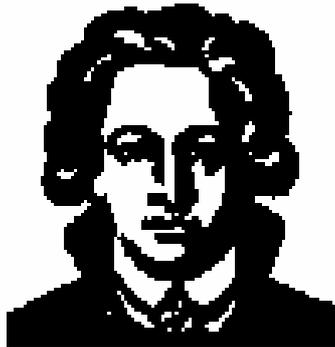


# Synthese von modifizierten Nukleotiden und modifizierten Oligodesoxynukleotiden zur DNA-Analytik



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Kerstin Jahn-Hofmann**  
aus  
Flörsheim am Main

Frankfurt am Main  
Juli 2004  
(DF 1)

Vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. J. W. Engels, Prof. Dr. G. Schneider

Datum der Disputation: 01.12.2004

Seit man begonnen hat, die einfachsten Behauptungen zu beweisen, erwiesen sich viele von ihnen als falsch.

*Bertrand Russell*

In Liebe für meine Eltern, Rolf und Usch

**Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2000 bis Juni 2004 am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. J. W. Engels angefertigt.**

Prof. Dr. J. W. Engels danke ich für die Überlassung der Themen, die sehr guten experimentellen Bedingungen, die gewährte Freiheit und für interessante und anregende Diskussionen.

Prof. Dr. G. Schneider danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Fonds der Chemischen Industrie für die Gewährung eines zweijährigen Stipendiums.

Weiterhin danke ich allen Angehörigen des Instituts und des Fachbereichs Chemie, die direkt oder indirekt zur Durchführung dieser Arbeit und zum "Funktionieren des Hauses" beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich:

- Herrn Dr. Eugen Uhlmann, Frau Silvia Hein und Herrn Lothar Hornung (*Aventis AG*, G838 Labor 108) für ein sehr angenehmes Arbeitsklima in ihrem Labor. Vor allem aber ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre Freundlichkeit waren bemerkenswert. Herrn Lothar Hornung danke ich für all die „kleinen“ und „großen“ Dinge, die mir das Laborleben sehr erleichtert haben.
- Herrn Dr. Thomas Ellinger und Herrn Dr. Eugen Ermantraut (*Clondia Chip Technology*) für die interessante und herausfordernde Themenstellung;
- meiner Laborkollegin Frau Beate Conrady für die Hilfe bei den HPLC-Trennungen und -Analysen und der Synthese und Reinigung von Oligodesoxynukleotiden;
- Frau Hannelore Brill und Frau Ilona Prieß für die Aufnahme meiner Massenspektren, vor allem bei den Versuchen mit dem „photolabilen Linker“;
- der NMR-Abteilung unter der Leitung von Dr. Zimmermann, Herrn Olbrich, Frau Kaiser, Frau Schmid und Frau Langner für die Messung von zahlreichen NMR-Spektren;
- Herrn Dr. Markus Schweitzer für die Durchsicht des Manuskripts, für viele interessante Diskussionen, anregende Besuche und seine Freundschaft;
- Familie Strube für die „mögliche Entladung“ meiner Gedanken;
- allen hier nicht namentlich erwähnten Mitgliedern des Arbeitskreises;
- der größte Dank gilt meiner Familie und Freunden, ohne deren Hilfe, Vertrauen und Zuversicht, diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin oder Adenosin
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AIBN	2,2'-Azobis-(2-methyl-propionitril)
arom.	Aromatisch
ATT	6-Aza-2-thiothymin
B	Nucleinsäurebase allgemein (A, T, C oder G)
BAL	Benzaldehyd
br.	breites Signal
Bn	Benzyl
BTT	Benzylthiotetrazol
Bu	Butyl
Bzl oder Bz	Benzoyl
C	Cytosin
CDI	Carbonyldiimidazol
CPG	Controlled Pore Glass
$\delta$	Chemische Verschiebung (NMR)
d	Dichte in g/ml
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dichloressigsäure
DCI	Dicyanoimidazol
DCM	Dichlormethan
DDC	Dicyclohexylcarbodiimid
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon
dd	Doppeldublett
DIPEA	Diisopropylethylamin („Hünigs Base“)
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DMTrCl	4,4'-Dimethoxytrityl-chlorid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDA	Ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie
EE	Essigsäureethylester
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
et al.	Et alii (und andere)
Fmoc-OSu	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid
G	Guanin
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure

HMPT	Hexamethylphosphortriamid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ("high Performance Liquid Chromatography")
IAF	Jodacetamidfluorescein
$\lambda$	Wellenlänge
Ibu	isobutyl
konz.	Konzentriert
LC	Liquid chromatography
LCAA-CPG	Long chain alkyl amin CPG
Lev	Laevulinsäure
LM	Lösungsmittel
M	Molar
m	Multipllett
m	Masse
MALDI	"matrix assisted laser desorption/ionization"
Me	Methyl
MeOH	Methanol
Mes	Mesyl
Mes-Cl	Methansulfonylchlorid
min	Minuten
MOPS	Anfärbelösung für DC-Platten
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl der Nucleotide (in einem Oligodeoxynucleotid)
NCS	N-Chlorsuccinimid
NEM	N-Ethylmorpholin
nH	nor-Harman
nm	Nanometer (Wellenlänge)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nr.	Nummer
O.D <sub>260</sub>	Extinktion ("Optische Dichte") bei 260 nm
Oligo	Oligodesoxyribonucleotid
Pac	Phenoxyacetyl
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Phenyl
PNA	Peptidnucleinsäuren ("peptide nucleic acids")
ppm	parts per million
p-Tos	p-Toluolsulfonyl
PyHCl	Pyridiniumhydrochlorid
Rf	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC ("Reversed Phase-HPLC")
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Natriumlauryl-sulfat
sec	Sekunden
Smp.	Schmelzpunkt
SNuPE	Single Nucleotide Primer Extension
SPR	Surface plasmon resonance
T	Thymin
t	Triplett
Tab.	Tabelle

TBE-Puffer	Laufpuffer für die Gelelektrophorese (siehe 4.4)
TBDPS	tert-Butyldiphenylsilyl
TBDPSCI	tert-Butyldiphenylsilylchlorid
TBHP	tert-Butylhydroperoxid
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tertramethyluronium
TCA	Trichloressigsäure
TDS	Dimethyl-thexylsilan
TDSCI	Chlor-dimethyl-thexylsilan
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
Tf	Trifluormethansulfonyl
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TMSCI	Trimethylsilyl-chlorid
Tm	Schmelzpunkt
Tof	Flugzeit (-massenspektrometer) ("time of flight")
Tos	Tosyl
Tos-Cl	p-Toluolsulfonsäurechlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	transfer-RNA
UV	Ultraviolett
Zers.	Zersetzung

# Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
2.0	Aufgabenbeschreibung	5
2.1	Grundlagen	5
2.2	Probenmaterial	7
2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	8
2.4	Oligodesoxynukleotid – Synthese	10
2.4.1	Phosphordiester – Methode	11
2.4.2	Phosphortriester – Methode	11
2.4.3	H-Phosponat – Methode	12
2.4.4	Phosphoramidit – Methode	12
2.4.5	Verwendete Schutzgruppen	13
2.4.6	Festphasensynthese	14
2.5	Aufreinigung und Analytik von Oligodesoxynukleotiden	17
2.5.1	HPL – Chromatographie	17
2.5.1.1	RP – Material	19
2.5.1.2	R3 – Material	22
2.5.1.3	Gen-Pak Fax – Material	23
2.5.2	Gelelektrophorese	23
2.5.3	Massenspektrometrie	24
2.5.3.1	Einlaßsystem	26
2.5.3.2	Ionenquelle	26
2.5.3.3	Trennsystem	27
2.5.3.4	Detektor	27
2.5.3.5	Das Massenspektrum	27
2.5.3.6	MALDI – Spektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation)	28
2.6	Entwicklungen in der DNA – Diagnostik	31
2.6.1	Das Genom und die DNA - Diagnostik	33
2.6.2	Einzelbasenpolymorphismus (SNP)	34
2.6.3	Identifizierung SNP	35
2.6.4	Blotting Techniken	36
2.6.5	DNA – Arrays	36
2.6.5.1	Hybridisierung	37
2.6.5.2	Basengehalt	38
2.6.5.3	Basensequenz	39
2.6.5.4	Duplexlänge	39
2.6.5.5	Kationenkonzentration	39

2.6.5.6	pH – Wert	39
2.6.5.7	Temperatur	40
2.6.5.8	Zugabe von Formamid oder Polymeren	40
2.6.5.9	Modifikationen	41
2.6.6	Oligodesoxynukleotid – Chip und DNA – Chiptechnologie	41
2.6.7	Expressionsarrays	42
2.6.8	Makroarrays	43
2.6.9	Mikroarrays	43
2.6.10	Spotting – Techniken	46
2.6.11	Lithographisches Verfahren	47
2.6.12	Nanogen – Technologie	48
2.6.13	Mikrospraying	48
2.6.14.1	Immobilisierung	48
2.6.14.2	Linkersysteme	50
2.6.13.3	Prozessierung und Derivatisierung eines Arrays	51
2.6.15	Detektion	53
2.6.15.1	Fluoreszenz	53
2.6.15.2	Fluoreszente Mikrobeads	53
2.6.15.3	Massenspektrometrie	54
2.6.15.4	Elektrische Detektion	54
2.6.16	Dot – Blot – Technik	54
2.6.17	<i>In situ</i> – Hybridisierung	55
2.6.18	Homogene Detektionsmethoden	55
2.6.19	Verwendung von Nukleosid – Analoga	56
2.6.19.1	Peptid – oder Polyamid – Nukleinsäuren PNA	57
2.6.19.2	Locked Nucleic Acids LNA	59
2.6.20	Auswahl laufender Projekte	59
2.6.21	Anwendungen und Ausblicke in der Chiptechnologie	61
2.6.22	Weitere Genotypisierungs – Möglichkeiten	62
2.6.22.1	Massenspektrometrie – basierte Genotypisierung	62
2.6.22.2	Biacore – Messungen (Oberflächen – Plasmon – Resonanz, Surface plasmon resonance, SPR)	63
2.7	Krebs und Krebsentstehung	65
2.8	DNA-Spaltungsreaktionen	68
2.8.1	Radikalische DNA-Spaltung	71
2.8.2	Photochemie	73
2.8.2.1	Photoreaktionen von Nitrobenzyl-Derivaten	74
3.0	Spezieller Teil	77
3.1	Allgemeines zur Entwicklung des Sonden – markierten Assays	77
3.2	Stand der Forschung (Synthesearbeiten)	77
3.2.1	Detektionsverfahren	78
3.2.2	Anforderungen an den Aufbau der modifizierten Sonde	78

3.2.3	Qualität eines Chips	79
3.2.4	Die selektiv spaltbare Bindung und der Assay – Aufbau	81
3.2.5	Aufgaben innerhalb des Projekts	83
3.3	Stand der Forschung (chemische Synthesearbeiten)	84
3.3.1	Synthesearbeiten: Synthese der vier 5'-mercapto-2'-desoxy-nukleosiden-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit)	85
3.3.2	Synthese 5'-S-(Trityl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylamino-phosphit <b>4</b> (Synthesestrategie 1)	85
3.3.3	Synthese 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenyl)-mercapto-2'-desoxy-thymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit	86
3.3.3.1	Synthesestrategie 2 der Verbindung <b>9</b>	86
3.3.3.2	Synthesestrategie 3 der Verbindung <b>9</b>	88
3.3.4	Synthese des Dimers <b>42</b>	90
3.3.5	Synthese des unmodifizierten T – Amidits <b>22</b>	92
3.3.6	Synthesearbeiten mit der Verbindung 9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thiol (AXT) <b>27</b>	96
3.3.7	Synthesearbeiten zum entsprechend modifizierten A-Derivat	99
3.3.8	Synthesestrategie 5 der Verbindungen <b>9, 66 – 68</b> (modifizierten Amidite)	101
3.4	Oligodesoxynukleotid – Synthese <b>69 – 90</b>	103
3.4.1	Bildung des Nebenproduktes <b>70</b>	104
3.4.2	Synthesearbeiten	105
3.5	Spaltungsreaktionen	109
3.5.1	Spaltungsreaktion in Lösung	110
3.5.2	Spaltungsreaktion auf einem Chip	114
3.5.3	Spaltung an einem Biacore – Chip CM5	118
3.5.4	Spaltung an Magnetic Beads	121
3.6	Post-Labeling	122
3.6.1	Modifizierungsreaktion am Trägermaterial	124
3.7	Punktmutationsdetektion durch festphasenvermittelte Single Nucleotid Primer Extension (SNUPE) und MALDI – MS	125
3.7.1	Stand der Forschung	125
3.7.1.1	SNUPE – Genotypisierung	126
3.7.1.2	Massenspektrometrie	127
3.8	Aufgaben des Projektes	129
3.8.1	Synthese des photolabilen Linkers	131
3.8.2	Immobilisierung des photolabilen Linkers	134
3.8.3	Oligodesoxynukleotid – Synthese am Trägermaterial	137
3.8.4	Verwendung des Amidits <b>9</b> (zur Abspaltung) und die Oligodesoxynukleotid – Synthese	138
3.8.5	Doppelstrang – Experiment	143
3.8.6	Inverse Oligodesoxynukleotid – Synthese	143
3.9	Verknüpfungsreaktionen von Acetal – geschützten Oligodesoxy-nukleotiden mit Hydrazin – Derivaten	144

3.10	Stand der Forschung	144
3.10.1	Die Aldehyd – Gruppe, Stand der Literatur	144
3.10.2	Acetal – modifizierte Oligodesoxynukleotide	145
3.10.3	Freisetzung der Aldehyd – Funktionalität	148
3.10.4	Freisetzung und Konjugationsreaktionen	151
4.0	Zusammenfassung und Ergebnisse	163
4.1	Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf einem Sonden-Array	163
4.2	Punktmutationsdetektion durch festphasenvermittelte Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE) und MALDI-MS	164
4.3	Verknüpfungsreaktionen von Acetal-geschützten Oligodesoxynukleotiden mit Hydrazin-modifizierten Derivaten	165
5.0	Experimentelle Arbeiten	167
5.1	Chemikalien und Lösungsmittel	167
5.2	Geräte und Ausrüstung	169
5.3	Chromatographie	170
5.3.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	170
5.3.2	Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie, LC)	170
5.3.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	170
5.4	Gelelektrophorese	172
5.5	NMR – Spektroskopie	172
5.6	Massenspektrometrie	172
5.7	Verwendete Lösungsmittel	173
5.8	Synthese der Einzelverbindungen	173
	5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-2'-desoxythymidin ( <b>2</b> )	173
	5'-S-Trityl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>3</b> )	174
	5'-(S-Trityl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylamino-phosphit ( <b>4</b> )	175
	5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin ( <b>5</b> )	176
	3',5'-O,S-Diacetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>6</b> )	177
	5'-Mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>7</b> )	178
	5'-S-DMTr-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>8</b> )	179
	5'-(S-DMTr)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylamino-phosphit ( <b>9</b> )	181
	5'-O-DMTr-2'-desoxythymidin ( <b>10</b> )	182
	5'-O-(DMTr)-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin ( <b>11</b> )	183
	3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin ( <b>12</b> )	184
	5'-O-Mesyl-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin ( <b>13</b> )	185
	5'-S-Benzoyl-3'-O-Benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>14</b> )	186
	5'-S-Acetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>15</b> )	187
	5'-S-(Triphenyl)-3'-O-Benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>16</b> )	188
	5'-S-(Triphenyl)-3'-O-Acetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>17</b> )	189
	5'-S-Triphenyl-3'-O-TBDPS-5'-mercapto-2'-desoxythymidin ( <b>18</b> )	190
	5'-Thiol-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin ( <b>19</b> )	191
	5'-Thiol-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin ( <b>20</b> )	193

5'-Thiol-3'-O-TBDPS-2'-desoxythymidin (21)	194
5'-(DMTr)-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropyl - amino-phosphit (22)	195
Benzimidazol-Triflat (23)	196
9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-ol (26)	197
9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thiol (AXT) (27)	198
5'-Chlor-2'-desoxythymidin (28)	199
5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-2'-deoxythymidin (29)	200
5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thio]-3'-O-Benzoyl-5'- mercapto-2'-desoxythymidin (30)	201
5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thio]-3'-O-TBDPS-5'- mercapto-2'-desoxythymidin (31)	202
5'-S-[(9-Methoxyphenyl)-xanthen]-5'-mercapto-3'-O-TMS-2'- desoxythymidin (32)	204
Laevulinsäureanhydrid (34)	205
5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thio]-3'-O-Lev-5'-mercapto- 2'-desoxythymidin (35)	206
5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thio]-3'-O-TDS-5'-mercapto- 2'-desoxythymidin (36)	207
5'-Mercapto-3'-O-Lev-2'-desoxythymidin (37)	208
5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-Bzl-5'- mercapto-2'-desoxythymidin (38)	209
5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-TBDPS-5'- mercapto-2'-desoxythymidin (39)	210
5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-Lev-5'- mercapto-2'-desoxythymidin (40)	211
5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-5'-mercapto- 2'-desoxythymidin (41)	213
5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-[(2-cyano- ethyl)-N,N'-diisopropylamidophosphoramidit]-2'-desoxythymidin (42)	214
5'-S-[9-(4-methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxy- thymidin-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropyl-phosphit) (43)	215
5'-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxyadenosin (46)	216
5'-S-(Acetyl)-5'-mercapto-2'-desoxyadenosin (47)	217
N <sup>6</sup> -Benzoyl-2'-desoxyadenosin (45)	218
N <sup>2</sup> -Isobutyryl-2'-desoxyguanosin (50)	220
N <sup>2</sup> -Dimethylformyl-2'-desoxyguanosin (51)	221
N <sup>4</sup> -Benzoyl-2'-desoxycytidin (53)	222
Allgemeine Arbeitsvorschrift für die 5'-O-Mesylierung und 5'-O- Tosylierung von 2'-Desoxynukleotiden 2, 54-58	223
5'-O-Mesylierung (55, 56, 57, 58)	223
5'-O-Tosylierung (2, 54)	224
4,4'-Dimethoxytriphenylmethanol (61)	228
4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol (62)	229
Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von 5'-S-(4,4'- Dimethoxytriphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxynukleotide (8, 63, 64, 65)	230
Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von 5'-S-(4,4'-	

	Dimethoxytriphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxynucleotide-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropyl-phosphite) ( <b>9</b> , <b>66-68</b> )	233
5.9	Oligodesoxynukleotid-Synthese	235
5.9.1	Reagenzien für die Festphasensynthese	235
5.9.2	Syntheseyklen	236
5.9.3	Trägerabspaltung und Entschützung der permanenten Schutzgruppen	236
5.9.4	Entschützung der temporären 5'-DMT-Schutzgruppe	236
5.9.5	Modifizierter Syntheseyklus für die Oligodesoxynukleotidsynthese mit den Amiditen <b>9</b> , <b>66-68</b>	237
5.10	Spaltungsreaktionen in Lösung	239
5.10.1	Spaltungsreaktionen auf dem Chip	239
5.10.2	Spaltungsreaktionen auf dem Biacore Chip	239
5.10.3	Spaltungsreaktionen an Magnetic Beads	241
5.11	Post – Labeling Reaktion	242
5.12	Punktmutationsdetektion durch festphasenvermittelte SNUPE und MALDI-MS	243
5.12.1	Synthese der Einzelverbindungen	243
	4-Brommethyl-3-Benzoesäure ( <b>94</b> )	243
	4-Brommethyl-3-Nitrobenzoesäure ( <b>95</b> )	244
	4-Hydroxymethyl-3-Nitrobenzoesäure ( <b>96</b> )	245
	4-(4,4'-Dimethoxytrityl)-Hydroxymethyl-3-Nitrobenzoesäure ( <b>101</b> )	246
	6-(Fmoc-amino)-1-hexanol ( <b>106</b> )	247
	1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-(Fmoc-amino)-1-hexanol ( <b>107</b> )	248
	1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-amino-1-hexanol ( <b>108</b> )	249
5.12.2	Trägerbeladung	250
	Trägerbeladung von Aminopropyl – CPG ( <b>102</b> )	250
	Beladung des Trägermaterials ( <b>109</b> ) mit 1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-amino-1-hexanol ( <b>108</b> )	251
5.12.3	Synthese und Massenbestimmung der verschiedenen trägergebundenen Oligodesoxynukleotiden <b>113</b> , <b>115</b> , <b>118 – 123</b>	252
	Synthese des Oligodesoxynukleotids ( <b>124</b> )	255
	Doppelstrangexperiment des trägergebundenen Oligodesoxynukleotid ( <b>123</b> ) und dem Oligodesoxynukleotid ( <b>124</b> )	255
5.12.4	Synthese der inversen Oligodesoxynukleotide <b>155</b> und <b>156</b>	255
5.13	Verknüpfungsreaktionen von Acetal-geschützten Oligodesoxynukleotiden	256
6.0	Literaturverzeichnis	262

## 1. Einleitung

Im letzten Jahr (2003) feierten die Forscher zum fünfzigsten Mal den Jahrestag der Strukturaufklärung der DNA. Sie feierten aber nicht nur dieses Jubiläum, sondern zu Recht auch die Entwicklungen, die in den letzten 50 Jahren auf diesem Gebiet stattgefunden haben. Denn mit der Entdeckung der DNA - Struktur begann eine rasante Entwicklung in der Molekularbiologie. Zwei Männer für die dieser Jahrestag etwas sehr besonderes gewesen sein muß, sind James D. Watson und Francis H. C. Crick. Die beiden entwarfen und publizierten<sup>1</sup> 1953 als Erste das räumliche Modell der DNA, das mit einem Schlag den Fortschritt in vielen molekularbiologischen Projekten ermöglichte. Die räumliche Struktur der DNA, ist heute nicht nur einer kleinen Gemeinde von Wissenschaftlern bekannt, sondern sie ist als Doppelhelix, zumindest bildlich, großen Teilen der Bevölkerung präsent. James D. Watson und Francis H. C. Crick erhielten zusammen mit Maurice H. F. Wilkins 1962 den Nobelpreis für diese Leistung. Heute ist die Verleihung an diese drei Wissenschaftler umstritten. Dabei soll hier nicht ihre vollbrachte Leistung geschmälert werden, allerdings hätte der Personenkreis um Rosalind Franklin erweitert werden müssen. Die räumliche Struktur konnte nur aufgrund ihrer Labordaten (Röntgenbeugungsbilder) aufgeklärt werden. Jedoch war Rosalind Franklin zum Zeitpunkt der Preisverleihung bereits an Krebs verstorben. Der Nobelpreis wird jedoch nur an lebende Personen vergeben. Heute geht man davon aus, dass Rosalind Franklin<sup>2</sup> durch die Arbeiten an der Röntgenkammer in dem Maße verstrahlt wurde, daß sie so früh an Krebs starb. Was ist das Besondere an dieser räumlichen Struktur, wie sieht ihr Aufbau aus? Aufgrund der gemessenen Röntgenbeugungsbilder und der prozentual gefunden Elementzusammensetzung (Elementaranalyse) weist die beschriebene Struktur die folgenden Eigenschaften auf. Die äußere Gestalt der DNA-Doppelhelix wird vom Rückgrat der beiden umeinander gewundenen Stränge (Wendeltreppe) geprägt. Die beiden Stränge sind aus Untereinheiten, die man als Nukleotide bezeichnet, aufgebaut. Ein Nukleotid besteht dabei immer aus einer Zuckereinheit, einem Phosphatrest und einer Purin – oder Pyrimidinbase, beides planare, ringförmige Moleküle mit einem Gerüst aus Kohlenstoff und Stickstoff. Im Fall der DNA handelt es sich bei der Zuckereinheit um die 2'-Desoxyribose. *Abbildung 1.* und *2.* zeigen die räumliche Darstellung der Doppelhelix und einen kleinen Ausschnitt, um deren repetitiven Einheiten aufzuzeigen.

---

<sup>1</sup> J.D. Watson, F. H. C. Crick; *Nature* **1953**, 171, 737-738

<sup>2</sup> A. Piper; *TIBS* **1998**, 23, 4, 151-154

## 1. Einleitung

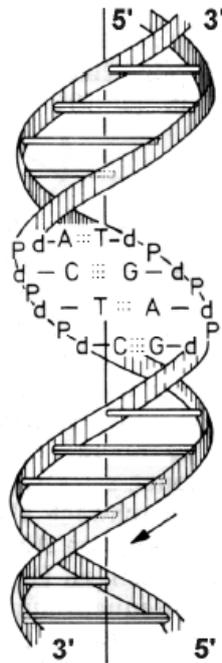


Abbildung 1: Ausschnitt aus der DNA-Doppelhelix

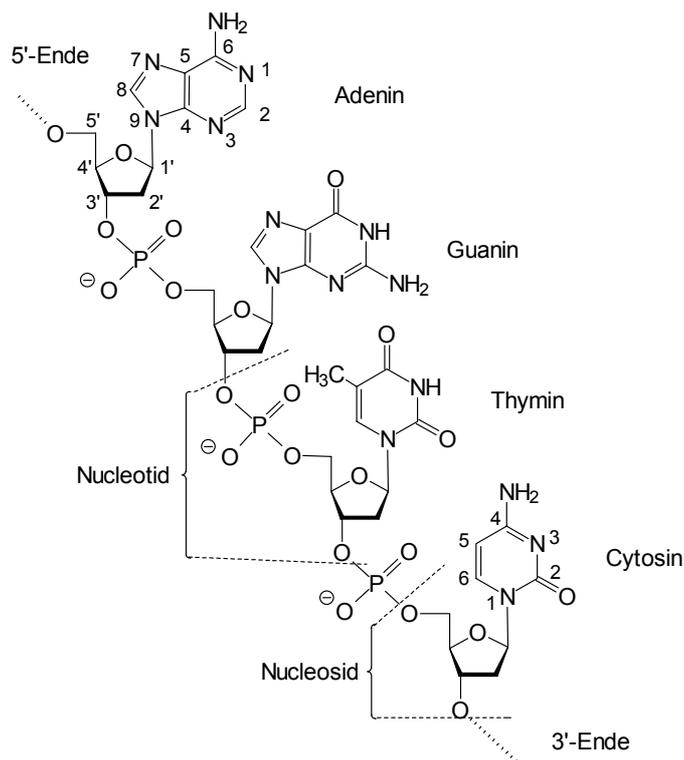


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Strukturformel eines DNA-Strangs

Eine revolutionäre Anwendung für die Molekularbiologie gelang K. B. Mullis (1985), mit der Entwicklung der Polymerasekettenreaktion<sup>3</sup> (PCR-Methode). Von da an stand den Forschern eine Möglichkeit zur Verfügung, gezielt schnell und auf relative

<sup>3</sup> R. K. Sakai, S. Scharf, F. Faloon, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, 230, 1350-1354

## 1. Einleitung

einfache Weise DNA zu vervielfältigen. Weitere Fortschritte auf dem Gebiet der Sequenzierung ermöglichten im Jahre 2001 die Entschlüsselung des humanen Genoms (Rohfassung)<sup>4</sup>. Bisher ist das Projekt mit dem Namen HUGO noch nicht vollständig abgeschlossen, seit der überstürzten Bekanntgabe der „Rohfassung“, arbeiten die Forscher nun vor allem daran, die Präzision der gemessenen Sequenzdaten zu steigern. Hier sind inzwischen vor allem auch die Bioinformatiker gefragt, an neuen Lösungen zu arbeiten um der anfallenden Datenmenge von 3 Milliarden Basen Herr zu werden. Wollte man zuerst „nur“ das menschliche Genom entschlüsseln, rückt nun, nach erfolgter Sequenzierung das Individuum, mit seinen einzelnen individuellen Gensequenzen, in den Vordergrund. Dabei konnte beobachtet werden, daß es sich bei den gefundenen Unterschieden zwischen den einzelnen Individuen um Mutationen handelt, die in den meisten Fällen nur eine einzelne Base betreffen. Man spricht hier von einem Einzelbasenpolymorphismus (single nucleotide polymorphisms, SNP). Aufgrund dieser Unterschiede ist es heute möglich, Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse, die Entstehung von Krankheiten und die Nebenwirkungen von Medikamenten zu machen. Es wurde mit der DNA-Diagnostik ein Markt geschaffen, von dem in den nächsten Jahren eine rasante Entwicklung erwartet wird. Und nicht nur Mediziner werden im Interesse ihrer Patienten DNA-Tests anordnen, nein, auch der „Otto-Normalbürger“ kann heute schon bei diversen Labors die unterschiedlichsten Tests in Auftrag geben (730 000 Gentests 2002 → ohne Vaterschaftstests und Erbgutanalysen von Rechtsmedizinern; Zahl der Gentests 2001: Italien 200 000, Großbritannien 60 000, Belgien 50 000). Das Ziel wird die Entwicklung einer personalisierten Medizin sein. Gemeint ist hiermit, daß jeder Patient aufgrund seines Erbmaterials, das für ihn optimale Medikament erhalten soll. Denn, von Person zu Person tritt zum Beispiel eine unterschiedlich starke Wechselwirkung mit einem Medikament auf. Zum jetzigen Zeitpunkt verstehen die Forscher die Unverträglichkeit von vielen Medikamenten noch nicht. Daher arbeiten viele universitäre Arbeitsgruppen und Firmen an der Entwicklung von neuen, schnelleren und präziseren DNA-Testsystemen. Um solche Testsysteme verwirklichen zu können, müssen in den verschiedenen Forschungsgebieten weiterführende Arbeiten geleistet werden. Dabei ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Fachbereiche unumgänglich.

Aber nicht nur Naturwissenschaftler sind hier gefragt, wenn man den inzwischen herrschenden „Test-Tourismus“ und den teilweise laxen Umgang in europäischen Kliniken und Labors berücksichtigt. Der Preis eines Gentests beträgt durchschnittlich 572 € (21 Länder berücksichtigt), allerdings zahlt der Auftraggeber in der Schweiz 700 €, in Großbritannien und Belgien 200 € und in Kroatien sogar nur 100 €. Daher

---

<sup>4</sup> A.) International Human Genome Sequencing Consortium; *Nature* **2001**, 409, 860-922; B.) C. Venter et al; *Science* **2001**, 291, 1304-1351

## 1. Einleitung

muß zukünftig weiterhin auch an ethischen, datenschutzrechtlichen sowie juristischer Fragen gearbeitet werden, zudem sind Fehlerraten von 2 bis 10% in keinem Fall akzeptabel.

Die hier vorliegende Arbeit möchte zur Weiterentwicklung und Standardisierung der DNA-Tests einen Beitrag leisten. Dabei wird die Modifizierung von Nukleotiden, die einfachere Anbindung von Oligodesoxynukleotiden an eine Trägeroberfläche, das Postlabeling nach erfolgter Synthese, sowie die Entwicklung eines neuen DNA - Testsystems hier im Vordergrund stehen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile auf, die hier nur kurz zum besseren Verständnis, skizziert werden sollen:

### 2.0 Aufgabenbeschreibung

#### a. Projektarbeit mit der Firma *Clondiag Chip Technology GmbH*, Jena

- Synthese der vier 5'-S-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5'-mercapto-2'-desoxynucleotid-3'-O-(2-cyanoethoxy-diisopropyl)-phosphite (Verbindungs-Nr. **9**, **66-68**)
- Einbau der modifizierten Nukleotide in verschiedene Modell-Oligodesoxynukleotide
- Durchführung verschiedener Spaltungsreaktionen (in Lösung und auf unterschiedlichen Oberflächen  $\Rightarrow$  Biacore-Chip, Magnetic-Beads und einem DNA-Chip)

#### b. Projektarbeit

- Verknüpfungsreaktionen von Acetal-geschützten Oligodesoxynukleotiden mit Hydrazin-modifizierten Derivaten-bzw. Oberflächen

#### c. Punktmutationsdetektion durch festphasenvermittelte Single

##### **Nucleotide Primer Extension (SNuPE) und MALDI-MS (DFG gefördert)**

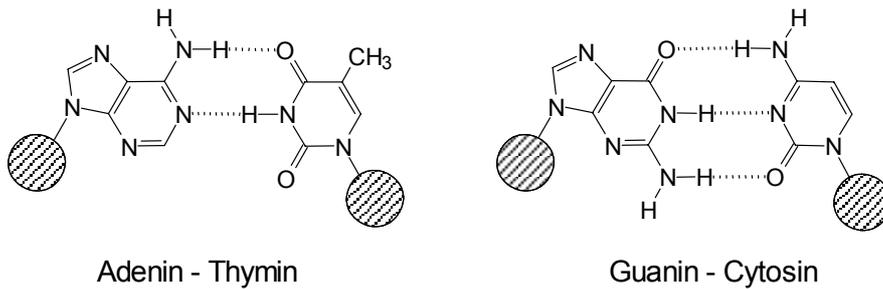
- Synthese eines photolabilen Linkers und Anknüpfung an die feste Phase
- Anbindung bzw. Synthese ( $3' \Rightarrow 5'$  sowie  $5' \Rightarrow 3'$ ) der entsprechenden Oligodesoxynukleotiden (Primer)
- Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR-Reaktion)
- Freisetzung des zu detektierenden PCR-Produktes direkt im Massenspektrometer

Aufgrund der breiten Themenvielfalt soll hier im Allgemeinen Teil zuerst auf den Stand der Forschung und die wichtigsten Entwicklungen auf diesen, doch sehr unterschiedlichen, Gebieten kurz eingegangen werden.

### 2.1 Grundlagen

Die Grundlage des Lebens, aber auch nahezu aller Methoden der DNA-Diagnostik und DNA-Therapie ist die gegenseitige Erkennung zweier komplementärer Nukleinsäurestränge. In den Nukleinsäuren sind die Nukleobasen N-glycosidisch an das Desoxyribosephosphatrückgrat (siehe *Abbildung 1.* und *2.*) gebunden. Die von Watson und Crick postulierte und später verfeinerte DNA-Doppelhelix bildet sich aus zwei zueinander komplementären DNA-Strängen durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren Adenin (A) - Thymin (T) und Guanin (G) - Cytosin (C) (Watson-Crick-Basenpaar) aus (siehe *Abbildung 3.*).

## 2. Allgemeiner Teil



**Abbildung 3:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Watson-Crick-Basenpaaren

Die genetische Information ist dabei in der Reihenfolge (Sequenz) der Basen in den beiden hybridisierten Strängen verschlüsselt. Bildet sich aus zwei komplementären Einzelsträngen ein Doppelstrang aus, bezeichnet man diesen Prozeß als Hybridisierung. Die beiden Stränge lagern sich dabei stets so zusammen, daß die 5' → 3'-Richtung des einen Stranges der umgekehrten Richtung des anderen entspricht. Die Hybridisierung kann zur Aufspürung und zum Nachweis eines Gens oder einer mRNA genutzt werden. Dazu wird ein Oligodesoxynukleotid definierter Sequenz benötigt, daß als Sonde in sequenzselektiver Weise den zu bestimmenden (Ziel)-Strang bindet.

Die Doppelhelix macht einen sehr trägen und unflexiblen Eindruck, sie ist chemisch und strukturell jedoch eines der vielseitigsten Moleküle in der Zelle. Die Stapelung der planaren Basenpaare scheint das Molekül „ziemlich steif“ zu machen. Und deren Ausrichtung ins Helixinnere, sieht nach einer Struktur aus, die zuerst zur Erhaltung des genetischen Codes gedacht ist, nicht aber nach einer, die sich leicht an biochemischen Reaktionen beteiligen könnte<sup>1</sup>. Die DNA kann jedoch viele Formen annehmen (A-Form, B-Form, Superhelix u.a., auf die hier nicht näher eingegangen werden soll) und mit anderen Molekülen in der Zelle interagieren. Sie hat eine Reihe von Eigenschaften, die ein Forscher heute in seinem Labor ausnutzen kann. Dazu gehören die Möglichkeiten der Hybridisierung, der Transkription, der Translation sowie die der Replikation. Es handelt sich hierbei primär um Prozesse, die der Zelle zur Vervielfältigung und zur Proteinbiosynthese dienen. Während der Proteinbiosynthese muß die in Form einer Basensequenz in der DNA bzw. RNA niedergelegte Information in eine Sequenz von Aminosäuren im Peptidverband eines Proteins übersetzt werden. Dieser Vorgang des Übersetzens (Translation) unterscheidet sich dabei grundsätzlich von den Prozessen der Replikation und Transkription. Denn bei diesen beiden Vorgängen handelt es sich nur darum, von einer Nukleinsäurekette unter Beibehaltung der prinzipiellen Eigenschaften der verwendeten „Sprache“ eine Kopie zu erstellen. Die Replikation, die Transkription und die Translation, sind höchst komplizierte Vorgänge und bedürfen eines gewaltigen Aufwandes an Energie und Material in der Zelle. Während dieser Prozesse können spontane Fehler auftreten. Spontane und induzierte Änderungen des Erbgutes werden als Mutationen bezeichnet. Alle Mutationen bewirken letztlich eine Veränderung, einen Defekt, oder das Fehlen von Genen. Dies kann unvermittelt durch

- Fehler bei der Meiose (Bildung der Gameten) der Eltern,

<sup>1</sup> Sonderheft Spektrum der Wissenschaft, Die Moleküle des Lebens, Scientific American

## 2. Allgemeiner Teil

- Fehler bei der DNA-Replikation (statistisch ca. 1:1 000 Basen),
- Faktoren der Umwelt wie elektromagnetische Strahlung (UV, Röntgen), radioaktive Strahlung, Chemikalien oder Temperatur,
- Fehler im Reparaturmechanismus der Zelle geschehen.

Bestimmte Regionen der DNA sind besonders anfällig für Mutationen, man nennt sie Hot Spot Regionen. Die Auswirkungen von Mutagenen für den Organismus können je nach Mutationstyp sehr unterschiedlich sein. Die Zellen vieler Arten besitzen einen umfangreichen DNA-Reparaturmechanismus. Daher könnte man entstandene Mutationen auch als Effekt mangelhafter DNA-Reparatur auffassen. Die Mechanismen der DNA-Reparatur sind inzwischen gut erforscht. Man findet sie zum Beispiel bei Bakterien, Pilzen, Fischen, Säugetieren, Menschen. Sie dienen der Vermeidung:

- des Zelltods,
- von Mutationen,
- von Replikationsfehlern,
- von dauerhaften DNA-Schäden und
- von Genom-Instabilitäten.

Fehler in diesen Reparatur-Prozessen sind vermutlich für den Alterungsprozeß und die Entwicklung von Krankheiten verantwortlich. Die Bedeutung der DNA-Reparatur kann man an der Tatsache ablesen, daß die DNA das einzige Molekül ist, das spezifisch repariert wird. Mehr als 100 Gene sind an dieser Reparatur, auch bei kleinen Genomen, beteiligt. Ein sehr ausführlicher Aufsatz zur DNA-Reparatur wurde von Orlando D. Schärer unter dem Titel DNA Schäden & Reparatur im Jahr 2003 veröffentlicht<sup>2</sup>.

Auf die Translation und die Replikation möchte ich im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingehen, es gibt zu diesen Themen genügend einführende<sup>3</sup>, wie auch weiterführende Literatur. Mein Interesse gilt hier den unterschiedlichsten Hybridisierungsexperimenten, die Forscher bereits erfolgreich ausnutzen können und der Transkription, im Rahmen der Polymerasekettenreaktion (PCR-Methode).

### 2.2 Probenmaterial

Um jedoch Hybridisierungsexperimente durchführen zu können, benötigt man zuerst das entsprechende Probenmaterial. Hier sind zum Einen die körpereigene DNA eines Probanden zu nennen, zum Anderen aber auch synthetisch hergestellte Oligodesoxynukleotide, die sowohl unmodifiziert als auch modifiziert hier zum Einsatz kommen können. Die Sequenz der Erbsubstanz ist zunächst einmal in allen Zellen eines Organismus identisch, so daß das Probenmaterial für eine DNA-Untersuchung in der Regel relativ einfach zu erhalten ist. Zum Beispiel sind 10 ml Blut, die ungefähr 250 µg an DNA enthalten, ausreichend. Die Isolierung der DNA aus dem entsprechenden Probenmaterial, ist heute bei „Standardfragen“ relativ einfach durch standardisierte Protokolle möglich. Die DNA von Blutzellen isoliert man

---

<sup>2</sup> O. D. Schärer; *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3052-3082

<sup>3</sup> A.) J. D. Watson, J. Tooze, D. T. Kurtz: *Rekombinierte DNA Eine Einführung*, Spektrum Verlag **1989**, ISBN 3-922508-34-0; B.) Sonderheft *Spektrum der Wissenschaft* **1986**, Die Moleküle des Lebens

zum Beispiel, indem man zuerst die Kerne mit Hilfe von Enzymen von den restlichen Zellbestandteilen abtrennt. Anschließend wird die DNA mit Chemikalien wie zum Beispiel Phenol oder Chloroform von den Proteinen abgetrennt und durch die Zugabe einer Salzlösung ausgefällt.

### 2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR-Reaktion)

Ist die Verfügbarkeit des Probenmaterials nicht gewährleistet, ist es seit 1985<sup>4</sup> möglich, das Material gezielt, schnell und auf relativ einfache Weise mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR-Methode) zu vervielfältigen. Die PCR-Methode ist heute in den molekularbiologischen Forschungs- und Diagnoselaboratorien, das am häufigsten angewendete Routineverfahren. Die Arbeit von Kary B. Mullis und seinen Kollegen (*Cetus Corporation*, USA) ermöglicht es, Segmente der DNA mit Oligodesoxynukleotid-Primern (Primern) zu versehen und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) zu vervielfältigen (Nobelpreis 1993). Zur Durchführung einer PCR benötigt der Forscher:

- das zu vervielfältigende DNA-Stück als Matrize
- entsprechende, komplementäre Oligodesoxynukleotidprimer (Primer)
- eine hitzestabile Polymerase  
(in den meisten Fällen die Taq-Polymerase)
- eine Mischung aus vier Nukleotidbasen (Triphosphaten, dNTPs)
- ein Temperaturwechselgerät (PCR-Gerät)

Der eigentliche PCR-Zyklus verläuft im Wesentlichen in drei temperatur-abhängigen Schritten, *Abbildung 4.* zeigt diese auf:

- Die Denaturierung des DNA-Doppelstranges in die beiden entsprechenden Einzelstränge (Target-DNA)  
⇒ bei hoher Temperatur ca. 95°C
- Die Anlagerung von zwei komplementären Primern an die beiden Enden der Target-DNA bei der Annealing-Temperatur  
⇒ abhängig vom Primer, G-C Gehalt, ca. bei 55 bis 58°C (möglichst 10°C unter dem entsprechenden  $T_M$ -Wertes des Duplex)
- Die Zugabe der vier Nucleotidbasen (dNTPs) und dem Enzym (Polymerase)  
⇒ bei 70°C

Dabei ist besonders auf die Salzkonzentration (Enzyme können sehr salzempfindlich reagieren) zu achten, sowie auf die Zugabe der Primer im Überschuß um die Amplifizierung nicht zu limitieren. Nach  $n$  Amplifizierungszyklen ist die Zahl der produzierten Kopien theoretisch  $2^n$ , das heißt, nach 20 Zyklen sollten  $1 \times 10^6$  Kopien des gewünschten Bereichs vorliegen. Der Vorteil der PCR ist die extrem hohe Empfindlichkeit, sie ermöglicht die Amplifizierung von DNA einer einzelnen Zelle. Diese stellt jedoch auch gleichzeitig einen signifikanten Nachteil dar, da auch nur die minimalste Verunreinigung schwerwiegende Folgen haben kann (Kontaminationsgefahr). Ein weiterer Nachteil der PCR ist, daß die DNA-Sequenz des zu vervielfältigenden Bereiches, bereits bekannt sein muß. Diese Problematik

---

<sup>4</sup> C. R. Newton, A. Graham: PCR , Spektrum Akademischer Verlag (1995)

## 2. Allgemeiner Teil

kann inzwischen jedoch teilweise umgangen werden, indem man Randomprimer einsetzt.

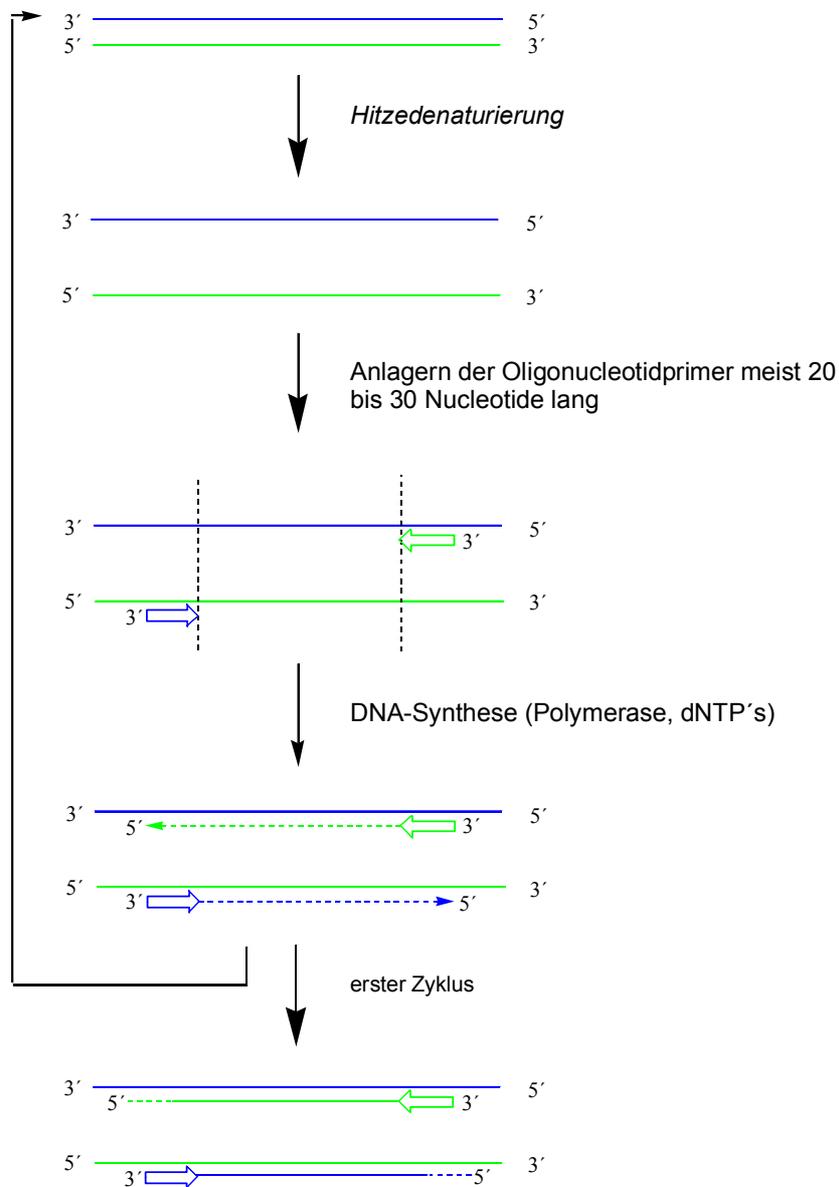


Abbildung 4: PCR-Zyklus

Die verwendeten PCR-Primer werden in der Regel synthetisch hergestellt, ihre Länge variiert um ca. 20 Basen und länger. Ihre geschickte Auswahl ist häufig der Schlüssel des Erfolges einer PCR-Reaktion. Daher sollte der Anwender sich für die Konzeption der PCR-Primer genügend Zeit nehmen und verschiedene Konzeptionshilfen beachten.

- Der G-C Gehalt des PCR-Primers soll etwa 50% betragen.
- Die Annealing Temperatur sollte etwa 55 bis 58 °C betragen, diese bestimmt daher auch die Länge des PCR-Primers.
- Die ausgewählte Sequenz sollte statistisch einmalig auf dem DNA-Abschnitt sein (Primer nicht kürzer als 12 Basen).
- Der Salzgehalt des PCR-Primers sollte nicht zu hoch sein (Reinheit).

## 2. Allgemeiner Teil

In einem PCR-Reaktionsansatz können heute mehrere unterschiedliche DNA Bereiche gleichzeitig vermehrt werden (Multiplex-PCR). Bei eukaryontischen Genen geht man von der reifen mRNA aus. Durch die RT-PCR, einer Kombination von Reverser Transkription und PCR, werden die zur mRNA passenden DNA-Abschnitte vervielfältigt.

Die asymmetrische PCR ist eine spezielle PCR-Technik, bei der einer der beiden Primer im Überschuß vorliegt, so daß in der Folge selektiv ein Strang amplifiziert wird. Ziel dieser Technik ist die Produktion einzelsträngiger PCR-Produkte, die keiner zusätzlichen Denaturierung vor einer Hybridisierungsreaktion bedürfen. Entwickelt wurde die Methode zur Didesoxysequenzierung von DNA, für die der Einzelstrang als Matrize benutzbar ist<sup>5</sup>.

### 2.4 Oligodesoxynukleotid-Synthese

Heute ist die Oligodesoxynukleotid-Synthese eines unmodifizierten PCR-Primers weder kostspielig, noch zeitaufwendig. Eine ausgereifte Synthesechemie und moderne DNA-Synthesizer erlauben eine schnelle und effiziente Herstellung von Oligodesoxynukleotiden nahezu jeder Sequenz. In der sogenannten Festphasensynthese wird die gewünschte Sequenz an einem inerten Trägermaterial aufgebaut und nach dem Syntheseende von diesem abgespalten. Gegenüber einer Synthese in homogener Phase hat die Festphasensynthese den großen Vorteil, daß die einzelnen Zwischenstufen nicht mühsam isoliert werden müssen. Überschüssige Reagenzien können einfach durch Spülschritte entfernt werden. Optimierte Syntheseprotokolle ermöglichen heute die Herstellung eines 21mers innerhalb von 70 Minuten (Anfang der 70er Jahre hätte ein Chemiker für die entsprechende Synthese drei Jahre benötigt!).

Nachdem Lord Alexander Todd die Grundlagen für eine synthetische Nukleotidchemie erarbeitet hatte (Nobelpreis 1957<sup>6</sup>), gelang es Gobind Khorana in den späten 50er Jahren mit seinem Phosphordiesterverfahren, definierte Trimerblöcke zu synthetisieren. Ohne diese wäre zum Beispiel die Entzifferung des genetischen Codes nicht möglich gewesen<sup>7</sup>. Seine Kombination aus chemischen und enzymatischen Syntheseverfahren führten außerdem zur ersten Totalsynthese eines funktionsfähigen Gens. Als weitere Meilensteine in der Entwicklung der synthetischen Nukleotidchemie sind die folgenden zu nennen:

- Phosphortriesterverfahren<sup>8</sup> (siehe *Abbildung 6.*)
- Chlorphosphitverfahren
- Die Entwicklung der DNA-Festphasensynthese durch Robert Letsinger<sup>9</sup>
- Die Einführung der heute allgemein gebräuchlichen Phosphoramiditbausteinen durch Marvin H. Caruthers<sup>10</sup>
- Die von Steven Fodor Anfang der 90er Jahre beschriebene photolithographische

---

<sup>5</sup> U. B. Gyllenstein, H. A. Erlich; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7652

<sup>6</sup> A. R. Todd; Nobel – Lectures Chemistry 1942-1962, World Scientific, Singapore, **1999**

<sup>7</sup> Er erhielt für diese Leistung, 1968 zusammen mit R. W. Holley und M. W. Nirenberg den Nobelpreis für Medizin.

<sup>8</sup> A.) A. M. Michelson, A. R. Todd; *J. Chem. Soc.* **1953**, 951; B.) F. Eckstein, I. Risk; *Chem. Ber.* **1969**, 102, 2362

<sup>9</sup> A.) R. L. Letsinger, W. B. Lunsford; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 2655; B.) R. Letsinger, V. Mahaderan; *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526

<sup>10</sup> S. L. Beaucage, M. H. Caruthers; *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859

## Parallelsynthese von Oligodesoxynukleotid-Arrays<sup>11</sup>

Die DNA-Synthese erfolgt heute in der Regel, vor allem bei unmodifizierten Oligodesoxynukleotiden nach der Phosphoramidit-Methode. Diese hat sich gegenüber den anderen zur Verfügung stehenden Methoden wie die Phosphordiester-, die Phosphortriester und die H-Phosphonat-Methode aufgrund der einfachsten Handhabung und zufriedenstellenden Ausbeuten durchgesetzt. Hier ist allerdings anzumerken, daß verschiedene Modifikationen (vor allem Backbone-Modifikationen) mit Hilfe dieser Synthesechemie nicht synthetisiert werden können, so daß der Forscher gelegentlich auf eine andere Synthesemethode zurückgreifen muss.

### 2.4.1 Die Phosphordiester-Methode

Die von Khorona (1979) eingeführte Methode<sup>12</sup>, konnte sich aufgrund langer Reaktionszeiten und einer Vielzahl von entstehenden Nebenprodukten nicht durchsetzen. Sie beruht auf der Verknüpfung eines 3'-Phosphorsäuremonoesters mit der 5'-Hydroxylfunktion eines zweiten Nucleosids unter Zuhilfenahme von DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) als Kondensationsmittel.

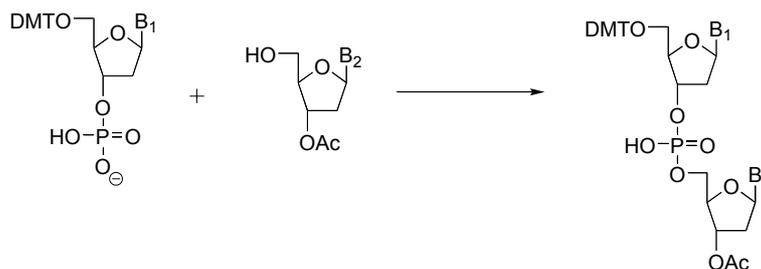


Abbildung 5: Die Phosphordiester-Methode

### 2.4.2 Die Phosphortriester-Methode

Hier wird das geschützte Nucleosidphosphorsäurediester-Derivat mit einem 5'-ungeschützten Nucleosid unter Aktivierung (z.B. Arylsulfonsäure-azolidin) umgesetzt<sup>13</sup>. Nebenreaktionen am Phosphor konnten hier gegenüber der Phosphordiester-Methode, durch die Einführung der Cyanoethylschutzgruppe am Phosphor unterbunden werden.

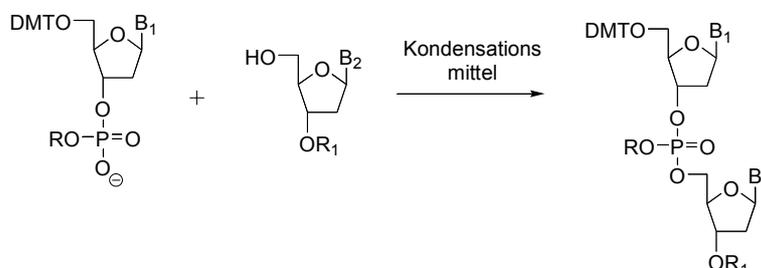


Abbildung 6: Die Phosphortriester-Methode

<sup>11</sup> A.) S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. T. Stryer, A. Lu, D. Solas; *Science* **1991**, 251, 767; B.) G. von Kiedrowski; *Angew. Chem.* **1991**, 103, 839

<sup>12</sup> H. G. Khorona; *Science* **1979**, 203, 614-625

<sup>13</sup> S. A. Narang, R. Brousseau, H. M. Hsiung, J. J. Michniewicz; *Methods Enzymol.* **1980**, 65, 610-628

### 2.4.3 Die H-Phosphonat-Methode

Die Umsetzung von fünfwertigen Phosphorverbindungen mit einem 5'-ungeschützten Nukleosid unter Verwendung eines Säurechlorids (z.B. Pivalylchlorid) als Kondensationsmittel, beruht auf den Arbeiten von Todd<sup>14</sup>. Die H-Phosphonate Methode kommt ohne Schutzgruppen am Phosphor aus.

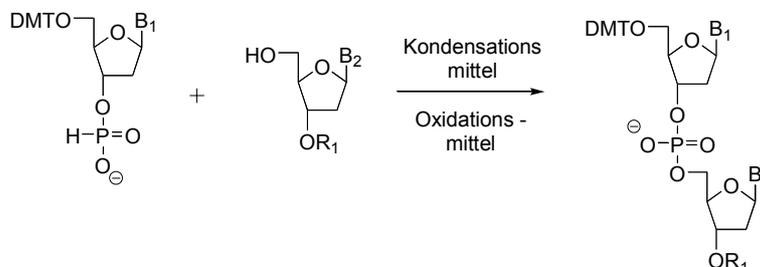


Abbildung 7: Die H-Phosphonat-Methode

In Lösung weist diese Methode exzellente Ausbeuten auf, die sogar die Phosphoramidit-Methode übertreffen. Zudem sind die H-Phosphonate für Modifikationen zugänglich und stabiler als die vergleichbaren Phosphoramidite. Die häufigste Nebenreaktion, die Acylierung, beruht auf der Verwendung des Kondensationsmittels. Ein weiterer Unterschied zur Phosphoramidit-Methode ist die Oxidation, die erst am Ende des gesamten Synthesesyklus erfolgt.

### 2.4.4 Die Phosphoramidit-Methode

Um ein Oligodesoxynukleotid nach der Phosphoramidit-Methode herstellen zu können müssen zuerst die entsprechenden kopplungsfähigen Nukleotide hergestellt werden<sup>15</sup>. Hier wird ein dreiwertiger Phosphor mit der N,N-Diisopropylaminogruppe als Amiditkomponente und der  $\beta$ -Cyanoethylgruppe als Phosphorschutzgruppe eingesetzt. Die eingesetzten Amiditbausteine (Abbildung 8. zeigt die heute verwendeten Standardamidite) sind leicht durch Tetrazol oder andere leicht saure Aktivatoren aktivierbar und die Kopplung erfolgt in ausgezeichneten Ausbeuten, meist  $\geq 99\%$ .

Die heute verwendeten DNA-Synthesizer beruhen ausschließlich auf dem Verfahren der Phosphoramidit-Methode. Die hier verwendeten Standardamidite (Abbildung 8.) werden, aufgrund ihres inzwischen günstigen Preises, von den meisten Anwendern bei den einschlägigen Herstellern (wie *Perseptive Biosystem*, *TriLink*, *Chemgenes*, *Glen Research*, *Eurogentech* u.a.) erworben. Natürlich können dort auch modifizierte Bausteine bezogen werden.

Die entsprechenden Amidite können dann zusammen mit einem Aktivator (z.B. 1H-Tetrazol, Dicyanoimidazol (DCI), Ethylthiotetrazol (ETA), Benzylthiotetrazol (BTA) oder Pyridiniumhydrochlorid (PyHCl)) im Kopplungsschritt zur Reaktion gebracht werden. *Abbildung 10.* zeigt den entsprechenden Synthesesyklus nach der Phosphoramidit-Methode.

<sup>14</sup> P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg; *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4055-4058

<sup>15</sup> A.) S. P. Adams, K. S. Kavka, E. K. Wykes, S. B. Holder, G. R. Galluooi; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 661; B.) N. D. Sinha, V. Großbruchhaus, H. Köster; *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24 (9), 877-880

## 2. Allgemeiner Teil

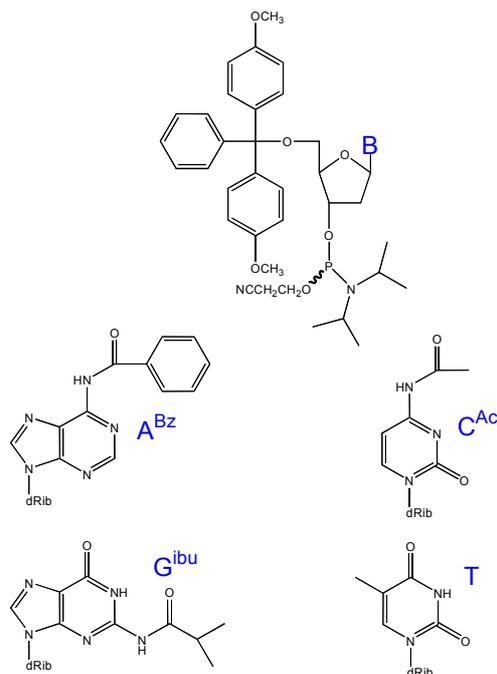


Abbildung 8: 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxynucleotid-3'-O-(2-cyanoethoxy-diisopropyl)-phosphite

Die Nukleinsäuren sind chemisch anspruchsvolle, polyfunktionelle Makromoleküle. Der Schlüsselschritt der Oligodesoxynucleotid-Synthese ist die Knüpfung der Phosphordiesterbindung zwischen der 5'-Hydroxylgruppe des einen Nucleosids und der 3'-Hydroxylgruppe des anderen Nucleosids.

### 2.4.5 Verwendete Schutzgruppen

Um diese Reaktion einheitlich und in guter Ausbeute durchführen zu können, müssen alle anderen an dieser Reaktion nicht beteiligten funktionellen Gruppen wie die exocyclische Aminogruppe der Nucleobase und die nicht umzusetzende Hydroxylgruppe des Kupplungspartners durch eine reversible Blockierung geschützt werden. Dabei ist zwischen einer temporären und einer permanenten, bis zur Vervollständigung der Synthese bestehende Blockierung, der funktionellen Gruppen zu unterscheiden. Permanent geschützt werden die exocyclischen Aminogruppen der Nucleobasen (A → N<sup>6</sup>: Benzoyl; C → N<sup>4</sup>: Acetyl oder Benzoyl; G → N<sup>4</sup>: iso-Buturyl) und die Phosphatbrücke (Cyanoethylester).

„Easy-off-Gruppen“ (schnellere Abspaltung möglich<sup>16</sup>) der Nucleobasen werden häufig mit Ethylendiamin oder Ethanolamin in 2 h bei RT abgespalten, es handelt sich hierbei um: A → N<sup>6</sup>: Pac (Phenoxyacetyl); C → N<sup>4</sup>: iso-Buturyl; G → N<sup>4</sup>: iso-Buturyl.

Inzwischen findet auch Diethylamin, aufgrund seiner Verwendung in der Pharmacon-Chemie und vor allem bei der Large-Scale Synthese, Anwendung als Abspaltungsreagenz.

Die Phosphordiester-Schutzgruppe und die Schutzgruppen der Nucleobasen wurden dabei so ausgewählt, daß sie nach erfolgter Synthese mit einer ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeit abgespalten werden können (basenlabil). Dies geschieht

<sup>16</sup> N. D. Sinha, P. Davis, N. Usman, J. Perez, R. Hodge, J. Kremsky, R. Casale; *Biochimie*, **1993**, 75, 13-23

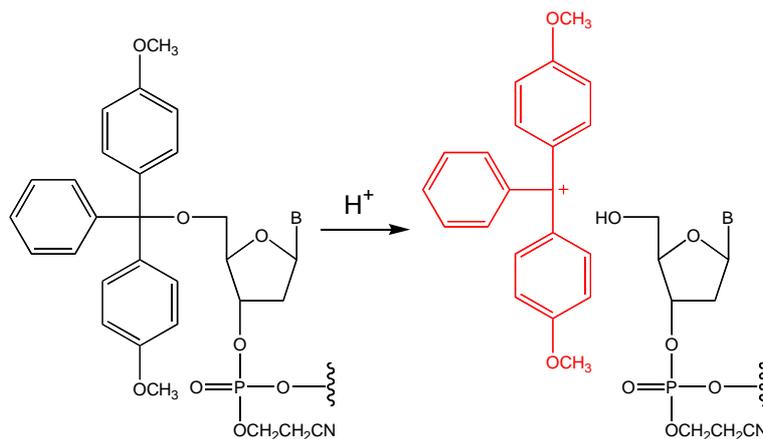
## 2. Allgemeiner Teil

entweder mit 25%iger Ammoniaklösung, methanolischer Ammoniaklösung, Ethylen-diamin oder Ethanolamin, im Falle der Cyanoethylester-Gruppe unter  $\beta$ -Eliminierung.

Die 5'-Hydroxylschutzgruppe wird mit einer temporären Schutzgruppe geschützt, die während der fortschreitenden Synthese wiederholt abgespalten wird (säurelabil). Um Depurinierungen zu vermeiden, können hier nur mild saure Bedingungen angewendet werden. Denn bei der Einwirkung von starken Säuren kommt es zum Bruch der N-glycosidischen Bindung zwischen der Zuckereinheit und den Purinen Adenin und Guanin.

### 2.4.6 Festphasensynthese

Aufgrund ihrer Säurelabilität haben sich daher in der Festphasensynthese die Tritylschutzgruppen als optimale 5'-Schutzgruppen erwiesen, insbesondere die Dimethoxytritylschutzgruppe. Sie kann mit 3%iger Trichloressigsäure oder Dichloressigsäure in Dichlormethan innerhalb von zwei Minuten (am CPG-Material) oder 1 Stunde mit 80%iger Essigsäure (in Lösung) abgespalten werden. Zudem gestattet die Farbe der bei der Abspaltung entstehenden Tritylkationen eine photometrische Verfolgung der Reaktion am polymeren Träger (siehe *Abbildung 9.*) und ermöglicht so eine Qualitätskontrolle während der Reaktion.



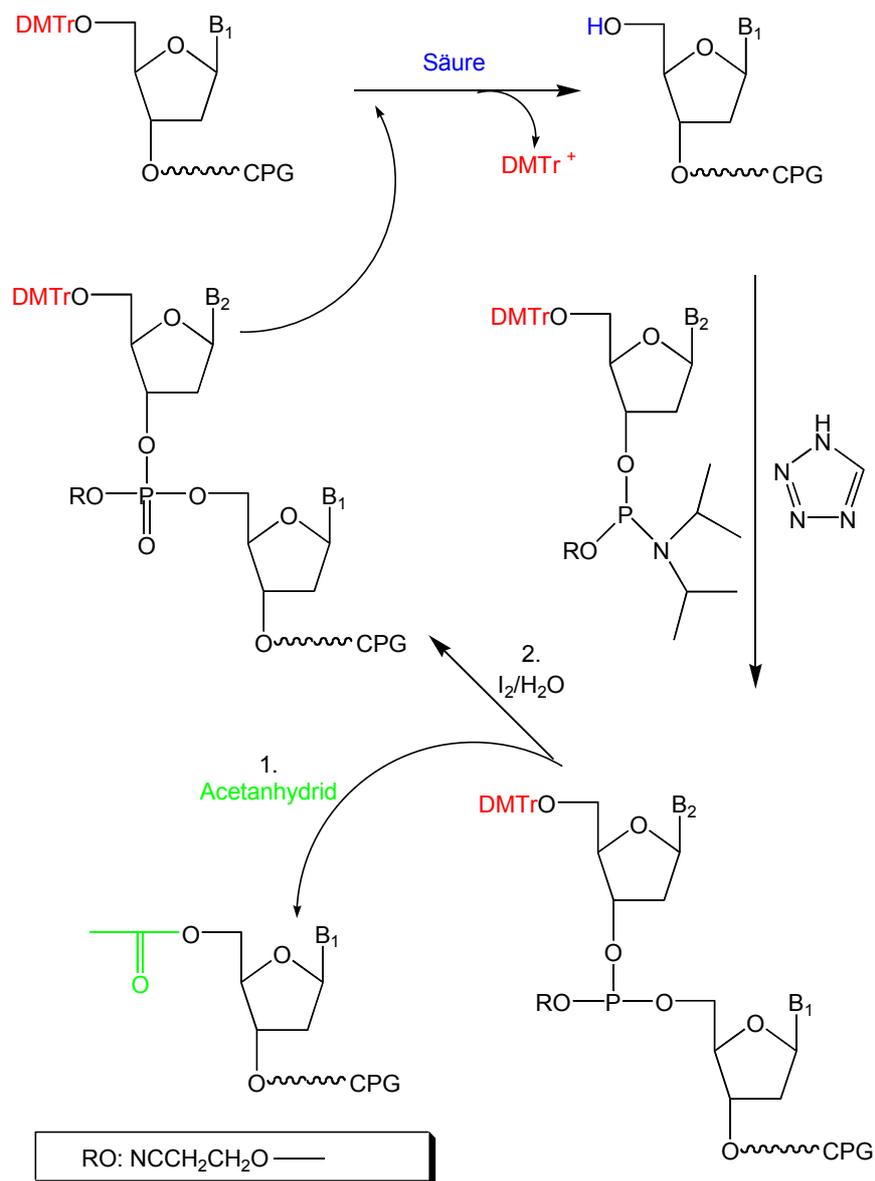
*Abbildung 9:* Abspaltung der Dimethoxytritylschutzgruppe

In der Festphasensynthese fungiert das Trägermaterial als permanente Schutzgruppe der 3'-Hydroxyl-Funktion, das ebenfalls nach erfolgreicher Synthese mit Ammoniak abgespalten wird. Im Gegensatz zur Biosynthese, synthetisiert der Chemiker im Labor vom 3'-Ende zum 5'-Ende. Als Trägermaterial wird in den meisten Fällen ein *controlled pore glass* (CPG-Material) verwendet, es handelt sich hier um ein chemisch inertes und nicht quellbares Silikat einer definierten Porosität. In letzter Zeit finden auch verstärkt Trägermaterialien auf Polymerbasis Anwendung (Beladungskapazität, entscheidend vor allem bei Synthesen  $> 15 \mu\text{mol}$ ). Der Silikatträger wird im Labor zuerst mit einer definierten Beladungsdichte an reaktiven Alkylamingruppen modifiziert. Zwischen dem ersten Nukleosid am 3'-Ende und dem Glaträger sollte außerdem noch ein Linker (meist Succinyl) aufgebaut werden der es ermöglicht, das synthetisierte Oligodeoxynukleotid vom Trägermaterial abspalten zu können. Zudem fungiert er als eine Art von Abstandhalter. Die käuflichen Trägermaterialien für die Standardsynthese tragen das erste zu koppelnde Monomer bereits auf ihrer Oberfläche. Man erhält ein Trägermaterial mit einer spezifischen

## 2. Allgemeiner Teil

Beladungsdichte, die in  $\mu\text{mol/g}$  angegeben wird. Die meisten Anwender beziehen jedoch bereits gefüllte Synthesäulen für ihre DNA-Synthesizer. Diese sind in verschiedenen gängigen Synthesemaßstäben erhältlich ( $0.05 \mu\text{mol}$ ,  $0.2 \mu\text{mol} \Rightarrow$  häufig für PCR-Primer;  $1 \mu\text{mol} \Rightarrow$  modifizierte Oligodesoxynukleotide und  $15 \mu\text{mol} \Rightarrow$  für Strukturuntersuchungen mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Methoden).

Die *Abbildung 10* beschreibt den Syntheszyklus der DNA-Festphasensynthese nach Caruthers<sup>17</sup>.



*Abbildung 10:* Phosphoramidit-Syntheszyklus nach Caruthers

Der Reaktionszyklus, dessen Anwendung die trägergebundene Oligodesoxynukleotid-kette schrittweise in 5'-Richtung verlängert, kann in vier Reaktionsschritte aufgeteilt werden:

1. Abspaltung (Detritylierung) der 5'-Hydroxyl-Schutzgruppe

<sup>17</sup> M. H. Caruthers, G. Geaton, J. V. Wu, W. Wiesler; *Methods Enzymol.* **1992**, 211, 3-19

## 2. Allgemeiner Teil

2. Aktivierung des Phosphoramidites durch Mischen mit einem Aktivator (schwache Säure; Tetrazol, DCI u.a.) und Zugabe zum trägergebundenen Oligodesoxynukleotid (freie 5'-OH-Gruppe)
3. Capping (nicht umgesetzte Hydroxylgruppen werden blockiert)
4. Oxidation des Phosphitriesters zum Phosphatriester durch I<sub>2</sub>-Zugabe

Die gängigen Synthesizer benötigen heute für die Synthesemaßstäbe bis 15 µmol, pro Synthesesyklus (Schritt 1-4) zwischen drei und sechs Minuten (je nach Modell). Die gesamte Reaktionsfolge wird bei Raumtemperatur und mit hohen Überschüssen an Reagenzien durchgeführt. Bei der Verwendung von modifizierten Amiditen wäre es wünschenswert, das überschüssige Material nach der Kopplung wieder zurück zu gewinnen, allerdings konnte bisher noch kein standardisiertes, schnelles und kostensparendes Verfahren hierfür entwickelt werden. Ist das gewünschte Oligodesoxynukleotid vollständig am Trägermaterial aufgebaut worden, stehen dem Synthetiker zwei alternative Wege zur Verfügung. Entweder spaltet er die 5'-endständige DMTr-Schutzgruppe noch am Synthesizer ab und entschützt das Oligodesoxynukleotid anschließend mit Ammoniak (Basenschutzgruppen, Phosphatschutzgruppen und die Freisetzung vom Trägermaterial), oder die Synthese erfolgt DMT-on, das bedeutet, daß die 5'-Schutzgruppe nicht abgespalten wird. Die Entschützung des Oligodesoxynukleotids erfolgt auch hier mit Ammoniak (16 h bei 55°C, 24 h bei RT oder 3 h bei 70°C bei Verwendung der Standardschutzgruppen). Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfacheren Aufreinigung des synthetisierten Oligodesoxynukleotids.

Auch wenn die Kopplungsausbeuten (Kopplungseffizienz) während der Synthese am Synthesizer „meist“  $\geq 99.8\%$  betragen, entstehen kürzere Fragmente (n-1-Abbruch), die abgetrennt werden müssen.

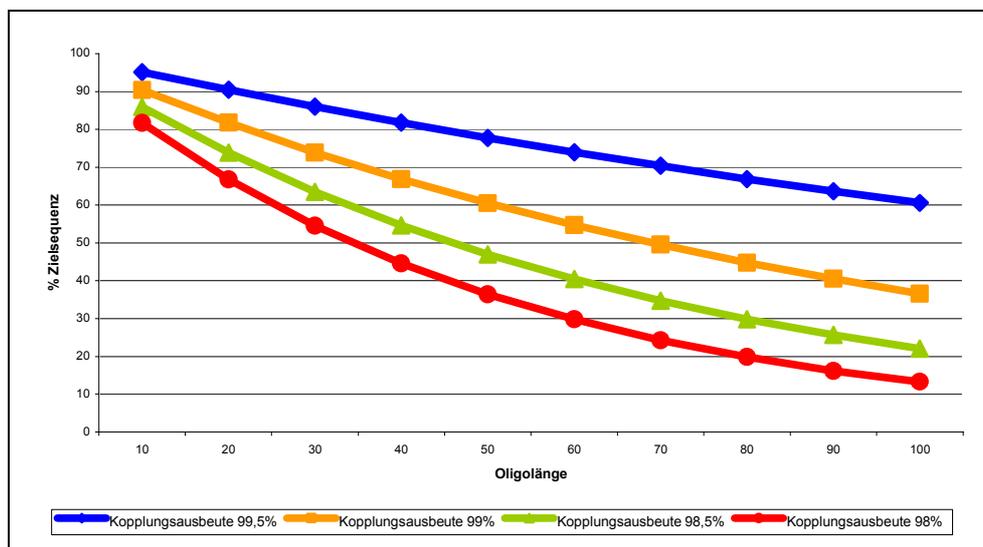


Abbildung 11: Syntheseausbeute bei einer schrittweisen Kopplungsausbeute von 98%, 98.5%, 99% und 99.5%

Wie *Abbildung 11* zeigt, hat die durchschnittliche schrittweise Kopplungsausbeute während der Oligodesoxynukleotidsynthese einen großen Einfluß auf die theoretisch erzielbare prozentuale Menge an der gewünschten Sequenz. Sie verdeutlicht

## 2. Allgemeiner Teil

ebenfalls, daß ein 80mer Rohprodukt bei einer sehr guten durchschnittlichen Kopplungsausbeute von 99% rein rechnerisch deutlich unter 50% Zielsequenz enthält, der Rest besteht aus kürzeren n-x Nebenprodukten. In der Regel werden daher die Roh-Oligodesoxynukleotide mit Hilfe der HPL-Chromatographie gereinigt.

Die lipophile Dimethoxytrityl-Gruppe ermöglicht hier eine leichtere Abtrennung des gewünschten Oligodesoxynukleotids von den kürzeren Abbruchsequenzen. Die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe wird nach erfolgter HPLC-Reinigung mit 80%iger Essigsäure (1 h bei Raumtemperatur) abgespalten und das Oligodesoxynukleotid mit Hilfe einer Salzlösung (1 M Natriumchlorid oder 5 M Ammoniumacetat) und Ethanol ausgefällt.

Zur HPLC-Reinigung stehen eine Vielfalt von verschiedenen Säulenmaterialien zur Verfügung. Natürlich können auch modifizierte Oligodesoxynukleotide mit Hilfe des DNA-Synthesizers hergestellt werden. Dazu benötigt man die Modifikation nur in Form des entsprechenden "Phosphoramidit-Bausteins". Allerdings wird für die modifizierten Bausteine die Kopplungszeit in der Regel von 20-30 Sekunden auf 120-300 Sekunden verlängert, oder das modifizierte Amidit zweimal auf die Synthes Säule gegeben (double-couple). Aufgrund der Qualität (Reinheit und Feuchtigkeit) und der teilweise verminderten Reaktionsbereitschaft (sterische Hinderung) der modifizierten Amidite ist diese Verlängerung notwendig. Längere Kopplungszeiten (> 300 sec) führen nicht zu besseren Ausbeuten (der aktivierte Komplex aus dem Amidit und dem Aktivator ist nur begrenzt stabil).

Heute wird der größte Teil der unmodifizierten Oligodesoxynukleotide als PCR-Primer eingesetzt. Ansonsten werden für die meisten Projekte modifizierte Oligodesoxynukleotide benötigt, die häufig für eine gezielte Fragestellung synthetisiert werden. Die Synthese und die Aufreinigung von Oligodesoxynukleotiden stellen einen sehr großen Teil dieser Arbeit dar, daher möchte ich hier noch auf die Möglichkeiten der Aufreinigung eingehen.

### 2.5 Aufreinigung und Analytik von Oligodesoxynukleotiden

Der größte Teil der synthetisch hergestellten Oligodesoxynukleotide werden heute mit Hilfe der HPL-Chromatographie gereinigt. Außer den chromatographischen Methoden stehen zur Untersuchung der Oligodesoxynukleotiden noch elektrophoretische, spektroskopische und massenspektrometrische Methoden zur Verfügung. Die Gelelektrophorese (PAGE) wurde innerhalb dieser Arbeit nur zur analytischen Kontrolle der hergestellten Oligodesoxynukleotiden und zur Detektion einer Spaltungsreaktion angewendet. Die Massenspektrometrie und die NMR-Spektroskopie wurden zur Charakterisierung der hergestellten Verbindungen eingesetzt.

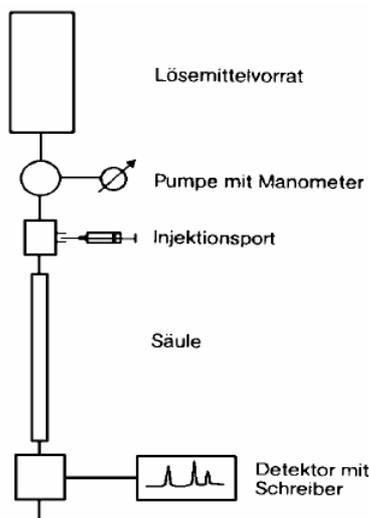
#### 2.5.1 HPL-Chromatographie

Für die bioanalytische Forschung werden sehr effiziente Trennverfahren benötigt. Durch die Entwicklung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) vor etwa dreißig Jahren, wurde die klassische Säulenflüssigchromatographie revolutioniert. Trennungen, die mit einer flüssigen Phase durchgeführt werden, beruhen auf den folgenden vier Wechselwirkungsprinzipien mit der stationären Phase:

Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch oder Ausschluß.

## 2. Allgemeiner Teil

Bei der HPLC strömt eine mobile flüssige Phase mit variabler Polarität über eine feste oder flüssige stationäre Phase. *Abbildung 12.* zeigt den schematischen Aufbau einer HPLC-Anlage.



*Abbildung 12:* Schematischer Aufbau eines HPLC-Geräts

Charakteristisch für die HPLC im Vergleich zur klassischen LC ist die Miniaturisierung und die Optimierung der Trennmaterialien und der benötigten Geräte (wie Pumpen, Autosammler etc.).

	<b>Klassische LC</b> 1906: M. Tswett <sup>18</sup> Trennung von Pflanzenstoffen	<b>HPLC</b> 1965: Theoretische Grundlagen 1970: Erste kommerziellen Geräte
Entwicklungsbeginn		
Säulendimension	m- bis cm-Bereich	cm- bis mm-Bereich
Säulenmaterial	Glas	Stahl, stabiles Glas, Polymere (Biomoleküle)
Stationäre Phase	Siliciagel, Aluminiumoxid	Modifizierte Siliciagel, modifizierte Polymere
Teilchengröße	Oberer $\mu\text{m}$ -Bereich (100-200 $\mu\text{m}$ )	Unterer $\mu\text{m}$ -Bereich (3-10 $\mu\text{m}$ )
Eluentförderung	Hydrostatisch, Schlauchpumpen	Hochdruckpumpen, Niederdruckpumpen
Säulenvordruck	bis ca. 0.5 Mpa (5 bar)	1 bis 20 Mpa (1-20 bar)
Säulenfülldruck	Hydrostatisch, wenige bar	40-80 Mpa für Siliciagele, 1-12 Mpa für Polymere
Flussrate	Mehrere ml/Stunde	0.3-2 ml/min (analytisch)
Analysenzeit	Stundenbereich	Minutenbereich
Probenmengen	mg- bis g-Bereich	pg- bis $\mu\text{g}$ -Bereich
Bodenzahl	1-100/m	5 000-100 000/m
Anzahl der Peaks	2-10	5-50 und mehr

Tabelle 1: Vergleich zwischen klassischer LC und HPLC<sup>19</sup>

<sup>18</sup> M. S. Tswett; *Ber. Dtsch. Bot. Ges* **1906**, 24, 385

<sup>19</sup> M. H. Gey, *Instrumentelle Bioanalytik* **1998**, Vieweg, ISBN-Nr. 3-528-06873-6

## 2. Allgemeiner Teil

Um eine qualitative chromatographische Trennung kleinster Substanzmengen (ng- bis pg-Bereich) innerhalb weniger Minuten durchführen zu können, mußten zuerst

- kleine monodisperse Materialien im Bereich von 5 µm
- spezielle Säulenfülltechniken unter Hochdruck
- empfindliche Detektoren mit nur geringem Volumen (10 µl) der Durchflußküvette
- und pulsarme Hochdruckpumpen entwickelt werden.

Die Miniaturisierung schreitet immer weiter fort. Sowohl bei den Säulenlängen, Säulenmaterialien und den Gerätekomponenten findet eine ständige Weiterentwicklung statt. Bis Ende der 90er Jahre war eine 30 cm lange HPLC-Säule und eine Analysenzeit von 60 Minuten für eine Trennung durchaus akzeptabel. Heute kommen Säulen von 5 bis 10 cm zum Einsatz, mit denen eine Trennung innerhalb von 10 Minuten in hervorragender Qualität möglich ist. Wird dieses System noch mit einem Massenspektrometer gekoppelt, erhält der Anwender innerhalb von 10 Minuten das entsprechende HPLC-Spektrum und die entsprechenden Molaren Massen der detektierten Produktpeaks (LC-MS)<sup>20</sup>. Dabei handelt es sich meist um Thermospray-, Elektrospray- oder Ionenspray-Techniken, die als Kopplungstechniken inzwischen „einigermaßen“ ausgereift zum Einsatz kommen. Desweiteren stehen dem Forscher heute eine Vielzahl an Säulenmaterialien für die präparative und analytische Trennung zur Verfügung. Allerdings ist der Markt an stationären Phasen für den „normalen Anwender“ kaum noch zu überblicken. Eine Hilfe kann hier, die von der Firma *Novia* (Industriepark Höchst) durchgeführte Studie sein, die sich preislich jedoch nur für Anwender lohnt, die häufig wechselnde Probengemische untersuchen müssen. Untersucht wurden im Rahmen dieser Studie 400 Säulen und deren Trennleistung.

Auf die Theorie der Auftrennung und dem physikalischen Hintergrund soll hier nicht weiter eingegangen werden. Weiterführende Literatur findet sich in einem informativen Buch von M. H. Gey „Instrumentelle Bioanalytik“ erschienen im Vieweg Verlag (ISBN-Nr. 3-528-06873-6).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier unterschiedliche Säulen verwendet:

- Präparative Säulen

LiChroCart<sup>®</sup> 250-10 (5µm) RP-18 (*Merck*) und

Poros<sup>®</sup> Oligo<sup>™</sup> R3 4.6 x 100 mm (*Applied Biosystem*)

- Analytische Säulen

EcoChroCart<sup>®</sup> 125-3 (5µm) RP-18 (*Merck*) und

Gen-Pak Fax 4.6 x 100 mm (*Waters*)

### 2.5.1.1 RP Material

Hierbei handelt es sich um ein unpolares Material, das Trennprinzip der RP-HPLC beruht auf einem Zusammenspiel von unterschiedlich starker Adsorption an der festen Phase, sowie einer unterschiedlich starken Verteilung. Das Kieselgel, daß die feste Phase darstellt, wird durch die kovalente Belegung der Oberfläche mit Alkylketten (meist C<sub>8</sub> oder C<sub>18</sub>-Ketten) modifiziert (siehe *Abbildung 13.*).

---

<sup>20</sup> B. Bothner, K. Chatman, M. Sarkisian, G. Siuzdak; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5 (23), 2863-2868

## 2. Allgemeiner Teil

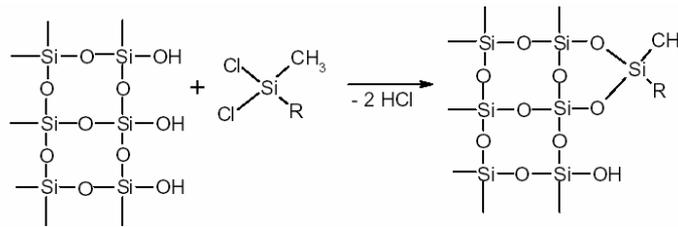


Abbildung 13: Beispiel für die Modifizierung eines Kieselgels

Dadurch kehrt sich die Polarität des Kieselgels um und die Elutionsreihenfolge der zu untersuchenden Verbindungen wird ebenfalls gegenüber Kieselgel umgekehrt. Daher eluieren an diesem Material polare Komponenten vor den unpolaren Komponenten von der Säule. Als mobile Phase wird meist ein steigender Gradient eines unpolaren Lösungsmittels (Acetonitril, Methanol) in einem wässrigen Puffer (0.1 M Triethylammoniumacetat für Oligodesoxynukleotide) verwendet. Trennungen können auch isokratisch durchgeführt werden, im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nicht isokratisch gearbeitet. Die Oligodesoxynukleotide besitzen durch das negativ geladene Phosphodiester-Rückgrat einen polaren Charakter. Die Polarität der heterocyclischen, aromatischen Basen weist einen eher unpolaren Charakter auf, der damit auch für die Bindung an die feste hydrophobe Phase sorgt. Trägt ein Oligodesoxynukleotid am 5'-Ende eine 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe, kann dieses aufgrund des lipophilen Charakters dieser Gruppe, hervorragend von den Abbruchsequenzen (die während der Synthese entstehen, n-x Nebenprodukten) abgetrennt werden. Die Abbruchsequenzen weisen eine andere Polarität und damit auch eine unterschiedliche Retentionszeit auf. Dieses Vorgehen macht man sich ausschließlich bei präparativen Trennungen zunutze.

Die Trennung beruht jedoch auf einem weiteren Effekt, da es sich bei der RP-Chromatographie mit Triethylammoniumacetat (TEAA) als Puffer um eine Ionenpaar-Chromatographie handelt. Das TEAA bindet an dem Säulenmaterial und lädt dieses positiv auf, so daß das negative Oligodesoxynukleotid an diesem binden kann. Beide Effekte (RP- und Ionenpaar-Charakter) ermöglichen eine erfolgreiche Reinigung und Analytik an der RP-Phase.

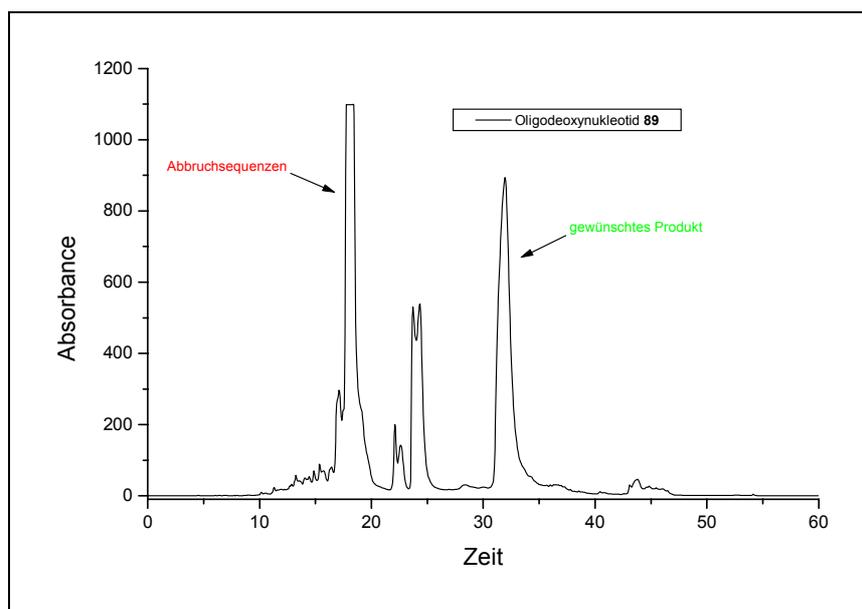


Abbildung 14: Präparative Trennung des Oligodesoxynukleotids **89** (24mer)

## 2. Allgemeiner Teil

Abbildung 14. zeigt die Trennung des Oligodesoxynukleotids **89** (24mer). Dieses wurde am Synthesizer DMT-on synthetisiert und per HPLC gereinigt. Bei dem Peak mit der Retentionszeit um ca. 30 min handelt es sich um das gewünschte Produkt (DMT-on). Die Peaks < 30 min repräsentieren die Abbruchsequenzen und die abgespaltenen Schutzgruppen dar.

Kurze Oligodesoxynukleotide können auch ohne die terminale 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe von n-1 Fehlsequenzen abgetrennt werden, da die Trennleistung der RP-HPLC von der Größe der Moleküle, also von der Anzahl der Nukleotide abhängt. Die Auflösung nimmt hier jedoch für längere Moleküle (> 8-10 Basen) rasch ab.

Die Oligodesoxynukleotide können nach der Reinigung und der Abspaltung der 5'-DMTr-Schutzgruppe (80%ige Essigsäure 1h bei RT, einrotieren in der Speed-Vac) ebenfalls analytisch untersucht werden.

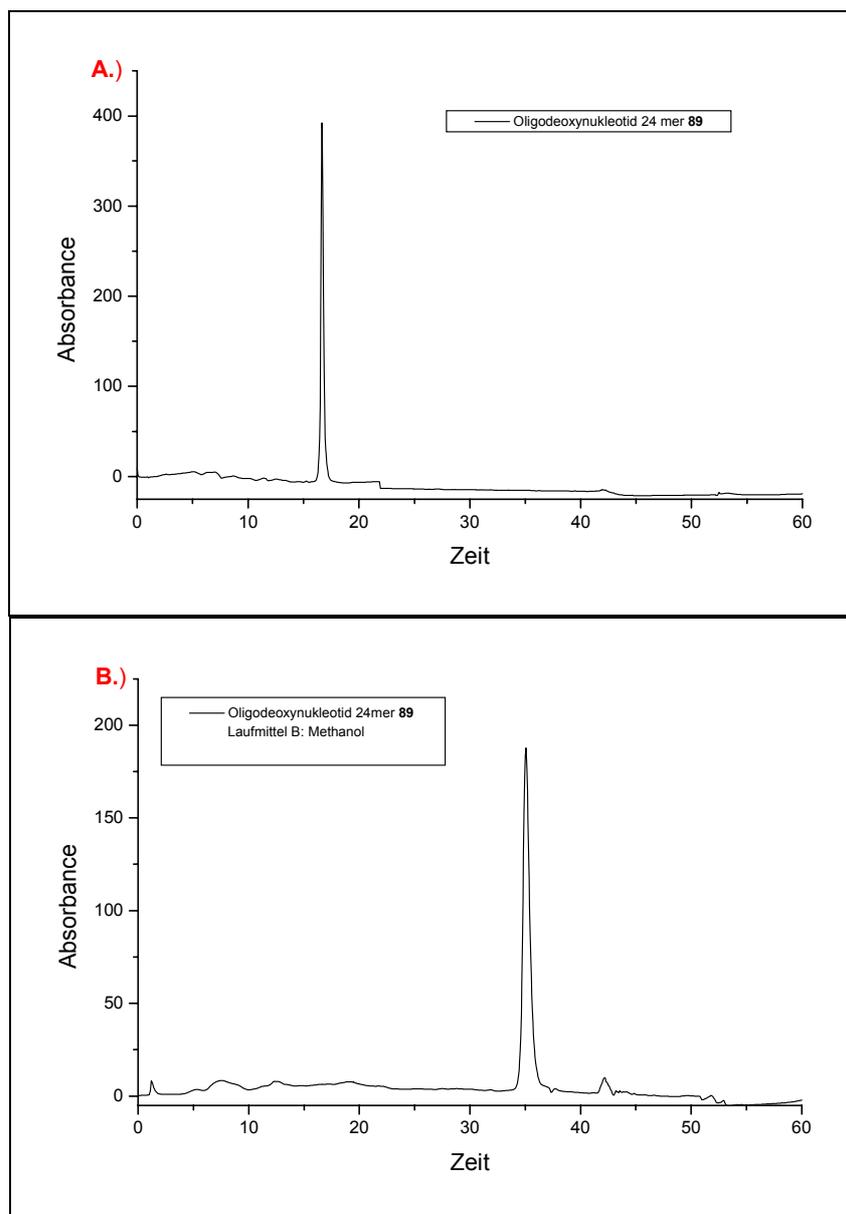


Abbildung 15: Analytischer HPLC-Lauf des Oligodesoxynukleotids **89** (DMT-off)  
Chromatogramm A.) Puffer A: TEAA; Puffer B: ACN; Gradient: 0 auf 40% in 40 min.  
Chromatogramm B.) Puffer A: TEAA; Puffer B: MeOH; Gradient: 0 auf 40% in 40 min.

## 2. Allgemeiner Teil

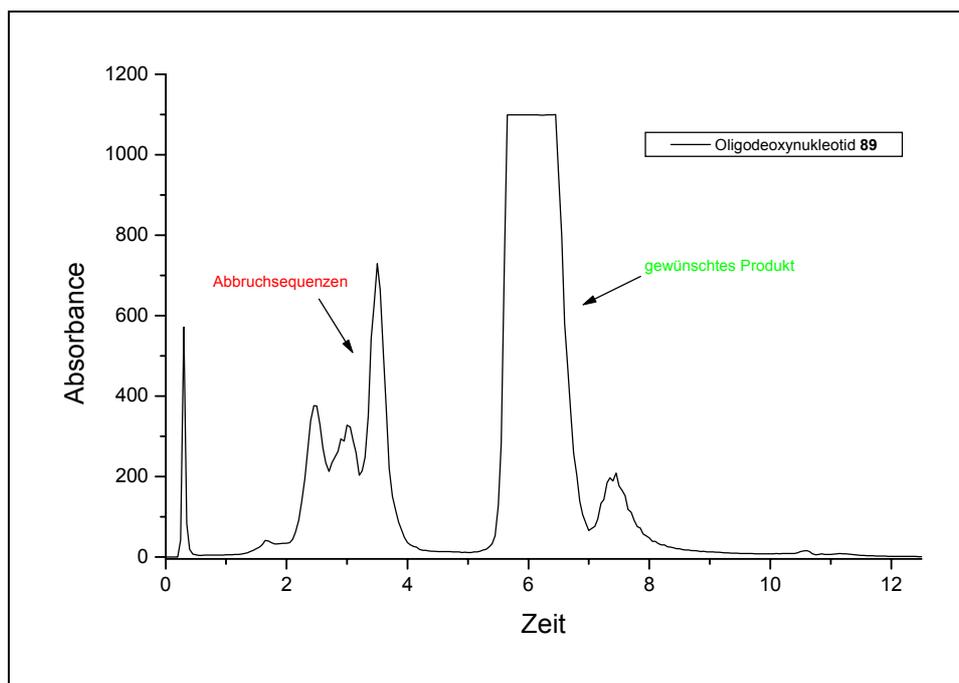
Bei den beiden *Abbildung 15. A.)* und B.) handelt es sich um zwei analytische HPLC-Läufe des Oligodesoxynukleotids **89** (DMT-off). Dabei wurde für beide Läufe die gleiche HPLC-Säule (EcoChroCart® 125-3 (5µm) RP-18 (Merck)) verwendet, allerdings unterscheiden sich die unpolaren Lösungsmittel (Puffer B).

Für eine analytische Untersuchung benötigt man nur sehr wenig Probenmaterial, typischerweise 0.1 bis 0.2 O.D<sub>260</sub>. Das entspricht etwa 0.5 bis 1.0 nmol eines 20mer Oligodesoxynukleotids. Bei der Untersuchung von modifizierten Oligodesoxynukleotiden (3'- oder 5'-Modifikation sowie Modifikationen am Phosphat-Rückgrat z.B. Phosphorothioate) kann es jedoch zu verbreiterten oder nicht einheitlichen Produktpeaks kommen (vorallem bei der Darstellung von Diastereomeren).

### 2.5.1.2 R3 Material

Die Trennung beruht hier ebenfalls auf dem unpolaren Charakter des Säulenmaterials, sowie auf einer weiteren Eigenschaft des Materials, dem Größenausschluß. Der große Vorteil dieser Säule ist die Möglichkeit, die Abspaltungslösung (Ammoniak) direkt nach der erfolgten Entschützung auf die HPLC-Säule aufzuspritzen. Während bei der RP-18 Säule die Ammoniaklösung zuerst im Vakuum (Speed-Vac) abgezogen werden muß, da ansonsten das Oligodesoxynukleotid nicht getrennt werden kann.

Die Analysenzeit für die R3-Säule beträgt 12 bis 15 Minuten pro Trennung. Die im Arbeitskreis verwendete RP-18 Säule (30 cm) weist eine Analysenzeit von 50 bis 60 Minuten bei entsprechender Qualität auf. Man spart hier also zum Einen die Zeit zum Abziehen des Ammoniaks im Vakuum (Speed-Vac) und zum Anderen benötigt die Trennung nur etwa  $\frac{1}{4}$  der Zeit. Allerdings können mit der Säule nur DMT-on Synthesen oder 5'-modifizierte Oligodesoxynukleotide (lipophile Modifikationen wie Biotin oder Fluorescein) aufgereinigt werden. Das Material wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nur für die präparative HPLC-Reinigung eingesetzt.



*Abbildung 16:* Trennung des Oligodesoxynukleotids **89** (24mer)

### 2.5.1.3 Gen-Pak Fax-Material

Die Auftrennung erfolgt hier aufgrund zweier Materialeigenschaften. Das Material, ein nicht poröses, DEAE funktionalisiertes Polymer, besitzt einen ausgeprägten Ionenaustausch-Charakter und einen gewissen Anteil an einem RP-Charakter. Die Trennung beruht auf den Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Polymeroberfläche und den negativen Phosphatgruppen der DNA. Der Laufpuffer A (z.B. 25 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) besitzt eine niedrige Salzkonzentration, der Laufpuffer B (z.B. 25 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8) enthält eine hohe Salzkonzentration. Anstelle von Tris-Cl kann ebenfalls ein Phosphat-Puffer verwendet werden (Temperaturstabilität). Die Trennung erfolgt mit Hilfe eines Gradienten, häufig 0% B gegen 60% B in 30 min. Kleinere Fragmente eluieren hier vor größeren Fragmenten (bis 5 000 bp). Vorallem bei der Trennung von RNA kann die Säule bei einer Temperatur von 30°C bis 60°C (Vermeidung von Sekundärstrukturen) und einer geringen Konzentration an einem organischen Lösungsmittel (10% Acetonitril) betrieben werden. Die Ionenstärke der einzuspritzenden Probe sollte nicht > 0.1 M betragen. Die meisten DNA Fragmente eluieren bei einer Ionenstärke zwischen 0.4 und 0.75 M NaCl bei 30°C. Die Reinheit des Materials beträgt nach der Reinigung in der Regel > 95%. In einem einzelnen HPL-Lauf können 50 bis 100 µg DNA gereinigt werden (Gen-Pak FAX 4.6 x 100 mm).

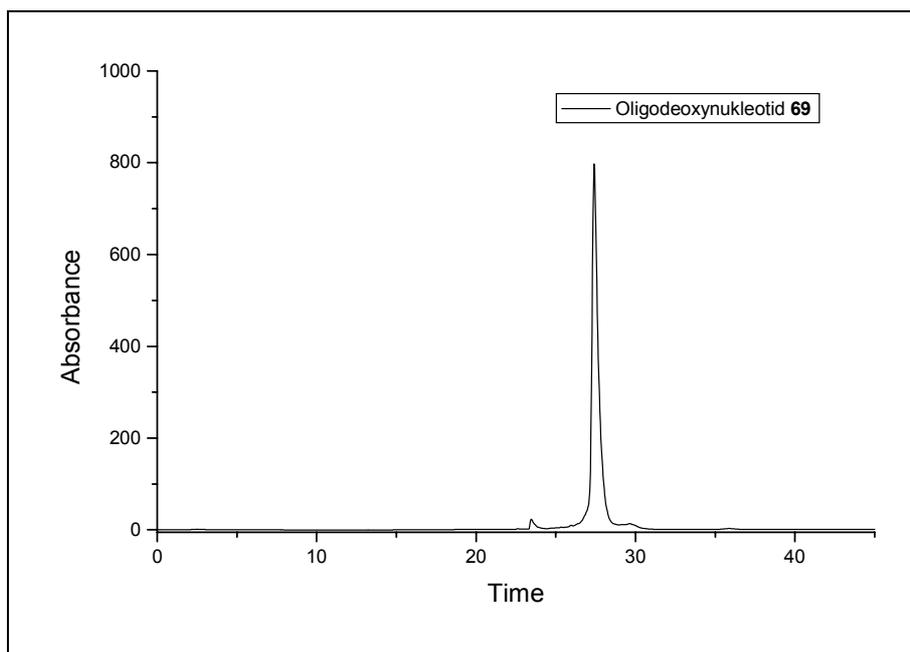


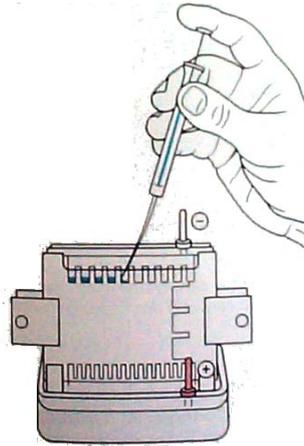
Abbildung 17: Analytischer HPLC-Lauf des Oligodesoxynukleotids **69**

### 2.5.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine zentrale analytische und präparative Trennmethode für biologisch relevante Makromoleküle (Nukleinsäuren und Proteine) dar. Vorallem für Verbindungen, die keine einheitliche Struktur aufweisen, erweist sie sich gegenüber der HPL-Chromatographie als günstigere und aussagekräftigere Alternative.

## 2. Allgemeiner Teil

DNA-Moleküle tragen negative Ladungen, wodurch eine Bewegung der Moleküle im elektrischen Feld ermöglicht wird. Erfolgt diese Bewegung innerhalb einer geeigneten Matrix (Trennmatrices  $\Rightarrow$  Agarose oder Polyacrylamid; PAGE = Polyacrylamid gel electrophoresis), so wandern DNA-Moleküle entsprechend ihrem Molekulargewicht unterschiedlich schnell und können so der Größe nach aufgetrennt werden (kleinere Moleküle „laufen“ schnell, größere „laufen“ langsamer). *Abbildung 18.* zeigt den schematischen Aufbau einer Gelelektrophorese-Apparatur.



*Abbildung 18:* Schematischer Aufbau einer Gelelektrophorese-Apparatur

Agarose-Gele trennen Nukleinsäuren über einen weiten Größenbereich und werden als Routinemethode für schnelle DNA-Untersuchungen verwendet. Polyacrylamid-gele trennen Proteine und kleinere Nukleinsäuren ( $< 500$  Basen) auf und werden zum Beispiel in der Sequenzierung durch die Didesoxy-Methode eingesetzt. Der Transfer der aufgetrennten Moleküle aus dem Gel auf eine Membran zur gezielteren Detektion ist ein sogenannter Blot. Aufgrund der sich entwickelnden Array-Technologie und besseren Trennmaterialien in der HPLC-Chromatographie verliert die Gelelektrophorese in verschiedenen Bereichen ihre herausragende Stellung in der Analytik (vorallem im präparativen Bereich, aufgrund der Entwicklung geeigneter HPLC- und FPLC-Materialien). Bei einer besonderen Form der Elektrophorese, der Kapillar-Gelelektrophorese wird die Trennung nicht in einem Gel-Bett, sondern in einer Kapillare durchgeführt. Sie besitzt eine besonders große Bedeutung in der DNA-Analytik, da ihr Auflösungsvermögen sehr hoch ist. Die CE-Gelelektrophorese wird heute für die Detektion von n-1-Sequenzen von verschiedenen Oligodesoxynukleotid-Herstellern herangezogen, da ihr Auflösungsvermögen, daß der HPLC übersteigt.

### 2.5.3 Massenspektrometrie

Zur Charakterisierung der hergestellten Verbindungen, sowie zur Detektion von Spaltungsprodukten wurde im Rahmen dieser Arbeit die Massenspektrometrie<sup>21</sup>

<sup>21</sup> A.) H. Ewald, H. Hintenberger: Methoden und Anwendung der Massenspektrometrie, Verlag Chemie, Weinheim (1953); B.) G. R. Waller, O. C. Dermer: Biochemical applications of mass spectrometry, John Wiley & Sons, New York (1980); C.) E. Schröder: Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen, Springer Verlag, Berlin (1991); D.) H. Budzikiewicz: Massenspektrometrie. Eine Einführung, VCH-Verlag, Weinheim (1992); E.) F. W. MacLafferty, F. Turecek: Interpretation von Massenspektren, Spektrum Akad. Verlag,

## 2. Allgemeiner Teil

angewendet. Sie hat in den letzten Jahren immer weiter an Bedeutung gewonnen. Dies beruht vor allem auf der Entwicklung von „weichen“ Ionisationstechniken. Dadurch besteht die Möglichkeit, Biopolymere mit Molekülmassen von mehreren tausend Dalton unfragmentiert in die Gasphase zu überführen. Mit Hilfe der MALDI-Spektrometrie kann heute, synthetisch hergestellte DNA oder RNA bis zu einer Länge von 50 Basen vermessen werden.

Die Probenmoleküle werden in der Massenspektrometrie in positiv oder negativ geladene Ionen überführt, die sich im Hochvakuum des Massenspektrometers frei bewegen können. Elektrostatische und magnetische Felder beschleunigen und trennen diese Ionen. Im Analysator werden die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt und anschließend mit einem Detektor registriert. Die Massenspektrometer arbeiten bei einem Vakuum von ca.  $10^{-5}$  Pa, um die Kollision zwischen ionisierten Teilchen zu vermeiden (Streueffekte). *Tabelle 2.* zeigt die Entwicklungen im Bereich der Massenspektrometrie in den letzten 80 Jahren auf.

Ereignis	Ungefähre Jahreszahl	Anwendung
Beschreibung des Verhaltens von Ionen im Magnetfeld	1920	Bestimmung des Isotopengehalts von Elementen
Doppelfokussierung	1935	Erreichen einer hohen Auflösung bei Massenpeaks
Erstes kommerzielles Massenspektrometer	1950	Quantitative Analyse von Petroleumprodukten
Funkenquelle	1955	Quantitative Elementaranalyse
Theorie zur Beschreibung der Fragmentierung molekularer Spezies	1960	Identifizierung und Strukturanalyse komplexer Mischungen
Verbinden von Massenspektrometern mit Chromatographen (GC)	1965	Qualitative und quantitative Analyse komplexer Mischungen
Tandem-Massenspektrometer	1970	Hochgeschwindigkeitsanalyse komplexer Mischungen
Neue Ionisationstechniken	1970	Erweiterte Kapazität zur Strukturaufklärung
Anwendung der Fourier-Transformation in der MS	1980	Verbesserte Massenauflösung und Signal/Rausch-Verhältnisse
Verbesserte Quellen für nichtflüchtige Spezies	1980	Analyse polymerer Moleküle und Oberflächen
MALDI-Technologie	1988	Schonende Desorption bzw. Ionisation

*Tabelle 2:* Entwicklung der Massenspektrometrie (Quelle Skoog, Leary: Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen)

Die Massenspektrometrie wird den Trennmethoden zugeordnet, dies geschieht, da es im elektromagnetischen Feld zu einer Ionenauftrennung kommt. Der Unterschied zu den Spektroskopie-Methoden (UV-, IR-, NMR- und ESR-Spektroskopie) besteht

---

Heidelberg (1996); F.) W. D. Lehmann: Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg (1996)

darin, daß bei den eigentlichen spektroskopischen Messungen die Probe nicht verändert oder zerstört wird, man kann sie nach der Messung wieder zurückgewinnen. Hier werden Energiebeträge, die für die Übergänge zwischen Energieniveaus eines Moleküls erforderlich sind, gemessen.

Abbildung 19. zeigt die Hauptbestandteile eines Massenspektrometers auf, dies sind<sup>22</sup>:

- das Einlaßsystem, die Ionenquelle, das Trennsystem  $\Rightarrow$  Analysator, der Detektor und die Steuer und-Auswerteeinheit

### Komponenten eines Massenspektrometers

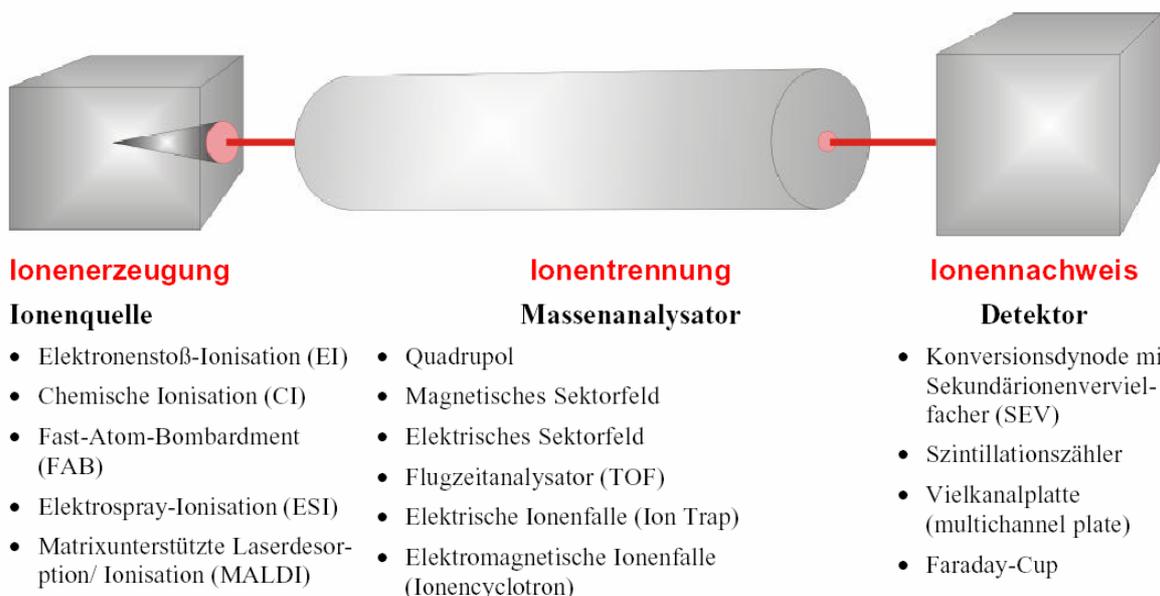


Abbildung 19: Komponenten eines Massenspektrometers<sup>23</sup>

#### 2.5.3.1 Das Einlaßsystem

Bei einem ESI-Spektrometer wird die Probe direkt in das unter Vakuum stehende Einlaßsystem appliziert und verdampft. Beim MALDI-Spektrometer dient der Probenhalter als Einlaßsystem, auf dem die Probe präpariert wird. Das Anlegen von Vakuum bewirkt, daß die Sauerstoff- und Stickstoffionen aus der Luft die Probensignale nicht überlagern.

#### 2.5.3.2 Die Ionenquelle

Die Ionisierung (siehe *Tabelle 3.*) der Probmoleküle erfolgt mit Hilfe der Ionenquelle.

<sup>22</sup> A.) G. Schwedt: Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1985); B.) E. Schröder: Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen, Springer Verlag, Berlin (1991); C.) F. W. MacLafferty, F. Turecek: Interpretation von Massenspektren, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg (1996); D.) W. D. Lehmann: Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg (1996)

<sup>23</sup> Die Abb. 19-25 wurden einer pdf-Präsentation (Projekt Z4-MS, MALDI-Einführung in die Massenspektrometrie) von Dr. Markus Wunderlin, iZKF, Ulm entnommen.

## 2. Allgemeiner Teil

MS-Ionisationsart	Ionisierung	Ionisations-Quelle	Reaktionsablauf
Elektronenstoßionisation	Hart	Elektronen	$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$
Chemische Ionisation	Hart	Reagenzionen	$M + CH_5^+ \rightarrow MH^+ + CH_4$
Fast Atom Bombardement (FAB)	Hart	Atome	$M + X \rightarrow (M+X)^+$
Sekundärionen Anregung	Hart	Ionen	$M + Ar^+ \rightarrow M^+ + Ar$
Photoionisation	Weich	UV-Strahlung	$M + h\nu \rightarrow M^+ + e^-$

*Tabelle 3:* Ionisierungsmethoden in der Massenspektrometrie

Eine harte Ionisation kann zur Fragmentierung der Moleküle führen. Durch schonende Ionisierungsarten ist es jedoch möglich diese Fragmentierung zu unterbinden.

### 2.5.3.3 Das Trennsystem

Im Massenanalysator werden die ionisierten Moleküle nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt. Die häufigsten Methoden zur Massentrennung der Ionen sind die Ablenkung in Magnetfeld (Sektorfeld, der Quadrupol), die Flugzeit (TOF), die Ion-Trap- und Cyclotron-Resonanz-Methode<sup>24</sup>.

### 2.5.3.4 Der Detektor

Er registriert im Massenspektrum die nach Masse-zu-Ladung getrennten Ionen. Die Detektion erfolgt durch die Registrierung von Ionenströmen (Faraday-Detektor, Sekundärelektronenvervielfacher).

### 2.5.3.5 Das Massenspektrum

Dieses wird entscheidend von der angewandten Ionisationsart geprägt. Weiche Ionisationen bewirken keine oder nur sehr geringe Fragmentierungen. So können auch hochmolekulare Probenmoleküle bestimmt werden. An Hand der Molpeaks und den sogenannten „Quasimolekülonen“ (siehe *Tabelle 4.*) erfolgt die Zuordnung des Molekulargewichts.

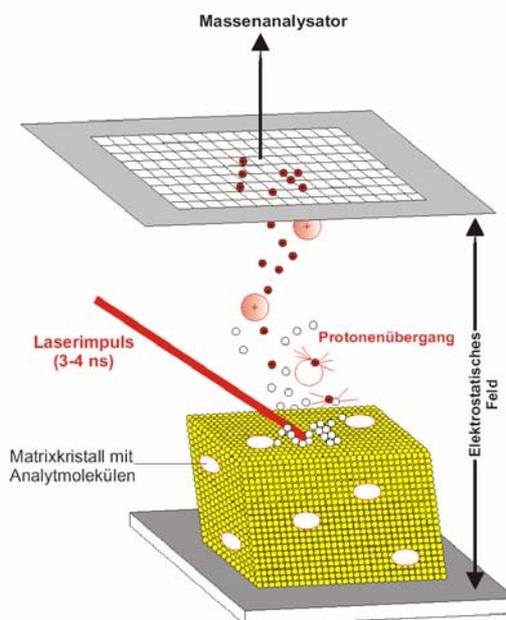
Bezeichnung	Reaktionsablauf
Protonierung	$M + H^+ \rightarrow [M-H]^+$
Deprotonierung	$M \rightarrow [M-H]^+ + H^+$
Kationisierung	$M + K^+ \rightarrow [M-K]^+ (K^+, Na^+)$
Hydridabstraktion	$M \rightarrow [M-H]^+ + H^-$

*Tabelle 4:* Bildungsprozesse von Quasimolekülonen

<sup>24</sup> A.) P. H. Dawson: *Quadrupole mass spectrometry and applications*, Elsevier, New York (1976); B.) R. J. Cotter; *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **1989**, 18, 513; C.) R. G. Cooks, R. E. Kaiser; *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 213

## 2.5.3.6 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI-MS)

Mit Hilfe der MALDI-Technologie ist eine schonende Desorption bzw. Ionisation mittels gepulster Laserstrahlung von intakten Biomolekülen möglich. Durch die Entwicklung von Karas und Hillenkamp (1988)<sup>25</sup> wurde es möglich unter Verwendung einer organischen Matrix, Verbindungsklassen wie Proteine, Nukleotide, Oligosaccharide und Lipide zu messen. Der prinzipielle Aufbau des Spektrometers unterscheidet sich nur im Einlasssystem von anderen Spektrometern. Hier arbeitet man mit einem Probenteller (inzwischen besteht sogar die Möglichkeit Plattformen aus der Chiptechnologie zu verwenden), der eine bestimmte Anzahl an Vertiefungen besitzt, in denen die Probenpräparation und der spätere Beschuss mit dem Laser stattfindet. Die Biomoleküle werden für die Messung mit einem 1000 bis ca. 10.000-fachen Überschuß der organischen Matrix (siehe *Tabelle 5.*) gemischt und durch einen gepulsten Laserstrahl desorbiert und ionisiert. *Abbildung 20.* zeigt die Vorgänge in einer präparierten Probe beim Laserbeschuss



*Abbildung 20:* Vorgänge in der präparierten Probe beim Laserbeschuss

Matrix	Wellenlänge
Sinapinsäure	337 nm, 355 nm
2,5-dihydroxybenzoesäure (DHB)	337 nm, 355 nm
Nicotinsäure	266 nm
$\alpha$ - Cyano-4-hydroxymizinsäure	337 nm, 355 nm
4-Hydroxypicolinsäure	337 nm, 355 nm
Bernsteinsäure	2.94 $\mu$ m, 10.6 $\mu$ m

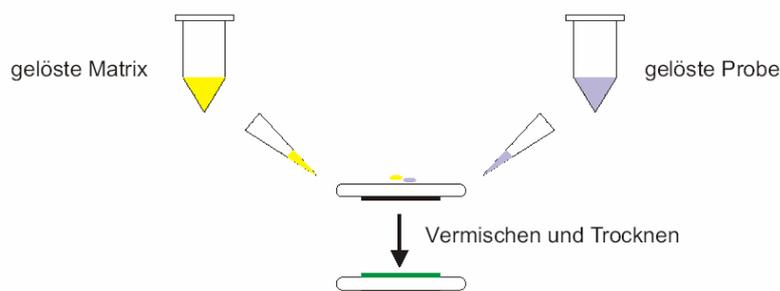
*Tabelle 5:* Häufig verwendete Matrices (Quelle M. H. Gey: Instrumentelle Bioanalytik)

<sup>25</sup> A.) M. Karas, F. Hillenkamp; *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299; B.) M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1989**, 92, 231; C.) M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp; *Angew. Chemie* **1989**, 101, 805; D.) F. Hillenkamp, M. Karas; *Methods Enzymol.* **1990**, 193, 280

## 2. Allgemeiner Teil

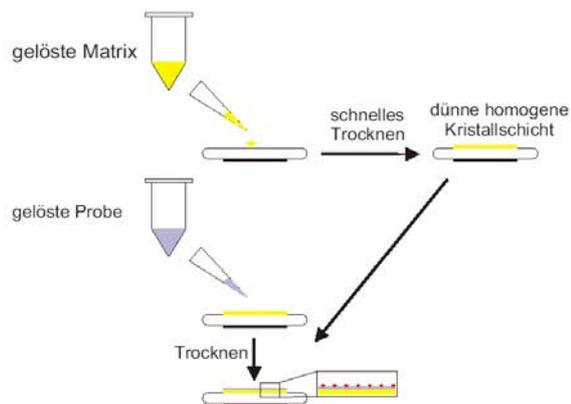
Karas und Hillenkamp hatten beim Arbeiten mit Laserlicht beobachtet, daß eine niedrig absorbierende Substanz im Gemisch mit einer hoch absorbierenden Komponente bereits bei Energiedichten des Laserpulses ionisiert wird, die für die Ionisierung im reinen Zustand nicht ausreichend sein würde. Auf diese Weise können Biomoleküle inzwischen mit Hilfe eines Flugzeitmassenspektrometers (TOF) in fast „unbegrenzt“ hohem Molekulargewichtsbereichen (bis ca. 500 000 D) mit hoher Empfindlichkeit (pmol- bis fmol-Bereich) und einer Genauigkeit von 0.1 bis 0.01% vermessen werden. Die Probenpräparation (Kristallisationsprozeß), die Probenhomogenität und die meist empirische Wahl der organischen Matrix (Erfahrungswerte) sind entscheidend für die Qualität der Messung. Die Dünnschicht- und die Standardpräparation (*Abbildung 21.* und *22.*) sind die beiden wichtigsten Präparationstechniken in der MALDI-Spektrometrie.

### 1. Standardpräparation - Dried Droplet



*Abbildung 21:* Präparationstechnik in der MALDI-MS

### 2. Dünnschichtpräparation



*Abbildung 22:* Präparationstechniken in der MALDI-MS

Die Matrix besitzt die folgenden Funktionen:

- Sie absorbiert und akkumuliert Energie aus der Laserstrahlung. Zusätzlich schützt sie aufgrund ihres eigenen Absorptionsvermögens und ihrer hohen Konzentration im Gemisch die Analyten vor Zerstörung und Fragmentierung im Massenspektrometer
- Die Matrixmoleküle übertragen Energie für die Desorption auf die Analyte.
- Die Matrix ist selbst an Protonen-Interaktionen und Protonen-Übergängen mit den Analytmolekülen beteiligt und überträgt die erforderliche Ionisierungsenergie. Dabei kann die Matrix sowohl Protonen aufnehmen als auch zur Verfügung stellen.

## 2. Allgemeiner Teil

- Die Matrix vermindert störende Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen untereinander und trägt zur Beseitigung von Adsorptionsphänomenen mit der Oberfläche des metallischen Targets bei.

Anfänglich wurden Nd-YAD-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 266 nm und einer Pulsdauer von ca. 10 ns zur Desorption und Ionisation der Moleküle verwendet. Für die DNA kann diese Anregungswellenlänge nicht verwendet werden, da es hier zur Fragmentierung kommt. Der CO<sub>2</sub>-Laser (infraroten Bereich) und der kostengünstigere Stickstoff Laser (UV-Strahlung 337 nm) finden hier ihren Einsatz.

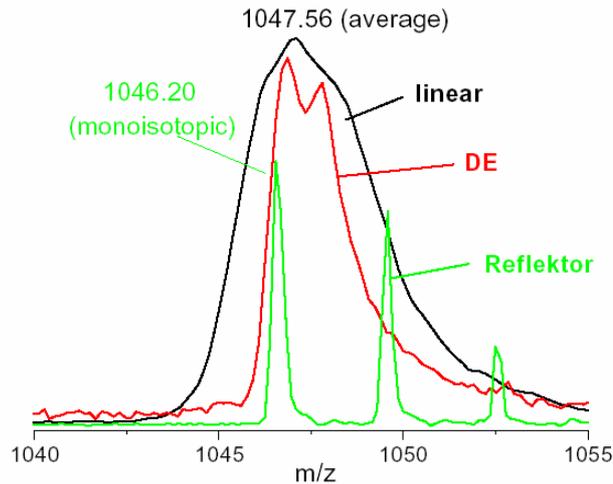


Abbildung 23: MALDI-MS von Angiotensin gemessen im linearen-, DE und Reflektor-Modus

Wie *Abbildung 23* zeigt, konnte die Qualität der zu messenden Spektren, durch die technischen Weiterentwicklungen der letzten Jahre, gesteigert werden. Die Messung im linearen Modus bereitet Probleme aufgrund der Anfangsenergieverteilung der freigesetzten Ionen bei der Ionisierung (Energie-, Orts- und Zeitunschärfe, abstoßende elektrische Kräfte, Abschirmeffekte, Stöße). *Abbildung 24* zeigt den prinzipiellen Aufbau eines linearen Flugzeitmassenspektrometers und ein in diesem Modus aufgenommenes Massenspektrum.

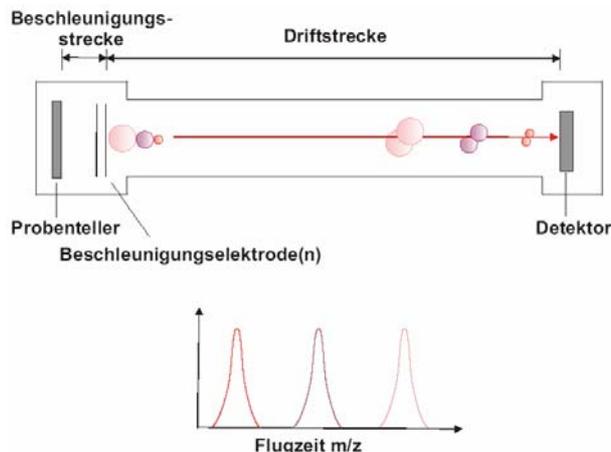


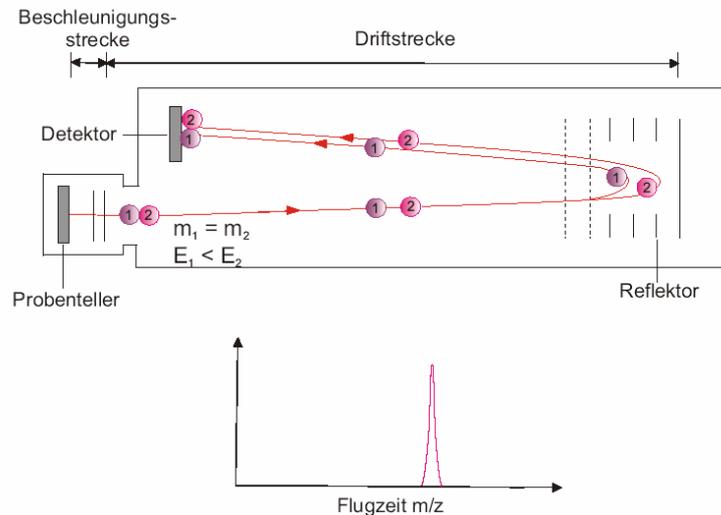
Abbildung 24: Prinzip eines linearen Flugzeitmassenspektrometers

## 2. Allgemeiner Teil

Die Messung im **DE-Modus** (Verzögerte Ionenextraktion, **D**elayed **E**xtraction) löst die folgenden Probleme:

- Die Startgeschwindigkeitsverteilung für Ionen gleicher Masse wird minimiert.
- Das elektrische Feld über der Probenoberfläche wird nicht permanent, sondern zeitversetzt zum Desorptionslaserimpuls eingeschaltet.
- Ionen mit einer höheren Startgeschwindigkeit entfernen sich während der Verzögerungszeit weiter von der Probenoberfläche und erfahren nach dem Einschalten des elektrischen Feldes eine geringere kinetische Energie als Ionen mit niedrigerer Startgeschwindigkeit.

Die Messung im **Reflektor-Modus** (siehe *Abbildung 25.*) sorgt für:



*Abbildung 25:* Prinzip eines Reflektor-Flugzeitmassenspektrometers (Ionen 1 und 2 besitzen die gleiche Molare Masse)

- Die Richtungsumkehr der Ionen in einem elektrischen Gegenfeld, das sich an die Driftstrecke anschließt.
- Ionen gleicher Masse, aber höherer Startenergie dringen dabei tiefer in das Gegenfeld ein (siehe Abb. 25. Reflektor), legen somit einen weiteren Weg im Reflektor zurück und holen die langsameren Ionen nach der Richtungsumkehr an einem bestimmten Punkt in der Driftstrecke wieder ein (siehe *Abbildung 25*).  
Aufgrund dieser Änderungen gegenüber des linearen Modus, kommt es zu einer wesentlich höheren Auflösung und damit zu qualitativ besseren Spektren.

### 2.6 Entwicklungen in der DNA-Diagnostik

Unterschiede in der DNA-Sequenz (Polymorphismen) zwischen gesunden Individuen wurden bereits Mitte der siebziger Jahre beschrieben, doch ihr gesamtes Ausmaß erkannte man erst Anfang der achtziger Jahre. Möglich war dies nur aufgrund der von Sanger und Gilbert (1975)<sup>26</sup> gemachten Entdeckung. Sie beschrieben ein Verfahren, mit dem es den Forschern gelang, die Sequenz der DNA zu entschlüsseln und so die Reihenfolge der Basen in einem bestimmten DNA-Abschnitt zu bestimmen. Für die Herstellung der ersten rekombinanten DNA-

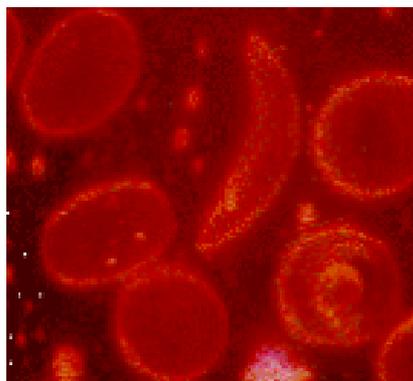
<sup>26</sup> siehe Allgemeine Lehrbücher der Biochemie, z.B. W. Seyffert, H. G. Gassen, O. Hess, H. Jäckle, K. F. Fischbach; Lehrbuch der Genetik **1998**, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (ISBN 3-437-25610-6)

## 2. Allgemeiner Teil

Moleküle und die DNA-Sequenzierung erhielten P. Berg, W. Gilbert und F. Sanger im Jahre 1980 für ihre herausragenden Leistungen den Nobelpreis. Die Entwicklung der Rekombinationstechnologie gründet auf Arbeiten, die Ende der sechziger, Anfang der siebziger Jahre durchgeführt wurden, diese sind:

- Die Isolierung von DNA-Restriktionsendonukleasen durch Smith und seine Mitarbeiter  
⇒ es handelt sich hierbei um Enzyme, die DNA an Stellen mit bestimmten Nukleotidsequenzen auseinanderschneiden
- Die Isolierung der DNA-Ligase  
⇒ es handelt sich hierbei um ein Enzym, das DNA-Fragmente miteinander verbinden kann
- Aufgrund dieser Vorarbeiten, gelang es Cohen und Boyer, erstmals DNA in Plasmide einzubauen und diese dann wieder in Bakterien einzuschleusen  
⇒ diesen Vorgang bezeichnet man heute als Klonierung
- Der 1960 gemachten Entdeckung, daß die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix (Duplex) getrennt werden können (Denaturierung) und anschließend wieder verbunden werden können (Renaturierung), folgte die Entwicklung sogenannter DNA-Sonden (zunächst radioaktive Sonden).
- 1975 wurde zum ersten Mal die Hybridisierung von DNA-Stücken auf einem festen Trägermaterial beobachtet<sup>27</sup>  
⇒ heute als Southern Blotting bekannt

Mit der Fähigkeit, DNA zu manipulieren, entwickelte sich gegen Ende der siebziger Jahre die biotechnologische Industrie. Die erste Biotechnologie-Gesellschaft *Genentech* wurde im Jahr 1976 gegründet. Auch im Jahre 1976 wurde die erste genetisch bedingte Krankheit, die  $\alpha$ -Thalassämie pränatal von Kann und seinen Mitarbeitern diagnostiziert. 1978 diagnostizierte man die Sichelzellenanämie. Es handelt sich hierbei um eine Genmutation im Gen der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins. Diese sorgt für eine veränderte Hämoglobinstruktur und der Patient besitzt sichelzellartige verformte Erythrozyten (siehe *Abbildung 26.*), die schlecht Sauerstoff speichern können. Homozygot ist das Krankheitsbild unter anderem von Anämie und Verstopfung der Blutgefäße gekennzeichnet.



*Abbildung 26:* Erythrocyten einer Person die Träger der Sichelzellenanämie ist

<sup>27</sup> E. M. Southern ; *J. Mol. Biol.* **1975**, 98, 503-517

## 2. Allgemeiner Teil

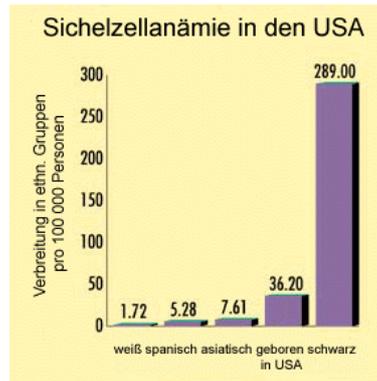


Abbildung 27: Verbreitung der Sichelzellenanämie in ethnischen Gruppen (USA)

Die Krankheit tritt erstaunlicherweise fast nur bei der schwarz-afrikanischen Bevölkerung auf (siehe *Abbildung 27.*).

Alle diese Entwicklungen, Fortschritte und das neu erworbene Wissen, ermöglichten die Entwicklung der modernen DNA-Diagnostik und die Durchführung von Projekten wie zum Beispiel das Humane Genom Projekt (Literatur: siehe z.B. <http://www.i-s-b.org/wissen/broschuere/basis.htm>).

### 2.6.1 Das Genom und die DNA-Diagnostik

Das Erbgut zweier beliebiger nichtverwandter Menschen ist zu 99.9% identisch. Für die genetische Individualität einer Person sind folglich Unterschiede in durchschnittlich jeder tausendsten Base die Ursache. Da das menschliche Genom aus etwa 3 Milliarden Basen besteht, besitzt jeder Mensch annähernd 3 Millionen interindividuelle Basen. Vom Schimpansen unterscheidet sich der Mensch statistisch in jeder hundertsten Basen (98.5% Gleichheit). Der individuelle Genotyp ist dabei nicht nur am Phänotyp und an der unterschiedlichen genetischen Disposition zur Entstehung von Krankheiten deutlich zu sehen, sondern drückt sich vor allem auch im Stoffwechsel durch unterschiedliche Aktivitäten von Enzymen aus. Die DNA-Diagnostik beschäftigt sich daher mit

- der Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen (Vaterschaftstest, Populationsgenetik) sowie der Gerichtsmedizin (Identifizierung von Tätern) und Forensik
- der Humangenetik, der Pathologie, der Onkologie, der Pharmakologie, der Toxikologie und weiteren Disziplinen der Medizin  $\Rightarrow$  Entstehung von komplexen Krankheiten (z.B. Infektionsdiagnostik, Krebs und der Nebenwirkung von Medikamenten, aufgrund von Veränderungen im Arzneimittelstoffwechsel)
- Zell- und Entwicklungsbiologie
- Pflanzenzüchtung, agro-chemische Industrie, Lebensmittelindustrie (Biochips, Nutrichips) und Umweltanalytik wie auch Umweltbiotechnologie

Sie versucht zum Beispiel zu erklären, warum der eine Patient ein Medikament verträgt, während ein anderer Patient eine Unverträglichkeit zeigt (unterschiedliche therapeutische Wirksamkeit). Dabei scheint vor allem der Einzelbasenpolymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) eine entscheidende Rolle zu spielen.

### 2.6.2 Einzelbasenpolymorphismus, SNP

Von einem Einzelbasenpolymorphismus spricht man, wenn eine Abweichung in einer Base in einer Häufigkeit von mehr als 1% in einer Population auftritt. Einzelbasenpolymorphismen verteilen sich mit unterschiedlicher Dichte im Genom, allerdings beobachtet man eine größere Häufigkeit in den nicht-kodierenden Bereichen (Intron). Zu einer phänotypischen Veränderung kann es kommen, wenn sich ein SNP in einem kodierenden (Exon) oder regulatorischen Bereich befindet. Dies kann weitreichende Konsequenzen für die Gesundheit eines Menschen haben. Die schon zuvor erwähnte Sichelzellenanämie ist eine Krankheit die in weiten Teilen Afrikas auftritt. Das Krankheitsbild wird hier durch eine Einzelbasenmutation hervorgerufen, im Gen für die  $\beta$ -Kette des Hämoglobins wird das Triplet GAG gegen GTG ausgetauscht. Anstatt der Glutaminsäure wird nun Valin in das Protein eingebaut, daraus resultiert die charakteristische Sichelzellenform der roten Blutkörperchen. Inzwischen haben Forscher etwa 4000 eindeutig genetisch bedingte Krankheiten ausgemacht. Einige davon, wie zum Beispiel die Mukoviszidose (Cystische Fibrose) und Chorea Huntington (Veitstanz) beruhen auf dem Austausch einer einzelnen Base in einer codierenden Region. Bei den sogenannten komplexen Krankheiten, zu denen Alzheimer, Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus und Neurodermitis gehören, vergrößern entsprechende genetische Dispositionen das Risiko, daß eine Person an einer dieser Krankheiten erkrankt. Allerdings resultiert der Ausbruch einer Krankheit hier aus der genetischen Disposition und bestimmten Umweltfaktoren wie Infektionen, Stress und auch Ernährungsgewohnheiten. In der Regel spielen hier jedoch Interaktionen zwischen mehreren Genen eine Rolle, die möglicherweise sogar in räumlicher Distanz zueinander im Genom vorliegen können. Da solche komplexen Ereignisse durch die klassische Genomanalyse kaum untersucht werden können, bietet die Chiptechnologie mit der Möglichkeit Tausende von Genen in einem einzigen Experiment gleichzeitig zu untersuchen, ideale Voraussetzungen. Die Aufgabe der Forscher ist es nun, im Rahmen der Pharmakogenetik eine personalisierte Medizin (bzw. eine Genotyp-spezifische Medikamententherapie) zu entwickeln, da eine Standard-Therapie nicht die Individualität eines Einzelnen berücksichtigt. Aus diesem neuen Forschungszweig sollen Studien hervorgehen, die klare Aussagen über die Medikamentenunverträglichkeit von Patienten und ihrem Genotyp aufzeigen. Die Unverträglichkeit eines Medikaments beruht auf der unterschiedlich starken Wechselwirkung des Wirkstoffes mit einem Zielprotein (genetischer Unterschied). Die Struktur die dieses Zielprotein einnimmt, hängt vom Genotyp des Patienten ab. Hier können individuelle Unterschiede in Form unterschiedlicher SNP-Muster auftreten. Sind die Zusammenhänge zwischen den SNP-Mustern und einer Unverträglichkeit gefunden, so erhoffen sich die Forscher durch eine Genanalyse des Patienten eine präzisere Medikation durchführen zu können. Hier geht es jedoch nicht nur um die Vermeidung von Nebenwirkungen, sondern auch um eine kostengünstigere und zeitsparendere Therapierung, sowie eine Optimierung des Therapieerfolges mit einem Minimum an körperlicher Belastung für den Patienten. Bei der medikamentösen Therapie konnte festgestellt werden, daß nur etwa ein Drittel der Einnahmen therapeutisch wirksam sind. Unerwünschte Nebenwirkungen zeigen sich bei einem weiteren Drittel, während bei dem dritten Drittel keinerlei therapeutische Wirkung zu erkennen ist. Unerwartete Arzneimittelwirkungen stellen die viert- bis sechshäufigste Todesursache dar<sup>28</sup>. Klinische Studien werden heute immer noch an

---

<sup>28</sup> J. Lazarou et al.; *Jama* **1998**, 279 (15), 1200-1205

Probanden durchgeführt, deren Genotypen relevanter Enzymsysteme nicht bekannt sind. Die Folge ist, daß die individuellen genetischen SNPs in der medikamentösen Therapie so nicht berücksichtigt werden können. 1993 wies eine Expertenkommission der WHO darauf hin, daß zum Beispiel Xenobiotika durch Enzymsysteme in der Phase I und Phase II verstoffwechselt werden. Individuelle Unverträglichkeiten durch den Patienten, könnten daher anhand einer SNP-Analyse der entsprechenden Genabschnitte vorhergesagt und somit auch vermieden werden. Die Gruppe um U. Certa<sup>29</sup> (Hoffman La Roche) untersucht, warum manche Melanompatienten auf eine Therapie mit  $\alpha$ -Interferon gut ansprechen, fast die Hälfte aber mit schwersten Nebenwirkungen reagiert. Stellt sich dabei heraus, daß eine spezifische Genvariante für diese Nebenwirkung verantwortlich ist, könnte man versuchen, einen speziellen diagnostischen Test zu entwickeln, um diesen Patienten die belastende Therapie von vornherein zu ersparen.

Im Forschungsbereich der Pharmakogenomik gilt es nun, aus den insgesamt ca. 10 Millionen SNPs im menschlichen Genom diejenigen mit einer medizinischen Relevanz herauszufiltern. Bekannt und in Datenbanken abgelegt sind heute bereits mehr als 1 Million SNPs. Um eine Genanalyse in diesem Umfang durchführen zu können, müssen jedoch moderne Screening Verfahren entwickelt werden. Die Anforderungen an diese Testverfahren, sind höchste Ergebnissicherheit, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit in der Routineanwendung. Doch letztlich sind diese Testsysteme nur Werkzeuge, um Hinweise auf die für eine Krankheit relevanten Gene zu erhalten. Gene sind aber nicht die einzigen Faktoren, die darüber entscheiden, ob ein Mensch gesund oder krank ist. Auch Umweltfaktoren können auf komplizierte Art und Weise in die biologischen Prozesse eingreifen. Daher sind Untersuchungen, die Proteine betreffend genauso relevant wie die Gen-Analyse. Nach den ersten, erfolgsversprechenden Ergebnissen der DNA-Chips, gewinnen nun die Protein Assays an Bedeutung. Hier stoßen die Forscher jedoch auf eine weit größere Problematik, als bei der Entwicklung der DNA-Chips.

### 2.6.3 Identifizierung SNP

Die sicherste Methode zur Identifizierung einer Einzelbasenmutation ist auch heute noch die Sangersche Sequenzierungsmethode (Dideoxy-Methode) neben dem LightCycler<sup>30</sup> und dem TaqMan-Assay<sup>31</sup> (bei beiden Methoden handelt es sich um spezielle PCR-Techniken).

Die Sangersche Sequenzierungsmethode ist jedoch mit einem hohen technischen, zeitlichen und kostenintensiven Aufwand verbunden.

Daher arbeiten viele universitäre Arbeitsgruppen und Firmen an der Entwicklung neuer, sicherer, schnellerer und automatisierten Analysenmethoden. Sie sollen Verfahren wie die:

- RT-PCR, 5'-Nuklease-Assay, differential display RT-PCR (DDRT-PCR)

---

<sup>29</sup> A.) U. Certa, M. Wilhelm-Seiler, M. Fosser, C. Broger, M. Neeb; *Gene* **2003**, 315, 79-86; B.) U. Certa, M. Seiler, E. Padovan, G. C. Spagnoli; *Br. J. Cancer* **2001**, 85 (1), 107-114

<sup>30</sup> A.) V. Blaschke, K. Reich, S. Blaschke, S. Zipprich, C. Neumann; *Biochemic* **2002**, 1, 6-7; B.) R. Rasmussen, T. Morrison, M. Herrmann, C. Witter; *Biochemica* **1998**, 2, 8-11; C.) A. Reiser, M. Geyer, R. van Miltenburg; M. Nauck, K. Tabiti; *Biochimica* **1999**, 2, 12-14

<sup>31</sup> A.) P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7276-7280; B.) L. G. Lee, C. R. Connell, W. Bloch; *Nucl. Acids Res.* **1993**, 21, 3761-3766

ablösen, die alle auf der PCR-Reaktion basieren. Aber auch andere Methoden wie:

- den Northern-Blot, den Southern Blot, den Dot-Blot und die Slot-Blot-Analyse verlieren vermutlich gegenüber den DNA-Chips an Bedeutung.

### 2.6.4 Blotting Techniken

Als Blotting Technik bezeichnet man die Immobilisierung von biologischen Makromolekülen auf Membranen (Nylon- oder Nitrocellulose) nach deren Auftrennung in einer Gelelektrophorese (vorherige Spaltung z.B. durch Restriktionsenzyme). Nach der Art der transferierten Moleküle, werden Southern-, Northern- oder Western-Blots beim Transfer von DNA, RNA bzw. von Proteinen unterschieden. Der Transfer der Nucleinsäuren erfolgt über Kapillarkräfte mit hochkonzentrierten Salzlösungen, Proteine wandern im Western-Blot in einem elektrischen Feld auf die Membran. Spezifische Nucleinsäuren werden in der Regel mit einer markierten komplementären markierten Nucleinsäure nachgewiesen, spezifische Proteine mit Antikörpern.

### 2.6.5 DNA-Arrays

Die heute gebräuchlichen DNA-Arrays beruhen auf drei unterschiedlichen Teilschritten (siehe *Abbildung 28*).

1. Oligodesoxynukleotide werden an einer Oberfläche immobilisiert oder synthetisiert (meist ein Chip)  
⇒ Detektionssonden oder Fängeroligonukleotide (engl. probes)  
Sonden: Oligo-Chip 16-60 Nucleotide;  
DNA-Chip lange cDNA-Abschnitte 500 bis 5 000 Nucleotide
2. Das zu untersuchende Probenmaterial wird markiert entweder durch den Einbau von modifizierten Nucleotiden (z.B. radioaktive Isotope oder chemische Modifikationen) oder einer 3'- oder 5'- Markierung (Fluoreszenzfarbstoffe, meist PCR-Produkt oder DNA Klone)  
⇒ Zielsequenz (engl. Target)
3. Das Target wird auf die Oberfläche gegeben, nach erfolgter sequenzspezifischer Hybridisierung wird die Oberfläche gewaschen und anschließend erfolgt eine Detektion (meist Fluoreszenzdetektion).

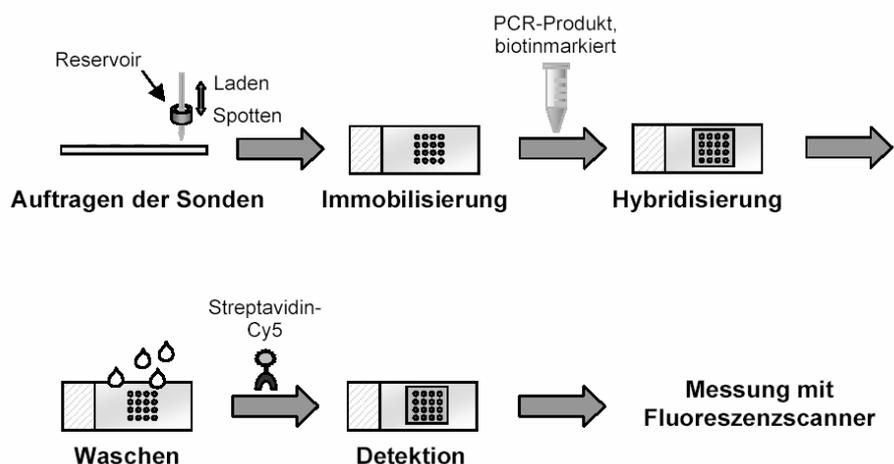


Abbildung 28: Beispiel für die Durchführung eines Assays

## 2. Allgemeiner Teil

Der biochemische beziehungsweise molekularbiologische Test kann daher in vier Teilschritte unterteilt werden:

- Probenvorbereitung
- Inkubation der Probe mit der Sonde
- Auslesen des Signals in Abhängigkeit von der biomolekularen Wechselwirkung
- Datenanalyse

Dieses Prinzip ermöglichte die Entwicklung eines High-Throughput-Screening auf der Grundlage von DNA-Mikroarrays oder DNA-Mikrochips. Es ist für die zukünftige biologische Forschung von größter Bedeutung und wird sich durch das Miniaturisierungs- und Automatisierungspotential zu einer Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts entwickeln. Vermutlich wird es die moderne Biotechnologie ähnlich revolutionieren wie die Entdeckung der PCR Anfang der 80er Jahre.

### 2.6.5.1 Hybridisierung

Im Falle des Oligonukleotidchips sind die verwendeten Sonden mit einer Länge von 16-60 Basen lang genug, um einen statistisch einmaligen Genomabschnitt abzudecken. Sie sind aber auch noch kurz genug, um zwischen vollständig komplementären und einzelbasenfehlpaarenden Sequenzen zu unterscheiden. Bei kleinen Oligodesoxynukleotiden (< 20 Basen) gilt, daß bei der Einführung einer Basenfehlpaarung (mismatch) der  $T_M$ -Wert um 5-20°C reduziert wird. Bei Temperaturen die 5-10°C unter dem  $T_M$  des perfekt gepaarten Doppelstranges liegen und bei niedrigen Salzkonzentrationen kann also im Prinzip die Anwesenheit einer bestimmten Sequenz selektiv detektiert werden (siehe *Abbildung 34.*). Dies gelingt nur, wenn eine Methode zur Verfügung steht mit der doppelsträngige DNA in Gegenwart von einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden kann. Zudem müssen unvollständig hybridisierte Target-Moleküle während des Wasch-Protokolls von der festen Phase weggespült werden (Vermeidung von Adsorptionsphänomenen). Um nur spezifische Bindungen zu detektieren, muß die Stringenz der Hybridisierung exakt eingestellt werden. Das heißt, daß zum Beispiel bei einer einheitlichen Temperatur und Salzkonzentration gearbeitet werden muß. Denn die Stabilität eines Duplexmoleküls ist abhängig:

- vom Basengehalt
- der Basensequenz
- der Duplexlänge
- der Kationenkonzentration
- dem pH-Wert
- der Temperatur
- dem Grad der Modifizierung des Oligonukleotids

Die Stärke der Hybridisierung wird also von einigen Faktoren beeinflusst.

## 2. Allgemeiner Teil

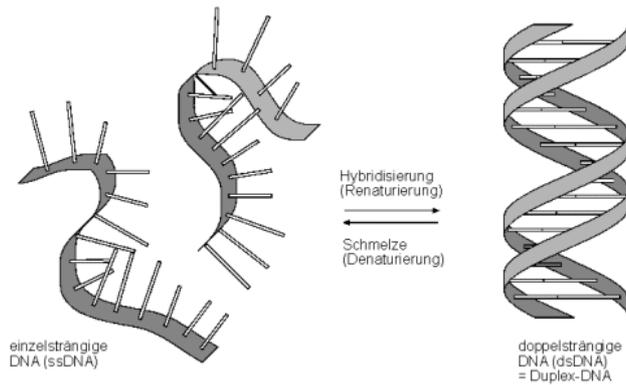


Abbildung 29: Hybridisierung und Denaturierung eines DNA-Duplex<sup>32</sup>

Hybridisierungen in Lösung folgen einer Kinetik der 2. Ordnung<sup>33</sup>. Ist die Sonde dagegen festphasen-gebunden, reduziert sich die Hybridisierungsrate um den Faktor 5 bis 10. Liegt die Probe im Überschuß vor, verläuft die Reaktion annähernd 1. Ordnung<sup>34</sup>.

Die Hybridisierungszeit eines Duplex ist abhängig von der Länge der Oligodesoxynukleotide und der Konzentration der beiden Stränge in der Lösung. Typische Zeiten für die Hybridisierungsrate ( $t_{1/2}$ ) bei einer Probenkonzentration von 1 nM sind 148 min für eine 20 bp Probe, 330 min für eine 100 bp Probe und bereits 17,4 h für eine Probe die 1000 bp lang ist<sup>35</sup>. Beim Aufbau eines Biosensors spielen daher die kinetischen Betrachtungen eine große Rolle. In den meisten Fällen ist die Sonde auf einer festen Oberfläche fixiert, während die Probe frei in der Lösung vorliegt. Um eine Hybridisierungsreaktion signifikant zu beschleunigen, sollten Probe und Sonde möglichst kurz, jedoch von ausreichender Spezifität sein (beim humanen Genom  $\geq 17$  bp). Polymere Zusätze können die Hybridisierungsgeschwindigkeit erhöhen. Allerdings konnte festgestellt werden, daß immobilisierte DNA gegenüber der DNA in homogenen Reaktionen eine veränderte Hybridisierungskinetik aufweist, die zum Einen (wie oben erwähnt) von der entsprechenden Länge des Oligonukleotids und zum Anderen, von dem zur Immobilisierung verwendeten Kopplungsreaktion<sup>36</sup> abhängt.

### 2.6.5.2 Basengehalt

Die Watson-Crick Basenpaare weisen unterschiedliche Stabilitäten auf. Ein G-C-Basenpaar wird durch drei Wasserstoffbrücken gebildet, ein A-T-Basenpaar nur durch zwei. Daher unterscheiden sich die Assoziationskonstanten dieser Paare und je höher der G-C-Gehalt eines Duplex ist, desto stabiler wird dieser sein. Der

<sup>32</sup> Quelle: Praktikumsprotokoll des MPI Dortmund; Versuch 1: DNA-Synthese und DNA-Hybridisierung (Protokoll kann im Internet unter [www.mpi-dortmund.mpg.de/deutsch/abteilungen/abt4/praktikum](http://www.mpi-dortmund.mpg.de/deutsch/abteilungen/abt4/praktikum) eingesehen werden)

<sup>33</sup> B. D. Young, M. L. Anderson (1985), Quantitative analysis of solution hybridization, in : Nucleic acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Oxford, Kapitel 3, S. 47-72

<sup>34</sup> R. N. Bryan, J. L. Ruth, R. D. Smith, J. M. LeBon; *Microbiology* 1986, S. 113 (Eds. L. Levine, American Society for Microbiology) Washington DC

<sup>35</sup> A.) J. Meinkoth, G. Wahl; *Anal. Biochem.* 1984, 138, 267; B.) J. G. Wetmur, N. Davidson; *J. Mol. Biol.* 1968, 31, 349

<sup>36</sup> U. Maskos, E. M. Southern; *Nucl. Acids Res.* 1992, 20, 7, 1679-1684

Schmelzpunkt eines Duplex läßt sich grob durch folgende Werte überschlagen, pro G-C-Paar addiert man 3°C, für ein A-T-Paar 2°C.

### 2.6.5.3 Basensequenz

Trotz gleicher Basenzusammensetzung, aber unterschiedlicher Sequenz, können Duplexmoleküle eine unterschiedliche Stabilität aufweisen. Der G-C-Gehalt kann also nicht alleine entscheidend für die Stabilität sein. Dies läßt den Rückschluß zu, daß auch die Position in der Sequenz einen Einfluß auf die Stabilität besitzt. Die Dissoziation eines Duplexes wird normalerweise an seinen Termini eingeleitet. Der Einbau eines G-C-Basenpaares an den Termini erschwert die Dissoziation verglichen mit dem Einbau des G-C-Basenpaares in interner Position. Ebenfalls einen großen Einfluß hat die Abfolge der Purin-Pyrimidin-Basen. Denn ein wesentlicher Teil der Stabilisierung eines Duplex resultiert aus der Stapelwechselwirkung (base stacking) der hydrophoben Nukleobasen. So ergaben zum Beispiel quantenchemische Berechnungen, daß ein 5'-C-G-3'/3'-G-C-5' Duplex - 14.6 kcal/mol, ein 5'-G-C-3'/3'-C-G-5' Duplex - 9.7 kcal/mol, ein 5'-G-G-3'/3'-C-C-5' Duplex - 8.3 kcal/mol Stapelwechselwirkungsenergie aufweisen<sup>37</sup>. Als Grund ist hier das unterschiedliche Stacking in den helicalen Duplexmolekülen zu nennen.

### 2.6.5.4 Duplexlänge

Je mehr Basen miteinander durch Wasserstoffbrückenbindungen (3-6 kcal/mol pro Wasserstoffbrückenbindung) und Stapelwechselwirkung interagieren können, desto stabiler wird der Duplex.

### 2.6.5.5 Kationenkonzentration

Bei der Bildung eines Duplex müssen sich zwei Polyanionen (Phosphordiester-Rückgrat) annähern. Die Hybridisierung wird daher durch Coulombabstoßung erschwert. Zugefügte Kationen kompensieren durch Komplexierung die negative Ladung. Daher steigt die Stabilität eines Duplexes mit steigender Ionenkonzentration. Auch die Natur des Kations besitzt einen Einfluß. Zweiwertige Kationen wie Mg<sup>2+</sup> wirken zum Beispiel besonders stabilisierend.

Eine höhere Ionenstärke erhöht die Stabilität des Doppelstranges. Bei Salzkonzentrationen < 0.1 M Na<sup>+</sup> ist die Hybridisierungsgeschwindigkeit sehr langsam, ein Anstieg auf 0.1 M Na<sup>+</sup> bewirkt eine 5 bis 10-fach höhere Reaktionsrate<sup>38</sup>

### 2.6.5.6 pH-Wert

Erhöht man den pH-Wert einer Lösung auf einen pH von > 13, hat dies denselben Effekt auf den Duplex, wie eine Erwärmung auf 100°C. Die komplementären Basenpaare werden getrennt und die Doppelhelix dissoziiert in zwei Einzelstränge. Daher ist bei der Messung des T<sub>M</sub> -Wertes ein Puffer von Nöten, der bei

---

<sup>37</sup> Daten entnommen aus einem Praktikumsprotokoll des MPI Dortmund; Versuch 1: DNA-Synthese und DNA-Hybridisierung (Protokoll kann im Internet unter [www.mpi-dortmund.mpg.de/deutsch/abteilungen/abt4/praktikum](http://www.mpi-dortmund.mpg.de/deutsch/abteilungen/abt4/praktikum) eingesehen werden)

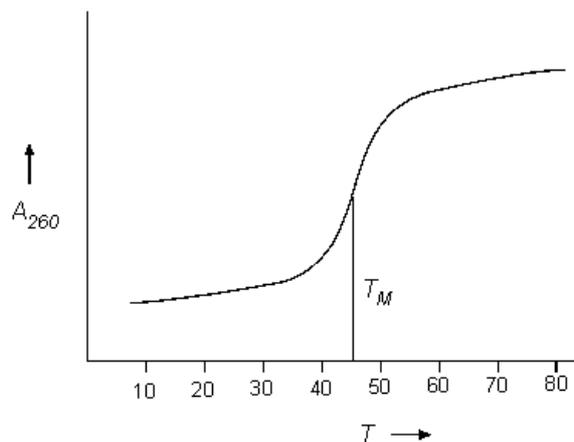
<sup>38</sup> M. L. M. Anderson, B. D. Young; Nucleic acid hybridization: a practical approach, IRL Press Oxford **1985** (Eds.: B. D. Hames, S. J. Higgins), S. 73-80

Temperaturerhöhung pH stabil bleibt (Verwendung von Phosphat-Puffern anstatt Tris- oder HEPES- Puffern<sup>39</sup>).

### 2.6.5.7 Temperatur

Bei erhöhter Temperatur kommt es zur Dissoziation. Den Punkt, bei dem 50% des Duplex dissoziiert ist, bezeichnet man als Schmelzpunkt  $T_M$ . Die Analogie zum physikalischen Phasenübergang des Schmelzens rührt von der vereinfachten Modell-Annahme, daß die Dissoziation ein „alles oder nichts“-Prozeß ist. Zwischenzustände werden hier nicht berücksichtigt, daher können analoge mathematische Modelle für den Schmelzvorgang angewendet werden. Der  $T_M$ -Wert ist ein Maß für die thermische Stabilität eines Duplex.

Am einfachsten kann man diesen Vorgang durch die Messung der Absorption von UV-Licht (260 nm), die auf die Purin- und Pyrimidinbasen der Einzelstränge zurückzuführen ist, verfolgen<sup>40</sup>. Dabei ist zu beobachten, daß einzelsträngige DNA bei dieser Wellenlänge etwa 1.4 mal besser absorbiert als doppelsträngige DNA (siehe *Abbildung 30.*).



*Abbildung 30:* Absorptionsverhalten eines Doppelstranges bei Temperaturerhöhung

Die Lage einer Schmelzkurve ist vom Lösungsmittel abhängig. Bei einer niedrigen Salzkonzentration, einem erhöhtem pH-Wert und der Anwesenheit organischer Lösungsmittel verschiebt sich die Schmelzkurve nach links, zu niedrigeren Temperaturen gegenüber einer Messung in einem Phosphat-Puffer (pH-Wert: 7, 10 mM Phosphat-Puffer, 140 mM Natriumchlorid).

### 2.6.5.8 Zugabe von Formamid und Polymeren

Die Zugabe von Formamid destabilisiert die Duplexbildung durch die Hemmung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Da es die Schmelztemperatur signifikant erniedrigt (1% Formamid erniedrigt den  $T_M$  um ca.  $0.7^\circ\text{C}$ <sup>41</sup>), wird es häufig

<sup>39</sup> J. D. Puglisi, I. Jr. Tinoco; *Methods in Enzymology* **1989**, 180, 304-325

<sup>40</sup> siehe Doktorarbeit Markus Schweitzer, Frankfurt am Main **1998**, Kapitel 6. Duplexstabilität und Schmelzkurven (hervorragende Zusammenfassung und Herleitung der entsprechenden mathematischen Modelle und relevanten physikalischen Größen)

<sup>41</sup> B. L. McConaughy, C. D. Laird, B. J. McCarthy; *Biochemistry* **1969**, 8, 3289

eingesetzt, um die Stringenz der Hybridisierung zu variieren. ( $T_{\text{Hyp}}$  liegt für stringente Bedingungen 5-15 °C niedriger als der  $T_M$ ).

Die Zugabe von Polymeren wie Dextransulfat<sup>42</sup>, Polyacrylsäure<sup>43</sup> oder Polyethylenglykol<sup>44</sup> hat einen wasserentziehenden verdrängenden Einfluß, der die effektive Konzentration an der Nukleinsäuren erhöht. Damit erhöht sich ebenso die Reaktionsgeschwindigkeit der Hybridisierung.

### 2.6.5.9 Modifikationen

Es kann erforderlich sein, daß eine Sonde für eine Messung in einem Hybridisierungsexperiment verlängert oder verkürzt werden muß, da sie andere Hybridisierungseigenschaften aufweist, als die Nachbarsonden. Das kann vor allem in DNA-Arrays bei der Verwendung von kurzen Sonden der Fall sein. Anstatt die Länge der Sonde zu verändern, können die Hybridisierungseigenschaften genauso gut durch eine Modifizierung der Sonde verändert werden. Allgemein läßt sich feststellen, daß die Einführung einer Modifikation, vor allem am Phosphatrückgrat, zu einer Destabilisierung des Duplex führt. Bei genauerer Betrachtung, läßt sich Folgendes feststellen:

- Untersucht man zum Beispiel Methylphosphonate unter dem Aspekt der Duplexstabilität, kann festgestellt werden, daß die beiden Diastereomere eine unterschiedliche Stabilität in einem Duplex aufweisen. Das Rp-Isomer besitzt innerhalb eines Duplex eine höhere Stabilität ( $> T_M$ ) als das entsprechende Sp-Isomer. Allerdings besitzen beide Diastereomere eine geringere Stabilität ( $< T_M$ ) als die entsprechend unmodifizierte Verbindung (Phosphordiester).

Viele Forschergruppen arbeiten zur Zeit an der Entwicklung von universellen Basen, stabilisierenden Modifikationen oder interkalierenden und damit ebenfalls stabilisierenden Modifikationen (zum Beispiel LNA oder PNA, siehe Kapitel 2.6.19).

Unter einer universellen Base versteht man eine modifizierte Nukleobase, die mit allen vier natürlichen Nukleobasen gleichermaßen paart und so universell eingesetzt werden kann. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind die Voraussetzungen für den erfolgreichen Einsatz von DNA-Arrays, durch den Einsatz entsprechender Modifikationen, könnten diese für alle Sonden auf einem Chip eingestellt werden.

### 2.6.6 Oligonukleotid-Chip und DNA-Chiptechnologie

Im Gegensatz zum Oligonukleotid-Chip (Sonden 16-60 Basen) werden bei der cDNA-Chiptechnologie, cDNAs in der Größe von 500 bis 5 000 Basen auf einem Glaträger immobilisiert. Die daraus entstehenden cDNA-Mikroarrays enthaltenen meist etwa 1 000 Gene oder Gensequenzen (Spots) und werden für Genexpressions- und Mutationsanalysen als auch für die Entdeckung neuer Gene eingesetzt. Vorteile bietet der Einsatz von cDNAs in der Hinsicht, daß keine intragenetische Vorabinformation zu den entsprechenden Targets bekannt sein müssen. Des Weiteren ist die Hybridisierungsspezifität durch Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen bei längeren Molekülen im Vergleich zu kurzen Sequenzen erhöht. Allerdings können hier unerwünschte Kreuzreaktionen auftreten, die während der Hybridisierung aufgrund zufälliger Sequenzübereinstimmungen

---

<sup>42</sup> J. G. Wetmur; *Biopolymers* **1975**, 14, 2517

<sup>43</sup> C. A. Miller, W. L. Patterson, P.K. Johnson, C. T. Swartzell, F. Wogoman, J. P. Albarella, R. J. Carrico; *J. Clin. Microbiol.* **1988**, 26, 1271-1276

<sup>44</sup> R. M. Amasino; *Anal. Biochem.* **1986**, 152, 304

zwischen Sonde und dem zu analysierenden Material auftreten. Weiterhin ist die Verwendung von cDNAs aufgrund hoher Sequenzhomologien eng verwandter cDNA-Moleküle weniger selektiv, was dazu führt, daß Sequenzhomologien in einem Experiment nicht unbedingt diskriminiert werden können. Im Gegensatz zu den Oligoarrays kann hier jedoch meist auf entsprechende Kontrollen verzichtet werden.

### 2.6.7 Expressionsarrays

Mikroarrays erlauben eine nie zuvor mögliche Geschwindigkeit in der Erstellung und Analyse biologischer Daten. Denn, während die vielen molekularbiologischen Methoden immer nur ein Zielmolekül in einem Analysenschritt untersuchen, ist folglich eine Vielzahl von Einzelversuchen notwendig, um eine statistisch auswertbare Menge an experimentellen Daten zu generieren, ermöglicht die Chip-Technologie jedoch die parallele Analyse einer großen Anzahl von Molekülen (Parallelisierung) einer Klasse (z.B. cDNA). Die Forderung nach Parallelisierung wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß es für die Sequenzanalyse durch Hybridisierung (sequencing by hybridization, SBH) eines lediglich acht Nukleotide enthaltenden Oligomers erforderlich ist, ein Array aus 65536 ( $4^8$ ) verschiedenen Sonden-Oligonukleotiden auf der Chipoberfläche zu immobilisieren. Inzwischen wurden Arbeiten publiziert, in denen zum Beispiel das gesamte Hefegenom (ca. 6 000 Gene) auf einem Chip eingesetzt wurde. Es ist daher nicht utopisch, daß in nicht ferner Zukunft das menschliche Genom (30 bis 40 000 Gene) auf wenige Chips immobilisiert werden könnte und entsprechende Expressionsstudien durchgeführt werden könnten. Inzwischen sind über DNA-Mikroarrays mehrere Bücher<sup>45</sup>, Übersichtsartikel<sup>46</sup> sowie einige populär-wissenschaftliche Beschreibungen<sup>47</sup> verfasst worden.

Die Forscher beschäftigt vor allem die Frage, nach den zellulären Regulationsmechanismen, die das komplexe Netzwerk aus Interaktionen zwischen den verschiedenen Genen kontrollieren. Sie interessieren sich dabei für die Gene, die in einer Zelle abgelesen und in Proteine übersetzt werden (Expression), und die Veränderung ihrer Aktivitätsmuster während verschiedener Entwicklungsstufen, im Krankheitsfall oder durch Umwelteinflüsse (funktionelle Genomanalyse). Ergebnisse dieser differentiellen Expressionsstudien erlauben ihnen Rückschlüsse auf die Beteiligung von Genen an bestimmten zellulären Stoffwechselprozessen oder deren genetische Kontrolle. Derzeit existieren hierfür verschiedene Plattformtechnologien: Makroarrays, Mikroarrays, Oligodesoxynukleotid-Arrays, mikroelektronische Arrays und zusätzlich eine Vielzahl an Varianten. *Abbildung 31.* zeigt, in welcher vielfältiger Weise ein entsprechender Chip gestaltet werden kann.

---

<sup>45</sup> A.) *DNA Microarrays. A Practical Approach* (Hrsg. M. Schena), Oxford Press, New York, **1999**; B.) *Microarray Biochip Technology* (Hrsg. M. Schena), Eaton, Natick, **2000**; C.) *Methods in molecular biology, Volume 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg. J. B. Rmoal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**

<sup>46</sup> A.) W. M. Freeman, D. J. Robertson, K. E. Vrana; *Biotechniques* **2000**, 29, 1042-1055; B.) J. Wang; *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28, 3011-3016; C.) D. H. Blohm, A. Guiseppi-Elie; *Curr. Opin. Biotechnology* **2001**, 12, 41-47; D.) C. M. Niemeyer, D. Blohm; *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3039-3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2865 - 2869

<sup>47</sup> W. W. Gibbs; *Sci. Am.* **2001**, 284, 33-34

## 2. Allgemeiner Teil

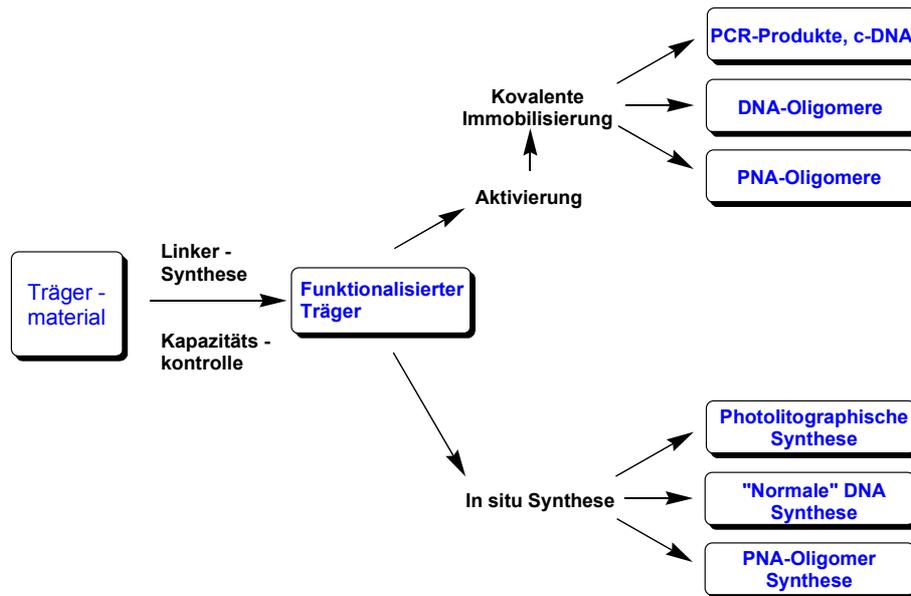


Abbildung 31: Schemata zur Funktionalisierung eines Arrays

Diese Formate unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten:

- Festkörpermatrices,
- der Anzahl und Dichte der immobilisierten Sonden,
- ihrer Größe
- und der Auswertungstechnik.

Das Konzept, Multiparameter-Analysen in einem einzigen Experiment zusammenzufassen, fand erstmals in Form des Dot-Blots Anwendung.

### 2.6.8 Makroarrays

- Festkörpermatrix

Membranstreifen aus Nitrozellulose oder Nylon

- Anzahl und Dichte der immobilisierten Sonden

Sonden werden individuell aufgebracht und immobilisiert (Spotting)

Sondendichte 200 bis 5 000 pro  $\text{cm}^2$

- Detektion und Auswertung

Entwickeln einer Photoemulsion, Exposition eines Röntgenfilms

(radioaktive Detektion) oder durch den Nachweis von enzymatisch katalysierten Farb- oder Lumineszenzreaktionen

### 2.6.9 Mikroarrays

- Festkörpermatrix

Glas, Plastik, Silikon und Keramik  $\Rightarrow$  neuartige Substratoberflächen

ermöglichen eine hohe Sondendichte und eine gute Immobilisierungs- und Hybridisierungskapazität. Aus einer Reihe von aktivierten Oberflächen, die sich im Bezug auf ihre Bindungschemie, Anzahl der Bindungsstellen, Kopplungseffizienz, Belegungsdichte und optische Eigenschaften unterscheiden, kann man die für den jeweiligen experimentellen Ansatz geeignete auswählen.

- Anzahl und Dichte der immobilisierten Sonden

## 2. Allgemeiner Teil

Steigerung der Sondenzahl und -dichte (> 10 000)

Affymetrix: 1.5 cm<sup>2</sup> Fläche, 40 000 Genfragmente ⇒ 400 000 Sektoren

- Größe

Hybridisierungsreaktionen finden hier in einer kleinen Flußzelle oder Hybridisierungskammer mit minimalen Volumen statt. Die dadurch erzielte Erhöhung der relativen Probenkonzentration führt zu einer Beschleunigung der Bindungsreaktionen und spart dadurch sowohl Zeit als auch Probenmaterial. Dies ist besonders dann entscheidend, wenn nur sehr wenig Material zur Verfügung steht.

- Detektion und Auswertung

Der entscheidende Fortschritt besteht allerdings darin, daß die Anwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mit einer ähnlichen Quantenausbeute zur Probenmarkierung, die Möglichkeit der kompetitiven Hybridisierung eröffnet. Dadurch können Transkriptionsprodukte (mRNAs), die aus zwei verschiedenen Gewebetypen stammen (z.B. Normalgewebe und Tumorgewebe) gleichzeitig auf ein und demselben Array hybridisiert werden (high density arrays). Die Hybridisierungsereignisse werden durch Filtersysteme getrennt voneinander ausgelesen. Hier können zum Beispiel verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden. Der anschließende direkte Vergleich der Intensitäten ermöglicht eine Bestimmung der relativen Anteile von mRNAs einzelner Gene und erlaubt Rückschlüsse auf ihr Expressionsniveau in der jeweiligen Gewebeprobe. Bei dieser Art von Chip, werden fluoreszenz-markierte cDNA Präparationen (500-5 000 Basen), die aus der mRNA zweier sich in einem Parameter unterscheidenden Kulturen gewonnen werden, verwendet. Die RNA aus Kultur 1 bzw. Kultur 2 wird mit Zufallsprimern und grün- bzw. rot-fluoreszierenden Nukleotidanaloga (Cy3, Anregung bei 488 nm; Cy5, 594 nm Anregung) durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die zelluläre RNA (t-RNA, m-RNA) besteht allerdings nur in geringem Ausmaß aus mRNA (E.coli: ca. 4% der Gesamt-RNA-Menge ist hier m-RNA). Sie wird nur dann gebildet, wenn ein Gen aktiv transkribiert wird. Der mRNA-Spiegel eines Gens kann als Maß für dessen Expressionsstatus benutzt werden. Der Vorteil von eukaryontischen Organismen von der Hefe bis zum Mensch, ist die einfache Möglichkeit die mRNA gezielt isolieren zu können. Da sie hier am 3'-Ende polyadenyliert vorliegt (ca. 200 Adenosylreste) und mit Hilfe der Oligo(dt)-Chromatographie angereichert werden kann. *Abbildung 32.* beschreibt die schematische Durchführung zweier Expressionsassays.

Im Assay A.) werden zwei unterschiedliche Zellen (Wachstum unter zwei unterschiedlichen Bedingungen) aufgeschlossen und die DNA, mRNA und Proteine als entsprechende Targets (Biological Target) isoliert. Diese müssen für eine mögliche Detektion zuerst mit einer Markierung (Different labeling) versehen werden. Bei der DNA und mRNA wird diese Markierung meist innerhalb einer PCR-Reaktion durch Verwendung eines markierten Nukleotids (dNTP) eingeführt. Auf dem Chip erfolgt die Hybridisierung des Targets mit den immobilisierten Sonden (Competitive binding). Die Auswertung erfolgt durch die getrennte Detektion der beiden Markierungen (hier Fluoreszenz) und dem anschließenden Intensitätsvergleich.

Im Assay B.) wird die unterschiedlich starke Expression verschiedener Proteine (Biological target) untersucht, die nach der Isolierung aus der Zelle ebenfalls markiert (Labeling) werden müssen. Auf dem Chip kann hier zum Beispiel die unterschiedlich starke Bindung an einem immobilisierten Rezeptor bestimmt werden (Binding und Quantification).

## 2. Allgemeiner Teil

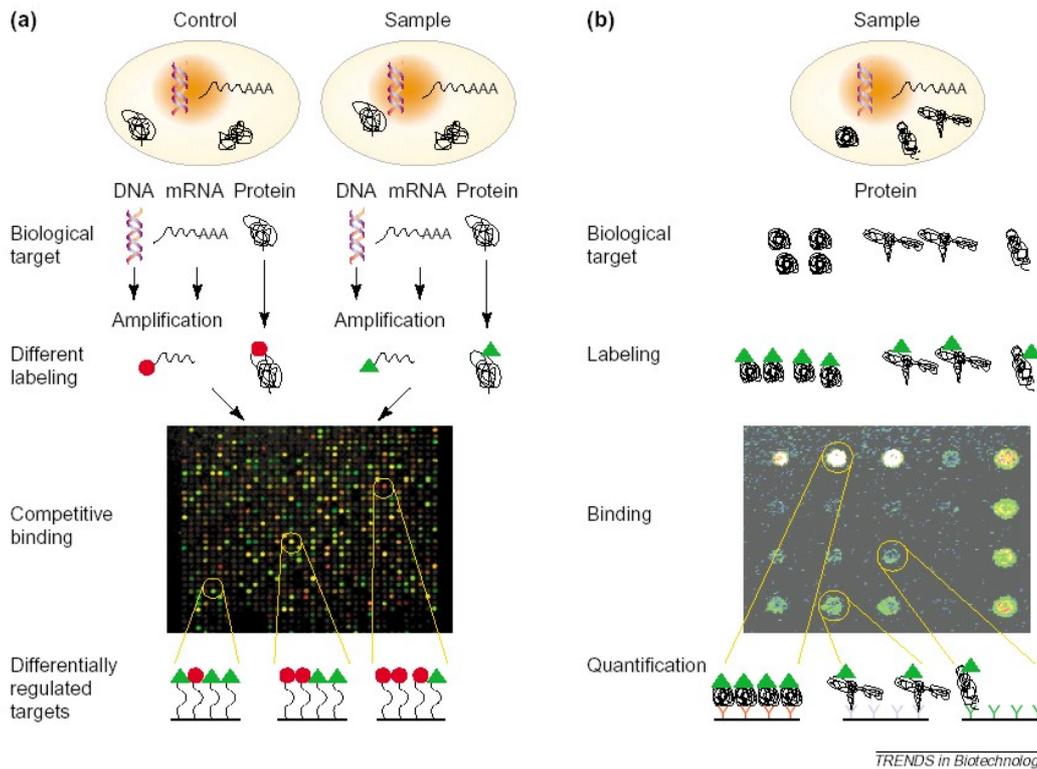
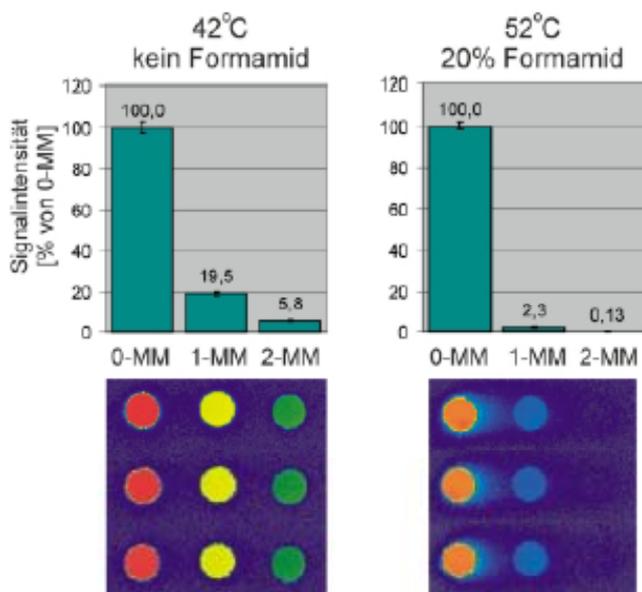


Abbildung 32: Zwei verschiedene Expressionsassays (Quelle Trends in Biotechnology)

### A.)

Target komplementär zu 0-Mismatch (MM)



### B.)

Target komplementär zu 1-Mismatch (MM)

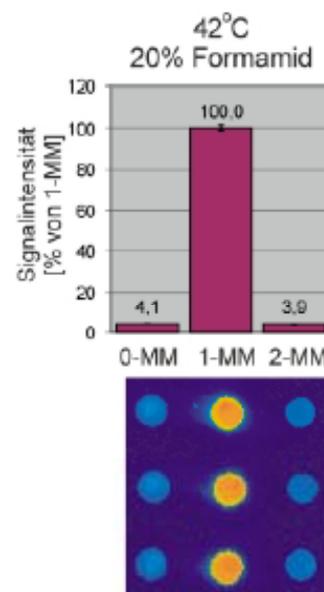


Abbildung 33: Quelle: BIOforum 10/2002, S. 632-634, GIT Verlag GmbH & Co., KG, Darmstadt<sup>48</sup>

<sup>48</sup> M. Lustig, M. Heisinger, S. Hauch, S. Waschütza, E. Schnakenberg, L. Boldt, S. Zieseniss, H. Wehning, L. Ziegenhagen, G. Mix, U. Steller; BIOforum 10/2002, S. 632-634, GIT Verlag GmbH & Co., KG, Darmstadt

Zu *Abbildung 33*:

A.) Ein 21 Basen langes Fänger-Oligodesoxynukleotid (0-Mismatch) sowie zwei weitere Oligodesoxynukleotide, deren Sequenz in zentraler Position von der des Fängers in einer (1-Mismatch) bzw. zwei Basen (2-Mismatch) abweichen, wurden in Form von Triplikaten gespottet (PicoSlides). Die Hybridisierung des Arrays erfolgte bei 42°C in PicoHybrid Hybridisierungspuffer mit einem Cy5-fluoreszenzmarkierten Target-Oligodesoxynukleotid, das eine exakt komplementäre Sequenz zum Fänger-Oligodesoxynukleotid (0-Mismatch) besitzt.

B.) Das Experiment wurde wie unter A.) beschrieben durchgeführt, jedoch wurde als Target ein Cy3-markiertes Oligodesoxynukleotid eingesetzt, dessen Sequenz exakt komplementär zum 1-Mismatch Fänger-Oligodesoxynukleotid ist.

Zu beobachten ist hier, daß es schon bei einer Hybridisierungstemperatur von 42°C und ohne Zusatz von Formamid (zum Hybridisierungspuffer) bei einer einzelnen Basenfehlpaarung bereits zu einem drastischen Absinken des Hybridisierungssignals kommt (auf etwa 20% des Wertes, der bei perfekter Basenpaarung erhalten wird). Das Diskriminierungsvermögen kann durch die Zugabe von 10% Formamid (erniedrigt  $T_M$ , siehe 2.6.5.8) noch deutlich gesteigert werden. Anhand des durchgeführten Kontrollexperimentes B.) konnte gezeigt werden, daß die oben beschriebenen Unterschiede tatsächlich auf unterschiedlichen Hybridisierungseffizienzen beruhen und nicht auf experimentelle Artefakte zurückzuführen sind.

### 2.6.10 Spotting-Techniken

Die Robotertechnologie ermöglicht inzwischen verschiedene Spotting-oder Druckverfahren (BioRobotics, Cartesian Technologies, Gene-Machines, Packard BioScience, Genetix Limited u.a.).

Die beiden Artikel

- Biochips - Das Labor in der Streichholzschachtel von S. Lorkowski, G. Lorkowski und P. Cullen
  - Die Herstellung von DNA-Chips von M. C. Pirrung
- geben einen ausführlichen Überblick über die Herstellung eines entsprechenden Biochips<sup>49</sup>.

Man unterscheidet zwischen drei Verfahren<sup>50</sup>:

- Mikrospeckung (Contact-Printing, Inkjet-Printing)
- Litographisches Verfahren (Affymetrix-Technologie)
- Mikrospeckung

Beim Mikrospeckung (Contact-Printing) werden synthetisierte Oligodesoxynukleotide oder PCR-Produkte auf dem Chip aufgebracht bzw. immobilisiert. Das Auftragen der extern synthetisierten Oligodesoxynukleotide (Modifikationen sind möglich)<sup>51</sup> ermöglicht eine höhere Variation in der Gestaltung des Arrays. Das Auftragen geschieht meist mit einer Mikrokapillare. Durch das Aufsetzen der Nadel auf dem Substrat wird über Adhäsionskräfte ein Teil der Flüssigkeit an dieser Stelle

---

<sup>49</sup> A.) S. Lorkowski, G. Lorkowski, P. Cullen; *Chemie in unserer Zeit* **2000**, 34 (6), 356-372;  
B.) M. C. Pirrung; *Angew.Chem.* **2002**, 114, 1326-1341

<sup>50</sup> E. Ermanntraut; *medgen* **1999**, 11, 6-11

<sup>51</sup> J. Hoheisel, M. Vingron; *Biospektrum* **1998**, 4/Heft 6, 17-20

abgegeben. Entwickelt wurde dieses Verfahren 1997 von der Firma *Synteni* (Fermont, USA). Problematisch gestaltet sich hier die Kontrolle und die Reproduzierbarkeit der Spotsmorphologie.

Basierend auf der Druckertechnologie der Computerindustrie wurden daher piezoelektrische Dispensiersysteme entwickelt, die sich durch eine größere Präzision bei der Abgabe definierter Volumina (100 pl bis 3 µl) auszeichnen (*GeSiM*, *Tecan*, *Rosetta Inpharmatics*, *Agilent Technologies*). Als fester Träger wird hier immer noch gerne der klassische mikroskopische Objektträger herangezogen. Modernste Geräte können darauf bis zu 15 000 Miniatur-Spots mit einem Durchmesser von weniger als 100 µm auftragen<sup>52</sup>. Noch besser dosierbar und präziser ist die Capillary Tube Technologie, bei der die DNA-Proben über Kapillarkräfte eingesaugt wird und das Titanium Pin Prinzip, bei dem die DNA-Lösung auf eine konkaven Pin-Oberfläche festgehalten und transferiert wird.

### 2.6.11 Lithographische Verfahren

Beim lithographischen Verfahren (*Affymetrix*, 1991)<sup>53</sup> wird DNA *in situ* auf dem eigentlichen Trägermaterial synthetisiert (siehe *Abbildung 34.*).

Möglich wurde dieses Verfahren durch die Anlehnung an die, aus der Halbleitertechnik stammenden Technik, der Photolithographie. Das Trägermaterial besitzt eine reaktive Schicht (z.B. photoempfindliches Material) die zu Beginn der Fertigung, mit einer Schutzgruppe blockiert ist<sup>54</sup>. Welche Schutzgruppenstrategie man hier anwendet, ist primär von dem entsprechenden Syntheseroboter abhängig. Zum Einsatz kommen heute vor allem photolabile Schutzgruppen. Diese haben den Vorteil, daß zu ihrer Abspaltung "nur" Licht erforderlich ist.

Mit der kombinatorischen Synthese können  $4^l$  unterschiedliche Sequenzen der Länge  $l$  in  $4 \times l$  chemischen Stufen hergestellt werden<sup>55</sup>. Die Firma *Affymetrix* brachte dieses Verfahren zur Marktreife. In 32 Syntheseyklen können mit diesem Verfahren durch geschickte Auswahl der 32 Lochmasken mehr als 65 000 verschiedene Oligodesoxynukleotide mit einer Kettenlänge von acht Bausteinen hergestellt werden. Auf einer Fläche von 1.6 cm<sup>2</sup> konnten die Forscher bisher ca. 400 000 verschiedene Gruppen von Oligodesoxynukleotiden platzieren. Jede Gruppe enthält dabei etwa  $10^7$  Oligodesoxynukleotide.

Ein Nachteil ist hier die nicht mögliche Synthesekontrolle und Kopplungsausbeuten, die meist nicht > 95% betragen. Dies führt zu einer großen Zahl an Kettenabbruchmolekülen und verschlechtert daher die Qualität der Hybridisierung. Bei der Herstellung eines Chips mit einer Basenlänge von 25 Basen, werden nur etwa 28% der zu erzeugenden 25 mere in der gewünschten Weise synthetisiert. Auf kommerziell erhältlichen Arrays wird diese Einschränkung durch eine große Anzahl an sich ergänzenden Sonden kompensiert.

---

<sup>52</sup> T. Köbberling, D. Terzenbach; *Bioforum Spezial 10 1999*, 16

<sup>53</sup> A.) S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. T. Stryer, A. Lu, D. Solas; *Science 1991*, 251, 767-773; B.) S. Gaisser; *Bio World 2 1999*, 48-49; C.) M. C. Pirrung, J. L. Read, S. P. A. Fodor, L. Stryer; Patent (USA): 5,143, 854, 1990

<sup>54</sup> J. D. Hoheisel, M. Vingron; *Biospektrum 4 1998*, 6, 17-20

<sup>55</sup> A.) M. C. Pirrung; *Chem. Rev. 1997*, 97, 473-488; B.) J. Zlatanova, A. Mirzabekov, *Methods in molecular biology Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rampal) Humana Press Totowa, NJ, 2001, 71-102

## 2. Allgemeiner Teil

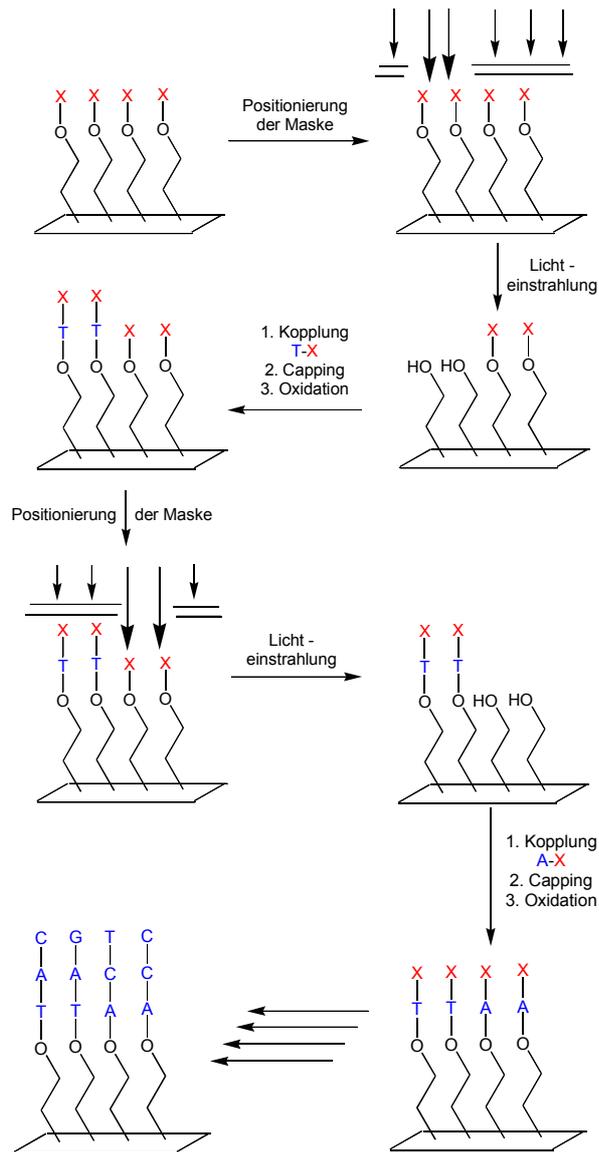


Abbildung 34: Photolithografisches Verfahren

Ein weiteres Problem stellt die Synthese von modifizierten Sonden da. Sollen Modifikationen in die Sonde eingebaut werden, muß der Syntheszyklus modifiziert werden. Dies ist auf der (Chip)-Oberfläche leider nicht so einfach zu realisieren wie bei den „gängigen“ Synthesizern.

Eine Entwicklungstendenz der photolithographischen Verfahren weist daher in die Richtung computergesteuerter, regionspezifischer Belichtung (Mikrospiegel<sup>56</sup>, LED-Arrays, Spiegelarrays, *Texas Instruments*, high-definition television mirror arrays, *NimbleGen*, *Xeotron*, *Febit*), welche die Verwendung des komplexen Maskensystems überflüssig machen würde. Mit diesem Verfahren konnten bereits Zehntausende von 16 µm großen, DNA-haltigen Areale mit einem Abstand von 1 µm auf einer Fläche von 10 x 14 mm realisiert werden, in denen theoretisch 480 000 verschiedene Oligodesoxynukleotide synthetisiert werden können.

<sup>56</sup> N.N., Neues maskenloses Verfahren für die DNA-Chip-Herstellung. *Transkript* 5, **1999**, 10-11, 49 (Autor namentlich nicht genannt)

### 2.6.12 Nanogen Technologie

Eine interessante Ausnahmestellung nimmt die elektronische Fokussierung der Firma *Nanogen Inc.* (San Diego, USA) ein. Es handelt sich hier um ein komplettes Analysensystem bestehend aus einer Reaktionskartusche und einer Workstation. Hier sind auf einem Silicium Chip Platinelektroden angebracht und durch das Anlegen eines elektrischen Stroms können verschiedene Proben nacheinander an spezifischen Positionen immobilisiert werden. Durch die gezielte Hybridisierung (Anlegen eines elektrischen Potentials) an einzelnen Positionen kann die Reaktion hier stark beschleunigt werden. Ein einfaches Umpolen steigert die Selektivität der Reaktion und kann sogar die gebundene Probe vollständig entfernen, was die Wiederverwendbarkeit des Chips ermöglichen könnte. Biochips werden in der Regel jedoch nur einmal verwendet, trotz ihres hohen Preises. Da ein erneuter Einsatz zu problematisch wäre, denn bei geringsten, noch anhaftenden Substanzspuren würde die folgende Untersuchung verfälscht werden. Der Chip von *Nanogen* besitzt aufgrund der eingebauten Elektroden einen sehr komplexen Aufbau, trotzdem wird er ebenfalls als Einwegartikel verwendet. Der Vorteil des Chips besteht darin, daß der Anwender vor Ort den Chip gezielt beladen kann und so zum Beispiel 100 verschiedene Proben aus verschiedenen Quellen auf einen Chip analysiert werden können.

### 2.6.13 Das Mikrospraying

Bei dem kontaktfreien Topspot-Verfahren (Mikrospraying) der *HSG-IMIT* (Villingen Schwenningen, Deutschland) wird die Flüssigkeit durch ein Kapillarsystem zu Mikrodüsen geleitet. Durch einen pneumatischen Druckimpuls erfolgt eine gleichmäßige Abgabe. Mit diesem Verfahren können auf  $3.6 \text{ cm}^2$  ca.  $10^4$  Oligodesoxynukleotide immobilisiert werden.

#### 2.6.14.1 Die Immobilisierung

Für sämtliche oberflächensensitive Methoden in der chemischen oder biochemischen Analytik wird einer der Reaktionspartner auf einer Sensoroberfläche immobilisiert. Wichtig ist bei der Immobilisierung, daß die entsprechende Komponenten auf der Oberfläche in angemessener Konzentration vorliegen und für den Reaktionspartner gut zugänglich sind. Nukleinsäuren können mit Hilfe von physikalischen und chemischen Verfahren an eine feste Oberfläche angebunden werden. Generell kann die Immobilisierung

- adsorptiv,
- kovalent,
- über Protein-Protein-Interaktionen (z.B. Protein-Antikörper) oder
- über Affinitätswechselwirkungen (Biotin-Avidin/Streptavidin, Antigen-Antikörper, Hybridisierung zwischen komplementären Oligodesoxynukleotiden) erfolgen.

Eine Reihe von Trägermaterialien wurden zur Immobilisierung von Oligodesoxynukleotiden für einen Einsatz in der diagnostischen DNA-Applikationen untersucht. Grundsätzlich lassen sich diese verwendeten Materialien in verschiedene Klassen einteilen:

- Nitrocellulose, Nylonmembrane und Filter
- definierte geometrische Teilchen, wie *controlled pore glass* (CPG)

## 2. Allgemeiner Teil

- amorphe Materialien, wie Acrylamidgel, Polystyrolmatrices, Mikrotiterplatten, Harze, TentaGel™, *magnetic beads*
- planare Oberflächen, wie Glas, Goldbeschichtungen oder Silicium-Wafer (Siliciumdioxid, Gold, Titandioxid u.a)

In der Biosensorik werden häufig Silanisierungsreaktionen angewendet, um Oberflächen chemisch zu modifizieren oder eine inerte Oberfläche zu erzeugen, an der keine unspezifischen Wechselwirkungen möglich sind. Um kopplungsfähige Gruppen auf der Oberfläche zu erzeugen, werden Reagenzien wie Aminopropyltriethoxysilan (APTS) oder 3-Glycidoxy-propyltrimethoxysilan (GOPS) verwendet<sup>57</sup>.

Grundsätzlich muß eine hinreichend stabile Anbindung der Proben an die Substratoberfläche gewährleistet sein. Hier kommen die klassischen Verfahren die auch zur Herstellung von Chromatographiematerialien<sup>58</sup> verwendet werden, zum Einsatz.

### 2.6.14.2 Linkersysteme

Für das Anknüpfen von DNA an einen Träger stehen dem Forscher heute eine Reihe an unterschiedlichen Reaktionen zur Verfügung, die sich teilweise jedoch in der Praxis nicht durchgesetzt haben. Als ausgesprochen wichtig für die Immobilisierung, die Durchführung und die Auswertung eines Arrays haben sich Linkersysteme (heterobifunktionale Moleküle) erwiesen. Der verwendete Linker dient zuvörderst als Abstandshalter. Es zeigte sich, daß es von Vorteil ist, wenn zwischen der Chipoberfläche und dem zur Hybridisierung genutzten Oligonukleotid genügend Platz geschaffen wird. Dadurch werden sterische Kollisionen verhindert.

Häufig verwendete Linkersysteme sind:

- Ethylenglykolligomere (PEG), Sequenzen aus Poly-T, Poly-L-Lysin

Mit Hilfe des Linkers erfolgt zum Einen die Verknüpfung mit der Oberfläche und zum Anderen mit der zu immobilisierenden Sonde. Daher handelt es sich bei den verwendeten Linkern, um heterobifunktionale Moleküle.

Verschiedene Forschergruppen haben in den letzten Jahren für die Verknüpfung vielseitige dendrimere Linker entwickelt<sup>59</sup>. Der Wert der ursprünglichen Immobilisierung konnte so auf einen etwa fünffachen Wert gesteigert werden. Da eine zunehmende Oligodesoxynukleotiddichte auf dem Chip die Signale und damit auch die Empfindlichkeit erhöhen sollte, nimmt die Immobilisierung der Sonde einen Schlüsselschritt in der Qualitätssicherung ein. Ein weiterer Ansatz zur Steigerung der

---

<sup>57</sup> A.) G. T. Hermansson, A. Krishna-Mallia, P. K. Smith; **1992** Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, Inc., 1. Aufl., London; B.) R. Polzius, T. Schneider, F. F. Bier, U. Bilitewski; *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 5, 503-514; C.) M. Shoffner, J. Cheng, G. E. Hvichia, L. J. Kricka, P. Wilding; *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 375-379; D.) E. T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundström; *J. Coll. Interf. Sci.* **1991**, 147, 1, 103-118

<sup>58</sup> E. M. Southern, U. Maskos; *J. of Biotech* **1994**, 35, 217-227

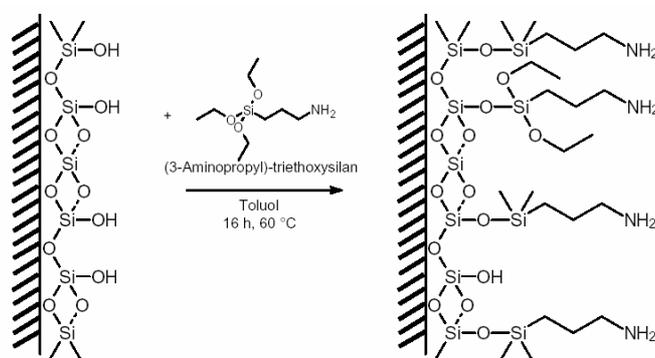
<sup>59</sup> A.) S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäß, G. Burdinski, J. R. Havens, T. J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer; *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30 (21), 4793-4802; B.) M. Beier, J. D. Hoheisel; *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 1970-1977

Beladungsdichte, ist die Verwendung eines Trägermaterials, daß eine dreidimensional Oberfläche aufweist (Verwendung gelbildender Verfahren<sup>60</sup>).

### 2.6.14.3 Prozessierung und Derivatisierung eines Arrays

Die Prozessierung eines Arrays beginnt mit einer intensiven Oberflächenreinigung, um jegliche organische und anorganische Oberflächenverunreinigungen zu entfernen, die zum Beispiel die nachfolgende Silanisierung stören könnten. Außerdem soll eine spätere Wechselwirkung mit den zu untersuchenden Target-Molekülen so unterbunden werden. *Abbildung 35.* zeigt die Funktionalisierung einer Siliciumdioxid-Oberfläche.

Die einheitliche Derivatisierung des Trägers bereitet einigen Herstellern auch heute noch erhebliche Schwierigkeiten. Vorallem eine durchgehende Chargenqualität kann häufig nicht gewährleistet werden.



*Abbildung 35:* Aminofunktionalisierung eines Kieselgelmaterials

Aber nicht nur die Oberfläche, sondern auch die zu immobilisierenden Sonden-Moleküle müssen entsprechend funktionalisiert werden. Dies geschieht entweder während der konventionellen automatisierten Synthese oder während einer PCR Reaktion (Verwendung modifizierter dNTPs). Die Einführung einer chemisch reaktiven Gruppierung (wie die Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Thiol-Gruppe u.a.) oder die gezielte Markierung (5'- und 3'- Modifikationen: Biotin, Fluorescein, Cy3, Cy5 etc.) stellen für den Forscher "in der Regel" kein Problem dar. Die entsprechenden Amidite oder funktionalisierten Oligodesoxynukleotide sind meist käuflich zu erwerben und die benötigten Synthese- und Reinigungs-Protokolle bekannt. Allerdings ist hier zu bemerken, daß die Synthesen bei der Verwendung käuflicher, modifizierter Amidite sehr stark in ihren zu erzielenden Ausbeuten schwanken (Qualitätsunterschiede) können.

Eine wichtige Verknüpfungsgruppe ist die Einführung eines Biotin-Derivates (Vitamin H, Bildung einer Biotin-Streptavidin Verknüpfung;  $K_D$  ca.  $10^{15}$ , die Wechselwirkung ist aufgrund des hohen  $K_D$ 's nicht regenerierbar<sup>61</sup>). All diese Funktionalisierungen

<sup>60</sup> A.) J. Zlatanova, A. Mirzabekov, *Methods in molecular biology Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rampal) Humana Press Totowa, NJ, **2001**, 17-38; B.) G. Yershow, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanova, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, A. Mirzabekov; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4913-4918

<sup>61</sup> A.) M. Wilchek, E. A. Bayer; *Meth. Enzymol.* **1990**, 34, 463; B.) H. J. Watts, D. Yeung, H. Parkes; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4283-4289; C.) N. M. Green; *Avidin – Biotin technology, Methods in Enzymology* **1990**, 51-67, Vol. 184 (Eds. M. Wilchek, E. A. Bayer), Academic Press Inc., San Diego, USA

## 2. Allgemeiner Teil

werden in der Regel am 5'-Ende der DNA durchgeführt, da das 3'-Ende durch das CPG Material oder einen anderen Träger blockiert ist. Es existieren allerdings auch Trägermaterialien, die nach erfolgter Synthese und Abspaltung ebenfalls funktionalisiert vorliegen, z.B. Fluorescein derivatisiertes CPG-Material. Die Syntheseausbeuten sind hier jedoch wesentlich geringer, als bei der entsprechenden 5'-Synthese (die Aufreinigung gestaltet sich problematischer, da auch die bei der Synthese entstehenden Abbruchsequenzen die Modifikation tragen). Für Hybridisierungsassays dürfte die Position der Funktionalisierung unerheblich sein. Andere Assays, bei denen enzymatische Umwandlungen (Polymerase, Ligasen) am trägegebundenen Oligodesoxynukleotid stattfinden müssen, erfordern ein freies 3'-Ende, so daß die Modifizierung intern oder am 5'-Ende erfolgen muß<sup>62</sup>.

Kovalente, elektrophile Gruppen auf der Oberfläche beziehungsweise dem Linker ermöglichen in einem meist einstufigen Prozess eine effiziente, gleichmäßige und stabile Bindung mit einem ebenfalls entsprechendem modifizierten Oligodesoxynukleotid.

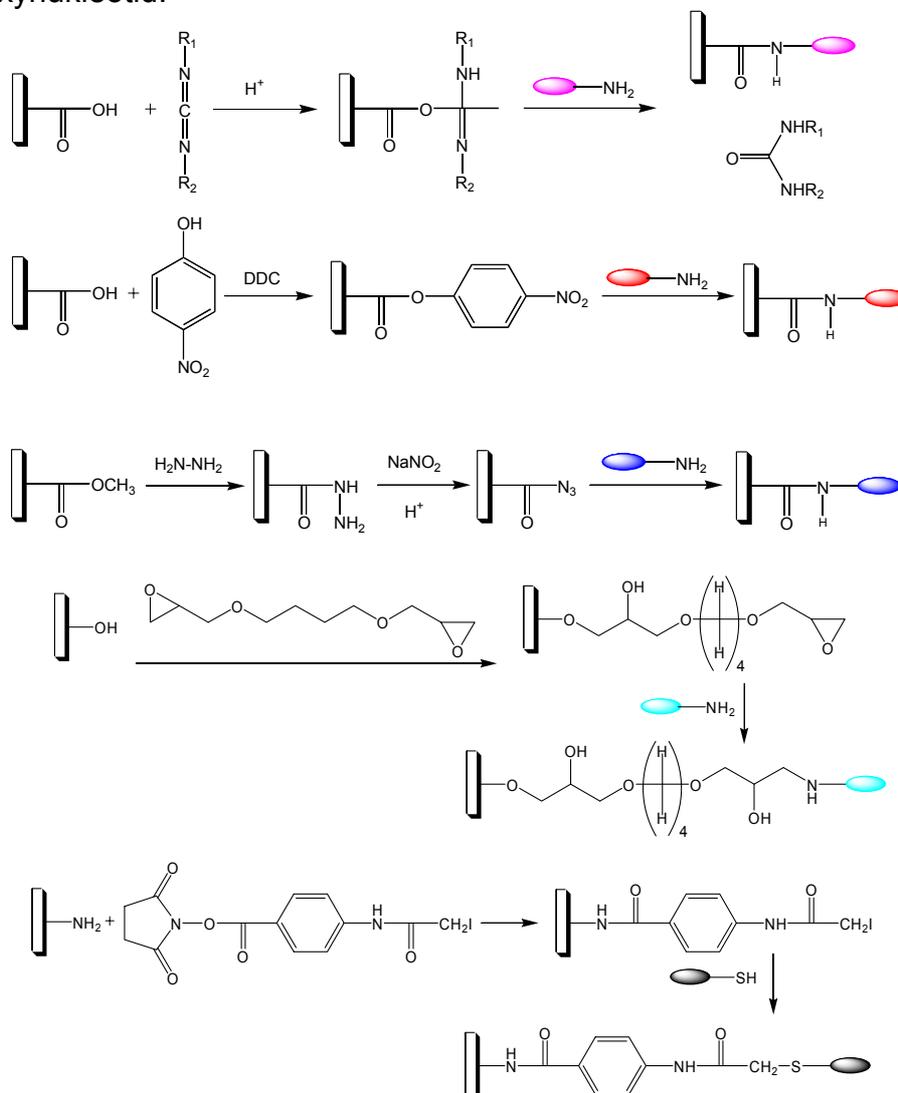


Abbildung 36: Gebräuchliche Bindungsmethode zur kovalenten Immobilisierung

<sup>62</sup> A.) M. Beier, J. D. Hoheisel; *J. of Biotechnology* **2002**, 94, 15-22; B.) M. Beier, A. Stephan, J. D. Hoheisel; *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 2089-2095; C.) M. J. O'Donnell, K. Tang, H. Köster, C. L. Smith, C. R. Cantor; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2438-2443; D.) D. P. Little, A. Braun, M. J. O'Donnell, H. Köster; *Nature Medicine* **1997**, 3 (12), 1413-141

## 2. Allgemeiner Teil

Der eigentlichen Kopplung geht hier häufig eine Aktivierungsreaktion der Festphase oder des Oligodesoxynukleotids voraus (meist durch Aktivatoren aus der Peptidchemie, wie DCC, DDQ u.a.). Im Allgemeinen empfiehlt sich eine Aktivierung der an der Oberfläche gebundenen funktionellen Gruppen, da die Aktivierung der gelösten Komponente häufig zu inter- oder intramolekularen Nebenreaktionen führen kann. Exemplarisch seien in *Abbildung 36* die gängigsten Verfahren schematisch kurz vorgestellt. In den ausgewählten Beispielen erfolgt die Kopplung über primäre Amino- beziehungsweise Thiolgruppen des Liganden an die aktivierten Oberflächengruppen (Carbonsäuren, Hydroxylgruppe, Aminogruppe u.a.).

- Die Aktivierung von oberflächengebundenen Carboxylgruppen ist sowohl mit Hilfe von Carbodiimiden über die Ausbildung eines o-Acylisoharnstoffderivates als auch über die Bildung des p-Nitrophenylesters möglich. Proteine können zum Beispiel über die Aminosäureseitenketten in Gegenwart eines Carbodiimids an einen aminofunktionalisierten Träger gebunden werden. Die Verknüpfung erfolgt jeweils unter Ausbildung einer Amidbindung.
- Desweiteren können Carbonsäureester nach Überführung in die reaktiveren Azide unter Ausbildung einer Amidbindung mit Aminogruppen eines Biomoleküls reagieren.
- Nach der Einführung eines bifunktionellen Epoxids als hydrophilen Spacer gelingt die Anbindung von Aminogruppen an Hydroxylfunktionen unter Ausbildung von sekundären Aminbrücken (Beladungsdichten von 100 fmol DNA/mm<sup>2</sup> können hier erreicht werden).
- Zur Verknüpfung von primären Aminen mit oberflächengebundenen Aminogruppen ist als heterobifunktionelles crosslinking Reagenz N-Succinimidyl-(4-iodoacetyl)-aminobenzoat geeignet, welches nach der Kopplung an die Oberfläche eine Iodoacetamido-Gruppe präsentiert, die wiederum mit einer Thiolgruppe kondensieren kann. Diese Immobilisierungstechnik wurde bereits erfolgreich zur kovalenten Anbindung disulfidmodifizierter Oligodesoxynukleotide nach der Reduktion an Silicium-Wafer angewendet.

### 2.6.15 Die Detektion

Wie erkennt der Untersuchende - sei es ein Arzt, Chemiker oder Pharmazeut - an welche der Tausende von Genabschnitten auf der pfenniggroßen Chipoberfläche seine zu untersuchende DNA gebunden ist? An diesem Problem arbeiten viele Firmen und universitäre Forschergruppen weltweit.

#### 2.6.15.1 Fluoreszenz

Das zur Zeit gängigste Verfahren zur Detektion der gebundenen Target-Moleküle ist das Prinzip der Fluoreszenz. Das Target wird hier mit Hilfe eines fluoreszenten Stoffes markiert. Bindet die DNA durch Hybridisierung an den Chip, kann der Forscher durch die Art (Wellenlänge) und den Ort der Fluoreszenz auf dem Chip erkennen, um welche DNA es sich handelt. Auch eine quantitative Aussage ist hier möglich. Diese Art der Detektion hat die radioaktive und chemoluminente Markierung abgelöst.

#### 2.6.15.2 Fluoreszente Mikrobeads

Das von K. J. Lackner (Universitätsklinik Regensburg) entwickelte Verfahren zeichnet sich durch einen geringen präparativen und finanziellen Aufwand und eine

leichte Anpassung aus. Hier werden die Nukleotide nicht auf Chips aufgetragen, sondern auf Microbeads. Diese sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mit verschiedener Intensität markiert, so daß auf den so unterscheidbaren Beads spezielle DNA-Sequenzen fixiert werden können. Nach der Hybridisierung mit ebenfalls markierter Target-DNA können die Microbeads in einem Durchflußcytometer vermessen werden. Hier gibt es weiterhin in letzter Zeit einige interessante Entwicklungen die zum Beispiel auf der Lichtstreuung von Partikeln beruhen (*Quiagen, Genomic Sciences*).

### 2.6.15.3 Massenspektrometrie

Ein massenspektrometrisches Verfahren, das sich zur Vermessung der DNA-Stücke auf dem Chip eignet, haben C. Cantor und seine Kollegen entwickelt. Beim Beschuß der Chipoberfläche mit dem Laser wird die DNA von der Oberfläche gelöst und die Moleküle werden dann anhand ihrer Flugzeit (Time of Flight-) im Massenspektrometer detektiert. Der Vorteil dieser Methode ist ihre hohe Empfindlichkeit (fmol) und die große Anzahl von Messungen in kurzer Zeit<sup>63</sup>. Die modernste Technologie, die von der Firma *Sequenom Industrial Genomics* (USA) unter den Namen MassARRAY<sup>®</sup> und SpectroCHIP<sup>®</sup> angeboten wird, kann mittels ausgeklügelter DNA-Vervielfältigungsmethodik und MALDI-TOF 3840 Auswertungen in vier Stunden vornehmen, das sind weniger als vier Sekunden pro Probe. Es handelt sich hierbei um eine Komplettlösung, die es dem Forscher erlaubt, zuerst Assays für die PCR automatisch zu entwickeln (MassEXTEND<sup>™</sup>) und anschließend die Proben durch eine automatisierte Pipettiereinheit (SpectroPREP<sup>™</sup>) zu prozessieren.

### 2.6.15.4 Elektrische Detektion

Es handelt sich hier um ein elegantes und schnelles Verfahren, das allerdings einen großen technischen und apparativen Aufwand erfordert. Auf einem Silicium-Chip sind 0.1-0.7 µm große Ultramikroelektroden angebracht, auf denen verschiedene DNA-spezifische Fängermoleküle (Sonden) verankert sind. Bindet Target-DNA an einer spezifisch adressierten Sondenposition auf dem Chip, kann dieser Vorgang qualitativ durch Zweipolimpedanz gemessen werden. Es ist sogar eine quantitative Messung möglich, wenn die Target-DNA vor oder nach der Bindung mit Enzymen markiert wird, die elektrodenaktive Redoxmoleküle produzieren.

### 2.6.16 Dot-Blot-Technik

Es ist die einfachste Methode zur Identifizierung homologer Nukleotidsequenzen. Dabei werden Ziel-DNAs (z.B. aus verschiedenen Organismen) an einem Punkt (dot) auf einer Membran (Oberfläche) fixiert. Eine radioaktive Sonde wird in einer Lösung mit der Membran inkubiert, bindet, wenn vorhanden, an homologe Sequenzen und kann über eine Autoradiographie nachgewiesen werden.

---

<sup>63</sup> A.) M. J. O'Donnell, K. Tang, H. Köster, C. L. Smith, C. R. Cantor; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2438-2443; B.) D. P. Little, A. Braun, M. J. O'Donnell, H. Köster; *Nature Medicine* **1997**, 3 (12), 1413-1416

### 2.6.17 *In situ* Hybridisierung

Hier werden zytologische oder histologische Präparate durch direktes Aufbringen der Hybridisierungslösungen, die spezifisch markierte DNA-Sonden enthalten, analysiert. Die Detektion erfolgt durch den zunehmenden Einsatz von fluorochromen-Sonden und dem Fluoreszenz-Mikroskop. Hier ist eine Einzelbeobachtung oder die Darstellung innerhalb eines Gewebeverbandes möglich und bietet daher eine wesentlich verbesserte Zuordnung der Untersuchungsergebnisse zur detaillierten Topographie des zu untersuchenden Gewebes, der Zelle oder des Chromosoms. Das genomische Hybridisierungsziel ist hier in der Regel die DNA in den Chromosomen. Die spezifische Sequenz der Ziel-DNA kommt dabei im menschlichen Genom entweder einfach (single copy) oder zu mehrfach Tausenden Kopien (repetitive Sequenzen) von kürzeren sich wiederholenden Sequenzen (VNTR- oder STR-Regionen) vor. Die verwendeten Sonden werden dabei je nach Fragestellung ausgewählt. Die Lokalisation und Funktionsuntersuchung der Gene sowie die chromosomale, physikalische Kartierung stehen hier im Vordergrund. Die klinische Anwendung dient vor allem der Diagnosestellung. Untersucht werden somatische und sporadische Keimbahnveränderungen (in der Humangenetik, pränatal und postnatal). Es gibt zum Beispiel einige, nur aufgrund einer spezifischen genetischen Störung definierte, Subklassen von Leukämien. Dies hat große klinische Bedeutung, da sich einige dieser so definierten Subtypen deutlich in ihrem Krankheitsverlauf und Therapieansprechen unterscheiden. Die *in situ* Hybridisierung kann ebenfalls zum Monitoring eines Krankheitsverlaufes eingesetzt werden (FISH-Untersuchung). Zum Nachweis von Punktmutationen oder ähnlichen submikroskopischen Störungen ist die Methode nicht empfindlich genug. Die *in situ* Hybridisierung hat sich bereits im Klinikalltag bewährt und ermöglicht eine gezieltere Therapie.

### 2.6.18 Homogene Detektionsmethoden

Nachweismethoden von Punktmutationen, die auf der Immobilisierung an einer festen Phase beruhen, bergen grundsätzlich die Gefahr unspezifischer Adsorptionen. Daher sind häufig zeitintensive Waschprotokolle notwendig. Vollständig umgehen kann man diese Probleme nur durch homogene Nachweismethoden. Diese sind jedoch konzeptionell wesentlich komplizierter, da das Detektionssignal (z.B. Fluoreszenz) sich als Folge der Bindung zweier Partner verändern muß<sup>64</sup>. Die Signaländerung kann dabei durch die Wechselwirkung zweier Fluoreszenzmarker erfolgen (Quenching). Dieses Prinzip liegt dem TaqMan-Assay<sup>65</sup>, dem Molecular Beacons<sup>66</sup> und dem Primer Extension Assay<sup>67</sup> zugrunde. Als Routineverfahren in der medizinischen Diagnostik findet heute der Oligonukleotide Ligation Assays (OLA) Verwendung<sup>68</sup>.

---

<sup>64</sup> L. E. Morrison; *J. Fluoresc.* **1999**, 9, 187-197

<sup>65</sup> P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7276-7280

<sup>66</sup> S. Tyagi, F. R. Kramer; *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303-308

<sup>67</sup> X. Chen, B. Zehnbauser, A. Gnirke, P. Kwok; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10756-10761

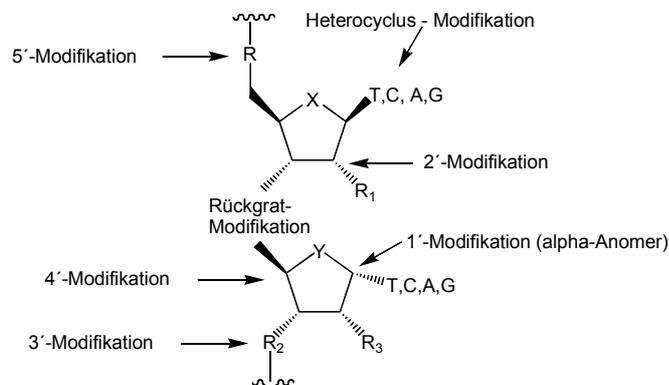
<sup>68</sup> H. Baron, S. Fung, A. Aydin, S. Bähring, F. Luft, H. Schneider; *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1279-1282

## 2.6.19 Verwendung von Nukleosid-Analoga

In den letzten Jahren wurden eine Reihe derivatisierter beziehungsweise nicht-natürlicher Nukleinsäure-Analoga synthetisiert (siehe *Abbildung 37.*) und getestet. Das primäre Ziel ihrer Darstellung ist die Diagnose und Therapie von Krankheiten.

Diese Modifikationen umfassen unter anderem:

- Veränderung der Internukleosidbrücken:  
Phosphordiester  $\Rightarrow$  Methylphosphonate<sup>69</sup>  $\Rightarrow$  Phosphoramidate  $\Rightarrow$  Phosphorthioate<sup>70</sup>  $\Rightarrow$  Hydroxylamine
- Veränderung der Zuckerkomponenten:  
Ribose  $\Rightarrow$  diverse Hexo- beziehungsweise Pentopyranosen  $\Rightarrow$  3'-5'-carbocyclische verbrückte Derivate der 2'-Desoxyribose<sup>71</sup>
- Austausch des Strangrückgrats:  
Polyesterketten auf Basis von Zucker-Phosphat-Einheiten  $\Rightarrow$  Carboxamidketten auf Basis von Aminosäurederivaten wie N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten



*Abbildung 37:* Mögliche Positionen für die Modifikation von Oligodesoxynukleotiden

Im Rahmen des Antisense-Konzeptes mußten die Forscher schon sehr früh modifizierte Nucleotide herstellen<sup>72</sup>. Da sie erkannten, daß der Abbau (durch Enzyme in der Zelle) eines Oligodesoxynucleotids in der Zelle verzögert oder verhindert werden kann, wenn dieses modifiziert eingesetzt wird.

Phosphorthioate zählen zu der ersten Generation, 2'-O-Methyl RNA (OMe) und 2'-O-Methoxyethyl RNA (MOE) werden zur zweiten Generation der Antisense-Moleküle gerechnet. Die dritte Generation beinhaltet die Peptide nucleic acid (PNA), N3'-P5'-Phosphoramidit (NP), 2'-Fluor-Arabino Nucleinsäure (FANA), Locked nucleic acid (LNA), Morpholin Phosphoramidit (MF) und Cyclohexen Nucleinsäure (CeNA).

<sup>69</sup> A.) P. S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman; *Biochemistry* **1979**, 18 (23), 5134-5143; B.) P. S. Miller, N. Dreon, S. M. Pulford, K. B. McParland; *J. Biol. Chem.* **1980**, 255 (20), 9659-9665, C.) K. L. Agrawal, F. Rittina; *Nucl. Acids Res.* **1979**, 6 (9), 3009-3024

<sup>70</sup> A.) E. DeClercq, F. Eckstein, H. Sternbach, T. C. Merigan; *Virology* **1970**, 42, 421-428; B.) F. Eckstein, *Angew. Chem.* **1983**, 95 (6), 431-447

<sup>71</sup> R. Steffens, C. J. Leumann; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11548-11549

<sup>72</sup> J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628-1644

## 2. Allgemeiner Teil

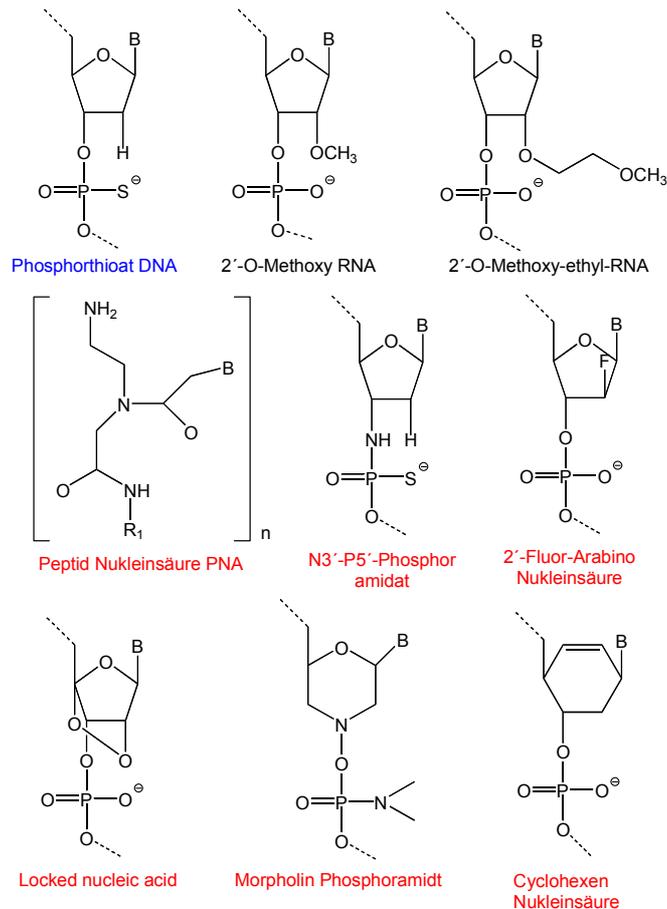


Abbildung 31: Nukleotide der 1ten, 2ten und 3ten Generation (zur Herstellung von Antisense-Oligodesoxynukleotiden)

Aber nicht nur als Antisense-Nukleotide finden diese Bausteine eine Anwendung. Sie werden ebenfalls in vielen Untersuchungen eingesetzt, um prinzipielle Mechanismen zu untersuchen und zu belegen (DNA-Arrays, RNAi-Konzept, Evolutionsbiologie, etc.).

Die Vielfalt der heute zur Verfügung stehenden Modifikationen ist für den Forscher unüberschaubar. Viele Modifikationen werden inzwischen gezielt für eine bestimmte Problematik ausgearbeitet.

### 2.6.19.1 Peptid- oder Polyamid-Nukleinsäuren (PNA)

Hier erfolgt ein kompletter Wechsel der zugrunde liegenden präparativen Arbeiten, weg von der Nukleosidchemie und hin zu der Peptidchemie<sup>73</sup>.

Im Falle des Austausches des Strangrückgrates handelt es sich um nicht-natürliche Peptid- oder Polyamid-Nukleinsäuren (PNA), deren Nukleobasen-tragendes Peptid-Rückgrat jedoch strukturell dem Nukleobasen-tragenden Zucker-Phosphat-Rückgrat natürlicher Polynukleotide ähnlich sein müssen (siehe *Abbildung 39*).

<sup>73</sup> M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1895-1897

## 2. Allgemeiner Teil

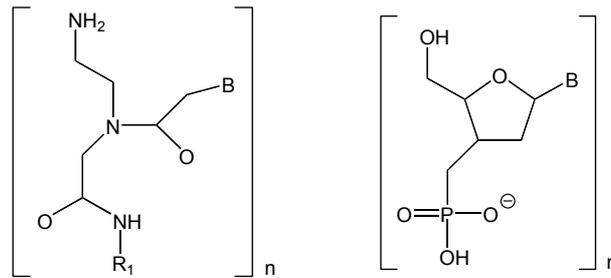


Abbildung 39: Strukturvergleich von PNA und DNA

PNA:DNA- und PNA:RNA-Wechselwirkungen beruhen auf der H-Brückenvermittelten Basenpaarung nach Watson-Crick. CD-Spektren weisen auf ähnliche Paarungsstrukturen wie bei der antiparallelen Basenpaarung (DNA:DNA) hin. Die Geschwindigkeit für die PNA:DNA-Hybridisierung ist mit der von reinen DNA:DNA-Hybridisierungen vergleichbar (ca.  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ). Die Stabilität von PNA:DNA- bzw. PNA:RNA-Hybriden ist jedoch größer als die der korrespondierenden DNA:DNA- bzw. DNA:RNA-Hybride. Dies belegen Schmelzpunktmessungen ( $T_M$ ) mit verschiedenen Oligomeren.

Die experimentell bei pH 7 und 0.11 M Natrium-Ionen ermittelten Daten für die komplementär-antiparallele Hybridisierung eines 15 mers und zweier 10 mere



(Orientierung : PNA = N  $\rightarrow$  C, entspricht DNA/RNA = 5'  $\rightarrow$  3') mit dem korrespondierenden Gegenstrang bei 4  $\mu\text{mol/L}$  für jeweils beide Bindungspartner betragen:

Bindungspartner	Schmelzpunkt in °C
PNA : DNA	69.5
PNA : RNA	72.3
DNA : DNA	53.3
DNA : RNA	50.6
PNA : DNA	51
DNA : DNA	33.5
PNA : DNA	49
DNA : DNA	33.5

Tabelle 6: Vergleich der Schmelzpunkte verschiedener Doppelstränge

Andererseits ist aber die Abnahme der Stabilität eines Duplex im Falle von Fehlpaarungen in der Oligomer-Sequenz, erkennbar am Absinken der Schmelztemperatur, bei PNA:DNA-Hybriden stärker ausgeprägt als bei DNA:DNA-Hybriden, das heißt die Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen korrekten und fehlerhaften Basenpaarungen (Diskriminierungsschärfe) ist bei PNA:DNA-Hybriden ausgeprägter. So sinkt zum Beispiel der Schmelzpunkt für das Hybrid aus



Im Falle von PNA um 10 bis 12 °C, wenn **A** gegen G, C oder T ausgetauscht wird, im Falle von DNA hingegen nur um 5 bis 10°C<sup>74</sup>.

Daher zielen die Bemühungen der Forscher vor allem darauf ab, hochaffine Oligonukleotid-Therapeutika bereitzustellen<sup>75</sup> wie zum Beispiel Antisense-Sonden, Genblocker, Triplexing-Agentien und PNA-Arrays<sup>76</sup>.

### 2.6.19.2 Locked Nucleic Acids LNA

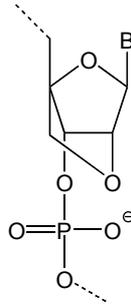


Abbildung 40: Locked Nucleic Acids (LNA)

Durch die Verwendung von Locked Nucleic Acids (LNAs) (siehe *Abbildung 40.*) besteht die Möglichkeit zur Hochdurchsatz-Analytik mit der Fähigkeit, Punktmutationen mit hoher Genauigkeit zu unterscheiden.

Die LNAs besitzen den Vorteil, daß sie bei der Hybridisierung ebenfalls einen hohen Schmelzpunkt mit dem Gegenstrang zeigen. Durch den hohen Schmelzpunkt der LNAs können daher sehr kurze Oligodesoxynukleotide als spezifische „capture probes“ eingesetzt werden. Charakteristisch ist dabei der große Unterschied des Schmelzpunktes ( $\Delta T_M$ ) eines „perfect match“ im Vergleich zu einem Einzelbasen „mismatch“. Diese Eigenschaft von LNAs ermöglicht Hybridisierungen mit einer hervorragenden Unterscheidung von Punktmutationen bei SNPs.

Anstelle von 15-20 Basenpaaren die man bei der Verwendung von DNA in einem Hybridisierungsexperiment (Sonde) benötigt, können LNA-8mere mit gleicher Spezifität angewendet werden (Punktmutationsdetektion).

Es soll hier jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß sowohl die PNA, wie auch die LNA-Bausteine einen wesentlich höheren Preis und eine verminderte Kopplungsausbeute gegenüber den DNA-Bausteinen besitzen. Zudem kann nicht jeder DNA-Synthesizer für die entsprechende PNA-Chemie verwendet bzw. umgerüstet werden.

### 2.6.20 Auswahl laufender Projekte

⇒ Uni Leipzig; Prof. Dr. A. Bader

Entwicklung eines organspezifischen Leberchips zur Durchführung von Expressionsanalysen in organotypischen Leberkulturzellen.

- Durch den Vergleich verschiedener Expressionsprofile soll festgestellt werden, inwieweit kultivierte Hepatozyten der in vivo Situation entsprechen.

⇒ Firma *Hoffmann-La Roche*

Testet Chips, die das gesamte Erbgut von Bakterien, wie *Haemophilus influenza* und

<sup>74</sup> M. Engholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9677-9678

<sup>75</sup> C. Hélène, J. J. Toulmé; *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1049, 99-125

<sup>76</sup> J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel; *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2792-2799

## 2. Allgemeiner Teil

*Streptococcus pneumoniae* enthalten. Ihr Ziel ist es, mit deren Hilfe verwundbare Schlüsselstellen des Bakterien-Stoffwechsels aufzuspüren und so neue Antibiotika zu entwickeln.

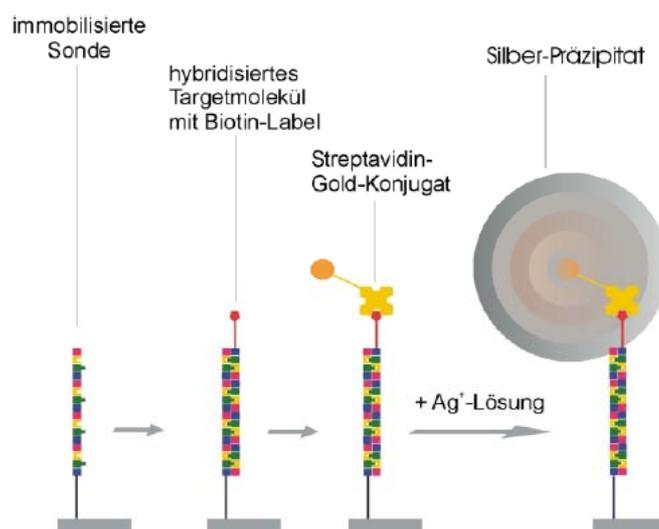
⇒ Firma *Affymetrix*

- p53-Gen (Aktivität des Krebsgens, 60% aller Tumorerkrankungen weisen eine Mutation im p53 auf, 50 Mutationen bekannt, Testempfindlichkeit liegt bei 1 Tumorzelle in 10 000 Normalzellen)
- BRAC-1 und BRAC-2-Chip (breast cancer, Brustkrebsgene-Reparaturenzyme, Kooperation mit *GeneLogic*)
- Gene Chip Human Genome U133A 2.0 Array

⇒ Firma *Clondia Chip Technology GmbH*

Das von Clondia entwickelte ArrayTube Verfahren (siehe *Abbildung 41.* und *42.*) stellt eine Alternative zur DNA-Array-Technologie dar und hilft den Forschern in den Bereichen der Genotypisierung und Mutationsanalyse.

Im Mittelpunkt des ArrayTube (AT) steht ein einfaches Reaktionsgefäß mit einem fest integrierten DNA-Sondenarray im Boden. Alle notwendigen Schritte können direkt in dem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die im AT integrierten DNA-Arrays werden mit maßgeschneiderten Sonden versehen (Beladungsdichten: Immobilisierung 144 spezifische Sonden pro Array; Direktsynthese 10 000 spezifische Sonden pro Array). Zusammen mit dem AT-System wird ein robustes und zugleich hochempfindliches Markierungssystem eingesetzt. Hier werden die spezifisch hybridisierten Targetmoleküle mit Goldpartikeln versehen. Nach der Zugabe einer Silberionen-enthaltenden Lösung (Verstärkungslösung) bildet sich ein Silberniederschlag, der das spezifische Hybridisierungsmuster der untersuchten Probe abbildet (Detektion mit Lesegerät, kolorimetrische Messung). Eine Applikation für das AT-System stellt die Analyse der angeborenen Neigung zu Thrombosen dar. In Deutschland sind 2 von 1 000 Menschen von einer tiefen Bein- oder Beckenvenenthrombose betroffen. Jährlich sterben 40 000 Patienten an den schweren Folgen einer Lungenembolie. Neben den Risikofaktoren (Rauchen, Übergewicht, zeitweise Immobilisierung, Schwangerschaft u.a.) ist die Thrombophilie zu einem erheblichen Anteil genetisch belastet (wahrscheinlich mehr als die Hälfte der Thrombosepatienten).



*Abbildung 41:* Schematische Darstellung der Gold-Silber-Markierung zum Nachweis von spezifisch hybridisierten Targetmolekülen

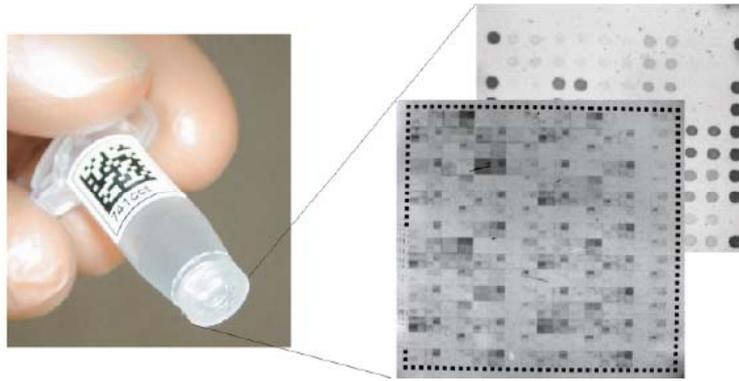


Abbildung 42: Größe des ArrayTube von Clondiag Chip Technology

### 2.6.21 Anwendungen und Ausblicke in der Chiptechnologie

Da das Funktionsprinzip der Biochips auf grundlegenden molekularen Interaktionen (Hybridisierung) beruht, ist ihre Anwendung nicht nur auf die Analyse von DNA beschränkt, sondern kann auch zur Untersuchung anderer Stoffklassen herangezogen werden. Um spezifische Bindungsprofile untersuchen zu können, werden mittlerweile auch Peptide, Antikörper und sogar ganze Zellen auf die Chipoberfläche aufgebracht. Daher stellt die Chiptechnologie aufgrund ihrer Flexibilität und Effektivität mittlerweile ein weit verbreitetes Verfahren (zumindest in der Forschung) in vielen Bereichen der modernen Biotechnologie dar. Sie besitzt das Potential in Zukunft, die heute üblichen molekularbiologischen Verfahren in der Expressionsanalyse, der molekularen Diagnostik und dem biologischen Screening zu ersetzen. Die Genauigkeit und die Zuverlässigkeit der Chipanalyse hängt allerdings im kritischen Maß vom Design der Chipplattform ab. Eine Reihe von Spezialdisziplinen müssen daher zum Gelingen des Chip-Prinzips kombiniert werden. Daher gilt es technische Hürden bei

- der DNA-Synthese
- der Synthese, Markierung und Neuentwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen
- den Immobilisierungstechniken und der Festphasentechnik
- der Lasertechnologie für Detektionssysteme
- der Chip und Wafer-Herstellung
- der Geräteentwicklung
- der Entwicklung der entsprechenden Software zu überwinden.

Dies bedeutet eine effektivere

- Positionierung der Spots,
- Reproduzierbarkeit der Immobilisierung fertiger Sondenmolekülen,
- *in situ* Synthese, die Qualitätskontrolle und
- die Detektion.

Die Chiptechnologie verlangt daher die synergetische Kooperation von Biologen, Biotechnologie-Ingenieuren, Chemikern, Computer-wissenschaftlern, Medizinern und Physikern.

Anwendungsbereich	Zielsetzung
Medikamentenentwicklung	Gezieltes und schnelleres Medikamentendesign
Pharmakologie, Pharmakogenetik	Molekulares Verstehen von Medikamentenwirkung und Nebenwirkung
Qualitätskontrolle	Reinheitsnachweis von synthetischen Oligodesoxynukleotiden und Genen
In-Prozess-Kontrolle	Genetische Veränderungen bei normalen und rekombinanten Zellen während der Fermentation
Diagnostik	Identifizierung von Erregern Bestimmung von Medikamentenresistenzen Von Krankheitsassoziierten Mutationen
Krebsforschung	Identifizierung von Krankheitsgenen Bestimmung des individuellen Krebsrisikos
Mikrobiologie	Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen
Nahrungsmittelsektor	Identifizierung von genetisch veränderten Nahrungsmitteln
Pflanzenzüchtung	Molekulare Marker für Pflanzenkreuzungen
Ökologische Studien	Mikrobielle Kontaminationen von Grundwasser oder Böden
Differenzielle Genexpression	Verstehen von Zellspezialisierung und Zellentartung

Tabelle 7: Anwendungsmöglichkeiten von DNA-Chips (Quelle: Pharmazeutische Zeitung 2001)

Kombiniert mit bereits etablierten Verfahren wie die PCR und immunologischen Nachweisreaktionen verspricht die Chiptechnologie schnelle, vereinfachte und kostengünstigere Laboranalysen. In der Forschung, Forensik, Nahrungsmittelkontrolle, Hygieneanalytik und auch als Routineanwendung bieten sich für sie vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

Der Preis eines Chips, der vorwiegend als Einmalartikel anzusehen ist, variiert von 10 bis 1 000 Dollar. Der Weltjahresumsatz mit Gen-Chips betrug im Jahr 2000 etwa 2.3 Millionen Dollar und wird 2005 schätzungsweise 6 Milliarden Dollar betragen. Eine sehr ausführliche Marktübersicht über die zur Zeit bereitstehenden Geräte bietet ein Artikel in der Zeitung Biospektrum 2.01 Jahrgang 7, Seite 157-164.

## 2.6.22 Weitere Genotypisierungs-Möglichkeiten

Nicht nur mit Hilfe der Chiptechnologie kann eine Genotypisierung erfolgen. Da nicht jeder Forscher oder jede Arbeitsgruppe sich das entsprechende Equipment leisten kann oder will, muß daher an weiteren Methoden gearbeitet werden, die ebenfalls zuverlässig, kostengünstig und automatisiert arbeiten.

### 2.6.22.1 Massenspektrometrie-basierte Genotypisierung

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie erfüllt diese Voraussetzungen. Durch die Kombination mit dem Primer Extension-basierten Verfahren kann sie zur

Genotypisierung eingesetzt werden. Dabei weist sie sogar einige Vorteile gegenüber den Chips auf:

- keine fluoreszenzmarkierten Primer sind erforderlich
- hohe Zuverlässigkeit der Experimente
- automatisierbar
- Multiplex-Ansätze
- niedrige Kosten pro Analyse
- femto-molarer Arbeitsbereich

Die Messungen beruhen hier auf dem Nachweis des Polymorphismus anhand von allelspezifischen Produkten (siehe SNUPE, Kap. 3.7.1.1). Leistungsfähige Verfahren sind:

- GOOD ASSAY, Centre Nationale de Génotypage (Paris, Frankreich),
- MassARRAY, *Sequenom* (San Diego, USA)
- Genopure-Verfahren

### 2.6.22.2 Biacore (Oberflächen-Plasmon-Resonanz, surface plasmon resonance, SPR)

Da SPR-Techniken bei der Untersuchung von anderen Arten der biologischen Erkennung erfolgreich eingesetzt werden (z.B. Biacore Geräten), setzt man auch in die zukünftige Verwendung der SPR-Bildgebung bei Mikroarrays große Hoffnung<sup>77</sup>. Dieses Prinzip würde die Qualitätssicherung der Arrays revolutionieren, da bisher keine direkte Qualitätskontrolle erfolgen kann.

1983 wurde die Oberflächenplasmonresonanz oder Surface Plasmon Resonance (SPR) entdeckt, eine optische Technik basierend auf der Totalreflexion. In den letzten Jahren wurde sie eingesetzt, um makromolekulare Wechselwirkungen zwischen Proteinen, Viren/ Rezeptoren, Proteinen/DNA<sup>78</sup> und DNA/DNA<sup>79</sup> oder PNA-RNA/DNA<sup>80</sup> und andere, markerfrei zu bestimmen. Die Technologie arbeitet in Echtzeit und kommt ohne Molekül-Markierungen aus.

Bei der SPR wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Energie der Photonen des Lichts, auf die Elektronen eines Metalls übertragen werden kann. Die Wellenlänge des Lichtes, bei der eine Übertragung (Kopplung) auftritt, ist charakteristisch für das Metall und die Umgebung, die bestrahlt wird. Tritt Resonanz zwischen der Energie der Photonen und den Elektronen der Metalloberfläche auf, erfolgt ein Energieübergang. Dieser Übergang kann durch Messung der Intensität des von der Metalloberfläche reflektierten Lichtes gemessen werden. Die Resonanzwellenlänge wird absorbiert, während das Licht aller anderen Wellenlängen reflektiert wird. Die Kopplung des Lichts in der Metalloberfläche resultiert in der Bildung eines Plasmons, einer Gruppe angeregter Elektronen, die sich wie ein einziges elektrisches Feld verhalten. Das Plasmon seinerseits bildet ein elektrisches Feld mit einer Ausdehnung von 100 nm aus. Jeder Wechsel der chemischen Zusammensetzung in Reichweite des Plasmonenfeldes resultiert in einer Verschiebung der Wellenlänge des Lichts,

---

<sup>77</sup> J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8044-8051

<sup>78</sup> A.) K. Bondeson, A. Frostell-Karlsson, L. Fagerstam, G. Magnusson; *Anal. Biochem.* **1993**, 214, 245-251; B.) R. Gambari, N. Bianchi, C. Rutigliano, E. Borsetti, M. Tomassetti, G. Feriotto, F. Zorzato; *Int. J. of Oncology* **1997**, 11, 145-149

<sup>79</sup> S. J. Wood; *Microchem. J.* **1993**, 47, 330-337

<sup>80</sup> K. K. Jensen, H. Orum, P. E. Nielsen, B. Nordén; *Biochemistry* **1997**, 36, 5072-5077

## 2. Allgemeiner Teil

die absorbiert statt reflektiert wird<sup>81</sup>. Der Winkel des reflektierten Lichts, bei dem SPR beobachtet wird, ist vom Brechungsindex des Mediums in der Nähe der Sensoroberfläche abhängig. Wird eine Verbindung auf der Sensoroberfläche immobilisiert, so ändert sich der Brechungsindex und damit auch das SPR-Signal, das in RU (Resonanzeinheit) ausgedrückt wird.

Die Grundelemente eines BIACORE-Gerätes sind:

- der Sensor Chips (In einem BIACORE-Chip wird Gold zum Beispiel mit einer 100 nm dicken Schicht von carboxyliertem Dextran modifiziert. Diese hydrophile Oberfläche ist geeignet für die Immobilisierung von Biomakromolekülen.)
- ein Surface Plasmon Resonance (SPR)-Detektor
- und ein spezielles Flußsystem.

Jeder Anwender immobilisiert seine benötigten Bindungspartner eigenständig an der Chipmatrix. Zur Immobilisierung der Liganden auf der carboxylierten Dextranoberfläche wird diese zum Beispiel mit einem Gemisch aus N-Ethyl-N´-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) inkubiert. Die dabei entstandenen NHS-Ester können anschließend zum Beispiel mit den Aminogruppen eines Liganden reagieren<sup>82</sup>. Entsprechende Standard-Prozeduren dauern ca. 45 Minuten. Verschiedene Chip-Oberflächen und Kopplungsstrategien stehen zur Verfügung, unter anderem:

- CM Dextran      kovalente Kopplung von Proteinen (über -NH , -SH, -CHO, -COOH)
- Streptavidin    Immobilisierung biotinylierter DNA, RNA, Peptide, Kohlehydrate
- Nickel-NTA      reversible Adsorption von His-Tag-Proteinen
- Lipid Capture    reversible Adsorption von Lipid-Doppelschichten

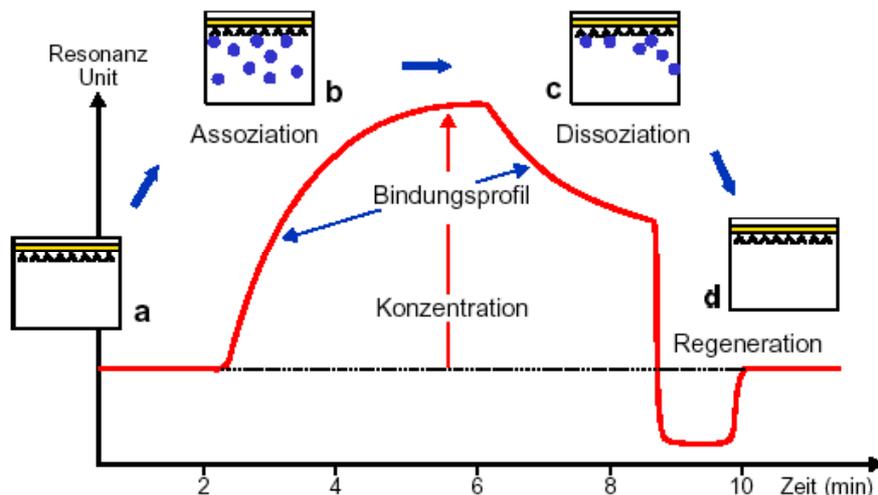


Abbildung 43: Sensorgramm einer Biacore Messung

Die Darstellung der Änderung des Oberflächenresonanzwinkels erfolgt in einem Sensorgramm, wobei die Signaländerung (Relative Response) in Resonanzeinheiten

<sup>81</sup> I. Chaiken, S. Rose, R. Karlsson; *Anal. Biochem.* **1992**, 201, 197-210.

<sup>82</sup> D. J. O'Shannessy, M. Brigham-Burk, K. Peck; *Anal. Biochem.* **1992**, 205, 132-136

(Resonance Units, RU) ausgedrückt wird, die gegen die Zeit verfolgt wird. Dabei entspricht 1 RU einer Konzentrationsänderung von 1 pg/mm<sup>2</sup> Oberflächenprotein. Typische Signale für die Oberflächenanbindung von Proteinen betragen bei Biacore Messungen 100 bis 20 000 RU.

### 2.7 Krebs und Krebsentstehung

Krebs ist eine der häufigsten Erkrankungen des Menschen. Familiär bedingt, durch multiple Mutationen in Onkogenen, ist nach den neuesten Erkenntnissen nur ein geringer Anteil (ca. 25%) der häufigsten Karzinome wie Mamma, Prostata, Kolon und Lunge. Einige Krebsarten können hier allerdings gehäuft auftreten, beispielsweise Brustkrebs und Dickdarmkrebs. Charakteristisch an diesen familiären Erkrankungen ist, daß sie schon im frühen Alter auftreten. Der größte Anteil der sporadischen (nicht-familiären) Tumore tritt dagegen im höheren Alter auf. Dies beruht auf einer langen Latenzzeit nach der Initiation.

Zellen teilen sich in unserem Organismus nicht einfach grundlos. Sie teilen sich dann, wenn ein spezifischer Bedarf nach einer bestimmten Zellart besteht.

Wann weiß der Körper, wann eine Nachproduktion eines speziellen Zelltyps notwendig ist? Unser Körper überzeugt auch hier wieder durch elegante Lösungen. Am Beispiel der Erythrozyten soll hier kurz das auslösende Signal für die einsetzende Nachproduktion dieses Zelltyps dargestellt werden.

Die Nierenzellen „messen“ den Sauerstoff-Partialdruck im Gewebe. Fällt dieser unter einen kritischen Wert, sezernieren die Zellen Erythropoetin. Erythropoetin wird im Blut transportiert und erreicht so das Knochenmark, wo es die Bildung von neuen Erythrozyten ankurbelt. Dieser Regelkreis ist zum Beispiel dafür verantwortlich, daß bei längerem Aufenthalt in großen Höhen der Hämatokrit Wert steigt. An diesem Beispiel wird ein allgemein gültiges Prinzip klar: Proliferation erfolgt nicht einfach aufs Geradewohl, sondern genau geregelt und erst, wenn Bedarf nach neuen Zellen besteht. Dieser Bedarf wird meist von anderen Zellen gemessen und durch ein Signalmolekül denjenigen Zellen mitgeteilt, die durch Proliferation den Bedarf decken können. Wenn sich eine zur Proliferation fähige Zelle dazu entschlossen hat, sich zu teilen, bedeutet das, daß sich der innere Zustand der Zelle verändert. Viele Gene, die in der G0/G1-Phase aktiv waren, müssen abgeschaltet werden, andere dafür angeschaltet werden. Beispiele für Gene, die angeschaltet werden müssen, sind all jene, die zur DNA-Replikation benötigt werden. Bei der Replikation entstehen spontane Fehler. Daher sind Mutationen nicht prinzipiell auf, aus der Umwelt stammende, Mutagene zurückzuführen. Die molekularen Maschinerien für die Replikation und Reparatur arbeiten mit unglaublicher Präzision; aber sie sind nicht perfekt. Durch Imperfektion entstehen etwa 10<sup>-6</sup> Mutationen pro Gen und Zellteilung. Da der Mensch in seinem Leben etwa 10<sup>16</sup> Zellteilungen durchmacht, treffen im Lauf seiner Lebenszeit 10<sup>10</sup> Mutationen jedes einzelne Gen, allerdings in vielen verschiedenen Zellen.

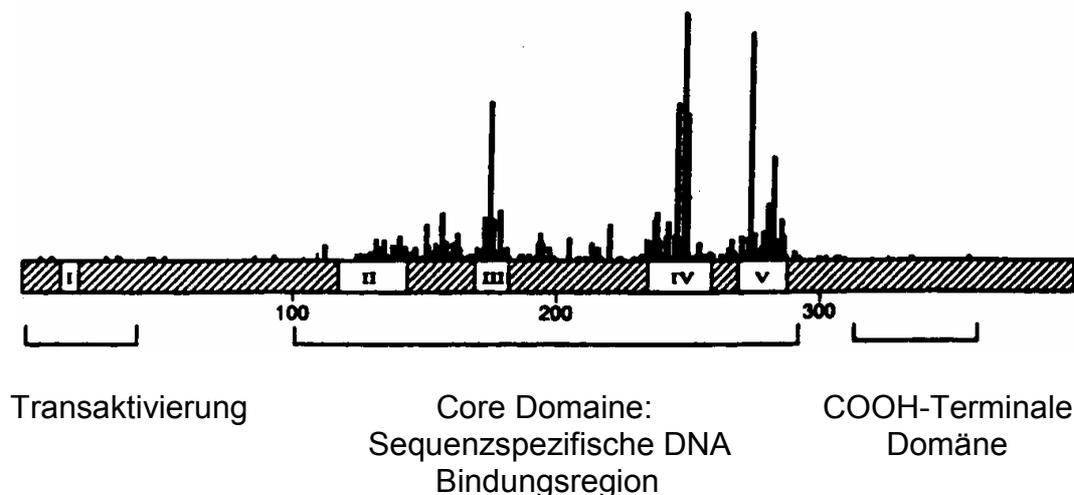
Die Krebsentstehung ist daher ein langwieriger Prozess, der viele Schritte umfasst. Am Anfang steht eine Mutation in einer einzelnen z.B somatischen Zelle, in der Regel in einem Tumorsuppressor-Gen oder einem Proto-Onkogen. Danach vermehrt sich die veränderte Zelle auf Grund einer erhöhten Proliferations-und/oder verminderten Apoptoserate verglichen mit dem normalen Gewebe. Es folgt eine weitere Mutation in einem anderen Gen einer Zelle dieses Klons und dadurch zum Beispiel eine verstärkte Expansion der derart veränderten Zelle. Durch Mutationen in weiteren Genen, wobei auch DNA-Reperaturgene betroffen sein können, wird dieser Prozess weitergeführt bis schließlich eine hoch aberrante, maligne entartete

## 2. Allgemeiner Teil

Zellpopulation vorliegt. Forscher gehen inzwischen davon aus, daß mindestens sechs voneinander unabhängige Mutationen stattfinden müssen (durchschnittlich 10 Jahre), damit ein bösartiger Tumor entsteht. Das Zusammentreffen von sechs seltenen, unabhängigen Ereignissen in derselben Zelle ist am Beginn des Lebens sehr unwahrscheinlich, wird aber mit zunehmendem Alter immer wahrscheinlicher. Die Bildung eines Tumors ist daher ein sehr komplexer Vorgang, den die Forscher auch heute nur partiell verstehen und erklären können. Sie hoffen, mit Hilfe der Mikroarray-Technologie der Frage nachgehen zu können, durch welche Genaktivitätsprofile sich die unterschiedlichen Stadien eines Tumors auszeichnen (vor allem vergleichende Untersuchungen der Genaktivitätsprofile von Patienten mit einer guten oder schlechten Prognose).

Die Untersuchung der Ursachen von Mutationen (Vermeidung der Exposition) beziehungsweise das Erkennen von Promotoren (Vermeidung von Proliferationsfaktoren wie zum Beispiel bestimmte Hormone, Fettleibigkeit etc.) kann zur Prävention beitragen. Denn die bedeutendsten Auslöser von Krebs sind zu jeweils 30-35% das Rauchen und falsche Ernährung.

Das am häufigsten mutierte Gen in der Krebsentwicklung ist vermutlich das p53-Gen. Die Funktionen von p53 sind komplex und noch nicht vollständig verstanden. In Zellen in denen das exprimierte p53-Protein seine Funktion verloren hat, beruht dieser Funktionsverlust in den meisten Fällen auf Punktmutationen in spezifischen Regionen der DNA (Hot-Spot-Region). *Abbildung 44.* zeigt die Mutationsstellen und deren Häufigkeit im p53-Gen auf.



*Abbildung 44:* Schematische Darstellung des p53-Genproduktes, mit den auftretenden Mutationsstellen und deren Häufigkeit<sup>83</sup>.

(Leider ist in der Quelle *Science* **1994**, 265, 346-355 keine Angabe zur Skalierung der y-Achse angegeben. Das heißt, die auftretende Häufigkeit kann hier nur virtuell abgeschätzt werden. Dem interessierten Leser steht eine weitere Quelle *Science* **1993**, 262, 1980-1981 zur Verfügung, in ihr ist eine entsprechende Graphik mit der auftretenden Mutationshäufigkeit abgebildet. In dieser Literaturstelle wurden n = 1361 Substitutionen in der Basensequenz bestimmt, davon entfallen auf das Codon 175 n = 77, Codon 245 n = 55, Codon 248 n = 112, Codon 249 n = 55, Codon 273 n = 89 und Codon 282 n = 42 Substitutionen.)

Dies spricht dafür, daß die dort kodierten Aminosäuren, meist Arginin, von besonderer funktioneller Bedeutung sind beziehungsweise daß das Austauschen

<sup>83</sup> Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich; *Science* **1994**, 265, 346–355

## 2. Allgemeiner Teil

dieser Aminosäuren besonders malignitätsfördernd wirkt. Funktionierendes p53 ist ein „Wächter über die Integrität des Genoms“, wenn p53 in einer Zelle funktionell nicht mehr vorhanden ist, hat das bei auftretenden Fehlern (z.B. Doppelstrangbrüche oder weitere Mutationen), fatale Folgen für die Zelle. p53 ist auch für die Tumorthherapie von großer Bedeutung. Bestrahlung und Chemotherapie induzieren DNA-Schäden. Anscheinend sind diese Maßnahmen um vieles effektiver, wenn der behandelte Tumor noch funktionstüchtiges p53 hat: dieses leitet in den betroffenen Zellen den apoptotischen Prozeß ein. Tumorarten, bei denen p53 intakt ist, sprechen in der Regel gut auf Therapieversuche an.

Es hat sich gezeigt, daß Insertion- und Deletionsmutationen im Tumor-Suppressorgen p53 durch Hybridisierungsassays mit einem Gen-Chip nicht einfach nachzuweisen sind<sup>84</sup>, durch Primerverlängerungsassays dagegen leicht<sup>85</sup>. Daher sollte ein solcher Assay im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden.

Die notwendige Voraussetzung für die Therapie von genetisch bedingten Krankheiten sind Verfahren zur Detektion der zugrunde liegenden Genmutationen.

Dabei kann es sich um drei verschiedene Mutationstypen handeln.

1. Genommutation
2. Chromosomenmutation
3. Punktmutation

Mutationen sind genetische Änderungen der Basensequenz in der Desoxyribonukleinsäure. Beim Zustandekommen einer Mutation innerhalb körpereigener Zellen kann es zum Zelltod (Apoptose) oder einer krankhaften Gewebsänderung kommen, welche häufig die Möglichkeit zur Entstehung eines Tumors birgt. Ebenso kann der Basenaustausch einer Nukleobase (Transition oder Transversion), welcher zu Fehlpaarungen bei der Replikation und Transkription führt, zum Einbau einer anderen Aminosäure (Missense) (siehe *Abbildung 45.*) oder zum Abbruch der Polypeptidsynthese (Nonsense) führen. Da der genetische Code degeneriert ist, kann ein Austausch auch ohne Folgen bleiben. Die Früherkennung von Gendefekten vor allem bei ungeborenem Leben wird immer häufiger zur Diskussion gestellt<sup>86</sup>. In vielen Fällen beruht ein solcher Gendefekt auf der Veränderung einer einzelnen Base und wird dann als Punktmutation bezeichnet. Die Punktmutation ist die häufigste auftretende Mutation und damit der Hauptgrund für genetisch bedingte Variationen. Sie kann verheerende Auswirkungen auf den Gesundheitszustand einer Person haben.

---

<sup>84</sup> F. P. Wikman, M. L. Lu, T. Thykjaer, S. H. Olesen, L. D. Andersen, C. Cordon-Cardo, T. E. Orntoft; *Clin. Chem.* **2000**, 46, 1555-1561, B.) S. A. Ahrendt, S. Halachmi, J. T. Chow, L. Wu, N. Halachmi, S. C. Yang, S. Wehage, J. Jen, D. Sidransky; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 9, 7382-7387

<sup>85</sup> J. M. Shumaker, J. J. Tollett, K. J. Filbin, M. P. Montague-Smith, M. C. Pirrung; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2269

<sup>86</sup> A.) B. Glick, *Molekulare Biotechnologie*, Spektrum Verlag, Heidelberg **1995**; B.) R. J. Trent, *Molekulare Medizin*, Spektrum Verlag, Heidelberg **1994**

## 2. Allgemeiner Teil

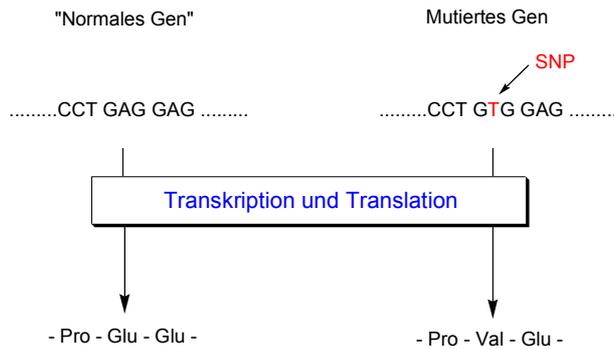


Abbildung 45: Die Abweichung eines einzigen Bausteins der DNA kann zu einer Veränderung in der Genexpression führen.

Bekannte Krankheiten, die auf einer Punktmutation beruhen, sind die Sichelzellenanämie, die Cystische Fibrose und die Phenylketonurie. Auch bei der Tumorbildung spielt diese Art der Mutation eine wichtige Rolle. So liegt unter anderem bei praktisch jeder Krebsform, ob Brust-, Darm-, Leber-, Haut- oder Lungenkrebs zu über 50 % eine Punktmutation des Tumorsuppressor-Gens p53 vor<sup>87</sup>. Ist die Stelle einer potentiellen Punktmutation bekannt, so kann heute mit diversen Verfahren dieser Defekt diagnostiziert werden. Dazu zählen ältere Methoden wie der Southern Blot oder die denaturierende Gradient-Gelelektrophorese. Die zahlreichen neuen Methoden beruhen fast ausschließlich auf einem PCR-Verfahren oder einer Hybridisierungstechnik, die Ergebnisse können dann nur nach dem Einsatz einer Elektrophorese und/oder dem Einführen eines Labels (Fluoreszenzfarbstoff, radioaktiver Kerne <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H) erhalten werden<sup>88</sup>.

### 2.8 DNA-Spaltungsreaktionen

Zwei wichtige Verfahren der Biochemie die Maxam-Gilbert-Sequenzierung und der Edman-Abbau, beruhen auf einer chemischen Spaltungsreaktion eines biologischen Makromoleküls (DNA, RNA und Peptide).

Mit Hilfe der Maxam-Gilbert-Sequenzierung kann die Sequenz einer zu untersuchenden DNA, durch die chemische Spaltung und die Detektion der entstandenen Bruchstücke, bestimmt werden. Dieses Verfahren wurde in der Mitte der 70er Jahre von A. Maxam und W. Gilbert zum ersten Mal angewendet und rasch weiterentwickelt<sup>89</sup>. Die Sequenzierung beruht auf fünf Teilschritten:

- a. der radioaktiven Markierung der zu untersuchenden DNA (<sup>32</sup>P)
- b. der Modifikation einer Base durch die Zugabe von Dimethylsulfat
- c. die Freisetzung der modifizierten Base
- d. die Spaltung des Rückgrats durch Alkali (basisch)
- e. die Detektion im Gel (Autoradiogramm).

<sup>87</sup> A.) E. Culotta, D. E. Koshland Jr.; *Science* **1993**, 262, 1958; B.) C. C. Harris; *Science* **1993**, 262, 1980; C.) J. M. Hall, M. K. Lee, B. Newman, J. E. Morrow, L. A. Anderson, B. Huey, M. C. King; *Science* **1990**, 250, 1684

<sup>88</sup> A.) C. T. Caskey; *Science* **1987**, 236, 1223; B.) C. D. K. Bottema, G. Sarkar, J. D. Cassady, S. Li, C. M. Dutton, S. S. Sommer; *Meth.Enzymol.* **1993**, 218, 388; C.) R. K. Saiki, T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich; *Nature* **1986**, 324, 163; D.) U. Landegren; *Laboratory protocols for mutation detection*; Oxford University Press, New York **1996**

<sup>89</sup> Nobelpreis 1980 für P. Berg, W. Gilbert und F. Sanger für die Herstellung der ersten rekombinanten DNA-Moleküle und DNA-Sequenzierung

## 2. Allgemeiner Teil

Der Edmann-Abbau ermöglicht die Sequenzaufklärung eines Peptids. P. Edmann entwickelte ein Verfahren, bei dem das zu untersuchende Peptid zuerst durch die Zugabe von Phenylisothiocyanat am aminoständigen Ende modifiziert wird. Der aminoterminal markierte Rest, einschließlich der ersten Aminosäure, wird anschließend vom Gesamtpeptid abgespalten (Bedingung – schwach sauer), ohne die Peptidbindung zwischen den übrigen Aminosäureresten zu zerstören. Das um eine Aminosäure verkürzte Peptid wird anschließend wieder dem Edmann Abbau, bis zur vollständigen Sequenzierung, unterzogen. Welche Aminosäure abgespalten wurde, kann mit Hilfe der HPL-Chromatographie festgestellt werden.

Beide genannten Verfahren sind ausgereifte und in der Routineanalytik angewendete Verfahren (robust, automatisiert), zu denen eine Reihe von Übersichtsartikeln existieren, daher möchte ich hier nicht weiter auf die zugrundeliegende Theorie eingehen. Gezeigt werden soll, anhand der beiden Beispiele, daß die chemische Spaltung innerhalb eines Makromoleküls von hohem Interesse ist. Dabei muß allerdings festgestellt werden, daß eine gezielte und spezifische Spaltung einer einzelnen Bindung innerhalb eines Makromoleküls nur durch die Verwendung einer Modifikation, möglich ist. Bei der Behandlung eines unmodifizierten Oligodesoxynukleotids, mit einer entsprechenden Chemikalie, bilden sich eine Reihe von Spaltungsstücken, aufgrund der Ähnlichkeit der Bindungsverhältnisse. Durch die Zugabe von bestimmten Reagenzien ist eine basenspezifische Spaltung (chemische Sequenzierung) innerhalb der DNA möglich.

Spaltungsstelle	Reagenzien
$G > A^{a*}$	DMS, erwärmen bei pH 7; 0.1 M Alkali bei 90°C
$A > G^{a*}$	DMS + Säure/Alkali
$C + T^a$	Hydrazin bei 20°C
$C^a$	Hydrazin + 2 M NaCl
$G^b$	DMS
$G + A^b$	Säure
$G + T^b$	Hydrazin
$C^b$	Hydrazin + Salz
$A > C^b$	NaOH
$G > A^b$	DMS Erwärmen bei pH 7
$G^c$	Methylenblau
$T^c$	Osmiumtetroxid
$T \gg G, C^{d,e,f}$	$10^{-4}$ M $KMnO_4$ in Wasser
$C^d$	Hydrazin:Wasser 3:1 (v:v); 5 M Hydrazin x Essigsäure
$C^{d,e}$	3 M Hydrazin – Salzsäure in Wasser, pH 6
$T > G \gg A, Gg$	1 M Cyclohexylamin in Wasser + UV Bestrahlung
$T^h$	1 M Spermin in Wasser + UV Bestrahlung
$G > T^h$	1 M Ethylamin in Wasser + UV Bestrahlung
$T^i$	0.5 M $NaBH_4$ in Wasser, pH 8 – 10
$T \gg C^{i,j}$	2 – 3 M Wasserstoffperoxid in Carbonat-Puffer, pH 9.6
$C^j$	2 – 3 M Wasserstoffperoxid in Carbonat-Puffer, pH 8.3 oder 7.4
$G^{c,k}$	0.1 Methylenblau + Sichtbares Licht
$G^{l,t}$	4% DMS in Formiat-Puffer, pH 3.5
$G \gg C^m$	0.3 Diethylpyrocarbonat in Kakodylat-Puffer, pH8, 90°C
$A + G^m$	0.3 Diethylpyrocarbonat in Kakodylat-Puffer, pH8, 90°C

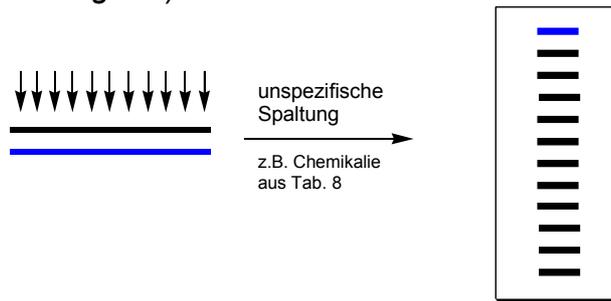
## 2. Allgemeiner Teil

A + G <sup>n,f</sup>	60 – 80%ige wässrige Ameisensäure
A + G <sup>e</sup>	Citrat-Puffer, pH 4, 80°C
A + G <sup>o</sup>	2-3% Diphenylamin in 66%iger Ameisensäure
G <sup>p</sup>	0.5% DMS in 50 mM Kakodylat-Puffer, pH8
A + G <sup>p</sup>	2% Diphenylamin in 66%iger Ameisensäure
C + T <sup>p</sup>	Hydrazin – Wasser 7:4 (v/v)
A <sup>q</sup>	K <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> bei pH 2
Bei der Kennzeichnung <sup>a-q</sup> handelt es sich um weitere Beschreibungen zur Reaktionsdurchführung	

Tabelle 8: Chemische Sequenzierung

Die *Tabelle 8.* gibt einen Überblick über die gängigen Reagenzien und deren bevorzugtes Spaltungsmuster wieder, es handelt sich hierbei um eine Übersicht aus einem Artikel von L. T. C. Franca<sup>90</sup>.

Wie *Tabelle 8.* zeigt, sind die Möglichkeiten der Spaltung sehr vielfältig. Eine gezielte Bindungsspaltung durch eine „einfache“ bzw. gängige Chemikalie an einer spezifischen Bindung im Oligodesoxynukleotid wäre wünschenswert. Bei der Behandlung eines Oligodesoxynukleotids mit den in *Tabelle 8.* genannten Chemikalien, erfolgt die Spaltung an der jeweils aufgeführten Base in der Sequenz beliebig oft, dabei entstehen viele Bruchstücke. In einem Gel ergibt sich folgendes Spaltungsmuster (*Abbildung 46.*).



*Abbildung 46:* Die unspezifische Spaltung eines DNA-Doppelstranges durch die Zugabe einer entsprechenden Chemikalie aus *Tabelle 8.*

Die nichtenzymatische Hydrolyse des Phosphordiester-Rückgrats kann ebenfalls durch die Verwendung von Cu(II), Zirconium(IV)<sup>91</sup>- und Cer(IV)-Komplexen (Reduktionsempfindlichkeit bei molekularbiologischer Anwendung problematisch) erfolgen.

Oligodesoxynukleotide können neben Chemikalien auch durch die Verwendung von Enzymen (z.B. Restriktionsenzyme, endo- und Exonukleasen u.a.) gespalten werden. Die Spaltung mit Hilfe von Restriktionsenzymen erfolgt sequenzspezifisch (4-8 bp Erkennungssequenz, es handelt sich meist um Palindrome). Die Verwendung von Nukleasen führt zum vollständigen Abbau der DNA, diese Möglichkeit nutzt man zum Beispiel bei einem enzymatischen Verdau (Detektion per RP-HPLC) um die Zusammensetzung einer Oligodesoxynukleotid-Sequenz festzustellen. Es handelt sich hierbei um ein relevantes Verfahren um den Einbau eines modifizierten Nukleotids in eine DNA nachweisen zu können. Die Verwendung natürlicher Enzyme

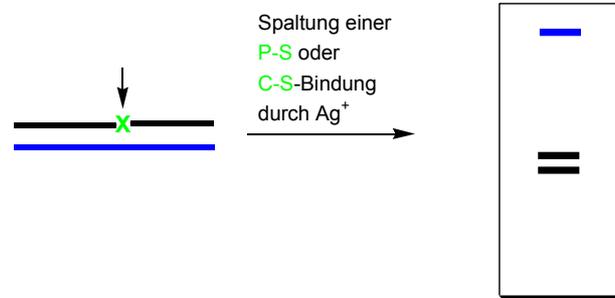
<sup>90</sup> L.T.C. Franca, E. Carrilho, T. B. L. Kist; *Quart. Rev. Biophysics* **2002**, 169-200

<sup>91</sup> R. Ott, R. Krämer; *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2064

## 2. Allgemeiner Teil

wird durch deren Sequenzspezifität, ihrer Größe und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Salzen stark eingeschränkt.

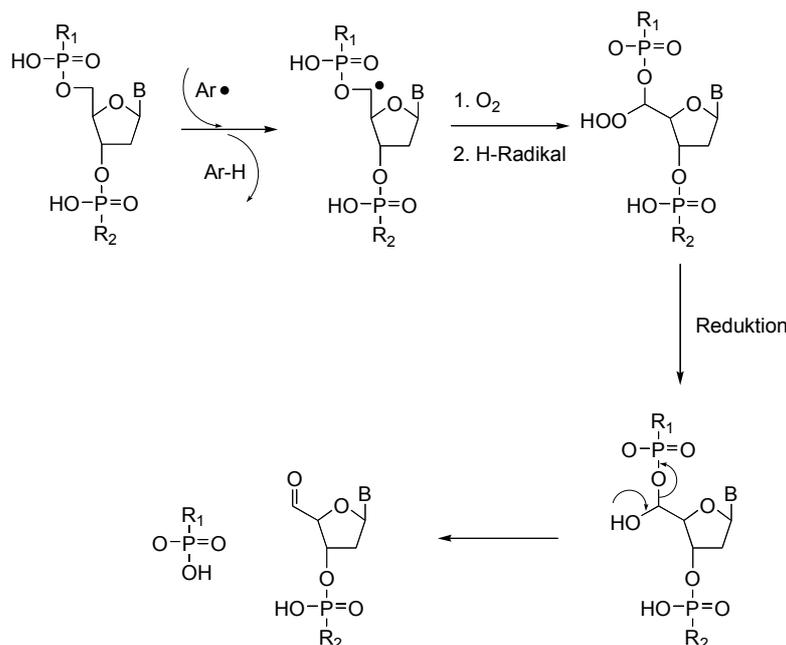
Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte P-S-Bindung bzw. C-S-Bindung stellt eine vielversprechende Möglichkeit für die Erzeugung einer spezifischen Spaltungsstelle innerhalb der DNA dar. Hier erfolgt eine Spaltung durch Schwermetallionen nur an den Positionen innerhalb des Oligodesoxynukleotids, die durch eine 5'-O-P-S-C-3' (im Rückgrat) oder eine C-S-Bindung modifiziert wurden (*Abbildung 47.*).



*Abbildung 47:* Gezielte DNA-Spaltung durch die Verwendung einer Modifikation (X = P-S oder C-S – Bindung)

### 2.8.1 Radikalische DNA-Spaltung

Eine weitere Möglichkeit der DNA-Spaltung beruht auf dem Einsatz von Radikalen. Allgemein bekannt sind hier die durch Umweltbedingungen (Bsp. Ozonschicht, Abgase – Stickoxide etc.) in der DNA auftretenden Mutationen bzw. Strangbrüche. Verschiedene Forschergruppen haben sich diesen Mechanismus, der radikalischen DNA-Spaltung, für die Synthese von Antibiotika-Derivaten zum Vorbild genommen. Die Wirkung der Endiin-Antibiotika (z.B Neocarzinostatin) beruht auf der Abstraktion eines 5'-H und dem dadurch resultierenden Strangbruch (siehe *Abbildung 48.*). Etwa 80% der Wirkung des Neocarzinostatin ist auf diesen Mechanismus zurückzuführen.



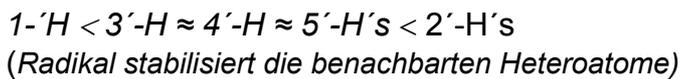
*Abbildung 48:* Radikalische DNA-Spaltung durch H-5'-Abstraktion

## 2. Allgemeiner Teil

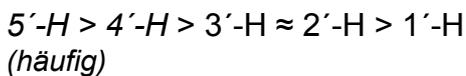
Die Wasserstoffatome der Desoxyribose werden je nach Position mit einer sehr unterschiedlichen Effizienz durch ein Radikal abstrahiert. Es können sogar Unterschiede in der Abstraktionseffizienz eines H-Atoms ausgemacht werden, wenn man zum Einen ein Nukleosid und zum Anderen ein B-DNA-Strang untersucht werden<sup>92</sup>.

Abstraktionseffizienz:

a.) Nukleosid mit freier Desoxyribose



b.) B-DNA-Doppelhelix



Die radikalische Spaltung kann ebenfalls durch  $\gamma$ -Strahlung, durch die Fenton-Reaktion<sup>93</sup>, andere Naturstoffe wie z.B. Bleomycin A<sub>2</sub><sup>94</sup>, Dimethylpyrimidoblastamsäure<sup>95</sup>, Calicheamicin<sup>96</sup>, Elsamicin, Esperamicin A<sub>1</sub><sup>97</sup> und verschiedener Chinoliziniumderivate<sup>98</sup> erfolgen

Nach H. Sugiyama<sup>99</sup> und F. Wetterich<sup>100</sup> spielen die C-1' und C-2'-Radikale im DNA-Strangbruch keine entscheidende Rolle. Eine  $\beta$ -Phosphatelimination ist daher auf die Bildung eines C-4'-Radikals zurückzuführen. Ebenfalls besitzt die Base einen entscheidenden Einfluß auf den aeroben Strangbruch. Sowohl bei der Verwendung von Neocarcinostatin, wie auch der radikalischen Spaltung von Nukleotiden und Dimeren, folgt der  $\beta$ -Phosphatelimination eine Hydrolyse der Base. Diese scheint sowohl geschwindigkeitsbestimmend für den gesamten Spaltungsprozeß zu sein, wie auch die prozentuale Produktbildung zu bestimmen. Dabei konnte folgende Reihenfolge für die Basenhydrolyse festgestellt werden.



Dies bedeutet, daß die Base T schon im neutralen Milieu hydrolysiert, während für die Base C, die Hydrolyse erst durch die Zugabe einer 2 M HCl-Lösung stattfindet. In tierischen und menschlichen Zellen konnte festgestellt werden, daß 40 – 50 Doppelstrangbrüche innerhalb einer Zelle, für diese den Zelltod bedeuten. Es besteht jedoch innerhalb der Zelle die Möglichkeit, einen Einzelstrangbruch mit Hilfe einer Enzymkaskade zu reparieren, falls der komplementäre Strang noch intakt ist. So daß auf die Weise ein Doppelstrangbruch vermieden werden kann.

<sup>92</sup> W. K. Pogozelski, T. D. Tullis; *Chem. Rev.* **1998**, 98 (3), 1089-1108

<sup>93</sup> Fenton-Reaktion:  $\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}(\text{EDTA})^{2-} + \text{H}_2\text{O} + \text{OH}\bullet$

<sup>94</sup> G. H. McGall, L. E. Rabow, G. W. Ashley, S. H. Wu, J. W. Kozarich, J. Stubbe; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4958

<sup>95</sup> Boger; *Angew. Chem.* **1999**, 470

<sup>96</sup> K. C. Nicolaou; *J. Med. Chem.* **1996**, 2103

<sup>97</sup> B. H. Long, J. Golik, S. Forenza, B. Ward, R. Rehfuß, J. C. Dabrowiak, J. J. Catino, S. T. Musial, K. W. Brookshire, T. W. Doyle; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 2

<sup>98</sup> Katja Faulhaber, Dissertation, Bayrische Julius-Maximilians Universität Würzburg, **2003**

<sup>99</sup> H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, K. Fufimoto, I. Saito; *J. Am Chem. Soc.* **1993**, 115, 4443

<sup>100</sup> F. Wetterich, Dissertation, Universität Basel, **1994**

## 2.8.2 Photochemie

Mit Hilfe von photolabilen Schutzgruppen und photolabilen Linkern ist die gezielte Synthese oder Spaltung einer Bindung möglich.

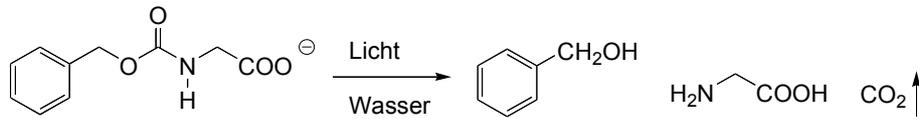


Abbildung 49: Photoreaktion von N-Benzyloxycarbonylglycin

Die erste mit einer Schutzgruppe versehene Substanz ist das von J.A. Barltrop und P. Schofield 1962 untersuchte N-Benzyloxycarbonylglycin.<sup>101</sup> (Abbildung 49.).

Aber nicht nur photolabile Schutzgruppen und Linker sind heute für die Forschungsgruppen in den Laboren von Interesse. B. Armitage beschreibt in einem Übersichtsartikel<sup>102</sup> (Photocleavage of Nucleic Acids) die Möglichkeit, Nukleinsäure spaltende photolabile Reagenzien (sogenannte „Photonucleasen“) herzustellen und diese auf ihre potentielle Verwendung als Medikamente hin zu testen. Dieser Ansatz könnte sich vor allem bei der Behandlung von Krebs als eine erfolgsversprechende Behandlungsalternative herausstellen. Einen interessanten Ansatz stellt hier die Substanz Porifmer (Handelsname Photofrin) dar. Es handelt sich hierbei um ein Gemisch aus Dihaematoporphyrinethern oder -estern. Die Substanz verstärkt die Empfindlichkeit gegenüber einer Bestrahlung mit Laserlicht (630nm). Unter ihrem Einfluß wird bei der Bestrahlung vermehrt Singulett-Sauerstoff gebildet, der toxisch auf das entsprechende Gewebe wirkt. Porifmer soll sich nach intravenöser Applikation im Tumorgewebe anreichern. Die Substanz ist induziert zur Behandlung von nichtkleinzelligen endobronchialen Frühkarzinomen, die einer chirurgischen oder radiotherapeutischen Behandlung nicht zugänglich sind. Sie verursacht u.a. ernsthafte pulmonale Nebenwirkungen wie respiratorische Insuffizienzen, Pleuraerguss, Lungenblutungen, Bronchospasmus, Lungenembolie und Pneumonie. Es handelt sich um eine Reservesubstanz, deren therapeutischer Stellenwert nicht geklärt ist<sup>103</sup>.

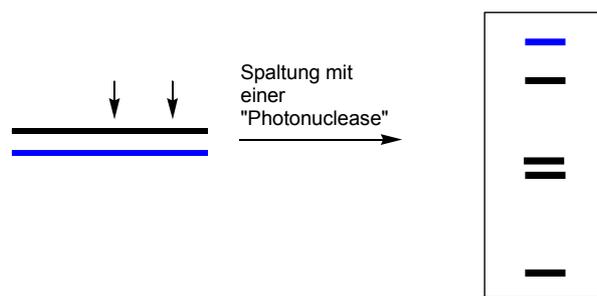


Abbildung 50: DNA-Spaltung mit Hilfe einer sogenannten „Photonuclease“

Das Prinzip, auf dem diese Arbeit beruht, baut auf der Theorie des Antisense-Konzeptes<sup>104</sup> auf. Allerdings erfüllen die bisher untersuchten Verbindungen die

<sup>101</sup> J.A. Barltrop, P. Schofield; *Tetrahedron Letters* **1962**, 16, 697-699

<sup>102</sup> B. Armitage; *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1171-1200

<sup>103</sup> Pharmakologie/Toxikologie systematisch **2002**, UNI-MED (Klinische Lehrbuchreihe, ISBN 3-89599-148-1

<sup>104</sup> J. Kurrek; *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628-1644

## 2. Allgemeiner Teil

Kriterien, die an sie als photospaltende Nucleasen gestellt werden, nicht. Diese sind eine

- katalytische Aktivität und
- die direkte Reaktion mit der DNA.

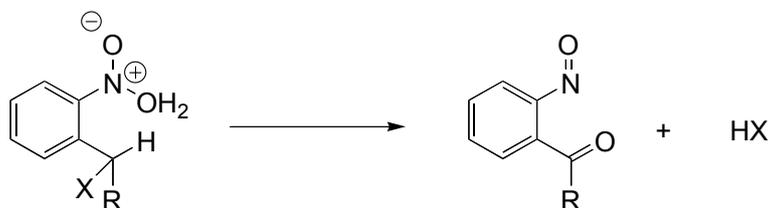
Die meisten der bisher untersuchten potentiellen photospaltenden Reagenzien initiieren eine Reaktionsabfolge (Oxidation des Zucker- oder des Basebausteins – meist Guanin), die als Endprodukt die DNA-Spaltung bewirkt. Dabei generieren sie reaktive Zwischenprodukte, wie Radikale (Hydroxyl), Carbene und Carbokationen. Die dabei entstehenden Zwischenprodukte müssen jedoch häufig in einer weiteren Reaktion, zum Beispiele durch die Zugabe von Piperidin (DNA) oder Anilin (RNA), weiter umgesetzt werden, um den endgültigen Strangbruch zu erzielen.

Die Detektion der DNA-Spaltung durch photospaltende Reagenzien erfolgt mit Hilfe der Gelelektrophorese (PAGE) (siehe *Abb. 51*) und der Verwendung von gelabelter DNA. Wird gleichzeitig eine chemische Sequenzierung nach Maxam-Gilbert durchgeführt, kann durch den Vergleich der Gele eine Aussage über die bevorzugten photolabilen Spaltungsstellen in der zu untersuchenden DNA gemacht werden. Bei Verwendung eines hochauflösenden Gels, sind sogar Aussagen zu dem eventuellen Spaltungsmechanismus möglich.

Eine „Photonuclease“ soll die DNA an einer speziellen Stelle (sequenzspezifisch) spalten (siehe *Abb. 50*), dies ist nur möglich, wenn das Reagenz eine bevorzugte Position innerhalb der DNA angreift.

### 2.8.2.1 Photoreaktionen von Nitrobenzyl-Derivate

Als photolabile Schutzgruppen kommen vor allem Nitrobenzylderivate zum Einsatz. Bei der Photoreaktion von Nitrobenzylderivaten entstehen Nitrosoketone oder Nitrosoaldehyde (wie *Abbildung 51* zeigt).



*Abbildung 51*: Photoreaktion eines Nitrobenzylderivats

Die zu schützende Substanz X wird dabei freigesetzt. Eine Vielzahl von funktionellen Gruppen können auf diese Art geschützt werden:

- Alkohole<sup>105</sup>
- Aldehyde<sup>106</sup>
- Amide<sup>107</sup>
- Amine<sup>108</sup>
- Carbonsäuren
- Thiole

<sup>105</sup> P. Collins, H. Eder; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 5, 927-931

<sup>106</sup> D. Gravel, S. Murray, G. Ladouceur; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1228-1229

<sup>107</sup> G. F. Miknis, R. M. Williams; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 536-547

<sup>108</sup> A.) G. M. Coppola; *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, 23, 223-224; B.) A. Rahman, A. A. Hattaba; *Indian J. Chem. Sect. B* **1987**, 26, 987-988

## 2. Allgemeiner Teil

Die Geschwindigkeit der Photoreaktion ist abhängig von dem Rest R, der Abgangsgruppe, dem Lösungsmittel und dem pH-Wert. Das Absorptions-maximum kann durch verschiedene Lösungsmittel in einem Bereich von ca. 200 nm (in Hexan) bis zu 450 nm (in Triethylamin) verschoben werden. Der genaue Mechanismus der Photoreaktion ist bis heute nicht geklärt.

Der von D. Gravel, R. Giasson und anderen vorgeschlagene Abspaltungsmechanismus wurde lange als richtig angenommen<sup>109</sup> (Abbildung 53.). Bei der photochemischen Anregung handelt es sich um einen  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang. Der gebildete angeregte Singulett-Zustand geht innerhalb weniger Picosekunden in den Triplett-Zustand über und die Verbindung reagiert unter intramolekularem Wasserstoff-Transfer zu einer Acinitroverbindung. Lange Zeit gingen die Forscher davon aus, daß diese Reaktion nur vom  $T_1^*$ -Zustand ausgeht. Dies konnte jedoch durch die Verwendung von Triplettquenchern widerlegt werden. Allerdings konnte die Reaktion innerhalb des Experiments nicht vollständig gequenchet werden. Es müssen daher, neben dem Mechanismus über den Triplettzustand, noch weitere Reaktionsmechanismen existieren.

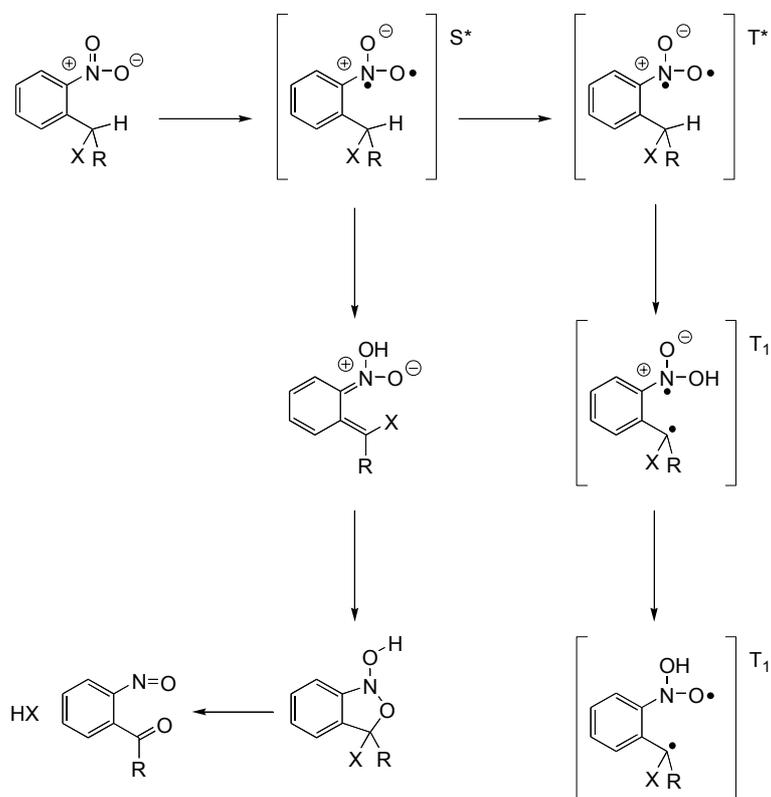


Abbildung 52: Mechanismus der Photoreaktion von o-Nitrobenzylderivaten

Das in *Abbildung 52*. postulierte cyclische Zwischenprodukt konnte bisher noch nicht experimentell nachgewiesen werden. Der hier gezeigte Mechanismus kann ebenfalls nicht alle beobachteten experimentellen Daten erklären (z.B den Zerfall des *aci*-Nitrointermediats und die pH-Abhängigkeit). Daher legen semi-empirische und ab-initio Rechnungen den in *Abbildung 53*. beschriebenen Mechanismus nahe.

<sup>109</sup> A.) R. W. Yip, Y. X. Wen, D. Gravel, R. Giasson, D. K. Sharma; *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 6078-6081; B.) C. Kosmidis, K. W. D. Ledingham, H. S. Kilic, T. McCanny, R. P. Singhal, A. J. Langley, W. Shaikh; *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 2264-2270

## 2. Allgemeiner Teil

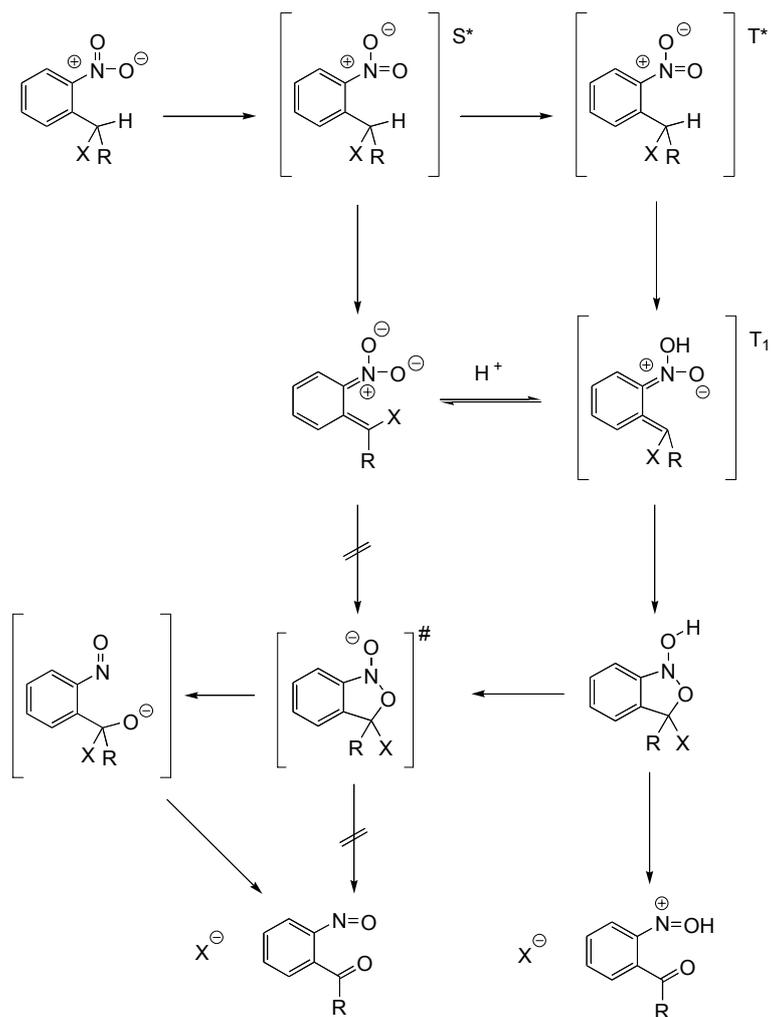


Abbildung 53: Mechanismus der Photoreaktion von o-Nitrobenzyl-Verbindungen über das Z-Isomer des aci-Nitrointermediates<sup>110</sup>

<sup>110</sup> K. Schaper, D. Dommaschke, S. Globisch, S. A. Madani-Mobarekeh; *J. of Information Recording* **2000**, 25, 539-554

#### 3.0 Spezieller Teil

#### 3.1 Allgemeines zur Entwicklung des Sonden-markierten Assays

Derzeitige Herausforderungen in der Chiptechnologie sind:

• eine verbesserte und vereinfachte Probenvorbereitung (Target)
• eine aussagekräftige Kontrolle bzw. Qualitätskontrolle der verwendeten Sequenzen (einschließlich entsprechend gestalteter Kontrollexperimente)
• ein hoher Reinheitsgrad der Proben (Aufreinigung) oder eine erhöhte Kopplungsausbeute bei der <i>in situ</i> Synthese
• eine stabile und reproduzierbare Bindung der Probenmoleküle (Target) an die Substratoberfläche (Immobilisierung)
• eine Kontrolle der Oberflächenbeschaffenheit des eingesetzten Trägers (minimale Eigenfluoreszenz, maximale Anzahl gut zugänglicher und definierter Bindungstellen)
• stringente Hybridisierungseigenschaften für alle Sonden
• eine einfache und aussagekräftige Detektion
• eine entsprechend sichere Software für die Auswertung
• die Durchführung zeitabhängiger Untersuchungen, die die Messung kinetischer Parameter (Assoziation und Dissoziation der Wechselwirkungspartner) ermöglichen und so zur Charakterisierung der Wechselwirkung und zur Kalibrierung genutzt werden können
• die Durchführung von Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen zur Optimierung der Experimente
• die Bereitstellung vorkonfektionierter und leicht regenerierbarer Chips

#### 3.2 Stand der Forschung

In einer Kooperation mit der Firma *Clondiag Chip Technology* aus Jena sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf einem Sonden-Array entwickelt werden, bei dem auf die Markierung der Targetmoleküle verzichtet werden kann.

Der prinzipielle Aufbau eines Arrays und die Durchführung eines Assays wurden bereits im Allgemeinen Teil (Kapitel 2.6.5 bis 2.6.14) beschrieben. Hier soll jedoch auf die Problematiken solcher Testsysteme eingegangen werden, die innerhalb eines solchen Assays auftreten können. Zum Nachweis der Wechselwirkung

zwischen Target und Sonde werden, wie im Allgemeinen Teil Kapitel 2.6.14 und 2.6.15 beschrieben, eine Vielzahl von Verfahren eingesetzt.

#### 3.2.1 Detektionsverfahren

Dabei sind die Fluoreszenz-basierten Verfahren, bei denen die Targets vor, nach oder im Verlauf der spezifischen Interaktion mit den Sonden mit fluoreszierenden Markern versehen werden, die Bekanntesten. Im Vergleich zur radioaktiven Markierung weisen sie allerdings eine etwa 100-fach geringere Sensitivität auf. Trotzdem werden diese Assays aufgrund ihrer hohen Ortsauflösung und eines geringen technischen Aufwandes eingesetzt. Hier muss jedoch festgestellt werden, daß die Markierung der einzelnen Target-Sequenzen (Probenmaterial) mit einer sehr unterschiedlichen Effizienz gelingt. Die auf einer Markierung des Targets beruhenden Nachweisverfahren weisen die gemeinsamen Nachteile auf, daß sie sehr schwer standardisierbar sind und die Einführung einer Markierung notwendig ist. Es sind bereits Verfahren zur Detektion von molekularen Wechselwirkungen bekannt, bei denen auf eine Markierung des Targets verzichtet werden kann, die Wichtigste ist dabei die Sandwich-Hybridisierungs-Methode<sup>1</sup>. Ebenfalls angewendet werden die SPR (Biacore) Technologie<sup>2</sup>, die Gitterkoppler Technologie<sup>3</sup> und die Reflektometrische Interferenzspektroskopie<sup>4</sup>, die bisher allerdings nur für Einkanalmessungen verwendet werden können (Biosensoren, optische Detektoren). Bei allen drei genannten Verfahren erfolgt der Nachweis einer Anlagerung von Biomolekülen an einer mit Rezeptoren immobilisierten Oberfläche durch die Detektion der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit eines Oberflächen-Plasmons (SPR) oder geführter Lichtwellen (Gitterkoppler und Interferometer). Da deren apparativer Aufwand sehr kompliziert ist, sind sie nicht geeignet eine Vielzahl unterschiedlicher Wechselwirkungen auf einem Sonden-Array parallel zu detektieren. Sie verhindern jedoch eine mögliche Beeinflussung der Wechselwirkung durch eine Markierung, genauso wie die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten an der Oberfläche durch unspezifische Quenchingeffekte oder das Photobleaching. Wobei sich bei der kommerziellen Umsetzung bislang nur das SPR System eine relevante Marktstellung erarbeiten konnte (siehe Biacore).

#### 3.2.2 Anforderungen an den Aufbau der modifizierten Sonde

Ziel ist es ein Verfahren zu entwickeln, daß eine Vielzahl unterschiedlicher Wechselwirkungen zwischen Targets und Sonden auf einem Array effizient, das

---

<sup>1</sup> F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.), *Bioanalytik*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin **1998**

<sup>2</sup> A.) Homepage der Firma Biacore ([www.biacore.com](http://www.biacore.com)); B.) F. F. Bier; Habilitationsschrift, Universität Potsdam **1997**; C.) L. G. Fagerstam, A. Frostell-Karlsöon, R. Karlsöon, B. Persson, I. Ronnberg; *J. Chromatogr.* **1992**, 597, 397-410; D.) E. Kretzschmar, H. Raether; *Z. Naturforsch.* **1968**, 23a, 2135; E.) E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky; *J. Coll. Interf. Sci.* **1991**, 143, 513-526

<sup>3</sup> A.) C. R. Graham, D. Leslie, D. J. Squirrell; *Biosens. Bioelectron.* 1992, 7, 487-493; B.) K. Tiefenthaler (**1992**), *Integrated optical couplers as chemical waveguide sensors*, in: *Advances in Biosensors* (Ed.: A. P. F. Turner), S. 261-289, Vol. 2, JAI Press, London

<sup>4</sup> A. Brecht, G. Gauglitz; *Frontiers in Biosensorics*, Vol.2, Applications, (Eds.: F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz), Birkhäuser, Basel

### 3. Spezieller Teil

heißt insbesondere mit hoher Sensitivität und Spezifität, nachweisen kann. Ein vielversprechender Ansatz besteht darin, die Sonden zu markieren und diese nach einer erfolgreichen Wechselwirkung mit dem Target für eine gezielte Detektion auszunutzen. Dies könnte zum Beispiel durch eine selektive Spaltung der Sonden von der Chipoberfläche realisiert werden. Dabei sollen die Sonden von der Oberfläche entfernt werden, die keine Wechselwirkung mit dem Target eingegangen sind. Dies bedeutet jedoch, daß die Sonden entsprechend modifiziert werden müssen, damit sie von der Oberfläche entfernt werden können<sup>5</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wird dafür eine chemisch spaltbare Bindung präferiert, da eine enzymatische Spaltung auf einer Oberfläche ineffizient verlaufen kann, wodurch bei der Detektion ein hoher Hintergrund durch fälschlicherweise positive Signale erzeugt werden würde. An die selektiv chemisch spaltbare Bindung werden verschiedene Bedingungen geknüpft:

- sie darf die Spezifität der Wechselwirkung zwischen einer Sonde und einem Target möglichst nicht oder nur minimal beeinflussen
- sie muß unter bestimmten Bedingungen, durch einfache chemische Agenzien, spezifisch spaltbar sein, ohne das andere Bindungen, insbesondere die Bindung des Rückgrats der Sondenmoleküle beeinträchtigt werden
- sie muß während des Assays stabil vorliegen
- sie muß eine gute Handbarkeit aufweisen, bzw. in die Oligodesoxynukleotid-Synthesechemie (Phosphoramiditchemie) integriert werden können (gilt ebenfalls für die verwendete Markierung)
- die Darstellung der Synthesebausteine sollte sich nicht zu komplex gestalten und in befriedigender Ausbeute möglich sein

Eine effiziente Spaltung an der Oberfläche sollte durch Agenzien mit einem geringem Ausmaß wie Atome oder Ionen möglich sein, beispielsweise durch die Zugabe von von Säure-, Base-, Fluorid- und/oder Schwermetallionen wie Silberionen (Quecksilberionen sollten aufgrund ihrer problematischen Entsorgung vermieden werden).

Außer der selektiv chemisch spaltbaren Bindung müssen alle auf dem Chip immobilisierten Sonden noch mit einer Markierung versehen werden (z.B. Fluoreszenzfarbstoffe o.a.). Durch diese ist eine Standardisierung des Arrays möglich. Die Markierung einer Sonde, soll innerhalb des Assays dann entfernt werden, wenn die Sonde keine Wechselwirkung mit einem entsprechenden Target eingegangen ist.

#### 3.2.3 Qualität eines Chips

Da alle Sonden auf dem Chip zu Beginn des Assays die eingeführte Markierung aufweisen, könnte durch die Detektion dieser (Belegungsdichte) eine qualitative Aussage über den hergestellten Chip gemacht werden (Nullpunkt). Über eine Normierung der Signale durch die Verwendung von internen Kontrollmarkierungen sollte eine quantitative Aussage möglich sein, da diese allen Schritten des Assays ausgesetzt sind und damit auch der häufig unspezifischen Abnahme des Markierungssignals während der Durchführung unterliegen.

Bisher kann die Qualität eines Chips vor der Durchführung nicht, oder nur mit einem hohen Aufwand festgestellt und in die anschließende Auswertung mit

---

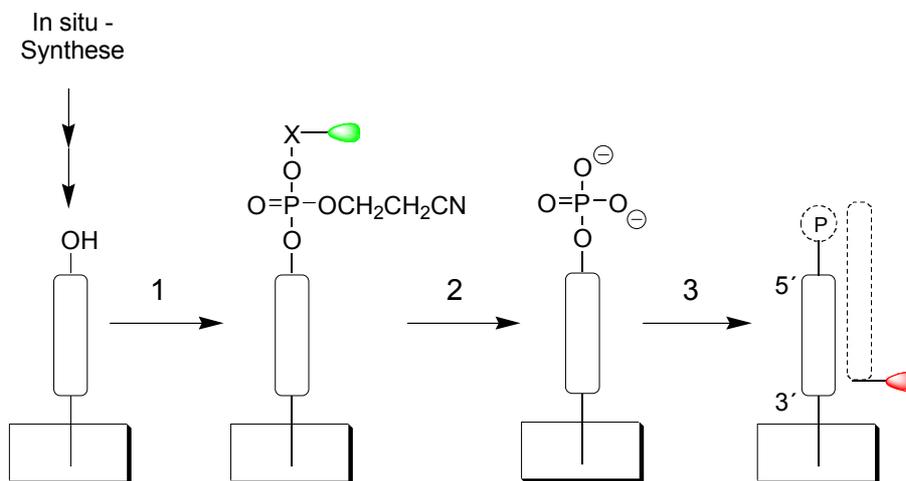
<sup>5</sup> Patent WO 98/01533

### 3. Spezieller Teil

einbezogen werden. Der bisher erreichte Standardisierungsgrad ist daher nicht zufriedenstellend und durchgeführte Experimente sind in der Regel nur schwer miteinander vergleichbar, selbst wenn sie im gleichen Labor durchgeführt wurden<sup>6</sup>. Die bisher durchgeführte Targetmarkierung ist ein schlecht standardisierbarer Prozeß, der durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, zum Beispiel durch

- die Qualität des Ausgangsmaterials (vor allem Reinheit und Salzgehalt),
- die Markierungseffizienz,
- die Qualität der Monomere bzw. der markierenden Amidite und
- den entsprechend eingesetzten Enzymen.

M. Beier und J. D. Hoheisel<sup>7</sup> beschreiben die Möglichkeit der Qualitätskontrolle eines Arrays, der durch *in situ* Synthese erzeugt wurde. Wie *Abbildung 54* zeigt, wird dabei im Anschluß an die durchgeführte Oligodesoxynukleotid-Synthese auf der Arrayoberfläche ein Farbstoff über einen labilen Linker an das Oligodesoxynukleotid gekoppelt (Schritt 1). Die an den einzelnen Spots ermittelte Signalintensität ist dabei ein Maß für die Syntheseausbeute (bei einer ausreichenden Kopplungseffizienz).



*Abbildung 54*: On-Chip Qualitätskontrolle nach M. Beier und J. D. Hoheisel

Der Farbstoff wird vor der weiteren Durchführung des Assays (essentiell z.B. bei enzymvermittelten Arrays) abgespalten (Schritt 2), da er die Hybridisierungseigenschaften der Sonde verändern kann. Es stellt sich daher die Frage, wie lohnenswert der präparative Aufwand hier ist. Da in diesem Experiment sowohl das Target als auch die Sonde markiert werden muß (siehe Schritt 3).

Es kann festgestellt werden, daß gegenwärtig kein Verfahren literaturbekannt ist, das die bei der Markierung der Targetmoleküle verbundenen Fehler vermeidet und zudem die Arrayqualität in die Auswertung des durchgeführten Experimentes mit einbezieht.

Wie im Allgemeinen Teil Kapitel 2.6.10 und 2.6.11 beschrieben, können Oligodesoxynukleotide entweder extern synthetisiert und dann auf den Chip

<sup>6</sup> A.) J. Schuchhardt, D. Beule, A. Malik, E. Wolski, H. L. Eickhoff, H. Herzel, H. Lehrbach; *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28 (1), 47; B.) G. C. Tseng, M. K. Oh, L. Rohlin, J. C. Liao, W. H. Wong; *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29 (15), 2549-2557; C.) D. J. Lockhart, E. A. Winzeler; *Nature* **2000** 405 (6788), 827-836

<sup>7</sup> M. Beier, J. D. Hoheisel; *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28 (4), e11

### 3. Spezieller Teil

gespottet werden (Spotting-Technologie), oder sie werden *in situ* auf dem Chip synthetisiert (z.B. Lithographie). Während die Qualität (Kopplungseffizienz) der extern synthetisierten Oligodesoxynukleotide kontrolliert und diese auch gereinigt werden können, ist dies bei der *in situ* Synthese nicht möglich. Allerdings kann bei der *in situ* Synthese die Spotmorphologie besser kontrolliert bzw. beeinflusst werden, als bei der Spotting-Technik. Beide Verfahren weisen sowohl Vor- als auch Nachteile auf, so daß jeder Anwender für den Aufbau seines Experiments, diese gegeneinander abwägen muß. Weitere Probleme sind:

- Die Spot-Homogenität und die Hintergrundfluoreszenz nach der Hybridisierung (Signal-Hintergrund Verhältnis).

- Selektivität der Hybridisierung

a. bei Expressionsassays (lange DNA-Sequenzen)

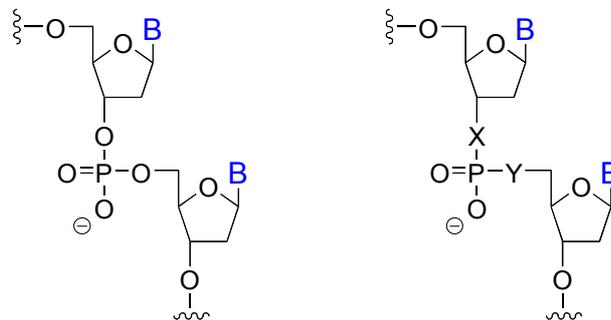
Nachteilig ist hier, daß ein solches aus vielen großen Nucleinsäuren bestehendes Gemisch eine sehr inhomogene Hybridisierungskinetik aufweist. Daher sind die Hybridisierungsbedingungen (Temperatur, pH, Salzkonzentration) für einzelne Moleküle oft nicht optimal, so daß unspezifische oder unvollständige Hybridisierungen auftreten die die Ergebnisse verfälschen können. Ferner sind die Nucleinsäuren z.B. aus einer Bibliothek häufig ungeordnet auf dem Substrat aufgebracht und daher für die Nucleinsäuren der zu hybridisierenden Probe teilweise sterisch unzugänglich.

b. bei kurzen Sequenzen

Sie weisen meist ähnliche Hybridisierungsbedingungen auf. Als Kontrollen müssen hier außer den Perfect Match-Oligodesoxynukleotiden noch Mismatch-Oligodesoxynukleotide aufgebracht werden. Unter idealen Bedingungen findet zwischen der Probe und dem Mismatch keine Hybridisierung statt. Signale, die dennoch an Stellen mit Mismatch-Oligodesoxynukleotiden auftreten, müssen daher von unspezifischen hybridisierten Nucleinsäuren stammen.

#### 3.2.4 Die selektiv spaltbare Bindung und der Assay-Aufbau

Die selektiv spaltbare Bindung innerhalb der Oligodesoxynukleotid-Sonde ist vorzugsweise eine Phosphorthioatbindung oder eine Phosphoramidatbindung (siehe *Abbildung 55*).

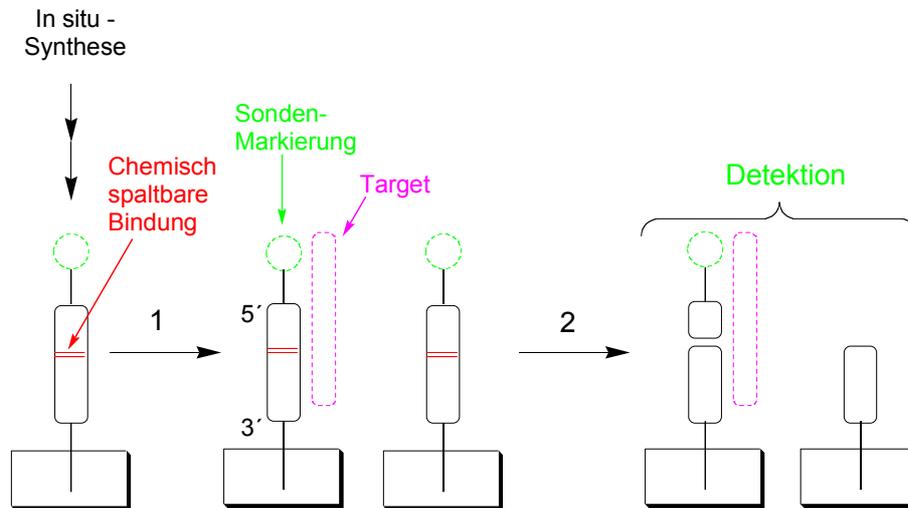


*Abbildung 55:* Vergleich eines Dimers mit einem Phosphordiester – Rückgrat und einem entsprechend modifizierten Dimer [Zucker – X – P – Y – Zucker] (B entspricht der Nucleobase)

X und Y können in *Abbildung 55*. entweder O, NH oder S sein, wobei X und Y nicht gleichzeitig O sind. Vorstellbar wäre auch eine photolytisch spaltbare

### 3. Spezieller Teil

Bindung, da jedoch die *in situ* Synthese der Oligodesoxynukleotide inzwischen zu großen Teilen photolithographisch durchgeführt wird, entfällt diese Modifikation. *Abbildung 56.* zeigt die schematische Durchführung des Sonden-markierten Assays auf.



*Abbildung 56:* Schematischer Aufbau des Sonden-markierten Assays

Die selektiv spaltbare Bindung sollte etwa im mittleren Sequenzteil der markierten Sonde liegen. An welcher Stelle genau die „Sollbruchstelle“ in die Sonde eingeführt wird, entscheidet der durchzuführende Assay. Wie *Abbildung 56.* zeigt, wird die Markierung von denjenigen Sonden entfernt, bei denen keine Wechselwirkung mit dem Target stattgefunden hat (Schritt 2). Dagegen bleiben solche Markierungen mit der Array-Oberfläche verknüpft, deren Sonden spezifisch mit dem Target wechselgewirkt haben. Schlüsselschritt dieses Verfahrens ist die weiterhin stabile Hybridsierung des Targets mit dem Spaltungsstück der Sonde, das die Markierung trägt.

Um die Spaltungseffizienz und damit auch den inhärenten Signalhintergrund feststellen zu können werden auf dem Array Kontrollsonden (randomisierte Sequenzen) aufgebracht, die keine Wechselwirkung mit dem Target (spezifische Affinität) eingehen. Um eine quantitative Auswertung des Arrays zu ermöglichen, sind verschiedene Kontrollsysteme möglich, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll<sup>8</sup>, da sie abhängig des durchzuführenden Assays durchdacht und entwickelt werden müssen.

Die Sonden-Arrays sind aufgrund ihrer Flexibilität, mit einer Vielzahl physikalischer, chemischer oder biochemischer Detektionsverfahren kompatibel. Die Detektion kann auf folgenden spezifischen Eigenschaften der Markierung beruhen:

- der Fluoreszenz (Cyanin-, Alexa-, Texas-Rot-, Fluorescein-, Rhodamin-Farbstoffe),
- dem Magnetismus,
- der Ladung,
- der Masse,
- der chemischen und enzymatischen Affinität,

<sup>8</sup> T. Ellinger, E. Ermantraut, R. Ehrlich, J. W. Engels, K. Jahn-Hofmann, PCT Int. Appl. **2003**, 165 pp. WO 0318838

### 3. Spezieller Teil

- der Reaktivität,
- oder einer Gold-Silber-Markierung (Ag-Präzipitat) und dergleichen<sup>9</sup>.

Abbildung 57. beschreibt den Aufbau des Sonden-markierten Assays am Beispiel des Modelloligonukleotids **69** (24mer mit einer exemplarischen Sequenz).

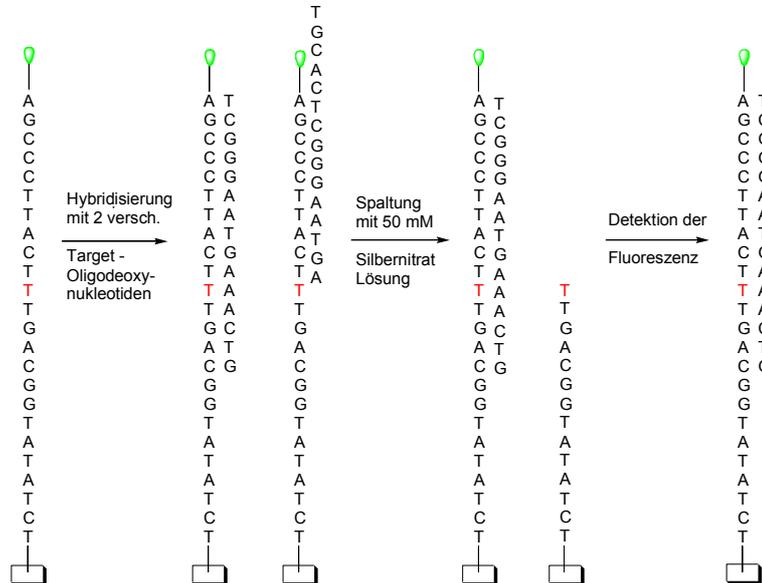


Abbildung 57: Aufbau des Sonden-markierten Assays für das Modelloligodesoxynukleotid **69**

Es soll ein Verfahren entwickelt werden, das eine effiziente, homogene und/oder parallele Synthese der modifizierten Sonden gewährleistet. Dafür müssen zuerst die entsprechend modifizierten Amidite hergestellt werden. Im Rahmen dieses Projekts sahen wir die Phosphorthioate mit einer 5'-O-P-S-3' Verbrückung aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der natürlichen Verbrückung 5'-O-P-O-3' als die am erfolgsversprechendsten Bausteine für die Synthese und das gewünschte Verhalten innerhalb eines Assays an.

#### 3.2.5 Aufgaben innerhalb des Projektes

Im Rahmen dieses Projektes waren daher verschiedene Aufgaben zu bearbeiten:

- die Synthese der vier 5'-Mercapto-2'-desoxynukleosiden-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphite) (siehe *Abbildung 58*.)

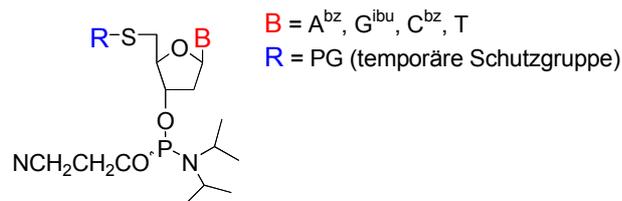


Abbildung 58: Allgemeine Formel für die modifizierten Amidite

<sup>9</sup> Lottspeich, Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 1998, Kapitel 23.3 und 23.4

### 3. Spezieller Teil

- die Entwicklung eines Synthesesyklus für die Oligodesoxynukleotid-Synthese mit den modifizierten Amiditen
- die Durchführung von Testspaltungen in homogener Phase und an der Oberfläche von verschiedenen Trägermaterialien

#### 3.3 Stand der Forschung (chemische Synthesearbeiten)

Die Synthese der entsprechenden 5'-S-Triphenyl-mercapto-2'-desoxy-nukleosiden-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphiten) ist bereits seit etwa 20 Jahren literaturbekannt<sup>10</sup>. Die Synthesearbeiten dieses Projekts beruhen auf den Vorarbeiten der folgenden Forscher:

- Die von M. Mag im Arbeitskreis von Prof. Engels an der Universität Frankfurt, in den 90ern durchgeführte Synthese (siehe *Abbildung 59.*) für das entsprechende T-Amidit stellte die Grundlage der ersten Synthesearbeiten dieser Arbeit dar (Synthesestrategie 1.).

Die Synthese des folgenden 12 mers (AGA C<sub>PS</sub>TC GAG TCT) gelang M. Mag in einer Ausbeute von 69%.

- Diese übersteigt die von B. S. Sproat erzielte Ausbeute von 20% nach der HPLC-Reinigung für das Oligodesoxynukleotid 5'-Trityl-S-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' um ein Vielfaches. Dieses Oligodesoxynukleotid konnte nach der erfolgten Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe mit Silbernitrat und der anschließenden Reduktion mit DTT zu dem freien Thiol, mit Jodacetamidfluorescein (IAF) in 37% iger Ausbeute modifiziert werden. B. S. Sproat beschreibt ebenfalls in seiner Publikation von 1987, daß bei dem Oxidationsschritt im Phosphoramidit-Synthesesyklus (verdünnte Jodlösung) keine Strangbrüche an der P-S-Bindung zu detektieren sind. Er vermutet, daß die Spaltung der P-S-Bindung nur in konzentrierten Lösungen erfolgen kann und daß die Beladung des CPG-Materials dafür zu gering ist.

- A. B. Jr. Burgin folgt 1995 der von M. Mag beschriebenen Synthese und gibt für die von ihm synthetisierten Oligodesoxynukleotide eine Ausbeutespanne von 25 – 50% an. Er beschreibt ebenfalls die Zugabe von DTT in die wässrige Ammoniaklösung zur Abspaltung vom Trägermaterial und Abspaltung der Basenschutzgruppen.

- E. J. Reist beschreibt schon 1963 die 3'-Benzoylierung und Acetylierung, sowie die entsprechenden Umsetzungen von Thio-Verbindungen mit entsprechend aktivierten 5'-Nukleosiden. Er verwendet, wie auch

- N. Miller 1964 im Gegensatz zu R. Cosstick ausschließlich saure Lösungen (1 M HCl) für die Abspaltung entsprechender Schutzgruppen in Thio-modifizierten Nukleosiden.

---

<sup>10</sup> A.) B. A. Connolly, P. Rider; *Nucl. Acids Res.* **1985**, 13 (12), 4485-4502; B.) B. S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849; C.) R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; D.) M. Mag, S. Lücking, J. W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7), 1437-1441; E.) R. G. Kuimelis, L. W. McLaughlin; *Nucl. Acids Res.* **1995**, 23 (23), 4753-4760; F.) A. B. Jr. Burgin; *Methods Mol. Biol.* **2001**, 95 (pt.2), 119-128; G.) N. Miller, J. J. Fox; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 1772-1775; H.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; I.) B. Kamber, W. Rittel; *Helv. Chim. Acta*, **1968**, Vol. 51, 8, 2061-2064

### 3. Spezieller Teil

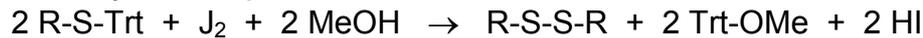
• R. Cosstick und J. S. Vyle beschreiben die erfolgreiche Abspaltung entsprechender Schutzgruppen mit ethanolischer Natronlauge bei 5°C und die erfolgreiche Spaltung mit Jod. Dazu verwendeten sie:

a. wässriges Aceton mit Jod  $\Rightarrow$  8 h bei 50°C

b. wässriges Pyridin mit Jod  $\Rightarrow$  2 h bei RT.

Außerdem beschreiben sie entsprechende Thio-modifizierte 3'-Nucleoside und für die Dimer-Synthese das Oxidationsmittel Tetrabutylammoniumperjodat (TBA) für eine erhöhte Ausbeute.

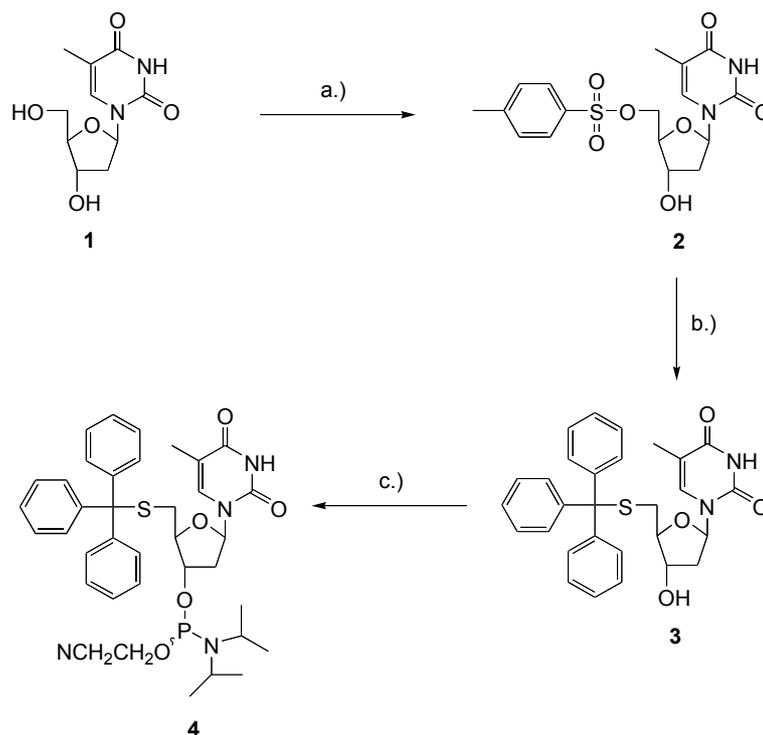
• B. Kamber und W. Rittel beschrieben schon 1968 die folgende Reaktion für den Aufbau von Cystein-Peptiden:



All diese Vorarbeiten beziehungsweise Informationen wurden für die folgenden Synthesearbeiten genutzt.

3.3.1 Synthesearbeiten: Synthese der vier 5'-Mercapto-2'-desoxy-nucleosiden-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphiten)

3.3.2 Synthese 5'-S-Trityl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylamino-phosphit **4** (Synthesestrategie 1.)



a.) p-Toluolsulfonsäurechlorid, Pyridin, 4°C, über Nacht, 68%; b.) Triphenylmethylmercaptan, NaOH, EtOH, Reflux, 8 h, RT, über Nacht, 51%; c. P-Reagenz II, DIPEA, DCM:ACN, RT, 1 h, 62%

Abbildung 59: Synthesestrategie 1.

Die Synthese startet mit der Einführung der aktivierenden 5'-Schutzgruppe. Hier wird 2'-Desoxythymidin in Pyridin bei 4°C mit p-Toluolsulfonsäurechlorid zur Reaktion gebracht. Die Verbindung **2** 5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-2'-desoxythymidin

### 3. Spezieller Teil

kann nach der Aufreinigung in 68%iger Ausbeute isoliert werden. Die Einführung des benötigten Schwefels **3** erfolgt in nur 51%iger Ausbeute durch die Umsetzung der Verbindung **2** mit Triphenylmethylmercaptan, NaOH und Ethanol bei Reflux. Das gewünschte Amidit **4** 5'-S-Trityl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylamino-phosphit) wird in 62% iger Ausbeute durch die Umsetzung der 3'-Hydroxyl-Gruppe mit dem Phosphitierungsreagenz Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid erhalten. Dies bedeutet eine Gesamtsyntheseausbeute für die Synthesestrategie 1. von 22%. Das Amidit **4** kann mit Hilfe des Phosphoramidit-Synthesesyklus am Synthesizer gekoppelt werden. Allerdings muß nach der Kopplung des modifizierten Bausteins **4**, die Synthesesäule vom Synthesizer abgenommen werden und die Abspaltung der Trityl-Gruppe mit einer wässrigen Silbernitrat-Lösung manuell erfolgen. Da die Labilität der Trityl-Gruppe gegenüber der Abspaltungslösung (3% DCA in DCM) am Synthesizer zu gering ist. Im Standard-Synthesesyklus werden daher aufgrund ihrer höheren Labilität gegenüber Säuren, die 5'-(4,4'-Dimethoxytrityl)-modifizierten Amidite eingesetzt. Der Spaltung schließen sich mehrere Waschschriffe, sowie eine Reduktion mit einer wässrigen DTT-Lösung an. Diese muß durchgeführt werden, da ansonsten die Kopplungsausbeute des folgenden Amidits sehr gering ist. Nach der erfolgten Reduktion schließen sich weitere Waschschriffe per Hand (2 Spritzen) an. Anschließend wird die Synthese des Modelloligodesoxynukleotid **69** am Synthesizer weitergeführt. Die erzielten Ausbeuten sind nicht befriedigend und die Herstellung des Oligodesoxynukleotids gestaltet sich recht komplex und arbeitsintensiv.

#### 3.3.3 Synthese 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenyl)-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropyl-phosphit) **9**

Um eine Vereinfachung der Oligodesoxynukleotid-Synthese zu erreichen sollte anstatt des 5'-S-Trityl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) **4** das entsprechende 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenyl)-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) **9** hergestellt werden. Die Herstellung der Verbindung **9** ist mit der folgenden Synthesestrategie möglich:

- Veresterung der 5'-OH-Gruppe des Nukleosids mit einer als Abgangsgruppe geeigneten Säure
- Umsetzung des Esters mit einem Thioester
- Verseifung des Thioesters zu dem entsprechenden Thiol
- Schutz der Thiol-Funktion mit der 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr)
- Aktivierung des geschützten Thiols an der 3'-Position

*Abbildung 60.* beschreibt die Synthese des 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) **9**.

##### 3.3.3.1 Synthesestrategie 2. zu der Verbindung **9**

Die Synthese startet hier mit dem Produkt **2** aus der Synthesestrategie 1. Dieses wird mit Acetanhydrid in der 3'-Position in 94% iger Aubeute<sup>11</sup> zu 5'-O-(p-

<sup>11</sup> E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558

### 3. Spezieller Teil

Tosylsulfonyl)-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin **5** acetyliert. Die Umesterung an der 5'-Position erfolgt mit Kaliumthioacetat in Aceton in einer Ausbeute von 94%. Hier sind allerdings zwei Dinge zu beachten:

- Die Umsetzung kann nicht einfach durch eine DC-Kontrolle mit Kieselgel als stationäre Phase detektiert werden, da das Edukt und Produkt das gleiche Laufverhalten aufweisen. Mit Hilfe des MOPS-Mix<sup>12</sup> kann die Umsetzung detektiert werden, da die beiden Verbindungen ein unterschiedliches Färbeverhalten auf der DC-Platte zeigen.
- Kaliumthioacetat als Schwefel-Quelle wurde der Vorrang gegenüber der freien Thioessigsäure gegeben, da dieses Reagenz zum Einen lagerstabil ist und zum Anderen bei der Lagerung weniger geruchsbelästigende Abbauprodukte gebildet werden.

Die Freisetzung des Thiols **7** 5'-Mercapto-2'-desoxythymidin<sup>13</sup> erfolgt bei 45°C mit 1 M methanolischer Salzsäure. Die Abspaltung wird per DC-Kontrolle detektiert wobei das entstehende Produkt nicht isoliert wird, sondern direkt zum Produkt **8** 5'-S-DMTr-5'-mercapto-2'-desoxythymidin umgesetzt wird. Die Freisetzung des Thioesters **6** muß hier mit 1 M HCl durchgeführt werden, da bei der Verwendung von alkalischen Lösungen wie NH<sub>3</sub> in Methanol oder Natriummethanolat in Methanol u.a., das gewünschte Produkt nur in sehr geringer Ausbeute isoliert werden kann<sup>14</sup>. Als Hauptprodukt entsteht hier ein Dimer mit einer S-S-Verbrückung. Die weitere Umsetzung mit einem 4,4'-Dimethoxytrityl-Derivate (Alkohol oder Chlorid) zum 5'-S-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **8**, erfolgt hier in stark saurer Lösung<sup>15</sup>. Diese acide Bedingung wird normalerweise für die Abspaltung der 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe verwendet.

Im Syntheszyklus nach Caruthers<sup>16</sup> erfolgt die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe zum Beispiel mit einer 3% igen DCA Lösung in DCM innerhalb von 20 Sekunden. DMT-on synthetisierte Oligodesoxynukleotide werden zur Abspaltung der DMT-Gruppe nach der Reinigung mit einer 80% igen Essigsäure für 1 Stunde behandelt. Die freie Thiol-Gruppe weist jedoch gegenüber der Hydroxyl-Gruppe eine höhere Nukleophilie auf, daher ist die Umsetzung mit einem 4,4'-Dimethoxytrityl-Derivate in essigsaurer Lösung in 68% iger Ausbeute hier möglich. Die anschließende Phosphitilierung mit Phosphorigsäure-bis-(diisopropylamid)-2-cyanethylester und Tetrazol führt in 83% iger Ausbeute zu dem modifizierten Amidit **9**.

Dies ergibt für die Synthesestrategie 2. (siehe *Abbildung 60.*) eine Gesamtsyntheseausbeute von 34%.

---

<sup>12</sup> Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie. E. Merck, Darmstadt

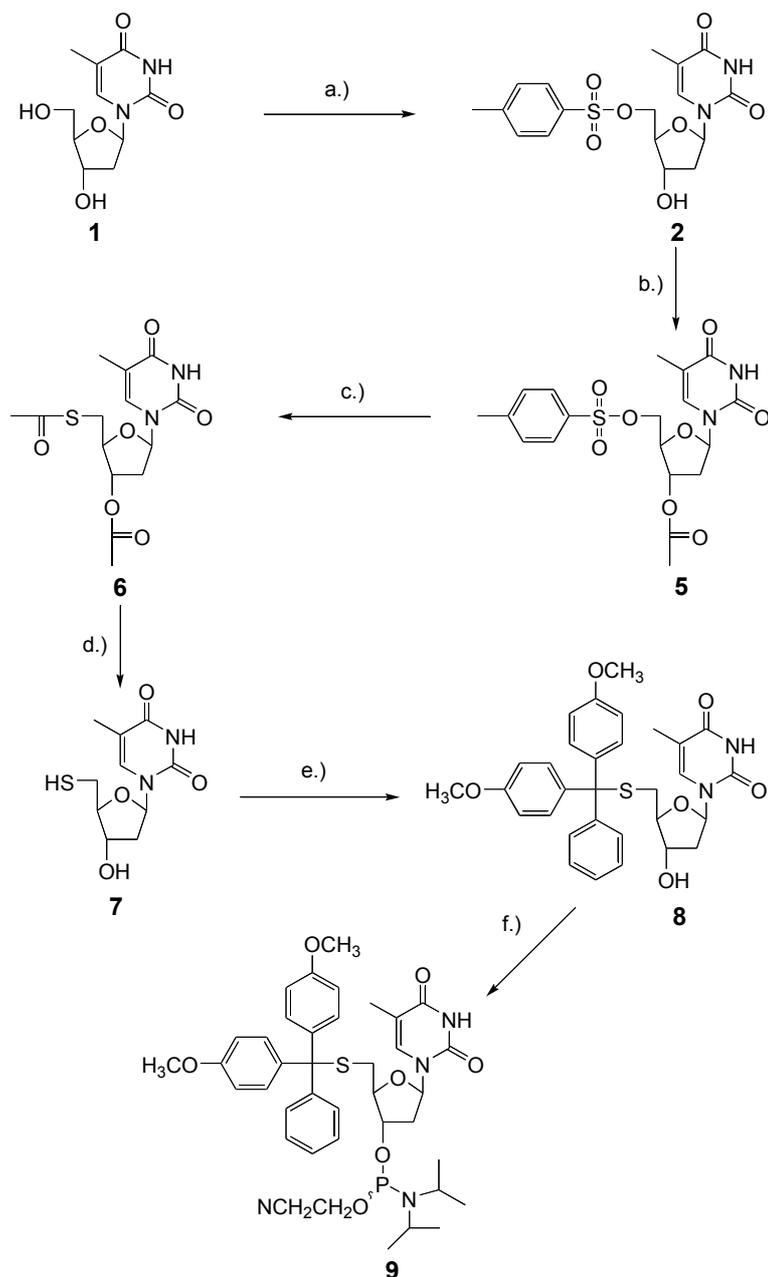
<sup>13</sup> A.) R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K. J. Divakar, A. Mottoh, C. B. Reese, Y. S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974

<sup>14</sup> G.) N. Miller, J. J. Fox; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 1772-1775; H.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558

<sup>15</sup> B. Greiner, G. Breipohl, E. Uhlmann; *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82 (12), 2151-2159

<sup>16</sup> M. H. Caruthers, G. Geaton, J. V. Wu, W. Wiesler; *Methods Enzymol.* **1992**, 211, 3-19

### 3. Spezieller Teil



a.) p-Toluolsulfonsäurechlorid, Pyridin, 4°C, über Nacht, 68%; b.) Acetanhydrid, Pyridin, RT, 16 h, 94%; c.) Kaliumthioacetat, Aceton, 50°C, 3-5 h, RT, über Nacht, 94%; d.) 1 M methanilische HCl, 45°C, 2 h, Ausbeute nicht bestimmt, da Edukt für Reaktion e.) DMTr-Cl, Wasser, Essigsäure, NaOH, RT, 3 h, 68%; f.) Tetrazol, P-Reagenz I, DCM:ACN, RT, 1 h, 84%

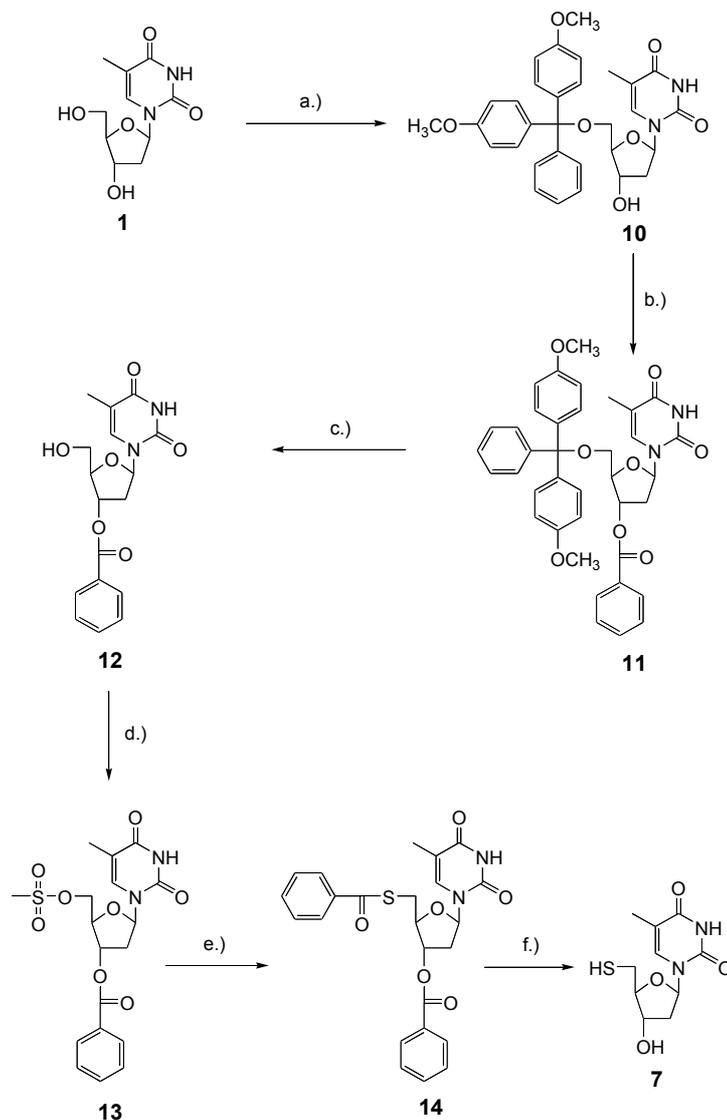
Abbildung 60: Synthesestrategie 2.

#### 3.3.3.2 Synthesestrategie 3. zu der Verbindung **9**

Die Synthese des gewünschten Bausteins **9** kann ebenfalls wie in der Synthesestrategie 3. gezeigt (siehe *Abbildung 61.*) erfolgen. Die Synthesestrategie 3. gestaltet sich gegenüber der Synthesestrategie 2. komplexer, da mehr Reaktionsschritte für die Synthese der Verbindung benötigt werden. Da die beiden Synthesen jedoch parallel zueinander ausgearbeitet wurden, soll hier auch die Synthesestrategie 3. vorgestellt werden. Die Synthese

### 3. Spezieller Teil

startet mit 2-Desoxythymidin **1**, welches an der 5'-Position durch die Umsetzung von 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin<sup>17</sup> geschützt wird. Die Verbindung **10** 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin kann nach der Umkristallisation aus Benzol in 86% iger Ausbeute isoliert werden. In 87% iger Ausbeute kann das Produkt **11** 5'-O-DMTr-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin<sup>18</sup> durch die Umsetzung von **10** mit Benzoylchlorid in Pyridin und anschließendem Ausfällen mit Eiswasser isoliert werden. Die folgende Detritylierung<sup>19</sup> zu 3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **12** verläuft mit einer 66% igen Ausbeute unbefriedigend.



a.) DMTr-Cl, Pyridin, DMAP, RT, 12 h, 89%, b.) Benzoylchlorid, Pyridin, 4°C, 16 h, 87%; c.) 80% ige Essigsäure, RT, 2 h, 66%; d.) Methansulfochlorid, Pyridin, -12°C, 1 h, 4°C, 16 h, 94%; e.) Natriumthiobenzoat, DMF, 100°C, 5 h, 40%; f.) 1 M methanolische HCl, 45°C, 2 h, Ausbeute nicht bestimmt, Rohprodukt weiter umgesetzt

Abbildung 61: Synthesestrategie 3.

<sup>17</sup> H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827

<sup>18</sup> E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558

<sup>19</sup> B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (4), 1729-1743

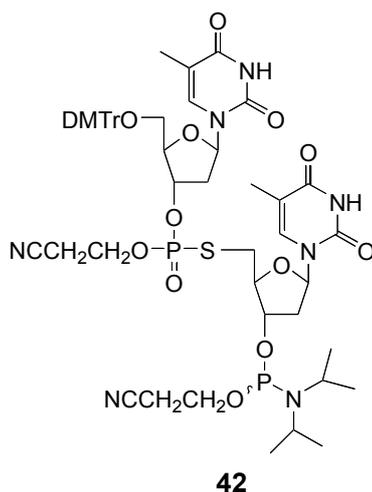
### 3. Spezieller Teil

Vermutlich war hier die Reaktionszeit mit der 80% igen Essigsäure zu lang, so daß sich entsprechende Nebenprodukte (z.B. Depurinierung) ausbilden konnten. Die Mesyl-Schutzgruppe<sup>20</sup> konnte in einer sehr guten Ausbeute von 94% durch die Umsetzung mit Methansulfonsäurechlorid in Pyridin bei 4°C über Nacht eingeführt werden. Die Verbindung **13** 5'-O-Mesyl-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin wird anschließend mit Natriumthiobenzoat in DMF für 5 h bei 100°C zu 5'-S-Benzoyl-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **14**<sup>21</sup> umgesetzt. Natriumthiobenzoat ist nicht käuflich, daher muß es vor der Umsetzung erst aus Thiobenzoessäure und Natronlauge hergestellt werden. Das gebildete Natriumthiobenzoat wird entgegen der Literatur nicht umkristallisiert. Wie bereits für die Synthesestrategie 1. beschrieben, wird die Verbindung **14** mit 1 M methanolischer HCl zu **7** entschützt und die Lösung direkt für die folgende 5'-Tritylierung zu Produkt **8** eingesetzt. Die sich anschließende Phosphitlierung liefert das gewünschte Amidit **9**.

Dies ergibt für die Synthesestrategie 3. (siehe *Abbildung 61.*) eine Gesamtsyntheseausbeute bis zu dem entsprechenden Amidit **9** von 6%. Dies entspricht gegenüber der Synthesestrategie 2. eine um 27% erniedrigete Syntheseausbeute. Die Oligodesoxynukleotid-Synthese ist mit dem modifizierten Amidit **9** möglich, allerdings verliefen die Synthesen zu Beginn ebenfalls in nicht zufriedenstellenden Ausbeuten (siehe Abschnitt 3.4.) und erfordern einen erheblich modifizierten Synthesesyklus. Da das modifizierte Amidit **9** im Rahmen des Sonden-markierten Assays möglichst mit einem Standard-Synthesesyklus auf dem Chip gekoppelt werden soll, war es aufgrund der geringen Ausbeuten notwendig, die Synthese eines Dimers wie in *Abbildung 62.* gezeigt zu entwickeln.

#### 3.3.4 Synthese des Dimers **42**

Die Kopplung dieses Dimers **42** innerhalb der Oligodesoxynukleotid-Synthese, sollte mit einem Standard-Synthesesyklus, eventuell mit der Ausnahme einer verlängerten Kopplungszeit ohne Nebenreaktionen möglich sein.



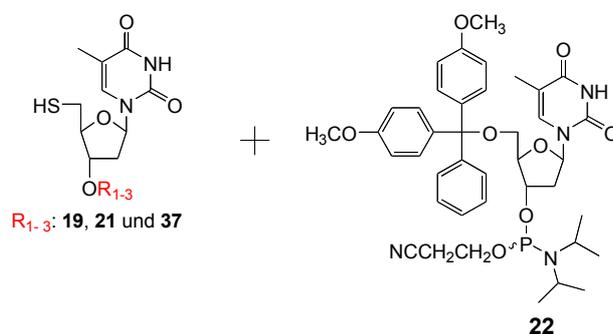
*Abbildung 62:* Dimer **42**.

<sup>20</sup> A.) J. P. Horwitz, J.A. Urbanski, J. Chua; *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3300-3302; B.) J. P. Horwitz, J. Chua, M. Noel, *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2076-2078; C.) J. J. Fox, N.C. Miller; *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 936-942

<sup>21</sup> A.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; B.) R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835

### 3. Spezieller Teil

Um das entsprechende Dimer herstellen zu können, müssen die beiden folgenden Edukte zur Reaktion gebracht werden (siehe *Abbildung 63.*).



*Abbildung 63:* Edukte für die Synthese des modifizierten Dimers **42**.

Die Darstellung der Verbindungen **19**, **21** und **37** erfolgt, wie in *Abbildung 64.* und *Abbildung 68.* gezeigt.

Die Synthese startet mit der Verbindung **3** 5'-S-Trityl-2'-desoxythymidin, deren Darstellung bereits für die Synthesestrategie 1. beschrieben wurde. Die Umsetzungen von **3** in Pyridin mit Benzoylchlorid<sup>22</sup>, Acetanhydrid<sup>23</sup> oder tert.-Butyl-diphenylchlorsilan<sup>24</sup> führen zu den Verbindungen **16** (95%), **17** (96%) und **18** (91%). Die Abspaltung<sup>25</sup> der 5'-Trityl-Gruppe erfolgt durch das Auflösen der Verbindungen **16** – **18** in Methanol und die Zugabe von Silbernitrat und Pyridin. Dabei entstehen die entsprechenden Silbersalze, die unlöslich sind. Die Freisetzung des Thiols erfolgt durch das Suspendieren der Silbersalze in Methanol, der Zugabe von Essigsäure und dem Einleiten von Schwefelwasserstoff, dabei entstehen die Verbindungen **19** (76%) und **21** (53%). Die Verbindung **20** konnte nur in einer Ausbeute von 13% isoliert werden. Der Verlauf der Reaktion (Qualität und Quantität) hängt davon ab, daß die Verbindungen **16** – **18** vollständig in Methanol gelöst werden. Ist dies nicht möglich, kann per DC Detektion die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden. Daher sollte ein entsprechender Feststoffanteil vor der Versuchsdurchführung abfiltriert werden.

Die Gesamtausbeuten der Verbindungen **19** – **22** betragen:

Verbindungsnummer	Ausbeute
<b>19</b>	25%
<b>20</b>	4%
<b>21</b>	17%
<b>22</b>	74%

Tabelle 8: Ausbeuten der Verbindungen **19** – **22**

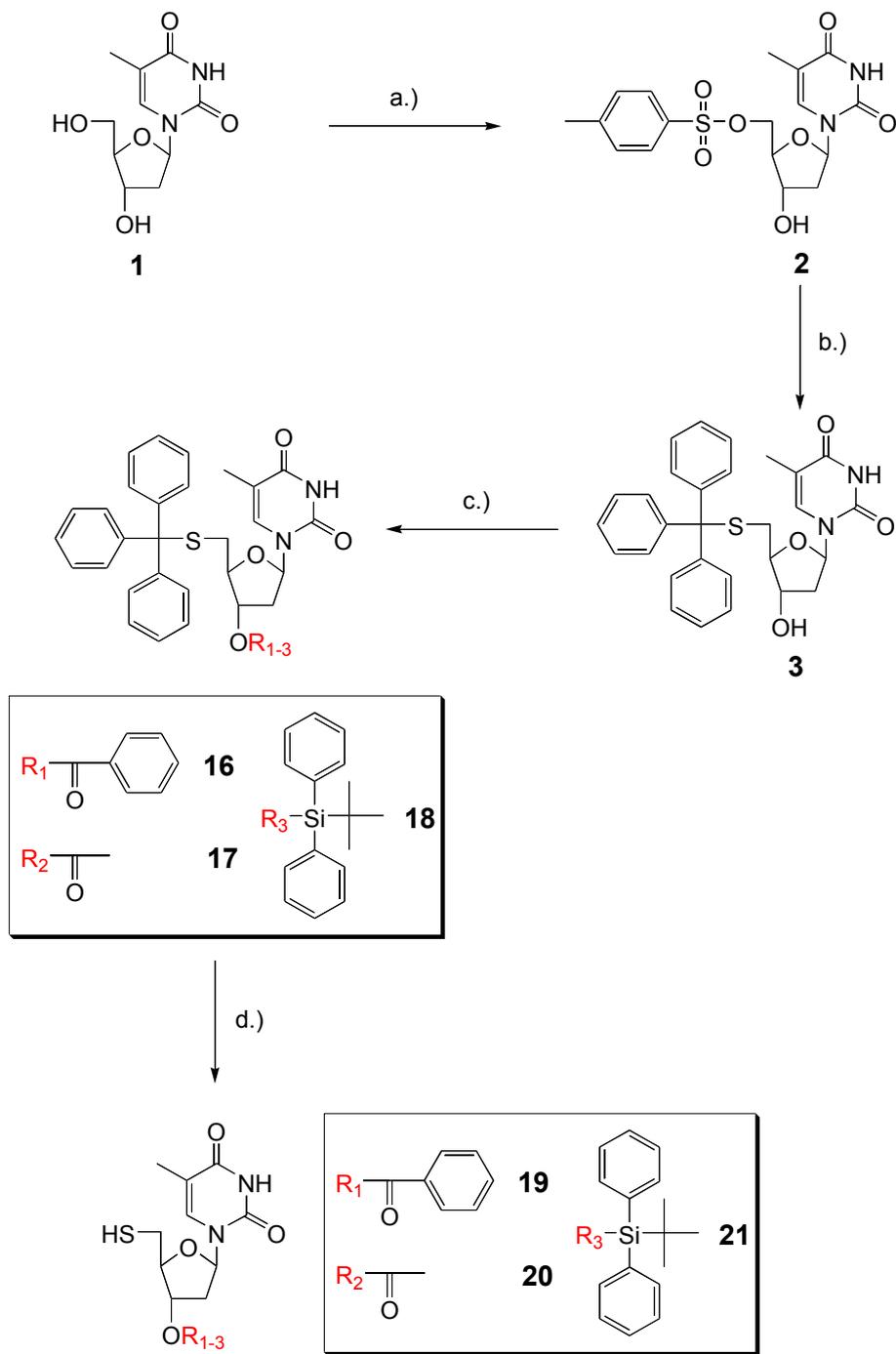
<sup>22</sup> N. Takeda, M. Shibata, N. Tajima, K. Hirao, M. Komiyama, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4391-4396

<sup>23</sup> E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558

<sup>24</sup> T. Szabó, J. Stawinski; *Tetrahedron* **1995**, 51 (14), 4145-4160

<sup>25</sup> A.) R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K. J. Divakar, A. Mottoh, C. B. Reese, Y. S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974

### 3. Spezieller Teil



- a.) p-Toluolsulfonsäurechlorid, Pyridin, 4°C, über Nacht, 68%; b.) Triphenylmethylmercaptan, NaOH, EtOH, Reflux, 8 h, RT, über Nacht, 51%;  
 c.) **16**: Benzoylchlorid, Pyridin, RT, 16 h, 95%, **17**: Acetanhydrid, Pyridin, RT, 16 h, 96%, **18**: Imidazol, tert.-Butyl-diphenylchlorosilan, Pyridin, RT, 16 h, 91%;  
 d.) **19**: I. Silbernitrat, Methanol, Pyridin II. Methanol, Essigsäure, H<sub>2</sub>S, RT, 76%, **20**: 51%, **21**: 53%

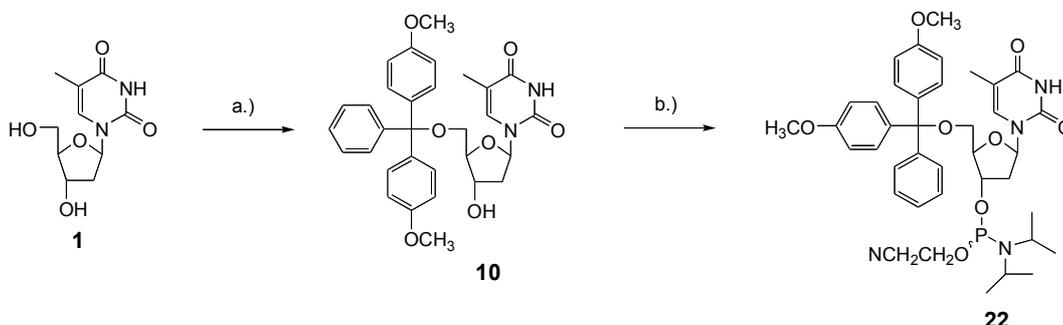
Abbildung 64: Synthesestrategie 4.

#### 3.3.5 Synthese des Amidits **22**

Desweiteren wird die Verbindung **35**, in der Synthesestrategie 5. (Abbildung 68.) beschrieben, in die Verbindung **37** umgesetzt.

### 3. Spezieller Teil

Die Verbindungen **19**, **21** und **37** können mit dem in drei Schritten synthetisiertem T-Amidit **22** zur Reaktion gebracht werden. *Abbildung 65* beschreibt die Synthese der Verbindung **22**. Durch die Reaktion von 2'-Desoxythymidin **1** mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin wird die Verbindung **10** 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin in 89% iger Ausbeute hergestellt. Die anschließende Phosphitilierung erfolgt mit Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid in 83% iger Ausbeute zu der Verbindung **22**.



a.) DMTr-Cl, Pyridin, DMAP, RT, 12 h, 89%; b.) P-Reagenz II, DIPEA, DCM:ACN, RT, 1 h, 82%

*Abbildung 65*: Synthese des T-Amidites **22**

Die Dimere **38** – **40** werden durch die Reaktion der Monomere **19**, **21** und **37** mit dem T-Amidit **22** wie *Abbildung 66* zeigt, hergestellt<sup>26</sup>.

Hier ist vorallem auf absolute Trockenheit zu achten. Die Monomere **19**, **21** und **37** werden jeweils zusammen mit dem T-Amidit **22** und dem Katalysator Benzimidazol-Triflat **23** (entsteht durch die Umsetzung von Benzimidazol und Trifluoressigsäure) über Nacht im HV getrocknet und die Reaktion durch die Zugabe des Lösungsmittelgemischs (ACN:DCM) gestartet. Nach einer Stunde Reaktionszeit, wird die Reaktion durch die Zugabe von Tetrabutylammoniumperjodat (Oxidationsmittel) gequencht. Die Dimere werden mit Hilfe der Säulenchromatographie gereinigt und in den folgenden Ausbeuten isoliert **38** (71%), **39** (51%) und **40** (61%). Dies ergibt für die 3'-geschützten Dimere **38** – **40** eine Gesamtausbeute von:

Verbindungsnummer	Ausbeute
<b>38</b>	13%
<b>39</b>	8.7%
<b>40</b>	8%

Tabelle 9: Syntheseausbeuten für die 3'-geschützten Dimere **38** – **40**

<sup>26</sup> A.) Y. Hayakawa, M. Kataoka, R. Noyori; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7996-7997; B.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835

### 3. Spezieller Teil

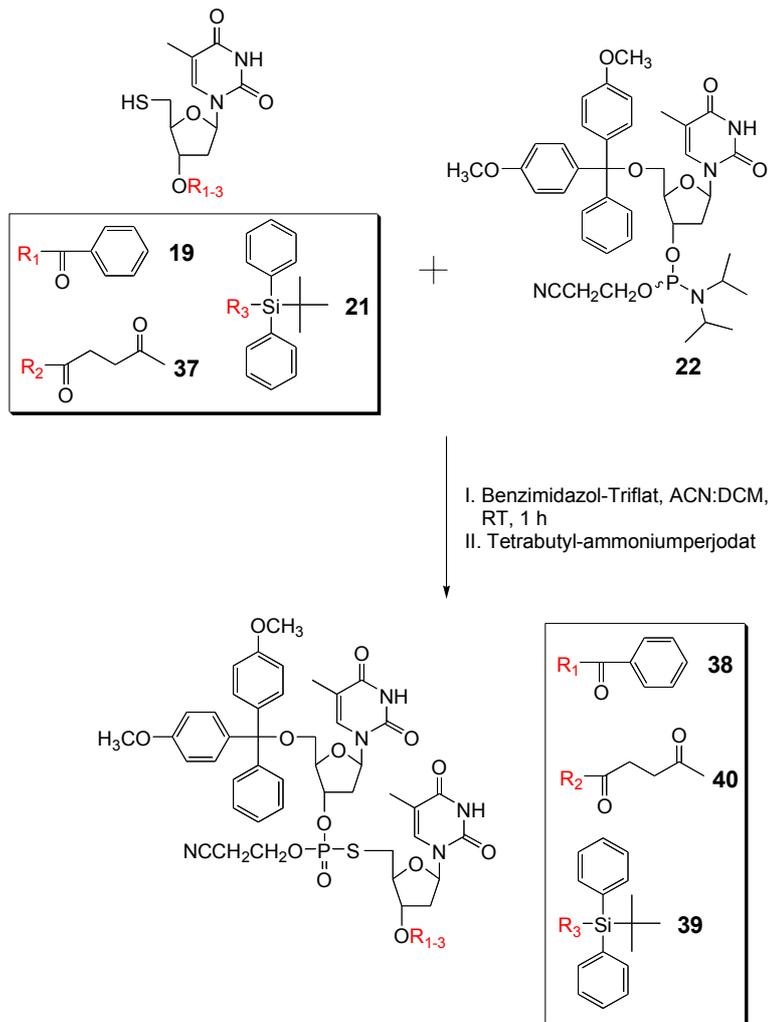
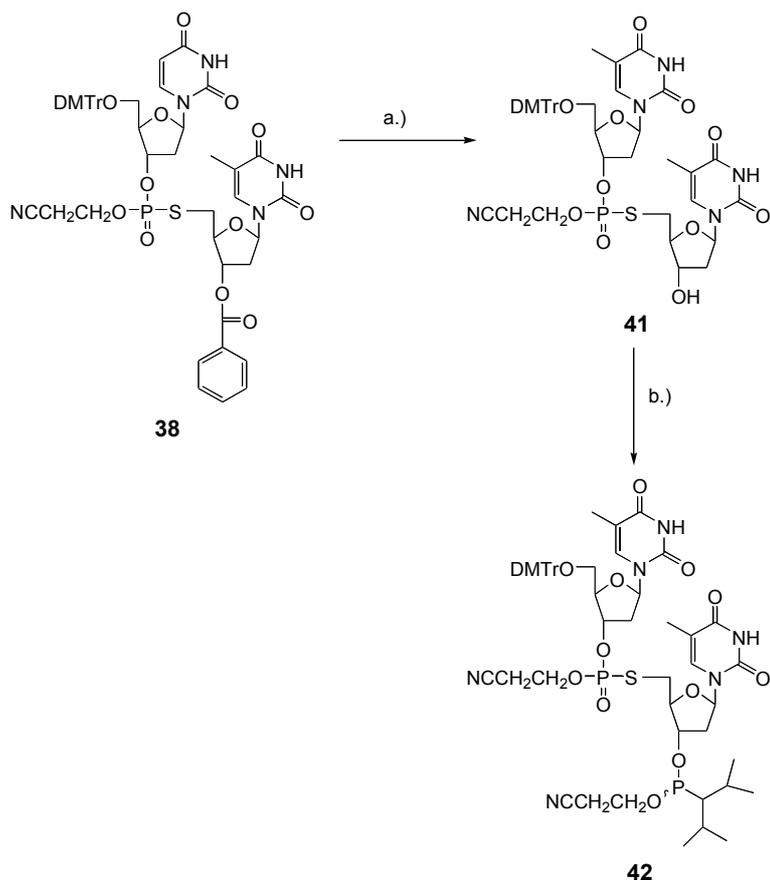


Abbildung 66: Synthese der 3'-geschützten Dimere **38** – **40**.

Die nötige Abspaltung der 3'-Schutzgruppe, um die 3'-Hydroxyl-Gruppe mit einem Phosphitierungsreagenz in das gewünschte dimere Amidit **42** umzusetzen gelang in zufriedenstellender Ausbeute nur für die Verbindung **38** (siehe *Abbildung 67*). Dahingegen verläuft die Abspaltung der 3'-Laevulin-Schutzgruppe **40** nur mit einer Ausbeute von 16%. Die Abspaltung der 3'-Silyl-Gruppe **39** bereitete bei der Abspaltung mit Tetrabutylammoniumfluorid Schwierigkeiten, die in diesem Maße nicht zu erwarten waren.

### 3. Spezieller Teil



a.) ca. 3 M ammoniakalisches MeOH, 55°C, 16 h, 98%, b.) P-Reagenz II, DIPEA, ACN:DCM, RT, 1 h, 93%

**Abbildung 67:** Freisetzung der 3'-Schutzgruppe und Phosphitylierung des Dimers, zu der Verbindung **42**

Da durch die Zugabe von Molekularsieb zur Trocknung, die Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) Lösung destabilisiert und damit inaktiviert wird, wurden andere wasserfreie Lösungen für die quantitative Abspaltung untersucht:

- Pyridin / HF
- Triethylamin-tris-trihydrofluorid, N-Methylpyrrolidin, Triethylamin<sup>27</sup>

Die Fluorid-Komponenten wurden in verschiedenen Lösungsmitteln, Konzentrationen und bei unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt. Jedoch führte keine der oben genannten Fluorid-Quellen zu einem befriedigenden Ergebnis. Dabei ist zu bemerken, daß die entsprechenden Monomere **18** und **21** mit der 1 M TBAF-Lösung in THF sauber gespalten wurden, das entsprechende Dimer **39** allerdings mit der gleichen Lösung zu einer Reihe von Produkten umgesetzt wurde.

Die Entschützung der 3'-O-Benzoyl-Gruppe **38** erfolgte mit Ammoniak. Hier wurde eine etwa 3 M methanolische Ammoniak-Lösung verwendet (24 h bei Raumtemperatur), da nach der erfolgten Abspaltung die Lösung abgezogen werden konnte (Rotationsverdampfer) und das Produkt **41** direkt phosphityliert

<sup>27</sup> F. E. Wincott, N. Usman, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 74: Ribozyme Protocols, 58-68

wurde (wasserfreies Arbeiten). Die Ausbeuten für die letzten beiden Schritten, die Entschützung zu der Verbindung **41** und die Umsetzung zu dem phosphitylierten Produkt **42** verlaufen mit 93% und 87% Ausbeute (siehe *Abbildung 67.*).

Bei Berücksichtigung aller Syntheseschritte ergibt sich für die Synthese der Verbindung **42** eine Gesamtausbeute von 10%. Diese könnte eventuell durch eine modifizierte Schutzgruppenstrategie gesteigert werden.

Das Dimer **42** wurde ebenfalls als Amidit in das Modelloligodesoxynukleotid **69** eingebaut. Allerdings konnte hier festgestellt werden, daß die Ausbeute nicht wesentlich gegenüber dem Monomer verbessert werden konnte. Da die Synthesen sowohl für die Amidite **9** und **42** und das Modelloligodesoxynukleotids **69** in nicht befriedigender Ausbeute verlaufen, mußte nach weiteren Synthesealternativen gesucht werden.

#### 3.3.6 Synthesearbeiten mit der Verbindung 9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thiol (AXT) **27**

Die Freisetzungen der Thiole **19** – **21** verlaufen in nicht befriedigender Ausbeute, daher wurde zum Einen nach neuen 3'-Schutzgruppen (weitere Silyl-Schutzgruppen) und zum Anderen nach einer anderen Schwefel-Quelle gesucht. Der Schwefel kann nicht nur durch Triphenylmercaptan, Natriumthiobenzoat und Kaliumthioacetat eingeführt werden, es besteht ebenfalls die Möglichkeit, diesen über die Verbindung 9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thiol (AXT) **27** einzuführen. Diese Verbindung wird von

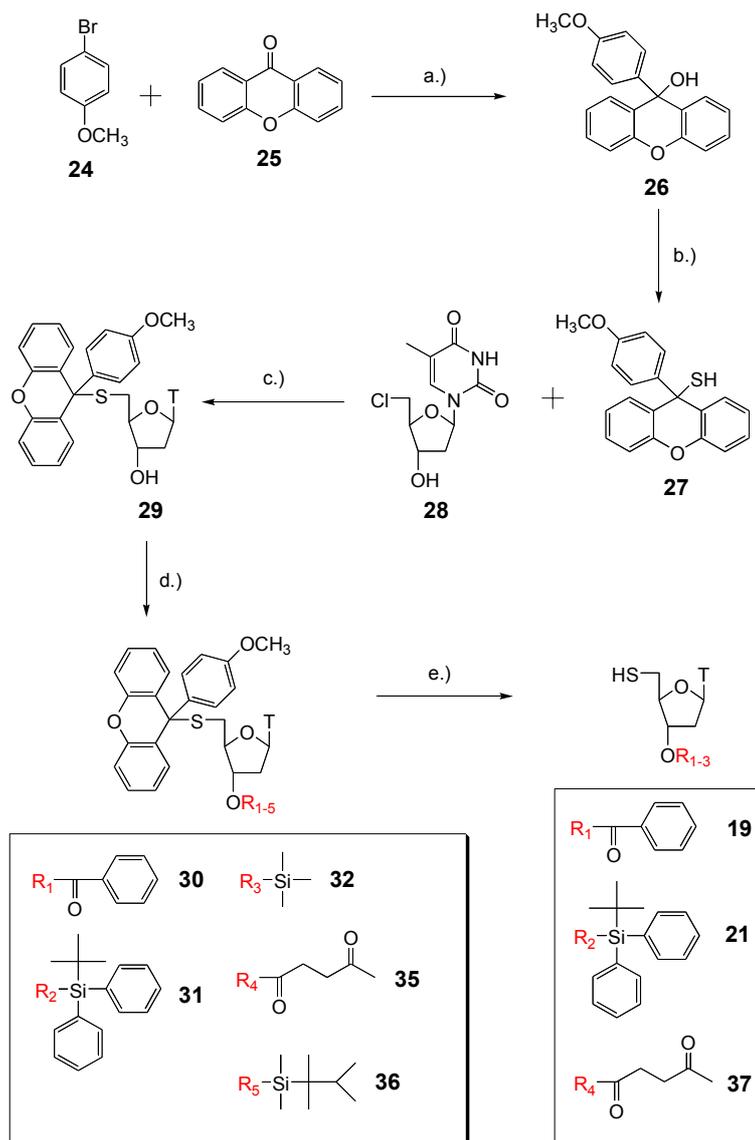
- R. Reese und seiner Gruppe für die Synthese verschiedener Schwefel-modifizierter Amidite (DNA und RNA) genutzt.
- M. Kwiatkowski<sup>28</sup> verwendet die AXT Schutzgruppe um synthetisierte RNA mit Hilfe der RP-HPLC aufzureinigen zu können. Hier konnte ebenfalls auf weitere Vorarbeiten von<sup>29</sup>:
- J. H. Marriott beschreibt die Synthese der Schutzgruppe (AXT) und die entsprechender 2'-Thio-RNA Bausteine sowie die Abspaltung der AXT Schutzgruppe im sauren Milieu. Im basischen Milieu beobachtet er die Bildung von Dimeren.
- P. R. J. Gaffney beschreibt ebenfalls die Derivatisierung von Nukleosiden mit AXT und die Stabilität der AXT-Gruppe gegenüber Säuren. Hier können folgende Abspaltungslösungen genutzt werden (RNA)
  - a. 2.5 eq Pyrrol (frisch destilliert) in Essigsäure bei 70°C für 2.5 h
  - b. 1.5 eq Phenol in TFA, Reflux für 2 h
  - c. Pyrrol in TFA, RT für 10 Minuten
  - d. Methanol, Silbernitrat, Pyridin ⇒ RT für 5 Minuten; Niederschlag in Methanol, Essigsäure und Schwefelwasserstoff ⇒ RT für 20 Minuten zurückgeriffen werden.

Hier muß allerdings beachtet werden, daß die RNA gegenüber der DNA eine höhere Stabilität unter sauren Bedingungen besitzt.

<sup>28</sup> M. Kwiatkowski, J. Chattopadhyaya; *Acta Chem. Scand.* **1984**, B 38, 657-671

<sup>29</sup> A.) J. H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (51), 7485-7488; B.) J. H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese; *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 257-269; C.) P. R. J. Gaffney, L. Changsheng, M V. Rao, C. B. Reese, J. G. Ward; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 6, 1355-1360

### 3. Spezieller Teil



a.) Mg, Diethylether, 68%; b.) Dichloressigsäure, DCM, H<sub>2</sub>S, RT, 1,5 h, 80%; c.) 1,1,3,3-Tetramethyl-guanidin, DMSO, RT, 3 h, 95%; d.) **30**: Benzoylchlorid, Pyridin, RT, 3 h, 93%, **31**: Imidazol, tert.-Butyldiphenylsilylchlorid, Pyridin, RT, 16 h, 92%, **32**: Imidazol, Trimethylsilylchlorid, Pyridin, RT, 16 h, 37%, **35**: DMAP, Laevulinsäureanhydrid, Pyridin, RT, 16 h, 77%, **36**: Imidazol, Chlor-dimethyl-thexylsilan, Pyridin, RT, 16 h, 94%; e.) **19**: I. Silbernitrat, Methanol, Pyridin II. Methanol, Essigsäure, H<sub>2</sub>S, RT, 76%, **21**: 53%, **37**: 24%

Abbildung 68: Synthesestrategie 5.

Das Thiol **27** kann mit 5'-Chlor-2'-desoxythymidin **28**<sup>30</sup> in DMSO durch die Zugabe der Base 1,1,3,3-Tetramethyl-guanidin in die Verbindung 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29** umgesetzt werden.

[Die Verbindung **28** entsteht bei der Umsetzung von 2'-Desoxythymidin **1** mit Tetrachlorkohlenstoff und Triphenylphosphin in 73%iger Ausbeute. Ein alternativer

<sup>30</sup> J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt; J. Org. Chem. **1972**, 37 (14), 2289-2299

### 3. Spezieller Teil

Syntheseweg von K. Kigugawa<sup>31</sup> für den entsprechenden 5'-Halogen modifizierten Baustein konnte hier nicht nachvollzogen werden. Er setzt das entsprechende 5'-Hydroxyl-Nukleosid mit Thionylchlorid in HMPT zu der entsprechenden 5'-Halogen-Verbindung um. Aufgrund der stark krebserregenden Wirkung von HMPT, sollte dieses nur im Ausnahmefall verwendet werden, der Ersatz des Lösungsmittels HMPT durch DMF, führt allerdings nicht zu dem gewünschten Produkt.

J. P. Neenan<sup>32</sup> beschreibt die Umsetzung von 5'-O-Tosyl-2'-desoxythymidin **2** mit Natriumchlorid in DMF bei 120°C für 2 h, die Literaturlausbeute dieser Reaktion beträgt allerdings nur ca. 25%.]

Die Verbindung **29** wird nach der Reinigung durch eine Säulenchromatographie in 95% iger Ausbeute isoliert. Während der Aufarbeitung der Reaktion sollte auf eine gute Belüftung des Scheidetrichters geachtet werden, da sich hier ein extrem hoher Druck bei der Extraktion aufbaut.

Die Verbindung **29** kann in einer Gesamtsyntheseausbeute von 52% aus den Verbindungen **24** und **25** hergestellt und mit den folgenden Chemikalien in Pyridin umgesetzt werden:

Benzoylchlorid<sup>33</sup> ⇒ **30** (93%),

tert.-Butyl-diphenylchlorsilan<sup>34</sup> ⇒ **31** (92%),

Trimethylsilylchlorid ⇒ **32** (37%),

Laevulinsäureanhydrid<sup>35</sup> ⇒ **35** (77%),

Chlor-dimethyl-thexylsilan ⇒ **36** (94%)

Verbindungsnummer	Gesamtausbeute <sup>a</sup>
<b>30</b>	48%
<b>31</b>	48%
<b>32</b>	19%
<b>35</b>	40%
<b>36</b>	49%

<sup>a</sup> Die Ausbeute der Verbindung **28** 5'-Chlor-2'-desoxythymidin wurde hier nicht berücksichtigt.

Tabelle 10: Gesamtsyntheseausbeuten der Verbindungen **30** – **32**, **35** und **36**

Für die Abspaltung der AXT-Schutzgruppe stehen verschiedene Abspaltungsmethoden zur Verfügung. Außer der Freisetzung mit Silbernitrat kann die Abspaltung ebenfalls mit Säuren z.B. auch Pyrrol in Essigsäure durchgeführt werden. Festzustellen ist hier, daß die verwendeten Silyl-Schutzgruppen (-OTMS und -OTDS) der Verbindungen **32** und **36** unter den verwendeten Abspaltungsbedingungen nicht stabil sind, sie zersetzen sich. Die Verbindung **35** wurde, mit Silbernitrat behandelt und das freie Thiol **37** in 24% iger Ausbeute

<sup>31</sup> K. Kigugawa, M. Ichino; *Tetrahedron Lett.* **1971**, 2, 87-90

<sup>32</sup> J. P. Neenan, W. Rohde; *J. Med. Chem.* **1973**, 16, 580-581

<sup>33</sup> E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558

<sup>34</sup> T. Szabó, J. Stawinski; *Tetrahedron* **1995**, 51 (14), 4145-4160

<sup>35</sup> A.) K. K. Ogilvie, M. J. Nemer, G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, M. Lucas; *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23 (26), 2615-2618; B.) J. H. van Boom, P. M. J. Burgers; *Tetrahedron Lett.* **1976**, 52, 4875-4878, C.) H. J. Koeners, J. Verhoeven, J. H. van Boom; *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 381-382; D.) A. Hassner, G. Strand, M. Rubinstein, A. Patchornik; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1614-1615

### 3. Spezieller Teil

isoliert<sup>36</sup>. Die Reaktion der Verbindungen **19**, **21** und **37** mit dem T-Amidit **22** zu dem entsprechenden Dimer wurde zuvor schon beschrieben (*Abbildung 66.*). Die Verwendung der 5'-AXT-Schutzgruppe birgt hier gegenüber der 5'-S-Trityl-Gruppe keinen Vorteil.

Ein entsprechend modifiziertes 5'-S-[9-(4-methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropyl-phosphit) **43** kann durch die Umsetzung der Verbindung **29** mit Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid in 81% iger Ausbeute isoliert werden. Setzt man dieses Amidit **43** in den Phosphoramidit-Syntheszyklus ein, mußte festgestellt werden, daß die Verbindung zwar erfolgreich gekoppelt werden (Detektion per MS-Spektrometrie) kann, aber eine Abspaltung der AXT-Gruppe mit dem Detritylierungsreagenz (3% DCA in DCM) nicht vollständig möglich ist. Die Labilität der AXT-Gruppe gegenüber der Detritylierungs-Lösung ist zu gering.

#### 3.3.7 Synthese des modifizierten A-Derivates

Da im Rahmen dieser Arbeit nicht nur das entsprechend modifizierte T-Amidit **9** hergestellt werden sollte, wurde nun versucht die bisher ausgearbeiteten Synthesestrategien für den modifizierten T-Baustein **9** auf den entsprechend modifizierten A-Baustein zu übertragen:

- Tosylierung der 5'-Position
- Umwandlung des Sulfonyl-Esters mit einem Thioester bevorzugt Kaliumthioacetat
- Deacetylierung mit einer 1 M methanolischen HCl
- Schützung der 5'-Position mit der DMTr-Gruppe
- Einführung einer Schutzgruppe in der Nukleobase und
- die Aktivierung der 3'-Position

*Abbildung 69.* zeigt die ersten Syntheseveruche für den entsprechend modifizierten A-Baustein auf.

2'-Desoxyadenosin **44** wird mit p-Toluolsulfonsäure in Pyridin in 43% iger Ausbeute zu dem Produkt **46** 5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxyadenosin umgesetzt. Die Ausbeute dieser Standardreaktion ist so gering, da zum Einen das disubstituierte Produkt entsteht (5'- und 3'-Tosylierung) und zum Anderen die Amino-Gruppe der Nukleobase ebenfalls reagiert.

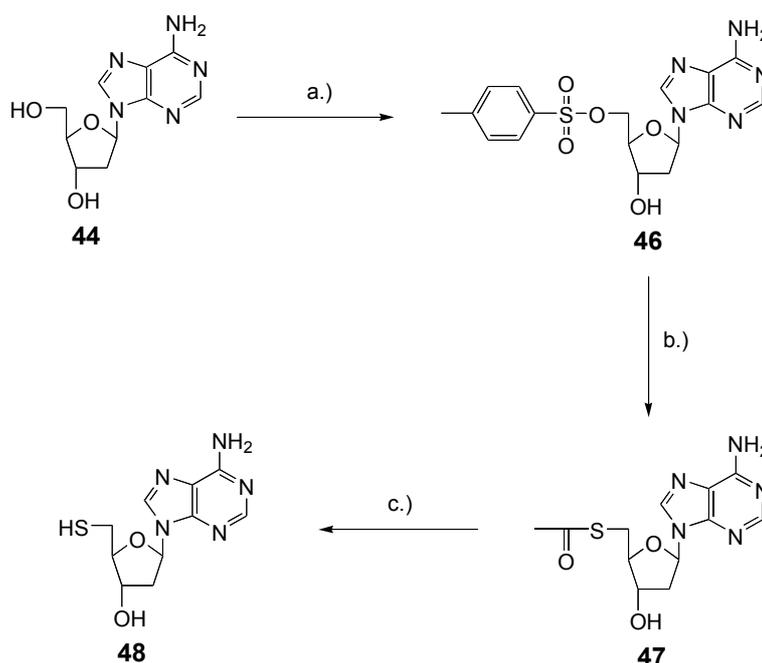
R. Kuhn<sup>37</sup> beschreibt schon 1965 die Synthese von 5'-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxyadenosin **46** in drei Syntheseschritten mit einer durchschnittlichen Ausbeute von je 75% pro Syntheseschritt, was ebenfalls zu einer Gesamtausbeute von ca. 42% führt. Um die Nebenreaktion an der Nukleobase zu unterbinden, sollte die Amino-Gruppe der Nukleobase zuerst geschützt werden, allerdings würde die dabei verwendete Benzoyl-Schutzgruppe während der Debenzoylierung (Verseifung) mit der 1 M methanolischen HCl abgespalten werden. Die Wahl einer alternativen Schutzgruppenstrategie für diesen Baustein, wäre ein möglicher Weg. Allerdings muß hierbei beachtet werden, daß die entsprechende Schutzgruppe nach einer erfolgten Oligodesoxynukleotid-Synthese mit einer 25% igen Ammoniaklösung abspaltbar sein sollte, dies limitiert die

<sup>36</sup> A.) R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K. J. Divakar, A. Mottoh, C.B. Reese, Y. S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974

<sup>37</sup> R. Kuhn, W. Jahn; *Chem. Ber.* **1965**, 98, 1699-1704

### 3. Spezieller Teil

Auswahl der möglichen Schutzgruppen. Eine Benzoylierung zu einem späteren Zeitpunkt um das Nucleosid im Phosphoramidit-Syntheszyklus verwenden zu können, ist zum Beispiel noch nach der Tritylierung möglich.



a.) p-Toluolsulfonsäurechlorid, Pyridin, 4°C, über Nacht, 43%; b.) Acetanhydrid, Pyridin, RT, 16 h, 24%; c.) Kaliumthioacetat, Aceton, 50°C, 3-5 h, RT, über Nacht; d.) 1 M methanilische HCl, 45°C, 2 h

Abbildung 69: Syntheseversuche zur Herstellung des modifizierten A-Amidits

Für erste orientierende Experimente wurde die Verbindung **46** mit Kaliumthioacetat in Aceton umgesetzt. Das Produkt **47** konnte allerdings nur in 24% iger Ausbeute gewonnen werden. Noch problematischer gestaltete sich jedoch die Deacetylierung der Verbindung **47** zu dem freien Thiol **48**. In verschiedenen Abspaltungsversuchen mußte festgestellt werden, daß unter sauren Bedingungen die Depurinierung überwiegt, während unter basischen Bedingungen die Dimerbildung präferiert wird. Dieses Ergebnis konnte durch die Arbeiten von E. J. Reist und N. Miller bestätigt werden. In den entsprechenden Publikationen<sup>38</sup> finden sich Verweise auf eine überwiegende Dimerausbildung bei Reaktionen, die bei pH-Werten größer 7 durchgeführt wurden.

Hier soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß in einigen anderen Publikationen<sup>39</sup> der starke Einfluß des pH-Wertes, in Bezug auf die Dimerausbildung nicht beobachtet werden konnte. Die Wahl des pH-Wertes spaltet die Synthetiker anscheinend in zwei Lager, genauso wie die Spaltungsreaktion der P-S- oder C-S-Bindung durch Jod. Die von S. Hecht publizierte Synthese für den entsprechenden 5'-S-DMT-geschützten A-Baustein konnte hier nicht nachvollzogen werden<sup>40</sup>.

<sup>38</sup> A.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; B.) N. Miller, J.J. Fox; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 1772-1775

<sup>39</sup> R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4) 829-835

<sup>40</sup> K. A. Henningfeld, T. Arslan, S. M. Hecht; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11701-11714

### 3. Spezieller Teil

Hiermit kann festgestellt werden, daß die Synthese des T-Amidits unter den zuvor vorgestellten Reaktionsbedingungen möglich ist, daß das A-Amidit allerdings auf diese Weise nicht dargestellt werden kann. Es mußte daher eine weitere Synthesemöglichkeit gefunden werden, die die Synthese aller vier modifizierten Amidite in befriedigender Ausbeute ermöglicht.

#### 3.3.8 Synthesestrategie 5. für die Verbindungen **9, 66-68** (5-S-DMT-modifizierte Amidite)

Da die 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe als temporäre 5'-Schutzgruppe im Phosphoramidit-Synthesesyklus verwendet wird, wäre es wünschenswert, diese Gruppierung als Schwefel-Quelle verwenden zu können. In den bisherigen Synthesearbeiten wurde die Gesamt-Syntheseausbeute durch den Schritt der Schwefeinführung und der Thiolfreisetzung minimiert. Durch die Verwendung der 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe als Schwefel-Quelle sollte daher die Synthese des T-Bausteins in einer höheren Ausbeute und die Synthese der anderen drei modifizierten Bausteine möglich sein.

Die Umwandlung der Verbindung 9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-ol **26** in das 9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-thiol **27** diente hier als Grundlage für die folgenden Synthesearbeiten.

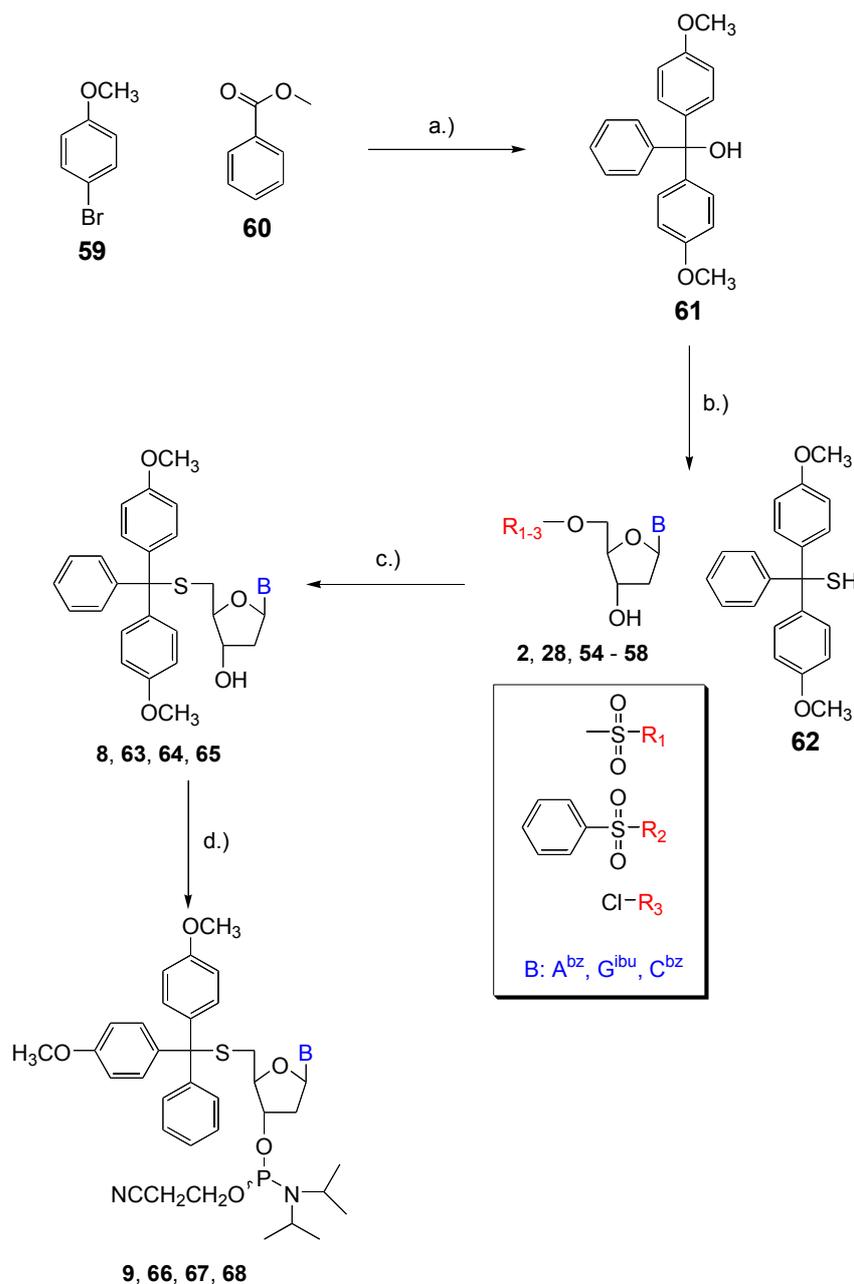
In einer Grignard Reaktion wird p-Bromanisol **59** mit Benzoesäuremethylester **60** in THF umgesetzt. Das gewünschte Produkt **61** 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanol kann in 95% iger Ausbeute isoliert werden. Die Verbindung 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol **62** kann durch die Umsetzung von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanol **61** oder 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid mit DCA und Schwefelwasserstoff in DCM hergestellt werden. Die Umsetzung erfolgt in 85% iger Ausbeute. Hiermit steht nun eine Schwefel-Quelle zur Verfügung, die die Synthese der entsprechend modifizierten Amidite ermöglichen sollte.

Das 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol **62** kann mit entsprechend 5'-modifizierten (aktivierten) Nucleosiden **2, 28, 54-58** durch die Zugabe von 1,1,3,3-Tetramethyl-guanidin umgesetzt werden. Die entstandenen 5'-DMTr-S-Nucleoside **8, 63-65** können mit einem Phosphitierungsmittel zu den entsprechenden Amiditen **9, 66-68** reagieren.

5'-X-Nucleosid Eduktnummer	5'-DMTr-S-Nucleosid		Phosphitierung	
	Ausbeute	Nr.	Ausbeute	Nr.
5'-OTos-T <b>2</b>	94%	<b>8</b>	73%	<b>9</b>
5'-Cl-T <b>28</b>	64%			
5'-OMes-T <b>58</b>	98%			
5'-OTos-A <sup>bz</sup> <b>54</b>	94%	<b>63</b>	68%	<b>66</b>
5'-OMes-A <sup>bz</sup> <b>55</b>	41%			
5'-OMes-G <sup>ibu</sup> <b>56</b>	45%	<b>64</b>	72%	<b>67</b>
5'-OMes-C <sup>bz</sup> <b>57</b>	82%	<b>65</b>	76.4%	<b>68</b>

Tabelle 11: Syntheseausbeuten

### 3. Spezieller Teil



a.) Magnesium, Diethylether, 95%; b.) Dichloressigsäure, DCM, H<sub>2</sub>S, 1,5 h, 85%, c.) 1,1,3,3-Tetramethyl-guanidin, DMSO, RT, 3h, **8**: 64-98%, **63**: 41-94%, **64**: 45%, **65**: 82%; d.) P-Reagenz I, DIPEA, DCM:ACN, RT, 1 h, **9**: 73%, **66**: 68%, **67**: 72%, **68**: 76%

Abbildung 70: Synthesestrategie 5.

Hier kann festgestellt werden, daß in einer vierstufigen Synthese (die Synthese des 5'-geschützten Nucleosids nicht eingerechnet) das entsprechende Amidit in einer Gesamtausbeute zwischen 23% (5'-OMes-A<sup>bz</sup> **55**) und 58% (5'-OMes-T **58**) hergestellt werden kann. Die Ausbeuten für die Synthesen der entsprechenden 5'-geschützten Nucleoside sind vermutlich noch zu verbessern. Hier traten vor allem Verluste (Löslichkeit und Auskristallisieren) während der Säulenchromatographie auf, die durch die Auswahl eines anderen Laufmittels unter Umständen zu beheben sind.

### 3. Spezieller Teil

Um die erzielten Ausbeuten zu erhöhen, ist die Verwendung anderer Basen- und 5'-Schutzgruppen ebenfalls denkbar. Da die Ausbeuten der 5'-Schützung (gute Abgangsgruppe) ebenfalls von der verwendeten Schutzgruppe an der Nukleobase abhängen, müssen diese mit Bedacht ausgewählt werden. Die Löslichkeit des an der Nukleobase geschützten Nukleosids, beeinflusst die weitere Reaktivität der Verbindung.

Mit Hilfe dieser Synthesemöglichkeit (Synthesestrategie 5.) besteht nun die Möglichkeit, alle vier modifizierten 5'-Thio-Amidite **9**, **66-68** in zufriedenstellender Ausbeute herzustellen. Zudem ist es nun möglich, an jeder beliebigen Stelle eines Oligodesoxynukleotids die gewünschte Modifikation einzubauen.

#### 3.4 Oligodesoxynukleotid-Synthese **69-90**

Die Oligodesoxynukleotide **69-90** für dieses Projekt wurden an einem ABI 394 von *Applied Biosystem* oder an einem Expedite von *Perseptive Biosystem* Synthesizer hergestellt. Für die Synthese wurden unterschiedliche Synthesesyklen verwendet. Aufgrund der größeren Variabilität des Gerätes, wurden die Kopplungen der modifizierten Bausteine am ABI 394 vorgenommen. Die unmodifizierten Amidite wurden am Perseptive Biosystem gekoppelt (kürzere Synthesesyklen).

Das Modelloligodesoxynukleotid **69**



wurde daher in drei Teilschritten synthetisiert:

Syntheseschritt	Synthetisierte Sequenz	Verwendeter Synthesizer
<b>69-1</b>	5'-TGA CGG TAT ATC T-3'	Perseptive
<b>69-2</b>	5'-TT-3'	ABI 394
<b>69-3</b>	5'-AGC CCT TAC TT-3'	Perseptive

*Tabelle 12:* Modelloligodesoxynukleotid **69**

Bei den hier verwendeten Synthesesyklen handelt es sich um bereits für die beiden Synthesizer optimierte Synthesesyklen, die zu besseren Ausbeuten gegenüber den vom Hersteller angegebenen Protokollen führen.

Verwendeter Synthesizer	Zyklusname (Nr.)
Perseptive	MOSS thio 1µm TEG-ver 2 (1)
ABI 394	1µmol-teg-2 (2)

*Tabelle 13:* Verwendeter Synthesizer und Zyklen

Nach der Kopplung des modifizierten Bausteins **T (9)** ist bei dem folgenden Detritylierungsschritt zuerst keine Orangefärbung zu erkennen. Diese tritt erst

### 3. Spezieller Teil

zeitverzögert auf, so daß der verwendete Zyklus für eine vollständige Detritylierung weitergehend modifiziert werden mußte. Die Zufuhr der TCA Lösung wurde auf jeweils 30 Sekunden und die Hold-Time ebenfalls auf 30 Sekunden verlängert.

Verwendeter Synthesizer	Zyklusname (Nr.)
ABI 394	1µmol-teg-2 (3)

Tabelle 14: Verwendeter Synthesizer und Zyklus

Die aufgenommenen HPL-Chromatogramme der Roholigodesoxynukleotide **69-a**, **69-b** und **69-c** (DMT-on Synthese) sahen sehr viel versprechend aus. Da im HPL-Chromatogramm nur ein sehr geringer Anteil an Abbruchsequenzen zu detektieren waren (siehe *Abbildung 71.*), wurden die Roholigodesoxynukleotide direkt für die ersten Spaltungsexperimente in Lösung verwendet.

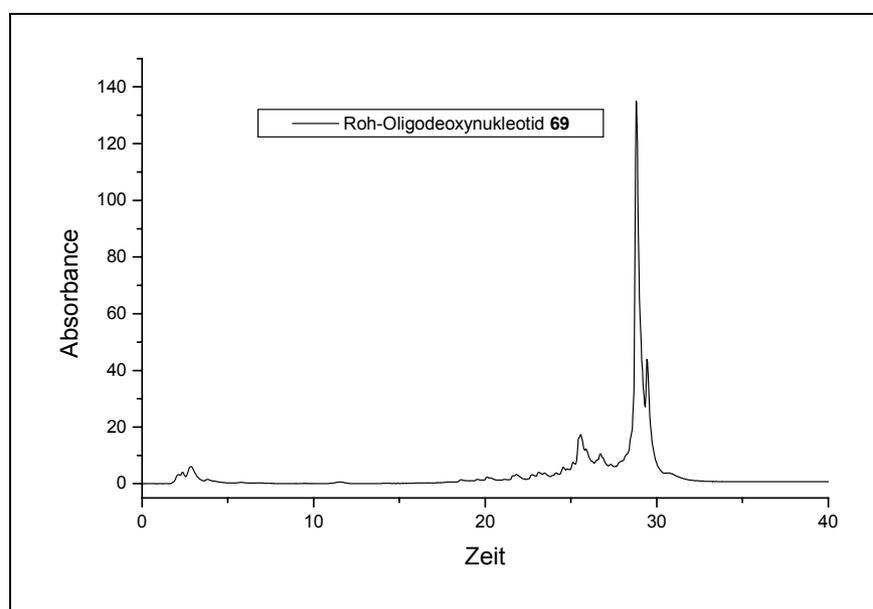


Abbildung 71: HPL-Chromatogramm Oligodesoxynucleotid **69-a** (Rohspektrum)

#### 3.4.1 Bildung des Nebenproduktes **70**

Hier mußte festgestellt werden, daß die gewünschte Spaltung nicht quantitativ verlief. Daher wurden die Roholigodesoxynukleotide **69** mit Hilfe der HPLC-Chromatographie aufgereinigt. Zudem wurde von den Roholigodesoxynukleotiden ein Massenspektrum aufgenommen und die Fraktionen der HPLC-Reinigung mit Hilfe der Gelelektrophorese eingehender untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß außer dem gewünschten Produkt, noch ein zweites Produkt in hoher Ausbeute entsteht. Es handelt sich hierbei vermutlich um ein Dimer, daß sich nach der erfolgten Detritylierung des modifizierten Bausteins bildet.

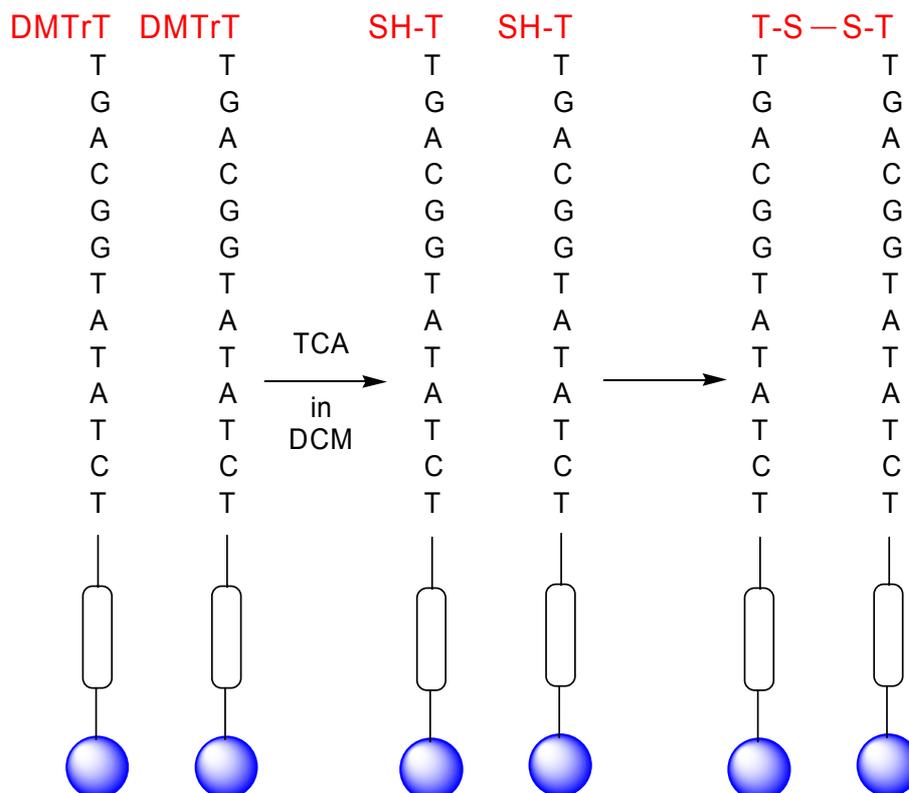


**70**

Sowohl die Gelelektrophorese der HPLC-Fraktionen und das gemessene Massenspektrum bestätigen, daß es sich bei dem Nebenprodukt um das Dimer **70**

### 3. Spezieller Teil

handelt. Die Bildung des Dimers kann schematisch in folgender Weise erklärt werden (siehe *Abbildung 72*):



*Abbildung 72*: Entstehung des Dimer **70** (Nebenreaktion am CPG Material)

#### 3.4.2 Synthesearbeiten

Nach der erfolgten Kopplung des modifizierten Amidits **T**, erfolgt die Detritylierung (3% DCA in DCM) um die nächste Kopplung durchführen zu können. Durch die Detritylierung entstehen auf dem CPG-Material freie Thiol-Gruppen. Diese sind so reaktiv, daß sich noch während der anschließenden Waschschritte Disulfid-Verbrückungen (Dimer) ausbilden. Stränge, bei denen dies geschieht, stehen damit nicht mehr für die weitere Synthese zur Verfügung. Daher nimmt die Ausbeute an der gewünschten Sequenz rapide ab. Nach der erfolgten Synthese entstehen damit bei der Entschützung mit Ammoniak (Abspaltung vom CPG-Material, Abspaltung der Basen- und Phosphor-Schutzgruppen) zwei Hauptprodukte, das Dimer **70** und das gewünschte Oligodesoxynukleotid **69**.

Oligodesoxynukleotid	Retentionszeit Analytik (min)	Berechnete Masse	Gefundene Masse
<b>69</b>			
Roh	28.82; 29.45	7309.8	7308.34 + 8567.03
Gereinigt	28.70	7309.8	7309.56
Nebenprodukt	-	8569.8	8565.64

*Tabelle 15*: Charakteristische Daten für das Oligodesoxynukleotid **69**

Um diese Theorie zu untermauern, wurden die folgenden drei Oligodesoxynukleotide synthetisiert,

### 3. Spezieller Teil



mit Hilfe der RP-HPLC gereinigt (DMT-on) und die Ausbeuten der einzelnen HPLC-Fractionen bestimmt.

Bei den vorderen HPLC-Fractionen sollte es sich dabei um die entsprechenden Dimere handeln (DMT-off), die hinteren Fractionen sollten dem gewünschten 5'-DMT geschützten Produkt entsprechen (siehe *Tabelle 16.*).

Oligodesoxynukleotid HPLC-Fr.	Gesamt Roh-O.D.	Isolierte Ausbeute <sup>a</sup>	Verhältnis Vordere: Hintere <sup>b</sup>	Berechnete Masse g/mol	Gemessene Masse g/mol
Vordere <b>74-a</b>	101	9 O.D. 9%	1 : 3.4	-	-
Hintere <b>74-a</b>		30.2 O.D. 30%		4284.9	4283.88
Vordere <b>74-b</b>	92.3	7.0 O.D. 8%	1 : 2.9	-	-
Hintere <b>74-b</b>		20.6 O.D. 22%		4284.9	4283.88
Vordere <b>75-a</b>	89.3	20.8 O.D. 23%	1 : 1.4	8023.4	8050.47
Hintere <b>75-a</b>		28.5 O.D. 32%		4284.9	4283.81
Vordere <b>75-b</b>	92.1	19.8 O.D. 22%	1 : 1.2	8023.4	8050.47
Hintere <b>75-b</b>		24.4 O.D. 27%		4284.9	4283.81
Vordere <b>76</b>	103	40.4 O.D. 39%	1 : 1.1	14005.2	14044.74
Hintere <b>76</b>		44.5 O.D. 43%		7284.8	7283.08

<sup>a</sup>: Bezogen auf die gemessenen Roh-O.D.

<sup>b</sup>: Bezogen auf die Ausbeuten der vorderen HPLC-Fraktion (Nebenprodukt) und der hinteren HPLC-Fraktion (Produkt).

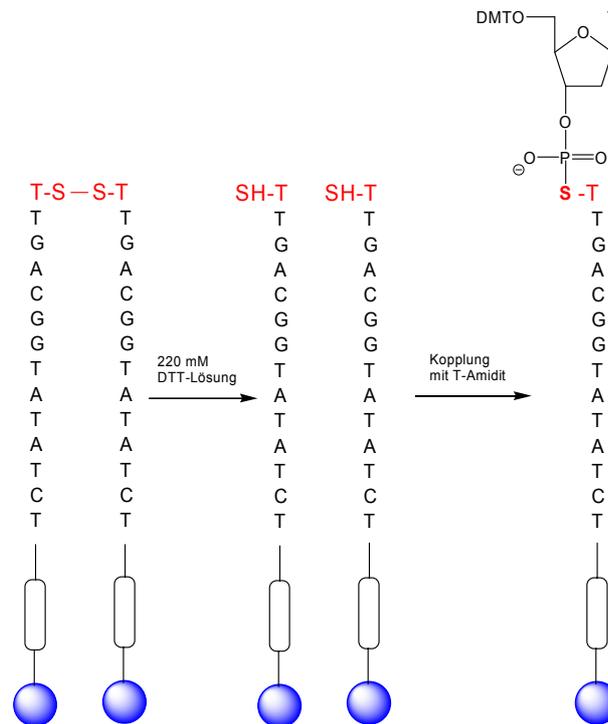
*Tabelle 16:* Ausbeuten und gemessene Massen der Oligodesoxynukleotide **74-76**

Dabei ist zu beobachten, daß der Anteil an dem disulfid-verbrückten Oligodesoxynukleotid steigt, je weiter die entsprechende Modifikation vom Träger entfernt eingebaut wird (Flexibilität des immobilisierten Stranges steigt). Die analytischen Daten der *Tabelle 16.* (Ausbeuten, Gelelektrophorese, Massenspektrometrie) bestätigen diese Theorie.

Der Anteil an dem ungewünschten Dimer steigt ebenfalls, je höher die Beladungsdichte des CPG Material ist. Daher sollte im Rahmen dieses Projektes auf hochbeladene Trägermaterialien verzichtet werden. Nachdem eine Erklärung für die geringe Ausbeute an dem gewünschten Produkt gefunden wurde, galt es diese zu erhöhen. Dazu mußten die gebildeten Disulfid-Verbrückungen vor dem nächsten Kopplungsschritt gelöst werden, so daß das freie 5'-Thiol für die

### 3. Spezieller Teil

Kopplung mit dem folgenden Amidit zur Verfügung stand (siehe *Abbildung 73*). Nur so kann die Ausbeute an dem gewünschten Produkt positiv beeinflusst werden.



*Abbildung 73:* Reduktion des Dimers und anschließende Kopplung des T-Bausteins im Phosphoramidit-Synthesezyklus

Der erste Versuch der hierfür unternommen wurde, bestand in der Zugabe eines Reduktionsmittels zu der Detritylierungslösung (3% DCA in DCM). Als Reduktionsmittel kommt hier DTT in Frage, das 220 mM der Detritylierungslösung zugesetzt wird. Der verwendete Synthesezyklus war: 1  $\mu$ mol-teg-mod (**3**)

Oligodesoxy-nukleotid HPLC-Fr.	Roh-O.D.	Isolierte Ausbeute	Verhältnis Vorderere: Hintere	Berechnete Masse g/mol	Gemessene Masse g/mol
Vordere <b>69-d</b>	79.1	31.9 O.D. 40%	1.29 : 1	8569.8	8568.28
Hintere <b>69-d</b>		22.8 O.D. 29%		7309.8	7309.87

*Tabelle 17:* Ausbeuten und gemessene Massen des Oligodesoxynucleotids **69**

Die Roh-Ausbeute ist hier sehr niedrig, normalerweise sollte man bei einem Oligodesoxynucleotid dieser Länge und Sequenz eine Roh-Ausbeute von über 100 O.D. erwarten können. Zudem zeigt sich, daß die Bildung des Dimers auf diese Art nicht unterbunden werden kann. Ganz im Gegenteil, es entsteht prozentual ein höherer Anteil an dem Dimer **70**, als an dem gewünschten Produkt **69**.

Anstatt das Reduktionsmittel in die Detritylierungslösung zu geben, wurde es in der folgenden Synthese erst im Anschluß an die Detritylierung auf die Säule gegeben. Um nicht mit einer rein wässrigen Lösung arbeiten zu müssen, wird das

### 3. Spezieller Teil

DTT in einer Lösung aus THF/Pyridin/Wasser 7/2/1 gelöst. Eine entsprechende Zusammensetzung weist die im Syntheszyklus ebenfalls verwendete Oxidationslösung auf.

Der Syntheszyklus wird entsprechend verändert, so daß sich der Detritylierung ein Reduktionsschritt von 10 Minuten und verschiedene Waschschrte anschließen.

Oligodesoxy-nukleotid HPLC-Fr.	Roh-O.D.	Isolierte Ausbeute	Verhältnis Vordere: Hintere	Berechnete Masse g/mol	Gemessene Masse g/mol
Vordere <b>69-e</b>	109.7	9.1 O.D. 8%	1 : 3.9	8569.8	8568.38
Hintere <b>69-e</b>		35.7 O.D. 35%		7309.8	7309.82
Vordere <b>69-f</b>	108.8	24.7 O.D. 25%	1 : 2.7	8569.8	8568.38
Hintere <b>69-f</b>		66.1 O.D. 61%		7309.8	7309.82

*Tabelle 18:* Ausbeuten und gemessene Massen des Oligodesoxynukleotids **69**

Die Ausbeute des gewünschten Produktes konnte durch den Reduktionsschritt nach der Detritylierung wesentlich gesteigert werden (siehe *Tabelle 18.*). Um zu überprüfen, ob die Ausbeute bei dem Oligodesoxynukleotid



ebenfalls gesteigert werden kann, wurde dieses mit dem modifizierten Syntheszyklus 1µmol-teg-mod-red (**4**) synthetisiert.

Oligodesoxy-nukleotid HPLC-Fr.	Roh-O.D.	Isolierte Ausbeute	Verhältnis Vordere: Hintere	Berechnete Masse g/mol	Gemessene Masse g/mol
Vordere <b>75-c</b>	84.6	7.8 O.D. 9%	1 : 5.5	8569.8	8568.38
Hintere <b>75-c</b>		42.9 O.D. 51%		7309.8	7309.82

*Tabelle 19:* Ausbeuten und gemessene Massen des Oligodesoxynukleotids **75**

Wie die Ergebnisse in *Tabelle 19.* zeigen, konnte das Verhältnis der Ausbeute von 1:1.2 (ohne Reduktion) auf 1:5.5 (mit Reduktion) gesteigert werden.

Da mit Hilfe des modifizierten Syntheszyklus 1µmol-teg-mod-red (**4**) die Synthese von chemisch selektiv spaltbaren Oligodesoxynukleotiden möglich ist (siehe *Tabelle 20.*), sollte im Anschluß die Spaltung dieser untersucht werden. *Tabelle 20.* zeigt die für dieses Projekt synthetisierten Oligodesoxynukleotide.

Oligodesoxynukleotid (Nr.)
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>69</b> <sup>a</sup>
5'-TAT ACC GTC AAA GTA AGG-3' <b>71</b>
5'-AGC CCT TAC T-3' <b>72</b>

### 3. Spezieller Teil

5'-TTG ACG GTA TAT CT-3'	<b>73</b>
5'-TTG ACG GTA TAT CT-3'	<b>74<sup>a</sup></b>
5'-TTG ACG GTA TAT CT-3'	<b>75<sup>a</sup></b>
5'-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'	<b>76<sup>a</sup></b>
5'-Amino-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'	<b>77</b>
5'-Biotin-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'	<b>78</b>
5'-Amino-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'	<b>79<sup>a</sup></b>
5'-Biotin-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'	<b>80<sup>a</sup></b>
5'-GCA GCT AGA TAT ACC GTC AA-3'	<b>81</b>
5'-CAG CTA GAT ATA CCG TCA AA-3'	<b>82</b>
5'-AGC TAG ATA TAC CGT CAA AG-3'	<b>83</b>
5'-GCT AGA TAT ACC GTC AAA GT-3'	<b>84</b>
5'-CTA GAT ATA CCG TCA AAG TA-3'	<b>85</b>
5'-TAG ATA TAC CGT CAA AGT AA-3'	<b>86</b>
3'-AGA TAT ACC GTC AAA GTA AG-3'	<b>87</b>
3'-GAT ATA CCG TCA AAG TAA GG-3'	<b>88</b>
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'	<b>89</b>
5'-AGC CCT TAC (TT)T GAC GGT ATA TCT-3'	<b>90<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup> : T ⇒ Amidit **9**; <sup>b</sup>: (TT) ⇒ Dimer **42**

Tabelle 20: Synthetisierte Oligodesoxynukleotide **69**, **71-90**

### 3.5. Spaltungsreaktionen

Das Oligodesoxynukleotid 5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' **69** dient hier als Modelloligodesoxynukleotid, an dem die Spaltung in Lösung und an der festen Phase untersucht werden sollte. Die Spaltung der P-S und C-S-Bindung ist bereits literaturbekannt und wurde im Arbeitskreis von Prof. Engels, Universität Frankfurt bereits erfolgreich durchgeführt<sup>41</sup>. Bei der Behandlung des Oligodesoxynukleotids **69** mit Silber- oder Quecksilber Salzen sollten die folgenden Spaltungsprodukte **91** und **92** entstehen (siehe Abbildung 74.).

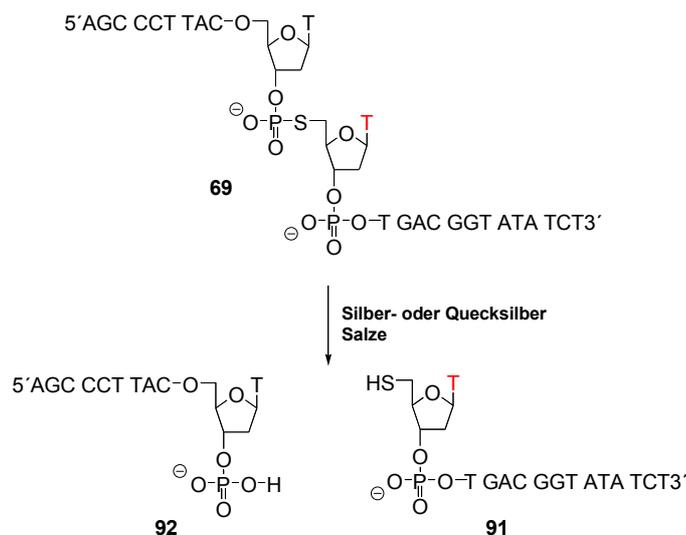


Abbildung 74: Spaltung des Oligodesoxynukleotids **69**

<sup>41</sup> M. Mag, S. Lücking, J.W. Engels, *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7), 1437-1441

### 3.5.1 Spaltungsreaktion in Lösung

Die ersten orientierenden Spaltungstests wurden in Lösung durchgeführt und die entstehenden Spaltungsprodukte wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese und der HPL-Chromatographie untersucht.

Wird das Oligodesoxynukleotid **69** an der gewünschten Stelle geschnitten, entsteht aus dem 24 mer



ein 10 mer **72** und ein 14 mer **73**.

Für die Detektion der entsprechenden Spaltungsprodukte wurden daher die folgenden zwei Kontrollen **72** und **73** für die Gelelektrophorese und das unmodifizierte Oligodesoxynukleotid **89** (Kontrolle) synthetisiert.



Zur Vereinfachung, wurde das 14 mer **73** nicht als 5'-Thiol hergestellt, da dieses vermutlich nur durch die Zugabe von DTT stabil gelagert werden kann. Im Gel sollte die Verbindung **73** identische Laufeigenschaften besitzen, wie das entstehende Spaltungsprodukt **91**. Auf die Einführung der 3'-Phosphat-Gruppe bei dem Oligodesoxynukleotid **72** wurde ebenfalls verzichtet. Die ersten Spaltungsexperimente wurden mit den Roh-Oligodesoxynukleotiden **69 a-c** durchgeführt.

Die Spaltungsexperimente gestalten sich in der Regel wie folgt:

Für die Spaltung wird 1 O.D des entsprechenden Oligodesoxynukleotids in 20 µl Wasser gelöst und mit 10µl einer 50 mM Silbernitrat-Lösung versetzt. Um die Probe zu quenchen werden 2.5 µl einer 220 mM DTT-Lösung zugesetzt und die Probe nach 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand kann mit Hilfe der Gelelektrophorese, der HPL-Chromatographie und der Massenspektrometrie untersucht werden.

Für die Roh-Oligodesoxynukleotide **69 a-c** konnten zwei Beobachtungen gemacht werden. Zum Einen wurde die Spaltung mit Hilfe der Gelelektrophorese detektiert, laut dieser fand eine vollständige Spaltung des Rohproduktes statt (stark denaturierende Bedingungen). Zum Anderen diente die HPL-Chromatographie zur Untersuchung der durchgeführten Spaltung. Allerdings konnte hier festgestellt, daß nur etwa 55% des Edukts gespalten wurde (siehe *Abbildung 75*).

Daher wurden die Roh-Oligodesoxynukleotide (DMT-on) **69 a-c** mit Hilfe der RP-HPLC gereinigt (gegenüber der Gen-Pak Fax-Säule ist hier eine Trennung möglich) und die Fraktionen per Gelelektrophorese (siehe *Abbildung 76*.) und Massenspektrometrie untersucht. Wie bei der Synthese der Oligodesoxynukleotide bereits beschrieben, enthielt das Roh-Oligodesoxynukleotid einen großen Anteil an dem unerwünschten Dimer **70**.

### 3. Spezieller Teil

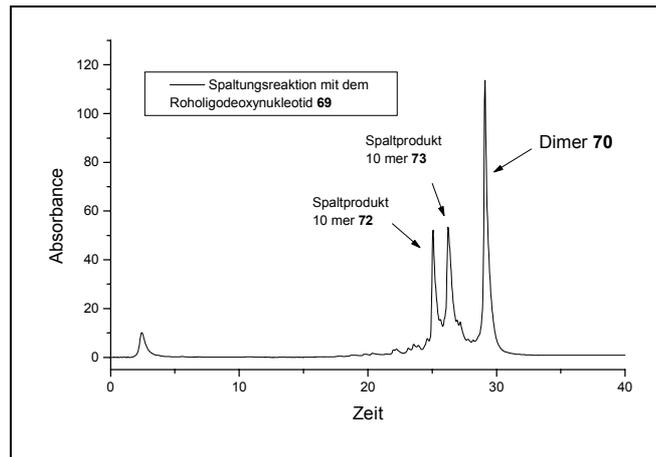
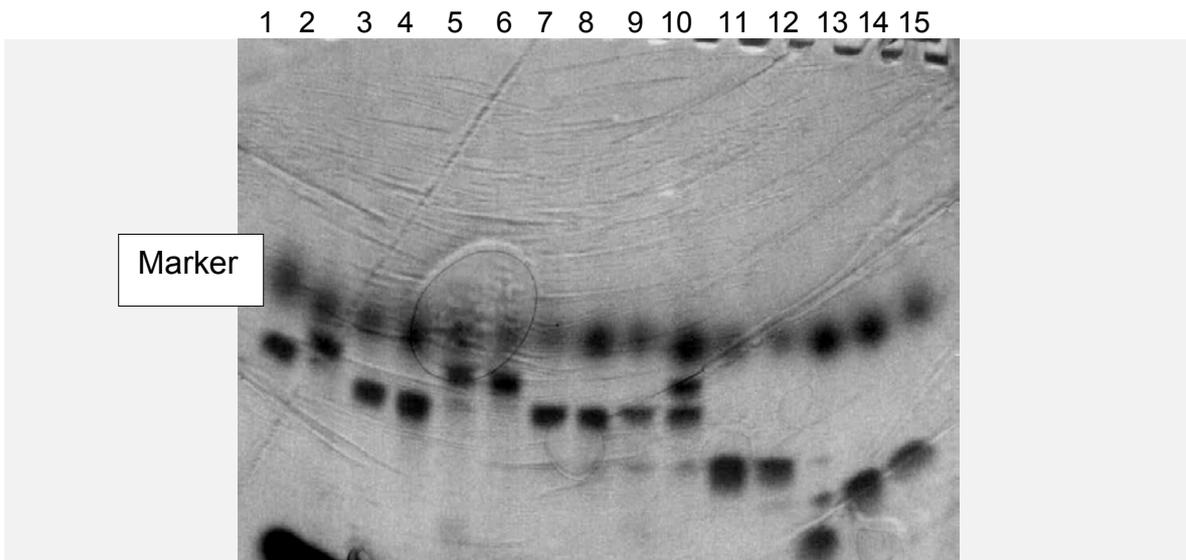


Abbildung 75: HPL-Chromatogramm der Spaltungsreaktion des Roholigodesoxynucleotids **69**

Da die Auftrennung in der Gelelektrophorese auf dem Größenunterschied der DNA beruht, können für die Verbindungen **69** und **70** zwei Banden detektiert werden. Das Oligodesoxynucleotid **70** (28mer) ist vier Basen länger als die Verbindung **69**. Daher läuft das Oligodesoxynucleotid **69** aufgrund seiner kürzeren Basensequenz weiter im Gel.



Lane:	1	Oligodesoxynucleotid <b>69-a</b>	(hintere HPLC-Fraktion + 2 Marker)
	2	Oligodesoxynucleotid <b>69-b</b>	(vordere)
	3	Oligodesoxynucleotid <b>69-b</b>	(hintere)
	4	Oligodesoxynucleotid <b>69-b</b>	(hintere)
	5	Oligodesoxynucleotid <b>69-c</b>	(vordere)
	6	Oligodesoxynucleotid <b>69-c</b>	(vordere)
	7	Oligodesoxynucleotid <b>69-c</b>	(hintere)
	8	Oligodesoxynucleotid <b>69-d</b>	(hintere)
	9	Oligodesoxynucleotid <b>69-d</b>	(hintere)
	10	Oligodesoxynucleotid <b>69-d</b>	(gemischt)
	11	Oligodesoxynucleotid <b>71</b> (18 mer)	
	12	Oligodesoxynucleotid <b>71</b> (18 mer)	
	13	Oligodesoxynucleotid <b>72</b> (10 mer)	
	14	Oligodesoxynucleotid <b>73</b> (14 mer)	
	15	Oligodesoxynucleotid <b>73</b> (14 mer)	

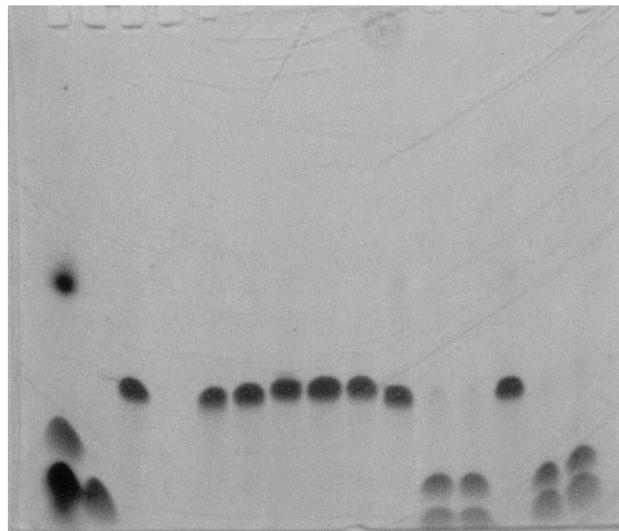
Abbildung 76: Gelbild

### 3. Spezieller Teil

Einen weiteren Beweis, daß es sich bei dem Nebenprodukt um das Dimer handelt lieferte das folgende Spaltungsexperiment.

In diesem wurden unterschiedliche HPLC Fraktionen als Edukte für die Spaltung eingesetzt. Für Fraktionen, die dem Oligodesoxynukleotid **69** entsprachen, wurden im Gel zwei Banden detektiert. Die beiden Banden weisen das gleiche Laufverhalten, wie die beiden Kontrollen **72** (10 mer) und **73** (14 mer) auf. Für die HPLC Fraktionen, die dem Dimer **70** (28 mer) entsprechen sollten, konnte im Gel nur eine Bande detektiert werden, nämlich die mit dem entsprechenden Laufverhalten des 14 mers **73**. Dieses Ergebnis läßt sich durch ein weiteres Experiment bestätigen. Die gleichen HPLC Fraktionen wurden mit einer 220 mM DTT-Lösung behandelt. Das DTT sollte hier nur die Spaltung des Dimers **70** (28 mer) in zwei 14 mere **73** bewirken, das Oligodesoxynukleotid **69** sollte unter diesen Bedingungen nicht gespalten werden. Genau dieses Ergebnis kann mit Hilfe der Gelelektrophorese detektiert werden. Das Oligodesoxynukleotid **69** wird nicht gespalten, das Dimer **70** weist eine Bande in der Höhe des 14 mers **73** auf. Die mit Hilfe der R3-Säule gereinigten Oligodesoxynukleotide **69**, **75**, **76**, **79**, **80** und **90** konnten quantitativ innerhalb von 60 Minuten mit einer 50 mM Silbernitrat-Lösung gespalten werden. Exemplarisch wird hier das Gelbild für die quantitative Spaltung der Oligonukleotide **77-80** dargestellt (siehe *Abbildung 77*).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



- Lane: 1 Oligonukleotid **73** (14 mer) + 2 Marker  
2 Oligonukleotid **72** (10 mer)  
3 Oligonukleotid **77** (Kontrolle)  
4 leer  
5 Oligonukleotid **77** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>  
6 Oligonukleotid **77** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>  
7 Oligonukleotid **78** (Kontrolle)  
8 Oligonukleotid **78** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>  
9 Oligonukleotid **78** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>  
10 Oligonukleotid **79** (Kontrolle)  
11 Oligonukleotid **79** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>  
12 Oligonukleotid **79** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>  
13 Oligonukleotid **80** (Kontrolle)  
14 Oligonukleotid **80** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>  
15 Oligonukleotid **80** Behandlung mit AgNO<sub>3</sub>

*Abbildung 77*: Gelbild der Spaltungsreaktion der Oligodesoxynukleotide **77-80**

### 3. Spezieller Teil

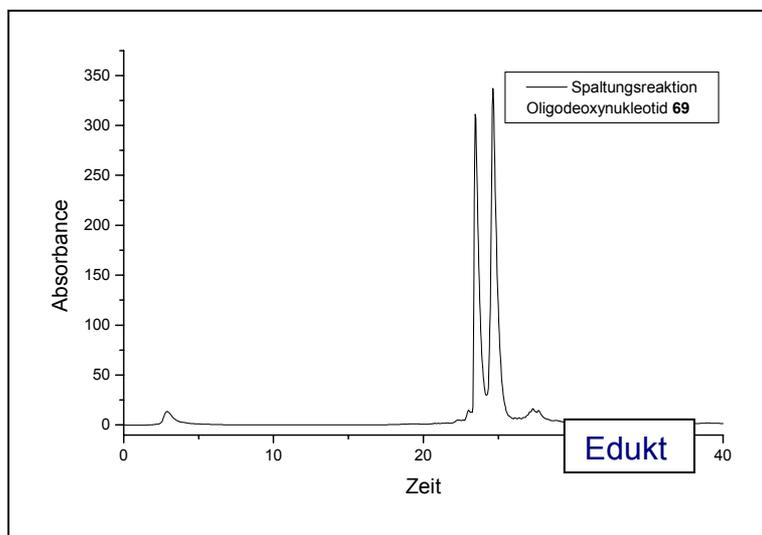
Hier kann gezeigt werden, daß die modifizierten Oligodesoxynukleotide **79** und **80** wie gewünscht gespalten werden und die unmodifizierten Oligodesoxynukleotide **77** und **78** nicht gespalten werden.

Um die Spaltung gezielt in der Chiptechnologie einsetzen zu können, muß die benötigte Spaltungszeit von einer Stunde wesentlich verkürzt werden. Daher wurde mit dem Oligodesoxynukleotid **69** eine Spaltungskinetik mit einer 50 mM Silbernitrat-Lösung durchgeführt. Die Reaktion wurde dabei durch die Zugabe von DTT gequenchet und per HPL-Chromatographie detektiert.

Zeit	Retentionszeit	Spaltung
0 min.	27.42 min	—
1 min.	23.35; 25.80	Vollständig
3 min.	23.46; 24.71	Vollständig
5 min.	23.43; 24.62	Vollständig
7 min.	23.29; 24.47	Vollständig
10 min.	23.51; 24.74	Vollständig
15 min	24.21; 25.42	Vollständig

*Tabelle 21:* Spaltungskinetik für Oligodesoxynukleotid **69**

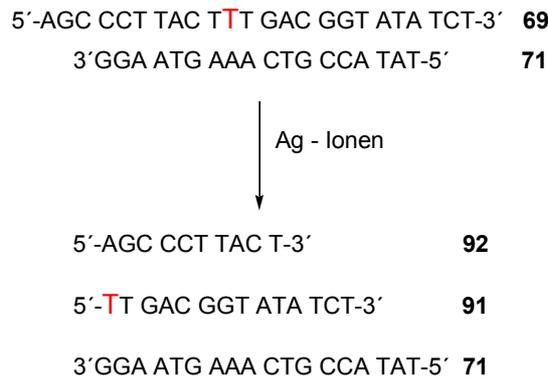
Wie die *Tabelle 21.* zeigt, ist die Spaltung mit einer 50 mM Silbernitrat-Lösung bereits nach einer Minute vollständig. Daher wird die Spaltungskinetik mit dem gleichen Oligodesoxynukleotid **69** mit einer 25 mM und 10 mM Silbernitrat-Lösung durchgeführt. Die Spaltung wurde hier mit Hilfe der Gelelektrophorese und der HPL-Chromatographie untersucht. Hier kann ebenfalls gezeigt werden, daß die Spaltung nach drei Minuten vollständig ist (siehe *Abbildung 78.*).



*Abbildung 78:* HPL-Chromatogramm der Spaltungsreaktion des Oligodesoxynukleotids **69** mit einer 25 mM Silbernitrat nach 3 min

Für weiterführende Experimente wurde die Spaltung an einem Doppelstrang, aus einem unmodifizierten Oligodesoxynukleotid **71** und dem modifizierten Oligodesoxynukleotid **69** untersucht (siehe *Abbildung 79.*).

### 3. Spezieller Teil



**Abbildung 79:** Spaltung eines Doppelstranges aus den Oligodesoxynukleotiden **69** und **71**

Das modifizierte Oligodesoxynukleotid **69** wird laut Gelelektrophorese von der 50 mM Silbernitrat-Lösung gespalten, das Oligodesoxynukleotid **71** wie erwartet nicht.

Da die modifizierten Oligodesoxynukleotide später auf der Oberfläche eines Chips gespalten werden sollen, wurde nach der erfolgreichen Spaltung in Lösung, das Spaltungsverhalten an verschiedenen Oberflächen untersucht. Die Spaltungen wurden an der Oberfläche eines

- Chips (Firma *Clondia Chip Technology GmbH*),
- **Biacore-Chips (CM5)** (Firma *Biacore*) und
- **Magnetic Beads** (Firma *Dynal*) durchgeführt.

#### 3.5.2 Spaltung auf dem Chip

Um die Phosphorothioat-verbrückten Oligodesoxynukleotide in einem Assay als Sonden verwenden zu können, mußte zuerst festgestellt werden, ob diese die gleichen Hybridisierungseigenschaften wie die unmodifizierten Oligodesoxynukleotide aufweisen. Diese Versuche wurden von der Firma *Clondia Chip Technology GmbH* durchgeführt, daher soll im Rahmen dieser Arbeit nur kurz darauf eingegangen werden (siehe Ellinger, Thomas; Ermantraut, Eugen; Ehrlich, Ralf; Engels, Joachim W.; Jahn-Hofmann, Kerstin. Probe arrays containing selectively cleavable probes. PCT Int. Appl. 2003,165 pp. WO 0318838 A2 20030306).

Die beiden Oligodesoxynukleotide

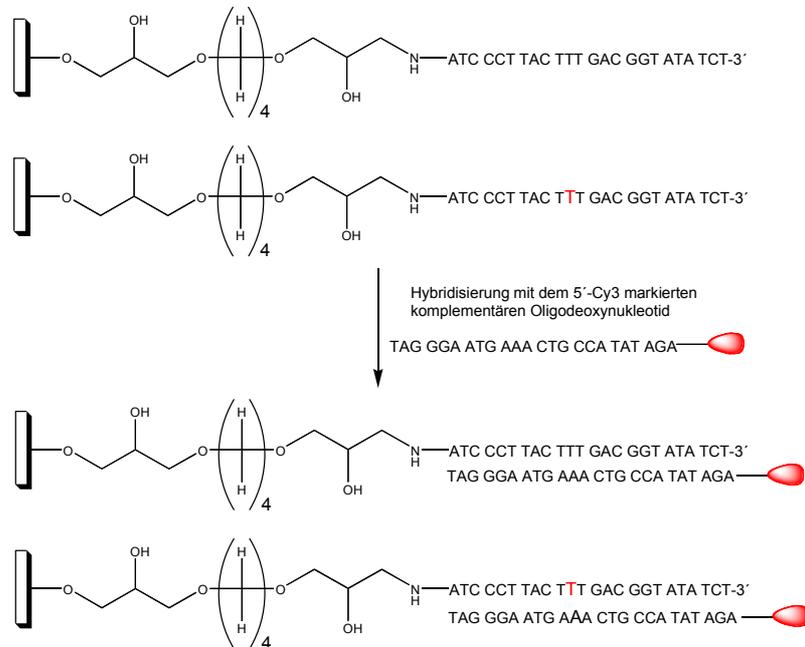


wurden auf einer epoxidierten Pyrex-Glasoberfläche immobilisiert (schematisch in *Abbildung 80.* und *81.* dargestellt).

Anschließend wurde eine Hybridisierung mit einem vollständig komplementären, am 5'-Ende mit einem Cy3-Farbstoff markierten Oligodesoxynukleotid (*MWG Biotech*, Ebersberg) durchgeführt. *Abbildung 80.* zeigt die immobilisierten Oligodesoxynukleotide **77** und **79** und die durchgeführte Hybridisierung. Die Detektion der Hybridisierung erfolgt mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (*Zeiss*,

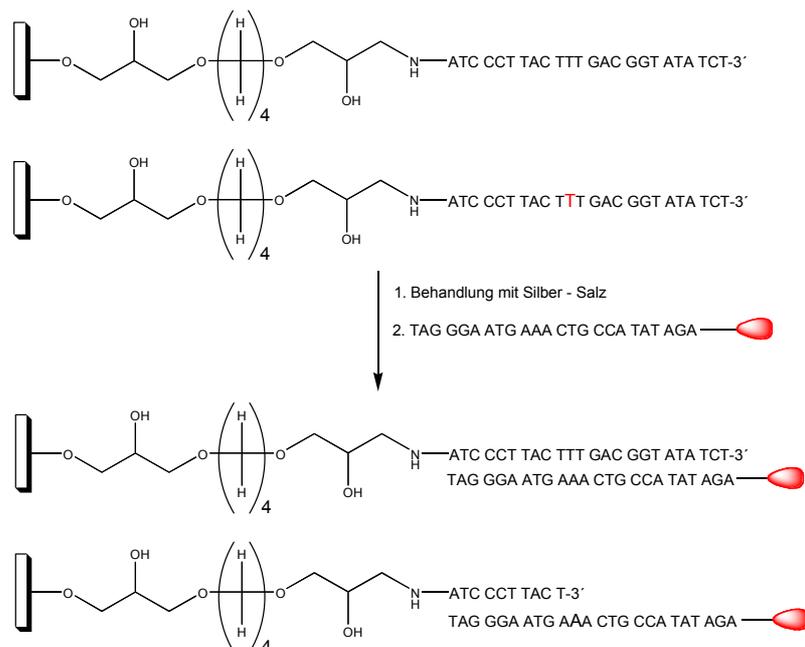
### 3. Spezieller Teil

Jena, Deutschland) im Auflicht mit einer Weißlichtquelle und einem für Cy3 geeigneten Filtersatz. Die Signale wurden mit einer CCD-Kamera (*PCO-Sensicam*, Kehlheim, Deutschland) aufgezeichnet. Dabei konnte festgestellt werden, daß an beiden Sondenmolekülen ein Hybridisierungssignal mit gleicher Intensität detektiert werden konnte. Folglich zeigen Phosphorrrthioat- und Phosphat-Oligodesoxynukleotide weitgehend vergleichbare Hybridisierungseigenschaften.



**Abbildung 80:** Immobilisierung und Hybridisierungsexperiment an der Chipoberfläche

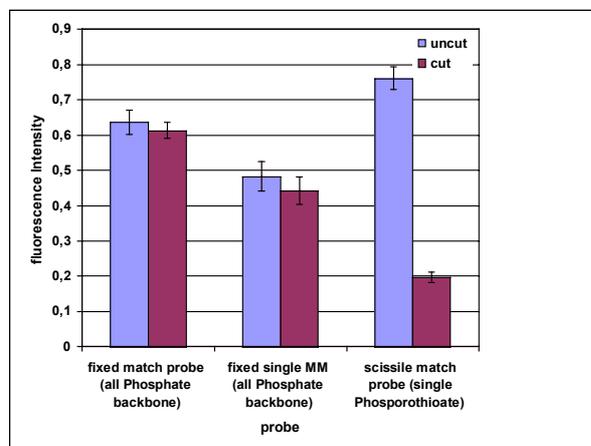
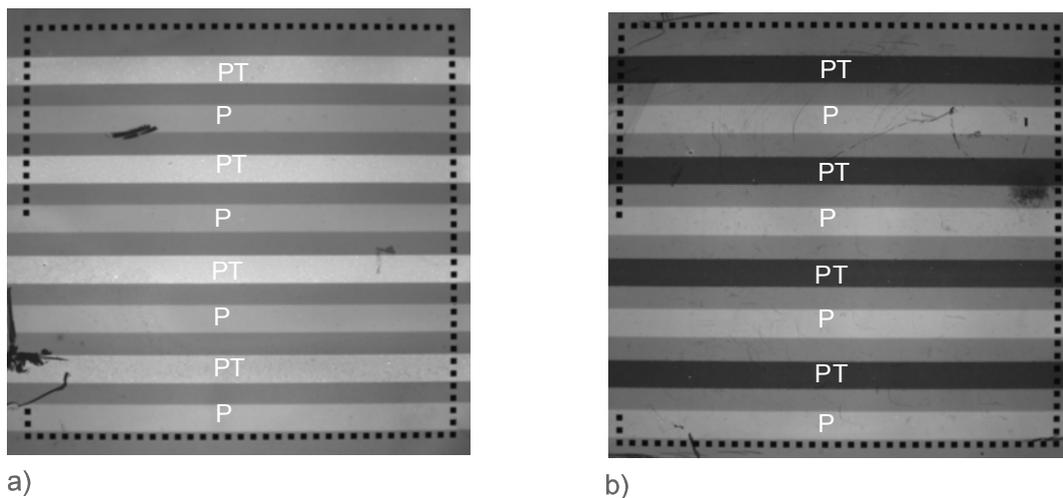
Als nächstes mußte die Spezifität und die Effektivität der Spaltung der verbrückten Phosphorrrthioat-Bindung überprüft werden.



**Abbildung 81:** Behandlung der immobilisierten Oligodesoxynukleotide **77** und **79** mit Silber-Ionen und anschließende Hybridisierung

### 3. Spezieller Teil

Das in *Abbildung 81*. aufgezeigte Experiment wurde durchgeführt: Dazu wurde das Experiment aus *Abbildung 80*. wiederholt, allerdings wurde vor der Hybridisierung mit dem Cy3-markierten Oligodesoxynukleotid die Chipoberfläche mit einer Silberion-Lösung behandelt. Dadurch werden die Phosphorothioat-Bindungen gespalten, während die Phosphordiester-Bindungen nicht geschnitten werden. Nach der Hybridisierung mit dem komplementären und markierten Oligodesoxynukleotid wurde an den nicht modifizierten Oligodesoxynukleotid-Sonden ein starkes Hybridisierungssignal detektiert, während das Signal an den Phosphorothioat-modifizierten Sonden weitgehend verschwunden war (liegt an der Detektionsgrenze). Folglich können die Phosphorothioat-Bindungen auf einer Oberfläche selektiv und effizient geschnitten werden.



*Abbildung 82:* Aufnahme der verwendeten Chips und die entsprechend gemessenen Signalintensitäten (PT Phosphorothioat, P Phosphordiester)

*Abbildung 82.* zeigt das Ergebnis der zuvor beschriebenen Experimente auf.

**Chip a.)** zeigt die Intensität der Fluoreszenz-Messung des Kontrollexperiments, hier wurde die Hybridisierung mit dem komplementären und Cy3 markierten Oligodesoxynukleotids detektiert (ohne Silberionen-Zusatz).

**Chip b.)** zeigt die Fluoreszenz nach der Behandlung mit einer Silberion-Lösung und der anschließenden Hybridisierung mit dem komplementären und Cy3 markierten Oligodesoxynukleotid.

### 3. Spezieller Teil

Die Quantifizierung der durchgeführten Spaltung auf dem Chip ist mit Hilfe der Bestimmung der Fluoreszenz (Cy3) möglich. Es konnte festgestellt werden, daß das unmodifizierte Oligodesoxynukleotid **77** und die verwendete Mismatch-Kontrolle durch die Zugabe von Silbernitrat nicht geschnitten wurden und das Fluoreszenz-Signal vor und nach der Zugabe von Silbernitrat im Rahmen der Fehlergrenze konstant bleibt. Während das Fluoreszenz-Signal des verwendeten modifizierten Oligodesoxynukleotid **79** vor der Silbernitrat-Behandlung ca. viermal so hoch ist, wie nach der Behandlung mit dem Silbernitrat.

Als drittes Experiment sollte die Bindungsspaltung im hybridisierten Zustand und die Untersuchung der Stabilität des gespaltenen Hybrids untersucht werden. Dazu wurden die beiden Amino-modifizierten Oligodesoxynukleotide **77** und **79** auf dem Chip immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem komplementären und markierten Cy3 Oligodesoxynukleotid und erst anschließend erfolgte die Behandlung mit einer 50 mM Silbernitrat-Lösung. Dabei konnte festgestellt werden, daß unter geeigneten Bedingungen, z.B. einer Erhöhung der Ionenstärke durch die Zugabe von 1 M Natriumnitrat-Lösung, die Hybridisierung sowohl am Phosphorthioat-modifizierten Oligodesoxynukleotid als auch am nicht modifizierten Phosphat-Oligodesoxynukleotid nachgewiesen werden konnte. Nach der Denaturierung der Hybride und einer erneuten Hybridisierung mit dem komplementären 24mer unter stringenten Bedingungen ist nur noch am ungespaltenen Phosphat-Oligodesoxynukleotid ein starkes Hybridisierungssignal detektierbar. Dies zeigt, daß auch im hybridisierten Zustand eine effiziente Spaltung der Phosphorthioat-Bindung erfolgt und daß das Hybrid unter geeigneten Bedingungen hinreichend stabilisiert werden kann, um eine Dissoziation nach der Bindungsspaltung zu unterbinden.

Die bisher erzielten Ergebnisse ermöglichen nun die Herstellung und die Qualitätsüberprüfung eines Sonden-markierten Arrays.

Es wurde ein Array hergestellt, der insgesamt 52 gegen 8 *in vitro* RNAs gerichtete Sonden enthält. Die Sonden sind durch eine spaltbare Bindung (etwa in der Mitte der Sequenz) und eine Markierung gekennzeichnet. Drei weitere Sequenzen wurden als Kontrollen ebenfalls auf dem Chip immobilisiert, die Sonden 53 und 54 besitzen keine spaltbare Bindung. Die Sonde 53 besitzt eine Markierung, während 54 unmarkiert ist (sie dienen in verschiedenen Mischungsverhältnissen von 1 bis 1:10 000 als Eichreihe zur Kalibrierung der Ergebnisse). Sonde 55 hybridisiert nicht mit den Targetsequenzen und dient zur Definition des experimentellen Hintergrundsignals. Nach der Herstellung des Arrays wird die Qualität der Spots überprüft. Anschließend erfolgt die Hybridisierung mit einem definierten Gemisch der acht unmarkierten *in vitro* RNAs. Nach der Hybridisierung der Sonden mit der *in vitro* erzeugten RNA, schließt sich die Behandlung mit einer 50 mM Silbernitrat-Lösung an. Die Spaltung wird bei 0°C durchgeführt, die Hybridisierung wird durch die Zugabe von 1 M Natriumnitrat-Salzlösung stabil gehalten. Auch während des anschließenden Waschschruttes muß eine hohe Ionenkonzentration (1 M Natriumnitrat) eingestellt werden. Die Fluoreszenz wird gemessen und von allen Werten der Hintergrund abgezogen (Sonde 55). Das normierte, auf den Spots verbleibende Signal ist direkt proportional zur Menge der in Lösung vorliegenden Targets. Die Signalintensitäten an den Spots entsprechen denen von Vergleichsexperimenten mit markierter RNA und unmarkierten, nicht spaltbaren Sonden.

### 3. Spezieller Teil

Dies dokumentiert die Eignung des Verfahrens zum Nachweis von molekularen Wechselwirkungen auf Sonden-markierten Arrays. In einer Versuchsreihe von je zehn Experimenten, nach dem klassischen und dem Sonden-markierten Verfahren zeigt sich, daß die Streuung der nach dem Sonden-markierten Verfahren ermittelten Werten deutlich geringer ist als die der nach dem klassischen Verfahren gewonnenen.

Die Qualitätskontrolle der immobilisierten Sonden wird durch die Detektion des Fluoreszenzsignals auf dem Array bestimmt.

#### 3.5.3 Spaltung an einem Biacore-Chip CM5

Die Messung wurde an einem Biacore 1000 Gerät mit einem CM5 Chip durchgeführt. (siehe Kapitel 2.6.22.2). Bei diesem Experiment soll die Spaltung eines Doppelstranges, aus dem modifizierten Oligodesoxynukleotid **80** und einem unmodifizierten Oligodesoxynukleotid quantitativ bestimmt werden. Dazu wurden acht partiell komplementäre unmodifizierte Oligodesoxynukleotide **81-88** synthetisiert und der Schmelzpunkt dieser mit dem Oligodesoxynukleotid **80** gemessen (siehe Tabelle 22.).

Doppelstrang	Gemessener Schmelzpunkt
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-AA CTG CCA TAT AGA TCG ACG-5' <b>81</b>	49.6°C
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-AAA CTG CCA TAT AGA TCG AC-5' <b>82</b>	50.6°C
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-G AAA CTG CCA TAT AGA TCG A-5' <b>83</b>	53.4°C
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-TG AAA CTG CCA TAT AGA TCG-5' <b>84</b>	54.9°C
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-ATG AAA CTG CCA TAT AGA TC-5' <b>85</b>	54.9°C
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-A ATG AAA CTG CCA TAT AGA T-5' <b>86</b>	55.8°C
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-GA ATG AAA CTG CCA TAT AGA-5' <b>87</b>	57.6°C
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' <b>80</b> 3'-GGA ATG AAA CTG CCA TAT AG-5' <b>88</b>	55.8°C

Tabelle 22: Schmelzpunkte der Doppelstränge

Aufgrund des hohen Preises für die Biacore Chips wurden allerdings nur drei Doppelstränge für das Biacore Experiment ausgewählt (siehe *Abbildung 83.* und *85.*). Für die Messung muß der Chip (CM 5) zuerst mit Streptavidin modifiziert werden, dazu wird zuerst ein Aktivator (EDC/NHS) und Streptavidin auf den Chip gegeben. Das aufgenommene Sensorgramm (siehe *Abbildung 84.*) zeigt die erfolgreiche Immobilisierung des Streptavidins, exemplarisch für eine der drei durchgeführten Immobilisierungen.

### 3. Spezieller Teil

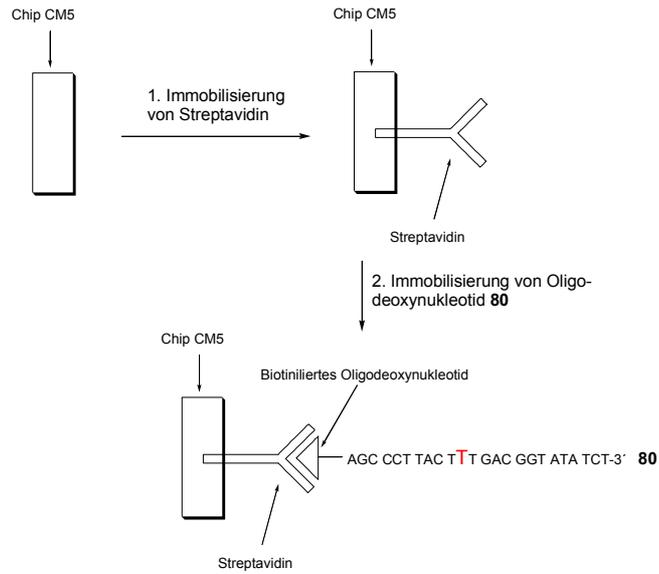


Abbildung 83: Modifizierung des CM 5 Chips

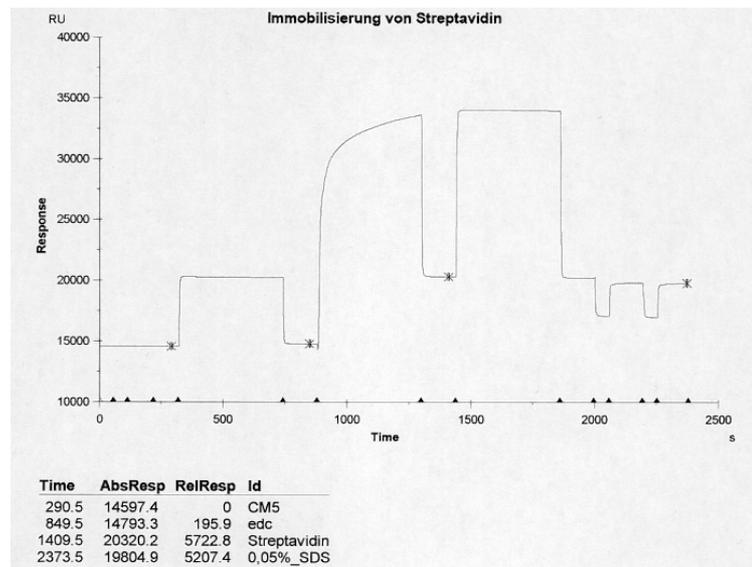


Abbildung 84: Sensorgramm des Schrittes 1. Streptavidin-Beladung (Sensorgramm 290.5 sec – 849.5 sec Aktivierung des Chips mit EDC; 849.5 sec – 1409.5 sec Beladung mit Streptavidin; 1409.5 sec – 2373.5 sec Capping mit einer 0.05%igen SDS Lösung → Beladung des Chips ergibt sich aus der Absolute Response (AbsResp im Sensorgramm) 19804.9 – 14597.4 = 5107.5 RU)

Anschließend kann das 5'-Biotin modifizierte Oligodesoxynucleotid **80** auf den Chip immobilisiert werden (Streptavidin-Biotin Bindung). Die drei teilweise komplementären Oligodesoxynucleotide **81**, **84** und **88** können in drei verschiedenen Experimenten hybridisiert werden.

### 3. Spezieller Teil

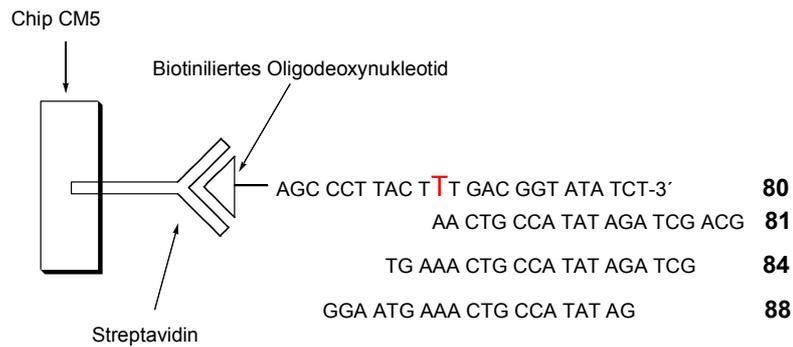


Abbildung 85: Hybridisierung der Oligodesoxynucleotide **80** und **81**, **84** und **88**

- Die Spaltung erfolgt durch die Zugabe von Silbernitrat-Lösung und dem anschließenden Spülen mit einer EDTA-Lösung.

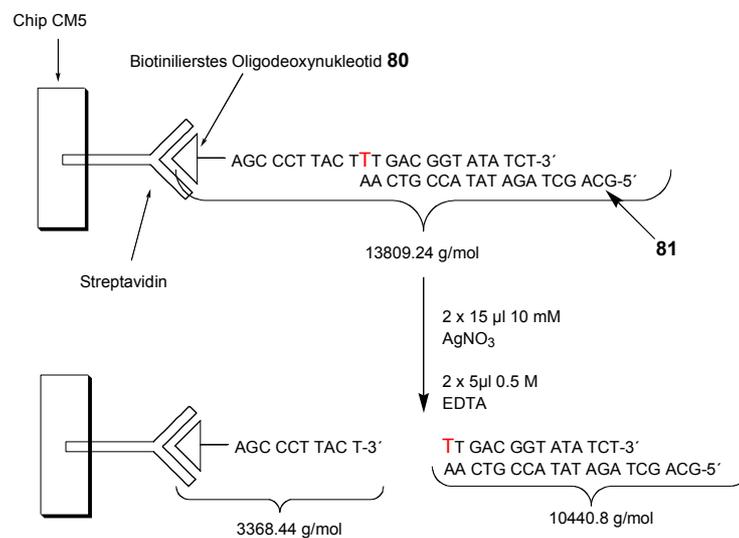


Abbildung 86: Durchführung der Spaltungsreaktion, exemplarisch für den Doppelstrang aus dem Oligodesoxynucleotid **80** und **81** gezeigt

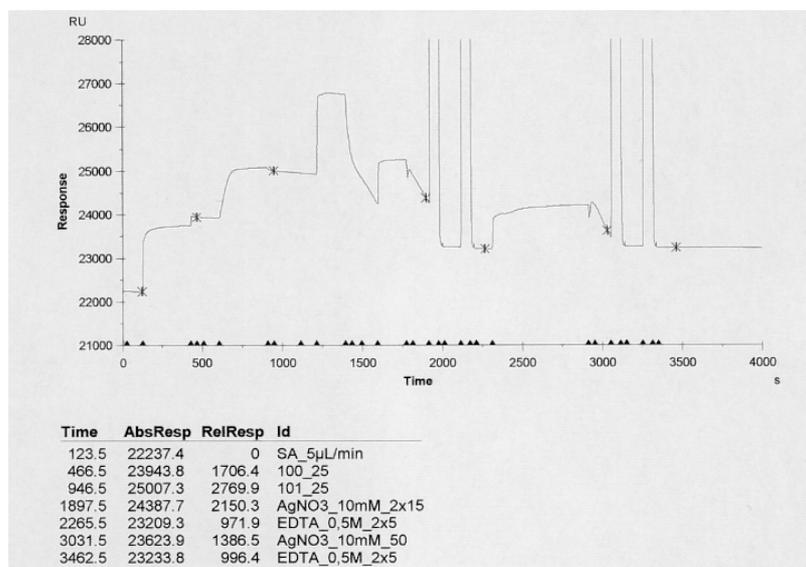


Abbildung 87: Sensorgramm der Hybridisierung und Spaltung auf dem Chip

### 3. Spezieller Teil

Zu *Abbildung 87*:

Ausgangspunkt ist der Streptavidin immobilisierte Chip; bis 123.5 sec erfolgt ein Spülschritt mit dem Laufpuffer; 123.5 sec – 466.5 sec hier erfolgt die Beladung mit dem biotinylierten Oligodesoxynukleotides **100**; 466.5 sec – 946.5 sec diese Zeit entspricht der Hybridisierung des teilweise komplementären Oligodesoxynukleotides **101**; 946.5 sec – 1897.5 sec entspricht der Spaltungszeit mit einer 10 mM Silbernitrat Lösung; 1897.5 sec – 2265.5 sec entspricht der Zugabe einer 0.5 M EDTA-Lösung um vorhandene Silber-Ionen zu komplexieren und von der Oberfläche abzulösen; die beiden Schritte der Spaltung und Komplexierung werden nochmals wiederholt → die resultierende Beladung des Chips ergibt sich aus der Absolute Response (AbsResp im Sensorgramm) 23233.8 - 22237.4 = 996.4 RU

*Tabelle 23.* zeigt, daß der Grad der Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide **81**, **84** und **88** zunimmt, je größer der komplementäre Bereich mit dem Oligodesoxynukleotid **80** ist. Die Spaltung verläuft laut Sensorgramm nicht quantitativ (nur zu etwa 84%). Der Grund hierfür ist vermutlich die Einlagerung von Silberionen auf der Chipoberfläche oder Adsorptionseffekte am Streptavidin-Biotin-System.

Unterstützen läßt sich diese Theorie durch die Beobachtung, daß die Spaltung mit den Silberionen erst nach der Zugabe einer EDTA-Lösung zum Chip, detektiert werden konnte. Mit dieser werden auf dem Chip adsorbierte Silberionen komplexiert und gewaschen. Durch die Zugabe der EDTA-Lösung wird jedoch ebenfalls die Hybridisierung überlappender Sequenzen destabilisiert. *Tabelle 23.* faßt die ermittelten Resultate für die Hybridisierung und Spaltung der Oligodesoxynukleotide **80**, **81**, **84** und **88** zusammen.

Streptavidin- Labeling RU abs	Reaktion mit <b>80</b>			Hybridisierung		Spaltung	
	RU abs	RU rel	Nr.	RU abs	RU rel	RU abs	RU rel
22237.4	23943.8	1706.4	<b>81</b>	25007.3	2769.9 (78.7%)	23233.8	996.4 (85.9%)
21684.5	23429.1	1744.6	<b>84</b>	24492.8	2808.3 (80.0%)	22766.0	1081.5 (83.4%)
19562.9	20578.0	1015.1	<b>88</b>	21327.0	1764.1 (92.2%)	20206.8	643.9 (83.7%)

RU abs: Response Unit Absorption

*Tabelle 23:* Ergebnisse der Biacore Messungen

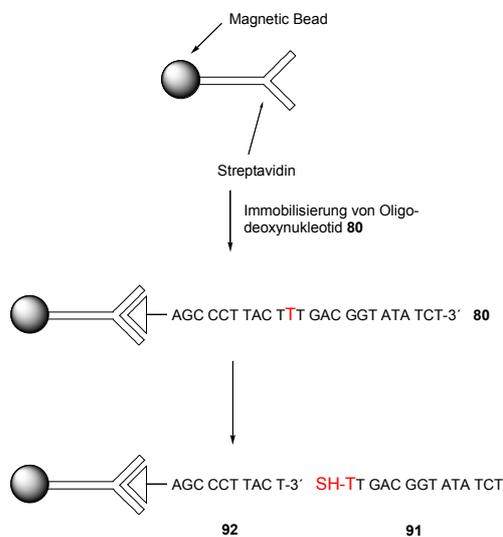
#### 3.5.4 Spaltung an Magnetic Beads

Die Spaltung der Thio-modifizierten Oligodesoxynukleotide wurde ebenfalls an Magnetic Beads durchgeführt. Dazu wird das biotinylierte Oligodesoxynukleotid **80** an Streptavidin tragende Magnetic Beads gebunden und die Spaltung mit einer Silbernitrat-Lösung durchgeführt. Magnetic Beads zeichnen sich dabei durch ihre leichte Handhabung aus. Die Beads weisen im Inneren einen Eisenkern auf,

### 3. Spezieller Teil

dadurch können sie durch das Anhalten eines Magnets gezielt an einer bestimmten Stelle fixiert werden. Ansonsten muß beim Arbeiten mit heterogenen Systemen während Wasch- bzw. Spülschritten das Material immer wieder abzentrifugiert werden und die überstehenden Lösungen mit äußerster Vorsicht abpipettiert werden, was trotzdem häufig zu Verlusten führt. Die Magnetic Beads stellen hier eine nützliche Weiterentwicklung für heterogene Reaktionssysteme dar. Allerdings weisen sie in der Regel eine wesentlich geringere Beladung auf, als entsprechende andere Trägermaterialien. Man erhält die Beads inzwischen mit den verschiedensten reaktiven Gruppen funktionalisiert und sie werden häufig dann eingesetzt, wenn nur wenig Testmaterial zur Verfügung steht.

Die Beladung der Beads erweist sich als recht einfach, so daß das Oligodesoxynukleotid **80** an die Beads angekuppelt werden konnte. Nach der Anbindung erfolgte die Spaltung mit einer 50 mM Silbernitrat-Lösung, die Reaktionszeit betrug 30 min (siehe *Abbildung 88*).



*Abbildung 88:* Spaltung des Oligodesoxynukleotids **80** an Streptavidin modifizierten Magnetic Beads

Die Detektion des Spaltungsprodukts **91** war in den ersten Experimenten nicht möglich. Erst durch die Modifizierung des Immobilisierungs- und Spaltungsprotokolls konnte das Spaltungsprodukt **91** per HPL-Chromatographie erfolgreich detektiert werden. Allerdings mußte ebenfalls festgestellt werden, daß das Oligodesoxynukleotid entweder nicht vollständig gespalten wird, oder daß das Spaltungsprodukt adsorbiert wird. Diese Feststellung gründet auf der Bestimmung der optischen Dichte der Abspaltungslösung bei 260 nm. Hier konnte beobachtet werden, daß das Abspaltungsprodukt **91** in einer nur sehr geringen Konzentration detektiert werden kann. So daß gerade genügend Material für einen analytischen HPLC-Lauf zur Verfügung stand. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß eine entsprechende Spaltung der P-S-Bindung auch an den inzwischen häufig verwendeten Magnetic Beads möglich ist. Der Versuch, das Spaltungsprodukt (Thiol) im Anschluß zu modifizieren, wurde hier nicht unternommen.

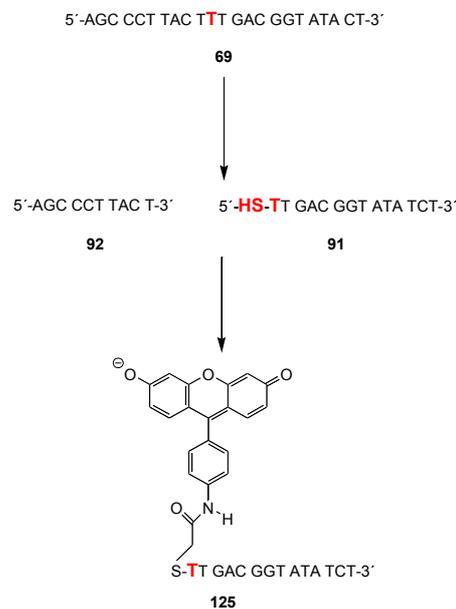
#### 3.6. Post-Labeling

Außer der gezielten chemischen Spaltung mit Schwermetallionen ergeben sich für die 5'-Thio-modifizierten Amidite weitere interessante Arbeitsgebiete.

### 3. Spezieller Teil

Das Thiol kann zum Beispiel an eine Goldoberfläche gebunden werden (häufig verwendete Immobilisierungsmethode) oder mit einem weiteren Thiol zu einer Disulfidbindung reagieren.

Ebenfalls können die synthetisierten modifizierten Oligodesoxynukleotide mit verschiedenen Verbindungen, wie zum Beispiel Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt werden (Post-Labeling), siehe *Abbildung 89*. Das freigesetzte Thiol kann mit Jodacetamiden, Maleinimiden, Alkyl- und Sulfonylhalogeniden verschiedenster Farbstoffe, Markern und Linkern zur Reaktion gebracht werden. Die Ausbeuten, die zum Beispiel bei der Reaktion mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen in der Regel zu erreichen sind, schwanken beträchtlich. Die Konjugation mit Hilfe des Thiols stellt hier eine vielversprechende Alternative dar. Die vorallem bei der Durchführung am festen Träger (siehe *Abbildung 90*.) durch ihre einfache Handbarkeit, Schnelligkeit und zufriedenstellenden Ausbeuten überzeugt.



*Abbildung 89:* Postlabeling des Spaltungsprodukts der Verbindung **69**

Die in *Abbildung 89* gezeigte Reaktion ist Literatur bekannt<sup>42</sup>, bei der Durchführung der entsprechenden Vorschrift, mußte jedoch festgestellt werden, daß die Umsetzung der Verbindung **91** (Spaltungsprodukt aus der Reaktion von Verbindung **69** und einem Silbersalz) mit dem Fluoreszenzfarbstoff (IAF) nur in geringem Maße zu dem Produkt **125** führt (die Ausbeuten schwanken zwischen 12 – 23%). Die Reaktion von IAF findet bevorzugt mit dem zur Reduktion nötigem DTT statt. Eine entsprechende Alternative für das Post-Labeling, stellt daher die Reaktion an der festen Phase dar (DTT kann hier leicht entfernt werden) oder die Verwendung eines alternativen Reduktionsmittel, wie Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP x HCl).

<sup>42</sup> B. A. Connolly, P. Rider; Nucl. Acids Res. 1985, 13,12, 4485

### 3. Spezieller Teil

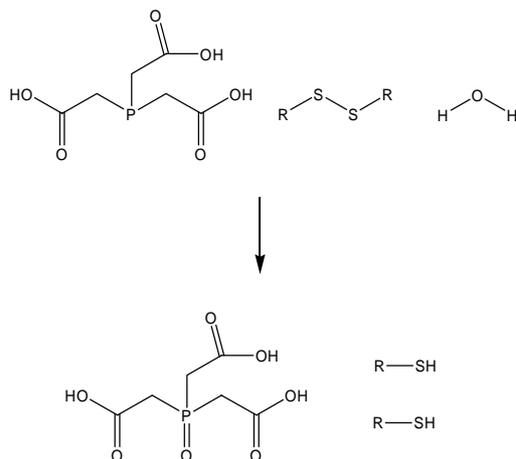


Abbildung 90: Reduktion einer organischen Disulfidbindung mit TCEP

Dieses Reduktionsmittel weist keine freie Thiol-Gruppe auf, so daß die zuvor aufgezeigte Konkurrenzreaktion des Thiols aus dem DTT mit dem IAF nicht zu beobachten ist. Das Reduktionsmittel kann immobilisiert zum Beispiel in wässriger Lösung verwendet werden, so daß sich die Aufreinigung des Postlabeling dadurch einfacher gestalten könnte.

#### 3.6.1 Modifizierungsreaktion am Trägermaterial

Die Oligodesoxynukleotid-Synthese des modifizierten Oligodesoxynukleotids **126** erfolgt in einem Maßstab von 1  $\mu\text{mol}$ . Der Baustein **9** (T) wird mit Hilfe des modifizierten Synthesezyklus gekoppelt.

Die 5'-DMTr-Schutzgruppe wird mit einer 3% DCA in DCM Lösung (Detritylierungslösung) abgespalten (siehe *Abbildung 91.*). Das CPG-Material wird solange mit der Detritylierungslösung behandelt, bis keine Orangefärbung mehr auftritt. Anschließend wird das CPG-Material **127** für 10 Minuten mit einer 220 mM DTT-Lösung behandelt. Für eine möglichst quantitative Umsetzung (Modifizierung) ist es dabei besonders wichtig, die DTT-Lösung vollständig zu entfernen. Da die Modifizierung hier an der festen Phase durchgeführt wird, kann die verwendete DTT-Lösung schnell und einfach entfernt werden. Nach den entsprechenden Waschschrinen, wird die Verbingung **127** mit Jodacetamidfluorescein (IAF) in DMF, Wasser und 1 M Tris x HCl (pH 8) für 24 h zur Reaktion gebracht. Anschließend wird das Trägermaterial gewaschen und mit einer 25%igen Ammoniaklösung (24 h bei RT) das Oligodesoxynukleotid **128** abgespalten. Das modifizierte Oligodesoxynukleotid **128** wird mit Hilfe der HPL-Chromatographie gereinigt. Das Oligodesoxynukleotid **128** konnte in einer Ausbeute von 43% isoliert werden. Die Synthesebedingungen und damit auch die erzielten Ausbeuten können sicher noch verbessert werden. Die Verbindung **128** wurde mit Hilfe der ESI-Spektrometrie charakterisiert.

Entsprechend im Vorgehen konnte ein weiteres Oligodesoxynukleotid **129** in 58% Ausbeute isoliert werden (*Abbildung 91.*).

### 3. Spezieller Teil

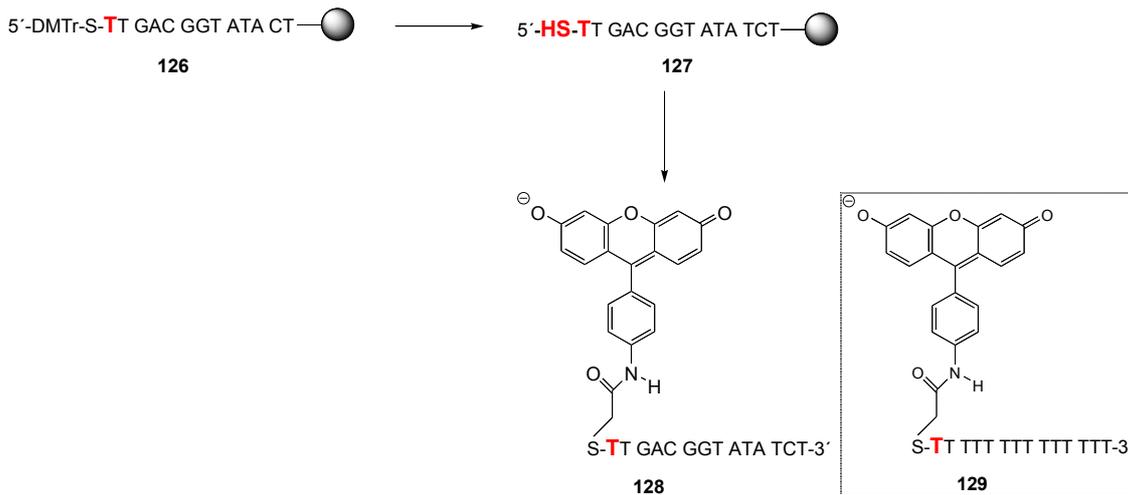


Abbildung 91: Modifizierung der Verbindung **126** und die Struktur der Verbindung **129**

Tabelle 24. zeigt die Synthese- und Analysedaten der Verbindungen **128** und **129**.

Verbindung	Ausbeute	Gradient	Berechnete Masse	Gefundene Masse
<b>128</b>	43%	10-50% B in 25 min.	4672.24	4672.8
<b>129</b>	58%	10-50% B in 25 min.	4600.18	4601.55

Tabelle 24: Charakteristische Daten für die Oligodesoxynukleotide **128** und **129**

## 3.7 Punktmutationsdetektion durch festphasenvermittelte Single Nucleotid Primer Extension (SNUPE) und MALDI-MS

### 3.7.1 Stand der Forschung

Ziel dieses Forschungsvorhabens ist die Entwicklung eines neuen, elektrophoresereifen Verfahrens zur Detektion von bekannten Punktmutationen mittels fester Phase und MALDI-Massenspektrometrie. Hierfür wird zunächst ein synthetisches Oligodesoxynukleotid, welches später als Primer fungiert, über einen photolytisch spaltbaren Linker an eine feste Phase gebunden. Dessen Oligodesoxynukleotid-Sequenz wird dabei so ausgewählt, daß sie komplementär zur Zielsequenz einer mutierten DNA ist und direkt vor der zu detektierenden Punktmutation endet. Durch eine enzymatische Polymerasereaktion wird der Primer dann um eine Base, die entweder komplementär zur korrekten DNA oder zur Mutation ist, verlängert<sup>43</sup>. Das Reaktionsprodukt kann dann direkt mittels MALDI-MS photolytisch von der festen Phase getrennt und analysiert werden. Die Masse des Reaktionsproduktes ist festgelegt durch den erfolgten Einbau einer von vier Nucleobasen und gibt daher unmittelbar Auskunft über das Vorhandensein einer Punktmutation.

<sup>43</sup> A.) L. A. Haff, I. P. Smirnov; *Genome Research* **1997**, 378-388; B.) L. A. Haff, I. P. Smirnov; *Nucl. Acids Res.* **1997**, 25 (18), 3749-3750

### 3. Spezieller Teil

Es hat sich gezeigt, daß Insertion- und Deletionsmutationen im Tumor-Suppressorgen p53 durch Hybridisierungsassays mit einem Gen-Chip nicht einfach nachweisen zu sind<sup>44</sup>, durch Primerverlängerungsassays dagegen leicht<sup>45</sup>. Daher sollte ein solcher Assay im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden

L. Haff und I. Smirnov konnten bereits 1997 zeigen, daß innerhalb einer PCR Reaktion durch eine geeignete Primer-Auswahl mehrere Punktmutationen gleichzeitig innerhalb einer MALDI-Messung detektiert werden können<sup>46</sup>. Außer der geschickten Auswahl der entsprechenden Primer können ebenfalls, wie Z. Fei zeigen konnte, modifizierte ddNTPs für eine einfachere Detektion eingesetzt werden. Hier werden modifizierte Nukleotide eingesetzt, die sich deutlicher in ihren Molaren Massen gegenüber der von unmodifizierten ddNTPs unterscheiden. So daß eine Differenzierung mit einem vertretbaren apparativen Aufwand erfolgen kann. Dabei kann das Probenmaterial, das auf eine Punktmutation untersucht werden soll, entweder heterozygot oder homozygot vorliegen, so daß die Möglichkeit besteht, bei der MALDI-Untersuchung zwei Produkte zu detektieren, deren Masse bei der Verwendung von Standard-ddNTPs um nur ca. 12 Dalton variieren. Die Vermessung einer solchen Probe erfordert eine hohe Sensitivität des Verfahrens und einen entsprechenden apparativen Aufbau<sup>47</sup>.

*Abbildung 92.* beschreibt die inzwischen häufig angewendete SNuPE-Genotypisierung.

#### 3.7.1.1 SNuPE-Genotypisierung

Die Single Nucleotide Primer Extension (SNuPE) ist ein Verfahren zur Detektion von Punktmutationen<sup>48</sup>. Dabei wird zunächst ein Primer an den zu untersuchenden DNA-Strang hybridisiert. Das Oligodesoxynukleotid wird dabei so konstruiert, daß es direkt vor der Stelle der möglichen Punktmutation der DNA endet. Führt man nun eine enzymatische Polymerasereaktion durch und gibt dabei eines der vier Nukleotide A, C, G oder T (ddNTPs) zum Reaktionsgemisch, so kommt es zum Einbau des entsprechenden komplementären Nukleotids. Anhand der erfolgten Primerverlängerung kann die Base in der zu untersuchenden DNA ermittelt werden.

---

<sup>44</sup> F. P. Wikman, M. L. Lu, T. Thykjaer, S. H. Olesen, L. D. Andersen, C. Cordon-Cardo, T. E. Orntoft; *Clin. Chem.* **2000**, 46, 1555-1561, B.) S. A. Ahrendt, S. Halachmi, J. T. Chow, L. Wu, N. Halachmi, S. C. Yang, S. Wehage, J. Jen, D. Sidransky; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 9, 7382-7387

<sup>45</sup> J. M. Shumaker, J. J. Tollett, K. J. Filbin, M. P. Montague-Smith, M. C. Pirrung; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2269

<sup>46</sup> L.A. Haff, I.P. Smirnov; *Nucl. Acids Res.* **1997**, 25 (18), 3749-3750

<sup>47</sup> Z. Fei, T. Ono, L. M. Smith; *Nucl. Acids Res.* **1998**, 26 (11), 2827-2828

<sup>48</sup> A.) M. N. Kuppaswamy, J. W. Hoffmann, C. K. Kasper, S. G., Spitzer, S. L., Groce, S. P., Bajaj; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88, 1143; B.) L. A. Haff, I. P. Smirnov; *Genome Methods Cold Spring Harbor Laboratory Press* ISSN 1054-9803/97; C.) Christian Wojczewski, Dissertation, J. W. Goethe-Universität Frankfurt **1999**

### 3. Spezieller Teil

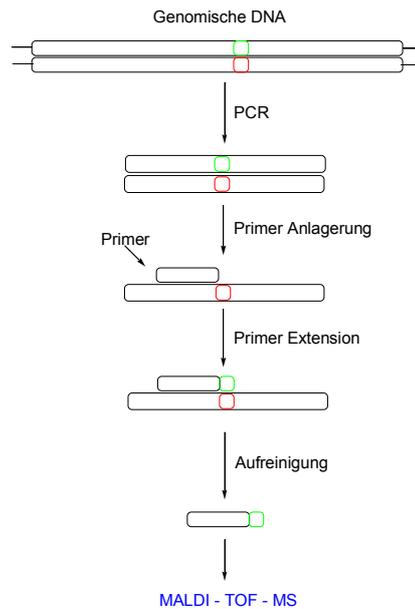


Abbildung 92: SNUPE-Genotypisierung

Die verwendeten Nukleotide müssen dazu bisher entweder radioaktiv markiert werden, um in einem Autoradiogramm den Primer detektieren zu können, oder es können alternativ Markierungen mit einer Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgen. Forscher des Max Delbrück Center für Molekulare Medizin setzen hier zum Beispiel verschiedene F-ddNTPs (Fluoreszenz gelabelte ddNTPs) ein und detektieren deren Einbau mit Hilfe der Kapillargelelektrophorese.

#### 3.7.1.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie spielte auf dem Gebiet der Nukleinsäuredetektion lange eine untergeordnete Rolle, gewann jedoch in den letzten Jahren an Bedeutung<sup>49</sup>. Die direkte Detektion von Peptiden an der festen Phase ist schon länger möglich (1996) aber auch hier wird ein photolabiler Linker für eine gezielte Abspaltung des Peptids benötigt<sup>50</sup>.

Eine interessante Lösung ist die Arbeit von M. R. Carrasco<sup>51</sup>, die ein duales Linkersystem vorstellt (Abbildung 93.). Das verwendete Konstrukt baut sich dabei aus den folgenden Komponenten auf:

- Trägermaterial, photolabiler Linker, ionisierbare Sequenz (4mer Peptid), chemisch spaltbarer Linker, das zu untersuchende Substrat (Peptid)

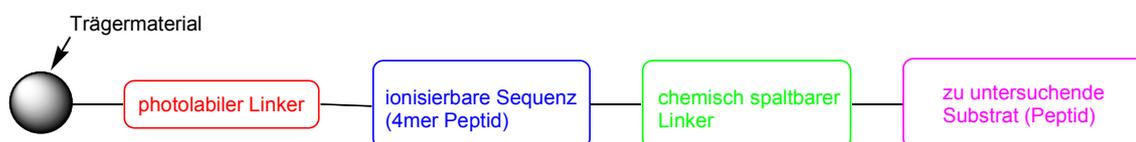


Abbildung 93: Konstrukt M. R. Carrasco

<sup>49</sup> M. Jürgens; *BIOforum* 2001, 7-8, 490-491

<sup>50</sup> A.) M. C. Fitzgerald, K. Harris, C. G. Shevlin, G. Siuzdak; *Bioorganic & Medicinal Chem. Letters* **1996**, 6 (8), 979-982; B.) J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak; *Nature* **1999**, 399, 243-246

<sup>51</sup> M. C. Carrasco, Y. Oda, S. B. H. Kent; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (36), 6331-6334

### 3. Spezieller Teil

Nach jedem Kopplungsschritt kann hier eine geringe Menge an Trägermaterial auf eine erfolgreiche Kopplung hin untersucht werden, dazu wird die zu detektierende Probe photolabil abgespalten. Am Ende der Synthese kann das gewünschte Target dann chemisch freigesetzt werden.

A. Meyer beschreibt den Einsatz der MALDI-Spektrometrie ebenfalls als Instrument zur Qualitätskontrolle der Oligodesoxynukleotid-Synthese. Hier wird während der präparativen Synthese das CPG-Material (LCAA-CPG) nach einer erfolgten Kopplung direkt vermessen und so der Synthesefortschritt überprüft<sup>52</sup>. Dieser Aufwand rechtfertigt sich allerdings nur für präparative Synthesen oder zur Überprüfung einer sehr komplexen und entscheidenden Kopplung. Die Qualität einer solchen MALDI-Messung hängt jedoch ganz entscheidend von der Handfertigkeit des Experimentators ab.

In den ersten Arbeiten zur MALDI-Analyse von Oligodesoxynukleotiden mußten zuerst die experimentellen Bedingungen optimiert werden. Es zeigten sich dabei die vielfältigen Möglichkeiten dieses Verfahrens (entsprechender Übersichtsartikel<sup>53</sup> von E. Nordhoff) für die Analyse dieser Substanzklasse, aber auch ihre Limitierungen. Zu diesen gehören vor allem unerwünschte Fragmentierungsreaktionen der Analytionen und die Frage nach entsprechenden geeigneten Matrices<sup>54</sup>. Fragmentierungsreaktionen können wertvolle Strukturinformationen liefern, schränken jedoch gleichzeitig den zugänglichen Massenbereich ein. Neben den Fragmentierungsreaktionen bei der Desorption/Ionisation limitieren die abnehmenden Signalintensitäten und der vermutlich weniger effiziente Einbau, in den Matrixfestkörper, die Detektion größerer Oligodesoxynukleotide<sup>55</sup>. Die MALDI-Massenspektrometrie wird heute zur Analyse von biochemisch relevanten Proben wie z.B. von exo/endo-nukleolytischen Abbaureaktionen oder bestimmten PCR-Produkten erfolgreich eingesetzt<sup>56</sup>. Daß die Konzentration der enzymatisch erzeugten Oligofragmente beim Sanger-Verfahren unter geeigneten Bedingungen für die DNA-Sequenzierung mit Hilfe der MALDI-MS ausreichend ist, konnte von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gezeigt werden<sup>57</sup>. Die Einsatzmöglichkeit der

<sup>52</sup> A. Meyer, N. Spinelli, J. J. Imbach, J. J. Vasseur; *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2000**, 14, 234-242

<sup>53</sup> E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, K. Kristansen, P. Roepstorff; *Nucl. Acids Res.* **1993**, 21, 3347-3357

<sup>54</sup> A.) K. J. Wu, A. Steding, C. H. Becker; *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1993**, 7, 142-146; B.) K. Tang, S. L. Allmann, R. B. Jones; C. H. Chen, S. Araghi; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 435-439; C.) K. J. Wu, T. A. Shaler, C. H. Becker; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1637-1645; D.) U. Pielers, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser; *Nucl. Acids Res.* **1993**, 21, 3191-3196

<sup>55</sup> A.) E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, K. Kristansen, P. Roepstorff; *Nucl. Acids Res.* **1993**, 21, 3347-3357; B.) M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith; *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3204-3211

<sup>56</sup> A.) M. J. Doktycz, G. B. Hurst, S. Habibi-Goudazi, S. A. McLuckey, K. Tang, C. H. Chen, M. Uziel, K. B. Jacobson, R. P. Woychik, M. V. Buchanan; *Anal. Biochem.* **1995**, 230, 205-215; B.) Y. H. Liu, J. Bai, X. Liang, D. M. Lubman, P. J. Venta; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3482-3490; C.) K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp; *Int. J. Spectrom. Ion Proc.* **1991**, 111, 89-102; D.) E. Nordhoff, A. Ingendog, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. Crain; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 771-776; E.) A. Shaler, J. N. Wickham, K. A. Sannes, K. J. Wu, C. H. Becker; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 576-579

<sup>57</sup> A.) B. J. Egner, G. J. Langley, M. Bradley; *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2652; B.) C. L. Brummel, I. N. W. Lee, Y. Zhou, S. J. Benkovic, N. Winograd; *Science* **1994**, 264, 399; C.) M. T. Roskey, P. Juhasz, I. P. Smirnov, E. J. Takach, S. A. Martin, L. A. Haff; *Proc. Natl.*

Massenspektrometrie wurden jedoch lange Zeit aufgrund der notwendigen Aufreinigung der Proben, wie sie z.B. bei der Sanger Sequenzierung oder einer PCR-Reaktion entstehen, eingeschränkt<sup>58</sup>. Neben der Aufreinigung durch die Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen oder der HPL-Chromatographie wurden alternative Ansätze zur Isolation des Analyten über die spezifische Bindung bzw. Affinität an geeigneten Oberflächen gefunden (Herausfischen der gewünschten Verbindungen ⇒ Fishing). Als Modellbeispiel seien hier mit Streptavidin beladene Magnetic Beads genannt. Die bei Verwendung eines Biotin-gelabelten Targets zu einer Streptavidin-Biotin Verknüpfung führen<sup>59</sup>.

#### 3.8 Aufgaben des Projektes

Zunächst sollte die prinzipielle Durchführbarkeit des Projekts an den folgenden drei Punkten mit exemplarischen Oligodesoxynukleotid-Sequenzen erarbeitet werden:

- Das Anbringen eines Oligodesoxynukleotids an die feste Phase.
- Die Durchführung der Polymerase-Reaktion an der festen Phase. Dabei müssen die optimalen Bedingungen für eine Festphasenreaktion gefunden werden.
- Das photolytische Abtrennen des Primers von der festen Phase durch den UV-Laser des MALDI-MS und die anschließende Detektion im Massenspektrometer. Dabei soll die zur einwandfreien Identifizierung minimal notwendige Konzentration bestimmt werden, um eine Aussage über die Empfindlichkeit der Methode treffen zu können.

Im Anschluß an diese prinzipiellen Arbeiten sollten Versuche zur Optimierung des Verfahrens mit dem Ziel der Parallelisierbarkeit und einer möglichst hohen Empfindlichkeit durchgeführt werden<sup>60</sup>.

Wesentliche Vorteile dieser neuen Methode im Vergleich zu bestehenden Verfahren sind der außerordentlich geringe Zeitaufwand und die unmittelbare Detektion ohne Label. Das Einführen des Labels ist entweder mit einer aufwendigen Laborausstattung (Isotopenlabor) oder einer verringerten Substratazeptanz der Enzyme (Fluoreszenzfarbstoff) verbunden.

---

*Acad. Sci.* **1996**, 93, 4724; D.) D. P. Little, D. J. Aaserud, G. A. Valaskovic, F. W. McLafferty; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9352; E.) D. van den Boom, C. Jurinke, S. Higgins, T. Becker, H. Köster; *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17 (9-11) 2157-2164; F.) H. Köster, D. van den Boom, A. Braun, A. Jacob, C. Jurinke, D. P. Little, K. Tang; *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16 (5&6) 563-571

<sup>58</sup> A. Shaler, J. N. Wickham, K. A. Sannes, K. J. Wu, C. H. Becker; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 576-579

<sup>59</sup> A.) A. Shaler, Y. Tan, J. N. Wickham, K. J. Wu, C. H. Becker; *Rapid Commun. Mass Spectrom* **1995**, 9, 942-947; B.) K. Tang, D. Fu, S. Kötter, R. F. Cotter, C. R. Cantor, H. Köster; *Nucl. Acids Res.* **1995**, 23, 3126-3131; C.) S. L. Cohen, B. T. Chait; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 31-37; D.) Stephanie Hahner, Dissertation, Universität Münster **1997**

<sup>60</sup> A.) L. A. Haff, I. P. Smirnov, *Genome Methods* Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 1054-9803/97; B.) Christian Wojczewski, Dissertation, J. W. Goethe-Universität Frankfurt **1999**

### 3. Spezieller Teil

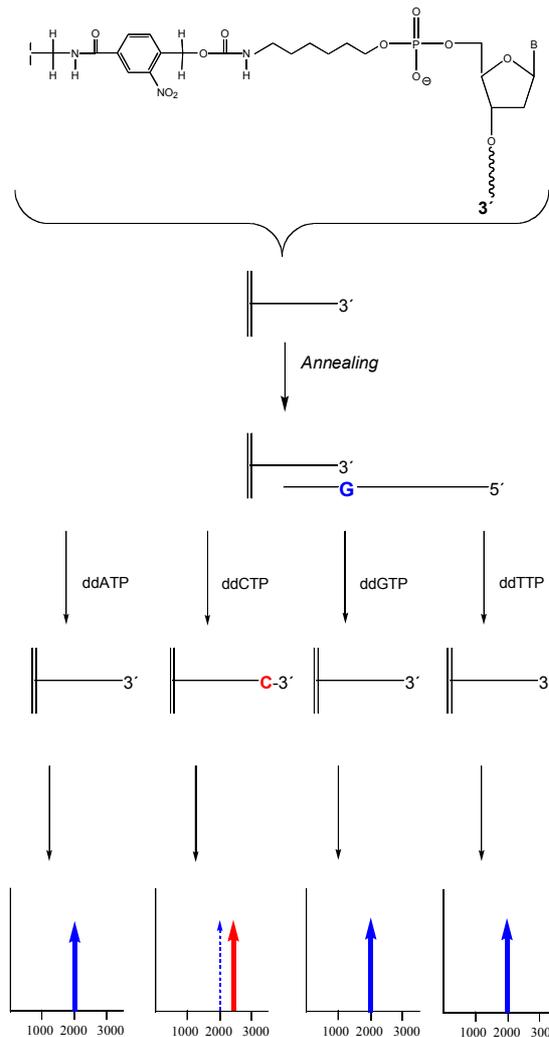


Abbildung 94: Schematische Darstellung des Projektes

Das Arbeitsprogramm gliederte sich nach der Literaturrecherche (Stand April 2000) wie folgt:

#### A Entwicklung des Verfahrens

1. Primer-Synthese einschließlich benötigter 5'-Modifikationen (Kinasierung oder Aminospacer)
2. Gegebenenfalls die Darstellung des entsprechenden photolabilen Linkers und die Festphasenreaktion
3. Single Nucleotide Primer Extension (SNuPE)  
Ionen austausch (falls notwendig) und die direkte Detektion durch MALDI-MS

#### B Optimierung und Parallelisierung

4. Kombination der vier SNuPE Reaktionen mit den Basen A, G, C und T  
Ionen austausch (falls notwendig) und die gleichzeitige Detektion verschiedener Punktmutationen durch DE-MALDI-MS

Zunächst sollte die Durchführbarkeit der Methode gezeigt werden. *Abbildung 94.* beschreibt die prinzipielle Durchführung des Experiments. Nach der Immobilisierung des photolabilen Linkers und der Anknüpfung des entsprechenden Oligodesoxynukleotids, erfolgt die PCR-Reaktion bzw. die Verlängerung um eine Base. Die Freisetzung des Oligodesoxynukleotids erfolgt durch den Laserbeschuss der in die Matrix eingebetteten Probe.

Wird die Verlängerung um eine Base in vier verschiedenen Gefäßen durchgeführt, handelt es sich bei der Detektion um ein ja/nein-Entscheidung. Die Masse des verlängerten Oligodesoxynukleotids unterscheidet sich um ca. 300 Dalton ( $A \Rightarrow 313$  Da,  $G \Rightarrow 328.7$ ,  $C \Rightarrow 288.3$  und  $T \Rightarrow 301.7$ ) von dem nicht verlängerten. Wird die Reaktion in einem Cap durchgeführt, das bedeutet alle vier ddNTPs werden dem Enzym gleichzeitig zum Einbau angeboten, variieren die eingebauten Massen der Standard-ddNTPs im ungünstigsten Fall nur um ca. 12 Dalton (A-T). Dies bedeutet einen extrem hohen qualitativen Anspruch an die durchzuführende MALDI-Messung. Der bei der PCR vorliegende Doppelstrang kann entweder vor der MALDI-Messung bereits aufgetrennt werden, zum Beispiel durch die Inkubation mit 25% iger Ammoniak Lösung<sup>61</sup>, oder der Doppelstrang wird während der Messung aufgetrennt<sup>62</sup>. Entscheidend für die Qualität des aufgenommenen Spektrums ist der Gehalt an adsorbierten Ionen an dem Trägermaterial.

#### 3.8.1 Synthese des photolabilen Linkers

Die Synthese des photolabilen Linkers gestaltet sich wie folgt:

Der Linker 3-Nitro-4-Brommethyl-benzoessäure **95** wurde ausgewählt, da er bei einer Wellenlänge von 355 nm gespalten werden kann. Die Wellenlänge der Spaltungsreaktion war in diesem Fall entscheidend für die Auswahl der Verbindung **95**. Vorallem in der Peptidsynthese werden photolabile und andere spaltbare Linker eingesetzt<sup>63</sup>, in der Nukleosidchemie finden vorallem photolabile Schutzgruppen eine vielseitige Anwendung<sup>64</sup> aber auch photolabil spaltbare Trägermaterialien<sup>65</sup>. Der hier verwendete Linker muß durch den im MALDI-Gerät verwendeten Laser (Stickstoff-Laser 337 nm) gespalten werden können. Eine Anregung bei einer niedrigeren Wellenlänge könnte zu Fragmentierungen in der DNA und damit zu falschen Massen führen.

Die Synthese des photolabilen Linkers (siehe *Abbildung 95.*) erfolgt durch die Bromierung (nukleofuge Abgangsgruppe) von 4-Methyl-benzoessäure **93**. Diese gestaltet sich langwierig und die Detektion per DC-Kontrolle bereitet anfänglich Probleme (gleiches Laufverhalten des Edukts und Produkts, eine Differenzierung gelingt durch das unterschiedliche Anfärbeverhalten mit der MOPS-Lösung). Die Reaktion erfolgt mit dem Bromierungsmittel N-Brom-succinimid (NBS) in Benzol

---

<sup>61</sup> C. Jurinke, D. van den Boom, V. Collazo, A. Lüchow, A. Jacob, H. Köster; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 904-910

<sup>62</sup> R. Sudha, R. Zenobi; *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 3136-3143

<sup>63</sup> A.) J. P. Tam, F. S. Tjoeng, R. B. Merrifield; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6117-6127; B.) V. N.R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer; *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3408-3412; C.) A. Ajayaghosh, V. N. R. Pillai; *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 5714-5717; D.) F. Albericio, E. Nicolas, J. Josa, A. Grandas, E. Pedroso, E. Giral, C. Grainer, J. VanRietschoten; *Tetrahedron* **1987**, 43 (24), 5961-5971; E.) S. S. Wang; *J. Org. Chem.* **1976**, 41 (20), 3258-3261; F.) C. G. Bochet; *Angew. Chem.* **2001**, 113, 11, 2140-2142

<sup>64</sup> A.) S. Bühler, H. Giegrich, W. Pfeleiderer; *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, 18 (6+7), 1281-1283; B.) A. Hasan, K. P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote; *Tetrahedron* **1997**, 53 (12), 4247-4264; C.) H. Giegrich, S. Eisele-Bühler, C. Hermann, E. Kvasnyuk, R. Charubala, W. Pfeleiderer; *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17 (9-11), 1987-1996; D.) K. C. Nicalaou, B. S. Safina, N. Winssinger; *Synlett* **2001**, 900-903; E.) C. G. Bochet; *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6341-6346; F.) A. Stutz, S. Pitsch; *Synlett* **1999**, S1, 930-934

<sup>65</sup> D. L. McMinn, R. Hirsch, M. M. Greenberg; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4155-4158

### 3. Spezieller Teil

über vier Tage in der Siedehitze. Zur Aktivierung des NBS wird AIBN als Radikalstarter eingesetzt. Das gewünschte Produkt 4-Brommethyl-benzoesäure **94** kann in 71% iger Ausbeute isoliert werden. Die Nitrierung von 4-Brommethyl-benzoesäure **94** erfolgt mit 90% iger Salpetersäure bei  $-10^{\circ}\text{C}$ . Das mono-substituierte Produkt 3-Nitro-4-Brommethyl-benzoesäure **95** entsteht bei dieser Temperatur in 81% iger Ausbeute<sup>66</sup>. Durch die Nitrierung entsteht ein Produkt, welches lichtempfindlich ist und daher müssen alle weiteren Synthese- und Reinigungsschritte unter Lichtausschluß stattfinden.

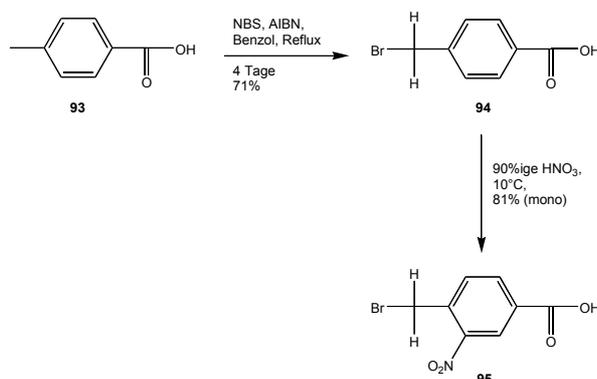


Abbildung 95: Synthese des bifunktionellen Linkers **96**

Anfängliche Versuche den Linker **95** mit einer Dicarbonsäure (Cäsium-Salz) zur Verbindung **97** umzusetzen schlugen fehl. Die Darstellung des entsprechenden Amino-modifizierten Linkers 3-Nitro-4-Aminomethyl-benzoesäure **99** gelang ebenfalls nicht, zwar konnten die Zwischenprodukte, der Gabriel-Synthese (Phthalimid) und der Delépin-Reaktion (Urotropin), 3-Nitro-4-phthalimidomethyl-benzoesäure **100** und 3-Nitro-4-Hexamethylentetramin-benzoesäure **98** in quantitativer Ausbeute hergestellt werden<sup>67</sup>. Die Freisetzung zur 3-Nitro-4-Aminomethyl-benzoesäure **99** konnte per DC detektiert werden, allerdings bereitete die Aufarbeitung beziehungsweise die Isolierung Probleme. Eine Umsetzung mit Hilfe von Ammoniak unter Druck konnte im Labor nicht durchgeführt werden, da dazu ein entsprechender Autoklav nicht zur Verfügung stand. Diese Umsetzung ist in der Literatur beschrieben<sup>68</sup>. Die Reaktion zu 3-Nitro-4-Hydroxymethyl-benzoesäure **96** konnte mit Natriumjodid in Wasser über zwei Tage bei Reflux durchgeführt werden<sup>69</sup>. Die Verbindung **96** konnte in 64% iger Ausbeute isoliert werden (siehe *Abbildung 96*).

<sup>66</sup> A.) D. H. Rich, S. K. Gurwara; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1575-1579; B.) D. H. Rich, S. K. Gurwara; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 5, 301-304

<sup>67</sup> A.) V. N. R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer, I. Gatfield; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 5364-5370; B.) J. C. Sheehan, W. A. Bolhorte; *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2786-278

<sup>68</sup> R. P. Hammer, F. Albericio, L. Gera, G. Barany; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 36, 31-45

<sup>69</sup> N. Kneib-Cordonier, F. Albericio, G. Barany; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 527-538

### 3. Spezieller Teil

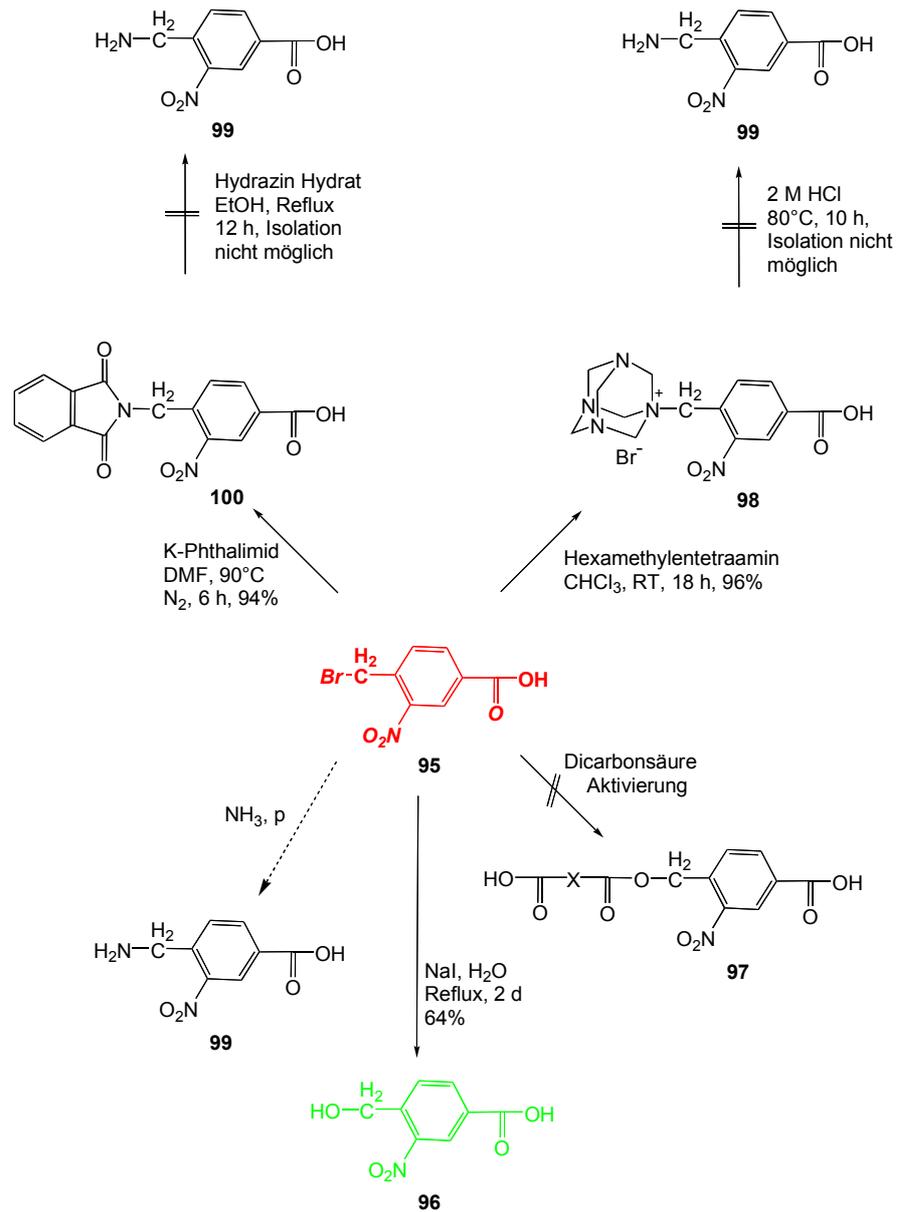


Abbildung 96: Syntheseversuche bifunktionaler photolabiler Linker

Die Umsetzung von 3-Nitro-4-Hydroxymethyl-benzoessäure **96** mit 4,4'-Dimethoxytrityl-chlorid und DMAP in Pyridin gelingt in 92% iger Ausbeute zu 3-Nitro-4-(4,4'-Dimethoxytrityl)-Hydroxymethyl-benzoessäure **101** (siehe Abbildung 97.).

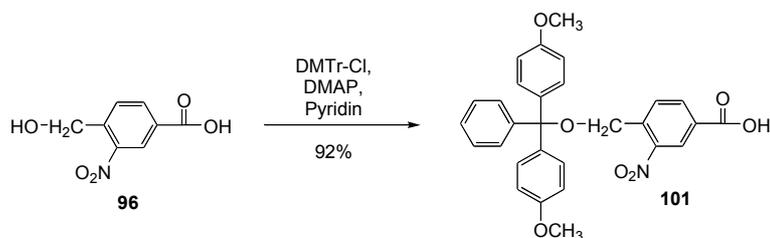


Abbildung 97: Synthese **101**

## 3.8.2 Immobilisierung des photolabilen Linkers

Die Verbindung **101** kann mit dem Aktivator TBTU und N-Ethylmorpholin (NEM) in DMF an eine feste Phase (Amino modifiziertes CPG-Material) angebunden werden. Die Beladungsdichte kann durch die äquivalente Zugabe der Verbindung **101**, TBTU und NEM gesteuert werden.

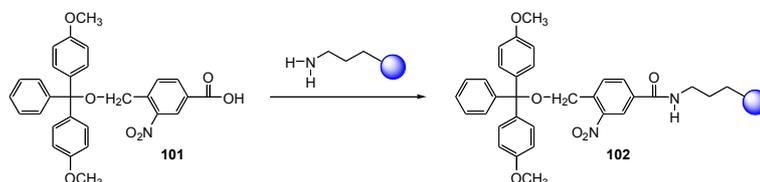


Abbildung 98: Immobilisierung des photolabilen Linkers **101** an Aminopropyl-CPG

Die hergestellte Verbindung **102** (siehe *Abbildung 98.*) wurde mit der Matrix  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylzimtsäure und Ammoniumcitrat vermischt und die Verbindung **102** durch den Beschuss der Mischung mit dem Laser des MALDI-Gerätes freigesetzt (siehe *Abbildung 99.*). Die Verbindung **103** konnte mit einer Masse von 321.48 im Spektrum detektiert werden. Allerdings ist dies noch kein allgemeingültiger Beweis, daß die photolabile Spaltung auch bei anderen Verbindungen möglich ist.

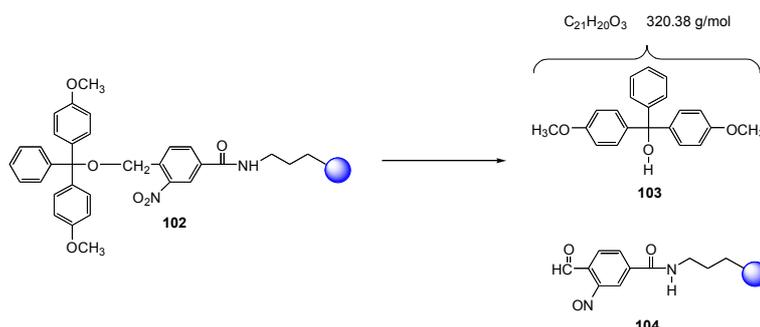


Abbildung 99: Spaltungsreaktion der Verbindung **102** im MALDI-Spektrometer

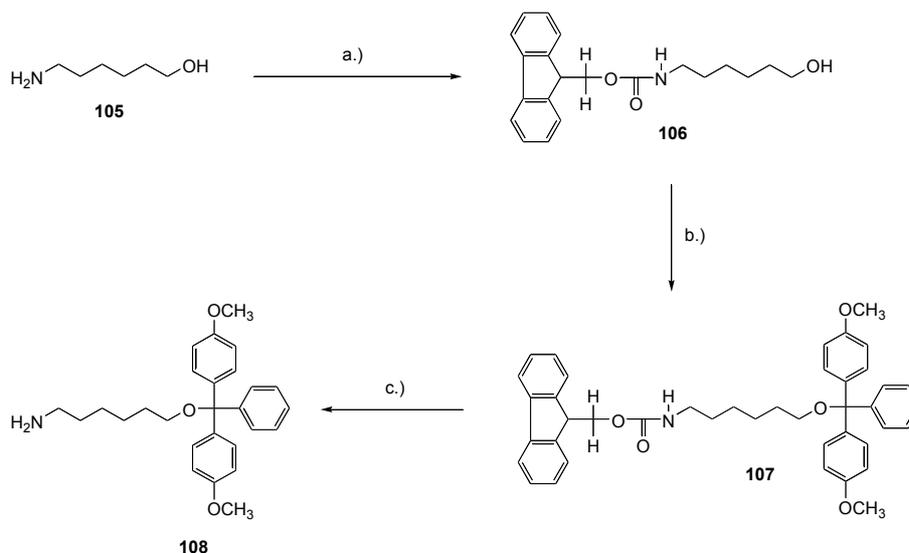
Um ein Oligodesoxynukleotid an den photolabilen Linker in befriedigender Ausbeute anbinden zu können, sollte zwischen der festen Phase und dem Oligodesoxynukleotid ein Linker angebracht werden. Dieser Linker ermöglicht eine gezielte Anbindung ohne eine sterische Hinderung. Die Synthese gestaltet sich dabei wie folgt (siehe *Abbildung 100.*):

Aminohexanol **105** wird durch die Reaktion mit Fmoc-OSu, Natriumcarbonat und DMF in 72% iger Ausbeute zu 6-(Fmoc-amino)-hexanol **106** umgesetzt. Die Amino-Gruppe kann in diesem Fall mit der Fmoc-Schutzgruppe selektiv geschützt werden, ebenso kann im folgenden Reaktionsschritt die Hydroxyl-Gruppe mit der 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe geschützt werden<sup>70</sup>. Die Umsetzung der Verbindung **106** mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid und DMAP in Pyridin führt zu der Verbindung 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-(Fmoc-Amino)-hexanol **107**. Aufgrund der

<sup>70</sup> A.) L. A. Carpino, G. Y. Han; *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 22, 3404-3409; B.) C. D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1980**, 15, 59-66; C.) C. D. Chang, J. Meienhofer; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1978**, 11, 246-249; D.) L. Lapatsanis, G. Milias, K. Froussios, M. Kolovos; *Synthesis* **1983**, 671-673

### 3. Spezieller Teil

hohen Lipophilie der Verbindung **107** kann diese nur bedingt mit Hilfe der Säulenchromatographie gereinigt werden. Daher wurde auf eine Aufreinigung verzichtet und die Verbindung **107** 1.5 h bei Raumtemperatur mit einer 20%igen Diethylamin-Lösung in DMF behandelt. Dabei erfolgt die selektive Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und die Verbindung **108** kann nach einer Säulenchromatographie über eine breite und kurze Säule in 75% iger Ausbeute isoliert werden. Die Verbindung 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-Amino-1-hexanol **108** kann anschließend mit Hilfe von TBTU und NEM in DMF an einem festen Träger immobilisiert werden (siehe *Abbildung 101*.)

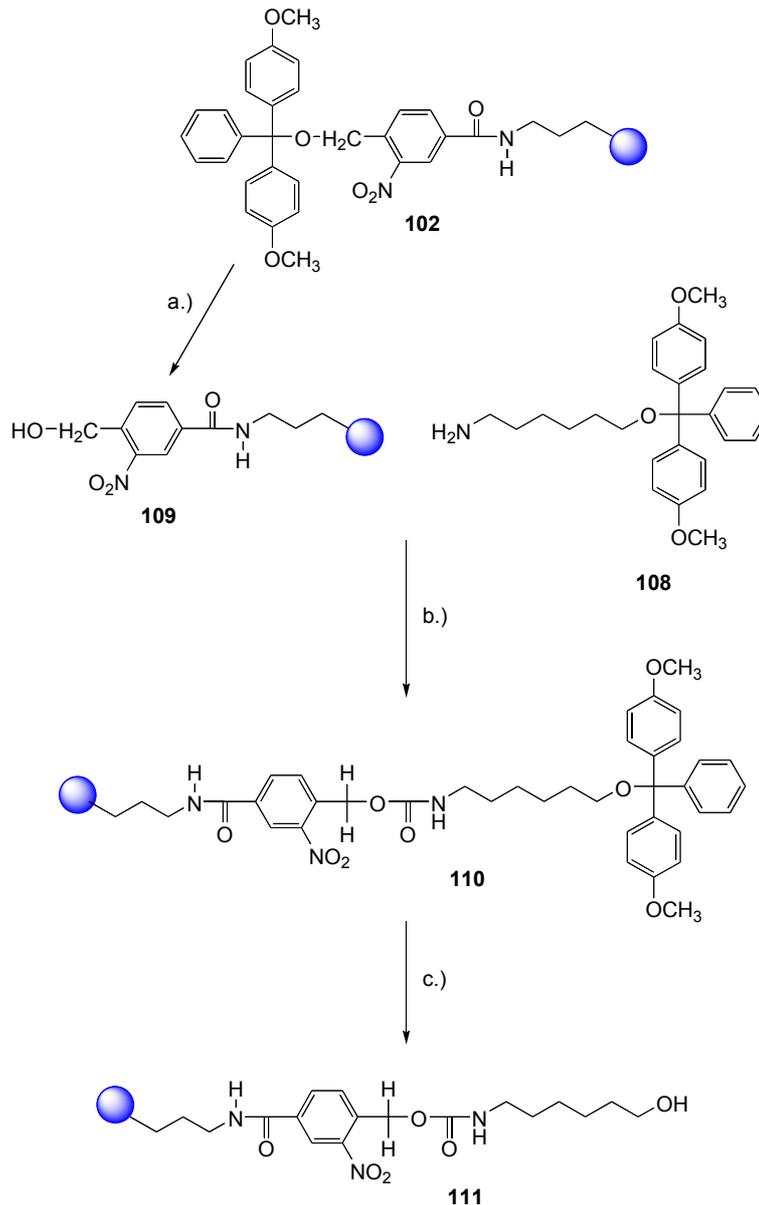


a.) Fmoc-OSu, Natriumcarbonat, DMF, 72%; b.) DMTr-Cl, DMAP, Pyridin; c.) 20% Diethylamin in DMF, 75%

*Abbildung 100*: Darstellung der Verbindung **108** 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-Amino-1-hexanol

Das Trägermaterial **102** wird mit einer Lösung aus 3%iger DCA in DCM behandelt, bis keine Orangefärbung des Trägermaterials mehr zu erkennen ist. Und anschließend mit DCM und ACN gewaschen und getrocknet. Der detritylierte Träger **109** wird durch die Zugabe von CDI voraktiviert und anschließend mit der Verbindung **108** in THF oder DMF zur Reaktion gebracht. (Hier musste in verschiedenen Versuchen festgestellt werden, daß die umgekehrte Aktivierung der Amino-Verbindung **108** mit CDI und die folgende Reaktion mit dem Trägermaterial **109** zu keiner reproduzierbaren Verknüpfung führt.) Die Beladungsdichte des hergestellten Trägermaterials **110** kann mit Hilfe der UV-Spektroskopie (498 nm) durch die Abspaltung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe mit einer 0.1 M p-Toluolsulfonsäure in ACN oder mit einer DCA Lösung in DCM bestimmt werden. Die Verbindung **110** kann durch die Verwendung von 3%iger DCA in DCM detrityliert und anschließend mit einem Oligodesoxynukleotid umgesetzt werden. Das Trägermaterial **111** wird zur Ankopplung der zu messenden Oligodesoxynukleotide verwendet (siehe *Abbildung 101*).

### 3. Spezieller Teil



a.) 3% DCA in DCM; b.) Voraktivierung der Verbindung **109** in DMF oder THF, Zugabe von Verbindung **108**; c. 3% DCA in DCM

*Abbildung 101:* Synthese der Verbindung **111** zur möglichen Ankopplung eines Oligodesoxynukleotids

Das Trägermaterial **110** wird mit der MALDI-Matrix vermischt und die Verbindung **112** durch den Beschuß mit dem Laser detektiert (siehe *Abbildung 102.*).

Das gewünschte Spaltungsprodukt kann mit einer Masse von 462.21 (463.51 berechnete Masse) detektiert werden, allerdings erfolgt ebenfalls die Detektion verschiedener Salzaddukte.

### 3. Spezieller Teil

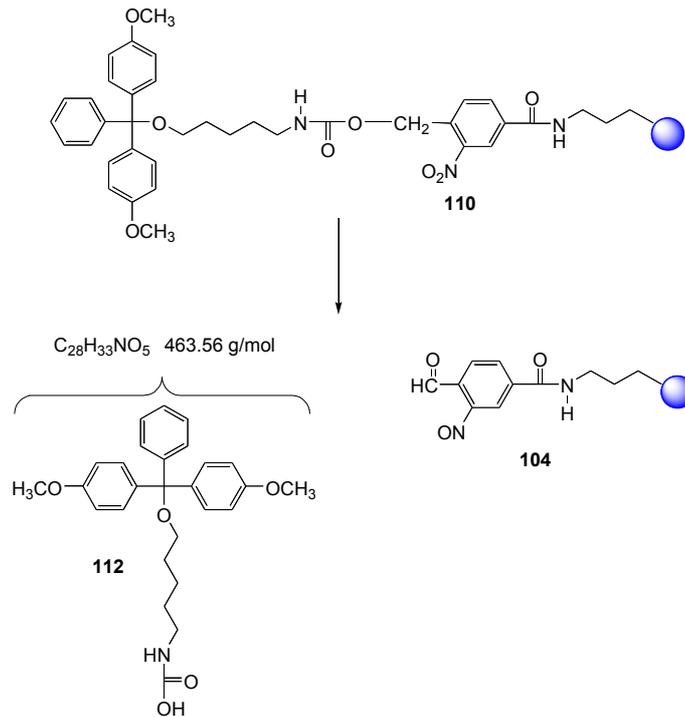


Abbildung 102: Spaltungsreaktion der Verbindung **110** im MALDI-Spektrometer

#### 3.8.3 Oligodesoxynukleotid-Synthese am Trägermaterial

Das Trägermaterial **110** wird als modifizierter Träger im Phosphoramidit-Syntheszyklus nach Caruthers verwendet (siehe *Abbildung 10.*) In einem Maßstab von 1  $\mu\text{mol}$  wurde das Oligodesoxynukleotid **113** synthetisiert. Dabei entsteht allerdings ein 3'-geschütztes Oligodesoxynukleotid, das enzymatisch nicht verlängert werden kann. Hier soll jedoch zuerst durch ein einfaches Modellsystem die gewünschte Spaltung untersucht werden. Anschließend kann eine entsprechend inverse Synthese ( $5' \rightarrow 3'$ ) durchgeführt werden, um ein freies 3'-Ende zu erhalten. Das Trägermaterial **113** wird mit 6-Aza-2-thiothymidin (ATT), norHarman (nH) und Ammoniumcitrat (siehe *Abbildung 103.* und *104.*) vermischt und mit dem Laser beschossen.

Allerdings muß hier festgestellt werden, daß die Qualität des gemessenen Spektrums keine klaren Aussagen zulässt. Das zu detektierende Spaltungsprodukt **114** besitzt eine Masse von 3159.14 als 3'-Phosphat. Das detektierte „Hauptprodukt“ besitzt eine Masse von 3192.2 (+ 33.1  $\rightarrow$  Salz-Addukte). Jedoch wäre bei der beobachteten Qualität des Spektrums nicht einmal eine ja/nein-Entscheidung über einen Baseneinbau möglich.

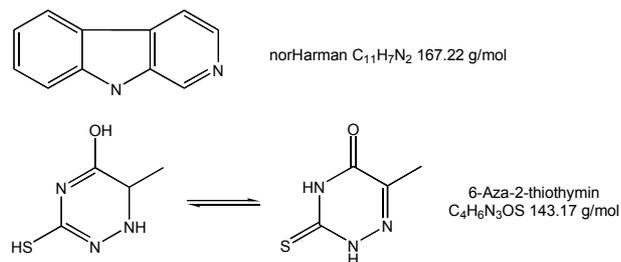


Abbildung 103: Verwendete Matrices 6-Aza-thiothymidin und norHarman

### 3. Spezieller Teil

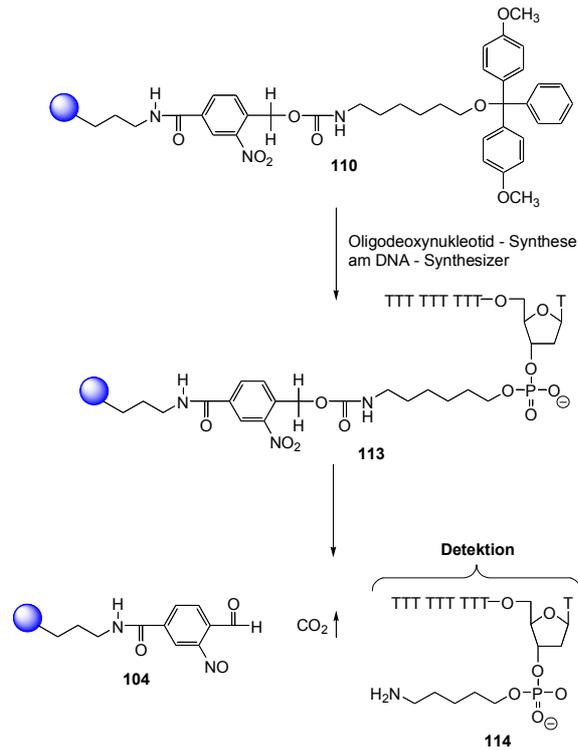


Abbildung 104: Festphasensynthese eines T<sub>10</sub> an dem modifizierten Trägermaterial **110** und die Freisetzung im MALDI-Spektrometer

#### 3.8.4 Verwendung des Amidits **9** für die Oligodesoxynukleotid-Synthese

Das in der Projektarbeit mit der Firma *Clondiaq Chip Technology* hergestellte, chemisch selektiv spaltbare Phosphoramidit **9** könnte hier als Alternative zu dem photolabilen Linker verwendet werden. Dazu wurde das Trägermaterial **102** für die DNA-Synthese verwendet und das Amidit **9** als erste Base gekoppelt. *Abbildung 105* zeigt das synthetisierte Oligodesoxynukleotid **115** und die entsprechende Freisetzung zu den Spaltprodukten **116** und **117**.

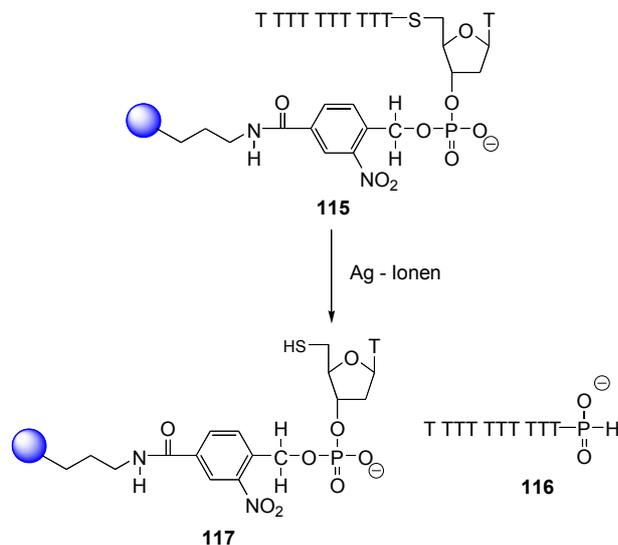


Abbildung 105: Freisetzung der Verbindung **116** im MALDI-Spektrometer

### 3. Spezieller Teil

Bei der Durchführung der Messung mußte festgestellt werden, daß bei der Spaltung mit Silberionen kein definiertes Produkt detektiert werden kann, sondern daß mehrere Spaltungsprodukte entstehen. Vorallem stellt die Messung mit Silberionen jedoch ein apparatives Problem dar. Die Silberionen kontaminieren („verstopfen“) den Detektor des MALDI-Gerätes und die Qualität der aufgenommenen Spektren wird mit jeder Messung schlechter.

Berechnete Massen	Ansatz-Nummer Matrix	Gemessen	Abweichung
a.) T <sub>10</sub> unmodifiziert 2979.99 g/mol	<b>115</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	3016.63 3016.63	a.) + 36.64 b.) - 27.34
	<b>115 + Ag</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	Nicht auswertbar!	
b.) T <sub>10</sub> -3'-Phosphat 3043.97 g/mol	<b>115</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	3065.59	b.) + 21.62
c.) T <sub>11</sub> -3'-OH 3300.25 g/mol	<b>115</b> α-cyano	Nicht auswertbar	
d.) T <sub>11</sub> -3'-Phosphat 3365.23 g/mol	<b>115</b> α-cyano	3051.09 3289.20 3628.23	b.) + 7.12 c.) - 11.05 e.) + 28.77
	<b>115 + Ag</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	Nicht auswertbar	
e.) T <sub>11</sub> -3'-Linker 3599.46 g/mol	<b>115</b>	2979.07	a.) + 0.92
		3000	a.) + 20.0
	ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	3012.49 3012.49	a.) + 32.5 b.) - 31.5
		3315.16	c.) + 14.9

*Tabelle 25:* Berechnete und gefundene Molmassen zur Freisetzung der Verbindung **115**

Erstaunlicherweise muß jedoch festgestellt werden, daß das entsprechende Spaltungsprodukt **116**, sowie das entsprechende Natrium-Salz und ein Produkt mit einer um 32.5 größeren Masse detektiert werden können, wenn das Trägermaterial **115** in die Matrix eingebettet beschossen wird. *Tabelle 25.* zeigt die Ergebnisse verschiedener Experimente für die Spaltungsreaktion der Verbindung **115**.

Die Ergebnisse dieser Messungen waren vielversprechend, so daß vier weitere Oligodesoxynukleotide **118** bis **121** synthetisiert wurden, um deren entstehenden Spaltungsprodukte zu untersuchen.

5'-AGC AGC CAG<sub>PS</sub> T-Linker-CPG     **118**

5'-CGG TTG CTA A<sub>PS</sub>T-Linker-CPG     **119**

5'-GAC TTA CCG G<sub>PS</sub>T-Linker-CPG     **120**

5'-TAA TGC CGA C<sub>PS</sub>T-Linker-CPG     **121**

Die Oligodesoxynukleotide **118** bis **121** wurden in einen Maßstab von 1 µmol synthetisiert. Die Synthese erfolgt DMT-off die Abspaltung der Basenschutzgruppen und der Cyanoethoxy-Gruppe erfolgt mit Ammoniak bei Raumtemperatur

### 3. Spezieller Teil

über 24 Stunden. Das Trägermaterial wurde anschließend mit wenig Methanol und einer 50 mM Ammoniumacetat-Lösung gewaschen.

Die Trägermaterialien der Synthesen **118** bis **121** wurden mit dem Matrix-Gemisch versetzt und die Spaltungsprodukte detektiert (siehe *Tabelle 26.*).

Oligodesoxynukleotid	Berechnete Masse	Gefundene Masse	Differenz
5'-AGC AGC CAG <sub>P</sub> -3'	2797.83	2152.64	
5'-C AGC CAG <sub>P</sub> -3' <sup>b</sup>	2154.41	2152.64	- 1.77
5'-CGG TTG CTA A <sub>P</sub> -3'	3108.02	3120.01	+ 11.99 <sup>a</sup>
5'-GAC TTA CCG G <sub>P</sub> -3'	3093.01	3104.65	+ 11.64 <sup>a</sup>
5'-TAA TGC CGA C <sub>P</sub> -3'	3077.01	3089.19	+ 12.18 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Eichung des MALDI-Geräts weicht um ca. 12 Masseinheiten ab.

<sup>b</sup>: Das Dimer am 5'-Ende AG wurde während der Messung abgespalten.

*Tabelle 26:* Detektierte Massen für die Oligodesoxynukleotide **118-121**

Hier kann festgestellt werden, daß die Spaltung durch den Laserbeschuß nicht willkürlich im Molekül erfolgt, sondern daß die Spaltung bevorzugt an der P-S-Bindung stattfindet. Mechanistisch sollte die Photospaltung wie *Abbildung 106.* zeigt erfolgen.

Außer den oben aufgeführten Massen konnte jeweils noch eine weitere höhere Spaltungsmasse detektiert werden. Dieses Spaltungsprodukt beinhaltet den Linker.

Oligodesoxynukleotid	Berechnete Masse	Gefundene Masse	Differenz
5'-AGC AGC CAG <sub>PS</sub> T-Linker-3'	3465.3	-	
5'-CGG TTG CTA A <sub>PS</sub> T-Linker-3'	3471.29	3439.55	- 31.74
5'-GAC TTA CCG G <sub>PS</sub> T-Linker-3'	3456.28	3423.52	- 33.28
5'-TAA TGC CGA C <sub>PS</sub> T-Linker-3'	3440.28	3409.52	- 30.76

*Abbildung 27:* Detektierte Massen für die Oligodesoxynukleotide **118-121**



### 3. Spezieller Teil

Lösung	Gefundene Massen	Berechnete Massen	Differenzen
Ammoniumacetat	3596.25 3970.69	3599.46 <sup>a</sup> ?	- 3.21
Ammoniak	3064.67 3386.39	3043.97 <sup>b</sup> 3365.23 <sup>c</sup>	+ 20.7 + 21.16
EDA	3061.54 3383.11	3043.97 <sup>b</sup> 3365.23 <sup>c</sup>	+ 17.57 + 17.88

<sup>a</sup> : T<sub>11</sub>-3'-Linker; <sup>b</sup> : T<sub>10</sub>-3'-Phosphat; <sup>c</sup> : T<sub>11</sub>-3'-Phosphat

Tabelle 28: Detektierte Massen für das Oligodesoxynukleotid **113**

Wie *Tabelle 28.* zeigt, weisen die MALDI-Spektren jeweils zwei Spaltungsprodukte auf. Um ein allgemeingültiges Verfahren zu entwickeln, muß die Spaltungsreaktion ebenfalls an gemischten Sequenzen untersucht werden (siehe *Tabelle 29.* und *30.*).

Für die weiteren Untersuchungen wurden die zwei Oligodesoxynukleotide

5'-CTC GTA TCA G<sub>PS</sub>T-Linker-CPG **122**

5'-ATC GCT ACT T<sub>PS</sub>T-Linker-CPG **123**

synthetisiert.

Die Oligodesoxynukleotide **122** und **123** wurden mit dem EDA-Mix behandelt und es wurden Proben nach: 1 h, 2 h und 3 h (5h) vermessen.

Behandlung	Gemessene Masse	Berechnete Masse	Qualität des Spektrums
Unbehandelt	-	-	Nicht auszuwerten
1 h	3089.59	3066.99 (+ 22.60) <sup>a</sup>	Starker Untergrund
2 h	3085.48	3066.99 (+ 18.49) <sup>a</sup>	Gute Qualität
3 h	3094.92 3430.69	3066.99 (+ 27.93) <sup>a</sup> 3387,25 (- 43.44) <sup>b</sup>	Starker Untergrund

<sup>a</sup> : 5'-CTC GTA TCA G<sub>P</sub>-3'; <sup>b</sup> : 5'-CTC GTA TCA G<sub>PS</sub>T<sub>P</sub>-3'

Tabelle 29: Detektierte Massen für das Oligodesoxynukleotid **122**

Behandlung	Gemessene Masse	Berechnete Masse	Qualität des Spektrums
Unbehandelt	-	-	Nicht auszuwerten
1 h	3063.14	3041.98 (+ 21.16) <sup>a</sup>	Sehr gute Qualität
2 h	3063.54 3381.41	3041.98 (+ 21.56) <sup>a</sup> 3362.24 (+ 19.17) <sup>b</sup>	Gute Qualität
3 h	3060.8 3379.38	3041.98 (+ 18.82) <sup>a</sup> 3362.24 (+ 17.14) <sup>b</sup>	Höhere Masse Überwiegt
5 h	2979.24 3378.73	3041.98 (- 62.74) <sup>a</sup> 3362.24 (+ 16.49) <sup>b</sup>	Starker Untergrund

<sup>a</sup> : 5'-ATC GCT ACT T<sub>P</sub>-3'; <sup>b</sup> : 5'-ATC GCT ACT T<sub>PS</sub>T<sub>P</sub>-3'

Tabelle 30: Detektierte Massen für das Oligodesoxynukleotid **123**

## 3.8.5 Doppelstrang-Experiment

Da das gewünschte Spaltungsprodukt durch die Behandlung mit dem EDA-Mix für 2 h, detektiert werden kann, soll im nächsten Schritt in einem Doppelstrang-Experiment nachgewiesen werden, ob die PCR-Probe als Doppelstrang vermessen werden kann.



Dazu werden die beiden Oligodesoxynukleotide **123** und **124** gemeinsam auf 90°C erwärmt und anschließend langsam abgekühlt. Das Trägermaterial wird nicht gewaschen sondern sofort im MALDI-Gerät vermessen. Die beiden Oligodesoxynukleotide **123** und **124** können detektiert werden (siehe *Tabelle 31.*). Folgende Werte konnten für das Doppelstrangexperiment gemessen werden.

Oligodesoxynukleotid	Gefundene Masse	Berechnete Masse
<b>123</b>	3043.68 (1498.7)	3041.98 (- 1.7)
<b>124</b>	8193.80 (4101.88)	8186.35 (- 7.45)

*Tabelle 31:* Detektierte Massen für die Oligodesoxynukleotide **123** und **124**

Bei den beiden kleineren Massen handelt es sich um die doppeltgeladenen Spaltungsprodukte.

## 3.8.6 Inverse Oligodesoxynukleotid-Synthese

Um ein freies 3'-Ende für eine Polymerasereaktion zu erhalten, muß die Synthese des zu detektierenden Oligodesoxynukleotids vom 5'- zum 3'-Ende erfolgen. Die dafür benötigten Amidite sind käuflich, ihre Reaktivität ist jedoch gegenüber den Standard-Amiditen geringer. Die temporäre 3'-Schutzgruppe kann dabei sowohl photolytisch<sup>71</sup> wie auch chemisch gespalten werden. Die Synthese muß entweder mit einem anderen Aktivator wie Pyridiniumhydrochlorid oder mit einem modifizierten Synthesezyklus durchgeführt werden. Die Kopplungszeit für das Amidit muß bei der Verwendung von DCI verlängert werden (120 bis 300 sec). Um eine entsprechend hohe Kopplungsausbeute zu erreichen, wird das Amidit am Besten jedoch zweimal hintereinander gekoppelt (Double-couple). Bei der Verwendung von DCI konnten keine qualitativ hochwertigen Spektren des entsprechenden Spaltungsproduktes aufgenommen werden. Eine wesentlich höhere Beladungsdichte, an den invers synthetisierten Oligodesoxynukleotiden **155** und **156**, erhält man durch die Verwendung von Pyridinhydrochlorid oder Benzylthiotetrazol als Aktivator im Synthesezyklus.



<sup>71</sup> T. Wagner, W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 2023-2035

### 3. Spezieller Teil

Allerdings lassen die gemessenen Spektren, aufgrund ihrer Qualität, hier nur eine ja/nein-Entscheidung über den Einbau eines Nukleotids innerhalb der DNA-Synthese am Synthesizer zu. Wird dieses Fragment noch innerhalb einer PCR-Reaktion eingesetzt, ist kein auswertbares Spektrum aufzunehmen. Trotz der durchgeführten Waschschriffe (Wasser, ACN, MeOH, Wasser, 50 mM Ammoniumacetat) nach der PCR-Reaktion ist die Menge der absorbierten Ionen zu hoch, um ein eindeutiges Spektrum zu erzielen. Es ist keine Differenzierung zu dem erfolgten Einbau der entsprechenden Base möglich. Daher sollte in Anbetracht der erzielten Ergebnisse die Entwicklung dieses Verfahrens nochmals überdacht werden. Einen interessanten Aspekt stellt hier auf jeden Fall die Aufklärung des Spaltungsmechanismus dar. Für den Nachweis einer Punktmutation, erweist sich das entwickelte Konstrukt jedoch zu komplex, da bereits einfachere und zuverlässigere Verfahren für den Nachweis einer Punktmutation existieren.

#### 3.9 Verknüpfungsreaktionen von Acetal-geschützten Oligodesoxynukleotiden mit Hydrazin-Derivaten

#### 3.10 Stand der Forschung

Die Konjugation und die Immobilisierung von Biomolekülen sind ausgesprochen wichtige Prozesse für heutige Forschungsprojekte. In der Praxis kann die gerichtete Konjugation den Forschern jedoch Probleme bereiten. Die Reaktionen verlaufen zum Teil in nicht zufriedenstellenden Ausbeuten, obwohl den Forschern eine große Auswahl an

- funktionellen Gruppen  $\Rightarrow$  wie z.B. Alkohole, Amine, Imine, Halogene, Carbonsäure-Derivate, Thiole, Nitrile u.a. und entsprechende
  - Abgangsgruppen  $\Rightarrow$  Triflate, Sulfonate, Mesylate etc.
- zur Verfügung stehen, gestaltet sich die Konjugation von Biomolekülen häufig nicht trivial.

Die drei häufigsten verwendeten Konjugationssysteme beruhen auf:

- einer Amid-Bindung (Reaktion einer Amino-Gruppe mit einer aktivierten Carboxyl-Gruppe)
- einem Thioether oder Disulfid-Bindungen (Reaktion von Thiolen, Maleinimiden, Pyridinyl-disulfiden u.a.)
- einem Biotin/Avidin-Komplex (Ligand Biotin bindet an den Rezeptor (Protein) Avidin)

Alle drei Systeme weisen wie alle anderen Konjugationssysteme Vor- und Nachteile auf. Zum Beispiel sind Thiole auf die Dauer nicht stabil und schwer zu handhaben, da sie bei folgenden Reaktionen häufig Nebenreaktionen eingehen. Der Biotin/Avidin-Komplex ist so stabil, daß er meist nicht einfach zu lösen ist (Dissoziation). Bei der Ausbildung der Amid-Bindung wird immer ein Aktivator benötigt und intramolekulare Reaktionen der aktivierten Verbindung sind möglich.

##### 3.10.1 Die Aldehyd-Funktion, Stand der Literatur

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Möglichkeit der Konjugation von Acetal-modifizierten Oligodesoxynukleotiden untersucht werden. Diese Acetal-modifizierten Oligodesoxynukleotide stellen dabei maskierte Aldehyd-Oligodesoxy-

### 3. Spezieller Teil

nukleotide dar. Die Reaktionen von Aldehyden mit Fluorophoren, Reporter-Gruppen, Proteinen, Nucleinsäuren und anderen Biomolekülen sind literaturbekannt<sup>72</sup>. Nucleinsäuren tragen in ihrer natürlichen Form keine Aldehyd-Funktionen, daher sind sie für eine gezielte Modifikation besonders geeignet.

Die Einführung einer Aldehydgruppe in ein Oligodesoxynukleotid ist zum Beispiel am 3'-Ende durch die Oxidation eines RNA-Bausteins mit Natriumperjodat möglich oder am 5'-Ende durch die Kopplung eines vicinalen Diols und der anschließenden Oxidation zum Aldehyd<sup>73</sup>. Mit einem entsprechend hohen synthetischen Aufwand kann ein modifiziertes Nucleotid hergestellt werden, welches in einer Seitenkette ein vicinales Diol trägt<sup>74</sup>. Bisher beschriebene Darstellungen beruhen ausschließlich auf der Oxidation von vicinalen Diolen mit Natriumperjodat. Dabei bereitet die Entfernung des Oxidationsmittels häufig Schwierigkeiten. Für Moleküle, die andere durch Perjodat ebenfalls oxidierbare Gruppen tragen, ist diese Reaktionsführung nicht möglich.

Liegt sowohl die 3'- wie auch die 5'-Position frei vor (Hydroxyl-Gruppe), ist zum Beispiel eine selektive Oxidation der 3'- oder der 5'-Gruppe nicht möglich.

- M. W. Reed beschreibt die Konjugation von 5'-Benzaldehyd modifizierten Oligodesoxynukleotiden an eine Semicarbazid modifizierte Siliciumoberfläche und die DNA-Synthese mit einem cyclischen Acetal-modifizierten Amidit<sup>75</sup>. Die Konjugation erfolgt durch die Kopplung des cyclischen Acetals und die Freisetzung des reaktiven Benzaldehyd (BAL).
- I. Saito gelang die Synthese eines 3-Formylindol Nucleosids, das als universelle Base innerhalb einer Oligodesoxynukleotid-Sequenz eingebaut werden kann<sup>76</sup>. Die Aldehyd-Funktion wird hier unmaskiert eingeführt und die Hybridisierung mit einem komplementären Gegenstrang ist möglich.
- M. Schweitzer beschreibt die Möglichkeit der Immobilisation von endständig modifizierten Hydrazin-Oligodesoxynukleotiden an eine, zum Beispiel durch Aldehyde, modifizierte Oberfläche<sup>77</sup>.

#### 3.10.2. Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotide

Der Einsatz der Acetal-modifizierten Oligonucleotiden bietet gegenüber den bisher verwendeten Aldehyd-Oligodesoxynukleotiden die folgenden Vorteile:

- Aldehyde sind nicht unbegrenzt lagerstabil, sie bilden bei längerer Lagerung Zersetzungsprodukte
- Acetale sind stabil gegenüber den Bedingungen der Standardmethoden der Oligodesoxynukleotid-Synthese und der Vervielfältigung (PCR)

---

<sup>72</sup> A.) G. T. Hermanson; *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego **1996**; B.) E. N. Timofeev, S. V. Kochetkova, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev; *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 3142

<sup>73</sup> A.) E. N. Timofeev, S. V. Kochetkova, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev; *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 3142; B.) M. Lemaitre, B. Bayard, B. Lebleu; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, 84, 648

<sup>74</sup> A.) M. Dechamps, E. Sonveaux; *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, 14, 867; B.) M. Dechamps, E. Sonveaux; *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17 (4), 697; C.) E. Trevisio, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8687

<sup>75</sup> M. A. Podyminogin, A. A. Lukhtanov, M. W. Reed; *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29 (24), 5090-5098

<sup>76</sup> A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4581-4583

<sup>77</sup> S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäß, G. Burdinski, J. R. Havens, T. J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer; *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30 (21), 4793-4802

### 3. Spezieller Teil

- Acetale sind gut handhabbar und in der klassischen Chemie leicht in ihre entsprechenden Aldehyde umzuwandeln

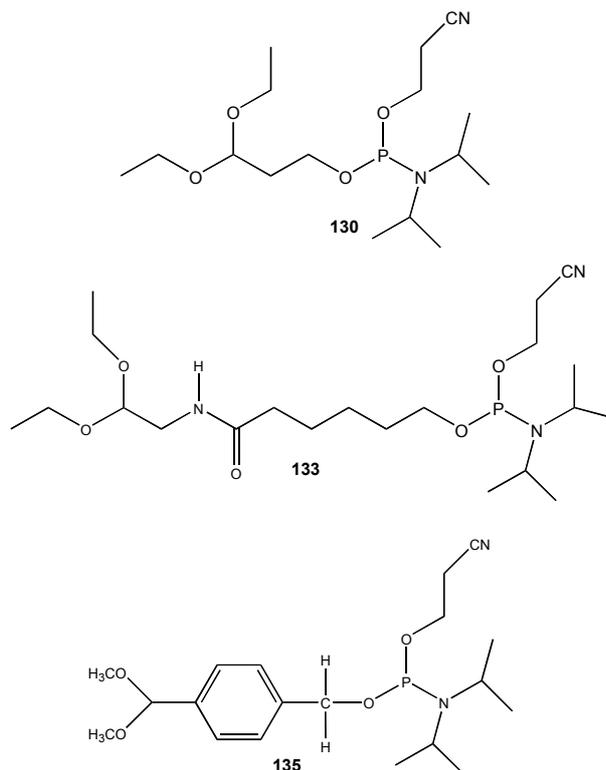


Abbildung 108: Acetal-modifizierte Amidite für die 5'-Modifikation

Im Rahmen dieser Arbeit standen drei entsprechende kopplungsfähige Acetal-Derivate zur 5'-Modifikation zur Verfügung **130**, **133** und **135** (Abbildung 108.).

Diese wurden an das 5'-Ende des Oligodesoxynukleotid **131** mit Hilfe eines Standard-Syntheszyklus mit einer verlängerten Reaktionszeit angekoppelt (siehe Abbildung 109., 110. und 111.).

Die Oligodesoxynukleotide **132**, **134** und **136** wurden nach der Synthese mit einer 25%igen Ammoniak-Lösung vom Trägermaterial abgespalten und entschützt (24 h bei RT) und mit Hilfe der HPL-Chromatographie gereinigt (siehe Tabelle 32.).

Oligodesoxynukleotid	Gradient <sup>a</sup>	Ausbeute	MALDI Berechnet	MALDI Gemessen <sup>b</sup>
<b>132</b>	0-20% B in 40 min.	30-40%	6093.03	6096.76
<b>134</b>	0-20% B in 40 min.	30-40%	6192.16	6192.83
<b>136</b>	0-20% B in 40 min.	30-40%	6127.04	6082.56 (Aldehyd 6081.47)

<sup>a</sup> LiChroCart 250-10, 5 µm, Purospher STAR, RP18e

<sup>b</sup> Matrix: ATT + Ammoniumcitrat + nH

Tabelle 32: Charakteristische Daten der Oligodesoxynukleotide **132**, **134** und **136**

### 3. Spezieller Teil

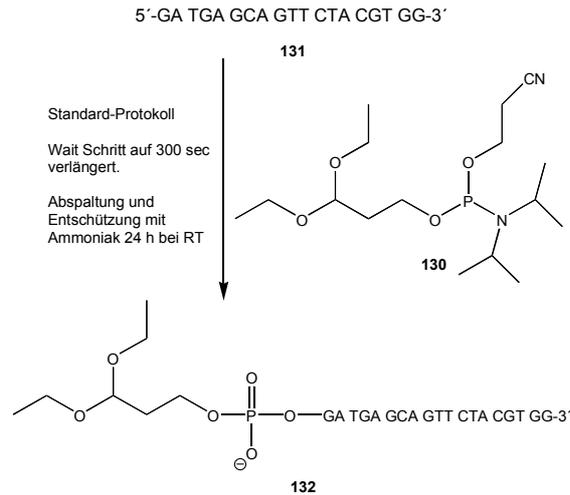


Abbildung 109: Synthese des Oligodesoxynucleotids **132**

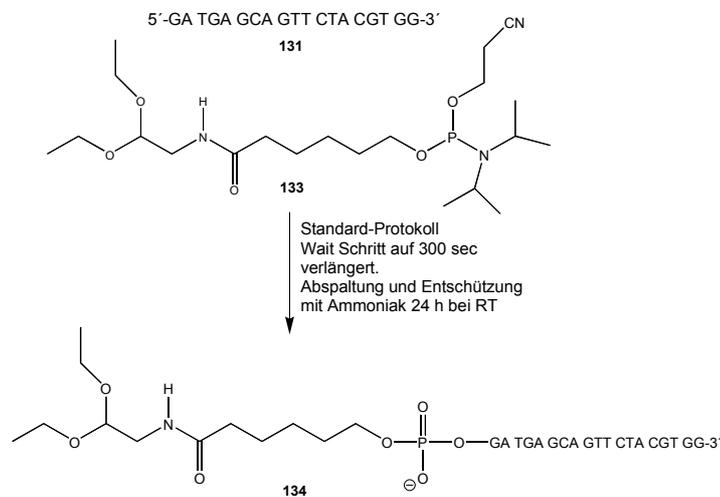


Abbildung 110: Synthese des Oligodesoxynucleotids **134**

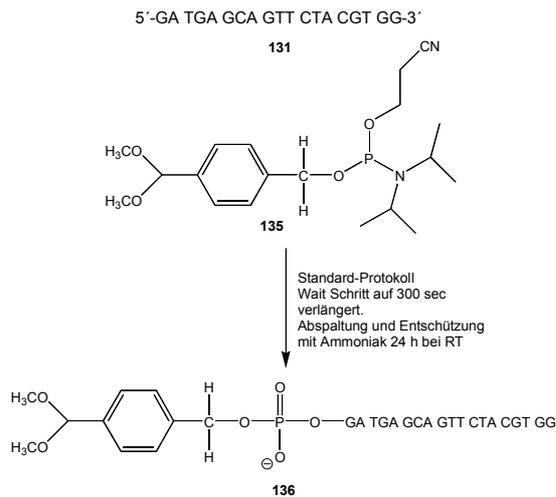
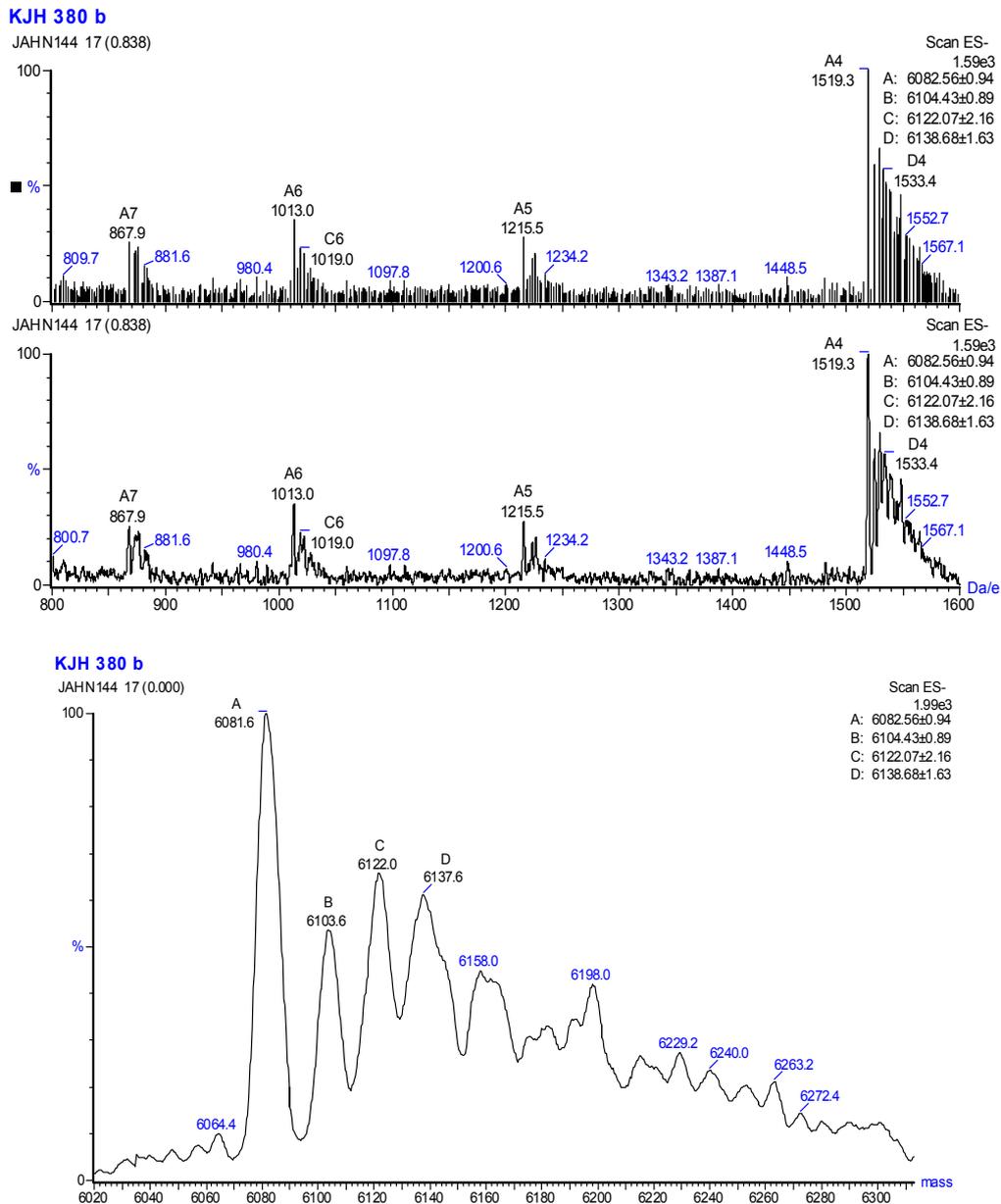


Abbildung 111: Synthese des Oligodesoxynucleotids **136**

Die detektierten Massen für die Oligodesoxynucleotide **132** und **134** stimmen mit den berechneten Massen sehr gut überein. Anders gestaltet sich dies bei dem Oligodesoxynucleotid **136**. Hier konnte die Molare Masse des entsprechenden

### 3. Spezieller Teil

Acetals nicht detektiert werden. Die detektierte Masse entspricht dem des freigesetzten Aldehyds. Die herrschenden Messbedingungen führen bei dem aromatischen Acetal bereits zur Freisetzung des Aldehyds aus dem maskierten Acetal (siehe *Abbildung 112*.  $\Rightarrow$  berechnete Masse Acetal-modifiziertes Oligodesoxynukleotid 6127.04 g/mol; berechnete Masse des Aldehyd-modifizierten Oligodesoxymukleotids 6081.47 g/mol).



*Abbildung 112:* ESI-Spektrum der Verbindung **136**

#### 3.10.3 Freisetzung der Aldehyd-Funktionalität

Die Freisetzung der Aldehyd-Funktionalität aus den synthetisierten Acetalen **132**, **134** und **136** sollte hier mit wässrigen Säuren, wie

- Essigsäure
- Salzsäure
- Trifluoressigsäure

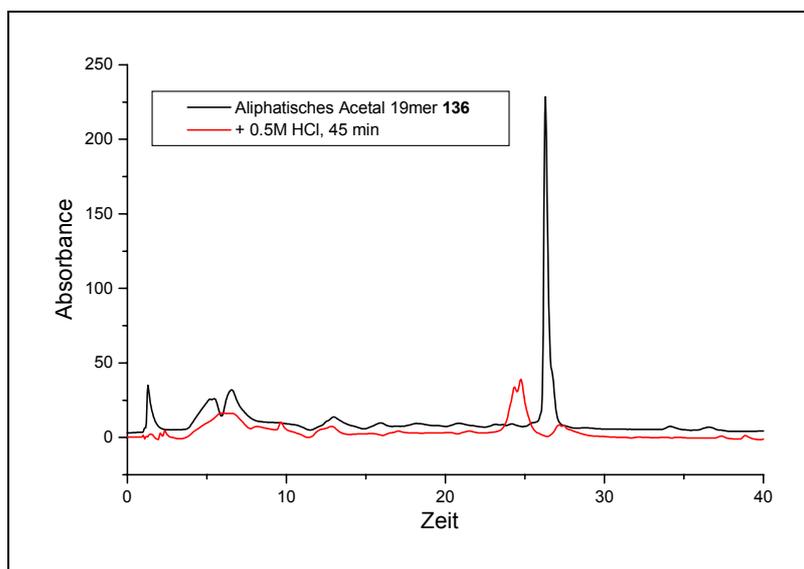
### 3. Spezieller Teil

gelingen.

Die ersten präparativen Versuche zur Demaskierung der Acetal-geschützten Oligodesoxynukleotide **132**, **134** und **136** beruhten auf den Vorarbeiten des Patents WO 01/70751. In diesem wurde zum Beispiel ein Acetal-modifiziertes Oligodesoxy-nukleotid 6.5 h bei RT mit 1 M HCl für eine Aldehyd-Freisetzung behandelt (der Reaktionsfortschritt wurde per HPLC detektiert). Die Lösung wurde anschließend mit 1 M NaOH neutralisiert und daß freigesetzte Aldehyd konnte für weitere Konjugationsreaktionen verwendet werden.

Das Oligodesoxynukleotid **132** wurde daher mit 1 M HCl Lösung versetzt, dabei trat eine leichte Trübung auf, die innerhalb der nächsten 2 h wieder verschwand. Ein Teil der Reaktionslösung wurde mit Hilfe der HPLC auf den Reaktionsfortschritt hin untersucht (siehe *Abbildung 113*). Dabei mußte festgestellt werden, daß sich die Konzentration des Oligodesoxynukleotids in der Lösung drastisch geändert hat.

Bei der auftretenden anfänglichen Trübung scheint es sich daher entweder um das ausgefallene Edukt oder ein entstehendes Nebenprodukt zu handeln. Die Säurebehandlung führt zu einem breiten Peak im HPL-Chromatogramm.



*Abbildung 113*: HPL-Chromatogramm der Reaktion von **136** mit 0.5 M HCl nach 45 min.

Die Umsetzung dieser Lösung mit Biotinhydrazid **146** führte nicht zu dem gewünschten Produkt.

Die Freisetzung wurde daher wiederholt, die Reaktionslösung wurde jedoch vor der folgenden Konjugationsreaktion neutralisiert, entsalzt (PD 10 Säule) und anschließend mit Biotinhydrazid **146** umgesetzt. Hier konnte trotz der durchgeführten Neutralisation und Entsalzung ebenfalls keine Umsetzung detektiert werden.

### 3. Spezieller Teil

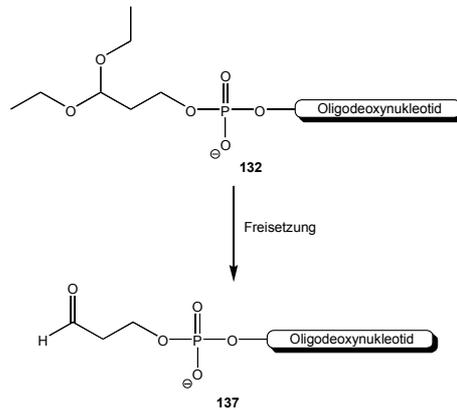


Abbildung 114: Freisetzung des Acetal-modifizierten Oligodesoxynucleotids **132**

Anstelle des Oligodesoxynucleotids **132** wurde das Oligodesoxynucleotid **134** für weitere Abspaltungsreaktionen verwendet. Da das Oligodesoxynucleotid **132** bei der Freisetzung vermutlich nicht zu dem offenkettigen Aldehyd reagiert, sondern bei der Säurezugabe eine Cyclisierung stattfinden kann. Dadurch steht die Aldehyd-Gruppe für eine weitere Umsetzung nicht zur Verfügung.

Die idealen Abspaltungsbedingungen sollten in verschiedenen Experimenten erarbeitet werden. Dabei konnte zuerst festgestellt werden, daß die Freisetzung nicht gelingt, wenn das Oligodesoxynucleotid in der Säure gelöst bzw. aufgenommen wird. Weiterhin mußte festgestellt werden, daß sich die Freisetzung des Aldehyds problematischer gestaltet, als erwartet. Zudem schwankt die Qualität der HPLC-Spektren von Abspaltung zu Abspaltung. Eine Detektion der Freisetzung mit Hilfe der MS-Spektrometrie führt ebenfalls nicht zu interpretierbaren Spektren.

Das freigesetzte Aldehyd konnte nur in einer Probe des Oligodesoxynucleotids **132** detektiert werden, bei der das Oligodesoxynucleotid **132** eine Woche in autoklavierten Wasser bei 4°C aufbewahrt wurde. Bei der HPLC-Analyse dieser Probe, konnten zwei Peaks detektiert werden, Peak 1: 23.31 min und Peak 2: 25.62 min (Gradient 0 auf 40% in 40 min). Hier konnte neben dem Edukt **132** (Peak 2) eine weitere Masse detektiert werden, die dem des Aldehyds (siehe *Abbildung 115.*) entspricht (Peak 1).

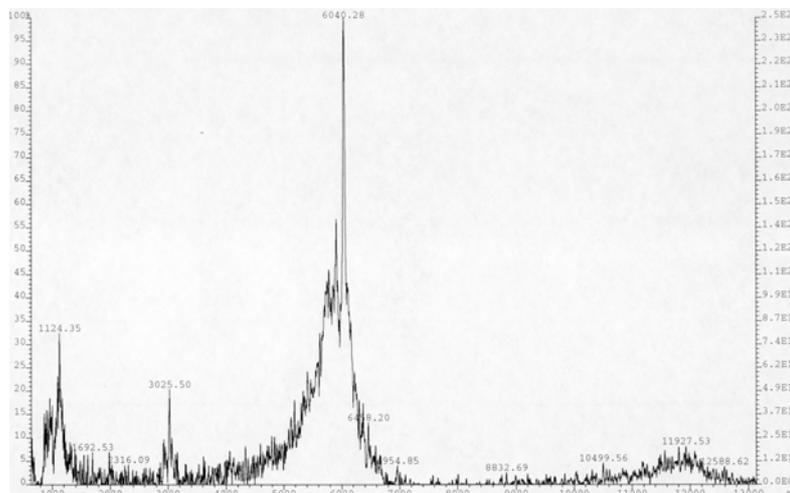
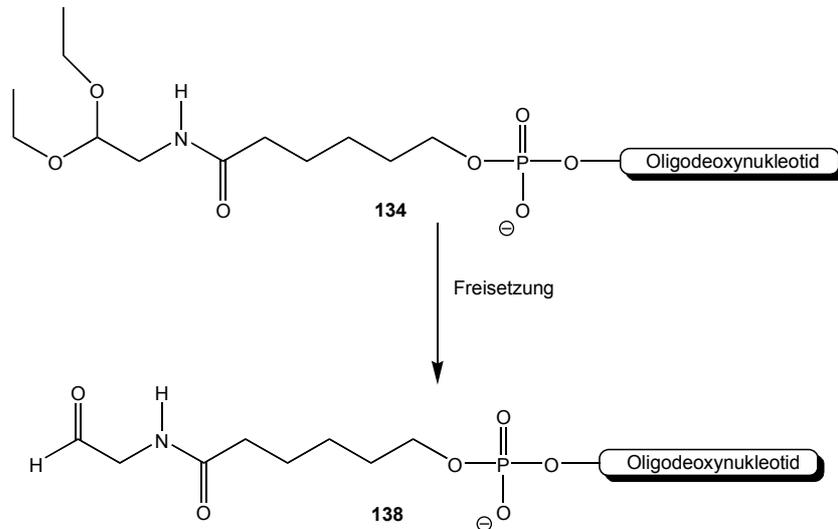


Abbildung 115: MALDI-Spektrum des Peaks 1 (berechnete Masse  $\Rightarrow$  Acetal: 6093.02 g/mol; Aldehyd: 6019.1 g/mol)

### 3. Spezieller Teil

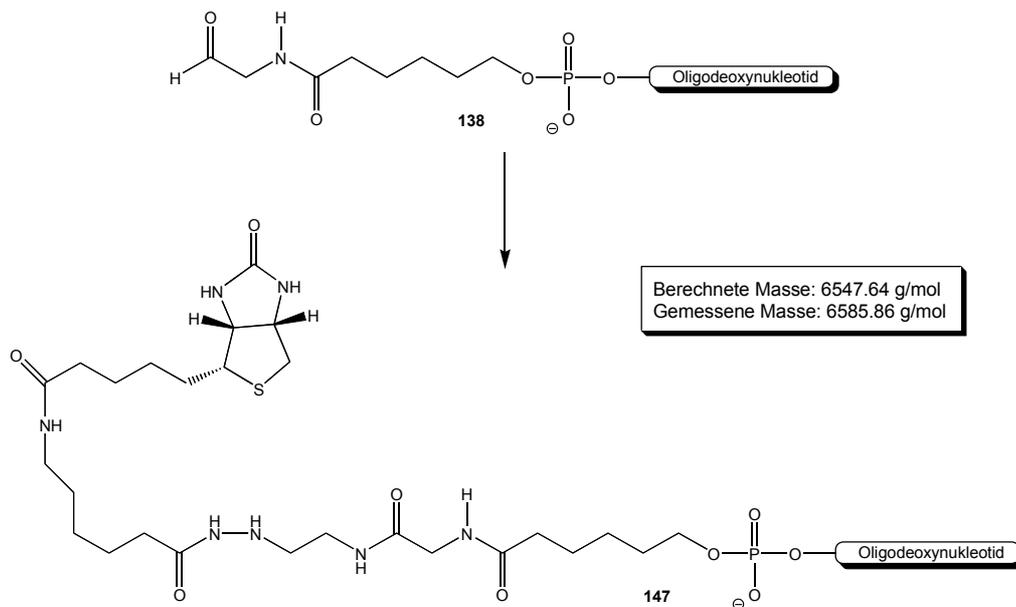
Die Demaskierung des Oligodesoxynukleotids **134** sollte wie in *Abbildung 116* gezeigt, erfolgen.



*Abbildung 116*: Freisetzung des Acetal-modifizierten Oligodesoxynukleotids **134**

#### 3.10.4 Freisetzung und Konjugationsreaktionen

Die Freisetzung des Aldehyds **138** aus der Verbindung **134** konnte mit einer 0.5 M Salzsäure nicht mit Hilfe der HPL-Chromatographie oder der MS-Spektrometrie detektiert werden. Trotzdem wurde die entsprechende Abspaltungslösung neutralisiert, entsalzt (PD 10 Säule) und die Lösung mit Biotinhydrazid **146** zur Reaktion gebracht (siehe *Abbildung 117*.). Das Produkt **147** aus der Umsetzung der Reaktionslösung und Biotinhydrazid **146** konnte per MALDI-Spektrometrie nachgewiesen werden (siehe *Abbildung 118*.).



*Abbildung 117*: Umsetzung des Oligodesoxynukleotids **138** mit Biotinhydrazid **146**

### 3. Spezieller Teil

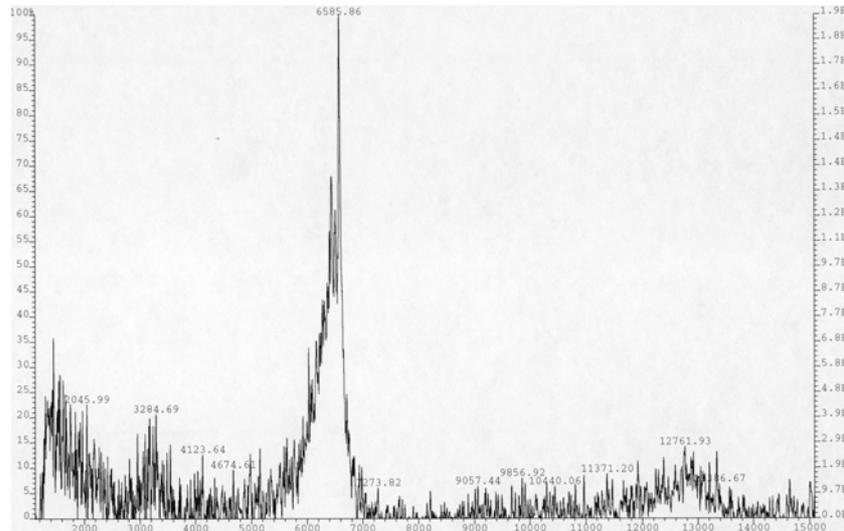


Abbildung 118: MALDI-Spektrum der Umsetzung des Oligodesoxynukleotids **138** mit Biotinhydrazid **146**

Bei dieser Umsetzung muß Natriumcyanborhydrid als Reduktionsmittel zugegeben werden, da das gebildete Hydrazone nicht stabil ist (Acyl-Hydrazone). Die Ausbeute dieser Umsetzung beträgt jedoch nur ca. 8%, daher mußte nach einer weiteren Methode für die Konjugation gesucht werden.

Aufgrund der Probleme bei der Abspaltung wurden zwei weitere Oligodesoxynukleotide **140** und **141** (siehe Abbildung 119.) synthetisiert, um festzustellen, ob die Sequenz des Oligodesoxynukleotids einen Einfluß auf die Abspaltungsreaktion besitzt.

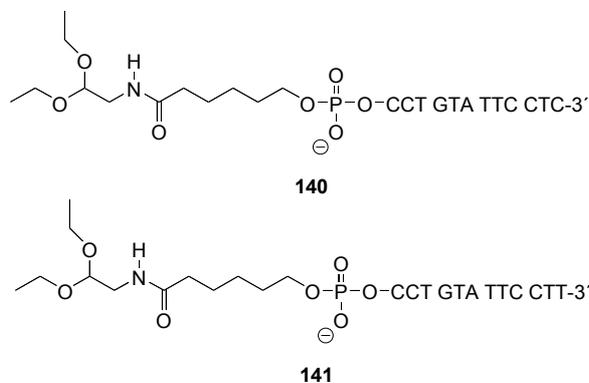


Abbildung 119: Oligodesoxynukleotide **140** und **141**

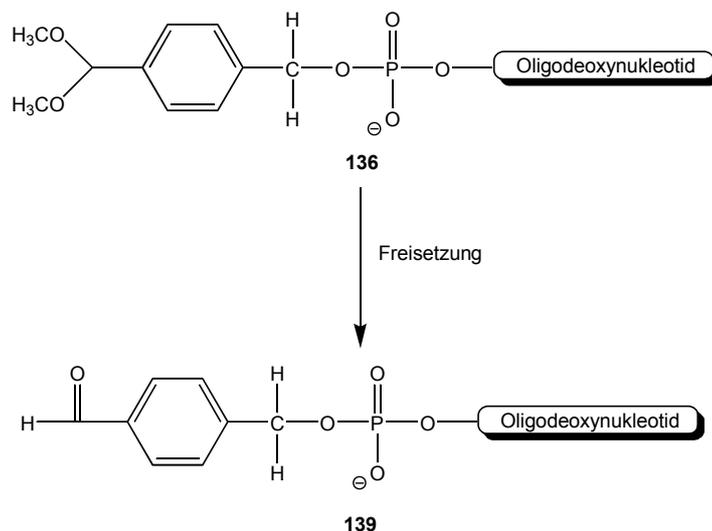
Die Freisetzung des entsprechenden Aldehyds mit einer sauren Lösung bereitet bei den beiden Oligodesoxynukleotiden **140** und **141** die gleichen Probleme wie zuvor, so daß festgestellt werden kann, daß die bei der Freisetzung auftretenden Probleme nicht sequenzspezifisch sind. Daher mußte eine Alternative für die Aldehyd-Freisetzung gefunden werden.

Das aromatische Acetal-geschützte Oligodesoxynukleotid **136** wurde ebenfalls auf die mögliche Konjugation als Aldehyd hin untersucht. Ein aromatisches Aldehyd bietet gegenüber den aliphatischen Aldehyden den Vorteil, daß bei der Umsetzung kein Reduktionsmittel zugesetzt werden muß. Ein großer Vorteil der Reaktion

### 3. Spezieller Teil

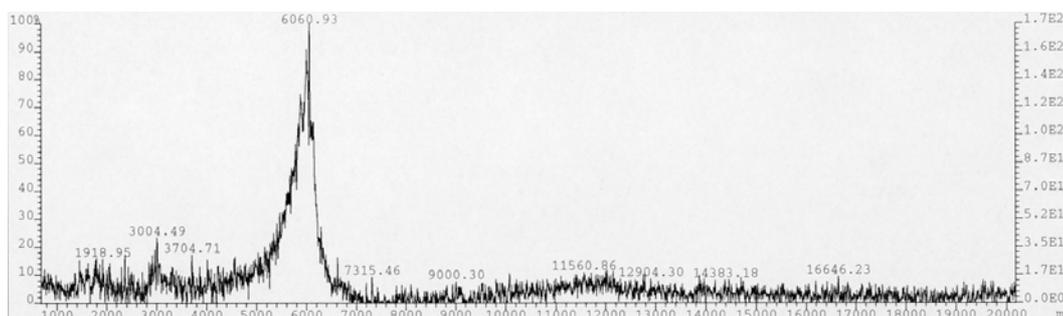
eines Hydrazids mit einem aromatischen Aldehyd besteht darin, daß hier kein Kupplungsreagenz (Aktivator) benötigt wird.

Anstelle der Konjugation mit dem Biotinhydrazid **146** wurden die ersten Testreaktionen mit zwei bekannten Hydraziden, N,N-Diphenyl-hydrazin x HCl **142** und 4'-Hydrazin-2-Stilbazol x HCl **143** durchgeführt<sup>78</sup>. In verschiedenen Testreaktionen konnte festgestellt werden, daß hier die Freisetzung des Aldehyds **139** (siehe *Abbildung 120.*) durch die Zugabe einer Säure nicht notwendig ist.



*Abbildung 120:* Freisetzung des Acetal-modifizierten Oligodesoxynucleotids **136**

Bei den folgenden drei *Abbildungen 122.-124.* handelt es sich um die MALDI-Spektren der Aldehyd-Demaskierung durch 80% ige Essigsäure, 1 M HCl und 0.5 M HCl (*Abbildung 121.* entspricht dem Edukt **136**).



*Abbildung 121:* Oligodesoxynucleotid **136** (Molmasse Acetal: 6127.04 g/mol; Aldehyd: 6081.47 g/mol)

<sup>78</sup> A.) A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4581-4583; B.) K. Kobayashi, Y. Akiyama, K. Kawaguchi, S. Tanabe; *Analytical Sciences* **1985**, 1, 81-84; C.) S. Mizutani, Y. Wakuri, N. Yoshida, T. Nakajima, Z. Tamura; *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17 (11), 2340-2348

### 3. Spezieller Teil

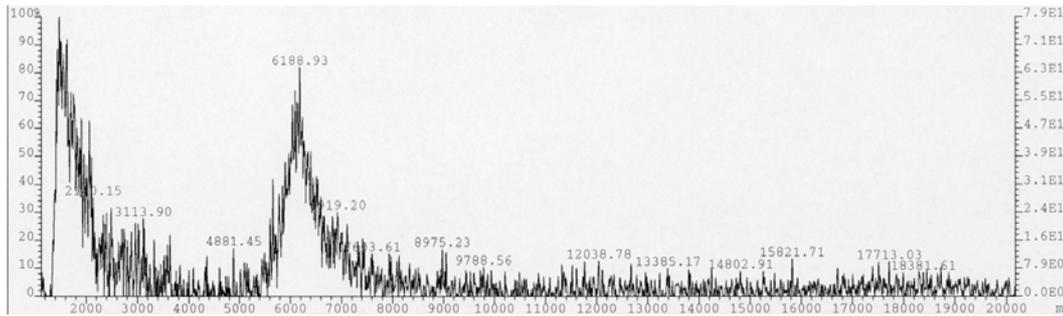


Abbildung 122: Oligodesoxynucleotid **136** + 80% ige Essigsäure 1h bei RT

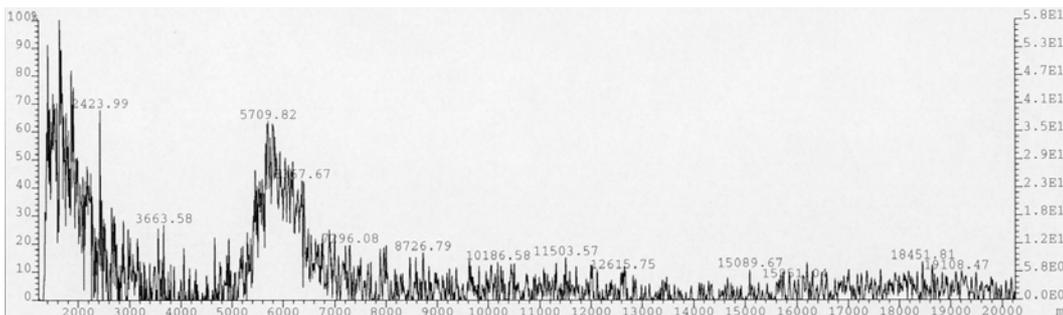


Abbildung 123: Oligodesoxynucleotid **136** + 1 M HCl 1 h bei RT

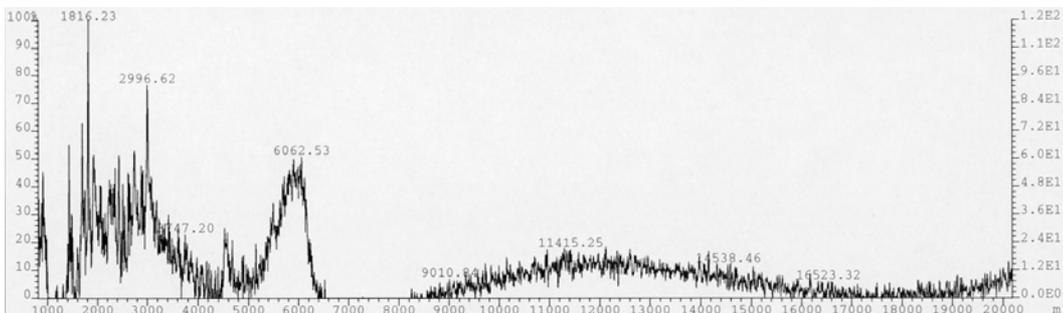
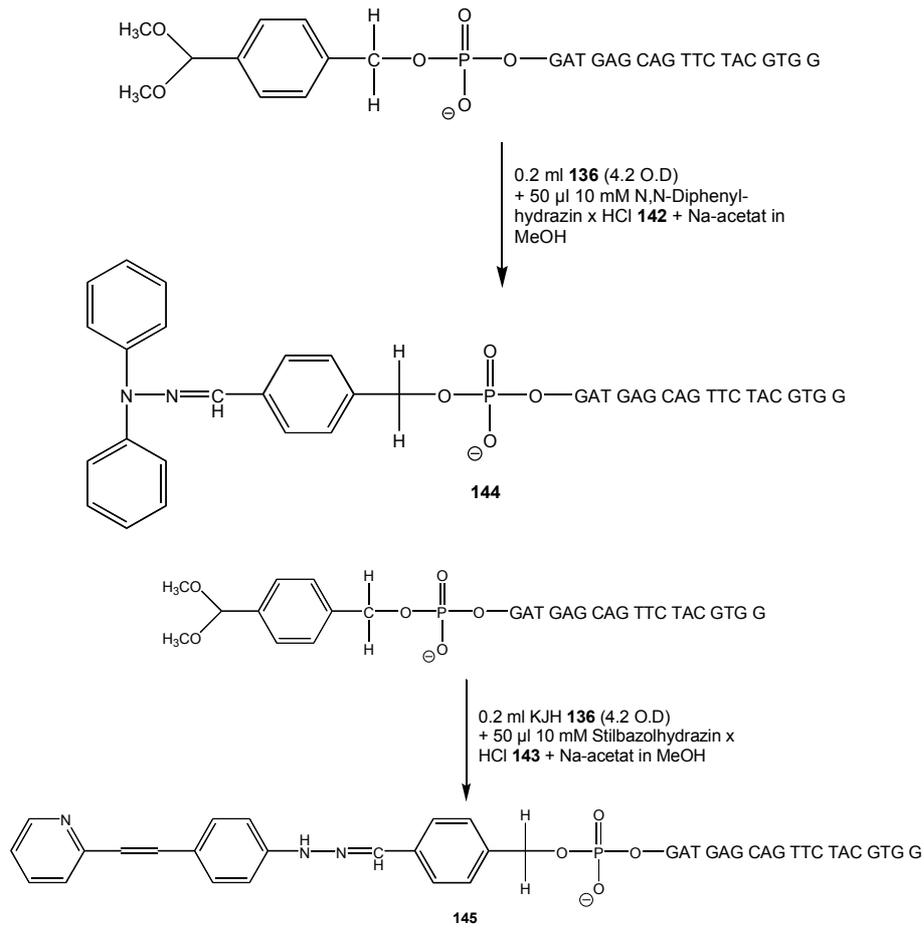


Abbildung 124: Oligodesoxynucleotid **136** + 0.5 M HCl 1h bei RT

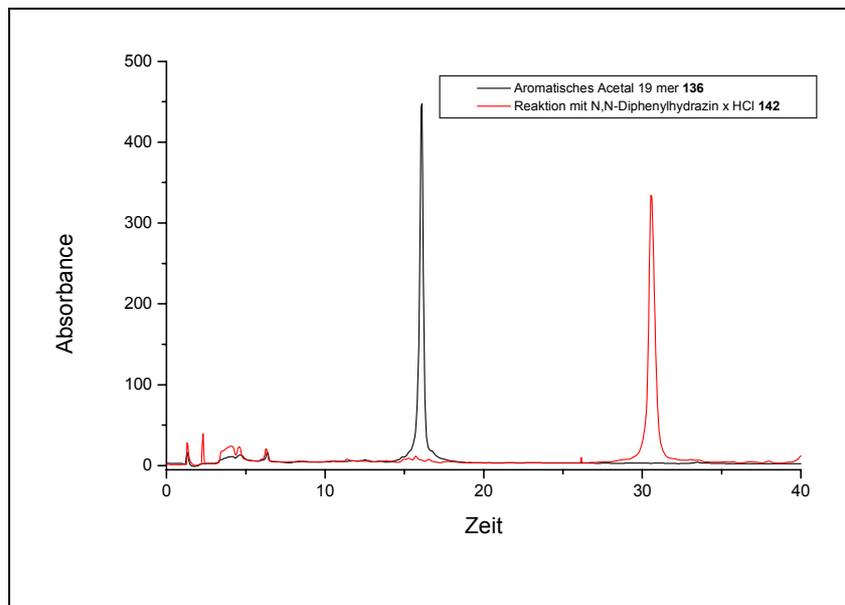
Wie die *Abbildungen 122.-124.* zeigen, gelingt eine klare Aussage zur Demaskierung des Aldehyds per MALDI-Spektrometrie nicht.

Das Oligodesoxynucleotid **136** kann jedoch direkt in einer „Eintopfreaktion“ mit N,N-Diphenylhydrazin x HCl **142** oder mit dem entsprechenden 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol x HCl **143** in einer wässrigen ethanolischen Lösung umgesetzt werden (siehe *Abbildung 125.* und *126.*).

### 3. Spezieller Teil



**Abbildung 125:** Umsetzung des Oligodesoxynucleotids **136** mit N,N-Diphenylhydrazin x HCl **142** oder mit 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol x HCl **143**



**Abbildung 126:** Reaktion des Oligodesoxynucleotids **136** mit N,N-Diphenylhydrazin **142**

Von den Produkten **144** und **145** konnten aussagekräftige Massenspektren aufgenommen werden. Als Beispiel soll hier das Oligodesoxynucleotid **144** in

### 3. Spezieller Teil

Abbildung 127. gezeigt werden. Die für das Oligodesoxynukleotid berechnete Masse beträgt 6247.8 g/mol und stimmt daher mit der gemessenen Masse von 6249.29 g/mol gut überein.

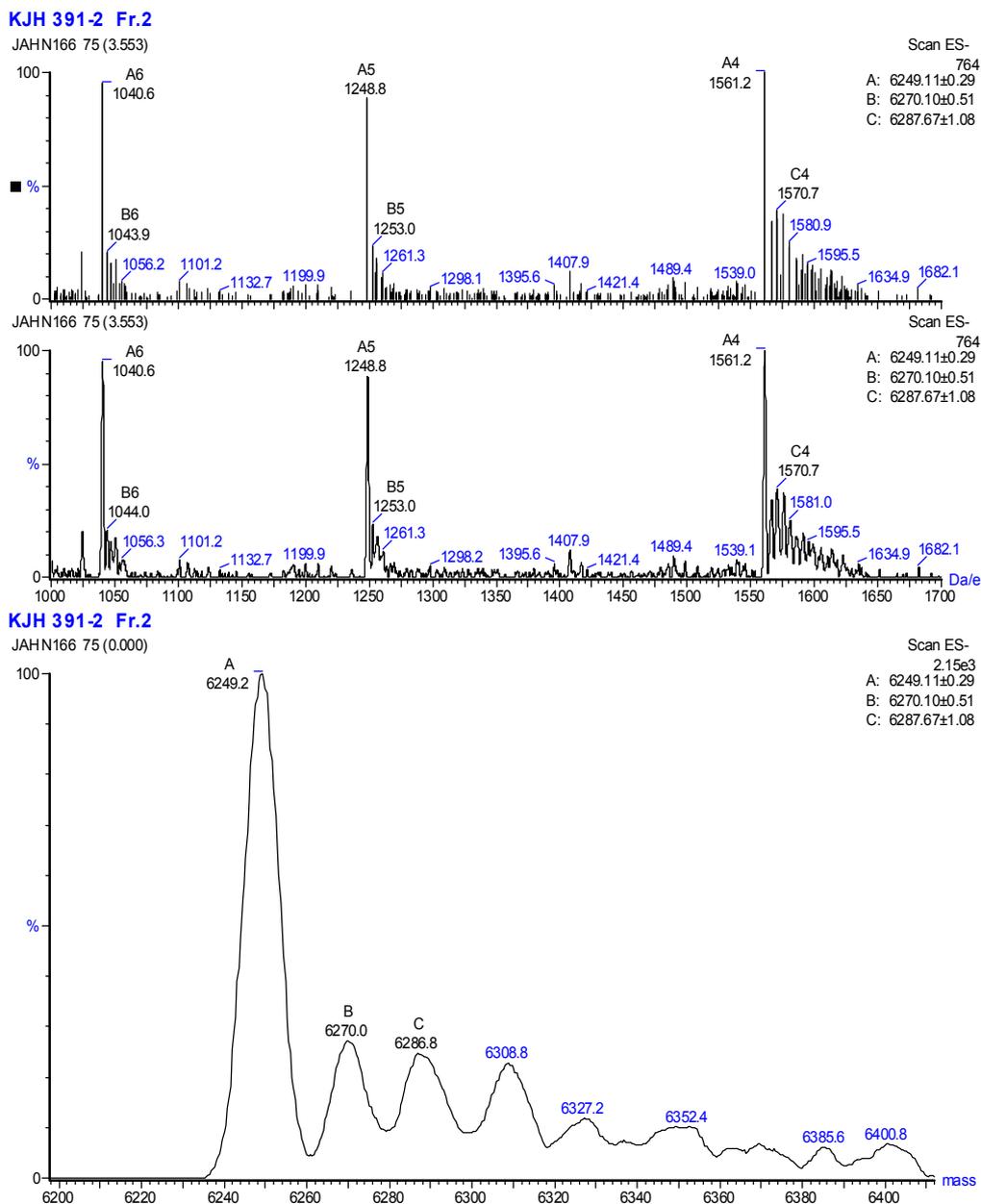


Abbildung 127: ESI-MS des Oligodesoxynukleotids **144**

Für eine erfolgreiche Reaktion des aromatischen Oligodesoxynukleotids **136** mit verschiedenen Hydrazin-Derivaten, müssen diese entweder als Hydrochlorid oder TFA-Salz eingesetzt werden. Bei der Umsetzung des aromatischen Acetals **136** ist die Zugabe eines Reduktionsmittels (zum Beispiel Natriumcyanborhydrid) nicht notwendig. Das Oligodesoxynukleotid **136** wird in Wasser aufgelöst und mit einer 10 bis 15 mM Lösung des Hydrazin-Derivates und Natriumacetat in Methanol (Laufmittel B: in der HPLC  $\Rightarrow$  Methanol) versetzt. Die Zugabe von Natriumacetat zu der Reaktion wirkt sich negativ auf die Detektion des Reaktionsfortschritts mit Hilfe der Massenspektrometrie aus. Allerdings konnte festgestellt werden, daß bei der Reaktionsführung von p-Anisaldehyd und N,N-Diphenylhydrazin x HCl **142** die

### 3. Spezieller Teil

Reaktion durch die Zugabe von Natriumacetat katalysiert wird, da die Reaktion ohne die Zugabe des Salzes nicht quantitativ und wesentlich langsamer verläuft. Die Detektion des Reaktionsfortschrittes wurde hier mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie vorgenommen.

Um ein qualitativ hochwertiges Massenspektrum aufnehmen zu können, müssen die Produkte vor der MS-Messung daher mit Hilfe der HPLC-Reinigung getrennt beziehungsweise entsalzt werden. Die Reaktionslösung sollte dabei aus vier Teilen Wasser und einem Teil Methanol bestehen, um den Reaktionsfortschritt direkt mit Hilfe der HPL-Chromatographie untersuchen zu können. Sollte das entsprechende Hydrazin-Derivat nicht als Hydrochlorid oder als TFA-Salz eingesetzt werden können, muß Salzsäure in einer 10 bis 15 mM Konzentration zugegeben werden. Anstelle von Acetonitril wird hier Methanol als Puffer B in der HPLC eingesetzt. Die Verwendung von Methanol als Puffer B (HPLC) führt allerdings zu verbreiterten Produktpeaks.

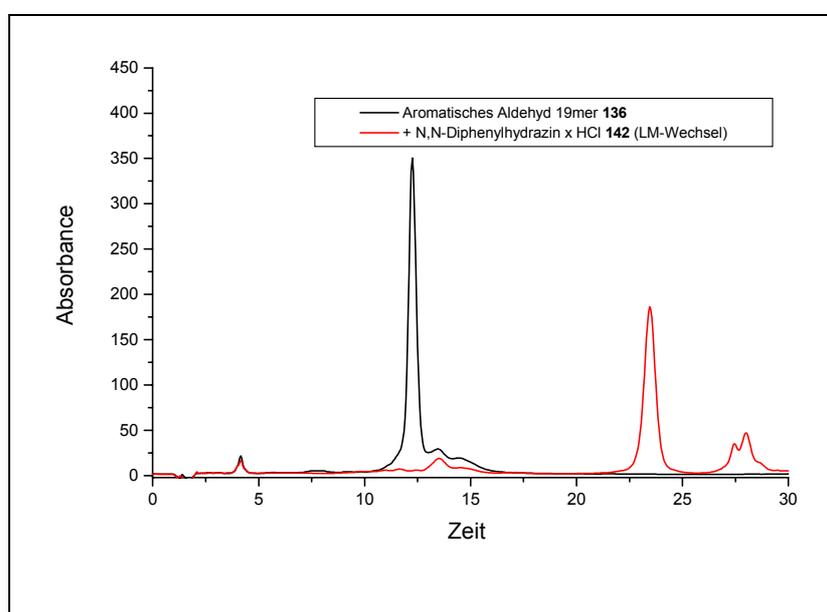
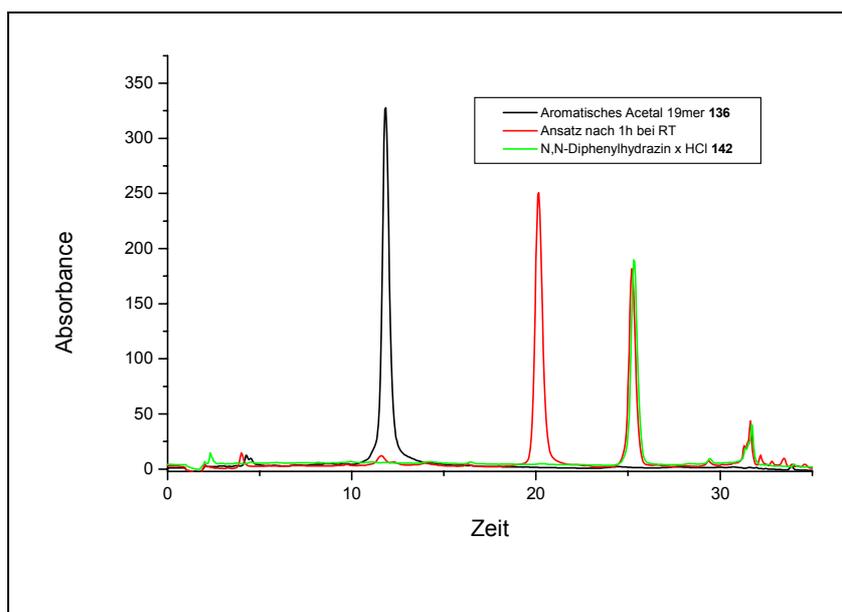


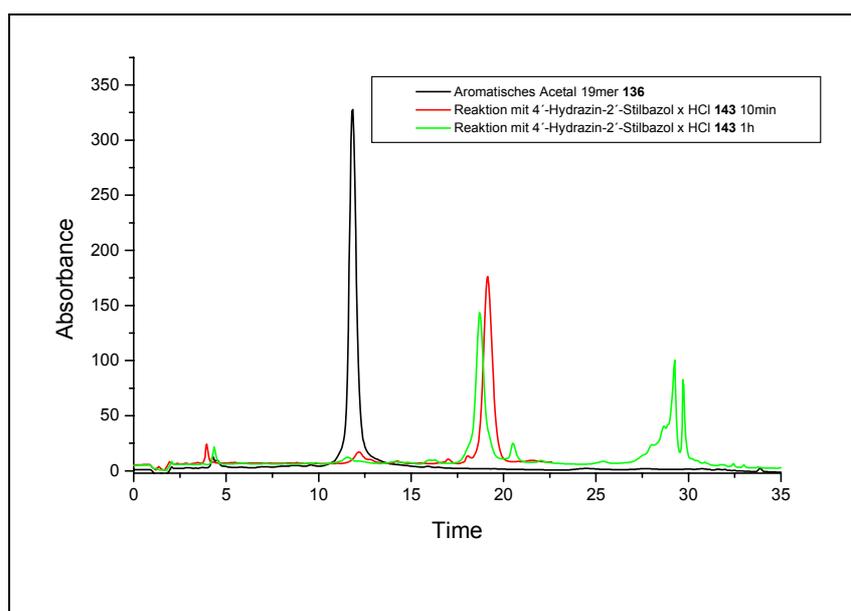
Abbildung 128: Reaktion des Oligodesoxynukleotids **136** mit N,N-Diphenylhydrazin **142** (HPLC-Laufmittel: Puffer A: TEAA, Puffer B: MeOH)

Die Reaktionszeiten des Oligodesoxynukleotids **136** mit den unterschiedlichen Hydrazin-Derivate variieren, die Reaktionen werden jedoch alle bei Raumtemperatur (eine Temperaturerhöhung führt bei den hier eingesetzten Hydraziden zu wesentlich schlechteren Reaktionsausbeuten) und Ausschluß von Licht durchgeführt. Die Umsetzung des Oligodesoxynukleotids **136** mit N,N-Diphenylhydrazin x HCl **142** oder 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol x HCl **143** ist innerhalb von 1h beziehungsweise 10 Minuten quantitativ (siehe *Abbildungen 129.* und *130.*).

### 3. Spezieller Teil



**Abbildung 129:** Reaktionskontrolle des Oligodesoxynucleotids **136** mit N,N-Diphenylhydrazin x HCl **142**



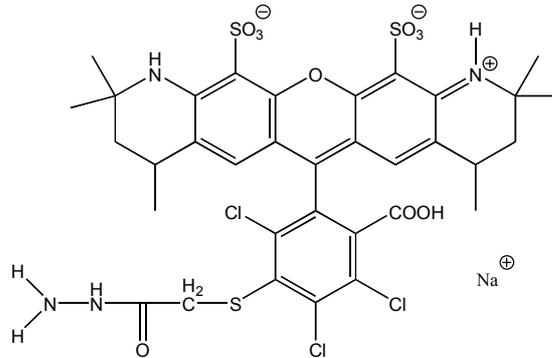
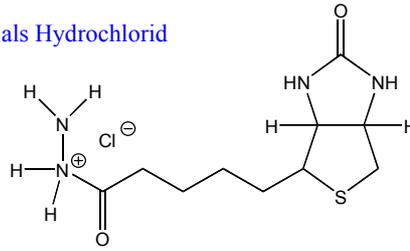
**Abbildung 130:** Reaktionskontrolle des Oligodesoxynucleotids **136** mit 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol x HCl **143**

Die folgenden Hydrazin-Derivate **146**, **148**, **149** und **150** (siehe *Abbildung 131*. und *132*.) wurden für die Konjugation des Oligodesoxynucleotids **136** eingesetzt.

### 3. Spezieller Teil

Biotin-Derivat als Hydrochlorid

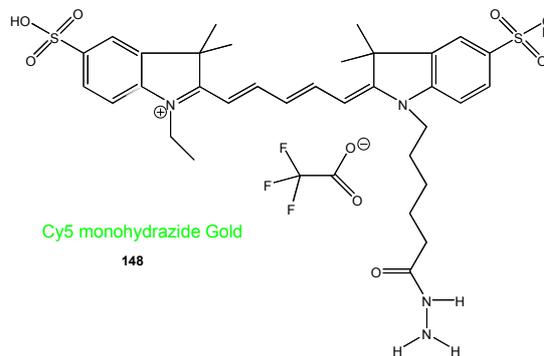
146



AlexaFluor 546

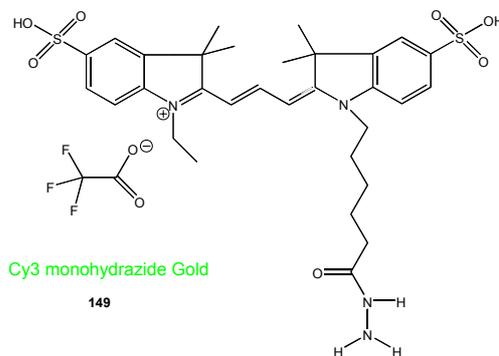
150

Abbildung 131: Strukturformel der Monohydrazide **146** (Biotin) und **150** (AlexaFluor 546)



Cy5 monohydrazide Gold

148



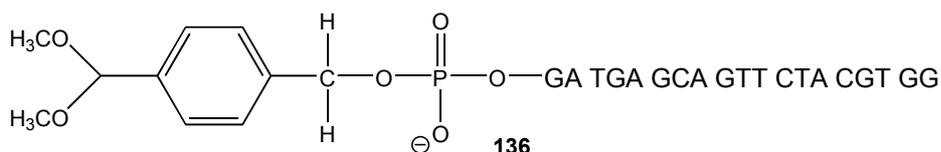
Cy3 monohydrazide Gold

149

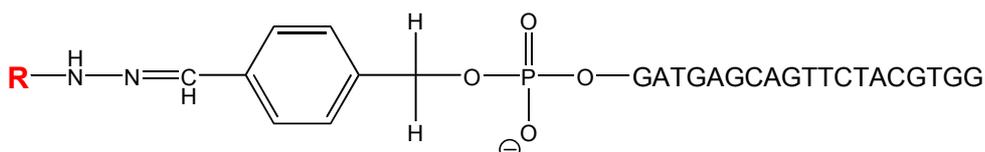
Abbildung 132: Strukturformel der Monohydrazide Cy3 und Cy5

Die folgenden Reaktionen konnten in sehr zufriedenstellender Ausbeute durchgeführt werden (siehe *Tabelle 33.*).

### 3. Spezieller Teil



↓  
Acetal-Oligodeoxynucleotid  
+ Hydrazin Derivat, Na-acetat in  
MeOH:Wasser 2:8



<b>R =</b> Hydrazin Derivat	Gradient	Retentionszeit	Umsetzung
Diphenyl <b>142</b>	15%-45%	23.46	> 95%
Diphenyl <b>142</b>	15%-55%	19.08	> 95%
Stilbazol <b>143</b>	15%-55%	17.51	> 95%
Cy3 <b>149</b>	15%-55%	13.12	> 50% <sup>a</sup>
Biotin <b>146</b>	-	-	-
AlexaFluor <b>150</b>	15%-60%	13.18	> 90%
Cy5 <b>148</b>	15%-60%	15.99	80%

<sup>a</sup> Vgl. 5'-Modifikation mit Cy3-Amidit (GlenResearch) 38%<sup>79</sup>

**Tabelle 33:** Charakteristische Daten für die 5'-modifizierte Oligodesoxynukleotide, Hydrazid-Derivate **142**, **143**, **146**, **148** und **150**

5'-Modifikation Oligodeoxynukleotid Nr.	Berechnete Molare Masse	Gefundene Molare Masse
Diphenyl <b>144</b>	6247.8	6265.07
Stilbazol <b>145</b>	6274.72	6275.19
Cy 3 <b>151</b>	6708.22	6708.14 + 6730.11
Cy 5 <b>152</b>	6735.53	6735.35 + 6756.6
AlexaFluor <b>153</b>	6936.78	6937.2 + 6957.71
Biotin <b>154</b>	-	-

**Tabelle 34:** Gemessene Molare Massen der Verbindungen **144**, **145**, **151-154**

Die *Abbildungen 133.-135.* zeigen die HPL-Chromatogramme der Reaktionen des Oligodesoxynukleotids **136** mit N,N-Diphenylhydrazin x HCl **142**, 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol **143**, Cy 3 **149** und Cy 5 **148**.

<sup>79</sup> L. K. Dombi, N. Griesang, C. Richter; *Synthesis* **2002**, 6, 816-824

### 3. Spezieller Teil

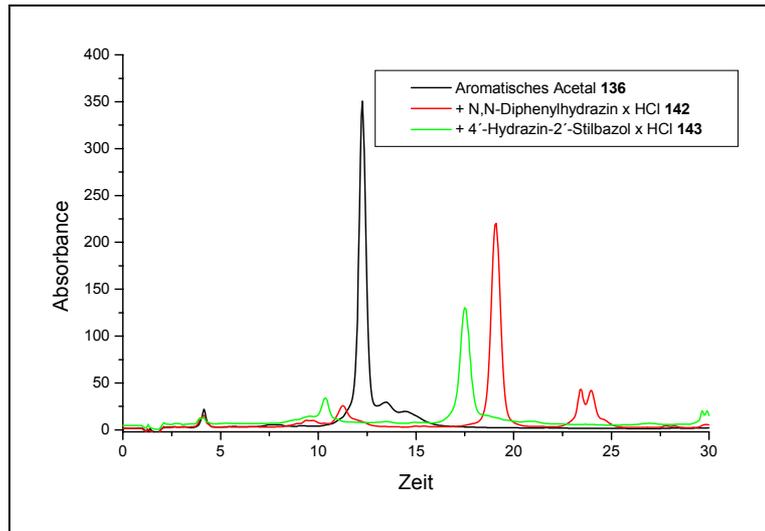


Abbildung 133: Reaktionskontrolle des Oligodesoxynucleotids **136** mit N,N-Diphenylhydrazin x HCl **142** und 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol **143**

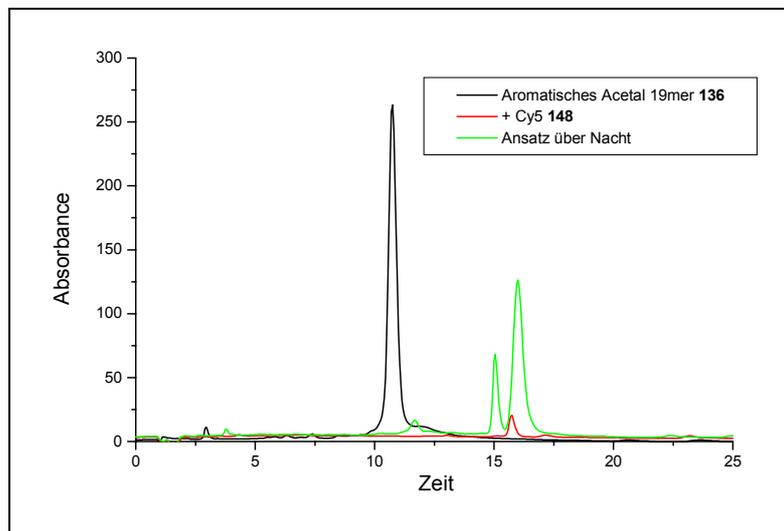


Abbildung 134: Reaktionskontrolle des Oligodesoxynucleotids **136** mit Cy5 **148**

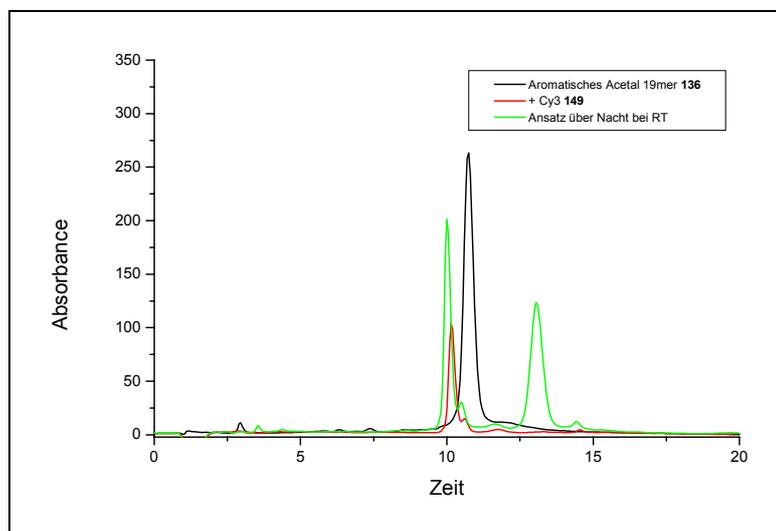
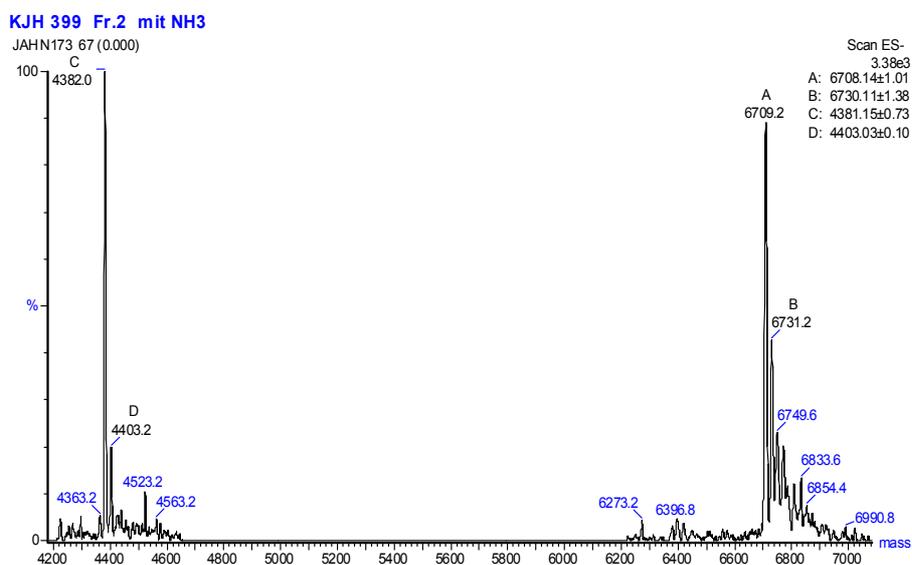


Abbildung 135: Reaktionskontrolle des Oligodesoxynucleotids **136** mit Cy3 **149**

### 3. Spezieller Teil

Die *Abbildung 136*. zeigt exemplarisch das Massenspektrum der Verbindung **151**, mit einer detektierten Masse von 6708.14 stimmt diese mit der berechneten Masse von 6708.22 sehr gut überein.



*Abbildung 136*: ESI-Spektrum der Verbindung **151**

Die Reaktion mit dem Biotin-Derivat **146** wurde mehrmals durchgeführt, allerdings konnte keine Umsetzung detektiert werden. Eine neue Charge des Monohydrazids führte ebenfalls nicht zu der gewünschten Reaktion. Die geringe Ausbeute des Cy3-Derivates beruht vermutlich auf der schlechten Qualität des Monohydrazids **149**. Allerdings ist die hier erzielte Ausbeute mit einer 50%igen Umsetzung wesentlich höher als die meisten gefundenden Literaturausbeuten. Das entsprechende Cy3-Amidit von GlenResearch führt bei der 5'-Modifikation zu Ausbeuten von etwa 35%.

### 4.0 Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse

#### 4.1 Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf einem Sonden-Array

Innerhalb des Projektes mit der Firma *Clondia* *Chip Technology* sollte ein Verfahren entwickelt werden, dass zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf Sonden-Arrays genutzt werden kann. Der prinzipielle Aufbau dieses Testsystems wurde bereits in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Einer der entscheidenden Schritte zur Entwicklung dieses Verfahrens, ist die Einführung einer selektiv spaltbaren Bindung innerhalb der DNA. Die von uns hierfür präferierte Bindung ist die 5'-O-P-S-3' Bindung, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der natürlichen Verbrückung 5'-O-P-O-3'. Das erste zu realisierende Ziel innerhalb der Projektarbeit bestand damit in der Synthese der entsprechend 5'-Thio-modifizierten Amidite. Mit Hilfe der Synthesestrategien 1. bis 3. konnte das entsprechende 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) **9** hergestellt werden. Die hier verwendeten Reaktionsbedingungen konnten allerdings nicht auf die anderen drei benötigten Nucleoside übertragen werden, da es hier zu beträchtlichen Nebenreaktionen kam (Disulfidbildung oder Depurinierung). Da für die erfolgreiche Entwicklung des Verfahrens jedoch alle vier modifizierten Amidite benötigt werden, musste eine alternative Synthesestrategie entwickelt werden. Die Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol, als alternative Schwefel-Quelle und gleichzeitig temporäre 5'-Schutzgruppe stellt den Schlüsselschritt der Synthesestrategie 5. dar. Mit Hilfe dieser Strategie gelingt es nun, die entsprechend benötigten Amidite **9** und **66-68** in zufriedenstellender Ausbeute in vier Syntheseschritten herzustellen.

1. Einführung einer entsprechenden Basenschutzgruppe (z.B. *ibu*, *bz*, *dmf* etc.)
2. Einführung einer aktivierenden 5'-Abgangsgruppe (z.B. *Tosyl*, *Mesyl*, *Chlor* etc.)
3. Umsetzung des entsprechenden Nucleosids mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol
4. Phosphitylierung der 3'-Hydroxylgruppe

Die erzielten Syntheseausbeuten liegen hier zwischen 23 und 58%, diese können durch eine modifizierte Schutzgruppen-Chemie (sowohl der Basen- wie auch der aktivierenden 5'-Schutzgruppe) sicher gesteigert werden.

Beim Einbau der entsprechend modifizierten Amidite in einen DNA-Strang mit Hilfe der Phosphoramidit-Chemie, mußte der entsprechend verwendete Syntheszyklus durch einen Reduktionsschritt mit DTT nach der erfolgten 5'-Detritylierung ergänzt werden, da ansonsten die Konkurrenzreaktion zu einem Dimer (z.B. Bildung der Verbindung **70**) mit einer Disulfidbindung, die erzielte Ausbeute stark minimiert.

Die Schwefel-Modifikation kann nur dann mit einem Standardsyntheszyklus am Synthesizer eingeführt werden, wenn das entsprechende modifizierte Dimer **42** verwendet wird. Dieses beinhaltet bereits die gewünschte 5'-O-P-S-3'-Verbrückung. Allerdings ist die Syntheseausbeute der Verbindung **42** mit 10% sehr gering und die erzielte Ausbeute am Synthesizer übersteigt nicht die, des Amidits **9**. Durch die Anwendung des modifizierten Syntheszyklus ist die Synthese des Modelloligodeoyknucleotids **69** mit der Verbindung **9** möglich. Mit dieser Verbindung wurde die erwünschte Spaltung der 5'-O-P-S-3' Bindung mit Hilfe von Silbernitrat in

## 4. Zusammenfassung

Lösung und an verschiedenen Oberflächen (Chip, Biacore-Chip und Magnetic Beads) untersucht. Zur Detektion der Spaltungseffizienz in Lösung wurden die HPL-Chromatographie und die Gelelektrophorese angewendet. Die Spaltung in Lösung verläuft quantitativ innerhalb von 3 Minuten mit einer 25 mM Silbernitrat-Lösung. Ebenfalls quantitativ verlaufen die Spaltungen an der Chipoberfläche sowie an den Magnetic Beads. Hier wird die Spaltung an den Magnetic Beads mit Hilfe der HPL-Chromatographie und die am Chip, mit Hilfe eines entsprechenden Hybridisierungsexperimentes untersucht. Die Spaltung an dem Biacore Chip verläuft vermutlich ebenfalls quantitativ, sie kann allerdings nur mit einer Effizienz von ca. 84% detektiert werden. Vermutlich verfälschen hier Adsorptionseffekte an der Chip-Matrix das gemessene Ergebnis. Experimente an der Chipoberfläche zeigen, daß das entsprechend modifizierte Phosphorothioat-verbrückte Oligodesoxynukleotid **69** die gleichen Hybridisierungseigenschaften aufweist wie das unmodifizierte Oligodesoxynukleotid. Damit besteht nun die Möglichkeit die Thio-modifizierten Oligodesoxynukleotide als Sonden innerhalb eines Sonden-markierten Assays einzusetzen. Innerhalb eines Hybridisierungsexperiments an der Chipoberfläche konnte bereits gezeigt werden, daß eine an die Sonde hybridisierte Targetsequenz in der Lage ist, im Anschluß an die Spaltungsreaktion mit Silbernitrat, das entstehende Spaltungsstück bei niedriger Temperatur und hoher Salzkonzentration für eine anschließende Detektion zu halten.

### 4.2 Punktmutationsdetektion durch festphasenvermittelte Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE) und MALDI-MS

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines neuen, elektroforesefreien Verfahrens zur Detektion von bekannten Punktmutationen mittels fester Phase und der MALDI-Massenspektrometrie.

Die Synthese des bifunktionellen und photolabilen Linkers **96** 3-Nitro-4-Hydroxymethyl-benzoesäure gelang in drei Schritten mit einer Gesamt-Syntheseausbeute von 38%. Die Anknüpfung an die feste Phase (CPG) kann gezielt durch die Zugabe von TBTU, NEM und der Verbindung 4-(4,4'-Dimethoxytrityl)-hydroxymethyl-3-nitrobenzoesäure **101** erfolgen. Das Trägermaterial **102** kann nach der Detritylierung mit 1-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-(Fmoc-Amino)-1-hexanol **108** umgesetzt werden. Der zusätzlich eingeführte Linker soll die Ausbeute der folgenden Oligodesoxynukleotid-Synthese erhöhen. Das Trägermaterial **110** kann mit einer Beladungsdichte von 153.3  $\mu\text{mol/g}$  zur Oligodesoxynukleotid-Synthese eingesetzt werden. Das mit einem Standard-Syntheszyklus synthetisierte  $T_{10}$  Oligodesoxynukleotid wurde hergestellt um das prinzipielle Funktionieren der gewünschten Photospaltung zu untersuchen. Dazu wurde das Trägermaterial **113** mit dem Matrixgemisch vermischt, mit dem Laser beschossen und im Spektrometer vermessen. Dabei musste festgestellt werden, daß die Freisetzung des Oligodesoxynukleotids erfolgt, die aufgenommenen Spektren jedoch von schlechter Qualität sind. Das bedeutet, daß die Auswertung aufgrund auftretender komplexer Salzaddukte nicht möglich ist. Der Einsatz der Verbindung **9** innerhalb dieses Projektes sollte eine interessante Alternative darstellen. Allerdings darf die Spaltung der entsprechend hergestellten Verbindung **115** nicht mit Silberionen im Spektrometer erfolgen, da diese den Detektor des Spektrometers kontaminieren. Eine interessante Beobachtung konnte hier an der Verbindung **115** gemacht werden. Es erfolgt eine Freisetzung des Oligodesoxynukleotids ohne die Zugabe von Silberionen. Eine durchgeführte Blindprobe (Trägermaterial **115** + Matrixgemisch) zeigt im Spektrum das gewünschte Spaltungsprodukt. Aufgrund dieser Beobachtung

## 4. Zusammenfassung

wurden weitere Oligodesoxynukleotide **118 – 121** synthetisiert und auf ihre Spaltung mit Hilfe des Lasers hin untersucht. Dabei konnten verschiedene Beobachtungen gemacht werden,

- die Beladungsdichte des Trägermaterials ist entscheidend für die Spektrenqualität,
- die Beladungsdichte sinkt bei der Behandlung mit einer Ammoniaklösung, so daß
- die Entschützung der Basen- und Phosphatschutzgruppen mit dem EDA-Mix (EDA:ACN:EtOH:H<sub>2</sub>O, 1 – 2h bei RT) erfolgen muß.
- Das Trägermaterial muß im Anschluß an die Entschützung mit einer Ammoniumacetat-Lösung behandelt werden, um entsprechende Salzaddukt zu verdrängen.

Das so behandelte Trägermaterial wird mit der Matrix vermischt, vermessen. Dabei kann beobachtet werden, daß die Spaltung durch den Laser nicht willkürlich im Molekül erfolgt, sondern bevorzugt die P-S-Bindung gespalten wird. Für die erfolgreiche Massenbestimmung im Anschluß an die SNUPE Reaktion musste in diesem Stadium des Projektes geklärt werden, ob die Vermessung eines Doppelstranges aus dem Templat und dem festphasen-gebundenen Primer im Spektrometer ebenfalls möglich ist. In einem Doppelstrang-Experiment konnten die beiden Einzelstränge eines eingesetzten Doppelstranges aus einem 27mer **124** und dem trägergebundenen Primer **123** (10mer) getrennt voneinander im Spektrum detektiert werden. Um die SNUPE Reaktion durchführen zu können, benötigt das Enzym für die erwünschte Verlängerung ein freies 3'-Ende, die hier synthetisierten Oligodesoxynukleotide weisen jedoch ein freies 5'-Ende auf. Daher wurde das Trägermaterial **102** für eine inverse Synthese vom 5' zum 3'-Ende eingesetzt. Trotz einer verlängerten Kopplungszeit von 300 sec innerhalb des Synthesesyklus musste bei der Verwendung von DCI als Katalysator festgestellt werden, daß die Beladungsdichte zu gering war, um ein Spektrum entsprechender Qualität aufzunehmen. Die beiden, hauptsächlich in der RNA-Synthese eingesetzten Katalysatoren, Pyridiniumhydrochlorid und Benzylthiotetrazol wurden anstelle von DCI eingesetzt. Durch den Ersatz des Katalysators kann die Beladungsdichte so weit erhöht werden, daß ein entsprechendes Massespektrum des inversen Oligodesoxynukleotids aufgenommen werden konnte. Im Anschluß an die PCR Reaktion kann jedoch kein Spektrum in der benötigten Qualität aufgenommen werden. Trotz verschieden durchgeführter Waschprotokolle für das Trägermaterial, ist die Adsorption an Ionen am Trägermaterial zu stark. Das hier entwickelte Konstrukt gestaltet sich für die Anwendung als ein Standardanalyseverfahren zu komplex, da für die Detektion von Punktmutationen aussagekräftigere und einfachere Verfahren zur Verfügung stehen. Daher erscheint eine weitere Ausarbeitung als nicht effektiv. Allerdings wirft der hier beobachtete Spaltungsmechanismus einige Fragen auf, die durch einige zusätzliche Experimente vermutlich geklärt werden könnten. Für einen Einsatz als photolabiles Trägermaterial ist dieses Konstrukt jedoch ebenfalls zu kompliziert, es existieren einfachere und preiswertere photolabile Trägermaterialien.

### 4.3 Verknüpfungsreaktionen von Acetal-geschützten Oligodesoxynukleotiden mit Hydrazin-modifizierten Derivaten

Die effektive Konjugation von modifizierten Oligodesoxynukleotiden und Hydrazin-Derivaten durch die Verwendung einer 5'-Acetalfunktion konnte hier durch die Verwendung des aromatischen Phosphitlierungsreagenz **135** gezeigt werden. Das hergestellte 5'-Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotid fungiert hier als ein maskiertes 5'-Aldehyd. Die 5'-Modifizierung (**130**, **133** oder **135**) wird mit Hilfe eines Standard-Synthesesyklus mit einer verlängerten Reaktionszeit von 300 sec

#### 4. Zusammenfassung

gekoppelt. Der Einsatz des maskierten Acetals weist gegenüber dem reaktiven Aldehyd-Derivat mehrere Vorteile auf

- es ist lagerstabil, gut handhabbar und
- stabil gegenüber den Bedingungen der Oligodesoxynukleotid-Synthese.

Leider musste hier festgestellt werden, daß die eingesetzten aliphatischen Acetale **130** und **133** als 5'-Modifikationen durch die Behandlung mit Säure nicht einfach in ihre Aldehyde zu überführen sind. Bei der Behandlung der Oligodesoxynukleotide **132** und **134** mit Säure, konnte die Freisetzung des Aldehyds nicht durch die HPL-Chromatographie oder die Massenspektrometrie nachgewiesen werden und die folgende Konjugation mit einem Hydrazin-Derivat ist nur eingeschränkt möglich. Das aromatische Acetal-geschützte Oligodesoxynukleotid **136** kann jedoch in einer Eintopfreaktion mit einem entsprechenden Hydrazin-Derivat umgesetzt werden. Das verwendete Hydrazin-Derivat (10 bis 15 mM) muß jedoch als Hydrochlorid oder als Trifluoracetat eingesetzt werden. Die Reaktion erfolgt in wässriger methanolischer Lösung durch den Zusatz von Natriumacetat, dieses katalysiert die Reaktion. Durch den Einsatz von Methanol als Lösungsmittel kann der Reaktionsansatz direkt mit Hilfe der HPL-Chromatographie gereinigt werden. Die Umsetzung des Oligodesoxynukleotids **136** wurde mit den folgenden Hydrazinen

- N,N-Diphenylhydrazin x HCl (> 95%)
- 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol x HCl (> 95%)
- Biotin x HCl (keine Reaktion)
- AlexaFluor 546 x HCl (> 90%)
- Cy3 x TFA (> 50%)
- Cy5 x TFA (> 80%)

bei RT durchgeführt. Außer dem Biotin-Derivat reagieren alle Hydrazin-Derivate in zufriedenstellenden Ausbeuten. Die mit den Hydraziden erreichten Ausbeuten übersteigen bei weitem die der entsprechenden Aktivester. Vorallem das Arbeiten in wässriger Lösung erleichtert die Synthese und die Aufreinigung, zudem sind die Hydrazide gegenüber den Aktivestern stabiler. Hiermit steht mit der Verbindung **135** eine 5'-Modifikation zur Verfügung, die eine Konjugation mit Hydrazin-Derivaten in sehr guten Ausbeuten ermöglicht.

## 5.0 Experimentelle Arbeiten

### 5.1 Chemikalien und Lösungsmittel

- Acetanhydrid;  $C_4H_6O_3$  [102,09]; Fluka Nr. 45830, puriss. p.a., > 99%, d 1.08  
 Aceton;  $C_3H_6O$  [58,08]; Techn. Qualität oder Fluka 00561, Sdp. 55.5 - 56.5°C, d 0.79  
 Acetonitril;  $C_2H_3N$  [41,05]; Merck Nr. 13358, 99,8 %, Chromasolv für die HPLC  
 Acetonitril;  $C_2H_3N$  [41,05]; Biosolve Nr. 01205831, 99.9%,  $H_2O < 0.001\%$  (zum Lösen der Amidite), abs. über Molsieb  
 6-Amino-1-hexanol;  $C_6H_{15}NO$  [117,2]; Fluka Nr. 08053, purum > 97%  
 Ammoniak, 25 % wäßrige Lösung;  $H_3N$  [17,3]; Merck Nr. 5432, p.a., d 0.91  
 Ammoniak, 32 % wäßrige Lösung;  $H_3N$  [17,3]; Merck Nr. 105426, reinst, d 0.88  
 Ammoniumacetat;  $C_2H_7NO_2$  [77,08]; Fluka Nr. 09690, p.a. > 98 %  
 di-Ammoniumhydrogencitrat;  $C_6H_{14}N_2O_7$  [226,2]; Fluka  
 Argon; Linde, Qualität 4.8, eingesetzt wie gekauft  
 2,2'-Azobis-(2-methyl-propionitril) (AIBN);  $C_8H_{12}N_4$  [164,2]; Fluka Nr. 11630, purum, > 98 %  
 Benzimidazol;  $C_7H_6N_2$  [118,1]; Fluka Nr. 12250, purum, > 98%  
 Benzol;  $C_6H_6$  [78,11]; Fluka Nr. 12552, > 99,5 %, puriss., Sdp. 80°C, d 0.879  
 O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tertramethyluronium (TBTU);  $C_{11}H_{16}BF_4N_5O$  [321.08]; Fluka Nr. 1280, purum, > 97%  
 Benzoylchlorid;  $C_7H_5ClO$  [140,57]; Fluka Nr. 12930, 99.5 %, purum, Sdp. 198°C, d 1.210  
 Benzylthiotetrazol (BTT);  $C_8H_8N_4S$  [192.2]; emp Biotech Nr. NC-0101-01  
 4-Bromanisol;  $C_7H_7BrO$  [187.04]; Fluka Nr. 16260, Sdp. 98-99°C, d 1.495,  $\geq 97\%$   
 Bromsuccinimid;  $C_4H_4BrNO_2$  [178.0]; Fluka Nr. 18350, purum, > 98%  
*tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCI);  $C_{16}H_{19}ClSi$  [274,87]; Aldrich Nr. 19,553-7, 98%, d 1.057  
*tert*-Butylhydroperoxid (TBHP);  $C_4H_{10}O_2$  [90,12]; Fluka Nr. 19998, ~ 3 M in Isooktan, wasserfrei, d 0.76  
 Carbonyldiimidazol (CDI);  $C_7H_6N_4O$  [162,2]; Fluka Nr. 21860, purum, > 95%  
 Calciumchlorid;  $CaCl_2$  [75,53]; Merck Nr. 102389, > 95%, wasserfrei  
 Chloroform;  $CHCl_3$  [119,38]; Grüssing Nr. 10251, 99%, reinst, d 1.476  
 Chlor-dimethyl-thexylsilan (TDSCI);  $C_8H_{19}ClSi$  [178.78]; Fluka Nr. 88329,  $\geq 99\%$ , Sdp. 55-56°C, d 0.909  
 Chlortrimethylsilan (Trimethylchlorsilan, TMSCI);  $C_3H_9ClSi$  [108,64]; Merck Nr. 818737 oder Fluka 92360, > 99%, zur Synthese, Sdp. 57°C, d 0.86  
 2'-Desoxyadenosin;  $C_{10}H_{13}N_5O_4$  [251,25]; Pharma Waldhof Nr. 60013, 99,1%  
 2'-Desoxycytidin x HCl;  $C_{10}H_{13}N_5O_3 \times HCl$  [263,68]; Pharma Waldhof Nr. 6102340, 99,7%  
 2'-Desoxyguanosin;  $C_{10}H_{13}N_5O_3$  [337,336] Pharma Waldhof Nr. 6201340, 99,4%  
 2-Desoxythymidin;  $C_{10}H_{14}N_2O_5$  [242,231], Pharma Waldhof Nr. 66013, 99,4%  
 Dichloressigsäure (DCA);  $C_2H_2Cl_2O_2$  [128,94]; Fluka Nr. 35810, 98.5%, Smp. 13-15°C, Sdp. 193-195°C, d 1.567  
 Dichlormethan (Methylenchlorid, DCM);  $CH_2Cl_2$  [84,93]; technische Qualität, Sdp. 40°C; über Calciumchlorid destilliert  
 Dichlormethan (Methylenchlorid, DCM);  $CH_2Cl_2$  [84,93]; Fluka Nr. 66749; puriss., abs. über Molsieb, > 99,5%,  $H_2O < 0,005\%$ ; Sdp. 40°C  
 Dicyclohexylcarbodiimid (DCC);  $C_{13}H_{22}N_2$  [206,33]; Fluka Nr. 36650, puriss., >99%

## 5. Experimenteller Teil

- Diethylamin;  $C_4H_{11}N$  [73,14]; Fluka 31731, purum, > 99%
- Diethylether;  $C_4H_{10}O$  [74,12]; Techn. Qualität, Sdp. 35-37°C, d 0.713,  $\geq 99.5\%$
- N,N-Dimethylformamid-diethylacetal;  $C_7H_{17}NO_2$  [147,2]; Fluka Nr. 40252,  $\geq 95\%$ , Sdp. 128-130°C, d 0.859
- Dimethylsulfoxid (DMSO);  $C_2H_6OS$  [78,13]; Fluka Nr. 41639, d 1.1, 99.5%
- N,N-Diisopropylethylamin (Hünigs Base, DIPEA);  $C_8H_{19}N$  [129,25]; Fluka Nr. 03440, > 98%, purum, d 0.755, Sdp. 123-126°C
- 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl);  $C_{21}H_{19}ClO_2$  [338,83]; Merck Nr. 818616; zur Synthese
- 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP);  $C_7H_{10}N_2$  [122,17]; Fluka Nr. 39405, purum, > 98%, Smp. 112-113°C
- Dimethylformamid (DMF);  $C_3H_7N$  [73,1]; Fluka Nr. 40250, puriss., > 98%, abs. über Molsieb, d 0.984
- 1,4-Dithio-DL-threit (DTT);  $C_4H_{10}O_2S_2$  [154,3]; Fluka Nr. 43817, > 99%
- Essigsäure (AcOH);  $C_2H_4O_2$  [60,05]; Riedel de Haën Nr. 27225; reinst, 100 %, d 1,05
- Essigsäureethylester (EtOAc, EE);  $C_4H_8O_2$  [88,12]; Techn. Qualität, Sdp. 77,8 °C, über Kaliumcarbonat destilliert
- Ethanol (EtOH);  $C_2H_6O$  [46,07]; Riedel de Haën Nr. 32205, absolut, > 99,8 %, Sdp. 78-79°C, d 0.788
- Ethylendiamin (EDA);  $C_2H_8N_2$  [60,10]; Fluka Nr. 03550, puriss., > 99,5 %, Sdp. 117-118°C, d 0.895
- Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA);  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2 H_2O$  [372,2]; Fluka Nr. 03682, puriss. p.a. > 99%
- 4-Ethylmorpholin;  $C_6H_{13}NO$  [115.18]; Fluka Nr. 04499, purum, ca. 97%, Spd. 137-139°C, d 0.913
- N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu);  $C_{19}H_{15}NO_5$  [337,3]; Fluka Nr. 46920, purum, > 98%
- Imidazol;  $C_3H_4N_2$  [68,08]; Fluka Nr. 56750, puriss p.a., > 99,0 %, Smp. 88-90°C, wird bei Bedarf im Exsikkator über  $P_2O_5$  getrocknet
- Isobuttersäureanhydrid;  $C_8H_{14}O_3$  [158,2]; Fluka Nr. 58390, purum, > 98 %, Sdp. 179-182°C, d 0.953
- 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES);  $C_8H_{18}N_2O_4S$ , [238.3],  $\geq 99.5\%$ , Fluka Nr. 54457
- Kaliumthioacetat;  $C_2H_3KOS$  [114,21]; purum, > 98%
- Laevulinsäure;  $C_5H_8O_3$  [116,12]; Fluka Nr. 61380, purum, >97%,
- Magnesium; Mg [24,31]; Fluka Nr. 13103, > 99.5%
- Methanol (MeOH);  $CH_4O$  [32,04]; Fluka Nr. 65550, > 99%, Sdp. 63-65°C, d 0.791
- Methansulfonylchlorid (Mes-Cl);  $CH_3ClO_2S$  [114,55]; Fluka Nr. 64260, puriss  $\geq 99\%$ , d 1.474, Sdp. 53-55°C
- 1-Methylimidazol;  $C_4H_6N_2$  [82,11]; Fluka Nr. 67560, > 99 %, Sdp. 195-197°C
- Molekularsieb 3Å; Fluka Nr. 69831, die Aktivierung erfolgt durch Ausheizen (Heizpilz Stufe 1 oder Trockenpistole) im Ölpumpenvakuum
- Natriumcarbonat;  $Na_2CO_3$  [105,99]; Fluka Nr. 71350, wasserfrei, > 99,5%
- Natriumchlorid; NaCl [58,44]; Merck Nr. 1540, > 99,5 %, für die Molekularbiologie
- Natriumhydrogencarbonat;  $NaHCO_3$  [84,01]; Grüssing Nr. 12144, reinst 99,5%,
- Natriumhydroxid; NaOH [40,0]; Grüssing Nr. 12155, 99%, Pellets
- Natriumlauryl-sulfat (SDS);  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  [288.4];  $\geq 99\%$ , Fluka Nr. 71725
- Natriumjodid; NaI [149,89]; Riedel de Haën Nr. 03129, reinst
- Natriumsulfat;  $Na_2SO_4$  [142,04]; Riedel de Haën Nr. 13462, techn., 99%, wasserfrei
- Natriumsulfit;  $Na_2SO_3$  [126,04]; Fluka Nr. 71991, purum, > 97%

## 5. Experimenteller Teil

Phosphorpentoxid;  $P_4O_{10}$  Riedel de Haën Nr. 04113, 98,5%  
Phosphorigsäure-bis-(diisopropylamid)-2-cyanethylester (P-Reagenz I)  $C_{15}H_{32}N_3OP$  [301.4]; purum,  $\geq 98\%$ , Sdp. 98 -100°C, d 0.949  
Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid (P-Reagenz II)  $C_9H_{18}ClN_2OP$  [236.7]; purum,  $\geq 98\%$ , d 1.061  
Pyridin;  $C_5H_5N$  [79,10]; Fluka Nr. 82704 oder Grüssing Nr. 13057,  $> 99,5\%$ , Sdp. 115°C  
Pyridinhydrochlorid;  $C_5H_6NCl$  [115.56];  
Salpetersäure;  $HNO_3$  [63.01]; Fluka Nr. 78005, rauchend,  $\geq 99,5\%$   
Silbernitrat;  $AgNO_3$  [169,87]; Fluka Nr. 85228, krist. rein  
Tetrabutylammoniumperjodat;  $[CH_3(CH_2)_3]_4NIO_4$  [433,37]; Aldrich Nr. 24,705-7, Smp. 175°C  
Tetrachlorkohlenstoff;  $CCl_4$  [153,8]; Fluka Nr. 87032, d 1.58, n 1.46, Sdp. 77°C  
Tetrahydrofuran (THF);  $C_4H_8O$  [72,11]; Baker Nr. 8075,  $> 99\%$ , Sdp. 65.8-66.2 °C  
1,1,3,3-Tetramethyl-guanidin;  $C_5H_{13}N_3$ , [115,18]; Fluka Nr. 87844, Sdp. 158°C, d 0.916,  $\geq 99\%$   
1H-Tetrazol;  $CH_2N_4$  [70,05]; Janssen Nr. 22 305 92,  $> 99\%$   
Thiobenzoessäure;  $C_7H_6OS$  [138,18]; Fluka Nr. 88500, pract.;  $\approx 90\%$ , d 1.183, Sdp. 103-105°C  
p-Toluolsulfonsäurechlorid (Tos-Cl);  $C_7H_7ClO_2S$  [190,65]; Fluka Nr. 89730, puriss.,  $> 99\%$   
Trichloressigsäure (TCA);  $C_2HCl_3O_2$  [163,39]; Fluka Nr. 91232;  $> 99\%$  p.a., Smp. 54-57 °C  
Triethylamin (TEA);  $C_6H_{15}N$  [101,19]; Fluka Nr. 90340, puriss. p.a., 99,5 %, Sdp. 88-89°C, d 0.73  
Trifluormethansulfonsäure;  $CHO_3F_3S$  [150,1]; Fluka Nr. 71786, puriss., d 1.72, Sdp. 167-170°C  
Triphenylmethylmercaptan;  $C_{19}H_{16}S$  [276.4]; Fluka Nr. 93070, 98% Smp. 104-106°C  
Triphenylphosphin;  $C_{18}H_{15}P$  [262,29]; Fluka Nr. 93090,  $> 98,5\%$ , Smp. 79-81°C  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris);  $C_4H_{11}NO_3$  [121,1]; Serva 37180  
Toluol;  $C_7H_8$  [92,14]; Merck, 99,5%, Sdp. 110°C, d 0.87  
Wasser;  $H_2O$  [18,02]; Riedel de Haën Nr. 34877; für die Chromatographie  
Xanthon;  $C_{13}H_8O_2$  [196,21]; Fluka Nr. 95502,  $> 97\%$ , Smp. 172-174°C

### 5.2 Geräte und Ausrüstung

Analysenwaage	Sartorius BP 221 S (Max. 220g)
DNA-Synthesizer	Perceptive Biosystems Expedite 8905 Applied Biosystem ABI 394
Kühlzentrifuge	Sigma 3K10
HPLC-Anlagen	• Merck-Hitachi Anlage (L6220 Intelligent Pump, D6000 Interface, L4250 UV-VIS Detector) • Beckman Anlage (GoldStar-System) Programmable Detector Module 166 Programmable Solvent Module 126 Autosampler 507
pH-Meter	Knick 761 calimatic, Schott CG 822
Speed-Vac	Savant SC 110
UV-Spektrometer	Varian Cary 1, Hitachi U-1100

Wasseraufbereitungsanlage      Millipore, Milli-Q mit Organtex-Kartusche

### 5.3 Chromatographie

#### 5.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

DC-Platten: Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Schichtdicke 0,2 mm; Merck Nr. 5554)

Die Platten wurden auf eine Größe von 5 × 10 cm zugeschnitten und bei Kammersättigung mit den entsprechenden Laufmitteln eluiert.

Detektion: • UV-Licht bei 254 nm  
• Verbindungen, die eine DMTr-Schutzgruppe tragen können durch HCl-Gas, der MOPS-Lösung oder starker Hitze durch das Entstehen einer intensiven Orangefärbung detektiert werden.

MOPS-Lösung ⇒ Zusammensetzung:

25 ml Molybdätophosphorsäure

10 g Cer (IV) sulfat

940 ml Wasser

60 ml Schwefelsäure conc.

Die Dünnschicht-Platte wird nach dem Lauf kurz in die Anfärbelösung (MOPS) eingetaucht, die überschüssige Lösung wird an einem Tuch abgestreift und anschließend wird die DC-Platte vorsichtig auf der Heizplatte (mit Alufolie bedeckt) eines Magnetrührers erwärmt (Heißluftfön ist ebenfalls möglich, allerdings erfolgt die Erwärmung hier sehr punktuell ⇒ dies führt zu nicht-interpretierbaren blauen und schwarzen Flecken).

Verbindungen, die eine DMT-Schutzgruppe tragen, zeigen schon nach dem Eintauchen die spezifische Orangefärbung, während andere Verbindungen erst durch das Erwärmen entsprechend angefärbt werden können (meist blau bis schwarz).

#### 5.3.2 Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie, LC)

Trennmaterial: Kieselgel 60 mit der Korngröße 40-63 µm  
Merck Nr. 9385

Durchführung: nach W.C. Still (1978)  
Die entsprechenden Zusammensetzungen der verwendeten Laufmittelgemische werden bei den Einzelverbindungen beschrieben

#### 5.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Gerät 1: Merck-Hitachi Anlage (Universität) bestehend aus  
- L6220 Intelligent Pump  
- D6000 Interface  
- L4250 UV-VIS Detector  
- Computer mit Chromatographie Data Station, Software HPLC-Manager Version 2

Gerät 2: Beckmann HPLC Anlage, System Gold (Aventis AG) bestehend aus

## 5. Experimenteller Teil

- Programmable Detector Module 166
- Programmable Solvent Module 126
- Autosampler 507

### Säulen für die RP- und Größenausschluß-Chromatographie

#### Analytische Säule:

- EcoCart<sup>®</sup> RP18; 5µm; 125 × 4 mm; Fluß 0.8 ml/min  
(Firma *Merck*, Bestellnummer 51232)
- Probenschleife: 20 µl

#### Präparative Säulen:

- LiChrospher<sup>®</sup> RP18; 5µm; 250 × 10 mm; Fluß 4.0 ml/min  
(Firma *Merck*, Bestellnummer 50257)
- R3 Säule; 100 x 10 mm; Fluß 3 - 5 ml/min  
(Firma *Applied Biosystem*, Bestellnummer Material 1-1339-03)

Probenschleife: 700 µl

Eluenten: **A:** 0,1 molare Triethylammoniumacetat-Lösung pH-Wert 7,5 (TEAA)

Herstellung:

140 ml (1mol) Triethylamin wird unter Eiskühlung mit 200 ml Millipore-Wasser und 58 ml Essigsäure versetzt. Anschließend wird mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt, der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH 7,5 eingestellt. Die 1 molare Stammlösung wird vor Gebrauch 1:10 verdünnt und der pH-Wert nochmals überprüft.

**B:** Acetonitril oder Methanol (Qualität entsprechend für die Chromatographie)

### Säule für die Ionenaustausch - Chromatographie

#### Analytische Säule:

- Gen-Pak Fax 100 x 4.6 mm (Firma *Waters*, Bestellnummer 15490)

Eluenten	<b>A:</b>	ACN	400 ml
		Wasser	1600 ml
		Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	3.12 g
		Natriumchlorid	11.69 g
<b>B:</b>	ACN	1600 ml	
	Wasser	400 ml	
	Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	3.12 g	
	Natriumchlorid	175.32 g	

Der pH-Wert der beiden Lösungen wird auf pH 6.8 eingestellt.

Der Gradient W-05-60 bedeutet: 5% auf 60% Puffer B innerhalb von 30 min.

Detektion: Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm

### 5.4 Gelelektrophorese

Mini-Gelapparatur, Fertiggele (16% PAA mit 7 M Harnstoff), Stromstärke 250 Volt  
Laufpuffer: 1 x TBE-Puffer

Zusammensetzung des 10 x TBE-Puffers:

242.28 g Tris,  
102.64 g Borsäure und  
7.44 g EDTA

werden in einem 2 l Messkolben vorgelegt und in Wasser gelöst (bei längeren Stehen kann es zur Kristallbildung kommen). Der Puffer wird vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

Farbstoffe (als Marker für die Laufhöhe der Proben):

- Bromphenolblau (Marker  $\Rightarrow$  höhere Masse)
  - Xylencyanol (Marker  $\Rightarrow$  niedrigere Masse)
- (Ansetzen der Lösung  $\Rightarrow$  In 20 ml Formamid werden je 50 mg Bromphenolblau und Xylenxanol gelöst.)

Die Proben wurden in Formamid aufgenommen und mit Hilfe einer Pipette in die Geltaschen eingebracht.

### 5.5 NMR-Spektroskopie

Geräte: AMX 250 für  $^1\text{H}$ -NMR  
WH 270 für  $^1\text{H}$ -NMR  
AMX 400 für  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR (entspricht einer Phosphor-Frequenz von 162 MHz)  
alle drei Geräte werden von der Firma Bruker hergestellt

Die chemische Verschiebung  $\delta$  (in ppm) wurde auf die Protonen-Signale der deuterierten Lösungsmittel bezogen (Eichung  $\text{CDCl}_3$  auf 7,26 ppm,  $\text{DMSO-d}_6$  auf 2,5 ppm und  $^{31}\text{P}$ -Signale als Referenz diente hier eine 85%ige Phosphorsäure).

### 5.6 Massenspektrometrie

Massenspektren wurden auf Geräten der Firmen:

- VD-Analytical und
- VG Biotec (Micromas) gemessen.

Für die Electrospray Ionisation (ESI) stand eine VG Platform II mit Quadrupol Analysator zur Verfügung.

Spektren mit matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation (MALDI) wurden auf einem Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) im linearen Modus gemessen.

Als Matrices für die MALDI-Spektrometrie werden

- ATT 6-Aza-2-thiothymin (ges. Lösung in EtOH),
- nH norHarman (ges. Lösung in EtOH) und
- alpha-cyano alpha-Cyano-4-hydroxymizsäure (ges. Lösung in EtOH)
- di-Ammoniumhydrogencitrat wird 0.1 mol in Wasser für die Messungen benötigt verwendet.

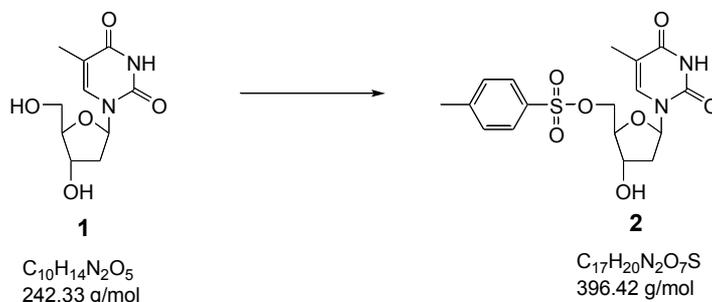
## 5.7 Verwendete Lösungen

- MOPS-Lösungen (Anfärbe-Reagenz für die Dünnschichtchromatographie, siehe 4.3 Dünnschichtchromatographie)
- Gesättigte Natriumhydrogencarbonat Lösung
- Gesättigte Natriumchlorid Lösung
- 5% ige Natriumhydrogencarbonat Lösung
- 5% ige Natriumchlorid Lösung
- 5% ige Natriumsulfit Lösung
- EDA-Mix  $\Rightarrow$  50:23.75:23.75:2.5 EDA:ACN:EtOH:Wasser

## 5.8 Synthese der Einzelverbindungen

5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-2'-desoxythymidin 2

Literaturstelle E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman, *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558

Chemikalien

2'-Desoxythymidin **1**  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ , 242.33 g/mol

p-Toluolsulfonsäurechlorid  $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClO}_2\text{S}$ , 190.65 g/mol, puriss > 99%

Pyridin  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 79.1 g/mol, puriss.; abs. über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115-116°C

Ansatzgröße

10 g	2'-Desoxythymidin <b>1</b>	(41.6
mmol)		
9.8 g	p-Toluolsulfonsäurechlorid	(51.5 mmol)
100 ml	Pyridin	

Durchführung

2'-Desoxythymidin **1** wird in 50 ml Pyridin suspendiert und der Reaktionsansatz auf 0°C abgekühlt (Eiskühlung), über einen Zeitraum von 30 min wird eine Lösung aus p-Toluolsulfonsäurechlorid in 30 ml Pyridin zugetropft. Der Ansatz steht über Nacht bei 4°C (Kühlraum). Eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1) zeigt die vollständige Umsetzung der Reaktion an. Die Reaktionslösung wird in 250 ml Eiswasser (150 ml Wasser und 100 g Eis) eingebracht und der entstandene Niederschlag abgesaugt. Der Feststoff wird anschließend in 300 ml DCM gelöst und die Lösung wird 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung

## 5. Experimenteller Teil

extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Zur Aufreinigung schließt sich eine Säulenchromatographie an. Es wurde mit einem Stufengradienten von 0% bis 4% Methanol in Dichlormethan eluiert. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und einrotiert.

**Ausbeute** R = 11.12 g = 68% Ausbeute (100% ige Ausbeute = 16.36 g)

**Rf-Wert** Dichlormethan:Methanol 9:1 0.29

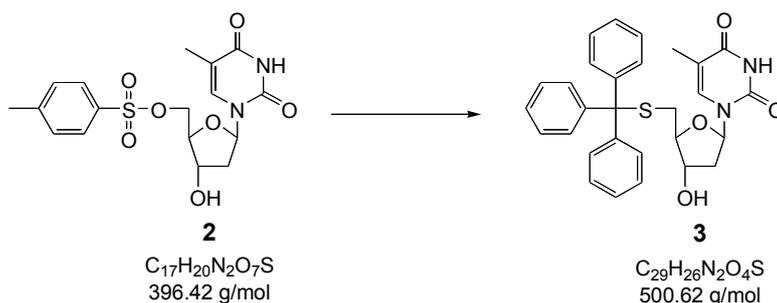
**ESI(+)-MS** ( $C_{17}H_{20}N_2O_7S = 396.4$  g/mol) Gemessen 397.1 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.31 (br. s, 1H, N-H), 7.82 (d, 2H, aromatisch, AA'BB'), 7.44 (d, 2H, aromatisch, AA'BB'), 7.36 (d, 1H, H-6), 6.14 (t, 1H, H-1'), 5.57 (d, 1H, 3'-OH), 4.21 (m, 3H, H-5' + H-5'' + H-3'), 3.85 (m, 1H, H-4'), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Tosyl), 2.10 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-S-Trityl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin 3

**Literaturstellen** A.) M. Mag, S. Lücking, J.W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7), 1437-1441; B.) B.A. Connolly, P. Rider; *Nucl. Acids Res.* **1985**, 13 (12), 4485-4502; C.) B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849



### Chemikalien

Natriumhydroxid NaOH, 40 g/mol

Triphenylmethylmercaptan  $C_{19}H_{16}S$ , 276.4 g/mol, Smp. 104-106°C, 98%

Ethanol  $C_2H_5OH$ , 46.07 g/mol, d 0.79, absolut zur Analyse

### Ansatzgröße

2.2 g	Natriumhydroxid	(55 mMol)
13.82 g	Triphenylmethylmercaptan	(55 mMol)
3.96 g	5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxythymidin <b>2</b>	(10 mMol)
180 ml	Ethanol	

### Durchführung

Triphenylmethylmercaptan wird in 100 ml Ethanol suspendiert, zu dieser Suspension wird eine Lösung aus Natriumhydroxid in 20 ml Wasser gegeben. Dabei ist eine leichte Gelbfärbung des Reaktionsgemisches zu beobachten und der suspendierte

## 5. Experimenteller Teil

Feststoff löst sich zum Teil auf. 5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxythymidin **2** wird in 80 ml Ethanol suspendiert und zugetropft, dabei wechselt die Verfärbung der Lösung nach rosa und der gesamte Feststoff löst sich auf. Die Reaktionslösung refluxiert 8 h und rührt anschließend bei RT über Nacht. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit wenig Ethanol nachgewaschen. Die gesamte Lösung wird einrotiert, der Rückstand in 400 ml Essigsäureethylester aufgenommen und 2 × mit je 100 ml 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie an. Es wurde mit einem Stufengradienten von 0% bis 5% Methanol in Dichlormethan eluiert. Das Produkt eluiert unter diesen Bedingungen relativ spät von der Säule, eine frühere Erhöhung des Methanol-Gehaltes führt jedoch zu einer wesentlich schlechteren Trennung und damit zu einem verunreinigtem Produkt. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute R = 2.55 g = 51% Ausbeute (100% ige Ausbeute = 5 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 0.48

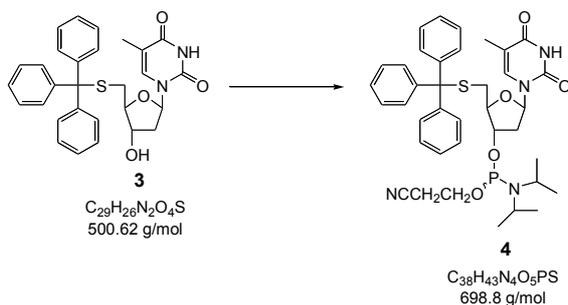
ESI(-)-MS (C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S = 500.62 g/mol) Gemessen 499.3 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.91 (br. s, 1H, N-H), 7.18-7.42 (m, 16H, aromatisch, H-6), 6.15 (t, 1H; H-1'), 4.08 (m, 1H, H-3'), 3.75 (m, 1H, H-4'), 2.63 (dd, 1H, H-5''), 2.46 (dd, 1H, H-5'), 2.25 (m, 1H, H-2'), 1.99 (m, 1H, H-2''), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-(S-Trityl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylamino-phosphit **4**

Literaturstellen A.) M. Mag, S. Lücking, J.W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7), 1437-1441; B.) B.A. Connolly, P. Rider; *Nucl. Acids Res.* **1985**, 13 (12), 4485-4502; C.) B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849



### Chemikalien

N,N-Diisopropylethylamin C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N, 129.25 g/mol, purum; ≥ 98% (GC) Sdp. 126-128°C, d 0.755

## 5. Experimenteller Teil

Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid (P-Reagenz II)

$C_9H_{18}ClN_2OP$ , 236.7 g/mol, purum;  $\geq 98\%$ , d 1.061

Dichlormethan  $CH_2Cl_2$ , 84.93 g/mol, puriss.; abs.; über Molsieb, Sdp. 40°C, d 1.325

Acetonitril  $C_2H_3N$ , 41.05 g/mol, puriss.; abs.; über Molsieb, Sdp. 81°C, d 0.782

### Ansatzgröße

0.75 g	5'-S-Trityl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>3</b>	(1.5 mmol)
1.04 ml	DIPEA	(6.0 mmol)
0.4 ml	P-Reagenz II	(1.8 mmol)
10 ml	Dichlormethan:Acetonitril	

### Durchführung

Zu einer Lösung aus 5'-S-Trityl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **3** in 10 ml Dichlormethan:Acetonitril und DIPEA wird unter Argon-Atmosphäre das Phosphitierungs-Reagenz II langsam zugetropft. Nach 1 h erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DC 95:5 DCM:MeOH), diese zeigt die vollständige Umsetzung des Eduktes an. Die Lösung wird mit 0.5 ml n-Butanol gequench und einrotiert. Der Rückstand wird in 150 ml Essigsäureethylester aufgenommen und 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der ölige Rückstand wird in 10 ml Dichlormethan:Diethylether aufgenommen und in 200 ml kaltes n-Pentan einpipettiert. Der voluminöse Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem n-Pentan nachgewaschen und am HV getrocknet.

Ausbeute R = 0.73 g = 61.9% Ausbeute (100% ige Ausbeute = 1.18 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.65

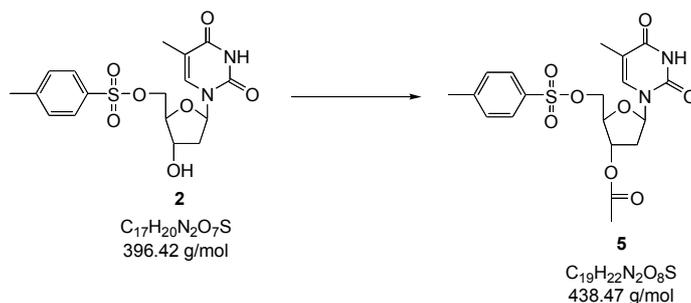
ESI(-)-MS ( $C_{38}H_{43}N_4O_5PS$  = 698.8 g/mol) Gemessen 697.6 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>31</sup>P-NMR  $CDCl_3$  + 0.1% DIPEA  
149.55, 149.35 ppm

### 5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin **5**

Literaturstelle E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



## 5. Experimenteller Teil

### Chemikalien

Acetanhydrid C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, 102.09 g/mol, puriss. p.a. > 99.5%, d 1.08

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss. abs. über Molsieb, ≥ 99.8%, d 0.983

### Ansatzgröße

5 g 5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxythymidin **2** (12.6 mmol)

5 ml Acetanhydrid (53.0 mmol)

60 ml Pyridin

### Durchführung

Zu einer Lösung aus 5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxythymidin **2** in Pyridin wird langsam Acetanhydrid zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird durch die Zugabe von 10 ml Methanol gequenchet und anschließend einrotiert. Um Reste von Acetanhydrid zu entfernen, wird der ölige Rückstand 3 × mit Toluol koevaporieret und anschließend am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute R = 5.2 g = 94% (100% ige Ausbeute = 5.5 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.67

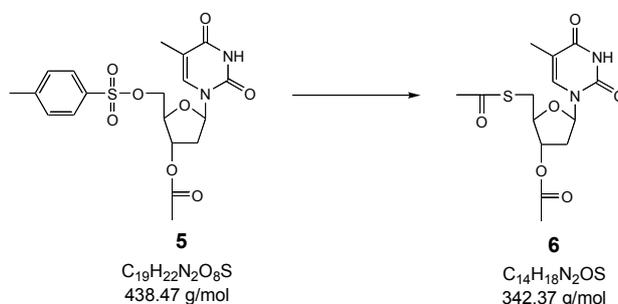
ESI(+)-MS (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S = 438.47 g/mol) Gemessen 439.1 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.74 (br. s, 1H, N-H), 7.75-7.70 (d, 2H, aromatisch, AA'BB'), 7.42 (d, 1H, H-6), 7.30-7.20 (d, 2H, aromatisch, AA'BB'), 6.36-6.30 (t, 1H, H-1'), 5.12-5.10 (m, 1H, OH), 4.2-4.3 (m, 3H, H-3' + H-5' + H-5''), 4.09-4.08 (m, 1H, H-4'), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Tosyl), 2.32-2.32 (m, 2H, H-2' + H-2''), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T) 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Acetyl)

### 3',5'-O,S-Diacetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **6**

Literaturstelle E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



### Chemikalien

Kaliumthioacetat C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KOS, 114.21 g/mol, purum. > 98%

Ansatzgröße

2.25 g	5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin <b>5</b>	(5.13 mmol)
3 g	Kaliumthioacetat	(26.3 mmol)
40 ml	Aceton	

Durchführung

Eine Suspension von 5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin **5** und Kaliumthioacetat in Aceton rührt 2 h bei RT, es erfolgt eine DC-Kontrolle. Laut DC (LM DCM:MeOH 9:1) ist „scheinbar“ keine Umsetzung detektierbar. Da das Produkt und das Edukt einen identischen R<sub>f</sub>-Wert besitzen, kann der Reaktionsfortschritt nur durch das unterschiedliche Anfärbeverhalten dieser mit einer Molybdosäure-Lösung (MOPS) untersucht werden. Die Suspension wird auf 50°C erwärmt und rührt für 3 h. Da laut DC-Kontrolle die Umsetzung nicht vollständig ist, rührt der Ansatz bei RT über Nacht. Der Niederschlag wird anschließend abgesaugt und mehrmals mit Aceton nachgewaschen, die organischen Lösungen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer einrotiert.

Ausbeute

R = 5.2 g = 94% Ausbeute (100% ige Ausbeute = 5.5 g)

R<sub>f</sub>-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.57

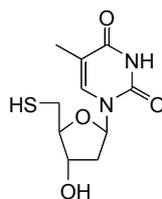
ESI(+)-MS (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S = 342.37 g/mol) Gemessen 349.0 [M-Li]<sup>+</sup>  
365.0 [M-Na]<sup>+</sup>

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.38 (br. s, 1H, N-H), 7.53-7.51 (d, 1H, H-6), 6.17-6.12 (dd, 1H, H-1'), 5.13-5.10 (dd, 1H, H-3'), 3.99-3.97 (dd, 1H, H-4'), 3.29-3.22 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.50-2.47 (m, 1H, H-2'), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S-Ac), 2.37-2.25 (m, 1H, H-2''), 2.07 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-O-Ac), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

5'-Mercapto-2'-desoxythymidin **7**

Literaturstelle A.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K.J. Divakar, A. Mottoh, C.B. Reese, Y.S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974

**7**

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S  
258.4 g/mol

ChemikalienMethanol CH<sub>4</sub>O, 32.04 g/mol, d 0.79, Sdp. 64-65°C

Methanolische HCl ca. 5 M (Eigenherstellung ⇒ Einleiten von HCl in MeOH bei Stickstoffkühlung)

Ansatzgröße Reaktion a:

1.5 g	5'-S-Acetyl-3'-O-Acetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>6</b>	(5 mmol)
40 ml	Methanol	
10 ml	5 M methanolische HCl	

Ansatzgröße Reaktion b:

2.2 g (4.7mmol)	5'-S-Benzoyl-3'-O-Benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>14</b>
32 ml	Methanol
80 ml	5 M methanolische HCl

Ansatzgröße Reaktion c:

1.2 g	5'-S-Acetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>15</b>	(3.51 mmol)
10 ml	Methanol	
20 ml	5 M methanolische HCl	

Durchführung

5'-S-Acetyl-3'-O-Acetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **6**, 5'-S-Benzoyl-3'-O-Benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **14** oder 5'-S-Acetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **15** werden jeweils in Methanol gelöst und methanolische HCl zugegeben, die Lösung wird auf 45°C erwärmt. Nach 2 h erfolgt eine DC Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1). Sollte die Spaltung zu diesem Zeitpunkt vollständig sein, wird die Lösung auf etwa die Hälfte ihres Volumens am Rotationsverdampfer reduziert und direkt als Edukt für die Umsetzung zu 5'-S-Dimethoxytriphenylmethyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **8** verwendet. Andernfalls rührt die Lösung weiter bei 45°C bis zur Detektion der vollständigen Spaltung.

Rf-Wert     Dichlormethan:Methanol 9:1     Startfleck

ESI(-)-MS (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S = 258.4 g/mol)     Gemessen 257.0 [M-H]<sup>-</sup>  
(280.9 [M-Na]<sup>-</sup>)

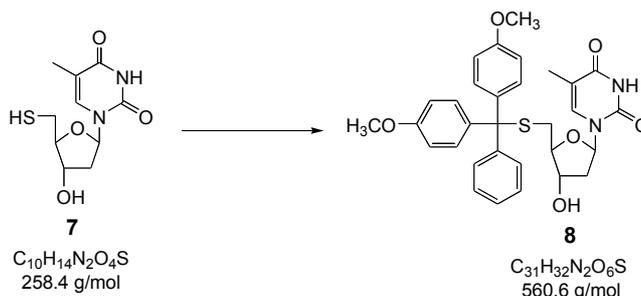
NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.32 (br. S, 1H, N-H), 7.50 (d, 1H, H-6), 6.21-6.15 (dd, 1H, H-1'), 4.24-4.18 (m, 1H, H-3'), 3.8-3.74 (m, 1H, H-4'), 2.74-2.73 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.26-2.15 (m, 1H, H-2'), 2.09-2.02 (m, 1H, H-2''), 1.78 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

5'-S-Dimethoxytriphenylmethyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **8**

Literaturstelle B. Greiner, G. Breipohl, E. Uhlmann; *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82 (12), 2151-2159

## 5. Experimenteller Teil



### Chemikalien

4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid  $C_{21}H_{19}ClO_2$ , 338.84 g/mol, > 97%

Pyridin  $C_5H_5N$ , 79.1 g/mol, d 0.983, puriss. abs., über Molsieb,  $\geq 99.8\%$

Essigsäure  $C_2H_4O_2$ , 60.05 g/mol, d 1.05, min. 99.8%

### Ansatzgröße

1.29 g	5'-Mercapto-2'-desoxythymidin-Lsg. aus Reaktion <b>7a-c</b>	(5.00 mmol)
3 g	4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid	(8.85 mmol)
5 ml	Wasser	
10 ml	Essigsäure conc.	

### Durchführung

Zu einer Lösung aus 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid in Essigsäure wird eine Lösung aus 5'-Mercapto-2'-desoxythymidin **7 a-c** in methanolischer HCl und Wasser gegeben. Der Ansatz rührt 3 h bei RT, es erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1). Laut DC ist die Umsetzung vollständig. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer auf etwa die Hälfte reduziert. Es werden 50 ml Wasser zugegeben und mit einer 2 molaren Natronlauge ein pH-Wert von 10 eingestellt. Die wässrige Lösung wird 3  $\times$  mit 150 ml Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden 1  $\times$  mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Zur Aufreinigung schließt sich eine Säulenchromatographie an. Es wurde mit einem Stufengradienten von 0% bis 2% Methanol in Dichlormethan eluiert. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute R = 1.91 g = 68.24% (100% ige Ausbeute = 2.80 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.51

ESI(-)-MS ( $C_{31}H_{32}N_2O_6S = 560.6$  g/mol) Gemessen 559.2 [M-H]<sup>-</sup>

FAB-MS Gemessen 561.2 [M-H]<sup>+</sup>

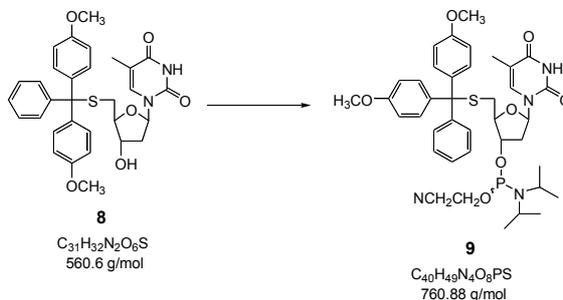
### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.81 (br. s, 1H, N-H), 7.64-7.56 (m, 1H, H-6), 7.35-7.14 (m, 9 H, aromatisch), 6.77-6.71 (m, 4H, aromatisch), 6.14-6.09 (dd, 1H, H-1'), 4.05-4.03 (m, 1H, H-3'), 3.76-3.74 (m, 1H, H-4'), 3,7 (s, 6H, 2  $\times$  OCH<sub>3</sub>), 2.6-2.53 (m, 1H, H-5'), 2.45-2.38 (m, 1H, H-5''), 2.25-2.18 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.78 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

## 5. Experimenteller Teil

### 5'-(S-DMTr)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylamino-phosphit 9

Literaturstelle M. Mag, S. Lücking, J. W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7), 1437-1441



### Chemikalien

N,N-Diisopropylethylamin  $C_8H_{19}N$ , 129.25 g/mol, purum;  $\geq 98\%$  (GC), d 0.755

Phosphorigsäure-bis-(diisopropylamid)-2-cyanethylester (P-Reagenz I)

$C_{15}H_{32}N_3OP$ , 301.4 g/mol purum;  $\geq 98\%$ , Sdp. 98 -100°C, d 0.949

Tetrazol  $CH_2N_4$ , 70.06 g/mol, 99% Smp. 157-158°C

Dichlormethan  $CH_2Cl_2$ , 84.93 g/mol, puriss.; abs.; über Molsieb, Sdp. 40°C, d 1.325,

Acetonitril  $C_2H_3N$ , 41.05, puriss.; abs.; über Molsieb, Sdp. 81°C, d 0.782

### Ansatzgröße

1.4 g	5'-S-DMTr-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>8</b>	(2.5 mmol)
0.21g	Tetrazol	(3.0 mmol)
1.14 ml	Phosphitilierungs-Reagenz I	(3.7 mmol)
15 ml	Dichlormethan:Acetonitril	

### Durchführung

Zu einer Lösung aus 5'-S-DMTr-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **8** in Dichlormethan:Acetonitril wird unter Argon-Atmosphäre bei Eiskühlung Tetrazol zugegeben und anschließend das Phosphitilierungs-Reagenz I langsam zugetropft. Nach 30 min erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5). Die Lösung wird auf RT erwärmt, und rührt eine weitere Stunde, da die Umsetzung nicht vollständig ist. Die anschließende DC-Kontrolle zeigt die vollständige Umsetzung des Eduktes. Die Lösung wird mit 200 ml Essigsäureethylester verdünnt und 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der ölige Rückstand wird in 15 ml Dichlormethan:Diethylether aufgenommen und in 300 ml kaltes n-Pentan einpipettiert. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit wenig kaltem n-Pentan nachgewaschen und am HV getrocknet.

Ausbeute R = 1.58 g = 83.6% (100% ige Ausbeute = 1.9 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9 :1 0.65

## 5. Experimenteller Teil

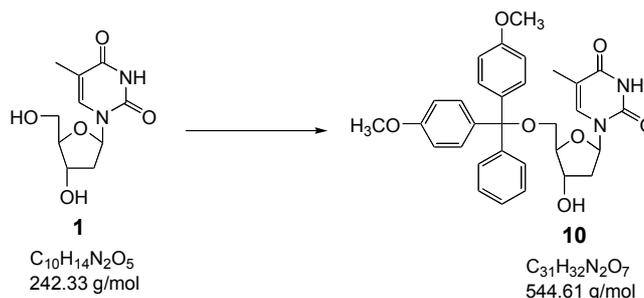
ESI(+)-MS ( $C_{40}H_{49}N_4O_7PS = 760.86$  g/mol) Gemessen 761.2 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>31</sup>P-NMR  $CDCl_3 + 0.1\%$  DIPEA  
149.55, 149.35 ppm

### 5'-O-Dimethoxytriphenylmethyl-2'-desoxythymidin 10

Literaturstelle H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827



### Chemikalien

4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid  $C_{21}H_{19}ClO_2$ , 338.84 g/mol, > 97%

Pyridin  $C_5H_5N$ , 79.1 g/mol, d 0.983, puriss. abs., über Molsieb, ≥ 99.8%

Dimethylaminopyridin  $C_7H_{10}N_2$ , 122.17 g/mol, purum > 98%

Triethylamin  $C_6H_{15}N$ , 101.19 g/mol, d 0.726, ≥ 98%

### Ansatzgröße

2,42 g mmol)	2'-Desoxythymidin <b>1</b>	(10
4,07 g	4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid	(12 mmol)
1,94 ml	Triethylamin	(14 mmol)
0,061 g	Dimethylaminopyridin	
30 ml	Pyridin abs.	

### Durchführung

Dimethylaminopyridin und 2'-Desoxythymidin **1** werden gemeinsam 1 Tag im HV getrocknet und anschließend in Pyridin gelöst und Triethylamin zugegeben. Unter Rühren erfolgt die portionsweise Zugabe von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid. Nach 12 h Rühren zeigt das DC eine vollständige Umsetzung (LM DCM:MeOH 92:8). Die Reaktion wird durch die Zugabe von 10 ml Methanol gequench und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über  $MgSO_4$  getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird an der Ölpumpe getrocknet und aus Benzol umkristallisiert.

Ausbeute R = 4.9 g = 88.6% (100% ige Ausbeute = 5.5 g)

## 5. Experimenteller Teil

<u>Rf-Wert</u>	Dichlormethan:Methanol 9:1	0.54
	Dichlormethan:Methanol 92:8	0.47

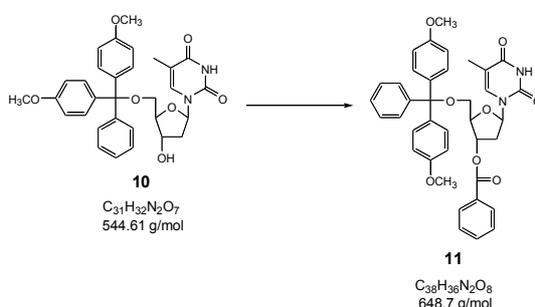
ESI(-)-MS ( $C_{31}H_{32}N_2O_7 = 544.61$  g/mol)      Gemessen 543.2 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.35 (br. s, 1H, N-H), 7.52 (s, 1H, H-6), 7.07-7.38 (m, 9H, arom. H), 6.73-6.77 (m, 4H, arom. H), 6.36 (m, 1H, H-1'), 4.50-4.48 (m, 1H, H-3'), 4.00-3.92 (m, 1H, H-4'), 3.69 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>), 3.40-3.35 (m, 1H, H-5'), 3.30-3.25 (m, 1H, H-5''), 3.06-3.04 (m, 1H, OH-3'), 2.40-2.31 (m, 1H, H-2'), 2.28-2.17 (m, 1H, H-2''), 1.37 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-O-(DMTr)-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin 11

Literaturstelle E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



### Chemikalien

Benzoylchlorid  $C_7H_5ClO$ , 140.57 g/mol, puriss. p.a.; ≥ 99.5%, d 1.212, Sdp. 73-74°C  
Pyridin  $C_5H_5N$ , 79.1 g/mol, d 0.983, puriss. abs., über Molsieb, ≥ 99.8%

### Ansatzgröße

15 g	5'-O-DMTr-2'-desoxythymidin <b>10</b>	(27.5 mmol)
4.65 g	Benzoylchlorid	(33.1 mmol)
40 ml	Pyridin	

### Durchführung

5'-O-DMTr-2'-desoxythymidin **10** wird in Pyridin gelöst und bei Eiskühlung wird langsam Benzoylchlorid zugetropft. Nach der vollständigen Zugabe des Benzoylchlorids bildet sich ein Niederschlag aus. Nach einer Stunde bei RT erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1), laut DC ist die Umsetzung noch nicht vollständig. Der Ansatz rührt über Nacht im Kühlraum (4°C). Nach einer weiteren DC-Kontrolle wird der Ansatz geteilt und in jeweils 300 ml Eiswasser einpipettiert (200 g Eis und 100 ml Wasser). Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen und am HV getrocknet.

Ausbeute R= 15.5 g = 87% (100% ige Ausbeute = 17.87 g)

## 5. Experimenteller Teil

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.65

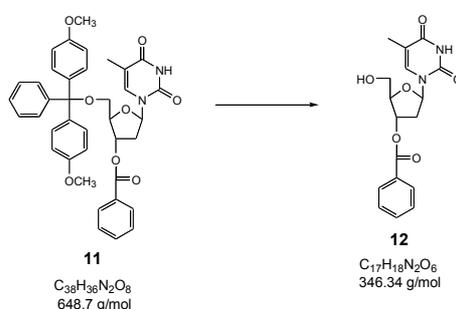
ESI(-)-MS (C<sub>38</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> = 648.7 g/mol) Gemessen 655.0 [M-Li]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.42 (b s, 1H, NH), 8.06-7.75 (m, 2H, arom. H-Benzyl), 7.74-7.68 (s, 1H, H-6), 7.61-7.54 (m, 3 H, arom. H-Benzyl) 7.36-7.07 (m, 9H, arom. H-DMT), 6.76-6.74 (m, 4H, arom. H-DMT), 6.36-6.31 (m, 1H, H-1'), 5.52-5.48 (m, 1H, H-3'), 4.01-3.94 (m, 1H, H-4'), 3.69 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>), 3.42-3.36 (m, 1H, H-5'), 3.29-3.25 (m, 1H, H-5''), 2.42-2.32 (m, 1H, H-2'), 2.29-2.18 (m, 1H, H-2''), 1.37 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **12**

Literaturstelle B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl; Nucl. Acids Res. 1987, 15 (4), 1729-1743



### Chemikalien

Essigsäure C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 60.05 g/mol, d 1.05, min. 99.8%

### Ansatzgröße

10 g	5'-O-DMTr-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin <b>11</b>	(15.41
mmol)		
200 ml	80%ige Essigsäure	

### Durchführung

5'-O-DMTr-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **11** wird in 80%iger Essigsäure suspendiert, während der Reaktion geht der Feststoff in Lösung. Nach einer Stunde rühren bei RT erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1), die Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe ist nicht vollständig. Die Lösung rührt eine weitere Stunde, anschließend wird die Essigsäure am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand zweimal mit Toluol koevaporiert. Das ölige Produkt wird in 400 ml Essigsäureethylester aufgenommen und je 1 × mit Wasser und 1 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Die wässrigen Phasen werden 2 × mit Essigsäureethylester reextrahiert und die organischen Phasen vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Zur Aufreinigung erfolgt eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 95:5. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

## 5. Experimenteller Teil

**Ausbeute** R = 3.5 g = 65.7% (100% ige Ausbeute = 5.33 g)

**Rf-Wert** Dichlormethan:Methanol 9:1 0.41

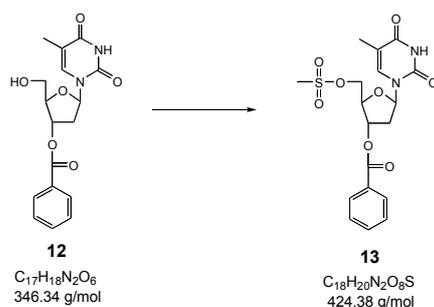
**ESI(+)-MS** (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> = 346.34 g/mol) Gemessen 369.00 [M+Na]<sup>+</sup>

### NMR ändern!

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, DMSO): δ = 11.39 (br. s, 1H, N-H), 8.03-7.8 (m, 2H, aromatisch), 7.70-7.65 (d, 1H, H-6), 7.60-7.52 (m, 3H, aromatisch), 6.37-6.30 (dd, 1H, H-1'), 5.54-5.49 (m, 1H, H-3'), 4.48-4.43 (m, 1H, H-4'), 3.40-3.28 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.51-2.45 (m, 1H, H-2'), 2.26-2.15 (m, 1H, H-2''), 1.82 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-O-Mesyl-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin 13

Literaturstelle A.) J. P. Horwitz, J.A. Urbanski, J. Chua; *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3300-3302; B.) J. P. Horwitz, J. Chua, M. Noel; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2076-2078; C.) J. J. Fox, N. C. Miller; *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 936-942



### Chemikalien

Methansulfochlorid CH<sub>3</sub>ClO<sub>2</sub>S, 114.55 g/mol, puriss ≥ 99%, d 1.474, Sdp. 53-55°C

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; abs. über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115-116°C

### Ansatzgröße

3.4 g	3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin <b>12</b>	(9.82 mmol)
1.74 g	Methansulfochlorid	(15.23 mmol)
35 ml	Pyridin	

### Durchführung

3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **12** wird in Pyridin gelöst und die Lösung auf -12°C abgekühlt. Methansulfochlorid wird innerhalb 30 min zugetropft, anschließend rührt die Reaktionslösung 1 h bei -12°C und steht über Nacht bei 4°C (Kühlraum). Laut DC (LM DCM:MeOH 9:1) ist die Umsetzung vollständig. Die Lösung wird in 300 ml Eiswasser eingebracht (200 g Eis, 100 ml Wasser) und der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen und am HV getrocknet.

## 5. Experimenteller Teil

**Ausbeute** R = 3.93 g = 94.2% (100%ige Ausbeute = 4.17 g)

**Rf-Wert** Dichlormethan:Methanol 9:1 0.53

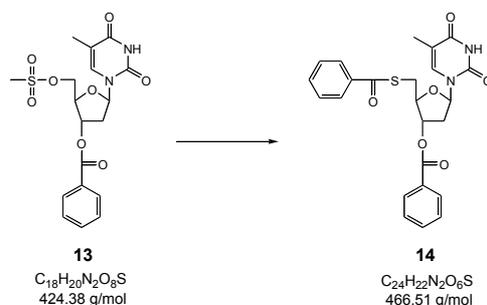
**ESI(+)-MS** ( $C_{18}H_{20}N_2O_8S = 425.38$  g/mol) Gemessen 425.7 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, DMSO):  $\delta = 11.42$  (br. s, 1H, N-H), 8.06-7.75 (m, 2H, aromatisch), 7.74-7.68 (d, 1H, H-6), 7.61-7.54 (m, 3H, aromatisch), 6.37-6.31 (dd, 1H, H-1'), 5.52-5.48 (m, 1H, H-3'), 4.56-4.54 (m, 2H, H-5' + H-5''), 4.48-4.43 (m, 1H, H-4'), 3.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Mesyl), 2.26-2.15 (m, 1H, H-2'), 2.51-2.45 (m, 1H, H-2''), 1.82 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-S-Benzoyl-3'-O-Benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin 14

Literaturstelle A.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; B.) R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835



### Chemikalien

Thiobenzoessäure  $C_7H_6OS$ , 138.18 g/mol, pract.;  $\approx 95\%$ , d 1.183

Natriumhydroxid NaOH, 40.00 g/mol, Plätzchen, reinst

Dimethylformamid  $C_3H_7N$ , 73.1 g/mol, puriss.; abs. über Molsieb, d 0.984

### Darstellung des Eduktes Natriumthiobenzoat

10 M Natronlauge-Lösung wird zu einer eisgekühlten Thiobenzoessäure-Lösung aus 10 g Thiobenzoessäure in 15 ml Wasser gegeben, bis diese einen pH-Wert von 7 besitzt. Die Lösung wird auf  $-5^\circ C$  gekühlt und der entstandene Niederschlag wird abfiltriert. Die wässrige Lösung wird einrotiert und mit Ethanol koevaporiert. Entgegen der Literatur, wird das entstandene Rohprodukt nicht umkristallisiert. Der hygroskopische Feststoff wird im Exikkator unter Phosphorpentoxid aufbewahrt.

### Ansatzgröße

2.8 g	5'-O-Mesyl-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin <b>13</b>	(6.6 mmol)
4.3 g	Natriumthiobenzoat	(26.7 mmol)
35 ml	Dimethylformamid	

## Durchführung

5'-O-Mesyl-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **13** und Natriumthiobenzoat werden in Dimethylformamid gelöst und 5 h bei 100°C im Ölbad gerührt. Es erfolgt eine DC-Kontrolle der Reaktion (LM DCM:MeOH 9:1), da die Umsetzung vollständig ist wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Es werden 300 ml Dichlormethan zugegeben und mit 300 ml 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 2 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der ölige Rückstand wird mit Toluol koevaporiert. Anschließend erfolgt eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

## Ausbeute

R = 1.23 g = 39.9 % (100 %ige Ausbeute = 3.08 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.6

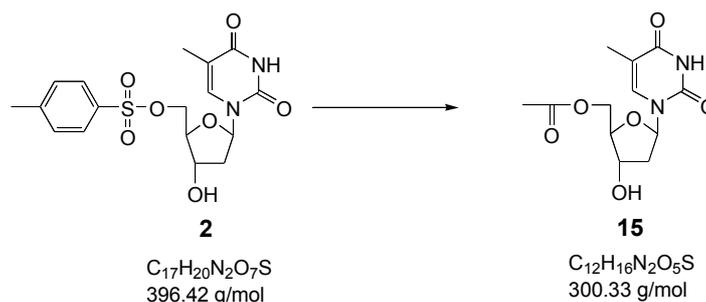
ESI(-)-MS (C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S = 466.51 g/mol) Gemessen 488.7 [M+Na]<sup>-</sup>

## NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, DMSO): δ = 11.45 (br. s, 1H, N-H), 7.76-7.73 (m, 4H, aromatisch), 7.66-7.58 (d, 7H, H-6 + aromatisch), 6.34-6.33 (dd, 1H, H-1'), 5.54-5.51 (m, 1H, H-3'), 4.37-4.36 (m, 1H, H-4'), 3.68-3.65 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.85-2.70 (m, 1H, H-2'), 2.60-2.41 (m, 1H, H-2''), 1.83 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

## 5'-S-Acetyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin 15

Literaturstelle E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



## Chemikalien

Kaliumthioacetat C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KOS, 114.21 g/mol, purum. > 98%

Aceton C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, 58.08 g/mol, Sdp. 56°C, d 0.79, > 99.5%

## Ansatzgröße

12 g	5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxythymidin <b>2</b>	(30.3 mmol)
18 g	Kaliumthioacetat	(124.8 mmol)
250 ml	Aceton	

## Durchführung

Eine Suspension von 5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxythymidin **2** und Kaliumthioacetat in Aceton wird auf 50°C erwärmt und für 6 h unter Argon-Atmosphäre und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Es erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1), diese zeigt, daß die Umsetzung vollständig verlaufen ist. Die Suspension wird gekühlt (Eiskühlung) und der Niederschlag abgesaugt und mit Aceton nachgewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt und die Lösung am Rotationsverdampfer einrotiert. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 9:1 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

## Ausbeute

R = 8.6 g = 94.5% (100% ige Ausbeute = 9.1 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.35

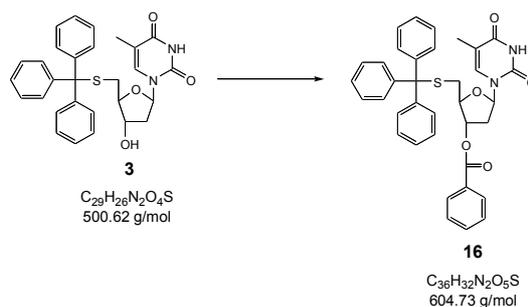
ESI(+)-MS (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S = 300.33 g/mol) Gemessen 301.2 [M-H]<sup>+</sup>

## NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, DMSO): δ = 11.33 (br. s, 1H, N-H), 7.46 (d, 1H, H-6), 6.19-6.13 (dd, 1H, H-1'), 5.43 (s, 1H, OH-3'), 4.20-4.10 (m, 1H, H-3'), 3.8-3.71 (m, 1H, H-4'), 3.22-3.3.2 (m, 1H, H-5'), 3.15-3.12 (m, 1H, H-5''), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-Ac), 2.30-2.18 (m, 1H, H-2'), 2.12-2.01 (m, 1H, H-2''), 1.81 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

## 5'-S-(Triphenyl)-3'-O-Benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **16**

Literaturstelle N. Takeda, M. Shibata, N. Tajima, K. Hirao, M. Komiyama; *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4391-4396



## Chemikalien

Benzoylchlorid C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClO, 140.57 g/mol, puriss.; ≥ 99.5%, d 1.212, Sdp. 73-74°C

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115°C

## Ansatzgröße

1.11 g	5'-S-(Triphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>3</b>	(2.2 mmol)
0.465 g	Benzoylchlorid	(3.3 mmol)
15 ml	Pyridin	

## Durchführung

Zu einer Lösung aus 5'-S-(Triphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **3** in Pyridin wird langsam Benzoylchlorid zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 200 ml Eiswasser (100 g Eis und 100 ml Wasser) eingegossen und der entstehende Niederschlag abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen. Der Rückstand wird aufgrund seiner öligen Konsistenz in 200 ml Dichlormethan aufgenommen und 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem LM DCM:MeOH 96:4 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

## Ausbeute

R = 1.83 g = 94.8% (100% ige Ausbeute = 1.93 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 95:5 0.53

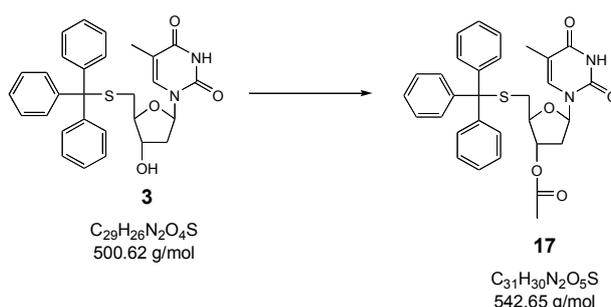
ESI(-)-MS (C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S = 604.73 g/mol) Gemessen 603.4 [M-H]<sup>-</sup>

## NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.6 (br. s, 1H, N-H), 7.92-7.89 (m, 2H, aromatisch) 7.55-7.10 (m, 18H, aromatisch + H-6), 6.26-6.20 (dd, 1H, H-1'), 5.13-5.10 (m, 1H, H-3'), 4.07-4.02 (m, 1H, H-4'), 2.73-2.71 (dd, 1H, H-5''), 2.68-2.66 (dd, 1H, H-5'''), 2.48-2.35 (m, 1H, H-2'), 2.28-2.12 (m, 1H, H-2''), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

## 5'-S-(Triphenyl)-5'-mercapto-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin **17**

Literaturstelle E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



## Chemikalien

Acetanhydrid C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, puriss. p.a. > 99.5%, 102.09 g/mol, d 1.08

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115°C

## Ansatzgröße

1.48 g	5'-S-(Triphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>3</b>	(2.96 mmol)
1.17 ml	Acetanhydrid	(12.5 mmol)
20 ml	Pyridin	

## Durchführung

Zu einer Lösung aus 5'-S-(Triphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **3** in Pyridin wird langsam Acetanhydrid zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Es erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5), laut DC ist die Umsetzung vollständig. Der Ansatz wird durch die Zugabe von 10 ml Methanol gequenchet. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer einrotiert und die Reste von Acetanhydrid durch koevaprieren mit Toluol entfernt. Der Rückstand wird am Hochvakuum über Nacht getrocknet.

## Ausbeute

R = 1.54 g = 96.2% (100% ige Ausbeute = 1.60 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 95:5 0.51

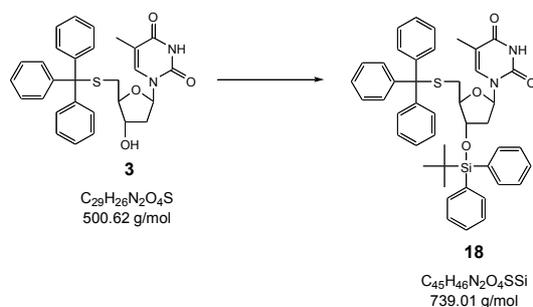
ESI(-)-MS (C<sub>31</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S = 542.65 g/mol) Gemessen 541.4 [M-H]<sup>-</sup>

## NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.71 (br. s, 1H, N-H), 7.35-7.09 (m, 16H, aromatisch, H-6), 6.17-6.12 (m, 1H, H-1'), 4.90-4.85 (m, 1H, H-3'), 3.93-3.88 (m, 1H, H-4'), 2.66-2.61 (dd, 1H, H-5'), 2.48-2.44 (dd, 1H, H-5''), 2.29-2.21 (m, 1H, H-2') 2.12-2.02 (m, 1H, H-2''), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-Ac), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

## 5'-S-Triphenyl-3'-O-TBDPS-5'-mercapto 2'-desoxythymidin 18

Literaturstelle T. Szabó, J. Stawinski; *Tetrahedron* **1995**, 51 (14), 4145-4160



## Chemikalien

tert.-Butyl-diphenylchlorsilan C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClSi, 274.87 g/mol, Sdp. 90°C, d 1.074

Imidazol C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>, 68.08 g/mol, Smp. 88-91°C, ≥ 99.5%

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115°C

## Ansatzgröße

1.0 g	5'-S-Triphenyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>3</b>	(2.0 mmol)
0.306 g	Imidazol	(4.4 mmol)
0.8 ml	tert.-Butyl-diphenylchlorsilan	(3.0 mmol)
10 ml	Pyridin	

## Durchführung

5'-S-Triphenyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **3** und Imidazol werden über Nacht gemeinsam im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die beiden Edukte werden in Pyridin gelöst und unter Rührung wird bei Raumtemperatur langsam tert.-Butyldiphenylsilylchlorid zugetropft. Die Lösung rührt über Nacht, laut DC Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5) ist die Umsetzung vollständig. Der Ansatz wird durch die Zugabe von Methanol (2 ml) gequenchet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Essigsäureethylester aufgenommen und 2 x mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend 2 x mit Essigsäureethylester reextrahiert und die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel Dichlormethan:Methanol 98:2 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

## Ausbeute

R = 1.35 g = 91.1% (100% ige Ausbeute = 1.48 g)

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 95:5 0.63

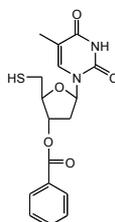
ESI(-)-MS (C<sub>45</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>SSi = 739.01 g/mol) Gemessen 761.6 [M+Na]<sup>-</sup>

## NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.25 (br. s, 1H, N-H), 7.52-7.11 (m, 26 H, aromatisch + H-6), 6.27-6.21 (m, 1H; H-1'), 4.05-4.02 (m, 1H, H-3'), 3.95-3.94 (m, 1H, H-4'), 2.27-2.12 (m, 2H, H-5'' + H-5'), 2.11-1.94 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T), 1.0 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-Silyl-PG)

## 5'-Thiol-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin 19

Literaturstelle A.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K. J. Divakar, A. Mottoh, C. B. Reese, Y. S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974



**19**

C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S  
361.39 g/mol

## Chemikalien

Silbernitrat AgNO<sub>3</sub>, 169.87 g/mol, krist. rein

Methanol CH<sub>4</sub>O, 32.04 g/mol, d 0.79, n 1.3280, Sdp. 64-65 °C

Essigsäure C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 60.05 g/mol, d 1.05, min. 99.8%

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115°C

Ansatzgröße Ansatz a.

1.5 g mmol)	5'-S-(Triphenyl)-3'-O-Bzl-5'-mercapto 2'-desoxythymidin <b>16</b>	(2.5
0.6 g	Silbernitrat	(3.5 mmol)
0.3 ml	Pyridin	
80 ml	Methanol	
0.5 ml	Essigsäure	
40 ml	Methanol	

Ansatzgröße Ansatz b.

1.5 g	5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-thio]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>30</b>	(2.3 mmol)
0.6 g	Silbernitrat	(3.5 mmol)
0.3 ml	Pyridin	
80 ml	Methanol	
0.5 ml	Essigsäure	
40 ml	Methanol	

Durchführung

5'-S-(Triphenyl)-3'-O-Bzl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **16** oder 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-thio]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **30** werden in Methanol gelöst<sup>1</sup> und mit Pyridin und Silbernitrat versetzt, die Suspension wird über Nacht gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und anschließend in ca. 40 ml Methanol suspendiert und mit Essigsäure versetzt. In die Suspension wird für 30 min Schwefelwasserstoff-Gas eingeleitet. Die Lösung wird anschließend für 15 min mit Argon gespült, der Niederschlag (Silbersulfid) abgesaugt und die Lösung nicht ganz bis zur Trockene einrotiert. Die verbleibende Lösung wird mit Dichlormethan verdünnt und es schließt sich zur Aufreinigung eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 98:2 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute Ansatz a:

R = 0.69 g = 76% (100% ige Ausbeute = 0.903 g)

Ausbeute Ansatz b:

R = 0.32 g = 51 % (100% ige Ausbeute = 0.83 g)

Rf-Wert

Laufmittel	Dichlormethan:Methanol 95:5	0.53
	Dichlormethan:Methanol 9:1	0.67

<sup>1</sup> Entscheidend für die Qualität der Reaktion ist, daß der Feststoff vollständig gelöst ist. Sollte dies nicht der Fall sein, muß die Lösung filtriert werden.

## 5. Experimenteller Teil

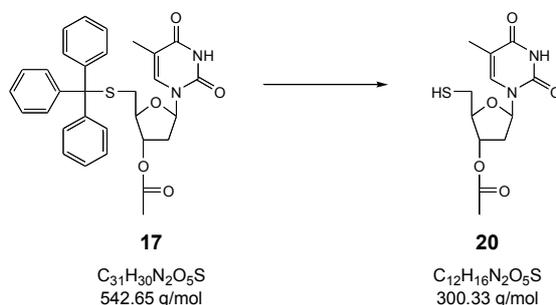
ESI(-)-MS ( $C_{17}H_{17}N_2O_5S = 361.39$  g/mol) Gemessen 360.9 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=11.38 (br. s, 1H, N-H), 8.04-8.02 (m, 2H, ortho-H Benzoyl), 7.7-7.53 (m, 3 H, meta- + para-H Benzoyl), 6.3-6.24 (dd, 1H, H-1'), 5.46 (m, 1H, H-3'), 4.21 (m, 1H, H-4'), 2.95-2.90 (m, 1 H, H-5'), 2.66-2.60 (m, 1H, H-5''), 2.51 (m, 2 H, H-2' + H-2''), 1.83 (d 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-Thiol-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin 20

Literaturstelle A.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K. J. Divakar, A. Mottoh, C. B. Reese, Y.S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974



Chemikalien (siehe Reaktion zu **19**)

### Ansatzgröße

0.255 g mmol)	5'-S-(Triphenyl)-3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin <b>17</b>	(0.47
0.16 g	Silbernitrat	(0.94 mmol)
0.087 g	Pyridin	(1.1 mmol)
15 ml	Methanol	
0.1 ml	Essigsäure	
8 ml	Methanol	

Durchführung (siehe Reaktion zu 19)

### Ausbeute

R = 0.019 g = 13% (100% ige Ausbeute = 0.141 g)

### Rf-Wert

Laufmittel	Dichlormethan:Methanol 95:5	0.53
	Dichlormethan:Methanol 9:1	0.67

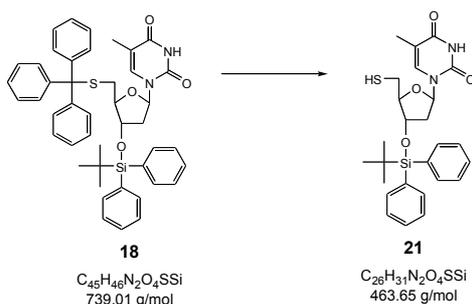
ESI(-)-MS ( $C_{17}H_{17}N_2O_5S = 361.39$  g/mol) Gemessen 360.9 [M-H]<sup>-</sup>

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.71 (br. s, 1H, N-H), 7.46-7.45 (m, 1 H, H-6), 6.17-6.12 (m, 1H, H-1'), 4.90-4.85 (m, 1H, H-3'), 3.93-3.88 (m, 1H, H-4'), 2.66-2.61 (dd, 1H, H-5'), 2.48-2.44 (dd, 1H, H-5''), 2.29-2.21 (m, 1H, H-2') 2.12-2.0 (m, 1H, H-2''), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-Ac), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

5'-Thiol-3'-O-TBDPS-2'-desoxythymidin 21

Literaturstelle A.) R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K. J. Divakar, A. Mottoh, C. B. Reese, Y. S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974

Chemikalien (siehe Reaktion zu **19**)Ansatzgröße

3 g	5'-Triphenyl-3'-OTBDPS-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>18</b>	(3.83 mmol)
0.7 g	Silbernitrat	(4.01 mmol)
26 ml	Methanol	
0.316 ml	Pyridin	
80 ml	Methanol	
4 ml	Essigsäure	

Durchführung (siehe Reaktion zu **19**)Ausbeute

R = 0.944 g = 53.0% (100% ige Ausbeute = 1.78 g)

Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 95:5 0.69

ESI(-)-MS ( $C_{26}H_{31}N_2O_4SSi = 463.65$  g/mol) Gemessen: 426.15 [M-H]<sup>-</sup>

NMR

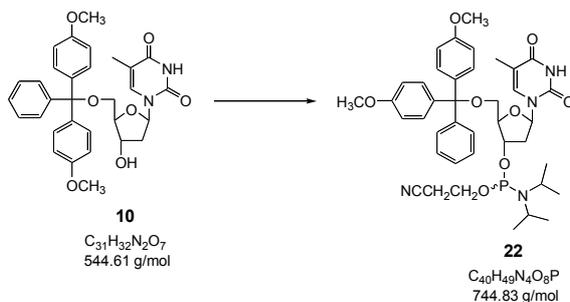
<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.01 (br. s, 1H, N-H), 7.61-7.55 (m, 4H, aromatisch), 7.42-7.31 (m, 7H, aromatisch + H-6), 6.27-6.21 (m, 1H, H-1'), 4.05-4.02 (m, 1H, H-3'), 3.96-3.94 (m, 1H, H-4'), 2.57-2.45 (m, 1H, H-5') 2.40-2.30 (m, 1 H, H-5''), 2.25-

## 5. Experimenteller Teil

2.15 (m, 1H, H-2') 2.0-1.88 (m, 1H, H-2''), 1.8 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T), 1.0 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-Silyl-PG)

### 5'-O-(DMTr)-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropylamino-phosphit 22

Literaturstelle A.) M. Mag, S. Lücking, J.W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7). 14 37-1441; B.) B.A. Connolly, P. Rider; *Nucl. Acids Res.* **1985**, 13 (12), 4485-4502; C.) B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849



### Chemikalien

N,N-Diisopropylamin C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N, 129.25 g/mol, purum; ≥ 98%, Sdp. 126°C, d 0.755  
Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid (P-Reagenz II)

C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>OP, 236.7 g/mol, ≥ 98%, Sdp. 98-100°C, d 1.061

Dichlormethan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 84.93 g/mol, puriss.; über Molsieb, Sdp. 40°C, d 1.325

Acetonitril C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, 41.05, puriss.; über Molsieb, Sdp. 81°C, d 0.782

### Ansatzgröße

0.75 g	5'-O-DMTr -2'-desoxythymidin <b>10</b>	(1.5 mmol)
1.04 ml	DIPEA	(6.0 mmol)
0.4 ml	P-Reagenz II	(1.8 mmol)
10 ml	Dichlormethan:Acetonitril	

### Durchführung

Zu einer Lösung aus 5'-O-DMTr-2'-desoxythymidin **10** in 10 ml Dichlormethan:Acetonitril wird unter Argon-Atmosphäre das Phosphitierungs-Reagenz II langsam zugetropft. Nach 1 h erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5), diese zeigt die vollständige Umsetzung des Eduktes an. Die Lösung wird mit 0.5 ml n-Butanol gequench und die Reaktionslösung wird einrotiert. Der Rückstand wird in 150 ml Essigsäureethylester aufgenommen und 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der ölige Rückstand wird in 10 ml Dichlormethan:Diethylether aufgenommen und in 200 ml kaltes n-Pentan einpipettiert. Der voluminöse Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem n-Pentan nachgewaschen und am HV getrocknet.

### Ausbeute

R = 0.81 g = 79% Ausbeute (100% ige Ausbeute = 1.03 g)

## 5. Experimenteller Teil

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 95:5 0.42 + 0.51

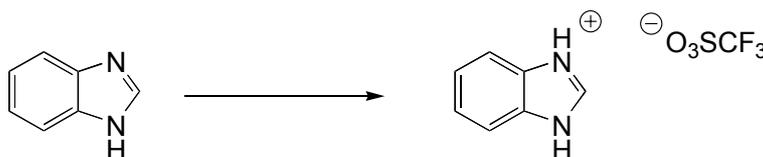
ESI(-)-MS ( $C_{40}H_{49}N_4O_8P = 744.83$  g/mol) Gemessen 743.5 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>31</sup>P-NMR  $CDCl_3 + 0.1\%$  DIPEA  
148.45 ppm; 148.25 ppm

### Benzimidazol-Triflat 23

Literaturstelle Y. Hayakawa, M. Kataoka, R. Noyori; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7996 - 7997



### Chemikalien

Trifluormethansulfonsäure  $CHO_3F_3S$ , 150.1 g/mol, d 1.72, Sdp. 167-170°C

Benzimidazol  $C_7H_6N_2$ , 118.1 g/mol, purum,  $\geq 98\%$

Dichlormethan  $CH_2Cl_2$ , 84.93, puriss.; über Molsieb, Sdp. 40°C, d 1.325

### Ansatzgröße

10 ml	Trifluormethansäure	(110 mmol)
13.0 g	Benzimidazol	(110 mmol)
300 ml	Dichlormethan	

### Durchführung

In einem ausgeheizten Rundkolben wird unter Argon aus einer frisch geöffneten Ampulle Trifluormethansulfonsäure in 150 ml Dichlormethan vorgelegt. Unter Rühren wird eine Suspension aus Benzimidazol in 150 ml Dichlormethan zugegeben (leichte Wärmeentwicklung). Nach erfolgter Zugabe wird der Reaktionsansatz drei Stunden gerührt. Das Produkt fällt dabei als feinkristalliner Niederschlag aus. Die Suspension wird abgekühlt und anschließend der Niederschlag abgesaugt und mit wenig kaltem Dichlormethan nachgewaschen. Der Niederschlag wird aus Essigsäureethylester :Acetonitril 4:1 umkristallisiert. Das Produkt wird nach dem Absaugen und Nachwaschen im Ölpumpenvakuum getrocknet.

### Ausbeute

R = 25.6 g = 86.4 % Ausbeute (100% ige Ausbeute = 29.5 g)

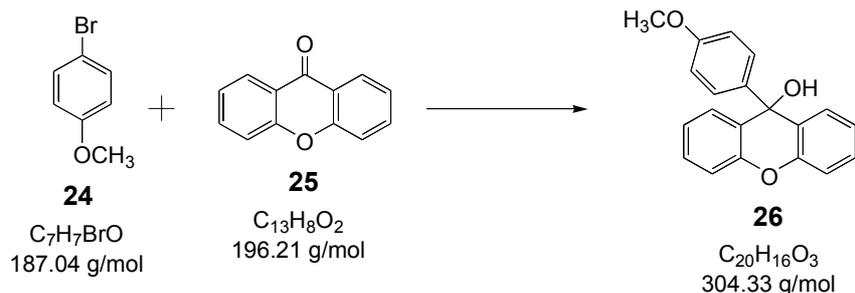
ESI(±)-MS ( $C_8H_7F_3N_2O_3S = 268.21$  g/mol) Gemessen 148.8 [M-H]<sup>-</sup>  
118.6 [M-H]<sup>+</sup>

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ= 13.80 (b, 2 H, 2 x N-H), 9.58 (s, 1 H, N=CH-N), 7.95- 7.85 (m, 2 H, arom), 7.67-7.59 (m, 2 H, arom.)

Darstellung von 9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-ol **26**

Literaturstelle A.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C.B. Reese; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (51), 7485-7488; B.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese; *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 257-269; C.) P. R. J. Gaffaney, L. Changsheng, M V. Rao, C.B. Reese, J.G. Ward; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 6, 1355-1360

Chemikalien

Xanthon C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, 196.21 g/mol, Smp. 172-174°C, ≥ 97%

Magnesium Mg, 24.31 g/mol, ≥ 99.5%

4-Bromanisol C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>BrO, 187.04 g/mol, Sdp. 98-99°C, d 1.495, ≥ 97%

Diethylether C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O, 74.12 g/mol, Sdp. 35-37°C, d 0.713, ≥ 99.5%

Ansatzgröße

14.7 g	Magnesium-Späne	(0.6 mol)
75 ml	4-Bromanisol	(0.6 mol)
53.5 g	Xanthon	(0.27 mol)
300 ml	Diethylether	

Durchführung

Magnesium-Späne werden in 100 ml Diethylether suspendiert und eine Lösung aus Bromanisol in 100 ml Diethylether langsam zugetropft. Sobald die Grignard-Reaktion einsetzt, wird die Reaktionslösung auf 15°C abgekühlt. Die verbleibende etherische Bromanisol-Lösung wird nun innerhalb von 20 min so zugetropft, so daß die Reaktionslösung leicht siedet. Nach erfolgter Zugabe wird für eine weitere Stunde unter Rückfluß gesiedet und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. In kleinen Portionen wird nun Xanthon innerhalb von 10 min zugegeben, das Reaktionsgemisch wird mit 100 ml Diethylether verdünnt und anschließend zum Sieden erhitzt. Die Lösung siedet für weitere 2 h. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz entgegen der Vorschrift B.) mit Diethylether verdünnt, um den entstandenen Niederschlag absaugen zu können. Der abgesaugte Niederschlag wird mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Der fein verriebene Feststoff wird in 300 ml konz. HCl (Eisbadkühlung) eingebracht. Die resultierende schwarz-rote Lösung wird vorsichtig in 2 L Eiswasser eingetropt. Die wäßrige Lösung wird 3 x mit 650 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und 3 x mit 1.5 L gesättigter

## 5. Experimenteller Teil

Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 2 x mit 1 L Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Es erfolgt eine Umkristallisation aus Cyclohexan.

### Ausbeute

R = 56.43 g = 68% (100% ige Ausbeute = 83 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Hexan:EE 3:1 0.49

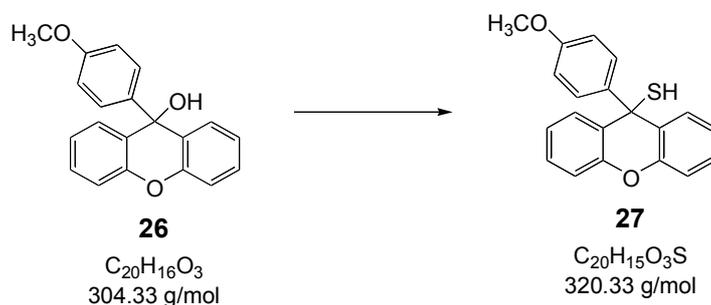
ESI(+)MS ( $C_{20}H_{16}O_3 = 304.33$  g/mol) Gemessen 286.9 [M-H-(OH)]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 55.15, 70.15, 113.23, 116.33, 123.47, 127.36, 128.87, 128.91, 140.40, 149.66, 158.21

### Darstellung von 9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-thiol (AXT) 27

Literaturstelle A.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C.B. Reese; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (51), 7485-7488; B.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese; *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 257-269; C.) P. R. J. Gaffaney, L. Changsheng, M. V. Rao, C.B. Reese, J.G. Ward; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 6, 1355-1360



### Chemikalien

Dichloressigsäure  $C_2H_2Cl_2O_2$ , 128.94 g/mol, 99%, Sdp. 193-195°C, d 1.567

Dichlormethan  $CH_2Cl_2$ , 84.93 g/mol, puriss.; über Molsieb  $\geq 99.5\%$ ; Sdp. 40°C

### Ansatzgröße

20.8 g	Dichloressigsäure	(0.25 mol)
38.6 g	9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-ol <b>26</b>	(0.127 mol)
1.1 l	Dichlormethan	

### Durchführung

In eine Lösung aus Dichloressigsäure in 0.5 L Dichlormethan wird bei Eiskühlung für 15 min H<sub>2</sub>S eingeleitet. Eine Lösung aus 9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-ol **26** in 0.6 L Dichlormethan wird unter weiterer H<sub>2</sub>S-Einleitung innerhalb 1 h zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wird für weitere 15 min H<sub>2</sub>S eingeleitet. Durch die anschließende

## 5. Experimenteller Teil

Einleitung von Argon, wird überschüssiges H<sub>2</sub>S verdrängt. Die Reaktionslösung wird anschließend 3 x mit 0.7 L gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (Vorsicht! Druck!) und 2 x mit 0.6 L Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Es erfolgt eine Umkristallisation aus Cyclohexan.

### Ausbeute

R = 17.02 g = 80.3% (100% ige Ausbeute = 21.2 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Hexan:EE 3:1 0.72

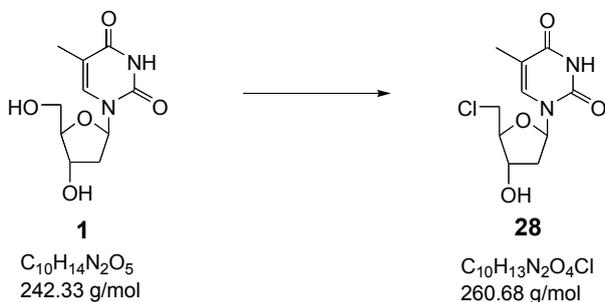
ESI(+)-MS (C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S = 320.33 g/mol) Gemessen 321.0 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 51.35, 55.25, 113.20, 116.40, 123.42, 128.32, 129.10, 129.43, 130.24, 138.23, 149.62, 159.49

### Darstellung von 5'-Chlor-2'-desoxythymidin **28**

Literaturstelle J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt; J. Org. Chem. 1972, 37 (14), 2289-2299



### Chemikalien

2'-Desoxythymidin C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 242.33 g/mol

Triphenylphosphin C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>P, 262.29 g/mol, > 97%, Smp. 79-81°C

Tetrachlorkohlenstoff CCl<sub>4</sub>, 153.8 g/mol, d 1.58, Sdp. 77°C

Dimethylformamid C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N, 73.1 g/mol, d 0.984, puriss., abs. über Molsieb

### Ansatzgröße

9.6 g mmol)	2'-Desoxythymidin <b>1</b>	(40
14 g	Triphenylphosphin	(54 mmol)
20 ml	Tetrachlorkohlenstoff	(200 mmol)
200 ml	DMF	

### Durchführung

## 5. Experimenteller Teil

2'-Desoxythymidin **1** und Triphenylphosphin werden über Nacht gemeinsam im Pumpenvakuum getrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre werden Tetrachlorkohlenstoff und DMF zugegeben. Es ist eine leichte Erwärmung zu beobachten. Die Reaktionslösung rührt 24 h bei RT. Durch die Zugabe von Methanol wird die Reaktion gequenchet. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der ölige Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert. In der Mutterlauge befindet sich noch Produkt, welches jedoch nicht sauber isoliert werden kann.

### Ausbeute

R = 7.56 g = 72.6% (100% ige Ausbeute = 9.6 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.38

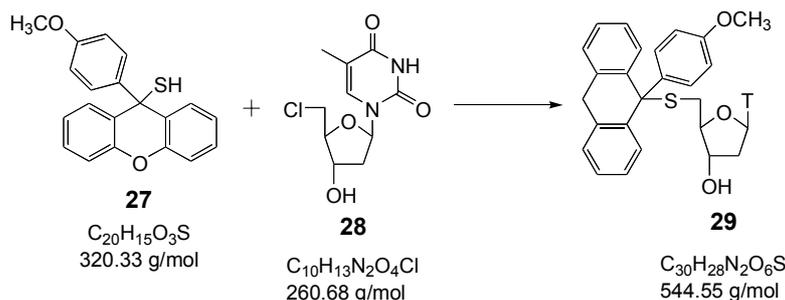
ESI(+)-MS ( $C_{17}H_{20}N_2O_7S = 260.68$  g/mol) Gemessen 261.9 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 11.38 (br. s, 1H, N-H), 7.55 (d, 1H, H-6), 6.22 (t, 1H, H-1'), 4.25 (m, 1H, 3-OH), 4.24 (m, 3H, H-4' + H-5' + H-5''), 3.34 (d, 1H, 3'-H), 2.32-2.21 (m, 1H, H-2'), 2.14-2.06 (m, 1H, H-2''), 1.8 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29**

Literaturstelle A.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C.B. Reese; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (51), 7485-7488; B.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese; *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 257-269; C.) P. R. J. Gaffaney, L. Changsheng, M V. Rao, C.B. Reese, J.G. Ward; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 6, 1355-1360



### Chemikalien

1,1,3,3-Tetramethylguanidin  $C_5H_{13}N_3$ , 115.18 g/mol, Sdp. 158°C, d 0.916, ≥ 99%  
Dimethylsulfoxid  $C_2H_6OS$ , 78.13 g/mol, d 1.1, 99.7%

### Ansatzgröße

4.4 g	5'-Chlor-2'-desoxythymidin <b>28</b>	(17.0 mmol)
8.17 g	9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-thiol <b>27</b>	(25.5 mmol)
2.42 ml	1,1,3,3-Tetramethylguanidin	(18.9 mmol)

## 5. Experimenteller Teil

150 ml Dimethylsulfoxid

### Durchführung

5'-Chlor-2'-desoxythymidin **28** und 9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-thiol **27** werden gemeinsam im Pumpenvakuum über Nacht getrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre wird DMSO zugegeben und 1,1,3,3-Tetramethylguanidin langsam in die Lösung eingetropf. Nach drei Stunden kann per DC (Laufmittel DCM:MeOH 95:5) kein Edukt mehr detektiert werden. Die Reaktionslösung wird in 1 L gekühltes Dichlormethan eingegossen und die organische Lösung mit 0.8 L gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert (Achtung! Druck!). Die wässrige Phase wird mit 0.2 L Dichlormethan reextrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und 4 x mit 0.4 L Wasser extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Zur Reinigung der Verbindung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 97:3 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Ausbeute

R = 7.1 g = 95% (100% ige Ausbeute = 7.5 g)

### Rf-Wert

Laufmittel	Dichlormethan:Methanol 95:5	0.183
	Dichlormethan:Methanol 9:1	0.46

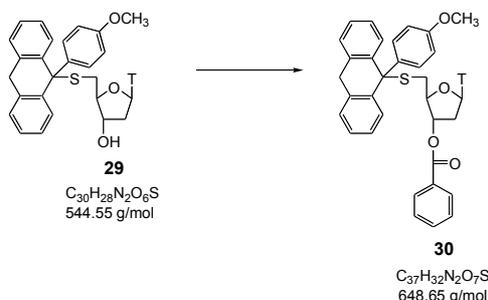
ESI(-)-MS (C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S = 544.55 g/mol) Gemessen 543.3 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.82 (br. s, 1H, N-H), 7.38-7.35 (m, 2H, aromatisch), 7.2-7.02 (m, 7H, aromatisch), 6.9-6.93 (m, 2H, aromatisch), 6.81-6.78 (m, 2H, aromatisch), 6.06-6.01 (dd, 1H, H-1'), 3.86-3.82 (m, 1H, H-3'), 3.73 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.6-3.52 (m, 1H, H-4'), 2.21-2.11 (m, 2 H, H-5' + H-5''), 1.9-1.79 (m, 2 H, H-2' + H-2''), 1.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-yl]-3'-O-Benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **30**

Literaturstelle E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



### Chemikalien

Benzoylchlorid C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClO, 140.57 g/mol, puriss.; ≥ 99.5%, d 1.212, Sdp. 73-74°C

## 5. Experimenteller Teil

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 116°C

### Ansatzgröße

1.47 g	5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>29</b>	(2.7 mmol)
0.568 g	Benzoylchlorid	(4.0 mmol)
20 ml	Pyridin	

### Durchführung

5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29** wird in Pyridin unter Schutzgasatmosphäre gelöst und bei Eiskühlung wird langsam Benzoylchlorid zugetropft. Nach 3 h kann per DC (LM DCM:MeOH 9:1) kein Edukt mehr detektiert werden. Der Ansatz wird in 400 ml Eiswasser (200 g Eis und 200 ml Wasser) eingegossen und der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen. Da der Niederschlag auf der Fritte ausölt, wird der ölige Feststoff in Dichlormethan gelöst und die organische Phase mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert.

### Ausbeute

R = 1.66 g = 93% (100% ige Ausbeute = 1.78 g)

### Rf-Wert

Laufmittel	Dichlormethan:Methanol 95:5	0.52
	Dichlormethan :Methanol 9:1	0.77

ESI(-)MS (C<sub>37</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S = 648.65 g/mol) Gemessen 671.3 [M-Na]<sup>-</sup>

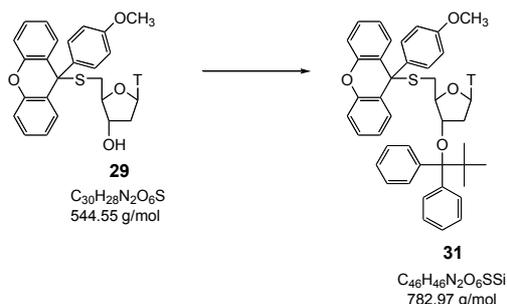
### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.87 (br. s, 1H, N-H), 8.58-8.55 (m, 1H, H-6), 7.90-7.87 (m, 2H, ortho-H Benzoyl), 7.52-7.35 (m, 15 H, aromatisch), 6.18-6.12 (dd, 1H, H-1'), 5.21-4.95 (m, 1H, H-3'), 3.95-3.94 (m, 1H, H-4'), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.59-2.54 (m, 2 H, H-5' + H-5''), 2.39-2.3 (m, 1 H, H-2'), 2.11-2.05 (m, 1H, H-2''), 1.88 (d 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-3'-O-TBDPS-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **31**

Literaturstelle T. Szabó, J. Stawinski; *Tetrahedron* **1995**, 51 (14), 4145-4160

## 5. Experimenteller Teil



### Chemikalien

tert.-Butyl-diphenylchlorosilan C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClSi, 274.87, Sdp. 90°C, d 1.074, ≥ 97%

Imidazol C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>, 68.08 g/mol, Smp. 88-91°C, ≥ 99.5%

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; abs. über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115-116°C

### Ansatzgröße

0.55 g	5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>29</b>	(1 mmol)
0.153 g	Imidazol	(2.2 mmol)
0.4 ml	tert.-Butyldiphenylsilylchlorid	(1.5 mmol)
5 ml	Pyridin	

### Durchführung

5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29** und Imidazol werden über Nacht gemeinsam im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die beiden Edukte werden in Pyridin gelöst und unter Rührung wird bei Raumtemperatur langsam tert.-Butyldiphenylsilylchlorid zugetropft. Die Lösung rührt über Nacht, laut DC Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5) ist die Umsetzung vollständig. Der Ansatz wird durch die Zugabe von Methanol (2 ml) gequenchet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Essigsäureethylester aufgenommen und 2 x mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend 2 x mit Essigsäureethylester reextrahiert und die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel Dichlormethan:Methanol 98:2 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Ausbeute

R = 0.728 g = 92% (100% ige Ausbeute = 0.791 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 95:5 0.61

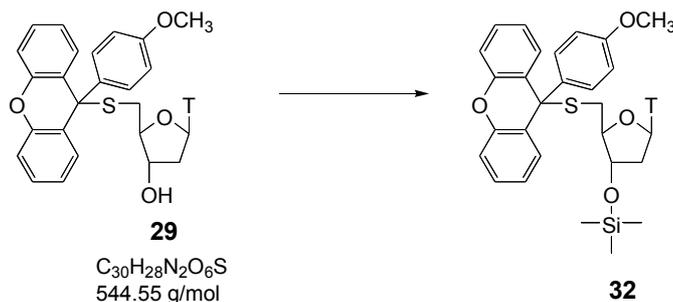
ESI(-)-MS (C<sub>46</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>SSi = 789.97 g/mol) Gemessen 805.4 [M-Na]<sup>-</sup>

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.35 (br. s, 1H, N-H), 7.50-6.83 (m, 23H, aromatisch + H-6), 6.22-6.16 (dd, 1H, H-1'), 3.97-3.75 (m, 1H, H-4' + H-3'), 3.70 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.21-1.98 (m, 3 H, H-5' + H-5'' + H-2'), 1.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T), 1.61-1.40 (m, 1 H, H-2'')

5'-S-[9-Methoxyphenyl]-xanthen-9-yl]-3'-O-TMS-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **32**

Literaturstelle T. Szabó, J. Stawinski; *Tetrahedron* **1995**, 51 (14), 4145-4160

Chemikalien

Trimethylsilylchlorid C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>ClSi, 108.6, d 0.89, Sdp. 57-59°C, n 1.389

Imidazol C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>, 68.08 g/mol, Smp. 88-91°C, ≥ 99.5%

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115°C

Ansatzgröße

0.55 g	5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>29</b>	(1.0 mmol)
0.153 g	Imidazol	(2.2 mmol)
0.19 ml	Trimethylsilylchlorid	(1.5 mmol)
5 ml	Pyridin	

Durchführung

5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29** und Imidazol werden über Nacht gemeinsam im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die beiden Edukte werden in Pyridin gelöst und unter Rührung wird bei Raumtemperatur langsam Trimethylsilylchlorid zugetropft. Die Lösung rührt über Nacht, laut DC Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5) ist die Umsetzung vollständig. Der Ansatz wird durch die Zugabe von Methanol (2 ml) gequenchet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Essigsäureethylester aufgenommen und 2 x mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend 2 x mit Essigsäureethylester reextrahiert und die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel Dichlormethan:Methanol 98:2 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute

R = 0.55 g = 37.2 % (100% ige Ausbeute = 1.48 g)

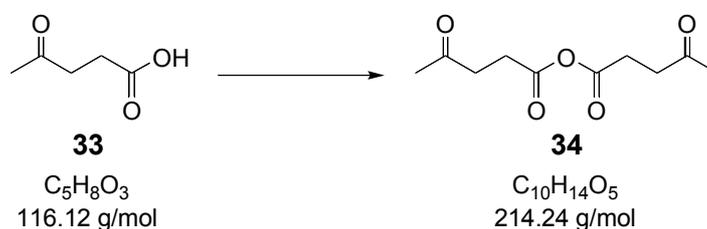
ESI(-)-MS ( $C_{45}H_{46}N_2O_4SSi = 616.8$  g/mol) Gemessen 638.9 [M-Na]<sup>-</sup>

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.35 (br. s, 1H, N-H), 7.50-6.83 (m, 14H, aromatisch + H-6), 6.20-6.16 (dd, 1H, H-1'), 3.98-3.73 (m, 2H, H-4' + H-3'), 3.70 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.22-1.97 (m, 3 H, H-5' + H-5'' + H-2'), 1.83 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T), 1.59-1.40 (m, 1H, H-2''), 1.0 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-TMS)

Laevulinsäureanhydrid 34

Literaturstelle B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849

Chemikalien

Laevulinsäure  $C_5H_8O_3$ , 116.12 g/mol, purum., > 97%

Dicyclohexylcarbodiimid  $C_{13}H_{22}N_2$ , 206.33 g/mol, puriss., > 99%, Smp. 35-36°C,  
Sdp. 122-124°C (*Achtung starkes Allergen!*)

Diethylether  $C_4H_{10}O$ , 74.12 g/mol, Sdp. 35-37°C, d 0.713, ≥ 99.5%

Ansatzgröße

23.2 g	Laevulinsäure	(200 mmol)
20.6 g	Dicyclohexylcarbodiimid	(100 mmol)
65 ml	Diethylether	

Durchführung

In einem ausgeheizten und mit Argon belüfteten Kolben wird Laevulinsäure in Ether vorgelegt und mit DCC versetzt (Achtung! Heftige Reaktion! Stark schäumend, Größe des Kolbens berücksichtigen!). Nach etwa 10 min ist eine Niederschlagsbildung zu erkennen. Der Ansatz rührt weitere sechs Stunden, der Niederschlag wird abgesaugt und mit wenig Ether nachgewaschen. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer einrotiert. Die zuerst ölige Phase kristallisiert im Kühlschrank aus.

Ausbeute

R = 32.1 g = 75 % (100% ige Ausbeute = 42.8 g)

## 5. Experimenteller Teil

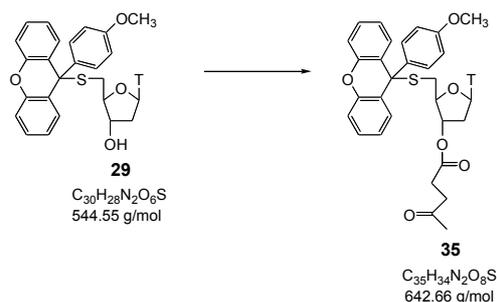
ESI(-)-MS ( $C_{10}H_{14}O_5 = 214.24$  g/mol)      Gemessen 213.3 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 2.75$  (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.62 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.10 (s, 6H, CH<sub>3</sub>)

### 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-yl]-3'-O-Lev-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **35**

Literaturstelle B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849



### Chemikalien

Dimethylaminopyridin  $C_7H_{10}N_2$ , 122.17 g/mol, puriss.,  $\geq 99\%$

Laevulinsäureanhydrid **34**

Pyridin  $C_5H_5N$ , 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 116°C

### Ansatzgröße

0.272 g	5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>29</b>	(0.5 mmol)
0.214 g	Laevulinsäureanhydrid <b>34</b>	(1.0 mmol)
3.1 mg	Dimethylaminopyridin	
3 ml	Pyridin	

### Durchführung

Laevulinsäureanhydrid **34** wird in Pyridin gelöst, unter Argon Atmosphäre erfolgt die Zugabe von 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29** und DMAP. Die Reaktionslösung steht über Nacht (starke Verfärbung nach lila). Eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5) zeigt die vollständige Umsetzung. Die Reaktionslösung wird langsam in 100 ml Eiswasser (50 g Eis und 50 ml Wasser) einpipettiert. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen und in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Es schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 98:2 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Ausbeute

R = 0.25 g = 77% (100% ige Ausbeute = 0.325 g)

## 5. Experimenteller Teil

### Rf-Wert

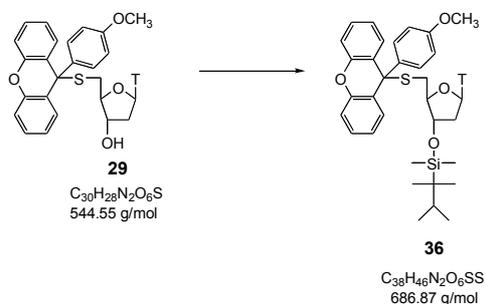
Laufmittel Dichlormethan:Methanol 95:5 0.36

ESI(-)-MS (C<sub>35</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S = 642.66 g/mol) Gemessen 641.4 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.90 (br. s, 1H, N-H), 7.40-6.78 (m, 14H, aromatisch + H-6), 6.09-6.04 (dd, 1H, H-1'), 4.72-4.69 (m, 1H, H-3'), 3.90-3.79 (m, 1H, H-4'), 3.70 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.71-2.62 (m, 2 H, H-5' + H-5'') 2.52-2.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.28-1.91 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.82 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-yl]-3'-O-TDS-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **36**



### Chemikalien

Chlor-dimethyl-thexylsilan C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>ClSi, 178.78, Sdp. 55-56°C, d 0.909, purum, ≥ 97%

Imidazol C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>, 68.08 g/mol, Smp. 88-91°C, ≥ 99.5%

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp 115-116°C

### Ansatzgröße

1.1 g	5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>29</b>	(2.0 mmol)
0.306 g	Imidazol	(4.4 mmol)
0.268 ml	Chlor-dimethyl-thexylsilan	(3.8 mmol)
10 ml	Pyridin	

### Durchführung

5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29** und Imidazol werden über Nacht gemeinsam im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die beiden Edukte werden in Pyridin gelöst und unter Rührung wird bei Raumtemperatur langsam Chlor-dimethyl-thexylsilan zugetropft. Die Lösung rührt über Nacht, laut DC Kontrolle (LM DCM:MeOH 95:5) ist die Umsetzung vollständig. Der Ansatz wird durch die Zugabe von Methanol (5 ml) gequenchet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Essigsäureethylester aufgenommen und 2 x mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend 2 x mit Essigsäureethylester reextrahiert und die organischen Phasen werden vereinigt, über

## 5. Experimenteller Teil

Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel Dichlormethan:Methanol 98:2 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Ausbeute

R = 1.3 g = 93.5% (100%ige Ausbeute = 1.39 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 95:5 0.49

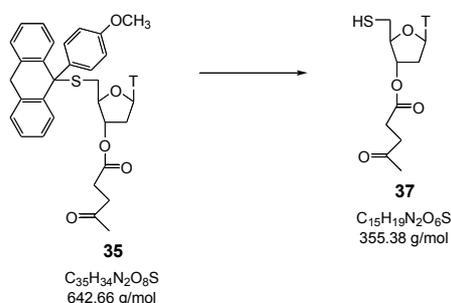
ESI(-)-MS ( $C_{38}H_{46}N_2O_6SSi = 686.87$  g/mol) Gemessen 709.3 g/mol  $[M-Na]^-$

### NMR

$^1H$ -NMR (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.70$  (br. s, 1H, N-H), 7.48-6.83 (m, 14H, aromatisch + H-6), 6.14-6.10 (dd, 1H, H-1'), 3.96-3.91 (m, 1H, H-3'), 3.89-3.8 (m, 1H, H-4'), 3.75 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.49-3.38 (m, 2H, H-5' + H-5''), 1.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T), 1.90-1.79 (m, 1H, H-2'), 1.62-1.50 (m, 1H, H-2''), 0.83-0.72 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-TDS), 0 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-TDS)

### 5'-Mercapto-3'-O-Lev-2'-desoxythymidin 37

Literaturstelle A.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835; B.) E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558; C.) K.J. Divakar, A. Mottoh, C.B. Reese, Y.S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974



### Chemikalien

Silbernitrat  $AgNO_3$ , 169.87 g/mol, krist. reinst

Methanol  $CH_4O$ , 32.04 g/mol, d 0.79, Sdp. 64-65 °C

Essigsäure  $C_2H_4O_2$ , 60.05 g/mol, d 1.05, min. 99.8%

Pyridin  $C_5H_5N$ , 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983, Sdp. 115°C

### Ansatzgröße

1.5 g	5'-S-[9-(4-Methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-3'-O-Lev-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>35</b>	(2.33mmol)
600 mg	Silbernitrat	(3.5 mmol)
300µl	Pyridin	
80 ml	Methanol	
0.5 ml	Essigsäure	

## 5. Experimenteller Teil

40 ml Methanol

Durchführung (siehe Reaktion zu **19**)

Ausbeute

R = 0.2 g = 24.3% (100%ige Ausbeute = 0.83 g)

Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 95:5 0.48

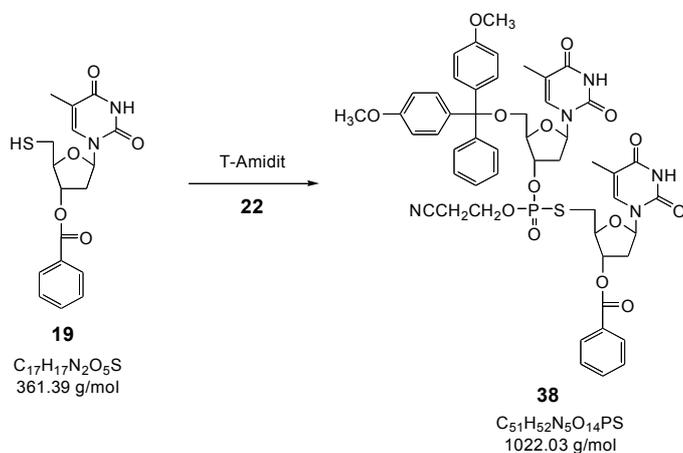
ESI(-)-MS (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S = 355.38 g/mol) Gemessen 354.9 [M-H]<sup>-</sup>

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.90 (br. s, 1H, N-H), 7.46-7.45 (m, 1H, H-6), 6.09-6.04 (dd, 1H, H-1'), 4.72-4.69 (m, 1H, H-3'), 3.90-3.79 (m, 1H, H-4'), 3.70 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.71-2.62 (m, 2 H, H-5' + H-5''), 2.52-2.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.08-1.91 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.82 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-Bzl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **38**

Literaturstelle A.) Y. Hayakawa, M. Kataoka, R. Noyori; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7996-7997; B.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835



Chemikalien

Dichlormethan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 84.93 g/mol, puriss.; über Molsieb, Sdp. 40°C, d 1.325

Acetonitril C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, 41.05 g/mol, puriss.; über Molsieb, Sdp. 81°C, d 0.782

Tetrabutylammoniumperjodat [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>4</sub>NIO<sub>4</sub>, 433.37 g/mol, Smp. 175°C

Ansatzgröße

0.361 g	5'-Mercapto-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin <b>19</b>	(1 mmol)
0.745 g	T-Amidit <b>22</b>	(1 mmol)
0.38 g	Benzimidazol-Triflat <b>23</b>	(1.4 mmol)

## 5. Experimenteller Teil

5 ml	DCM	
5 ml	ACN	
Oxidation		
0.876 g	Tertbutylammoniumperjodat	(2 mmol)

### Durchführung

5'-Mercapto-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **19**, T-Amidit **22**, Benzimidazol-Triflat **23** werden im Pumpenvakuum getrocknet (1 Tag). Die Reaktion wird durch die Zugabe von Acetonitril:Dichlormethan gestartet. Die Lösung rührt für 1 h bei RT und laut DC (LM DCM:MeOH 9:1) kann kein Edukt mehr detektiert werden. Es erfolgt die Zugabe des Oxidationsmittels in 8 ml DCM. Die Reaktionslösung rührt 8 min und wird dann mit der vierfachen Menge an DCM verdünnt. Die Aufarbeitung erfolgt durch die Extraktion mit 5%iger Natriumsulfit-Lösung und 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Zur Aufreinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 95:5 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Ausbeute

R = 0.719 g = 70.5% (100 % Ausbeute = 1.02 g)

### Rf-Wert

Laufmittel	Dichlormethan:Methanol 95:5	0.11
	Dichlormethan:Methanol 9:1	0.47

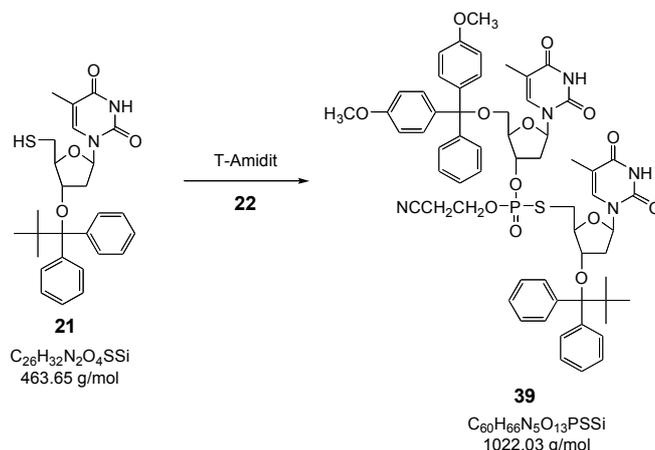
ESI(-)-MS (C<sub>51</sub>H<sub>52</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub>PS = 1022.03 g/mol)      Gemessen 1020.8 g/mol

### NMR

<sup>31</sup>P-NMR      CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
17.26, 17.22 ppm

### 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-TBDPS-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **39**

Literaturstelle A.) Y. Hayakawa, M. Kataoka, R. Noyori; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7996-7997; B.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835



Chemikalien (siehe Reaktion zu **38**)Ansatzgröße

0.361 g	5'-Mercapto-3'-O-TBDPS-2'-desoxythymidin <b>21</b>	(1 mmol)
0.745 g	T-Amidit <b>22</b>	(1 mmol)
0.38 g	Benzimidazol-Triflat <b>23</b>	(1.4 mmol)
5 ml	DCM	
5 ml	ACN	
Oxidation		
0.876 g	Tertbutylammoniumperjodat	(2 mmol)

Durchführung

5'-Mercapto-3'-O-Benzoyl-2'-desoxythymidin **21**, T-Amidit **22**, Benzimidazol-Triflat **23** werden im Pumpenvakuum getrocknet (1 Tag). Die Durchführung entspricht der Vorschrift zu Verbindung **38**.

Ausbeute

R = 0.54 g = 51% (100 % Ausbeute = 1.06 g)

Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.32

ESI(-)-MS (C<sub>60</sub>H<sub>66</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>PSSi = 1156.3 g/mol) Gemessen 1154.8 [M-H]<sup>-</sup>

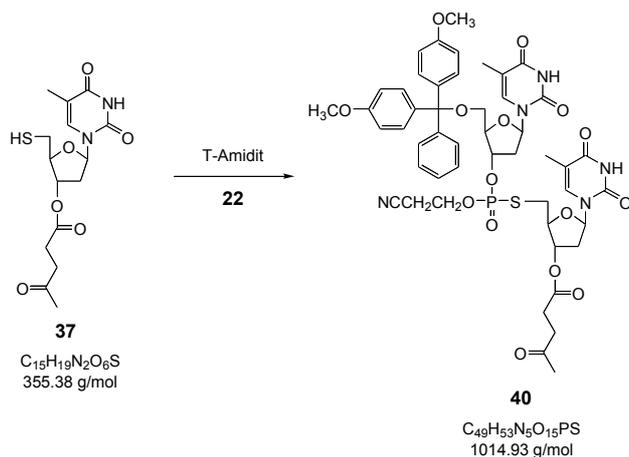
NMR

<sup>31</sup>P-NMR CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
29.11, 29.09 ppm

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-Lev-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **40**

Literaturstelle A.) Y. Hayakawa, M. Kataoka, R. Noyori; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7996-7997; B.) R. Cosstick, J.S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835

## 5. Experimenteller Teil



Chemikalien (siehe Reaktion zu **38**)

### Ansatzgröße

0.36 g	5'-Mercapto-3'-O-Lev-2'-desoxythymidin <b>37</b>	(1 mmol)
0.745 g	T-Amidit <b>22</b>	(1 mmol)
0.38 g	Benzimidazol-Triflat <b>23</b>	(1.4 mmol)
5 ml	DCM	
5 ml	ACN	
Oxidation		
0.876 g	Tertbutylammoniumperjodat	(2 mmol)

### Durchführung

5'-Mercapto-3'-O-Lev-2'-desoxythymidin **37**, T-Amidit **22**, Benzimidazol-Triflat **23** werden im Pumpenvakuum getrocknet (1 Tag). Die Durchführung des Versuches entspricht der Vorschrift zu Verbindung **38**.

### Ausbeute

R = 0.61 g = 60.7% (100 % Ausbeute = 1.01 g)

### Rf-Wert

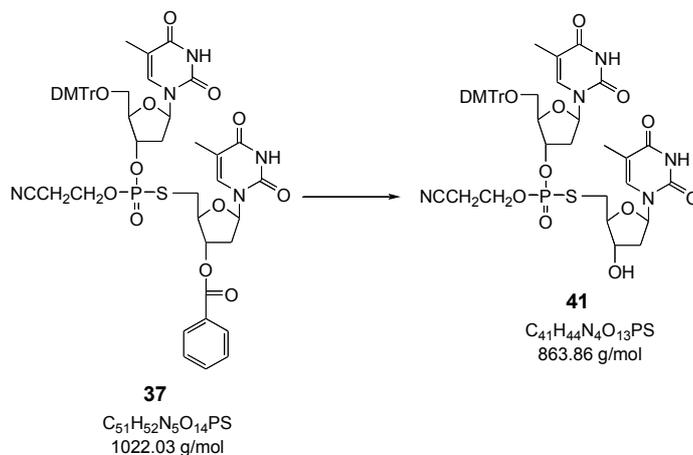
Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.47

ESI(-)MS ( $C_{49}H_{53}N_5O_{15}PS = 1014.93$  g/mol)

Gemessen 961.2  $[M-H-(CH_2CH_2CN)]^-$  und 1014.9  $[M-H]^-$

NMR  $^{31}P$ -NMR: nicht auswertbar

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **41**



### Chemikalien

7 M Ammoniak in Methanol  
Methanol

### Ansatzgröße

0.586 g	5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-Bzl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>37</b>	(0.57mmol)
2 ml	7 M Ammoniak in Methanol	
3 ml	Methanol	

### Durchführung

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-Benzyl-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **37** wird in ammoniakalischem Methanol gelöst und steht über Nacht bei 55°C im Wasserbad. Die vollständige Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppe wird per Massenspektrometrie kontrolliert. Die Lösung wird einrotiert und mehrmals mit Methanol koevaporiert.

### Ausbeute

R = 0.485 g = 98 % (100 %ige Ausbeute = 0.495 g)

### Rf-Wert

Laufmittel    Dichlormethan:Methanol 9:1    Startfleck

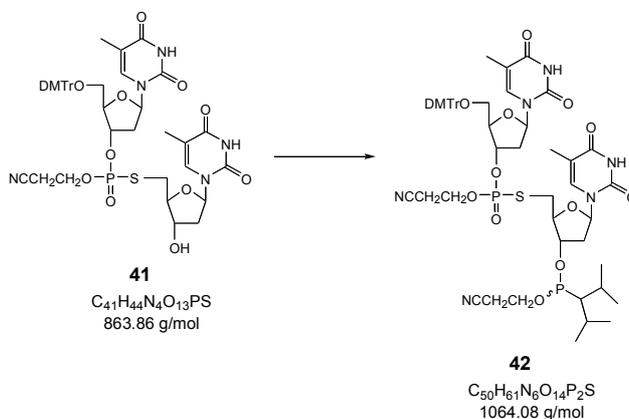
ESI(-)-MS (C<sub>41</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>PS = 863.86 g/mol)    Gemessen    863.6 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>31</sup>P-NMR    CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
1.49 ppm

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylamidophosphoramidit]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin 42**

Literaturstelle A.) B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849; B.) M. Mag, S. Lücking, J.W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7) 14 37-1441



## Chemikalien

Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid (P-Reagenz II)

C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>OP, 236.68 g/mol, pract.; 95% (GC), d 1.023

N,N-Ethyldiisopropylamin C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N, 129.25 g/mol, purum; ≥ 98% (GC) Sdp. 126-128°C, d 0.755

Acetonitril C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, 41.05 g/mol, puriss.; über Molsieb, ≥ 99.5%, Sdp. 82°C

Dichlormethan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 84.93 g/mol, puriss.; über Molsieb, ≥ 99.5%, Sdp. 40°C

## Ansatzgröße

0.485 g	5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidylyl-(3'→5')-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>41</b>	(0.56 mmol)
0.16 g	P-Reagenz	(0.67 mmol)
0.384 ml	N-Ethyldiisopropylamin	(2.24 mmol)
5 ml	Dichlormethan:Acetonitril	

## Durchführung

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidylyl-(3'→5')-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **41** wird über Nacht im Pumpenvakuum getrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre wird DCM:ACN und DIPEA zugegeben. Das Phosphitlierungsreagenz wird langsam bei Eiskühlung zugetropft. Per DC (LM DCM:MeOH 95:5) kann nach 1 h kein Edukt mehr detektiert werden. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 0.5 ml Butanol gequencht. Die Lösung wird mit 200 ml Essigsäureethylester verdünnt und 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der ölige Rückstand wird in 7,5 ml Dichlormethan:Diethylether aufgenommen und in 150 ml kaltes n-Pentan einpipettiert. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit wenig kaltem n-Pentan nachgewaschen und am HV getrocknet.

## 5. Experimenteller Teil

### Ausbeute

R = 0.556 g = 93% (100% ige Ausbeute = 0.6 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.12

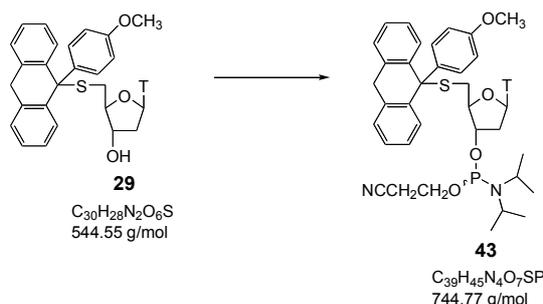
ESI(-)-MS ( $C_{50}H_{61}N_6O_{14}P_2S = 1064.08$  g/mol) Gemessen 1063.8 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>31</sup>P-NMR  $CDCl_3 + 0.1\%$  DIPEA  
140.82, 140.75; 15.99, 15.85

### 5'-S-[9-(4-methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropyl-phosphit) 43

Literaturstelle A.) B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849; B.) M. Mag, S. Lücking, J.W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7) 14 37-1441



### Chemikalien

Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid (P-Reagenz II)

$C_9H_{18}ClN_2OP$ , 236.68 g/mol, pract.; 95% (GC), d 1.023

N,N-Ethyldiisopropylamin  $C_8H_{19}N$ , 129.25 g/mol, purum;  $\geq 98\%$  (GC) Sdp. 126-128°C, d 0.755

Acetonitril  $C_2H_3N$ , 41.05 g/mol, puriss.; über Molsieb,  $\geq 99.5\%$ , Sdp. 82°C,

Dichlormethan  $CH_2Cl_2$ , 84.93 g/mol, absolut; über Molsieb,  $\geq 99.5\%$ , Sdp. 40°C,

### Ansatzgröße

0.75 g	5'-S-(9-(4-methoxyphenyl)xanthen-9-yl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin <b>29</b>	(1.38 mmol)
0.392 ml	P-Reagenz II	(1.65 mmol)
0.706 ml	N-Ethyldiisopropylamin	(4.13 mmol)
5 ml	DCM	
5 ml	ACN	

### Durchführung

5'-S-[9-(4-methoxyphenyl)xanthen-9-yl]-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **29** wird über Nacht im Pumpenvakuum getrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre wird DCM:ACN

## 5. Experimenteller Teil

und DIPEA zugegeben. Das Phosphitierungsreagenz wird langsam bei Eiskühlung zugetropft. Per DC (LM DCM:MeOH 95:5) kann nach 1 h kein Edukt mehr detektiert werden. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 0.5 ml Butanol gequenchet. Die Lösung wird mit 200 ml Essigsäureethylester verdünnt und 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der ölige Rückstand wird in 10 ml Dichlormethan:Diethylether aufgenommen und in 200 ml kaltes n-Pentan einpipettiert. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit wenig kaltem n-Pentan nachgewaschen und am HV getrocknet.

### Ausbeute

R = 0.83 g = 81% (100% = 1.03 g)

### Rf-Wert

Laufmittel	Dichlormethan:Methanol 9:1	0.77
	Dichlormethan:Methanol 95:5	0.51 und 0.44

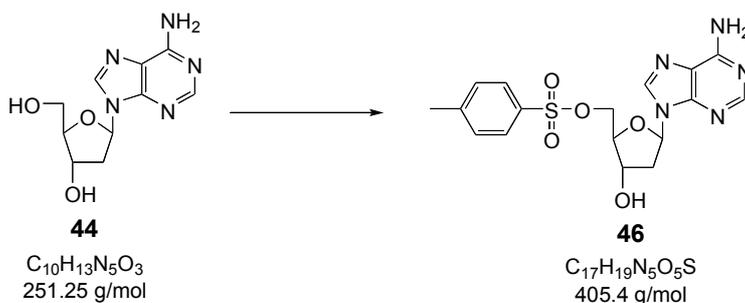
ESI(-)-MS (C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S = 744.77 g/mol) Gemessen 743.8 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>31</sup>P-NMR CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
150.21, 149.94 ppm

### 5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxyadenosin **46**

Literaturstelle E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



### Chemikalien

p-Toluolsulfonsäurechlorid C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub>S, 190.65 g/mol  
2'-Desoxyadenosin **44** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>, 267.25 g/mol

### Ansatzgröße

5.02 g	2'-Desoxyadenosin <b>44</b>	(20.0 mmol)
4.73 g	p-Toluolsulfonsäurechlorid	(24.8 mmol)
50 ml	Pyridin	

## Durchführung

2'-Desoxyadenosin **44** wird in 25 ml Pyridin suspendiert und mit Hilfe eines Eisbades gekühlt, p-Toluolsulfonsäurechlorid wird in 25 ml Pyridin gelöst und innerhalb von 30 min zum Ansatz zugetropft. Der Ansatz rührt über Nacht bei Eiskühlung. Laut DC (LM DCM:MeOH 9:1) entsteht außer dem gewünschten mono-tosylierten Produkt auch das di-tosylierte Produkt. Die Lösung wird in 250 ml Eiswasser (100 ml Wasser und 150 g Eis) gegossen. Das Produkt ölt aus, der Ansatz wird durch die Zugabe von Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird 2 × mit 5% iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Es schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 97:3 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

## Ausbeute

R = 3.31 g = 42.8% (100% ige Ausbeute = 7.92 g)

## Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.47

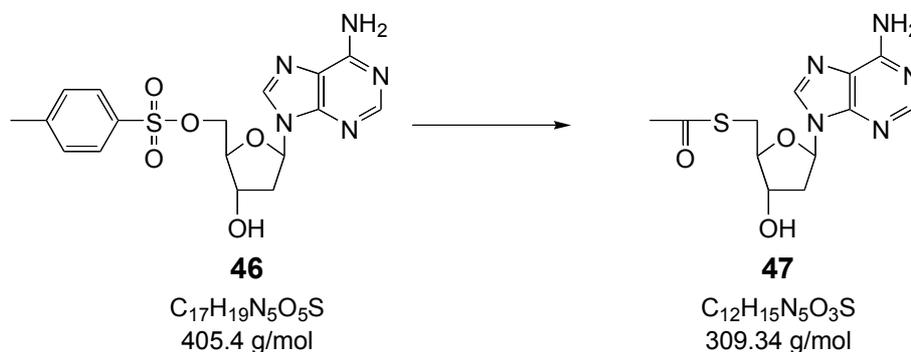
ESI(+)-MS (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S = 405.4 g/mol) Gemessen 406.1 [M-H]<sup>+</sup>

## NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.13 (s, 1H, H-8), 7.93 (s, 1H, H-2), 7.6 (d, 2H, H-Tosyl), 7.23 (d, 2H, Tosyl), 6.28 (t, 1H, H-1'), 6.21 (s, 2H, N-6), 4.53 (dt, 1H, H-3'), 4.27 (dd, 1H, H-5'), 4.21 (dd, 1H, H-5''), 4.06 (dt, 1H, H-4'), 2.81 (dt, 1H, H-2'), 2.36 (m, 1H, H-2''), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Tosyl)

## 5'-(S-Acetyl)-5'-mercapto-2'-desoxyadenosin **47**

Literaturstelle E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558



## Chemikalien

Kaliumthioacetat C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KOS, 114.21 g/mol, purum. > 98%

Aceton C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, 58.08 g/mol, Sdp. 55.5-56.5°C, d 0.79-0.792

Ansatzgröße

3.2 g	5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxyadenosin <b>46</b>	(7.9 mmol)
4.5 g	Kalium-thioacetat	(31.6 mmol)
70 ml	Aceton	

Durchführung

5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-2'-desoxyadenosin **46** und Kaliumthioacetat werden in Aceton unter Schutzgasatmosphäre suspendiert. Das Reaktionsgemisch rührt für 3 h bei 45°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird mit Dichlormethan verdünnt und 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert, die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Es schließt sich eine Aufreinigung durch Säulenchromatographie an (Laufmittel DCM:MeOH 9:1). Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute

R = 0.6 g = 24.3% (100%ige Ausbeute = 2.47 g)

Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.31

ESI-(+)MS (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S = 309.34 g/mol) Gemessen 310.1 [M-H]<sup>+</sup>

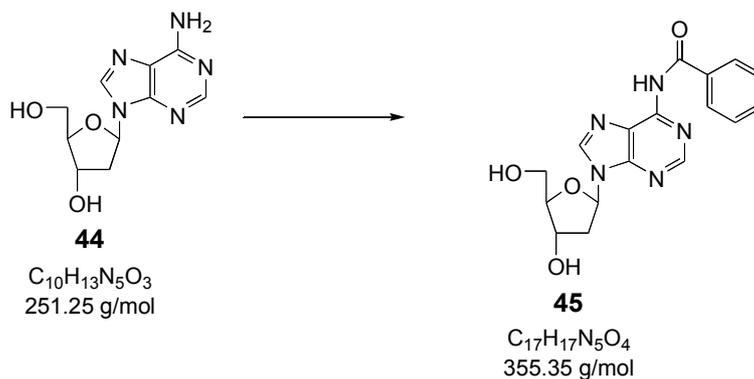
NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.10 (s, 1H, H-8), 7.87 (s, 1H, H-2), 6.25 (t, 1H, H-1'), 6.20 (s, 2H, N-6), 4.50 (dt, 1H, H-3'), 4.29 (dd, 1H, H-5'), 4.24 (dd, 1H, H-5''), 4.06 (dt, 1H, H-4'), 2.80 (dt, 1H, H-2'), 2.58 (m, 1H, H-2''), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S-OAc), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Tosyl)

Einführung der entsprechenden BasenschutzgruppenN<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-desoxyadenosin **45**

Literaturstelle A.) H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827; B.) G.S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1316-1319

## 5. Experimenteller Teil



### Chemikalien

Trimethylchlorsilan  $C_3H_9ClSi$ , 108.6 g/mol, d 0.89, Sdp. 57-59°C

Benzoylchlorid  $C_7H_5ClO$ , 140.57 g/mol,  $\geq 99.5\%$ , d 1.212, Sdp. 73-74°C

Pyridin  $C_5H_5N$ , 79.1 g/mol, d 0.983, abs., über Molsieb,  $\geq 99.8\%$

### Ansatzgröße

12.89 g	2'-Desoxyadenosin <b>44</b>	(51.3 mmol)
32.4 ml	Trimethylchlorsilan	(256 mmol)
27.8 ml	Benzoylchlorid	(256 mmol)
400 ml	Pyridin	
	wässrige Ammoniaklösung	
	Essigsäureethylester	
	Wasser	

### Durchführung

2'-Desoxyadenosin **44** wird über Nacht im Pumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Der Feststoff wird in Pyridin suspendiert und das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Zuerst wird Trimethylchlorsilan zugetropft und nach 30 min Rühren wird Benzoylchlorid zugetropft und der Ansatz für weitere 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 0°C gekühlt und mit 100 ml Wasser und 100 ml Ammoniaklösung versetzt. Nach 30 min wird der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer eingengt. Der verbleibende Rückstand wird in 350 ml heißem Wasser gelöst und zweimal mit 150 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die Essigester-Phasen werden vereinigt und mit 100 ml heißem Wasser extrahiert. Die wässrige Lösung steht über Nacht im Kühlschrank, dabei bildet sich ein Niederschlag aus, dieser wird abgesaugt und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

### Ausbeute

R = 11.4 g = 63% (100% = 18.23 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.33

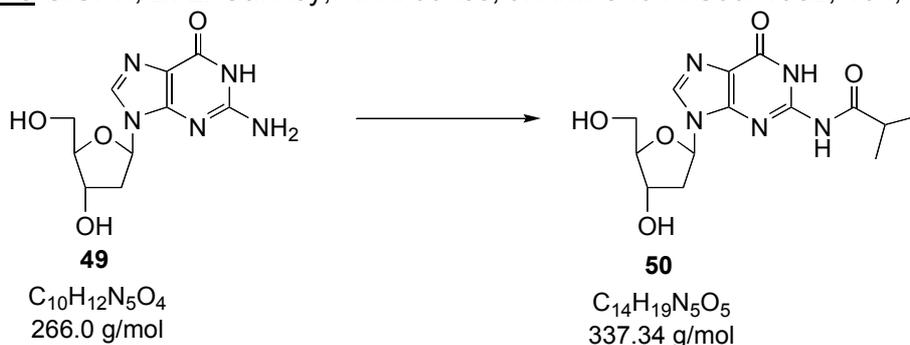
ESI(-)-MS ( $C_{17}H_{17}N_5O_4$  = 355.35 g/mol) Gemessen 354.1 [M-H]<sup>-</sup>

NMR

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ = 8.76-8.72 (2s, 2H, H-8 und H-2), 8.06-8.02 (m, 2H, ortho-H Benzoyl), 7.64-7.51 (m, 3H, meta- + para-H Benzoyl), 6.53-6.47 (m, 1H, H-1'), 4.50-4.46 (m, 1H, H-3'), 3.95-3.90 (m, 1H, H-4'), 3.68-3.52 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.85-2.75 (m, 1H, H-2'), 2.43-2.34 (m, 1H, H-2'')

 $\text{N}^2$ -Isobutyryl-2'-desoxyguanosin **50**

Literaturstelle G.S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1316-1319

Chemikalien

Trimethylchlorsilan  $\text{C}_3\text{H}_9\text{ClSi}$ , 108.6 g/mol, d 0.89, Sdp. 57-59°C

Isobuttersäureanhydrid  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$ , 158.2 g/mol, Sdp. 179-182°C, d 0.953

Pyridin  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 79.1 g/mol, d 0.983, puriss., über Molsieb,  $\geq 99.8\%$

Ansatzgröße

13.36 g	2'-Desoxyguanosin <b>49</b>	(50 mmol)
31.6 ml	Trimethylchlorsilan	(250 mmol)
41.6 ml	Isobuttersäureanhydrid	(250 ml)
400 ml	Pyridin	

Durchführung

2'-Desoxyguanosin **49** wird über Nacht im Pumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Der Feststoff wird in Pyridin suspendiert und das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Trimethylchlorsilan wird zugetropft, dabei geht der Feststoff in Lösung. Nach 30 min Rühren wird Isobuttersäureanhydrid zugegeben und für weitere 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 0°C abgekühlt und mit 100 ml Wasser und 100 ml Ammoniaklösung versetzt, nach 30 min wird der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer eingengt. Der verbleibende Rückstand wird in 300 ml heißem Wasser gelöst und zweimal mit 200 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die Essigester-Phasen werden vereinigt und mit 50 ml heißem Wasser reextrahiert. Die wässrige Lösung steht über Nacht im Kühlschrank, dabei bildet sich ein Niederschlag, dieser wird abgesaugt und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute

R = 12.4 g = 73.3% (100% = 16.8 g)

Rf-Wert

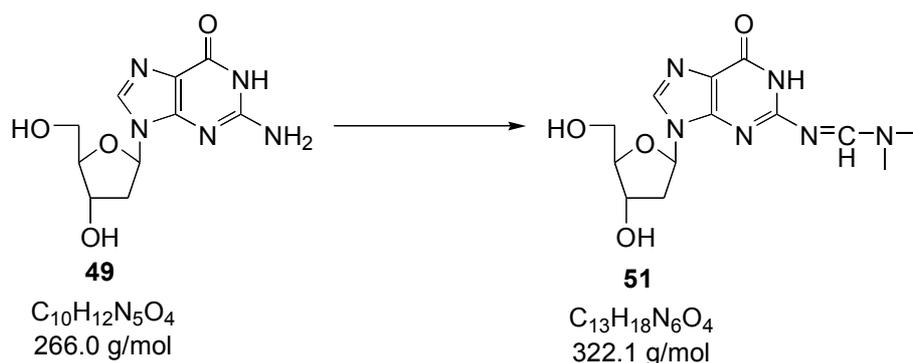
Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.37

ESI(-)-MS (C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> = 337.34 g/mol) Gemessen 336.0 [M-H]<sup>-</sup>NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 8.16 (s, 1H, H-8), 6.25-6.19 (m, 1H, H-1'), 5.33 (d, 1H, 3'-OH), 5.33-5.31 (d, 1H, 5'-OH), 4.39-4.38 (m, 1H, H-3'), 3.87-3.83 (m, 1H, H-4'), 3.61-3.34 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.84-2.73 (m, 1H, CH-Isobutyryl), 2.62-2.54 (m, 1H, H-2'), 2.33-2.24 (m, 1H, H-2''), 1.14-1.07 (dd, 6 H, CH<sub>3</sub>-Isobutyryl)

N<sup>2</sup>-Dimethylformyryl-2'-desoxyguanosin 51

Literaturstelle F.Seela, K. Mersmann, J. A. Grasby, M. J. Gait; *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1809-1819

Chemikalien2'-Desoxyguanosin **49** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, 266.0 g/molN,N-Dimethylformamid-diethylacetal C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>, 147.2 g/mol, Sdp. 130°C, d 0.859Dimethylformamid C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO, 73.1 g/mol, Sdp. 154°C, d 0.984Ansatzgröße

5.34 g	2'-Desoxyguanosin	(20 mmol)
40 ml	N,N-Dimethylformamid-diethylacetal	(233 mmol)
100 ml	Dimethylformamid	

Durchführung

2'-Desoxyguanosin **49** wird in Dimethylformamid gelöst und mit N,N-Dimethylformamid-diethylacetal versetzt. Unter Argon wird der Ansatz für 2 h bei 50°C gerührt. Die Lösung wird einrotiert und der ölige Rückstand wird mit Methanol

## 5. Experimenteller Teil

koevaporiert. Als Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 8:2 an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Ausbeute

R = 5.75 g = 89.1% (100% = 6.46 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 kurz oberhalb des Startflecks

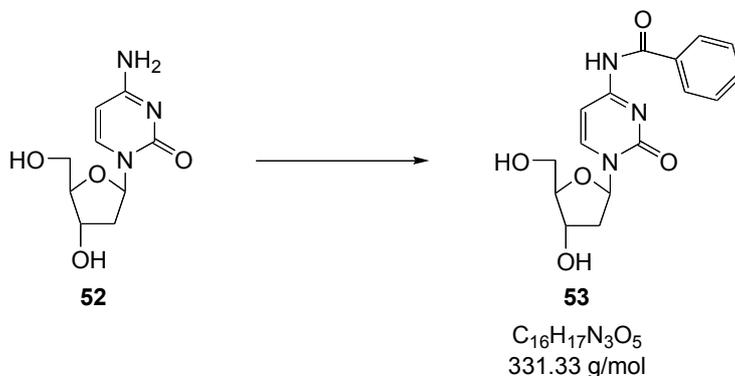
ESI(-)-MS (C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> = 322.1 g/mol) Gemessen 321.1 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ= 11.30 (br. s, 1H, N-H), 8.47 (s, 1H, -N=CH-), 8.04 (s, 1H, H-8), 6.29-6.24 (m, 1H, H-1'), 5.31-5.29 (d, 1H, 3'-OH), 4.97-4.92 (d, 1H, 5'-OH), 4.40-4.39 (m, 1H, H-3'), 3.87-3.83 (m, 1H, H-4'), 3.59-3.34 (m, 2H, H-5' + H-5''), 3.09 (s, 3H, -N-CH<sub>3</sub>), 3.04 (s, 3H, -N-CH<sub>3</sub>), 2.63-2.55 (m, 1H, H-2'), 2.29-2.20 (m, 1H, H-2'')

### N<sup>4</sup>-Benzoyl-2'-desoxycytidin 53

Literaturstelle A.) H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827; B.) G.S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1316-1319



Chemikalien (siehe Reaktion zu **45**)

### Ansatzgröße

7.91g	2'-Desoxycytidin × HCl <b>52</b>	(30 mmol)
19 ml	Trimethylchlorsilan	(150 mmol)
17.4 ml	Benzoylchlorid	(150 mmol)
300 ml	Pyridin	
60 ml wässrige Ammoniaklösung, 60 ml Wasser		
Essigsäureethylester		
Wasser		

Durchführung (Durchführung siehe Reaktion zu **45**)

Ausbeute

R = 7.3 g = 73.2% (100% = 9.97 g)

Rf-Wert

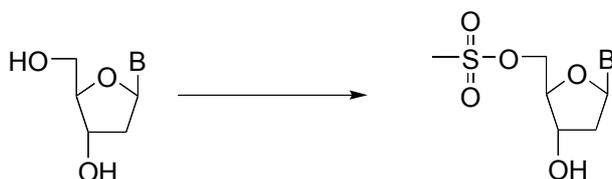
Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.27

ESI(-)-MS (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> = 331.33 g/mol) Gemessen 330.0 [M-H]<sup>-</sup>NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ= 11.23 (br. s, 1H, N-H), 8.41-8.39 (d, 1H, H-6), 8.03-8.00 (m, 2H, ortho-H Benzoyl), 7.67-7.49 (m, 3H, meta- und para-H Benzoyl) 7.36-7.33 (d, 1H, H-5), 6.18-6.13 (m, 1H, H-1'), 5.28-5.26 (d, 1H, 3'-OH), 5.09-5.05 (m, 1H, 5'-OH), 4.29-4.22 (m, 1H, H-3'), 3.92-3.87 (m, 1H, H-4'), 3.71-3.57 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.38-2.29 (m, 1H, H-2'), 2.13-2.02 (m, 1H, H-2'')

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die 5'-O-Mesylierung und 5'-O-Tosylierung von 2'-Desoxynukleotiden 2, 54-58

5'-O-Mesylierung 55-58

Literaturstelle J.P. Horwitz, J. Chua, M.Noel; *J.Org.Chem* **1964**, 29, 2076-2078

2'-Desoxynukleosid (Nr.)	Molare Masse Summenformel	2'-Desoxynukleosid (Nr.)	Molare Masse Summenformel
T (1)	242.33 g/mol C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5'-O-Mes-T (58)	320.32 g/mol C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S
A <sup>bz</sup> (45)	355.35 g/mol C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	5'-O-Mes-A <sup>bz</sup> (55)	433.4 g/mol C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S
G <sup>ibu</sup> (50)	337.34 g/mol C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	5'-O-Mes-G <sup>ibu</sup> (56)	415.43 g/mol C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S
C <sup>bz</sup> (53)	331.33 g/mol C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	5'-O-Mes-C <sup>bz</sup> (57)	409.42 g/mol C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S

ChemikalienMethansulfonsäurechlorid CH<sub>3</sub>ClO<sub>2</sub>S, 114.6 g/mol, Sdp. 53-55°C, d 1.474Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, d 0.983, puriss., über Molsieb, ≥99.8%

Ansatzgröße2'-Desoxynukleosid **1, 45, 50, 53**

(4 mmol)

Eduktnummer	2'-Desoxynukleosid	Eingesetzte Menge	Produktnummer
<b>1</b>	T	0.97 g	<b>58</b>
<b>45</b>	A <sup>bz</sup>	1.42 g	<b>55</b>
<b>50</b>	G <sup>ibu</sup>	1.35 g	<b>56</b>
<b>53</b>	C <sup>bz</sup>	1.33 g	<b>57</b>

0.372 ml Methansulfonsäurechlorid

(4 mmol)

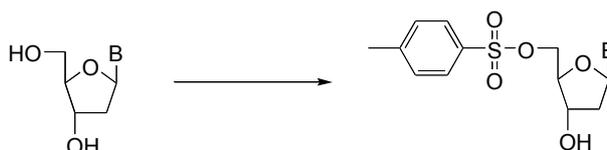
40 ml Pyridin

Durchführung

Das entsprechende 2'-Desoxynukleosid **1, 45, 50, 53** wird in Pyridin suspendiert (Thymidin ergibt eine klare Lösung) und das Reaktionsgemisch auf -20°C abgekühlt. Über eine Zeit von 30 min wird Methansulfonsäurechlorid zugetropft. Der Reaktionsansatz steht über Nacht bei -20°C. Der Reaktionsfortschritt wird per DC (LM Dichlormethan:Methanol 9:1) kontrolliert. Bei vollständiger Reaktion, wird mit Methanol gequenchet und am Rotationsverdampfer eingengt. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit entsprechenden Dichlormethan:Methanol-Gemischen an. Dabei ist zu beobachten, daß die Verbindungen in reinem Dichlormethan schwer löslich sind. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

5'-O-Tosylierung **2, 54**

Literaturstelle E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman, *J.Org.Chem.* **1964**, 29, 554-558



2'-Desoxynukleosid (Nr.)	Molare Masse Summenformel	2'-Desoxynukleosid (Nr.)	Molare Masse Summenformel
T ( <b>1</b> )	242.33 g/mol C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5'-O-Tos-T ( <b>2</b> )	396.42 g/mol C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S
A <sup>bz</sup> ( <b>45</b> )	355.35 g/mol C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	5'-O-Tos-A <sup>bz</sup> ( <b>54</b> )	509.43 g/mol C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S

Chemikalienp-Toluolsulfonsäurechlorid C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub>S, 190.65 g/mol, puriss > 99%Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, puriss.; über Molsieb, d 0.983 Sdp. 115-116°C

Ansatzgröße2'-Desoxynukleotid **1, 45**

(4 mmol)

Eduktnummer	2'-Desoxynukleosid	Eingesetzte Menge	Produktnummer
<b>1</b>	T	0.97 g	<b>2</b>
<b>45</b>	A <sup>bz</sup>	1.42 g	<b>54</b>

0.92 g p-Toluolsulfonsäurechlorid  
40 ml Pyridin

(4.8 mmol)

Durchführung

Das entsprechende 2'-Desoxynukleosid **1, 45** wird in Pyridin suspendiert (Thymidin ergibt eine klare Lösung) und das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Über eine Zeit von 15 min wird p-Toluolsulfonsäurechlorid portionsweise zugegeben. Der Reaktionsansatz rührt bei Eiskühlung. Der Reaktionsfortschritt wird per DC (LM Dichlormethan:Methanol 9:1) kontrolliert. Bei vollständiger Umsetzung, wird die Reaktionslösung in 25 ml Eiswasser (15 ml Wasser und 10 g Eis) einpipettiert, die Produkte ölen aus. Der ölige Feststoff wird anschließend in 30 ml DCM gelöst und die Lösung wird 2 × mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit einem Dichlormethan:Methanol-Gemisch an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

T-Nukleoside **2, 28, 58**Analytik von 5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-2'-desoxythymidin **2**Ausbeute 68%Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.29

ESI(+)-MS (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S = 396.42 g/mol) Gemessen 397.1[M-H]<sup>+</sup>NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.31 (br. s, 1H, N-H), 7.82 (d, 2H, aromatisch, AA'BB'), 7.44 (d, 2H, aromatisch, AA'BB'), 7.36 (d, 1H, H-6), 6.14 (t, 1H, H-1'), 5.57 (d, 1H, 3'-OH), 4.21 (m, 3H, H-5' + H-5'' + H-3'), 3.85 (m, 1H, H-4'), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Tosyl), 2.10 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

Analytik von 5'-O-(Mesylsulfonyl)-2'-desoxythymidin **58**Ausbeute 64%

## 5. Experimenteller Teil

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.32

ESI(+)-MS ( $C_{11}H_{16}N_2O_5S = 320.32$  g/mol) Gemessen 321.0 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 11.32$  (br. s, 1H, N-H), 7.49 (d, 1H, H-6), 6.26-6.20 (t, 1H, H-1'), 5.49 (d, 1H, 3'-OH), 4.35-4.21 (m, 2H, H-5' + H-5''), 4.29-4.27 (m, 1H, 3-H'), 4.01-3.96 (m, 1H, H-4'), 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Mesityl), 2.53-2.50 (m, 1H, H-2'), 2.27-2.07 (m, 1H, H-2''), 1.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### Analytik von 5'-Chlor-2'-desoxythymidin 28

Ausbeute 72.6%

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.38

ESI(+)-MS ( $C_{17}H_{20}N_2O_7S = 260.68$  g/mol) Gemessen 261.9 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.38 (br. s, 1H, N-H), 7.55 (d, 1H, H-6), 6.22 (t, 1H, H-1'), 4.25 (m, 1H, 3-H'), 4.24 (m, 3H, H-4' + H-5' + H-5''), 3.34 (d, 1H, CH<sub>3</sub>-Mesityl), 2.32-2.21 (m, 1H, H-2'), 2.14-2.06 (m, 1H, H-2''), 1.8 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

## A-Nukleoside 54, 55

### Analytik 5'-O-(p-Tosylsulfonyl)-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenosin 54

Ausbeute 39%

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.42

MALDI-MS ( $C_{24}H_{23}N_5O_6S = 509.43$  g/mol) Gemessen 509.69 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.68-8.56$  (m, 2H, H-8 + H-2), 7.97-7.91 (m, 2H, ortho-H Benzoyl), 7.58-7.27 (m, 7H, meta- + para-H Benzoyl, H-Tosyl), 6.42-6.37 (m, 1H, H-1'), 4.79-4.69 (m, 1H, H-3'), 4.55-4.51 (m, 1H, H-4'), 2.93-2.76 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.59-2.47 (m, 2H, H-2' + H-2''), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Tosyl)

**Analytik 5'-O-(Mesylsulfonyl)-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenosin 55****Ausbeute** 79%**Rf-Wert**

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.33

**ESI(-)MS** (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S = 433.4 g/mol) Gemessen 432.4 [M-H]<sup>-</sup>**NMR**

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ= 11.2 (br. s N-H), 8.78-8.66 (m, 2H, H-8 und H-2), 8.08-8.04 (m, 2H, ortho-H Benzoyl), 7.69-7.48 (m, 3H, meta- + para-H Benzoyl), 6.59-6.53 (m, 1H, H-1'), 4.56-4.37 (m, 2H, OH + H-3'), 4.18-4.14 (m, 1H, H-4'), 3.37-3.27 (m, 2H, H-5' + H-5''), 3.21-3.17 (d, 3H, H-Mesyl), 2.99-2.88 (m, 1H, H-2'), 2.47-2.41 (m, 1H, H-2'')

**G-Nukleosid 56****Analytik 5'-O-(Mesylsulfonyl)-N<sup>2</sup>-Isobutyryl-2'-desoxyguanosin 56****Ausbeute** 93%**Rf-Wert**

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.28

**ESI(-)MS** (C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S = 415.43 g/mol) Gemessen 414.0 [M-H]<sup>-</sup>**NMR**

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ= 11.62 (br. s, 1H, N-H), 8.22-8.17 (s, 1H, H-8), 6.31-6.25 (m, 1H, H-1'), 5.57-5.55 (d, 1H, 3'-OH), 4.46-4.31 (m, 3H, H-3' + H-5' + H-5''), 4.11-4.06 (m, 1H, H-4'), 3.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Mesyl), 2.83-2.66 (m, 2H, H-2' und CH-Isobutyryl), 2.41-2.31 (m, 1H, H-2''), 1.15-1.07 (dd, 6 H, CH<sub>3</sub>-Isobutyryl)

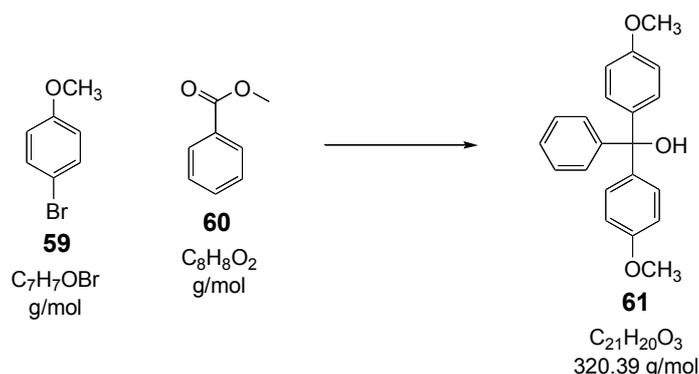
**C-Nukleosid 57****Analytik 5'-O-(Mesylsulfonyl)-N<sup>4</sup>-benzoyl-2'-desoxycytidin 57****Ausbeute** 48% (Löslichkeit der Verbindung ist problematisch, fällt auf der Säule aus!)**Rf-Wert**

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.28

**ESI(-)MS** (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S = 409.42 g/mol) Gemessen 408.1 [M-H]<sup>-</sup>

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 11.27 (br. s, 1H, N-H), 8.33 (d, 1H, H-6), 8.14-8.03 (m, 2H, ortho-H Benzoyl), 7.67-7.49 (m, 3H, meta- + para-H Benzoyl), 7.39-7.36 (d, 1H, H-5), 6.24-6.19 (m, 1H, H-1'), 5.56-5.54 (d, 1H, 3'-OH), 4.49-4.39 (m, 2H, H-5' + H-5''), 4.31-4.25 (m, 1H, H-3'), 4.13-4.08 (m, 1H, H-4'), 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Mesityl), 2.42-2.32 (m, 1H, H-2'), 2.25-2.08 (m, 1H, H-2'')

4,4'-Dimethoxytriphenylmethanol **61**Chemikalien

Magnesiumspäne Mg, 24.31 g/mol,  
 p-Bromanisol C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>BrO, 187.0 g/mol, Sdp. (10 Torr) 98-99°C, d 1.495,  
 Benzoessäuremethylester C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, 136.1 g/mol, Sdp. 197-202°C, d 1.088

Ansatzgröße

8.26 g	Magnesiumspäne	(0.34 mol)
43.25 ml	p-Bromanisol <b>59</b>	(0.35 mol)
20 ml	Benzoessäuremethylester <b>60</b>	(0.16 mol)
30 ml	THF	

Durchführung

Magnesiumspäne werden unter Schutzgasatmosphäre mit 30 ml THF bedeckt und p-Bromanisol **59** langsam zugetropft, bis die Lösung selbstständig zu Sieden beginnt. Nach der erfolgten Zugabe refluxiert der Ansatz 1 h. Nach dem Zutropfen von Benzoessäuremethylester **60** in 30 ml THF bei RT wird die Reaktionslösung 90 min refluxiert und anschließend abgekühlt. Durch die Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung erfolgt die Hydrolyse. Die dabei entstehenden Phasen werden getrennt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und anschließend wird die wässrige Phase mit Toluol reextrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Einrotieren wird das Rohprodukt in wenig Dichlormethan (oder Hexan:EE 3:1 aufgenommen, Problem Löslichkeit) aufgenommen und eine Säulenchromatographie durchgeführt (Laufmittel Dichlormethan oder Hexan:EE 3:1). Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute

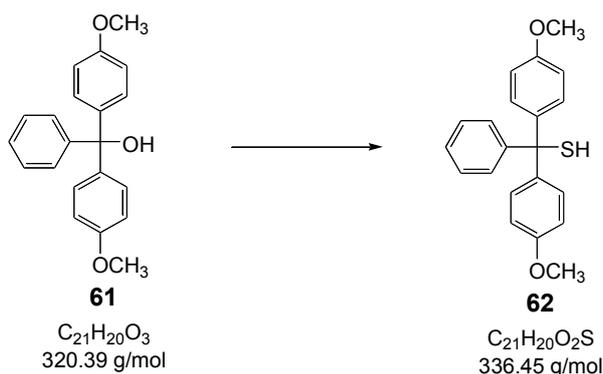
R = 48.7 g = 95% (100% ige Ausbeute = 51.3 g)

Rf-Wert

Laufmittel Hexan:EE 3:1 0.43

ESI(+)MS (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub> = 320.39 g/mol) Gemessen 304.2 [M-H-(OH)]<sup>+</sup>NMR<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.27-7.06 (m, 9H, aromatisch), 6.78-6.72 (m, 4 H, aromatisch), 3,77 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>)4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol **62**

Literaturstelle A.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C.B. Reese, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (51), 7485-7488; B.) J.H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese, *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 257-269; C.) P. R. J. Gaffaney, L. Changsheng, M. V. Rao, C.B. Reese, J.G. Ward, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 6, 1355-1360

ChemikalienDichloressigsäure C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 128.9 g/mol, Sdp. 193-195°C, d 1.567Dichlormethan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 84.93 g/mol, über Molsieb, ≥ 99.5%, Sdp. 40°C, d 1.325Ansatzgröße

30.95 g	Dichloressigsäure	(0.24 mol)
38.44 g	4,4'-Dimethoxytriphenylmethanol <b>61</b>	(0.12 mol)
800 ml	Dichlormethan	

Durchführung

In eine Lösung aus Dichloressigsäure in 400 ml Dichlormethan wird bei Eiskühlung für 15 min Schwefelwasserstoff eingeleitet. Eine Lösung aus 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanol **61** in 400 ml Dichlormethan wird unter anhaltender Schwefelwasserstoff-Einleitung innerhalb 1 h zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wird für weitere 15 min Schwefelwasserstoff eingeleitet. Durch das anschließende Einleiten

## 5. Experimenteller Teil

von Argon wird überschüssiger Schwefelwasserstoff verdrängt. Die Reaktionslösung wird anschließend dreimal mit 700 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (Vorsicht! Druck!) und zweimal mit 600 ml Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird in wenig Dichlormethan gelöst und mit Hexan versetzt, dabei ist eine Niederschlagsbildung zu beobachten. Die Lösung steht für 4 h bei Eiskühlung, der Feststoff wird abgesaugt und getrocknet.

### Analytik

R = 34.31 g = 85% (100% ige Ausbeute = 40.4 g)

### Rf-Wert

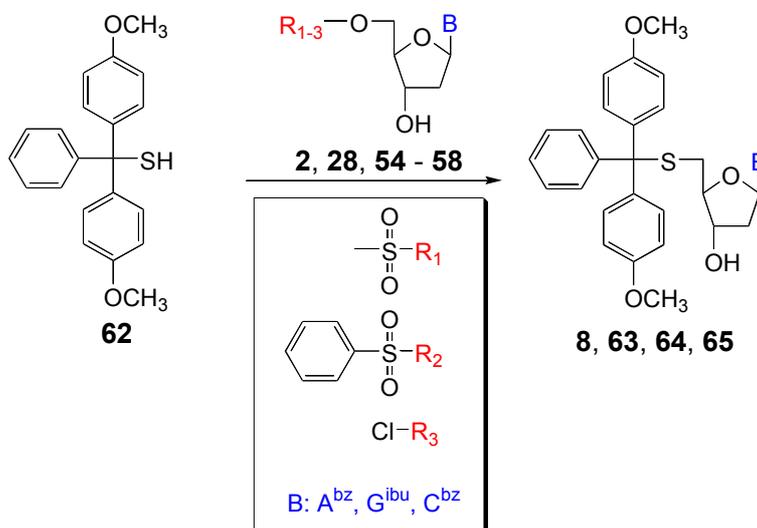
Laufmittel Hexan:EE 3:1 0.66

MALDI-MS (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>S = 336.45 g/mol) Gemessen 336.45 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.24-7.0.6 (m, 9H, aromatisch), 6.75-6.69 (m, 4 H, aromatisch), 3,72 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>)

### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenyl)-5'-mercapto-2'-desoxynukleotide **8, 63, 64, 65**



### Ansatzgröße

5'-X-Nukleosid <b>2, 28, 54 - 58</b>		(1 mmol)
5'-X-Nukleosid (Nr.)	Eingesetzte Menge	Produktnummer
5'-O-Tos-T ( <b>2</b> )	396.42 mg	<b>8</b>
5'-Cl-T ( <b>28</b> )	260.68 mg	
5'-O-Mes-T ( <b>58</b> )	320.32 mg	
5'-O-Tos-A <sup>bz</sup> ( <b>54</b> )	509.43 mg	<b>63</b>
5'-O-Mes-A <sup>bz</sup> ( <b>55</b> )	433.40 mg	

## 5. Experimenteller Teil

5'-O-Mes-G <sup>ibu</sup> ( <b>56</b> )	415.43 mg	<b>64</b>
5'-O-Mes-C <sup>bz</sup> ( <b>57</b> )	409.42 mg	<b>65</b>

505 mg      4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol      (1.5 mmol)  
 0.14 ml     1,1,3,3-Tetramethylguanidin                      (1.11 mmol)  
 10 ml        DMSO

### Durchführung

Das entsprechende 5'-X-Nukleosid **2**, **28**, **54** - **58** und 4,4'-Dimethoxytriphenylmethanthiol **62** werden gemeinsam im Pumpenvakuum über Nacht getrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre wird DMSO zugegeben und 1,1,3,3-Tetramethylguanidin langsam in die Lösung eingetropft. Nach drei Stunden wird per DC (Laufmittel DCM:MeOH 95:5) der Reaktionsfortschritt verfolgt. Sollte zu diesem Zeitpunkt die Reaktion beendet sein, wird die Reaktionslösung in 300 ml gekühltes Dichlormethan eingegossen und die organische Lösung mit 150 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert (Achtung! Druck!). Die wässrige Phase wird mit 100 ml Dichlormethan reextrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und 4 x mit 100 ml Wasser extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Zur Reinigung schließt sich eine Säulenchromatographie mit Laufmittelgemischen aus Dichlormethan und Methanol an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin **8**

#### Ausbeute bei Verwendung von

- |    |                                                  |       |
|----|--------------------------------------------------|-------|
| a. | 5'-Cf-2'-desoxythymidin <b>28</b>                | 63.6% |
| b. | 5'-O-(Tosylsulfonyl)-2'-desoxythymidin <b>2</b>  | 94%   |
| c. | 5'-O-(Mesylsulfonyl)-2'-desoxythymidin <b>58</b> | 97.5% |

#### Rf-Wert

Laufmittel      Dichlormethan:Methanol 9:1                      0.51

ESI(-)-MS (C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S = 559.66 g/mol)                      Gemessen 559.5 [M-H]<sup>-</sup>

#### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.81 (br. s, 1H, N-H), 7.64-7.56 (m, 1H, H-6), 7.35-7.14 (m, 9 H, aromatisch), 6.77-6.71 (m, 4H, aromatisch), 6.14-6.09 (dd, 1H, H-1'), 4.05-4.03 (m, 1H, H-3'), 3.76-3.74 (m, 1H, H-4'), 3,7 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 2.6-2.53 (m, 1H, H-5'), 2.45-2.38 (m, 1H, H-5''), 2.25-2.18 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.78 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-T)

### 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxyadenosin **63**

#### Ausbeute bei Verwendung von

- |    |                                                                          |     |
|----|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| a. | 5'-O-(Tosylsulfonyl)-N <sup>6</sup> -benzoyl-2'-desoxyadenosin <b>54</b> | 94% |
|----|--------------------------------------------------------------------------|-----|

## 5. Experimenteller Teil

b. 5'-O-(Mesylsulfonyl)-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenosin **55** 41%

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.45

ESI(-)-MS (C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S = 673.77 g/mol) Gemessen 672.6 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.08 (br. s, 1H, N-H), 8.65, 8.22 (s, 2H, H-2 und H-8), 7.93-7.92 (m, 2H, ortho-H-Benzoyl), 7.51-7.11 (m, 12H, aromatisch), 6.74-6.68 (m, 4H, aromatisch), 6.27-6.22 (m, 1H, H-1'), 4.33-4.29 (m, 1H, H-3'), 3.77-3.74 (m, 1H, H-4'), 3.69 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 2.74-2.36 (m, 4H, H-5' + H-5'' + H-2' + H-2'')

### 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyryl-5'-mercapto-2'-desoxyguanosin **64**

### Ausbeute bei Verwendung von

a. 5'-O-(Mesylsulfonyl)-N<sup>2</sup>-Isobutyryl-2'-desoxyguanosin **56** 45%

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.43

ESI(+)-MS (C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S = 655.76 g/mol) Gemessen 656.1 [M-H]<sup>+</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 10.24 (br. s, 1H, N-H), 7.66 (s, 1H, H-8), 7.29-7.02 (m, 9H, aromatisch), 6.75-6.62 (m, 4H, aromatisch), 5.98-5.93 (t, 1H, H-1'), 4.98 (s br., 1H, 3'-OH), 4.63 (m, 1H, H-3'), 4.09-4.01 (m, 1H, H-4'), 3.64 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 2.89-2.84 (m, 1H, CH-Isobutyryl), 2.53-2.45 (m, 2H, H-5' + H-5''), 2.31 (m, 2H, H-2' + H-2''), 1.21-1.16 (dd, 6 H, CH<sub>3</sub>-Isobutyryl)

### 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N<sup>4</sup>-benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxycytidin **65**

### Ausbeute bei Verwendung von

a. 5'-O-(Mesylsulfonyl)-N<sup>4</sup>-benzoyl-2'-desoxycytidin **57** 82%

### Rf-Wert

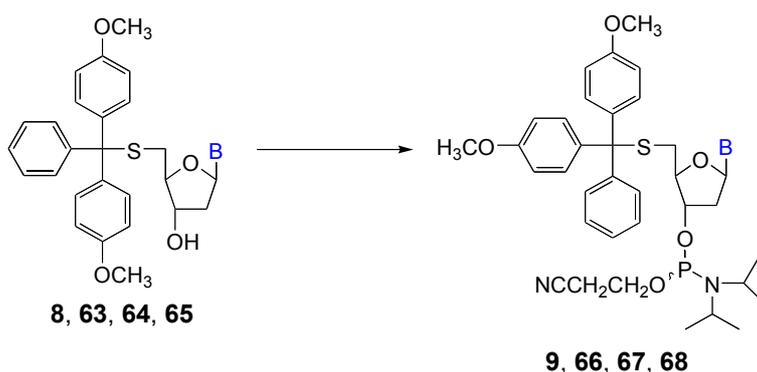
Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.44

ESI(-)-MS (C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S = 649.77 g/mol) Gemessen 634.4 [M-H-(CH<sub>3</sub>)]<sup>-</sup>

NMR

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 8.17-8.15 (m, 1H, H-6), 7.86-7.04 (m, 16H, ortho-H Benzoyl, H-Trityl), 7.81-6.77 (m, 2H, aromatisch), 6.06-6.01 (d, 1H, H-1'), 3.90-3.83 (m, 2H, H-3' + H-4'), 3.73 (s, 6H, 2  $\times$   $\text{OCH}_3$ ), 2.57-2.29 (m, 4H, H-5' + H-5'' + H-2' + H-2'')

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-5'-mercapto-2'-desoxynucleotide-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropyl-phosphite) **9, 66-68**

Ansatzgröße

5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-nucleoside **8, 63 – 65** (1 mmol)

Eingesetztes Edukt Eduktnummer	Eingesetzte Menge	Produktnummer
5'-DMTr-S-T <b>8</b>	559.66 mg	<b>9</b>
5'-DMTr-S-A <sup>bz</sup> <b>63</b>	673.77 mg	<b>66</b>
5'-DMTr-S-G <sup>bu</sup> <b>64</b>	655.76 mg	<b>67</b>
5'-DMTr-S-C <sup>bz</sup> <b>65</b>	649.77 mg	<b>68</b>

0.268 ml Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid (P-Reagenz II) (1.2 mmol)  
 0.51 ml N-Ethyl-diisopropylamin (3 mmol)  
 4 ml DCM  
 4 ml ACN

Durchführung

Das jeweilige 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-5'-mercapto-nucleosid (**8, 63 - 65**) wird über Nacht im Pumpenvakuum getrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre wird Dichlormethan:Acetonitril und DIPEA zugegeben. Das Phosphitlierungs-Reagenz wird langsam bei Eiskühlung zugetropft. Per DC (Laufmittel DCM:MeOH 95:5) wird der Reaktionsfortschritt verfolgt (ca. 1 h). Der Ansatz wird durch die Zugabe von 0.5 ml Butanol gequenchet. Die Lösung wird mit 200 ml Essigsäureethylester verdünnt und 2  $\times$  mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1  $\times$  mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat

## 5. Experimenteller Teil

getrocknet und einrotiert. Der ölige Rückstand wird in 6 ml Dichlormethan:Diethylether aufgenommen und in 120 ml kaltes n-Pentan einpipettiert. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit wenig kaltem n-Pentan nachgewaschen und am HV getrocknet.

### Analytik 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-5'-mercapto-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) 9

Ausbeute 73%

#### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.65

ESI(+)-MS (C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>PS = 760.86 g/mol) Gemessen 761.2 [M-H]<sup>+</sup>

#### NMR

<sup>31</sup>P-NMR CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
149.55, 149.35 ppm

### Analytik 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N<sup>6</sup>-benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxyadenosin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) 66

Ausbeute 68%

#### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.90  
Dichlormethan:Methanol 95:5 0.81 und 0.77

ESI(+)-MS (C<sub>47</sub>H<sub>52</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>PS = 873.99 g/mol) Gemessen 858.6 [M-H-(CH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>

#### NMR

<sup>31</sup>P-NMR CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
149.99, 149.74 ppm

### Analytik 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N<sup>6</sup>-isobutyryl-5'-mercapto-2'-desoxyguanosin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) 67

Ausbeute 72%

#### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.71  
Dichlormethan:Methanol 95:5 0.37

ESI(+)-MS (C<sub>44</sub>H<sub>54</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>PS = 856.01 g/mol) Gemessen 856.6 [M-H]<sup>+</sup>

NMR

<sup>31</sup>P-NMR CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
150.13, 148.93 ppm

Analytik 5'-S-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N<sup>4</sup>-benzoyl-5'-mercapto-2'-desoxycytidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) **68**

Ausbeute 76.4%

Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.76 und 0.67

ESI(+)-MS (C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>PS = 849.99 g/mol) Gemessen 832.5 [M-H-(CH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>

NMR

<sup>31</sup>P-NMR CDCl<sub>3</sub> + 0.1% DIPEA  
150.43, 149.99 ppm

5.9 Oligodesoxynukleotid-Synthese

Die Synthese der Oligodesoxynukleotide erfolgte wie schon in Abschnitt 2.4.6 beschrieben, nach der Festphasensynthese (Phosphoramidit-Synthesesyklus). Bei den verwendeten Synthesizern handelt es sich entweder um ein 2-Säulengerät der Firma *Perseptive Biosystem* (Expedite 8900) oder dem 4-Säulengerät 394 der Firma *Applied Biosystem* ABI 394.

5.9.1 Reagenzien für die Festphasensynthese

<i>Aktivatorreagenzien</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4% Tetrazol in Acetonitril,</li> <li>• 0.25 M Dicyanimidazol in Acetonitril (1 g in 34 ml ACN)</li> <li>• 0.5 M Pyridiniumhydrochlorid in ACN oder (2.9 g in 50 ml ACN mit Molsieb versetzt)</li> <li>• 0.25 M Benzylthiotetrazol in ACN (1.5 g in 32 ml ACN ⇒ 8 mmol)</li> </ul>
<i>5'-DMTr-Abspaltungslösung</i>	3% Dichloressigsäure in Dichlormethan
<i>Capping-Reagenzien</i>	4-(tBu)-Phenoxyacetic Anhydrid in THF
	16% 1-Methylimidazol
<i>Oxidation</i>	I <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O/Pyridin/THF (3:2:20:75) TBHP
<i>Lösungsmittel</i>	für die Standardamidite und die modifizierten Amidite: Acetonitril (Amidite Diluent)
<i>Trägermaterial</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 µmol Fertigsäulen der Firma <i>Perseptive Biosystem</i>, CPG-Material, 500 Angström</li> <li>• oder selbstgefüllte Säulen der Firma HTI mit CPG-Material, 500 Angström</li> </ul>

### 5.9.2 Synthesezyklen

Die Standardamidite wurden nach dem Standardsynthesezyklus gekuppelt.

Die Kopplung der modifizierten Amidite erfolgte bei Verwendung von 1H-Tetrazol, Dicyanoimidazol (DCI); Pyridiniumhydrochlorid (PyHCl) oder Benzylthiotetrazol (BTT) als Katalysatoren mit einer verlängerten Kopplungszeit von 300 sec für das Amidit und den Katalysator. Der Synthesezyklus für die 5'-Thio-modifizierten Bausteine **9, 66-68** mußte weiterführend modifiziert werden.

Die Abspaltungszeit für die temporäre 5'-Schutzgruppe (DMTr) wurde verlängert, da die Stabilität der -C-S-DMTr-Bindung gegenüber der Detritylierungs-Lösung höher ist, als die der -C-O-DMTr-Bindung. An die Detritylierung schließt sich ein Reduktionsschritt mit einer 220 mM DTT-Lösung an, da ansonsten die freien Thiol-Gruppen auf dem CPG-Material zu Disulfiden reagieren und damit für eine weiterführende Reaktion nicht mehr zugänglich sind.

### 5.9.3 Trägerabspaltung und Entschützung der permanenten Schutzgruppen

Die Abspaltung und Entschützung der Oligodesoxynukleotide erfolgt durch vierundzwanzigstündige Inkubation mit 0.7 ml konzentriertem (32%igem) Ammoniak bei RT für modifizierte Oligodesoxynukleotide. Unmodifizierte Oligodesoxynukleotide wurden bei 55°C für 16 h mit 25%igem Ammoniak behandelt. Die Oligodesoxynukleotide die über die R3-Säule aufgereinigt wurden (5'-DMT-on synthetisierte Oligodesoxynukleotide), konnten direkt auf die Säule gegeben werden (700 µl Probenschleife). Für die Oligodesoxynukleotide, die über die RP-18 Säule aufgereinigt wurden, mußte die ammoniakalische Lösung in der Speed Vac abgezogen werden. Das Pellet wurde anschließend in Wasser aufgenommen und die Lösung, wenn nötig über einen Spritzenfilter filtriert. Es hat sich in der Praxis bewährt, die Lösung nicht vollständig einzurotieren, da ansonsten häufig Löslichkeitsprobleme zu beobachten sind. Wichtig ist hier allerdings, daß kein Ammoniak mehr in der Lösung enthalten sein darf, da ansonsten das Oligodesoxynukleotid nicht auf der Säule bindet ( $t_R < t_0$ ). Es schließt sich die HPLC-Reinigung an. Alle präparativen Reinigungen wurden an der Merck-Anlage durchgeführt.

### 5.9.4 Entschützung der temporären 5'-DMTr-Schutzgruppe

Die DMT-on aufgereinigten Oligodesoxynukleotide werden in einer 80%igen Essigsäure aufgenommen und stehen für ca. 1 h bei RT. Die Essigsäure wird in der Speed Vac abgezogen und das Pellet in einer Salzlösung (1 M Natriumchlorid oder 5 M Ammoniumacetat) aufgenommen. Die Lösung wird mit der dreifachen Menge an Ethanol versetzt und für zwei Stunden bei Eiskühlung gelagert. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert, die überstehende Lösung wird vorsichtig abgegossen oder mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wird kurz (ca. 5 min) in der Speed Vac getrocknet und anschließend in autoklavierten Wasser (meist 1 ml) aufgenommen und die Ausbeute durch UV-Messung bei 260 nm bestimmt. Dazu wird ein Aliquot der Lösung abgenommen, in der Regel 10 µl und mit 990 µl Wasser verdünnt und in eine Glasküvette gefüllt. Die Absorption der Lösung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und die Gesamtmenge berechnet.

### 5.9.5 Modifizierter Syntheszyklus für die Oligodesoxynukleotidsynthese mit den Amiditen **9**, **66-68** (siehe Tabelle 35.).

Reaktion	Reagenz	Standardzyklus		Modifizierter Zyklus	
		sec <sup>a</sup>	Wartezeit	sec <sup>a</sup>	Wartezeit
Detritylierung	3% TCA in DCM	125	20	375	60
Reduktion	50 mM DTT	-	-	60	600
Wasch-	ACN	23	-	60	-
Schritt	DCM	-	-	60	-
Kopplung	Amidit + Tetrazol	12	25	12	300
Capping	Ac <sub>2</sub> O/NMI/THF	10	30	10	30
Oxidation	I <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O/Pyridin	8	15	8	15

<sup>a</sup> Zeit der Reagenzzugabe

Tabelle 35: Vergleich des Standardzyklus und des modifizierten Zyklus (1 µmol-teg-mod-red (**4**))

Die folgenden Oligodesoxynukleotide wurden für dieses Projekt synthetisiert (siehe Tabelle 36.).

Oligodesoxynukleotid (Nr.)	HPLC-Reinigung Ausbeute O.D und %	Berechnete Masse (g/mol)	Gemessene Masse (g/mol)
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-a</b> )	RP-18 22.3 O.D, 16.4%	7309.8	7309.56
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-b</b> )	RP-18 25 O.D, 23.8%		
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-c</b> )	RP-18 28.2 O.D, 21.6%		
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-d</b> )	R3 22.8 O.D, 28.8%		
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-e</b> )	R3 35.8 O.D, 32.8%		
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-f</b> )	R3 66.1 O.D, 61.2%		
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-g</b> )	R3 67.7 O.D, 70.0%		
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' ( <b>69-h</b> )	R3 56.5 O.D, 61.6%		
5'-TAT ACC GTC AAA GTA AGG-3' ( <b>71</b> )	R3 68.7 O.D, 52.5%	5531.7	5529.56
5'-AGC CCT TAC T-3' ( <b>72</b> )	R3 35 O.D, 55.6%	2963.0	2961.42
5'-TTG ACG GTA TAT CT-3' ( <b>73</b> )	R3 66.1 O.D, 75.5%	4268.8	4267.03

5. Experimenteller Teil

5'-TTG ACG GTA TAT CT-3' (74-a)	R3 30.2 O.D, 30%	4284.9	4283.88
5'-TTG ACG GTA TAT CT-3' (74-b)	R3 20.6 O.D, 22.3%		
5'-TTG ACG GTA TAT CT-3' (75-a)	R3 28.5 O.D, 32%	4284.9	4283.81
5'-TTG ACG GTA TAT CT-3' (75-b)	R3 24.4 O.D, 26.5%	4284.9	4283.81
5'-TTG ACG GTA TAT CT-3' (75-c)	R3 42.9 O.D, 50.7%	4284.9	4283.81
5'-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (76)	R3 44.5 O.D, 43.2%	7284.8	7283.88
5'-Amino-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (77-a)	R3 32.3 O.D, 58.7%	7472.94	7475.64
5'-Amino-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (77-b)	R3 72.7 O.D, 66.0%		
5'-Biotin-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (78-a)	R3 72.4 O.D, 58.2%	7699.24	7702.02
5'-Biotin-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (78-b)	R3 67.8 O.D, 52.9%		
5'-Amino-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (79-a)	R3 32.4 O.D, 39.5%	7489.00	7491.35
5'-Amino-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (79-b)	R3 71.0 O.D, 82.3%		
5'-Biotin-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (80-a)	R3 42.3 O.D, 51.6%	7715.30	7717.97
5'-Biotin-ATC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (80-b)	R3 40.1 O.D, 64.4%		
5'-GCA GCT AGA TAT ACC GTC AA-3' (81)	R3 60.7 O.D, 89.5%	6110.00	6112.35
5'-CAG CTA GAT ATA CCG TCA AA-3' (82)	R3 63.5 O.D, 76.8%	6094.00	6096.21
5'-AGC TAG ATA TAC CGT CAA AG-3' (83)	R3 75.2 O.D, 85.9%	6134.10	6136.10
5'-GCT AGA TAT ACC GTC AAA GT-3' (84)	R3 23.1 O.D, 33%	6125.10	6135.89
5'-CTA GAT ATA CCG TCA AAG TA-3' (85)	R3 54.6 O.D, 56.4%	6109.10	6111.32
5'-TAG ATA TAC CGT CAA AGT AA-3' (86)	R3 56.0 O.D, 61%	6133.10	6135.22
3'-AGA TAT ACC GTC AAA GTA AG-3' (87)	R3 88.7 O.D, 85.4%	6158.10	6160.27
3'-GAT ATA CCG TCA AAG TAA GG-3' (88)	R3 24.7 O.D, 33.2%	6174.10	6175.71
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-2' (89-a)	R3 93.9 O.D, 70.1%	7293.80	7292.94
5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-2' (89-b)	R3 62.1 O.D, 69.9%		
5'-AGC CCT TAC (TT)T GAC GGT ATA TCT-2' (90-a)	R3 34.2 O.D		7315.20

## 5. Experimenteller Teil

5'-AGC CCT TAC (TT)T GAC GGT ATA TCT-2' (90-b)	R3 39.4 O.D	7309.8	und (6687.41)
---------------------------------------------------	----------------	--------	------------------

T: Amidit **9** (1 µmol-teg-mod-red (4))

(TT): Dimer **42** (1 µmol-teg-mod-red (4))

Biotin: Biotin Phosphoramidit (1 µmol-Wait-300sec),

Bestell-Nr. 10-1953-95 GlenResearch

Amino: 5'-Amino Modifier C6 (1 µmol-Wait-300sec),

Bestell-Nr. 10-1906-02 Glen Research

RP 18: LiChrospher RP18; 5 µm; 250 × 10 mm; Fluß 4,0 ml/min, Gradient 0-40%  
in 40 min

R3 Säule: R3; Fluß 4 ml/min, Gradient 0-25% (30%) in 12 min.

Tabelle 36: Beinhaltet die charakteristischen Daten der synthetisierten Oligodesoxy-  
nukleotide

### 5.10 Spaltungsreaktionen in Lösung

Die Spaltung der modifizierten Oligodesoxynukleotide erfolgt nach der folgenden  
allgemeinen Arbeitsvorschrift:

Für die Spaltung wird 1 O.D des entsprechenden Oligodesoxynukleotids in 40 µl  
Wasser gelöst und mit 10 µl einer 50 mM Silbernitrat-Lösung versetzt. Um die Probe  
zu quenchen werden 2.5 µl einer 220 mM DTT-Lösung zugesetzt und die Probe nach  
15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand kann mit Hilfe der Gelelektrophorese, der  
HPL-Chromatographie und der Massenspektrometrie untersucht werden.

Die Spaltungsreaktionen wurden mit Hilfe der HPLC-Analytik untersucht, dazu wird  
die Gen-Pak Fax Säule (4.6 mm x 100 mm) verwendet. Der Gradient beträgt 5% auf  
60% B in 30 min (Puffer siehe 4.3, Säule für die Ionenaustausch-Chromatographie).

Für die Gelelektrophorese wurden 5 µl der Spaltungslösung mit 5 µl Formamid  
versetzt und in die Geltaschen aufgetragen (Mini-Gel 10 x 10 cm, 16%iges Gel, 7 M  
Harnstoff, 1 x TBE, 250V).

#### 5.10.1 Spaltungsreaktionen auf dem Chip

Siehe Patent WO 0318838

#### 5.10.2 Spaltungsreaktionen auf dem Biacore<sup>2</sup> Chip

Die Spaltungsversuche wurden an einem BIACORE 1000 Gerät mit einem CM 5  
Chip durchgeführt.

---

<sup>2</sup> A.) Homepage der Firma Biacore ([www.biacore.com](http://www.biacore.com)); B.) F. F. Bier; Habilitationsschrift,  
Universität Potsdam **1997**; C.) L. G. Fagerstam, A. Frostell-Karlssoon, R. Karlssoon, B.  
Persson, I. Ronnberg; *J. Chromatogr.* **1992**, 597, 397-410; D.) E. Kretzschmar, H. Raether;  
*Z. Naturforsch.* **1968**, 23a, 2135; E.) E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky; *J.*  
*Coll. Interf. Sci.* **1991**, 143, 513-526

## 5. Experimenteller Teil

### Verwendete Lösungen und Verbindungen

- HBS-Puffer  
10 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure), pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA (bei gekaufter Ware ist Surfactant P20 enthalten)
  - Silbernitrat-Lösung  
10 mM  $\Rightarrow$  0.169 g Silbernitrat in 100 ml Wasser
  - SDS (Natriumlauryl-sulfat)  
0.05%  $\Rightarrow$  0.05 g in 100 ml Wasser
  - EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraessigsäure)  
0.5 M  $\Rightarrow$  18.6 g in 100 ml Wasser
  - NHS/EDC  
 $\Rightarrow$  100 mM NHS in Wasser und 400 mM EDC in Wasser werden vermischt  $\Rightarrow$  Die Endkonzentration der Reaktionsmischung soll 50 mM NHS und 200 mM EDC betragen
  - Streptavidin-Lösung  
 $\Rightarrow$  Streptavidin wird in einem 10 mM Natriumacetat-Puffer pH5 gelöst
  - Oligodesoxynukleotide
- 80**  $\Rightarrow$  50  $\mu$ mol  $\Rightarrow$  15 O.D in 1.2 ml Wasser
- 81**  $\Rightarrow$  500 nmol  $\Rightarrow$  0.12 O.D in 1 ml
- 84**  $\Rightarrow$  500 nmol  $\Rightarrow$  0.11 O.D in 1 ml
- 88**  $\Rightarrow$  500 nmol  $\Rightarrow$  0.12 O.D in 1 ml

### Durchführung

#### 1. Streptavidin Immobilisierung

- a. Kontinuierlicher Fluß mit dem Puffer HBS (Flußrate 5  $\mu$ l/min)
- b. Injektion von 35  $\mu$ l (7 min) 50 mM EDC / 200 mM NHS
- c. Injektion von 35  $\mu$ l (7 min) Streptavidin (50  $\mu$ g/ml)
- d. Injektion von 35  $\mu$ l (7 min) 0.05% SDS

#### 2. Bindung (a.), Hybridisierung (b.) und Spaltung (c. und d.)

- a. Injektion von 25  $\mu$ l (5 min) des Oligodesoxynukleotids **80** (0.1  $\mu$ g/ml)
- b. Injektion von 25  $\mu$ l (5 min) der Oligodesoxynukleotide **81**, **84**, **88** (500 nM)
- c. 2 x 15  $\mu$ l (2 x 3 min) 10 mM AgNO<sub>3</sub>
- d. 2 x 5  $\mu$ l (2 x 1 min) 0.5 M EDTA

### 5.10.3 Spaltungsreaktionen an Magnetic Beads

Streptavidin beladene Dynabeads (oberflächen-modifiziertes Material mit einem Eisenkern) können direkt zur Immobilisierung von biotinylierten Oligodesoxynukleotiden verwendet werden. Dies bedeutet, daß die Dynabeads biotinylierte Verbindungen aus einer heterogenen Lösung herausfischen können. Die Wasch- und Immobilisierungsprotokolle sind schnell und leicht aufgrund der Verwendung eines Magnets durchzuführen. Ein Nachteil ist die geringe Beladung (1 mg Beads binden 200 pmol eines biotinylierten Oligodesoxynukleotid-Einzelstranges, 650-900 pmol freies Biotin oder 5-10 µg eines biotinylierten Antikörpers) der Beads und ihr hoher Preis. Daher werden sie vor allem in der medizinischen Chemie angewendet, wenn nur eine minimale Menge an Probenmaterial zur Verfügung steht.

Die Beads werden wie folgt geliefert:

10 mg/ml (annähernd  $6-7 \times 10^8$  Beads/ml) in einer phosphat gepufferten Salzlösung bei pH 7.4 versetzt mit 0.1% BSA und 0.02% Natriumazid.

(Vorsicht! Die Beads dürfen nicht in destilliertem Wasser aufgenommen werden und die Lagerung muß in einem entsprechenden Puffer erfolgen. Ebenfalls dürfen die Beads nicht eingefroren oder getrocknet werden, sie verlieren ansonsten ihre Aktivität. Die Bindungskapazität hängt stark von der Salzkonzentration der Immobilisierungslösung ab, die ideale Salzkonzentration beträgt ca. 1 M NaCl.)

Das verwendete Waschprotokoll gestaltet sich wie folgt:

1. Die abgesetzten Beads werden durch leichtes Schütteln suspendiert.
2. Die benötigte Menge an Beads wird mit einer Pipette abgenommen und in ein Cap überführt.
3. Das Cap wird in den „Magnet-Stand“ gestellt und die Beads werden separiert (Lösung – Beads).
4. Die überstehende Lösung wird mit Hilfe einer Pipette abgenommen.
5. Die Beads werden in einem PBS Puffer, pH 7.4 (0.16 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0.98 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 8.1 g NaCl in 1L Wasser) aufgenommen und suspendiert.
6. Die Schritte 3 – 5 werden zweimal wiederholt, es schließt sich die Immobilisierung des biotinylierten Einzelstranges an.

### Immobilisierung

7. Die Beads werden zweimal mit einem 2 x B&W-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2.0 M NaCl  $\Rightarrow$  Binding & washing Puffer) gewaschen.
8. Die Beads werden in 2 x B&W-Puffer und Wasser suspendiert. Das biotinylierte Oligodesoxynukleotid wird in Wasser gelöst zugegeben, so daß eine Endkonzentration der Lösung von 1 M NaCl eingestellt wird.
9. Die Immobilisierungslösung steht für 15 min bei RT (Reaktionszeit für Oligodesoxynukleotide < 1kb).  
Entgegen der gängigen Immobilisierungsvorschrift<sup>3</sup> werden die Schritte 9 – 10 zweimal wiederholt, um die Immobilisierungseffektivität zu steigern.
10. Die Immobilisierungslösung wird abgenommen und die Beads werden zweimal mit dem 2 x B&W-Puffer gewaschen.

---

<sup>3</sup> Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Herausgeber Firma Dynal (Jahrgang 1997)

## 5. Experimenteller Teil

Es schließt sich direkt die Spaltungsreaktion durch die Zugabe einer Silbernitrat-Lösung an. Ist dies aus technischen oder zeitlichen Gründen nicht möglich, müssen die Beads in einem entsprechenden Puffer gelagert werden und vor der Spaltungsreaktion nochmals mit dem 2 x B&W-Puffer gewaschen werden.

- Die Beads werden in einer 10 mM AgNO<sub>3</sub> Lösung in PBS-a Puffer, pH 7.4 (1.7 g AgNO<sub>3</sub>, 0.16 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0.98 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O in 1 L Wasser) suspendiert. Die Spaltungslösung wirkt 1 h auf die Beads ein, die durch saches Schütteln alle 5 min suspendiert werden. Die Lösung wird abgenommen und mit Hilfe der HPL-Chromatographie untersucht. Der Gradient startet bei 5% Puffer B und wird in 30 min auf 60% Puffer B erhöht. Die Retentionszeit des Spaltungsprodukt beträgt 24.59 min das entspricht der zuvor bestimmten Retentionszeit für das 14 mer.

Das HPLC-Spektrum (GenPak-Fax Säule, Labor Aventis GmbH) zeigt das entsprechende Spaltungsprodukt. Es ist jedoch festzustellen, daß die Spaltung nicht quantitativ verläuft, da die detektierte Konzentration des Spaltungsprodukts sehr gering ist (UV-Absorption). Allerdings ist in diesem Fall auch die Adsorption des Spaltungsprodukts an den Beads oder des Caps möglich, so dass eine zu geringe Spaltungsausbeute per HPLC detektiert wird.

### 5.11 Post-Labeling Reaktion

Die Synthese der Oligodesoxynukleotide **126** und **129-a** erfolgt im 1 µmol Maßstab DMT-on.



Die 5'-DMT-Schutzgruppe wird am DNA-Synthesizer mit der Detritylierung-Lösung, abgespalten bis keine Orangefärbung mehr auftritt.



Das CPG-Material wird in einer 220 mM DTT-Lösung (0.65 g DTT in 13 ml THF/ 1.9 ml Pyridin/ 3.75 ml Wasser) suspendiert und nach 10 min abgesaugt und kurz mit Methanol und Acetonitril gewaschen. Anschließend wird es für 24 h zu einer Lösung aus

1 mg IAF in 500 µl DMF,

100 µl Wasser und

10 µl 1 M Tris x HCl pH 8

gegeben. Das Trägermaterial wird abgesaugt, mit Methanol und Acetonitril gewaschen und für 24 h mit 25% iger Ammoniak-Lösung inkubiert. Die ammoniakalische Lösung wird in der Speed-Vac abgezogen und der Rückstand mit Hilfe der HPL-Chromatographie analysiert und gereinigt (RP-18-Säule, Gradient: 15% auf 60% B in 25 min; Puffer B: MeOH)

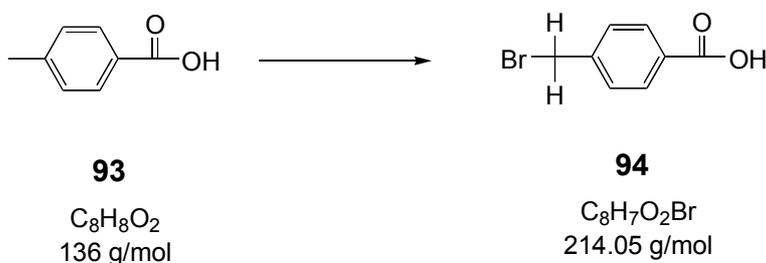
Verbindung	Ausbeute	Gradient	Berechnete Masse	Gefundene Masse
<b>128</b>	43%	10-50% B in 25 min	4672.24	4672.8
<b>129</b>	58%	10-50% B in 25 min	4600.18	4601.55

## 5.12 Punktmutationsdetektion durch festphasenvermittelte SNuPE und MALDI-MS

### 5.12.1 Synthese der Einzelverbindungen

#### 4-Brommethyl-3-Benzoessäure **94**

Literaturstelle A.) D. H. Rich, S. K. Gurwara; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1575-1579; B.) D. H. Rich, S. K. Guawara; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 5, 301-304



### Chemikalien

AIBN  $C_8H_{12}N_4$ , 164,2 g/mol; purum, >98 %

Bromsuccinimid (NBS)  $C_4H_4BrNO_2$ , 178.0 g/mol, purum, >98%

Benzol  $C_6H_6$ , 78,11 g/mol, >99,5 %, puriss., Sdp. 80 °C, d 0.879

### Ansatzgröße

0.4 g	AIBN	(2.4 mmol)
17.8 g	N-Bromsuccinimid	(100 mmol)
13.6 g	4-Methyl-3-Benzoessäure <b>93</b>	(100 mmol)
100 ml	Benzol	

### Durchführung

4-Methyl-3-Benzoessäure **93** wird in Benzol suspendiert, AIBN und Bromsuccinimid werden portionsweise über eine Stunde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird zum Sieden erhitzt (laut Literatur ist die Reaktion nach 24 h vollständig), der Reaktionsfortschritt wird per DC verfolgt, dabei kann festgestellt werden, daß das Edukt und Produkt einen identischen Rf-Wert besitzen, so daß eine Unterscheidung nur durch ihr unterschiedliches Anfärbeverhalten mit der MOPS-Lösung erfolgen kann. Das Reaktionsgemisch siedet vier Tage. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der Feststoff wird in 100 ml heißem Wasser suspendiert. Der Niederschlag wird



## 5. Experimenteller Teil

Der Niederschlag wird getrocknet und mit einem Gemisch aus Dichlormethan:Hexan umkristallisiert.

### Analytik

R = 11.61 g = 81% (100% ige Ausbeute = 14.34 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 0.23

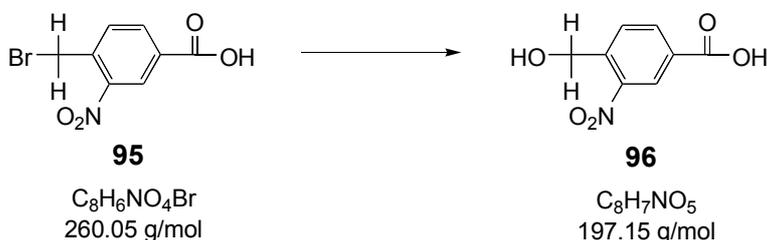
MALDI-MS ( $C_8H_6NO_4Br = 260.05$  g/mol) Gemessen 258.0 und 260 [M-H]<sup>-</sup> (zudem wurde ein Dimer bei 516.9, 519.0 und 520.9 g/mol detektiert; die Messungen zeigen das typische Isotopenmuster für Brom-haltige Derivate!)

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.94 (s, 1H, aromatisch C-2), 8.4 (s, 1H, aromatisch C-6), 7.53 (s, 1H, aromatisch C-5), 4.56 (s, 2H, CH<sub>2</sub>)

## 4-Hydroxymethyl-3-Nitrobenzoesäure 96

Literaturstelle N. Kneib-Cordonier, F. Albericio, G. Barany, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 527-538



### Chemikalien

Natriumjodid NaI, 149.89 g/mol, reinst

### Ansatzgröße

1 g	4-Brommethyl-3-Nitrobenzoesäure <b>95</b>	(3.8 mmol)
0.071 g	Natriumjodid	(0.426 mmol)
100 ml	Wasser	

### Durchführung

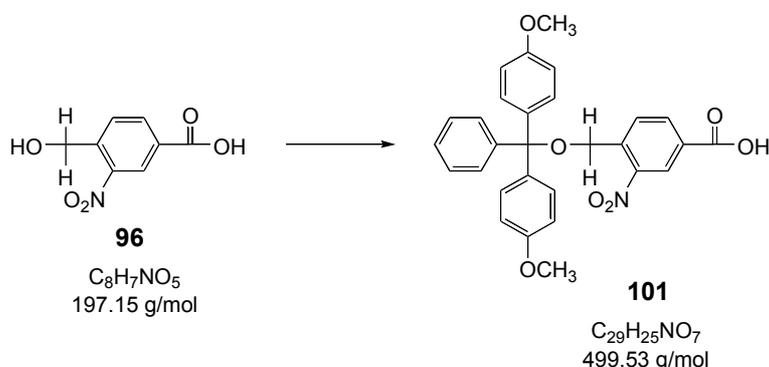
Eine Mischung aus 4-Brommethyl-3-Nitrobenzoesäure **95** und Natriumjodid in Wasser wird für 16 h bei 95°C behandelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch abgekühlt, der Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und das Rohprodukt aus heißem Wasser umkristallisiert.

Analytik

R = 0.49 g = 64% (100% ige Ausbeute = 0.76 g)

Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.17

MALDI-MS ( $C_8H_7NO_5 = 197.15 \text{ g/mol}$ ) Gemessen 196.2 [M-H]<sup>-</sup>NMR<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.75 (d, 1H, aromatisch C-2), 8.28-8.26 (dd, 1 H, aromatisch C-6), 7.66-7.64 (d, 1H, aromatisch), 4.83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>)4-(4,4'-Dimethoxytrityl)-hydroxymethyl-3-Nitrobenzoesäure 101Chemikalien4,4'-Dimethoxytritylchlorid  $C_{21}H_{19}ClO_2$ , 338.84 g/mol, purum; ≥ 97%2-Dimethylaminopyridin  $C_7H_{10}N_2$ , 122.17 g/mol, purum; ≥ 98%Triethylamin  $C_6H_{15}N$ , 101.19 g/mol, puriss. p.a.; ≥ 98%, d 0.726Pyridin  $C_5H_5N$ , 79.1 g/mol, d 0.983, puriss.; über Molsieb, ≥ 99.8%Ansatzgröße

0.25 g	4-Hydroxymethyl-3-nitrobenzoesäure <b>96</b>	(1.27 mmol)
7.7 mg	DMAP	(0.06 mmol)
0.176 ml	TEA	(1.27 mmol)
0.516 g	DMTr-Cl	(1.52 mmol)

Durchführung

4-Hydroxymethyl-3-nitrobenzoesäure **96** wird in 10 ml Pyridin gelöst, und DMAP, TEA und DMTr-Cl zugegeben. Der Ansatz rührt über Nacht, laut DC (LM DCM:MeOH 9:1) ist die Umsetzung vollständig. Die Reaktionslösung wird einrotiert, der ölige Rückstand wird in DCM aufgenommen und je 1 x mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zur Aufreinigung schließt sich eine

## 5. Experimenteller Teil

Säulenchromatographie mit dem Laufmittel DCM:MeOH 9:1 + 0.5% Triethylamin an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Analytik

R = 0.58 g = 91.8% (100% ige Ausbeute = 0.63 g)

### Rf-Wert

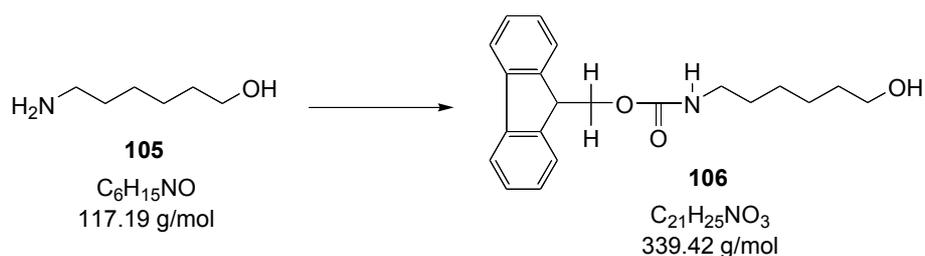
Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.46

ESI(-)-MS ( $C_{29}H_{25}NO_7 = 499.53$  g/mol) Gemessen 498.1 [M-H]<sup>-</sup>

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.40 (d, 1H, aromatisch C-2), 8.25-8.22 (dd, 1 H, aromatisch C-6), 8.00-7.96 (d, 1H, aromatisch), 7.46-7.29 (m, 9H, aromatisch), 6.91-6.89 (m, 4H, aromatisch), 4.50 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>)

### 6-(Fmoc-amino)-1-hexanol 106



### Chemikalien

Fmoc-OSu  $C_{19}H_{15}NO_5$ , 337.33 g/mol

Aminohexanol  $C_6H_{15}NO$ , 117.19 g/mol, Sdp. 135-140°C/30mm, Smp. 56-58°C

Natriumcarbonat  $Na_2CO_3$ , 105.99 g/mol, wasserfrei, > 99,5 %

DMF  $C_3H_7N$ , 73.1 g/mol, puriss., > 98%, abs. über Molsieb, d 0.984

### Ansatzgröße

2.34 g	Aminohexanol <b>105</b>	(20 mmol)
5.3 g	Fmoc-OSu	(16 mmol)

### Durchführung

Aminohexanol **105** wird zu 50 ml einer 5%igen Natriumcarbonat-Lösung gegeben (Eiskühlung). Fmoc-OSu wird in 50 ml DMF gelöst und langsam zu der Lösung zugetropft. Dabei bildet sich beim Zutropfen der Lösung sofort ein NS aus. Der Reaktionsansatz rührt für 15 min bei Eiskühlung. Es erfolgt eine DC-Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1), laut dieser ist die Umsetzung nicht vollständig. Die Reaktion rührt eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird der Ansatz in 600 ml Wasser eingegossen und 1 × mit Ether und 2 × mit EE extrahiert, laut DC geht das

## 5. Experimenteller Teil

Produkt in die organische Phase über, die vereinigten organischen Phasen werden 1 × mit 5%iger Natriumcarbonat-Lösung und 1 × mit ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und einrotiert.

### Analytik

R = 4.88 g = 72% (100% ige Ausbeute = 6.78 g)

### Rf-Wert

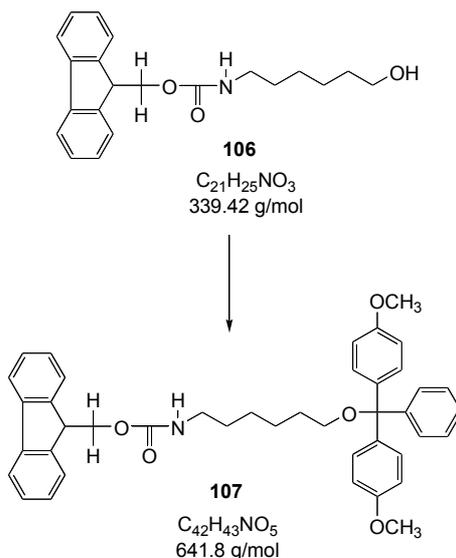
Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 0.5

ESI(+)-MS (C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub> = 339.42 g/mol) Gemessen 340.2 g/mol

### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.84 (m, 2H, arom.), 7.55 (m, 2H, arom.), 7.38 (m, 2H, arom.), 7.28 (m, 2H, arom.), 4.35-4.27 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)), 4.25-4.20 (m, 1H, C-H), 3.4-3.29 (m, 4H, C-6 + C-1), 1.55-1.29 (m, 8H, C-5 – C-2)

### 1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-(Fmoc-amino)-1-hexanol 107



### Chemikalien

4,4'-Dimethoxytritylchlorid C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>2</sub>, 338.84 g/mol, purum; ≥ 97%

2-Dimethylaminopyridin C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>, 122.17 g/mol, purum; ≥ 98%

Triethylamin C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N, 101.19 g/mol, puriss. p.a.; ≥ 98%, d 0.726

Pyridin C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 79.1 g/mol, d 0.983, puriss., über Molsieb; ≥ 99.8%

### Ansatzgröße

3.39 g	6-(Fmoc-amino)-1-hexanol <b>106</b>	(10 mmol)
6 mg	DMAP	(0.5 mmol)
1.4 ml	TEA	(10 mmol)
4.07 g	DMTr-Cl	(12 mmol)

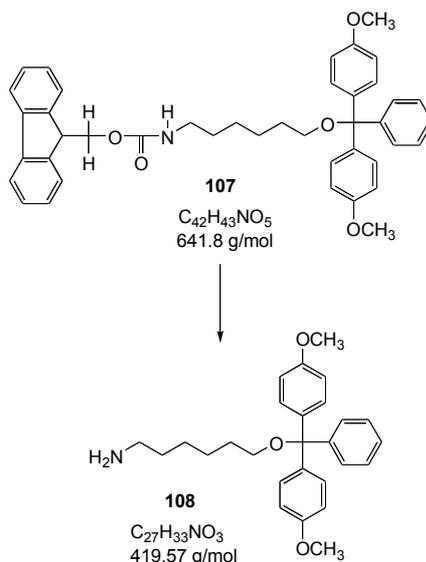
Durchführung

6-(Fmoc-amino)-1-hexanol **106** wird in 50 ml Pyridin gelöst, und DMAP, TEA und portionsweise DMTr-Cl zugegeben. Der Ansatz rührt über Nacht, laut DC (LM DCM:MeOH 97:3) ist eine Aussage über die Umsetzung nicht möglich, da das DMTr-Cl den gleichen Rf-Wert, wie das Produkt besitzt. Die Reaktionslösung wird einrotiert, der ölige Rückstand wird in DCM aufgenommen und je 1 x mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet (Rückstand = 5.9 g).

Analytik

R = 5.9 g = 92.2% (verunreinigt) (100% ige Ausbeute = 6.4 g)

ESI-MS (C<sub>42</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>5</sub> = 641.8 g/mol) nicht gemessen!

1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-amino-hexanol **108**Chemikalien

Diethylamin C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N, 73.14 g/mol, d 0.704, puriss. ≥ 99.7%

DMF C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N, 73.1 g/mol, d 0.984, puriss.; absolut; über Molsieb

Ansatzgröße

5.5 g	1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-(Fmoc-amino)-hexanol <b>107</b>	(7.8 mmol)
10 ml	DMF	
2 ml	Diethylamin	(19.2 mmol)

Durchführung

1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-(Fmoc-amino)-hexanol **107** (Rohprodukt) wird in DMF gelöst und 1 ml Diethylamin zugegeben, der Ansatz rührt 30 min dann erfolgt eine

## 5. Experimenteller Teil

DC Kontrolle (LM DCM:MeOH 9:1), laut DC ist die Abspaltung nicht vollständig. Die Lösung rührt weitere 15 min eine DC Kontrolle zeigt, daß die Abspaltung nicht vollständig ist. 1 ml Diethylamin wird zugegeben und die Reaktionslösung rührt weitere 30 min. Der Ansatz wird mit 200 ml DCM versetzt und 2 x mit einer 5%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert, die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Es schließt sich eine Säulenchromatographie (breite und sehr kurze Säule) mit dem Laufmittel DCM:MeOH 8:2 + 0.5%  $\text{NEt}_3$  an. Die Produktfraktionen werden vereinigt und einrotiert.

### Analytik

R = 2.46 g = 74.5% (100% ige Ausbeute = 3.3 g)

### Rf-Wert

Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1 nicht bestimmt

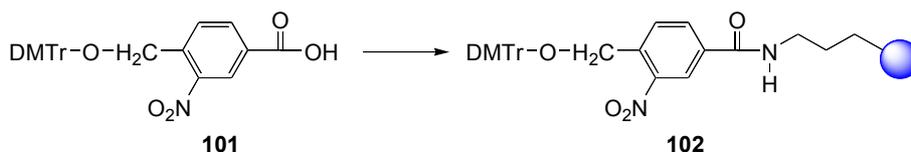
ESI-MS ( $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_3 = 419.57 \text{ g/mol}$ ) Gemessen 303.0 (DMT-Gruppe)

### NMR

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.39\text{-}7.21$  (m, 9H, aromatisch), 6.92-6.85 (m, 4H, aromatisch), 3.73 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ), 2.97-2.93 (t, 2H,  $-\text{O-CH}_2$ ), 2.52-2.48 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ), 1.48-1.40 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 1.35-1.20 (m, 6H,  $-\text{CH}_2-$ )

### 5.12.2 Trägerbeladung

#### Trägerbeladung von Aminopropyl-CPG 102



### Chemikalien

O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tertramethyluronium (TBTU)  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{BF}_4\text{N}_5\text{O}$ , 321.08 g/mol, purum, > 97%

4-Ethylmorpholin (N-EM)  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}$ , 115.18 g/mol, purum ca. 97%, d 0.913

DMF  $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ , 73.1 g/mol, d 0.984, puriss.; absolut; über Molekularsieb

### Ansatzgröße

Chemikalien	Trägerbeladung 22.5 $\mu\text{mol/g}$ (Soll)	Trägerbeladung 100 $\mu\text{mol/g}$ (Soll)	Trägerbeladung 200 $\mu\text{mol/g}$ (Soll)
<b>101</b>	11 mg (22.5 $\mu\text{mol}$ )	50 mg (100 $\mu\text{mol}$ )	100 mg (200 $\mu\text{mol}$ )
TBTU	7 mg (22.5 $\mu\text{mol}$ )	32 mg (100 $\mu\text{mol}$ )	64 mg (200 $\mu\text{mol}$ )
NEM	3 $\mu\text{l}$ (27 $\mu\text{mol}$ )	15 $\mu\text{l}$ (120 $\mu\text{mol}$ )	30 $\mu\text{l}$ (200 $\mu\text{mol}$ )
Träger	0.5 g	0.5 g	0.5 g

## 5. Experimenteller Teil

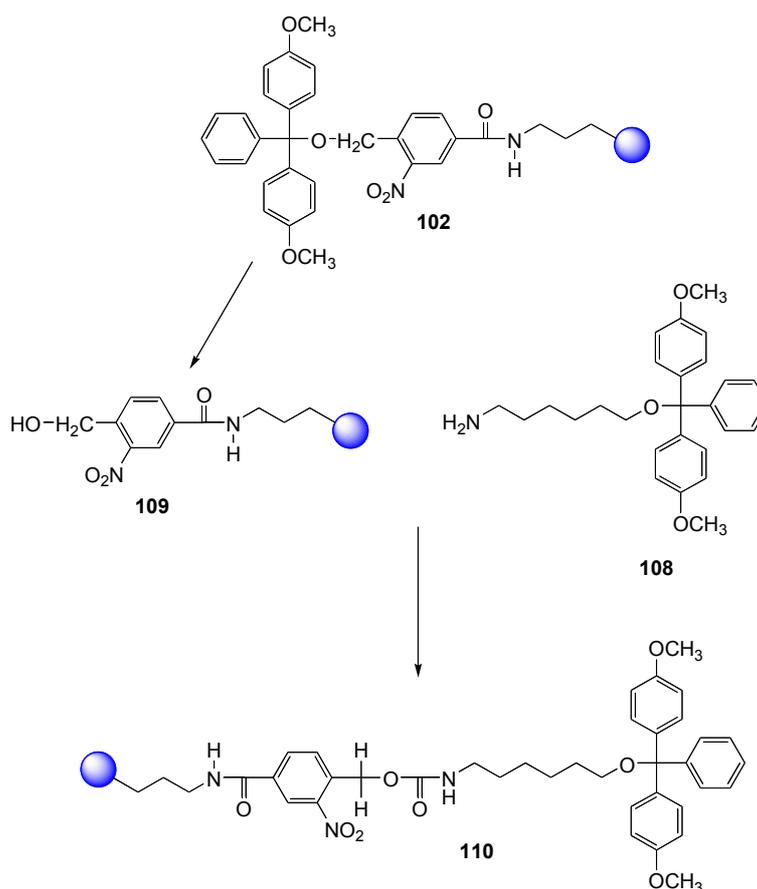
DMF	4 ml	4 ml	4 ml
Beladung	21.6 $\mu\text{mol/g}$	90.2 $\mu\text{mol/g}$	179.2 $\mu\text{mol/g}$

### Durchführung

**101**, TBTU und N-EM werden in 2 ml DMF gelöst und 10 min voraktiviert, bevor die Lösung zum Trägermaterial gegeben wird. Das Trägermaterial wird über Nacht saft geschüttelt, abgesaugt und mit MeOH, DCM und ACN gewaschen. Die Beladungsdichte wird bestimmt (Einwaage des Trägermaterials in einen 10 ml Messkolben und Zugabe der Detritylierungslösung, Messung der UV-Absorption bei 498 nm). Bei erfolgreicher Kopplung werden die noch freien funktionellen Gruppen mit den Capping Lösungen des Synthesizers gecappt. Das Trägermaterial wird anschließend nochmals gewaschen und getrocknet.

### Beladung des Trägermaterials **109** mit 1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-amino-1-hexanol **108**

Literaturstelle H.A. Staab, *Angew. Chemie* **1962**, 74 (12), 407-423



### Chemikalien

1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O, 162.15 g/mol, ca. 97%  
Tetrahydrofuran C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O, 72,11 g/mol, >99 %, Sdp. 65,8-66,2 °C

Ansatzgröße

250 mg	Trägermaterial <b>102</b>	(Ausgangsladung 179 µmol/g)
7.5 mg	CDI	(44.80 µmol)
56.5 mg	1-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-amino-1-hexanol <b>108</b>	(134.4 µmol)
2 ml	THF	

Durchführung

Die Detritylierung der Verbindung **102** erfolgt mit der Detritylierungslösung des DNA-Synthesizers (3% DCA in DCM). Das Trägermaterial wird nach der erfolgten Detritylierung am HV getrocknet und anschließend in THF aufgenommen und mit CDI für 1.5 h aktiviert. Die Komponente **108** wird zugegeben und das Trägermaterial wird sacht für 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend wird es abgesaugt, mit DCM, MeOH und DCM gewaschen und im HV getrocknet.

Beladungsdichte

Um die Beladungsdichte des Trägermaterials **110** zu bestimmen, werden 2 x 1.16 mg Trägermaterial in einen 10 ml Meßkölbchen eingewogen und 0.1 molare p-Toluolsulfonsäure in ACN zugegeben und die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 498 nm gemessen.

<u>Absorption</u>	I	1.2439	$(1.2439 \text{ abs} \times 143)/1.16 \text{ mg} = \mathbf{153.3 \mu\text{mol/g}}$
	II	1.2436	$(1.2436 \text{ abs} \times 143)/1.16 \text{ mg} = \mathbf{153.3 \mu\text{mol/g}}$

Capping

Das Trägermaterial wird mit den beiden Capping-Lösungen Cap A und Cap B des Synthesizers behandelt. Anschließend wird das Material mit MeOH, DCM und ACN gewaschen und im Vakuum getrocknet.

5.12.3 Synthese und Massenbestimmung der verschiedenen trägergebundenen Oligodesoxynukleotiden **113, 115, 118 - 123**

5'-T TTT TTT TTT-Linker-CPG	<b>113</b>
5'-TT TTT TTT TT <sub>PS</sub> T-Linker-CPG	<b>115</b>
5'-AGC AGC CAG <sub>PS</sub> T-Linker-CPG	<b>118</b>
5'-CGG TTG CTA A <sub>PS</sub> T-Linker-CPG	<b>119</b>
5'-GAC TTA CCG G <sub>PS</sub> T-Linker-CPG	<b>120</b>
5'-TAA TGC CGA C <sub>PS</sub> T-Linker-CPG	<b>121</b>
5'-CTC GTA TCA G <sub>PS</sub> T-Linker-CPG	<b>122</b>
5'-ATC GCT ACT T <sub>PS</sub> T-Linker-CPG	<b>123</b>

## 5. Experimenteller Teil

Chemikalien      siehe DNA-Synthese

Ansatzgröße      1 µmol, DMT-off, Trägermaterial **110**

### Verwendeter Syntheszyklus

1 µmol-teg-mod-red (4) ⇒ Amidit **9**

1 µmol Standardsyntheszyklus ⇒ Standard-Amidite

MALDI-Experiment      Matrix: ATT + Ammoniumcitrat

Für die Freisetzung (Messung) wird das Trägermaterial direkt mit dem Matrix Gemisch auf dem Probenhalter des MALDI-Gerätes gemischt und eingetrocknet.

Berechnete Massen	Ansatz-Nummer Matrix	Gemessen	Abweichung
a.) T <sub>10</sub> unmodifiziert 2979.99 g/mol	<b>115</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	3016.63 3016.63	a.) + 36.64 b.) - 27.34
	<b>115 + Ag</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	Nicht auswertbar!	
b.) T <sub>10</sub> -3'-Phosphat 3043.97 g/mol	<b>115</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	3065.59	b.) + 21.62
c.) T <sub>11</sub> -3'-OH 3300.25 g/mol	<b>115</b> α-cyano	Nicht Auswertbar	
d.) T <sub>11</sub> -3'-Phosphat 3365.23 g/mol	<b>115</b> α-cyano	3051.09 3289.20 3628.23	b.) + 7.12 c.) - 11.05 e.) + 28.77
	<b>115 + Ag</b> ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	Nicht auswertbar	
e.) T <sub>11</sub> -3'-Linker 3599.46 g/mol	<b>115</b>	2979.07	a.) + 0.92
		3000	a.) + 20.0
	ATT, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , nH	3012.49	a.) + 32.5
		3012.49	b.) - 31.5
		3315.16	c.) + 14.9

Das Oligodesoxynukleotid **115** wurde ein zweites Mal synthetisiert und das Trägermaterial in drei Teile geteilt und

- mit 50 mM Ammoniumacetat Lösung
- mit Ammoniak für 4 h bei Raumtemperatur, 50 mM Ammoniumacetat Lösung
- mit EDA-Mix (50:23.75:23.75:2.5 EDA:ACN:EtOH:Wasser) für 3 h bei Raumtemperatur, 50 mM Ammoniumacetat Lösung

behandelt.

Die Trägermaterialien wurden anschließend mit dem Matrix-Gemisch versetzt und die Spaltungsprodukte nach dem Beschuss mit dem MALDI-Laser detektiert.

## 5. Experimenteller Teil

Lösung	Gefundene Massen	Berechnete Massen	Differenzen
Ammoniumacetat	3596.25 3970.69	3599.46 <sup>a</sup> ?	- 3.21
Ammoniak	3064.67 3386.39	3043.97 <sup>b</sup> 3365.23 <sup>c</sup>	+ 20.7 + 21.16
EDA	3061.54 3383.11	3043.97 <sup>b</sup> 3365.23 <sup>c</sup>	+ 17.57 + 17.88

<sup>a</sup> : T<sub>11</sub>-3'-Linker; <sup>b</sup> : T<sub>10</sub>-3'-Phosphat; <sup>c</sup> : T<sub>11</sub>-3'-Phosphat

Die folgenden Oligodesoxynukleotide wurden mit der EDA-Lösung entschützt, mit Ammoniumacetat behandelt und mit der Matrix vermischt, vermessen.

Oligodesoxynukleotid	Berechnete Masse	Gefundene Masse	Differenz
5'-AGC AGC CAG <sub>P</sub> -3' <b>118</b>	2797.83	2152.64	
5'-C AGC CAG <sub>P</sub> -3' <sup>b</sup> <b>118</b>	2154.41	2152.64	- 1.77
5'-CGG TTG CTA A <sub>P</sub> -3' <b>119</b>	3108.02	3120.01	+ 11.99 <sup>a</sup>
5'-GAC TTA CCG G <sub>P</sub> -3' <b>120</b>	3093.01	3104.65	+ 11.64 <sup>a</sup>
5'-TAA TGC CGA C <sub>P</sub> -3' <b>121</b>	3077.01	3089.19	+ 12.18 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> : Eichung des MALDI-Geräts weicht um ca. 12 Masseinheiten ab.

<sup>b</sup> : Das Dimer am 5'-Ende AG wurde während der Messung abgespalten.

Das Oligodesoxynukleotid **122** wurde mit dem EDA-Mix behandelt und es wurden Proben nach: 1 h, 2 h und 3 h vermessen.

Behandlung	Gemessene Masse	Berechnete Masse	Qualität des Spektrums
Unbehandelt	-	-	Nicht auszuwerten
1 h	3089.59	3066.99 (+ 22.60) <sup>a</sup>	Starker Untergrund
2 h	3085.48	3066.99 (+ 18.49) <sup>a</sup>	Gute Qualität
3 h	3094.92 3430.69	3066.99 (+ 27.93) <sup>a</sup> 3387,25 (- 43.44) <sup>b</sup>	Starker Untergrund

<sup>a</sup> : 5'-CTC GTA TCA G<sub>P</sub>-3'; <sup>b</sup> : 5'-CTC GTA TCA G<sub>PS</sub>T<sub>P</sub>-3'

Das Oligodesoxynukleotid **123** wurde mit dem EDA-Mix behandelt und es wurden Proben nach: 1 h, 2 h, 3 h und 5 h vermessen.

Behandlung	Gemessene Masse	Berechnete Masse	Qualität des Spektrums
Unbehandelt	-	-	Nicht auszuwerten
1 h	3063.14	3041.98 (+ 21.16) <sup>a</sup>	Sehr gute Qualität
2 h	3063.54 3381.41	3041.98 (+ 21.56) <sup>a</sup> 3362.24 (+ 19.17) <sup>b</sup>	Gute Qualität
3 h	3060.8 3379.38	3041.98 (+ 18.82) <sup>a</sup> 3362.24 (+ 17.14) <sup>b</sup>	Höhere Masse überwiegt
5 h	2979.24 3378.73	3041.98 (- 62.74) <sup>a</sup> 3362.24 (+ 16.49) <sup>b</sup>	Starker Untergrund

<sup>a</sup> : 5'-ATC GCT ACT T<sub>P</sub>-3'; <sup>b</sup> : 5'-ATC GCT ACT T<sub>PS</sub>T<sub>P</sub>-3'

### Synthese des Oligodesoxynukleotids 124

## 5. Experimenteller Teil

Sequenz 3'-TCC TCA GCT TAG CGA TGA TGC ATC CCT -5'

Synthesezyklus 1 µmol Standardzyklus, DMT-on Synthese

HPLC-Reinigung R3-Säule (Gradient 0-40% in 20 min),  
Ausbeute: 82 O.D (als Ammonium-Salz gefällt)

MALDI Berechnet 8186.35 g/mol  
Gemessen 8208.14 [M-Na]<sup>-</sup>

### Doppelstrangexperiment des trägergebundenen Oligodesoxynukleotid **123** und dem Oligodesoxynukleotid **124**

3'-TCC TCA GCT TAG CGA TGA TGC ATC CCT-5' **124**  
5'-ATC GCT ACT T<sub>PS</sub>T-Linker-CPG **123**

1 mg Träger der Verbindung **123** (theoretisch) ⇒ 0.66 O.D oder 6.67 nmol  
1 nmol **124** ⇒ 0.272 O.D

Doppelstrangexperiment: 2 mg **123** (13.34 nmol)  
3.62 O.D **124** (13.34 nmol)  
in 200 µl Wasser aufgenommen

Durchführung: Die Verbindungen **123** und **124** werden in Wasser aufgenommen, auf 90°C erwärmt und anschließend langsam abgekühlt. Das Trägermaterial wird direkt aus der Lösung entnommen und mit der Matrix (ATT + Ammoniumcitrat + norHarman) vermischt und vermessen.

Oligodesoxynukleotid	Gefundene Masse	Berechnete Masse
<b>123</b>	3043.68 (1498.7)	3041.98 (- 1.7)
<b>124</b>	8193.80 (4101.88)	8186.35 (- 7.45)

### 5.12.4 Synthese der inversen Oligodesoxynukleotide **155** und **156**

**3'**-CTC GTA TCA G<sub>PS</sub>T-Linker-CPG **155**

**3'**-ATC GCT ACT T<sub>PS</sub>T-Linker-CPG **156**

Chemikalien siehe DNA-Synthese, anstelle der Standard-Amidite werde hier die entsprechend inversen Bausteine (3'-DMT-geschützt, 5'-Phosphitiliert) der Firma *Transgenomic* verwendet.

3'-DMT-adenosine-5'-CEPA 22-9420-19

3'-DMT-guanosine-5'-CEPA 22-9410-19

3'-DMT-cytidine-5'-CEPA 22-9430-19

3'-DMT-thymidine-5'-CEPA 22-9400-19

Die Amidite werden 0.1 molar gelöst und mit Pyridiniumhydrochlorid oder Benzylthiotetrazol als Katalysatoren mit einer Reaktionszeit von 300 sec gekoppelt. Bei der Verwendung von DCI als Katalysator ist die Kopplungsausbeute zu gering um von dem Trägermaterial ein entsprechendes Massenspektrum aufzunehmen.

Ansatzgröße 1 µmol, DMT-off, Trägermaterial **110**

Verwendeter Synthesezyklus

1 µmol-teg-mod-red (4) ⇒ Amidit **9**

1 µmol Synthesezyklus mit einer Wait-Time (Kopplung) von 300 sec ⇒ Inverse-Amidite

Die Oligodesoxynukleotide **155** und **156** wurden mit der EDA-Lösung entschützt, mit Ammoniumacetat behandelt und mit der Matrix vermischt, vermessen.

MALDI-Experiment Matrix: ATT + Ammoniumcitrat

Für die Freisetzung (Messung) wird das Trägermaterial direkt mit dem Matrix Gemisch auf dem Probenhalter des MALDI-Gerätes gemischt und eingetrocknet.

**155**: Berechnete Masse: 3066.99; Gefundene Masse 3089.1

**155**: Berechnete Masse: 3041.98; Gefundene Masse 3063.83

Die Experimente für die SNUPE Reaktion wurde mit unterschiedlichen Enzymen und Waschprotokollen durchgeführt, leider kann anschließend kein entsprechendes Spektrum im Massenspektrometer aufgenommen werden.

**5.13 Verknüpfungsreaktionen von Acetal-geschützten Oligodesoxynukleotiden**

Die Oligodesoxynukleotide dieses Projekts wurden an einem Expedite Perceptive Synthesizer hergestellt. Die Synthese erfolgt bis zur 5'-Modifizierung mit dem Standard-Synthesezyklus. Die folgenden drei Verbindungen **130**, **133** und **135** wurden genutzt, um die Acetal-Funktion in die Oligodesoxynukleotide einzuführen.

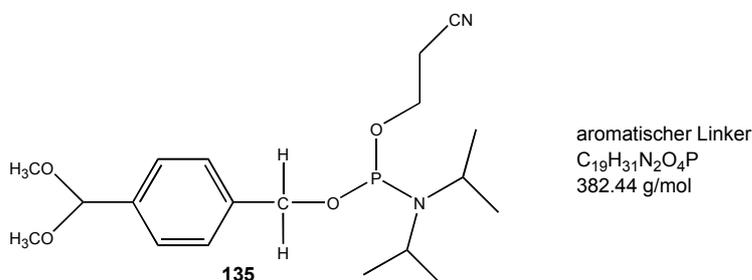
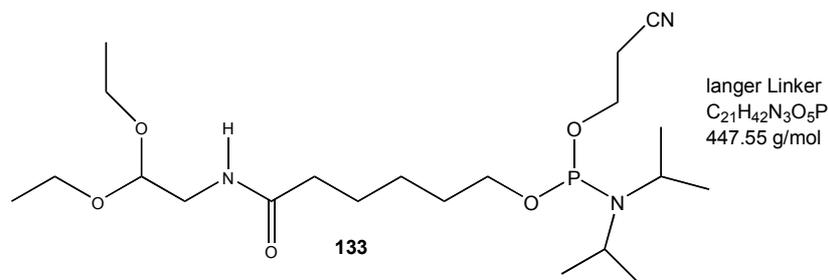
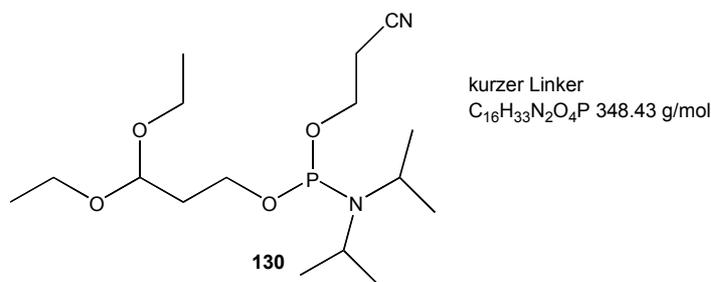
Die kopplungsfähigen Acetal-Derivate **130**, **133** und **135** wurden an das 5'-Ende des Oligodesoxynukleotids **131**



mit Hilfe des Standard-Synthesezyklus mit einer verlängerten Reaktionszeit (Wait-Step) von 300 sec gekoppelt. Die Modifikationen wurden als 0.1 molare Lösungen eingesetzt.

Verbindungsnummer <b>Nr.</b>	Kopplungslösung
<b>130</b>	0.1 g in 2.87 ml
<b>133</b>	0.1 g in 2.2 ml
<b>135</b>	0.1 g in 2.6 ml

## 5. Experimenteller Teil



Die folgenden Oligodesoxynukleotide wurden synthetisiert, gereinigt und die Produktfraktionen untersucht:

Oligodesoxynukleotid	Gradient <sup>a</sup>	Ausbeute	MALDI Berechnet	MALDI Gemessen <sup>b</sup>
<b>131</b>	0-25% in 12 min <sup>c</sup>	55%	5883.87	5885.11
<b>131 + 130 ⇒ 132</b>	0-20% B in 40 min	30-40%	6093.03	6096.76
<b>131 + 133 ⇒ 134</b>	0-20% B in 40 min	30-40%	6192.16	6192.83
<b>131 + 135 ⇒ 136</b>	0-20% B in 40 min	30-40%	6127.04	6082.0 (Aldehyd 6081.47)

<sup>a</sup> LiChroCart 250-10, 5 µm, Purospher STAR, RP18

<sup>b</sup> Matrix: ATT + Ammoniumcitrat + nH

<sup>c</sup> Reinigung über R3-Säule, Oligodesoxynukleotid **131** wird als HPLC-Vergleich verwendet

### Abspaltung und Entschützung

Nach der erfolgten Synthese wird das CPG-Material mit 25% iger Ammoniak-Lösung für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trägermaterial wird abfiltriert und die Lösung in der Speed-Vac abgezogen. Der Rückstand wird in 700 µl Wasser aufgenommen und mit Hilfe der HPL-Chromatographie gereinigt.

HPLC-Analytik und HPLC-Reinigung

Die Analytik wird mit der Säule

EcoCART 125-3; LiChrospher; RP 18; 5  $\mu\text{m}$  (Firma *Merck*) durchgeführt.

Die präparative Reinigung erfolgt mit der Säule

LiChroCART 250-10; Purospher STAR; RP 18e; 5  $\mu\text{m}$  (Firma *Merck*).

Verbindungsnummer	Gradient	Gemessene Retentionszeiten
<b>131</b>	0-15% B in 40 min	33.15 min
<b>132</b>	0-15% B in 40 min	34.15-34.92 min
<b>134</b>	0-15% B in 40 min	34.18-35.42 min
<b>136</b>	0-25% B in 40 min	22.15 min

Freisetzung der Aldehyd-Funktion und anschließende Konjugation

20 O.D der Verbindung **134** wurden in 500  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst und mit 500  $\mu\text{l}$  1 M HCl Lösung versetzt. Nach 1 h wird die Lösung durch die Zugabe von 1 M NaOH neutralisiert (gekühlt). Die Reaktionslösung wird über eine PD 10 Säule entsalzt.

Für die Konjugation mit dem Biotinhydrazid **146**, werden:

5 O.D (ca. 25 nmol) der Verbindung **138** in 500  $\mu\text{l}$  Wasser mit

50  $\mu\text{l}$  15 mM Biotinhydrazid-Lösung **146**

500  $\mu\text{l}$  Natriumacetat-Puffer

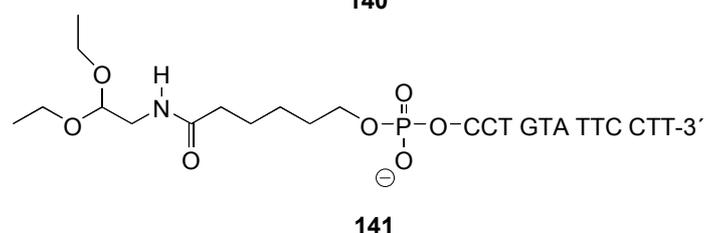
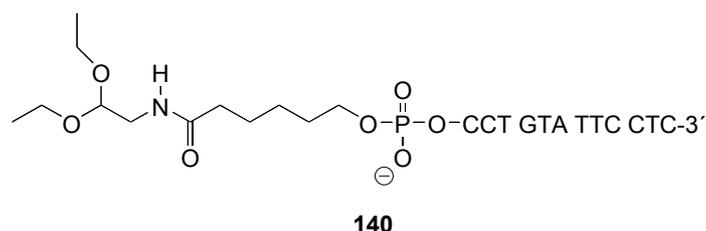
50  $\mu\text{l}$  Natriumcyanborhydrid

versetzt und die Reaktionslösung über Nacht bei RT geschüttelt.

Verwendete Lösungen

- 500 mM Natriumacetat  
34.02 g in 250 ml Wasser, mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt
- 100 mM Natriumcyanborhydrid  
62.84 mg in 10 ml Natriumacetat-Puffer (pH 5)
- 15 mM Biotinhydrazid-Lösung **146**  
1 mg in 180  $\mu\text{l}$  Wasser

Der Reaktionsfortschritt wird mit Hilfe der HPLC untersucht. Ein Teil der Lösung wird mit der analytischen Säule (Gradient: 0 auf 30% in 40 min) getrennt und mit Hilfe der MALDI-MS vermessen. Dabei konnte festgestellt werden, daß die gemessene Molekulare Masse (6547.64 g/mol) gegenüber der berechneten Masse mit 6585.86 g/mol gut übereinstimmt, die Ausbeute der Reaktion jedoch nur ca. 8% beträgt.

Synthese der Verbindungen **140** und **141**

Die beiden Oligodesoxynukleotide wurde bis zur 5'-Modifikation mit einem Standard-Syntheszyklus hergestellt, die Modifikation wird mit einer verlängerten Reaktionszeit gekoppelt (300 sec). Die Abspaltung und Entschützung der Oligodesoxynukleotide erfolgt mit Ammoniak bei RT über 24 h. Die HPLC-Reinigung erfolgt mit der LiChroCart 250-10 Säule von Merck.

Oligodesoxy-nukleotid	Gradient <sup>a</sup>	Gemessene Retentionszeiten	Ausbeute	MALDI Berechnet	MALDI Gemessen <sup>b</sup>
<b>140</b>	0-20% in 40 min	26.67 min	45 - 50%	3756.51	3758.31
<b>141</b>	0-25% B in 40 min.	21.93 min	40 - 45%	3771.52	3773.43

<sup>a</sup> LiChroCart 250-10, 5 µm, Purospher STAR, RP18e; Gradient 0-20% B in 40 min

<sup>b</sup> Matrix: ATT + Ammoniumcitrat + nH

Bei der Freisetzung der Aldehyd-Funktion durch die Zugabe von Säure, mußte festgestellt werden, daß die Freisetzungen der Oligonukleotide **140** und **141** ebenfalls nicht quantitativ verlaufen.

Reaktion des Oligodesoxynukleotid **136** mit den Hydraziden **142** und **143**

Das Oligodesoxynukleotid **136** wurde mit zwei weiteren Hydrazin-Derivaten **142** N,N-Diphenylhydrazin x HCl und **143** 4'-Hydrazin-2'-Stilbazol zur Reaktion gebracht.

Reaktionsansatz a:

5 O.D (in 200 µl Wasser) des Oligodesoxynukleotids **136**  
 + 100 µl 10 mM **142** und Natriumacetat  
 (22 mg **142** und 7.7 mg Natriumacetat in 10 ml Ethanol)  
 schüttelt über Nacht bei RT.

Reaktionsansatz b:

5 O.D (in 200 µl Wasser) des Oligodesoxynukleotids **136**  
 + 100 µl 10 mM **143** und Natriumacetat  
 (14 mg **143** und 7.7 mg Natriumacetat in 10 ml Ethanol)  
 schüttelt über Nacht bei RT.

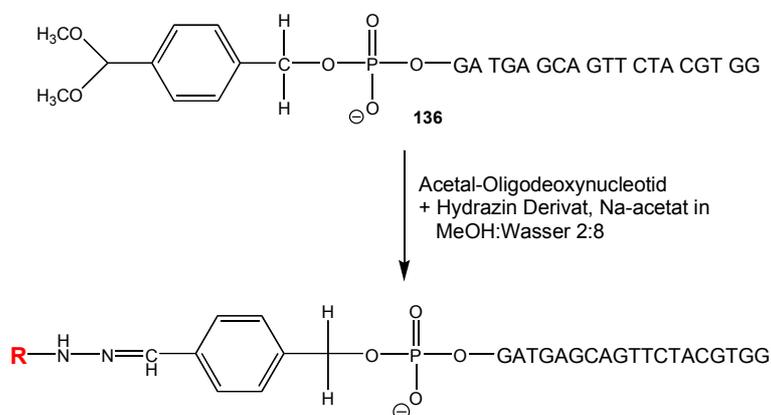
Beide Reaktionen führen zu den konjugierten Produkten **144** und **145**. Die Reaktionsführung bereitete hier kein Problem, problematisch gestaltete sich die Aufreinigung. Um diese zu erleichtern, wurden die Reaktionsansätze a. und b. wiederholt. Anstelle des Ethanols wurde Methanol als Lösungsmittel verwendet. Ebenso wurde das HPLC-Lösungsmittel B: Acetonitril gegen Methanol ausgetauscht. So daß die Reaktionslösung direkt auf die HPLC aufgetragen werden kann. Um eine gute Trennung zu erreichen, sollte das Verhältnis von Wasser zu Methanol etwa 4:1 betragen.

Außer den beiden Hydraziden **142** und **143** wurden weitere Hydrazide eingesetzt:

- a. Cy5 Monohydrazid Gold (TFA-Salz) **148**
- b. Cy3 Monohydrazid Gold (TFA-Salz) **149**
- c. Alexa Fluor 546 **150**

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur 5'-Konjugation

5 O.D (in 200 µl Wasser) des Oligodesoxynukleotids **136**  
 + 50 µl 10 mM Hydrazid - Derivat und Natriumacetat in Methanol:Wasser 4:1  
 schüttelt bei RT.



R = Hydrazin-Derivat	Gradient	Retentionszeit	Umsetzung
Diphenyl <b>142</b>	15% - 45%	23.46	> 95%
Diphenyl <b>142</b>	15% - 55%	19.08	> 95%
Stilbazol <b>143</b>	15% - 55%	17.51	> 95%
Cy3 <b>149</b>	15% - 55%	13.12	> 50% <sup>a</sup>
Biotin <b>146</b>	-	-	-
AlexaFluor <b>150</b>	15% - 60%	13.18	> 90%
Cy5 <b>148</b>	15% - 60%	15.99	80%

Charakteristische Daten für die 5'- modifizierten Oligodesoxynukleotide

## 5. Experimenteller Teil

5'-Modifikation Oligodeoxynukleotid Nr.	Berechnete Molare Masse	Gemessene Molare Masse
Diphenyl <b>144</b>	6247.8	6265.07
Stilbazol <b>145</b>	6274.72	6275.19
Cy 3 <b>151</b>	6708.22	6708.14 + 6730.11
Cy 5 <b>152</b>	6735.53	6735.35 + 6756.6
AlexaFluor <b>153</b>	6936.78	6937.2 + 6957.71
Biotin <b>154</b>	-	-

Die Reaktionszeiten der Hydrazide variieren stark. Die Verbindungen **142** und **143** reagieren innerhalb von 10 min, während die anderen Hydrazid-Verbindungen **146**, **148**, **149**, **150** ca. drei Stunden für eine quantitative Reaktion benötigen. Entscheidend für die Qualität der Reaktionen ist die Verwendung von Hydraziden als Hydrochloride oder Trifluoracetate. Sind diese nicht käuflich bzw. herstellbar, muß der Reaktionslösung 10 mM Salzsäure zugesetzt werden. Auf die Zugabe von Natriumacetat kann aufgrund einer langsameren und unvollständigen Reaktion ebenfalls nicht verzichtet werden. Die Reaktionen des Oligodesoxynukleotids **136** mit den Verbindungen **143**, **149**, **148** und **150** wurden im Dunklen bei RT durchgeführt. Eine Temperaturerhöhung bewirkt die vermehrte Bildung von unerwünschten Nebenprodukten.

## A

- S. P. Adams, K. S. Kavka, E. K. Wykes, S. B. Holder, G. R. Galluppi; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 661-663  
Hindered Dialkylamino Nucleoside Phosphite Reagents in the Synthesis of Two DNA 51mers
- K. L. Agrawal, F. Riftina; *Nucl. Acids Res.* **1979**, 6 (9), 3009-3024  
Synthesis and enzymatic properties of deoxyribonucleotides containing methyl and phenylphosphonate linkages
- S. A. Ahrendt, S. Halachmi, J. T. Chow, L. Wu, N. Halachmi, S. C. Yang, S. Wehage, J. Jen, D. Sidransky; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96 (13), 7382-7387  
Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array
- A. Ajayaghosh, V. N. R. Pillai; *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 5714-5717  
2'-Nitrobenzhydryl Polystyrene Resin: A New Photosensitive Support for Peptide Synthesis
- F. Albericio, E. Nicolas, J. Josa, A. Grandas, E. Pedroso, E. Giralt, C. Grainer, J. VanRietschoten; *Tetrahedron* **1987**, 43 (24), 5961-5971  
Convergent Solid Phase Peptide Synthesis. V. Synthesis Of The 1-4, 32-34 and 53-59 Protected Segments Of The Toxin II Of *Androcotonus Australis* Hector
- R. M. Amasino; *Anal. Biochem.* **1986**, 152, 304  
Accereration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol
- M. L. M. Anderson, B. D. Young; Nucleic acid hybridization: a practical approach, IRL Press Oxford **1985** (Eds.: B. D. Hames, S. J. Higgins), 73-80  
Quantitative filter hybridization
- B. Armitage; *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1171-1200  
Photocleavage of Nucleic Acids

## B

- J. A. Barltrop, P. Schofield; *Tetrahedron Lett.* **1962**, 16, 697-699  
Photosensitive protecting groups
- H. Baron, S. Fung, A. Aydin, S. Bähring, F. Luft, H. Schneider; *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1279-1282  
Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the dignostic familial hypercholesterolemia
- L. M Beacham; *J. Org. Chem.* **1979**, 44 (18), 3100-3001  
Convenient Preparation of 5'-Chloro-2',5'-dideoxyadenosine
- S. L. Beaucage, M. H. Caruthers; *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859  
New methods for synthesizing deoxyoligonucleotides
- M. Beier, J. D. Hoheisel; *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 1970-1977  
Versatile derivatisation of solid support media for covlent bonding on DNA - microchips
- M. Beier, J. D. Hoheisel; *J. of Biotechnology* **2002**, 94, 15-22

## 6. Literaturverzeichnis

Analysis of DNA-microarrays produced by inverse in situ oligonucleotide synthesis

M. Beier, J. D. Hoheisel; *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28 (4), e11

Production by quantitative photolithographic synthesis of individually quality checked DNA microarrays

M. Beier, A. Stephan, J. D. Hoheisel; *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 2089-2095

Synthesis of Photolabile 5'-O-Phosphoramidites for the Photolithographic Production of Microarrays of Inversely Oriented Oligonucleotides

M. Beier, F. Reck, T. Wagner, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser; *Science* **1999**, 283, 699-703

Chemical etiology of nucleic acid structure: comparing pentopyranosyl-(2'-4') oligonucleotides with RNA

G. Bertolini, G. Pavich, B. Vergani; *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6031-6034

A New Simple One-Pot Regioselective Preparation of mixed Diesters of carbonic Acid

F. F. Bier; Habilitationsschrift, Universität Potsdam **1997**

Biomolekulare Erkennung und Signaltransduktion in Affinitätssensoren

V. Blaschke, K. Reich, S. Blaschke, S. Zipprich, C. Neumann; *Biochemic* **2002**, 1, 6-7

Quantitative RT-PCR: Comparing Real-Time LightCycler Technology with Quantitative Competitive RT-PCR

D. H. Blohm, A. Guiseppi-Elie; *Curr. Opin. Biotechnology* **2001**, 12, 41-47

New developments in microarray technology

C. G. Bochet; *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6341-6346

Wavelength-selective cleavage of photolabile protecting groups

C. G. Bochet; *Angew. Chem.* **2001**, 113, 11, 2140-2142

Orthogonale Photolyse von Schutzgruppen

D. L. Boger, H. Cai; *Angew. Chem.* **1999**, 111, 470-500

Bleomycin: Untersuchung zu Synthese und Wirkungsmechanismus

K. Bondeson, A. Frostell-Karlsson, L. Fagerstam, G. Magnusson; *Anal. Biochem.* **1993**, 214, 245-251

Lactose repressor-operator DNA interactions: kinetic analysis by surface plasmon resonance

D. van den Boom, C. Jurinke, S. Higgins, T. Becker, H. Köster; *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17 (9-11) 2157-2164

Mass Spectrometric DNA Diagnostics

J. H. van Boom, P. M. J. Burgers; *Tetrahedron Lett.* **1976**, 52, 4875-4878

Use Of Levulinic Acid In The Protection Of Oligonucleotides Via The Modified Phosphotriester Method: Synthesis Of Decaribonucleotide U-A-U-A-U-A-U-A-U-A

B. Bothner, K. Chatman, M. Sarkisian, G. Siuzdak; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett.* **1995**, 5 (23), 2863-2868

Liquid Chromatography Mass Spectrometry of Antisense Oligonucleotides

## 6. Literaturverzeichnis

C. D. Bottema, G. Sarkar, J. D. Cassady, S. Li, C. M. Dutton, S. S. Sommer; *Meth. Enzymol.* **1993**, 218, 388

Polymerase chain reaction amplification of specific alleles: a general method of detection of mutations, polymorphisms, and haplotypes

A. Brecht, G. Gauglitz; *Frontiers in Biosensorics*, Vol.2, Applications, (Eds.: F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz), Birkhäuser, Basel

Reflectometric interference spectroscopy for direct affinity sensing

J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8044-8051

A multistep chemical modification procedure to create DNA Arrays on gold surfaces for the study of protein – DNA interactions with surface plasmon resonance imaging

C. L. Brummel, I. N. W. Lee, Y. Zhou, S. J. Benkovic, N. Winograd; *Science* **1994**, 264, 399

A mass spectrometric solution to the address problem of combinatorial libraries

R. N. Bryan, J. L. Ruth, R. D. Smith, J. M. LeBon; *Microbiology* **1986**, S. 113 (Eds. L. Levine, American Society for Microbiology) Washington DC

Diagnosis with clinical samples with synthetic oligonucleotide hybridization probes

H. Budzikiewicz: Massenspektrometrie. Eine Einführung **1992**, VCH-Verlag, Weinheim (ISBN 3-527-26870-7)

S. Bühler, H. Giegrich, W. Pfeleiderer; *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, 18 (6+7), 1281-1283

New Photolabile Protecting Groups of the 2-(2-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl- and the 2-(2-Nitrophenyl)-ethylsulfonyl-Type for the Oligonucleotide Synthesis

A. B. Jr. Burgin; *Methods Mol. Biol.* **2001**, 95 (pt.2), 119-128

Synthesis and use of DNA containing 5'-bridging phosphorothioate

## C

L. A. Carpino, G. Y. Han; *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 22, 3404-3409

The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group

M. R. Carrasco, M. C. Fitzgerald, Y. Oda, S. B. H. Kent; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (36), 6331-6334

Direct Monitoring of Organic Reactions on Polymeric Supports

M. H. Caruthers, G. Beaton, J. V. Wu, W. Wiesler; *Methods Enzymol.* **1992**, 211, 3-19

Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides and deoxyoligonucleotide analogs

C. T. Caskey; *Science* **1987**, 236, 1223-1229

Disease diagnosis by recombinant DNA methods

U. Certa, M. Wilhelm-Seiler, M. Fossier, C. Broger, M. Neeb; *Gene* **2003**, 315, 79-86

Expression modes of interferon-alpha inducible genes in sensitive and resistant melanoma cells stimulated with regular and pegylated interferon-alpha.

U. Certa, M. Seiler, E. Padovan, G. C. Spagnoli; *Br. J. Cancer* **2001**, 85 (1), 107-114

High density oligonucleotide array analysis of interferon-alpha 2a sensitivity and transcriptional response in melanoma cells

## 6. Literaturverzeichnis

- I. Chaiken, S. Rose, R. Karlsson; *Anal. Biochem.* **1992**, 201, 197-210  
Analysis of macromolecular interactions using immobilized ligands
- C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1980**, 15, 59-66  
Preparation and Properties of N $\alpha$ -Fluorenylmethyloxycarbonylamino Acids bearing *tert.*-Butyl Side Chain Protection
- C.-D. Chang, J. Meienhofer; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1978**, 11, 246-249  
Solid-Phase Peptide Synthesis using mild base Cleavage of N $\alpha$ -Fluorenylmethyloxycarbonylamino Acids, Exemplified by a Synthesis of Dihydrosomatostatin
- X. Chen, B. Zehnbauser, A. Gnirke, P. Kwok; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10756-10761  
Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method
- Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich; *Science* **1994**, 265, 346-355  
Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations
- S. L. Cohen, B. T. Chait; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 31-37  
Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins
- P. Collins, H. Eder; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 5, 927-931  
The Photochemistry of Carbohydrate Derivatives. Part 6. Synthesis of 3-(Methoxycarbonyl)propyl Pyranosides of 2,3-Di-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactose and 3-O-( $\alpha$ -D-Galactopyranosyl)-2-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactose using Photolabile O-(2-Nitrobenzylidene) Acetals as Temporary Blocking Groups
- B. A. Connolly, P. Rider; *Nucl. Acids Res.* **1985**, 13 (12), 4485-4502  
Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment of thiol specific probes
- R. G. Cooks, R. E. Kaiser; *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 213  
Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry
- G. M. Coppola; *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, 23, 223-224  
The Chemistry of 2H-3,3-Benzoxazine-2,4-(1H)-dione (Isatoic Anhydride) **19** (1)  
Direct Formation of 2-Aminobenzyl Alcohol from Reduction of N-substituted Isatoic Anhydrides
- R. Cosstick, J. S. Vyle; *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18 (4), 829-835  
Synthesis and properties of dithymidine phosphate analogues containing 3'-thiothymidine
- R. Cosstick, J. S. Vyle; *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30 (35), 4693-4696  
Solid Phase Synthesis of Oligonucleotides Containing 3'-Thiothymidine
- R. Cosstick, J. S. Vyle; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 992-993  
Synthesis and Phosphorus-Sulphur Bond Cleavage of 3'-Thiothymidylyl-(3'-5')-thymidine
- R. J. Cotter; *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **1989**, 18, 513

Time-of-flight mass spectrometry: an increasing role in the life science

E. Culotta, D. E. Koshland Jr.; *Science* **1993**, 262, 1958-1961  
p53 sweeps through cancer research

## D

B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (4), 1729-1743  
Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with phosphorus substituents

P. H. Dawson: *Quadrupole mass spectrometry and its applications* **1976**, Elsevier, New York

E. DeClercq, F. Eckstein, H. Sternbach, T. C. Merigan; *Virology* **1970**, 42, 421-428;  
The antiviral activity of thiophosphate-substituted polyribonucleotides in vitro and in vivo

M. Dechamps, E. Sonveaux; *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, 14, 867  
Aldehyde functions in synthetic oligonucleotides

M. Dechamps, E. Sonveaux; *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17 (4), 697-709  
Aldehyde-oligodeoxyribonucleotides for bioconjugation

K. J. Divakar, A. Mottoh, C. B. Reese, Y. S. Sanghvi; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 969-974  
Approaches to the Synthesis of 2' Thio Analogues of Pyrimidine Ribosides

M. J. Doktycz, G. B. Hurst, S. Habibi-Goudazi, S. A. McLuckey, K. Tang, C. H. Chen, M. Uziel, K. B. Jacobson, R. P. Woychik, M. V. Buchanan; *Anal. Biochem.* **1995**, 230, 205-215  
Analysis of polymerase chain reaction-amplified DNA products by mass spectrometry using matrix assisted laser desorption and electrospray: current status

L. K. Dombi, N. Griesang, C. Richter; *Synthesis* **2002**, 6, 816-824  
Oligonucleotide Arrays from Aldehyde-Bearing Glass with Coated Background

M. J. O'Donnell, K. Tang, H. Köster, C. L. Smith, C. R. Cantor; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2438-2443  
High-Density, Covalent Attachment of DNA to Silicon Wafers for Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry

## E

F. Eckstein, I. Risk; *Chem. Ber.* **1969**, 102, 2362  
Synthese von Oligodesoxynukleotiden über Phosphorsäuretriester

F. Eckstein; *Angew. Chem.* **1983**, 95 (6), 431-447  
Phosphorothioatanaloga von Nukleotiden-Werkzeuge zur Untersuchung biochemischer Prozesse

M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1895-1897

## 6. Literaturverzeichnis

Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone

B. J. Egner, G. J. Langley, M. Bradley; *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2652  
Solid Phase Chemistry: Direct Monitoring by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. A Tool for combinatorial Chemistry

T. Ellinger, E. Ermantraut, R. Ehricht, J. W. Engels, K. Jahn-Hofmann. Probe arrays containing selectively cleavable probes. *PCT Int. Appl.* **2003**, 165 pp. CODEN: PIXXD2 WO 0318838 A2 20030306 CAN 138:216448 AN 2003:173823

M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9677-9678  
Recognition of Guanine and Adenine in DNA by Cytosine and Thymine Containing Peptide Nucleic Acids (PNA)

E. Ermantraut; *medgen* **1999**, 11, 6-11  
Herstellung von biomolekularen Arrays – eine technologische Herausforderung

H. Ewald, H. Hintenberger: Methoden und Anwendung der Massenspektrometrie **1953**, Verlag Chemie, Weinheim

## F

L. G. Fagerstam, A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson, I. Ronnberg; *J. Chromatogr.* **1992**, 597, 397-410  
Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding-site and concentration analysis

Katja Faulhaber; Dissertation Bayrische Julius-Maximilians Universität Würzburg, **2003**  
Untersuchungen der Wechselwirkung von anellierten Chinoliziniumsalzen mit DNA

Z. Fei, T. Ono, L. M. Smith; *Nucl. Acids Res.* **1998**, 26 (11), 2827-2828  
MALDI-TOF mass spectrometric typing of single nucleotide polymorphisms with mass-tagged ddNTPs

M. C. Fitzgerald, K. Harris, C. G. Shevlin, G. Siuzdak; *Bioorganic & Medicinal Chem. Letters* **1996**, 6 (8), 979-982  
Direct Characterization of Solid Phase Resin-Bound Molecules by Mass Spectrometry

M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith; *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3204-3211  
Basic matrixes for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides

S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. T. Stryer, A. Lu, D. Solas; *Science* **1991**, 251, 767-773  
Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis

J. J. Fox, N. C. Miller; *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 936-942  
Nucleosides. XVI. Further Studies of Anhydronucleosides

L. T. C. Franca, E. Carrilho, T. B. L. Kist; *Quart. Rev. Biophysics* **2002**, 169-200

A review of DNA sequencing techniques

W. M. Freeman, D. J. Robertson, K. E. Vrana; *Biotechniques* **2000**, 29, 1042-1055;  
Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis

## G

P. R. J. Gaffaney, L. Changsheng, M V. Rao, C. B. Reese, J. G. Ward, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 6, 1355-1360

Some Substituted 9-Phenylxanthen-9-yl Protecting Groups

S. Gaisser; *Bio World 2* **1999**, 48-49

R. Gambari, N. Bianchi, C. Rutigliano, E. Borsetti, M. Tomassetti, G. Feriotto, F. Zorzato; *Int. J. of Oncology* **1997**, 11, 145-149

Surface plasmon resonance for real-time detection of molecular interactions between chromomycin and target DNA sequences

P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4055-4058

Nucleoside H-phosphonates. IV. Automated solid phase synthesis of oligoribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach.

M. H. Gey: *Instrumentelle Bioanalytik* **1998**, vieweg (ISBN 3-528-06873-6)

W. W. Gibbs; *Sci. Am.* **2001**, 284, 33- 34

H. Giegrich, S. Eisele-Bühler, C. Hermann, E. Kvasyuk, R. Charubala, W. Pfeleiderer; *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17 (9-11), 1987-1996

New Photolabile Protecting Groups in Nucleoside and Nucleotide Chemistry-  
Synthesis, Cleavage Mechanism and Application

B. R. Glick: *Molekulare Biotechnologie* **1995**, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg  
(3-86025-378-6 oder 3-86025-383-2)

Stefan Globisch; Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2002**  
Systematische Untersuchungen zur Photochemie der o-Nitrobenzyl-Schutzgruppe

C. R. Graham, D. Leslie, D. J. Squirrell; *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 7, 487-493  
Gene probe assays on a fibre – optic evanescent wave biosensor

D. Gravel, S. Murray, G. Ladouceur; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1228-1229

o-Nitrobenzyl Alcohol a Simple and Efficient Reagent for the Photoreversible  
Protection of Aldehydes and Ketons

N. M. Green; *Avidin-Biotin technology, Methods in Enzymology* **1990**, Vol. 184, 51-67, (Eds. M. Wilchek, E. A. Bayer), Academic Press Inc., San Diego, USA  
Avidin and Strptavidin

B. Greiner, G. Breipohl, E. Uhlmann; *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82 (12), 2151-2159  
Influence of the type of junction in DNA-3'-peptide nucleic acid (PNA) chimeras on  
their binding affinity to DNA and RNA

U. B. Gyllensten, H. A. Erlich; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7652  
Ancient roots for polymorphism at the HLA-DQ alpha locus in primates

## H

- L. A. Haff, I. P. Smirnov; *Genome Research* **1997**, 378-388  
Single-Nucleotide Polymorphism Identification Assays Using a Thermostable DNA Polymerase and Delayed Extraction MALDI-TOF Mass Spectrometry
- L. A. Haff, I. P. Smirnov; *Nucl. Acids Res.* **1997**, 25 (18), 3749-3750  
Multiplex genotyping of PCR products with MassTag-labeled primers
- L. A. Haff, I. P. Smirnov; *Genome Methods* Cold Spring Harbor Laboratory Press  
ISSN 1054-9803/97
- Stephanie Hahner; Dissertation, Universität Münster **1997**  
Untersuchungen zur Anwendung der Matrix-unterstützten Laser-, Desorption-, Ionisations (MALDI-MS) auf die Struktur- und Sequenzanalyse von Nukleinsäuren
- J. M. Hall, M. K. Lee, B. Newman, J. E. Morrow, L. A. Anderson, B. Huey, M. C. King; *Science* **1990**, 250, 1684  
Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17p21
- R. P. Hammer, F. Albericio, L. Gera, G. Barany; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 36, 31-45  
Practical approach to solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions based on a photolysable anchoring linkage
- C. C. Harris; *Science* **1993**, 262, 1980-1981  
p53: At the Crossroads of Molecular Carcinogenesis and Risk Assessment
- A. Hasan, K. P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote; *Tetrahedron* **1997**, 53 (12), 4247-4264  
Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Synthesis and Photodprotection Rates
- A. Hassner, G. Strand, M. Rubinstein, A. Patchornik; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1614-1615  
Levulinic Esters. An Alcohol Protecting Group Applicable to Some Nucleosides
- Y. Hayakawa, M. Kataoka, R. Noyori; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7996-7997  
Benzimidazolium triflate as an efficient promoter for nucleotide synthesis via the phosphoramidite method.
- C. Hélène, J. J. Toulmé; *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1049, 99-125  
Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigenic nucleic acids
- K. A. Henningfeld, T. Arslan, S. M. Hecht; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11701-11714  
Alteration of DNA Primary Structure by DNA Topoisomerase I. Isolation of the Covalent Topoisomerase I-DNA Binary Complex in Enzymatically Competent Form
- G. T. Hermanson, A. Krishna-Mallia, P. K. Smith; *Immobilized Affinity Ligand Techniques* **1992**, Academic Press, Inc., 1. Aufl., London
- G. T. Hermanson; *Bioconjugate Techniques* **1996**, Academic Press, San Diego  
Aldehyd-Oligodeoxynucleotides for Bioconjugation

## 6. Literaturverzeichnis

F. Hillenkamp, M. Karas; *Methods Enzymol.* **1990**, 193, 280-295  
Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization

J.D. Hoheisel, M. Vingron; *Biospektrum* **1998**, 6, 17-20

P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7276-7280

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase

J. P. Horwitz, J. Chua, M. Noel; *J. Org. Chem* **1964**, 29, 2076-2078  
Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- $\beta$ -D-lyxofuranosyl)thymine

J. P. Horwitz, J. A. Urbanski, J. Chua; *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3300-3302  
Nucleosides. II. 5'-O-Mesylythymidine and 3'-O-Mesylythymidine

### I

International Human Genome Sequencing Consortium; *Nature* **2001**, 409, 860-922  
Initial sequencing and analysis of the human genome

### J

K. K. Jensen, H. Orum, P. E. Nielsen, B. Nordén, *Biochemistry* **1997**, 36, 5072-5077  
Kinetics for Hybridization of Peptide Nucleic Acids (PNA) with DNA and RNA Studied with the BIAcore Technique

M. Jürgens; *BIOforum* **2001**, 7-8, 490-491  
Automatisierte SNP-Genotypisierung mittels MALD-TOF MS

C. Jurinke, D. van den Boom, V. Collazo, A. Lüchow, A. Jacob, H. Köster; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 904-910  
Recovery of Nucleic Acids from Immobilized Biotin-Streptavidin Complexes Using Ammonium Hydroxide and Applications in MALDI-TOF Mass Spectrometry

### K

B. Kamber, W. Rittel; *Helv. Chim. Acta*, **1968**, Vol. 51, 8, 2061-2064  
Eine neue, einfache Methode zur Synthese von Cystinpeptiden

M. Karas, F. Hillenkamp; *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299  
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons

M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1989**, 92, 231  
UV laser matrix desorption/ionization mass spectrometry of proteins in the 100,000 Dalton range

M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp; *Angew. Chem.* **1989**, 101 (6), 805  
Laserdesorption-Massenspektrometrie von Proteinen mit Molmassen zwischen 100 000 und 250 000

H. G. Khorona; *Science* **1979**, 203, 614-625  
Total Synthesis of a gene

## 6. Literaturverzeichnis

- G. von Kiedrowski; *Angew. Chem.* **1991**, 103 (7), 839-840  
Lichtgesteuerte Parallelsynthese von bis zu 250 000 verschiedenen Oligopeptiden und Oligonucleotiden
- K. Kikugawa, M. Ichino; *Tetrahedron Lett.* **1971**, 2, 87-90  
Direct Halogenation of Sugar Moiety Of Nucleosides
- N. Kneib-Cordonier, F. Albericio, G. Barany; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 527-538  
Orthogonal solid-phase synthesis of human gastrin-I under mild conditions
- K. Kobayashi, Y. Akiyama, K. Kawaguchi, S. Tanabe; *Analytical Sciences* **1985**, 1, 81-84  
Fluorometric Determination of N-Acetyl and N-Glycolyl Neuraminic Acids by High Performance Liquid Chromatography as Their 4'-Hydrazino-2-stilbazole Derivatives
- T. Köbberling, D. Terzenbach; *Bioforum Spezial 10* **1999**, 16
- H. J. Koeners, J. Verhoeven, J. H. van Boom; *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 381-382  
Synthesis Of Oligosaccharides By Using Levulinic Ester As An Hydroxyl Protecting Group
- C. Kosmidis, K. W. D. Ledingham, H. S. Kilic, T. McCanny, R. P. Singhal, A. J. Langley, W. Shaikh; *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 2264-2270  
On the Fragmentation of Nitrobenzene and Nitrotoluenes Induced by a Femtosecond Laser at 375 nm
- H. Köster, D. van den Boom, A. Braun, A. Jacob, C. Jurinke, D. P. Little, K. Tang; *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16 (5&6) 563-571  
DNA Analysis By Mass Spectrometry: Applications In DNA Sequencing And DNA Diagnostics
- E. Kretzschmar, H. Raether; *Z. Naturforsch.* **1968**, 23a, 2135  
Radiative decay of non-radiative surface plasmon by light
- R. Kuhn, W. Jahn; *Chem. Ber.* **1965**, 98, 1699-1704  
Vom Adenosin abgeleitete Thioäther und S-Oxide
- R. G. Kuimelis, L. W. McLaughlin; *Nucl. Acids Res.* **1995**, 23 (23), 4753-4760  
Cleavage properties of an oligonucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate RNA linkage
- M. N. Kuppaswamy, J. W. Hoffmann, C. K. Kasper, S. G. Spitzer, S. L. Groce, S. P. Bajaj; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88, 1143  
Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes
- J. Kurrek; *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628-1644  
Antisense technologies Improvement through novel chemical modifications
- M. Kwiatkowski, J. Chattopadhyaya; *Acta Chem. Scand.* **1984**, B 38, 657-671  
The 9-(4-Octadecyloxyphenylxanthen)-9-yl-Group. A new Acid-labile Hydroxyl Protective Group and Its Application in the Preparative Reverse-phase Chromatographic Separation of Oligoribonucleotides

**L**

- U. Landegren; *Laboratory protocols for mutation detection* **1996**; Oxford University Press, New York
- L. Lapatsanis, G. Miliadis, K. Froussios, M. Kolovos; *Synthesis* **1983**, 671-673  
Synthesis of N-2,2,2-(Trichloroethoxycarbonyl)-L-amino Acids Involving Succinimidoxo Anion as a Leaving Group in Amino Acids
- J. Lazarou, B. H. Pomeranz, P. N. Corey ; *Jama* **1998**, 279 (15), 1200-1205  
Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies
- L. G. Lee, C. R. Connell, W. Bloch; *Nucl. Acids Res.* **1993**, 21, 3761-3766  
Allelic discrimination by nick – translation PCR with fluorogenic probes
- W.D. Lehmann: *Massenspektrometrie in der Biochemie* **1996**, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- M. Lemaitre, B. Bayard, B. Lebleu; *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* **1987**, 84, 648  
Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site
- R. L. Letsinger, W. B. Lunsford; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3655-3661  
Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates
- R. L. Letsinger, V. Mahadevan; *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527  
Oligonucleotide synthesis on a polymer support
- D. P. Little, A. Braun, M. J. O'Donnell, H. Köster; *Nature Medicine* **1997**, 3 (12), 1413-1416  
Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis
- D. P. Little, D. J. Aaserud, G. A. Valaskovic, F. W. McLafferty; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9352-9359  
Sequence Information from 42-108-mer DNAs (Complete for a 50 mer) by Tandem Mass Spectrometry
- Y. H. Liu, J. Bai, X. Liang, D. M. Lubman, P. J. Venta; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3482-3490  
Use a nitrocellulose film substrate in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for DNA mapping and screening
- D. J. Lockhart, E. A. Winzeler; *Nature* **2000** 405 (6788), 827-836  
Genomics, gene expression and DNA arrays
- B. H. Long, J. Golik, S. Forenza, B. Ward, R. Rehfuss, J. C. Dabrowiak, J. J. Catino, S. T. Musial, K. W. Brookshire, T. W. Doyle; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 2-6  
Esperamicins a class of potent antitumor antibiotics: Mechanism of action
- S. Lorkowski, G. Lorkowski, P. Cullen; *Chemie in unserer Zeit* **2000**, 34 (6), 356-372  
Biochips – Das Labor in der Streichholzschachtel
- F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.), *Bioanalytik* **1998**, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin (ISBN 3-8274-0041-4)

## 6. Literaturverzeichnis

M. Lustig, M. Heisinger, S. Hauch, S. Waschütza, E. Schnakenberg, L. Boldt, S. Zieseniss, H. Wehning, L. Ziegenhagen, G. Mix, U. Steller; *BIOforum* 10/**2002**, S. 632-634, GIT Verlag GmbH & Co., KG, Darmstadt  
Microarray zur SNP-Diagnostik in der Pharmakogenetik

### M

M. Mag, S. Lücking, J. W. Engels; *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19 (7), 1437-1441  
Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5-phosphorothioate linkage

F. W. MacLafferty, F. Turecek; *Interpretation von Massenspektren* **1996**, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg

J. H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (51), 7485-7488

9-(4-Methoxyphenyl)Xanthen-9-Thiol: A Useful Reagent For The Preparation Of Thiols

J. H. Marriott, M. Mottahedeh, C. B. Reese; *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 257-269  
Synthesis of 2'-Thioadenosine

A. Marshall, J. Hodgson; *Nature Biotechnology* **1998**, 16, 27-31  
DNA Chips: An array of possibilities

U. Maskos, E. M. Southern; *Nucl. Acids Res.* **1992**, 20, 7, 1679-1684  
Oligonucleotide hybridization on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesized *in situ*

J. Matulic-Adamic, P. Haeberli, A. B. DiRenzo, V. R. Mokler, L. Maloney, L. Beigelman, N. Usman, F. E. Wincott; *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16 (10&11), 1933-1950

Synthesis And Incorporation Of 5'-Amino- And 5'-Mercapto-5'-Deoxy-2'-Methyl Nucleosides Into Hammerhead Ribozymes

B. L. McConaughy, C. D. Laird, B. J. McCarthy; *Biochemistry* **1969**, 8, 3289  
Nucleic acid reassociation in formamide

G. H. McGall, L. E. Rabow, G. W. Ashley, S. H. Wu, J. W. Kozarich, J. Stubbe; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4958-4967  
New Insight into Mechanism of Base Propenal Formation during Bleomycin-Mediated DNA Degradation

D. L. McMinn, R. Hirsch, M. M. Greenberg; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4155-4158  
An Orthogonal Solid Phase Support for the Synthesis of Oligonucleotides Containing 3'-Phosphates and Its Application in the Preparation of Photolabile Hybridization Probes

J. Meinkoth, G. Wahl; *Anal. Biochem.* **1984**, 138, 267  
Hybridization of nucleic acids on solid supports

A. Meyer, N. Spinelli, J.-L. Imbach, J.-J. Vasseur; *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2000**, 14, 234-242

Analysis of solid-supported oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

## 6. Literaturverzeichnis

A. M. Michelson, A. R. Todd; *J. Chem. Soc.* **1953**, 951-956  
Nucleotides. XX: Mononucleotides derived from thymidine. Identity of thymidylic acid from natural sources with thymidine-5'-phosphate

G. F. Miknis, R. M. Williams; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 536-547  
Total Synthesis of (+,-)-Aspirochlorine

C. A. Miller, W. L. Patterson, P.K. Johnson, C. T. Swartzell, F. Wogoman, J. P. Albarella, R. J. Carrico; *J. Clin. Microbiol.* **1988**, 26, 1271-1276  
Detection of bacteria by hybridisation of rRNA with DNA-latex and immunodetection of hybrids

N. Miller, J. J. Fox; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 1772-1775  
Nucleosides. XXI. Synthesis of Some 3'-Substituted 2',3'-Dideoxyribonucleosides of Thymine and 5-Methylcytosine

P. S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman; *Biochemistry* **1979**, 18 (23), 5134-5143

Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates

P. S. Miller, N. Dreon, S. M. Pulford, K. B. McParland; *J. Biol. Chem.* **1980**, 255 (20), 9659-9665

Oligothymidylate analogues having stereoregular, alternating methylphosphonates/phosphodiester backbones. Synthesis and physical studies

S. Mizutani, Y. Wakuri, N. Yoshida, T. Nakajima, Z. Tamura; *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17 (11), 2340-2348

Fluorescence Assay of  $\alpha$ -Oxo Acids with 4'-Hydrazino-2-stilbazole

L. E. Morrison; *J. Fluoresc.* **1999**, 9, 187-196

Homogeneous detection of specific DNA sequences by fluorescence quenching and energy transfer

K. B. Mullis; *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1355

## N

S. A. Narang, R. Brousseau, H. M. Hsiung, J. J. Michniewicz; *Methods Enzymol.* **1980**, 65, 610-628

Chemical synthesis of deoxyribooligonucleotides by the modified triester method

J. P. Neenan, W. Rohde; *J. of Med. Chem.* **1973**, 16, 580-581

Inhibition of Thymidine Kinase from Walker 256 Carcinoma by Thymidine Analogs

C. R. Newton, A. Graham: PCR **1994**, Spektrum Akademischer Verlag (ISBN 3-86025-236-4)

K. C. Nicolaou, B. S. Safina, N. Winssinger; *Synlett* **2001**, 900-903

A New Photolabile Linker for the Photoactivation of Carboxyl Groups

C. M. Niemeyer, D. Blohm; *Angew. Chem.* **1999**, 111 (19), 3039-3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2865-2869

DNA-Mikroarrays

## 6. Literaturverzeichnis

E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, K. Kristansen, P. Roepstorff; *Nucl. Acids Res.* **1993**, 21, 3347-3357  
Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

E. Nordhoff, A. Ingendog, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. Crain; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 771-776  
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared

### O

K. K. Ogilvie, M. J. Nemer, G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, M. Lucas; *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23 (26), 2615-2618  
N-Levulination Of Nucleosides

A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4581-4583  
A facile incorporation of the aldehyde function into DNA: 3-formylindole nucleoside as an aldehyde-containing universal nucleoside

D. J. O'Shannessy, M. Brigham-Burke, K. Peck; *Anal. Biochem.* **1992**, 205, 132-136  
Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector

R. Ott, R. Krämer; *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2064  
Schnelle Phosphodiester-Hydrolyse durch Zirconium(IV)

### P

U. Pieleles, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser; *Nucl. Acids Res.* **1993**, 21, 3191-3196  
Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides

V. N. R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer; *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3408-3412  
3-Nitro-4-Aminomethylbenzoylderivate von Polyethylenglykolen: Eine neue Klasse von Photosensitiven löslichen polymeren Trägern zur Synthese von C-terminalen Peptidamiden

V. N. R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer, I. Gatfield; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 5364-5370  
New Easily Removable Polyethyleneglycol Supports For The Liquid-Phase Method Of Peptide Synthesis

A. Piper; *TIBS* **1998**, 23, 4, 151-154  
The dark lady

M. C. Pirrung; *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1326-1341  
Die Herstellung von DNA-Chips

M. C. Pirrung, J. L. Read, S. P. A. Fodor, L. Stryer; Patent (USA): 5,143,854, **1990**  
Large scale photolithographic solid phase synthesis of polypeptides and receptor binding screening thereof

M. C. Pirrung; *Chem. Rev.* **1997**, 97, 473-488  
Spatially Addressable Combinatorial Libraries

## 6. Literaturverzeichnis

- M. A. Podyminogin, A. A. Lukhtanov, M. W. Reed; *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29 (24), 5090-5098  
Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotid probes to semicarbazide-coated glass
- W. K. Pogozelski, T. D. Tullis; *Chem. Rev.* **1998**, 98 (3), 1089-1108  
Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety
- R. Polzius, T. Schneider, F. F. Bier, U. Bilitewski; *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 5, 503-514  
Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxide waveguides
- J. D. Puglisi, I. Jr. Tinoco; *Methods in Enzymology* **1989**, 180, 304-325  
Absorbance melting curves of RNA

## R

- S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäß, G. Burdinski, J. R. Havens, T. J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer; *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30 (21), 4793-4802  
Hydrazide oligonucleotides: new chemical modification for chip array attachment and conjugation
- A. Rahman, A. A. Hattaba; *Indian J. Chem. Sect. B* **1987**, 26, 987-988
- G. Ramsay; *Nature Biotechnology* **1998**, 16, 40-44  
DNA Chips: State of the Art
- R. Rasmussen, T. Morrison, M. Herrmann, C. Witter; *Biochemica* **1998**, 2, 8-11  
Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye
- A. Reiser, M. Geyer, R. van Miltenburg; M. Nauck, K. Tabiti; *Biochimica* **1999**, 2, 12-14  
Mutation Detection Using Multi-color Detection on the LightCycler System
- E. J. Reist, A. Benitez, L. Goodman; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 554-558  
The Synthesis of Some 5'-Thiopentofuranosylpyrimidines
- D. H. Rich, S. K. Gurwara; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1575-1579  
Preparation of a New o-Nitrobenzyl Resin for Solid-Phase Synthesis of tert-Butyloxycarbonyl-Protected Peptide Acids
- D. H. Rich, S. K. Gurwara; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 5, 301-304  
Removal Of C-Terminal Peptide Amides From A 3-Nitro-4-Aminomethyl-Benzoyl Amide Resin By Photolysis
- M. T. Roskey, P. Juhasz, I. P. Smirnov, E. J. Takach, S. A. Martin, L. A. Haff; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 4724  
DNA sequenching by delayed extraction-matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

## S

## 6. Literaturverzeichnis

- R. K. Saikai, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, 230, 1350-1354  
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia
- R. K. Saikai, T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich; *Nature* **1986**, 324, 163-166  
Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes
- H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827  
Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribopolynucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleotides and new synthesis of deoxyribonucleotide-3'-phosphates
- K. Schaper, D. Dommaschke, S. Globisch, S. A. Madani-Mobarekeh; *J. of Information Recording* **2000**, 25, 539-554
- O. D. Schärer; *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3052-3082  
Chemie und Biologie der DNA-Reparatur
- DNA Microarrays. A Practical Approach (Hrsg. M. Schena), Oxford Press, New York, **1999**
- Microarray Biochip Technology (Hrsg. M. Schena), Eaton, Natick, **2000**
- Methods in molecular biology, Volume 170: DNA arrays: methods and protocols (Hrsg. J. B. Rmoal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**
- E. Schröder: Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen **1991**, Springer Verlag, Berlin (ISBN 3-540-53329-X)
- J. Schuchhardt, D. Beule, A. Malik, E. Wolski, H. Eickhoff, H. Lehrbach, H. Herzel; *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28 (1), 47  
Normalization strategies for cDNA microarrays
- G. Schwedt: Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis **1995**, Georg Thieme Verlag Stuttgart (ISBN 3-13-100661-7)
- Markus Schweitzer; Dissertation Frankfurt am Main **1998**  
Synthese und Untersuchung chemisch modifizierter DNA am Beispiel der Oligonucleotid-Methylphosphonate
- F. Seela, K. Mersmann, J. A. Grasby, M. J. Gait; *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1809-1819  
7-Deazaadenosine: Oligoribonucleotide Building Block Synthesis and Autocatalytic Hydrolysis of Base-Modified Hammerhead Ribozymes.
- W. Seyffert, H. G. Gassen, O. Hess, H. Jäckle, K. F. Fischbach; Lehrbuch der Genetik **1998**, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (ISBN 3-437-25610-6)
- A. Shaler, J. N. Wickham, K. A. Sannes, K. J. Wu, C. H. Becker; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 576-579  
Effect of Impurities on the Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectra of Single-Stranded Oligodeoxynucleotides

## 6. Literaturverzeichnis

- T. A. Shaler, Y. Tan, J. N. Wickham, K. J. Wu, C. H. Becker; *Rapid Commun. Mass Spectrom* **1995**, 9, 942-947  
Analysis of enzymatic DNA sequencing reactions by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
- J. C. Sheehan, W. A. Bolhorter; *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2786-2788  
An Improved Procedure for the Condensation of Potassium Phthalimide with Organic Halides
- M. Shoffner, J. Cheng, G. E. Hvichia, L. J. Kricka, P. Wilding; *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 375-379  
Chip PCR: I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR
- J. M. Shumaker, J. J. Tollett, K. J. Filbin, M. P. Montague-Smith, M. C. Pirrung; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2269-2278  
APEX disease gene resequencing: mutations in exon 7 of the p53 tumor suppressor gene
- N. D. Sinha, V. Großbruchhaus, H. Köster; *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24 (9), 877-880  
Labile exocyclic amine protection of nucleosides in DNA, RNA and oligonucleotide analog synthesis facilitating N-deacylation, minimizing depurination and chain degradation
- N. D. Sinha, P. Davis, N. Usman, J. Perez, R. Hodge, J. Kremsky, R. Casale, *Biochimie*, **1993**, 75, 13-23  
Labile exocyclic amine protection of nucleosides in DNA, RNA and oligonucleotide analog synthesis facilitating N-deacylation, minimizing depurination and chain degradation.
- A. L. Smith, K. C. Nicolaou; *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2103-2117  
The Eneidyne Antibiotics
- E. M. Southern; *J. Mol. Biol.* 1975, 98, 503-517  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
- E. M. Southern, U. Maskos; *J. of Biotech* **1994**, 35, 217-227  
Parallel synthesis and analysis of large numbers of related chemical compounds: applications to oligonucleotides
- B. S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner; *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15 (12), 4837-4849  
The synthesis of protected 5'-mercapto-2',5'-dideoxyribonucleoside-3'-O-phosphoramidites; uses of 5'-mercapto-oligodeoxyribonucleotides
- H. A. Staab; *Angew. Chemie* **1962**, 74 (12), 407-423  
Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie Synthesen mit heterocyclischen Amiden (Azoliden)
- R. Steffens, C. J. Leumann; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11548-11549  
Tricyclo-DNA: A Phosphodiester-Backbone Based DNA Analog Exhibiting Strong Complementary Base-Pairing Properties
- E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky; *J. Coll. Interf. Sci.* **1991**, 143, 513-526

## 6. Literaturverzeichnis

- K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp; *Int. J. Spectrom. Ion Proc.* **1991**, 111, 89-102  
2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry
- A. Stutz, S. Pitsch; *Synlett* **1999**, S1, 930-934  
Automated RNA-Synthesis with Photocleavable Sugar and Nucleobase Protecting Groups
- R. Sudha, R. Zenobi; *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 3136-3143  
The Detection and Stability Duplexes Probed by MALDI Mass Spectrometry
- H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, K. Fufimoto, I. Saito; *J. Am Chem. Soc.* **1993**, 115, 4443
- T. Szabó, J. Stawinski; *Tetrahedron* **1995**, 51 (14), 4145-4160  
Synthesis and some conformational features of the 5'-deoxy-5'-methylphosphonate linked dimer, 5'-deoxy-5'-C-(phosphonomethyl) thymidin-3'-yl(thymidin-5'-yl) methylphosphonate [p(CH<sub>2</sub>)Tp(CH<sub>2</sub>)T].

## T

- N. Takeda, M. Shibata, N. Tajima, K. Hirao, M. Komiyama; *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4391-4396  
Kinetic and Theoretical Studies on the Mechanism of Alkaline Hydrolysis of DNA
- J. P. Tam, F. S. Tjoeng, R. B. Merrifield; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6117-6127  
Design and Synthesis of Multidetachable Resin Supports for Solid-Phase Peptide Synthesis
- K. Tang, S. L. Allmann, R. B. Jones; C. H. Chen, S. Araghi; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 435-439  
Laser mass spectrometry of oligonucleotides with isomer matrices
- K. Tang, D. Fu, S. Kötter, R. F. Cotter, C. R. Cantor, H. Köster; *Nucl. Acids Res.* **1995**, 23, 3126-3131  
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes
- G.S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1316-1319  
Transient Protection: Efficient one-flask synthesis of protected deoxynucleotides
- K. Tiefenthaler, Intergrated optical couplers as chemical waveguide sensors **1992**, in: *Advances in Biosensors* (Ed.: A. P. F. Turner), S. 261-289, Vol. 2, JAI Press, London
- E. N. Timofeev, S. V. Kochetkova, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev; *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 3142-3148  
Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels
- A. R. Todd; *Nobel-Lectures Chemistry 1942-1962*, World Scientific, Singapore, **1999**
- R. J. Trent; *Molekulare Medizin* **1994**, Spektrum Verlag, Heidelberg (ISBN 3-86025-243-7)
- E. Trévisiol, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (50), 8687-8690  
The Oxyamino-Aldehyde Coupling Reaction: An Efficient Method for the Derivatization of Oligonucleotides

## 6. Literaturverzeichnis

G. C. Tseng, M. K. Oh, L. Rohlin, J. C. Liao, W. H. Wong; *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29 (15), 2549-2557

Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects

M.S. Tswett; *Ber. Dtsch. Bot. Ges* **1906**, 24, 385

S. Tyagi, F. R. Kramer; *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303-308

Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization

### V

E. T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundström; *J. Coll. Interf. Sci.* **1991**, 147, 1, 103-118

Structure of 3-Aminopropyl Triethoxysilane on silicon oxid

J. C. Venter et al., *Science* **2001**, 291, 1304-1351

The Sequence of the Humane Genome

J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt; *J. Org. Chem.* **1972**, 37 (4), 2289-2299

Halo Sugar Nucleosides. III Reactions for the Chlorination and Bromination of Nucleoside Hydroxyl Groups

### W

T. Wagner, W. Pfeleiderer; *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 2023-2035

Synthesis of 2'-Deoxyribonucleoside 5'-Phosphoramidites: New Building Blocks for the Inverse (5'-3')-Oligonucleotide Approach

J. Wang; *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28 (16), 3011-3016

Survey and summary: From DNA biosensors to gene chips

S. S. Wang; *J. Org. Chem.* **1976**, 41 (20), 3258-3261

Solid Phase Synthesis of Protected Peptides via Photolytic Cleavage of the  $\alpha$ -Methylphenacyl Ester Anchoring Linkage

S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner; *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1601-1611

Photolabile Protecting Group for nucleosides: mechanistic studies of the 2-(Nitrophenyl)ethyl Group

G. R. Waller, O. C. Dermer: Biochemical applications of mass spectrometry **1980**, John Wiley & Sons, New York

J.D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964-967

Genetical implications of the structure of deoxyribose nucleic acid

J. D. Watson, J. Tooze, D. T. Kurtz: Rekombinierte DNA Eine Einführung **1989**, Spektrum Verlag, ISBN 3-922508-34-0

H. J. Watts, D. Yeung, H. Parkes; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4283-4289

Real-time detection and quantification of DNA hybridization by an optical biosensor

J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak; *Nature* **1999**, 399, 243-246

Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon

## 6. Literaturverzeichnis

- J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel, *Nucl. Acids Res.* **1997**, 25, 2792-2799  
Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays
- J. G. Wetmur, N. Davidson; *J. Mol. Biol.* **1968**, 31, 349-370  
Kinetics of renaturation of DNA
- J. G. Wetmur; *Biopolymers* **1975**, 14 (12), 2517-2524  
Acceleration of DNA Renaturation Rates
- F. Wetterich, Dissertation, Universität Basel, **1994**
- F. P. Wikman, M. L. Lu, T. Thykjaer, S. H. Olesen, L. D. Andersen, C. Cordon-Cardo, T. E. Orntoft; *Clin. Chem.* **2000**, 46, 1555-1561  
Evaluation of the performance of a p53 sequencing microarray chip using 140 previously sequenced bladder tumor samples
- M. Wilchek, E. A. Bayer; *Meth. Enzymol.* **1990**, 34, 463  
Introduction to avidin-biotin technology
- F. E. Wincott, N. Usmann; *Methods in Molecular Biology, Vol. 74: Ribozyme Protocols*, 59-68, Humana Press Inc., Totowa, NJ (Edited by P. C. Turner)  
A Practical Method for the Production of RNA and Ribozymes
- Christian Wojczewski; Dissertation, J. W. Goethe-Universität Frankfurt **1999**  
Synthese 3'-modifizierter Nukleotide und Entwicklung neuer Methoden für die DNA-Sequenzanalytik
- S. J. Wood; *Microchem. J.* **1993**, 47, 330-337  
DNA-DNA Hybridization in Real Time Using BIAcore
- K. J. Wu, A. Steding, C. H. Becker; *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1993**, 7, 142-146  
Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix
- K. J. Wu, T. A. Shaler, C. H. Becker; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1637 - 1645  
Time-of-flight mass spectrometry of underivatized single-stranded DNA oligomers by matrix-assisted laser desorption
- Y**
- G. Yershow, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanova, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, A. Mirzabekov; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4913-4918  
DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips
- R. W. Yip, Y. X. Wen, D. Gravel, R. Giasson, D. K. Sharma; *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 6078-6081  
Photochemistry of the o-Nitrobenzyl System in Solution: Identification of the Biradical Intermediate in the Intramolecular Rearrangement
- B. D. Young, M. L. Anderson, Quantitative analysis of solution hybridization **1985**, in : *Nucleic acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Kapitel 3, S. 47-72

**Z**

J. Zlatanova, A. Mirzabekov; *Methods in molecular biology* **2001**, Vol. 170: *DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rampal) Humana Press Totowa, NJ, 17 – 38

J. Zlatanova, A. Mirzabekov, *Methods in molecular biology* Vol. 170: *DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rampal) Humana Press Totowa, NJ, **2001**, 71-102

## CURRICULUM VITAE

### Persönliche Daten:

---

Name: **Kerstin Jahn-Hofmann**  
Adresse: Stoltzestraße 39  
D-63263 Neu-Isenburg  
Geburtsdatum: 05.05.1971  
Geburtsort: Flörsheim am Main  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: Verheiratet, seit 11. 05. 1994

### Schul- und Universitätsausbildung

03/2000 – 07/2004 **Doktorarbeit:** "Synthese von modifizierten Nukleotiden und modifizierten Oligodeoxynukleotiden zur DNA – Diagnostik" in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Engels, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt und Aventis Pharma Deutschland GmbH, Labor Dr. Eugen Uhlmann (G 838), Frankfurt

04/2000 – 04/2002 **Stipendium:** Des Fonds der Chemischen Industrie

02/1999 – 08/1999 **Diplomarbeit:** "Ansätze zur diastereoselektiven Synthese von Nukleosid-Methylphosphonaten an der festen Phase" in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Engels

10/1994 – 08/1999 Studium der Chemie  
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

1991 – 1994 Abendgymnasium für Berufstätige II, Frankfurt

1983 – 1987 Carl von Weinberg-Schule, Goldstein (Gesamtschule)

1981 – 1983 Friedjof Nansen-Schule, Frankfurt-Nied (Förderstufe)

1977 – 1981 Friedrich List-Schule, Frankfurt-Nied (Grundschule)

### Ausbildung und Berufstätigkeit:

---

04/2002 – 07/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Johann Wolfgang Goethe – Universität, Frankfurt

10/1994 – 02/1999 Technische Angestellte (Halbtagsstelle), Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Johann Wolfgang Goethe – Universität, Frankfurt

10/1990 – 10/1994 Chemielaborantin, (Hauptlaboratorium, G 830) Hoechst AG, Frankfurt-Höchst

09/1987 – 10/1990 Ausbildung zur Chemielaborantin Hoechst AG, Frankfurt-Höchst

## Publikationsliste

Mag, Matthias; Jahn, Kerstin; Kretzschmar, Gerhard; Peyman, Anusch; Uhlmann, Eugen. **Synthesis and duplex stability of oligodeoxyribonucleotides containing stereoregular or stereorandom octylphosphonate linkages.** *Tetrahedron* **1996**, 52(30), 10011-10024

Mag, Matthias; Muth, Jochen; Jahn, Kerstin; Peyman, Anusch; Kretzschmar, Gerhard; Engels, Joachim W.; Uhlmann, Eugen. **Synthesis and binding properties of oligodeoxyribonucleotides containing phenylphosphon(othio)ate linkages.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1997**, 5(12), 2213-2220

Reif, Bernd; Wittmann, Valentin; Schwalbe, Harald; Griesinger, Christian; Wörner, Karlheinz; Jahn-Hofmann, Kerstin; Engels, Joachim W.; Bermel, Wolfgang. **Structural comparison of oligoribonucleotides and their 2'-deoxy-2'-fluoro analogs by heteronuclear NMR spectroscopy.** *Helvetica Chimica Acta* **1997**, 80(6), 1952-1971

Eisenhardt, S.; Samstag, W.; Jahn-Hofmann, K.; Engels, J. W.; Renz, R.; Hofschneider, P. H.; Caselmann, W. H.; Alt, M. **Backbone modified antisense oligodeoxynucleotides directed against the hepatitis-C-virus (HCV)-RNA.** *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16(7-9), 1669-1672

Jahn-Hofmann, Kerstin; Engels, Joachim W. **A new concept for DNA-arrays.** Collection Symposium Series **2002**, 5 (Chemistry of Nucleic Acid Components), 335-337

Jahn-Hofmann, Kerstin; Engels, Joachim W. **A new concept for DNA-arrays.** *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 5-8, 1479-1482

Jahn-Hofmann, Kerstin; Engels, Joachim W. **Efficient solid phase synthesis of cleavable oligodeoxynucleotides based on a novel strategy for the synthesis of 5'-S-(4,4'-Dimethoxytrityl)-mercapto-amidites**, in work

Ellinger, Thomas; Ermantraut, Eugen; Ehrlich, Ralf; Engels, Joachim W.; Jahn-Hofmann, Kerstin. **Probe arrays containing selectively cleavable probes.** PCT Int. Appl. **2003**, 165 pp. CODEN: PIXXD2 WO 0318838 A2 20030306 CAN 138:216448 AN 2003:173823

## Eidesstattliche Erklärung

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

Neu-Isenburg, den .....

.....  
(Kerstin Jahn-Hofmann)