhend auf einer B-helikalen Struktur für die Strukturrechnung verwendet. Die mittleren drei Basenpaare wurden von der Geometriebeschränkung ausgenommen. Die Berechnung wurde mithilfe des Programmpakets ARIA/CNS durchgeführt.

### 4.3.3 Licht-induzierbare AntimiRs

#### 4.3.3.1 HPLC und Ethanol-Fällung HPLC-gereinigter AntimiRs

Die Abspaltung von der festen Phase und Detritylierung der AntimiRs erfolgte gemäß dem Standardprotokoll aus Abschnitt 4.2.2. Für die Aufreinigung der AntimiRs  $A^{pos}$ ,  $A^{neg}$ ,  $A^{3c}$  sowie  $A^{neg\ c}$  per RP-HPLC standen zwei unterschiedlich große Nucleosil 100-5 C18 Säulen zur Verfügung (4,6 x 250 mm und 20 x 250 mm). Es wurde ein Eluentensystem aus 0,1 M Triethylammoniumacetat pH 7 und Acetonitril benutzt. Es wurde ein linearer Gradient von 5% bis 50 % Acetonitril in 35 Minuten (dünne Säule, Fluss: 1 mL/min), bzw. 5 bis 54,1 % Acetonitril in 38 Minuten (dicke Säule, Fluss 5 mL/min) verwendet. Für die Aufreinigung der hochmodifizierten AntimiRs  $A^{5c}$  und  $A^{6c}$  wurde eine EclipseXDB-C18 Säule von *Agilent* verwendet wie im Allgemeinen Teil beschrieben. Es wurde hier ein modifizierter zweistufiger Gradient benutzt: 0 % bis 20 % Acetonitril in fünf Minuten, dann 20% bis 55,7 % Acetonitril in 25 Minuten (Fluss: 1 mL/min).

Um Reste von TEAA bzw. Triethylamin aus den gesammelten getrockneten Produktfraktionen zu entfernen, wurde eine Ethanol-Fällung gemäß folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Lösen des Oligonukleotids in 0,3 M Natriumacetat-Lösung (100 OD/mL).
2. Hinzufügen des 3-fachen Volumens 95 % EtOH. Vortexen und bei -20 °C 30 Minuten stehen lassen.
3. Zentrifugieren bei höchster Stufe für 10 Minuten.
4. Überstand abnehmen und Pellet erneut lösen.
5. Wiederholung der Schritte 2-4.
6. RNA-Pellet in PBS lösen, filtrieren, Konzentration bestimmen.

#### 4.3.3.2 ESI-MS-Daten der Mismatch-AntimiRs

**Tabelle 13:** ESI-MS-Daten der AntimiRs für die Mismatch-Studie aus Abschnitt 3.3.3.  $A^{mm-4+6}$  wurde von VBC Biotech HPLC-gereinigt bestellt und ein weiteres Mal selbst per HPLC aufgereinigt.

AntimiR	Masse ber. [Da]	Masse erh. [Da]
$A^{mm-5}$	7208.2	7208.7
$A^{mm-17}$	7208.2	7208.8
$A^{mm-5+17}$	7248.2	7248.8
$A^{mm-4+6}$	7105.2	7105.4
$A^{mm-4+6+17}$	7145.2	7145.7

#### 4.3.3.3 Zellkultur

HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurden von *Lonza* bezogen und in EBM-Medium (Endothelial Basal Medium, *Lonza*) kultiviert, welches zusätzlich mit Hydrocortison, Rinderhirnextrakt (BBE, bovine brain extract), epidermalem Wachstumsfaktor, Gentamycinsulfat, Amphotericin-B und 10 % fetalem Kälberserum (FCS, *Invitrogen*) versetzt wurde. Die Zellen wurden bis zur dritten Passage verwendet.

#### 4.3.3.4 Transfektion und Bestrahlung

HUVECs wurden bei einer Konfluenz von 40-60 % mit 1-50 nM der synthetisierten AntimiRs unter Verwendung von Lipofectamine RNAiMax (*Fa. Life Technologies*) transfiziert. Die Transfektion wurde gemäß dem Protokoll von *Life Technologies* durchgeführt. Ein typisches Transfektionsexperiment im 6-well Format wurde mit 130.000 Zellen pro well in einem Gesamtvolumen von 1,2 mL Medium durchgeführt. Die Menge an Transfektionsmedium wurde so gewählt, dass je 6 pmol AntimiR 1  $\mu$ L Lipofectamine RNAiMax verwendet wurden. Für die Transfektion wurde Optimum, ein Medium mit reduziertem Serumanteil, benutzt. Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS versetzt und bestrahlt oder für die Bestrahlungszeit im Dunkeln in PBS belassen. Die Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, für 25 Minuten bei 365 nm mit einem Transilluminator (*Bio View*, 5-6 mW), auf den die Zellkulturplatte gestellt wurde, bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde der PBS-Puffer abgesaugt und die Zellen wieder mit EBM-Medium mit den angegebenen Zusätzen versetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen noch für weitere 48 Std. in diesem Medium belassen.

#### 4.3.3.5 RNA-Isolation und quantitative Real Time PCR

Nach Ende der Assayzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Gesamt-RNA wurde mithilfe von TRI-Reagenz (*Fa. Sigma-Aldrich*) oder mit dem miRNeasy Kit und dem QiaCube (*Fa. Qiagen*) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde an einer NanoDrop 1000 (*Fa. Thermo Fisher Scientific*) bestimmt und die Lösung in geeigneter Weise verdünnt. Zur Detektion von miRs wurden 7,5 ng RNA (3  $\mu$ L, 2,5 ng/ $\mu$ L) in einer 10  $\mu$ L Reaktion revers transkribiert unter Verwendung eines TaqMan reverse Transcription Kit (*Fa. Life Technologies*). Eine typische Reaktion enthielt 0,1  $\mu$ L dNTPs (100 mM), 0,13  $\mu$ L RNase Inhibitor, 1  $\mu$ L 10x RT Puffer, 0,67  $\mu$ L MultiScribe Reverse Transkriptase, 1  $\mu$ L 10x Primer miR-92a und 1  $\mu$ L 10x Primer RNU48 sowie 3,1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Die erhaltene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser 1:5 verdünnt und für die Detektion der miRNAs (miR-126 oder miR-92a) mittels quantitativer TaqMan microRNA Assays (*Fa. Life Technologies*) an einem StepOnePlus Gerät

(Fa. *Applied Biosystems*) verwendet. Zur Normalisierung wurde RNU 48 als interner Standard gewählt. Eine typische 20  $\mu\text{L}$  PCR-Reaktion enthielt 10  $\mu\text{L}$  2x TaqMan Master Mix, 4  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 1  $\mu\text{L}$  Primer Mix sowie 5  $\mu\text{L}$  cDNA. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe relativer Expressionslevel und der Formel:

$$2^{-\Delta c_T} \quad \text{mit } \Delta c_T = c_T(\text{miR}) - c_T(\text{RNU 48})$$

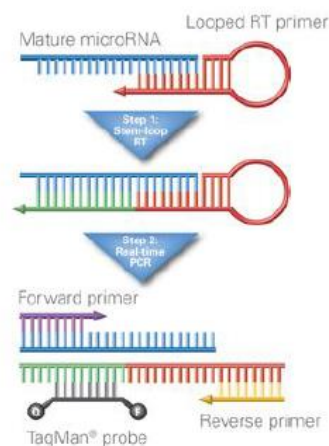
**Formel 12:** Formel zur Bestimmung der relativen Expressionshöhe von miRNAs

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.6.2 und 3.3.6.3 sind in % relativ zur Negativkontrolle angegeben. Die Berechnung erfolgte aus dem Mittelwert von vier unabhängigen Bestimmungen gemäß:

$$\frac{2^{-\Delta c_T}(\text{AntimiR})}{2^{-\Delta c_T}(\text{A}^{\text{neg}})} \cdot 100$$

**Formel 13:** Formel zur Bestimmung der Expressionshöhe von miRNAs in AntimiR-transfizierten Zellen in Relation zur Negativkontrolle in %.

Die Fehlerbalken ergeben sich aus dem Standardfehler des Mittelwertes, der definiert ist als der Quotient aus Standardabweichung geteilt durch die Wurzel der unabhängigen Einzelmessungen. In der unteren Abbildung ist das in Abschnitt 3.3.3 und 3.3.6.1 erklärte Prinzip des TaqMan microRNA Assay bildlich erklärt.



**Abbildung 87:** Prinzip des kommerziell erhältlichen TaqMan MicroRNA Assays. Es werden miR-spezifische Stamm-Schleife-, forward und reverse Primer und eine spezifische TaqMan-Sonde verwendet. Übernommen von der Applied Biosystems Website.<sup>[217]</sup>

Zur Detektion von Ziel-mRNA wurden 500 ng Gesamt-RNA in einer 20  $\mu\text{L}$  Reaktion mit MuLVRT (*Life Technologies*) revers transkribiert. Eine typische Reaktion enthielt 2  $\mu\text{L}$  Puffer,



4 µL MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 µL dNTPs (100 mM), 1 µL random hexamer Primer, 1 µL MuLV Reverse Transkriptase, 0,5 µL RNase Inhibitor, 0,5 µL H<sub>2</sub>O und 10 µL RNA (10 ng/µL). Die erhaltene cDNA wurde 1:6 oder 1:4 verdünnt und 8 µL davon wurden für eine SYBR Green qRT-PCR verwendet. Eine typische Reaktion enthielt 10 µL 2x SYBR Green Master Mix, 1 µL ITGα5 Primer bzw. 2 µL P0-Primer Mix (forward und reverse Primer) und 1 µL H<sub>2</sub>O (oder kein H<sub>2</sub>O für P0). Humane ribosomale P0 mRNA wurde als endogener Standard zur Normalisierung ausgewählt. Es wurden die folgenden Primersequenzen verwendet:

P0 (forward): 5'- TCG ACA ATG GCA GCA TCT AC -3'

P0 (reverse): 5'- ATC CGT CTC CAC AGA CAA GG -3'

Zur Detektion der ITGα5 mRNA wurde der QuantiTect Primer Assay (*Fa. Qiagen*) benutzt.

Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des internen Standards analog zum oben beschriebenen Vorgehen.

#### 4.3.3.6 Spheroid assay

Die Spheroide aus HUVECs wurden analog zu Korff et al. und Diehl et al. hergestellt.<sup>[184,185]</sup> HUVECs wurden in 6 cm-Dishes ausgebracht (285.000 Zellen/well) in einem Gesamtvolumen von 3 mL je well und mit 10 nM AntimiRs transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Optimum-Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS versetzt. Es wurde für 25 Minuten bestrahlt oder die Zellen wurden für die gleiche Zeit im Dunkeln belassen. 24 Std. nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 mL Trypsin/EDTA abgelöst und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden vier Minuten bei 200 g zentrifugiert, gezählt und dann so verdünnt, dass je 100 µL Zellsuspension in EBM-Methocel-Mix (80 % EBM + 20 % Methocel) 400 HUVECs enthielten. In eine nichtadhäsive 96-well Rundbodenplatte wurden je well 400 Zellen ausgebracht und für 24 Std. inkubiert. Zum Ausbringen der Spheroide in eine Kollagenmatrix wurde eine 24-well Platte vorgewärmt. Es wurde eine Lösung aus 80 % Methocel und 20 % FCS hergestellt, mit der die Spheroide nach Zentrifugation überschichtet wurden. Zu der Spheroid-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 eine Lösung, die 500 µL 10xM199 Medium, 4 mL Kollagen-Lösung (*Fa. BD Biosciences*), 90 µL HEPES (1M) und 400-800 µL NaOH (0,2 M) enthielt, gegeben. Die Mischung wurde 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 1 mL der Lösung für jede Bedingung wurde in ein well der vorgewärmten Platte gegeben. Die Lösung wurde zur Polymerisation in den Inkubator bei 37 °C gestellt und nachdem sich das Gel gebildet hatte, wurden 100 µL Kulturmedium zugegeben. Es wurde nun für weitere 24 Std. inkubiert, dann wurde das Kulturmedium vorsichtig entfernt und die Spheroide durch Zugabe von 1 mL 10 % Formaldehyd-Lösung in PBS fixiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei

Raumtemperatur wurde die Formaldehyd-Lösung entfernt und durch PBS ersetzt. Die Spheroide wurden nun entweder sofort ausgewertet oder bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop unter Verwendung digitaler Bildbearbeitungssoftware (AxioVision Rel.4.8 *Fa. Carl Zeiss*). Pro Bedingung und Experiment wurden zehn Spheroide verwendet. Von jedem der zehn Spheroide wurden die Aussprossungslängen summiert. Der Mittelwert dieser Summen ergab die kumulative Aussprossungslänge (cumulative sprout length) wie in Abbildung 71 im Abschnitt 3.3.6.5 beschrieben. Die kumulative Aussprossungslänge wurde auf die Kontrolle  $A^{neg}$  normiert.

#### 4.3.3.7 Statistik & Signifikanztests

Alle Daten sind immer als Mittelwert normiert auf die Negativkontrolle angegeben. Im Allgemeinen wurden immer vier, beim Spheroid Assay fünf unabhängige Einzelmessungen durchgeführt. Der angegebene Fehlerbalken stellt den Standardfehler des Mittelwerts dar. Als Signifikanztest wurde der Studentsche t-Test verwendet, für die Spheroide der Anova Bonferroni Test. Die Resultate wurden als statistisch signifikant angesehen für  $p < 0,05$ .

### 4.3.4 Aptacaging

#### 4.3.4.1 Synthese der modifizierten Aptamere

Die Synthese der modifizierten Aptamere wurde gemäß der allgemeinen Synthesebedingungen, die in Abschnitt 4.2.1 beschrieben wurden, durchgeführt. Das PC-Linker Amidit wurde von *Linktech* erworben. Es wurde hierfür eine verlängerte Kopplungszeit von 15 Minuten verwendet. In Tabelle 14 sind die Sequenzen und deren ESI-MS-Daten dargestellt. Die Abspaltung von der festen Phase und Detritylierung erfolgte gemäß Standardprotokoll (s. Abschnitt 4.2.2) Zur Aufreinigung per HPLC wurde ein Eluentensystem aus 0,1 M Triethylammoniumacetat pH 7 und Acetonitril benutzt. Es wurde ein linearer Gradient von 5 bis 40 % Acetonitril innerhalb von 35 Minuten (Flussrate: 1 mL/min) verwendet.

**Tabelle 14:** Übersicht der verwendeten Aptamer-Sequenzen mit den dazugehörigen ESI-MS-Daten. PC = photocleavable linker,  $NH_2$  CPG = C6 Amino Modifier.

Kürzel	Sequenz	Masse ber. [Da]	Masse erh. [Da]
<b>fHD1</b>	5'-GGTTGGTGTGGTTGG PC-NH <sub>2</sub> CPG-3'	5193,9	5194,0
<b>fHD1-T4A</b>	5'-GGTAGGTGTGGTTGG PC-NH <sub>2</sub> CPG-3'	5202,9	5203,0

#### 4.3.4.2 Filterbindungsstudien

10 pmol Aptamer wurden am 5'-Ende radioaktiv mit 20 U T4 Polynukleotid Kinase (*New England BioLabs*) markiert. Die verwendete Lösung enthielt 70 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol und 300 µM γ-<sup>32</sup>P-ATP (*PerkinElmer*). Humanes Thrombin (*Haematologic Technologies Inc.*) in verschiedenen Konzentration wurde mit 1 nM <sup>32</sup>P-markiertem Aptamer für 30 Minuten bei 37°C in PBS mit 1 mg/mL BSA, 1 µg/mL Hefe tRNA (*Life Technologies*), 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) inkubiert. Die Reaktionsmischungen wurden durch 0,45 µm Nitrocellulosemembranen (*Whatman*) gefiltert und dreimal mit PBS gewaschen. Die photostimulierte Lumineszenz (PSL) wurde mit einem FLA 3000 PhosphorImager (*Fujifilm*) quantifiziert. Das PSL Signal wurde mithilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ PSL} = \frac{\text{PSL (Probe)} - \text{PSL (Hintergrund)}}{(\text{PSL (Gesamt)} - \text{PSL (Hintergrund)}) \cdot n} \cdot 100 \%$$

**Formel 14:** Formel zur Bestimmung der photostimulierten Lumineszenz.

PSL (Probe) ist das radioaktive Signal der untersuchten Probe, PSL (Hintergrund) ist das Signal der Kontrollprobe ohne Aptamer, n ist der Korrekturfaktor für die Signalintensität des Aptamers alleine.

#### 4.3.4.3 Aptacaging-Crosslink-Reaktion

Zur Bildung des kovalenten Aptamer-Thrombin-Komplexes wurden 6,25 nmol funktionalisiertes Aptamer (fHD1 oder fHD1-T4A) mit 200 nmol Sulfo-EGS (*Thermo Scientific*) in 33 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Puffer (pH 8,2) mit 30 % DMSO für zwei Minuten inkubiert. Die Proben wurden mithilfe von MicroSpin G-25 Säulen (*GE Healthcare Life Sciences*), die mit PBS vorgewaschen wurden, per Zentrifugation bei 750 g für zwei Minuten aufgereinigt. Humanes Thrombin wurde mit einer Micro Bio-Spin 6 Säule (*Bio-rad*), vorgewaschen mit PBS, per Zentrifugation aufgereinigt (1000g, 4 Minuten). 50 pmol Thrombin wurden mit der Aptacaging-Reaktionsmischung in 100 µL PBS (pH 7,4) mit 1 µg/mL BSA und 40 µM HD22 (*Ella Biotech*) für zehn Minuten inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde mit einer Micro Bio-Spin 30 Säule (*Bio-rad*), vorgewaschen mit 500 µL PBS (pH 7,4) per Zentrifugation (1000 g, vier Minuten) aufgereinigt.

#### 4.3.4.4 *Thrombin-Aktivitäts Assay*

Die Aktivität des funktionalisierten Thrombins wurde mit einem Fluoreszenzassay in einem Synergy 2 Plate Reader (*BioTek*), Anregungswellenlänge 360 nm, Emissionswellenlänge 460 nm, bestimmt. Es wurde eine Standardkurve aus unfunktionalisiertem Thrombin in Konzentrationen von 0,03 bis 2 µg/mL erstellt. Die Proben aus der Aptacaging-Reaktion wurden 1:50 verdünnt und 50 µL dieser Verdünnung mit 50 µL 2 µM fluoreszente Peptidsubstrat I-1140 (z-Gly-Gly-Arg-AMC-HCl, *Bachem*) in PBS (pH 7,4) mit 1 mg/mL BSA versetzt und in eine weiße 96-well Platte pipettiert. Die Emission wurde für 30 Minuten gemessen und aus der Steigung des Fluoreszenzanstiegs mithilfe von Prism 5 Software die Konzentration aktiven Thrombins gemessen.

#### 4.3.4.5 *Hirudin Assay*

Die amidolytische Aktivität wurde in ähnlicher Weise wie in 4.3.3.4 in An- oder Abwesenheit von Hirudin gemessen, welches sowohl an Exosite I als auch an das aktive Zentrum bindet. Für diese Versuche wurden jeweils 25 µL Thrombin-Aptamer Komplex oder unmodifiziertes Thrombin, bestrahlt oder unbestrahlt, 50 µL 2 µM I-1140 und 25 µL Hirudin unterschiedlicher Konzentration in PBS (pH 7,4) mit 1 mg/mL BSA gemischt. Die Emission bei 460 nm wurde analog dem obigen Vorgehen zur Bestimmung der Aktivität verwendet.

#### 4.3.4.6 *Koagulationsassay*

Gepooltes humanes Plasma von gesunden Spendern wurde auf 37 °C erwärmt. Mit Thrombin unterschiedlicher Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt. Die Koagulationsassays wurden mit 50 µL humanem Thrombin sowie 50 µL 0,25 µg/mL Thrombin-Aptamer-Komplex (fHD1-Thrombin oder fHD1-T4A-Thrombin) ohne oder mit UV-Bestrahlung unter Zugabe von 50 µL Plasma durchgeführt (insgesamt sechs verschiedene Bedingungen). Die Absorption bei 360 nm wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen.

#### 4.3.4.7 *Western Blot*

1 µg/mL amidolytisch aktiver Komplex bzw. unmodifiziertes Thrombin wurden in 1x Lämmli-Puffer mit SDS, 2-Mercaptoethanol, Glycerin und Bromphenolblau gelöst. Die Proben wurden für fünf Minuten auf 95 °C aufgeheizt, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel bei 150 V aufgetrennt. Die Proben wurden mittels Wet-Blotting auf Nitrocellulose-Membranen (*Whatman*) übertragen. Die Membran wurde anschließend für 30 Minuten mit einer Lösung aus 5 % BSA in 20 mM Tris-Cl (pH 7,6), mit 137 mM NaCl und 0,1 % Tween-20 blockiert. Danach wurde die Membran für 16 Std. bei 4 °C mit einem Schaf-Antikörper

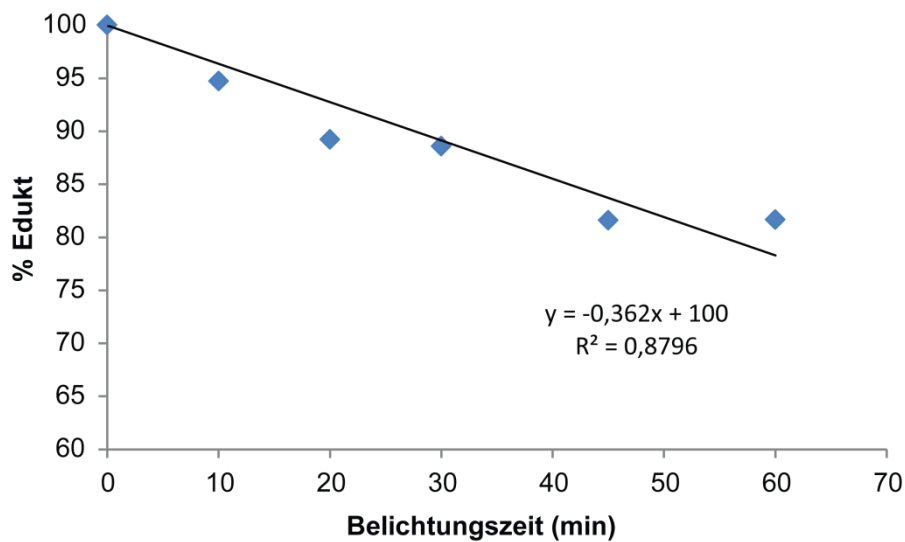
gegen humanes Thrombin (1:2000 verdünnt in Tris-Cl, pH 7,6) mit 5 % BSA, 137 mM NaCl und 0,1 % Tween-20 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für fünf Minuten mit 20 mM Tris-Cl, pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 wurde die Membran mit einem Zweitantikörper, IRDye 800CW Donkey Anti-Goat IgG (H+L) (*Li-cor Biotechnology*), kreuzreaktiv gegenüber Schaf-Antikörpern (1:2000 verdünnt in 20 mM Tris-Cl, pH 7.6 mit 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 und 5% BSA) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blots wurden bei 800 nm mit einem Odyssey Scanner (*Li-cor Biotechnology*) gescannt. Die Intensitäten der Banden wurden mit Quantity One Software (*Bio-rad*) quantifiziert.

#### 4.3.4.8 *Live-Clotting Experimente*

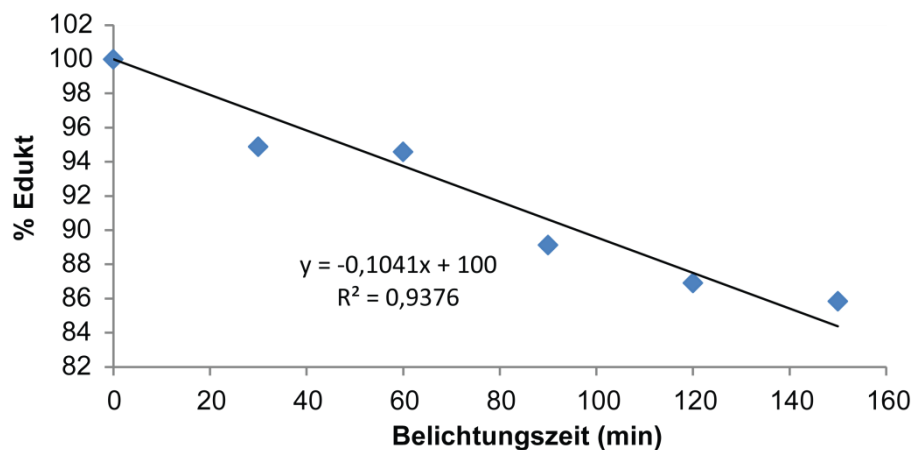
Für die Live-Clotting Experimente wurden rechteckige Glaskapillaren (0,03 x 0,3 x 50 mm und 0,04 x 0,4 x 50 mm) von *Vitrocom*, gefüllt mit einer Lösung aus Fibrinogen (8mg/mL) und fHD1-Thrombin-Komplex (0,1 µg/mL) in PBS (pH 7,4 mit 1 mg/mL PBS), verwendet. Die Mikroskopbilder wurden an einem Carl Zeiss Axioobserver.Z1 mit einem A-Plan 10x/0,25 Ph1 (a = 4,4 mm) Objektiv, einem dichroic filterset 02 und einer MRm AxioCam aufgenommen (*Fa. Carl Zeiss*). Zur Bestrahlung im Mikroskop wurde eine UVICO 120 W Hg-Lampe (*Rapp*) und ein Fluor 10x/0,50 Objektiv von *Carl Zeiss* verwendet. Die Bilder wurden mit Zen 2012 blue edition Software (*Carl Zeiss*) bearbeitet.

## 5 Anhang

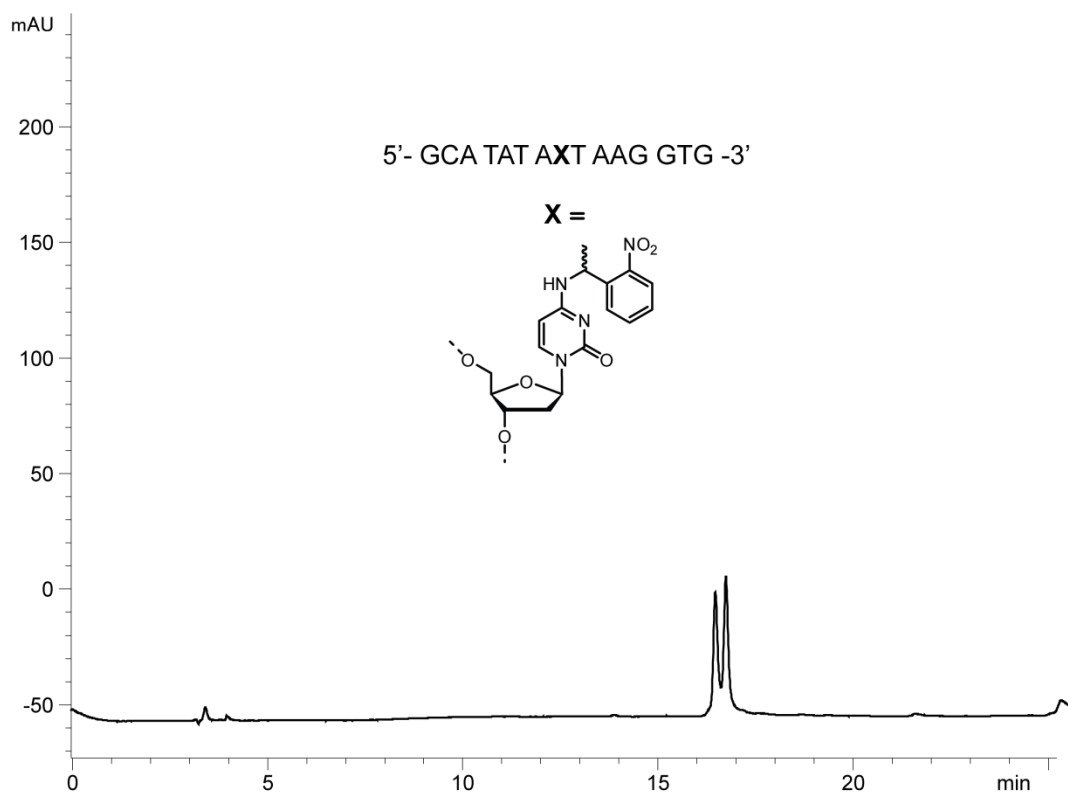
### 5.1 HPLC-Spektren & Photolysekinetiken



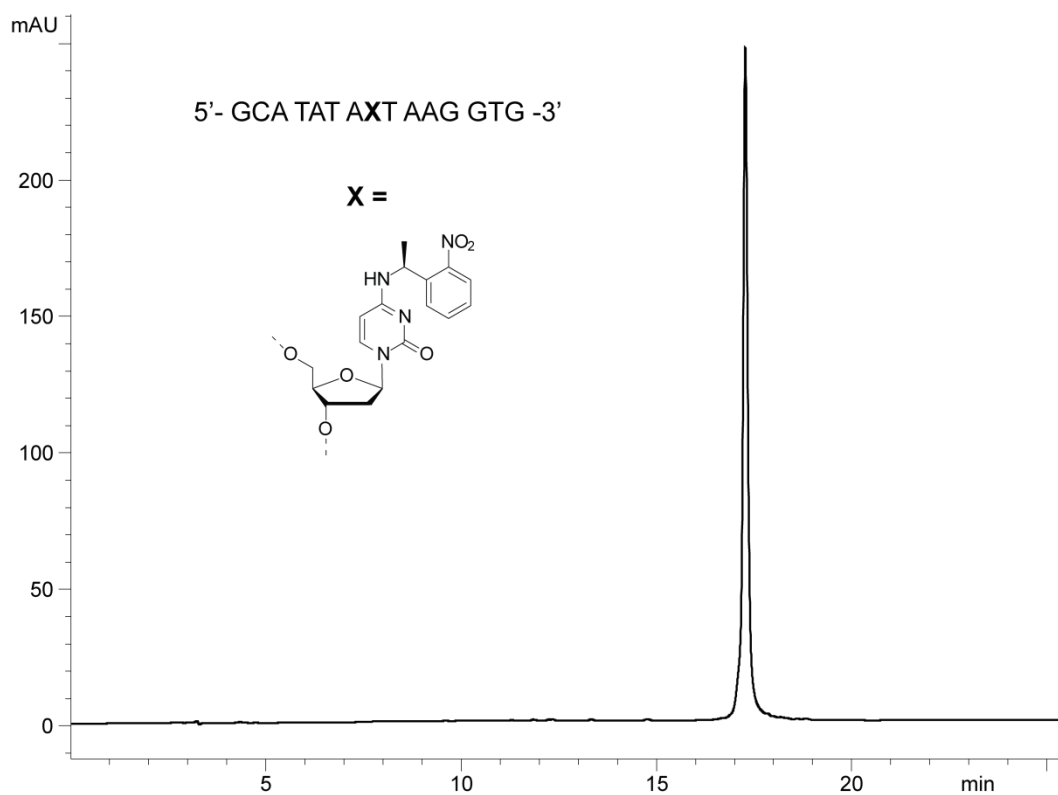
**Abbildung 88:** Photolysekinetik der Zweiphotonen-Entschützung der dC<sup>NDBF</sup>-geschützten Benchmark-Sequenz (2 μM) am Laser-Setup im AK-Wachtveitl. Aus den erhaltenen Daten wurde per linearer Regression die Photolyserate in pmol/s bestimmt.



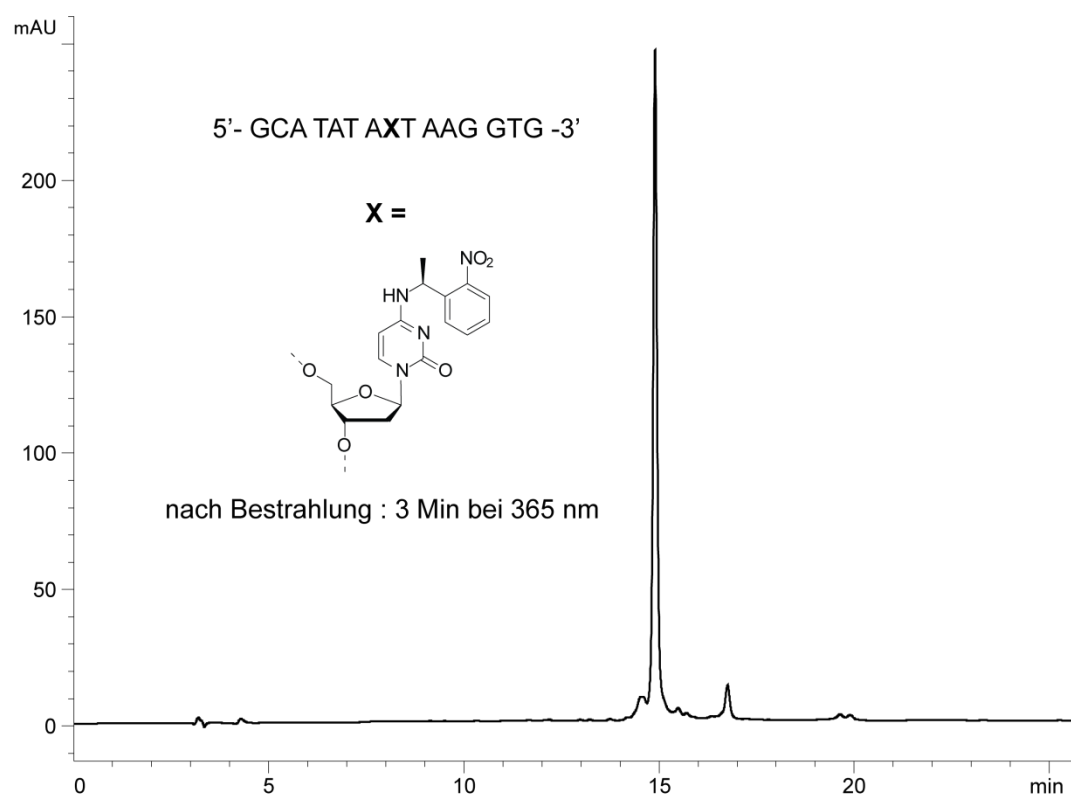
**Abbildung 89:** Photolysekinetik der Zweiphotonen-Entschützung von MNI-Glutamat (500 μM) geschützten Benchmark-Sequenz am Laser-Setup im AK-Wachtveitl. Aus den erhaltenen Daten wurde per linearer Regression die Photolyserate in pmol/s bestimmt.



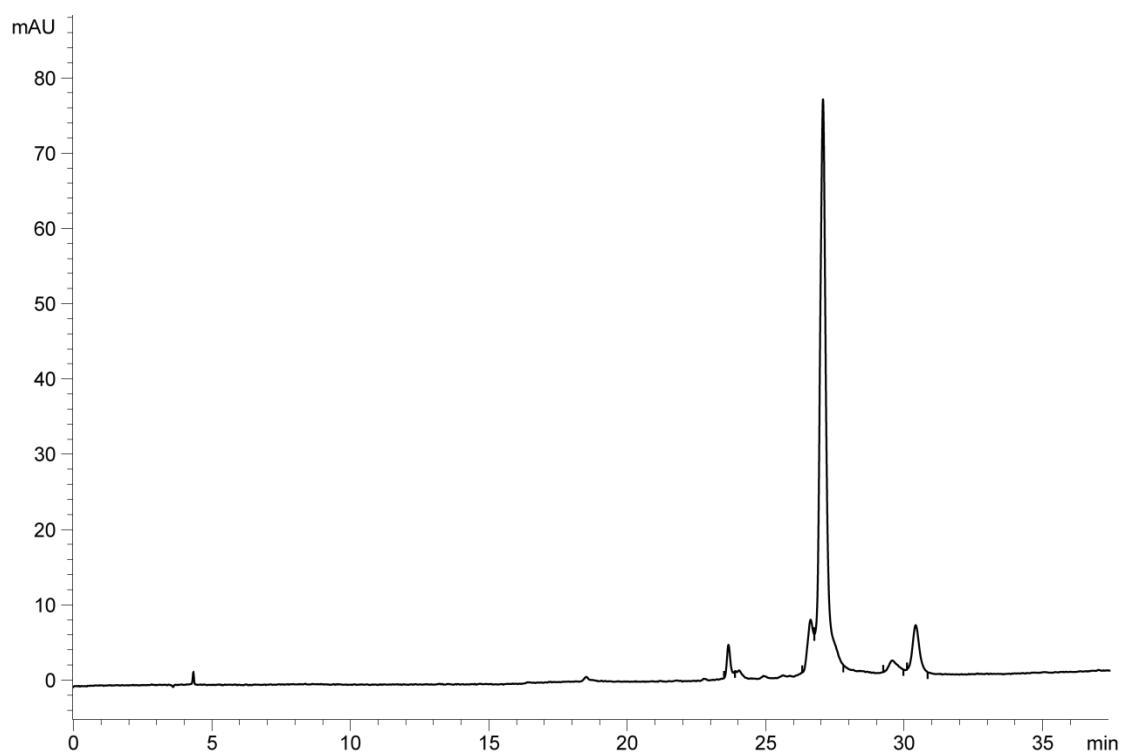
**Abbildung 90:** analytisches HPLC-Spektrum des dC<sup>NPE</sup>-modifizierten Einzelstrangs für das in Abschnitt 3.2 beschriebene Projekt vor Trennung der Diastereomere.



**Abbildung 91:** analytisches HPLC-Spektrum des dC<sup>S-NPE</sup>-modifizierten Einzelstrangs.



**Abbildung 92:** analytisches HPLC-Spektrum des dC<sup>5-NPE</sup>-modifizierten Einzelstrangs nach 3-minütiger Bestrahlung an einer UV-LED ( $\lambda = 365$  nm).



**Abbildung 93:** analytisches HPLC-Spektrum des AntimiRs A<sup>3c</sup>.



## 5.2 Literaturverzeichnis

- [1] C. G. Bochet, *Synlett* **2004**, 20, 2268–2274.
- [2] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes, S. P. Fodor, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5022–5026.
- [3] J. Engels, E.-J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 907–911.
- [4] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, 17, 1929–1935.
- [5] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8572–8604.
- [6] Günter Mayer, Alexander Heckel, *Angewandte Chemie* **2006**, 118, 5020–5042.
- [7] M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [8] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, 4, 619–628.
- [9] D. D. Young, A. Deiters, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 999–1005.
- [10] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 441–458.
- [11] A. Hasan, K.-P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, 53, 4247–4264.
- [12] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Meth.* **2006**, 3, 35–40.
- [13] M. Gaplovsky, Y. V. Il'ichev, Y. Kamdzhilov, S. V. Kombarova, M. Mac, M. A. Schwoerer, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4, 33–42.
- [14] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 441–58.
- [15] H. Giegrich, S. Eisele-Bühler, C. Hermann, E. Kvasyuk, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Nucleosides and Nucleotides* **1998**, 17, 1987–1996.
- [16] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1601–1611.
- [17] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2012**, 113, 119–191.
- [18] J. C. Sheehan, R. M. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5277–5281.
- [19] K. R. Gee, L. W. Kueper, J. Barnes, G. Dudley, R. S. Givens, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1228–1233.
- [20] G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, *Tetrahedron* **1997**, 53, 3917–3932.
- [21] R. S. Givens, C.-H. Park, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6259–6262.
- [22] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6860–6861.
- [23] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 5768–5774.
- [24] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1193–1200.
- [25] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, 248, 73–76.
- [26] W. Denk, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 6629–6633.
- [27] M. C. Pirrung, T. M. Dore, Y. Zhu, V. S. Rana, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5313–5315.
- [28] Y. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4653–4663.
- [29] S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgogne, M. Goeldner, J.-F. Nicoud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9525–9529.
- [30] S. Gug, S. Charon, A. Specht, K. Alarcon, D. Ogden, B. Zietz, J. Leonard, S. Haacke, F. Bolze, J.-F. Nicoud, et al., *ChemBioChem* **2008**, 9, 1303–1307.
- [31] A. Specht, F. Bolze, L. Donato, C. Herbivo, S. Charon, D. Warther, S. Gug, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11, 578.

- [32] A. Blanc, C. G. Bochet, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5567–5577.
- [33] M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1179–1181.
- [34] A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4707–4712.
- [35] P. Stegmaier, J. M. Alonso, A. del Campo, *Langmuir* **2008**, *24*, 11872–11879.
- [36] V. San Miguel, C. G. Bochet, A. del Campo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5380–5388.
- [37] N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16927–16931.
- [38] M. N. Stanton-Humphreys, R. D. T. Taylor, C. McDougall, M. L. Hart, C. T. A. Brown, N. J. Emptage, S. J. Conway, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 657–659.
- [39] S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 123–125.
- [40] J. P. Olson, H.-B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 130415074117000.
- [41] K. Tanaka, H. Katada, N. Shigi, A. Kuzuya, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2120–2126.
- [42] W. Wu, B. P. Stupi, V. A. Litosh, D. Mansouri, D. Farley, S. Morris, S. Metzker, M. L. Metzker, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6339–6349.
- [43] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotech.* **1996**, *14*, 303–308.
- [44] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746–2748.
- [45] C. Wang, Z. Zhu, Y. Song, H. Lin, C. J. Yang, W. Tan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5708–5710.
- [46] B. Fuertig, J. Buck, V. Manoharan, W. Bermel, A. Jaeschke, P. Wenter, S. Pitsch, H. Schwalbe, *Biopolymers* **2007**, *86*, 360–383.
- [47] B. Fürtig, P. Wenter, S. Pitsch, H. Schwalbe, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 753–765.
- [48] Claudia Höbartner, Scott K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7305–7309.
- [49] P. Wenter, B. Fürtig, A. Hainard, H. Schwalbe, S. Pitsch, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 417–420.
- [50] J. Buck, B. Fürtig, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15699.
- [51] J. M. Govan, M. O. Lively, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13176–13182.
- [52] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 475–477.
- [53] J. M. Govan, R. Uprety, J. Hemphill, M. O. Lively, A. Deiters, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1247–1256.
- [54] J. L. Richards, X. Tang, A. Turetsky, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6255–6258.
- [55] X. Tang, J. Swaminathan, A. M. Gewirtz, I. J. Dmochowski, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 559–569.
- [56] X. Tang, S. Maegawa, E. S. Weinberg, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11000–11001.
- [57] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, J. A. Yoder, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2937–2940.
- [58] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1352–1356.
- [59] P. K. Jain, S. Shah, S. H. Friedman, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 440–446.
- [60] R. A. Blidner, K. R. Svoboda, R. P. Hammer, W. T. Monroe, *Mol. BioSyst.* **2008**, *4*, 431–440.
- [61] V. Mikat, A. Heckel, *RNA* **2007**, *13*, 2341–2347.

- [62] A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1955**, 0, 2632–2638.
- [63] C. B. Reese, *Tetrahedron* **2002**, 58, 8893–8920.
- [64] H. G. Khorana, W. E. Razzell, P. T. Gilham, G. M. Tener, E. H. Pol, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 1002–1003.
- [65] P. T. Gilham, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6212–6222.
- [66] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3655–3661.
- [67] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859–1862.
- [68] L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 245–248.
- [69] N. D. Sinha, J. Biernat, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5843–5846.
- [70] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154.
- [71] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 5319–5324.
- [72] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223–2311.
- [73] J. W. Engels, E. Uhlmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, 28, 716–734.
- [74] E. J. Nurminen, J. K. Mattinen, H. Lonnberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2159–2165.
- [75] E. J. Nurminen, J. K. Mattinen, H. Lonnberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 2551–2556.
- [76] F. Wincott, A. DiRenzo, C. Shaffer, S. Grimm, D. Tracz, C. Workman, D. Sweedler, C. Gonzalez, S. Scaringe, N. Usman, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 2677–2684.
- [77] X. Wu, S. Pitsch, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 4315–4323.
- [78] A. H. Krotz, P. G. Klopchin, K. L. Walker, G. S. Srivatsa, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3875–3878.
- [79] C. Vargeese, J. Carter, J. Yegge, S. Krivjansky, A. Settle, E. Kropp, K. Peterson, W. Pieken, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1046–1050.
- [80] “Glen Report | RNA & DNA Oligonucleotide Synthesis | Modification | Labelling,” <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR20-24.html>, **2013**
- [81] J. C. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 397–416.
- [82] “Glen Report | RNA & DNA Oligonucleotide Synthesis | Modification | Labelling,” <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR22-18.html>, **2013**
- [83] N. Usman, K. K. Ogilvie, M. Y. Jiang, R. J. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7845–7854.
- [84] S. Pitsch, P. A. Weiss, X. Wu, D. Ackermann, T. Honegger, *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 1753–1761.
- [85] D. J. Dellinger, Z. Timár, J. Myerson, A. B. Sierzchala, J. Turner, F. Ferreira, Z. Kupihár, G. Dellinger, K. W. Hill, J. A. Powell, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11540–11556.
- [86] P. P. Amaral, M. E. Dinger, T. R. Mercer, J. S. Mattick, *Science* **2008**, 319, 1787–1789.
- [87] A. G. Seto, *Int. J. Biochem. Cell B.* **2010**, 42, 1298–1305.
- [88] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, 75, 843–854.
- [89] B. Wightman, I. Ha, G. Ruvkun, *Cell* **1993**, 75, 855–862.
- [90] A. E. Pasquinelli, B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, et al., *Nature* **2000**, 408, 86–89.
- [91] R. C. Lee, V. Ambros, *Science* **2001**, 294, 862–864.
- [92] N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, D. P. Bartel, *Science* **2001**, 294, 858–862.
- [93] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Science* **2001**, 294, 853–858.
- [94] V. N. Kim, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2005**, 6, 376–385.

- 
- [95] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281–297.
- [96] J. Han, Y. Lee, K.-H. Yeom, Y.-K. Kim, H. Jin, V. N. Kim, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 3016–3027.
- [97] J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, J. W. Nam, I. Heo, J. K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B. T. Zhang, V. N. Kim, *Cell* **2006**, *125*, 887 – 901.
- [98] J. G. Ruby, C. H. Jan, D. P. Bartel, *Nature* **2007**, *448*, 83 – 86.
- [99] E. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, U. Kutay, *Science* **2004**, *303*, 95 – 98.
- [100] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs, *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 228–234.
- [101] M. Jinek, J. A. Doudna, *Nature* **2009**, *457*, 405–412.
- [102] B. N. Davis-Dusenbery, A. Hata, *J. Biochem.* **2010**, *148*, 381–392.
- [103] S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188–200.
- [104] T. Watanabe, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, et al., *Nature* **2008**, *453*, 539–543.
- [105] D. S. Schwarz, G. Hutvágner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* **2003**, *115*, 199–208.
- [106] M. Ghildiyal, P. D. Zamore, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 94–108.
- [107] Y. Wang, G. Sheng, S. Juranek, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **2008**, *456*, 209–213.
- [108] Y. Tay, J. Zhang, A. M. Thomson, B. Lim, I. Rigoutsos, *Nature* **2008**, *455*, 1124–1128.
- [109] J. R. Lytle, T. A. Yario, J. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9667 – 9672.
- [110] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, E. Izaurralde, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1885 – 1898.
- [111] M. R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 351–379.
- [112] L. Wu, J. G. Belasco, *Mol Cell* **2008**, *29*, 1 – 7.
- [113] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, N. Sonenberg, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 102–114.
- [114] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, N. Sonenberg, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 102–114.
- [115] B. Wang, A. Yanez, C. D. Novina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5343–5348.
- [116] P. H. Olsen, V. Ambros, *Dev. Biol.* **1999**, *216*, 671–680.
- [117] C. P. Petersen, M. E. Bordeleau, J. Pelletier, P. A. Sharp, *Mol. Cell* **2006**, *21*, 533–542.
- [118] M. R. Fabian, N. Sonenberg, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 586–593.
- [119] S. Djuranovic, A. Nahvi, R. Green, *Science* **2012**, *336*, 237–240.
- [120] A. A. Bazzini, M. T. Lee, A. J. Giraldez, *Science* **2012**, *336*, 233–237.
- [121] D. P. Bartel, *Cell* **2009**, *136*, 215–233.
- [122] A. Grimson, K. K.-H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, D. P. Bartel, *Mol. Cell* **2007**, *27*, 91–105.
- [123] P. Sætrom, B. S. E. Heale, O. Snøve, L. Aagaard, J. Alluin, J. J. Rossi, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2333–2342.
- [124] F. Ruberti, C. Barbato, C. Cogoni, *Exp. Neurol.* **2012**, *235*, 419–426.
- [125] M. Selbach, B. Schwanhausser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, N. Rajewsky, *Nature* **2008**, *455*, 58–63.

- [126] R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350–1354.
- [127] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [128] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [129] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 822–823.
- [130] A. Rodrigues-Correia, M. B. Koepfel, F. Schäfer, K. B. Joshi, T. Mack, A. Heckel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *399*, 441–447.
- [131] T. Mack, *Dissertation*, Goethe Universität Frankfurt, **2010**.
- [132] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
- [133] M. C. R. Buff, *Dissertation*, Goethe Universität Frankfurt, **2010**.
- [134] A. Heckel, M. C. R. Buff, M. L. Raddatz, J. Müller, B. Pöttsch, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6748–6750.
- [135] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pöttsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [136] J.-Y. Zhang, H. Esrom, I. W. Boyd, *Appl. Surf. Sci.* **1999**, *138-139*, 315–319.
- [137] Libuše Pavlíčková, Petr Kuzmič, Milan Souček, *Coll. Czech. Chem. C.* **1986**, *51*, 368–374.
- [138] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [139] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [140] M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086–1092.
- [141] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [142] H. S. Steinert, *Diplomarbeit*, Goethe-Universität Frankfurt, **2010**.
- [143] Jean-Louis Mergny, Laurent Lacroix, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537.
- [144] M. S. Searle, D. H. Williams, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2051–2056.
- [145] G. A. Leonard, J. Thomson, W. P. Watson, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9573–9576.
- [146] J. L. Leroy, X. Gao, M. Guéron, D. J. Patel, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5653–5661.
- [147] S. Wärmländer, A. Sen, M. Leijon, *Biochemistry* **1999**, *39*, 607–615.
- [148] C. Chen, I. M. Russu, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2545–2551.
- [149] J. Rinnenthal, B. Klinkert, F. Narberhaus, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3834–3847.
- [150] M. Guéron, J.-L. Leroy, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1995**, pp. 383–413.
- [151] F. Lottspeich, J. Engels, *Bioanalytik*, Elsevier, **2006**.
- [152] D. M. Gray, S.-H. Hung, K. H. Johnson, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1995**, pp. 19–34.
- [153] F. Schäfer, J. Wagner, A. Knau, S. Dimmeler, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2013**, *submitted*.
- [154] Z. Liu, A. Sall, D. Yang, *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 978–999.
- [155] D. Grimm, K. L. Streetz, C. L. Jopling, T. A. Storm, K. Pandey, C. R. Davis, P. Marion, F. Salazar, M. A. Kay, *Nature* **2006**, *441*, 537–541.
- [156] W.-Y. Choi, A. J. Giraldez, A. F. Schier, *Science* **2007**, *318*, 271–274.

- [157] M. S. Ebert, J. R. Neilson, P. A. Sharp, *Nat Meth* **2007**, *4*, 721–726.
- [158] J. Stenvang, S. Kauppinen, *Expert Opin. Biol. Th.* **2008**, *8*, 59–81.
- [159] J. Krutzfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [160] J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, R. Braich, K. G. Rajeev, J. Pena, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, 2885–2892.
- [161] S. L. Ameres, M. D. Horwich, J.-H. Hung, J. Xu, M. Ghildiyal, Z. Weng, P. D. Zamore, *Science* **2010**, *328*, 1534–1539.
- [162] C. Esau, S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, et al., *Cell Metab.* **2006**, *3*, 87–98.
- [163] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- [164] J. Elmen, M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, et al., *Nature* **2008**, *452*, 896–899.
- [165] A. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, M. J. Gait, *RNA* **2011**, *17*, 933–943.
- [166] S. Obad, C. O. dos Santos, A. Petri, M. Heidenblad, O. Broom, C. Ruse, C. Fu, M. Lindow, J. Stenvang, E. M. Straarup, et al., *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 371–378.
- [167] H. L. A. Janssen, H. W. Reesink, E. J. Lawitz, S. Zeuzem, M. Rodriguez-Torres, K. Patel, A. J. van der Meer, A. K. Patick, A. Chen, Y. Zhou, et al., *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 1685–1694.
- [168] C. M. Connelly, R. Uprety, J. Hemphill, A. Deiters, *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 2987–2993.
- [169] G. Zheng, L. Cochella, J. Liu, O. Hobert, W. Li, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1332–1338.
- [170] J. C. Griepenburg, B. K. Ruble, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, DOI: 10.1016/j.bmc.2013.04.082.
- [171] P. Carmeliet, *Nature* **2005**, *438*, 932–936.
- [172] E. van Rooij, W. S. Marshall, E. N. Olson, *Circ. Res.* **2008**, *103*, 919–928.
- [173] A. Bonauer, G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, et al., *Science* **2009**, *324*, 1710–1713.
- [174] L. Lai, Y. Song, Y. Liu, Q. Chen, Q. Han, W. Chen, T. Pan, Y. Zhang, X. Cao, Q. Wang, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 7956–7967.
- [175] C. Ohyagi-Hara, K. Sawada, S. Kamiura, Y. Tomita, A. Isobe, K. Hashimoto, Y. Kinose, S. Mabuchi, T. Hisamatsu, T. Takahashi, et al., *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 1876–1889.
- [176] T. Zhou, G. Zhang, Z. Liu, S. Xia, H. Tian, *Int. J. Col. Dis* **2013**, *28*, 19–24.
- [177] B. Robertson, A. Dalby, J. Karpilow, A. Khvorova, D. Leake, A. Vermeulen, *Silence* **2010**, *1*, 10.
- [178] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [179] R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan, S. L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253–1254.
- [180] “<http://www.glenresearch.com//GlenReports/GR10-12.html>,” **2013**.
- [181] V. Mikat, *Dissertation*, Goethe Universität Frankfurt, **2010**.
- [182] J. T. Yang, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Development* **1993**, *119*, 1093–1105.
- [183] C. Urbich, E. Dernbach, A. Reissner, M. Vasa, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, *Arterioscl. Throm. Vas.* **2002**, *22*, 69–75.
- [184] T. Korff, H. G. Augustin, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1341–1352.
- [185] F. Diehl, L. Rössig, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, C. Urbich, *Blood* **2007**, *109*, 1472–1478.

- [186] R. Hinkel, D. Penzkofer, S. Zühlke, A. Fischer, W. Husada, Q.-F. Xu, E. Baloch, E. van Rooij, A. M. Zeiher, C. Kupatt, et al., *Circulation* **2013**, *in press*.
- [187] T. Thum, *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 3–14.
- [188] T. G. Hullinger, R. L. Montgomery, A. G. Seto, B. A. Dickinson, H. M. Semus, J. M. Lynch, C. M. Dalby, K. Robinson, C. Stack, P. A. Latimer, et al., *Circ. Res.* **2012**, *110*, 71–81.
- [189] P. Theer, M. Hasan, W. Denk, *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 1022–1024.
- [190] F. Rohrbach, F. Schäfer, M. A. H. Fichte, F. Pfeiffer, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2013**, *angenommen*.
- [191] A. Deiters, D. Groff, Y. Ryu, J. Xie, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2728–2731.
- [192] N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14306–14307.
- [193] C. Chou, D. D. Young, A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 972–977.
- [194] C. Chou, A. Deiters, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6971–6974.
- [195] C. H. Self, S. Thompson, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 817–820.
- [196] L. Bédouet, H. Adenier, S. Pulvin, C. Bedel-Cloutour, D. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2004**, *320*, 939–944.
- [197] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.
- [198] A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 537–550.
- [199] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [200] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505.
- [201] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, *344*, 467–468.
- [202] G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672–2689.
- [203] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566.
- [204] J. Oldenburg, H.-J. Hertfelder, *Pharmazie in unserer Zeit* **2006**, *35*, 20–28.
- [205] T. E. Adams, J. A. Huntington, *Arterioscl. Throm. Vas.* **2006**, *26*, 1738–1745.
- [206] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3745–3749.
- [207] K. Padmanabhan, A. Tulinsky, *Acta Crystallogr. D* **1996**, *52*, 272–282.
- [208] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [209] A. Heckel, M. C. R. Buff, M. L. Raddatz, J. Müller, B. Pötzsch, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6900–6902.
- [210] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570–9571.
- [211] C. Daniel, F. Mélaïne, Y. Roupioz, T. Livache, A. Buhot, *Biosens. Bioelec.* **2013**, *40*, 186–192.
- [212] V. D. Filippis, I. Russo, A. Vindigni, E. D. Cera, S. Salmaso, A. Fontana, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2213–2217.
- [213] A. Heckel, M. C. Buff, M. S. Raddatz, J. Muller, B. Potzsch, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6748.
- [214] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [215] C. P. Salerno, M. Resat, D. Magde, J. Kraut, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3403–3404.
- [216] H. S. Steinert, J. Rinnenthal, H. Schwalbe, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 2564–2574.
- [217] <http://www.lifetechnologies.com/global/en/website-overview/ab-welcome.html>, **2013**





### 5.3 Abkürzungsverzeichnis

AcOH	Essigsäure
ADAR	adenosine desaminase acting on RNA
Ago	Argonaut-Protein
AK	Arbeitskreis
ASO	Antisense-Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
Bhc	6-Brom-7-hydroxy-4-methylcumarin
BNSF	2,7-bis-{4-nitro-8-[3-(2-propyl)-styryl]}-9,9-bis-[1-(3,6-dioxaheptyl)]fluoren
BNSMB	4,4'-bis{8-[4-nitro-3-(2-propyl)-styryl]}-3,3-dimethoxybiphenyl
bp	base pair
BNZ	Benzoin
C4MNB	$\alpha$ -Carboxy-4-methoxy-2-nitrobenzyl
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CANBP	2-(4'-bis(carboxymethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol
CCR4	C-C chemokine receptor type 4
CD	Circulardichroismus
CD-DMNPE	Cyclododecyl-1-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)ethyl
cDNA	complementary DNA
CDNI	4-carboxymethoxy-5,7-dinitroindolin-1-yl
CNB	$\alpha$ -Carboxy-2-nitrobenzyl
COSY	COrelated SpectroscopY
CPG	controlled pore glass
$\delta_a$	Zweiphotoneneinfangquerschnitt
$\delta_u$	Zweiphotonenwirkungsquerschnitt
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DCP1	mRNA decapping enzyme 1A
DEACM	7-Diethylaminocumarin
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEXD/H	Dead box protein
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene8
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
d.h.	das heißt

---

DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMNB	4,5-Dimethoxynitrobenzyl
DMTr	Dimethoxytrityl-
dsRBD	double-stranded RNA binding domain
dsRNA	doppelsträngige RNA
DUF283	domain of unknown function
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EANBP	2-(4'-((di(tris-ethoxy(methyl))amino)-4-nitro[1,1'-biphenyl]-3-yl)propyl
EBM	endothelial basal medium
eIF4E	eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 4 E
EGS	Ethylenglycol- bissuccinimidylsuccinat
eq.	Äquivalente
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
et al.	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	green fluorescent protein
Glu	Glutamat
GM	Göppert-Mayer
Hg-Lampe	Quecksilberdampf Lampe
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HnRNP	heterogeneous ribonucleoprotein particle
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
<i>i</i> PrPac	<i>Isopropylphenoxycetyl</i>
IR	Infrarot
IRES	internal ribosomal entry site
ITG $\alpha$ 5	Integrin $\alpha$ 5
$K_D$	Dissoziationskonstante
KSRP	KH-type splicing regulatory protein
$\lambda_{irr}$	Bestrahlungswellenlänge
LCAA	long chain amino alkyl
LED	Leuchtdiode
LNA	locked nucleic acid

---

Lsg.	Lösung
m <sup>7</sup> G-Cap	7-Methylguanosin-Kappe
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MHz	Megahertz
miRISC	miRNA induced RNA silencing complex
miR, miRNA	microRNA
MNI	4-Methoxy-7-nitroindolin
MPA-Glu	Methoxyphenacyl-Glutamat
mRNA	messenger RNA
MuLVRT	Maus-Leukämievirus Reverse Transkriptase
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NDBF	Nitrodibenzofuran
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NPE	1-(2-nitrophenyl)ethyl
NPPOC	2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl
NPOM	6-nitropiperonyloxymethyl
ONB	<i>ortho</i> -Nitrobenzyl
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
PABP	Poly(A)-Bindepotein
PACT	protein activator of PKR
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PC	Perizyten
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data base
pHP	<i>p</i> -Hydroxyphenacyl
piRNA	piwi-interacting RNA
PIWI	P-element induced wimpy testis.
PKR	protein kinase R
PMNB	3-(2-propyl)-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl
PNA	peptide nucleic acid
ppm	parts per million
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA

---

Prof.	Professor
PSL	photostimulated luminescence
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
RAN	RAs-related Nuclear protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC loading complex
rmsd	root mean square deviation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase H	Ribonuklease H
RNAi	RNA-Interferenz
RP-HPLC	reversed phase HPLC
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
SELEX	Selective Enrichment of Ligands by Exponential Amplification
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
siRNA	small interfering RNA
SMC	smooth muscle cell
snRNA	small nuclear ribonucleic acid
Std.	Stunden
stRNA	small temporal RNA
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TC	2'-Thiomorpholine-4-carbothioate
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
TFO	Triplex-formendes Oligonukleotid
THF	Tetrahydrofuran
TIPS-Cl	Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid
TLR	toll-like receptor
TNRC	trinucleotide repeat containing proteins
tom	Triisopropylsilyloxymethyl
TRBP	Tar RNA binding protein
tRNA	transfer RNA
TUT4	terminal uridyl transferase 4
UTR	untranslatierte Region

---

UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

## 6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Alexander Heckel für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die ausgezeichnete Betreuung, die mir gewährte wissenschaftliche Freiheit und besonders sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Prof. Dr. Joachim W. Engels möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Der gesamten aktuellen Arbeitsgruppe und allen ehemaligen Mitgliedern danke ich für die gute Atmosphäre in den vergangenen vier Jahren besonders während der Gruppenevents im Kleinwalsertal oder im Rahmen des SFBs.

Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Felix Friedrich, Manuela Fichte und Jennifer Rinne für ihre ständige Diskussionsbereitschaft bezüglich meiner Projekte und vor allem auch bezüglich vieler Themen abseits der Forschung. Besonders Felix möchte ich dabei für seine wirklich ständige Diskussionsbereitschaft über politische Themen aller Art danken. Das man alles immer ausdiskutieren kann bzw. muss, hat uns allen in der Zeit deiner Abwesenheit wirklich gefehlt. Ein spezieller Dank geht auch an Manuela Fichte, die mich unermüdlich bei der Optimierung sämtlicher Abbildungen für Vorträge, Paper und nicht zuletzt für diese Arbeit unterstützt hat. Ich hoffe, du findest nicht mehr alle hier zu findenden Abbildungen und Farben hässlich und würdest es ganz anders machen. Allen meinen Laborkollegen danke ich für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.

Martin Held danke ich für die Aufnahme vieler Massenspektren und für die Hilfe bei HPLC- und Computerproblemen.

Dr. Jasmin Wagner, Andrea Knau und Prof. Stefanie Dimmeler danke ich für die gute, fokussierte und erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen des AntimiR-Projekts. Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die sowohl fachlich als auch menschlich bereichernde Zeit als „Gastwissenschaftler“. Dr. Jasmin Wagner danke ich darüber hinaus für die kritische Durchsicht von Teilen dieser Arbeit und zusammen mit Dr. Carmen Doebele für die Einführung in das Arbeiten mit Zellen.

Falk Rohrbach und Prof. Günter Mayer danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit beim Aptacaging-Projekt und Falk für die Korrektur dieses Teil der Arbeit.

---

Hannah Steinert, Dr. Henry A. Jonker und Prof. Harald Schwalbe danke ich für die gute Zusammenarbeit beim NMR-Projekt.

Dr. Uwe Hener und seinem Team danke ich für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren und die Diskussionsbereitschaft bezüglich der Ergebnisse.

Bei meinen Forschungspraktikanten Manuela Fichte, Angelika Schneider, Dragica Podgorski, Markus Gränz, Julian Scherr und Alix Tröster möchte ich mich für die Hilfe bei den Synthesen und ihre engagierte und selbständige Arbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit, die wertvolle Hilfe beim Korrekturlesen dieses Werks und dass sie mir mein Studium ermöglichten.

Meinem Sohn Jonas danke ich dafür, dass er auch in anstrengenden Zeiten immer wieder vermag mich aufzuheitern.

Mein letzter und zugleich größter Dank geht an meine Frau Jessica für ihre unermüdliche Hilfe beim Fertigstellen der Dissertation, ihre Geduld mit mir und dass sie immer bedingungslos zu mir hält.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Anschrift: Florian Schäfer  
Bergstraße 16  
63549 Ronneburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 02.09.1984  
in Salmünster



### Ausbildung:

seit 08/2009: Promotionsstudium der Chemie an der Goethe-Universität Frankfurt am Main

*Titel der Dissertation:* Licht-induzierbare AntimiRs und wellenlängenselektive Entschützung von DNA  
(Betreuer: Prof. Dr. Alexander Heckel)

04/2004-06/2009: Studium der Chemie an der Goethe-Universität Frankfurt a.M.  
Abschluss: Diplom (Note: sehr gut)

*Titel der Diplomarbeit:* Synthese 2'-modifizierter Purinnukleosidanaloga und deren potentielle Anwendung in der RNA-Interferenz  
(Betreuer: Prof. Dr. Joachim W. Engels)

07/2003-04/2004: Zivildienst im Burekhardtthaus – Ev. Institut für Jugend-, Kultur- und Sozialarbeit e.V. in Gelnhausen

08/1994-06/2003 : Grimmelshausen-Gymnasium Gelnhausen  
Abschluss: Abitur (Note: 1,4)



---

## Wissenschaftliche Publikationen & Preise

Erstveröffentlichungen: F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450-1453.

M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2387-2398.

A. Rodrigues-Correia, M. B. Koeppel, F. Schäfer, K. B. Joshi, T. Mack, A. Heckel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 471-477.

F. Schäfer<sup>+</sup>, J. Wagner<sup>+</sup>, A. Knau, S. Dimmeler, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2013**, eingereicht. (<sup>+</sup> = geteilte Erstautorenschaft)

F. Rohrbach, F. Schäfer, M. A. H. Fichte, F. Pfeiffer, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2013**, angenommen.

Preis: Förderpreis der Dr. Albert Hloch-Stiftung für hervorragende Leistungen in der Diplom-Vorprüfung des Studiengangs Chemie

### Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Licht-induzierbare AntimiRs und wellenlängenselektive Entschützung von DNA“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den .....

.....

(Unterschrift)