

Synthese und Strukturuntersuchungen an 2'-Fluor modifizierten UUCG-Haarnadelschlaufen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Thorsten Strube
aus
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main
Oktober 2001

Katharina und meinen Eltern

Wenn Ihr das Leben gar zu ernsthaft nehmt, was ist dann dran? Wenn uns der Morgen nicht zu neuen Freuden weckt, am Abend uns keine Lust zu hoffen übrig bleibt; ist´s wohl des An- und Ausziehens wert?

Scheint mir die Sonne heute, um das zu überlegen was gestern war? und um zu raten, zu verbinden, was nicht zu erraten, nicht zu verbinden ist, das Schicksal eines kommenden Tages?

Johann Wolfgang von Goethe

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels in der Zeit von Oktober 1997 bis Juni 2001 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. W. Engels danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung und die sehr guten experimentellen Bedingungen. Durch seine stetige Diskussionsbereitschaft hat er mit seinen Kenntnissen und Erfahrungen Einfluss auf diese Arbeit genommen. Dankbar schätzte ich auch die gewährte akademische Freiheit in der Zeit.

Weiterhin danke ich allen, die direkt oder indirekt zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich:

- Meinem Kollegen Jörg Parsch für die gute Zusammenarbeit, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft nicht nur während dieser Arbeit sondern in der gesamten Studienzeit;
- Meinen Kollegen Stefan Amberg und meinen Laborkolleginnen und -kollegen Peter Schell, Kerstin Jahn-Hofmann, Wolfgang Laux und Astrid Klöpfer für die angenehme Arbeitsatmosphäre;
- Olav Schiemann und Fraser Macmillan für die Aufnahme der ESR-Spektren;
- Dr. Zimmermann, seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter für die Messung von NMR-Spektren;
- Dr. Jan. W. Bats für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen und Auswertung der kristallographischen Daten;
- Hannelore Brill und Ilona Pries für die Messungen der Massenspektren;

- Marianne Christof für die Durchführung der Elementaranalysen;
- Rainer Schmitt für seine stete Hilfsbereitschaft;
- Dr. Valentin Wittmann für seine Diskussionsbereitschaft und die Bestellung von Literatur;
- Jörg Parsch und Katharina Aumüller für die kritische Durchsicht des Manuskripts;
- Allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre;
- Der Hermann Willkomm-Stiftung für die finanzielle Beihilfe zum Besuch des „XIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components“ vom 04.09.-10.09.1999 in Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik und des „XIVth International Roundtable Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications“ vom 10.09.-14.09.2000 in San Francisco, USA;

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Strukturen von Nukleinsäuren	8
2.1	Aufbau von DNA und RNA	8
2.2	Strukturen von DNA	9
2.3	Strukturen von RNA	15
2.3.1	Strukturelemente von RNA	15
2.3.2	Doppelstränge	17
2.3.3	Ausstülpungen	19
2.3.4	Haarnadelschlaufen.....	19
2.3.5	Interne Schleifen	20
2.3.6	Verbindungsstellen	21
2.3.7	Einzelsträngige Regionen	21
2.3.8	Tertiärstrukturelemente.....	21
3	Fluor ein vielseitiges Atom in der organischen Chemie	26
3.1	Fluorierung – warum ?.....	26
3.2	Substanzklassen fluorierter Moleküle.....	28
3.2.1	Hochfluorierte Verbindungen	28
3.2.2	Niedrigfluorierte Verbindungen	29
3.3	Fluorierungsmittel.....	31
3.3.1	Elementares Fluor	32
3.3.2	Fluoraktive Metallfluoride	32
3.3.3	Elektrofluorierung.....	33
3.3.4	Metallfluoride	33
3.3.5	Fluorwasserstoff.....	34
3.3.6	Schwefeltetrafluorid und Analoga	35
3.4	Fluorierung von Nukleosiden	36
3.4.1	Fluorierungspositionen	36
3.4.2	Auswirkungen von Fluor an der 2'-Position.....	37

4	Aufgabenstellung und Ziele.....	39
5	Synthese der Phosphoramidit-Bausteine für die Untersuchung des UUCG-Hairpins.....	42
5.1	Möglichkeiten zur Darstellung von 2'-fluorierten Pyrimidin-Bausteinen.....	42
5.2	Darstellung der 2'-fluorierten Uridin- und Cytidinphosphoramidite	43
5.2.1	Darstellung von 2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil 19	43
5.2.2	Darstellung von 2'-Fluor-2'-desoxyuridin 20	44
5.2.3	Schützung der 5'-OH-Funktion	45
5.2.4	Phosphitylierung	46
5.2.5	Umwandlung von 22a/b in sein Cytidinanalogon 23a/b	47
5.3	Darstellung von 2'-Desoxyuridinphosphoramidit 26a/b	50
6	Synthese und Charakterisierung der Oligonukleotide.....	51
6.1	Synthese von Oligonukleotiden	51
6.1.1	Phosphordiester-Methode.....	52
6.1.2	Phosphortriester-Methode.....	52
6.1.3	H-Phosphonat-Methode	53
6.1.4	Phosphoramidit-Methode.....	54
6.1.4.1	Basenschutzgruppen.....	56
6.1.4.2	Alternativen zu 1H-Tetrazol	57
6.1.4.3	Unterschiede zwischen DNA- und RNA-Synthese	58
6.2	In dieser Arbeit synthetisierte RNA-Oligonukleotide	59
6.2.1	Entschützung.....	62
6.3	Aufreinigung der RNA-Oligonukleotide	62
6.3.1	Anionenaustausch-HPLC.....	62
6.3.2	Entsalzen	64
6.4	Quantifizierung	64
6.4.1	Berechnung der Extinktionskoeffizienten	64
6.5	Charakterisierung der Oligonukleotide.....	66

7	Thermodynamische und spektroskopische Untersuchung von UUCG-Tetraloops	68
7.1	UV-Spektroskopie	68
7.1.1	Aufnahme von Schmelzkurven.....	70
7.1.2	Auswertung von Schmelzkurven.....	70
7.2	Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen an UUCG-Tetraloops.....	75
7.2.1	Konzeption.....	75
7.2.2	Bereits veröffentlichte Ergebnisse	76
7.2.3	Ergebnisse aus dem Einbau der Bausteine U _F 22a/b und C _F 23a/b	77
7.2.4	Ergebnisse aus dem Einbau des 2'-fluorierten Bausteins U ^F 27a/b	80
7.2.5	Ergebnisse aus dem Einbau des 2-Desoxyuridin Bausteins dU 26a/b	80
7.2.6	Ergebnisse aus dem Einbau des isosteren Uridinanalogs B 28a/b	81
7.2.7	Vergleich der Ergebnisse mit einer modellierten Struktur	82
7.3	CD-Spektroskopische Untersuchungen der UUCG-Tetraloops	83
7.4	Enthalpie-Entropie-Kompensation	88
8	ESR-Spektroskopie von Biomolekülen	91
8.1	Theoretische Grundlagen	91
8.2	Paramagnetische Sonden (Spin-Label)	96
8.3	Spin-Labeling von Proteinen	98
8.4	Spin-Labeling von Nukleinsäuren	100
9	Eine neue Methode für das Spin-Labeling von Oligonukleotiden	106
9.1	Konzeption.....	106
9.2	Synthese des Spin-Labels 29	108
9.2.1	Darstellung von (3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on)-hydrobromid 42	108
9.2.2	Darstellung von 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxamid 43	109
9.2.3	Oxidation der Aminofunktion zum Nitroxid	110
9.2.3.1	Darstellung von Dimethyldioxiran 45	110
9.2.4	Hydrolyse des Nitroxids 44	111
9.2.5	Strategien zur Darstellung des Aldehyds 48	112
9.2.5.1	Darstellung des Weinrebamids 50	113
9.2.5.2	Reduktion des Weinrebamids 50 zum Aldehyd 48	113

9.2.5.3	Kristallstruktur des Aldehyds 48	114
9.2.6	Verlängerung der Seitenkette des Aldehyds 48	114
9.2.7	Dehydrochlorierung zur Generierung des terminalen Alkins.....	116
9.2.8	Alternative Synthesewege.....	117
9.3	Darstellung der iodierten Phosphoramiditbausteine 39 und 40	120
9.3.1	Darstellung der acetyl-geschützten Bausteine	120
9.3.2	Einführung des Iodatoms mit Cerammoniumnitrat (CAN).....	120
9.3.3	Entschützung der Hydroxylfunktionen.....	122
9.3.4	Schützen der 5'-OH -Funktion.....	122
9.3.5	Schützen der 2'-OH-Funktion von Verbindung 62	123
9.3.6	Phosphitylierung	124
9.3.7	Syntheseübersichten der Phosphoramiditbausteine 39 und 40	125
9.4	Sonogashira-Kupplung	127
9.4.1	Kupplung in flüssiger Phase	127
9.5	Sonogashira-Kupplung an fester Phase	129
9.5.1	Wahl des Katalysators	131
9.5.2	Kupplungsversuche erst nach vollständigem Strangaufbau	132
9.6	Dargestellte gelabelte Stränge	132
9.7	Aufreinigung der Stränge.....	133
9.8	Analytik der gelabelten Stränge.....	135
9.8.1	Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie	135
9.8.2	Massenspektrometrie	135
9.8.3	Enzymatischer Verdau der Oligonukleotide.....	136
9.8.4	ESR-Spektroskopie.....	138
10	Zusammenfassung	141
11	Experimenteller Teil	146
11.1	Allgemeines	146
11.1.1	Chromatographie	146
11.1.2	Spektroskopie.....	147
11.1.3	Massenspektrometrie	148
11.1.4	Elementaranalyse	148
11.1.5	Schmelzpunktbestimmung.....	148

11.1.6	Enzymatische Hydrolyse	148
11.1.7	Chemikalienliste und Lösungen.....	149
11.2	Liste der synthetisierten Verbindungen.....	155
11.3	Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen	157
12	Literaturverzeichnis.....	204
13	Anhang	226
Teil A	Kristallstruktur von 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-N-oxyl 144	227
Teil B	Abbildung ausgewählter Spektren	237
Teil C	Abkürzungsverzeichnis.....	241
Teil D	Publikationen und Poster	247

1 Einleitung

Von Mendel bis zum Human Genom Projekt – Meilensteine genetischer Forschung

Mit der Aufstellung der Vererbungsgesetze im Jahr 1866 legte der Augustinermönch Gregor Mendel (1822-1884) die Grundlage für die systematische Erforschung des Bauplans des Lebens. Aus umfangreichen Kreuzungsexperimenten mit Varietäten derselben Pflanzenart konnte er Grundregeln ableiten, die die Weitergabe der Erbanlagen beschreiben (Mendel 1866).

Fast zeitgleich entdeckte der Schweizer Biochemiker Johann Friedrich Miescher (1844-1895) in Tübingen 1869 die Desoxyribonukleinsäure (DNA). Er erkannte, dass die DNA aus langen fadenartigen Molekülen besteht, die sich aus Phosphatresten, Zucker und verschiedenen Nukleobasen zusammensetzen. Ferner erkannte er, dass die DNA den Hauptbestandteil des Nukleus bildet. Der Begriff „Nukleinsäure“ für diese Substanzklasse wurde allerdings erst 1889 von Richard Altman geprägt.

Während die Mendelschen Gesetze die Genetik rein phänomenologisch und nicht auf molekularer Ebene beschreiben, war sich Miescher der Funktion der DNA nicht bewusst. Es sollte noch fast ein ganzes Jahrhundert dauern, bis feststand, dass die DNA der Träger der genetischen Information ist.

Dabei waren die Chromosomen als Träger der Erbanlagen schon 1883 von Wilhelm Roux und August F. L. Weismann erkannt worden. Aus diesen Erkenntnissen formulierte Theodor Boveri in der Zeit von 1902-1904 die Chromosomentheorie der Vererbung, die die Mendelschen Gesetze zum ersten Mal auf molekularer Ebene verständlich machten. Von der „Ein-Gen-ein-Protein“-Hypothese, die 1941 von George W. Beadle und Edward L. Tatum bestätigt wurde (Beadle & Tatum, 1941), war es trotzdem noch ein großer Schritt, den Zusammenhang zwischen DNA und den Genen herzustellen.

Zwar wusste man durch DNA-spezifische Färbemethoden, die Robert J. W. Feulgen in den zwanziger Jahren durchgeführt hat, dass DNA fast ausschließlich in den Chromosomen vorkommt, den aber wohl entscheidenden Hinweis gaben die Arbeiten von Fred Griffith und Oswald Avery. Griffith konnte 1928 mit Arbeiten an *Streptococcus pneumonia* zeigen, dass durch Hitze abgetötete, pathogene Zellen zu einem kleinen Prozentsatz nicht pathogene

Zellen in pathogene umwandeln können. Offensichtlich wurde die Erbinformation von den abgetöteten Bakterien auf die nicht pathogenen übertragen. Diesen heute als Transformation bezeichneten Vorgang hat Avery zum Anlass genommen, die biochemischen Eigenschaften der transformierenden Substanz zu untersuchen. Er behandelte die Bakterienextrakte mit Lipasen, Proteasen, RNasen und Saccharidasen, ohne dass die Transformation beeinträchtigt wurde. Ausschließlich die DNase-Behandlung führte zur Blockade der Transformation. Dieses war der erste Hinweis, dass zumindest bei Bakterien der transformierende Faktor die DNA ist (Avery *et al.*, 1944).

1952 konnten dann Alfred D. Hershey und Martha Chase endgültig nachweisen, dass die DNA das genetische Material ist. Sie zeigten, dass ausschließlich die DNA eines Phagen in das Wirtsbakterium eindringt und die aus Proteinen aufgebaute Virushülle außen zurückbleibt (Hershey & Chase, 1952).

Nach dieser Erkenntnis sollte die Aufklärung der molekularen Struktur der DNA der nächste Meilenstein der Molekularbiologie werden. Erwin Chargaff stellte die nach ihm benannte Regel auf, dass sich die Mengen von Guanin und Cytosin sowie Adenin und Thymin in einem DNA-Molekül entsprechen (Chargaff, 1951).

Schon kurze Zeit später war bekannt, dass die einzelnen Nukleotide über 3'-5'-Phosphordiesterbrücken verknüpft sind (Brown & Todd, 1952). Außerdem war aus Röntgenbeugungsmustern bekannt, dass die DNA eine Helixstruktur aus zwei antiparallelen Strängen aufweist. Trotz dieser Erkenntnisse war es noch eine große intellektuelle Leistung, anhand dieser Indizien die Struktur der DNA aufzuklären. Mit Hilfe von Modellen gelang es James D. Watson und Francis H. C. Crick im Frühjahr 1953 am Cavendish Laboratorium in Cambridge, die Struktur der DNA aufzuklären. Sie kamen zu dem Schluss, dass die beiden Zucker-Phosphat-Rückgrate auf der Außenseite des Moleküls liegen müssen, während die Purin- und Pyrimidinbasen innerhalb des Moleküls liegen. Hier stehen sich die Basen jeweils so gegenüber, dass eine Purinbase mit einer Pyrimidinbase Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Die Wasserstoffbrücken der charakteristischen A-T und C-G Basenpaare halten die komplementären Stränge zusammen und stabilisieren die Doppelhelixstruktur (Watson & Crick, 1953a). Für diese Leistung wurden Watson und Crick zusammen mit Maurice Wilkins mit dem Medizin Nobelpreis ausgezeichnet.

Durch die Komplementarität der Stränge lassen sich nun auch die Chargaff-Regeln auf struktureller Ebene verstehen. Sie erlauben außerdem eine plausible Erklärung für den Mechanismus der DNA Vervielfältigung (Replikation). Es waren erneut Watson und Crick,

die hierfür ein Modell vorschlugen (Watson & Crick, 1953b), das von Matthew Meselson und Franklin W. Stahl 1958 experimentell bestätigt wurde (Meselson & Stahl, 1958). Dabei trennen sich die in der Doppelhelix umwundenen Stränge und dienen nach den Watson-Crick Regeln der Basenpaarung als Matrize für den Aufbau neuer Stränge.

Francis Crick war es auch, der das sogenannte zentrale Dogma der Molekularbiologie aufgestellt hat. Es beinhaltet eine gewisse Hierarchie der Biomoleküle bei dem Fluss der genetischen Information vom Gen zum Protein (Crick, 1958; Crick 1970).

DNA Stränge dienen zur Speicherung von Information, wenn sie als Matrize für komplementäre DNA-Stränge fungieren (Replikation). Um genetische Informationen in ein Protein umzusetzen, werden komplementäre Ribonukleinsäuren (RNA) synthetisiert (Transkription).

Diese als messenger-RNA (mRNA) bezeichneten Moleküle tragen die Information aus dem Zellkern in das Cytoplasma und dienen als Bauplan für die Proteinsynthese an den Ribosomen (Translation). Dieses Grundprinzip der Weitergabe und des Flusses der genetischen Information hat seine Gültigkeit bis heute behalten (Abb. 1.1).

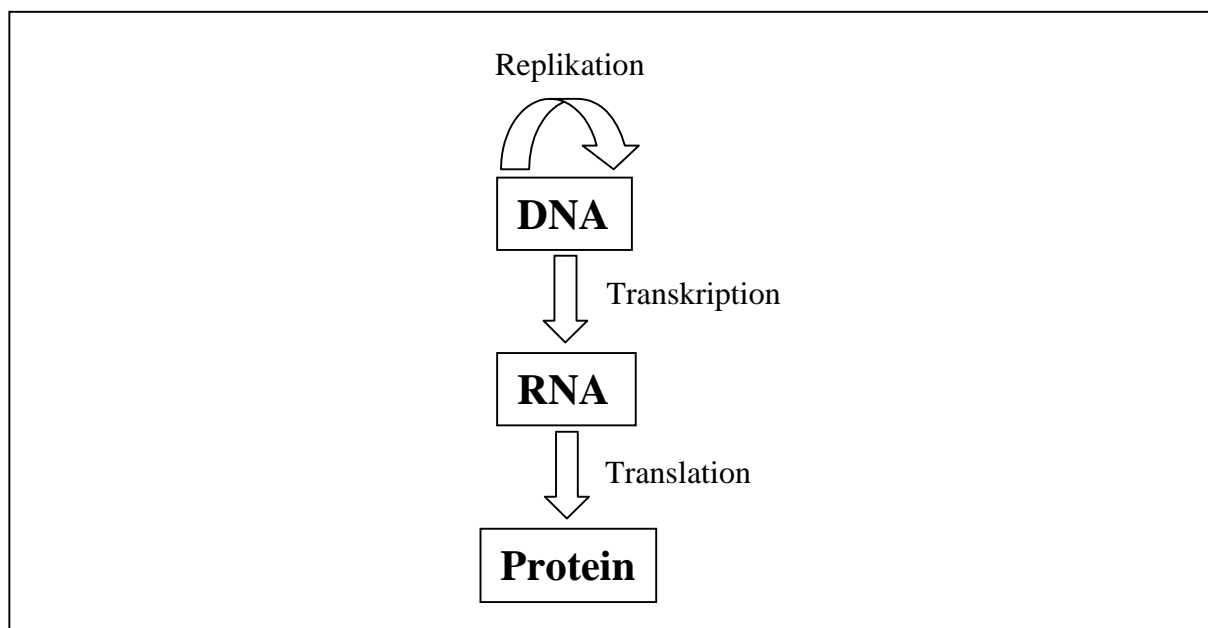


Abb.1.1 Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Allerdings mussten mit der Zeit Ergänzungen gemacht werden, so etwa die Umschreibung genetischer Information von RNA in DNA bei der Reversen Transkription, die Bestandteil des Lebenszyklus von Retroviren (z.B. HIV) ist.

In jüngster Zeit scheint mit der Verbreitung der spongiformen Enzephalopathien das molekularbiologische Dogma verletzt oder zumindest einer Erweiterung bedürftig.

Auf der bisher vergeblichen Suche nach einem viralen Erreger, der diese Krankheiten auslöst, haben Wissenschaftler eine Prionentheorie aufgestellt. Bei Prionen handelt es sich um infektiöse Proteine, die zur Konformationsänderung bei anderen Proteinen führen. Es scheint, als seien Prionen infektiöse Partikel, die sich im Wirt ohne Nukleinsäure zu replizieren vermögen. Auch wenn dabei nicht die Information für die Aminosäuresequenz des Prions übertragen wird, sondern die Information für dessen räumliche Struktur, so handelt es sich doch um einen Informationsfluss von Protein zu Protein (Edendorfer *et al.*, 1997).

Nach der Aufklärung der DNA-Struktur und der Erforschung des genetischen Informationsflusses stand in den folgenden Jahren die Entschlüsselung des genetischen Codes, der „Sprache“ der DNA, im Mittelpunkt des Interesses. Wesentliche Beiträge stammen aus den frühen 60er Jahren von H. Gobind Khorana, Robert W. Holley und Marshall W. Nirenberg (Nirenberg *et al.*, 1963; Khorana, 1965). Die vor allem von Khorana und seinen Mitarbeitern vorangetriebene Forschung auf dem Gebiet der chemischen Oligonukleotidsynthese machten es möglich, Oligonukleotide als Matrizen für die Proteinbiosynthese einzusetzen. Aus den jeweils eingebauten Aminosäuren war ein Rückschluss auf den genetischen Code zu ziehen.

Die universellen Basiseinheiten dieses Codes sind Basentriplets, welche jeweils für eine Aminosäure stehen. Viele Aminosäuren werden durch verschiedene Triplets codiert, man spricht hier von der Degenerierung des genetischen Codes. Von den 64 möglichen Kombinationen der drei Basen stehen 61 Kombinationen für Aminosäuren, die übrigen stehen für Stoppsignale. Als Startsignal für die Proteinbiosynthese wirkt das Basentriplett AUG, das außerdem für die Aminosäure Methionin steht. Bemerkenswert ist, dass dieser Code von fast allen Organismen unverändert benutzt wird (Nirenberg, 1973).

Der stark wachsende Forschungsaufwand führte sehr schnell zu immer neuen Erkenntnissen auf dem Gebiet der Nukleinsäuren. Die Entwicklung und Optimierung gentechnischer Arbeitsmethoden vollzogen sich rasant. Durch die Entdeckung von Restriktionsenzymen Ende der 60er Jahre wurde das Tor zur Gentechnik geöffnet. Diese Enzyme erlauben es, DNA und RNA an spezifischen Restriktionsschnittstellen zu schneiden. Andere Enzyme können Stränge miteinander verknüpfen oder Phosphatgruppen an das Ende von Strängen anfügen. So sind heute die Isolation von Nukleinsäuren aus Organismen, das Schneiden und Einfügen von

synthetisierten Abschnitten, das Wiederverbinden und Zurückübertragen in die Zelle in Laboratorien zur Routine geworden.

Ein wichtiger Fortschritt in der Nukleinsäuretechnik war die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction, PCR) durch Kary Mullis, die die Vervielfältigung von DNA- und RNA-Molekülen erlaubt (Saiki *et al.*, 1985). Mit Hilfe von Enzymen (Polymerasen) wird ein vorhandener DNA-Strang mehrfach kopiert. Diese Technik findet heute weite Verbreitung und Anwendung auf vielen Gebieten vor allem in der medizinischen Diagnostik sowie Forensik, wo minimalste Spuren von DNA -theoretisch reicht ein Molekül- nach Vervielfältigung durch PCR identifiziert und zur Überführung eines Täters genutzt werden können.

1977 schafften Allan M. Maxam und Walter Gilbert den Durchbruch auf dem Gebiet der chemischen Sequenzierung von DNA Strängen (Maxam & Gilbert, 1977). Im gleichen Jahr stellte Frederick Sanger mit der Didesoxymethode ein enzymatisches Sequenzierungs-Verfahren vor.

Dabei wird ausgehend von einem als Matrize dienenden DNA Strang durch eine DNA-Polymerase ein neuer Strang aufgebaut. Zusätzlich zu den von der Polymerase benötigten Triphosphaten der Nukleoside sind auch in geringen Mengen 2',3'-Didesoxynucleosid-Triphosphate zugesetzt. Der Einbau eines solchen Nukleosids führt zu einem Kettenabbruch an dieser Stelle, da diesem die 3'-Hydroxylgruppe für eine weitere Kettenverlängerung fehlt. Es entsteht eine statistische Mischung von DNA Stücken unterschiedlicher Länge.

Eine Auftrennung nach Fragmentgröße auf einem Elektrophoresegel und anschließende Detektion ermöglicht dann die Bestimmung der Sequenz (Sanger *et al.*, 1977). Heute existieren leistungsfähige Sequenzierungsautomaten, die einen hohen Sequenzierdurchsatz erlauben.

Parallel zu den enzymatischen Methoden wurden auch Techniken zur chemischen Synthese von DNA und RNA entwickelt. Da DNA Polymerasen keine „de novo“ Synthese durchführen können, sondern nur in der Lage sind vorhandene Stränge (Primer) zu verlängern, ist der Bedarf nach kurzen Oligonukleotiden vor allem durch die immer stärkere Verbreitung der PCR- und Sequenzierungsmethoden sehr groß geworden. Außerdem ist der Einbau chemisch modifizierter Nukleotide mit Enzymen nicht immer zu bewerkstelligen. 1963 hat Robert B. Merrifield die chemische Peptidsynthese auf die feste Phase übertragen (Merrifield, 1963). Aufbauend auf der Festphasensynthese und der Phosphit-Triester-Methode (Letsinger *et al.*,

1975) haben 1987 Serge L. Beaucage und Marvin H. Caruthers die Phosphoramiditmethode entwickelt (Beaucage & Caruthers, 1981; Beaucage, 1993), die heute routinemäßig an leistungsfähigen Syntheseautomaten durchgeführt wird.

Der große Forschungsaufwand weltweit und die rasante Entwicklung von Klonierungs- und PCR-Methoden, automatisierten Oligonukleotidsynthesen und vor allem die Konstruktion hochleistungsfähiger Sequenzierungsautomaten haben zu einem bedeutenden Meilenstein in diesem Jahr geführt.

Im Februar diesen Jahres ist das vollständig sequenzierte menschliche Genom zeitgleich in Nature und Science veröffentlicht worden. 1990 hatte das amerikanische National Health Institute das „Human Genom Projekt“ ins Leben gerufen. Ziel war es, die ca. drei Milliarden chemischen „Buchstaben“ bis zum Jahr 2005 zu sequenzieren. Obwohl zu diesem Zeitpunkt die nötigen Techniken zur Klonierung menschlicher Chromosomsequenzen, die genetische und physikalische Kartierung der Chromosomen und die eigentliche Sequenzierung noch in den Kinderschuhen steckten, wurde dieses technologisch und finanziell aufwendige Projekt in Angriff genommen. Im Dezember 1999 wurde die Sequenz des menschlichen Chromosoms 22 von einem internationalen Konsortium, angeführt vom britischen Sanger-Center, bekannt gegeben.

Im Mai 2000 folgte die Entschlüsselung des Chromosoms 21 durch ein deutsch-japanisches Konsortium in Berlin und Tokio. Im Juni 2000 wurde die Entschlüsselung des gesamten menschlichen Bauplanes in Entwurfsqualität in Pressekonferenzen bekannt gegeben. Das akademische HGP-Konsortium und die konkurrierende Firma Celera Genomics haben die Ergebnisse schließlich im Februar 2001 veröffentlicht (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Celera, 2001).

Die Kenntnis des genetischen Bauplanes des Menschen in Kontext mit den Bauplänen anderer Organismen ist eine einzigartige wissenschaftliche Errungenschaft, die mit der Mondlandung oder der Erfindung des Buchdrucks verglichen werden kann. Die Konsequenzen für die Wissenschaft, vor allem für die Biologie und Medizin sind noch nicht abzusehen. Die Konsequenzen dieses Wissens werden aber weit in gesellschaftliche und ethische Aspekte hineinreichen. Wie werden wir in Zukunft mit Genomtests und ihren Informationen umgehen? Werden wir verhindern können, dass individuelle genetische Informationen als Entscheidungsgrundlage für Versicherungen, Krankenkassen oder Arbeitgeber fungieren?

Inwieweit werden sich Gentests in der pränatalen Diagnostik durchsetzen und welche Konsequenzen für das ungeborene Leben resultieren daraus?

Der Umgang mit menschlichen Genen, die mögliche Klonierung menschlicher Zellen, Patentrechte auf humane Gensequenzen oder die Präimplantationsdiagnostik (PID) sind heute schon Gegenstand kontroverser internationaler Debatten.

Aber auch für die Forschung sind viele Fragen zu klären. Nach der Entschlüsselung des Genoms wird es in Zukunft darum gehen, die Gene zu identifizieren. Glaubte man vor kurzem noch, dass ca. 100.000 Gene nötig sind, um die komplexen Prozesse menschlicher Zellen zu steuern, so vermutet man heute, dass ca. 30.000 Gene ausreichen. Diese können rechnerisch aber nur ca. 200.000 Transkripte codieren. Darüber hinaus interagieren die Gene mit Proteinen und RNA in einer Vielzahl hochkomplexer Kaskaden. Durch differenzielles Spleißen können aus einem Gen verschiedene Transkripte und damit verschiedene Proteine entstehen. Jedes Protein kann darüber hinaus nach der Translation am Ribosom funktionell zum Beispiel durch Zuckerreste modifiziert werden, sodass in den 30.000 Genen letzten Endes weit mehr als 30.000 Bauanleitungen stecken.

Um in Zukunft diese hochkomplexen Probleme lösen und die damit verbundenen Datenmengen verarbeiten und auswerten zu können, werden auf der Chiptechnologie basierende Genomuntersuchungen und die Bioinformatik eine große Rolle spielen. Desweiteren wird es wichtig sein, Strukturen von Biomolekülen schneller und präziser aufklären und verstehen zu können. Die Aufklärung und genaue Kenntnis von Struktur-Wirkungsbeziehungen der vielfältig interagierenden Biomoleküle werden die Wissenschaft noch lange beschäftigen und weitere Meilensteine setzen.

2 Strukturen von Nucleinsäuren

2.1 Aufbau von DNA und RNA

Nucleinsäuren sind fadenförmige, langkettige Moleküle, deren Basiseinheiten verschiedene Nucleotide bilden. Nucleotide bestehen aus einer Pentose, einer Base und einer Phosphatgruppe. Bei dem Zucker handelt es sich um 2'-Desoxy-D-ribose im Falle eines DNA- und um D-Ribose im Falle eines RNA-Moleküls. Abbildung 2.1 zeigt einen Ausschnitt aus einem Polynucleotidmolekül. Neben den charakteristischen Einheiten sind auch die verschiedenen Torsionswinkel bezeichnet.

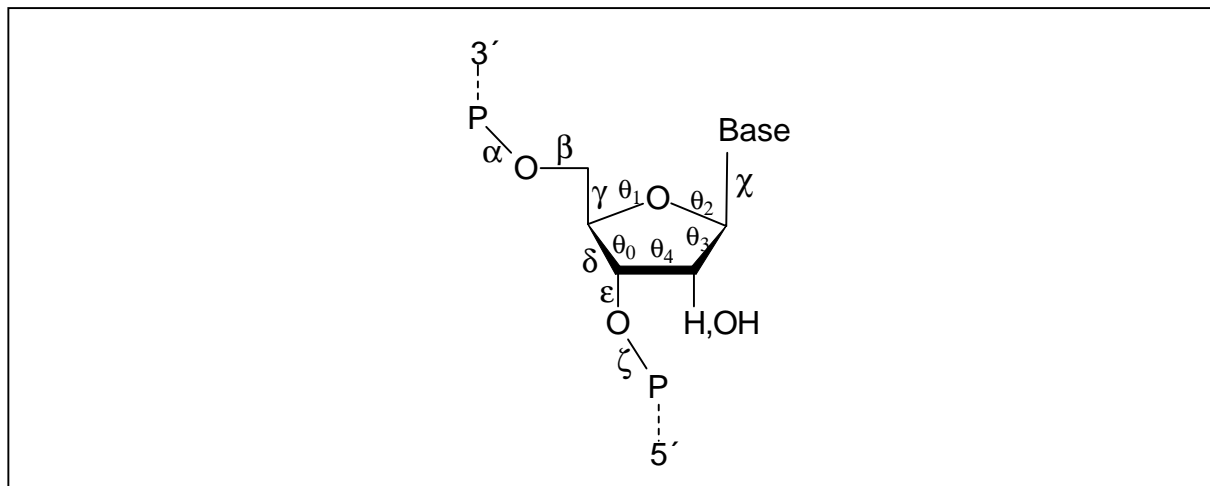


Abb. 2.1 Ausschnitt aus einem Polynucleotidmolekül mit Notation der Torsionswinkel

Über die 1'-Position ist der Zucker mit heterocyclischen Basen über eine β -N-glycosidische Bindung verknüpft. Bei den Basen handelt es sich um die Purin-Derivate Guanin (G) und Adenin (A) sowie die Pyrimidin-Derivate Thymin (T) und Cytosin (C). Bei RNA ist Thymin durch Uracil (U) ersetzt, die sich lediglich durch das Fehlen der Methylgruppe in 5-Position unterscheiden.

Relativ zum Zucker können diese Basen zwei Hauptorientierungen einnehmen. Diese werden über den Winkel χ definiert (bei Purinen O4'-C1'-N9-C4, bei Pyrimidinen O4'-C1'-N1-C2). Zeigt der Hauptteil des Heterocyclus vom Zucker weg, spricht man von der *anti*-Konformation, die gleichzeitig die Hauptkonformation darstellt. Zeigen die Basen mit ihrem Hauptteil zum Zucker hin, ist dieses die *syn*-Konformation, wie sie beispielsweise bei den Purinen in der Z-DNA vorkommt.

Die Nucleobasen selbst können prinzipiell verschiedene tautomere Formen aufweisen. Zu einem existiert eine Keto-Enol- zum anderen eine Amino-Imino-Tautomerie, die in Abbildung 2.2 dargestellt sind. Spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass die fünf natürlich vorkommenden Basen zu über 99,99% jeweils als Keto- und Amino-Tautomer vorliegen.

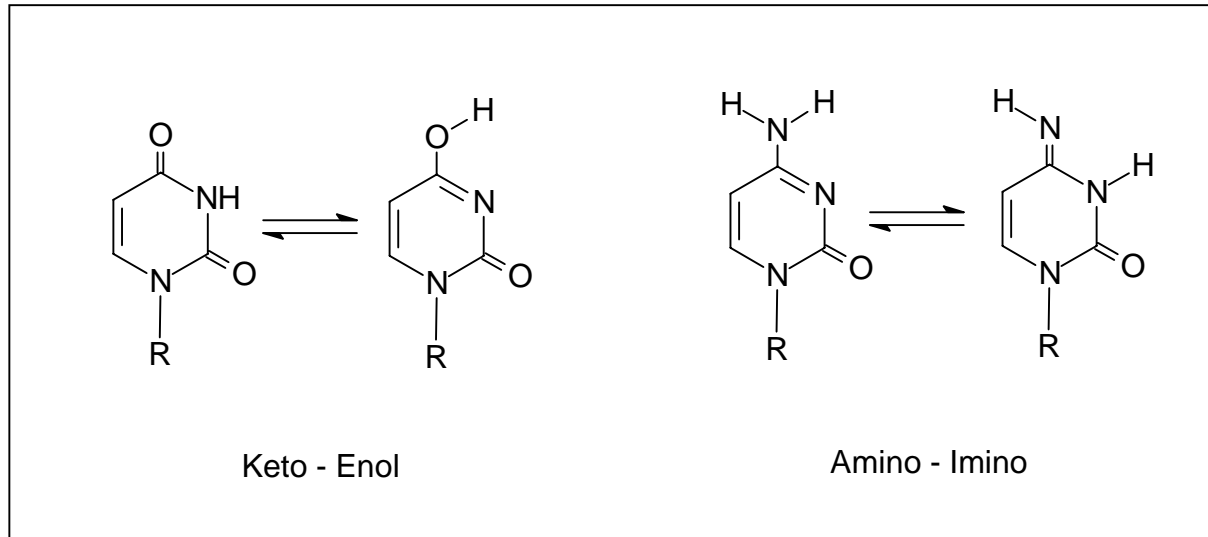


Abb. 2.2 Beispiele für Keto- Enol- und Amino-Imino-Tautomerie bei den Pyrimidin-Basen

Eine Einheit aus Zucker und der jeweiligen Base bezeichnet man als Nucleosid. Im Fall der RNA sind es Guanosin, Adenosin, Cytidin und Uridin, die entsprechenden DNA-Nucleoside werden aufgrund der Desoxyribose als Desoxyguanosin, Desoxyadenosin, Desoxycytidin und Desoxythymidin bezeichnet. In Abgrenzung dazu versteht man unter Nucleotiden die Phosphatester der Nucleoside. Die jeweiligen Zucker sind über ihre 3'- und 5'-Hydroxylfunktionen über Phosphodiester-Einheiten miteinander verknüpft und bilden das Rückgrat der Nucleinsäurestränge. Abbildung 2.3 zeigt einen schematischen Aufbau von DNA.

2.2 Strukturen von DNA

1953 haben Watson und Crick ein Modell der DNA Doppelhelix entworfen, das folgende charakteristische Eigenschaften besitzt:

- Die Doppelhelix besteht aus zwei gegenläufig (antiparallel) ausgerichteten Polynucleotidsträngen, die sich um eine gemeinsame Achse winden.

- Die Helix ist rechtsgängig.
- Die beiden Stränge werden durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten, die die komplementären Basen Adenin und Thymin sowie Guanosin und Cytosin ausbilden. Diese Art der Basenpaarung wird als Watson-Crick Basenpaarung bezeichnet. In der Basensequenz liegt die genetische Information (Abb. 2.5).
- Die Doppelhelix erfährt eine weitere Stabilisierung durch Stapelungswechselwirkungen zwischen den Basen des jeweils gleichen Stranges.
- Während sich die Basen im Inneren der Helix befinden, steht das Zucker-Phosphat Gerüst außen. Die Zucker sind fast senkrecht zu den Basen ausgerichtet.
- Da sich die glycosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht diametral gegenüber liegen, entstehen außen eine kleine und große Furche.

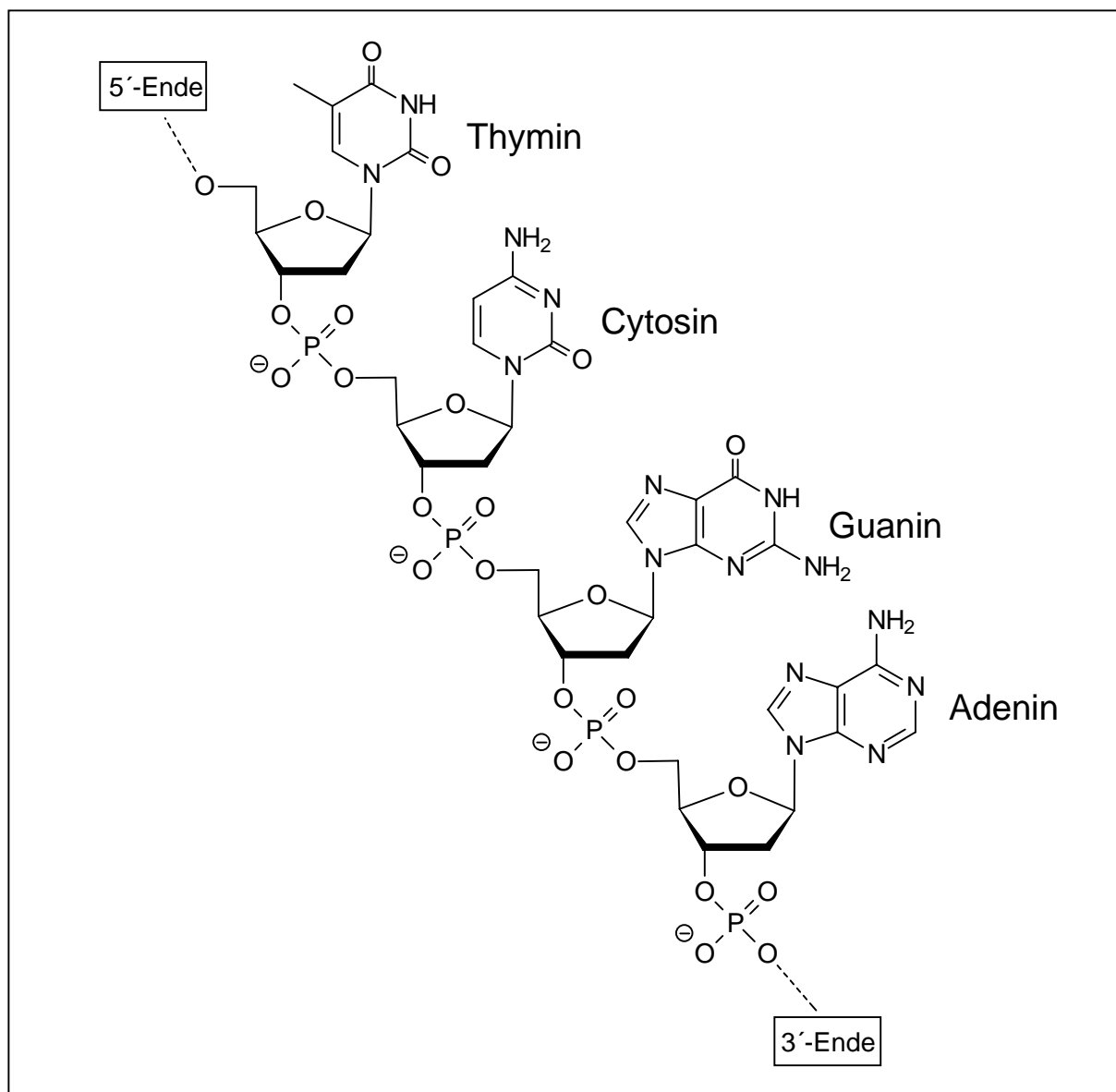


Abb. 2.3 Schematischer Aufbau der DNA mit Bezeichnung der Nucleobasen

Diese natürliche Form der DNA wird als B-DNA bezeichnet. Ihre strukturelle Stabilität steht im engen Verhältnis zu dem Vorhandensein von Wassermolekülen, die hochgeordnet in der kleinen und großen Furche sowie an den Nukleobasen zu finden sind. Darüber hinaus existieren noch zwei weitere Formen, die als A-DNA und Z-DNA bezeichnet werden.

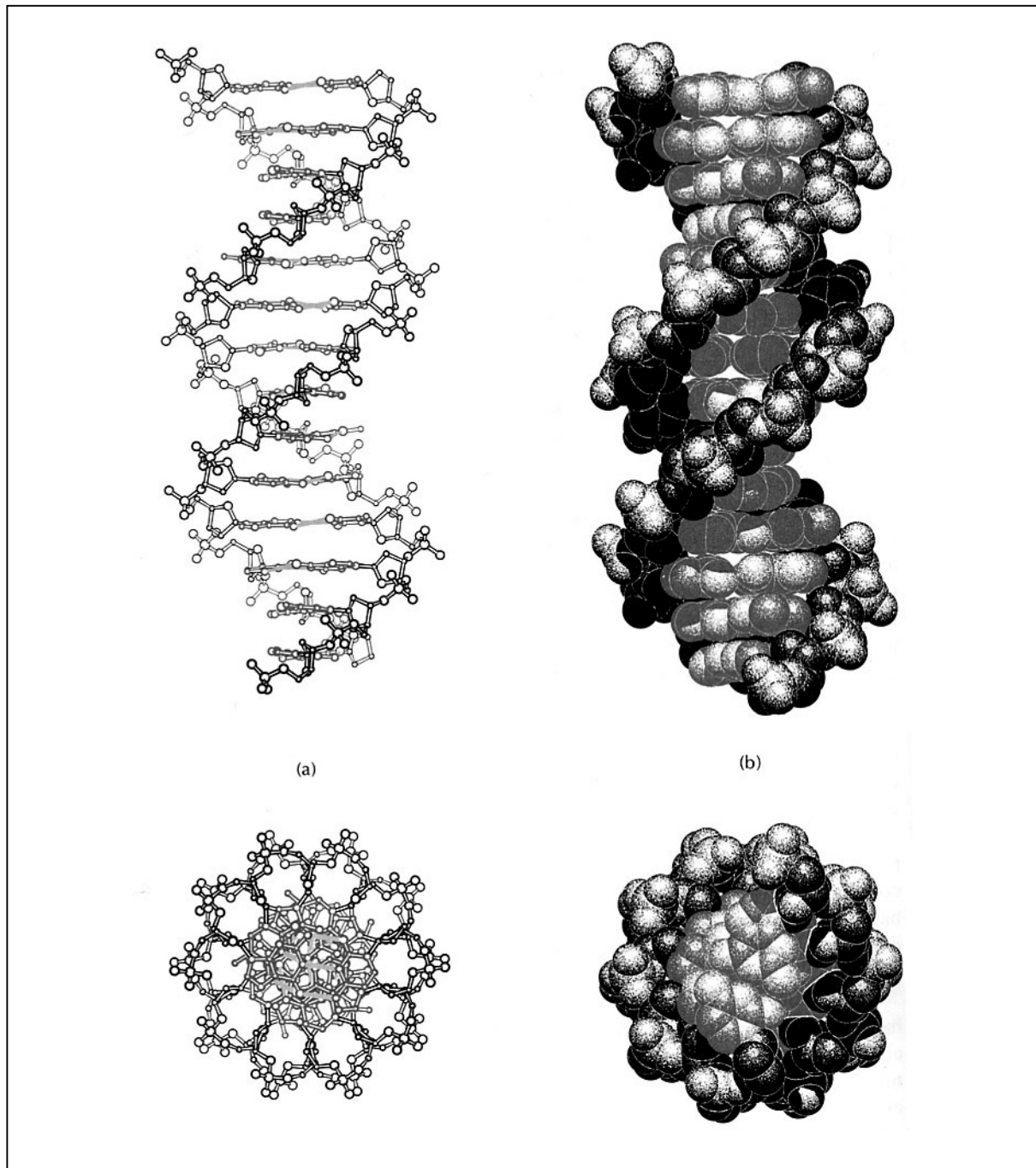


Abb. 2.4 B-DNA in Auf- und Seitenansicht

Die A-DNA, deren Struktur anhand von Röntgenbeugungsmustern dehydratisierter DNA aufgeklärt wurde, weist ebenfalls eine rechtsgängige Doppelhelix aus antiparallelen Strängen auf. Diese wird gleichermaßen durch Watson-Crick Basenpaare zusammengehalten.

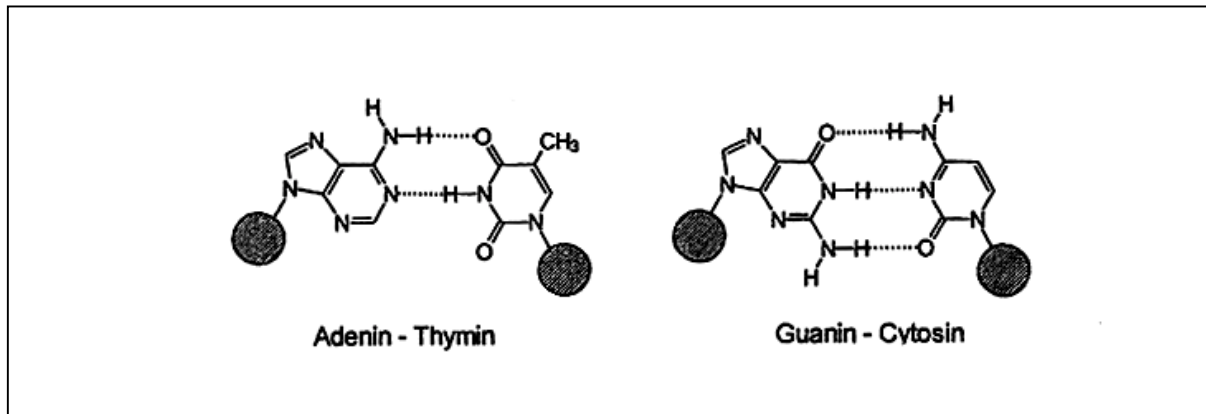


Abb. 2.5 Watson-Crick Basenpaare

Im Gegensatz zur B-DNA findet man sie vor allem bei Anwesenheit weniger Wassermoleküle und einer hohen Salzkonzentration.

Die strukturellen Unterschiede zwischen A- und B-DNA entstehen vor allem durch eine Konformationsänderung des Furanose-Rings. Dieser kann in einer E-Konformation (envelope) oder einer T-Konformation (twist) vorliegen.

In der E-Konformation steht ein Atom aus der Ebene heraus, während sich die anderen in einer Ebene befinden. Bei der T-Konformation liegen drei Atome in einer Ebene während die Atome benachbarter Zentren nach oben beziehungsweise nach unten aus der Ebene herausstehen.

Die Bezeichnung dieser Konformationen richtet sich nach der Orientierung der aus der Ebene herausstehenden Atome relativ zu C5'. Zentren die auf der gleichen Seite wie C5' stehen, werden als *endo*, Zentren, die in die andere Richtung stehen, als *exo* bezeichnet. Die folgende Abbildung 2.6 verdeutlicht diese Zusammenhänge.

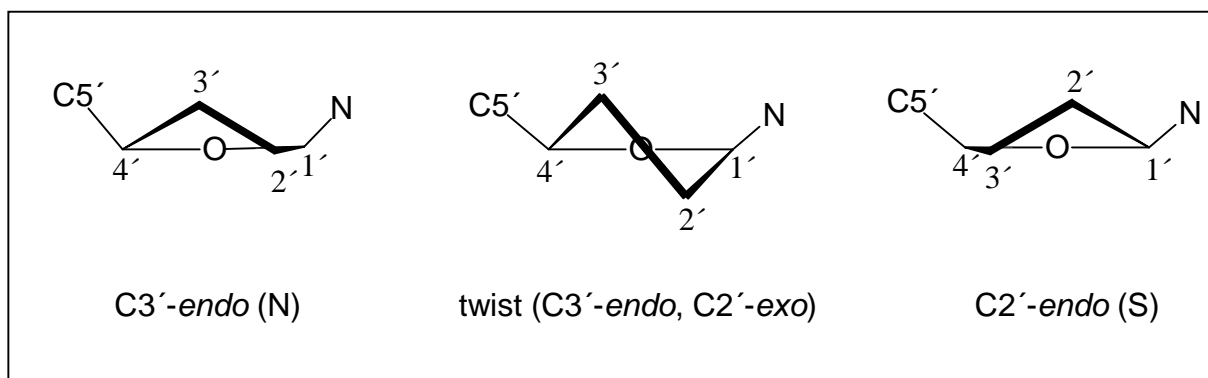
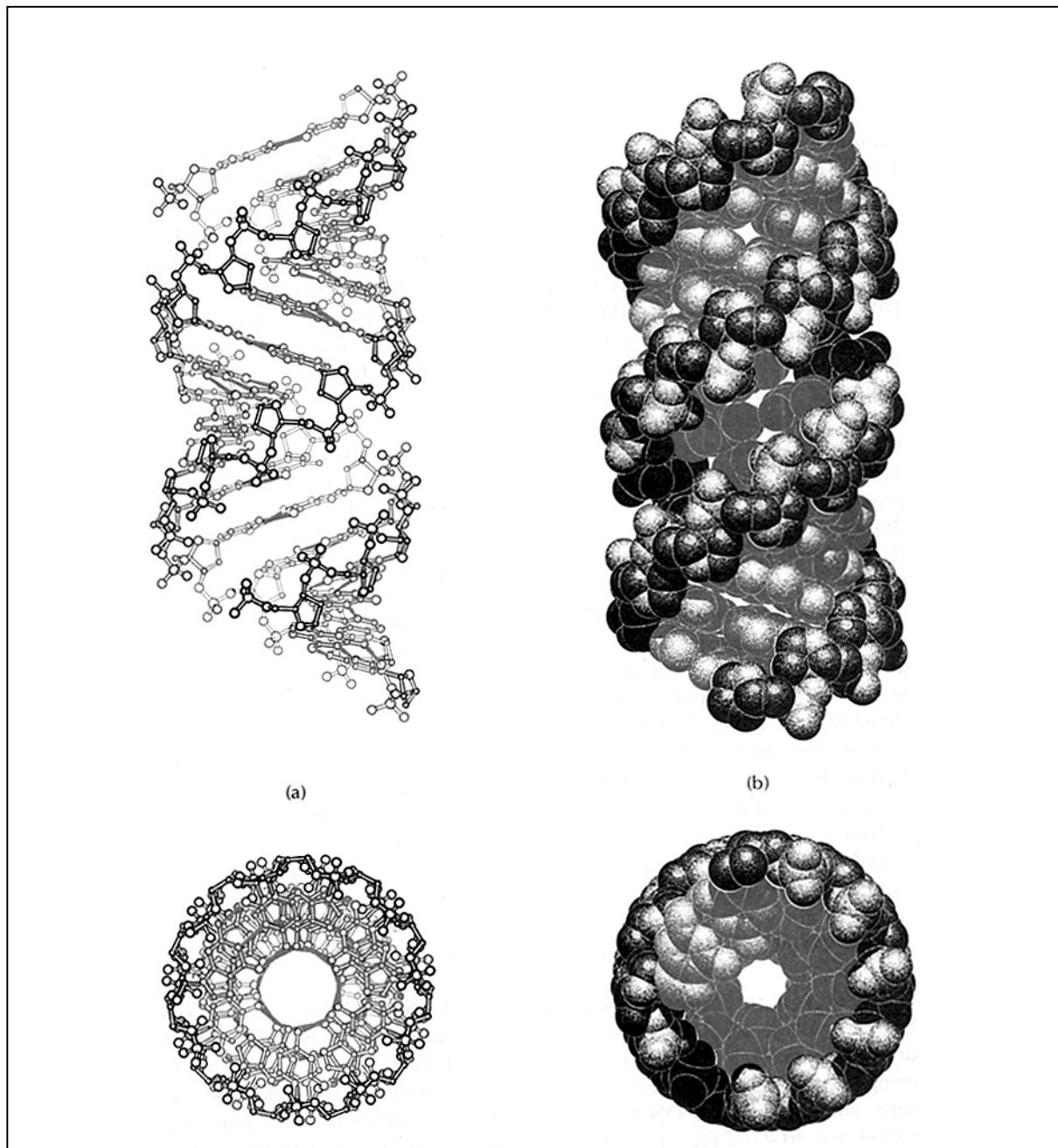


Abb. 2.6 Konformationen der Furanose

Die A-DNA (Abb. 2.7) besitzt Zuckereinheiten mit einer C3'-*endo* Konformation, B-DNA hingegen solche mit C2'-*exo* Konformation. Entsprechend dem Pseudorotationszyklus der Furanose werden diese jeweils auch als N (north) und S (south) Formen bezeichnet.



2.7 A-DNA in Auf- und Seitenansicht (Saenger, 1988)

Die Z-DNA wurde von Alexander Rich entdeckt. Bei der Strukturaufklärung des Hexanukleotids CGCGCG stieß man auf eine linksgängige Helix, bei der die Phosphatgruppen im Rückgrat einen Zickzackverlauf zeigen. Diese Anordnung resultiert daraus, dass die repetitiven Einheiten hier nicht Mononukleotide, sondern Dinukleotide sind.

Bei den beschriebenen drei Formen handelt es sich um wichtige Hauptkonformationen. Aus CD-spektroskopischen Untersuchungen jüngerer Zeit ist aber bekannt, dass es sich hierbei nicht um die einzigen, von unterschiedlicher Umgebung abhängigen Strukturen handelt, sondern eine große Vielzahl weiterer Strukturen in Lösungen existieren.

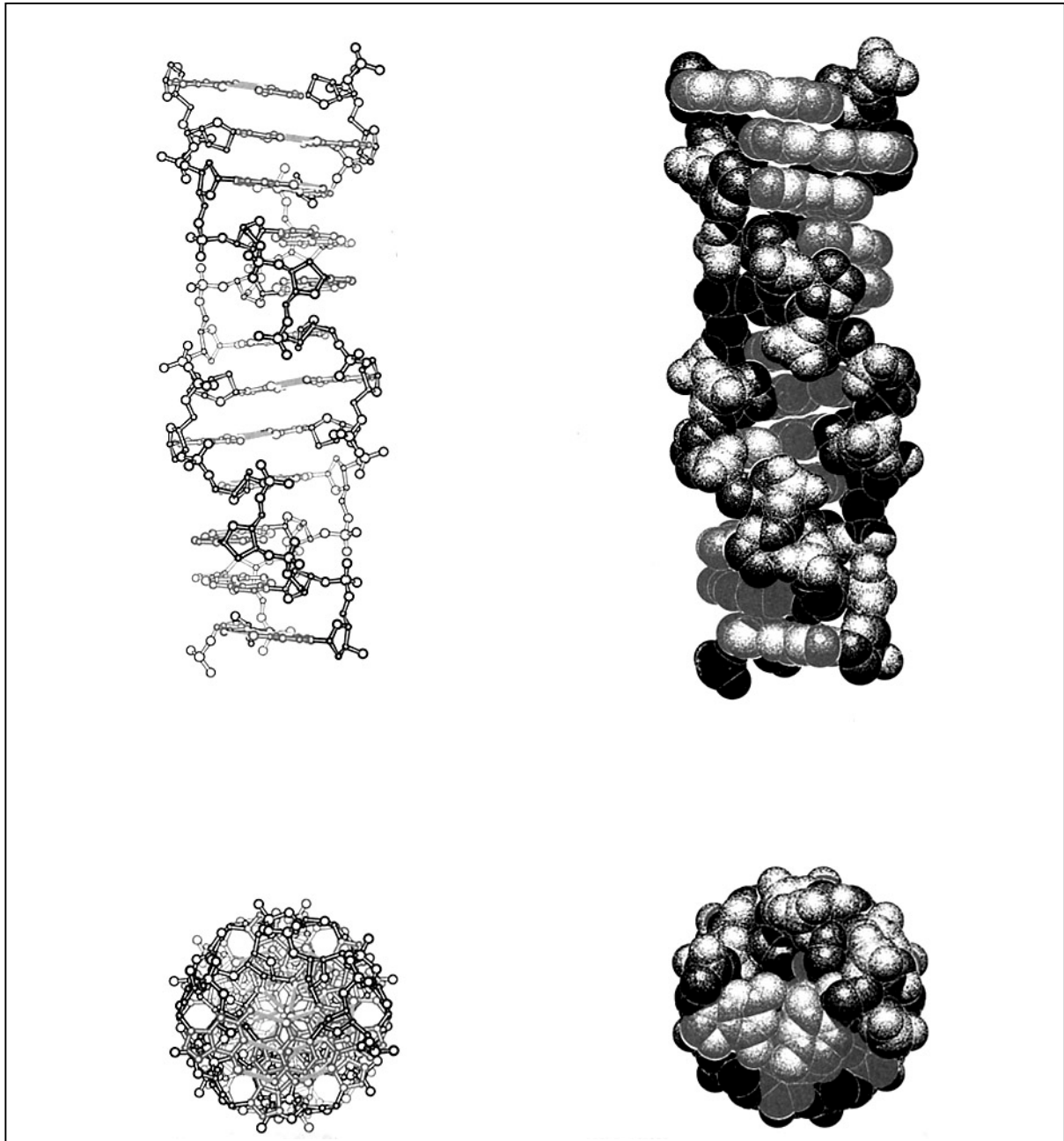


Abb. 2.8 Z-DNA in Auf- und Seitenansicht (Saenger, 1988)

Meist sequenzabhängig bilden sich in Teilbereichen der DNA verschiedene Strukturen aus, die unter anderem aus der Maximierung von Basenstapelungswechselwirkungen resultieren. Dabei ändert sich zum einen die Zuckerkonformation und zum anderen treten Veränderungen bei

der Orientierung der Basen auf. Das Zucker-Phosphat Rückgrat zeigt sich bei diesen Strukturveränderungen als relativ flexibel.

Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die strukturellen Parameter der beschriebenen DNA-Formen.

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Gängigkeit	rechts	rechts	links
Basen pro Windung	11	10	12
Helixdurchmesser [nm]	2,55	2,37	1,84
Höhe pro Basenpaar [nm]	0,23	0,34	0,38
Ganghöhe [nm]	2,53	3,45	4,56
Zuckerkonformation	<i>C3'-endo</i>	<i>C2'-endo</i>	<i>C3'-endo (syn)</i>
Neigung der Basenpaare zur Helixachse	19°	1°	9°

Tabelle 2.1 Strukturelle Parameter von A-, B-, und Z-DNA

2.3 Struktur von RNA

2.3.1 Strukturelemente von RNA

Im Gegensatz zur DNA ist bei RNA die Base Thymin durch Uracil ersetzt und an der 2'-Position des Zuckers ist eine Hydroxylgruppe vorhanden. RNA weist eine große strukturelle Vielfalt auf und ähnelt in funktioneller Hinsicht mehr den Proteinen als der DNA.

Bei jedem Schritt der Übermittlung zellulärer Informationen von den in der DNA codierten Genen zu funktionellen Proteinen spielt RNA eine entscheidende Rolle. Diese Vielfalt biologischer Funktionen geht auf die Fähigkeit der RNA zurück, einerseits Träger genetischer Information sein zu können, andererseits durch komplexe dreidimensionale Faltungen Zentren für eine chemische Katalyse zu schaffen.

Die Struktur der RNA lässt sich in drei grundlegende Organisationsebenen einteilen: Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur.

Mit der Primärstruktur wird die Nucleotidsequenz einer RNA bezeichnet, die sich in erster Näherung aus der DNA-Sequenz des Gens ableiten lässt, das für die RNA codiert. Allerdings werden viele RNAs posttranskriptional modifiziert, sodass die DNA-Sequenz oft nicht die genaue Primärstruktur widerspiegelt. Zu diesen Modifikationen gehören Methylierungen der Basen, die Bildung ungewöhnlicher Basen wie Pseudouracil oder Dihydrouridin. Ferner kommt es zur Insertion oder Deletion von Nucleotiden oder dem Herausschneiden (Spleißen) ganzer interner Sequenzen (Introns) aus der prä-mRNA.

Zur Bestimmung der Primärstruktur muss RNA zunächst sauber isoliert und dann mit Sequenzierungsmethoden und Massenspektrometrie charakterisiert werden.

Die Sekundärstruktur ist die zweidimensionale Darstellung der Basenpaarungen des Moleküls. Hier gibt es im wesentlichen Strukturen, die hauptsächlich Watson-Crick Basenpaare aufweisen sowie ungepaarte Bereiche. Typische Sekundärstrukturen sind Doppelstränge, Haarnadelschlaufen, Ausstülpungen, interne Schlaufen und Verbindungsstellen (Abb. 2.9).

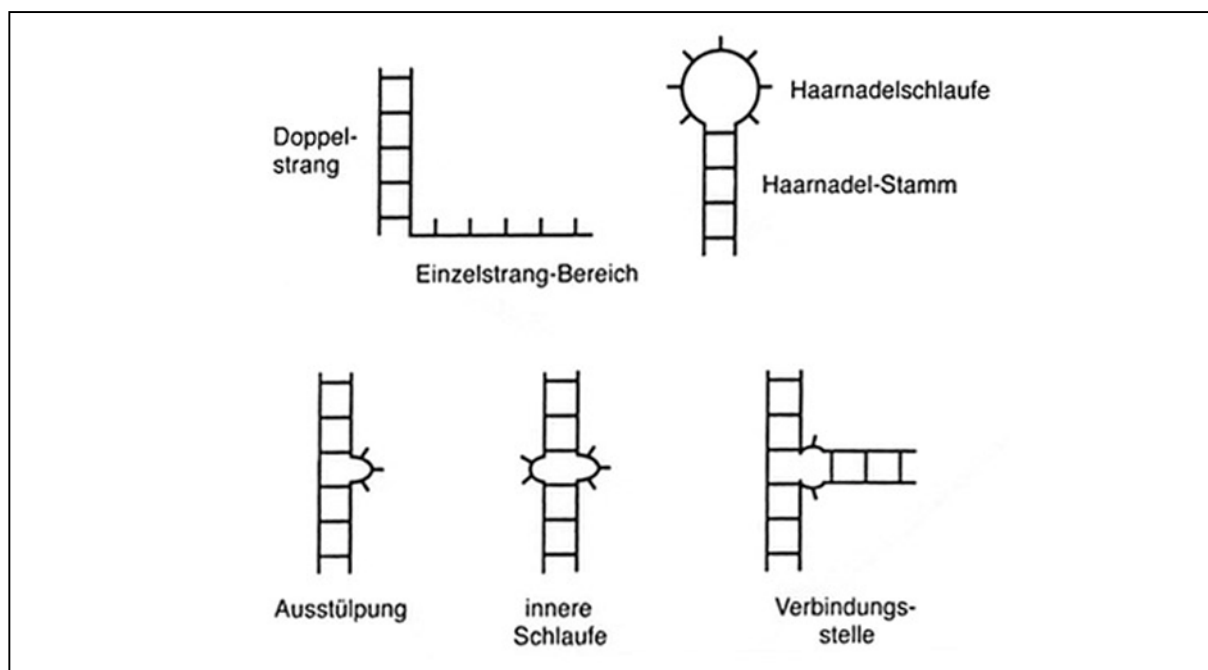


Abb. 2.9 Sekundärstrukturen von RNA (Batey, 1999)

Die Tertiärstruktur ist die dreidimensionale Struktur des Moleküls, wobei es zu Wechselwirkungen einzelner Sekundärstrukturelemente kommen kann. Das wohl bekannteste Motiv neben Tripelhelices oder den Schlaufen-Schlaufen Wechselwirkungen ist der Pseudoknoten.

Abbildung 2.10 zeigt die verschiedenen Strukturebenen am Beispiel der tRNA^{Phe} aus Hefe. Im Folgenden werden die einzelnen Strukturelemente genauer beschrieben.

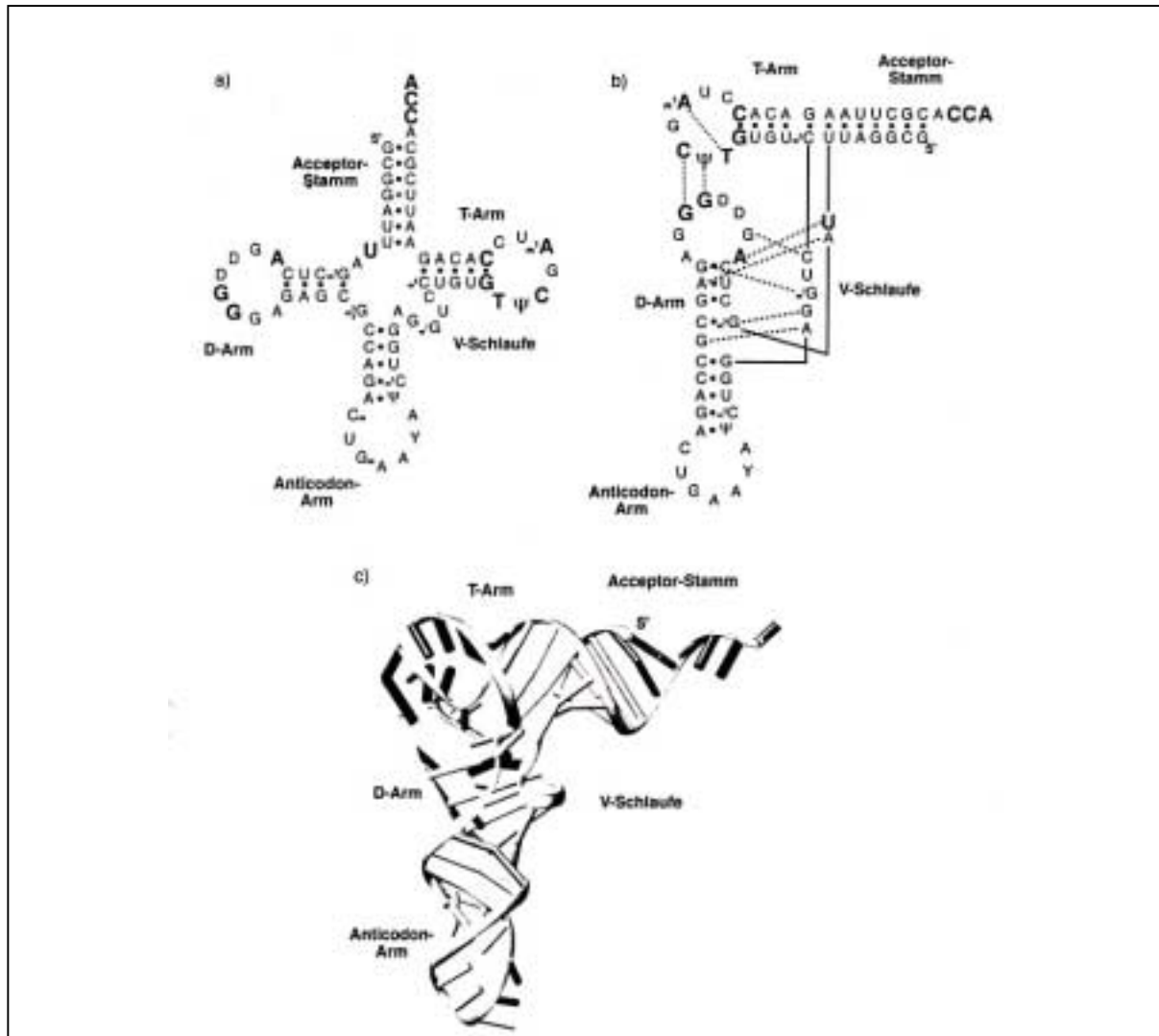


Abb. 2.10 Strukturebenen am Beispiel der tRNA^{Phe} aus Hefe. a) Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur in der klassischen Kleeblattstruktur. G-U-Wobble-Basenpaare werden durch offene Kreise symbolisiert. b) Tertiäre Wechselwirkungen in einer modifizierten Darstellung der Sekundärstruktur. Tertiäre Wechselwirkungen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. c) Darstellung der dreidimensionalen Kristallstruktur (Batey, 1999)

2.3.2 Doppelstränge

Ähnlich wie DNA kann RNA Duplices ausbilden. Im Vergleich zur regulären B-DNA weist RNA eine A-Form auf, die durch eine rechtsgängige Helix gekennzeichnet ist (Abb. 2.11). Dabei nehmen die Basen bevorzugt die 3'-endo Konformation ein.

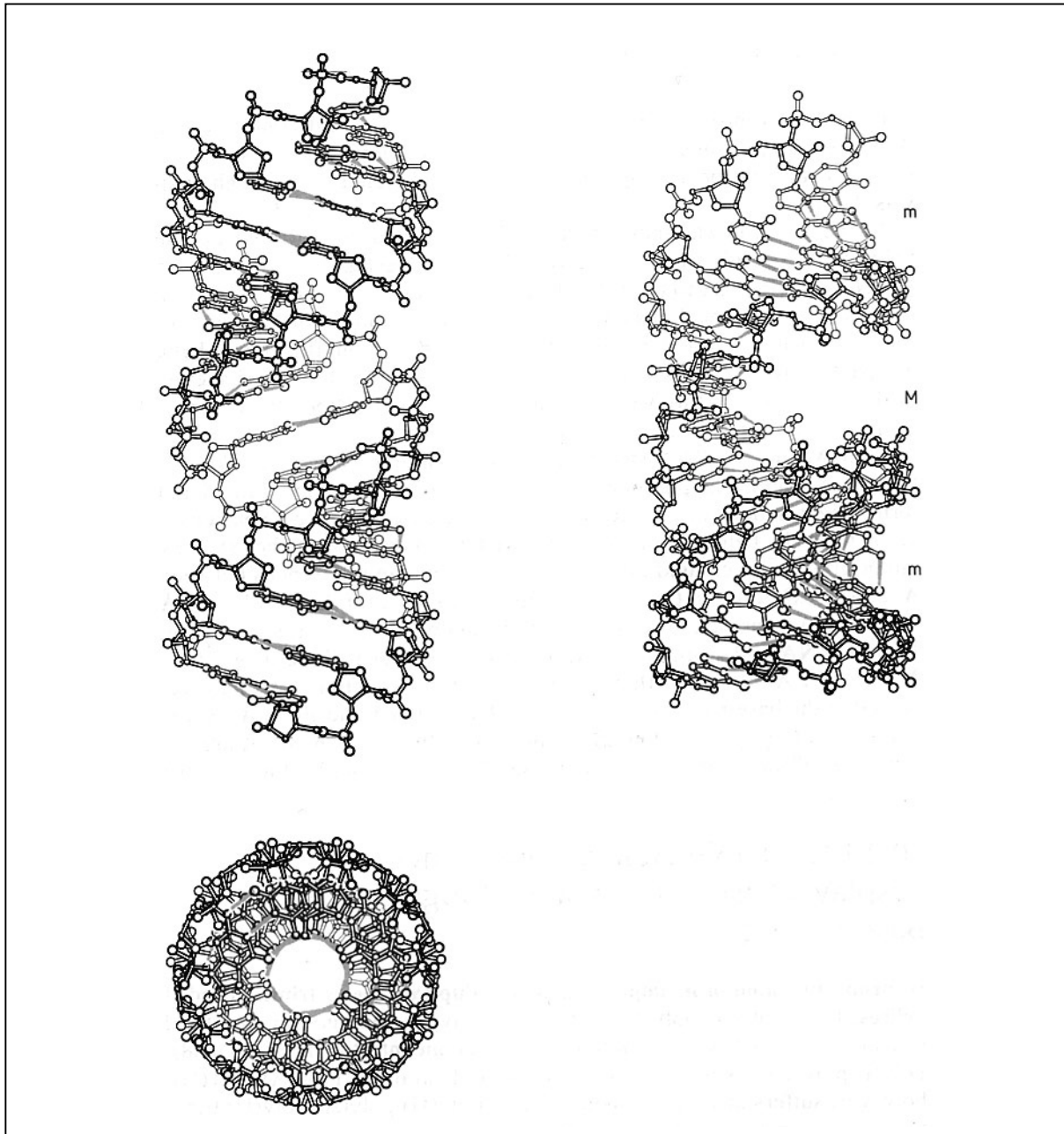


Abb. 2.11 A-RNA in Auf- und Seitenansicht. Die große und kleine Furche sind durch „M“ bzw. „m“ gekennzeichnet. (Saenger, 1988)

Durch eine Verschiebung der Basenpaare von der Helixachse weg (ca. 4 Å) ist die große Furche besonders tief und eng, während die kleine Furche eher flach und breit ist. In Kristallen sind RNA Duplices nicht einheitlich.

Die Anzahl der Basenpaarungen pro Windung variiert zwischen 10 und 11. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Oligonukleotid bestehend aus einer alternierenden Folge von Cytosin und Guanin eine linksgängige Doppelhelix ausbildet, die strukturell der Z-DNA sehr

ähnlich ist (Hall, 1984; Davis, 1990). Diese Z-RNA wird durch eine hohe Salzkonzentration, hohe Temperatur und durch geringe Wechselwirkung mit Wassermolekülen begünstigt.

2.3.3 Ausstülpungen

Bei Ausstülpungen (Bulges) handelt es sich um eine oder mehrere ungepaarte Nukleotide eines Stranges innerhalb eines sonst normal gepaarten Duplex.

Auch Ausstülpungen sind Strukturen, die eine besondere Funktionalität besitzen. Keese und Symons (1985) identifizierten ein einzelnes ausgestülptes U innerhalb einer sonst konservierten Helix als zentrale Core-Einheit in Viroiden. Eine Ausstülpung, entweder A oder U, ist bei *E.coli* die Kontaktstelle zwischen der ribosomalen 5S RNA und dem Protein L18 (Peattie *et al.*, 1981).

Die Anwesenheit einer Ausstülpung induziert oft eine Biegung des Stammes und stört die Struktur der gesamten Helix. Ferner werden Basenstapelungen unterbrochen (White & Draper, 1987). Ausstülpungen scheinen zum einen aufgrund ihrer Konformation und zum anderen in ihrer Eigenschaft als bevorzugte Interkalationsstellen für aromatische Aminosäuren als Proteinbindungsstellen zu dienen.

2.3.4 Haarnadelschlaufen

Haarnadelschlaufen (Hairpins) (Abb. 2.9) sind weit verbreitete Motive. Ein bekanntes Beispiel ist die Erkennung des Codons von m-RNA durch die Anticodon-Schleife der t-RNA. Diese Haarnadelschleife ist im Gegensatz zu den anderen Schleifen der t-RNA nicht an tertiären Wechselwirkungen beteiligt.

Die Anticodon-Schleife besteht aus sieben Nukleotiden. Während die ersten beiden Nukleotide eine deutliche Verdrehung aufweisen, weisen die anderen fünf vom 3'-Ende beginnend eine starke Basenstapelungswechselwirkung (Stacking) auf, sodass die helicale Geometrie des gepaarten Stammes in die Schleife übertragen wird.

Doch diese Anticodon-Schleife ist sicher kein gutes allgemeines Modell. Besonders stabile und häufig vorkommende Schleifen werden durch vier Basen gebildet, vornehmlich Schleifen des Typs UNCG und GNRA. Dabei kann N jedes Nukleotid sein, R steht entweder für Guanosin oder Cytidin (Hilbers, 1993). Diese werden häufig durch ein C•G-Basenpaar geschlossen.

Aber auch kürzere Schlaufen sind stabil. Puglisi untersuchte eine Schlaufe mit nur 3 Nukleotiden, die alle 2'-endo Konformation aufwiesen (Puglisi, 1989). Auch drei Basen reichen dabei aus, um den Stamm zu überbrücken.

Der Mechanismus einer solchen Schlaufenbildung vollzieht sich in zwei Schritten. Zunächst bildet sich aus dem ungeordneten Zustand (random coil) die Schlaufenregion aus und im zweiten Schritt der helicale Stamm. Die Stabilität dieses Sekundärstrukturelements resultiert zum einen aus Wasserstoffbrücken innerhalb der Schlaufenregion zum anderen aus Basenstapelungswechselwirkungen.

1988 versuchte Turner, die Vorhersage der Sekundärstruktur und Schlaufenbildung im wesentlichen auf der Grundlage der freien Enthalpie (ΔG) zu treffen. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die Länge, sondern vor allem die Zusammensetzung der Schleife für die Stabilität entscheidend ist (Turner, 1988).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Stabilität ist die Salzkonzentration. So zeigt das Oligonukleotid r(5'-GGAC-GCUU-CUCC) in einer Lösung mit 0,1 molaren Natriumchlorid-Konzentration einen Schmelzpunkt von 60°C und in einer ein molaren einen Schmelzpunkt von 71°C.

Die genauen Mechanismen und Parameter, die die Stabilität dieser Haarnadelschlaufen bestimmen, sind noch nicht vollständig verstanden und können erst mit genauen und verlässlichen Strukturanalysen in Lösung aufgeklärt werden.

2.3.5 Interne Schlaufen

Gegenüberstehende Nukleotide, die nicht durch Watson-Crick Basenpaarung verknüpft sind, bilden Interne Schlaufen (Internal Loops). Diese Fehlpaarungen kommen häufig in RNA-Duplex Regionen vor. Oft werden G•U-Basenpaare gefunden, wie zum Beispiel im Aminosäure-Akzeptorbereich der tRNA^{Phe} und tRNA^{Ala} (McClain *et al.*, 1988). Ein Basenpaar, das geometrisch dem G•U-Basenpaar ähnelt, ist ein protoniertes A, welches mit C paart (AH⁺•C).

Größere Interne Schlaufen sind meist purinreich und können als Proteinbindungsstellen wirken. Innerhalb der Schleife findet man oft ungewöhnliche Basenpaarungen, zusätzliche Wasserstoffbrücken und sehr starke Basenstapelungswechselwirkungen, die die helicale Struktur des Duplex durch die Interne Schleife hindurch beibehalten zu vermögen (Gewirth, 1988).

2.3.6. Verbindungsstellen

Verbindungsstellen (Junctions) sind Regionen, die drei oder mehrere Stämme miteinander verbinden. Besonders in großen RNAs findet sich dieses Strukturelement besonders häufig. In der Kleeblattstruktur der tRNA findet man eine Verbindungsstelle, die vier Stämme miteinander verknüpft. In 16S ribosomalen RNAs werden bis zu fünf Stämme miteinander verbunden.

Ein bekanntes Beispiel für eine Verbindungsstelle, die drei Stämme verknüpft, ist die RNA schneidende Domäne des Hammerhead-Ribozyms. In der dreidimensionalen Struktur stehen sich die an einer Verbindungsstelle beteiligten Stämme paarweise koaxial gegenüber. Diese koaxiale Stapelung helicaler Bereiche ist wohl das grundlegendste strukturelle Merkmal, durch das bei RNA eine höhergeordnete Organisationsform erreicht wird. Sie ist Folge der günstigen energetischen Beiträge der Stapelwechselwirkungen des π -Elektronensystems der Basen.

2.3.7 Einzelsträngige Regionen

Einzelsträngige Regionen können sich an den 3'- bzw. 5'-Enden der Moleküle oder zwischen zwei anderen Sekundärstrukturelementen befinden. Im Gegensatz zu Haarnadelschlaufen oder Internen Schlaufen sind die Nukleotide einzelsträngiger Regionen strukturell oder konformationell nicht so stark eingeschränkt.

Trotzdem zeigen sie oft definierte Strukturen. So formen Homopolynukleotidstränge von rA oder rC bei pH 7 einzelsträngige Helices, die vor allem durch Basenstapelungswechselwirkungen stabilisiert werden. Stehen einzelne Nukleotide ungepaart am Ende eines Stranges zeigen sie ebenfalls starke Stapelungswechselwirkungen. (Dangling ends) (Varani *et al.* 1989).

2.3.8. Tertiärstrukturelemente

Die Tertiärstruktur entsteht durch die Wechselwirkungen verschiedener Sekundärstrukturen mit Einzelstrangregionen oder miteinander.

Die Wechselwirkungen beinhalten hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen, die verschiedenste Basenpaarungen ermöglichen. Es finden sich aber auch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen, der Ribose und dem Phosphatrückgrat.

Die Tatsache, dass in der tRNA^{Phe} von 76 Basen nur vier nicht an Stapelungswechselwirkungen beteiligt sind, unterstreicht die Bedeutung des „base-stackings“ für die Stabilität komplexer RNAs (Kim, 1976). Es gibt Tertiärstruktur motive, die eine solch dichte Packung der hochgeladenen, anionischen doppelsträngigen Helices erlauben, dass eine globuläre Architektur entsteht.

Die Wechselwirkung zwischen den Nukleotiden einer Haarnadelschleife und einem einzelsträngigen, ungepaarten komplementären Bereich bezeichnet man als Pseudoknoten (Pseudoknot).

Der klassische Pseudoknoten, dessen Struktur durch NMR-Spektroskopie genau charakterisiert wurde, besteht aus einer Haarnadelschleife, die in unmittelbarer Nähe zum Stamm mit einer komplementären Sequenz paart und eine durchgängige, coaxiale gestapelte Helix bildet (Puglisi *et al.* 1990).

Ähnlich wie bei Verbindungsstellen und dicht gepackten Schleifen ist auch für die coaxiale Stapelung im Pseudoknoten Mg^{2+} oder eine hohe Na^+ -Konzentration zur Stabilisierung notwendig (Puglisi *et al.*, 1990). Pseudoknoten stellen ein sehr wichtiges Strukturelement für die Gesamtarchitektur einer RNA da.

Ein besonders eindrucksvolles Beispiel bietet das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym. Es ist außergewöhnlich stabil. Hohe Temperaturen (65-70°C) und Reagenzien, die normalerweise Nukleinsäurestrukturen denaturieren (5-8M Harnstoff, 10-18M Formamid) können der Struktur und Aktivität nichts anhaben. Dieses ist umso erstaunlicher, da in der Kristallstruktur weder zweiwertige Kationen noch ungewöhnliche Basenpaarungen gefunden wurden. Die Struktur wird ausschließlich durch Watson-Crick Basenpaarungen und die stark gewundene doppelte Pseudoknoten-Topologie des Rückgrates stabilisiert (Batey *et al.*, 1999).

Ein weiteres wichtiges Motiv sind Basentripel. Diese treten bei Wechselwirkungen zwischen helicalen Bereichen und noch ungepaarten Motiven auf. Abbildung 2.12 zeigt Beispiele für solche Basentripel, die eine Basenpaarung vom Hoogsteen- oder reversen Hoogsteen-Typ zur Grundlage haben. Das entstehende Gebilde bei der Anlagerung eines Einzelstranges an einen helicalen Bereich bezeichnet man als Tripelhelix.

Der Pseudoknoten oder die Tripelhelix sind nur zwei Elemente vieler möglicher Formen der Interaktion verschiedener Sekundärstrukturelemente, die an dieser Stelle nicht alle Erwähnung finden können.

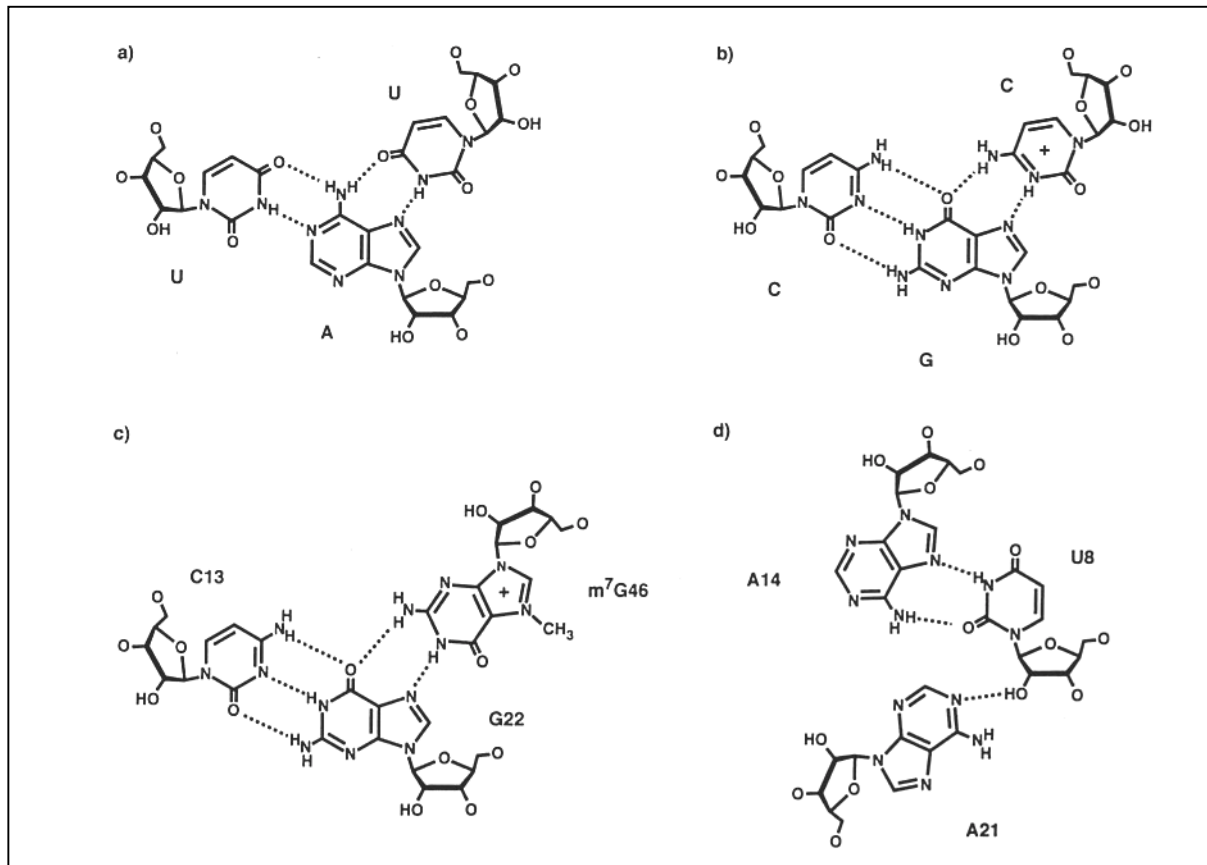


Abb. 2.12 Beispiele für Basentripel in RNA. a) Basentripel A•A-U vom Hoogsteen-Typ b) Protoniertes C⁺•GC Basentripel vom Hoogsteen-Typ c) Purin-Basentripel in der großen Furche der tRNA^{Phe} d) Basentripel in der tRNA^{Phe}, in der ein Adenosinrest über eine H-Brücke in der kleinen Furche mit der 2'-Hydroxylgruppe eines reversen Hoogsteen-A•U-Basenpaares verknüpft ist (Batey *et al.*, 1999).

Analog dem Problem der Proteinfaltung stellt sich auch hier die Frage, wie sich bei RNA die dreidimensionale Struktur aus der Primärsequenz ergibt.

Während bei Proteinen der ungefaltete Zustand als Zufallsknäuel (random coil) charakterisiert ist, aus dem sich im Faltungsprozess Sekundärstrukturen (α -Helices, β -Faltblätter) und Tertiärstrukturen bilden, ist im ungefalteten Zustand der RNA der größte Teil der Sekundärstrukturen schon vorgeformt.

Der Faltungsvorgang umfasst dann im wesentlichen die schrittweise Bildung der tertiären Wechselwirkungen bis zur nativen Struktur. Daher leisten tertiäre Wechselwirkungen die wichtigsten Beiträge zur Steuerung des Faltungsvorganges (Batey *et al.*, 1999).

Die meisten großen biologischen RNA-Moleküle sind in Domänen organisiert, die im Allgemeinen bereits eine Sekundärstruktur erkennen lassen. Bei RNA ist der Begriff

„Domäne“ nicht streng definiert, sondern bezeichnet einen Bereich, der sich als unabhängige Einheit faltet.

Wegweisende Untersuchungen an tRNA haben einige grundlegende Eigenschaften der RNA-Faltung aufgeklärt. Mit Temperatursprung-Relaxationsmessungen und NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die tRNA^{Met} aus *E.coli* bei mäßiger Ionenstärke (174mM Na⁺, kein Magnesium) während der thermisch induzierten Entfaltung fünf definierte Übergänge durchläuft (Cole & Crothers, 1972). Diese sind in Abbildung 2.13 dargestellt.

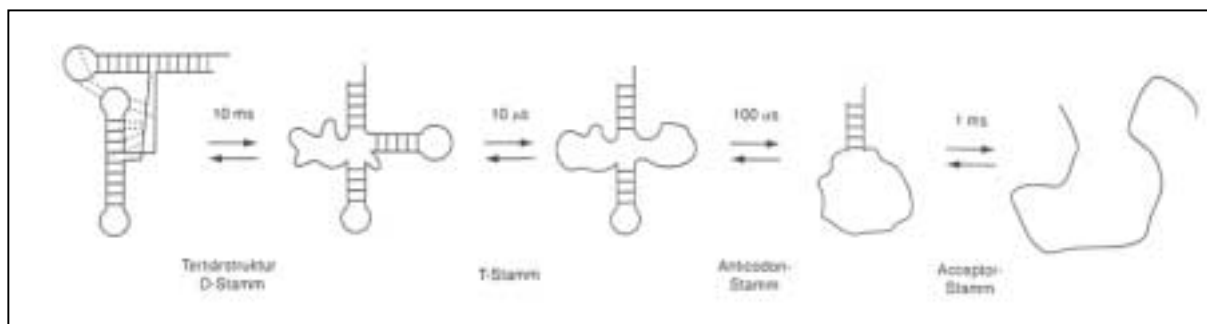


Abb. 2.13 Entfaltungsweg der tRNA, bestimmt durch thermische Denaturierungsexperimente. Die ungefähren Zeitkonstanten für jeden Schritt der Entfaltungsreaktion sind angegeben. (Crothers *et al.*, 1974)

Bei den niedrigsten Temperaturübergängen werden die tertiären Wechselwirkungen der D- und T-Schleife zerstört, gefolgt von den schwachen Sekundärstrukturelementen im D-Stamm. Die Sekundärstrukturelemente des T- und Anticodonbereichs sowie des Akzeptorstammes schmelzen dann bei höheren Temperaturen.

Da die thermische Denaturierung bei der tRNA reversibel ist, folgt daraus, dass sich die Struktur hierarchisch entlang des Faltungsweges bildet, wobei fast alle Sekundärstrukturelemente vor der Tertiärstruktur entstehen. Diese schrittweise Bildung von Sekundärstruktur und Tertiärstruktur ist die Basis des „hierarchischen Modells“ der RNA-Faltung.

Weiterführende Untersuchungen (Stein & Crothers, 1976) verdeutlichen, dass die Bindung mehrwertiger Ionen an die RNA während des Faltungsvorganges im Allgemeinen eher der Stabilisierung der Bildung der Tertiärstruktur als der Sekundärstruktur dient.

Untersuchungen jüngerer Datums zeigen, dass die Faltung auch kinetischer Kontrolle unterliegt. Native tertiäre Wechselwirkungen können kinetische Barrieren beim

Faltungsvorgang verursachen und geschwindigkeitsbestimmende Schritte und damit die Faltungsgeschwindigkeit beeinflussen (Treiber *et al.*, 1998).

Statt Faltung nur als einen einfachen Vorgang mit der schrittweisen Bildung von Zwischenstufen zu beschreiben, wie es durch das hierarchische Modell impliziert wird, wird sie korrekter als ein Ensemble von Molekülen beschrieben, die parallelen Faltungswegen folgen, sodass sich insgesamt eine „Faltungsenergielandschaft“ bildet (Batey *et al.*, 1999).

3 Fluor – ein vielseitiges Atom in der organischen Chemie

3.1 Fluorierung – warum ?

Fluorhaltige organische Verbindungen, vor fünfzig Jahren noch eher eine Kuriosität, sind heute aus vielen Gebieten der Chemie nicht mehr wegzudenken. Treibende Kraft dieser Entwicklung, die heute nur noch schwer in allen Einzelheiten zu überschauen ist, sind die ungewöhnlichen Eigenschaften, die zahlreiche Verbindungen durch die Einführung von Fluorsubstituenten aufweisen. Im Folgenden sind die wichtigsten Auswirkungen von Fluorsubstituenten beschrieben (Schlosser, 1977).

- Als Element der siebten Hauptgruppe zeigt Fluor eine besonders starke Wechselwirkung zwischen seinen neun Protonen und den Elektronen. Da die Elektronen auf den inneren Schalen liegen, kommt es zu derart starken Wechselwirkung, dass der Atomradius auf 1,35 Å reduziert ist, und damit dem van-der-Waals-Radius des Wasserstoffs (1,1 Å) am nächsten kommt.

Die sterischen Ansprüche ähneln sich so stark, dass der Ersatz von Wasserstoff durch Fluor als „isogeometrische“ Transformation angesehen werden kann (Gerstenberger & Haas, 1981). Diese Transformation verändert die chemischen Eigenschaften des Moleküls, ohne dabei die molekulare Geometrie zu verändern. So können ein Substrat und sein fluoriertes Analogon für die Bindungsstelle eines Enzyms nicht zu unterscheiden sein.

- Die C-F-Bindung weist mit 485 kJ/mol eine besonders hohe Stabilität auf. Im Vergleich dazu betragen die Bindungsenergien von C-H 413 kJ/mol, C-O 358 kJ/mol, C-C 346 kJ/mol, C-Cl 339 kJ/mol, C-Br 284,5 kJ/mol und C-I 213 kJ/mol. Aufgrund dieser starken Bindung können fluorierte Moleküle als Antimetaboliten wirken. Als sterisch nicht unterscheidbar können sie im Stoffwechsel metabolisiert werden, bis zu einer Stufe, an der die starke Bindung die weitere Metabolisierung erschwert oder inhibiert. Wird eine derartige Zwischenstufe im Organismus aus einer Vorstufe synthetisiert, so spricht man von einer „Letalsynthese“.

Das klassische Beispiel einer solchen Letalsynthese ist die Metabolisierung von Fluoressigsäure im Krebs-Zyklus (Zitronensäure-Zyklus). Fluoressigsäure verdrängt initial die Essigsäure und bildet Fluoracetyl-Coenzym A, welches in den Krebszyklus eingeht und zunächst mit Oxalacetat zu α -Fluorzitronensäure metabolisiert wird. Das natürliche Substrat, die Zitronensäure, würde nun von dem Enzym Aconitase dehydriert, um nach einer reversen Hydrierung zu Isozitronensäure zu führen. Die Aconitase ist aber nicht in der Lage, die α -Fluorzitronensäure zu dehydrieren. Das Substrat bindet irreversibel an das Enzym, die Metabolisierung wird gestoppt und die Zelle stirbt ab (Bergstrom & Swartling, 1988).

- Die Substitution eines Wasserstoffatoms durch Fluor erhöht die Fettlöslichkeit des Moleküls und erleichtert die Passage des Moleküls durch Lipidmembranen. Die Verbesserung des Membrantransports ist die Hauptmotivation für das Einführen von CF_3 -Gruppen in der Arzneistoffsynthese.
- Fluor weist die höchste Elektronegativität aller Elemente des Periodensystems auf. Der Unterschied in der Elektronegativität zu Chlor, dem nächsten Homologen, ist wesentlich größer als der Abstand der jeweils weiteren Homolgen zueinander. Diese Tatsache spiegelt sich auch in dem Begriff „Superhalogen“ wieder, der Fluor beigemessen wird (Pauling, 1960). Fluor hat einen ähnlich starken polarisierenden Effekt wie ein Sauerstoffatom innerhalb eines Moleküls. Um neben dem isopolaren Effekt auch noch isoster zu sein, kann eine OH-Gruppe oder ein Sauerstoffatom durch CF_2H bzw. CF_2 ersetzt werden. Ob Fluor ähnlich dem Sauerstoff in organischen Molekülen auch als Wasserstoffbrücken-Akzeptor dienen kann, ist umstritten.
- Durch den ausgeprägten polarisierenden $-I$ Effekt kann Fluor die Reaktivität benachbarter Zentren verändern oder sogar invertieren. So lässt sich 1,1,1-Trifluor-2-propanol selbst mit konzentrierter Schwefelsäure sogar bei 190°C nicht dehydratisieren (Schlosser, 1978). Im Gegensatz zu Aceton bildet Hexafluoraceton stabile Hydrate, Halbacetale und Halbaminale. Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel ist die pK_a -Differenz von Ethylamin und 2,2,2-Trifluorethylamin. Während ersteres einen pK_a von 10,7 aufweist, sinkt dieser für das dreifach fluorierte Analogon auf 5,7 ab.

3.2 Substanzklassen fluorierter Moleküle

3.2.1 Hochfluorierte Verbindungen

Fluorierte Moleküle lassen sich prinzipiell in zwei Klassen einteilen. Die erste Klasse besteht aus Molekülen, bei denen alle oder zumindestens die meisten Kohlenstoff-gebundenen Wasserstoffatome durch Fluor ersetzt sind (hochfluorierte Verbindungen). Sind nur wenige Wasserstoffe ersetzt, fallen sie in die Klasse der niedrig fluorierten Verbindungen.

Hochfluorierte Verbindungen weisen eine hochgradige chemische und bedingt auch biologische Inertheit auf. Fehlende chemische Wechselwirkung wird vor allem bei perhalogenierten Verbindungen gefunden. Daraus resultiert auch eine niedrige Toxizität. Perfluorierte Cycloalkane, Amine oder Sauerstoffheterocyclen werden als Blutersatzmittel entwickelt, da sie in Bezug auf Fließeigenschaften, osmotischen Druck oder Transport und Austausch von O_2 und CO_2 große Ähnlichkeiten mit normalem Blut aufweisen (Riess & Le Blanc, 1978)

Industriell haben hochfluorierte Verbindungen als Kühlmittel für Kältesysteme und als Treibmittel für Aerosole weite Verbreitung gefunden. Wegen des notwendigen niedrigen Siedepunktes werden häufig kurzkettige Chlorfluoralkane und -cycloalkane eingesetzt. Es hat sich aber herausgestellt, dass diese Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) maßgeblich für die Zerstörung der Ozonschicht unseres Planeten verantwortlich sind. Deshalb wird heute intensiv nach Alternativen geforscht.

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet sind Polymere. Das bekannteste Beispiel hier ist sicher das Polytetrafluorethylen (Teflon), das einen hohen Schmelzpunkt, Unlöslichkeit in allen gängigen Solventien sowie eine thermische und chemische Widerstandsfähigkeit aufweist.

Aber auch in oberflächenaktiven Verbindungen werden die Eigenschaften des Fluors genutzt. So können Perfluoralkansulfonsäuren und deren Derivate ($C_7F_{15}SO_3H$ bis $C_{10}F_{21}SO_3H$) die Oberflächenspannung wässriger Systeme schon in Konzentrationen stark herabsetzen, in denen die analoge nicht fluorierte Verbindung noch nicht wirksam ist. So findet man diese Verbindungen in Feuerlöschschäumen, als Benetzungsmitteln oder als Emulgierungsmitteln bei der Polymerisation.

Interessanterweise erfahren hochfluorierte Verbindungen bei nicht ganz vollständiger Fluorierung schnell eine Abschwächung ihrer chemischen Inertheit. Diese Eigenschaft macht man sich bei Inhalationsanästhetika wie z.B. Halothan ($\text{CF}_3\text{-CHClBr}$) oder Isofluran ($\text{F}_2\text{CH-O-CHCl-CF}_3$) zu Nutze.

Es gibt allerdings auch einige Ausnahmen für die Inertheit und geringe Toxizität hochfluorierter Verbindungen (Abb. 3.1). Perfluoralkylsulfonyl-substituierter Harnstoff **1** wirkt stark hypocholesterinämisch und anorektisch (Gerstenberger & Haas, 1981). Das hochsubstituierte Pyrrol **2** ist ein ausgezeichnetes Fungizid und Insektizid (Dorn *et al.*, 1979), während das hochhalogenierte Benzimidazol **3** als starker Entkoppler der Atmungskette bekannt ist (Büchel *et al.*, 1965).

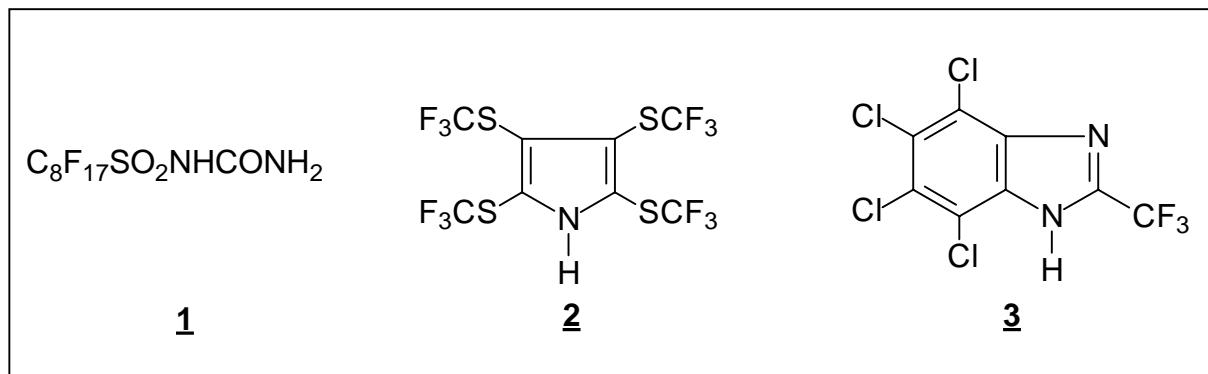


Abb.3.1 Hochfluorierte Moleküle mit ausgeprägter biologischer Aktivität

3.2.2. Niedrigfluorierte Verbindungen

Eine spezifische Wechselwirkung einer fluorhaltigen Verbindung mit dem Organismus ist meist nur möglich, wenn nicht alle Wasserstoffatome durch Fluor ersetzt sind.

Das breiteste Anwendungsspektrum für niedrig fluorierte Verbindungen bildet die Pharmakologie. Viele fluorhaltige Pharmaka zeigen starke strukturelle Analogien zu Nucleobasen, Steroiden oder Aminosäuren. Zum einen erhöht sich, wie schon beschrieben, die Fettlöslichkeit und damit die Membrangängigkeit der Moleküle, zum anderen werden fluorierte Pharmaka im Sinne von Antimetaboliten eingesetzt.

Neben der schon erwähnten Trifluoressigsäure seien hier beispielhaft 5-Fluoruracil als kompetitiver Hemmstoff der Thymidilat-Synthetase und somit wirksames antineoplastisches Pharmakon sowie 2-Deuterio-3-fluor-D-alanin als „Zellwand-aktives“ Breitbandantibiotikum erwähnt (Gerstenberger & Haas, 1981).

Durch die Einführung von Fluor können ferner Adsorption, Ausscheidung, therapeutische Breite, Toxizität oder Nebenwirkungen von Pharmaka verändert werden.

Auch in vielen wirksamen Pestiziden, Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden haben Fluoratome die Wirksamkeit und Einsatzfähigkeit verbessert. Als letzte Gruppe niedrigfluorierter Verbindungen seien an dieser Stelle Farbstoffe erwähnt, bei denen man sich hauptsächlich den induktiven Effekt des Fluors für die Eigenschaften des Farbstoffs zu Nutze macht. Fluor erhöht darüber hinaus auch die Reaktivität des Farbstoffs gegenüber den nukleophilen Gruppen der Faser, wie bei dem in Abbildung 3.2 dargestellten Azofarbstoffes **4** (Barrie *et al.*, 1962).

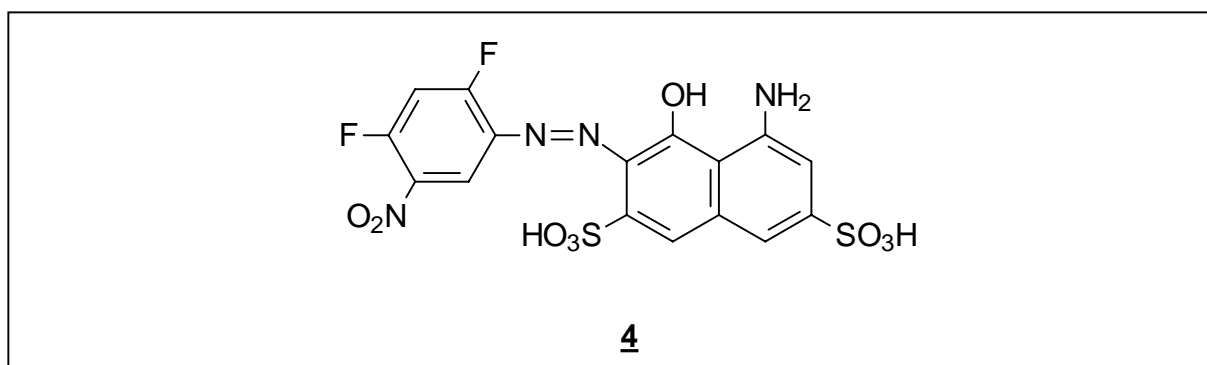


Abb. 3.2 Fluorierter Azofarbstoff

Fluor wird ferner in der Bioorganik und Medizin als Sonde genutzt. Es ist ein Reinelement und besitzt den Kernspin $\frac{1}{2}$, ist also für die NMR-Spektroskopie zugänglich. Aus der chemischen Verschiebung des Fluors oder Kopplung mit anderen Kernen lassen sich Informationen über die chemische Umgebung des Atoms gewinnen. Durch die großen Fortschritte im Bereich der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie findet Fluor als Sonde immer größere Bedeutung.

^{18}F markierte Analoga von Biomolekülen können mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) *in vivo* detektiert werden. Diese Methode nutzt Positronen emittierende Nuklide, die an ein Biomolekül geheftet im Organismus in bestimmte Gewebe gelangen, sich dort akkumulieren und detektiert werden können. Das Nuklid ^{18}F verfügt über eine relative lange Halbwertszeit (110 min), die für die PETT unerlässlich ist. ^{18}F wird durch Beschuss von ^{20}Ne mit Deuterium in einem Cyclotron oder Beschleuniger dargestellt. Es kann dann in ein Fluorierungsmittel eingebaut werden.

Im Gewebe wandelt es sich durch das Aussenden eines Positrons in ^{18}O um. Das Positron interagiert mit einem Elektron in der Umgebung. Die dabei freiwerdende Gammastrahlung wird durch einen beweglichen Detektor detektiert.

Es ist bekannt, dass sich 5-Fluoruracil und 5-Fluor-2'-desoxyuridin selektiv in Tumorzellen anreichern (Mercer *et al.*, 1986). 5-[¹⁸F]Fluor-2'-desoxyuridin wurde erfolgreich eingesetzt, um PETT-Bilder eines Tumors beim Hasen zu erhalten (Abe *et al.*, 1983). Obwohl der technische Aufwand sehr groß ist und nur wenige Synthesen für diese Halbwertszeit geeignet scheinen, ist diese Methode gerade für die medizinische Forschung von großer Bedeutung (Katzenellenbogen, 1999).

3.3 Fluorierungsmittel

Mit der steigenden Bedeutung und wachsenden Anzahl von hoch- und niederfluorierten Verbindungen wächst auch die Fülle an Synthesemethoden und Reagenzien. Zur Darstellung hochfluorierter Verbindungen kommen im wesentlichen drei Verfahren in Betracht: Fluorierung mit elementarem Fluor, mit fluoraktiven Metallfluoriden oder die Elektrofluorierung.

Diese Verfahren, die auf einem Austausch eines Wasserstoffatoms durch ein Fluoratom und/oder auf einer oxidativen Fluorierung eines Kohlenstoffs- oder Heteroatoms beruhen, sind meist unselektiv, was aber im Sinne eines gewünschten hohen Fluorierungsgrades ist.

Im Gegensatz dazu erfordert die Darstellung niedrigfluorierter Substanzen hochselektive Fluorierungsmittel. Grundsätzlich gibt es bei der Darstellung fluorierter Substanzanaloga zwei methodische Ansätze. Die Fluorierung kann auf einer frühen Stufe erfolgen und die folgenden Syntheseschritte eventuell modifiziert unter Beibehaltung des Konzepts durchgeführt werden. In vielen Fällen ändert Fluor das Reaktionsverhalten der Moleküle allerdings so drastisch, dass Reaktionsfolgen meist neu konzipiert werden müssen. Die Inkorporierung des Fluoratoms am Ende des Syntheseweges umgeht diese Problematik, bedingt aber Fluorierungsmethoden, die sehr selektiv sind, das heißt vorhandene funktionelle Gruppen oder Mehrfachbindungen intakt lassen.

Darüber hinaus spielen natürlich im industriellen Bereich Effizienz, Wirtschaftlichkeit, Umweltverträglichkeit und technischer Aufwand eine wichtige Rolle.

Im Folgenden werden wichtige Fluorierungsmittel und beispielhafte Anwendungen beschrieben.

3.3.1 Elementares Fluor

Fluorierungen in der Gasphase gehören zu den ältesten Fluorierungsmethoden. Wurden diese Reaktionen ursprünglich in der Gasphase bei hohen Temperaturen durchgeführt, wird das Fluor in neueren Verfahren mit Stickstoff oder Helium verdünnt, um Fragmentierung von länger-kettigen oder verzweigten Verbindungen durch die hohe Reaktionswärme zu vermeiden (Lagow & Margave, 1979). Die Reaktionen lassen sich so bei deutlich niedrigeren Temperaturen durchführen, bei denen auch Produktgemische vermieden werden können.

Eine beispielhafte technische Anwendung ist die gleichzeitige Fluorierung und Funktionalisierung von Polypropylen-Oberflächen, um deren Benetzungseigenschaften zu verbessern (Abb.3.3).

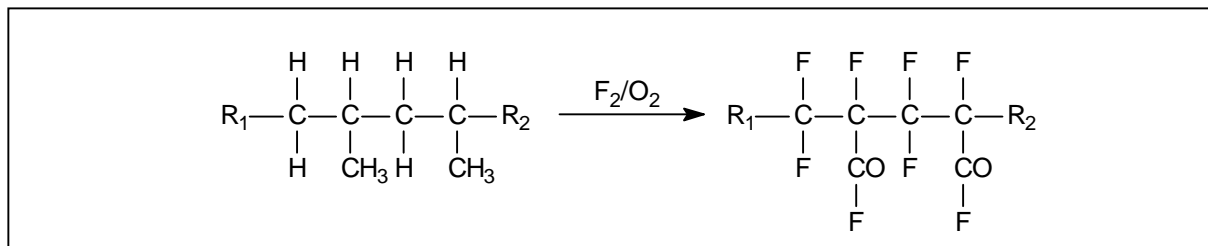


Abb. 3.3 Fluorierung und Funktionalisierung von Polypropylen (Adock *et al.*, 1978)

3.3.2 Fluoraktive Metallfluoride

Metallfluoride können bei höheren Temperaturen unter eigener Reduktion Fluor in freier Form abgeben. Bekannte Beispiele sind AgF_2 , MnF_3 , CeF_4 , BiF_5 . Am häufigsten werden CoF_3 und KCoF_4 verwendet. Die Abgabe des Fluors wird durch folgende reversible Gleichung beschrieben:



Fluoraktive Metallfluoride werden als feste „Transportform“ des Fluors angesehen. Die Reaktionen sind mit denen des freien Fluors verwandt. Die Fluorierungen sind wenig spezifisch und lassen sich nur bedingt durch Temperatur oder Konzentration steuern.

3.3.3 Elektrofluorierung

Diese Methode, die vor allem im industriellen Bereich von Bedeutung ist, eignet sich zur Darstellung hochfluorierter Alkane. Das zu fluorierende Substrat wird in Fluorwasserstoff vorgelegt. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit werden einige Procente Wasser oder ein Leitsalz (NH_4F) zugegeben. Die Elektrolysespannung liegt in der Regel unter dem Abscheidungspotential von elementarem Fluor, um dessen Entstehung zu vermeiden.

Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass die meisten funktionellen Gruppen wie Amine oder Carbonsäuren nicht erhalten bleiben. Durch die Verwendung verschiedener Anodenmaterialien (Nickel, Platin) oder Zusatz anderer Lösungsmittel lässt sich aber die Entstehung von Produktgemischen und das Auftreten unerwünschter Reaktionen beeinflussen.

3.3.4 Metallfluoride

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit erfreuen sich Metallfluoride für eine nukleophile Substitution von Chlor, Brom oder Iod großer Beliebtheit. Einfache Metallfluoride finden auch Anwendung für den Halogenaustausch an Heteroatomen wie Silicium (KF , AgF), Phosphor (SbF_3) oder Schwefel (PbF_2).

Bei Naturstoffen kommen im wesentlichen Kupferfluorid oder Kupferhydrogenfluorid zur Anwendung (Gerstenberger & Haas, 1981). Aus Gründen der Zugänglichkeit wird hier oft statt einem Halogen eine Tosylatgruppe als Abgangsgruppe eingesetzt. Eine besondere Bedeutung kommt Molybdänhexafluorid zu, das je nach Reaktionsbedingungen sehr selektive Fluorierungen möglich macht. Ungewöhnlich ist Uranhexafluorid, welches als einziges Fluorierungsmittel unter milden Bedingungen einen Aldehyd-Wasserstoff substituieren kann.

Ähnlich wie die Metallfluoride wirkt auch Tetrabutylammoniumfluorid. Es wird häufig zur Fluorierung der Zuckerpositionen bei Nukleosiden eingesetzt. Auch hier muss zunächst eine Abgangsgruppe wie Mesylat oder Triflat eingeführt werden (Kawasaki, 1993). Wasserfreies Tetrabutylammoniumfluorid ist ein stark hygroskopisches Salz, das sich bei höheren Temperaturen explosionsartig zersetzt und so die Handhabung schwierig macht.

Die nukleophile Substitution wird von aprotischen, polaren Lösungsmitteln begünstigt. Durch den Einsatz von chelatisierenden Kronenethern entstehen unsolvatisierte „nackte“ Fluorid-Ionen, die außerordentlich nukleophil sind. Als Beispiele sind hier die Fluorierung der Steroide **5** und des Nucleosids **7** gezeigt (Abb. 3.4).

Durch die Kombination von KF mit Kronenethern gelingt sogar die Substitution von Halogenen wie Chlor oder Brom in akzeptablen Ausbeuten unter milden Bedingungen, wobei reaktive funktionelle Gruppen intakt bleiben.

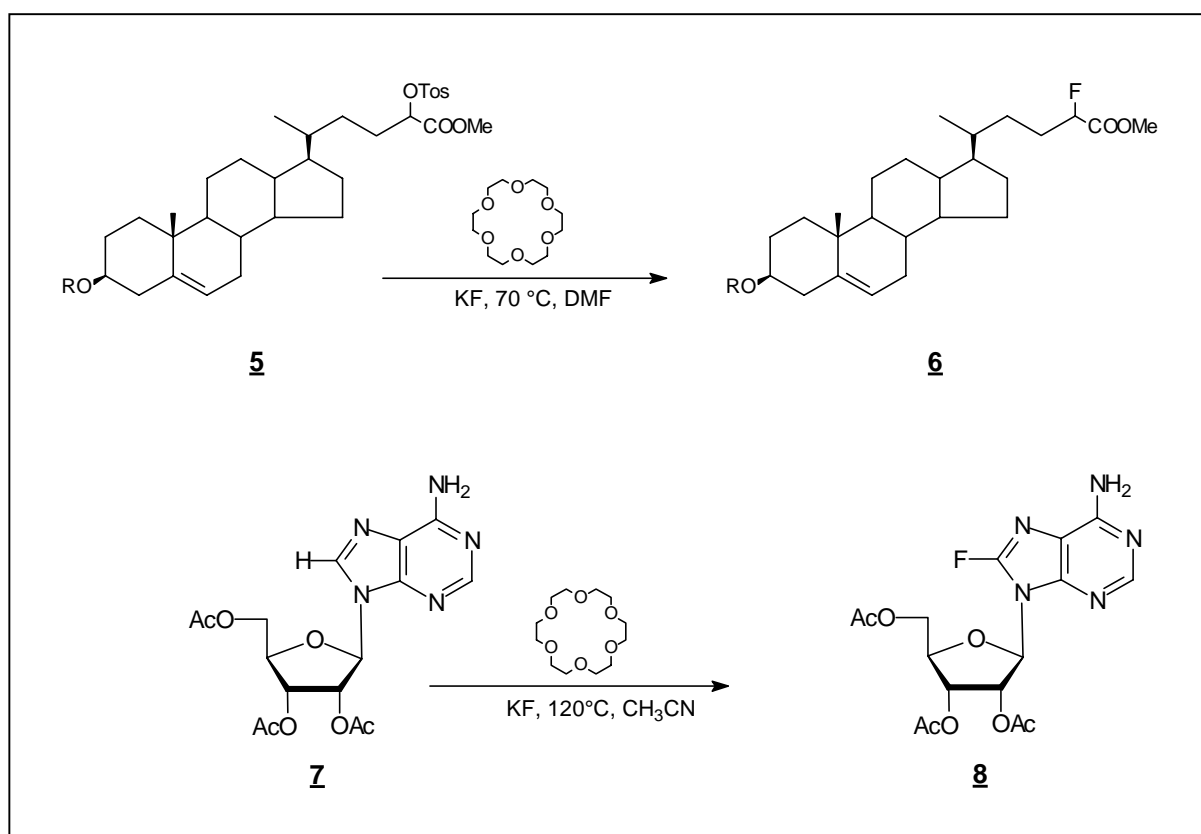


Abb. 3.4 Fluorierungen mit KF und Kronenether

3.3.5 Fluorwasserstoff

Fluorwasserstoff hat das Potenzial Halogene gegen Fluor auszutauschen, sowie sich an Doppel- oder Dreifachbindungen zu addieren. Jedoch ist die Handhabung von wasserfreiem Fluorwasserstoff sehr aufwendig. Eine deutliche Verbesserung ergab sich durch die Einführung eines (HF)_x/Pyridin Gemisches durch Olah *et al.*, 1973. Fluorwasserstoff löst sich gut in Pyridin. Eine ca. 70%ige Lösung verliert bis 50 °C kein HF, was deren Handhabung wesentlich erleichtert.

Während HF in Pyridin eine schwächere Säure als in reiner Form ist, wird die Nucleophilie des Fluorid-Ions erhöht. Sowohl die Addition an Doppel- und Dreifachbindungen, als auch nucleophile Substitution mit dem Olah-Reagenz findet breite Anwendung. Ferner ermöglicht es, Epoxide oder Azaridin-Ringe durch einen nucleophilen Angriff zu öffnen (Abb. 3.5) (Wade *et al.*, 1979).

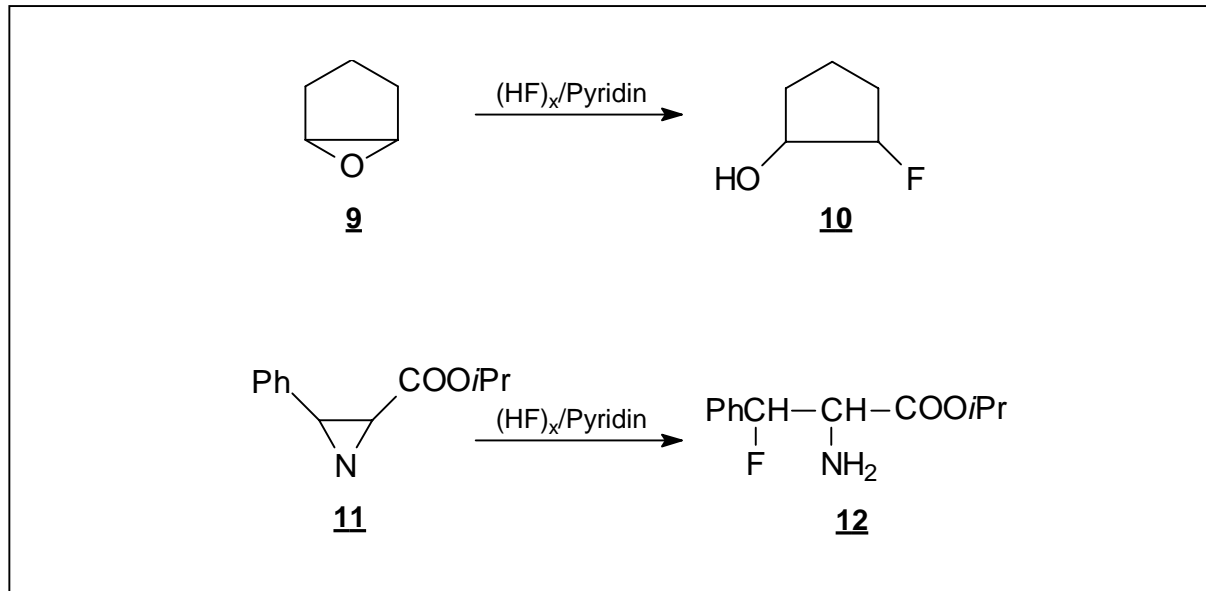


Abb. 3.5 Ringöffnungen mit $(\text{HF})_x/\text{Pyridin}$

3.3.6 Schwefeltetrafluorid und Analoga

Schwefeltetrafluorid gehört zu den am häufigsten verwandten Fluorierungsmitteln (Gerstenberger & Hass, 1981). Es verfügt über ein breites Anwendungsspektrum besonders bei reaktionsträgen Substraten. Hervorzuheben ist die Umwandlung von Carbonsäuren in Säurefluoride oder CF_3 -Gruppen. Besonders bei der Generierung von CF_3 -Gruppen in aromatische Systeme spielt Schwefeltetrafluorid eine wichtige Rolle. Darüber hinaus konnte am Beispiel des Adamantan gezeigt werden, dass es sogar Wasserstoffatome an einem tertiären Kohlenstoffatom substituieren kann (Khadin *et al.*, 1979).

Allerdings ist die Handhabung nicht unproblematisch. Es verfügt über einen Siedepunkt von -40°C und ist in seiner Toxizität mit Phosgen vergleichbar.

Vorteile bringt die Substitution von einem oder mehreren Fluor-Atomen durch sekundäre Amino-Funktionen. Die Amino-Derivate sind weniger flüchtig und somit sind keine Druckreaktionen oder aufwendige Kühlungen erforderlich. Durch die reduzierte Reaktivität

werden selektivere Reaktionen möglich und unerwünschte Umlagerungen oder Eliminierungen unterdrückt.

Der wohl bekannteste und präparativ bedeutendste Vertreter dieser Gruppe ist Diethylaminoschwefeltrifluorid **15** (DAST) (Abb. 3.6). Besonders in der Naturstoffsynthese ist DAST von besonderer Bedeutung. Im Gegensatz zu den Metallfluoriden ist es möglich, eine Hydroxylgruppe direkt zu substituieren, ohne vorher eine Abgangsgruppe einzuführen. Eckstein und Bensler haben diesen Vorteil bei der Synthese von geschütztem 2'-Fluorguanosin genutzt (Eckstein & Bensler, 1992) (Abb. 3.6). Bei der Handhabung ist aber zu beachten, dass sich DAST oberhalb von 50°C explosionsartig zersetzen kann.

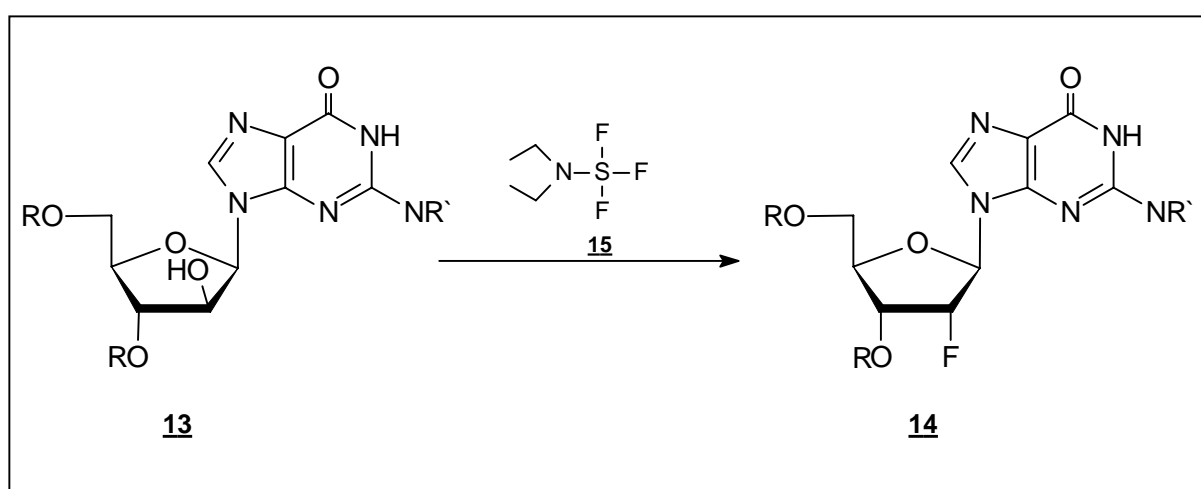


Abb. 3.6 Fluorierung mit DAST **15** (Eckstein & Bensler, 1992)

3.4 Fluorierung von Nucleosiden

3.4.1 Fluorierungspositionen

Die Entwicklung von geeigneten Fluorierungsreagenzien hat es möglich gemacht, Fluoratome oder CF_n -Gruppen an verschiedenen Positionen von Nucleosiden und Nucleotiden einzuführen. Abbildung 3.7 gibt eine Übersicht über mögliche Fluorierungspositionen.

Fluor-substituierte Analoga der natürlichen Nucleoside haben sich als antivirale Pharmaka, als Zytostatika oder als Fungizide etabliert. Es ist nicht verwunderlich, dass ein hoher Prozentsatz von fluorierten Nucleosiden oder Nucleotiden eine deutliche biologische

Aktivität zeigt, da durch die Einführung des Fluors die dreidimensionale Geometrie nur wenig beeinflusst wird.

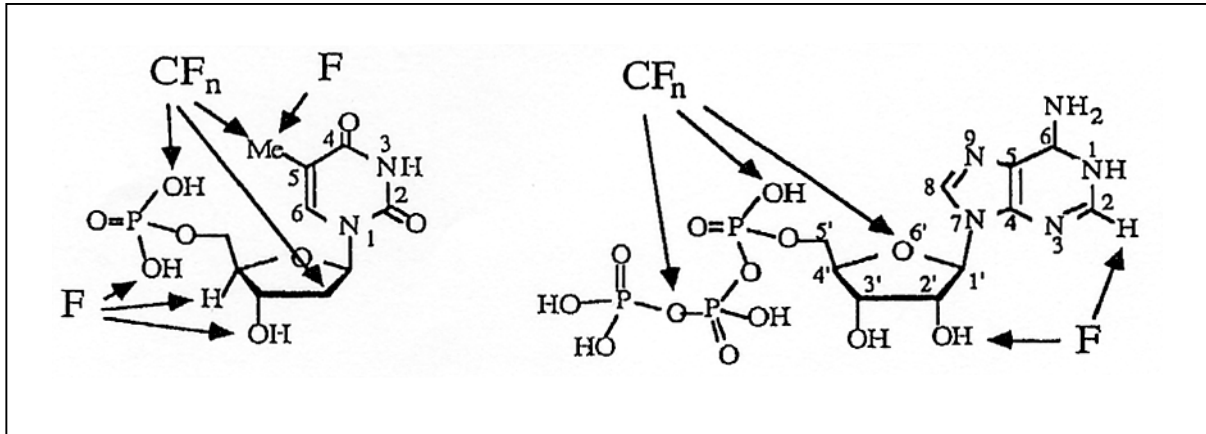


Abb. 3.7 Fluorierungspositionen an Nucleotiden (Bergstrom & Swartling, 1988)

3.4.2 Auswirkungen von Fluor in der 2'-Position

Über ihre pharmakologische Wirkung hinaus dienen fluorierte Analoga auch als Sonden, um Informationen über Strukturen, Wasserstoffbrücken oder Stabilisierungseffekte innerhalb von Nucleinsäuren zu gewinnen. Besondere Bedeutung kommt dabei den 2'-Desoxy-2'-fluornucleosiden zu.

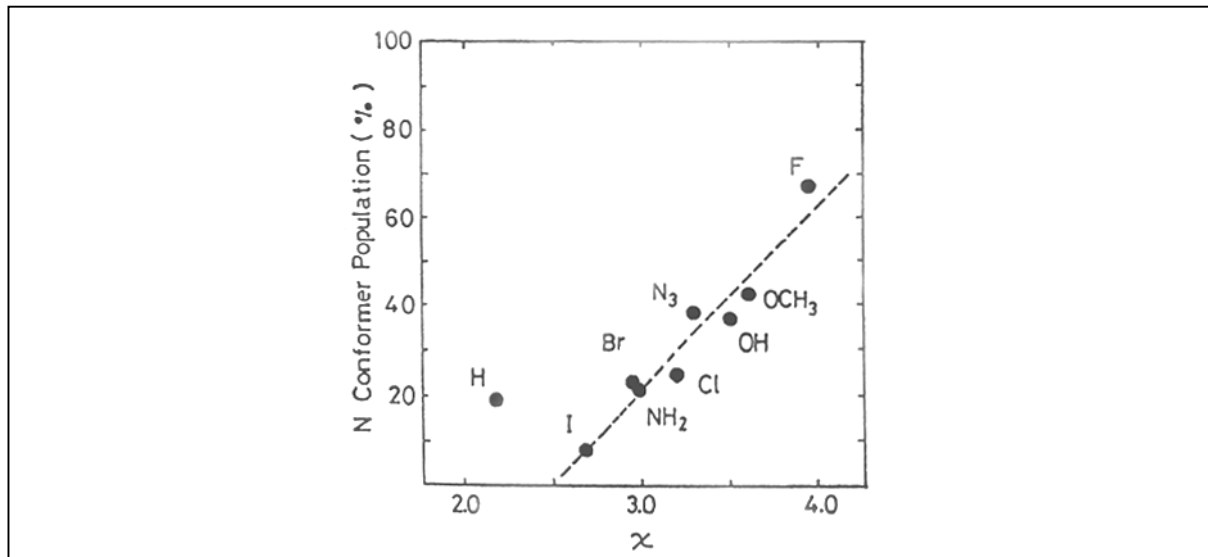


Abb. 3.8 Einfluss der Elektronegativität der 2'-Substituenten auf die Ringkonformation

Die 2'-OH-Funktion ist maßgeblich an der strukturellen Vielfalt der RNA gegenüber der DNA verantwortlich. Sie ermöglicht als Wasserstoffbrückendonator die Ausbildung vieler

Sekundärstrukturelemente. Durch ihren Austausch gegen Fluor lässt sich gezielt ihr Einfluss und ihre Funktion untersuchen.

Darüber hinaus hat das Fluor aufgrund seiner hohen Elektronegativität einen Einfluss auf die Ringkonformation. Ikehara konnte zeigen, dass nicht der sterische Anspruch des 2'-Substituenten sondern dessen Elektronegativität die Ringkonformation beeinflusst. Er konnte am Beispiel des Desoxyadenosins, das in der 2'-Position verschiedene Substituenten trägt, zeigen, dass mit steigender Elektronegativität sich das Verhältnis zwischen N- und S-Konformer zugunsten des N-Konformers (*3'-endo*) verschiebt (Ikehara, 1984). Diesen nahezu linearen Zusammenhang zeigt Abbildung 3.8.

4 Aufgabenstellung und Ziele

Diese Arbeit möchte einen Beitrag zur Strukturaufklärung von kleinen DNA- und RNA-Strukturen leisten.

Eine besonders interessante RNA-Struktur sind die Haarnadelschlaufen des UUCG-Typs (Abb. 4.1), die über eine besonders hohe Stabilität verfügen. Mit Hilfe von 2'-Fluor modifizierten Pyrimidinbausteinen, 2'-Desoxyuridin und einer dem Uridin isosteren Baustein soll der Einfluss von Zuckerkonformation und Wasserstoffbrücken auf die Stabilität innerhalb der Schlaufenregion untersucht werden.

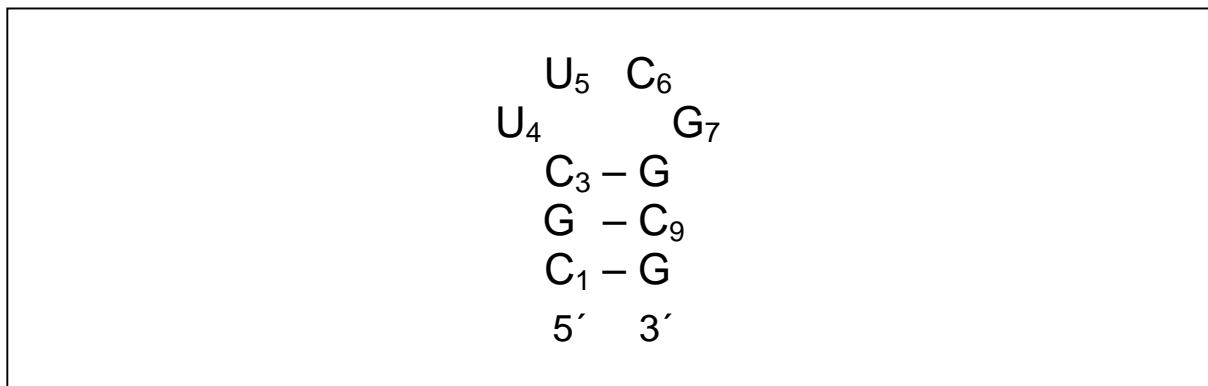


Abb. 4.1 UUCG-Haarnadelschleife

Dazu müssen die Phosphoramiditbausteine 22a/b, 23a/b und 26a/b (Abb. 4.2) synthetisiert werden. Die Bausteine sollen dann an der festen Phase selektiv an verschiedenen Positionen in die UUCG-Haarnadelschlaufen eingebaut werden.

Die erhaltenen Stränge sollen nach Aufreinigung und Charakterisierung mit Hilfe von UV- und CD-Spektroskopie untersucht werden. Die erhaltenen Schmelzpunkte und thermodynamischen Daten sollen dazu beitragen, die ungewöhnliche Stabilität dieser Haarnadelschleife besser zu verstehen.

Neben der NMR-Spektroskopie hat sich in den letzten zehn Jahren die ESR-Spektroskopie als Methode zur Strukturaufklärung bei Biomakromolekülen, vor allem bei Proteinen etabliert. Neben dem Vorteil eines größeren Zeitfensters, ist das benötigte Probenvolumen deutlich kleiner als bei der NMR-Spektroskopie.

Es scheint besonders reizvoll, durch das Anbringen von paramagnetischen Sonden Nukleinsäuren und deren Dynamik zu untersuchen. Darüber hinaus können Abstände zwischen zwei Sonden innerhalb eines Moleküls bestimmt werden.

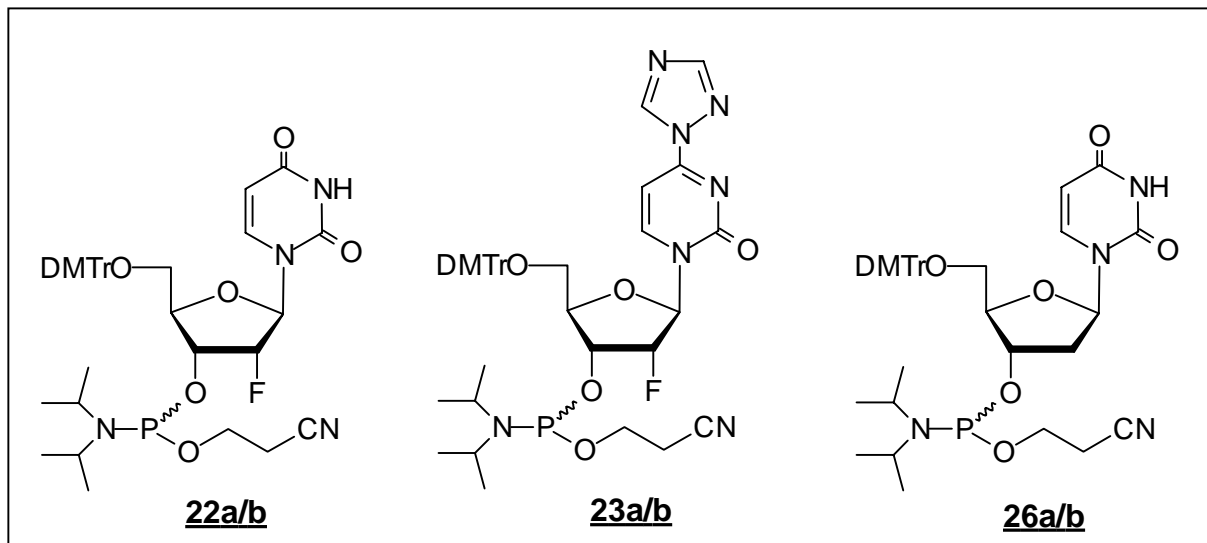


Abb. 4.2 Phosphoramiditbausteine zur Untersuchung der UUCG-Haarnadelsschleife

Einschränkend ist hier ist die aufwendige Synthese dieser mit Sonden markierten Proben. Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten, die die Synthese eines markierten Phosphoramiditbausteines vorsehen, soll in dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, um die paramagnetischen Sonden (Spin label) während der Festphasensynthese einzuführen. Dadurch entfällt der synthetische Aufwand zur Darstellung der markierten Phosphoramidite und die benötigte Menge des Spin-Labels wird stark reduziert. Diese Methode würde es ermöglichen, viele markierte Proben in kurzer Zeit darzustellen.

Dazu muss zunächst ein für Abstandsbestimmungen geeigneter Spin-Label (Abb. 4.3) in achtstufiger Synthese dargestellt werden.

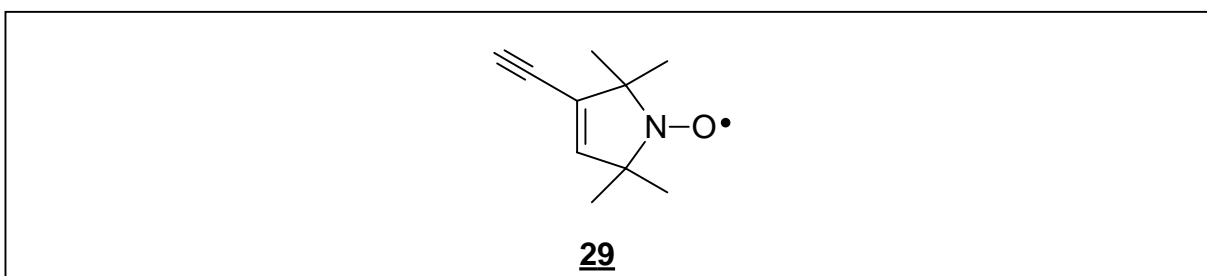


Abb. 4.3 Paramagnetische Sonde für Abstandsbestimmungen in Nukleinsäuren

Dieser soll mit Hilfe der Sonogashira-Kupplung während der Festphasensynthese kovalent gebunden werden. Schließlich müssen Aufreinigungs- und Charakterisierungsmethoden für die synthetisierten Stränge entwickelt werden.

5 Synthese der Phosphoramidit-Bausteine für die Untersuchung des UUCG-Hairpins

5.1 Möglichkeiten zur Darstellung von 2'-fluorierten Pyrimidin-Bausteinen

Zur Darstellung von 2'-Fluornukleosiden gibt es im wesentlichen drei Methoden:

1. Eine Möglichkeit ist eine direkte Fluorierung eines entsprechend geschützten Nucleosids. Diese Methode findet vor allem bei Pyrimidinnucleosiden Anwendung.
2. Wenn eine direkte Fluorierung, vor allem bei Purinnucleosiden nur sehr schwer oder gar nicht möglich ist, bietet es sich an, den entsprechend geschützten Zucker zu fluorieren und anschließend durch eine Glykosylierung das gewünschte Nucleosid darzustellen.
3. Es kann sich anbieten, schon einen Vorläufer des Zuckers zu fluorieren, der dann nach weiteren Syntheseschritten ebenfalls glykosyliert wird.

Abbildung 5.1 zeigt die ersten Schritte einer Synthese, bei der die Fluorierung schon an einem Vorläufermolekül des Zuckers erfolgt. Um die 2',2'-Difluorverbindung **17** zu erhalten, wird das R-Enantiomer von 2,3-(Isopropylidendioxy)propanal **15** mit Ethylbromdifluoracetat unter Reformatsky-Bedingungen umgesetzt. Man erhält das Diastereoisomerengemisch **16a/b**, wobei das gewünschte Stereoisomer im Verhältnis 3:1 entsteht. Nach saurer Abspaltung der Isopropyliden-Gruppe wird nach dem Ringschluss das Lacton silyliert. (Hertel *et al.*, 1988).

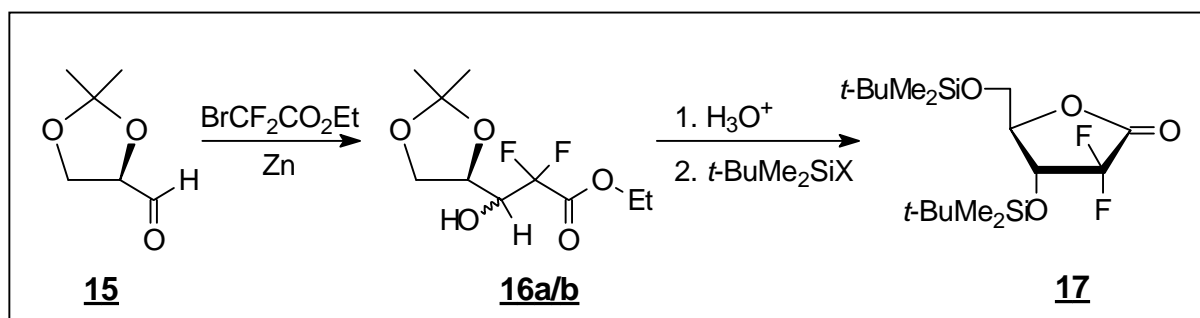


Abb. 5.1 Schlüsselschritte bei der Fluorierung eines Zuckervorläufers

In dieser Arbeit wurde die Darstellung von der 2'-fluorierten Pyrimidinbasen auf der Stufe des Nucleosids vollzogen. Insbesondere das Uridin ist durch seine Anhydroverbindung für die Fluorierung in der 2'-Position leicht zugänglich. Das Cytidinanalogon lässt sich durch eine Umwandlung aus einem 2'-fluorierten Uridinbaustein darstellen.

5.2 Darstellung der 2'-fluorierten Uridin- und Cytidinphosphoramidite

5.2.1 Darstellung von 2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil **19**

Die Anhydroverbindung des Uridins **19** ist ein Schlüsselmolekül, das es erlaubt, an der 2'-Position selektiv Substituenten in der *ribo*-Konformation einzuführen. Dieses ist unter anderem für Fluor, Chlor, Brom, Iod und eine Aminofunktion beschrieben (Codington *et al.*, 1964).

Die Darstellung von Anhydrouridin **19** ist zum ersten Mal von Hampton *et al.* mit Dimethylformamid als Lösungsmittel beschrieben worden (Hampton *et al.*, 1966). Eine Ausbeutesteigerung kann durch Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) erzielt werden (Verheyden *et al.*, 1971).

Bei der Reaktion werden Uridin, Diphenylcarbonat und eine katalytische Menge Natriumhydrogencarbonat in HMPT gelöst und für zwanzig Minuten auf 150°C erhitzt. Nach der Aufarbeitung und der Umkristallisation aus Methanol erhält man in 84%iger Ausbeute das gewünschte Produkt (Abb. 5.2).

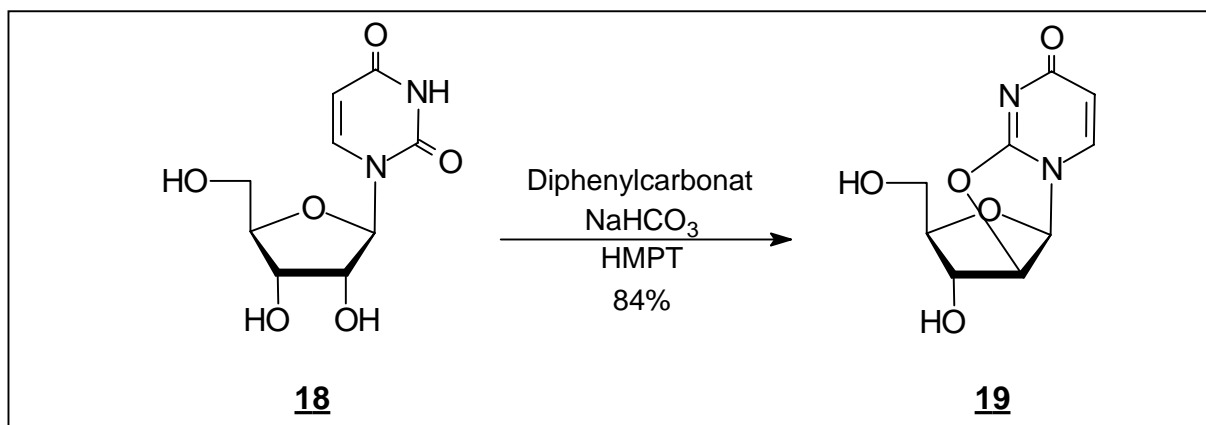


Abb. 5.2 Darstellung von Anhydrouridin **19**

Die Charakterisierung erfolgte durch ^1H - und ^{13}C -Spektroskopie sowie durch die Bestimmung des Schmelzpunktes.

5.2.2 Darstellung von 2'-Fluor-2'-desoxyuridin **20**

Zur Einführung des Fluorsubstituenten an der 2'-Position wurde Verbindung **19** mit dem Olah-Reagenz $(\text{HF})_x/\text{Pyridin}$ (Olah *et al.*, 1979) in absolutem Dioxan umgesetzt. Dieses hat im Gegensatz zu reiner Fluorwasserstoffsäure den Vorteil, besser handhabbar zu sein. In einem Teflongefäß wird die Mischung für 48 Stunden bei einer Temperatur von 120°C gerührt (Abb. 5.3).

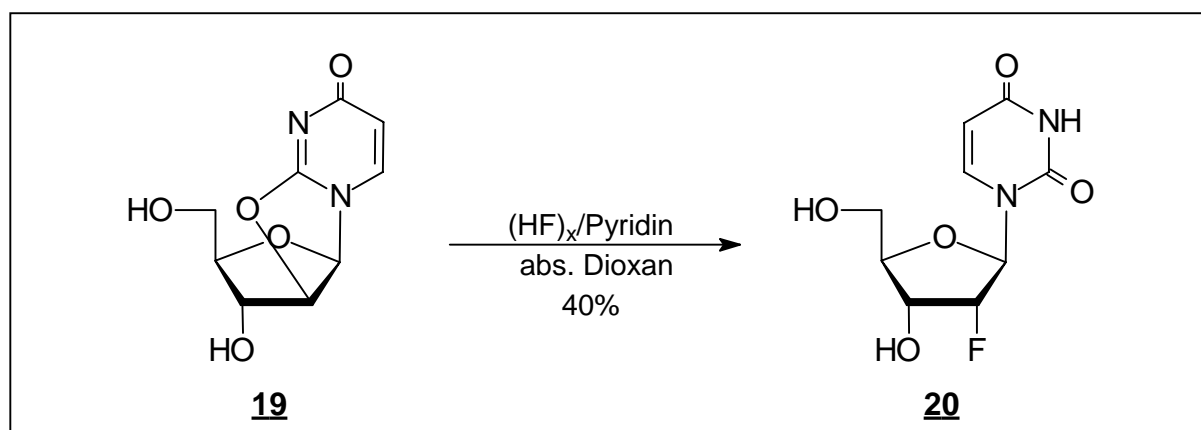


Abb. 5.3 Fluorierung der Anhydroverbindung **19** mit $(\text{HF})_x/\text{Pyridin}$

Es zeigte sich, dass die genaue Einhaltung der Reaktionsbedingungen für die Ausbeute von großer Bedeutung ist. Tabelle 5.1 zeigt verschiedene Versuchsbedingungen und die daraus resultierenden Ausbeuten.

Temperatur [$^\circ\text{C}$]	Zeit [h]	Ausbeute [%] 20
105	48	0
115	24	12
120	24	34
120	48	40
125	24	18

Tabelle 5.1 Reaktionsbedingungen und –ausbeuten der Fluorierung mit $(\text{HF})_x/\text{Pyridin}$

Für den Mechanismus dieser Reaktion werden zwei Stadien postuliert. Zunächst kommt es bei der Reaktion von HF mit der Anhydroverbindung **19** zu einer Protonierung von N3.

Durch den nukleophilen Angriff eines Fluoridions an C2' wird dann die Anhydrobindung geöffnet. Bei der Umsetzung der Verbindung **19** mit Chlorwasserstoff kann die protonierte Zwischenstufe als Hydrochlorid sogar als kristallines Produkt isoliert werden (Codington *et al.*, 1964).

Bei dieser Reaktion ist unbedingt auf absolute Wasserfreiheit zu achten. Die mögliche Hydrolyse der protonierten Anhydroverbindung läuft schneller ab als der nukleophile Angriff auf C2' und führt zu der entsprechenden 2'-*arabino*-Verbindung.

Auch bei Verwendung von absolutem Dioxan verläuft die Reaktion nur mit einer Ausbeute von maximal 40%. Neben dem gewünschten Produkt entstehen verschiedene Nebenprodukte. Ausserdem lassen sich nach der Aufarbeitung und Aufreinigung bis zu 40% des Edukts reisolieren. Die Charakterisierung erfolgte durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie, durch Bestimmung des Schmelzpunktes sowie Massenspektrometrie.

5.2.3 Schützung der 5'-OH-Funktion

Für die Schützung der 5'-OH-Funktion von Bausteinen, die in der Oligonukleotid-festphasensynthese eingesetzt werden sollen, können die Dimethoxytriphenylmethyl- (Dimethoxytrityl, DMTr), die Monomethoxytriphenylmethyl- oder die Triphenylmethylschutzgruppe eingesetzt werden. Mit jeder zusätzlichen Methoxyfunktion an der Tritylgruppe steigt die Säurelabilität dieser Schutzgruppe um den Faktor 10 (Smith *et al.*, 1962). Da für die Festphasensynthese eine möglichst starke Säurelabilität von Vorteil ist, hat sich die DMTr-Gruppe zunehmend durchgesetzt.

Aufgrund ihres sterischen Anspruches zeigt die Dimethoxytritylschutzgruppe eine hohe Selektivität für die primäre 5'-OH-Funktion. Mehrfach tritylierte Nebenprodukte werden in der Regel nur zu einem geringen Prozentsatz gefunden. Die Gruppe lässt sich mit 3%iger Trichloressigsäure in Dichlormethan innerhalb von 60 Sekunden (Oligonukleotid-festphasensynthese) oder mit 80%iger Essigsäure innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur abspalten.

Darüber hinaus bietet die Dimethoxytritylgruppe einen weiteren Vorteil. Da das Kation nach der Abspaltung im sichtbaren Bereich des Wellenlängen-Spektrums bei 498 nm

absorbiert, ist es möglich, nach jedem Kupplungsschritt während der Festphasensynthese die Kupplungsausbeute zu quantifizieren.

Zu Einführung der Dimethoxytritylschutzgruppe wurde 2'-Fluor-2'-desoxyuridin **20** in abs. Pyridin gelöst und mit 1,5 eq Dimethoxytritylchlorid sowie 1,5 eq Triethylamin versetzt. Die Reaktion verlief in 4 Stunden mit einer Ausbeute von 81% zu Verbindung **21** (Abb. 5.4). Die Charakterisierung erfolgte durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie.

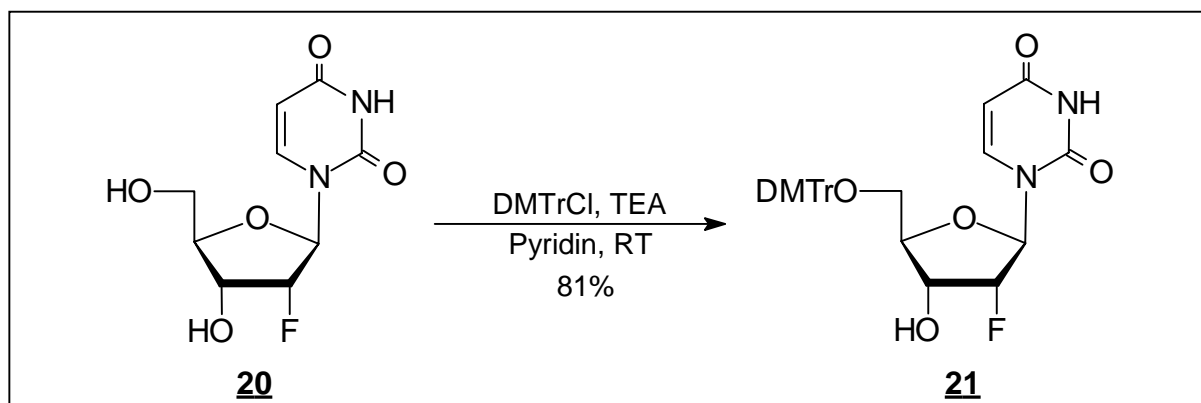


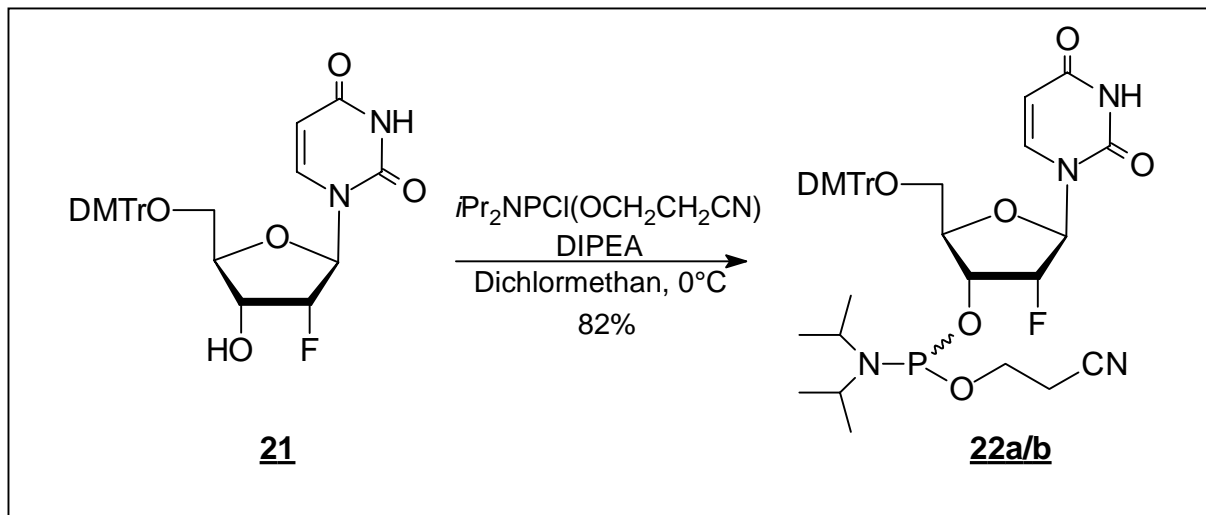
Abb. 5.4 Schützung der 5'-OH-Funktion

5.2.4 Phosphitylierung

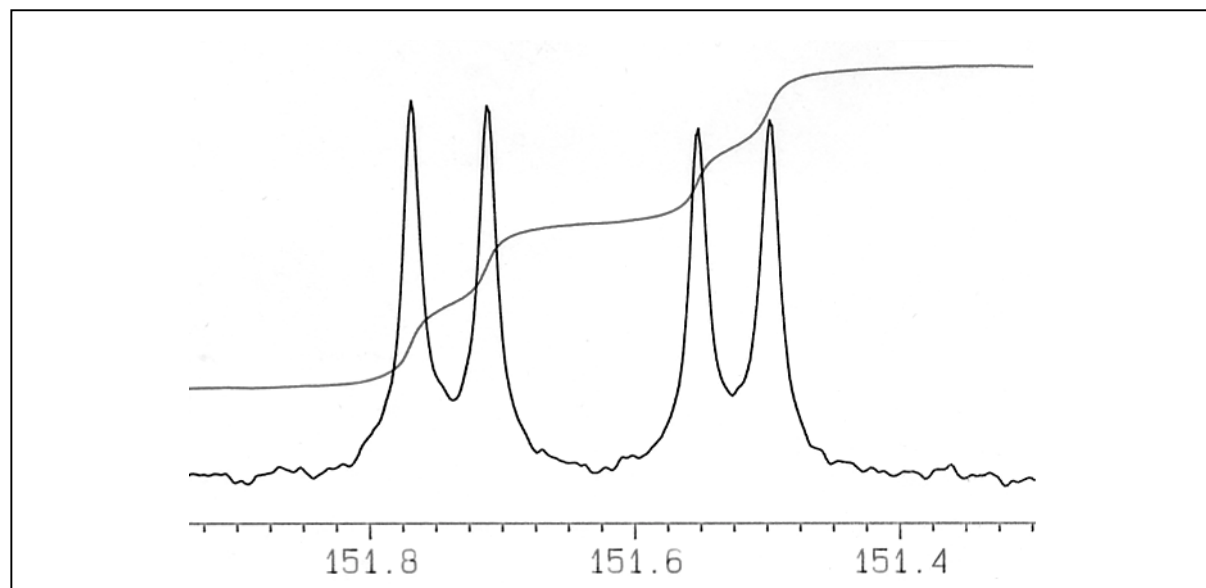
Phosphoramidite haben sich heute sowohl in der chemischen DNA- als auch RNA-Synthese als Standardbausteine durchgesetzt (Scaringe *et al.*, 1990). Dabei wird ein dreiwertiger Phosphor mit einer *N,N*-Diisopropylaminogruppe als auszutauschende Amiditkomponente (Adams *et al.*, 1983) und der β -Cyanoethylrest als Schutzgruppe verwendet.

Als Standardphosphitylierungsreagenz wird dabei 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit in abs. Dichlormethan oder Tetrahydrofuran in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylamin eingesetzt. (Sinha *et al.*, 1983; McBride & Caruthers, 1983; Gait, 1984).

Die Phosphitylierung der Verbindung **21** wurde in Dichlormethan unter Zusatz von drei Äquivalenten *N,N*-Diisopropylethylamin (Hünigs-Base, DIPEA) bei 0°C durchgeführt (Abb. 5.5).

Abb. 5.5 Phosphitylierung der Verbindung **21**

Die Charakterisierung erfolgte durch ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie. Im ^{31}P -NMR-Spektrum erkennt man deutlich die beiden Diastereoisomere **22a/b**, die jeweils durch die Phosphor-Fluor Kopplung ($^4J_{\text{P-F}}=9,4$ bzw. $9,7$ Hz) in zwei Dupletts aufgespalten sind (Abb. 5.6).

Abb. 5.6 Ausschnitt aus dem ^{31}P -NMR-Spektrum von **22a/b**

5.2.5 Umwandlung von **22a/b** in sein Cytidinanalogon **23a/b**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nicht nur 2'-Fluoruridin sondern auch 2'-Fluorcytidin als Amiditbaustein für die Oligonukleotidfestphasensynthese dargestellt werden. Grundsätzlich

kann das bewerkstelligt werden, indem zunächst die 2'-Hydroxylfunktion von Cytidin invertiert und mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid in eine gute Abgangsgruppe überführt wird. Die Fluorierung kann anschließend mit Tetrabutylammoniumfluorid durchgeführt werden. Die Schützung der 5'-Position sowie die Phosphitylierung erfolgt analog des Uridin-Bausteines.

1982 hat Divakar die Umwandlung des Uridin-Bausteines in ein Cytidinanalogon mit 1,2,4-Triazol auf der Ebene des 2'-Fluor-2'-desoxyribofuranosids beschrieben (Divakar *et al.*, 1982).

In dieser Arbeit ist die Umwandlung auf der Amiditebene (Strube, 1997) vollzogen worden. Dabei wird das 2'-Fluor-2'-desoxyuridinphosphoramidit **22a/b** mit 1,2,4-Triazol und POCl_3 in Acetonitril umgesetzt (Klebba, 1996). Die Umwandlung auf Amiditbasis hat im Vergleich zu den oben beschriebenen Methoden das Einsparen mehrerer Reaktionsschritte zur Folge.

Neben einem strikten Feuchtigkeitsausschluss ließen sich die besten Ausbeuten bei einer Reaktionszeit von zwei Stunden unter Eiskühlung und einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur erzielen.

Aufgrund der basenlabilen Cyanoethylgruppe und der säurelabilen Tritylschutzgruppe muss ferner auf einen neutralen pH-Wert geachtet werden. Bei diesen Reaktionsbedingungen erhält man das Cytidinanalogon **23a/b** in einer Ausbeute von 79% (Abb. 5.7).

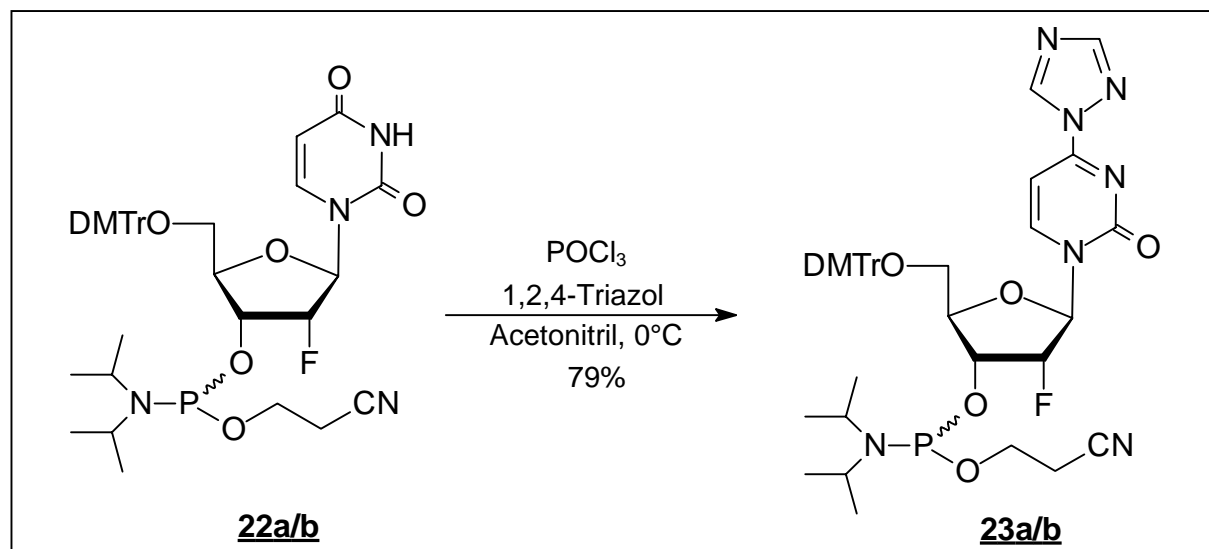


Abb. 5.7 Umwandlung von **22a/b** in das Cytidinanalogon **23a/b**

Der Baustein **23a/b** wird dann direkt in der Festphasensynthese eingesetzt. Bei der Aufarbeitung nach der Oligonukleotidsynthese mit Ammoniak/Methanol bei 55°C für 16 h wird das 1,2,4-Triazol gegen eine Aminogruppe substituiert.

Die Charakterisierung erfolgte durch ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie.

Abbildung 5.8 zeigt die Darstellung der 2'-fluorierten Uridin- und Cytidinbausteine **22a/b** und **23a/b** in einer Übersicht.

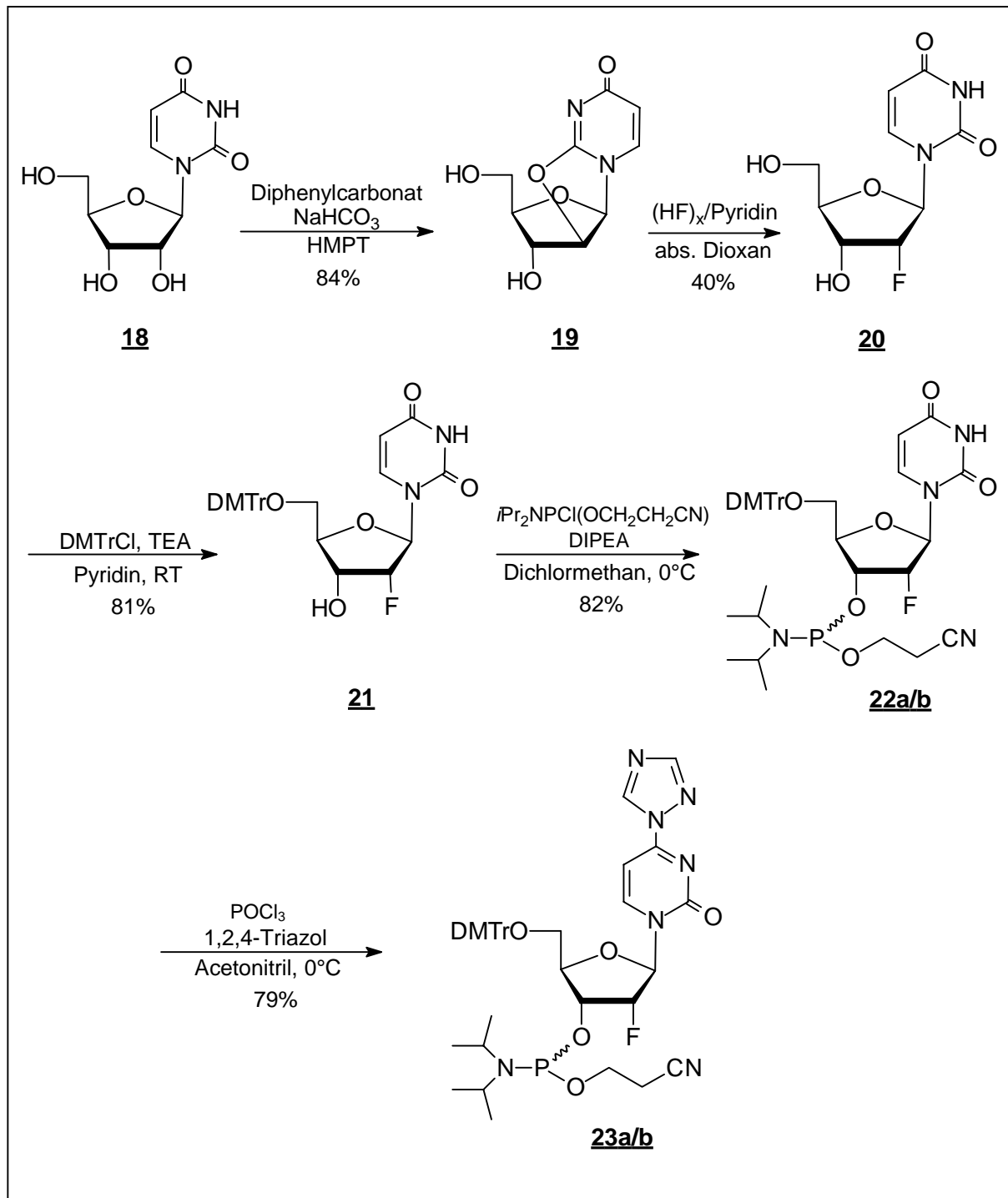


Abb. 5.8 Syntheseübersicht zu den Zielmolekülen **22a/b** und **23a/b**

5.3 Darstellung von 2'-Desoxyuridinphosphoramidit **26a/b**

Ausgehend von 2'-Desoxyuridin **24** wird zunächst wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben die 5'-OH-Funktion mit Dimethoxytritylchlorid geschützt.

5-*O*-(4,4'-Dimethoxytritylmethyl)-2'-desoxyuridin **25** wird in einer Ausbeute von 86% erhalten (Abb. 5.9). Die Charakterisierung erfolgte durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie.

Analog Kapitel 5.2.4 wird die Verbindung **25** in Dichlormethan mit DIPEA und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit zu **26a/b** in 83%iger Ausbeute umgesetzt (Abb. 5.9). Die Charakterisierung erfolgte durch $^1\text{H-}$ und $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie.

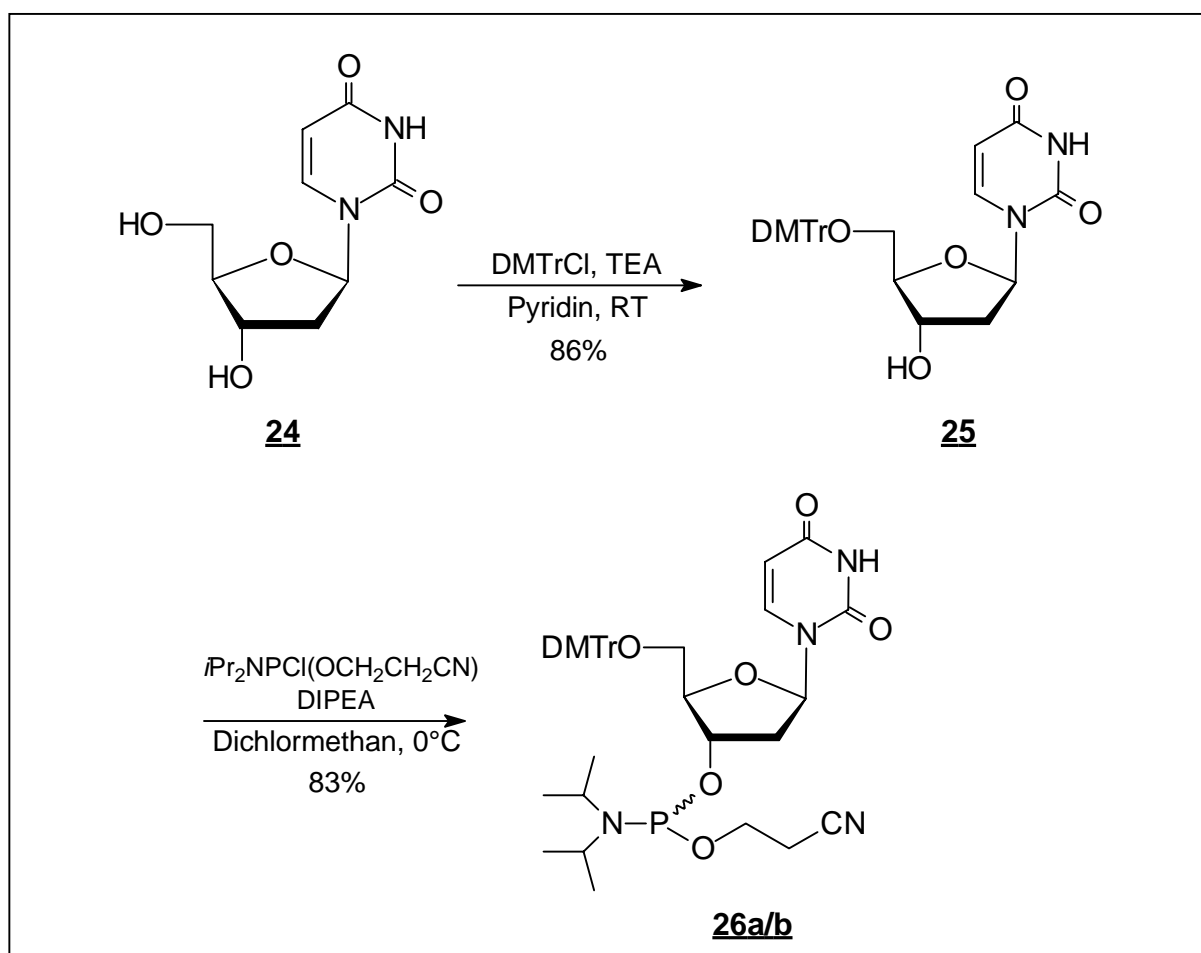


Abb. 5.9 Syntheseübersicht zum Zielmolekül **26a/b**

6 Synthese und Charakterisierung der Oligonukleotide

6.1 Synthese von Oligonukleotiden

Ein Oligonukleotid ist eine einzelsträngige Kette, die aus einzelnen über Phosphordiesterbrücken verbundenen Nucleosiden besteht. Dabei dienen jeweils die 5'- und 3'-Hydroxylfunktionen als Verbindungsstellen. Bei dem Aufbau von Oligonukleotiden handelt es sich um einen repetitiven Prozess, bei dem durch Polykondensation aktivierter Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide Desoxyribo- bzw. Ribonucleinsäuren entstehen. Grundsätzlich kann dieser Aufbau in 5'-3' oder in der 3'-5' Richtung erfolgen.

Während bei der enzymatischen Synthese (Milligan, 1987) basierend auf 5'-Triphosphatbausteinen die erste Möglichkeit genutzt wird, hat sich bei der Festphasensynthese die Richtung 3'-5' durchgesetzt. Hierbei wird die höhere Reaktivität der primären 5'-OH Funktion gegenüber der sekundären 3'-OH-Funktion ausgenutzt (Engels, 1989).

Das Prinzip der Festphasensynthese wurde in den fünfziger und sechziger Jahren von Bruce Merrifield am Beispiel der Polypeptide entwickelt (Merrifield, 1963). Diese Technik konnte von Robert Letsinger auf die Oligonucleotidsynthese übertragen werden (Letsinger *et al.*, 1976).

Durch die Entwicklung geeigneter und hochleistungsfähiger Syntheseautomaten hat sich die Festphasensynthese zur Darstellung von Oligonucleotiden durchgesetzt. Nur sehr lange Nucleotide werden enzymatisch synthetisiert.

Die Festphasensynthese bietet den Vorteil, dass durch die ermöglichte Automatisierung mehrere Stränge gleichzeitig aufgebaut werden können. Durch die Fixierung an der festen Phase können die Reagenzien durch einfache Waschprozesse entfernt werden, eine Aufreinigung nach jeder Kupplung entfällt. Limitierender Faktor waren effiziente chemische Verknüpfungsmethoden, die möglichst hohe Ausbeuten bei der Internucleotidbindung garantieren.

Seit den Anfängen in den siebziger Jahren sind bis heute die Phosphordiester-, Phosphortriester-, H-Phosphonat- und Phosphoramiditmethode entwickelt worden. Sie variieren im wesentlichen in der Art des Aufbaus des Zuckerphosphatrückgrates während der Synthese und der damit verbundenen Monomere und Aktivatoren. Im folgenden sind die verschiedenen Methoden beschrieben.

6.1.1 Phosphordiester-Methode

Die Phosphordiester-Methode ist von Khorana eingeführt worden und basiert auf der Verknüpfung eines 3'-Phosphorsäuremonoesters mit der 5'-OH-Funktion eines zweiten Nucleosids (Abb. 6.1). Die Phosphorsäurediesterbindung wird mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) geknüpft (Khorana *et al.*, 1979).

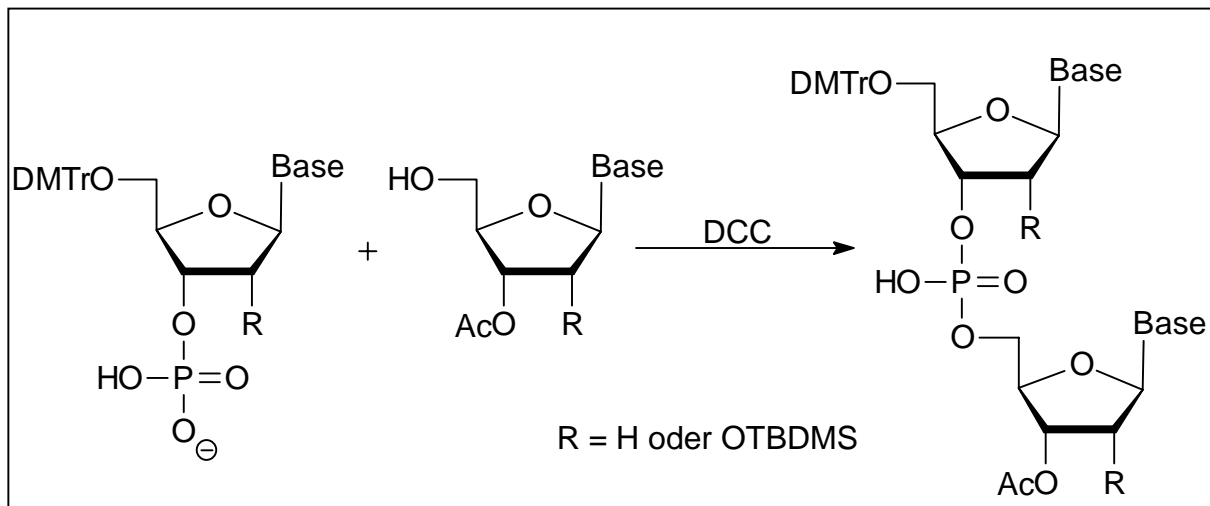


Abb. 6.1 Oligonukleotidsynthese nach der Phosphordiester-Methode

Bei dieser Methode treten eine Vielzahl von Nebenprodukten auf, unter anderem können sich durch eine weitere Anknüpfung an eine bereits bestehende Phosphordiesterbindung vernetzte Oligonukleotide ausbilden.

Aufgrund dieser Nachteile hat sich die Phosphordiester-Methode nicht durchsetzen können und besitzt nur noch historische Bedeutung.

6.1.2 Phosphortriester-Methode

Dieses Verfahren ist eine Weiterentwicklung der Phosphordiester-Methode (Narang *et al.*, 1980). Durch das Einführen einer Schutzgruppe am Phosphor, wie zum Beispiel der

β -Cyanoethylgruppe, können Nebenreaktionen und vor allem die Vernetzung der Oligonukleotide vermieden werden.

Diese Methode wurde sowohl in flüssiger als auch an fester Phase erprobt. Bei der Reaktion entstehen unter Einwirkung von Arylsulfonsäureazoliden als Kupplungsreagenzien Phosphortriester (Abb. 6.2).

Problematisch ist die mögliche O(6)-Phosphorylierung am Guanin, die im Gegensatz zur Phosphitylierung nicht reversibel ist. Dadurch können unerwünschte Kettenverzweigungen auftreten.

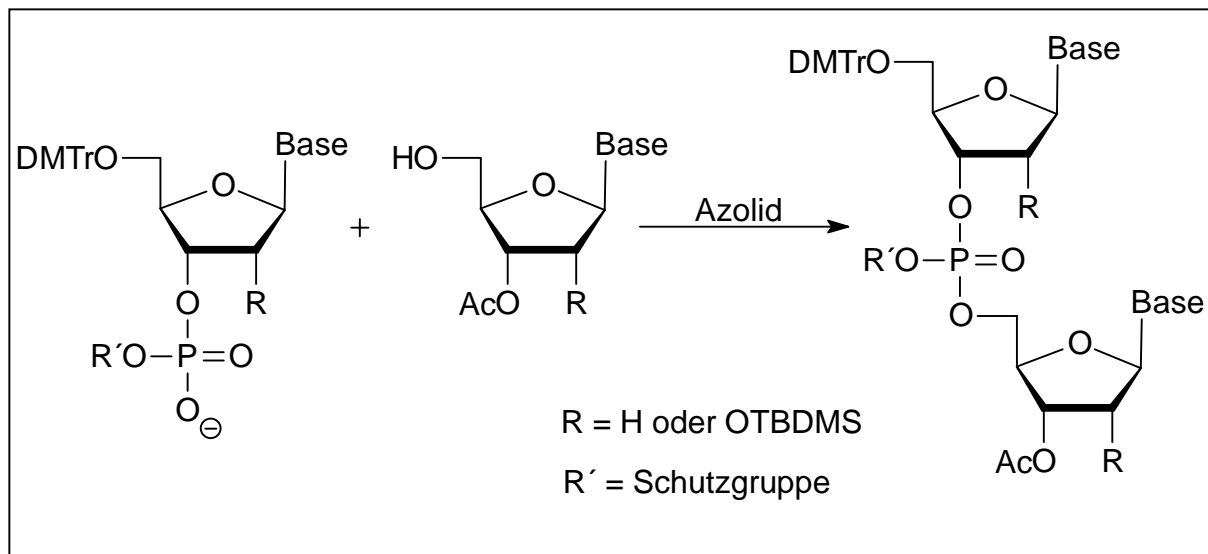


Abb. 6.2 Oligonukleotidsynthese nach der Phosphortriester-Methode

6.1.3 H-Phosponat-Methode

Während die Phosphorsäurediester- und Phosphorsäuretriester-Methode heute keine Bedeutung mehr besitzen, wird die H-Phosponat-Methode zur Darstellung von Nukleosiddimeren in Lösung oder für sterisch anspruchsvolle Phosphorrückgrat-Modifikationen eingesetzt (Garegg *et al.*, 1986).

An fester Phase erfolgt die Kupplung nach Abspaltung der 5'-OH-Schutzgruppe des am Träger gebundenen Monomers mit einem durch Pivaloylchlorid aktiviertem Phosponat (Abb. 6.3).

Der Oxidation erfolgt erst am Ende der gesamten Oligonukleotidsynthese, wodurch die Zykluszeiten verkürzt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die durch den Aktivator eingeleitete Bildung acylierter Nebenprodukte, wie z.B. auftretende Biacylphosphite (Froehler *et al.*, 1986).

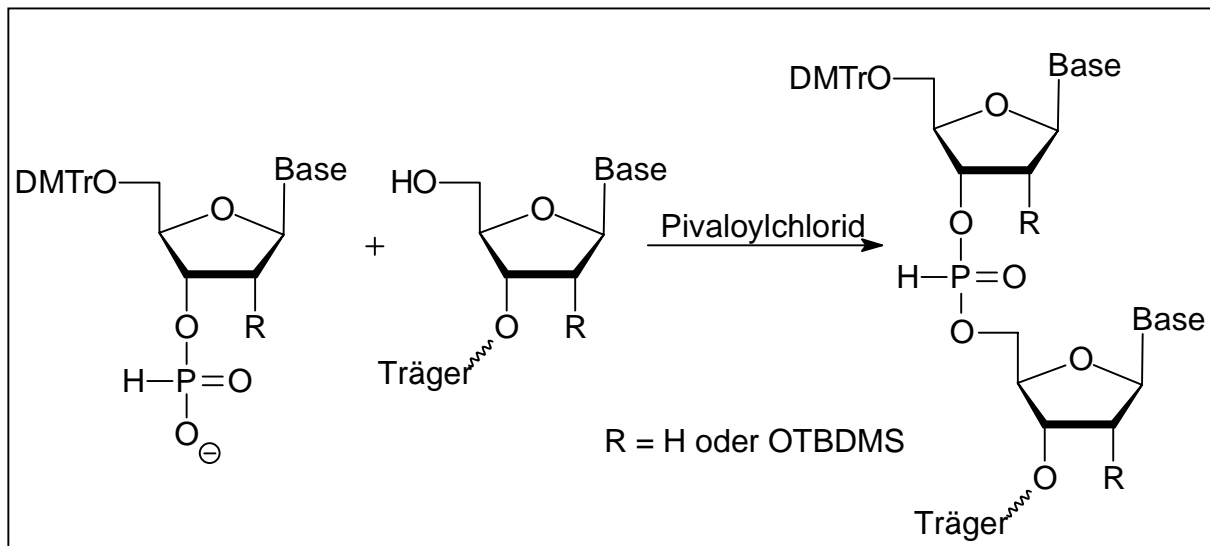


Abb. 6.3 Oligonukleotidsynthese nach der H-Phosphonat-Methode

6.1.4 Phosphoramidit-Methode

Die wichtigste Methode zur Darstellung von Oligonukleotiden ist die Phosphoramidit-Methode (Phosphitriester-Methode) (Sinha *et al.*, 1983). Da die Kupplungsausbeuten sehr hoch sind (>99% für DNA, >97% für RNA pro Kupplung) liegt den meisten Syntheseautomaten diese Methode zu Grunde.

Im Gegensatz zur H-Phosphonat-Methode werden Monomere mit dreiwertigem Phosphor eingesetzt. Dabei wird die 5'-Hydroxylfunktion eines trägergebundenen Nucleosids mit einem geschützten Nucleosidphosphoramidit zu einem Phosphitriester umgesetzt. Als Aktivator wird in der Regel 1H-Tetrazol verwendet. Abbildung 6.5 zeigt das Syntheschema der Phosphoramidit- Festphasenmethode.

Als Startnucleosid wird ein beliebiges 5'-Dimethoxytrityl-geschütztes Nucleosid eingesetzt, das über seine 3'-Hydroxylfunktion über einen Spacer (Succinyllinker) an einem festen Träger immobilisiert ist.

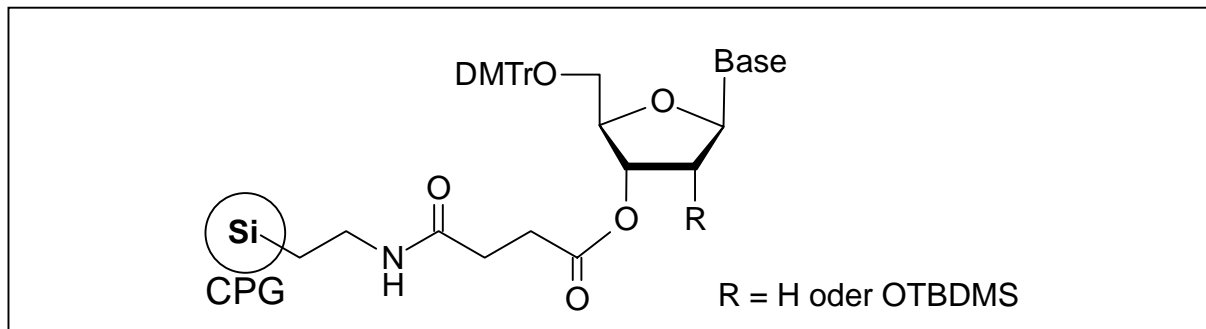


Abb. 6.4 Immobilisiertes Startnucleosid bei der Festphasensynthese

Bei diesem Träger handelt es sich um „controlled pore glass“ (CPG), das eine definierte Porengröße (meist 500 Å oder 1000 Å) besitzt. Es ist chemisch inert und ermöglicht über Aminofunktionen die kovalente Anknüpfung des Startnucleosids (Abb. 6.4)

Die wesentlichen Schritte des repetitiven Synthesesyklus sind:

- Abspaltung der 5'-Dimethoxytritylgruppe mit 3%iger Trichloressigsäure in Dichlormethan
- Aktivierung des zu kuppelnden Monomers mit 1H-Tetrazol
- Kupplung des Amidits (0,1M in Acetonitril)
- Maskierung der noch freien, nicht abreagierten 5'-OH-Funktionen mit Acetanhydrid/2,6-Lutidin/Tetrahydrofuran und 1-Methylimidazol in Tetrahydrofuran (Capping). Dieser Schritt dient der Vermeidung von Fehlsequenzen während der weiteren Synthese
- Oxidation des Phosphits zum Phosphat mit Iod in Wasser/Pyridin/Tetrahydrofuran
- Beginn eines neuen Zyklus

Zwischen den einzelnen Schritten werden Waschschrte mit Acetonitril durchgeführt. Nach der kompletten Synthese wird das Oligonucleotid zum Abspalten vom Träger und zur Entfernung der Basenschutzgruppen mit konz. Ammoniak behandelt. Hierbei variieren Einwirkzeit und Temperatur in Abhängigkeit der vorhandenen Schutzgruppen oder Modifikationen.

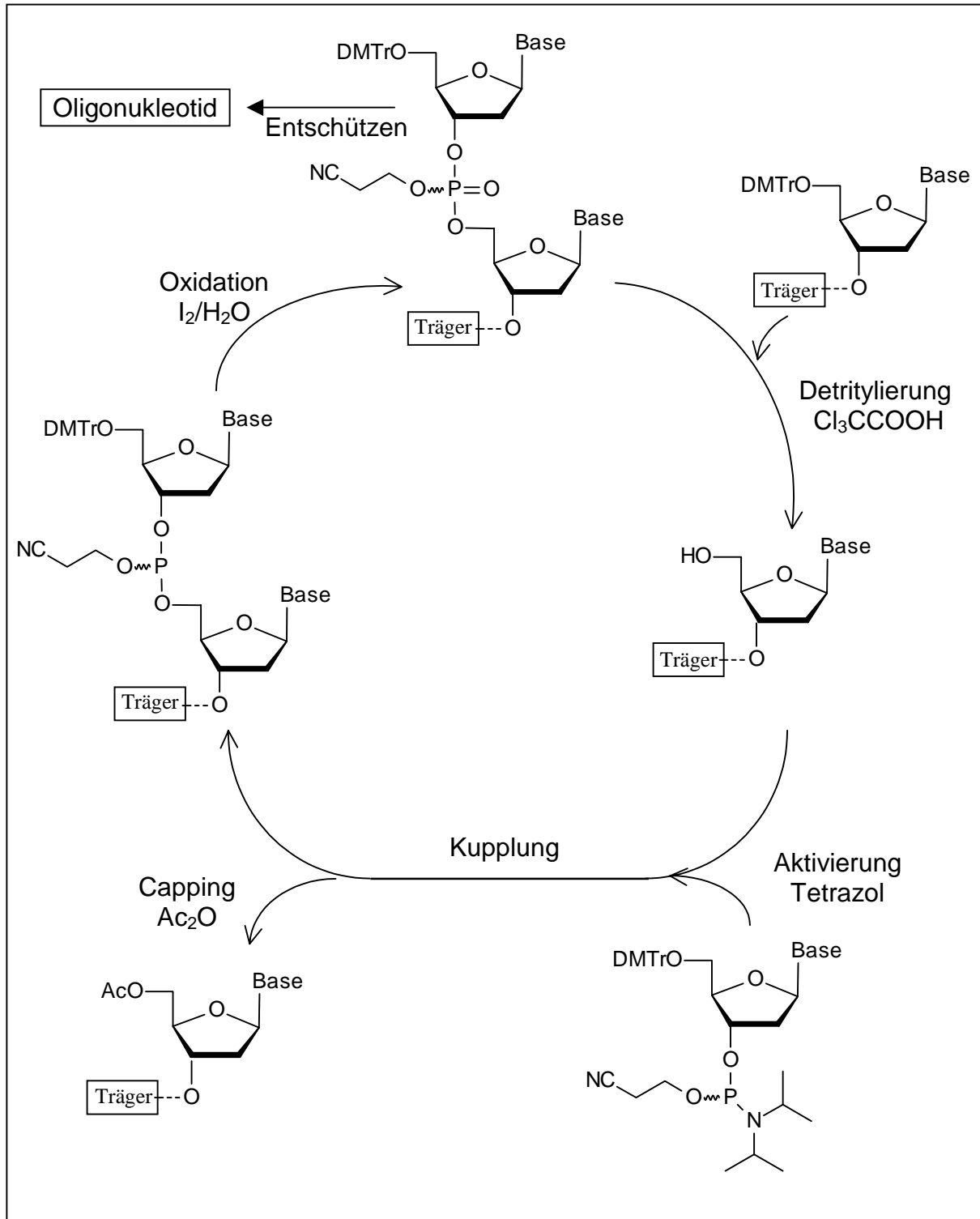


Abb. 6.5 Zyklus der Oligonukleotidfestphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode

6.1.4.1 Basenschutzgruppen

Neben der β -Cyanoethylschutzgruppe für das Phosphoratom müssen auch die exocyclischen Aminofunktionen der Basen geschützt werden. Als Standard haben sich hier die

Benzoylschutzgruppe für Adenin und Cytosin, sowie die Isobutyrylgruppe für Guanosin etabliert. Diese sind bei 55°C in konz. Ammoniak in einem Zeitraum von acht Stunden abspaltbar.

Um die Entschützungszeiten zu verkürzen, kann die von Schulhof eingeführte Phenoxyacetylschutzgruppen (PAC) verwendet werden (Schulhof *et al.*, 1987). Da es bei dieser Schutzgruppe zu Löslichkeitsproblemen vor allem beim Guanosinphosphoramidit kommt, werden die Isopropyl- oder *tert.*-Butylphenoxyacetylschutzgruppen (TAC) eingeführt (Abb. 6.6).

Diese Schutzgruppen können mit konz. Ammoniak innerhalb von 15 Minuten bei 55°C oder innerhalb von zwei Stunden bei Raumtemperatur abgespalten werden (Sinha *et al.*, 1993).

Eine Weiterentwicklung, bei der die Abspaltung vom Träger und das Entschützen der Basenpositionen innerhalb von zehn Minuten möglich sind, ist das „AMA“-Reagenz. Es besteht aus einer Mischung von wässriger Ammoniumhydroxidlösung und Methylamin (1:1). Während Adenin benzoyl- und Guanin isobutyrylgeschützt sein können, muss für dieses Verfahren Cytidin acetylgeschützt sein. Die Abspaltung vom Träger erfolgt in fünf Minuten bei Raumtemperatur, die Abspaltung der Schutzgruppen in weiteren fünf Minuten bei 65°C.

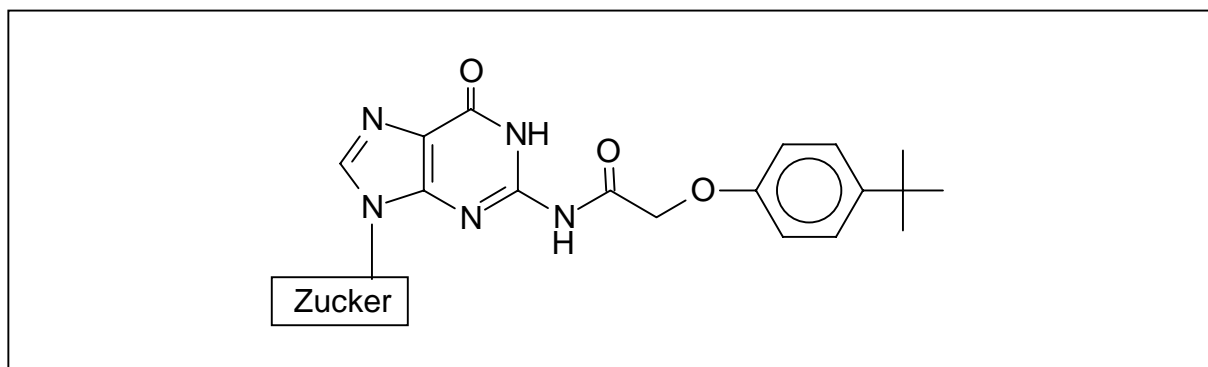


Abb. 6.6 *tert.*-Butylphenoxyacetyl-Schutzgruppe am Guanosin

6.1.4.2 Alternativen zu 1H-Tetrazol

Die Stärke der Phosphoramiditmethode liegt in der effektiven Aktivierung der Monomere durch 1H-Tetrazol, damit diese in möglichst quantitativer Ausbeute mit der freien 5'-OH-Funktion reagieren. Das 1H-Tetrazol protoniert zunächst den Phosphor, um dann nukleophil die Diisopropylgruppe zu substituieren (Abb 6.7). Diese reversible Protonierung und Substitution führt zu einem sehr reaktiven Zwischenprodukt, das eine schnelle und effiziente Kupplung ermöglicht (Dahl *et al.*, 1987).

Durch eine höhere Azidität kann die Protonierung und damit die Aktivierungsgeschwindigkeit verbessert werden. 5-Ethylthio-1H-tetrazol oder 5-Methylthio-1H-tetrazol nutzen diesen Effekt und werden vor allem bei der RNA-Synthese eingesetzt, um die Kupplungsausbeuten zu verbessern. Jedoch werden mit zunehmender Azidität auch immer größere prozentuale Anteile der säurelabilen Dimethoxytritylschutzgruppe abgespalten.

Ein anderer Ansatz neben der Steigerung der Azidität ist die Steigerung der Nukleophilie des Aktivators. Dicyanoimidazol (DCI) weist bei einer geringeren Azidität gegenüber 1H-Tetrazol (pK_a 5,5 gegenüber 4,8) eine deutlich höhere Nukleophilie auf. Aufgrund der dadurch verbesserten Kupplungsausbeuten wird DCI vor allem bei Synthesen sehr langer Oligonukleotide oder bei reduzierten Monomerkonzentrationen eingesetzt. Ein weiterer Vorteil ist die bessere Löslichkeit von DCI gegenüber 1H-Tetrazol. So lässt sich eine höhere Konzentration des Aktivators bei der Kupplung realisieren.

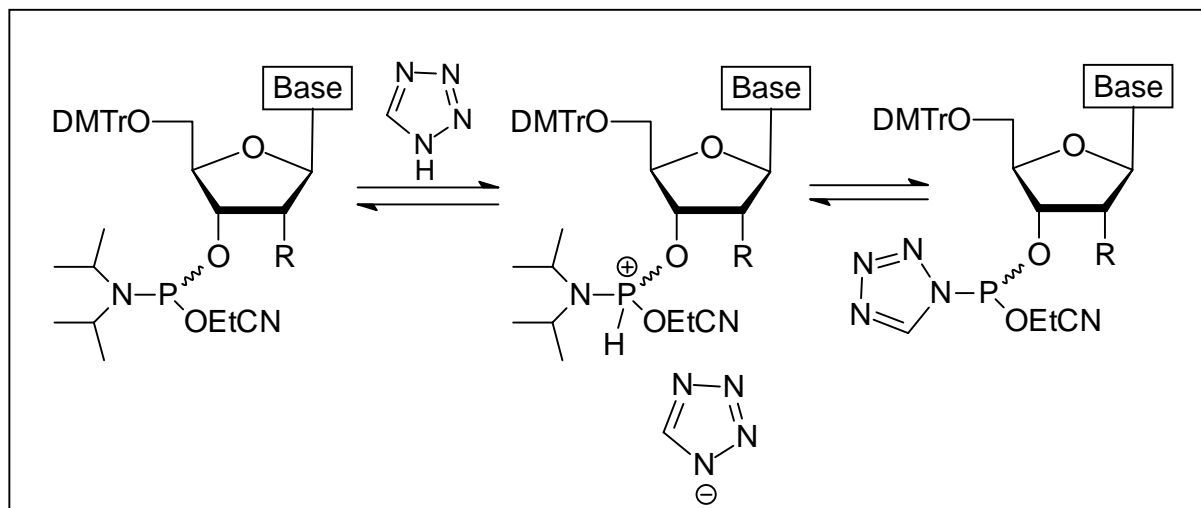


Abb. 6.7 Mechanismus der Aktivierung mit 1H-Tetrazol

6.1.4.3 Unterschiede zwischen DNA- und RNA-Synthese

Bei RNA muss im Gegensatz zu DNA zusätzlich die vorhandene 2'-OH-Funktion geschützt werden. Hierfür sind Silylschutzgruppen geeignet, die bei den Synthesebedingungen stabil sind und erst nach Abspaltung vom Träger und Entschützen der basenlabilen Schutzgruppen mit Fluoridionen abgespalten werden. Als Standardschutzgruppe hat sich die *tert.*-Butyldimethylsilylschutzgruppe etabliert.

Durch den sterischen Anspruch der 2'-Schutzgruppe vermindern sich bei der RNA-Synthese allerdings die Ausbeuten, da der Angriff der 5'-OH-Funktion auf den aktivierten Phosphor erschwert wird. Diesem Problem kann durch die Verwendung effizienterer Aktivatoren (siehe 6.1.4.2) gemindert werden.

1997 ist mit der Triisopropylsilyloxymethylgruppe (TOM) eine neue Schutzgruppe eingeführt worden (Pitsch *et al.*, 1997). Durch den Einbau eines „Spacers“ ist die sterisch anspruchsvolle Triisopropylsilylgruppe von dem Phosphorzentrum weiter entfernt und die Kupplungsausbeuten sind durch einen erleichterten Angriff auf den Phosphor deutlich verbessert (Abb. 6.8). Sie liegen bei 99% und sind somit mit den Ausbeuten bei der DNA-Synthese vergleichbar.

Die Aufarbeitungs- und Entschützungsbedingungen ändern sich durch die TOM-Schutzgruppe nicht.

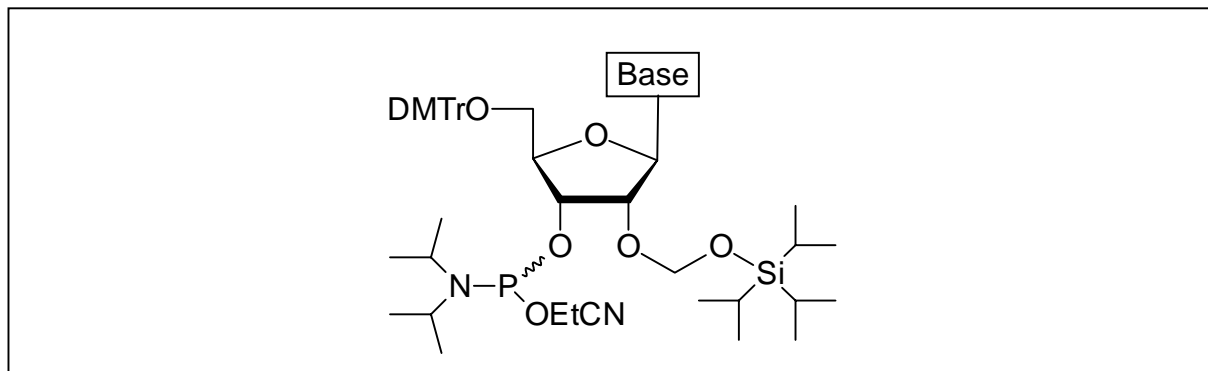


Abb. 6.8 TOM geschütztes Phosphoramidit

6.2 In dieser Arbeit synthetisierte RNA-Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode an Syntheseautomaten der Firma Eppendorf Biotronik (Modell D300+) und PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) hergestellt. Als Trägermaterial wurde CPG-Träger mit einer Porengröße von 500 Å in einem Maßstab von 1 µmol eingesetzt.

Die Standardnucleosidphosphoramidite und Synthesereagenzien (siehe Chemikalienliste) sind kommerziell erhältlich. Als Aktivator wurde Dicyanoimidazol eingesetzt. Die Kupplungszeiten lagen bei 10 min pro Amidit. Die genauen Protokolle sind im Anhang beschrieben.

Abbildung 6.9 zeigt die modifizierten Phosphoramidite und deren Kurzbezeichnungen. Der Index „F“ steht für die Fluorsubstitution an der 2'-Position, die Hoch- oder Tiefstellung gibt jeweils die *arabino*- oder *ribo*-Stellung an. Zum Einbau dieser modifizierten Nucleotidbausteine konnten ebenfalls die Standardprotokolle verwandt werden. Während die Bausteine **22a/b** (U^F), **23a/b** (C^F) und **26a/b** (dU) im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert worden sind, ist der Baustein **27a/b** (U^F) von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Victor Marquez

und der Baustein **28a/b** von Dipl. Chem. Jörg Parsch zur Verfügung gestellt worden. Tabelle 6.1 zeigt die dargestellten Oligonukleotide und deren Bezeichnungen.

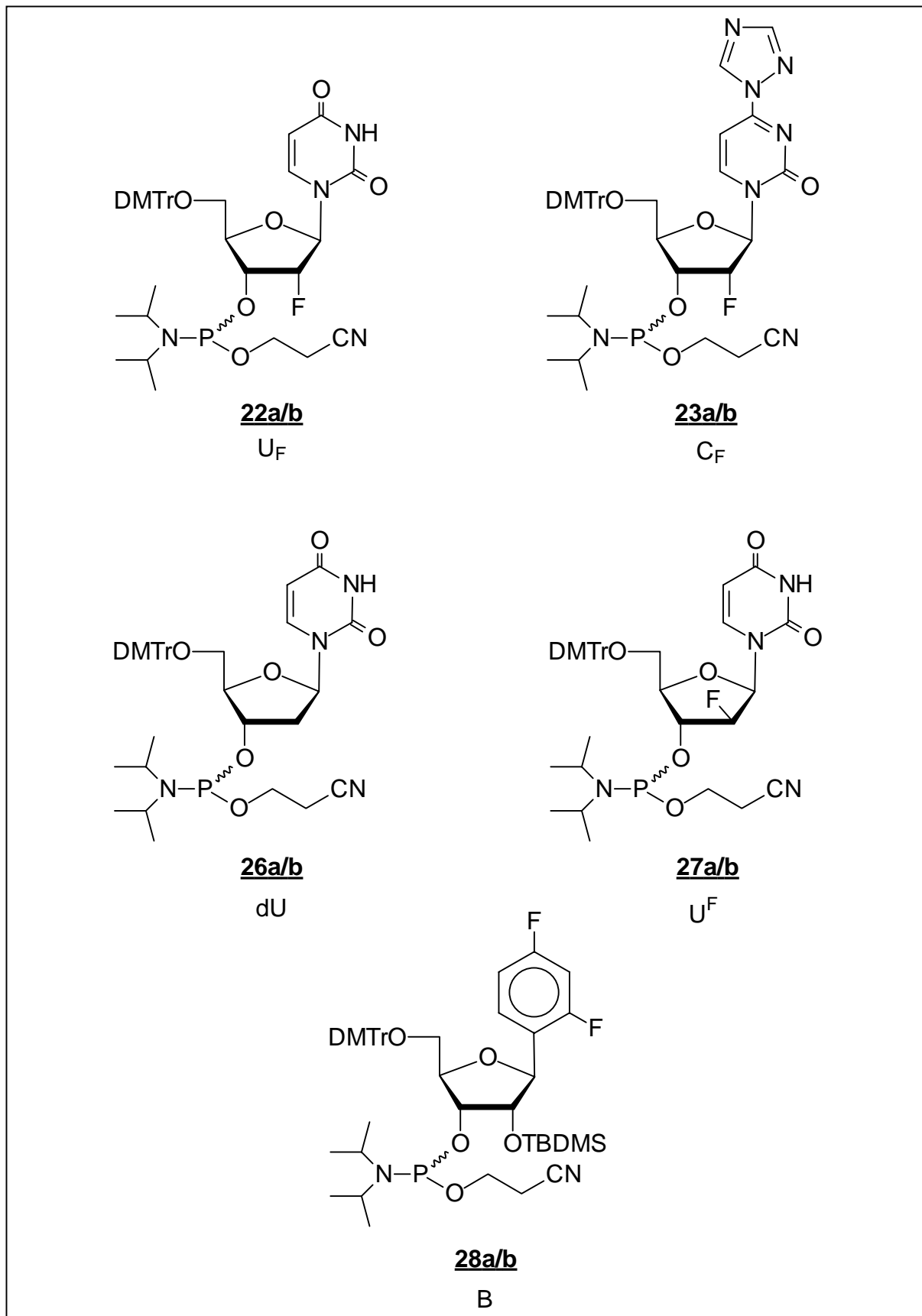


Abb. 6.9 Modifizierte Bausteine für die RNA-Synthese mit Kurzbezeichnungen

Abkürzung	Sequenz 5' → 3' RNA 10mer	Berechnete Masse [Da]	Gefundene Masse [Da] (MALDI)
HP1	CGC-UUCG-GCG	3151,95	3152,56
HP2 *	CGC-U _F UCG-GCG	3153,94	3150,20
HP3 *	CGC-UU _F CG-GCG	3153,94	3152,77
HP4 *	CGC-UUC _F G-GCG	3153,94	3153,59
HP5 *	CGC-U _F U _F CG-GCG	3155,93	3154,08
HP6 *	CGC-U _F UC _F G-GCG	3155,93	3155,82
HP7 *	CGC-UU _F C _F G-GCG	3155,93	3153,96
HP8 *	CGC-U _F U _F C _F G-GCG	3157,92	3156,48
HP9	CGC-U ^F UCG-GCG	3153,94	3165,91
HP10	CGC-UU ^F CG-GCG	3153,94	3153,01
HP11	CGC-U ^F U ^F CG-GCG	3155,93	3157,83
HP12	CGC-U ^F UC _F G-GCG	3155,93	3162,12 (Li-Add.)
HP13	CGC-UU ^F C _F G-GCG	3155,93	3154,16
HP14	CGC-dUUCG-GCG	3134,94	3134,00
HP15	CGC-UdUCG-GCG	3134,94	3134,32
HP16	C _F GC-UUCG-GCG	3153,94	3156,21
HP17	CGC _F -UUCG-GCG	3153,94	3154,79
HP18	CGC-UUCG-GC _F G	3153,94	3150,92
HP19	C _F GC-UUCG-GC _F G	3155,93	3154,08
HP20	C _F GC _F -UUCG-GC _F G	3157,92	3158,99
HP21	C _F GC _F -U _F U _F C _F G-GC _F G	3163,89	3161,65
HP22	CGC-BUCG-GCG	3155,93	3154,08
HP23	CGC-UBCG-GCG	3153,94	3153,40
HP24	CGC-BBCG-GCG	3153,94	3161,81 (Li-Add.)

Tabelle 6.1 Übersicht über die synthetisierten Oligonukleotide sowie deren berechnete und gefundenen Massen. (*) Zu den Daten siehe Strube, 1997.

6.2.1. Entschützung

Die Abspaltung der Oligonukleotide vom Träger erfolgte durch Behandlung mit 32%igen Ammoniak bei 55°C über Nacht. Zum Abtrennen des CPG-Trägers wurde über einen Sterilfilter mit Zelluloseacetatmembran (Nalgene 0,2 µm) abfiltriert und die verbliebene Lösung bis zur Trockne an einem Speed-Vac Konzentrator evaporiert.

Die Abspaltung der noch verbliebenen Silylschutzgruppen an der RNA erfolgte mit 1 ml Triethylamin Trihydrofluorid in 24 Stunden bei Raumtemperatur (Westmann, 1994). Nach der Einwirkzeit wurde die Lösung mit 3 ml vorgekühltem *n*-Butanol versetzt und vier Stunden bei -20°C stehen gelassen.

Das gewünschte Oligonukleotid sowie Abbruchsequenzen fielen dabei schlierenartig als weißer Feststoff aus. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 10.000 rpm innerhalb von zehn Minuten pelletiert und der Überstand abdekantiert. Zu dem Pellet wurden 500 µl Ethanol gegeben und bis zur Trockene evaporiert, um vorhandene Butanolreste zu entfernen.

6.3 Aufreinigung der RNA-Oligonukleotide

6.3.1 Anionenaustausch-HPLC

Zur Aufreinigung der Roh-RNA stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung. Zum einen ist es möglich, das gewünschte Nukleotid durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von den Abbruchsequenzen zu trennen. Die Separation erfolgt hierbei durch Ladungsdifferenzen. Diese Technik ist allerdings zeitaufwendig und bringt den Nachteil einer aufwendigen Reisolierung aus dem Gel. Während diese Methode vor allem für längere Nukleotide (>30) verwendet wird, hat sich für kürzere Stränge die Anionenaustausch-HPLC etabliert. Da es sich bei den in dieser Arbeit synthetisierten Strängen um 10mere handelt, hat diese Methode Anwendung gefunden.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) hat sich als geeignet erwiesen, um Oligonukleotide in höchster Reinheit zu erhalten. Die Anionenaustausch-HPLC („anion exchange“) trennt nach Ladungsunterschieden. Die negativen Ladungen des

Phosphatrückgrates treten in Wechselwirkungen mit den an der stationären Phase immobilisierten kationischen Gruppen.

Die gebundenen Oligonukleotide werden dann bei steigender Ionenkonzentration des Laufmittels von der Säule eluiert. Da das gewünschte Oligonukleotid die meisten Ladungen trägt, eluiert es als letzte Fraktion von der Säule. Die Detektion erfolgt mittels einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm (Abbildung 6.10).

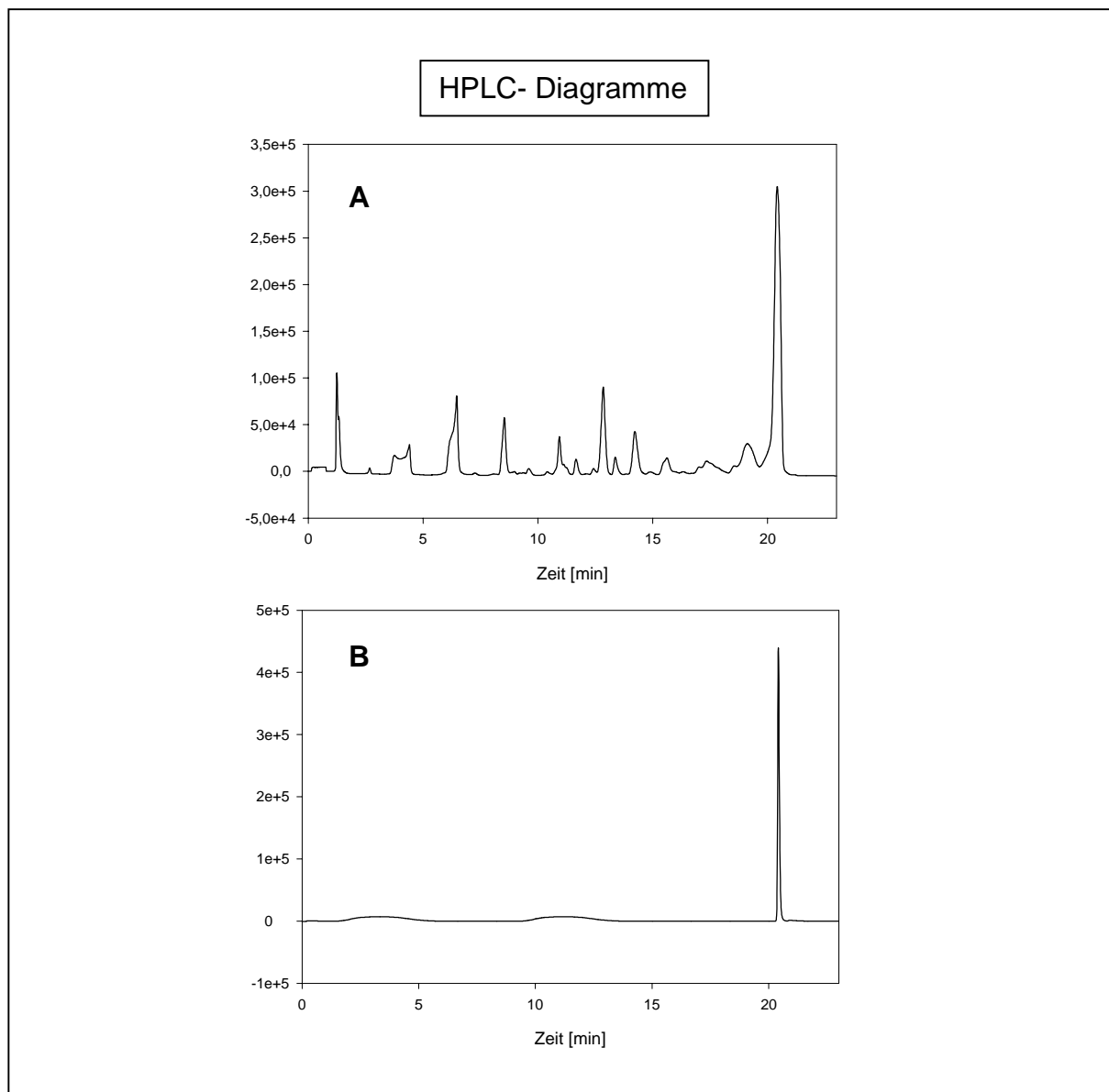


Abb. 6.10 HPLC-Läufe von CGC-UUCG-GCG. A) Präparativer Lauf B) Analytischer Lauf nach der Aufreinigung

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide wurden im „Trityl off“-Modus synthetisiert. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Tritylgruppe unter den Bedingungen der 2'-TBDMS-Entschützung teilweise abgespalten werden kann. Die Aufreinigung erfolgte an

einer HPLC-Anlage der Firma Jasco, die vorher sterilisiert worden war. Details zu der HPLC-Aufreinigung sind in Kapitel **XX** beschrieben.

6.3.2 Entsalzen

Nach der Anionenaustausch-HPLC Aufreinigung sind die Oligonukleotide mit großen Mengen Salz verunreinigt. Zur Entsalzung wird eine Gelfiltration durchgeführt. Deren Prinzip beruht auf der größenabhängigen Diffusion der Probenmoleküle in den Poren der stationären Phase.

Die polymeren Trennmaterialien besitzen mikroskopische Poren, in welche die Salzteilchen hinein diffundieren, während die großen Oligonukleotidmoleküle ausgeschlossen bleiben und somit rasch eluiert werden. Für die Entsalzung wurden kommerziell erhältliche fertig gepackte Sephadex-Säulen mit G25-Material der Firma Pharmacia eingesetzt.

6.4 Quantifizierung der Oligonukleotide

Nach erfolgreicher Aufreinigung wird die Menge des erhaltenen Oligonukleotids durch UV-Spektroskopie bestimmt. Durch Bestimmung der Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm erhält man den sogenannten OD_{260} -Wert (optical density). Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann man bei bekanntem Extinktionskoeffizienten die Konzentration der Probe bestimmen.

6.4.1 Berechnung der Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der synthetisierten Oligonukleotide wurde eine von Gray beschriebene Methode angewandt (Gray *et al.*, 1995).

Dabei werden neben der jeweiligen Häufigkeit der Basen auch die Wechselwirkungen der Chromophore mit ihrem nächsten Nachbarn berücksichtigt. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 6.2 angegeben.

Mit Hilfe dieser Koeffizienten kann der molare Extinktionskoeffizient ϵ [$10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$] nach folgender Formel berechnet werden (Gl. [6.1]):

$$[6.1] \quad \epsilon (\text{ACGU...}) = 2 [\epsilon (\text{AC}) + \epsilon (\text{CG}) + \epsilon (\text{GU}) + \dots] - [\epsilon (\text{C}) + \epsilon (\text{G}) + \epsilon (\text{U}) + \dots]$$

Dabei werden die beiden terminalen Basen in der Summe der spezifischen Extinktionskoeffizienten nicht berücksichtigt.

Da die Extinktionskoeffizienten für die fluormodifizierten Bausteine nicht bekannt sind, wurden jeweils die Werte für die nicht fluorinierten Uridin- oder Cytidinaloga eingesetzt. Für 2'-Desoxyuridin wurde der Wert von Uridin eingesetzt.

Baustein	RNA	DNA	Baustein	RNA	DNA
A	15,34	15,34	CG	9,39	9,39
C	7,6	7,6	CU(CT)	8,37	7,66
G	12,16	12,16	GA	12,98	12,92
U(T)	10,21	8,7	GC	9,19	9,19
AA	13,56	13,56	GG	11,43	11,43
AC	10,67	10,67	GU(GT)	10,96	10,22
AG	12,79	12,79	UA(TA)	12,52	11,78
AU(AT)	12,14	11,42	UC(TC)	8,9	8,15
CA	10,67	10,67	UG(TG)	10,4	9,7
CC	7,52	7,52	UU(TT)	10,11	8,61

Tabelle 6.2 Koeffizienten zur Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten

Mit Hilfe der berechneten molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich nun die Konzentration einer Oligonukleotidlösung mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes bestimmen, wobei c die Konzentration in mol/l und d die Schichtdicke der Küvette darstellt (Gl. [6.2 und 6.3]):

$$[6.2] \quad \text{OD}_{260} = e \cdot c \cdot d$$

$$[6.3] \quad c = \text{OD}_{260} / e \cdot d$$

6.5 Charakterisierung der Oligonukleotide

Während die Retentionszeiten einer HPLC-Analyse schon einen gewissen Hinweis auf die Identität eines Oligonukleotids geben können, wird zur sicheren Charakterisierung die Massenspektrometrie eingesetzt.

Elektrospray-Ionisations- (ESI) und matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisations- (matrix-assisted laser desorption/ionisation, MALDI) Massenspektrometrie ermöglichen die Massenbestimmung der Oligonukleotide mit hoher Empfindlichkeit ohne sie zu fragmentieren.

- Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Bei dieser Methode wird die Probe angelöst und durch eine Stahlkapillare geleitet, an die eine elektrische Spannung angelegt ist. An der Spitze wird diese bei Atmosphärendruck durch das starke elektrische Feld zerstäubt und ionisiert. Durch einen Gasstrom werden anhaftende Lösungsmittelmoleküle entfernt. Danach werden die Ionen aus der Atmosphärendruckquelle in das Hochvakuum des Massenspektrometers extrahiert.

Ein Problem bei dieser Methode ist die Anwesenheit von Salzen, vor allem Natrium. Dieses bildet Addukte mit dem negativ geladenen Rückgrat und stört darüber hinaus den Ionisationsprozess. Dieses Problem lässt sich durch den Austausch von Natriumionen gegen Ammoniumionen lösen, die durch Dissoziation im Hochvakuum nicht mehr als Addukte im Detektor auftreten.

- Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Diese Methode ist durch eine sehr schonende Ionisation charakterisiert, die selbst sehr empfindliche oder instabile Moleküle ohne Fragmentierung detektierbar macht (Karas & Hillenkamp, 1988; Tanaka *et al.*, 1988). Die Probe wird hierbei mit einer Matrix kokristallisiert und schließlich mit einem Laserpuls im Hochvakuum des Spektrometers beschossen. Zunächst werden dabei die Matrixmoleküle angeregt. Mit der absorbierten Lichtenergie verdampfen und ionisieren sie dabei die Probenmoleküle.

Die gepulste Desorptions-/Ionisationsmethode wird gewöhnlich mit einem Flugzeitmassenspektrometer (engl.: Time of flight, TOF) kombiniert, welches die Ionen in

einem elektrischen Feld beschleunigt und dann gemäß ihres Masse-/Ladungsverhältnisses zeitlich auftrennt.

Die MALDI-Methode ist im Vergleich zur ESI-Massenspektrometrie weniger empfindlich gegenüber Salzkontaminationen in der Probe.

In dieser Arbeit wurden die RNA-Oligonukleotide ausschließlich mittels MALDI/TOF-Massenspektrometrie bestimmt (Nordhoff *et al.*, 1993). Abbildung 6.11 zeigt ein typisches MALDI-Spektrum.

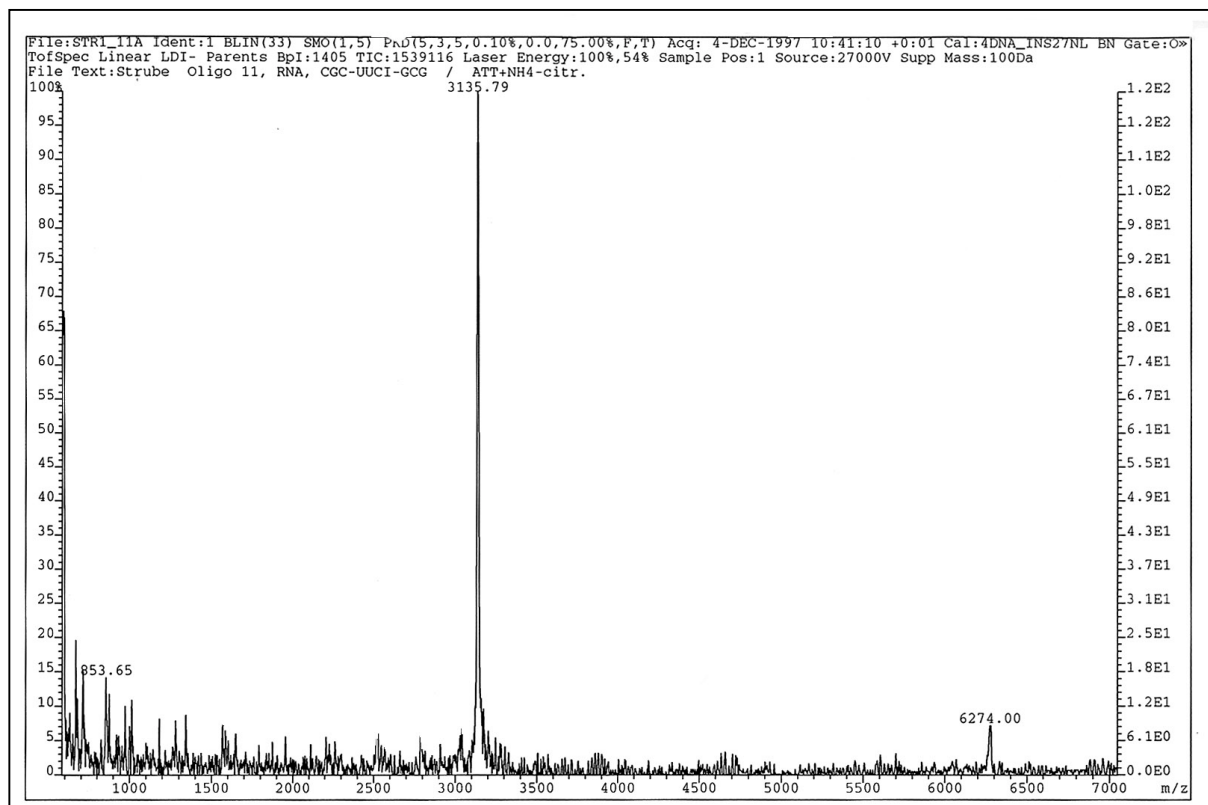


Abb. 6.11 MALDI-Spektrum einer Sequenz 5'-CGC-dUUCG-GCG, Berechnete Masse: 3134,94; gefundene Masse 3135,79. Neben dem Hauptpeak ist auch die doppelt geladene Spezies zu sehen.

7 Thermodynamische und spektroskopische Untersuchung von UUCG-Tetraloops

7.1 UV-Spektroskopie

Nukleoside, Nukleotide und Oligonukleotide weisen charakteristische UV-Absorptionsspektren auf. Bei Nukleinsäuren resultieren die Absorptionscharakteristika aus der starken UV-Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen mit einem Maximum um 260 nm. Das genaue Absorptionsmaximum und dessen Intensität sind vor allem von folgenden Faktoren abhängig:

- Basenzusammensetzung
- Basensequenz
- Dreidimensionale Struktur
- Salzkonzentration
- pH-Wert

Eine wichtige Eigenschaft ist die Abnahme des Extinktionskoeffizienten ϵ des Oligonukleotids durch Basenstapelungswechselwirkungen. Dieser als Hypochromizität bezeichnete Effekt, beruht auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der einzelnen benachbarten Basen und ist somit stark von der dreidimensionalen Struktur des Oligonukleotids abhängig. In helicalen Oligonukleotiden beträgt die Hypochromizität gewöhnlich 20-30%. Das genaue Ausmaß der Hypochromizität ist wellenlängenabhängig. Für A•T-Basenpaare liegt das Hypochromizitätsmaximum um 260 nm, für G•C-Basenpaare um 276 nm.

Auf der Basis der Hypochromizität lassen sich temperaturabhängige Schmelzkurven von Oligonukleotiden bestimmen. Beim langsamen Erwärmen einer geordneten Nukleinsäurestruktur, wie zum Beispiel einem Duplex, Triplex oder einer Haarnadelschleife, geht diese langsam in einen ungeordneten Zustand (random coil) über. Durch das damit verbundene Aufbrechen der Basenstapelungswechselwirkungen erhöht sich die Extinktion. Dieses ist genau der gegenteilige Effekt der Hypochromizität und wird als Hyperchromizität bezeichnet. Eine Schmelzkurve ergibt sich durch das Auftragen der Extinktion als Funktion

der Temperatur (Puglisi & Tinoco, 1989). Die Kurve weist einen sigmoidalen Verlauf auf. Am Wendepunkt dieser Kurve liegen gerade die Hälfte der Moleküle im ungeordneten Zustand vor (Abbildung 7.1). Den zugehörigen Temperaturwert bezeichnet man als Schmelzpunkt, den sogenannten T_m -Wert. Dieser Wert ist abhängig von der Basenzusammensetzung, der Anzahl und Art der Basenpaarungen, von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung.

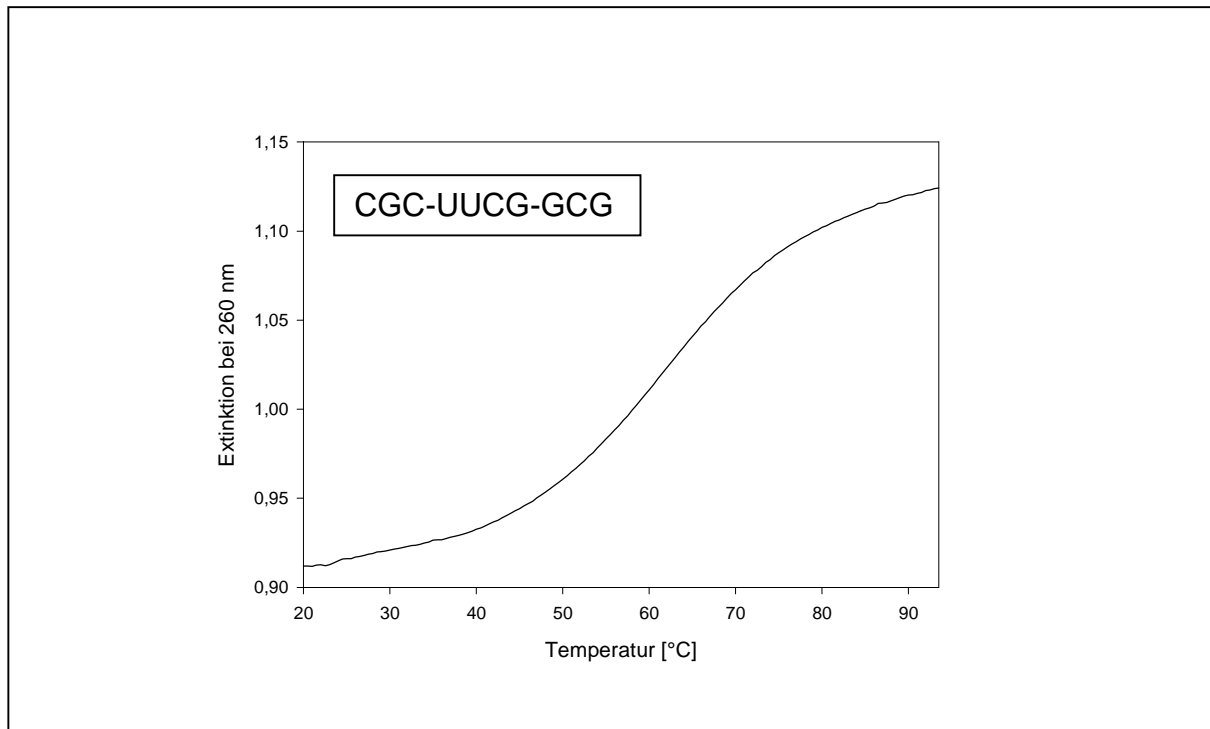


Abb. 7.1 UV-Schmelzkurve einer unmodifizierten UUCG-Schleife mit typisch sigmoidalen Verlauf. Die Hypochromizität beträgt etwa 20%.

Charakteristisch für das Schmelzen von Nukleinsäurestrukturen ist die Kooperativität des Prozesses (Sanger, 1984). Unter Kooperativität versteht man den Einfluss eines Nukleotids auf die Konformation seiner Nachbarn. Wird beim Übergang von einem geordneten in einen ungeordneten Zustand ein Basenpaar gelöst, so erzwingt diese Auflösung auch die schnelle Lösung weiterer Basenpaare in der Umgebung. So läuft eine Denaturierung häufig ausgehend vom Strangende oder A•T-reichen Sequenzen meist sehr schnell entlang der gepaarten Bereiche eines Oligonukleotids. Dieser mit dem Aufziehen eines Reißverschlusses vergleichbarer Prozess führt dazu, dass kurze Nukleotide entweder nur geordnet oder ungeordnet vorliegen, Zwischenstufen nur selten anzutreffen sind. Gerade dieses „Alles oder Nichts“-Modell ist Basis dafür, dass aus den gewonnenen Schmelzkurven neben dem Schmelzpunkt T_m auch thermodynamische Daten wie ΔH^0 , ΔS^0 und ΔG^0 bestimmt werden

können. Diese Parameter können nur unter der Bedingung vollständiger Kooperativität und einer Messung im thermischen Gleichgewicht aussagefähig bestimmt werden.

7.1.1 Aufnahme von Schmelzkurven

Die Schmelzkurven wurden bei 260 und 274 nm an einem Zweistrahl UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit thermostatisierbarem Küvettenhalter aufgenommen. Die Messküvette hatte eine Schichtdicke von 10 mm. Als Puffer diente ein 10mM Phosphatpuffer mit 140mM Natriumchlorid und einem pH-Wert von 7. Von jedem Olligonukleotid wurden abhängig vom jeweiligen Extinktionskoeffizienten ca. 0,8 bis 1,0 OD₂₆₀-Einheiten in einem Milliliter des Puffers gelöst, was einer Konzentration von 10 µmol/l entspricht. Nach einer Denaturierungsrampe, bei der das Oligonukleotid 5 Minuten bei 85°C denaturiert wird, wurden die Proben nach langsamen Abkühlen noch 10 min bei einer vorgegebenen Starttemperatur gekühlt. Je nach Oligonukleotid folgten die Messungen in einem Temperaturbereich von 20°-85°C. Als Aufheizrate wurde 0,5°C/min gewählt, um zu gewährleisten, dass die Messung im thermodynamischen Gleichgewicht stattfindet.

7.1.2 Auswertung von Schmelzkurven

Zur Auswertung von Schmelzkurven ist die Molekularität des Übergangs sowie die Zusammensetzung der untersuchten Oligonukleotide von grundlegender Bedeutung.

Während der Übergang bei Duplices, bei denen zwei komplementäre Stränge interagieren, biomolekularer Natur ist, ist das Aufschmelzen selbstkomplementärer Bereiche einer Haarnadelschleife ein unimolekularer Prozess. Dieser ist im Gegensatz zu den bi- oder höhermolekularen Prozessen nicht von der Konzentration abhängig.

Unter der Voraussetzung, dass die Basislinien der gemessenen sigmoidalen Kurve eine Steigung von null besitzen und die Kurve symmetrisch ist, entspricht der Wendepunkt dem Schmelzpunkt.

In der Praxis jedoch beobachtet man bei den Schmelzkurven der untersuchten Haarnadelschleifen einen frühen Anstieg der Basislinien, resultierend aus den Basenwechselwirkungen des einzelsträngigen Schleifenbereichs und der Abhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von der Temperatur.

Für die Auswertung ist es daher notwendig, die gemessenen Extinktionswerte unter Annahme eines linearen Anstiegs der Basislinien am oberen und unteren Bereich zu korrigieren (Gl. [7.1] und [7.2]). Dabei stehen $OD_{20}(T)$ und $OD_{85}(T)$ für die korrigierten Extinktionswerte, T für die Temperatur und a und b jeweils für die Steigung der unteren und oberen Basislinie (Abbildung 7.2).

$$[7.1] \quad OD_{20}(T) = OD_{20}^0 + a \cdot T$$

$$[7.2] \quad OD_{85}(T) = OD_{85}^0 + b \cdot T$$

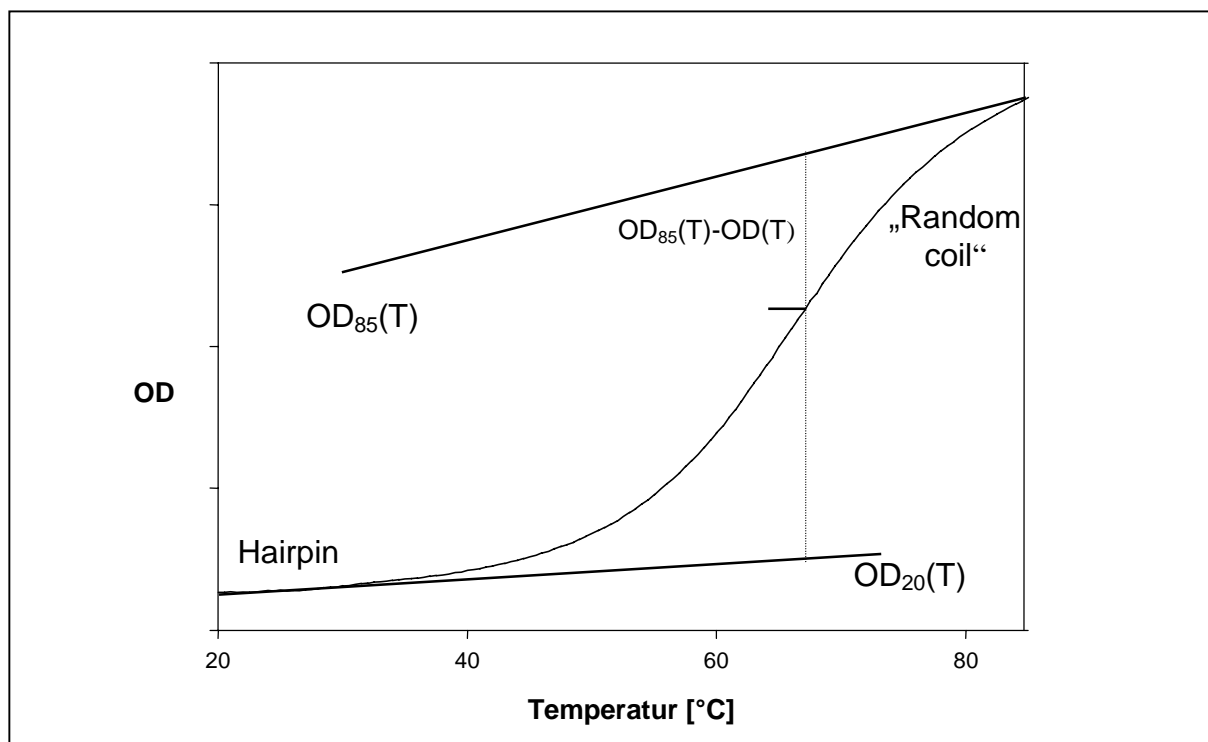


Abb. 7.2 Allgemeine Darstellung einer Schmelzkurve einer Haarnadelschleife (Hairpin)

Zur Bestimmung des Schmelzpunktes betrachtet man den Schmelzvorgang als ein Zwei-Zustands-Modell, in dem die geordnete und die ungeordnete Struktur in einem Gleichgewicht ohne populierte Zwischenstufen stehen (Marky & Breslauer, 1987).

Dies ist zulässig, da die UUCG-Haarnadelschleifen sehr stabile und nicht komplexe Strukturen darstellen. Es wird ein Wert α definiert (Gl. [7.3]), der dem Anteil der im geordneten Zustand vorliegenden Moleküle entspricht.

$$[7.3] \quad \alpha = \frac{[\text{Oligonukleotide im geordneten Zustand}]}{[\text{Gesamtmenge an Oligonucleotiden}]} = \frac{\text{OD}_{85}(\text{T}) - \text{OD}(\text{T})}{\text{OD}_{85}(\text{T}) - \text{OD}_{20}(\text{T})}$$

Am Schmelzpunkt liegen die Hälfte der Moleküle ($\alpha = 0,5$) im ungeordneten Zustand vor.

Die Gleichgewichtskonstante K für die Assoziation von n selbstkomplementären Molekülen kann unter der Annahme des Zweizustandsmodells in Werten von α mit folgender Formel ermittelt werden (Schweitzer, 1994):

$$nA \rightleftharpoons A_n$$

$$[7.4] \quad K = \frac{[A_n]}{[A]^n} = \frac{\alpha \cdot (C_T/n)}{[1-\alpha] \cdot C_T^n} = \frac{\alpha}{n \cdot C_T^{n-1} \cdot (1-\alpha)^n}$$

Dabei entspricht C_T der Gesamtkonzentration der Oligonukleotide und n steht für die Molekularität des Übergangs. Der Ausdruck für die Gleichgewichtskonstante am Schmelzpunkt ($\alpha = 0,5$) lautet (Gl. [7.5]):

$$[7.5] \quad K_{T_m} = \frac{1/2}{n \cdot (C_T^{n-1}) \cdot (1/2)^n} = \frac{1}{n \cdot (C_T/2)^{n-1}}$$

Da die Denaturierung einer Haarnadelschleife einer unimolekularen Reaktion ($n=1$) entspricht, ist die Gleichgewichtskonstante am Schmelzpunkt unabhängig von der Oligonukleotidkonzentration und somit gleich eins zu setzen.

Mit Hilfe der van't Hoff Gleichung und der Kenntnis der Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der Temperatur lässt sich die Schmelzenthalpie wie folgt bestimmen (Gl. [7.6])

$$[7.6] \quad \Delta H_0 = RT^2 \cdot \frac{\partial \ln K}{\partial t}$$

Das Ersetzen von K durch den Ausdruck [7.4] und Differentiation erhält man für $T=T_m$ folgendem Ausdruck für ΔH^0 (Gl. [7.7]):

$$[7.7] \quad \Delta H^0 = (2+2n) \cdot RT_m^2 \cdot \left[\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right]_{T=T_m}$$

Für einen unimolekularen Übergang ($n=1$) ergibt sich daraus (Gl. [7.8]):

$$[7.8] \quad \Delta H^0 = 4 \cdot RT_m^2 \cdot \left[\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right]_{T=T_m}$$

Der Term $(\partial a/\partial T)_{T=T_m}$ entspricht der Steigung am Schmelzpunkt der in Abbildung 7.3 dargestellten transformierten Kurve.

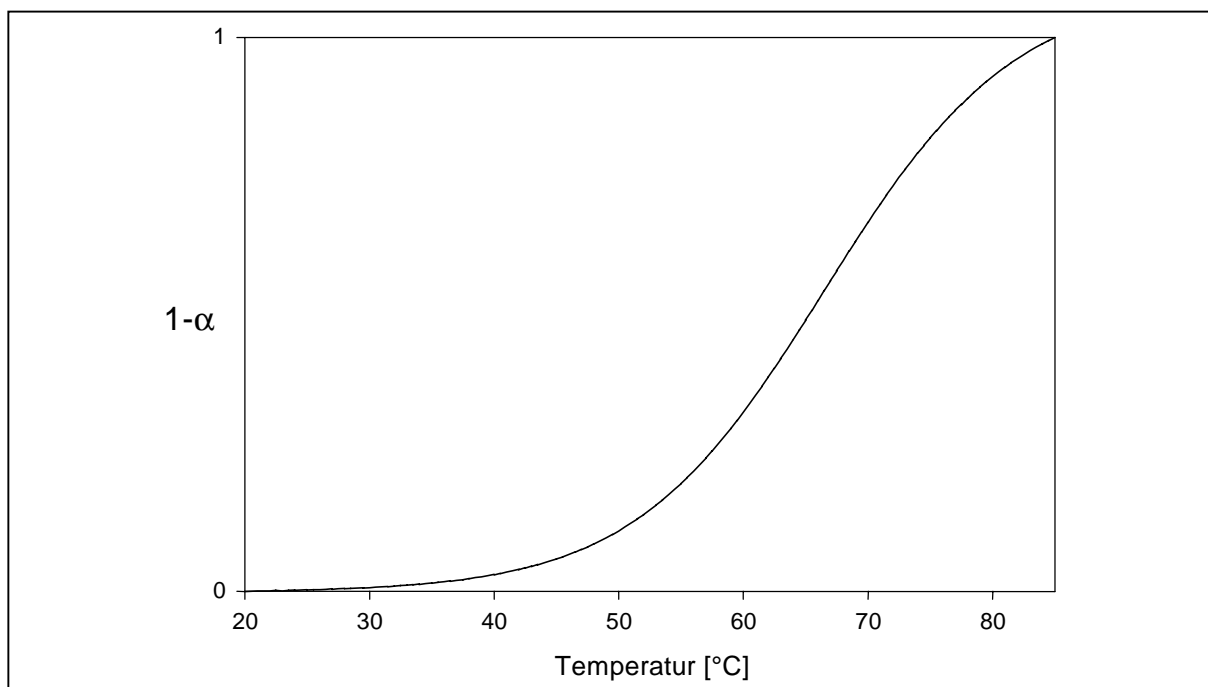


Abb. 7.3 Transformierte $(1-\alpha)$ -Kurve

Mit dem berechneten ΔH^0 -Wert aus Gleichung [7.8] lässt sich dann aus Gleichung [7.9] die Entropie ΔS^0 am Schmelzpunkt bestimmen.

$$[7.9] \quad \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Für $\Delta G^0=0$ und $T=T_m$ erhält man daraus folgenden Ausdruck:

$$[7.10] \quad \Delta S^0 = \Delta H^0 / T_m$$

In dieser Arbeit wurden die experimentell ermittelten Kurven computergestützt mit Hilfe eines geeigneten Algorithmus ausgewertet. Dabei werden sechs Parameter gefittet, der T_m -Wert, ΔH^0 , sowie die Steigung und der OD-Wert der oberen und unteren Basislinie. Dazu wird ein Algorithmus des Kalkulationsprogramm SigmaPlot® (Jandel Corporation) verwendet, das eine nicht lineare Regression auf der Grundlage des Marquardt-Levenberg Algorithmus durchführt.

Dabei werden Werte für die Parameter gesucht, die die Summe der Fehlerquadrate im Vergleich gemessener und berechneter Werte minimieren. Der Prozess ist iterativ. Bei den gemessenen Schmelzkurven haben sich die sechs Parameter sehr gut an die experimentelle Kurve fitten lassen.

Abbildung 7.1 zeigt deutlich, dass besonders die Anpassung der oberen Basislinie im Bereich von 85°C problematisch ist, was zu Fehlern bei der Bestimmung der thermodynamischen Parameter führen kann. Aufgrund dieser Tatsache erfolgten die computergestützten Auswertungen ohne Berücksichtigung der Basislinienanpassung im oberen Temperaturbereich.

Nach Puglisi ist eine schlechte Anpassung der Basislinien die größte Fehlerquelle bei der Bestimmung der thermodynamischen Parameter (Puglisi, 1989). Aufgrund der problematischen Basislinienanpassung und der vergleichsweise flachen Kurven einiger modifizierter UUCG-Haarnadelschlaufen sind die ermittelten thermodynamischen Daten mit großen Fehlern behaftet.

Ferner sollten die Annahmen, die bei der Bestimmung thermodynamischer Daten gemacht werden, stets im Auge behalten werden. Zum einen wird ein Zwei-Zustands-Modell, zum anderen die Temperaturunabhängigkeit von ΔH^0 und ΔS^0 vorausgesetzt. Die erhaltenen Werte sind auch nur für das angegebene Puffersystem gültig.

Trotzdem hat sich gezeigt, dass die quantitative Auswertung durchaus aussagefähige thermodynamische Daten liefern kann. Übersichten über die Auswertung von UV-Schmelzkurven geben Marky & Breslauer, 1987; Puglisi & Tinoco, 1989 sowie Parsch, 1999.

7.2 Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen an UUCG-Tetraloops

7.2.1 Konzeption

In vielen RNA-Molekülen, vor allem in der rRNA finden sich sehr häufig Haarnadelschlaufen, die vier Basen in der Schlaufenregion (Loopbereich), sogenannte „Tetraloops“ (Gutell *et al.*, 1985, Konnings & Gutell, 1995) enthalten. Von diesen Tetraloops gibt es 256 Typen, wobei die Tetraloops der UNCG- und GNRA-Familie (mit N=U, C, G, A und R=G, A) mit 70% am häufigsten auftreten (Uhlenbeck, 1990; Wolters, 1992).

Zu den stabilsten Tetraloops gehört der UUCG-Tetraloop, der über einen ungewöhnlich hohen Schmelzpunkt verfügt. Die hohe Stabilität lässt sich durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren erklären:

- Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Loopregion wirken stark stabilisierend. Hierbei scheint besonders die 2'-OH Funktion der Ribose als Wasserstoffbrückendonator einen wichtigen Beitrag zu leisten.
- Einzelne Basen interagieren über Basenstapelungswechselwirkungen miteinander.
- Die für die Stabilität synergetisch nahezu optimale Ausnutzung der Wasserstoffbrückenbindung auf der einen und Basenstapelungswechselwirkung auf der anderen Seite wird durch die dreidimensionale Struktur vorgegeben. Diese resultiert aus der Abfolge der Basen, der Konformation der Riboseeinheiten (*C3'-endo/C2'-endo*) und der Orientierung der Nukleobasen über die glykosidische Bindung (*syn/anti*).

Mit den in dieser Arbeit an einzelnen Positionen selektiv eingebauten Bausteinen können die einzelnen Beiträge für die Stabilisierung dieser Loopstruktur untersucht werden. Die 2'-OH-Funktion der fluorierten Pyrimidin-Bausteine **22a/b** und **23a/b** (Abb. 6.9) kann im Gegensatz zu den nicht fluorierten Bausteinen nicht mehr als Wasserstoffbrückendonator fungieren. Gleichzeitig wird durch die Fluorierung das *C3'-endo/C2'-endo* Gleichgewicht der Ribose verändert. Während dieses Verhältnis bei Anwesenheit einer 2'-OH-Funktion bei 0,49 liegt, wird es durch die Substitution durch das Fluoratom auf 0,81 zugunsten der *C3'-endo*

Konformation verschoben. Um den jeweiligen Einfluss auf Wasserstoffbrückenbindungen von dem Einfluss der Zuckerkonformation trennen zu können, ist Baustein **27a/b** zum Vergleich eingebaut worden. Hier besitzt die 2'-OH-Funktion zwar ebenfalls nicht mehr die Fähigkeit als Wasserstoffbrückendonor wirken zu können, aber die Ribose-Konformation wird zugunsten der 2'-endo Konformation verschoben (Hicks *et al.*, 1991). Die erhaltenen Werte sind darüber hinaus noch mit dem 2'-Desoxyuridin-Baustein **26a/b** verglichen worden.

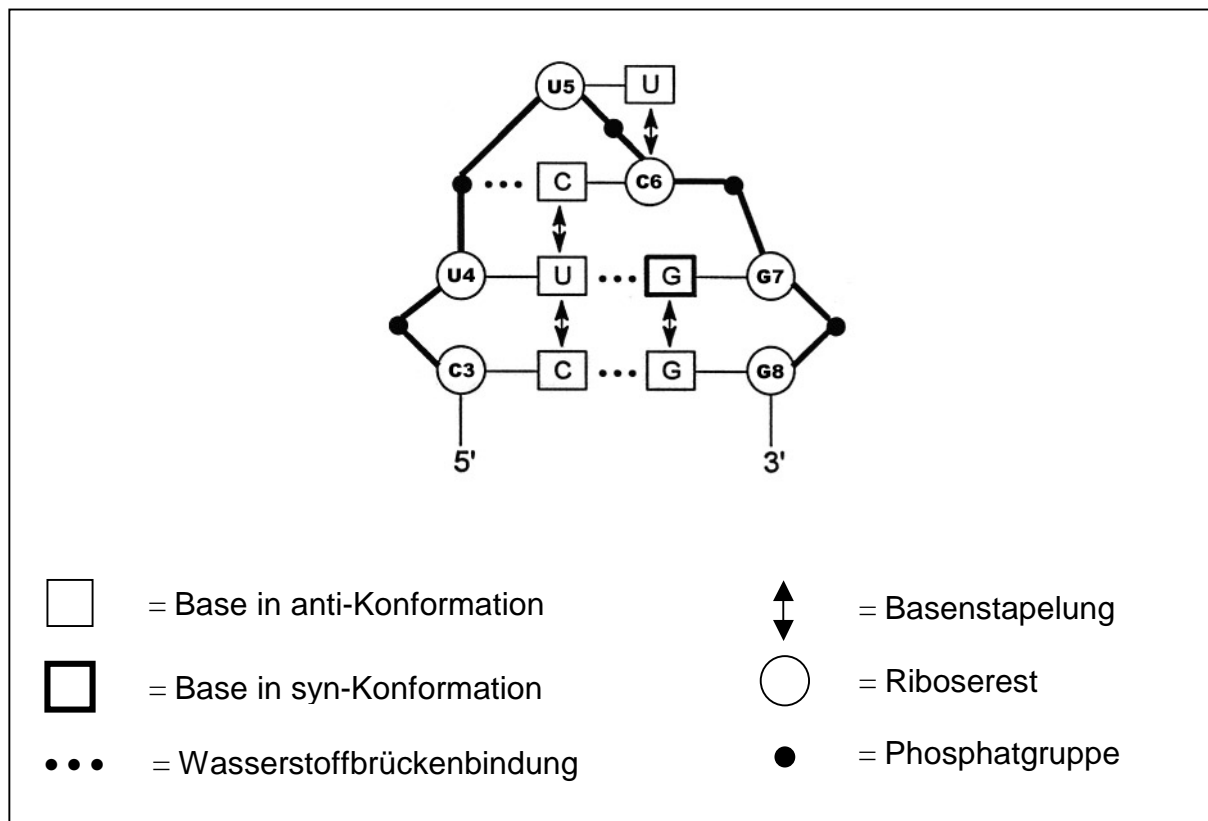
Um Basenstapelungswchselwirkungen zu untersuchen, ist der Baustein **28a/b** als sterisches Uridinanalogen eingeführt worden. Das Difluorbenzol sollte durch sein ausgeprägtes π -System die Basenstapelungswchselwirkungen positiv beeinflussen. Die Basenstapelungswchselwirkungen wurden darüber hinaus mit CD-Spektroskopie untersucht.

7.2.2 Bereits veröffentlichte Ergebnisse

Der UUCG-Tetraloop ist thermodynamisch, NMR-, Raman- und UV-spektroskopisch intensiv untersucht worden (Cheong *et al.*, 1990; Varani *et al.*, 1991; Allain & Varani, 1995; Kanyo *et al.*, 1996; Wörner, 1997; Reif *et al.*, 1997; Abdelkafi *et al.*, 1998; Williams & Hall, 2000; Williams *et al.*, 2001).

Abbildung 7.4 zeigt die wichtigsten Erkenntnisse über strukturelle Parameter, die hauptsächlich mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt worden sind. Hervorzuheben sind zwei interne Wasserstoffbrücken zwischen der ersten und letzten Nukleobase des Loops. Während U5 aus dem Tetraloop heraus steht, weist G7 eine *syn*-Konformation auf. Die Struktur scheint darüber hinaus durch eine starke Basenstapelungswchselwirkung zwischen C6 und U4 stabilisiert zu sein.

Von entscheidender Bedeutung bei der Strukturuntersuchung ist die Möglichkeit, dass sich statt einer Haarnadelschlaufen zwei Stränge zu einer Internen Schlaufe (Internal Loop) zusammenfügen. Das Verhältnis zwischen Haarnadelschlaufe und Interner Schlaufe ist von der Anzahl der Basen in der Schlaufen- und Stammregion, von der Konzentration der Stränge, von der Salzkonzentration und den Abkühlbedingungen (Annealing) bei dem Übergang von einer ungeordneten in eine geordnete Struktur abhängig. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen an Strängen, Salz und Annealing-Bedingungen der unmodifizierte UUCG-Tetraloop ausschließlich als Haarnadelschlaufe vorliegt (Reif *et al.*, 1997).

Abb. 7.4 Strukturelle Parameter des UUCG-Tetraloops (Varani *et al.*, 1991)

7.2.3 Ergebnisse aus dem Einbau der Bausteine U_F **22a/b** und C_F **23a/b**

Im Loopbereich wurden die Positionen U4, U5 und C6 zunächst einzeln, dann gleichzeitig an zwei Positionen und schließlich an allen drei Positionen durch ihre 2'-fluorierten Analoga **22a/b** und **23a/b** (HP2 – HP8) ersetzt (siehe dazu Tabelle 6.1).

Im Vergleich zu der nativen Struktur, die einen Schmelzpunkt von 71°C aufweist, wird der Tetraloop in allen Fällen destabilisiert. Die größte Destabilisierung ist bei der vollständigen Fluorierung des Loops zu beobachten, welcher einen T_m von 62°C besitzt. Aus den einzelnen Substitutionen lässt sich erkennen, dass der Destabilisierungsbeitrag bei der Substitution von C6 am höchsten ist (6°C), während die Substitution von U4 und U5 einen Beitrag jeweils von 5°C bringen.

Die Destabilisierung durch die Substitution an U4 wird verständlich und ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es eine Wechselwirkung zwischen der 2'-OH-Funktion von U4 und dem Carbonylsauerstoff von G7 gibt, die auch durch NMR-Daten belegt ist.

Die Fluorierung der Position U5 führt interessanterweise ebenfalls zu einer ähnlich großen Destabilisierung. Dieses Ergebnis lässt sich nicht sofort verstehen, da die 2'-OH-Funktion von U5 nach bisherigen Modellen nicht an Wasserstoffbrücken beteiligt ist.

Während die Base aus dem Loop heraussteht, ist das Fluoratom von der Loopstruktur umschlossen, was aus Sicht der ungünstigen Solvatisierung dieses Atoms sogar stabilisierend wirken sollte. Die Destabilisierung muss also vor allem aus der Veränderung der Zuckerkonformation herrühren.

Bei der Fluorierung von C6 spielen zwei Faktoren eine wichtige Rolle. Zum einen scheint hier nativ eine 2'-endo Konformation bevorzugt zu sein, zum anderen spielen Solvatationseffekte eine Rolle, da das Fluoratom Kontakt zum Lösungsmittel hat.

Überraschenderweise bringt die gleichzeitige Substitution von U4 und C6 nicht eine additive Destabilisierung, wie sie aufgrund der von einander unabhängigen oben beschriebenen Parametern zu erwarten wäre. Der T_m -Wert liegt nur 1°C unter der Einzelsubstitution von C6. Dieses lässt sich nur durch eine starke Veränderung der Loopstruktur und dadurch verbesserte Basenstapelungswechselwirkungen zwischen den beiden Basen erklären.

Die vollständige Fluorierung der Loopregion führt zu einem Schmelzpunkt von 62°C und damit zu einer Destabilisierung von 9°C gegenüber der nativen Struktur.

Der Einbau von **23a/b** in den Stammbereich (HP16-HP20) führt in allen Fällen zu einer Stabilisierung der gesamten Struktur. Diese Stabilisierung beruht auf der Verbesserung der Basenstapelungswechselwirkung im α -helicalen Stamm.

Der Substitution an C1 führt zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes um 6°C, während die einzelnen Einbauten an C3 und C9 jeweils eine Schmelzpunkterhöhung von 5°C bewirken. Die stabilste Haarnadelschleife entstand, wenn gleichzeitig C1 und C9 modifiziert waren (80°C).

Dagegen erniedrigt sich der Schmelzpunkt wieder bei der Substitution aller drei Pyrimidinpositionen des Stammes. Eine im Stamm und im Loop vollständige Substitution der Pyrimidine (HP21) lässt eine Haarnadelschleife entstehen, die gegenüber der nativen Struktur einen um 2°C erhöhten Schmelzpunkt aufweist. Durch den selektiven Einbau und getrennte Untersuchung der Stamm- und Schlaufen-Region konnte hier gezeigt werden, dass sich die stabilisierenden und destabilisierenden Effekte gegenseitig kompensieren. Tabelle 7.1 gibt eine Übersicht über die thermodynamischen Daten der beschriebenen Stränge.

Strang	Sequenz 5' → 3' RNA 10mer	T _m [°C]	ΔH ⁰ [kJ • mol ⁻¹]	ΔS ⁰ [J • mol ⁻¹ • K ⁻¹]	ΔG ⁰ (25°C) [kJ • mol ⁻¹]
HP1	CGC-UUCG-GCG	71	-100	-292	-13,0
HP2	CGC-U _F UCG-GCG	66	-125	-370	-14,7
HP3	CGC-UU _F CG-GCG	66	-96	-284	-11,4
HP4	CGC-UUC _F G-GCG	65	-92	-285	-7,1
HP5	CGC-U _F U _F CG-GCG	63	-79	-246	-5,7
HP6	CGC-U _F UC _F G-GCG	64	-88	-261	-10,2
HP7	CGC-UU _F C _F G-GCG	63	-78	-242	-5,9
HP8	CGC-U _F U _F C _F G-GCG	62	-75	-225	-8,0
HP16	C _F GC-UUCG-GCG	77	-155	-442	-23,3
HP17	CGC _F -UUCG-GCG	76	-151	-431	-22,6
HP18	CGC-UUCG-GC _F G	76	-151	-431	-22,6
HP19	C _F GC-UUCG-GC _F G	80	-168	-474	-26,7
HP20	C _F GC _F -UUCG-GC _F G	78	-184	-525	-27,6
HP21	C _F GC _F -U _F U _F C _F G-GC _F G	73	-175	-508	-23,6

Tabelle 7.1 Thermodynamische Daten der modifizierten Haarnadelschleifen (U_F und C_F); Die Fehlergrenzen betragen für den T_m-Wert ± 0,2°C und 5% für die übrigen Parameter.

Auffällig ist die Abflachung der Schmelzkurven bei zunehmenden Modifikationsgrad. Während die Kurve beim nativen Strang HP1 der sigmoidale Anteil recht scharf ist, verläuft er bei HP21 über einen weiten Temperaturbereich (Abb. 7.5).

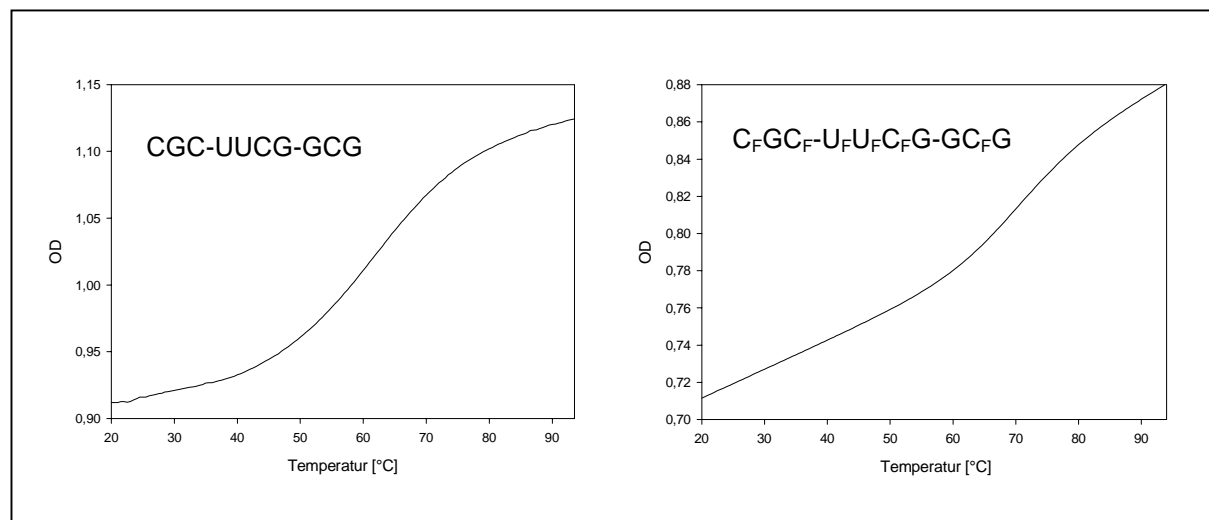


Abb. 7.5 Schmelzkurven des nativen HP1 und fluorierten HP21 UUCG-Tetraloops

Dieses weist auf eine Abnahme der Kooperativität oder auf das Vorhandensein verschiedener Zwischenstufen beim Aufschmelzen hin. Damit werden die Ungenauigkeiten beim Auswerten der Kurven größer, weil die Parameter unter der Voraussetzung eines Zwei-Zustands-Modells ermittelt werden. Zudem liegt nach NMR-Untersuchungen der Strang HP21 schon zu 18% als Interne Schlaufe vor (Reif *et al.*, 1997).

7.2.4 Ergebnisse aus dem Einbau des 2'-fluorierten Bausteins U^F **27a/b**

Der Baustein **27a/b** trägt ein Fluor-Atom in der *arabino*-Stellung an C2'. Dadurch wird das Gleichgewicht zugunsten der 2'-*endo*-Konformation verschoben. Der Baustein wurde an der Position U4 und U5 eingebaut. Dabei erniedrigte sich der Schmelzpunkt im Falle von U4 von 71°C bei der nativen Struktur auf 68°C. Damit ist die Destabilisierung an dieser Position 2°C geringer als bei einem Einbau von U_F. Da auch bei diesem Baustein die 2'-Position nicht als Wasserstoffbrückendonator fungieren kann, muss diese geringere Stabilisierung aus der Konformation der Ribose resultieren.

Der Einbau an U5 führt hingegen zu einer sehr starken Destabilisierung (62°C) verglichen mit dem Einbau von U_F an dieser Position (66°C). Sie bewirkt mit 9°C eine genauso große T_m-Wert Reduktion wie die vollständige Fluorierung aller Pyrimidinpositionen im Loop mit U_F. Diese starke Destabilisierung ist deshalb ungewöhnlich, da auch an dieser Position die 2'-*endo* Konformation bevorzugt ist. Die Gründe müssen somit in Basenstapelungswechselwirkungen und einer veränderten Solvatation liegen, das Ausmaß der Destabilisierung ist aber nicht vollständig verstanden.

Der Einbau von U^F gleichzeitig an beiden Positionen führte dann erwartungsgemäß zu einem sehr niedrigen T_m-Wert (59°C). Die Kombination von U^F jeweils an U4 und U5 mit C_F an C6 führte zu T_m-Werten von 63°C und 60°C. Tabelle 7.2 zeigt die ermittelten thermodynamischen Parameter.

7.2.5 Ergebnisse aus dem Einbau des 2-Desoxyuridin Bausteins dU **26a/b**

Der 2'-Desoxyuridin Baustein weist ein Konformerenverhältnis von C3'-*endo* zu C2'-*endo* von 0,35 auf (Williams *et al.*, 2001). Damit ist er vergleichbar mit U^F, allerdings hat die 2'-Position ein anderes Solvatationspotential. Der Einbau an U4 führte allerdings zu einer Destabilisierung von 8°C, was darauf hinweist, dass sich durch diese Substitution die Struktur

der Haarnadelschleife nachhaltig verändern muss. Denn die Einbauten von U^F und U^F haben gezeigt, dass eine 2'-endo Konformation an dieser Position zwar bevorzugt ist, trotzdem aber die Destabilisierung noch deutlich größer als bei dem Einbau von U^F ausfällt, welches eine C3'-endo Konformation aufweist.

Der Einbau an Position U5 führt hingegen ähnlich wie U^F nur zu einer leichten Destabilisierung von 2°C. Die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

Strang	Sequenz 5' → 3' RNA 10mer	T_m [°C]	ΔH^0 [kJ • mol ⁻¹]	ΔS^0 [J • mol ⁻¹ • K ⁻¹]	ΔG^0 (25°C) [kJ • mol ⁻¹]
HP1	CGC-UUCG-GCG	71	-100	-292	-13,0
HP9	CGC- U^F UCG-GCG	68	-92	-270	-11,5
HP10	CGC-UU F CG-GCG	62	-84	-250	-9,5
HP11	CGC- $U^F U^F$ CG-GCG	59	-113	-339	-12,0
HP12	CGC- $U^F U^F$ C $_F$ G-GCG	63	-109	-322	-13,0
HP13	CGC-UU F C $_F$ G-GCG	60	-92	-268	-12,1
HP14	CGC-dUUCG-GCG	63	-78	-234	-8,4
HP15	CGC-UdUCG-GCG	69	-98	-257	-12,5

Tabelle 7.2 Thermodynamische Daten der modifizierten Haarnadelschleifen (U^F und dU); Die Fehlergrenzen betragen für den T_m -Wert $\pm 0,2^\circ\text{C}$ und 5% für die übrigen Parameter.

7.2.6 Ergebnisse aus dem Einbau des isosteren Uridinanalogs B 28a/b

Statt des Uracils trägt der Baustein 28a/b über eine C-glykosidische Bindung ein Difluorbenzol. Er ist isoster zu Uridin und sollte durch sein ausgeprägtes π -System die Basenstapelungswechselwirkungen verbessern. Im Gegensatz zu den anderen modifizierten Bausteinen ist die 2'-OH-Funktion vorhanden und kann so wie in der nativen Struktur Wasserstoffbrücken ausbilden.

Der Einbau an Position U4 führt zu einer Destabilisierung von 12°C. Diese Stabilisierung fällt sogar noch stärker aus, als der Einbau von dU an dieser Position. Auch hier wird durch den Einbau die Struktur der Haarnadelschleife nachhaltig gestört. Daraus und aus den zuvor beschriebenen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das Vorhandensein der Base Uracil und deren räumliche Anordnung für die gesamte Loopstruktur einen erheblichen Einfluss hat.

Der Einbau des Bausteins B an der Position U5 führt ähnlich wie bei U_F zu einer Destabilisierung von 6°C. Gerade weil diese Base außerhalb des Loops steht, aber gleichzeitig Basenstapelungswechselwirkungen zu C6 zeigt, wäre hier eine weniger starke Destabilisierung zu erwarten gewesen. Hier scheinen sich deutlich Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel negativ auf die Stabilität auszuwirken.

Der gleichzeitige Einbau von B an U4 und U5 destabilisiert die Struktur noch weiter (58°C). Die thermodynamischen Daten sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst.

Strang	Sequenz 5'→3' RNA 10mer	T _m [°C]	ΔH ⁰ [kJ •mol ⁻¹]	ΔS ⁰ [J •mol ⁻¹ •K ⁻¹]	ΔG ⁰ (25°C) [kJ •mol ⁻¹]
HP1	CGC-UUCG-GCG	71	-100	-292	-13,0
HP22	CGC-BUCG-GCG	59	-95,8	-288,4	-9,9
HP23	CGC-UBCG-GCG	65	-130,5	-385,9	-15,5
HP24	CGC-BBCG-GCG	58	-82,5	-249,1	-8,3

Tabelle 7.3 Thermodynamische Daten der modifizierten Haarnadelschleifen (U^F und dU); Die Fehlergrenzen betragen für den T_m-Wert ± 0,2°C und 5% für die übrigen Parameter.

7.2.7 Vergleich der Ergebnisse mit einer modellierten Struktur

Abbildung 7.6 zeigt eine simulierte Struktur eines UUCG-Tetraloops mit einem schließenden C•G-Basenpaar (Williams *et al.*, 2001), der NMR-Daten zugrunde liegen. Deutlich erkennbar ist der enge Kontakt (Wasserstoffbrücke) zwischen der 2'-OH-Funktion von U4 und dem Carbonylsauerstoff von G7. Dieser Kontakt wird durch die vorliegenden Daten bestätigt. Allerdings fällt die Destabilisierung durch das Wegfallen dieser Wasserstoffbrücke durch den Einbau von dU stärker aus, als durch den Einbau von U_F, was einzig durch eine verbesserte Basenstapelung erklärt werden kann.

Die starke Destabilisierung durch den Einbau von U_F an C6 fällt besonders stark aus. Diese Destabilisierung muss so vor allem der nativen C2'-*endo* Konformation und der schlechteren Hydratisierung der Fluormodifikation zugeschrieben werden. Dieses erscheint plausibel, da die 2'-OH Funktion vollständig aus dem Loop nach außen heraus steht.

Der Einbau von U_F an der Position U5 führt zu einer Destabilisierung, obwohl die 2'-OH-Funktion nicht an Wasserstoffbrücken beteiligt ist und innerhalb des Loops Solvationseffekte eine untergeordnete Rolle spielen. Das Strukturmodell macht die

erhaltenen Daten insofern verständlich, als dass U5 in einer C2'-endo Konformation vorliegt. Die Fluor-Substitution mit U_F und ihrer C3'-endo Konformation stört die Struktur nachhaltig.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten decken sich mit der modellierten Struktur. Allerdings wird gerade aus den Mehrfacheinbauten deutlich, dass die Loopstruktur sehr flexibel ist. Die drei stabilisierenden Parameter Wasserstoffbrücken, Basenstapelung und Solvation wirken sehr eng miteinander zusammen und können nicht einzeln betrachtet werden können. Im Falle des nativen Loops ist die Ausnutzung der stabilisierenden synergistischen Effekte nahezu optimal. So ist es bisher nicht gelungen, durch den Einbau von Modifikationen den UUCG-Tetraloop weiter zu stabilisieren. Lediglich durch den Einbau eines dU an U5 und einer gleichzeitigen 2'-Amino-Modifikation an C6 wird eine ähnliche Stabilität erzielt. Die erwartete deutlich Stabilisierung war allerdings nicht zu beobachten (Williams *et al.* 2001).

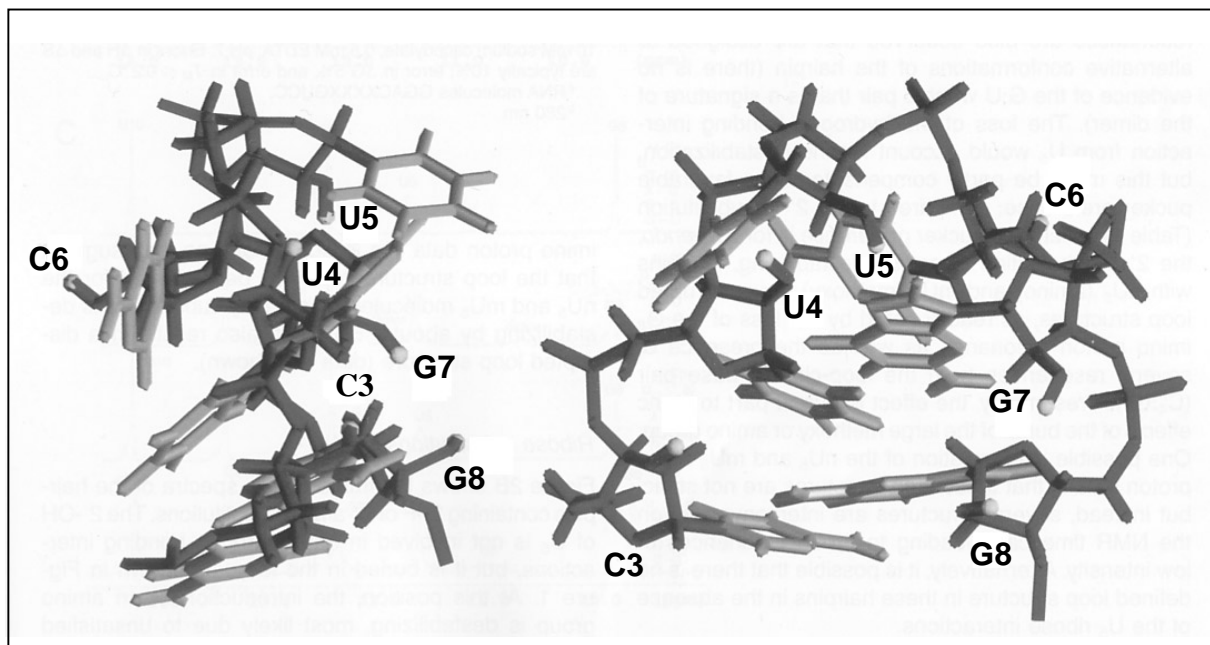


Abb.7.6 Modellierte Struktur eines UUCG-Tetraloops mit einem schließenden C•G-Basenpaares basierend auf NMR-Daten (Williams *et al.*, 2001)

7.3 CD-Spektroskopische Untersuchungen der UUCG-Tetraloops

Die Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht mit den gelösten Molekülen der Probe. Ein linear polarisierter Lichtstrahl ist aus zwei kohärenten,

zirkular polarisierten Strahlen entgegengesetzten Drehsinns mit gleicher Amplitude zusammengesetzt.

Da der molare Extinktionskoeffizient für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht verschieden ist, weisen nach dem Verlassen des optisch aktiven Mediums die links- und rechtszirkular polarisierten Anteile eine verschiedene Geschwindigkeit und Amplitude auf. Ihre Überlagerung führt somit nicht mehr zu linearem, sondern zu elliptisch polarisiertem Licht. Diese Erscheinung wird Zirkulardichroismus (CD) genannt. Der molare Zirkulardichroismus $\Delta\epsilon$ ist die Differenz der Extinktionskoeffizienten für rechts- und linkszirkular (ϵ_r und ϵ_l) polarisiertes Licht (Gl. [7.11])

$$[7.11] \quad \Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$$

Durch Einsetzen in das Lambert-Beer-Gesetz erhält man:

$$[7.12] \quad \Delta\epsilon = (E_l - E_r) / c \cdot d$$

Die Messgröße der CD-Spektrometer ist die Differenz der Extinktion für die beiden Arten des zirkular polarisierten Lichts:

$$[7.13] \quad \Delta E = E_l - E_r$$

In dieser Arbeit wurde ein CD-Spektrometer der Firma Jasco (Modell 701) verwendet. Dieses gibt den Messwert als Elliptizität θ in Milligrad an. Zwischen der Elliptizität θ und der Differenz der Extinktion (Gl. [7.13]) besteht folgende Beziehung (Gl. [7.14]):

$$[7.14] \quad \theta = 32980 \cdot \Delta E$$

Die Elliptizität θ lässt sich bei bekannter Konzentration der Probe c [mol/l] und bekannter Schichtdicke der Küvette d [cm] als molare Elliptizität $[\theta]$ [Grad \cdot cm² \cdot dezimol⁻¹] ausdrücken (Gl. [7.15]):

$$[7.15] \quad [\theta] = \theta / 10 \cdot c \cdot d$$

Für den Zusammenhang zwischen molarer Elliptizität und molarem Zirkulardichroismus $\Delta\epsilon$ [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$] gilt:

$$[7.16] \quad \Delta\epsilon = [\theta] / 3298$$

Da Nucleinsäuren aufgrund der Chiralität der 2'-Desoxyribose und Ribose sowie der chromophoren Systeme der Basen CD-Signale zeigen, werden sie seit mehreren Jahrzehnten mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Die Auftragung der Signale in Abhängigkeit von der Wellenlänge führt zu einem charakteristischem CD-Spektrum. Abbildung 7.6 zeigt ein für Tetraloops mit A-Konformation typisches CD-Spektrum mit seinen Maxima und Minima.

Die Stärke der CD-Spektroskopie liegt in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der räumlichen Anordnung der Chromophore (Konformation des Moleküls), in ihrer einfachen Durchführbarkeit des Experiments, einer nicht destruktiven Natur der Messung sowie einer geringen erforderlichen Probenmenge. Sie ermöglicht es, die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur von Nucleinsäuren sowie deren temperaturabhängige Veränderungen zu untersuchen. Durch die direkte Abhängigkeit der Intensität der Signale von der räumlichen Anordnung der Chromophore können besonders gut Erkenntnisse über Basenstapelungswechselwirkungen gewonnen werden.

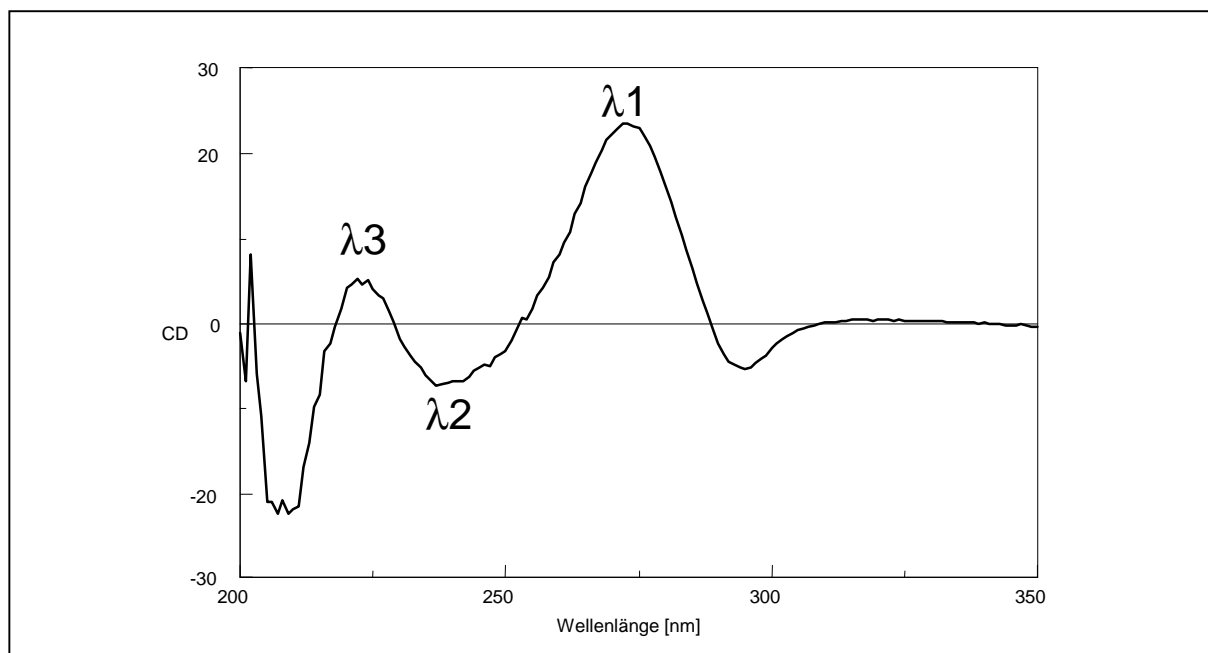


Abb. 7.7 CD-Spektrum von CGC-UUCG-GCG bei 20°C mit seinen für einen RNA-Tetraloop typischen Maxima (λ_1 und λ_3) und Minima (λ_2)

Dabei liefert die CD-Spektroskopie allerdings keine direkten Strukturinformationen, sondern nur ein strukturabhängiges Gesamtbild. Die Auswertung von CD-Spektren stützt sich deshalb auf den Vergleich mit bekannten Spektren, deren zugrundeliegende Struktur mit anderen Methoden (z. B. NMR, Röntgenbeugung) zuvor ermittelt wurde.

In dieser Arbeit wurden CD-Spektren von allen synthetisierten Haarnadelschleifen aufgenommen. Der Puffer und die Konzentration waren dieselben wie bei der Aufnahme der UV-Spektren. Die Kurven wurden bei verschiedenen Temperaturen (20°C, 40°C, 60°C und 80°C) aufgenommen. Verglichen wurden aber meist nur die Kurven bei 20°C und 80°C, da diese jeweils den nativen und geschmolzenen Zustand der Haarnadelschleife beschreiben. Die Proben an denen die Pyrimidinpositionen im Stamm mit C_F markiert waren, sind bei 80°C noch nicht vollständig in einen ungeordneten Zustand übergegangen, was die Interpretation und den Vergleich mit den anderen Spektren problematisch macht.

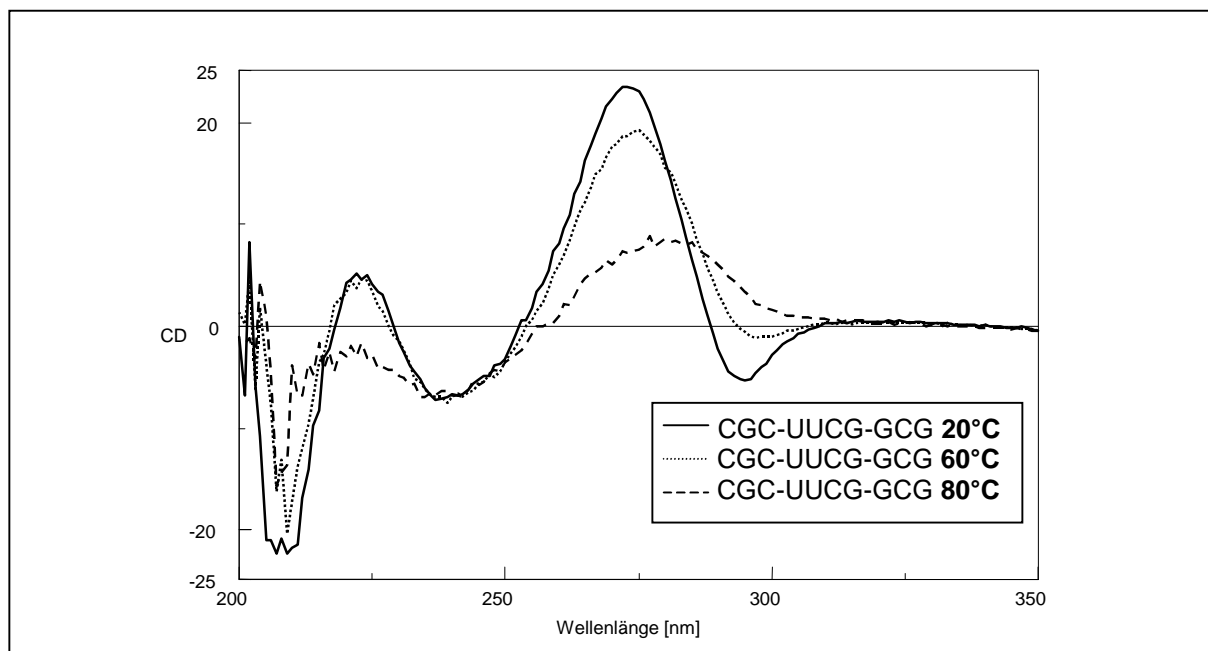


Abb. 7.8 CD-Spektren von CGC-UUCG-GCG bei 20°C, 60°C und 80°C

Grundsätzlich findet man bei den modifizierten Haarnadelschleifen einen ähnlich charakteristischen Verlauf wie für den nativen UUCG-Tetraloop. Bei der Temperaturerhöhung erniedrigt sich die Intensität von λ_1 und λ_3 deutlich, was auf der Veränderung von Basenstapelungswechselwirkungen beruht (Abb.7.7). Eine Strukturveränderung kann aus der Verschiebung der Intensitätsmaxima abgeleitet werden. Die aufgenommenen Spektren führten im wesentlichen zu folgenden Erkenntnissen:

- Beim Einbau von U_F in den Loopbereich ist die Abnahme des Intensitätsmaximums λ_1 beim Schmelzvorgang mit der nativen Struktur vergleichbar. Allerdings verschiebt sich das Maximum um 3,2 nm zu niedrigeren Wellenlängen zwischen dem nativen Tetraloop und HP8. Außerdem zeigt das Spektrum von HP8 eine deutlich intensivere Bande λ_3 (Abb. 7.8). Diese intensive Bande ist für einen RNA-Doppelstrang typisch. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass bei vollständiger Fluorierung der Loopregion sich die Struktur deutlich verändert, zum anderen können auch Anteile als interne Schleife vorliegen.

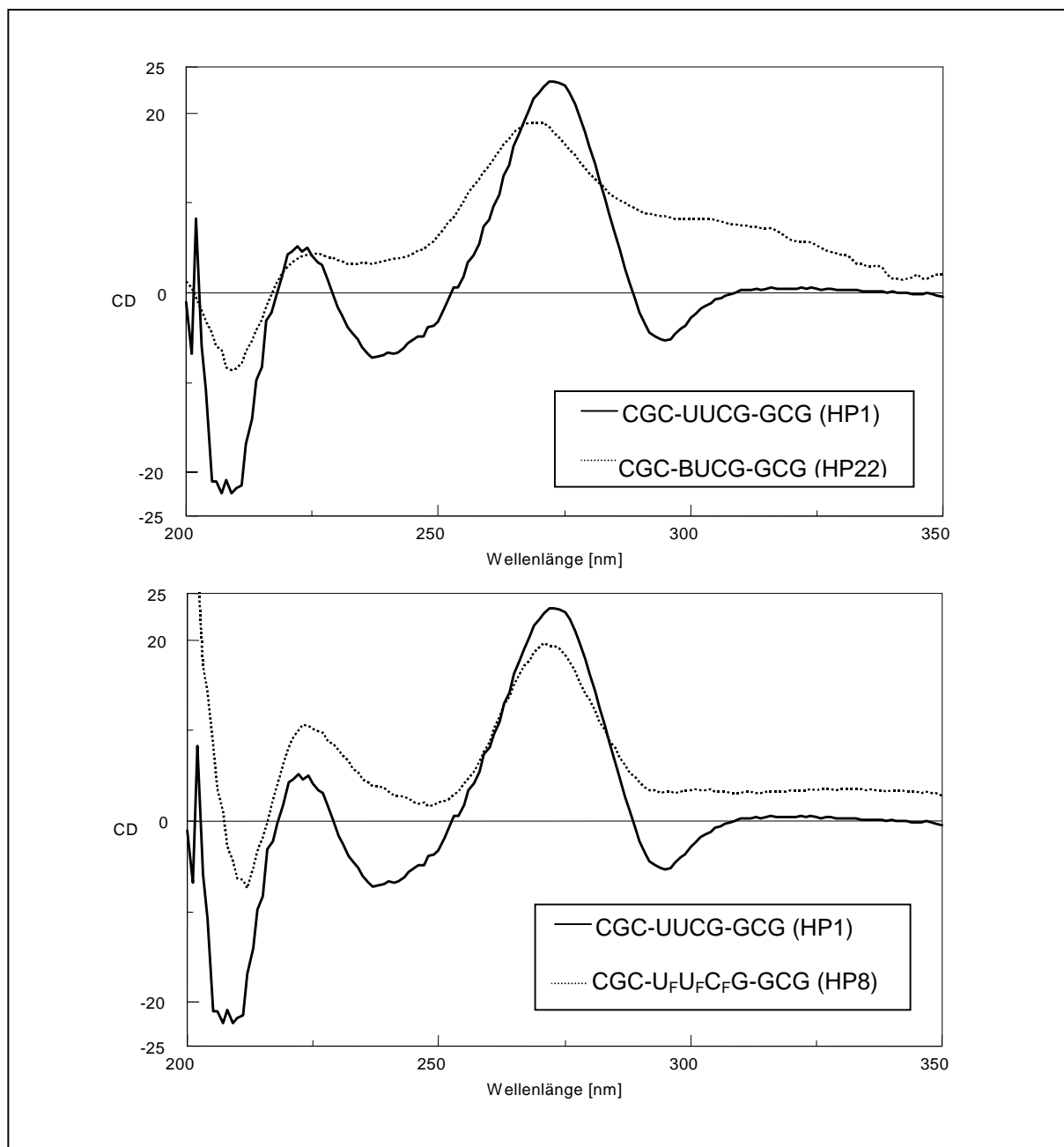


Abb. 7.9 Verschiedene CD-Spektren der modifizierten Stränge bei 20°C im Vergleich zum nativen UUCG-Tetraloop

- Der Einbau von dU an verschiedenen Positionen führt zu einer Intensitätsabnahme aller Banden, die sich beim Schmelzvorgang nur noch wenig verändern. Durch dU wird die Loopstruktur nachhaltig gestört, was sich auch mit den erhaltenen thermodynamischen Daten deckt.
- Die Fluorierung im Stammbereich führt erwartungsgemäß neben einer Intensitätszunahme von λ_3 zu keiner weiteren signifikanten Veränderung des Spektrums verglichen mit der nativen Struktur. Die hohen Intensitäten sprechen für starke Basenstapelungswechselwirkungen.
- Ähnlich dem Einbau von dU wirkt sich der Einbau des Bausteins B aus. Die wenig ausgeprägten und zu höheren Wellenlängen verschobenen Maxima, deuten darauf hin, dass sich hier die Struktur des Loops deutlich verändert (Abb. 7.8).

7.4 Enthalpie-Entropie-Kompensation

Eine besondere Eigenschaft bei der Strukturausbildung von Biomakromolekülen oder bei der molekularen Erkennung ist die Reversibilität des Prozesses. So müssen zum Beispiel DNA-Doppelhelices auf der einen Seite stabil genug sein, um die genetische Information dauerhaft sicher zu bewahren, auf der andern Seite müssen die komplementären Stränge lokal leicht aufschmelzen können um eine Replikation oder Transkription der Information zu gewährleisten.

Bei der Strukturausbildung oder Assoziation wirken zwei thermodynamische Kenngrößen antagonistisch. Zum einen sind solche Vorgänge enthalpisch günstig, sind aber mit einem Entropieverlust verbunden. Die Reversibilität eines Vorganges lässt sich anhand der aus Enthalpie- (ΔH) und Entropiedifferenz (ΔS) resultierenden Freien Enthalpie ΔG ablesen. Ist ΔG gleich oder nahe null ist ein Vorgang reversibel.

Um Reversibilität zu gewährleisten müssen sich also Enthalpiegewinn und Entropieverlust ungefähr die Waage halten. Dieses als Enthalpie-Entropie-Kompensation bezeichnete Phänomen findet man ubiquitär bei der molekularen Erkennung und Strukturausbildung (Searle & Williams, 1993; Gallicchio *et al.*, 1998).

Die verschiedenen sich kompensierenden Faktoren bei der Ausbildung einer Helix lassen sich in ihre jeweiligen Beiträge aufspalten (Gl. [7.17]-[7.19]) (Searle & Williams, 1993):

$$[7.17] \quad \Delta G_{\text{Helix}} = \Delta G_r + \Delta G_h + \Delta G_s + \Delta G_{\text{hb}}$$

$$[7.18] \quad \Delta H_{\text{Helix}} = \Delta H_r + \Delta H_h + \Delta H_s + \Delta H_{\text{hb}}$$

$$[7.19] \quad \Delta S_{\text{Helix}} = \Delta S_r + \Delta S_h + \Delta S_s + \Delta S_{\text{hb}}$$

(r = interne Rotoren; h = hydrophobe Wechselwirkungen; s = Basenstapelungswechselwirkungen; hb = Wasserstoffbrückenbindungen)

Die Ausbildung von Basenstapelungswechselwirkungen und Wasserstoffbrücken sind exotherme Vorgänge, die enthalpiegetrieben sind, während entropische Beiträge untergeordnet sind.

Die Beiträge durch Einschränkung von Rotatoren und hydrophobe Effekte sind dagegen vor allem entropischen Einflüssen zuzuordnen. Die enthalpischen Anteile beruhen folglich vor allem auf elektrostatischen Wechselwirkungen, während sich die entropischen Anteile auf dynamische Faktoren zurückführen lassen. Gerade der Enthalpiegewinn durch die elektrostatischen Anteile, wird durch die bedingte Einschränkung der Dynamik durch Entropieverlust kompensiert.

Dieses Phänomen der Enthalpie-Entropie-Kompensation ist thermodynamisch nicht zwingend, wie Beispiele nicht kompensierender Systeme zeigen (Gallicchio *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde bei den modifizierten Haarnadelschlaufen eine Kompensation der enthalpischen und entropischen Beiträge gefunden. Abbildung 7.9 zeige eine Auftragung der ermittelten thermodynamischen Parameter aller untersuchten Haarnadelschlaufen.

Die Regressionsgerade besitzt einen r^2 -Wert von 0,985. Die Mechanismen und Zusammenhänge für das Auftreten dieser Kompensation auf molekularer Ebene sind noch nicht vollständig verstanden. Deshalb ist vor einer Überinterpretation dieser Daten zu warnen.

Es ist sicherlich problematisch, bei der Diskussion von thermodynamischen Daten die Enthalpie und Entropie getrennt voneinander zu betrachten.

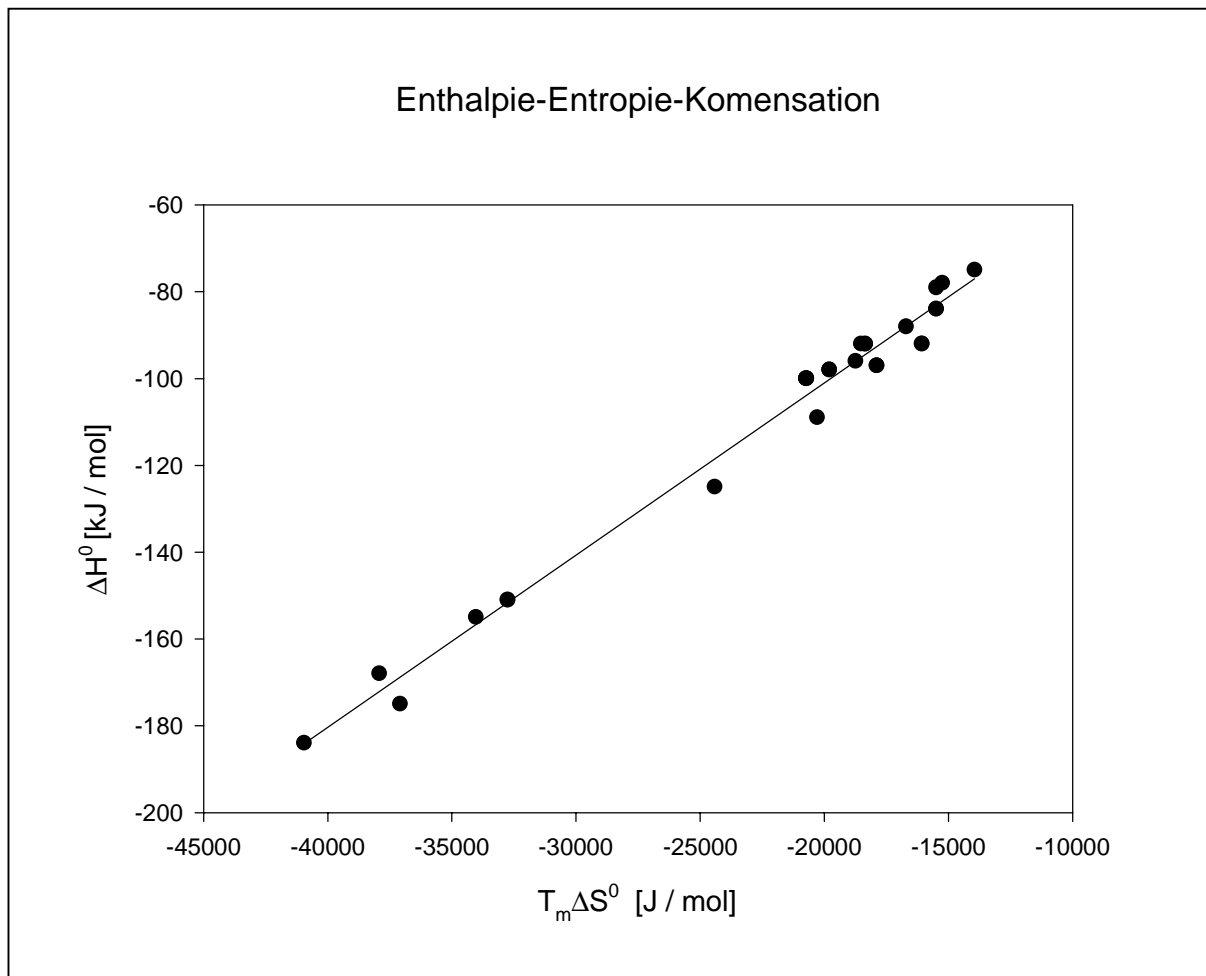


Abb. 7.10 Enthalpie-Entropie-Kompensation bei den dargestellten Tetraloops HP1-HP24

8 ESR-Spektroskopie von Biomolekülen

8.1 Theoretische Grundlagen

Die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) ist eine Spektroskopieart im Mikrowellenbereich, mit der sich paramagnetische Substanzen untersuchen lassen. Im einfachsten Fall sind Moleküle paramagnetisch, wenn sie eine ungerade Anzahl von Elektronen besitzen.

Diese ungepaarten Elektronen eines Atoms besitzen einen Bahndrehimpuls \vec{L} und einen Eigendrehimpuls (Spin) \vec{S} . Der Gesamtdrehimpuls \vec{J} setzt sich im Fall der Russel-Saunders-Kopplung der Drehimpulse additiv aus dem Bahn- und Eigendrehimpuls zusammen.

Die Elektronenbewegung ruft ein magnetisches Moment $\vec{\mu}_J$ hervor, das sich aus den Anteilen des Bahn- und Eigendrehimpulses zusammensetzt (Gl. [8.1]):

$$[8.1] \quad \vec{\mu}_J = \vec{\mu}_L + \vec{\mu}_S$$

Der Betrag des magnetischen Moments $\vec{\mu}_J$ beträgt:

$$[8.2] \quad \mu_J = -g \cdot \frac{e}{2m_e} \cdot J$$

Dabei ist g der Landé-Faktor (g-Faktor):

$$[8.3] \quad g = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)}$$

Das magnetische Moment wird oft in Einheiten des Bohrschen Magnetons angegeben (Gl. [8.4]). Dabei ist e die Elementarladung und m_e die Masse des Elektrons.

$$[8.4] \quad \mu_B = \frac{|e| \cdot \hbar}{2m_e} = 9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$$

Im Gegensatz zu paramagnetischen Übergangsmetallionen lässt sich in organischen Radikalen der Bahndrehimpuls meist vernachlässigen, sodass hier nur der Spin betrachtet werden muss ($g \cong 2$). Für ein freies Elektron gilt :

$$[8.5] \quad |\vec{\mu}_J| = |\vec{\mu}_S| = g\mu_B\sqrt{S(S+1)}$$

Das magnetische Moment $\vec{\mu}_S$ des Elektrons und der Eigendrehimpuls \vec{S} sind entgegengesetzt orientiert. Dadurch nimmt der Landé-Faktor den Wert 2 oder nach quantenmechanischen Berechnungen den Wert $g = 2,00232$ für ein freies Elektron ohne Bahnmoment an.

Wird ein ungepaartes Elektron in ein äußeres Magnetfeld der Flussdichte \vec{B}_0 eingebracht, so wechselwirken die magnetischen Momente der Elektronen mit diesem Magnetfeld und die ursprünglich isotrope räumliche Verteilung der Elektronenspins wird aufgehoben.

Wenn das \vec{B}_0 -Feld in z-Richtung liegt, wird die potentielle Wechselwirkungsenergie beschrieben durch:

$$[8.6] \quad E = -\vec{\mu}_S \cdot \vec{B}_0 = g\mu_B m_s B_0$$

Bezüglich der \vec{B}_0 -Feldrichtung sind für $S = 1/2$ quantenmechanisch nur zwei Einstellungen erlaubt. Diese werden durch die magnetischen Quantenzahlen $m_s = +1/2$ („parallele“ Spinrichtung) und $m_s = -1/2$ („antiparallele“ Spinrichtung) charakterisiert.

Diese stellen die Projektion des Spins \vec{S} auf die \vec{B}_0 -Feldrichtung dar. Allgemein gilt $m_s = S, S-1, \dots, -S$ und es gibt $(2S+1)$ Einstellungen im angelegten \vec{B}_0 -Feld. Mit $m_s = \pm 1/2$ für ein freies ungepaartes Elektron ergeben sich zwei Energierterme (Abb. 8.1).

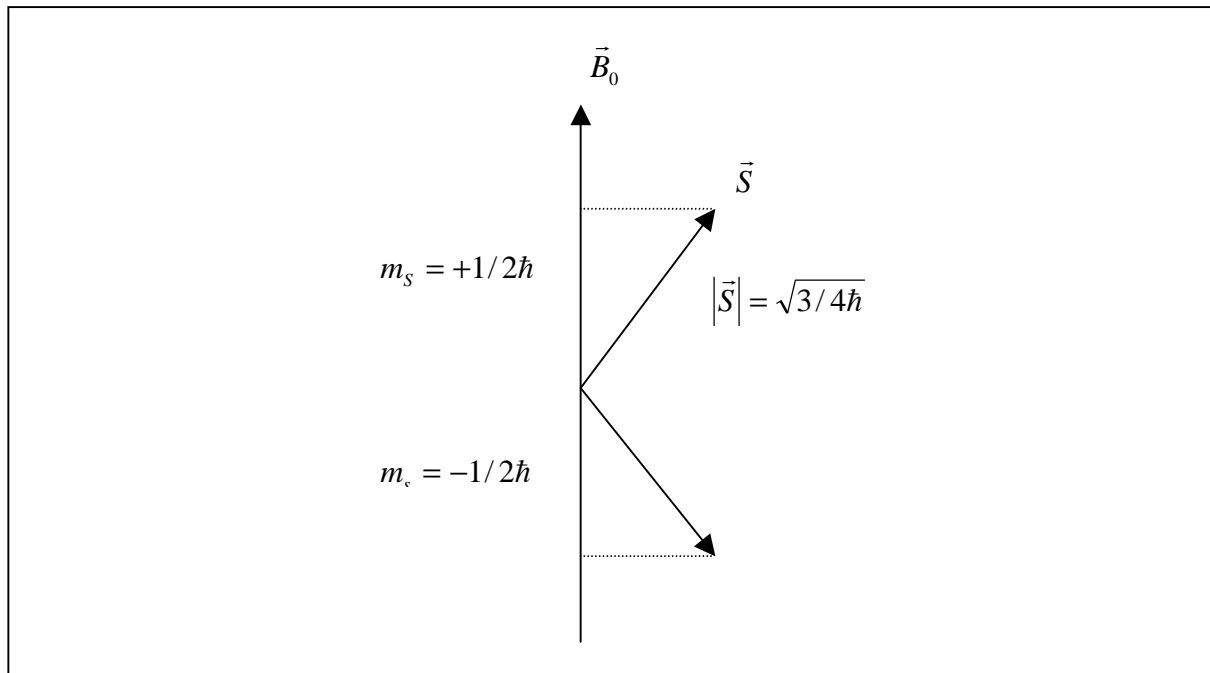


Abb. 8.1 Erlaubte Spineinstellungen eines freien Elektrons mit $S = 1/2$ in einem homogenen Magnetfeld \vec{B}_0

Durch Einsetzen der Quantenzahlen in Gl. [8.6] ergibt sich für den unteren Energieterm $E = -(1/2)g\mu_B B_0$ und für den oberen Term $E = +(1/2)g\mu_B B_0$, somit für die Energiedifferenz:

$$[8.7] \quad \Delta E = g\mu_B B_0$$

Wird diese Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung eingestrahlt, werden die einzelnen Elektronen vom unteren in das obere Energieniveau angeregt. Relaxationsvorgänge führen dann zur Wiederherstellung der Boltzmann-Verteilung.

Eine Adsorption der eingestrahltten Energie findet dann statt, wenn die eingestrahltte Energie dem Energieunterschied aus Gl. [8.7] entspricht (Abb. 8.2):

$$[8.8] \quad \Delta E = h \cdot \nu = g\mu_B B_0$$

Meist wird ein ESR-Spektrum bei einem Magnetfeld von 0,34 T und einer Frequenz von 9,5 GHz (X-Band) gemessen. Dazu wird eine Lösung mit der paramagnetischen Substanz in ein homogenes Magnetfeld gebracht und in einem Hohlraumresonator (Cavity) mit Mikrowellen

konstanter Frequenz bestrahlt. Durch zeitliche Variation der Feldstärke wird die Resonanzbedingung durchgeführt. Vorwiegend werden in der ESR-Spektroskopie nicht die Adsorptionsspektren selbst, sondern deren erste Ableitung registriert. Um Messungen von Radikalen bei verschiedenen Frequenzen vergleichen zu können, wird meist der g-Faktor als charakteristische Kenngröße eines Radikals angegeben:

$$[8.9] \quad g = \frac{\hbar \cdot \nu}{\mu_B \cdot H_0}$$

Für ein freies Elektron ist der g-Faktor isotrop, bei paramagnetischen Molekülen oder Ionen besitzt er Tensoreigenschaften, sein Wert hängt also von der räumlichen Orientierung des freien Elektrons in Bezug zur Richtung des eingestrahlten Magnetfeldes ab.

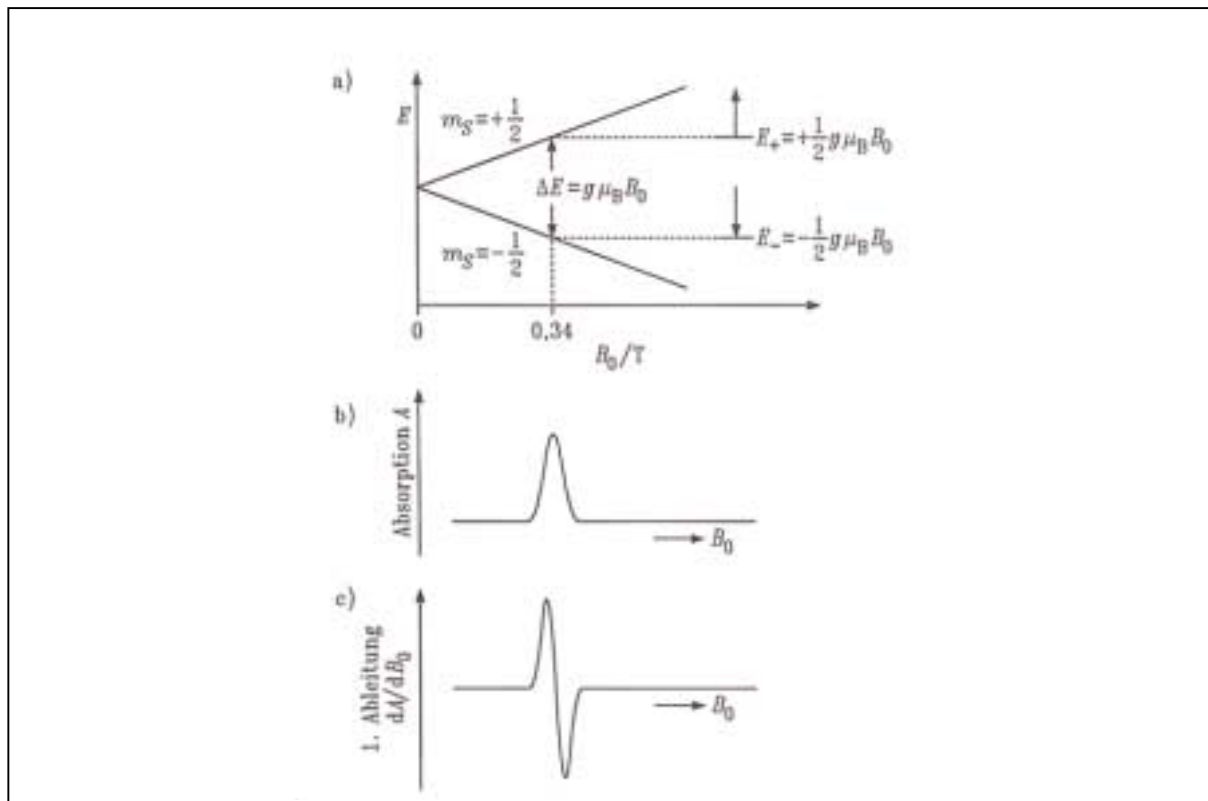


Abb. 8.2 a) Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus eines Elektrons im B_0 -Feld zunehmender Stärke. Bei 0,34 T wird die Mikrowellenstrahlung adsorbiert. b) Das Absorptionssignal als Funktion des B_0 -Feldes c) In der Regel wird durch Magnetfeldmodulation das 1. Ableitungssignal dA/dB_0 mit besserem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis dargestellt. (Winter & Noll, 1998)

Während für die bisher beschriebenen Wechselwirkungen nur eine Linie im ESR-Spektrum eines freien Elektrons zu erwarten ist, kommt es auch zu Wechselwirkungen der magnetischen Momente der ungepaarten Elektronen mit den magnetischen Momenten benachbarter Kernspins. Diese werden als Hyperfeinwechselwirkungen bezeichnet und führen zu einer Aufspaltung der ESR-Linien. Die Atomkerne erzeugen ein lokales Feld, das sich mit dem äußeren B_0 -Feld zu einem effektiven Feld addiert.

Die Atomkerne mit der Kernspinquantenzahl I haben – charakterisiert durch ihre m_I -Werte – $(2I+1)$ Einstellungsmöglichkeiten im B_0 -Feld. Somit spalten die ESR-Linien $(2nI+1)$ -fach auf. Dabei ist n die Anzahl der äquivalenten Nachbarkerne.

Abbildung 8.3 zeigt die Hyperfeinaufspaltung durch Wechselwirkung eines ungepaarten Elektrons ($S = 1/2$) mit einem ^{14}N -Kern mit $I = 1$. Die ESR-Linie spaltet in drei Linien auf und die jeweilige Resonanz erfolgt bei dem durch Gl. [8.10] gegebenen Feld:

$$[8.10] \quad B_{res} = B_0 - a \cdot m_I$$

Dabei gibt der Faktor a den Abstand der Hyperfeinlinien an und wird als Hyperfeinkopplungskonstante bezeichnet.

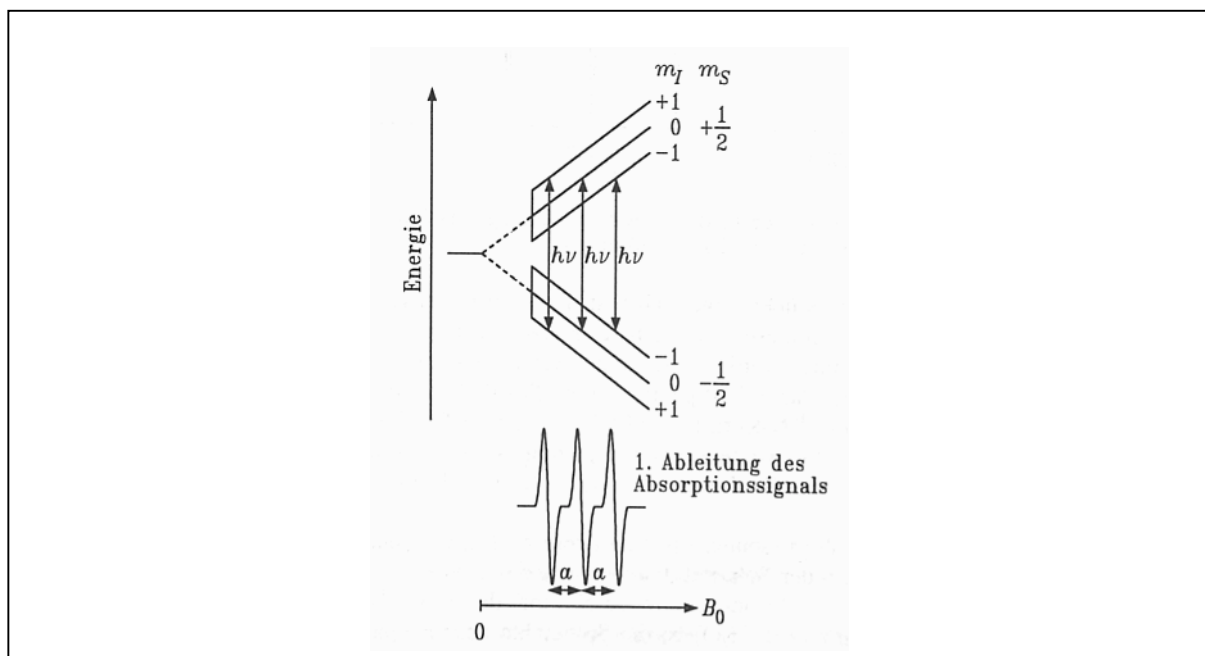


Abb. 8.3 Hyperfeinaufspaltung durch Wechselwirkungen eines freien, ungepaarten Elektrons ($S = 1/2$) mit dem magnetischen Moment eines ^{14}N -Kernspins ($I = 1$). Es gelten die Auswahlregeln $\Delta m_S = \pm 1$ und $\Delta m_I = 0$.

Die Hyperfeinstruktur, die Zahl und Intensität der Linien ergibt sich also aus der Zahl der Nachbarkerne und deren Spinquantenzahlen. In den meisten organischen Radikalen wird das freie Elektron durch p- oder π -Funktionen beschrieben. Bei solchen Systemen werden vorwiegend Kopplungen mit direkt benachbarten Kernen (α -Kopplungen) oder Kernen, die eine σ -Bindung weiter entfernt sind (β -Kopplung), beobachtet.

Die Hyperfeinkopplungskonstante a ist genauso wie der g -Faktor bei paramagnetischen Molekülen oder Ionen abhängig von der Orientierung zum äußeren B_0 -Feld. Können sich die Moleküle in Lösung schnell drehen, mittelt sich die Anisotropie von g und a heraus und man erhält isotrope Mittelwerte, die sich als drei scharfe Linien wie in Abbildung 8.3 zeigen.

Darüber hinaus ist besonders die Hyperfeinkopplungskonstante von der Polarität des Lösungsmittel abhängig, da diese die Elektronendichte in der Umgebung des Elektrons beeinflusst.

8.2 Paramagnetische Sonden (Spin-Label)

Die meisten Biomoleküle wie Proteine und vor allem Nucleinsäuren weisen kein paramagnetisches Zentrum auf. Ausnahmen bilden radikalische Übergangszustände, durch ionisierende Strahlung entstehende Zwischenprodukte sowie Metalloproteine, die ein paramagnetisches Übergangsmetallatom (im wesentlichen Fe, Mn, Cu, Co, Ni, Mo) in ihrer Struktur beinhalten.

Zur Untersuchung von im nativen Zustand diamagnetischen Biomolekülen muss eine paramagnetische Sonde (Spin-Label) in das Molekül eingeführt werden. Dieser Spin-Label muss drei wichtige Kriterien erfüllen:

- Er muss bei den Untersuchungsbedingungen chemisch stabil sein.
- Er muss interpretierbare Spektren liefern, die die Aufklärung der gegebenen Fragestellung ermöglichen.
- Die Störung des Systems sollte ausgeschlossen oder nur minimal sein. („One must ensure, that the reporter group is *reporting* the news, not *making* the news“)

Als Sonden haben sich verschiedene Nitroxide bewährt. Sie besitzen ein radikalisches Zentrum an der N-O Bindung, wobei das freie Elektron im wesentlichen in einem 2p-Orbital des Stickstoffs lokalisiert ist.

Durch flankierende Gruppen, die das paramagnetische Zentrum sterisch abschirmen, ist das Radikal je nach Wahl der Gruppen über Tage und Wochen stabil. Nitroxide vertragen darüber hinaus meist Temperaturen bis zu 80°C und sind in einem pH-Bereich von 3-12 in der Regel chemisch inert. Abbildung 8.4 zeigt einige Spin-Label, die häufig zur paramagnetischen Markierung von Proteinen und Nukleinsäuren eingesetzt worden sind.

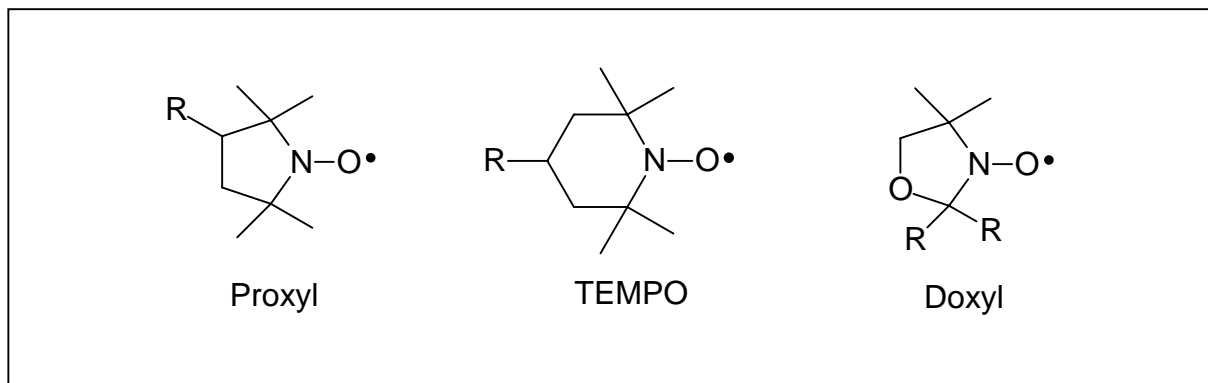


Abb. 8.4 Häufig verwandte Nitroxide: 2,2,5,5-Tetramethylpyrrolin-*N*-oxyl (Proxyl), 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-*N*-oxyl (TEMPO) und 4,4-Dimethyloxazolidin-*N*-oxyl (Doxyl). R steht jeweils für die kovalente Anknüpfung an ein Biomolekül

Das ESR-Spektrum dieser Nitroxide zeigt ein erwartete Dreilinienaufspaltung. Neben der ^{14}N -Kopplung ist eine weitere schwache Feinaufspaltung erkennbar, die durch die Wechselwirkung mit ^{13}C -Kernen ($I = 1/2$, natürliche Häufigkeit 1,1%) entsteht. Abbildung 8.5 zeigt ein EPR-Spektrum von TEMPO.

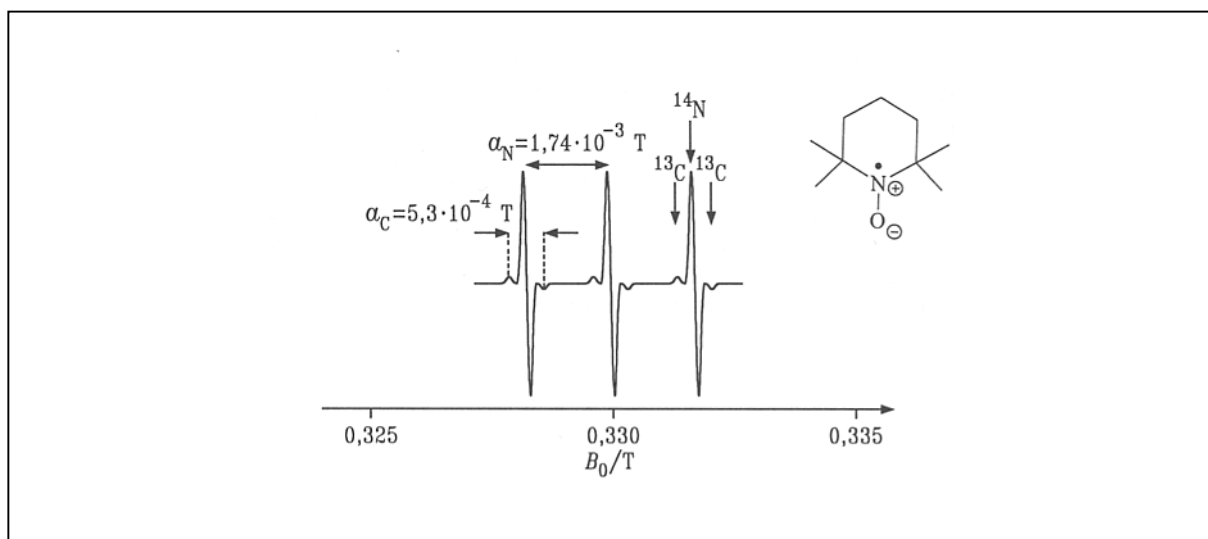


Abb. 8.5 EPR-Spektrum des Spin-Labels TEMPO in wässriger Lösung.

8.3 Spin-Labeling von Proteinen

EPR-Spektroskopie wurde zur Lösung vielfältiger Fragestellungen bei Proteinen und Peptiden eingesetzt. Durch einfachen oder mehrfachen Einbau von Spin-Labeln lassen sich vielfältige Parameter untersuchen.

So lassen sich durch die Veränderungen der Mobilität, die veränderte Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel und die veränderten Abstände zwischen den Labeln verschiedene strukturelle Informationen gewinnen:

- Die Beweglichkeit von Sekundärstrukturen wie α -Helices oder β -Faltblättern
- Veränderungen der Sekundärstruktur
- Relative Bewegungen zwischen einzelnen Domänen des Proteins

Da diese Strukturveränderungen im Millisekundenbereich ablaufen und damit im Zeitfenster der ESR-Spektroskopie liegen, können diese zeitlich verfolgt werden.

Dabei gibt es keinerlei Einschränkung für die Größe der Proteine. Für typische Messungen werden nur zwischen 50 und 100 pmol benötigt. Aufgrund dieser attraktiven Vorteile spielt die ESR-Spektroskopie bei der Strukturaufklärung und –untersuchung bei Proteinen eine sehr wichtige Rolle.

Zum Einführen der Spin-Label an definierten Positionen werden vorwiegend zwei Wege besprochen. Bei dem ersten können freie Aminopositionen genutzt werden, um einen Spin-Label über eine Amidbindung an das Protein zu binden.

Die zweite, in neueren Publikation dominierende Technik, ist die Aminosäureposition, an der ein Spin-Label eingeführt werden soll, in einer Mutagenese durch Cystein zu ersetzen.

Die kovalente Anknüpfung des Spin-Labels erfolgt dann durch die Bildung einer Disulfid-Brücke am Cystein. Abbildung 8.6 zeigt beispielhaft zwei verschiedene Kupplungsreaktionen.

Eine Übersicht über die verschiedensten Anwendung des Spin-Labelings bei Proteinen geben Hustedt & Beth, 1999 und Hubbell *et al*, 2000.

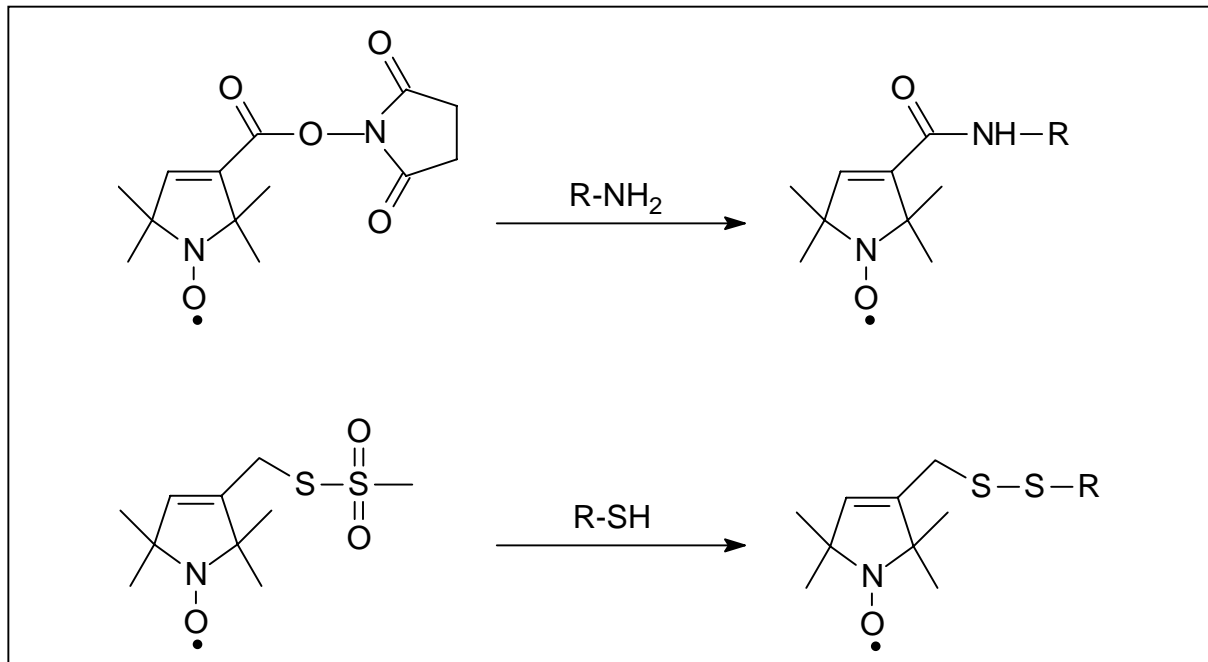


Abb. 8.6 Zwei Kupplungsreaktionen für das Labeln von Proteinen. Ein Succinimid-Spin-Label für die Knüpfung einer Amidbindung sowie einen Methanthiosulfonat-Spin-Label für eine Disulfidverknüpfung

Als besonders wertvoll hat sich die ESR-Spektroskopie bei Membranproteinen erwiesen. Diese sind nur sehr schwer zu kristallisieren und stellen eine besondere Herausforderung dar. Als sehr erfolgreiches Beispiel für den Einsatz der ESR-Spektroskopie sei hier das oft als Modell-Membranprotein beschriebene Rhodopsin erwähnt.

Rhodopsin ist ein membranständiger, G-Protein gekoppelter Photorezeptor in der Retina. Durch Lichtadsorption des 11-cis-Retinal-Chromophors verändert sich die Proteinstruktur und es erfolgt eine Aktivierung des Rezeptors. Rhodopsin weist sieben Transmembranhelices auf. Zwar war die grobe Struktur bekannt, doch konnten mit Hilfe der ESR-Spektroskopie weitere Details über die Topographie einzelner Domänen gewonnen werden. So ist es möglich, dass einzelne Bereiche sich innerhalb der Proteinmatrix befinden, in der Membran liegen oder Kontakt zur wässrigen Lösung haben. Hierzu wurden Mutanten hergestellt, die einzelne Cysteine an ausgewählten Positionen besitzen und mit Spin-Labeln versehen waren.

Die Lage dieser einzelnen Spin-Label wurde durch die sogenannte Spin-Label Relaxometrie bestimmt. Dabei wird die Veränderung der Relaxationszeit der Spin-Label beobachtet, wenn diese mit anderen paramagnetischen Substanzen wechselwirken. Bei Membranproteinen werden oft Sauerstoff und Chromoxalat als paramagnetische Substanzen zugesetzt.

Während Sauerstoff sowohl in den Membranlipiden als auch in der wässrigen Lösung löslich ist, findet sich Chromoxalat nur in der wässrigen Lösung. Beide Substanzen können nicht in für die Messung signifikanten Mengen in das Innere des Proteins penetrieren. So lassen sich durch Zugabe von Sauerstoff und Chromoxalat und der Beobachtung der Veränderung der Relaxationszeiten sehr genau die Lokalisation des Spin-Label tragenden Cysteine bestimmen.

8.4 Spin-Labeling von Nukleinsäuren

DNA und vor allem RNA zeigen eine große strukturelle Vielfalt, die stark mit ihrer biologischen Funktion verknüpft ist. Die Untersuchung und Charakterisierung der vielfältigen komplexen Strukturen und Struktur-Wirkungsmechanismen sind bis heute eine schwierige Herausforderung geblieben. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und des großen Zeitfensters scheint es besonders attraktiv, das Potenzial der ESR-Spektroskopie auch zur Untersuchung von Nukleinsäuren einzusetzen.

Im nativen Zustand sind Nukleinsäuren allerdings diamagnetisch. Ähnlich wie Proteine ohne ein metallisches Zentrum müssen auch Nukleinsäuren mit einer paramagnetischen Sonde versehen werden.

Als Positionen für eine kovalente Anknüpfung von Spin-Labeln wurde in bisherigen Arbeiten vorwiegend die 5-Position der Pyrimidine genutzt. Terminal kann auch die 3'- bzw. 5'- Position der Zucker markiert werden. Bei der Untersuchung von RNA bietet sich zusätzlich die 2'-Position an. Neben dem Verknüpfungspunkt und der zugrundeliegenden Chemie gibt es verschiedene Strategien, zu welchem Zeitpunkt sich der Spin-Label einführen lässt.

So kann zunächst ein paramagnetischer Baustein synthetisiert werden, der dann mittels chemischer oder enzymatischer Synthese in ein Oligonukleotid eingebaut werden kann. Der Spin-Label kann aber auch während oder nach der Oligonukleotidsynthese angekuppelt werden.

Die Wahl der Strategie richtet sich nach der verwendeten Chemie und der Stabilität des Labels bei den Synthese- und Aufreinigungsbedingungen für das Oligonukleotid.

Abbildung 8.7 zeigt die kovalente Anknüpfung eines Nitroxids an die 5-Position von 2'-Desoxycytidin, welches als Triphosphat vorliegt. Dieser Baustein lässt sich durch enzymatische Synthese in Oligonukleotide inkorporieren. Der über eine Amidbindung fixierte

Label zeigte sich auch bei den erhöhten Temperaturen einer T_m -Messung als stabil. Dieser Baustein wurde in Stränge eingebaut, die bei verschiedenen Salzkonzentrationen als B- oder Z-DNA vorliegen. Zum einen konnten die verschiedenen Konformationen im ESR-Spektrum deutlich unterschieden werden, zum anderen konnten Informationen über eine verlangsamte Dynamik der Basen bei Z-DNA gegenüber B-DNA gewonnen werden (Strobel *et al.* 1990).

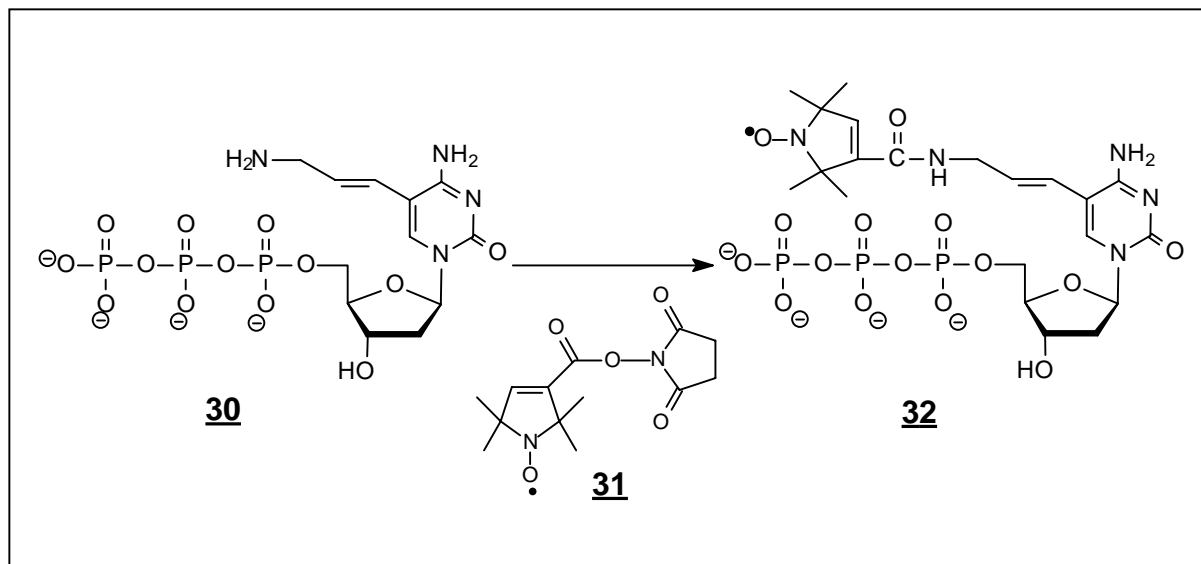


Abb. 8.7 Einführung eines Spin-Labels an 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat für die enzymatische Synthese von DNA

Das gleiche Verfahren für das Spin-Labeln eines entsprechenden Thymidinbausteins wurde benutzt, um die Konformationsänderungen eines DNA-Stranges bei der spezifischen Bindung an eine *EcoR1* Endonuklease zu untersuchen.

Dabei wurde der Baustein an verschiedenen Positionen eingebaut und mittels EPR-Spektroskopie die Veränderung der Mobilität bei der Titration mit dem Enzym beobachtet (Keyes *et al.*, 1996).

Die Verwendung von Enzymen zum Einbau spin-gelabelter Bausteine kann sowohl Templat-unabhängig mit Phosphorylasen oder terminalen Desoxynukleotidtransferasen oder Templat-abhängig mit Reversen Transkriptasen oder Polymerasen vollzogen werden (Duh & Bobst, 1991).

Allerdings lässt sich so nicht eine Sequenz beliebiger Länge darstellen, sondern ist von dem jeweiligen Enzym anhängig. Des weiteren ist ein erfolgreicher Einbau von der Natur des Labels abhängig.

Gerade bei kürzeren Oligonukleotiden, bei dem der Label an verschiedenen definierten Positionen eingebaut werden soll, ist die chemische Synthese der enzymatischen überlegen.

Da die in Abb. 8.7 gezeigte amidische Bindung des Spin-Labels bei den Abspaltungsbedingungen für die Schutzgruppen während der Aufreinigung nicht stabil ist, muss bei der chemischen Synthese eine andere Verknüpfungsart gewählt werden. Es ist möglich, den Spin-Label über eine Dreifachbindung an der 5-Position von 2'-Desoxyuridin zu fixieren.

Neben der Stabilität der Bindung ist der Label durch die enge Fixierung über eine starre Dreifachbindung an die Base sehr immobil und wird vorwiegend nur noch um seine Achse rotieren. Durch diese Einschränkung der eigenen Beweglichkeit ist der Label eine empfindliche Sonde, um eine Aussage über die Mobilität innerhalb des untersuchten Oligonukleotids zu gewinnen.

Der Spin-Label wird mittels einer Palladium-katalysierten Reaktion (Sonogashira-Kupplung) auf der Stufe des Nucleosids eingeführt (Abb. 8.8).

Das gelabelte Nucleosid muss entsprechend geschützt werden und kann in der Festphasensynthese nach der Phosphoramidit-Methode eingebaut werden. Dabei zeigt sich, dass der Label sowohl bei der Synthese als auch bei der Abspaltung der Schutzgruppen sowie der Aufreinigung stabil ist. (Spaltenstein *et al.*, 1989).

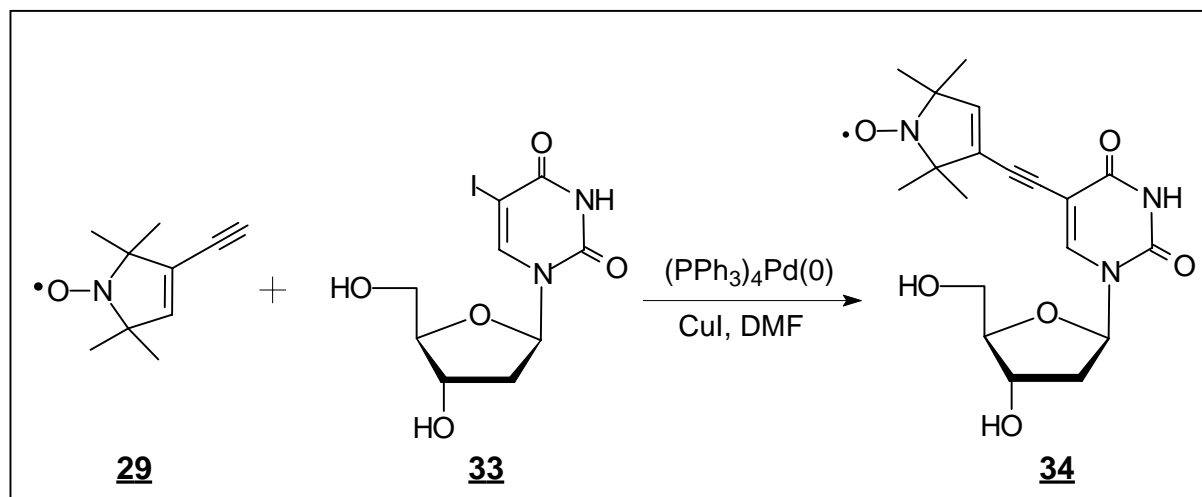


Abb. 8.8 Kupplung des Spin-Labels an die 5-Position mit Hilfe einer Sonogashira-Kupplung

Eine weitere Methode für das Spin-Labeling an der 5-Position und chemischen Oligonukleotidsynthese haben Duh und Bobst vorgestellt. Sie haben einen TEMPO-Abkömmling verwandt und zum Aufbau des Stranges die Phosphortriester-Methode verwandt.

Abb. 8.9 zeigt den Baustein der nach entsprechender Schützung eingebaut wurde (Duh & Bobst, 1991).

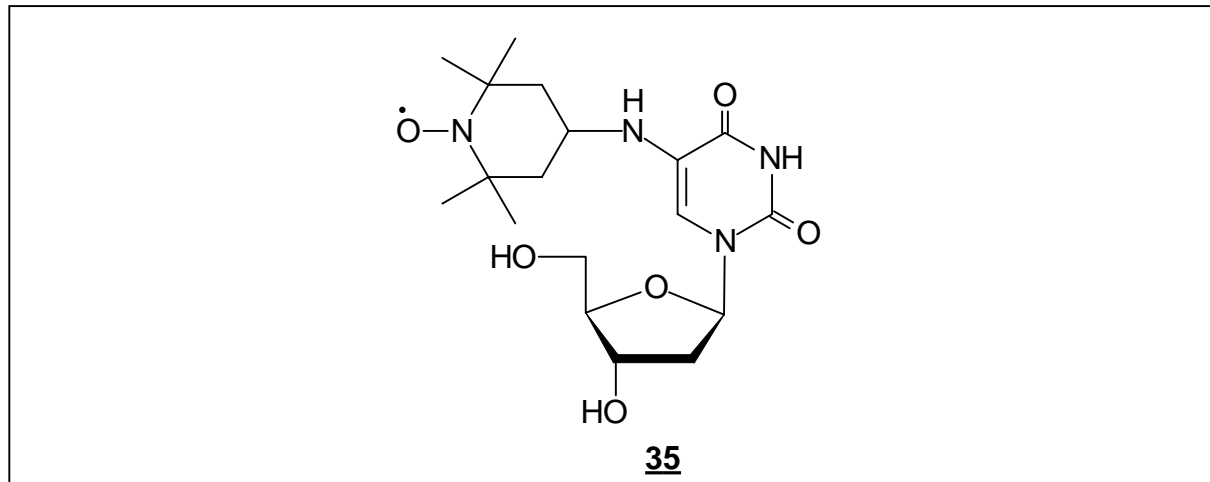


Abb. 8.9 TEMPO gelabelter 2'-Desoxyuridin Baustein

Eine weitere Möglichkeit spezifisch einen Label einzubauen, ist in Abb. 8.10 dargestellt. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden wird hier zunächst das Oligonukleotid - in diesem Falle RNA - synthetisiert, wobei an der zu markierenden Position 4-Thiouridin inkorporiert wird.

Erst nach der Synthese und Aufreinigung des Stranges wird dieser mit 3-(2-Iodoacetamido)proxyl versetzt (Ramos & Varani, 1998). Da dabei die Kupplung nicht quantitativ verläuft, schließen sich erneut Aufreinigungsprozesse an.

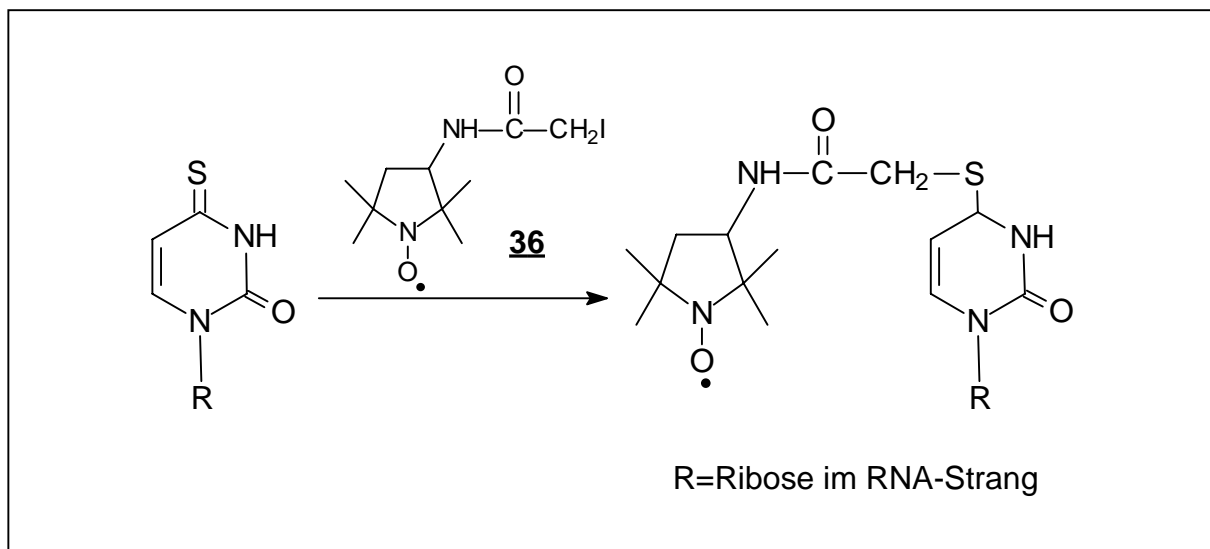


Abb. 8.10 Spin-Labeling nach der chemischen Synthese

Ein anderer Weg für das Labeling von RNA haben Macosko *et al.* vorgestellt (Macosko *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich ebenfalls um ein Verfahren, bei dem der Label nach der

Oligonukleotidsynthese eingeführt wird. Über ein DNA-Templat wird mit T7-Polymerase ein RNA Strang aufgebaut. Neben dem üblichen Guanosintriphosphat wurde auch Guanosinmonophosphorthioat bei der enzymatischen Synthese zugesetzt, welches am Ende des Stranges eingebaut werden soll.

Nach Gelaufreinigung und Isolation der modifizierten Stränge wird der S-(1-Oxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat Spin-Label **37** kovalent über eine Disulfidbindung angekuppelt (Abb. 8.11).

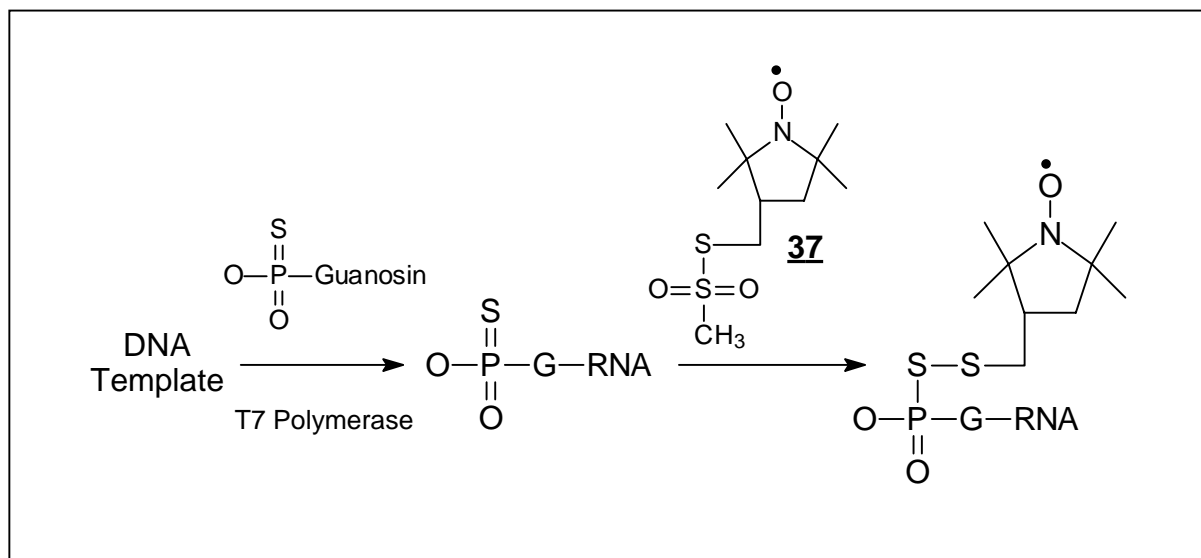


Abb. 8.11 Spin-Labeling Strategie durch Einbau von Guanosin-monophosphorthioat

Als letzte Methode sei das Labeling an der 2'-Position von RNA-Oligonukleotiden angeführt. Hierbei wird 2'-Aminouridin in das RNA-Oligonukleotid eingebaut. Die RNA wird entschützt und mit einem TEMPO-Isocyanat-Derivat **38** versetzt (Abb.8.12). Dieses ist so reaktiv, dass die RNA danach in einer Ausbeute von mehr als 90% gelabelt vorliegt (Edwards *et al.*, 2001)

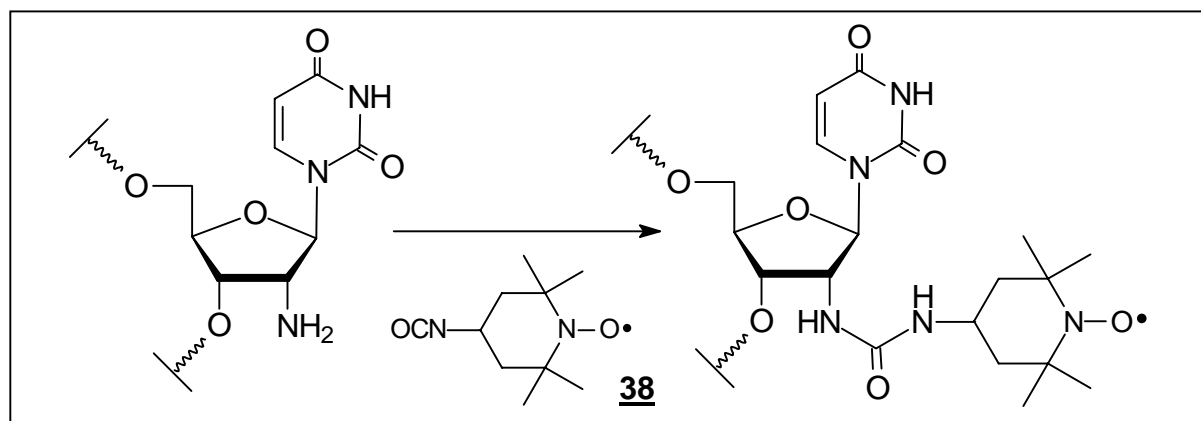


Abb. 8.12 Spin-Labeling eines RNA-Stranges an der 2'-OH Funktion

Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein sehr einfaches und effektives Verfahren für das Spin-Labeln von RNA. Allerdings ist die 2'-OH Funktion von RNA für das Ausbilden der vielfältigen Strukturen der RNA essenziell. Durch das Anbringen des Labels an dieser Position kann die Ausbildung der nativen Sekundär- und Tertiärstrukturen gestört werden, was erhaltene Messergebnisse in Frage stellen mag.

9 Eine neue Methode für das Spin-Labeling von Oligonukleotiden

9.1 Konzeption

Um die vielfältigen Möglichkeiten der ESR-Spektroskopie für die Strukturaufklärung von Nucleinsäuren nutzen zu können, ist es erforderlich, Verfahren zu entwickeln, die eine einfache, effiziente und schnelle Synthese von gelabelten Oligonukleotiden ermöglichen.

Die Schwierigkeiten, die das Labeln von Oligonukleotiden mit sich bringt, sind sicherlich einer der Hauptgründe warum die ESR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von Nucleinsäuren bei weitem noch nicht den Stellenwert eingenommen hat wie bei Proteinen.

Das Spin-Labeling sollte so konzipiert sein, dass die eingeführten Label, sowohl für Abstandsmessungen als auch für die Untersuchungen von Moleküldynamiken geeignet sind. Ferner sollten sie kovalent gebunden und in einem pH-Bereich von 4-12 stabil sein.

Der von Spaltenstein *et al.* (1989) verwendete Spin-Label **29** scheint hierzu geeignet (Abb. 8.8). Er wird über eine Dreifachbindung an die 5-Position kovalent gebunden. Die Starrheit des Labels wird durch die Doppelbindung im Ring weiter erhöht. Im Gegensatz zu den sechsgliedrigen Ringen ist der Fünfring kleiner und minimiert die Störung der untersuchten Strukturen.

Gerade im Hinblick auf die Untersuchung von RNA ist die Verknüpfung an der 5-Position der Verknüpfung an der 2'-Position vorzuziehen, da die 2'-Position der RNA als Wasserstoffbrückendonator bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen eine wichtige Rolle spielt.

Spaltenstein *et al.* hat die Anknüpfung mittels einer Sonogashira-Kupplung auf der Ebene des ungeschützten Nucleosids vollzogen und anschließend das Phosphoramidit dargestellt. Nachteil dieser Methode ist die nötige Menge des Labels und die vergleichsweise schlechten Ausbeuten bei der Darstellung des Phosphoramidits. yBei der Festphasensynthese wird das

Amidit darüber hinaus üblicherweise in einem 100-fachen Überschuss zugegeben, was einen weiteren Substanzverlust bedeutet.

Dieses Verfahren ist für die Darstellungen von RNA-Bausteinen ungeeignet, da beim Schützen der 2'-Position noch einmal ein hoher Prozentsatz der unerwünschten 3'-silylierten Verbindung anfällt.

Durch die schlechten Ausbeuten bei der Darstellung der Phosphoramiditbausteine werden pro markierter DNA-Base ca. 50 mg Spin Label benötigt.

In dieser Arbeit ist ein Verfahren entwickelt worden, dass die kovalente Anknüpfung des Spin-Labels **29** während der Festphasensynthese vollzieht. Die Sonogashira-Kupplung wird direkt auf der Säule durchgeführt („on-column-derivatisation“).

Dabei wird pro Kupplung je nach verwendetem Katalysator nur 1-2 mg des Spin-Labels verbraucht. Als Nukleotidbausteine sollen 2'-Desoxy-5-ioduridin **39** für DNA und 5-Ioduridin **40** für RNA synthetisiert und inkorporiert werden. Abbildung 9.1 zeigt die zu synthetisierenden Bausteine.

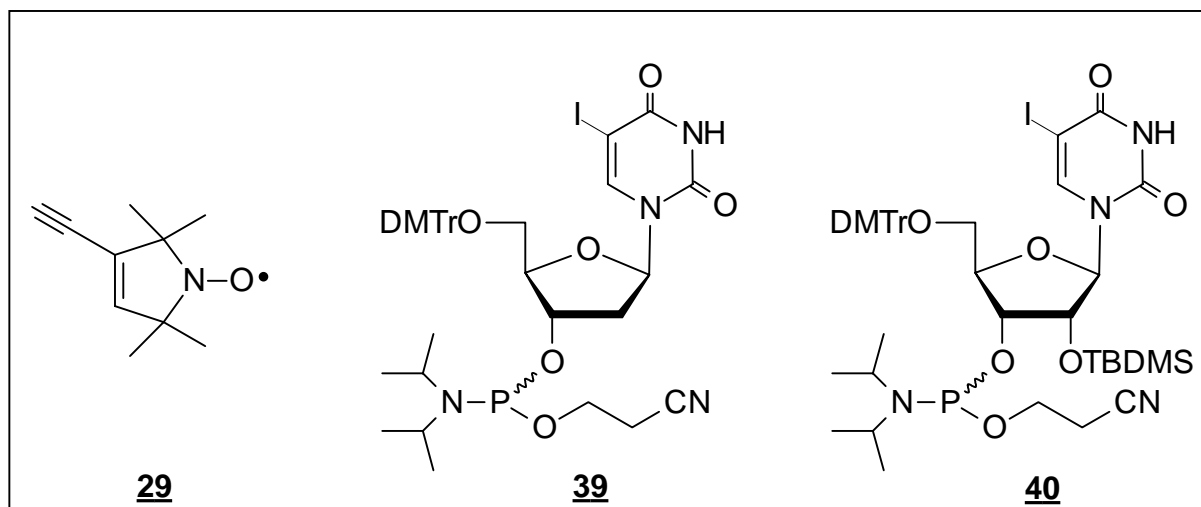


Abb. 9.1 Bausteine für das Spin-Labeln auf der Säule

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bilden die geeigneten Bedingungen und Arbeitsschritte für eine erfolgreiche und effiziente Sonogashira-Kupplung auf der Säule.

Abschließend müssen Aufreinigungsbedingungen getestet und analytische Methoden zur Untersuchung der synthetisierten Stränge getestet werden. Neben der ESR-Spektroskopie und Massenspektrometrie sollen die Stränge durch enzymatische Hydrolyse analysiert werden.

9.2 Synthese des Spin-Labels 29

9.2.1 Darstellung von (3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on)hydrobromid 42

Der Spin Label 19 ist nicht kommerziell erhältlich. Als Ausgangssubstanz für die Synthese wurde 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-on 41 eingesetzt. Dieses ist preiswert in größeren Mengen erhältlich. Verbindung 41 wurde in Essigsäure gelöst und durch Zutropfen von Brom in α - und α' -Position bromiert (Abb. 9.2).

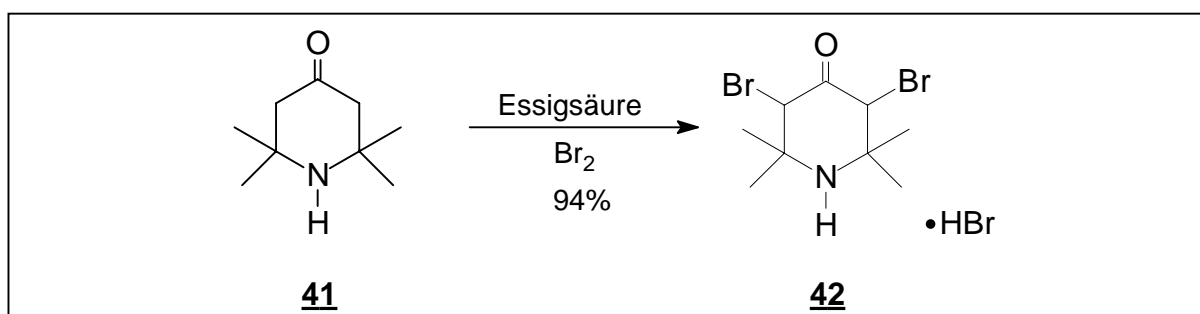


Abb. 9.2 Bromierung von Verbindung 41

Das Produkt fällt als grauer Feststoff während der Reaktion als Hydrobromid in 94%iger Ausbeute aus und kann nach dem Absaugen und Trocknen ohne Aufreinigung eingesetzt werden. Abbildung 9.3 zeigt ein ESI-Massenspektrum, in dem die verschiedenen Peaks zu sehen sind, die sich durch die Kombination der Massen der verschiedenen Bromisotope ergeben.

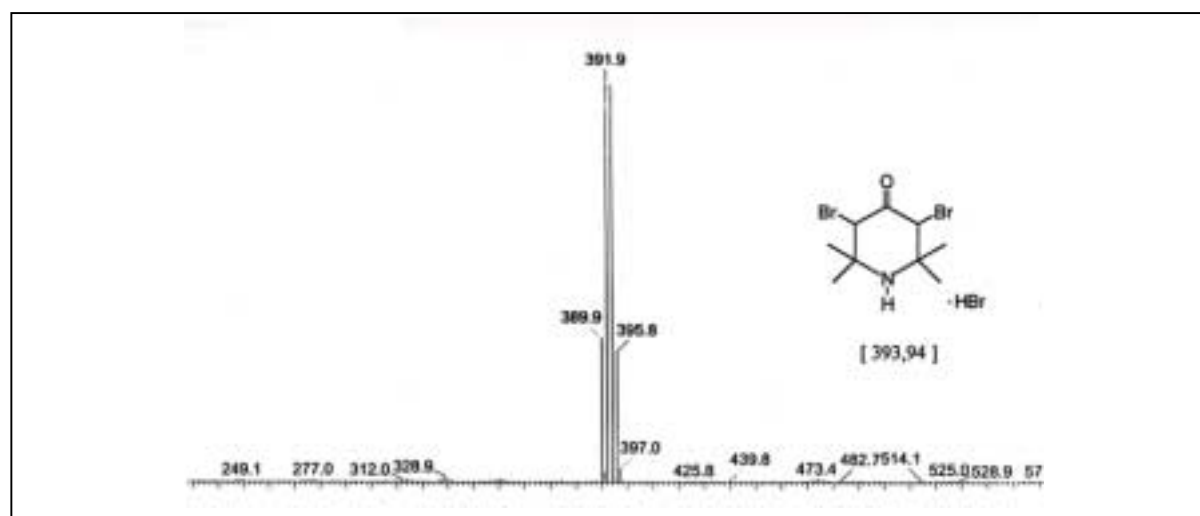


Abb. 9.3 ESI-Massenspektrum von 42 mit Isotopenaufspaltung

9.2.2 Darstellung von 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxamid **43**

Durch eine Favorskii-Umlagerung der Verbindung **42** wird ein Pyrrolin-Derivat erhalten. In dieser Reaktion werden dabei zwei strukturelle Merkmale der Zielverbindung realisiert. Zum einen bildet sich ein Fünfring, zum anderen wird die Doppelbindung innerhalb des Ringes aufgebaut.

Das Hydrobromid **42** wurde mit konzentriertem Ammoniak versetzt und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Bei der Zugabe kommt es zu einer starken Wärmeentwicklung, was eine langsame und vorsichtige Zugabe erforderlich macht. Durch die Sättigung mit Kaliumhydroxid wurde Verbindung **43** ausgefällt. Nach dem Trocknen erhält man das Produkt als einen hellbraunen Feststoff in 81%iger Ausbeute (Abb. 9.4).

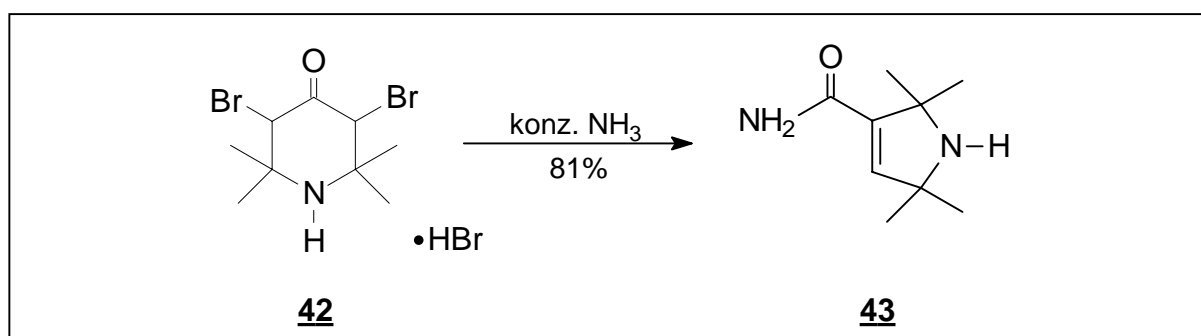


Abb. 9.4 Favorskii-Umlagerung zu Verbindung **43**

Der Mechanismus der Favorskii-Umlagerung ist in Abbildung 9.5 gezeigt. Zunächst wird basenkatalysiert ein Proton in α -Position abgespalten, was einen nukleophilen Angriff auf die α' -Position zur Folge hat. Es bildet sich intermediär neben dem vorhandenen Sechsring ein Fünfring aus. Durch einen nukleophilen Angriff des Ammoniaks auf den Carbonylkohlenstoff wird der Sechsring geöffnet. Im basischen Medium kommt es unter Eliminierung von HBr zur Ausbildung der Doppelbindung.

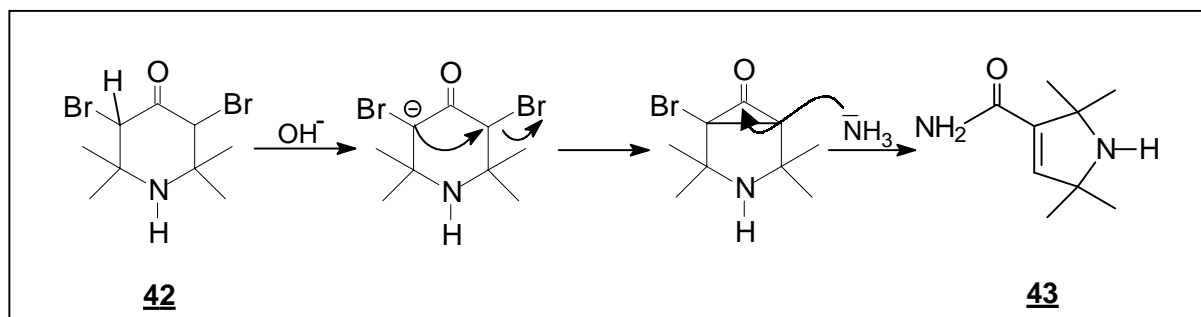


Abb. 9.5 Mechanismus der Favorskii-Umlagerung

9.2.3 Oxidation der Aminofunktion zum Nitroxid

Für die Oxidation der Aminofunktion stehen mehrere Methoden zur Auswahl.

In dieser Arbeit kamen zwei Methoden zur Anwendung (Abb. 9.6). Verbindung **43** wurde in Wasser suspendiert und mit Titriplex® II versetzt. Dieses enthält EDTA, welches bei der Reaktion störenden Metallionen, vor allem Eisenionen, komplexiert.

Die Oxidation wurde durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (30%ige Lösung) und Natriumwolframat-Dihydrat durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 Tage unter gelegentlichem Umrühren unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dabei fällt 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **44** als kristalline gelbe Substanz aus (Rozantzev & Krinitzkay, 1964; Groesbeek & Lutgenburg, 1995). Die Ausbeute beträgt 62%. Die Charakterisierung erfolgte durch Bestimmung des Schmelzpunktes, Elementaranalyse, Massenspektrometrie sowie ¹H-NMR-Spektroskopie. Nachteil dieser Methode ist neben der etwas geringeren Ausbeute die lange Reaktionszeit.

Nahezu quantitative Ausbeuten liefert die Reaktion mit Dimethyldioxiran **45**. Das Amin wurde in Aceton gelöst und eine Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton unter Eiskühlung langsam hinzugegossen. Dabei lässt sich eine Gelbfärbung der Lösung beobachten. Nach der Zugabe wurde noch eine halbe Stunde bei Raumtemperatur weiter gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Aceton evaporiert und das Nitroxid **44** in 99%iger Ausbeute erhalten. Es konnte ohne weitere Aufreinigung in den nächsten Synthesestufen eingesetzt werden. Obwohl diese Methode zur Oxidation quantitative Ausbeuten liefert und verglichen mit der ersten Methode nur eine sehr kurze Reaktionszeit erfordert, ist sie nur für kleine Ansatzmengen geeignet. Das Oxidationsmittel Dimethyldioxiran **45** muss vor der Oxidation in einer apparativ aufwendigen Synthese dargestellt werden und ist nur höchstens zwei Tage haltbar. Darüber hinaus lassen sich im Labormaßstab nur vergleichsweise geringe Mengen Dimethyldioxiran **45** darstellen.

9.2.3.1 Darstellung von Dimethyldioxiran **45**

Die Darstellung von Dimethyldioxiran erfolgte in einem 4l-Rundkolben, in dem Wasser, Aceton und Natriumhydrogencarbonat unter Eiskühlung vorgelegt werden. Über eine Pulverschnecke wird Caroot® (Kaliummonopersulfat Tripelsalz $2 \text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$) unter starkem Rühren mit einem KPG-Rührer in mehreren Portionen hinzugegeben. In einem

schwachen Vakuum werden in einen auf -78°C gekühlten Vorlagekolben ca. 150 ml abdestilliert. Das gelbliche Destillat enthält eine ca. 80mmolare Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton, die mit Kaliumcarbonat getrocknet und über Molsieb bei -20°C kurze Zeit lagerfähig ist (Adam *et al.*, 1991).

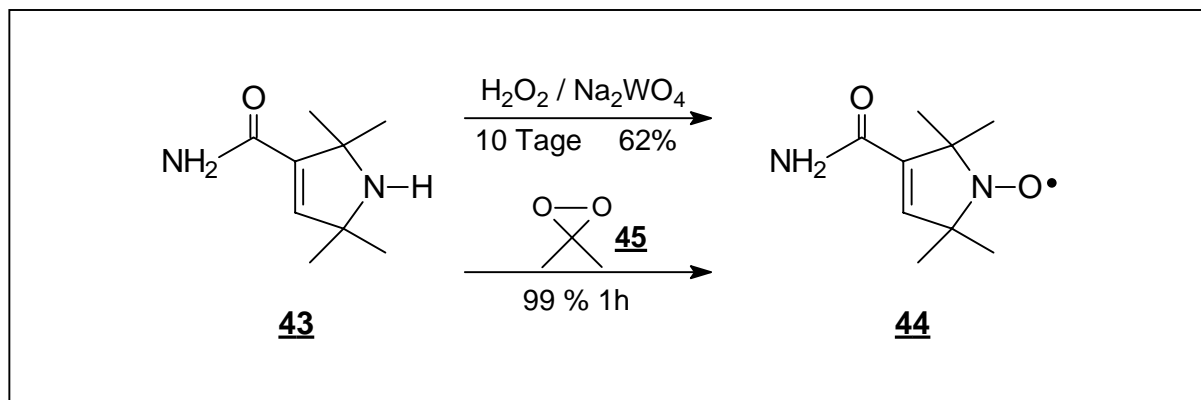


Abb. 9.6 Darstellung des Nitroxids **44** nach zwei verschiedenen Oxidationsmethoden

9.2.4 Hydrolyse des Nitroxids **44**

Während die Nitroxidfunktion von Verbindung **44** unter stark sauren Bedingungen instabil ist (Couet *et al.* 1985), ist sie im basischen Medium inert. Dieses erlaubt die Hydrolyse der Amidfunktion in 10%iger Natriumhydroxidlösung (Abb.9.7).

Verbindung **44** wurde in 10%iger wässriger Natriumhydroxidlösung suspendiert und eine halbe Stunde unter Rückfluss erhitzt. Bei der Neutralisation mit halbkonzentrierter Salzsäure fällt Verbindung **46** als gelblicher Feststoff aus.

Um nicht ausgefallenes Produkt vollständig zu isolieren, wurde die wässrige Phase mit Ether ausgeschüttelt und evaporiert. Die Ausbeute betrug 96%. Die Charakterisierung erfolgte durch Bestimmung des Schmelzpunktes, Elementaranalyse und Massenspektrometrie.

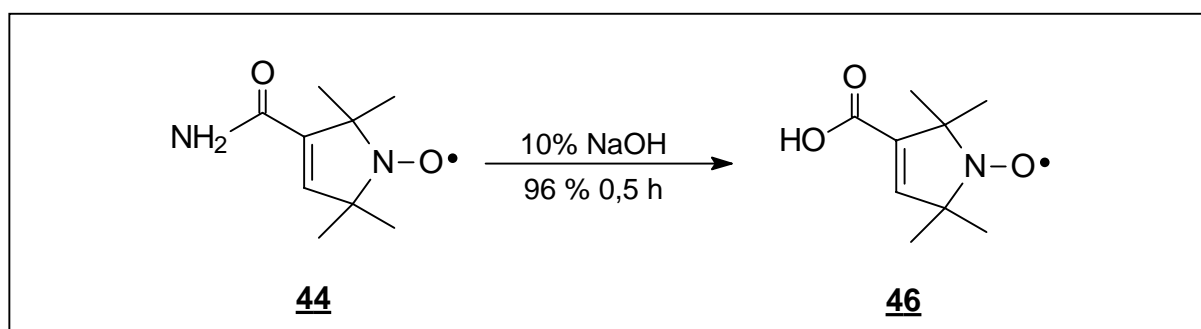


Abb. 9.7 Hydrolyse von **44** mit 10%iger Natriumhydroxidlösung

9.2.5 Strategien zur Darstellung des Aldehyds **48**

Zur Darstellung des Aldehyds **48** wurden verschiedene Methoden getestet. Die Nitroxid-Gruppe schränkt die üblichen Reduktionsmethoden ein, da sie gegenüber Reduktionen sehr empfindlich ist und die Reaktionen oft zu einer Zersetzung des Edukts geführt haben. Eine direkte Reduktion mit DIBALH war nicht erfolgreich und führte selbst bei niedrigen Temperaturen zu einer Reduktion des Nitroxids.

Hideg *et al.* (1980) beschreibt die Synthese des Aldehyds zunächst durch Reduktion zum entsprechenden Alkohol mit Natrium-bis-[2-methoxyethoxy]-aluminiumdihydrid und anschließende Oxidation mit Mangandioxid. Der Aldehyd **48** lässt sich in ca. 44%iger Ausbeute erhalten (Abb. 9.8).

In dieser Arbeit wurde eine weitere Methode getestet, die von dem Amid **44** ausgeht. Durch Umsetzen mit POCl₃ in Pyridin wird unter Wasserabspaltung das entsprechende Nitril in quantitativer Ausbeute gewonnen. Dieses wurde bei tiefen Temperaturen mit Diisobutylaluminiumhydrid oder Lithiumtri-*tert.*-butoxyaluminiumhydrid umgesetzt. Doch trotz der tiefen Temperaturen und einer vorsichtigen Zugabe kam es nicht zur gewünschten Produktbildung (Abb. 9.8).

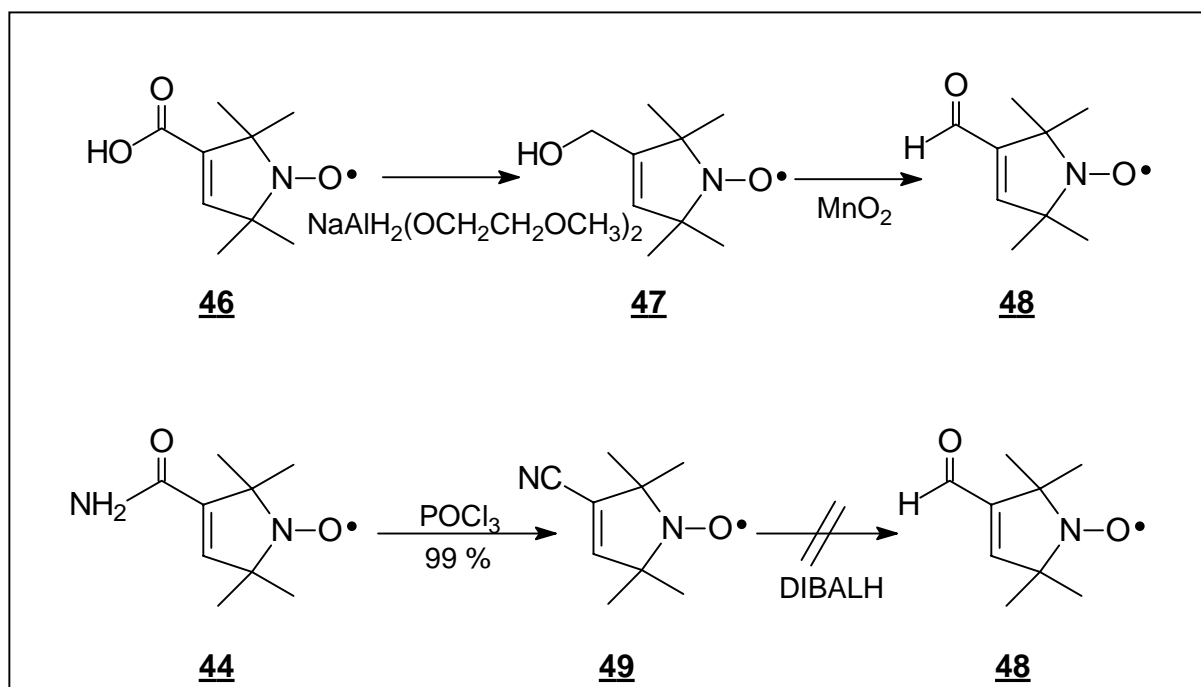


Abb. 9.8 Zwei Strategien zur Darstellung des Aldehyds **48**.

Als dritte Alternative bietet sich die Synthese eines Weinrebamids an. Dieses lässt sich in guter Ausbeute mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBALH) reduzieren.

9.2.5.1 Darstellung des Weinrebamids **50**

Die Carbonsäure **46** wurde in Dichlormethan gelöst und mit Pyridin versetzt. Durch langsames Zutropfen von Thionylchlorid wird intermediär das Säurechlorid generiert. Nun wurde *N*-Methoxy-*N*-methylamin **69** in Dichlormethan gelöst hinzugetropft. Dieses ist als Hydrochlorid kommerziell zu erwerben und lässt sich durch Erhitzen in Gegenwart von *sym*-Collidin freisetzen.

Nach dem Abfiltrieren von ausgefallenem Pyridiniumhydrochlorid und dem Waschen mit verdünnter Salzsäure wurde das Reaktionsprodukt durch pDC aufgereinigt. Das Produkt lässt sich als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 57 % gewinnen (Abb. 9.9).

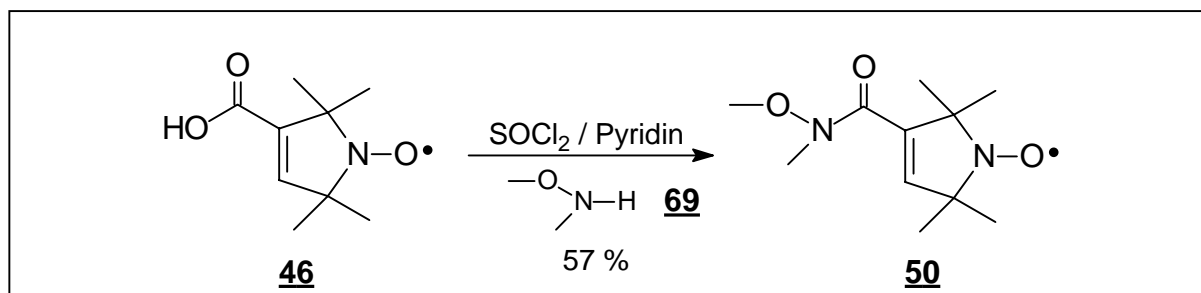
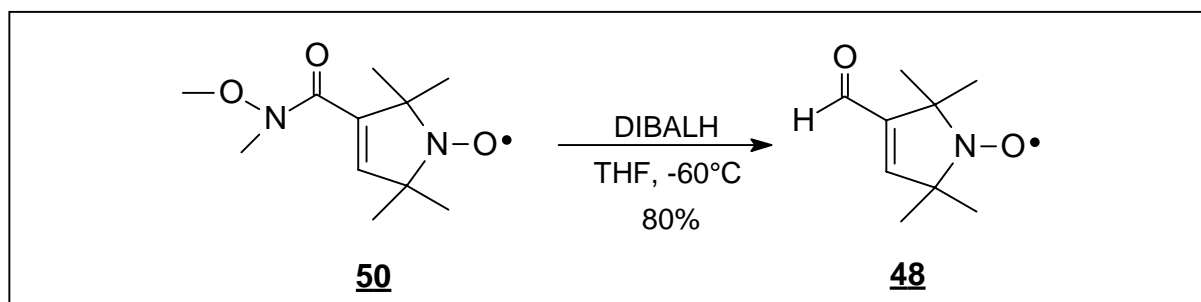


Abb. 9.9 Darstellung des Weinrebamids **50**

9.2.5.2 Reduktion des Weinrebamids **50** zum Aldehyd **48**

Das Weinrebamid **50** wird in Tetrahydrofuran gelöst und bei -60°C langsam mit DIBALH versetzt. Während diese Reaktion in Acetonitril nicht erfolgreich war, ließ sich in Tetrahydrofuran das gewünschte Produkt **48** nach Aufreinigung in 80%iger Ausbeute gewinnen (Abb. 9.10).

Bei der Hydrolyse des Aluminiumkomplexes während der Reaktion kommt es zu einer starken Wärmeentwicklung, was eine effektive Kühlung erforderlich macht. Die Charakterisierung erfolgte durch Bestimmung des Schmelzpunktes, Elementaranalyse Massenspektrometrie, sowie ^1H -NMR-Spektroskopie.

Abb. 9.10 Reduktion des Weinrebamids **50** mit DIBALH

9.2.5.3 Kristallstruktur des Aldehyds **48**

Es ist gelungen, Verbindung **48** aus Essigester in langen Nadeln zu kristallisieren. Von den Kristallen konnten Kristallstrukturen erhalten werden (Abb. 9.11).

Der Fünfring des Pyrrolins ist fast vollständig planar. Der größte Torsionswinkel innerhalb des Rings beträgt $2,2^\circ$. Die Aldehydfunktion ist coplanar mit dem Ring. Die Dimensionen der Nitroxid-Gruppe sind vergleichbar mit den Dimensionen, die in anderen strukturell ähnlichen Molekülen gefunden worden sind. Die Verbindung zeigt keine intramolekularen Kontakte.

In der Kristallpackung findet sich zwischen dem O1 (Nummerierung siehe Abb. 9.11 A) und H5 (Proton an C2) ein Abstand von $2,45 \text{ \AA}$, der nur wenig über dem van-der-Waals-Kontakt Radius zwischen O und H von $2,4 \text{ \AA}$ liegt. Einen weiteren engen Kontakt findet man zwischen O2 und einem Proton an C7. Dieser ist mit $2,58 \text{ \AA}$ ca. $0,2 \text{ \AA}$ länger als der van-der-Waals-Kontaktradius.

9.2.6 Verlängerung der Seitenkette des Aldehyds **48**

Durch die Umsetzung der Verbindung **48** mit (Chlormethyl)triphenylphosphoniumchlorid in einer Wittig-Reaktion wird die Seitenkette um eine Kohlenstoffeinheit verlängert. Das Chlorid wurde in THF vorgelegt bei -78°C mit *n*-Butyllithium in *n*-Hexan deprotoniert. Die Lösung verfärbt sich hierbei tiefrot.

Der Aldehyd **48** wurde in THF gelöst und langsam hinzugegossen. Nach dem Quenchen mit Wasser, Abtrennen der organischen Phase und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erhält man ein gelbes Öl (Abb. 9.12).

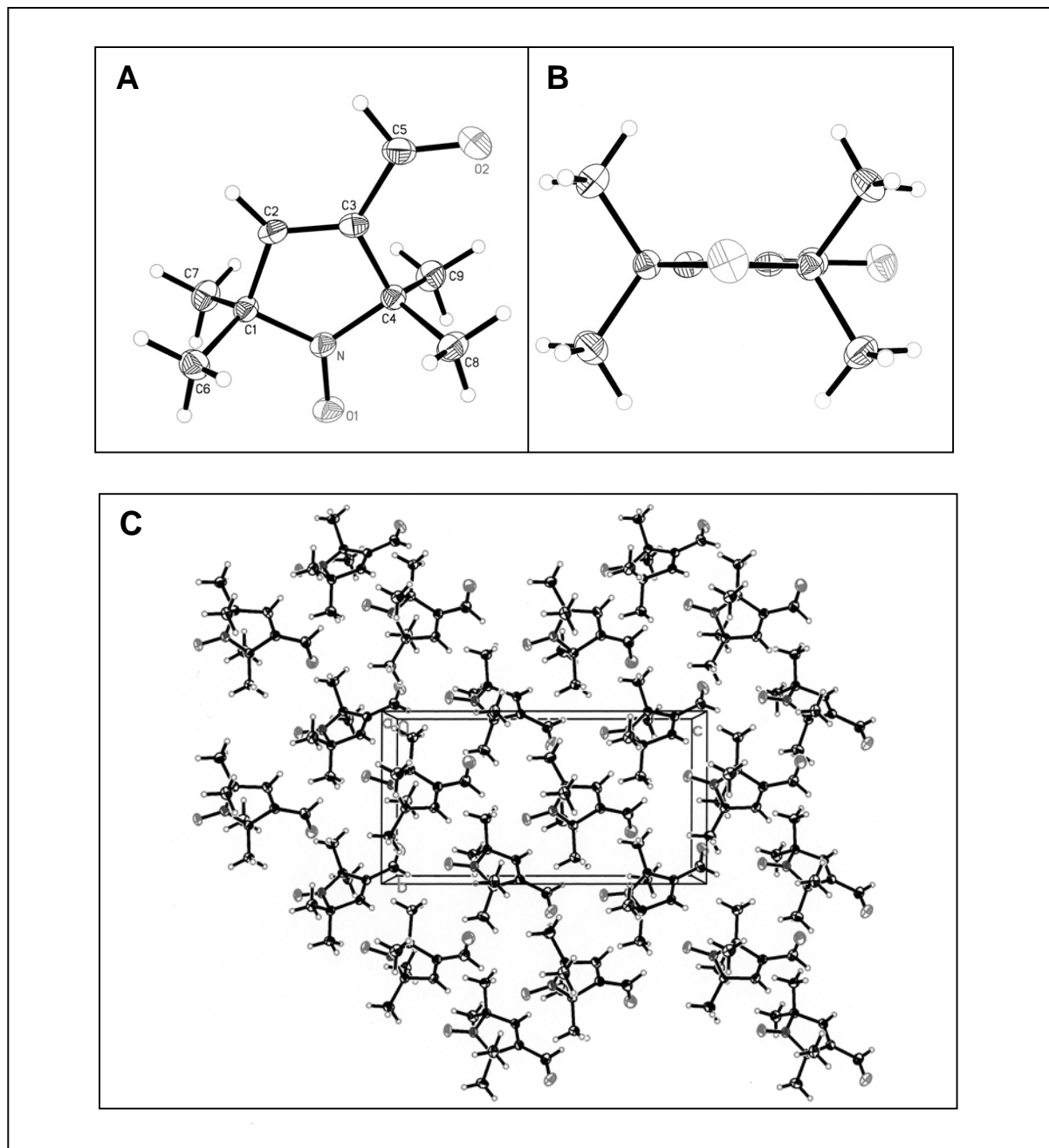
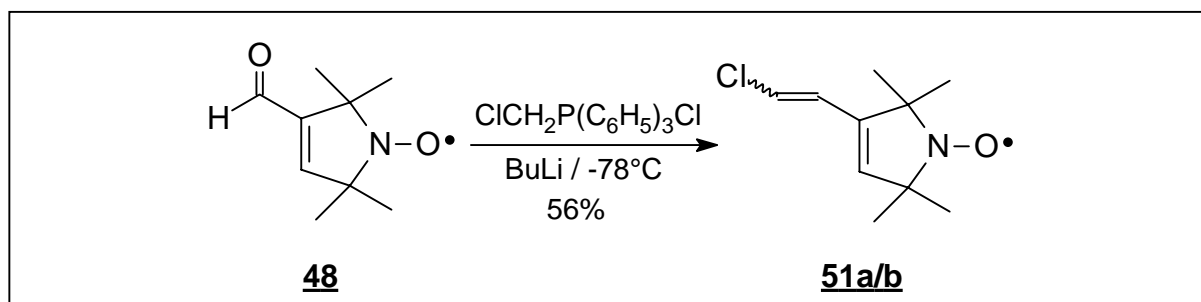


Abb. 9.11 A) Röntgenstruktur des Aldehyds **48**. B) Blick entlang der nahezu planaren Ringebene C) Kristallpackung

Das Produkt **51a/b** enthält das cis- und das trans-Isomere, die vor der weiteren Umsetzung nicht getrennt wurden. Die Ausbeute dieser Reaktion beträgt 56%. Durch Variation der Versuchsbedingungen, vor allem Reaktionszeit und -temperatur, war keine Ausbeutesteigerung zu erzielen. Die Charakterisierung erfolgte durch Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

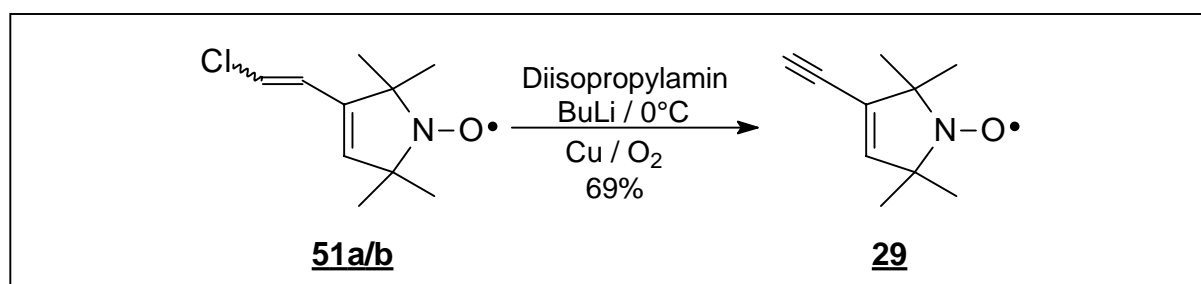
Abb. 9.12 Umsetzung von **48** in einer Wittig-Reaktion zu **51a/b**

9.2.7 Dehydrochlorierung zur Generierung des terminalen Alkins

Es wird eine basenkatalysierte Dehydrohalogenierung von Verbindung **51a/b** durchgeführt. Als Base für diese Reaktion dient Diisopropylamin, das zuvor mit *n*-Butyllithium in *n*-Hexan unter Eiskühlung deprotoniert wurde. Zu diesem Reaktionsgemisch wird langsam unter Eiskühlung Verbindung **48** in Tetrahydrofuran gelöst hinzugegeben.

Durch langsames Erwärmen auf Raumtemperatur über einen Zeitraum von 2 Stunden wird die Reaktion vervollständigt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Wasser beendet. Nach mehrfacher Extraktion mit Ether werden die organischen Phasen vereinigt, evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt.

Man erhält ein Produktgemisch, dessen Komponenten so dicht zusammenlaufen, dass sie säulenchromatographisch nicht zu trennen sind. Bei diesem Gemisch handelt es sich neben der gewünschten Zielverbindung **29** um das entsprechende Hydroxylamin.

Abb. 9.13 Darstellung der Zielverbindung **29**

Zur Reoxidation des Hydroxylamins wird das erhaltene Gemisch in Methanol gelöst, ein kleiner Kupferdraht hinzugefügt und einige Stunden Luft in die Lösung eingeleitet. Kupferionen in katalytischer Menge und Luftsauerstoff ermöglichen eine vollständige Oxidation des Hydroxylamins zum Nitroxid (DC-Kontrolle). Das Einleiten von Luft sollte nicht unnötig lange vollzogen werden, da es bei sehr langen Reaktionszeiten (>12 h) zur Bildung von Nebenprodukten kommen kann (kupferkatalysierte Kupplung der terminalen Alkine).

Das Produkt **29** wird in 69%iger Ausbeute als gelber Feststoff erhalten. Die Charakterisierung erfolgte durch Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Abbildung 9.14 zeigt eine Übersicht der einzelnen Syntheseschritte.

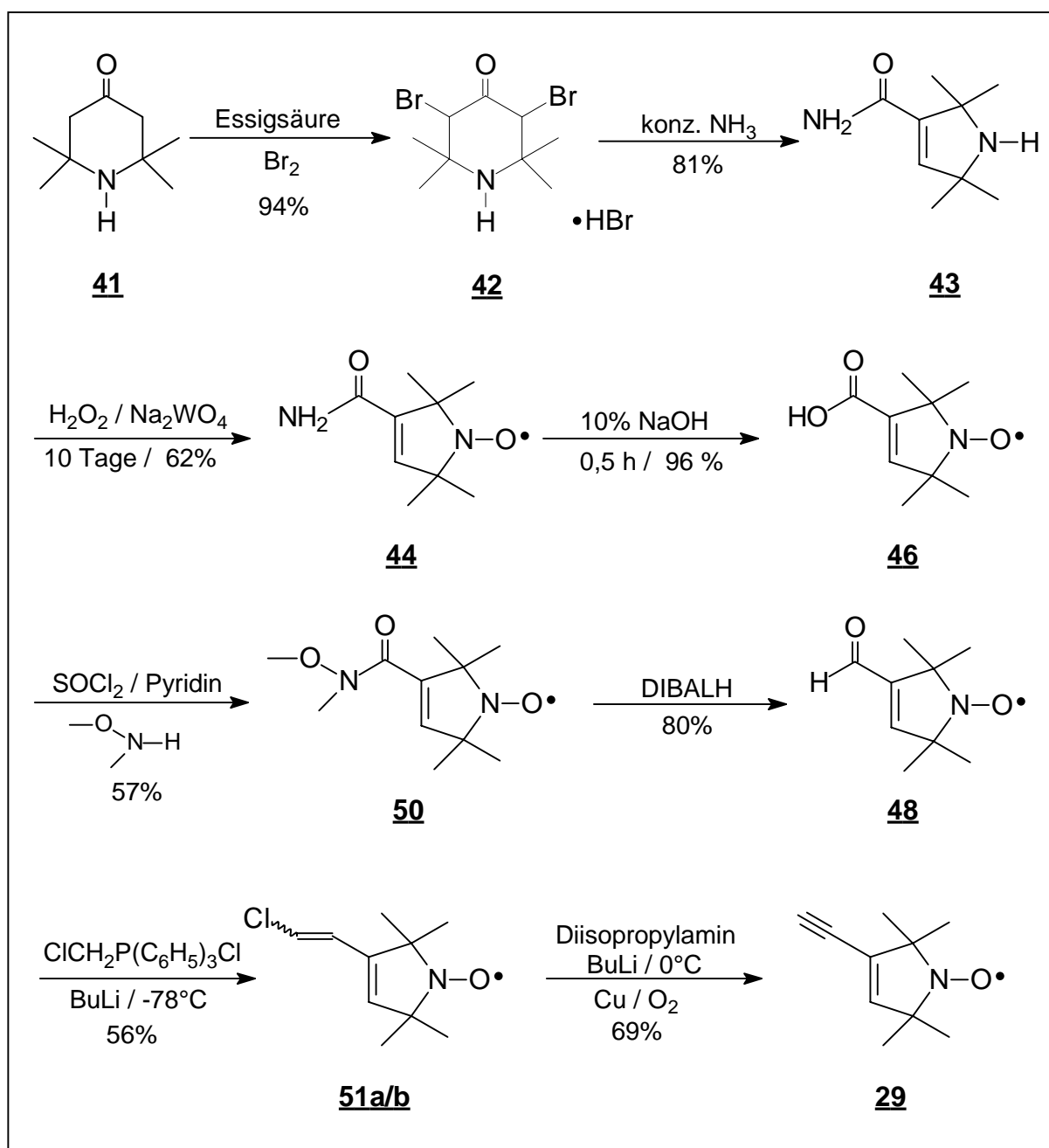


Abb. 9.14 Synthese des kupplungsfähigen Spin-Labels **29**

9.2.8 Alternative Synthesewege

Der in Abbildung 9.14 dargestellte Syntheseweg führt in acht Stufen in einer 8%igen Gesamtausbeute zu dem kupplungsfähigen Spin-Label **29**. Besonders die Darstellung des Aldehyds **48** ausgehend vom Säure **46** ist über zwei Stufen nur in einer Ausbeute von 46%

möglich. Es ist bekannt, dass die Nitroxid-Funktion die chemische Reaktivität des Moleküls stark verändert und die Ausbeuten bei ansonsten problemlosen Reduktionsreaktion erniedrigt oder nicht reproduzierbar macht (Groesbeck *et al.*,1995).

Vor diesem Hintergrund wurden die Reaktionen an der Seitenkette des Labels auf der Stufe des Amins vollzogen. Die Oxidationsreaktion sollte erst auf einer möglichst späten Stufe erfolgen, um die Problematik, die sich durch die veränderte Reaktivität der Nitroxidgruppe ergibt, zu umgehen.

Bei dieser Synthesefolge konnten zwei Schritte eingespart werden, indem bei der Favorskii-Umlagerung statt Ammoniak direkt *N*-Methoxy-*N*-methylamin **69** eingesetzt wurde (Abb. 9.15).

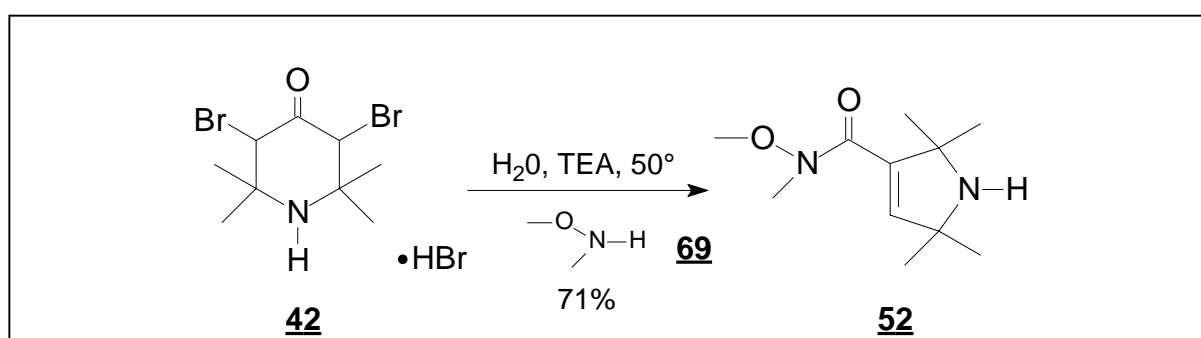


Abb. 9.15 Favorskii-Umlagerung mit *N*-Methoxy-*N*-methylamin

Die übrigen Reaktionen verliefen analog den oben beschriebenen Bedingungen. Die Produkte wurden als Öle erhalten. Die Reaktionsbedingungen und Ausbeuten sind in Abbildung 9.16 dargestellt.

Es wurde versucht, die Amine auf verschiedenen Reaktionsstufen zu Nitroxiden zu oxidieren. Als Oxidationsmittel wurden bei allen Reaktionen die beschriebenen Oxidationsmittel H₂O₂/Natriumwolframat sowie Dimethyldioxiran verwendet. Zusätzlich wurden MCPBA als Oxidationsmittel getestet.

Keines der Moleküle **52-55** konnte erfolgreich oxidiert werden. In allen Fällen kam es zu einer sehr schnellen Entfärbung der etwas gelblichen Lösungen, wonach weder das gewünschte Produkt noch das eingesetzte Edukt zu isolieren waren. Dieser Prozess lief mit Dimethyldioxiran auch bei niedrigen Temperaturen besonders schnell ab. Während die erfolglose Oxidation von Verbindung **53** und **55** durch die reaktive Aldehydfunktion bzw. das empfindliche terminale Alkin zu erklären ist, ist es nicht ganz klar, warum sich auch Verbindung **52** nicht zum Nitroxid oxidieren lässt.

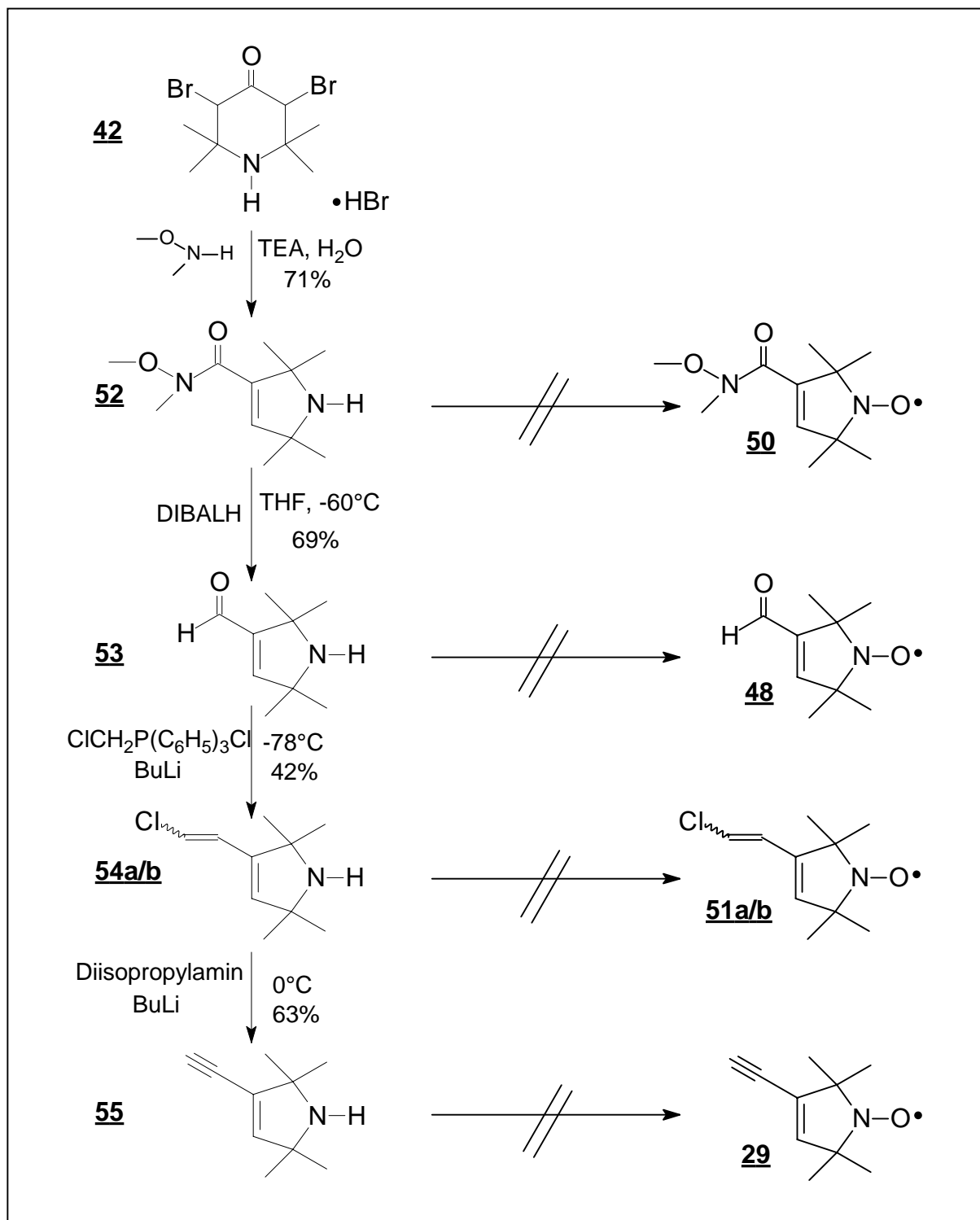


Abb. 9.16 Syntheseweg zum Amin **55** und Oxidationsversuche mit H₂O₂/Natriumwolframat, Dimethyldioxiran oder MCPBA auf einzelnen Stufen

9.3 Darstellung der iodierten Phosphoramiditbausteine **39** und **40**

Die Iodierung an der 5-Position der Bausteine **39** und **40** (Abb. 9.1) wird auf Stufe des Nucleosids vollzogen. Zu Einführung des Iodatoms an der 5-Position bei Pyrimidinen sind verschiedene Methoden beschrieben worden.

Zum ersten Mal ist die Iodierung der 5-Position mit dem System Iod/Salpetrige Säure in geringer Ausbeute beschrieben worden (Prussoff *et al.*, 1953).

Ohne zuvor die Hydroxylfunktionen zu schützen ist es möglich, Uridin in Ethanol mit *N*-Iodsuccinimid zu iodieren. Die Ausbeuten liegen allerdings bei nur 25% (Bakker *et al.*, 1981). Die erste effektive Synthese mit höheren Ausbeuten haben Robins *et al.* 1982 mit Chlorid beschrieben.

In dieser Arbeit wurde eine Cer-katalysierte Halogenierung vorgenommen, die sowohl für DNA- als auch für RNA-Bausteine geeignet ist (Asakura & Robins, 1990). Um eine bessere Löslichkeit zu gewährleisten, wurden zunächst die Hydroxylgruppen mit der Acetyl-Schutzgruppe geschützt.

9.3.1 Darstellung der acetyl-geschützten Bausteine

Uridin bzw. 2'-Desoxyuridin werden in Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit Essigsäureanhydrid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 Stunden wird die Reaktion durch die Zugabe von Wasser abgebrochen und vollständig evaporiert. Durch mehrmalige Coevaporation mit Toluol wird restliches Pyridin entfernt.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhält man Verbindung **56** bzw. **57** in 97%iger bzw. 98%iger Ausbeute als weißen Schaum (Abb. 9.17). Die Charakterisierung erfolgte jeweils durch Bestimmung des Schmelzpunktes, Massenspektrometrie und ¹H-NMR-Spektroskopie.

9.3.2 Einführung des Iodatoms mit Cerammoniumnitrat (CAN)

Die acetylgeschützten Bausteine **56** und **57** wurden in Acetonitril gelöst, mit Iod und Cerammoniumnitrat versetzt und eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Dabei generiert das

Ce(IV) unter eigener Reduktion zum Ce(III) *in situ* eine elektrophile Iodspezies, die an der 5-Position des Nucleosids angreift.

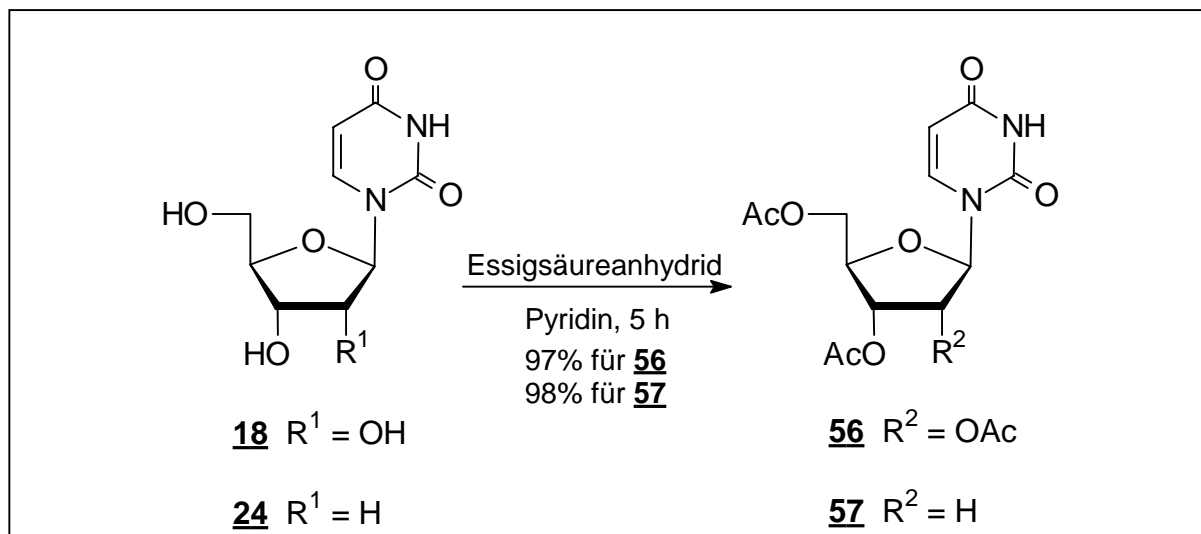


Abb. 9.17 Schützung der Hydroxylfunktionen

Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung wurden Ethylacetat, eine Natriumchlorid- sowie eine 5%ige Natriumsulfidlösung hinzugegeben. Dabei ist auf eine vorherige Kühlung der Lösung zu achten, um eine partielle Dehalogenierung zu verhindern. Die organische Phase wird abgetrennt, evaporiert und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt.

Das Produkt **58** bzw. **59** fällt als weißer Schaum in 93%iger bzw. 87%iger Ausbeute an (Abb. 9.18). Die Charakterisierung erfolgte jeweils durch Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

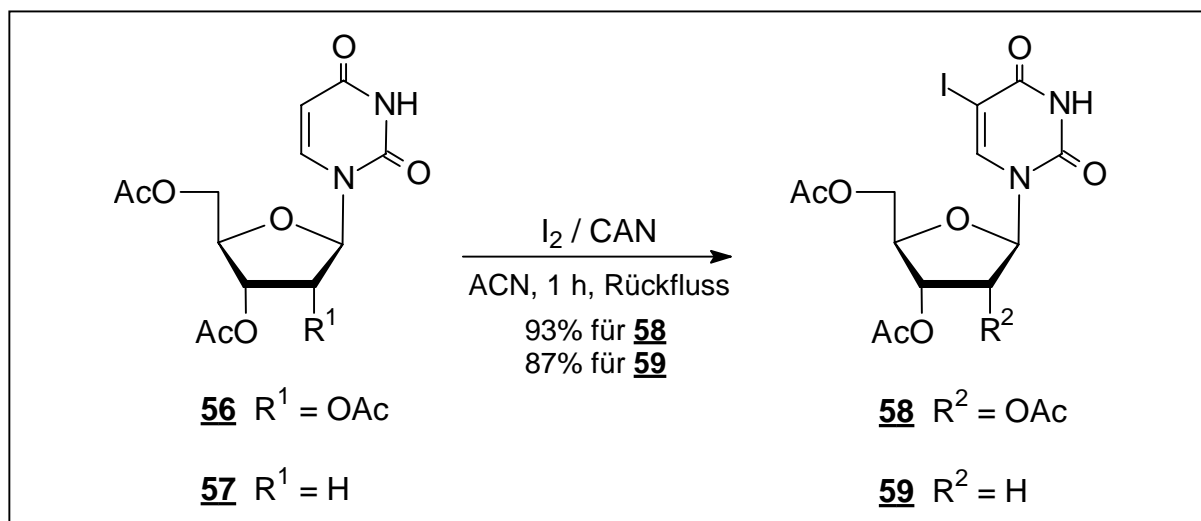


Abb. 9.18 Einführung von Iod mit Cerammoniumnitrat (CAN)

9.3.3 Entschützung der Hydroxylfunktionen

Die Entschützung der Hydroxylfunktionen der Verbindungen **58** und **59** erfolgte mit methanolischer Natriummethanolatlösung bei Raumtemperatur innerhalb einer Stunde. Nach Zugabe von Wasser wird die Lösung mit einem Ionenaustauscher neutralisiert. Das methanolische Filtrat wird evaporiert und der Rückstand mit Ethanol / Ethylacetat / Toluol (1:1:2) coevaporiert.

Der Rückstand wird im Falle der Verbindung **60** säulenchromatographisch, im Falle des Bausteins **61** durch Umkristallisation aus Wasser aufgereinigt. Die Produkte werden als weißer Feststoff in 97%iger bzw. 87%iger Ausbeute erhalten (Abb. 9.19).

Die Charakterisierung erfolgte jeweils durch Bestimmung des Schmelzpunktes, Massenspektrometrie, Elementaranalyse und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

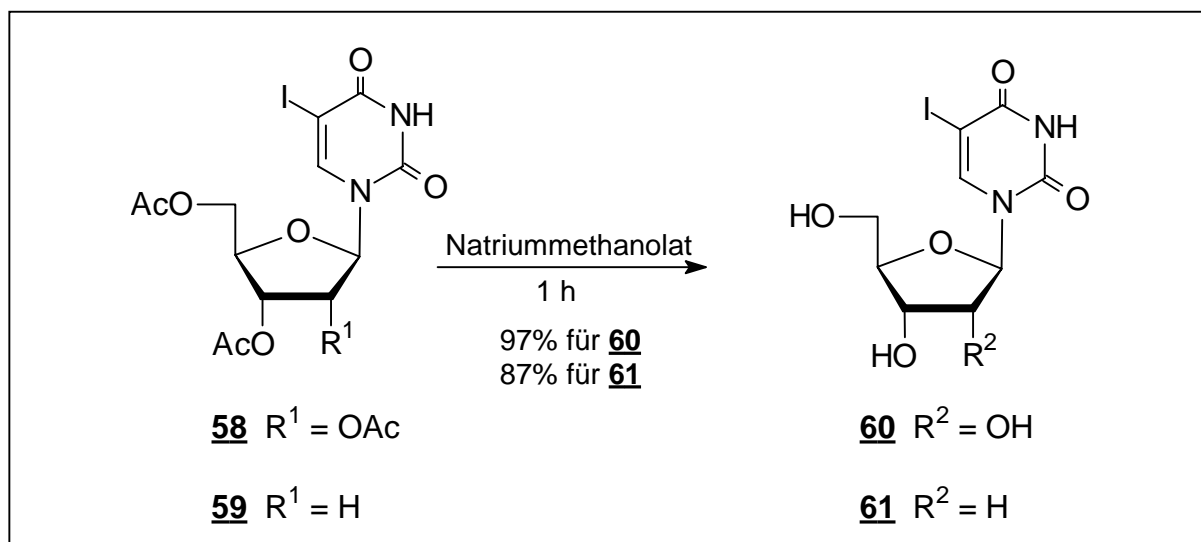


Abb. 9.19 Entschützung mit methanolischer Natriummethanolatlösung

9.3.4 Schützen der 5'-OH -Funktion

Die Schützung der 5'-OH-Funktion lief unter den schon beschriebenen Bedingungen ab (siehe Kapitel 5.2.3). Die DMTr-geschützten Produkte **62** und **63** konnten nach säulenchromatographischer Aufreinigung als leicht gelblicher Schaum in einer Ausbeute von 84% bzw. 83% gewonnen werden (Abb. 9.20).

Die Charakterisierung erfolgte jeweils durch Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

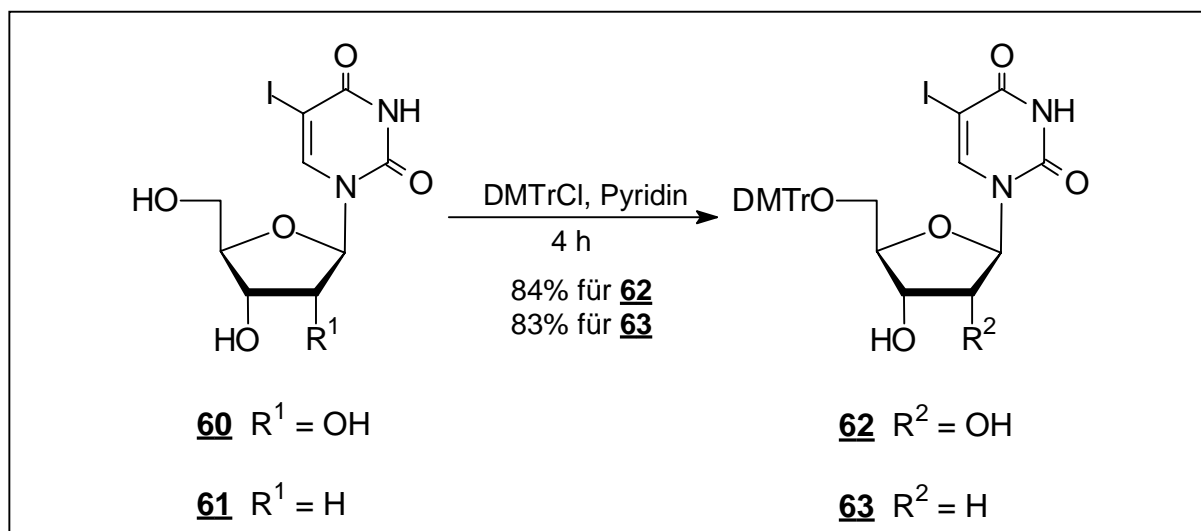


Abb. 9.20 Schützung der 5'-OH-Funktion

9.3.5 Schützen der 2'-OH-Funktion von Verbindung **62**

Für den RNA-Baustein **62** ist es nötig, die 2'-OH-Funktion zu schützen. Es werden standardmäßig Silylschutzgruppen verwendet, die unter den sauren Bedingungen der Festphasensynthese und den basischen Abspaltungsbedingungen stabil sind.

In dieser Arbeit wurde die *tert.*-Butyldimethylsilylgruppe (TBDMS) gewählt (Ogilvie *et al.*, 1978). Die Schutzgruppe lässt sich nicht regioselektiv einführen, sodass es zu der Bildung von Regioisomeren kommt. Weiterhin zeigen die Silylgruppen eine 2'-3'-Wanderungstendenz (Jones & Reese, 1979).

Vorteile dieser Schutzgruppe sind die hohe Stabilität während der Festphasensynthese und die leichte Abspaltbarkeit mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) oder Triethylamin Trihydrofluorid.

Durch Zugabe von Silbernitrat wird die Reaktion beschleunigt und das Isomerenverhältnis zugunsten des 2'-geschützten Derivates verschoben.

Zur Darstellung von **64** wurde die tritylgeschützte Verbindung **63** in 10 ml Tetrahydrofuran und 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit Silbernitrat versetzt. Nun wurde eine 1M Lösung von *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid in Tetrahydrofuran hinzugegeben. Unter Lichtausschluss lässt man den Reaktionsansatz 12 h rühren. Während der Reaktionszeit fällt Silberchlorid aus.

Nach der Isolierung des Isomerengemisches wird dieses säulenchromatographisch aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **64** wird in 55%iger, das unerwünschte 3'-silylierte Produkt **65** in 22%iger Ausbeute jeweils als weißer Schaum erhalten (Abb. 9.21). Die

Charakterisierung erfolgte durch ESI-Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Die eindeutige Zuordnung der jeweiligen Isomere konnte mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Spektren (H,H-COSY) erreicht werden.

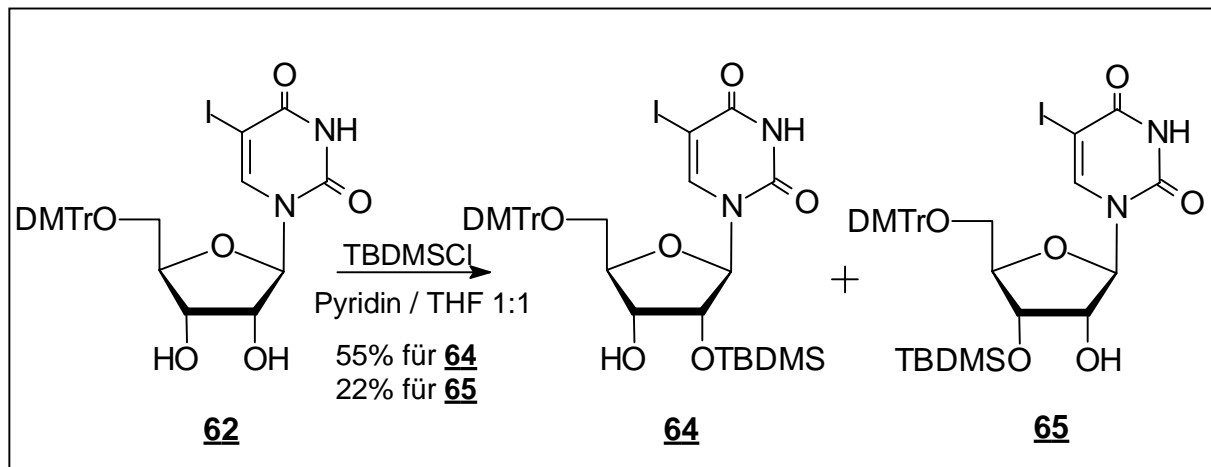


Abb. 9.21 Zwei Regioisomere bei der Silylschätzung von **62**

9.3.6 Phosphitylierung

Die Phosphitylierung der Bausteine **63** und **64** erfolgte unter den in Kapitel 5.2.4 beschriebenen Bedingungen. Dabei ließ sich der für den Einsatz am Synthesizer konzipierte RNA-Baustein **40** in einer 83%igen und der DNA-Baustein **39** in einer 87%igen Ausbeute jeweils als weißer Schaum erhalten (Abb. 9.22). Die Charakterisierung erfolgte durch ESI-Massenspektrometrie, $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowie $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektroskopie.

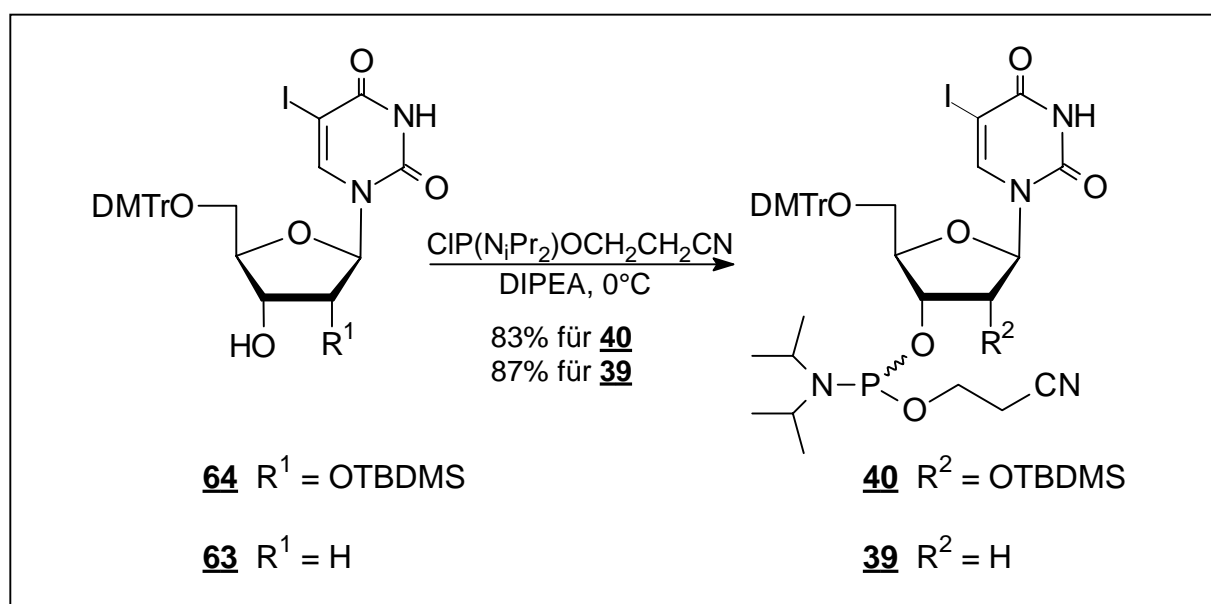


Abb. 9.22 Phosphitylierung

9.3.7 Syntheseübersichten der Phosphoramiditbausteine **39** und **40**

Die Abbildungen 9.23 und 9.24 zeigen zusammenfassend die Darstellung von 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-desoxy-5-iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **39** und 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5-iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **40**.

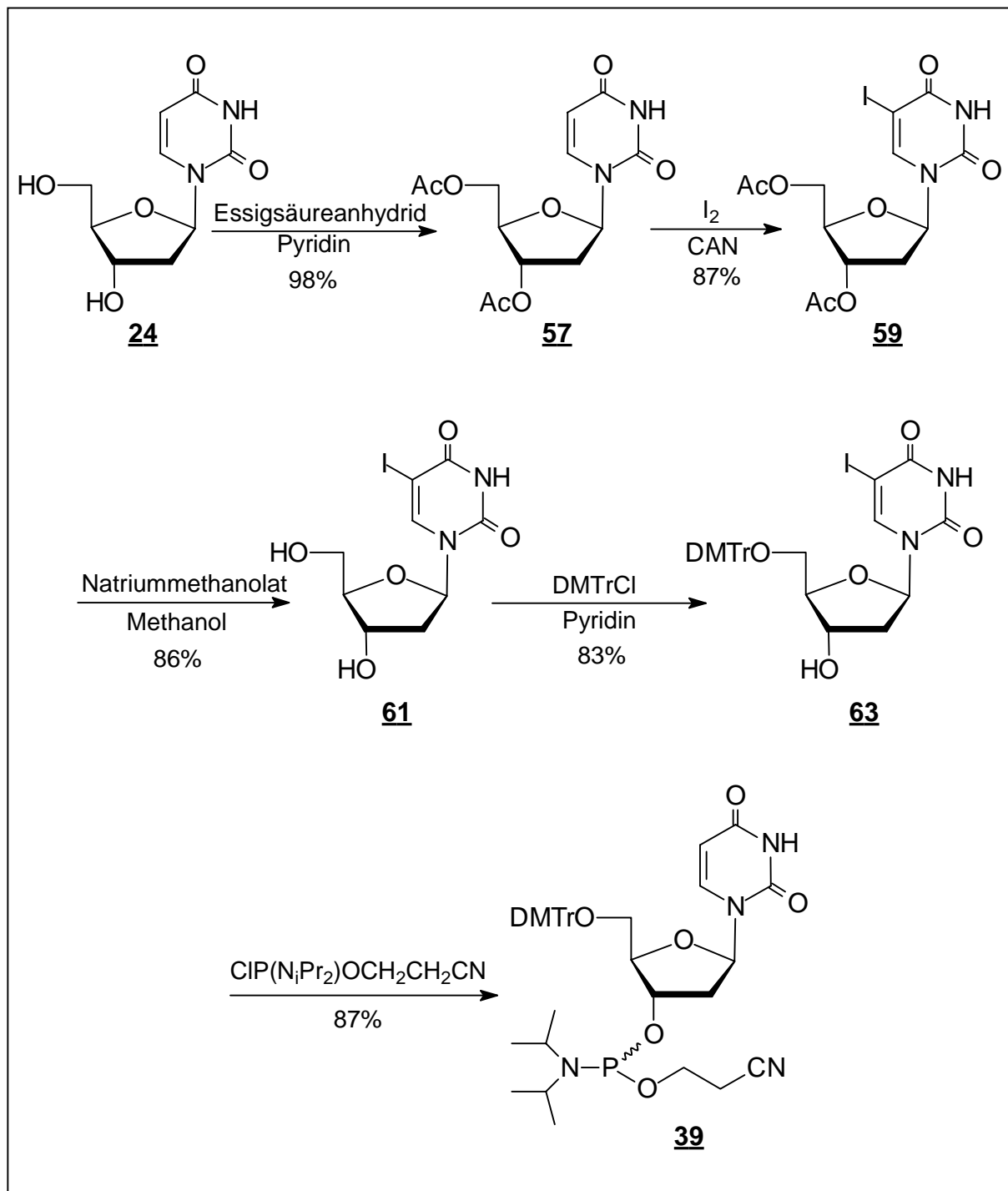
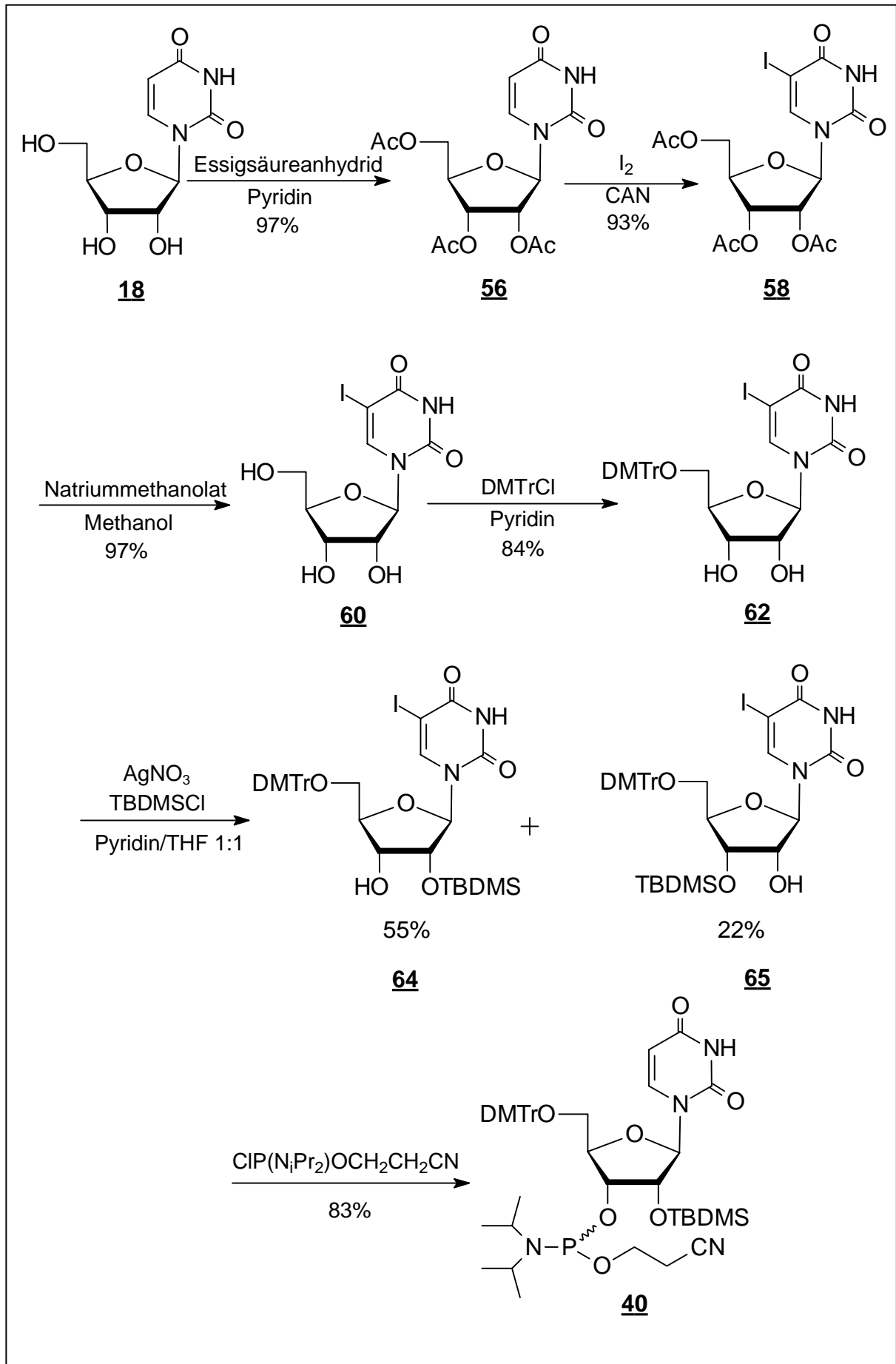


Abb. 9.23 Syntheseübersicht zum Phosphoramiditbaustein **39**

Abb. 9.24 Syntheseübersicht zum Phosphoramiditbaustein **40**

9.4 Sonogashira-Kupplung

Die Kupplung des terminalen Alkins des Spin-Labels **29** an die iodierter 5-Position der Phosphoramiditbausteine **39** und **40** soll mittels einer Sonogashira-Kupplung (Sonogashira *et al.*, 1975) durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich um eine palladiumkatalysierte Kupplung in *N,N*-Dimethylformamid mit Kupfer(I)iodid nach dem in Abbildung 9.25 dargestellten allgemeinem Schema.

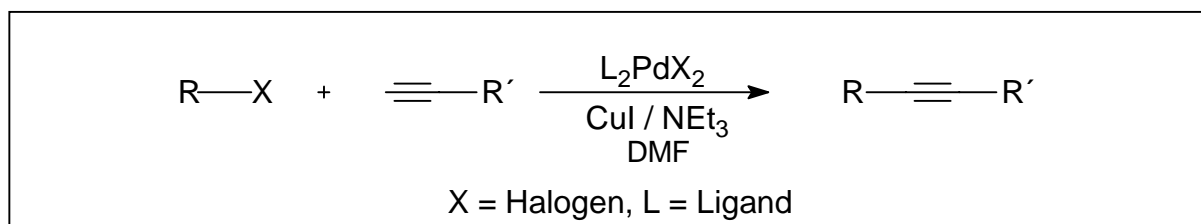


Abb. 9.25 Sonogashira-Kupplung

Mechanistisch wird angenommen, dass eine Palladium(0)-Spezies durch oxidative Addition zunächst in die Kohlenstoff-Iod-Bindung inseriert. Darauf folgt der nukleophile Angriff auf den Palladiumkomplex unter Transmetallierung. Im letzten Schritt wird das Produkt unter reduktiver Eliminierung der katalytischen Palladium(0)-Spezies freigesetzt.

Wird nicht direkt eine Pd(0)-Spezies, sondern eine Pd(II)-Spezies in der Reaktion eingesetzt, wird diese unter Bildung eines Diacetylens zunächst reduziert. Der Mechanismus ist in Abb. 9.25 dargestellt.

9.4.1 Kupplung in flüssiger Phase

Als Referenzsubstanz für die Analytik wurde der Spin-Label **29** an 2'-Desoxy-5-ioduridin **61** gekuppelt (Spaltenstein *et al.*, 1989).

Dazu wurden der Spin-Label und 2'-Desoxy-5-ioduridin in *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Da der Katalysator Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) **66** sauerstoffempfindlich ist, musste die Lösung durch Anlegen eines schwachen Vakuums vor der Zugabe mehrfach desoxygeniert werden. Danach erfolgte die Zugabe des Katalysators und des Kupfer(I)-iodids. Schließlich wurde Triethylamin hinzugegeben und der Reaktionsansatz ca. sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung färbt sich dabei tiefrot.

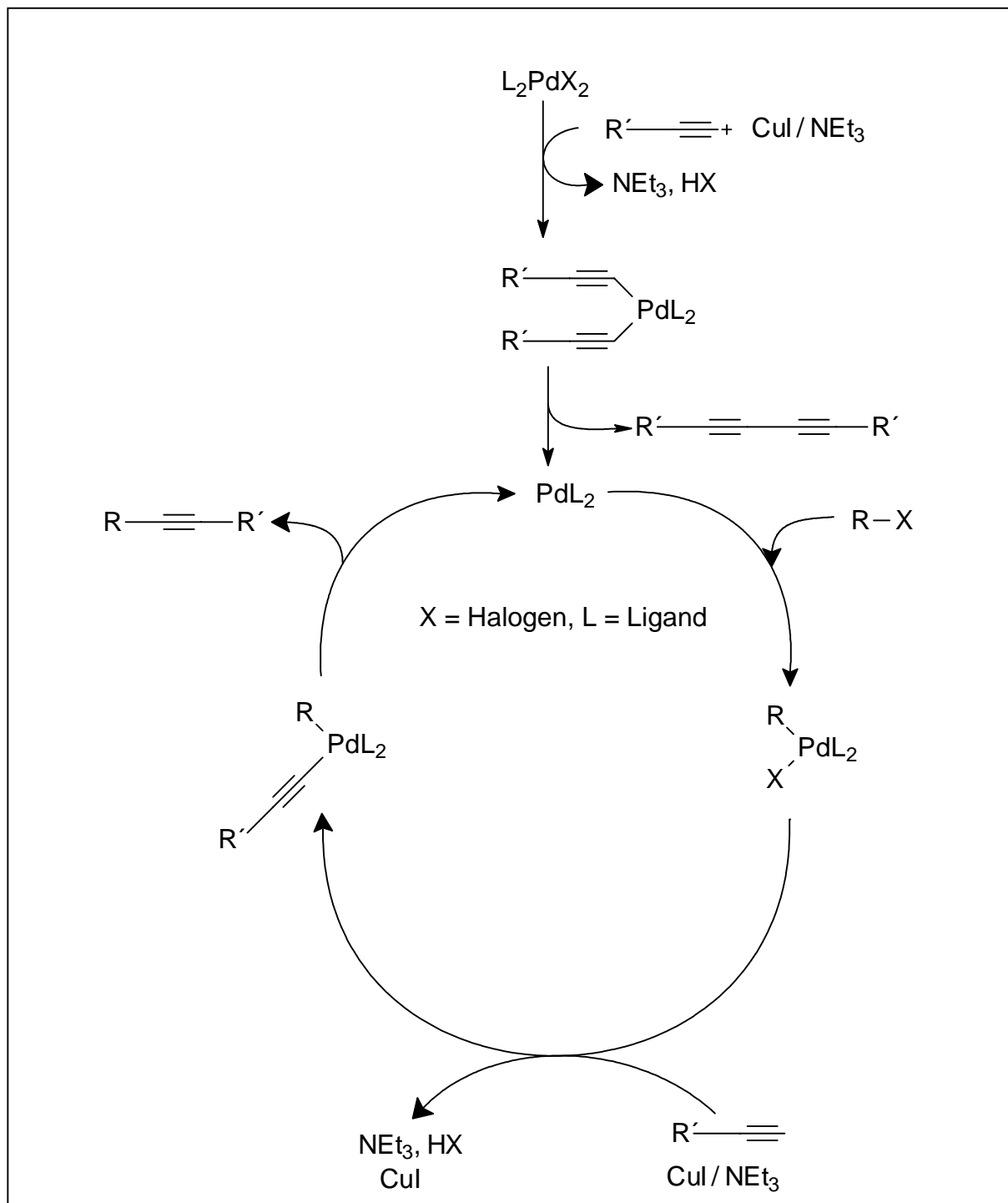


Abb. 9.26 Allgemeiner Mechanismus der Sonogashira-Kupplung

Nach Beendigung der Reaktion wird die Lösung vollständig evaporiert und der Rückstand nach dem Entfernen von ausgefallenem Palladium säulenchromatographisch aufgereinigt (Abb. 9.27).

Das Produkt **67** wird als gelber Feststoff in 71%iger Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte durch Massenspektrometrie, 1H -NMR-Spektroskopie und ESR-Spektroskopie.

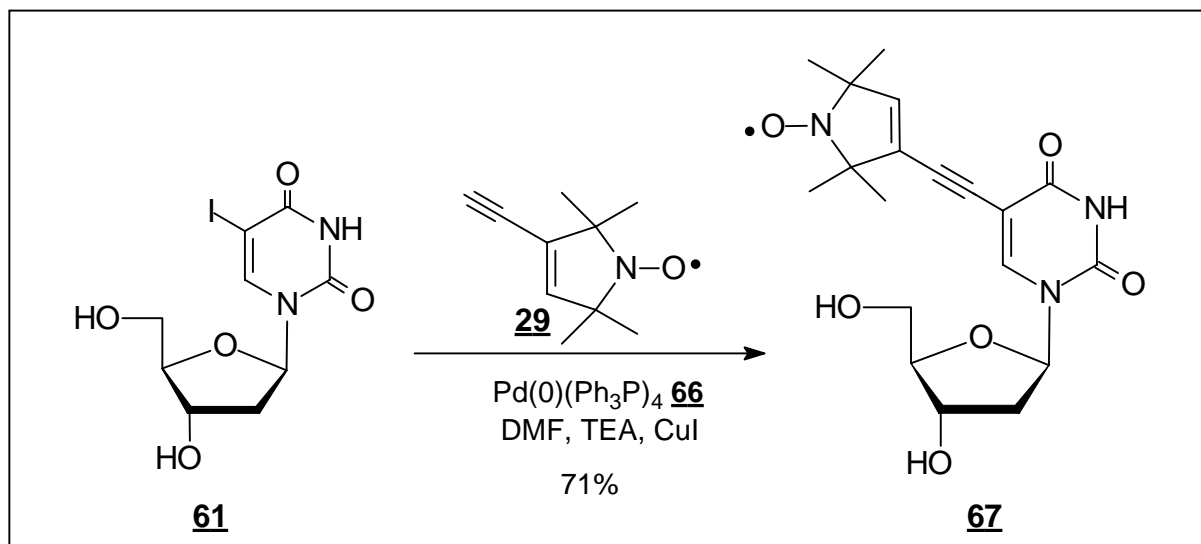


Abb. 9.27 Sonogashira-Kupplung in flüssiger Phase (Spaltenstein *et al.*, 1989)

9.5 Sonogashira-Kupplung an fester Phase

In Anlehnung an eine Methode von Khan & Grinstaff (1999) ist es gelungen, zum Spin-Labeling von Oligonukleotiden die Sonogashira-Kupplung an fester Phase - während der Oligonukleotidsynthese - durchzuführen (Abb. 9.28).

Dabei wird am Synthesizer der Oligonukleotidstrang bis zu dem Nukleotid synthetisiert, an dem die Spin-Sonde **29** eingeführt werden soll. Als Phosphoramidit für diese letzte Base wird der iodierter Baustein **39** bei DNA oder **40** bei RNA inkorporiert. Die Kupplungszeit für diese modifizierten Bausteine beträgt 10 Minuten bei einer Standardkonzentration von 0,1M. Die 5'-DMTr-Schutzgruppe wird nicht abgespalten („DMTr-on“).

Die Säule wird vom Synthesizer abgenommen und 10 min mit Argon geflutet, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Sie wird unter Argonatmosphäre, z.B. in einem Kolben aufbewahrt, um Sauerstofffreiheit innerhalb der Säule zu gewährleisten.

Parallel dazu wird die Reaktionslösung vorbereitet. Obwohl für die Säule nur ein Volumen von ca. 150 μl nötig ist, werden 1,75 ml *N,N*-Dimethylformamid und 0,75 ml Triethylamin in einem sorgfältig ausgeheiztem Kolben unter Argonatmosphäre gegeben. Dieses Lösungsvolumen lässt sich durch mehrfaches Anlegen eines schwachen Vakuums gut desoxygenieren. Alternativ kann auch über einen Zeitraum von 10 Minuten Argon in die Lösung eingeleitet werden.

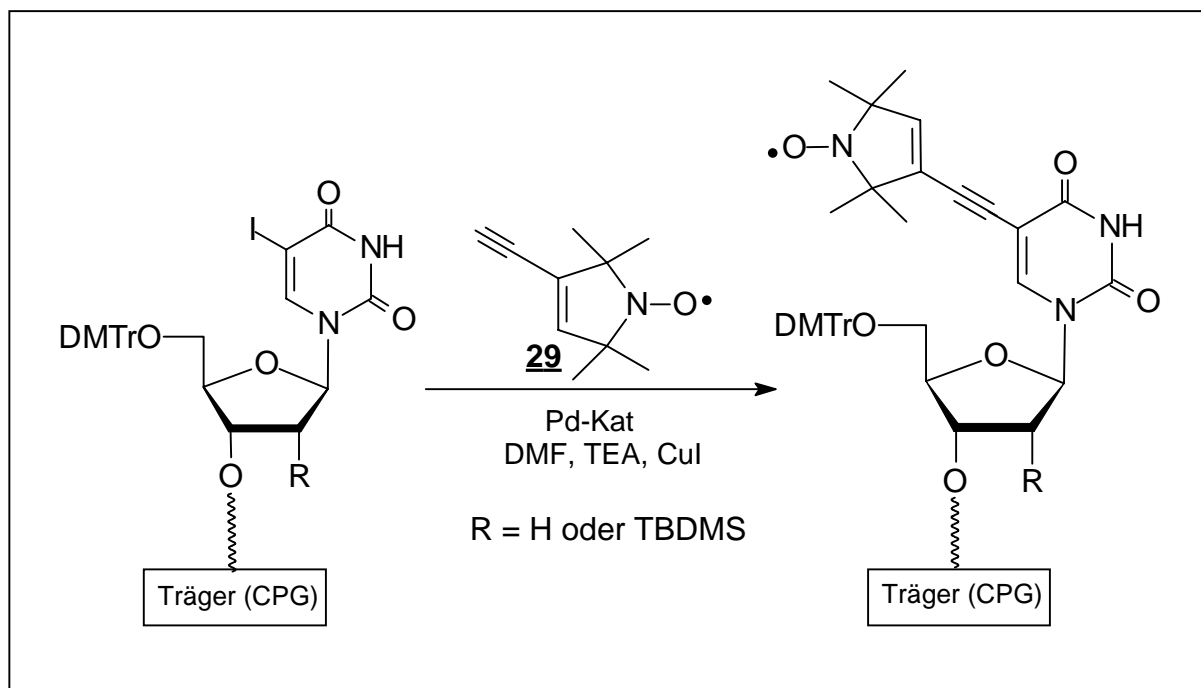


Abb. 9.28 Sonogashira-Kupplung an der festen Phase

Nun wird das Kupfer(I)iodid (genaue Mengen der Reaktanden siehe Tabelle 9.1) unter Rühren hinzugegeben und noch einmal desoxygeniert. Mit einer Spritze werden 150 μl dieser Lösung entnommen und in ein kleines ebenfalls unter Argonatmosphäre stehendes Gefäß überführt, in dem sich der Spin-Label **29** und der Palladiumkatalysator befinden (Abb. 9.29).

Nach vollständiger Auflösung der Reaktanden wird die tiefrote Lösung mit einer Spritze aufgezogen und mit Hilfe einer zweiten auf der anderen Säulenseite installierten Spritze auf die Säule aufgegeben. Dabei hellt sich die Lösung deutlich auf.

Synthesemaßstab Synthesizer	1 μmol	
Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) 66 oder Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid 68	3 μmol	3,5 mg 2,1 mg
Kupferiodid bezogen auf 150 μl / 2,5 ml	3 μmol / 50 μmol	0,6 mg / 9,5 mg
Spin-Label 29 bei Palladium(0)-Katalysator 66 bei Palladium(II)-Katalysator 68	6 μmol 12 μmol	1 mg 2 mg

Tab. 9.1 Eingesetzte Mengen in der Reaktionslösung der Sonogashira-Kupplung (150 μl)

Die strikte Einhaltung einer sauerstofffreien Atmosphäre ist bei diesem Verfahren durch die Sauerstoffempfindlichkeit des Katalysators unbedingt notwendig. Die Reaktionslösung färbt

sich sonst durch ausgefallenes Palladium sehr schnell schwarz und die Kupplung ist nicht erfolgreich.

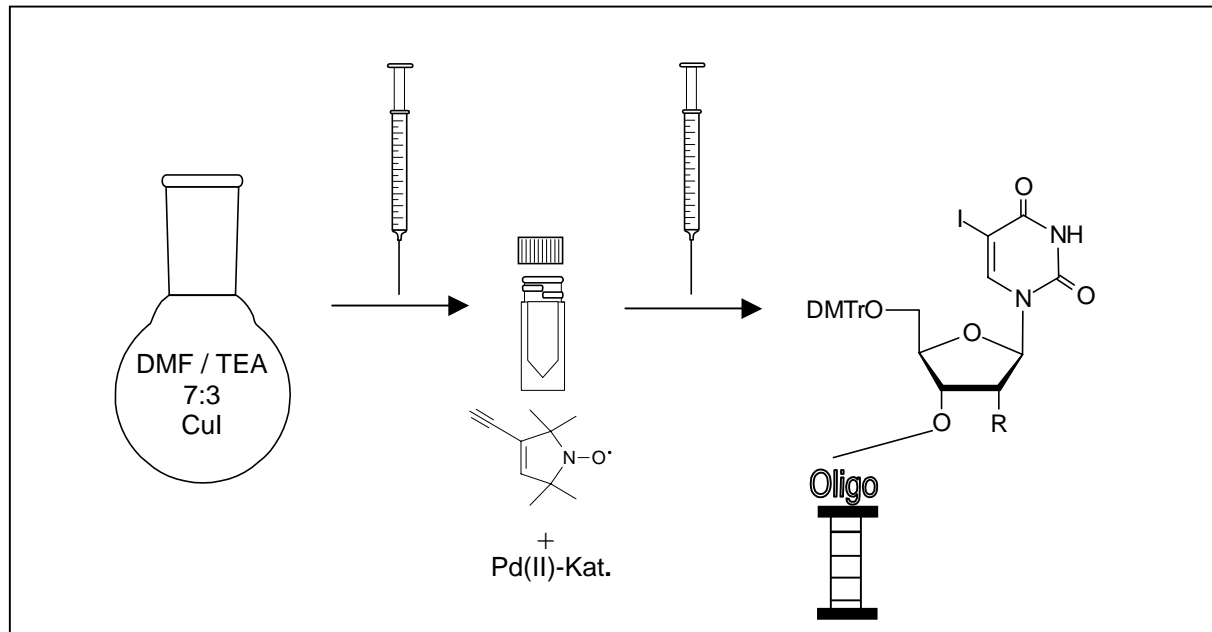


Abb. 9.29 Schematischer Ablauf der Kupplung

Zur Vervollständigung der Reaktion wird die Säule 3 Stunden lang lichtgeschützt aufbewahrt. Nach diesem Zeitraum wird die Säule mit 20 ml *N,N*-Dimethylformamid und 40 ml abs. Acetonitril gespült. Nach dem Trocknen wird die Säule wieder am Synthesizer installiert und die Oligonukleotidsynthese fortgesetzt.

9.5.1 Wahl des Katalysators

Wie aus Abbildung 9.26 zu erkennen ist, ist Pd(0) die katalytisch aktive Spezies. Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) **66** enthält das Palladium in dieser Oxidationsstufe. Allerdings ist diese Substanz äußerst sauerstoffempfindlich. Es macht vor allem bei den benötigten kleinen Mengen das Experimentieren und das Abwiegen sehr schwierig. Deshalb wurde für die Kupplung an der festen Phase Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid **68** eingesetzt.

Dieser Katalysator enthält das Palladium in seiner zweiwertigen Form. Im festen Zustand ist dieser Katalysator nicht sauerstoffempfindlich, was das Experimentieren wesentlich erleichtert.

Nachteil ist, dass bei der *in situ* Reduktion in der Reaktionslösung zum aktiven Pd(0) ein Diacetylen gebildet wird, wodurch die benötigte Stoffmenge des Spin-Labels **29** verdoppelt wird (siehe Tabelle 9.1).

9.5.2 Kupplungsversuche erst nach vollständigem Strangaufbau

Es wurde versucht, die Kupplung des Spin-Labels erst nach vollständiger Synthese des Oligonukleotids zu vollziehen. Dazu wurde an einer bestimmten Position der 5-iodierte Baustein inkorporiert, die Synthese dann allerdings nicht für die Kupplung unterbrochen, sondern bis zum Strangende weitergeführt. Erst dann wurde die Sonogashira-Kupplung durchgeführt. Die Kupplungsversuche waren allerdings nicht erfolgreich.

Dieses mag daran liegen, dass die 5-Position der Base durch die fortgeführte Synthese nicht mehr gut zugänglich ist.

Ein ähnlicher Versuch wurde bei dem gleichzeitigen Einbau von zwei iodierten Bausteinen hintereinander durchgeführt. Hier wurde die Oligonukleotidsynthese nicht nach dem ersten Einbau, sondern erst nach dem direkt folgenden zweiten Einbau unterbrochen und eine Kupplung versucht.

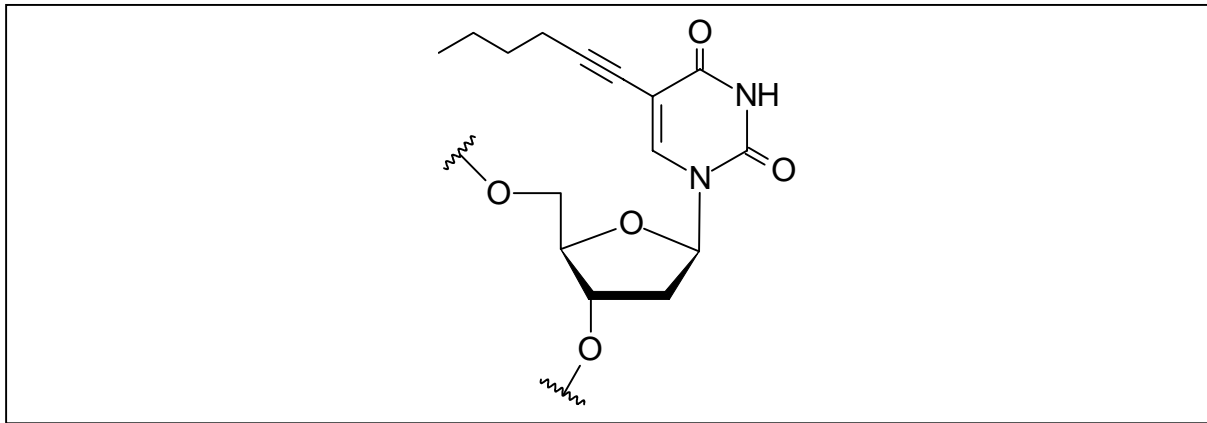
Aber auch hier war die Kupplung nur an der letzten nicht aber an der vorletzten Base erfolgreich. Diese Experimente haben gezeigt, dass es unumgänglich ist, die Synthese direkt nach dem Einbau des iodierten Bausteins abubrechen und die Kupplung durchzuführen.

9.6 Dargestellte gelabelte Stränge

Es wurden Stränge verschiedener Länge dargestellt. Das Labeln mit dem Spin-Label **29** erfolgt sowohl terminal als auch innerhalb des Stranges. Ferner wurden zwei Label innerhalb eines Stranges angebracht. Durch die Darstellung eines RNA-Stranges wurde die Übertragbarkeit der Methode auf RNA gezeigt.

Um den Einfluss des Spin-Labels auf Kupplungsausbeute, Aufreinigungsbedingungen und analytischen Methoden zu untersuchen, wurde als Testverbindung Hexin **69** an die 5-Position gekuppelt (Abb. 9.30).

Tabelle 9.2 zeigt eine Übersicht über die synthetisierten Stränge.

Abb. 9.30 Ausschnitt aus einem DNA-Strang nach der Sonogashira-Kupplung von Hexin **69**

SG1	5'-TAG GTC AAT ^{Hex} ACT
SG2	5'-TT*
SG3	5'-TTT TTT TT*
SG4	5'-r(UUU UUU UU*)
SG5	5'-TAG GTC AAT ACT
SG6	5'-AGT ATT GAC ATA
SG7	5'-TAG GTC AAT* ACT
SG8	5'-AGT ATT* GAC CTA
SG9	5- GGT GT*T* AGA GG
SG10	5'-CCT CTA ACA CC

Tab. 9.2 Dargestellte Oligonukleotide. Die gelabelten Positionen sind fett gedruckt. Die Bezeichnung „Hex“ steht für die Kupplung von Hexin **69**, die Bezeichnung „*“ steht für den Spin-Label **29**. Die Stränge SG5, SG6 sind Vergleichsstränge, SG10 ist der Gegenstrang zu SG9.

9.7 Aufreinigung der Stränge

Die Aufreinigung der Stränge ist mit Standardmethoden möglich. Der Spin-Label erfordert bei der Abspaltung vom Träger und dem Entschützen der Basenschutzgruppen mit konz.

Ammoniak keine Änderungen der üblichen Vorgehensweise. Beim RNA-Strang SG4 musste zusätzlich die 2'-Position entschützt werden (siehe Kapitel 6.2.1).

Die Aufreinigung der DNA-Stränge erfolgte durch Umkehrphasen-HPLC (Reversed Phase HPLC, RP-HPLC). Diese Methode trennt nach unterschiedlich starker Adsorption hydrophober Verbindungen an einer unpolaren festen Phase. Der Name Umkehrphasen-HPLC beruht auf der Polarität des Kieselgels, die durch die kovalente Belegung mit Alkylketten umgekehrt wird.

Dies führt dazu, dass die polarerer Komponenten vor den unpolaren eluiert werden. Die Kupplung des Labels macht das Oligonukleotid deutlich unpolarer. Deshalb eluiert es deutlich später von der Säule und Abbruchsequenzen oder nicht gekoppeltes Produkt lassen sich gut abtrennen.

Die unterschiedlichen Retentionszeiten zwischen gekoppelten und noch iodiertem Strang nehmen aber mit steigender Oligonukleotidlänge ab, sodass eine Trennung schon bei den 11-meren schwierig wird. Bei den 8-meren Nukleotiden in dieser Arbeit waren die Unterschiede in den Retentionszeiten allerdings groß genug.

Duh & Bobst (1991) berichten, dass es durch Acetonitril als Laufmittelkomponente in einer Stahlsäule zu Ausbeuteeinschränkungen kommen kann. Sie empfehlen, gerade bei längeren Nukleotiden FPLC (fast protein liquid chromatography) zu verwenden.

Der RNA-Strang wurde wie in Kapitel 6.3.1 beschrieben mit Anionenaustausch-HPLC aufgereinigt. Obwohl diese Methode nach Ladungen trennt, unterschieden sich auch hier die Retentionszeiten des gekoppelten und noch iodierten Stranges. Die Entsalzung erfolgte wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben.

In beiden Fällen ist zu erkennen, dass die Kupplungsausbeuten bei der Sonogashira-Kupplung sehr hoch lagen (>90%). Im Falle der DNA war kein unreaktierter iodierter Strang zu detektieren, während für RNA ca. 10% detektiert wurden (Abb. 9.31). Bei einer nicht erfolgreichen oder unvollständigen Kupplung konnten die iodierten Stränge abgetrennt und eindeutig identifiziert werden.

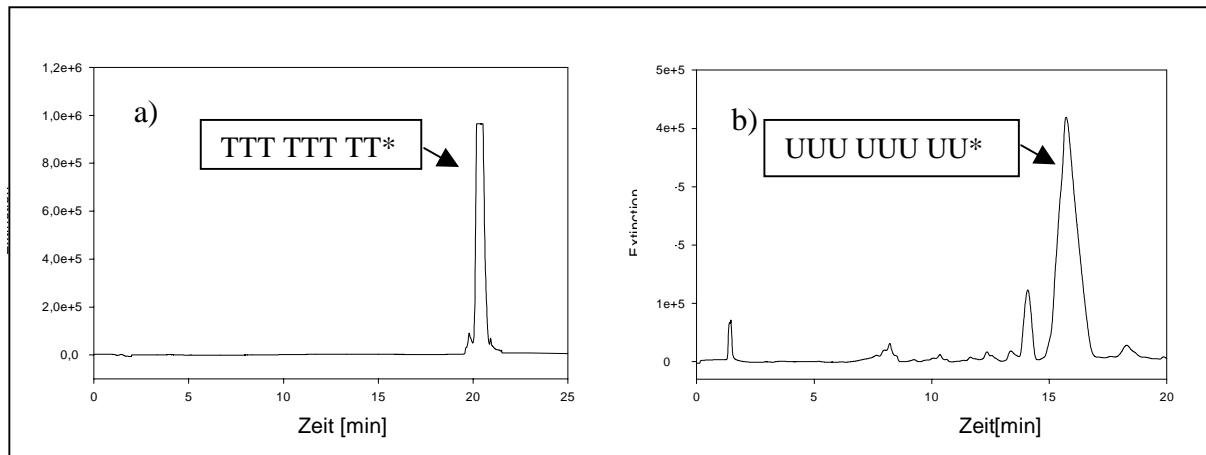


Abb. 9.31 HPLC-Diagramme der präparativen Aufreinigung von SG3 (a) und SG4 (b)

9.8 Analytik der gelabelten Stränge

9.8.1 Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie

Die Quantifizierung der Stränge wurde mittels UV-Spektroskopie wie in Kapitel 6.4 beschrieben durchgeführt. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der Spin-Label **29** selbst im Bereich von 260 nm schon eine geringe Adsorption zeigt und dadurch die Fehlergrenzen der gemessenen OD_{260} -Einheiten größer werden.

9.8.2 Massenspektrometrie

Die dargestellten Oligonukleotide wurden mit MALDI/TOF- und ESI-Massenspektrometrie bestimmt (siehe Kapitel 6.5). Insgesamt ist die Charakterisierung mittels Massenspektrometrie unbefriedigend, da das Nitroxid in starker Weise den Ionisationsvorgang beeinflusst.

Während das MALDI-Spektrum des Vergleichsstranges mit Hexin SG1 eindeutig und reproduzierbar war, waren die Spektren der spin-gelabelten Stränge nicht reproduzierbar. Sie zeigten Banden, die sich keinem denkbaren Produkt oder dessen Abbruchbanden zuordnen ließen. Da aber ein nicht abreagierter noch iodierter Strang sehr gut zu detektieren war, konnte zunächst festgestellt werden, ob ein solcher in der Probe vorhanden war.

Durch den Wechsel der Matrix von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon zu Norbornen und der Zugabe von Ammoniumcitrat konnte schließlich in den MALDI/TOF-Spektren eine deutliche Verbesserung erreicht werden. Das Ammoniumcitrat scheint durch Anlagerung an das freie Radikal dieses abzuschirmen (Abb. 9.32). Trotzdem wurden probenabhängig weiterhin eine oft eine starke Fragmentierung und nicht zuordnungsbare Peaks gefunden.

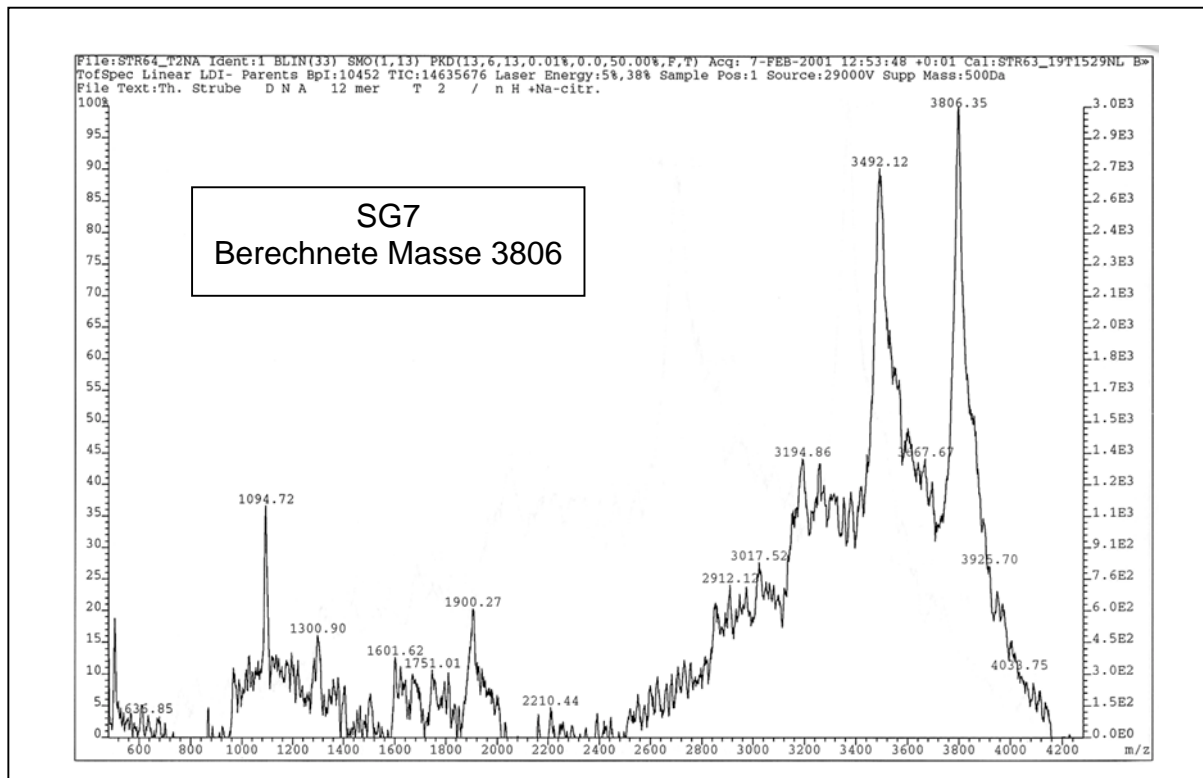


Abb. 9.32 MALDI-Spektrum von SG7

9.8.3 Enzymatischer Verdau der Oligonukleotide

Eine eindeutige Analytik bietet neben der Massenspektrometrie der enzymatische Verdau der Oligonukleotide. Dabei werden die Stränge mit einer Nuklease behandelt, die die Phosphordiesterbrücken zerschneidet. Die erhaltenen Mononukleotide werden anschließend mit Phosphatase inkubiert, die weiterhin die Phosphatgruppen abspaltet und die einzelnen Nucleoside zurücklässt.

Diese können dann mittels HPLC-Analytik detektiert werden. Neben der Anwesenheit der Nucleoside kann man aus der Integration unter den Peakflächen und den Extinktionskoeffizienten den prozentualen Anteil eines jeden Nucleosids bestimmen.

Abbildung 9.33 zeigt den enzymatischen Verdau von unmodifiziertem Strang SG5. Die ermittelten prozentualen Anteile weichen von den berechneten um $\pm 8\%$ ab. Diese Ungenauigkeit resultiert aus dem Anlegen der Basislinien bei der Integration der Peaks.

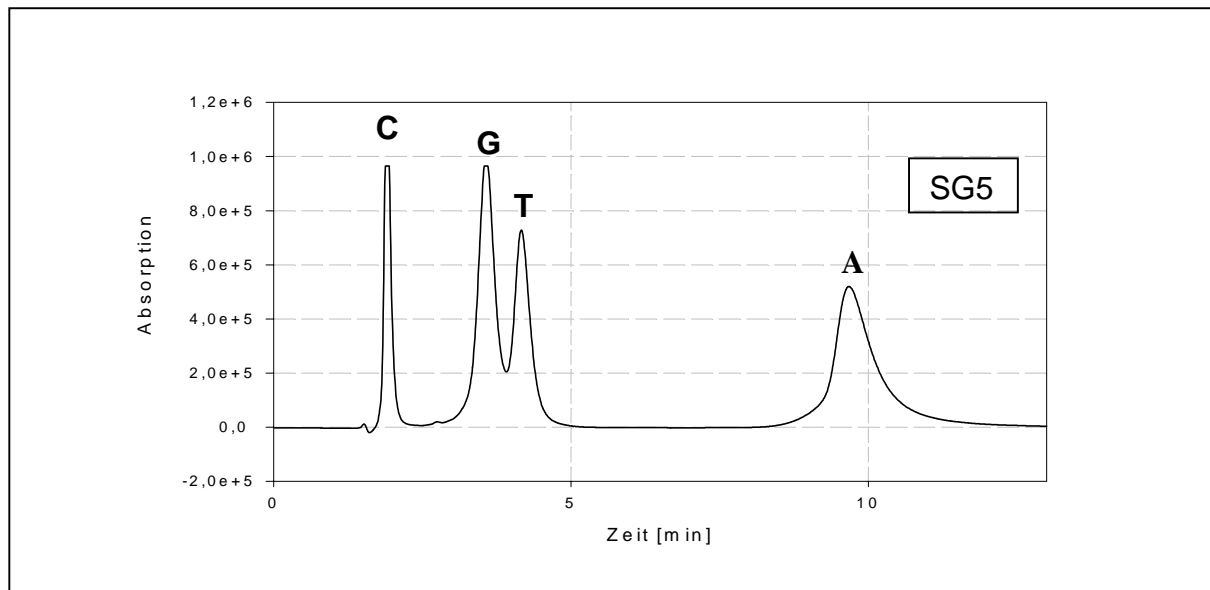


Abb. 9.33 Enzymatischer Verdau von SG5

Im Falle der spin-gelabelten Proben ist neben den vier Standardnukleosiden noch ein spin-gelabertes Thymidin vorhanden. Dieses ist deutlich unpolarer als Thymidin und eluiert deutlich später. In Abbildung 9.34 zeigt ein HPLC-Spektrum von SG3 mit einem sehr steilen Gradientenanstieg nach der Elution von T.

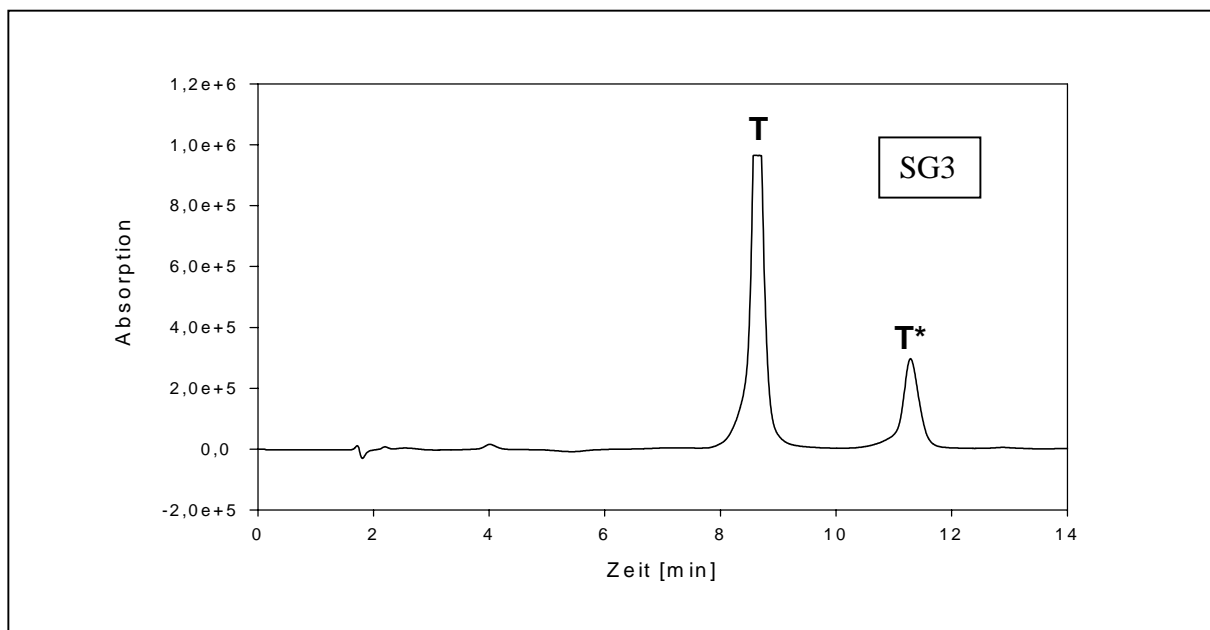


Abb. 9.34 HPLC-Diagramm von T und spin-gelabelten T* nach dem enzymatischen Abbau von SG3. Der Gradient ist nicht linear, sondern steigt nach der Elution von T steil an.

Alle dargestellten modifizierten Stränge wurden durch enzymatische Hydrolyse untersucht. Die Zuordnung von Peaks der modifizierten Basen erfolgte durch die Coinjektion Thymidin, spin-gelabeltes Thymidin sowie 2'-Desoxy-5-ioduridin.

Abbildung 9.35 zeigt ein HPLC-Diagramm eines Stranges bei dem die Kupplung nicht vollständig und die Stränge nicht sauber getrennt wurden. Die Abbildung macht deutlich, dass mit der Methode der enzymatischen Hydrolyse zwischen einem unmodifizierten, iodierten und spin-gelabelten Strang gut unterschieden werden kann.

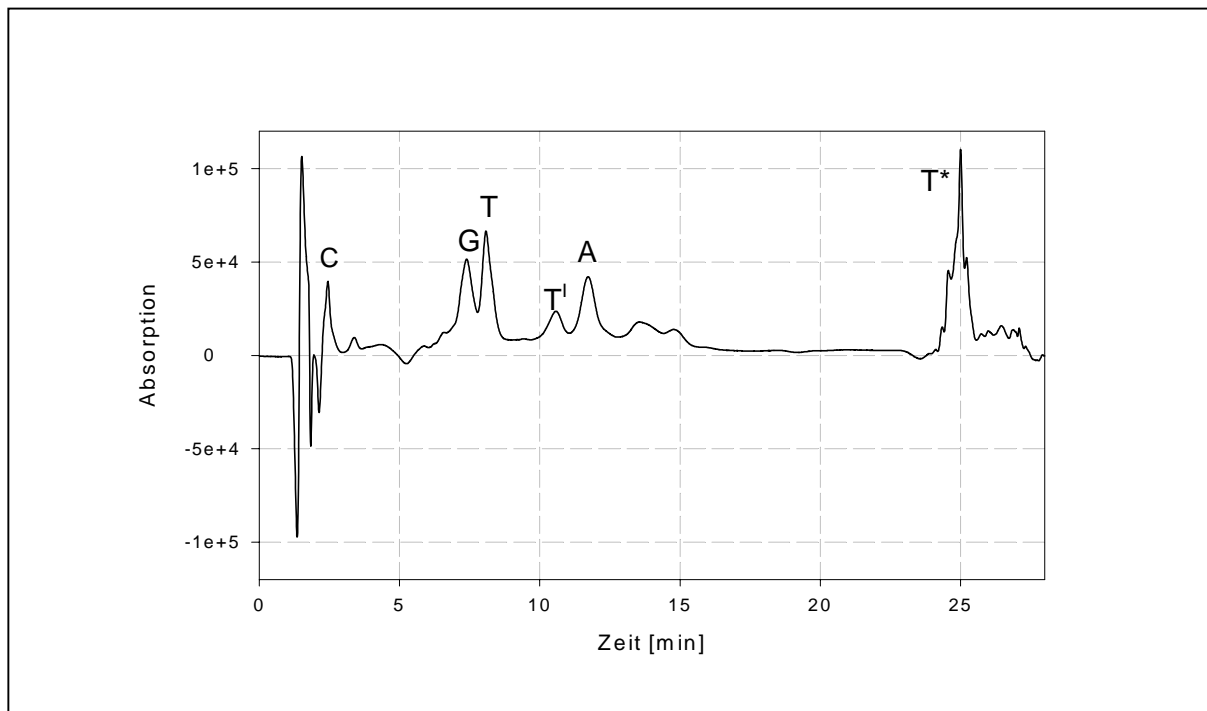
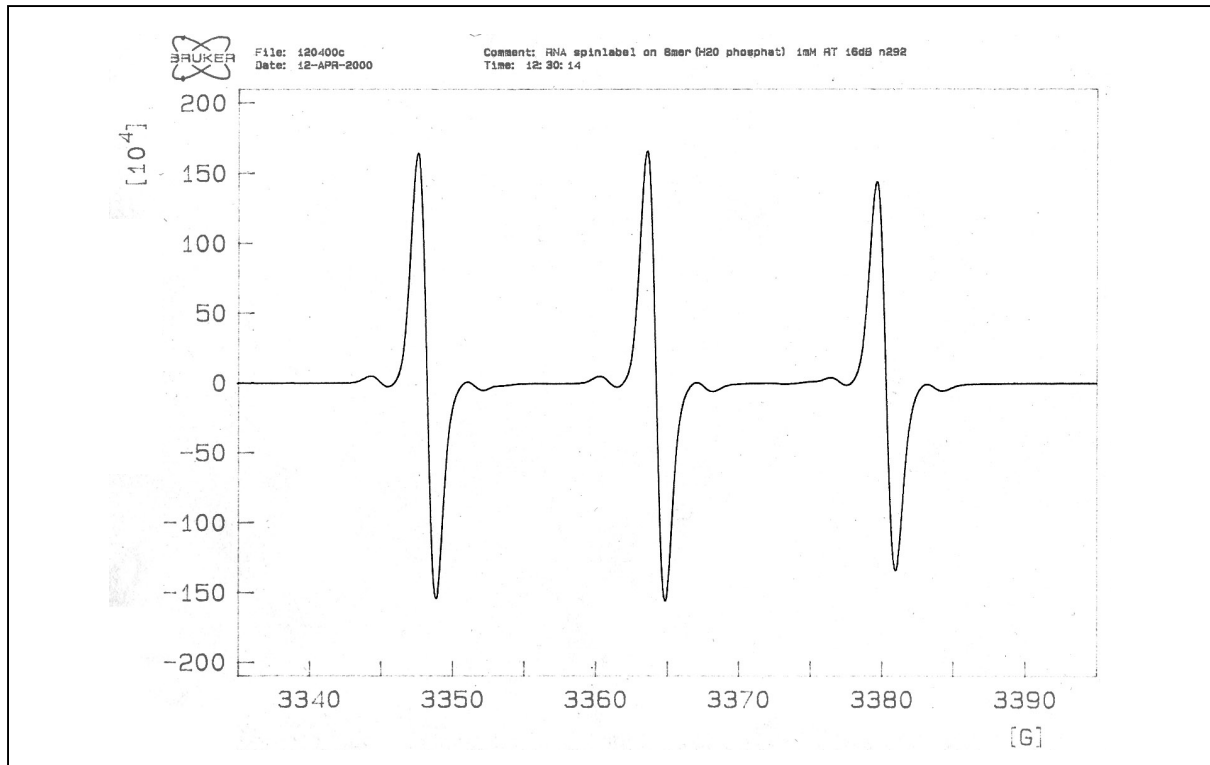


Abb. 9.35 Enzymatische Hydrolyse eines Gemisches aus iodierten (T^I) und spin-gelabelten Strängen (T^*).

9.8.4 ESR-Spektroskopie

Der Spin-Label **29** zeigt ein typisches Nitroxid Spektrum. Es sind drei Linien zu erkennen (Abb. 9.36).

Die Kupplung des Labels an ein Dimer führt zu einem identischen Spektrum, da durch die schnelle Bewegung bei Raumtemperatur verglichen zum Zeitfenster die anisotropen Effekte gemittelt werden.

Abb. 9.36 ESR-Spektrum des Nitroxids 29

Bei der Kupplung des Labels an den Poly-T Strang SG3 kommt es zu einer Einschränkung der Beweglichkeit und somit zu einer Anisotropie (Abb. 9.37).

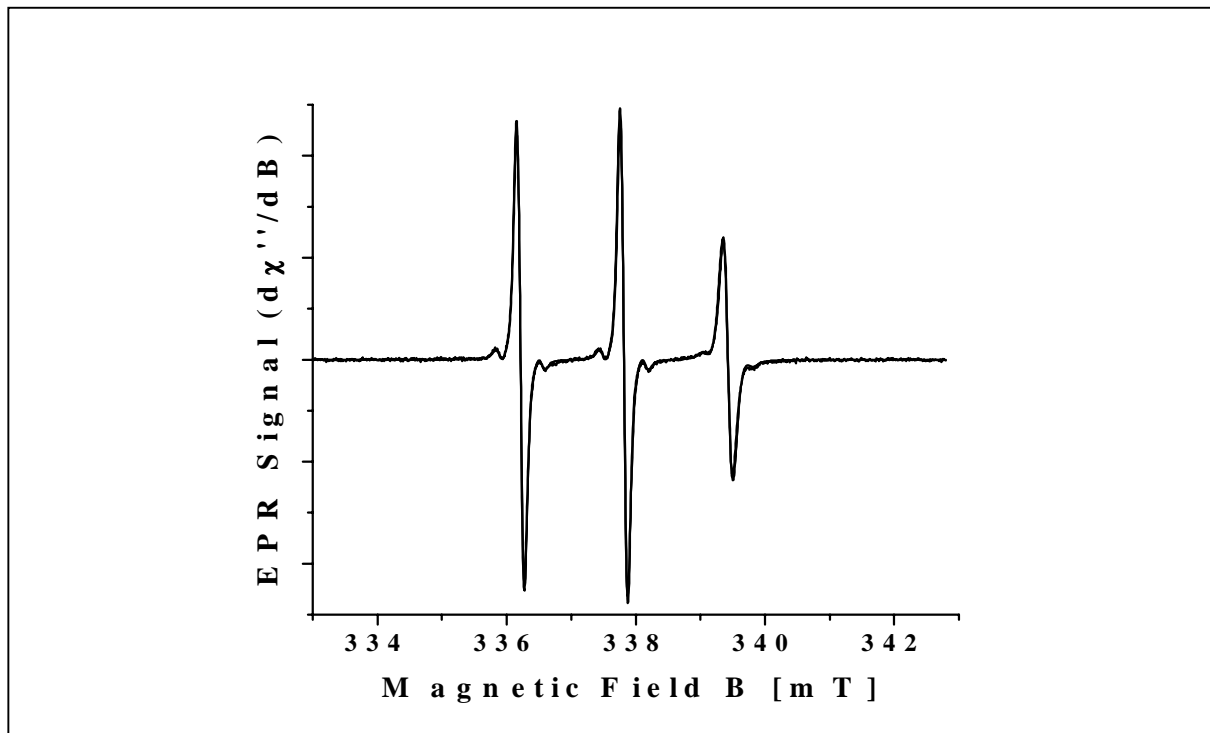


Abb. 9.37 ESR-Spektrum von SG3

Das CW-Spektrum wurde bei 9.48 GHz aufgenommen. Aus der Simulation des Spektrums erhält man folgende Parameter: $g_{\text{iso}} = 2.006$, $A(^{14}\text{N}) = -1.605$ mT, $A(^{13}\text{C}) = 0.660$ mT, $a = 1.13$, $b = 0.21$ and $c = 0.24$. Dabei sind a , b , c sind die Parameter, die für die Simulation der Linienbreite nach $\Delta H = a + bm_l + cm_l^2$ genutzt werden

10 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich im Wesentlichen mit zwei Zielen. Zum einen sollte durch den selektiven Einbau von modifizierten Nukleosiden der UUCG-Tetraloop untersucht werden, um seine ungewöhnlich hohe Stabilität besser zu verstehen. In einem zweiten Projekt stand die Entwicklung einer neuen Methode für das Spin-Labeling von Oligonukleotiden für die ESR-Spektroskopie im Mittelpunkt.

Die einzigartige hohe Stabilität des UUCG-Tetraloops beruht auf der Ausnutzung der drei stabilisierenden Faktoren: Wasserstoffbrücken, Basenstapelung und Solvation. Für die Untersuchung des UUCG-Tetraloops wurden 2'-Fluorpyrimidine **22a/b**, **23a/b** und **27a/b**, 2'-Desoxyuridin **26a/b** sowie ein dem Uridin isosterer Baustein **28a/b** eingesetzt (Abb. 10.1). Während die Bausteine **27a/b** und **28a/b** vorlagen, sind die Bausteine **22a/b**, **23a/b** und **26a/b** synthetisiert worden.

2'-Fluorpyrimidine können durch die fehlende 2'-OH-Funktion nicht als Wasserstoffbrückendonoren dienen. Weiterhin verschiebt die Fluorierung in *ribo*- bzw. *arabino*-Stellung das C3'-*endo*/C2'-*endo* Gleichgewicht. Im Vergleich mit dem Einbau von 2'-Desoxyuridin lassen sich Aussagen über Vorzugskonformation und Beteiligung an Wasserstoffbrücken einzelner Nukleotide im Loop machen.

Ein Schlüsselmolekül für die Synthese der 2'-Fluor modifizierten Bausteine **22a/b** und **23a/b** ist 2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil **19** welches durch die Umsetzung von Uridin **18** mit Diphenylcarbonat und Natriumhydrogencarbonat in HMPT erhalten werden kann. Dieses ermöglicht die selektive Einführung eines Fluor-Atoms.

Die 2'-Fluornukleoside wurden nach Standardbedingungen in Phosphoramidite überführt. Die Darstellung des Cytidinbausteins **23a/b** gelang durch direkte Umsetzung der Verbindung **22a/b** mit 1,2,4-Triazol und POCl₃. Diese Reaktion erspart einen gesonderten mehrstufigen Syntheseweg für die Verbindung **23a/b** ausgehend vom Cytidin.

Die Bausteine wurden selektiv an verschiedenen Positionen im Loop- und Stembereich der UUCG-Haarnadelschleife mittels der Phosphoramiditmethode an einem Syntheseautomaten eingebaut.

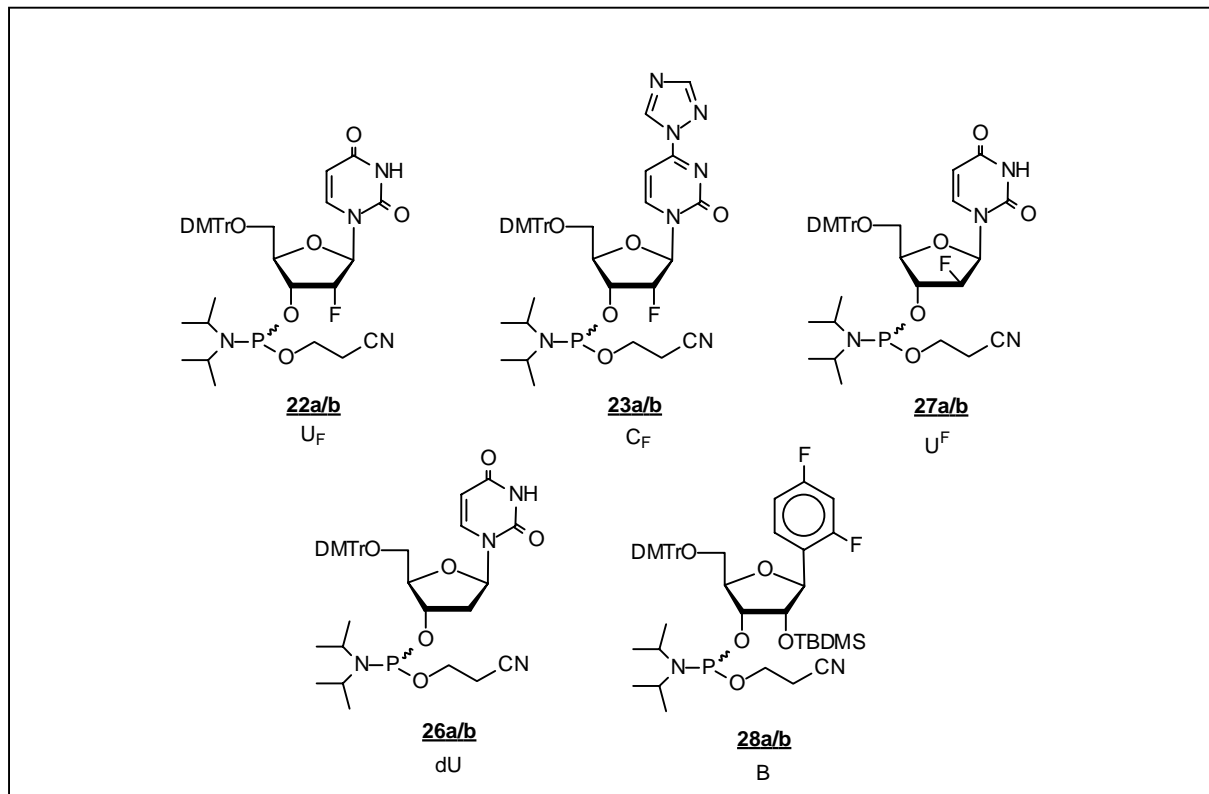


Abb. 10.1 Modifizierte Bausteine für die Untersuchung des UUCG-Tetraloops

Die Aufreinigung der erhaltenen RNA-Stränge erfolgte durch Anionenaustausch-HPLC. Nach der Charakterisierung durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Stränge mittels UV- und CD-Spektroskopie untersucht. Neben den T_m -Werten wurden auch die thermodynamischen Parameter bestimmt.

Aus den gemessenen Daten konnten im Wesentlichen folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Der Einbau aller Bausteine im Loopbereich führte zu einer Destabilisierung im Vergleich zum nativen Loop. Die Inkorporation von U_F im Stembereich hatte eine beachtliche Stabilisierung der Struktur zur Folge, im Fall des Stranges HP19 von 8°C (siehe Tab. 7.1, Seite 79)
- Der Einbau von U_F an der Position U4 führte erwartungsgemäß zu einer Destabilisierung, da die durch NMR-Daten belegte Wasserstoffbrücke zu G7 nicht ausgebildet wird.
- An der Position U4 liegt bevorzugt eine C2'-endo Konformation vor.
- Von besonderer Bedeutung für die Stabilität des Loops ist die Position C6. Die Inkorporation von C_F hat eine besonders deutliche Destabilisierung zur Folge, woraus auf eine bevorzugte C2'-endo Konformation geschlossen werden kann. Zum anderen spielen

hier Solvatationseffekte eine Rolle, da die 2'-OH-Funktion des nativen Loops Kontakt zum Lösungsmittel hat.

- Der Einbau des isosteren Bausteins **28a/b** führte an keiner Position zu einer Stabilisierung, obwohl durch das ausgeprägte π -System eine bessere Basenstapelung zu erwarten wäre. Im Gegenteil wird durch die modifizierte Base der Tetraloop nachhaltig destabilisiert (12°C).
- Auffällig ist eine Abflachung der erhaltenen Schmelzkurven, die auf eine Abnahme der Kooperativität oder das Vorhandensein verschiedener Zwischenstufen schließen lässt. Auch NMR-Ergebnisse belegen, dass der Tetraloop ein hohes Maß an Flexibilität zeigt. Die erhaltenen Daten sind in Übereinstimmung mit einer auf NMR-Daten beruhenden simulierten Struktur, die Williams et al, 2001 vorgeschlagen haben.
- Die Mehrfacheinbauten zeigen, dass die stabilisierenden Kräfte dieses Tetraloops synergetisch scheinbar optimal zusammenwirken und nur schwer getrennt voneinander betrachtet werden können.

Im zweiten Projekt sollten Oligonukleotide durch das Anbringen von Spin-Labeln für die ESR-Spektroskopie zugänglich gemacht werden.

Zunächst ist der durch seine Starrheit geeignete Label **29** in einer 8-stufigen Synthese ausgehend von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-on **41** synthetisiert worden. Nach der Bromierung in α und α' -Position wird durch eine Favorskii-Umlagerung der Fünfring aufgebaut. Die Oxidation des Amins wurde mit H_2O_2 /Natriumwolframat durchgeführt. Nach der basischen Hydrolyse wird die Seitenkette über ein Weinrebamid zum Aldehyd reduziert. Eine direkte Reduktion war nicht möglich.

Das terminale Alkin des Labels **29** wird durch Seitenkettenverlängerung durch eine Wittig-Reaktion mit anschließender Dehydrochlorierung erhalten. Ein alternativer Syntheseweg, der die Oxidation des Amins zum Nitroxid auf einer späteren Stufe vorsieht, war nicht erfolgreich.

Da die Ankupplung des Labels an die 5-Position eines Uridin- oder Desoxyuridin-Bausteins während der Festphasensynthese am Synthesautomaten erfolgen soll, ist der entsprechende 5-Ioduridinphosphoramidit- bzw. 2'-Desoxy-5-Ioduridinphosphoramidit-baustein synthetisiert worden.

Nach der Schützung der freien Hydroxylgruppen mit der Acetylschutzgruppe ist die Iodierung der 5-Position mit Iod und Cerammoniumnitrat durchgeführt worden. Nach der Entschützung der Hydroxylgruppen wurden die Phosphoramidite nach Standardmethoden synthetisiert.

Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten, die ein gelabeltes Phosphoramidit am Synthesizer eingebaut haben, wurde die Kupplung des Labels in dieser Arbeit während der Festphasensynthese durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu dem gelabelten Amidit pro Kupplung nur geringe Mengen des Spin-Labels verbraucht werden.

An der zu markierenden Position wird ein 5-Ioduridin oder 2'-Desoxy-5-ioduridinbaustein eingebaut und danach die Säule vom Synthesizer entfernt. Nun wird mit Hilfe von Spritzen eine Mischung des Labels, des Palladium(0)-Katalysators und CuI in DMF/Triethylamin auf die Säule aufgegeben. Nach der erfolgten Kupplung wird die Säule wieder am Synthesizer installiert und die Synthese fortgesetzt.

Es hat sich aus Gründen der einfacheren Handhabbarkeit als günstiger erwiesen, als Katalysator nicht Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) **66** sondern Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid **68** einzusetzen.

Die Kupplungsausbeuten des Labels lagen nach HPLC-Daten bei über 90% für die Stränge SG1 bis SG4 (siehe Tab. 9.2, Seite 132). Die Ausbeuten lagen damit genauso hoch wie die Kupplung des als Vergleichsverbindung eingesetzten Hexins.

Während die HPLC-Aufreinigung bei den kurzen Strängen erfolgreich war, waren bei den längeren Strängen SG7 bis SG9 die Unterschiede in den Retentionszeiten geringer, sodass es bei noch längeren Strängen nötig werden könnte, die Stränge mittels Gelelektrophorese aufzureinigen.

Die Analytik erfolgte durch ESR-Spektroskopie, enzymatischen Verdau und Massenspektrometrie. Jedoch habe sich sowohl die MALDI-TOF als auch die ESI-Massenspektrometrie als problematisch erwiesen. Die Spektren waren oft nicht aussagekräftig und wenig reproduzierbar.

Als Ausblick für zukünftige Arbeiten ausgehend von dieser Arbeit werden folgende Untersuchungen angeregt:

- Die Untersuchung, ob FPLC oder Gelelektrophorese geeignete Methoden darstellen, um längere gelabelte Stränge aufzureinigen.
- Darstellung von iodierten Purinnukleosiden, um beliebige Positionen innerhalb eines Oligonukleotids mit einem Spin-Label markieren zu können.
- Den Mehrfacheinbau von Spin-Labels um Abstände in kleinen RNA-Strukturen, z.B. Ribozymen zu bestimmen. Hier können auch Wechselwirkungen mit anderen paramagnetischen Sonden wie Manganionen ausgenutzt werden.

11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeines

11.1.1 Chromatographie

Folgende Lösemittel wurden für die präparative Säulen- und Dünnschichtchromatographie eingesetzt:

Acetonitril; p.a.

Dichlormethan; technische Qualität, über Calciumchlorid getrocknet und destilliert

Ethylacetat; technische Qualität, über Calciumchlorid getrocknet und destilliert

Isopropanol; technische Qualität, bei Normaldruck destilliert

Methanol; technische Qualität, bei Normaldruck destilliert

Toluol; technische Qualität, bei Normaldruck destilliert

Triethylamin; p.a.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator der Firma Merck verwendet (Kieselgel 60 F₂₅₄, Nr. 1.05554; 0,2 mm Schichtdicke). Die Laufstrecke betrug 6-8 cm. Die R_F-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Nukleoside und Nukleotide konnten unter einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert werden. Dimethoxytritylgeschützte Verbindungen konnten darüber hinaus durch Überleiten von Salzsäuredämpfen oder durch Erhitzen der Aluminiumfolien als orangegefärbte Flecken detektiert werden.

Präparative Dünnschichtchromatographie (pDC)

Die präparative Dünnschichtchromatographie wurde an einem Chromatotron Modell 7924 T (Harrison Research) durchgeführt. Dabei diente gipshaltiges Kieselgel (Merck 60 PF₂₅₄, Nr.7749) der Schichtdicke 1, 2 bzw. 4 mm, das auf entsprechende Glasplatten (Durchmesser 20 cm) aufgetragen wurde, als Trennmedium. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Präparative Säulenchromatographie (Flashchromatographie, FC)

Die Flash-Chromatographie erfolgte mit Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40-63 μm , (Merck Nr. 9385).

11.1.2 Spektroskopie

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren der Nukleoside und Nukleotide wurden bei 300 K auf den Geräten AM250, WH270 und AMX400 (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Als Eichung für die jeweilige chemische Verschiebung δ [ppm] diente das jeweilige Lösungsmittelsignal. Als Lösungsmittel wurden D_2O mit $\delta=4.79$, DMSO-d_6 mit $\delta=2.49$ ppm und CDCl_3 mit $\delta=7.26$ ppm für die ^1H -NMR-Spektren, sowie DMSO-d_6 mit $\delta=39,5$ ppm für die ^{13}C -NMR-Spektren verwendet.

UV-Spektroskopie

Die Schmelzkurven der Oligonukleotide wurden bei 260 und 274 nm an einem Cary 1 UV-Spektrometer der Firma Varian, Darmstadt aufgenommen. Die Heizrate betrug $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$.

Die optische Dichte (OD_{260} oder A_{260}) wurde bei 260 nm in einem Volumen von 1 ml Wasser bei 20°C bestimmt.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren der Nitroxide wurden an einem IR-Spektrometer der Firma Perkin Elmer (1600 Series FTIR) gemessen.

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem CD-Spektropolarimeter der Firma Jasco, Großumstadt unter folgenden Messbedingungen durchgeführt: Range (350-180 nm), Sensitivity (je nach OD_{260} zwischen 10 und 30 mdeg), Resolution (0,2 nm), Accumulation 5-10 (abhängig von der Oligonukleotidkonzentration), Band width (2,0 nm), Response (1 sec) und Speed (50 nm/min). Das Gerät war mit einem Thermostat RTE 100 der Firma Neslab ausgestattet.

Für die Messungen wurden Präzisionsküvetten aus Quarzglas der Firma Hellma (Suprasil 10.00 mm, 1 ml) verwendet. Diese sind bis zu einer Wellenlänge von 180 nm geeignet.

11.1.3 Massenspektrometrie

ESI

Die Massenspektren der Nukleoside und Nukleotide wurden auf einem Gerät der Firma Fisons, England (VG Platform II) aufgenommen. Die Massen der spin-gelabelten Bausteine waren häufig erst nach Säurezugabe detektierbar.

MALDI

Die Massenspektren der Oligonukleotide wurden an einem MALDI-TOF Massenspektrometer der Firma Fisons, England (VG TofSpec) ermittelt.

Als Matrix verwendete man eine Mischung aus zwei Teilen einer gesättigten Lösung von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon in einem Ethanol/Wasser Gemisch (1:1) mit 0,5%iger Trifluoressigsäure und einem Teil 0,1M Ammoniumcitrat in Wasser.

11.1.4 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden an einem Gerät mit der Bezeichnung CHNO-Rapid (Foss-Heraeus) durchgeführt.

11.1.5 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktapparatur nach Tottoli der Firma Büchi (Modell Büchi 510) gemessen. Die Werte wurden nicht korrigiert.

11.1.6 Enzymatische Hydrolyse

0,5 OD des Oligonukleotids werden in 100 µl Natriumacetatpuffer (30mM, pH 5,3) gelöst und mit 25 µl Nuclease P1 (300 Einheiten/ml Lösung) versetzt. Der Ansatz wird zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Abspalten der 5'-Phosphatgruppen werden 40 µl des Dephosphorilierungspuffers (0,5M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,5) und 10 µl alkalische Phosphatase (10 Einheiten) hinzugegeben und wiederum zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Nukleosidzusammensetzung wurde aufgrund der Peakflächen und den Extinktionskoeffizienten bei 260 nm (dC: 7300, dG: 11700, dT: 8800, dA: 15400) ermittelt.

11.1.7 Chemikalienliste und Lösungen

Acetonitril; C_2H_3N [41,09]; Fluka Nr. 00700; puriss, p.a., >99,5%

Acetonitril, zum Lösen der Amidite; C_2H_3N [41,09]; PE Biosystems; $H_2O < 10$ ppm

Aceton- d_6 ; C_3D_6O [64,02] Deutero GmbH; 99,8%

Adenosin; $C_{10}H_{13}N_5O_4$ [267,25]; Fluka Nr. 01890; >99%, Smp. 234-237°C

Alkalische Phosphatase; Roche 713 023; from calf intestine

Ammoniak; NH_3 (g) [17,03]; Linde

Ammoniak; NH_3 [17,03]; Merck Nr. 105426; 32% reinst, d=0,88

Ammoniumacetat; $C_2H_7O_2N$ [77,08]; Fluka Nr. 09688, BioChemika, >99%

Ammoniumcer(IV)-nitrat; $CeH_8N_8O_{16}$ [548,23]; Fluka Nr.2249; puriss. p.a., 99%

Argon; Linde; Qualität 4.0 und 4.8

Benzol; C_6H_6 [78,11]; Fluka Nr. 12553; absolut, über Molekularsieb, puriss. >99,5%, Sdp.; 80°C, d=0,879

Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid; $C_{36}H_{30}Cl_2PPd$ [701,89]; Lancaster Nr. 2888; 98%

Butylalkohol; $C_4H_{10}O$ [74,12]; Fluka Nr. 19420; puriss p.a., Sdp. 116-118°C, d=0,81

Tert.-Butyl-dimethylsilylchlorid 1M in THF (TBDMSCl); $C_6H_{15}ClSi$ [150,73]; Aldrich Nr. 37,295-1; d=0,879

Butyllithium 1,6M in Hexan; C_4H_9Li [64,06]; Aldrich Nr. 18,617-1

Calciumcarbonat; $CaCO_3$ [100,09]; Fluka Nr. 21061; MicroSelect >99%

Celite Filter Gel; Fluka Nr. 22139

Chlormethyl-triphenyl-phosphoniumchlorid; $C_{19}H_{17}Cl_2P$ [347,23]; Fluka Nr. 25305; purum >97%

Chloroform-d; $CDCl_3$; Aldrich Nr. 22,578-9; 99,8 Atom% D, enthält 0,03 Vol.-% TMS

sym.-Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin); $C_8H_{11}N$ [121,18]; Fluka Nr. 27690; puriss. >99%, Sdp. 170-172°C, d=0,914

2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit; $C_9H_{18}ClN_2OP$ [236,68]; Aldrich Nr. 30,230-9; 99%, Sdp. 103-105°C [0,08 mm], $d=1,061$

3'-O-(2-Cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidite für die DNA und RNA Synthese;

PerSeptive Biosystems, 5'-O [(MeO)₂Tr]iBu²G_d, 5'-O-[(MeO)₂Tr]Bz⁶A_d, 5'-O-[(MeO)₂Tr]Bz⁴C_d, 5'-O-[(MeO)₂Tr]T, 2'-O-tBuMe₂Si-5'-O-[(MeO)₂Tr]iBu²G, 2'-O-tBuMe₂Si-5'-O-[(MeO)₂Tr]PAC²G, 2'-O-tBuMe₂Si-5'-O-[(MeO)₂Tr]Bz⁶A, 2'-O-tBuMe₂Si-5'-O-[(MeO)₂Tr]-PAC⁶A, 2'-O-tBuMe₂Si-5'-O-[(MeO)₂Tr]Bz⁴C, 2'-O-tBuMe₂Si-5'-O-[(MeO)₂Tr]U

Cytidin; $C_9H_{13}N_3O_5$ [243,22]; Fluka Nr. 30270, BioChemika; >99%, Smp. 210-220°C

Deuteriumoxid; D_2O [20,01]; Deutero GmbH; 99,9%

Dichlorethan; $C_2H_4Cl_2$ [98,96]; Fluka Nr. 03527; puriss., >99,5%, über Molekularsieb, H_2O ; >50 ppm, Sdp. 84°C, $d=1,253$

Dichlormethan (Methylenchlorid); CH_2Cl_2 [84,93]; Fluka Nr. 66749; puriss., >99,5%, über Molekularsieb, H_2O <50 ppm, Sdp. 40°C, $d=1,325$

N,O-Dimethylhydroxylamin-hydrochlorid; $C_2H_7NO \cdot HCl$ [97,55]; Fluka Nr.40706; purum >99%, Smp. 112-115°C

Diethylether; $C_4H_{10}O$ [74,12]; Merck Nr. 100921; p.a., mind. 99,5%, max. 0,1 % H_2O , Sdp. 34°C, $d=0,712$

Diethylpyrocarbonat (DEPC); $C_4H_{10}O_5$ [162,14]; Fluka Nr. 32490; purum, >97%, Sdp. 160-163°C, $d=1,12$

3,4-Dihydro-2H-pyran; C_5H_8O [84,12]; Fluka Nr. 37350; purum ~97%, Sdp. 84-88°C, $d=0,928$

Diisobutylaluminiumhydrid 1,0M in Heptan; $C_8H_{19}Al$ [142,22]; Aldrich Nr. 21,496-5; $d=0,731$

Diisopropylethylamin (DIPEA); $C_8H_{19}N$ [129,25]; Aldrich Nr. 12,580-6; 99%, Sdp. 127°C, $d=0,742$

4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl); $C_{21}H_{19}ClO_2$ [338,38]; Merck Nr. 818616; >99%, Smp. 120-123°C

4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP); $C_7H_{10}N_2$ [122,17]; Fluka Nr. 39405; purum >98%, Smp. 112-113°C

N,N-Dimethylformamid (DMF); C_3H_7NO [73,10]; Merck Nr. 103053; p.a., mind. 99,5%, aminfrei, über Molekularsieb, H_2O <0,01%, Sdp. 153-155°C, $d=0,948$

Dimethylsulfoxid-d₆ (DMSO-d₆); C_2D_6OS ; Aldrich Nr. 15,187-4; 99,9 Atom%

Essigsäure; $C_2H_4O_2$ [60,05]; Riedel-de Haën Nr. 33209; mind. 99,8%, Sdp. 117-118°C,
d=1,049

Ethanol; C_2H_6O [46,07]; Heraeus Nr. 17396; abs., Sdp. 78°C, d=0,789

Guanosin; $C_{10}H_{13}N_5O_5$ [283,25]; Fluka Nr. 51050; BioChemika, >99%, Smp. 240-250°C

Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT); $C_6H_{18}N_3OP$ [179,20]; Fluka Nr. 52730;
purum >98%

Iodsäure; HIO_3 [175,91]; Fluka Nr. 58060; puriss. p.a. >99,5%

5-Ioduridin; $C_9H_{11}N_2O_6$ [370,01]; Fluka Nr. 58150; ~99%

Kaliummonopersulfat Tripelsalz; $2KHSO_5, KHSO_4, K_2SO_4$ [614,76]; Fluka Nr. 60404;
pract., >4.7% aktiver Sauerstoff

Kupfer(I)-iodid; CuI [190,44]; Fluka Nr. 61195; purum >98%

Lithiumchlorid; $LiCl$ [42,39]; Fluka Nr. 62476; BioChemika, >99%

Lithiumhydroxid Monohydrat; $LiOH \cdot H_2O$ [41,96]; Fluka Nr. 62528, BioChemika, >99%;

Magnesiumchlorid Hexahydrat; $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ [203,31]; Fluka Nr. 63068, BioChemika,
>99%

Mangan(IV)-oxid aktiviert; MnO_2 [86,94]; Fluka Nr. 53297; pract. ~90 %

Methanol; CH_4O [32,04]; Fluka Nr. 65542; puriss. >99,5%, über Molkularsieb, H_2O <100
ppm, Sdp. 64-65°C, d=0,79

1-Methyl-imidazol; $C_4H_6N_2$ [82,11]; Fluka Nr. 67558; puriss., >99%, H_2O <0,03%, d=1,035,
Sdp. 197-199°C

1-Methyl-2-pyrrolidinon; C_5H_9NO [99,13]; Sigma-Aldrich Nr. 27,045-8; 99% für die
HPLC-Spektroskopie, Sdp. 81-82°C/10mm, d=1,033

Molekularsieb 3Å Pulver; Aldrich Nr. 23,364-1; Korngröße 3,5 µm, ungetrocknet, die Aktivierung erfolgt durch Ausheizen (Heizpilz Stufe 1 oder Trockenpistole) im Ölpumpenvakuum

Natriumacetat; $C_2H_3O_2Na$ [82,04]; Fluka Nr. 71183; BioChemika, >99,5%

Natriumchlorid; $NaCl$ [58,44]; Fluka Nr. 71376; BioChemika, >99,5%

Natriumdihydrogenphosphat; NaH_2PO_4 [119,98]; Fluka Nr. 71636; BioChemika, >99,5%

Natriumhydrogencarbonat; $NaHCO_3$ [84,01]; Fluka Nr. 71630; purum, 98%

Natriumhydrogenphosphat; Na_2HPO_4 [141,96]; Fluka Nr. 71636; BioChemika, >99,5%

Natriumhydroxid-Plätzchen; $NaOH$ [40,01]; Roth Nr. 6771; 99%

Natriumsulfat; Na_2SO_4 [152,04]; Riedel-de Haën Nr. 13462; 99%, trocken

Natriumwolframat-Dihydrat; $Na_2O_4W \cdot 2H_2O$ [329,87]; Fluka Nr. 72069; MicroSelect >99,5%;

Nuclease P1; Roche 236 225; Für analytische und präparative Zwecke, aus *Penicillium citrinum*

Phenylhydrazin; $C_6H_8N_2$ [108,14]; Fluka Nr. 78670; purum p.a. >97%, Smp. 18-21°C

Phosphoroxchlorid; Cl_3OP [153,33]; Fluka Nr. 79580; purum >98%, Sdp. 105-110°C, $d=1,675$

Phosphorpentoxid; P_2O_5 [141,94]; Riedel-de Haën Nr. 04113; 98,5%

Pyridin; C_5H_5N [79,10]; Grüssing Nr. 13057; >99,5%, Sdp. 115°C, $d=0,978$

Pyridin; C_5H_5N [79,10]; Fluka Nr. 82704; puriss., >99,8%, H_2O <50ppm, über Molekularsieb, Sdp. 116°C, $d=0,983$

Salzsäure; HCl [36,46]; Riedel-de Haën Nr. 30721; p.a., mind. 37%

Silbernitrat; $AgNO_3$ [169,98]; Fluka Nr. 85228; puriss., >99,5%

Stickstoff; Qualität 4,0 für die Aufnahme der CD-Spektren; eingesetzt wie gekauft

Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) 1M in THF; $[CH_3(CH_2)_3]NF$ [261,47]; Aldrich Nr. 21,614-3

Tetrahydrofuran; C_4H_8O [72,11]; Fluka Nr. 87371; puriss., abs., über Molekularsieb, Sdp. 67°C, $d=0,89$

Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0); $C_{72}H_{60}P_4Pd$ [1155,58]; Fluka Nr. 87645; purum >97%

Titriplex II; $C_{10}H_{16}N_2O_8$ [292,25]; Merck Nr. 1.08417.0100

Toluol; C_7H_8 [92,14]; Fluka Nr. 89682; purum, >99%, Sdp. 110-112°C, $d=0,866$

Toluol; C_7H_8 [92,14]; technische Qualität, Sdp. 110°C, $d = 0,87$

Trägermaterial für die DNA- und RNA-Festphasensynthese; PerSeptive Biosystems; 5'-*O*-[(MeO)₂Tr]iBu²G_d, 5'-*O*-[(MeO)₂Tr]Bz⁶A_d, 5'-*O*-[(MeO)₂Tr]Bz⁴C_d, 5'-*O*-[(MeO)₂Tr]T_d
2'-*O*-tBuMe₂Si-5'-*O*-[(MeO)₂Tr]iBu²G, 2'-*O*-tBuMe₂Si-5'-*O*-[(MeO)₂Tr]Bz⁶A, 2'-*O*-
tBuMe₂Si-5'-*O*-[(MeO)₂Tr]Bz⁴C, 2'-*O*-tBuMe₂Si-5'-*O*-[(MeO)₂Tr]U

1,2,4-Triazol; $C_2H_3N_3$ [69,07]; Fluka Nr. 90630; puriss., >99%, Smp. 119-121°C

Triethylamin (TEA); $C_6H_{15}N$ [101,19]; Fluka Nr. 90340; puriss. p.a., >99,5%, Sdp. 88-89°C, $d=0,726$

Triethylamin Trihydrofluorid; $(C_2H_5)_3N \cdot 3HF$ [161,21]; Aldrich Nr. 34,464-8; Sdp. 70°C/15 mm, $d=0,989$

Uridin; $C_9H_{12}N_2O_6$ [121,14]; Fluka Nr. 94320; BioChemika, >99%, Smp. 163-167°C

Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen die der RNA-Aufreinigung und Analytik dienen, werden mit deionisierten DEPC-Wasser hergestellt.

DEPC-Wasser

1 ml Diethylpyrocarbonat wird zu 1000 ml deionisiertem Wasser gegeben und für 12 h stehen gelassen. Die Lösung wird danach 30 min bei 121°C autoklaviert.

Ammonikalische Methanollösung

Eine gesättigte Lösung wird durch Einleiten von NH_3 (g) in Methanol (p.a.) bei -78°C für 30 Minuten hergestellt. Die Lösung wird bei -20°C gelagert.

10mM Phosphatpuffer (Aufnahme von CD-Spektren und Schmelzkurven)

177 mg Na_2HPO_4 (10mM), 150 mg NaH_2PO_4 (10 mM) und 2,045 g NaCl (140 mM) werden in Wasser gelöst und auf 250 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit Salzsäure (0,1 N) auf 7.0 eingestellt.

30mM Acetatpuffer pH 5,3 (Enzymatische Hydrolyse)

246 mg Natriumacetat (wasserfrei) (3 mmol) und 47 μl (0,08 mmol) Essigsäure werden mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

1M Triethylammoniumacetatpuffer (HPLC)

140 ml Triethylamin (1 mol) und 58 ml Essigsäure (0,92 mol) werden im Eisbad gekühlt, zusammengegeben und schließlich mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit Triethylamin auf 7.0 eingestellt. Diese Lösung dient als Stammlösung und wird für die HPLC-Läufe im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt.

1M Lithiumchloridlösung (HPLC)

42,39 g (1 Mol) Lithiumchlorid werden in Wasser gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird 30 min bei 121°C autoklaviert.

11.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil **19**

2'-Fluor-2'-desoxyuridin **20**

2'-Fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **21**

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **22a/b**

N^4 -1,2,4-Triazol-3'-O-(2-cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin **23a/b**

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **25**

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **26a/b**

2,2,5,5-Tetramethyl-3-cyano-pyrrolin-*N*-oxyl **49**

Dimethyldioxiran **45**

N-Methoxy-*N*-methylamin **69**

2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxamid **43**

3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **44**

2,2,5,5-Tetramethyl-3-carboxy-pyrrolin-*N*-oxyl **46**

3-(*N*-Methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **50**

2-Formyl-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **48**

2,2,5,5-Tetramethyl-3-(2-chloroethenyl)pyrrolin-*N*-oxyl **51a/b**

2,2,5,5-Pentamethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **29**

5-[3-(2,2,5,5-Pentamethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl)ethinyl]-2'-desoxyuridin **67**

N-Methoxy-*N*,2,2,5,5-pentamethyl-3-pyrrolin-3-carboxamid **52**

2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxaldehyd **53**

2,2,5,5-Tetramethyl-3-(2-chlorethinyl)-3-pyrrolin **54a/b**

2,2,5,5-Tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin **55**

2',3',5'-Tri-*O*-acetyluridin **56**

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-5-ioduridin **58**

5-Ioduridin **60**

5-Iod-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **62**

5-Iod-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-*O*-(*tert.*-butyl-dimethylsilyl)uridin **64**

5-Iod-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-*O*-(*tert.*-butyl-dimethylsilyl)uridin **65**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5-iod-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-(*tert.*-butyl-dimethylsilyl)uridin **40**

3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxyuridin **57**

3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxy-5-ioduridin **59**

2'-Desoxy-5-ioduridin **61**

2'-Desoxy-5-iod-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **63**

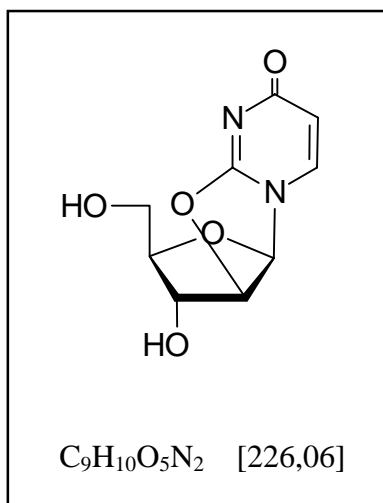
3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-desoxy-5-iod-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **39**

2-Cyanethoxy-dichlorphosphin **70**

2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **71**

11.3 Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen

2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil 19



5g Uridin 18 (20,48 mmol), 5,84 g Diphenylcarbonat (27,2 mmol) und 132 mg (1,56 mmol) Natriumhydrogencarbonat werden in 20 ml HMPT gelöst und 20 min auf 150°C erhitzt. Dabei ist eine leichte Gasentwicklung zu erkennen. Die Lösung wird farblos. Sofort nach Beendigung der Gasentwicklung läßt man die Reaktionsmischung abkühlen und versetzt sie mit 80 ml Wasser. Das Gemisch wird 4 mal mit Chloroform ausgeschüttelt und die wäßrige Phase evaporiert. Man erhält einen weißlich gelben Feststoff, der aus wenig Methanol umkristallisiert wird.

Ausbeute : 3,9 g (84%)

DC : R_f = 0,68 (Ethylacetat / MeOH 1:1)

Schmelzpunkt : 241-243°C

ESI-MS (+) : berechnet 226,06 g/mol
gefunden 227,3 g/mol

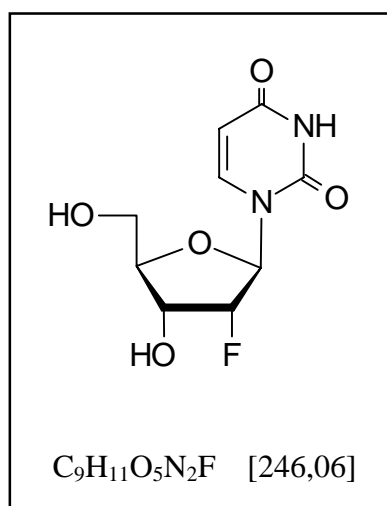
^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, D_2O

7.69 (d, 1 H, $J=7,5$ Hz, H-6); **6.31** (d, 1 H, $J=5,9$ Hz, H-1'); **5.96** (d, 1 H, $J=7,5$ Hz, H-5); **5.24** (d, 1 H, $J=5,9$ Hz, H-2'); **4.43** (m, 1 H, H-3'); **4.16** (m, 1 H, H-4'); **3.34** (m, 2 H, H-5')

^{13}C - NMR δ [ppm], 63 MHz, DMSO-d_6

171,61 (C-4); **160,20** (C-2); **137,42** (C-6); **109,01** (C-5); **90,41** (C-2'); **89,61** (C-1'); **89,16** (C-4'); **75,15** (C-3'); **61,24** (C-5');

2'-Fluor-2'-desoxyuridin 20



2,75 g (12,16 mmol) 2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil **19** werden in 250 ml abs. Dioxan in einem 500 ml Teflonkolben mit Rückflußkühler gelöst. Zu der Lösung gibt man 25 ml $\text{HF}_x/\text{Pyridin}$ (70/30) und erhitzt für ca. 48 Stunden auf 120°C .

Nach dem Abkühlen versetzt man die Lösung mit 30 ml Wasser und gibt langsam unter Rühren 60 g Calciumcarbonat zur Neutralisation hinzu. Die Reaktionslösung wird bis zur Trockene evaporiert. Der gelbliche Rückstand wird in Ethanol aufgenommen und mittels FC (Chloroform / MeOH 5:1) aufgereinigt. Das Produkt ist im Gegensatz zum Edukt UV-aktiv. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels erhält man einen weißen Schaum.

Ausbeute : 1,2 g (40%)

DC : $R_f = 0,36$ (Chloroform / MeOH 5:1)

Schmelzpunkt : 149-150°C

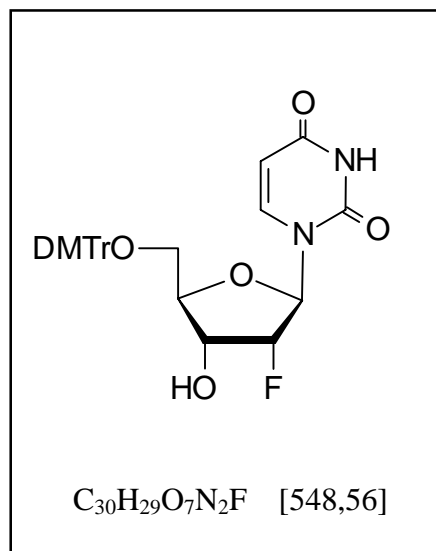
ESI-MS (+) : berechnet 246,06 g/mol
gefunden 246,9 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, D_2O

7.55 (d, 1 H, $J=8,1$ Hz, H-6); **5.72** (d, 1 H, $J_{\text{H-F}}=19,7$ Hz, H-1'); **5.59** (d, 1 H, $J=8,1$ Hz, H-5); **4.95** (ddd, 1 H, $J_{\text{H-F}}=52,8$ Hz, H-2'); **4.11** (m, 1 H, H-3'); **3.85** (m, 1 H, H-4'); **3.76-3.50** (m, 2 H, H-5')

^{13}C - NMR δ [ppm], 63 MHz, DMSO-d_6

163.19 (C-4); **150.28** (C-2); **140.45** (C-6); **101.64** (C-5); **93.49** (d, C-2', $J_{\text{C2'-F}}=184,3$ Hz); **87.11** (d, C-1', $J_{\text{C1'-F}}=34,0$ Hz); **83.13** (C-4'); **67.25** (d, C-3', $J_{\text{C3'-F}}=16$ Hz); **59.22** (C-5')

2'-Fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin 21

Zu einer Lösung von 556 mg 2'-Fluor-2'-desoxyuridin 20 (2,26 mmol) in 8,3 ml abs. Pyridin gibt man 1,15 g (3,39 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid und 472 μ l (3,39 mmol) TEA. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur erfolgt eine weitere Zugabe von 67,7 mg (0,2 mmol) Dimethoxytriphenylmethylchlorid.

Nach weiteren zwei Stunden wird die Reaktion durch Zugabe von Methanol beendet, das Reaktionsgemisch eingeengt und mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Chloroform / MeOH / TEA (95:5:1).

Ausbeute : 998 mg (81%)

DC : $R_f = 0,67$ (Dichlormethan / Methanol 9:1)

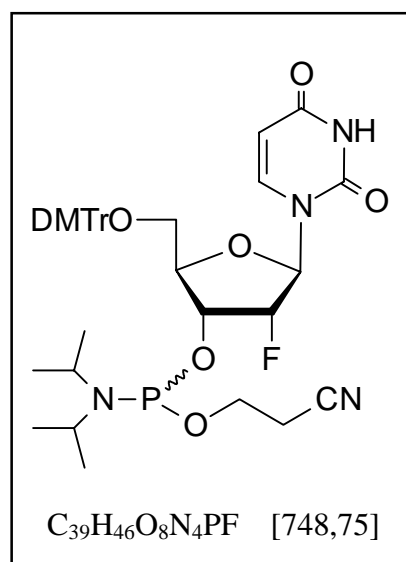
1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, $CDCl_3$

7.91 (d, 1 H, $J=8,2$ Hz, H-6); **7.4-7.2** (m, 9 H, arom. H); **6.84** (m, 4 H arom. H); **6.07** (dd, 1 H, $J_{H-F}=16,32$ Hz, H-1'); **5.34** (d, 1 H, $J=8,2$ Hz, H-5); **5.02** (dt, 1 H, $J_{H-F}=52,5$ Hz, H-2'); **4.59** (dq, 1 H, $J_{H-F}=20,2$ Hz, H-3'); **4.01** (m, 1 H, H-4'); **3.79** (s, 6 H, $-OCH_3$); **3.58** (m, 2 H, H-5')

^{13}C - NMR δ [ppm], 63 MHz, DMSO- d_6

163.25 (C-4); **158.28** (DMTr); **150.21** (C-2); **144.76** (DMTr); **140.94** (C-6);
135.48, **129.90**, **129.04**, **127.86**, **126.91**, **113.37** (DMTr); **101.56** (C-5); **93.59**
(d, C-2', $J_{\text{C}2'\text{-F}}=184,0$ Hz); **88.68** (d, C-1', $J_{\text{C}1'\text{-F}}=36,0$ Hz); **85.95** (DMTr);
81.14 (C-4'); **68.09** (d, C-3', $J_{\text{C}3'\text{-F}}=16,7$ Hz); **55.16** (C-5'); **55.16** (OCH₃)

3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin 22a/b



995 mg (1,81 mmol) 2'-Fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **21** werden einmal mit abs. Pyridin und dreimal mit Dichlormethan coevaporiert und nach Zugabe von 6 ml Dichlormethan und 932 μl (5,44 mmol) DIPEA auf 0°C abgekühlt. Nun werden 607 μl (2,72 mmol) β -Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphan **71** zugegeben. Nach fünf Minuten läßt man den Ansatz auf Raumtemperatur erwärmen und verdünnt ihn nach Vervollständigung der Reaktion (ca. 2,5 h) mit 30 ml Dichlormethan. Die Reaktionslösung wird mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Vor dem Trocknen über Natriumsulfat werden 0,2 ml TEA zugegeben.

Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird FC (Toluol / Ethylacetat 1:5) zur Aufreinigung eingesetzt.

Ausbeute : 1,11 g (82%)

DC : $R_f = 0,58$ und $0,49$ (Toluol / Ethylacetat 1:5)

ESI-MS (+) : berechnet 748,7 g/mol
gefunden 749,9 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

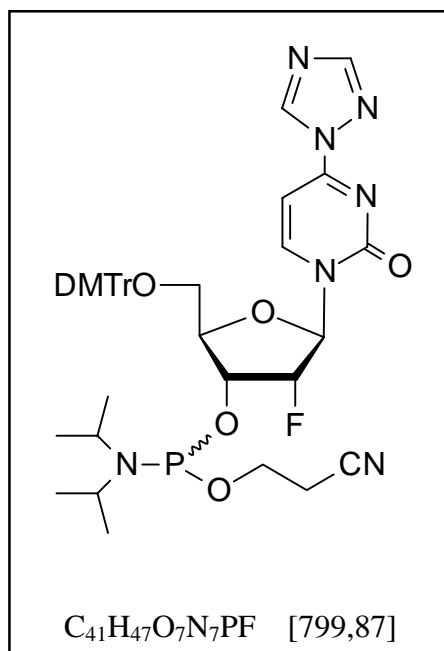
8.41 (s, 1 H, -NH); **7.91** bzw. **7.86** (2 d, 1 H, H-6); **7.86-6.72** (m, 13 H, arom. H); **6.02** (d, 1 H, H-1'); **5.19** bzw. **5.17** (2 d, 1 H, H-5); **5.02** (2 dd, 1 H, H-2'); **4.69-4.49** (m, 1 H, H-3'); **4.16** (m, 1 H, H-4'); **3.54** (3 s, 6 H, -OCH₃); **3.35-3.63** (m, 6 H, 2 CH₂, H-5', -OCH₂); **2.05** bzw. **2.36** (2 t, 2 H, CH₂CN); **1.18-1.03** (m, 12 H, CH₃)

^{31}P - NMR δ [ppm], 162 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

Diastereomer 1 : 151.51 (d, $J_{\text{P-F}} = 9.4$ Hz)

Diastereomer 2 : 151.74 (d, $J_{\text{P-F}} = 9.7$ Hz)

***N*⁴-1,2,4-Triazol-3'-*O*-(2-cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin 23a/b**



3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin 22a/b wird zunächst drei mal mit Benzol lyophilisiert.

Es werden 1,395 g (20,2 mmol) Triazol in 26 ml Acetonitril (<10 ppm H₂O) vorgelegt und mit Eis gekühlt. Es folgt eine langsame Zugabe von 0,67 g (0,4 ml) POCl₃ und 3 ml TEA. Danach werden in einem Zeitraum von ca. 15 min 246 mg (0,33 mmol) 3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin 22a/b in 6,6 ml Acetonitril gelöst hinzugegeben. In zwei weiteren Stunden unter Eiskühlung wird die Reaktion durch 1,5 stündiges Rühren bei Raumtemperatur vervollständigt (DC-Kontrolle). Der Ansatz wird mit 70 ml Dichlormethan verdünnt und mit 60 ml gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und 30 ml gesättigter wässriger Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der organischen Phase wird die Lösung nach Zugabe von 0,2 ml TEA abfiltriert und evaporiert.

Die Aufreinigung erfolgt durch pDC (1 mm Schichtdicke) mit dem Laufmittel Ethylacetat / *n*-Hexan (8:2).

Ausbeute : 210 mg (79%)

DC : $R_f = 0,52$ und $0,43$ (Toluol / Ethylacetat 1:5)

ESI-MS (+) : berechnet $799,8$ g/mol
gefunden $800,5$ g/mol

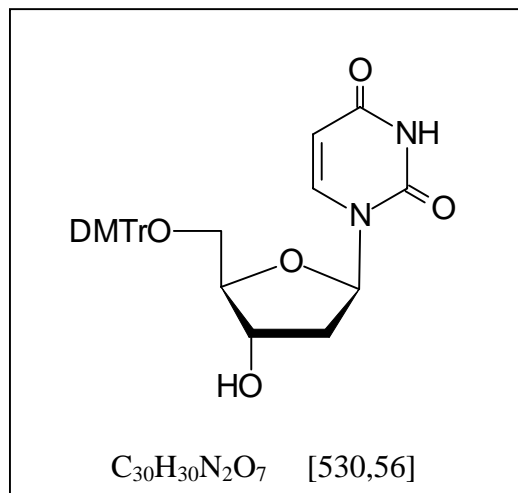
^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

9.18 (s, 1 H, Triazol); **8.75** (Ψt , 1 H, H-6); **8.01** (s, 1 H, Triazol); **7.38-6.70** (m, 13 H, aromat. H); **6.48** bzw. **6.41** (2 d, 1 H, H-5); **6.10** bzw. **6.04** (2 d, 1 H, H-1'); **5.15** (dd, 1 H, H-2'); **4.77-4.58** (m, 1 H, H-3'); **4.28** (Ψt , 1 H, H-4'); **3.75** bzw. **3.73** (2 d, 6 H, $-\text{OCH}_3$); **3.86 - 3.42** (m, 6 H, 2 CH_2 , H5', OCH_2); **2.48** (m, 2 H, CH_2CN); **1.37-0.99** (m, 12 H, $-\text{CH}_3$)

^{31}P - NMR δ [ppm], 162 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

Diastereomer 1 : 151.49 (d, $J_{\text{P-F}} = 4,86$ Hz)

Diastereomer 2 : 151.92 (d, $J_{\text{P-F}} = 9,02$ Hz)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin 25

In einem ausgeheizten Rundkolben werden 500 mg 2'-Desoxyuridin 24 (2,2 mmol) in 10 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 813 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (2,4 mmol) rührt man für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) werden 5 ml Methanol hinzugegeben und die Reaktionslösung eingengt und mit Toluol coevaporiert.

Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung mittels FC mit dem Laufmittel Chloroform / Methanol (95:5).

Ausbeute : 1,0 g (86%)

DC : $R_f=0,71$ (Chloroform / Methanol 95:5)

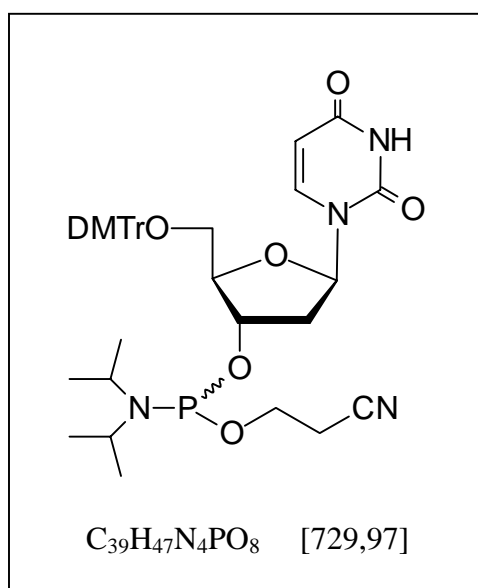
ESI-MS(-) : berechnet 530,56 g/mol
 gefunden 529,2 g/mol

1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, $CDCl_3$

7.53 (d, 1 H, $J=8,1$ Hz, H-6); **7.4-7.0** (m, 9 H, arom. H); **6.81-6.69** (m, 4 H arom. H); **6.28** (m, 1 H, H-1'); **5.22** (1 H, d, $J=8,1$ Hz, H-5); **4.41-4.36** (m, 1

H, H-3'); **3.94** (m, 1 H, H-4'); **3.79** (s, 6 H, -OCH₃); **3.19-2.97** (m, 2 H, H-5', H-5''), **1.89-1.65** (m, 2 H, H-2', H-2'')

3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin 26a/b



259 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin 25 (0,94 mmol) werden in einem ausgeheizten Rundkolben in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst. Nach der Zugabe von 484 µl DIPEA (2,82 mmol) kühlt man die Lösung auf 0°C. Anschließend werden 315 µl β-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphan 71 (1,4 mmol) zugetropft. Nach 5 Minuten läßt man den Reaktionsansatz auf Raumtemperatur erwärmen und verdünnt ihn nach Vervollständigung der Reaktion (ca 2,5 h) mit 15 ml Dichlormethan. Die Lösung wird mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchloridlösung extrahiert. Vor dem Trocknen über Magnesiumsulfat werden 0,2 ml TEA hinzugegeben. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt mittels FC (Toluol / Ethylacetat 1:5) aufgereinigt.

Ausbeute : 560 mg (83%)

DC : $R_f=0,57$ (Toluol / Ethylacetat 1:5)

ESI-MS(+) : berechnet 729,97 g/mol
gefunden 731,1 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

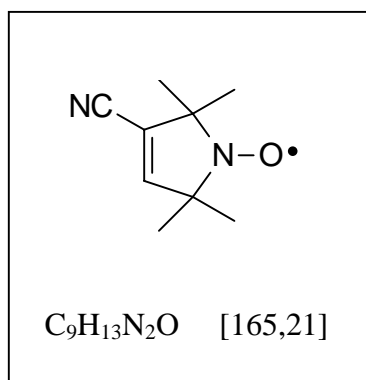
7.49 (2 d, 2 H, $J=8,2$ Hz, 2 H-6); **7.38 - 7.06** (m, 18 H, arom. H); **6.86-6.72** (m, 8 H arom. H), **6.38** (m, 2 H ,2 H-1'), **5.29** (2 d, 1 H, , $J=8,2$ Hz, 2 H-5); **4.48-4.40** (m, 2 H, 2 H-3'); **3.88** (m, 2 H, 2 H-4'); **3.78** (2 s, 12 H, 4 -OCH₃); **3.32-3.08** (m, 4 H, 2 H-5', 2 H-5''); **2.56, 2.46** (2 t, 4H, 2 -NCH₂); **2.41, 2.35** (2 m, 4 H, 2 CH₂CN); **1.98 - 1.72** (m, 4 H, 2 H-2', 2 H-2''); 1.16-1.01 (m, 24 H, 2 N(CH(CH₃)₂)₂);

^{31}P - NMR δ [ppm], 162 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

Diastereoisomer 1 : 151.55

Diastereoisomer 2 : 151.45

2,2,5,5-Tetramethyl-3-cyano-pyrrolin-*N*-oxyl 49



200 mg 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **44** (1,09 mmol) werden in 5 ml trockenem Pyridin gelöst und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Nun werden 140 μl Phosphoroxchlorid (1,5 mmol) langsam hinzugeotropft. Nach 15 min wird das Pyridin abgezogen, der Rückstand in Ether gelöst und mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung

extrahiert. Nach dem Trocknen wird die Etherphase evaporiert. Das Produkt ist rein genug für die weitere Umsetzung. Um eine analytische Probe zu erhalten, wird das Produkt mittels FC mit dem Laufmittel Ethylacetat / *n*-Hexan (1:3) aufgereinigt.

Ausbeute : 180 mg (99%)

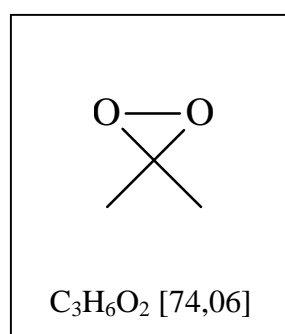
DC : $R_f = 0,52$ (Ethylacetat / *n*-Hexan 1:3)

Schmelzpunkt : 58°C

IR : 2226 cm^{-1} (-CN)

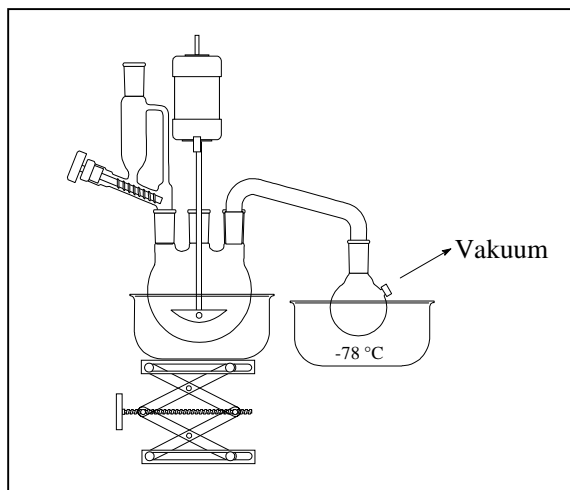
ESI-MS(+) : berechnet 165,21
gefunden 166,9 (nach Säurezugabe)

Dimethyldioxiran 45



In einem 4-l Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Pulverschnecke und aufgesetztem Bogen mit Fraktioniervorstoß werden 254 ml Wasser, 129 ml Aceton und 58 g Natriumhydrogencarbonat vorgelgt und auf 0°C abgekühlt.

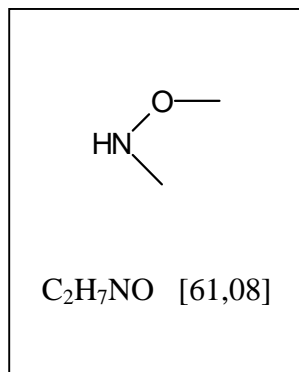
Unter starkem Rühren werden 120 g Carcoat[®] (Tripelsalz 2 $\text{KHSO}_3 \cdot \text{KH}_2\text{O}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$) in fünf Portionen im Abstand von 3 Minuten über die Pulverschnecke zugegeben.



Drei Minuten nach der letzten Zugabe wird das Eisbad entfernt und ein moderates Wasserstrahlvakuum angelegt. Unter starken Rühren werden nun ca. 150 ml Dimethyldioxiranlösung über den Bogen in ein auf -78°C gekühlten Vorlagekolben destilliert. Die gelbliche ca. 0,08 molare Lösung wird über Kaliumcarbonat getrocknet und bei -20° über Molsieb gelagert.

^1H - NMR δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3

1.66 (s, 6 H, 2 CH_3)

***N*-Methoxy-*N*-methyamin 69**

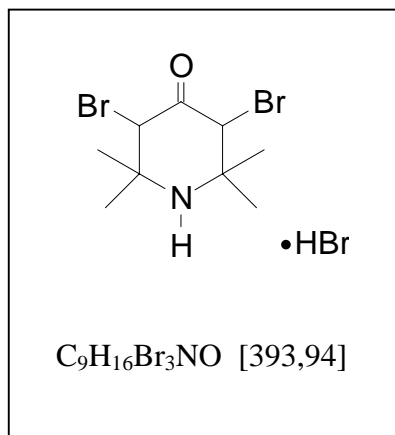
40 g *N,O*-Dimethylhydroxylamin-hydrochlorid (0,41 mol) werden in 80 ml *sym*-Collidin (0,6 mol) gelöst. Die Lösung wird im Ölbad zunächst auf 115°C erhitzt und dann die Temperatur langsam bis auf 178°C gesteigert. Das freie *N,O*-Dimethylhydroxylamin wird dabei abdestilliert und in einer eisgekühlten Vorlage aufgefangen.

Ausbeute : 26 ml (86%)

Siedepunkt : 40°C

1H - NMR δ [ppm], 250 MHz, $CDCl_3$

5.52 (s, 1 H, N-H); **3.45** (s, 3 H, -OCH₃); **2.64** (s, 3 H, -NCH₃)

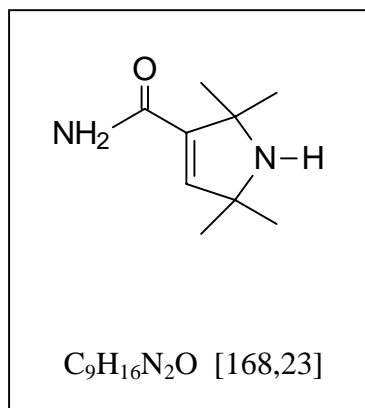
(3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on)hydrobromid 42

20 g 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-on 41 (128 mmol) werden in 120 ml Essigsäure gelöst. Bei Raumtemperatur werden nun 13,2 ml Brom (256 mmol) langsam zugetropft. Am Ende erhitzt man den Reaktionsansatz eine halbe Stunde auf 60°C. Beim Abkühlen fällt ein bräunlicher Feststoff aus. Das Produkt wird abgesaugt und mit wenig Wasser nachgewaschen.

Ausbeute : 47,4 g (94%)

ESI-MS(-) : berechnet 393,94 g/mol
gefunden 392,9 g/mol

EA : Ber.: C 27,44% H 4,10% N 3,56%
Gef.: C 27,62% H 4,32% N 3,55%

2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxamid 43

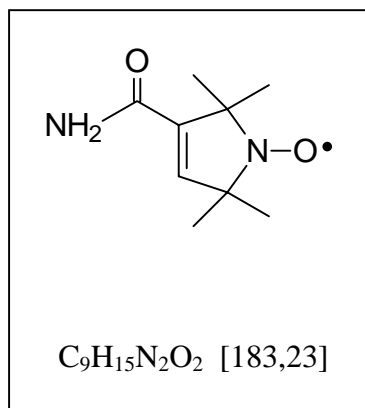
10 g (3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on)hydrobromid **42** (21 mmol) werden in 30 ml konz. Ammoniak (33 %) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird zwei Stunden gerührt und anschließend mit KOH gesättigt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute : 2,86 g (81%)

Schmelzpunkt : 167°C

ESI-MS(+) : berechnet 168,23 g/mol
gefunden 169,1 g/mol

1H - NMR δ [ppm], 250 MHz, $CDCl_3$
6.12 (s, 1 H, 5-H); **5.55** (s, 1H, NH); **1.45** (s, 6 H, 2 - CH_3); **1.34** (s, 6 H, 2 - CH_3)

3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-N-oxyl 44**Methode A**

8 g 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxamide **43** (47 mmol) werden in 80 ml Wasser suspendiert und mit 405 mg Titriplex[®] II, 405 mg $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ und 8,1 ml einer 30 %igen H_2O_2 -Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 10 Tage unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur stehen gelassen und einige Male geschüttelt. Die ausgefallenen gelben Kristalle werden abgesaugt, getrocknet und können ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden.

Ausbeute: 5,33 g (62%)

Methode B

1 g 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxamide **43** (6 mmol) werden in 50 ml Aceton gelöst und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Nun werden 120 ml einer 0,067 molaren Lösung (8 mmol) von Dimethyldioxiran in Aceton hinzugegeben. Dabei färbt sich die Lösung gelb. Nach der Zugabe wird noch 30 min weiter gerührt und das Aceton am Rotationsverdampfer evaporiert. Es bleiben gelbe Kristalle zurück, die ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden können.

Ausbeute : 1,09 g (99%)

Schmelzpunkt : 204°C

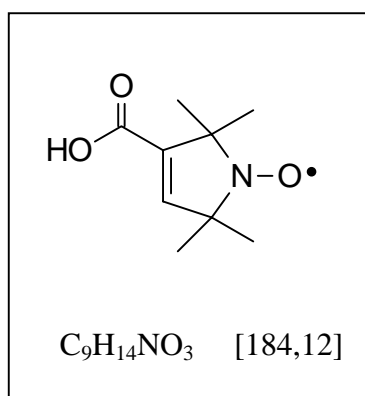
ESI-MS(-) : berechnet 183,23 g/mol
gefunden 182,1 g/mol

EA : Ber.: C 59,00 % H 8,25% N 15,29%
Gef.: C 58,86% H 8,23% N 15,29%

¹H - NMR δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃, Phenylhydrazin
6.12 (s, 1 H, 5-H); **1.45** (s, 6 H, 2 -CH₃); **1.34** (s, 6 H, 2 -CH₃)

ESR (CHCl₃) : 3 Linien

2,2,5,5-Tetramethyl-3-carboxy-pyrrolin-*N*-oxyl 46



500 mg 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl 44 (2,73 mmol) werden in einer 10%igen Natriumhydroxidlösung suspendiert und 0,5 h unter Rückfluß erhitzt, bis kein Ammoniak mehr entweicht.

Nach dem Abkühlen versetzt man die Lösung mit halbkonzentrierter Salzsäure. Dabei fällt ein gelblicher Niederschlag aus, der anschließend abgesaugt wird. Das saure Filtrat wird mit Ether extrahiert. Die Etherphase wird getrocknet und evaporiert. Der Rückstand wird mit dem abgesaugten Produkt vereinigt.

Ausbeute : 480 mg (96%)

Schmelzpunkt : 211°C

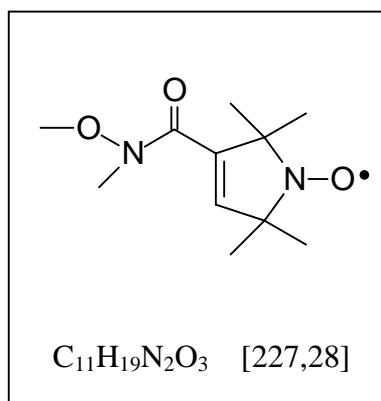
IR : 3200 – 2900 cm^{-1} (breit, O-H, CH₃), 1716 cm^{-1} (C=O)

ESI-MS(-) : berechnet 184,12 g/mol
gefunden 183,2 g/mol

EA : Ber.: C 58,68% H 7,66% N 7,60%
Gef.: C 58,88% H 7,66% N 7,60%

ESR (CHCl₃) : 3 Linien

3-(*N*-Methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl 50



1 g 2,2,5,5-Tetramethyl-3-carboxy-pyrrolin-*N*-oxyl **46** (5,4 mmol) und 0,9 ml Pyridin (11 mmol) werden in 15 ml Dichlormethan gelöst. Bei 0°C werden 440 μl Thionylchlorid (6,1 mmol) hinzuge tropft und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluß werden 480 μl *N*-Methoxy-*N*-methylamin **69** (6,6 mmol) in 3 ml Dichlormethan langsam hinzuge tropft. Die Lösung wird eine weitere Stunde gerührt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Die klare Lösung wird mit verdünnter Salzsäure gewaschen, um überschüssiges

Pyridin zu entfernen. Die Lösung wird evaporiert und mittels pDC (Schichtdicke 4 mm) mit dem Laufmittel Ethylacetat / *n*-Hexan (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute : 700 mg (57%)

Schmelzpunkt : 56°C

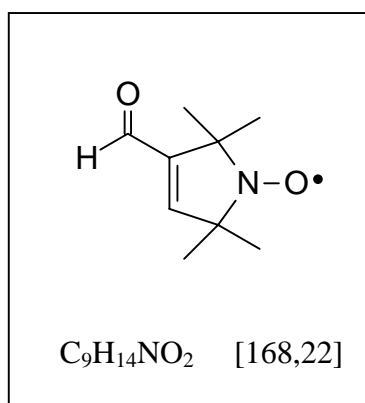
ESI-MS(+) : berechnet 227,28 g/mol
gefunden 228,10 g/mol

EA : Ber.: C 58,13% H 8,43% N 12,33%
Gef.: C 58,22% H 8,43% N 12,25%

¹H - NMR δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃, Phenylhydrazin

6.12 (s, 1 H, 5-H); **3.64** (s, 3 H, -OCH₃); **3.26** (s, 3 H, -NCH₃); **1.45** (s, 6 H, -CH₃); **1.34** (s, 6 H, -CH₃)

2-Formyl-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl 48



600 mg 3-(*N*-Methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **50** (2,6 mmol) werden in 10 ml THF gelöst und bei -60°C mit 5,4 ml DIBALH (1 molar in Heptan, 5,4 mmol) versetzt. Innerhalb einer Stunde läßt man auf 0°C erwärmen und gibt dann 3 ml

einer gesättigten wässrigen Ammoniumchloridlösung hinzu. Beim folgenden langsamen Erwärmen auf Raumtemperatur findet unter Gasentwicklung die Hydrolyse statt. Dabei ist auf ausreichende Kühlung zu achten, um das Sieden des Lösungsmittel zu vermeiden. Nach zwei Stunden wird über eine Schicht von Magnesiumsulfat und Celite abgesaugt. Die Lösung wird evaporiert und wird mittels pDC (Schichtdicke 4 mm) mit dem Laufmittel Ethylacetat / *n*-Hexan (1:3) aufgereinigt.

Ausbeute : 350 mg (80%)

Schmelzpunkt : 77°C

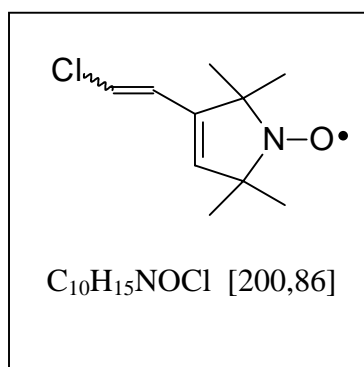
IR : 1679 cm⁻¹ (C=O)

ESI-MS(+) : berechnet 168,22 g/mol
 gefunden 169,7 g/mol

EA : Ber.: C 64,26% H 8,39% N 8,33%
 Gef.: C 64,10% H 8,37% N 8,27%

¹H - NMR δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃, Phenylhydrazin
9.68 (s, 1 H, 7-H); **6.59** (s, 1 H, =CH); **1.38** (s, 6 H, 2 CH₃); **1.28** (s, 6 H, 2 CH₃)

ESR (CHCl₃) : 3 Linien

2,2,5,5-Tetramethyl-3-(2-chloroethenyl)pyrrolin-*N*-oxyl 51a/b

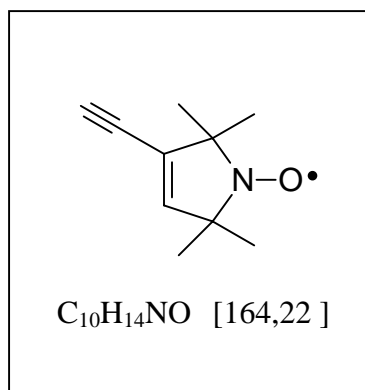
16,6 g (Chlormethyl)triphenylphosphoniumchlorid (47,7 mmol) werden in 80 ml THF suspendiert und auf $-78^{\circ}C$ abgekühlt. 26,6 ml (42,5 mmol) einer 1,6 molaren Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan werden langsam hinzuge tropft und die Lösung auf $-40^{\circ}C$ erwärmt. Nach 0,5 h wird die Lösung wieder auf $-78^{\circ}C$ abgekühlt und 2 g 2-Formyl-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **48** (11,9 mmol) in 20 ml Tetrahydrofuran hinzuge tropft. Nach der Zugabe wird das Kältebad durch ein Eisbad ersetzt und noch 0,5 h weitergerührt. Schließlich wird das Reaktionsgemisch mit Wasser gequenchet. Die organische Phase wird abgetrennt, getrocknet und evaporiert. Nach der Aufreinigung mittels Flashchromatographie (Ethylacetat / *n*-Hexan 1:3) erhält man ein gelbes Öl. Das Öl enthält das *cis*- und das *trans*-Isomere des Produkts, die vor der weiteren Umsetzung nicht getrennt werden.

Ausbeute : 1,34 g (56%)

ESI-MS(+) : berechnet 200,86 g/mol
gefunden 202,0 g/mol

1H - NMR δ [ppm], 250 MHz, $CDCl_3$, Phenylhydrazin
6.34-5.69 (m, 3 H, =CH); **1.30** (s, 6 H, 2 CH_3); **1.25** (s, 6 H, 2 CH_3)

ESR ($CHCl_3$) : 3 Linien

2,2,5,5-Pentamethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl 29

1,1 ml Diisopropylamin (7,5 mmol) werden in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C abgekühlt. Nun werden 4,7 ml einer 1,6 molaren Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (7,5 mmol) langsam hinzugegeben. Nach 15 min wird die Lösung auf -78°C abgekühlt und eine Lösung von 700 mg 2,2,5,5-Pentamethyl-3-(2-chlorethenyl)-3-pyrrolin-*N*-oxyl **51a/b** (3,7 mmol) in 10 ml THF hinzutropft. Die Lösung wird innerhalb eines Zeitraumes von 2 h auf 25°C erwärmt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser beendet. Das Reaktionsgemisch wird mehrfach mit Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherextrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und evaporiert. Das Reaktionsprodukt wird mit dem Laufmittel Ethylacetat / *n*-Hexan (1:5) über eine kurze Säule (4 cm) aufgereinigt. Mittels DC lassen sich zwei Flecken erkennen, die dem gewünschten Produkt sowie dessen Hydroxylamin-Derivat entsprechen.

Das so erhaltene Öl wird in 100 ml Methanol gelöst und mit einem dünnen Kupferdraht versetzt. Nun wird für eine Zeit von ca. acht Stunden Luft durch die Lösung geleitet, bis auf dem DC (Ethylacetat / *n*-Hexan 1:4) nur noch ein Fleck zu erkennen ist. Nach Abziehen des Methanols erfolgt die Aufreinigung mittels pDC mit dem Laufmittel Ethylacetat / *n*-Hexan (1:4).

Ausbeute : 419 mg (69%)

DC : $R_f=0,78$ (Ethylacetat / *n*-Hexan 1:4)

ESI-MS(+) : berechnet 164,22

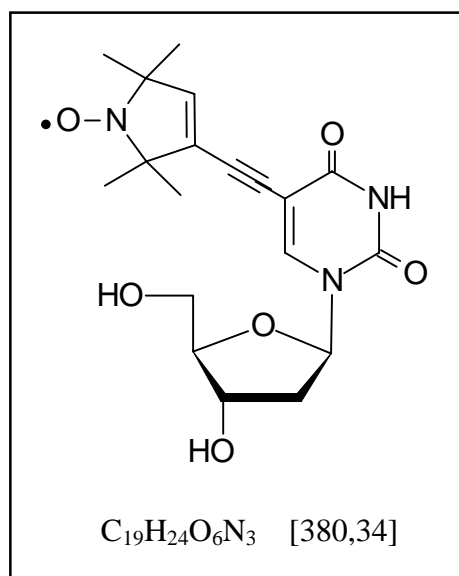
gefunden 166,1 (nach Säurezugabe)

^1H -NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3 , Phenylhydrazin

5.92 (s, 1 H, =CH); **3.02** (s, 1 H, -CCH); **1.33** (s, 6 H, 2 CH_3); **1.28** (s, 6 H, 2 CH_3)

ESR (CHCl_3) : 3 Linien

5-[3-(2,2,5,5-Pentamethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl)ethinyl]-2'-desoxyuridin **67**



125 mg 2,2,5,5-pentamethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **29** (0,75 mmol) und 400 mg 2'-Desoxy-5-ioduridin (1.1 mmol) werden in 5 ml *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird mehrfach durch Anlegen eines schwachen Vakuums desoxigeniert. 130 mg Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) **66** (0,1 mmol) und 290 mg Kupfer(Diodid) (1,5 mmol) werden hinzugegeben und die Lösung erneut desoxigeniert. Schließlich werden 51 μl Triethylamin (0,72 mmol) hinzugegeben und der Reaktionsansatz ca. sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bis kein Edukt (Nitroxid) mehr zu erkennen ist (DC-Kontrolle). Die Reaktionslösung wird zunächst evaporiert und anschließend mit 20% Methanol in Dichlormethan suspendiert und zum Entfernen der Palladiumrückstände über eine Schicht

von Kieselgel filtriert (2 cm). Die Lösung wird erneut evaporiert und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie mit dem Laufmittel Methanol / Dichlormethan (1:9) aufgereinigt.

Ausbeute : 114 mg (38%)

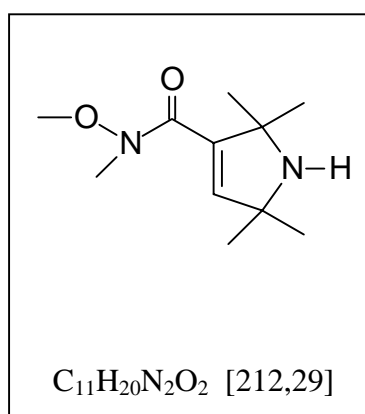
DC : $R_f = 0,55$ (Methanol / Dichlormethan 1:9)

ESI-MS(+) : berechnet 380,34 g/mol
gefunden 382,2 g/mol (nach Säurezugabe)

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, Aceton- d_6 , Phenylhydrazin

8.34 (s, 1 H, H-6); **6.33** (m, 1 H, H-1'); **5.60** (s, 1 H, =CH); **5.52** (m, 1 H, H-4'), **4.10** (m, 1 H, H-3'); **3.85-3.79** (m, 2 H, H-5', H-5''); **2.43-2.33** (m, 2 H, H-2', H-2''); **1.34** (s, 6 H, 2 CH₃); **1.28** (s, 6 H, 2 CH₃)

***N*-Methoxy-*N*,2,2,5,5-pentamethyl-3-pyrrolin-3-carboxamid 52**



48 g (3,5,-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on)hydrobromid **42** (122 mmol) werden in einer Mischung aus 110 ml Wasser, 110 ml Triethylamin und 13 g *N,O*-Dimethylhydroxylamin-hydrochlorid (133 mmol) suspendiert. Die Reaktionsmischung wird für 4 h unter kräftigen Rühren auf 50°C erhitzt, wobei eine klare Lösung entsteht. Nach dem

Abkühlen wird die Lösung 5 mal mit Ether ausgeschüttelt und die vereinigten Etherextrakte nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat evaporiert. Es wird ein bräunliches Öl erhalten.

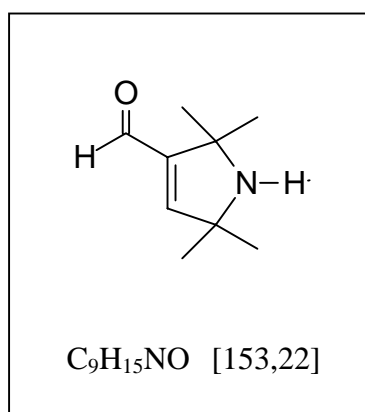
Ausbeute : 18,4 g (71%)

ESI-MS(+) : berechnet 212,27 g/mol
gefunden 212,8 g/mol

¹H - NMR δ[ppm], 270 MHz, CDCl₃

6.15 (s, 1 H, 5-H); **5.32** (s, 1H, NH); **3.65** (s, 1 H, N-CH₃); **3.27** (s, 1 H, O-CH₃); **1.41** (s, 6 H, 2 CH₃); **1.36** (s, 6 H, 2 CH₃)

2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxaldehyd 53



5 g *N*-Methoxy-*N*,2,2,5,5-pentamethyl-3-pyrrolin-3-carboxamid 52 (24 mmol) werden in 50 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf -60°C in einme Aceton / N₂-Kältebad abgekühlt. Es werden 31,2 ml DIBALH (50 mmol) langsam hinzugesetzt und 1 h weitergerührt. Bei 0°C werden im Anschluß 10 ml einer gesättigten Ammoniumchloridlösung hinzugegeben. Hierbei ist eine starke Wärmeentwicklung zu erkennen. Ein Sieden des Lösungsmittels sollte verhindert werden. Nach 2 h wird der ausgefallene Niederschlag über Celite abfiltriert und

das Lösungsmittel über Magnesiumsulfat getrocknet und evaporiert. Der ölige Rückstand wird mittels FC mit dem Laufmittel Ethylacetat / Methanol (3:1) aufgereinigt.

Ausbeute : 2,54 g (69%)

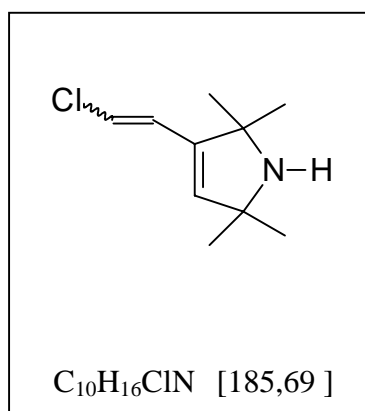
DC : $R_f = 0,42$ (Methanol / Ethylacetat 1:3)

ESI-MS(+) : berechnet 153,22 g/mol
gefunden 154,0 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3

9.81 (s, 1 H, 7-H); **6.68** (s, 1 H, 5-H); **5.43** (s, 1 H, N-H); **1.41** (s, 6 H, 2 CH_3); **1.36** (s, 6 H, 2 CH_3)

2,2,5,5-pentamethyl-3-(2-chlorethynyl)-3-pyrrolin 54a/b



16,6 g Chlormethyl-triphenyl-phosphoniumchlorid (47,7 mmol) werden in 80 ml Tetrahydrofuran suspendiert und auf -78°C in einem Aceton / N_2 -Kältebad abgekühlt. Es werden 27,3 ml einer 1,6 molaren Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (43,6 mmol) langsam hinzuge tropft. Die Reaktionsmischung wird auf -40°C erwärmt und 15 min gerührt. Nach

dem erneuten Abkühlen auf -78°C wird ein Lösung von 1,8 g 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxaldehyd **53** (11,7 mmol) in 20 ml Tetrahydrofuran langsam hinzugegeben.

Das Aceton / N_2 -Kältebad wird durch ein Eisbad ersetzt und die Reaktionsmischung noch 30 min weitergerührt. Nach der Zugabe von 3 ml Wasser wird die organische Phase abgetrennt und nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Ethylacetat / Methanol (3:1).

Ausbeute : 912 mg (42%)

DC : $R_f = 0,31$ (Ethylacetat / Methanol 3:1)

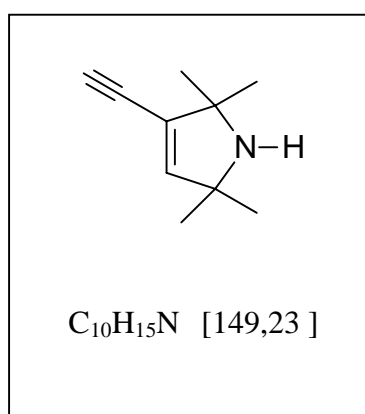
ESI-MS(+) : berechnet 185,69 g/mol
gefunden 186,1 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3

6.29 (s, 1 H, 5-H); **6.27** (d, 1 H, $J=10$ Hz, 7-H); **5.85** (d, 1 H, $J=10$ Hz, 8-H);

5.43 (s, 1 H, N-H); **1.33** (s, 6 H, 2 CH_3); **1.29** (s, 6 H, 2 CH_3)

2,2,5,5-tetramethyl-3-ethinyl-3-pyrrolin **55**



1,1 ml Diisopropylamin (7,5 mmol) werden in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C abgekühlt. Nun werden 4,7 ml einer 1,6 molaren Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan (7,5 mmol) langsam hinzugegeben. Nach 15 min wird die Lösung auf -78°C abgekühlt und eine

Lösung von 700 mg 2,2,5,5-Tetramethyl-3-(2-chlorethenyl)-3-pyrrolin **54a/b** (3,7 mmol) in 10 ml Tetrahydrofuran hinzuge tropft. Die Lösung wird innerhalb eines Zeitraumes von 2 h auf 25°C erwärmt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser beendet. Das Reaktionsgemisch wird mehrfach mit Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherextrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Ethylacetat / Methanol (3:1).

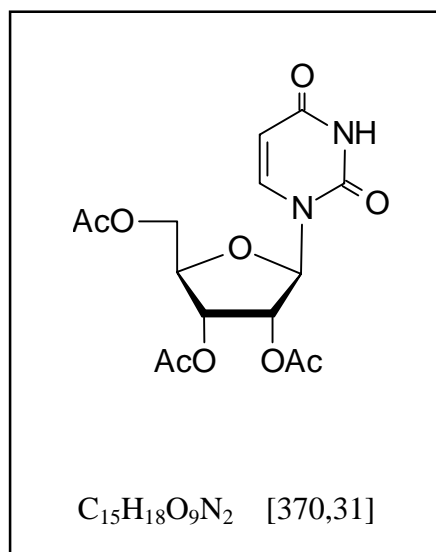
Ausbeute : 350 mg (63%)

DC : $R_f=0,2$ (Ethylacetat / Methanol 3:1)

ESI-MS(+) : berechnet 149,23 g/mol
gefunden 150,1 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3

6.29 (s, 1 H, 5-H); **6.27** (d, 1 H, $J=10$ Hz, 7-H); **5.85** (d, 1 H, $J=10$ Hz, 8-H);
5.45 (s, 1 H, N-H); **1.33** (s, 6 H, 2 CH_3); **1.29** (s, 6 H, 2 CH_3)

2',3',5'-Tri-*O*-acetyluridin 56

5 g Uridin **18** (20,47 mmol) werden in 40 ml Pyridin gelöst. Nun werden 7 ml (74 mmol) Essigsäureanhydrid hinzugegeben und 5 h bei Raumtemperatur gerührt (DC Kontrolle). Nach Zugabe von 10 ml Wasser wird die Reaktionslösung evaporiert und zwei Mal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Dichlormethan / Methanol 9:1.

Ausbeute : 7,33 g (97%)

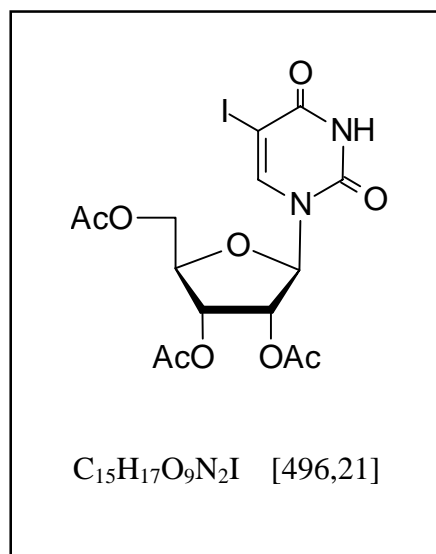
DC : $R_f = 0,32$ (Dichlormethan / Methanol 9:1)

Schmeltpunkt : 128°C

ESI-MS(+) : berechnet 370,31 g/mol
 gefunden 370,8 g/mol

1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, $CDCl_3$

7.72 (d, 1 H, $J=5,1$ Hz, H-6); **5.91** (m, 1 H, H-1'); **5.73** (d, 1 H, $J=5,1$ Hz, H-5); **5.45** (m, 1 H, H-2'); **5.23** (m, 1 H, H-3'); **4.38-4.17** (m, 3 H, H-4', H-5', H-5''); **2.08** (m, 9 H, 3 -CH₃)

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-5-ioduridin 58

Eine Mischung von 7 g 2',3',5'-Tri-*O*-acetyluridin 56 (18,9 mmol) und 2,7 g Iod (10,6 mmol) werden in 150 ml Acetonitril vorgelegt. Nach Zugabe von 5,18 g Ammoniumcer(IV)-nitrat (9,5 mmol) wird die Reaktionsmischung für 1 h auf 80°C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) und vollständigem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 100 ml Ethylacetat, 50 ml gesättigte wässrige Natriumchloridlösung und 20 ml einer 5%igen wässrigen Natriumhydrogensulfidlösung hinzugegeben. Die Lösungen sind vorher zu kühlen, um eine partielle Dehalogenierung zu vermeiden. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit Ethylacetat nachgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Chloroform / Aceton (9:1).

Ausbeute : 8,7 g (93%)

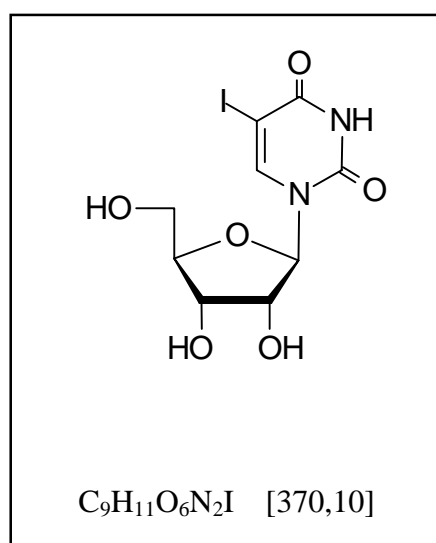
DC : $R_f = 0,53$ (Chloroform / Aceton 9:1)

ESI-MS(+) : berechnet 496,21 g/mol
gefunden 497,3 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6

11.82 (s, 1H, NH); **8.19** (s, 1 H, H-6); **5.88** (d, 1 H, $J=3,9$ Hz, H-1'); **5.48** (m, 1 H, H-2'); **5.36** (m, 1 H, H-3'); **4.41-4.13** (m, 3 H, H-4', H-5',H-5''); **2.08** (m, 9 H, 3 -CH₃)

5-Ioduridin 60



5 g 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-5-ioduridin 58 (10 mmol) werden in 150 ml einer methanolischen Natriummethanolatlösung (0,1 molar) bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wird mit Ionenaustauscher Dowex 50W-X8 (H⁺) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert und mehrmals mit Methanol nachgespült. Das methanolische Filtrat wird evaporiert und der Rückstand mit Ethanol / Ethylacetat / Toluol (1:1:2) coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Ethylacetat / Isopropanol / Wasser (4:1:2, obere Phase).

Ausbeute : 3,58 g (97%)

DC : R_f = 0,59 (Ethylacetat / Isopropanol / Wasser 4:1:2, obere Phase).

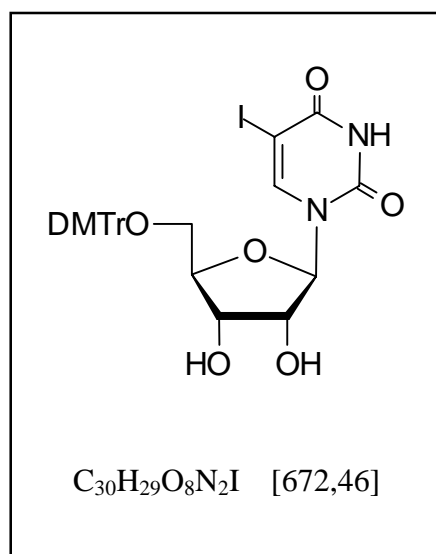
ESI-MS(+) : berechnet 370,10 g/mol
gefunden 370,9 g/mol

EA : Ber.: C 29,21% H 3,00% N 7,57%
Gef.: C 29,32% H 2,85% N 7,49%

¹H - NMR δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆

11.68 (s, 1H, NH); **8.48** (s, 1 H, H-6); **5.72** (d, 1 H, J=4,6 Hz, H-1'); **5.52-4.98** (m, 3 H, 2'-OH, 3'-OH, 5-OH); **4.05** (m, 1 H, H-2'); **3.93** (m, 1 H, H-3'); **3.84** (m, 1 H, H-4'); **3.75-3.49** (m, 2 H, H-5', H-5'')

5-Iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **62**



In einem ausgeheizten Rundkolben werden 2 g 5-Ioduridin **60** (5,4 mmol) in 30 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 2,5 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (6,5 mmol) in zwei Portionen rührt man für 4 h bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) werden 10 ml Methanol hinzugegeben, die Reaktionslösung evaporiert und der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert.

Das ölige Produkt wird in Chloroform aufgenommen und mehrmals mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Chloroform / Methanol (95:5).

Ausbeute : 3,04 g (84%)

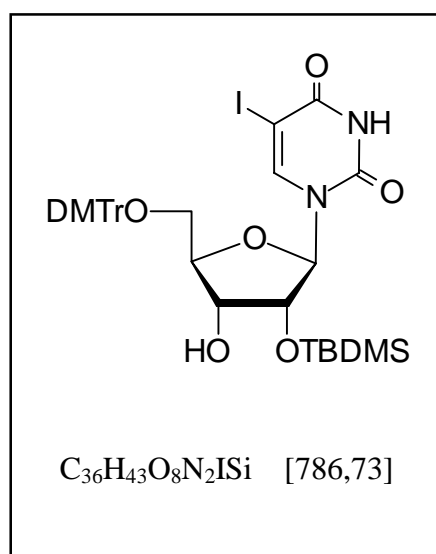
DC : $R_f = 0,41$ (Dichlormethan/Methanol 9:1)

ESI-MS(-) : berechnet 672,46 g/mol
gefunden 671,3 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 400 MHz, DMSO- d_6

11.76 (s, 1H, NH); **8.03** (s, 1 H, H-6); **7.49-6.72** (m, 13 H, arom. H); **5.77** (d, 1 H, $J=4,2$ Hz, H-1'); **5.14** (d, 1 H, $J=4,3$ Hz, 2'-OH); **5.18** (d, 1 H, $J=4,0$ Hz, 3'-OH); **4.38** (m, 2 H, H-2', H-3'); **3.94** (m, 1 H, H-4'); **3.72** (s, 6 H, -OCH₃); **3.31** (m, 2 H, H-5', H-5'')

5-Iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-(*tert.*-butyl-dimethylsilyl)uridin 64



In 10 ml abs. Tetrahydrofuran und 10 ml abs. Pyridin werden 2 g 5-Iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin 62 (2,97 mmol) und 604 mg Silbernitrat (3,56 mmol) unter Rühren gelöst. Zu der farblosen Lösung werden langsam 3,48 ml einer ein molaren Lösung von *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid in Tetrahydrofuran (3,48 mmol) hinzuge tropft. Unter Lichtausschluss läßt man den Reaktionsansatz 12 h rühren. Dabei fällt Silberchlorid als weisslich/grauer Niederschlag aus. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC (Dichlormethan / Ethylacetat 8:2) verfolgt. Nach Vervollständigung der Reaktion werden 10 ml einer gesättigten wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung hinzugegeben. Die Suspension wird über Celite abgesaugt und der Filterkuchen einige Male mit Dichlormethan nachgewaschen. Nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und evaporiert. Der ölige Rückstand wird anschließend dreimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Dichlormethan / Ethylacetat (8:2).

Ausbeute : 1,29 g (55%)

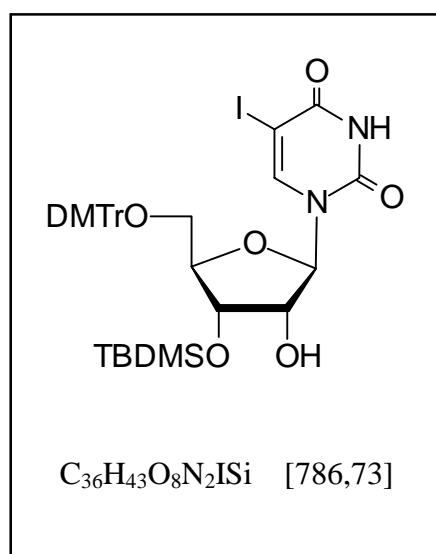
DC : $R_f = 0,29$ (Dichlormethan / Ethylacetat 8:2)

ESI-MS(+) : berechnet 786,73 g/mol
 gefunden 787,6 g/mol

¹H - NMR δ[ppm], 400 MHz, DMSO-d₆

11.78 (br s, 1H, NH); **8.04** (s, 1 H, H-6); **7.43-6.88** (m, 13 H, arom. H); **5.80** (d, 1 H, J= 4,3 Hz, H-1'); **5.10** (d, 1 H, J=4,5 Hz, 3'-OH); **4.31** (m, 1 H, H-2'); **4.02** (m, 2 H, H-3', H-4'); **3.74** (s, 6 H, -OCH₃); **3.29** (m, 2 H, H-5', H-5''); **0.84** (s, 9 H, SiC(CH₃)₃); **0.05, 0.04** (2 s, 6 H, Si(CH₃)₂)

5-Iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-(tert.-butyl-dimethylsilyl)uridin 65



Das bei der zuvor beschriebenen Reaktion entstandene 3'-silylierte Nebenprodukt wurde ebenfalls in reiner Form erhalten und charakterisiert.

Ausbeute : 532 mg (22%)

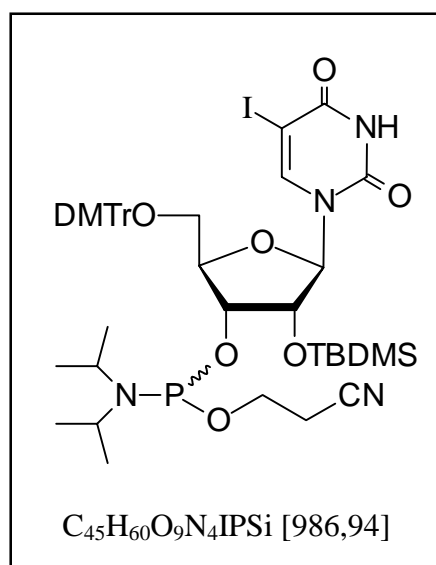
DC : $R_f = 0,09$ (Dichlormethan / Ethylacetat 8:2)

ESI-MS(+) : berechnet 786,73 g/mol
gefunden 787,5 g/mol

^1H -NMR δ [ppm], 400 MHz, DMSO- d_6

11.82 (br s, 1H, NH); **8.12** (s, 1 H, H-6); **7.51-6.97** (m, 13 H, arom. H);
5.82 (d, 1 H, J=4,3 Hz, H-1'); **5.34** (d, 1 H, J= 4,5 Hz, 2'-OH); **4.33** (m, 1 H,
H-2'); **4.05** (m, 2 H, H-3', H-4'); **3.79** (s, 6 H, -OCH₃); **3.34** (m, 2 H, H-5',
H-5''); **0.84** (s, 9 H, SiC(CH₃)₃); **0.01, -0.02** (2 s, 6 H, Si(CH₃)₂)

**3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5-iod-5'-O-(4,4'-
dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(tert.-butyl-dimethylsilyl)uridin 40**



369 mg 5-Iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(tert.-butyldimethylsilyl)uridin **64** (0,47 mmol) werden in einem ausgeheizten Rundkolben in 4 ml abs. Dichlormethan gelöst. Nach der Zugabe von 242 μl DIPEA (1,41 mmol) kühlt man die Lösung auf 0°C. Anschließend werden 158 μl β -Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphan **71** (0,72 mmol) zugetropft. Nach 5 Minuten lässt man den Reaktionsansatz auf Raumtemperatur erwärmen und verdünnt ihn nach Vervollständigung der Reaktion (ca. 2 h) mit 10 ml Dichlormethan. Die Lösung wird mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat- und

Natriumchloridlösung extrahiert. Vor dem Trocknen über Magnesiumsulfat werden 0,2 ml TEA hinzugegeben. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt mittels FC (Ethylacetat / Acetonitril 9:1) aufgereinigt.

Ausbeute : 703 mg (83%)

DC : $R_f = 0,7$ (Ethylacetat / Acetonitril 9:1)

ESI-MS(+) : berechnet 986,94 g/mol
gefunden 987,6 g/mol

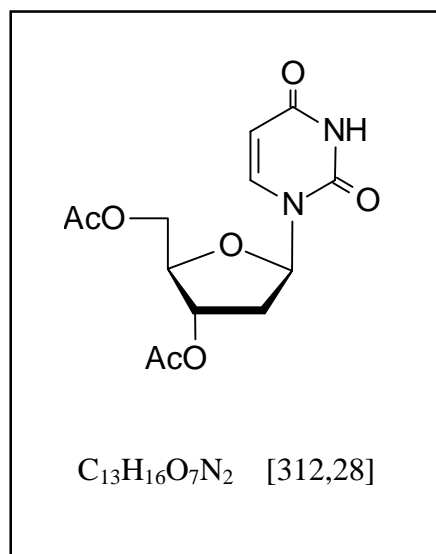
^1H - NMR δ [ppm], 400 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

8.94 (br s, 2H, NH); **8.04, 7.93** (2s, 2 H, 2 H-6); **7.52-6.78** (m, 26 H, arom. H); **5.89, 5.79** (2 d, 2 H, $J = 4,3$ bzw $4,4$ Hz, 2 H-1'); **4.51-4.19** (m, 6 H, 2 H-2', 2 H-3', 2 H-4'); **3.83, 3.74** (2s, 12 H, 4 -OCH₃); **3.78-3.34** (m, 8 H, 2 -OCH₂, 2 H-5', 2 H-5''); **2.63, 2.41** (2t, 4 H, 4 -NCH); **1.20-0.99** (m, 24 H, 2 N(CH(CH₃)₂)₂); **0.92, 0.84** (2s, 18 H, 2 SiC(CH₃)₃); **0.14, 0.08** (2 s, 12 H, 2 Si(CH₃)₂)

^{31}P - NMR δ [ppm], 162 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

Diastereomer 1 : 150.52

Diastereomer 2 : 151.01

3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxyuridin 57

4 g 2'-Desoxyuridin **24** (17,53 mmol) werden in 30 ml Pyridin gelöst. Nun werden 4,3 ml (45 mmol) Essigsäureanhydrid hinzugegeben und 5 h bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle). Nach Zugabe von 10 ml Wasser wird die Reaktionslösung evaporiert und zwei Mal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Dichlormethan / Methanol 9:1.

Ausbeute : 5,35 g (98%)

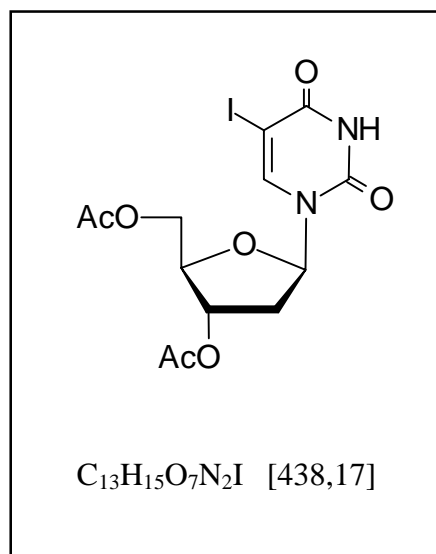
DC : $R_f = 0,32$ (Dichlormethan / Methanol 9:1)

Schmelzpunkt : 107°C

ESI-MS(-) : berechnet 312,28 g/mol
gefunden 311,3 g/mol

1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, $CDCl_3$

11.61 (bs, 1H, NH); **7.54** (d, $J=5,2$ Hz, 1 H, H-6); **5.94** (m, 1 H, H-1'); **5.75** (d, 1 H, $J=5,2$ Hz, H-5); **5.15** (m, 1 H, H-3'); **4.24** (m, 3 H, H-4', H-5', H-5''); **2.41-2.33** (m, 2 H, H2', H2''); **2.09, 1.98** (2s, 6 H, 2 -CH₃)

3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxy-5-ioduridin 59

Eine Mischung von 6,25 g 3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxyuridin 57 (20 mmol) und 2,79 g Iod (11 mmol) werden in 150 ml Acetonitril vorgelegt. Nach Zugabe von 5,48 g Ammoniumcer(IV)-nitrat (10 mmol) wird die Reaktionsmischung für 1 h auf 80°C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) und vollständigem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 100 ml Ethylacetat, 50 ml gesättigte wässrige Natriumchloridlösung und 20 ml einer wässrigen 5%igen Natriumhydrogensulfidlösung hinzugegeben. Die Lösungen sind vorher zu kühlen um eine partielle Dehalogenierung zu vermeiden. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit Ethylacetat nachgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt durch Umkristallisation aus wenig Ethanol.

Ausbeute : 7,65 g (87%)

DC : $R_f = 0,42$ (Chloroform / Aceton 4:1)

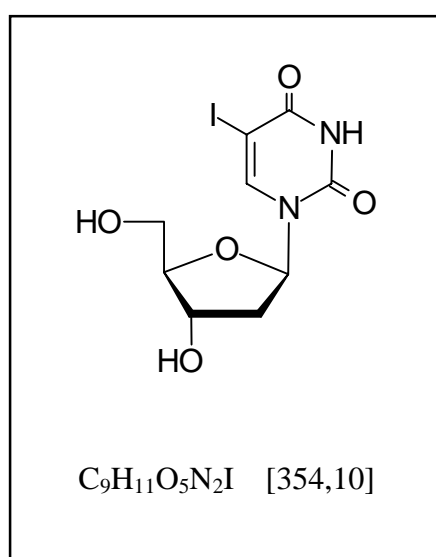
Schmelzpunkt : 160°C

ESI-MS(+) : berechnet 438,17 g/mol
gefunden 439,9 g/mol

^1H -NMR δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6

11.71 (br s, 1H, NH); **7.99** (s, 1 H, H-6); **5.88** (t, 1 H, $J=7,1$ Hz, H-1'); **5.17** (m, 1 H, H-3'); **4.30-4.19** (m, 3 H, H-4', H-5', H-5''); **2.46-2.29** (m, 2 H, H2', H2''); **2.06, 2.00** (2s, 6 H, 2 $-\text{CH}_3$)

2'-Desoxy-5-ioduridin **61**



4,38 g 3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxy-5-ioduridin **59** (10 mmol) werden in 150 ml einer methanolischen Natriummethanolatlösung (0,1 molar) bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wird mit Ionenaustauscher Dowex 50W-X8 (H^+) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert und mehrmals mit Methanol nachgespült. Das methanolische Filtrat wird evaporiert und der Rückstand mit Ethanol / Ethylacetat / Toluol (1:1:2) coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgt durch Umkristallisation aus wenig Wasser.

Ausbeute : 3,07 g (87%)

DC : $R_f = 0,68$ (Ethylacetat / Isopropanol / Wasser 4:1:2, obere Phase).

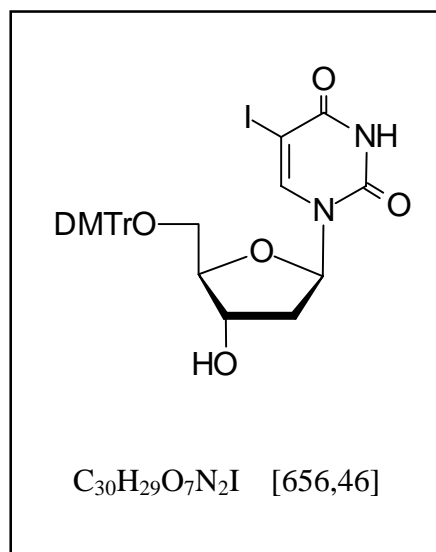
Schmelzpunkt : 165-172°C

ESI-MS(+) : berechnet 354,10 g/mol
gefunden 355,3 g/mol

EA : Ber.: C 30,53% H 3,13 % N 7,91%
Gef.: C 30,61% H 3,01% N 7,79%

¹H - NMR δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆

11.66 (s, 1H, NH); **8.42** (s, 1 H, H-6); **5.99** (d, 1 H, J=5,6 Hz, H-1'); **5.29-5.18** (m, 2 H, 2'-OH, 3'-OH); **4.25** (m, 1 H, H-3'); **3.86** (m, 1 H, H-4'); **3.69-3.51** (m, 2 H, H-5', H-5''); **2.20-2.09** (m, 2 H, H-2', H-2'')

2'-Desoxy-5-iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin 63

In einem ausgeheizten Rundkolben werden 1,0 g 2'-Desoxy-5-ioduridin 61 (2,8 mmol) in 15 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 1,2 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (3,5 mmol) in zwei Portionen rührt man für 4 h bei Raumtemperatur weiter. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) werden 5 ml Methanol hinzugegeben, die Reaktionslösung evaporiert und der Rückstand mit Toluol coevaporiert.

Das ölige Produkt wird in Chloroform aufgenommen und mehrmals mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels FC mit dem Laufmittel Chloroform / Methanol (95:5)

Ausbeute : 1,53 g (83%)

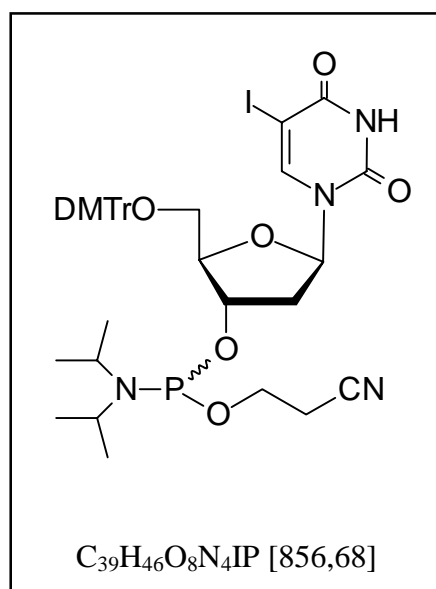
DC : $R_f = 0,62$ (Dichlormethan/Methanol 9:1)

ESI-MS(+) : berechnet 656,46 g/mol
gefunden 657,2 g/mol

^1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, CDCl_3

8.15 (s, 1 H, H-6); **7.61-7.23** (m, 13 H, arom. H); **6.25** (m, 1 H, H-1'); **4.54-4.21** (m, 3 H, H-3', H-2', H-2''); **3.94** (m, 1 H, H-4'); **3.84** (s, 6 H, $-\text{OCH}_3$); **2.62-2.35** (m, 2 H, H-5', H-5'')

3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-2'-desoxy-5-iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin 39



617 mg 2'-Desoxy-5-iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **63** (0,94 mmol) werden in einem ausgeheizten Rundkolben in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst. Nach der Zugabe von 484 μl DIPEA (2,82 mmol) kühlt man die Lösung auf 0°C . Anschließend werden 315 μl β -Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropyl-aminochlorophosphan (1,4 mmol) zugetropft. Nach 5 Minuten läßt man den Reaktionsansatz auf Raumtemperatur erwärmen und verdünnt ihn nach Vervollständigung der Reaktion (ca. 2 h) mit 15 ml Dichlormethan. Die Lösung wird mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchloridlösung extrahiert. Vor dem Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat werden 0,2 ml Triethylamin hinzugegeben. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt mittels FC (Toluol / Ethylacetat 1:5) aufgereinigt.

Ausbeute : 703 mg (87%)

DC : $R_f = 0,57$ (Toluol / Ethylacetat 1:5)

ESI-MS(+) : berechnet 856,86 g/mol
gefunden 857,9 g/mol

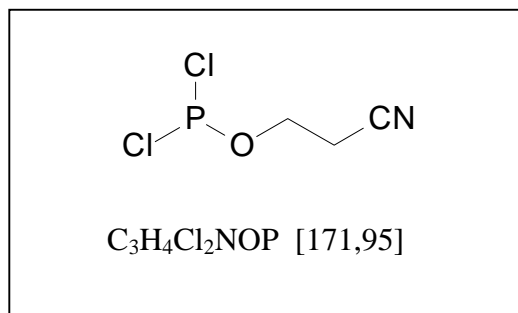
^1H - NMR δ [ppm], 250 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

8.42 (br s, 2H, NH); **8.07, 7.98** (2s, 2 H, 2 H-6); **7.42-6.75** (m, 26 H, arom. H); **6.12-6.12**(m, 2 H, 2 H-1'); **4.58-4.4.3** (m, 4 H, 2 H-2', 2 H-2''); **4.16-4.01** (m, 4 H, 2 H-3', 2 H-4'); **3.72, 3.71** (2s, 12 H, 4 -OCH₃), **3.68-3.16** (m, 8 H, 2 -OCH₂, 2 H-5', 2 H-5''); **2.59, 2.43** (2 t, 4 H, 2 -NCH); **1.20- 0.99** (m, 24 H, 2 N(CH(CH₃)₂)₂);

^{31}P - NMR δ [ppm], 162 MHz, CDCl_3 , Diastereoisomerengemisch

Diastereoisomer 1 : 151.67

Diastereoisomer 2 : 149.63

2-Cyanethoxy-dichlorphosphin 70

Die Reaktion wird in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

175 ml (2 mol) Phosphortrichlorid werden mit 100 ml abs. Diethylether in einem Kolben vorgelegt und über 20 Minuten eine Mischung aus 19,5 ml (285 mmol) 3-Hydroxypropionitril und 120 ml abs. Diethylether zugetropft. Anschließend wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Ether wird bei weniger als 40°C abdestilliert und das verbliebene Öl im Hochvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt wird als farblose Flüssigkeit bei 68 - 70°C (ca. $4 \cdot 10^{-5}$ mbar) erhalten.

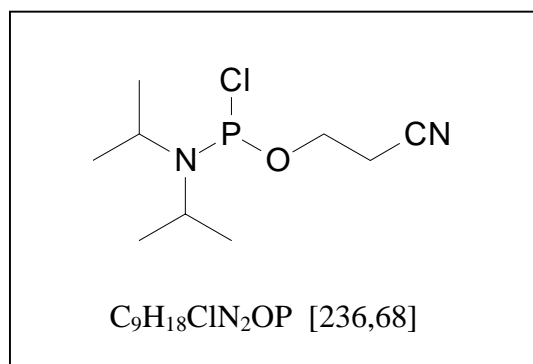
Ausbeute : 31,3 g (64 %)

1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, $CDCl_3$

4.36 (q, $J=7,7$ Hz, 2H, CH_2CN); **2.73** (t, $J=6,9$ Hz, 2H, OCH_2)

^{31}P - NMR δ [ppm], 162 MHz, $CDCl_3$

175.02

2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit 71

Die Reaktion wird in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

29,7 g (173 mmol) 2-Cyanoethoxy-dichlorphosphin **70** werden in 150 ml abs. Diethylether in einem Kolben vorgelegt und eine Mischung aus 47,2 ml (336 mmol) Diisopropylamin in 70 ml abs. Diethylether langsam über 90 Minuten bei $-30^{\circ}C$ zugetropft. Anschließend wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird über eine Schlenckfritte abgetrennt und der Ether abdestilliert. Das verbliebene Öl wird im Hochvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt wird als leicht trübes Öl bei $78 - 80^{\circ}C$ ($1 \cdot 10^{-5}$ mbar) erhalten.

Ausbeute: 22,66 g (56 %)

1H - NMR δ [ppm], 270 MHz, $CDCl_3$

4.05 (qt, $J=6,9$ Hz, 2H, CH_2CN); **3.80** (m, 2H, CH_2 isopropyl); **2.74** (q, $J=6,9$ Hz, 2H, OCH_2); **1.25** (m, 12H, CH_3 isopropyl)

^{31}P - NMR δ [ppm], 162 MHz, $CDCl_3$

181.22

12 Literaturverzeichnis

A

Abdelkafi, M.; Ghomi, M.; Turpin, P. Y.; Baumruk, V.; Lampire, O.; Goyer, P.; Namane, A.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Bednarova, L.; Common structural features of UUCG and UACG tetraloops in very short hairpins determined by UV adsorption, Raman, IR and NMR Spectroscopies, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1997**, *5*, 579-593

Abdelkafi, M.; Leulliot, N.; Baumruk, V.; Bednarova, L.; Turpin, P. Y.; Namane, A.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Ghomi, M.; Structural features of the UUCG and UGCG tetraloops in very short hairpins as evidenced by optical spectroscopy, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 7878-7884

Abe, Y.; Fukuda, H.; Ishiwata, K.; Yoshioko, S.; Yamada, K.; Studies on ^{18}F -labeled pyrimidines. Tumor uptakes of ^{18}F -5-fluorouracil, ^{18}F -5-fluorouridine and ^{18}F -5-fluorodeoxyuridine in animals, *Eur. J. Nucl. Med.*, **1983**, *8*, 258-261

Abrams, Douglas N.; Mercer, John R.; Knaus, Edward, E.; Wiebe, Leonard I.; Radiolabelled 2'-FUdR and 2'-CIUdR, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **1984**, *22*, 233-238

Adam, Waldemar; Bialas, Joachim; Hadjjarapoglou, Lazaros; A convenient preparation of acetone solutions of dimethyldioxirane, *Chem. Ber.*, **1991**, *124*, 2377-2378

Adams, S. P.; Wykesw, K. S.; Holder, S. B.; Galluppi, G. R.; Hindered dialkylamino nucleosides phosphite reagents in synthesis of two DNA 51-mer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 661-663

Adcock, J. L.; Inoue, S.; Lagow, R. J.; Simultaneous fluorination and functionalisation of hydrocarbon polymers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 1948-1950

Allain, F. H.-T.; Varani, Gabriele; Structure of the P1 helix group I self-splicing introns, *J. Mol. Biol.*, **1995**, *250*, 333-353

Asakura, Jun-ichi; Robins, Morris J.; Cerium(IV) catalyzed iodination at C5 of uracil nucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *23*, 2855-2858

Avery, Oswald T.; MacLeod, Colin M.; McCarty, Maclyn; Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid acid isolated from penumococcus type III, *J. Exp. Med.*, **1944**, *79*, 137-158

B

Barchi Jr., Joseph J.; Jeong, Lak-Shin; Siddiqui, Maqbool; Marquez, Victor E.; Conformational analysis of the complete series of 2' and 3' monofluorinated dideoxyuridines, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1997**, *34*, 11-29

Barchi, Joseph J.; Jeong, Lak-Shin; Siddiqui, Maqbool A.; Marquez, Victor E.; Conformational analysis of the complete series of 2' and 3' monofluorinated dideoxyuridines, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1997**, *34*, 11-29

Batey, Robert T.; Rambo, Robert P.; Doudna, Jennifer A.; Tertiäre Motive bei Struktur und Faltung von RNA, *Angew. Chem.*, **1999**, *111*, 2472-2491

Beadle, George W.; Tatum, Edward L.; Genetic control of biochemical reactions in neurospora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1941**, *27*, 499-506

Beaucage, Serge L.; Caruthers, Marvin H.; Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 1859-1862

Beaucage, Serge L.; Iyer, R. P.; Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 2223-2311

Beaucage, Serge L.; Iyer, R. P.; The synthesis of modified oligonucleotides by phosphoramidite approach and their applications, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 6123-6194

Benhida, Rachid; Blanchard, Pierre; Fourrey, Jean-Louis A mild and effective iodination method using iodine in the presence of bis-(trifluoroacetoxy)iodobenzene, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 6849-6852

Bergstrom, D. E.; Swartling, D. J.; Wisor, A.; Hoffman, M. R.; Evaluation of thymidine, dideoxythymidine and fluorine substituted deoxyribonucleoside geometry by the MINDO/3 technique: The effect of fluorine substitution on nucleoside geometry and biological activity, *Nucl. Nucl.*, **1991**, *10*, 693-697

Bergstrom, Donald E.; Swartling, Daniel J.; Fluorine substituted analogs of nucleic acid components, *Mol. Struct. Energ.*, **1988**, *8*, 259-308

Berrie, A. H.; Booth, G.; Durham, I.; Dyeing cellulosic textile materials (Br. Pat. 882001, 1959), *Chem. Abstr.*, **1962**, *56*, 8962h

Bhat, V.; Ugarkar, B. G.; Sayeed, V. A.; Grimm, K.; A simple and convenient method for the selective *N*-acylations of cytosine nucleosides, *Nucl. Nucl.*, **1989**, *8*, 179-183

Blackburn, Michael, G.; Gait, Micheal J.; Nucleic acids in chemistry and biology, *Oxford universiy press, Oxford, New York Tokyo*, **1990**

Blandin, Michael; Son, Tran-Dinh; Catlin, Joseph C.; Guschlbauer, Wilhelm; Nuclear magnetic resonance and circular dichroism studies on pyrimidine-2'-fluoro-2'-deoxyribonucleosides, *Biochim. Biophys. Acta*, **1974**, *361*, 249-256

Bowmann, M. K.; Michalski, T. J.; Peric, M.; Halpern, H.J.; Fourier-transform-EPR and low-frequency-EPR studies of nitroxides, *Pure & Appl. Chem*, **1990**, *62*, 271-274

Brik, M. E.; Selective preparation of cis-3,5-dibromo-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-hydroxy and conversion to nitroxide by peroxide copper catalysed, *Synth. Commun.*, **1990**, *20*, 597-601

Brill, Wolfgang K.-D.; Facile methods to recycle nucleosides during solid phase synthesis of oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3041-3044

Brown, D. M.; Todd, A. R.; Nucleotides, part X. Some observations on structure and chemical behaviour of nucleic acids, *J. Chem. Soc.*, **1952**, *74*, 52-58

Burdon, J.; Knights, J. R.; Parson, I. W.; Tatlow, J. C.; The fluorination of ethane and ethene over potassium tetrafluorocobalte(III) and cobalt trifluoride, *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 1041-1043

C

Catala, Laure; Tuerk, Philippe; Moigne, Jaques Le; Cian, André De; Kyritsakas, Nathalie; Synthesis of nitronyl- and imino-nitroxide-triradicals interconnected by phenyl enthenyl spacer, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 1015-1018

Catlin, Joseph C.; Guschlbauer, Wilhelm; Oligonucleotide conformations. III. Comparative optical and thermodynamic studies of uridylyl-2'-5'-nucleosides containing ribose, deoxyribose, or 2'-deoxy-2'-fluororibose in the uridine moiety, *Biopolymers*, **1975**, *14*, 51-72

Chang, Pauline K.; Welch, Arnold D.; Iodination of 2'-deoxycytidine and related substances, *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *8*, 327-328

Chargaff, Erwin; Structure and function of nucleic acids as cell constituents, *Fed. Proc.*, **1951**, *10*, 654-659

Cheong, Chaejoon; Varani, Gabriele; Tinoco, Ignacio Jr.; Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'GGAC(UUCG)GUCC, *Nature*, **1990**, *346*, 680-682

Ciriano, Maria Victoria; Korth, Hans-Gert; Scheppingen, Wibo B. van; Mulder, Peter; Thermal stability of 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) and related *N*-Alkoxyamines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 6375-6381

Clark, James H.; Smith, David, K.; Fluoronitrations using tetrabutylammonium fluoride, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 2233-2236

Codington, John F.; Doerr, Iris L.; Fox, Jack J.; Nucleosides. XIX. Structure of the 2'-halogeno-2'-deoxypyrimidine nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1964**, *29*, 558-564

Codington, John F.; Doerr, Iris L.; Fox, Jack J.; Nucleosides. XVIII. Synthesis of 2'-fluorothymidine, 2'-fluorodeoxyuridine, and other 2'-halogeno-2'-deoxy nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1964**, *29*, 558-564

Cole, P. E.; Cothers, D. M.; Conformational changes of transfer ribonucleic acid. Relaxation kinetics of the early melting transition of methionine transfer ribonucleic acid (*Escherichia coli*), *Biochemistry*, **1972**, *23*, 4368-4374

Conn, Graeme L.; Draper, David E.; RNA structure, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, 8, 278-285

Cox, Phillip D.; Terpinski, Jacek; Lawrynowicz, Witold; "Anhydrous" tetrabutylammonium fluoride: A mild but highly efficient source of nucleophilic fluoride ion, *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 3216-3219

Crick, Francis H. C.; On protein synthesis, *Symp Soc. Exp. Biol.*, **1958**, 12, 138-163

Crick, Francis H. C.; Central dogma of molecular biology, *Nature*, **1970**, 227, 561-563

Crothers, D. M.; Cole, P. E.; Hilbers, C. W.; Shulman, R. G.; Molecular mechanism of thermal unfolding of Escherichia coli formylmethionine transfer RNA, *J. Mol. Biol.*, **1974**, 87, 63-88

Cruickshank, Kenneth A.; Stockwell, Daniel L.; Oligonucleotide labeling: A concise synthesis of a modified thymidine phosphoramidite, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 5221-5224

Cuet, W. R.; Brasch, R. C.; Sosnovsky, G.; Lukszo, J.; Prakash, I.; Gnewuch, C. T.; Tozer, T. N.; Influence of chemical structure of nitroxyl spin labels on their reduction by ascorbic acid, *Tetrahedron*, **1985**, 7, 1165-1172

Curci, Ruggero; Fiorentino, Michele; Troisi, Luigino; Epoxidation of alkenes by dioxirane intermediates generated in the reaction of potassium caroate with ketones, *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 4758-4760

D

Dahl, O.; Nielsen, J.; Dahl, B. H.; Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligoribonucleotide synthesis I. Evidence for the nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorous substituents, *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 1729-1742

Davis, Tina M.; McFail-Isom, Lori; Keane, Elaine; Williams Loren D.; Melting of a DNA hairpin without hyperchromism, *Biochemistry*, **1998**, 37, 6975-6978

Divakar, K. J.; Reese, Colin B.; 4-(1,2,4-Triazol-1-yl)- and 4-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-1-(β -D-2,3,5-tri-*O*-acetyl-arabinofuranosyl)pyrimidin-2(1H)-ones. Valuable intermediates in the synthesis of derivatives of 1-(β -D-arabinofuranosyl)cytosine (Ara-C), *J.C.S. Perkin I*, **1982**, 1171-1176

Doboszewski, Bogdan; Hay, George W.; Szarek, Walter A.; The rapid synthesis of deoxyfluoro sugars using tris(dimethylamino)sulfonium difluorotrimethylsilicate (TASF), *Can. J. Chem.*, **1987**, 65, 412-419

Doerr, Iris L.; Fox, Jack J.; Nucleosides. XXXIX. 2'-Deoxy-2'-fluorocytidine, 1- β -D-arabinofuranosyl-2-amino-1,4(2H)-4-iminopyrimidine, and related derivatives, *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 1462-1470

Dorn, S.; Eggenberg P.; Gerstenberger, M. R. C.; Haas, A.; Niemann, U.; Zobrist, R.; 149.(Perhalogenmethylthio)heterocyclen. X. Säurekatalysierte Substitution an (Perchlorfluormethylthio)pyrrolen un deren biologische Wirkung, *Helv. Chim. Acta*, **1979**, 62, 1442-1448

Dragutan, Ileana; Caragheorgheopol, Agneta; Chiraleu, Filip; Mehlhorn, Rolf; New amino-nitroxide spin labels, *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 4, 1577-1583

Duh, Jauh-Lin; Bobst, Albert M.; 71. Sequence-specific spin labeling of oligothymidylates by phosphotriester chemistry, *Helv. Chim. Acta*, **1991**, 74, 739-747

Dunger, Anita; Limbach, Hans-Heinrich; Weisz, Klaus; NMR studies on the self-association of uridine and uridine analogues, *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 621-628

Duschinsky, R.; Plevin, E.; Heidelberger, J.; The synthesis of 5-Fluoropyrimidines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 4559-4560

E

Eaton, Bruce E.; Pieken, Wolfgang A.; Ribonucleosides and RNA, *Annu. Rev. Biochem.*, **1995**, 64, 837-63

Engels, Joachim W.; Uhlmann, E.; Gensynthese, *Angew. Chem.*, **1989**, 101, 733

F

Fischhaber, Paula L.; Reese, Annabelle W.; Nguyen, Thuc; Kirchner, James J.; Robinson, Bruce H.; Hopkins, Paul B.; Synthesis of duplex DNA containing a spin labeled analog of 2'-deoxycytidine, *Nucl. Nucl.*, **1997**, *16*, 365-377

Froehler, B. C.; Matteucci, M. D.; Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates, *Nucl. Acids Res.*, **1986**, *14*, 5399-5403

Fry, James L. A new synthesis of aldehydes via silane reduction of nitrilium ions, *Chem. Comm.*, **1974**, *89*, 45-52

G

Gait, Michael J.; Oligonucleotide Synthesis: A practical Approach, *IRL Press, Oxford*, 1984

Gallicchio, Emilio; Kubo, Masahito Mogami; Levy, Ronald M.; Entropy-enthalpy compensation in solvation and ligand binding revisited, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4526-4527

Gallopo, Andrew R.; Edwards, John O.; Kinetics and mechanisms of the oxidation of pyridine by Caro's acid catalyzed by ketones, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 1684-1688

Garegg, P. J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R.; Nucleoside-H-phosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 4055-4058

Gerstenberger, Michael R. C.; Haas, Alois; Fluorierungsmethoden in der Organischen Chemie, *Angew. Chem.*, **1981**, *93*, 659-680

Gewirth, D. T.; New approaches to structural studies of E. coli 5S RNA and its complexes with ribosomal proteins by NMR, *Ph. D. Thesis, Yale University*, **1988**

Godt, Adelheid; Franzen Corinna; Veit, Stephan; Enkelmann, Volker; Pannier, Matthias; Jeschke, Gunnar; EPR probes with well-defined, long distances between two or three unpaired electrons, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 7575-7582

Gopalan, Venkat; Kühne, Henriette; Biswas, Roopa; Li, Huimei; Brudvig, Gary W.; Altman, Sidney; Mapping RNA - Protein interactions in Ribonuclease P from *Escherichia coli* using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Biochemistry*, **1999**, 38, 1705-1714

Gray, D. M.; Hung, S.-H.; Johnson, K. H.; Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes, *Methods Enzymol.*, **1995**, 246, 19-34

Groesbeek, M.; Lugtenburg, J.; Synthesis of nitroxide containing polyenes: two chemically modified retinals and their interaction with bacterioopsin, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1995**, 114, 403-409

Gutell, R. R.; Weiser B.; Woese, C. R.; Noller, H. F.; Comparative Anatomy of 16-S-like Ribosomal RNA, *Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, **1985**, 32, 155-216

H

Hakoshima, Toshio; Omori, Hisako; Tomita, Ken-ichi; Miki, Hiroko; Ikehara, Morio; The crystal and molecular structure of 2'-deoxy-2'-fluorinosine monohydrate, *Nucleic Acids Res.*, **1981**, 9, 711-720

Hampton, A.; Nichol, A. W.; Purine ribonucleoside 2',3'-cyclic carbonates. Preparation and use for the synthesis of 5'-monosubstituted nucleosides, *Biochemistry*, **1966**, 5, 2076-2082

Herdewijn, P.; Aerschot, A. Van; Kerremans, L.; Synthesis of nucleosides fluorinated in the sugar moiety. The application of diethylaminosulfur trifluoride to the synthesis of fluorinated nucleosides, *Nucl. Nucl.*, **1989**, 8, 65-96

Hershey, Alfred D.; Chase, Marta; Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.*, **1952**, 36, 39-56

Heus, Hans A.; Pardi, Arthur; Structural features that give rise to the unusual stability of RNA Hairpins containing GNRA loops, *Science*, **1991**, 253, 191-193

Hicks, Nicola; Howarth, Oliver W.; Hutchinson, David W.; N.m.r. studies of the flexibility of the glycosyl ring in thymidine and uridine nucleosides, *Carbohydr. Res.*, **1991**, 216, 1-9

Hicks, Nicola; Howarth, Oliver W.; Hutchinson, David; N.m.r. studies of the flexibility of the glycosyl ring in thymidine and uridine nucleosides, *Carbohydrate Research*, **1991**, 216, 1-9

Hideg, K.; Hankovszky, Lex L.; Kulcsár, Gy.; Nitroxyls; VI. Synthesis and reactions of 3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydropyrrole-1-oxyl and 3-formyl derivatives, *Synth. Commun.*, **1980**, 10, 911-913

Hilbers, C. W.; Blommers, M. J.; High resolution NMR studies of DNA hairpins with four nucleotides in the loop region, *Nucl. Nucl.*, **1991**, 10, 61-80

Himmelsbach, Frank; Schulz, Bernd; Trichtinger; Thomas; Charubala, Ramamurthy; Pfeleiderer, Wolfgang; The p-nitrophenylethyl (NPE) group, *Tetrahedron*, **1984**, 40, 59-72

Huryn, Donna M.; Okabe, Masami; AIDS-Driven nucleoside chemistry, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1745-1768

Hustedt, Eric J.; Spaltenstein, Andreas; Kirchner, James J.; Hopkins, Paul B.; Robinson, Bruce H.; Motions of short DNA duplexes: An analysis of DNA dynamics using an EPR-active probe, *Biochemistry*, **1993**, 32, 1774-1787

I

Ikehara, Morio; 2'-Substituted 2'-deoxypurinnucleotides: their conformation and properties, *Heterocycles*, **1984**, 21, 75-90

International Human Genome Sequencing Consortium; Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, **2001**, 409, 860-922

Irani, Rostem J.; SantaLucia Jr., John; The synthesis of 5-iodocytidine phosphoramidite for heavy atom derivatisation of RNA, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 8961-8964

J

Johnson, Curtis W.; CD of nucleic acids, in: Circular Dichroism - Principles and Applications, *VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim, New York*, **1994**, 523-540

K

Kanyo, J. E.; Duhamel, J.; Lu P.; Secondary structure of the (CUUCGG) tetraloop, *Nucl. Acids Res.*, **1996**, *24*, 4015-4022

Karras, M.; Hillenkamp, F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 2299-2301

Katzenellenbogen, John A.; Steroids labeled with fluorine-18 for imaging tumors by positron emission tomography, *Fluorinated Bioact. Compd. Agric. Med. Fields*, **1999**, *32*, 1-14

Kawasaki, Andrew M.; Casper, Martin D.; Freier, Susan M.; Lesnik, Elena A.; Gonzalez, Carolyn; Cook, Pan P.; Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity für RNA targets, *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 831-841

Keana, John F. W.; Newer aspects of the synthesis and chemistry of nitroxide spin labels, *Chem. Rev.*, **1978**, *78*, 37-64

Keese, P.; Symons R. H.; Domain in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 4582-4586

Keyes, Robert S.; Cao, Ying Y.; Bobst, Elisabeth V.; Rosenberg, John M.; Bobst, Albert M.; Spin-labeled nucleotide mobility in the boundary of the EcoRI endonuclease binding site, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1996**, *14*, 163-172

Khan, Shoeb I.; Grinstaff, Mark W.; Palladium(0)-catalyzed modification of oligonucleotides during automated solid-phase synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 4704-4705

Khorana, H. G.; Total synthesis of a gene, *Science*, **1979**, *203*, 614-625

Khorana, H. G.; Polynucleotide synthesis and the genetic code, *Fed. Proc.*, **1965**, *24*, 1473-1487

Kim, S. H.; Three dimensional structure of transfer RNA, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **1976**, *17*, 181-216

Kirchner, James J.; Hustedt, Eric J.; Robinson, Bruce H.; Hopkins, Paul B.; DNA dynamics from a spin probe : Dependence of probe motion on tether length, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 593-596

Konnings, D. A. M.; Gutell, R. R.; A comparison of thermodynamic foldings of comparatively derives structures of 16 SN and 16 S-like rRNAs, *RNA*, **1995**, *1*, 559-574

Krug, A.; Oretskaya, T. S.; Volkov, E. M.; Cech, D.; Shabarova, Z. A.; Rosenthal, A.; The behaviour of 2'-deoxy-2'-fluorouridine incorporated into oligonucleotides by the phosphoramidite approach, *Nucl. Nucl.*, **1989**, *8*, 1473-1483

Krug, R. R.; Hunter, W. G.; Grieger, R. A.; Enthalpy-Entropy compensation. 1. Some fundamental statistical problems associated with the analysis of van't Hoff and Arrhenius data, *J. Phys. Chem.*, **1976**, *80*, 2335-2340

Krug, R. R.; Hunter, W. G.; Grieger, R. A.; Enthalpy-Entropy compensation. 2. Separation of the chemical from the statistical effect, *J. Phys. Chem.*, **1976**, *80*, 2341-2351

L

Lee, Terry D.; Keana, John F. W.; In situ reduction of nitroxide spin labels with phenylhydrazin in deuteriochloroform solution. A convenient method for obtaining structural information on nitroxides using nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 3145-3146

Letsinger, R. L.; Lunsford, W. B.; Synthesis of thimidine oligonucleotides by phophit triester intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 3655-3661

Letzinger, R. L.; Finnman, J. L.; Heaver, G. A.; Lunsford, W.B.; Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 3278-3279

Leulliot, Nicolas; Baumruk, Vladimir, Abdelkafi, Mouhiba; Turpin, Pierre-Yves; Namane, Abdelkader; Huynh-Dinh; Tam; Ghomi, Mahmoud; Unusual nucleotide conformations in GNRA and UNCG type tetraloops hairpins: evidence from Raman markers assignments, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 1398-1404

Li, Benjamin F. L.; Resse, Colin B.; Swann, Peter F.; Synthesis and characterisation of oligodeoxynucleotides containing 4-*O*-methylthymine, *Biochemistry*, **1987**, *26*, 1086-1093

M

Macosko, J.C.; Pio, M. S.; Tinoco Jr., I.; Shin, Y.-K.; A novel 5'-displacement spin-labeling technique for electron paramagnetic resonance spectroscopy of RNA, *RNA*, **1999**, *5*, 1158-1166

Marky, L. A.; Breslauer, K. J.; Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves, *Biopolymers*, **1987**, *26*, 1601-1620

Marquez, Victor E.; Russ, Pamela; Alonso, Randolph; Siddiqui, Maqbool A.; Hernandez, Susanna; George, Clifford, Ford Jr., Harry; Synthesis of conformationally restricted carbocyclic nucleosides: The role of the O(4')-atom in the key hydration step of adenosine deaminase, *Helv. Chim. Acta*, **1999**, *82*, 2119-2129

Martin, Joseph A.; Bushnell, David J.; Duncan, Ian B. Dunsdon, Stephen J.; Hall, Michael J.; Machin, Peter J.; Merrett, John H.; Parkes, Kevin E.; Synthesis and antiviral activity of monofluoro and difluoro analogues of pyrimidine deoxyribonucleosides against human immunodeficiency virus (HIV-1), *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2137-2145

Martin, Rainer,E.; Pannier, Matthias; Diederich, Francois; Gramlich, Volker; Hubrich, Michael; Spiess, Hans W.; Bestimmung der Länge von bis zu 2.8 nm langen TEMPO-Diradikalen mit neuen Vier-Puls-Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz-Experiment, *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2994-2998

Mathews, David H.; Sabina, Jeffrey; Zuker, Michael; Turner, Douglas H.; Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *288*, 911-940

Maxam, Allan M.; Gilbert, Walter A.; A new method of sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 560-564

McBride, L. J.; Caruthers, M. H.; Amidine protection groups for oligonucleotide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2040-2048

Mendel, Gregor; Versuche über Pflanzenhybriden, *Verhandlungen des naturforschenden Vereins*, **1866**, 3-47

Mengel, Rudolf; Guschlbauer, Wilhelm; A simple synthesis of 2'-deoxy-2'-fluorocytidine by nucleophilic substitution of 2,2'-anhydrocytidine, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, 17, 525

Mercer, J. R.; Knaus, E. E.; Wiebe, L. I.; Synthesis and tumor uptake of 5-halo-1-(2'-fluoro-2'-deoxy-beta-D-ribofuranolsyl)[2-¹⁴C]uracils, *J. Med. Chem.*, **1987**, 30, 670-675

Meroueh, May; Chow, Christine S.; Thermodynamics of RNA hairpins containing single internal mismatches, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 1118-1125

Merrifield, Robert B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154

Meselson, Metthew; Stahl, Franklin W.; The replication of DNA in a Escherichia coli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1958**, 44, 671-682

Mikhailopulo, Igor A.; Sivets, Grigorii, G.; A novel route for the synthesis of deoxy fluoro sugars and nucleosides, *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 2052-2065

Milligan, J. F.; Groebe, D. R.; Wihterell, G. W.; Uhlenbeck, O.C.; Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates, *Nucl. Acids Res.*, **1987**, 15, 8783-8798

Minguet, Maria; Amabilino, David, B.; Cirujeda, Joan; Wurst, Klaus; Mata, Ignasi; Molins, Elies; Novoa, Juan J.; Veciana, J.; Stereochemistry of Phenyl α -Nitronyl Nitroxide radicals, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 2350-2361

Müller, G.; Dürner, G.; Bats J. W.; Göbel, M. W.; Supramolekulare Phosphoryl-Übergangsreaktionen, *Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, , 1075-1092

Murray, Robert W.; Jeyaraman, Ramasubbu; Dioxiranes: Synthesis and reactions of methyldioxiranes, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2847-2853

Murray, Robert W.; Singh, Megh; A convenient high yield synthesis of nitroxides, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4677-4680

Mustafi, Devkumar; Boisvert, William E.; Makinen, Marvin W.; Synthesis of conjugated polyene carbonyl derivatives of nitroxyl spin-labels and determination of their molecular structure and conformation by electron nuclear double resonance, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3674-3682

N

Nirenberg, M. W.; Matthaei, J. H.; Jones, O. W.; Martin, R. G.; Barondes, S.H.; Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA, *Fed. Proc.*, **1963**, *22*, 55-61

Nirenberg, Marshall W.; The genetic code, *Nobel Lectures: Physiologie or medicine*, **1973**, Elsevier, New York, 372-395

Nordhoff, E.; Cramer, R.; Hillenkamp, F.; Kirpekar, F.; Kristiansen, K.; Roepstorff, P.; Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Nucl. Acids Res.*, **1993**, *21*, 3347-3357

O

O'Hagan, David; Rzepa, Henry S.; Some influences of fluorine in bioorganic chemistry, *Chem. Commun.*, **1997**, *54*, 645-652

Olah, George A.; Welch, John T.; Vankar, Yashwant D.; Nojima, Mosatomo, Kerekes, Istvan, Olah, Judith A.; Synthetic methods and reactions. 63. Pyridinium poly(hydrogen fluoride) (30% pyridine-70% hydrogen fluoride): A convenient reagent for organic fluorination reactions, *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 3872-3881

P

Pagratis, Nikos C.; Bell, Carol; Chang, Ying-Fon; Jennings, Susan; Fitzwater, Tim; Jellinek, Derek; Dang, Chinh; Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor, *Nature Biotechnol.*, **1997**, *15*, 68-73

Pankiewicz, Kryzysztof W.; Krzeminski, Jacek; Watanabe, Kyoichi, A.; Synthesis of 2'- β -fluoro- and 3'- α -fluoro-substituted guanine nucleosides. Effects of sugar conformational shifts on nucleophilic displacement of the 2'-hydroxy and 3'-hydroxy group with DAST, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 7315-7321

Parsch, Uwe; 6-Oxocytidin - ein Baustein für die pH-unabhängige Tripelhelix-Bildung, *Dissertation, Frankfurt am Main*, **1999**

Peattie, D. A.; Douthwaite, S.; Garrett, R. A.; Noller, H. F.; A "bulged" double helix in a RNA-protein contact site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78, 7331-7335

Perbandt, Markus; Nolte, Alexis; Lorenz, Sigfried; Bald, Rolf; Betzel, Christian; Erdmann, Volker A.; Crystal structure of domain E of *Thermus flavus* 5S rRNA: a helical RNA structure including a hairpin loop, *FEBS Lett.*, **1998**, 429, 211-215

Pitsch, Stefan; Weiss, Patrick A.; Jenny, Luzi; Ribonucleoside-derivative and preparing the same, *Swiss Patent Application 01931/79*, **1997**

Plaved, Janez; Tong, Weimin; Chattopadhyaya, Jyoti; How do the gauche and anomeric effects drive the pseudorotational equilibrium of the pentafuranose moiety of nucleosides ?, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9734-9746

Puglisi, Joseph D.; RNA-folding: structure and conformational equilibria of RNA pseudoknots, *Ph. D. Thesis, University of California*, 1986

Puglisi, Joseph D.; Tinoco, Ignacio Jr.; Adsorbance Melting curves of RNA, *Methods Enzymol.*, **1989**, 180, 304-325

Puglisi, Joseph D.; Wyatt, J. R.; Tinoco, Ignacio Jr.; Conformation of an RNA pseudoknot, *J. Mol. Biol.*, **1990**, 214, 437-453

R

Rabenstein, Mark D.; Shin, Yeon-Kyun; Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 8239-8243

Ramos, Andres; Varani, Gabriele; A new method to detect long-range protein-RNA contacts: NMR detection of electron-proton relaxation induced by nitroxide spin-labeled RNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10992-10993

Ranganathan, R.; Modification of the 2'-position of purine nucleosides: Synthesis of 2'-substituted-2'-deoxyadenosine analogs, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *15*, 1291-1294

Reichman, Uri; Watanabe, Kyoichi; Fox, Jack J.; A practical synthesis of 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinofuranose derivatives, *Carbohydr. Res.*, **1975**, *42*, 233-240

Reif, Bernd; Wittmann, Valentin; Schwalbe, Harald; Griesinger, Christian; Wörner, Karlheinz; Jahn-Hofmann, Kerstin; Engels, Joachim W.; 132. Structural Comparison of oligoribonucleotides and their 2'-deoxy-2'-fluoro analogs by heteronuclear NMR spectroscopy, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 1952-1971

Riess, J. G.; Le Blanc, M.; Perfluoro compounds as blood substitutes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, *17*, 621-634

Rirchner, Roland; Vogtherr, Martin; Limmer, Stephan; Sprinzl, Matthias; Secondary structure dimorphism and interconversion between hairpin and duplex form of oligoribonucleotides, *Nucl. Acids Res.*, **1989**, *8*, 507-516

Robins, Morris J.; Barr, Philip J.; Nucleic acid related compounds. 39. Efficient conversion of 5-iodo to 5-alkynyl and derived 5-substituted uracil bases and nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 1854-1862

Robins, Morris J.; Barr, Philip J.; Giziewicz, Jerzy; Nucleic acid related compounds. 38. Smooth and high yield iodination and chlorination at C-5 of uracil bases and p-toluy-protected nucleosides, *Can. J. Chem.*, **1982**, *60*, 554-557

Romby, P.; Westhof E.; Toukifimpa, R.; Mache R.; Ebel, J. P.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B.; Higher order structure of chloroplastic 5S ribosomal RNA from spinach, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 4721-4730

Rozantzev, E. G.; Krinitzkaya, L.A.; Free iminoxyl radicals in the hydrogenated pyrrole series, *Tetrahedron*, **1965**, *21*, 491-499

Russell, Alna F.; Hamamura, Ernest K.; Verheyden, Julien P. H.; Moffat, John G.; Reactions of 2-acyloxyisobutyryl halides with nucleosides. V. Reactions with cytidine and its derivatives, *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 2182-2186

S

Saenger, Wolfram; Principles of nucleic acid structure, *Springer Verlag, New York Berlin Heidelberg Tokyo*, **1988**

Saiki, R. K.; Scharf, S. J.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich H.A.; Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, **1985**, *230*, 1350-1354

SantaLucia Jr., John; Kierzek, Ryszard; Turner, Douglas H.; Context dependence of hydrogen bond free energy revealed by substitutions in an RNA hairpin, *Science*, **1992**, *256*, 217-219

Sár, Cecília; Jecoö, József; Fajer, Peter; Hideg, Kálmán; Synthesis and reactions of new alkynyl substituted nitroxide radicals, *Synthesis*, **1999**, *6*, 1039-1045

Scarringe, Stephen A.; Usmann, Nassim; Chemical synthesis of biologically active oligoribonucleotides using β -cyanoethyl protected ribonucleoside phosphoramidites, *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 5433-5441

Schlosser, M.; Introduction of fluorine into organic molecules: why and how, *Tetrahedron*, **1978**, *34*, 3-17

Schulhof, J-C.; Molko, D.; Teoule, R.; The final deprotection step in oligonucleotide synthesis is reduced to a mild rapid ammonia treatment by using labile base-protection groups, *Nucl. Acids Res.*, **1987**, *15*, 397-402

Schweitzer, Markus; Synthese und Charakterisierung modifizierter DNA Hairpin Loops, *Diplomarbeit, Frankfurt am Main*, **1994**

Scremin, Carlo L.; Zhou, Liang; Srinivasachar, Kasturi; Beaucage, Serge L.; Stepwise regeneration and recovery of deoxyribonucleoside phosphoramidite monomers during solid-phase oligonucleotide synthesis, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 1963-1966

Searle, Mark S.; Williams, Dudley H.; On the stability of nucleic acid structures in solution: enthalpy - entropy compensations, internal rotations and reversibility, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*, 2051-2056

Seiter, Michael S.; Bauer, Michael P.; Vogel, Pia D.; Trommer, Wolfgang E.; Synthesis of novel spin-labeled photoaffinity derivatives of NAD⁺ and ATP and their characterization as coenzymes and substrates of several enzymes, *Synthesis*, **1996**, *2*, 269-273

Sharma, Ramesh K.; Fry, James L.; Instability of anhydrous tetra-*n*-alkylammonium fluorides, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 2112-2114

Sigurdsson, Snorri Th.; Eckstein, Fritz; Site specific labelling of sugar residues in oligoribonucleotides: reactions of aliphatic isocyanates with 2' amino groups, *Nucl. Acids Res.*, **1996**, *24*, 3129-3133

Sinha, N. D.; Biernat, J.; Köster, H.; β -Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholino-monochloro phosphoramidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 5843-5846

Sinha, N. D.; Davis, P.; Usmann, N.; Perez, J.; Hodge, R.; Kremsky, J.; Casale, R.; Labile exocyclic amine protection of nucleosides in DNA, RNA and oligonucleotide analogue synthesis facilitating *N*-deacylation, minimizing depurination and chain degradation, *Biochimie*, **1993**, *75*, 13-23

Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H.G.; Studies on polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C-3'-C-5' interribonucleotide linkage. Synthesis of uridylyl-(3'-5')-uridine and uridylyl-(3'-5')-adenosine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 430-440

Sonogashira, Kenkichi; Tohda, Yasuo; Hagihara, Nobue; A convenient synthesis of acetylenes: Catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *50*, 4467-4470

Spaltenstein, Andreas; Robinson, Bruce H.; Hopkins, Paul B.; DNA structural data from a dynamic probe. The dynamic signatures of single-stranded, hairpin-looped, and duplex forms of DNA are distinguishable, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 2303-2305

Spaltenstein, Andreas; Robinson, Bruce H., Hopkins, Paul B.; A rigid and nonperturbing probe for duplex DNA motion, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1299-1301

Spaltenstein, Andreas; Robinson, Bruce; Hopkins, Paul B.; Sequence- and structure-dependent DNA base dynamics: synthesis, structure, and dynamics of site and sequence specifically spin-labeled DNA, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 9484-9495

Stein, A.; Crothers, D. M.; Conformational changes of transfer RNA. The role of magnesium(II), *Biochemistry*, **1976**, *15*, 160-168

Sterzycki, Roman Z.; Ghazzouli, Ismail; Brankovan, Vera; Martin, John C.; Mansuri, Muzammil M.; Synthesis and Anti-HIV activity of several 2'-fluoro containing pyrimidine nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2150-2157

Strobel, Oliver K.; Keyes, Robert S.; Bobst, Albert M.; Base dynamics of local Z-DNA conformations as detected by electron paramagnetic resonance with spin-labeled deoxycytidine analogues, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 8525-8528

Strube, Thorsten; Darstellung von 2'-Fluor modifizierten RNA Bausteinen und Einbau in Hairpins, Diplomarbeit, **1997**, Frankfurt am Main

Szarek, Walter A.; Hay, George W.; Doboszewski, Bogdan; Utility of tris(dimethylamino)sulphonium difluorotrimethylsilicate (TASF) for the rapid synthesis of deoxofluoro sugars, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, *169*, 663-664

T

Tanaka, K.; Waki, H.; Iod, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Protein and polymer analyses up to m/z 10000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Commun. Mass. Spectrom.*, **1988**, *2*, 151-153

Thomas, Fabrice; Michon, Josette; Lhomme, Jean; Interaction of a spin-labeled adenine-acridine conjugate with a DNA duplex containing an abasic site model, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 1930-1937

Treiber, Daniel K.; Rok, Martha S.; Zarrinkar, Patrick P.; Williamson, James R.; Kinetic intermediates trapped by native interactions in RNA folding, *Science*, **1998**, *279*, 1943-1946

Turner, D. H.; Sugimoto, N.; Freier, S. M.; RNA structure prediction, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **1988**, *17*, 167-192

U

Uesugi, Seiichi; Miki, Hiroko; Ikehara, Morio; Iwahashi, Hideo; Kyogoku, Yoshimasa; A linear relationship between electronegativity of 2'-substituents and conformation of adenine nucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *42*, 4073-4076

Uesugi, Seiichi; Takatsuka, Yoko; Ikehara, Mario; Cheng, Doris M.; Kann, Lou S.; Ts'o, Paul O. P.; Synthesis and characterisation of the dinucleoside monophosphates containing 2'-fluoro-2'-deoxyadenosine, *Biochemistry*, **1981**, *20*, 3056-3062

Uhlenbeck, Olke C.; Borer, Philip N.; Dengler, Barbara; Tinoco, Ignacio Jr.; Stability of RNA Hairpin Loops: A6-Cm-U6, *J. Mol. Biol.*, **1973**, *73*, 483-496

V

Varani, Gabriele; Cheong, Chaejoon; Tinoco, Ignacio Jr.; Structure of an unusually stable RNA hairpin, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 3280-3289

Varani, Gabriele; Wimberly, B.; Tinoco, Ignacio, Jr.; Conformation and dynamics of an RNA internal loop, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 7760-7772

Vargeese, Chandra; Carter, Jeff; Yegge, John; Krivjansky, Shira; Settle, Alecia; Kropp, Eric; Peterson, Kent; Pieken, Wolfgang; Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 1046-1050

Venter, Craig J. et al; The Sequence of the Human Genome, *Science*, **2001**, *291*, 1304-1351

Verheyden, J. P. H.; Wagner, D.; Moffat, J. G.; Synthesis of some pyrimidine 2'-amino-2'-deoxynucleosides, *J. Org. Chem.*, **1997**, *36*, 250-254

Volodarsky, Leonid B.; Advances in the chemistry of stable nitroxides, *Janssen Chim. Acta*, **1990**, 8, 12-19

Volodarsky, Leonid; Kosover, Vilen; Synthesis of acetone nitroxide radical and 1-hydroxy-2,2,4,6,6-pentamethyl-1,2,5,6-tetrahydropyrimidine, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 179-181

W

Wade, T. N.; Gaymard, F.; Guedj, R.; A new synthesis of 3-Fluorophenylalanine esters, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 2681-2682

Waglinenknecht, Hans-Achim; Stemp, Eric D. A.; Barton, Jacqueline, K.; DNA-bound peptide radicals generated through DNA-mediated electron transport, *Biochemistry*, **2000**, 39, 5483-5491

Wang, Weimin; Song, Quanlai; Jones, Roger A.; Nucleoside recovery in DNA and RNA synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 8971-8974

Watanabe, Kyoichi A.; Reichman Uri; Hirota, Kosaku; Lopez, Carlos; Fox, Jack J.; Nucleosides. 110. Synthesis and antiherpes virus activity of some 2'-fluoro-2'-deoxyarabinofuranosylpyrimidine nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1979**, 22, 21-24

Watson, James D.; Crick, Francis H. C.; Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **1953a**, 171, 737-738

Watson, James D.; Crick, Francis H. C.; Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*, **1953b**, 171, 964-967

White, S. A.; Draper, D. E.; Effects of single-base bulges in intercalator binding to small RNA and DNA hairpins and a ribosomal RNA fragment, *Biochemistry*, **1987**, 28, 1892-1897

Williams, D. Jeremy; Hall, Kathleen B.; Unrestrained stochastic dynamics simulations of the UUCG tetraloop using an implicit solvation model, *Biophys. J.*, **1999**, 76, 3192-3205

Williams, David M.; Benseler, Fritz; Eckstein, Fritz; Properties of 2'-fluorothymidine-containing oligonucleotides: Interaction with restriction endonuclease EcoRV, *Biochemistry*, **1991**, 30, 4001-4009

Williams, Jeremy D.; Boots, Jennifer L.; Hall, Kathleen B.; Thermodynamics of 2'-ribose substitutions in UUCG tetraloops, *RNA*, **2001**, 7, 44-53

Williams, Jeremy D.; Hall, Kathleen, Hall B.; Experimental and theoretical studies of the effects of deoxyribose substitutions on the stability of the UUCG tetraloop, *J. Mol. Biol.*, **2000**, 297, 251-265

Wincott, Francine; DiRenzo, Anthony; Shaffer Chris; Grimm, Susan; Tracz, Danuta; Scaringe, Stephen; Usman, Nassim; Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 2677-2684

Wolters, J.; The nature of preferred hairpin structures in 16S-like rRNA variable regions, *Nucl. Acids Res.*, **1992**, 20, 1843-1850

Wörner, Karlheinz; Synthese und Charakterisierung kleiner strukturbildender Oligoribonucleotide, *Dissertation, Frankfurt am Main*, **1997**

Wörner, Karlheinz; Strube, Thorsten; Engels, Joachim W.; Synthesis and stability of GNRA-loop analogs, *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 2094-2104

Wyatt, J. R.; Puglisi, Joseph D.; Tinoco, Ignacio Jr.; RNA pseudoknots. Stability and loop size requirements, *J. Mol. Biol.*, **1990**, 214, 455-470

Y

Yoneda, Norihiko; The combination of hydrogen fluoride with organic bases as fluorination agents, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 5329-5365

Z

Zhdanov, R. I.; Volkova, L.A.; Kuvichkin, V.V.; Petrov, A. I.; Nucleic acid spin labeling study of interaction between polyadenylic acid: Polyuridilic acid duplex and egg phosphatidylcholine vesicles, *Appl. Magn. Reson.*, **1994**, 7, 115-130

13 Anhang

Teil A Kristallstruktur von 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **144**

Teil B Abbildung ausgewählter Spektren

Teil C Abkürzungsverzeichnis

Teil D Publikationsliste

Teil A Kristallstruktur von 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-N-oxyl**144**

CRYSTAL DATA OF 2,2,5,5-TETRAMETHYL,3-FORMYL-PYRROLINE-1-OXYL AT -134°C

formula	C ₉ H ₁₄ NO ₂
mol. weight	168.22
crystal color	yellow, transparent
crystal shape	needle
crystal dimensions	0.19 x 0.24 x 0.90 mm
crystal system	tetragonal
space group	P 41
space group number	76
a = b	7.958(1) Å
c	15.033(1)
V	951.9(3) Å ³
Z	4
D _{calc}	1.174 g/cm ³
linear absorption coeff.	0.82 cm ⁻¹
radiation	Mo-K
scan range	sphere
(2 theta)max	63
resolution	0.68 Å
number of reflections measured	15868
number of independent reflections	2886
reflections used with I > 0	2854
number of variables	165
R(F)	0.051
wR(F)	0.038
S	0.82

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about -134 C. Repeatedly measured reflections remained stable. A numerical absorption correction based on ten crystal faces gave a transmission range from 0.961 to 0.987 . Equivalent reflections were averaged. Friedel opposites were not averaged.

R(I)internal = 0.044 .

The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from a difference Fourier synthesis and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

$$w(F) = 4 * F^2 / [\sigma^2(F^2) + (0.03 * F^2)^2] .$$

The final difference density was between -0.26 and +0.25 e/A . The calculations were performed with the SMART, SHELX and MolEN program systems.

DISCUSSION OF THE STRUCTURE

=====

The five-membered pyrroline ring is almost planar. The largest torsion angle in the five-membered ring is 2.2(1) . The aldehyde group is coplanar with the five-membered ring.

The dimensions of the 2,2,5,5-tetramethylpyrroline-N-oxide group are very similar with the dimensions of this group found in other crystal structures: (Laugier et al., *New J. Chem. (Nouv. J. Chim.)*, 7, 1983, 11; Dickman and Doedens, *Inorg. Chem.*, 22, 1983, 1591; Porter and Doedens, *Acta Cryst.*, C40, 1984, 1814; Boeyens and Kruger, *Acta Cryst.*, B26, 1970, 668; Kalai et al., *Synthesis*, 1997, 1049; Wiley et al., *Angew. Chem.*, 103, 1991, 459, *Int. Ed. Engl.*, 30, 1991, 450; Turley and Boer, *Acta Cryst.*, B28, 1972, 1641; Wiley et al., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1989, 1523).

The molecule shows no short intramolecular contacts.

The crystal packing shows an intermolecular distance of 2.45(1) A between O1 and H5 of a neighboring molecule (symmetry: 1-x, 2-y, z-0.5) which approaches the van der Waals contact distance of 2.4 A between O and H. An additional intermolecular distance of 2.58(2) A between O2 and H7C (symmetry: 2-y, 1+x, 0.25+z) is about 0.2 A longer than the van der Waals contact distance.

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

Atom	x	y	z	B(A ²)
----	-	-	-	-----
O1	0.6252(1)	0.8985(1)	0.19593(0)	2.24(2)
O2	0.7014(1)	1.1792(1)	0.52241(7)	2.82(2)
N	0.5771(1)	0.9160(1)	0.27637(7)	1.63(2)
C1	0.4364(2)	0.8173(2)	0.31507(8)	1.51(2)
C2	0.4420(2)	0.8824(2)	0.40882(8)	1.64(2)
C3	0.5622(2)	0.9951(2)	0.42243(8)	1.58(2)
C4	0.6609(2)	1.0341(2)	0.33877(8)	1.47(2)
C5	0.5944(2)	1.0746(2)	0.50907(9)	2.16(2)
C6	0.4759(2)	0.6301(2)	0.31005(9)	2.09(2)
C7	0.2723(2)	0.8590(2)	0.26731(9)	2.28(2)
C8	0.8473(2)	0.9915(2)	0.34475(9)	2.05(2)
C9	0.6345(2)	1.2143(2)	0.3070(1)	2.30(2)
H2	0.362(2)	0.840(2)	0.4527(9)	2.6(3)*
H5	0.518(2)	1.033(2)	0.5561(9)	2.7(3)*
H6A	0.587(2)	0.603(2)	0.3413(9)	2.7(3)*
H6B	0.484(2)	0.594(2)	0.249(1)	3.1(3)*

H6C	0.388(2)	0.565(2)	0.3374(9)	2.7(3)*
H7C	0.244(2)	0.981(2)	0.271(1)	3.7(4)*
H7B	0.179(2)	0.795(2)	0.2964(9)	2.5(3)*
H7A	0.279(2)	0.826(2)	0.205(1)	3.0(3)*
H8C	0.862(2)	0.877(2)	0.3667(9)	2.6(3)*
H8B	0.899(2)	1.001(2)	0.2882(9)	2.1(3)*
H8A	0.903(2)	1.074(2)	0.3847(9)	2.7(3)*
H9A	0.692(2)	1.293(2)	0.348(1)	3.2(3)*
H9B	0.514(2)	1.241(2)	0.3060(9)	2.4(3)*
H9C	0.688(2)	1.227(2)	0.251(1)	2.5(3)*

Starred atoms were refined isotropically.

Anisotropically refined atoms are given in the form of the
isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2*B(1,1) + b^2*B(2,2) + c^2*B(3,3) + ab(\cos \gamma)*B(1,2) + ac(\cos \beta)*B(1,3) + bc(\cos \alpha)*B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

Name	U(1,1)	U(2,2)	U(3,3)	U(1,2)	U(1,3)	U(2,3)
O1	0.0301(4)	0.0390(5)	0.0160(4)	-0.0019(4)	0.0048(4)	-0.0014(4)
O2	0.0356(5)	0.0387(5)	0.0330(5)	-0.0037(5)	-0.0009(5)	-0.0127(4)
N	0.0215(5)	0.0239(5)	0.0166(4)	-0.0015(4)	0.0027(4)	0.0000(4)
C1	0.0192(5)	0.0200(5)	0.0182(5)	-0.0014(5)	0.0012(5)	0.0010(5)
C2	0.0228(5)	0.0211(5)	0.0184(5)	0.0030(5)	0.0056(5)	0.0021(5)
C3	0.0207(5)	0.0195(5)	0.0199(5)	0.0049(5)	0.0022(5)	-0.0004(5)
C4	0.0196(5)	0.0179(5)	0.0184(5)	-0.0002(5)	0.0013(5)	0.0003(5)
C5	0.0269(6)	0.0306(7)	0.0247(6)	0.0041(6)	0.0036(5)	-0.0042(5)
C6	0.0331(6)	0.0203(6)	0.0261(6)	-0.0011(5)	0.0028(6)	-0.0016(5)
C7	0.0226(6)	0.0348(7)	0.0293(7)	-0.0010(5)	-0.0028(6)	0.0036(6)
C8	0.0207(6)	0.0345(7)	0.0226(6)	0.0009(6)	0.0017(5)	0.0006(6)
C9	0.0316(6)	0.0222(6)	0.0337(6)	0.0004(6)	0.0045(6)	0.0048(6)

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$$\exp [-2\pi i \{ h^2 a^2 U(1,1) + k^2 b^2 U(2,2) + l^2 c^2 U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3) \}]$$
 where a, b, and c are reciprocal lattice constants.

Table of Bond Distances in Angstroms

```

-----
Atom 1  Atom 2  Distance                Atom 1  Atom 2  Distance
=====  =====  =====                =====  =====  =====
O1      N        1.276(1)                C1      C7      1.527(2)
O2      C5      1.208(2)                C2      C3      1.327(2)
N       C1      1.486(2)                C3      C4      1.515(2)
N       C4      1.486(2)                C3      C5      1.470(2)
C1      C2      1.502(2)                C4      C8      1.524(2)
C1      C6      1.524(2)                C4      C9      1.526(2)
-----

```

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

```

-----
Atom 1  Atom 2  Atom 3  Angle                Atom 1  Atom 2  Atom 3
Angle
=====  =====  =====  =====                =====  =====  =====
=====
O1      N        C1      122.6(1)                C2      C3      C4
112.6(1)
O1      N        C4      122.2(1)                C2      C3      C5
123.6(1)
C1      N        C4      115.16(9)              C4      C3      C5
123.8(1)
N       C1      C2      99.37(9)                N       C4      C3
99.3(9)

```

N	C1	C6	110.0(1)	N	C4	C8
109.5(1)						
N	C1	C7	110.2(1)	N	C4	C9
109.6(1)						
C2	C1	C6	112.2(1)	C3	C4	C8
114.2(1)						
C2	C1	C7	113.1(1)	C3	C4	C9
112.4(1)						
C6	C1	C7	111.4(1)	C8	C4	C9
111.2(1)						
C1	C2	C3	113.5(1)	O2	C5	C3
124.5(1)						

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Atom 4	Angle
=====	=====	=====	=====	=====
O1	N	C1	C2	177.48 (0.10)
O1	N	C1	C6	59.64 (0.14)
O1	N	C1	C7	-63.59 (0.14)
C4	N	C1	C2	-1.10 (0.12)
C4	N	C1	C6	-118.94 (0.11)
C4	N	C1	C7	117.82 (0.11)
O1	N	C4	C3	-176.62 (0.10)
O1	N	C4	C8	-56.70 (0.14)
O1	N	C4	C9	65.48 (0.14)
C1	N	C4	C3	1.97 (0.12)
C1	N	C4	C8	121.89 (0.11)
C1	N	C4	C9	-115.93 (0.11)
N	C1	C2	C3	-0.43 (0.13)
C6	C1	C2	C3	115.77 (0.12)
C7	C1	C2	C3	-117.22 (0.12)
C1	C2	C3	C4	1.77 (0.15)
C1	C2	C3	C5	-178.90 (0.11)
C2	C3	C4	N	-2.21 (0.13)
C2	C3	C4	C8	-118.58 (0.12)
C2	C3	C4	C9	113.58 (0.12)
C5	C3	C4	N	178.47 (0.11)
C5	C3	C4	C8	62.10 (0.16)
C5	C3	C4	C9	-65.75 (0.15)
C2	C3	C5	O2	-178.78 (0.13)
C4	C3	C5	O2	0.47 (0.21)

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$-0.6455 X + 0.7240 Y + -0.2433 Z - 1.3120 = 0$$

$$0.0004 \quad 0.0004 \quad 0.0006 \quad 0.0059$$

Crystallographic Equation of Plane

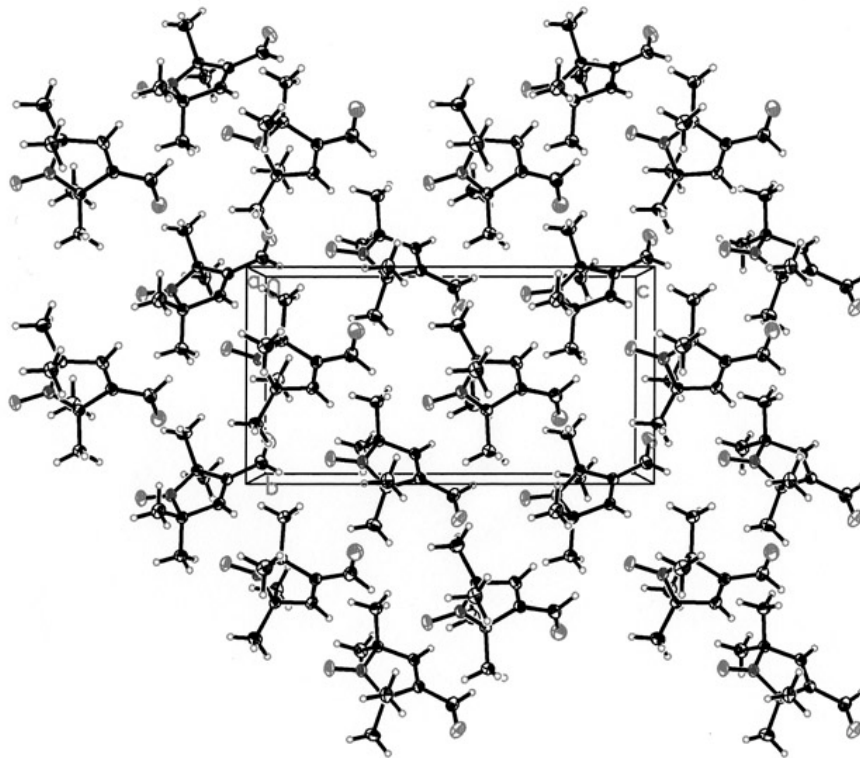
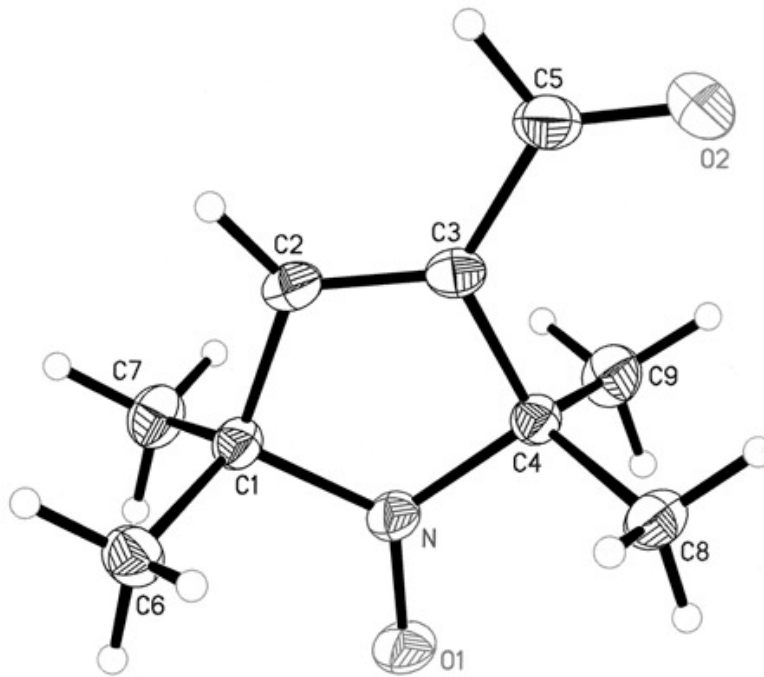
$$-5.1362 X + 5.7614 Y + -3.6574 Z - 1.3120 = 0$$

$$0.0036 \quad 0.0032 \quad 0.0086 \quad 0.0059$$

Atom	X	Y	Z	Distance	EsD
N	4.5925	7.2891	4.1546	-0.0096 +- 0.0010	
C1	3.4730	6.5037	4.7363	0.0028 +- 0.0012	
C2	3.5176	7.0216	6.1456	0.0062 +- 0.0012	
C3	4.4740	7.9185	6.3502	-0.0116 +- 0.0012	
C4	5.2591	8.2287	5.0926	0.0122 +- 0.0012	
Chi Squared =				326.3	

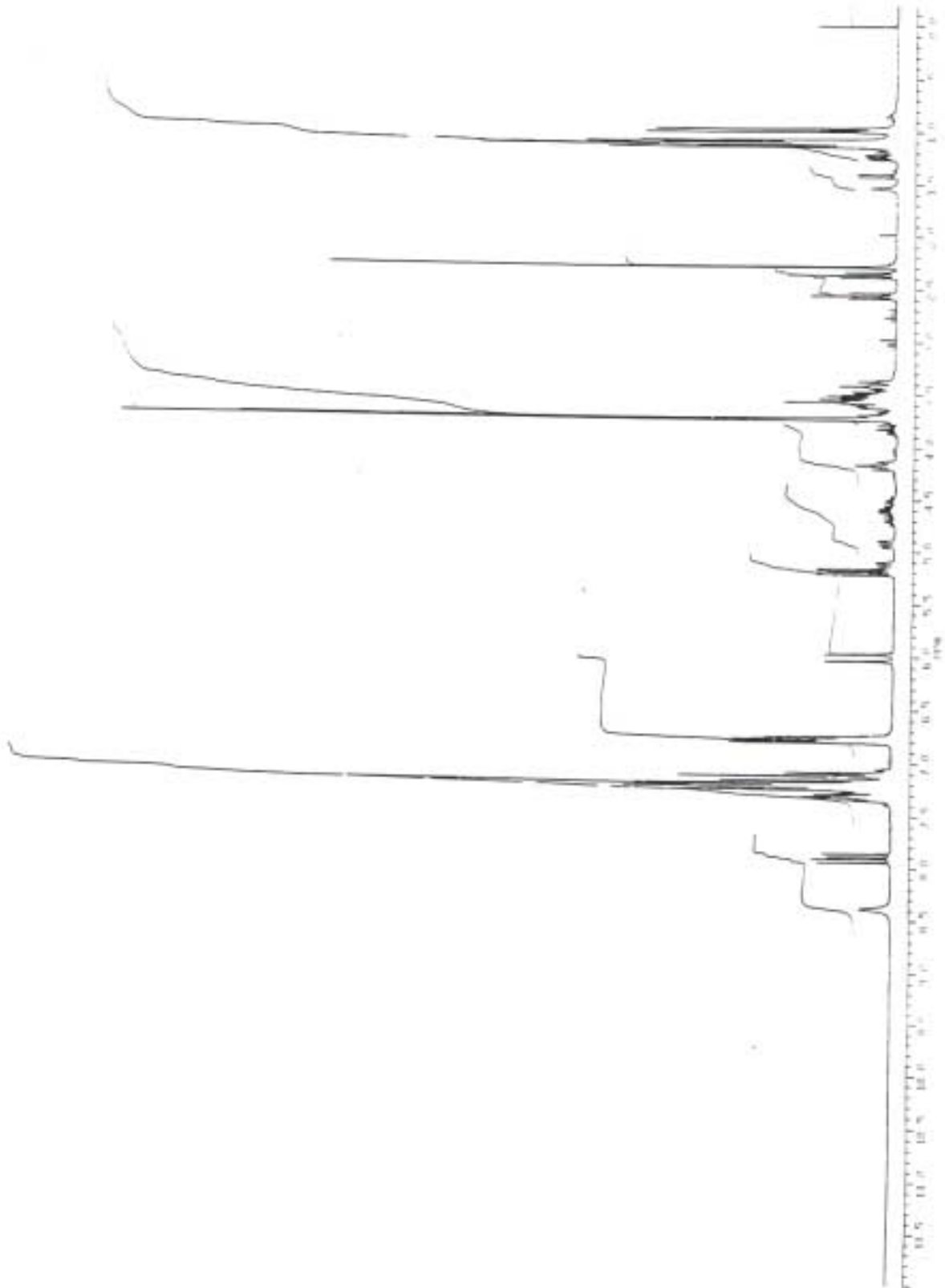
----- Other Atoms -----

O1	4.9754	7.1496	2.9454	-0.0635 +- 0.0009	
C5	4.7302	8.5511	7.6526	-0.0358 +- 0.0013	
O2	5.5812	9.3838	7.8531	-0.0310 +- 0.0010	
H2	2.8838	6.6851	6.8059	0.0109 +- 0.0137	
H5	4.1231	8.2222	8.3595	-0.0541 +- 0.0140	
C6	3.7870	5.0141	4.6608	-1.2600 +- 0.0013	
C7	2.1668	6.8354	4.0183	1.2607 +- 0.0013	
C8	6.7426	7.8898	5.1824	-1.2125 +- 0.0013	
C9	5.0489	9.6630	4.6153	1.3025 +- 0.0013	

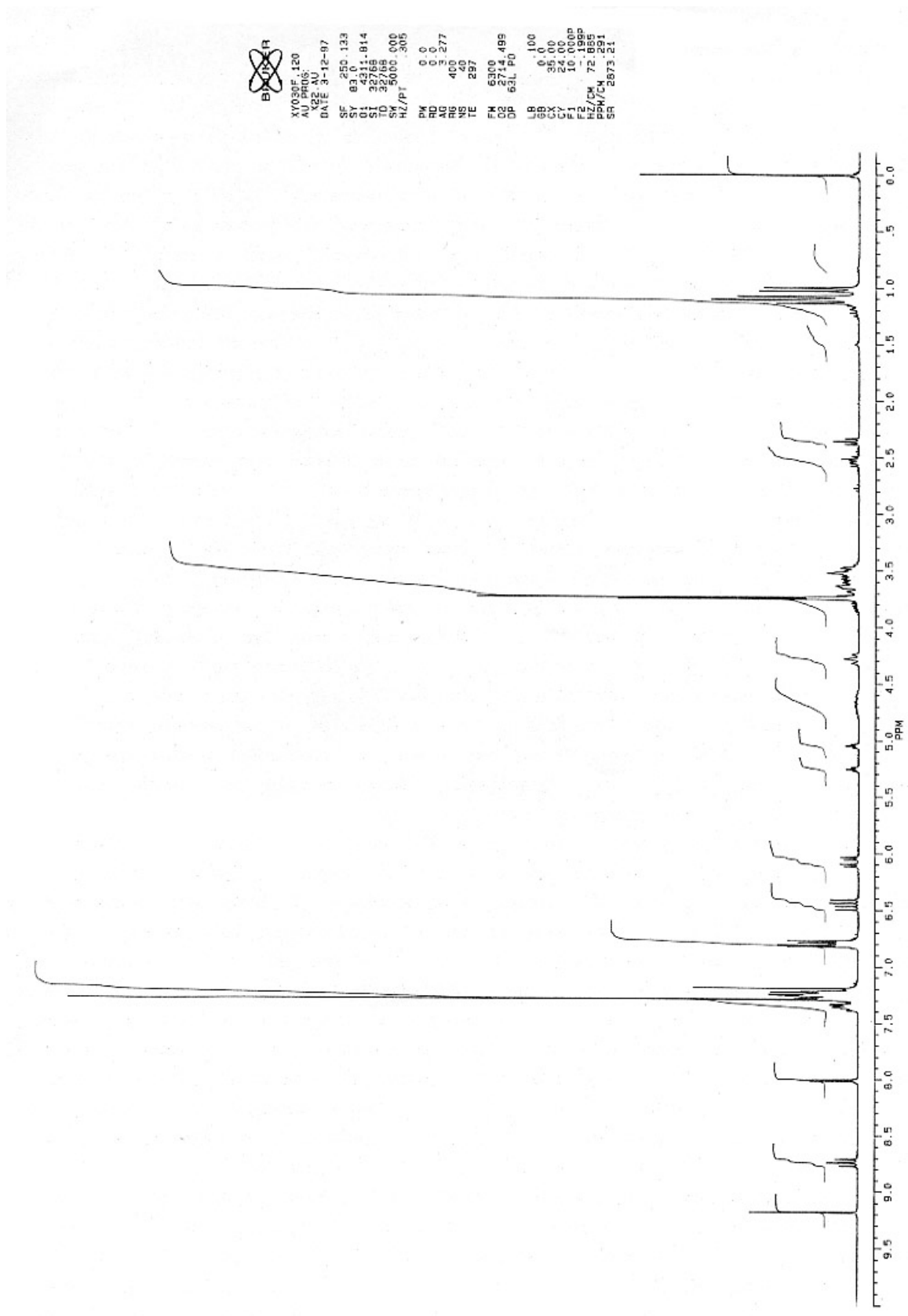


Teil B Abbildung ausgewählter Spektren

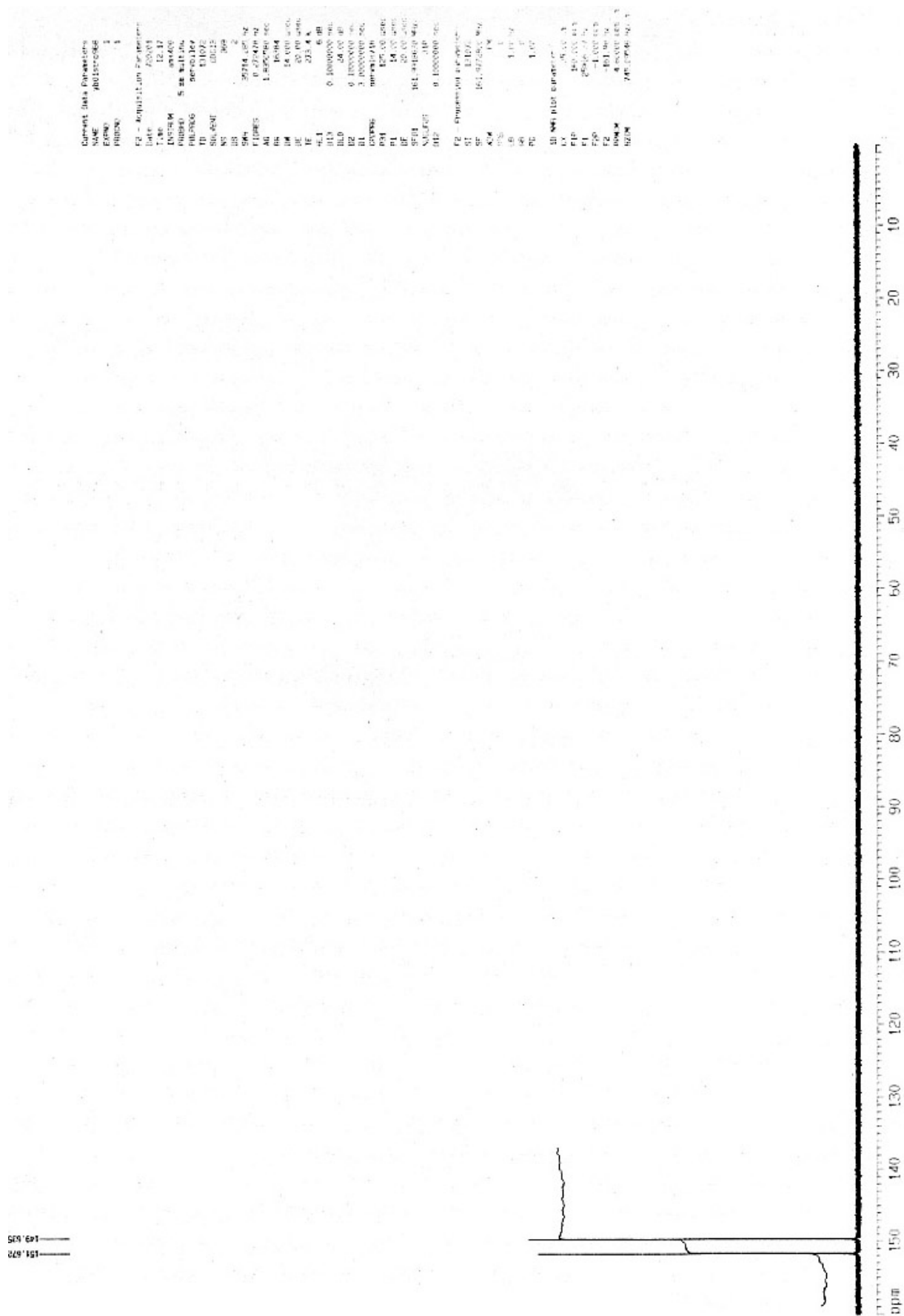
Spektrum von 3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin **22a/b**

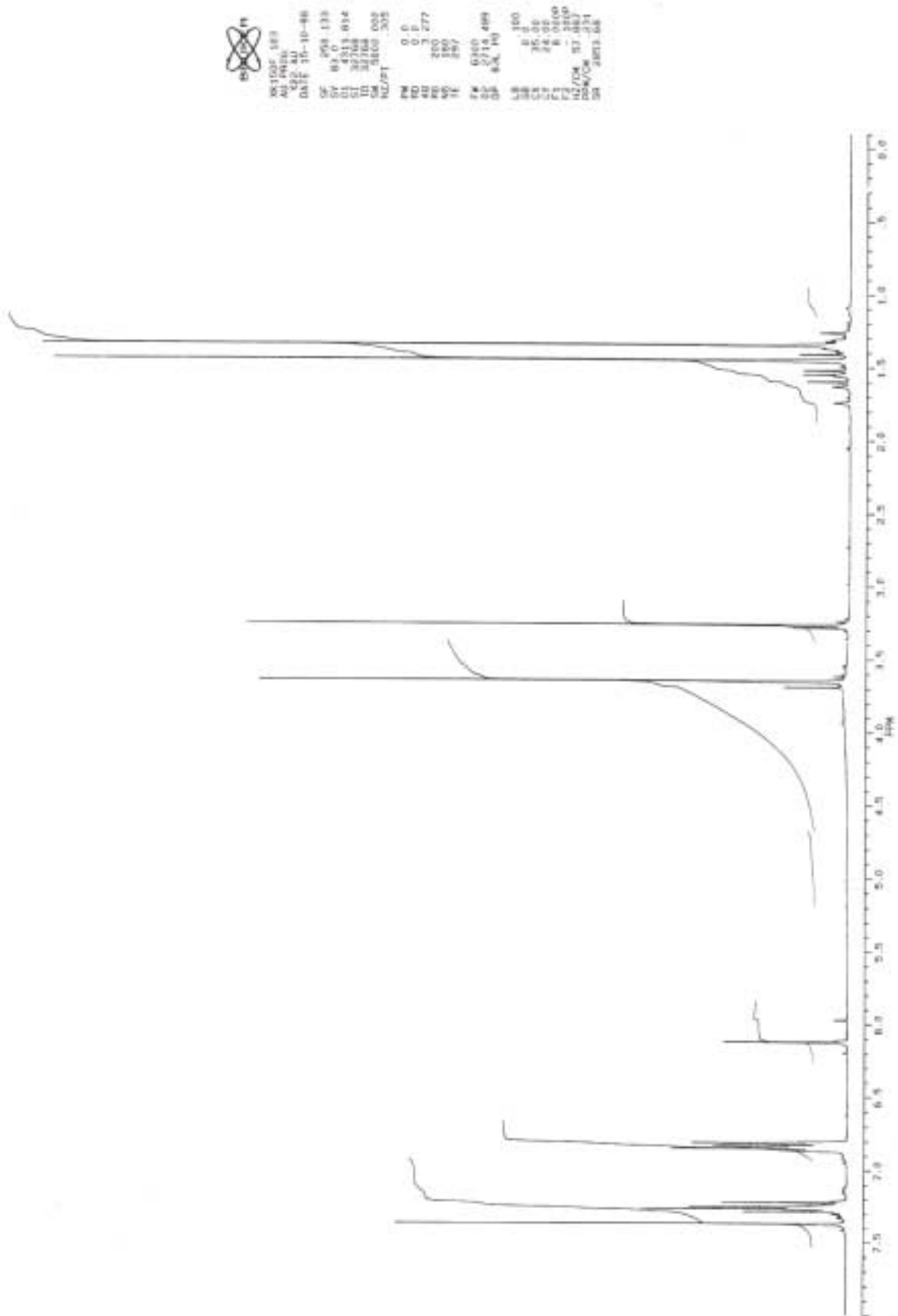


Spektrum von *N*⁴-1,2,4-Triazol-3'-*O*-(2-cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin **23a/b**



Spektrum von 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-2'-desoxy-5-iod-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)uridin **39**



Spektrum von 3-(*N*-Methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-*N*-oxyl **50**

Teil C Abkürzungsverzeichnis

α	Bruchteil der Oligonukleotide im geordneten Zustand
A	Adenosin, Adenin
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	5'-Adenosintriphosphat
B	1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose
Bn	Benzyl
Br	breit
BSE	Bovine spongiform encephalopathy
Bz	Benzoyl
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytidin, Cytosin, Celsius
c	Konzentration
C _F	N ⁴ -1,2,4-Triazol-3'-O-(2-cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin
ca.	circa
CAN	Cerammoniumnitrat
CD	Circular Dichroismus
cm	Zentimeter
COSY	korrelierte Spektroskopie
CPG	Controlled-Pore-Glas (engl.)
δ	Chemische Verschiebung
d	Dublett, Dichte, Schichtdicke
dA	Desoxyadenosin

DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	Desoxycytidin
dd	Dublett von Dublett
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dG	Desoxyguanosin
ΔG^0	Freie Standardreaktionsenthalpie
ΔH^0	Standardreaktionsenthalpie
d.h.	das heißt
DIBALH	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> – Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- d_6	Dimethylsulfoxid sechsfach deuteriert
DMTr	4,4'- Dimethoxytriphenylmethyl (Dimethoxytrityl)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ΔS^0	Reaktionsentropie
dU	
E	Extinktion, envelope
E_L	Extinktion für linkscircular polarisiertes Licht
E_R	Extinktion für rechtscircular polarisiertes Licht
ϵ	Extinktionskoeffizient
ϵ_L	Extinktionskoeffizient für linkscircular polarisiertes Licht
ϵ_R	Extinktionskoeffizient für rechtscircular polarisiertes Licht
El.	Elementar
engl.	englisch
eq.	Äquivalente
EPR	Elektronenspinresonanz Spektroskopie (engl. Electron paramagnetic resonance spectroscopy)
ESI(+)	Elektrosprayionisation im positiven Modus
ESI(-)	Elektrosprayionisation im negativen Modus
ESR	Elektronenspinresonanz Spektroskopie
et al.	et alii (und andere)

Fa.	Firma
FC	Flash-Chromatographie
FIAU	2'-Fluor-5-iod-1- β -D-arabinofuranosyluracil
fl.	flüssig
Fpmp	1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-1-yl
FT	Fourier Transformation
G	Guanosin, Guanin
g	Gramm, gasförmig
ges.	gesättigt(e)
h	Stunde(n)
HIV	Human immunodeficiency virus
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High performance liquid chromatography)
I _R	Intensität des rechts polarisierten Lichts
I _L	Intensität des links polarisierten Lichts
ibu	isobutyryl
iPr	isopropyl
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie
K	Gleichgewichtskonstante, Kelvin
K _{Diss}	Dissoziationskonstante
Kap.	Kapitel
katal.	katalytisch
kcal	Kilokalorien
konz.	konzentriert
krist.	kristallin

λ	Wellenlänge
LDA	Lithiumdiisopropylamin
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Masse, multiplett
MALDI	engl.: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
max.	maximal
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mGrad	Milligrad
MHz	Megahertz
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	millimol
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N	normal
n	Molekularität des Überganges
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OD ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
p.a.	pro analysi

PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl.: Polymerase chain reaktion)
pDC	präparative Dünnschichtchromatographie
ppm	parts per million
Θ	Elliptizität
q	Quartett
R	universelle Gaskonstante
R _f	Retentionsfaktor
r	ribo, Radius
r ²	Gütefaktor einer linearen Regression
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (engl.: Reversed Phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett, Sekunde(n)
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
sym.	symmetrisch
T	Thymin, Temperatur, Twist
t	Triplett
Ψ _t	Pseudo-Triplett
tac	<i>tert.</i> -butylphenoxyacetyl
TASF	Tris-(dimethylamino)-schwefel-(trimethylsilyl)-difluorid
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert.</i> - Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
techn.	technisch
tert.	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur (engl. melting temperature)

TOF	Flugzeit (engl. time of flight)
TOM	Triisopropylsiloxymethyl
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Uridin, Uracil
U _F	3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-2'-fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin
UV	Ultraviolett
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbar (engl.: visible)
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel
UV	Ultraviolett

Teil D

Publikationen und Poster**Publikationen**

- Strube, Thorsten; Engels, Joachim W.; Synthesis and Thermodynamic Properties of Different 2'-Fluoro Modified UUCG Hairpin Loops, *Collection Symposium Series*, **1999**, 2, 298-301
- Wörner, Karlheinz; Strube, Thorsten; Engels, Joachim W.; Synthesis and stability of GNRA-loop analogs, *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 2094-2104
- Wörner, Karlheinz; Strube, Thorsten; Engels, Joachim W.; Synthesis and stability of GNRA-loop analogs, in *Perspectives in Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry by Kisakiirek, Rosemeyer (Eds.)*, **2000**, Wiley-VCH, 323-333
- Strube, Thorsten; Schiemann, Olav; Macmillan, Fraser; Prisner, Thomas; Engels, Joachim W.; A new facile method for spin-labeling of oligonucleotides, *Nucl. Nucl.*, **2001**, 20, 1271-1274

Poster

- Thorsten Strube and Joachim W. Engels; Synthesis and thermodynamic properties of different 2'-fluoro modified UUCG hairpin loops, XI. Symposium on Chemistry of Nucleic Acids Components, Spindlerruv Mlyn, Tschechien, **1999**
- Thorsten Strube, Jörg Parsch and Joachim W. Engels; Fluoro-modified Ribonucleoside Analogues: Influence on the Stability of the UUCG-hairpin Loop, RNA-Tagung, Banz (DFG-Schwerpunktprogramm RNA Biochemie), **1999**
- Strube, Thorsten; Schiemann, Olav; Macmillan, Fraser; Prisner, Thomas; Engels, Joachim W.; A new facile method for spin-labeling of oligonucleotides, XIV. International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications, San Francisco, Californien, **2000**

Curriculum vitae

Thorsten Strube

* 14.12.1972 in Frankfurt am Main

Schule

1979 – 1983 Grundschule Glashütten
1983 – 1992 Taunusschule Königstein mit gymnasialer Oberstufe
27.05.1992 Abitur

Studium

Oktober 1992 Beginn des Chemiestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main
22.11.1994 Vordiplom
27.06.1997 Diplom
Thema der Diplomarbeit: „Darstellung von 2'-Flour modifizierten RNA-
Bausteinen und Einbau in Hairpins“ unter der Leitung von Prof. Dr. J. W.
Engels
seit Oktober 1997 Anfertigung der Dissertation am Institut für organische Chemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. W. Engels

Sonstige Ausbildungen

Heilpraktiker, Trainer-A Lizenz Ju-Jutsu