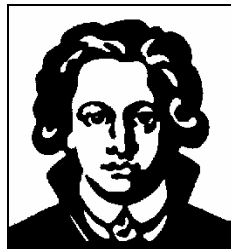


# Synthese und Analyse von Pyren gelabelten Oligonukleotiden



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Taewoo Kwon**  
aus  
Kyungnam

Frankfurt am Main  
April 2007  
(D F 1)

**Für meine Eltern, Sunjin Hyun und Familie**

# Danksagung

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 Dezember 2001 bis Dezember 2005 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. W. Engels danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, die sehr guten experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit, die hilfreichen Anregungen sowie Diskussionsbereitschaft.

Dalibor Odadžić, Jens Haas, Sigeng Han, Jelena Bozilovic, Ismail Hassani, Gerda Wittel, Radouane Rikini, Alma Sokovic, Dr. Romas Smicius, Dr. Yangzhou Li, Christian Grünewald, Diana Knapp, Nedeljka Tatarovic, Olga Frolow, Nadja Nikolaus, Angelika Keller, Katharina Strube, Beate Conrady, Rainer Schmidt, Ewa Rheinberger, Dr. Nelly Piton, Dr. Kerstin Jahn-Hofmann, Dr. Stefan Amberg, Dr. Astrid Klöpffer, Dr. Aleksandra Zivkovic, danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonders danken möchte ich:

- Rainer Schmidt für seine stete Hilfsbereitschaft.
- Dalibor Odadžić für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Jens Haas für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

- Stefan Bernhardt für die Zusammenarbeit bei der Synthese und Aufreinigung der RNA-Oligonukleotide.
- Jelena Bozilovic und Dr. Nelly Piton für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.
- Gerda Wittel für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die Bestellung von Literatur.
- Dr. Kerstin Jahn-Hofmann für die Zusammenarbeit bei der Synthese und Aufreinigung der DNA-Oligonukleotide.
- Dr. Zimmermann, seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Messung zahlreicher NMR-Spektren.
- Hannelore Brill und Ilona Priess für die Messung der Massenspektren.

Ohne die Liebe und Hilfe von meiner Ehefrau Sunjin Hyun wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Aufbau und Struktur von Nukleinsäuren</b>	3
2.1 Aufbau von Nukleinsäuren	3
<b>2.2 Stabilität von Doppelhelix</b>	6
2.2.1 Wasserstoffbrücken	6
2.2.2 $\pi$ - $\pi$ -Basenstapelungswechselwirkung	8
<b>2.3 DNA Strukturen</b>	9
2.3.1 Struktur von B-Form der DNA (B- DNA)	9
2.3.2 Struktur von A-Form der DNA (A-DNA)	10
2.3.3 Struktur von Z-Form der DNA (Z-DNA)	12
<b>2.4 Strukturen von RNA</b>	13
2.4.1 Sekundärstruktur von RNA	14
2.4.2 Tertiärstruktur von RNA	16
<b>2.5 Die Expression der genetischen Information</b>	17
<b>3. Synthese von Oligonukleotiden</b>	20
<b>3.1 Synthesemethoden von Oligonukleotiden</b>	20
3.1.1 Die Phosphoramidit-Methode nach Caruthers	20
3.1.2 Der Synthesesyklus der Phosphoramiditsynthese nach Caruthers	22
<b>4. Aufgabenstellung</b>	24
4.1 erste Aufgabe	24
4.2 zweite Aufgabe	25
4.3 dritte Aufgabe	26
<b>5 Pyren-gelabelte RNA</b>	28
<b>5.1 Einführung von Fluorophoren bei Nukleinsäuren</b>	28
5.1.1 Pyren als Fluorophor	28

5.1.2	Einführung von Pyren-Derivaten am Zucker-----	30
5.1.2.1	Modifikationen von Pyren-Derivaten an der----- 5'-Position vom Zucker	30
5.1.2.2	Modifikationen von Pyren-Derivaten an der----- 2'-Position vom Zucker	31
5.1.3	Modifikationen von Acetylen-Pyren an der Nukleobase----- von Pyrimdinen	35
<b>5.2</b>	<b>Chemische Synthese</b> -----	<b>39</b>
5.2.1	Synthese der halogenierten Verbindungen----- 1-Brom-pyren <u>45</u> und Iodpyren <u>48</u>	39
5.2.2	Synthese von 2-Methyl-4-pyren-1-yl-but-3-yn-2-ol <u>49</u> -----	40
5.2.3	Synthese von 1-Ethynylpyren <u>50</u> -----	41
5.2.3.1	Mechanismus von 1-Ethynylpyren <u>50</u> -----	42
5.2.4	Synthese von 2', 3', 5'-Tri-O-Acetyl-5-Iod-Cytidin <u>63</u> -----	43
5.2.5	Entschützung von Acetylgruppen an der 5', 3'----- und 2'-Position	44
5.2.6	Einführung von Amino-Schutzgruppen-----	45
5.2.7	Einführung der Dimethoxytriphenylmethyl-Gruppe----- an der 5'-Position	45
5.2.8	Synthese von 2-Cyanoethyl chlormethyl ether(CEM-Cl)-----	46
5.2.9	Einführung der 2-Cyanoethoxymethyl(CEM)-Schutzgruppe----- an der 2'-Position	47
5.2.10	Synthese von Alkynyl-Nukleosiden-----	49
5.2.11	Einführung der 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit----- -Gruppe an der 3'-Position	51
5.2.12	Syntheseübersichten-----	53
<b>5.3</b>	<b>Synthese von RNA-Oligonukleotiden</b> -----	<b>58</b>
5.3.1	Synthese von RNA-Oligonukleotiden ohne oder----- mit einfachem Einbau modifizierter Nukleotide	58
5.3.2	Aufreinigung von Oligonukleotiden-----	59
5.3.3	Charakterisierung von Oligonukleotiden-----	62
5.3.3.1	Massenspektroskopie an mono- und unmodifizierten----- RNA 12meren	62
5.3.3.2	Thermodynamische Untersuchungen (T <sub>m</sub> -Wert)-----	66

	an mono- und unmodifizierten RNA 12mer Duplexen	
5.3.3.3	CD-Spektroskopie an RNA 12 meren-----	69
5.3.3.4	Fluoreszenz-Spektroskopie an RNA 12 meren-----	71
<b>6.</b>	<b>Synthese der <i>o</i>-Nitrobenzyl-Schutzgruppe-----</b>	<b>75</b>
	<b>(nbm und (R)-npeom) an der 2'-Desoxynukleinsäure</b>	
	<b>und Abspaltung durch Photoreaktion</b>	
<b>6.1</b>	<b>Einführung von <i>o</i>-Nitrobenzyl-Schutzgruppen (nbm)-----</b>	<b>75</b>
	<b>an der 2'-Desoxynukleinsäure (DNA)</b>	
6.1.1	Schutzgruppe an der 2'-Position-----	75
6.1.2	Einführung der <i>o</i> -Nitrobenzyl-Schutzgruppe-----	77
<b>6.2</b>	<b>Chemische Synthese-----</b>	<b>81</b>
6.2.1	Reduktion von 2-Nitroacetophenon-----	81
6.2.2	Synthesen von <i>O,S</i> -Acetal-Verbindungen <u>1</u> und <u>7</u> -----	81
6.2.3	Halogenierung von <i>O,S</i> -Acetal-Verbindungen-----	83
6.2.4	Einführung der Dimethoxytriphenylmethyl-Gruppe-----	84
	an der 5'-Position	
6.2.5	Einführung von [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl (nbm) <u>4-1</u> -----	84
	und das Derivat <u>9-1</u> als Schutzgruppe an der 2'-Position	
6.2.6	Einführung der 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit-----	86
	Gruppe an der 3'-Position	
6.2.7	Syntheseübersichten-----	88
<b>6.3</b>	<b>Synthese des Oligodesoxynukleotides <u>S8</u>-----</b>	<b>91</b>
6.3.1	Synthese des Oligodesoxynukleotids <u>S8</u> mit Einbau-----	91
	midifiziertem Nukleotid	
6.3.2	Aufreinigung des Oligodesoxynukleotides-----	92
6.3.3	Charakterisierung von Oligodesoxynukleotiden-----	92
6.3.3.1	Massenspektrometrie-----	92
6.3.4	Photoabspaltung der [1-( <i>o</i> -Nitrobenzyl)oxy]methyl-----	93
	Schutzgruppe (nbm) in der Oligodesoxynukleotid <u>S8</u>	
6.3.4.1	Verwendung des Stickstofflaser zur Photoabspaltung-----	93
<b>7.</b>	<b>Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotide-----</b>	<b>96</b>
<b>7.1</b>	<b>Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotide-----</b>	<b>96</b>

7.1.1 Einführung des Aldehydes zur Konjugation-----	96
7.1.2 Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotide-----	97
<b>7.2 Chemische Synthese-----</b>	<b>99</b>
7.2.1 Synthese von Acetalverbindung <u>37</u> -----	99
7.2.2 Acetalisierung von Aldehyd-Verbindungen-----	99
7.2.3 Synthese der Epoxid-Verbindung <u>39</u> -----	100
7.2.4 Reduktion der Carbonylverbindung <u>43</u> -----	102
7.2.5 Synthese der Glykol-Verbindung aus Epoxid-Verbindung <u>39</u> -----	103
7.2.6 Synthese von cyclischen Acetal-Verbindungen <u>41</u> und <u>45</u> -----	104
7.2.7 Einführung der 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit-----	105
Gruppe an cyclischen Acetal-Verbindungen <u>42</u> und <u>46</u>	
7.2.8 Syntheseübersichten-----	107
<b>7.3 Synthese des Acetal-modifizierten Oligodesoxynukleotides-----</b>	<b>110</b>
7.3.1 Synthese der Oligodesoxynukleotide <u>S9</u> und <u>S10</u> -----	110
mit Einbau modifizierter Nukleotide	
7.3.2 Aufreinigung des Oligodesoxynukleotides-----	111
7.3.3 Charakterisierung von Oligodesoxynukleotiden-----	111
7.3.3.1 Massenspektrometrie-----	111
 <b>8. Zusammenfassung-----</b>	 <b>114</b>
8.1 Synthese und Analyse von Pyren-Analoga-----	114
gelabelter Oligonukleotide	
8.2 Synthese der o-Nitrobenzyl-Schutzgruppe-----	116
(nbm und (R)-npeom) an der 2'-Desoxynukleinsäure und	
Abspaltung durch Photoreaktion	
8.3 Synthese von Acetal-modifizierte Oligodeoxynukleotide-----	117
zur Aldehyd-Schutzung	
 <b>9. Experimenteller Teil-----</b>	 <b>119</b>
9.1 Allgemeines-----	119
9.1.1 Chromatographie-----	119
9.1.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)-----	119
9.1.1.2 Säulenchromatographie-----	119
(Flash-Chromatographie, FC)	



9.1.2	Spektroskopie-----	120
9.1.2.1	NMR-Spektroskopie-----	120
9.1.2.2	UV/VIS-Spektroskopie-----	120
9.1.2.3	IR-Spektroskopie-----	120
9.1.2.4	Massenspektrometrie-----	120
9.1.2.5	Schmelzpunktbestimmung-----	121
9.1.3	Verwendete Chemikalien-----	121
<b>9.2</b>	<b>Synthetisierte Verbindungen-----</b>	<b>126</b>
9.2.1	Liste der synthetisierten Verbindungen-----	126
9.2.2	Darstellung und Eigenschaften-----	129
	der Einzelverbindungen	
<b>9.3</b>	<b>Oligonukleotidsynthese-----</b>	<b>188</b>
<b>9.3.1</b>	<b>Eingesetzte Pufferlösungen-----</b>	<b>188</b>
9.3.1.1	Eingesetzte Pufferlösungen für die Anionenaustausch- HPLC (RNA-Aufreinigung)-----	188
9.3.1.2	Eingesetzte Pufferlösungen für Reverse-Phase-HPLC-----	188
	(RP- HPLC)(DNA-Aufreinigung)	
9.3.1.3	Eingesetzte Pufferlösungen für die Aufnahme-----	189
	der UV-Schmelzkurven, CD-Spektren und Fluoreszenz-Spektren	
9.3.2	Synthese der Oligonukleotide-----	189
9.3.2.1	Festphasensynthese der RNA-Oligonucleotide-----	190
9.3.2.1.1	Festphasensynthese der TBDMS-----	190
	Schutzgruppe an der 2'-Position geschützter RNA-Oligonucleotide	
9.3.2.1.2	Festphasensynthese der CEM-----	190
	Schutzgruppe an der 2'-Position geschützter RNA-Oligonucleotide	
9.3.2.2	Festphasensynthese der DNA-Oligonucleotide-----	190
9.3.3	Aufreinigung der Oligonukleotide-----	191
9.3.3.1	Aufreinigung von RNA-----	191
	durch Anionenaustausch-HPLC	
9.3.3.2	Aufreinigung von DNA-----	191

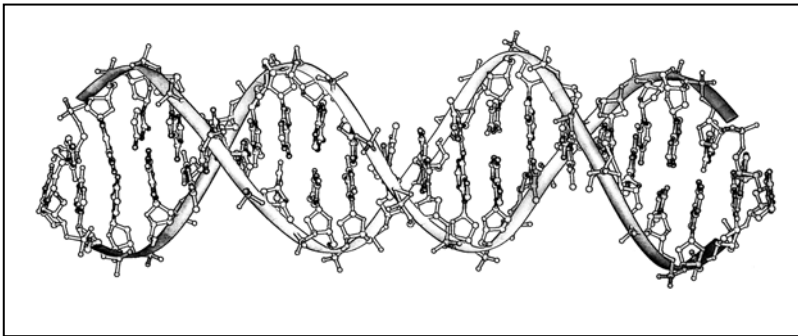
	durch reverse-phase-HPLC	
9.3.4	Quantifizierungen-----	191
9.3.4.1	Bestimmung der $T_m$ -Werte-----	193
9.3.5	CD-Spektroskopie der Oligonukleotide-----	194
9.3.6	Fluoreszenz-Spektroskopie-----	194
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis-----</b>	<b>195</b>
<b>11.</b>	<b>Anhang-----</b>	<b>218</b>
11.1	Abkürzungsverzeichnis-----	218
11.2	Curriculum Vitae-----	223
11.3	Publikationen-----	224
11.4	Poster-----	224

# 1. Einleitung

von Entdeckung der Nucleinsäuren bis zum menschlichen Genom

1869 wurden die Nucleinsäuren von Friedrich Miescher entdeckt. Die Entdeckung ist der Beginn der Geschichte von Desoxynucleinsäure (DNA) zur chemischen und biologischen Erforschung

Oswald T. Avery und Mitarbeiter<sup>1</sup> wiesen 1944 aufgrund genetischer, chemischer und enzymatischer Analysen zum ersten Mal nach, daß die genetische Information in DNA enthalten ist. 1951 wurde es von Erwin Chargaff<sup>2</sup> nachgewiesen, daß das Verhältnis an Adenin (A) und Thymin (T) sowie an Guanin (G) und Cytosin (C) in der DNA konstant ist. Todd<sup>3</sup> publizierte 1952, daß Nucleoside über 5'-3'-Phosphodiesterbrücken verknüpft sind. 1953 wurde die helikale Struktur durch Röntgenstrukturanalysen von Rosalind Franklin<sup>4</sup> und Maurice Wilkins<sup>5,6</sup> an DNA-Fasern entdeckt.



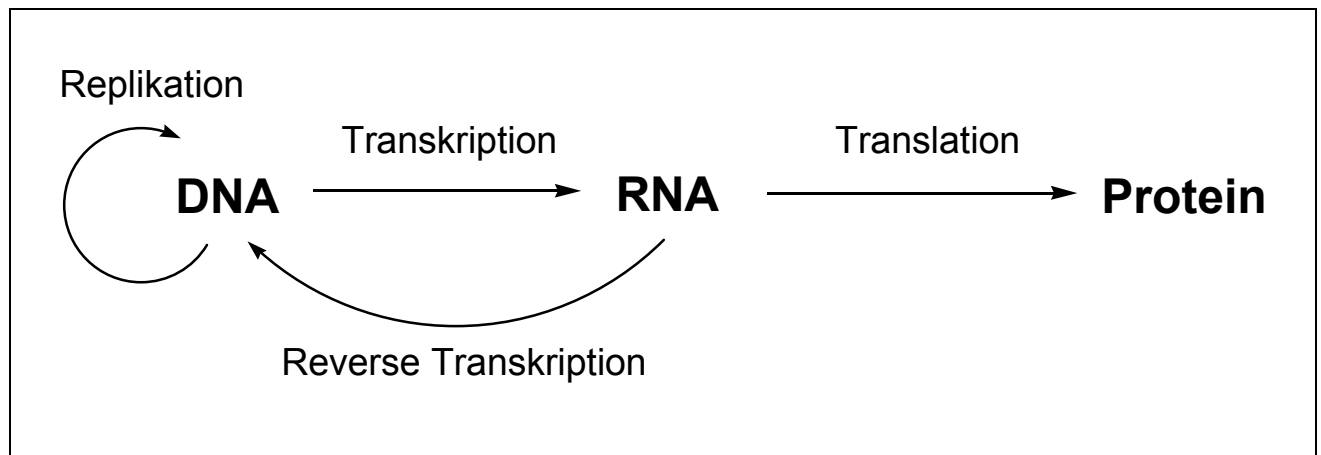
Schließlich wurde 1953 das Modell der DNA-Doppel-Helix von James D. Watson und Francis Crick<sup>7</sup> aufgrund der Chargaff-Regeln, den Ergebnissen von Todd und Röntgenstrukturanalysen von Rosalind Franklin und Maurice

*Abbildung 1.1 : DNA-Doppel-Helix*

Wilkins vorgestellt (Abbildung 1.1). Zudem schlugen sie ein Modell für die Replikation von DNA vor<sup>8</sup> und Matthew Meselson und Franklin W. Stahl<sup>9</sup> bestätigten 1958 die DNA-Replikation experimentell.

1961 haben H. Gobind Khorana, Robert W. Holley und Marshall W. Nirenberg<sup>10-12</sup> die Erforschung über die Entschlüsselung vom genetischen Code begonnen. Sie publizierten, daß die spezifische Übersetzung der mRNA in den natürlichen Aminosäuren eines Proteins durch Codons (Basentriplets), die die Aminosäuren codierten, durchgeführt wird.

1968 haben Francis Crick und Leslie Orgel<sup>13,14</sup> auch vorgeschlagen, daß das erste Informationsmolekül RNA ist. Es ist als das sogenannte zentrale Dogma der Molekularbiologie bekannt. 1972 hat Harry Noller die Rolle von ribosomaler RNA in der Translation von der mRNA zum Protein vorgeschlagen (Abbildung 1.2).



*Abbildung. 1.2 : Zentrales Dogma der Molekularbiologie (Erweitertes Schema des Informationsflusses in biologischen Systemen)*

Anfänger der 70er Jahre wurden die Restriktionsenzyme entdeckt. Damit kann DNA geschnitten und mittels Ligasen wieder neu verknüpft werden<sup>15,16</sup>. Maxam und Gilbert<sup>17</sup> haben die chemische Sequenziermethode entwickelt. Frederick Sanger<sup>18</sup> hat die enzymatische Sequenzierung entwickelt. Durch diese Entwicklung kann die Nukleosidabfolge der DNA-Sequenz bestimmt werden.

1984 konnte die Replikation von DNA und RNA durch die Polymerasekettenreaktion (polymer chain reaction, PCR) durchgeführt werden<sup>19-21</sup>. Die Methode zur chemischen Synthese von DNA bzw. RNA hat sich so schnell wie die enzymatischen Techniken entwickelt. Die Festphasensynthese-Technik wird durch diese Entwicklung erhalten. Damit kann DNA und RNA schnell und leicht synthetisiert werden und hohe Ausbeute erhalten.

Schließlich konnte das ganze menschliche Genom 2000 durch die enzymatischen Sequenzierungsmethode nach Sanger sequenziert werden<sup>22</sup>. Zudem wurden die Genome von Tier<sup>23</sup> und Pflanzenarten<sup>24</sup> z.B. Maus auch entschlüsselt.

## 2 Aufbau und Struktur von Nucleinsäuren

### 2.1 Aufbau von Nucleinsäuren

Zwei Typen von Nucleinsäuren kommen als Makromolekül in der Natur vor. Eine Nucleinsäure ist 2'-Desoxynucleinsäure (DNA) als ein Träger der genetischen Information und ein Zielmolekül von genetischen Methoden. Die Andere ist Ribonucleinsäure (RNA), die sich an der Synthese von Protein und Genexpression beteiligt<sup>26</sup>.

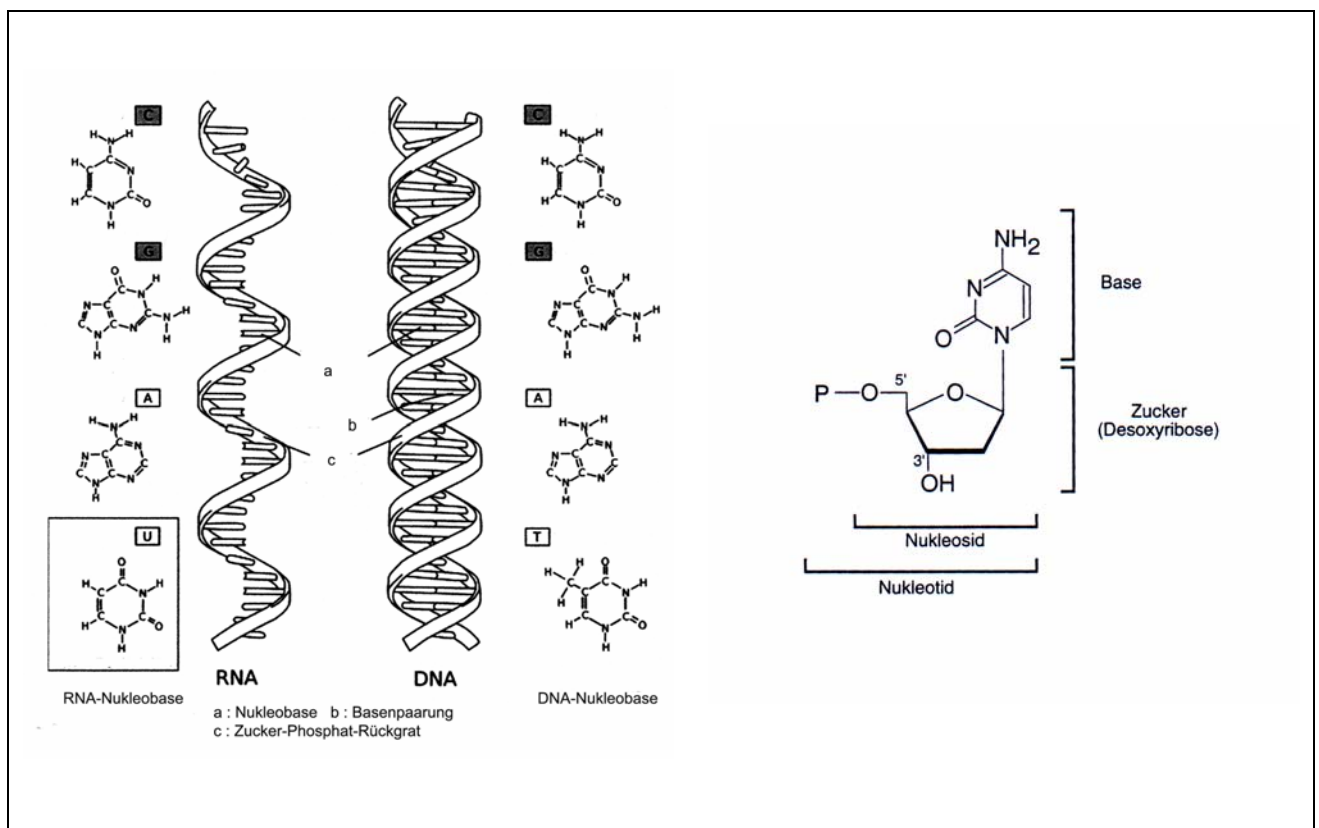


Abbildung 2.1 : Struktur von Nucleinsäuren

Das Makromolekül DNA besteht aus einer Abfolge der miteinander verknüpften 2'-Desoxyribonucleotide. In der RNA besteht das aus einer Abfolge der Ribonucleotiden.

2'-Desoxyribonukleotide und Ribonukleotide heißen die Verbindungen von Phosphat-Resten und Nucleosiden, die die heterozyklischen Basen und Zucker verknüpfen. In der DNA kommen die vier verschiedenen 2'-Desoxyribonukleotide vor. Es sind Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin und Desoxythymidin. In der RNA kommen Adenin, Guanin, Cytidin und Uridin als Ribonukleotide vor. Jeder Zucker wie 2'-Desoxy-D-ribose in der DNA und Ribose in der RNA sind durch 3' und 5'-Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft.

In der DNA kommen vier Arten von Basen vor. Es sind zwei Purinbasen, Adenin(A) und Guanin(G) und zwei Pyrimidinbasen, Cytosin(C) und Thymin(T). In der RNA kommt zwei Purinbasen, Adenin(A) und Guanin(G) und zwei Pyrimidinbasen, Cytosin(C) und Uracil(U) an Stelle des Thymin vor. Zudem sind Nucleobasen  $\beta$ -N-glycosidisch mit dem C1'-Kohlenstoffatom der Zucker verknüpft. Die Nucleobasen besitzen verschiedene tautomere Formen, sowohl eine Keto-Enol- als auch eine Amino-Imino-Tautomerie. Aber kommen die Nucleobasen meistens als Amino- und Keto-Tautomer in der Natur vor.

In der Natur kommt DNA (B-Form) als Doppelhelix vor, die aus zwei Nucleotidsträngen besteht, die sich schraubenförmig (rechtsgängig) um eine Achse windet und gegenläufig (antiparallel) zueinander angeordnet ist. 3',5'-Phosphodiesterbrücken, die die Nucleotide verbinden, und Zucker sitzen außen an der Helix, während die Nucleobasen im Inneren der Helix sind. Zudem steht die Ringebene der Nucleobasen senkrecht auf der Helixachse, während die Zucker wiederum fast senkrecht zu den Nucleobasen angeordnet sind.

Die Stabilität der DNA-Doppelhelix kann durch Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basenpaaren als Watson-Crick Basenpaaren und  $\pi$ - $\pi$ -Basenstapelungswechselwirkung wie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Nucleobasen des gleichen Stranges erklärt werden. Sie werden näher in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

Die beiden glycosidischen Bindungen stehen nicht diametral gegenüber, so daß die Basenpaare zwei Seiten, eine größere und kleinere Seiten haben. Sie heißen die große Furche und kleine Furche (Abbildung 2.2).

Zudem wird die Struktur von DNA durch der Konformation des Zuckers beeinflusst. Der Ribofuranosering ist nicht planar, so daß zwei Arten der Konformation vorkommen können.

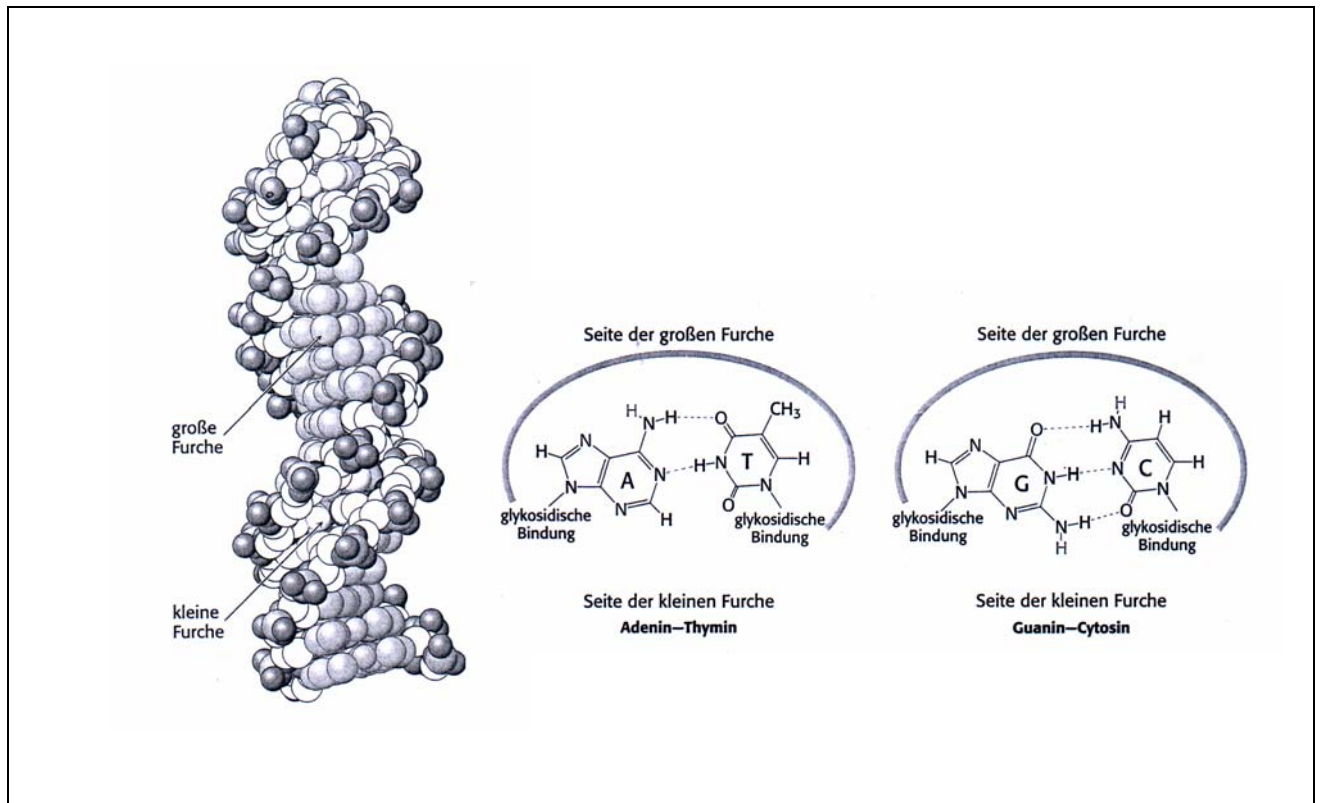


Abbildung 2.2 : Die Seiten der großen und kleinen Furche.

Die zwei Arten sind E-Konformation(envelope) und T-Konformation(twist). Die E-Konformation bedeutet, daß vier Atome des Furanoserings in einer Ebene liegen und das fünfte Atom steht um ca. 0,5 Å nach oben oder unten aus der Ebene heraus. Die T-Konformation wird genannt,wenn drei Atome des Furanoserings in einer Ebene liegen und zwei benachbarte Atome stehen eines nach oben und ein anderes nach unten aus der Ebene heraus. Wenn die Atome in die Richtung auf C5' stehen, heißt diese Form *endo*. Wenn die Atome in die entgegengesetzte Richtung zu C5' stehen, heißt diese Form *exo*. In der DNA(B-Form) kommt C2'-*endo*- Konformation vor und in der RNA C3'-*endo*- Konformation (Abbildung 2.3).

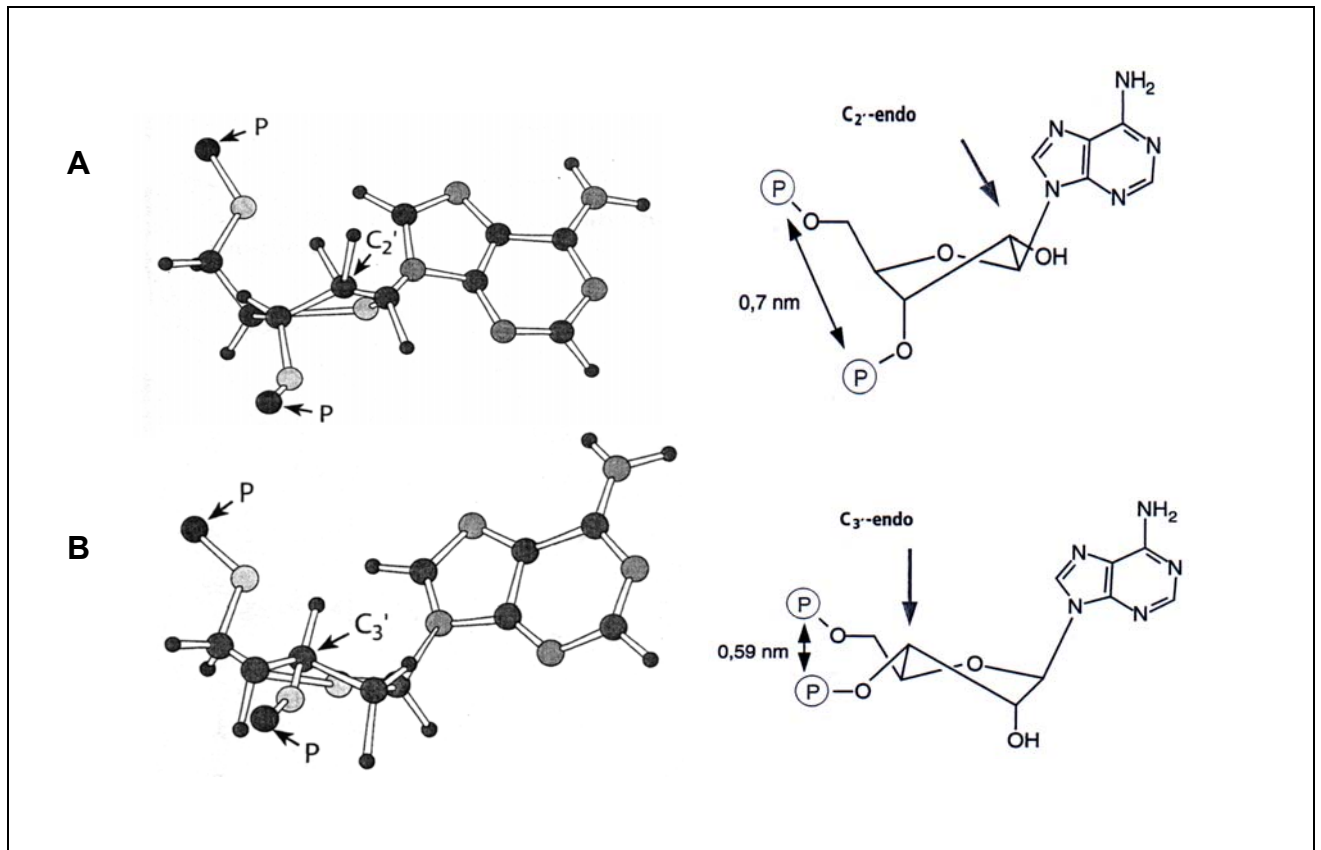


Abbildung 2.3 : Die Konformationen der Zucker, **A** : C2'-endo- Konformation **B** : C3'-endo- Konformation.

## 2-2 Stabilität der Doppelhelix

### 2-2-1 Wasserstoffbrücken

Die Doppelhelix wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basenpaaren als Watson-Crick Basenpaaren groß beeinflusst (Abbildung 2.4). In den Wasserstoffbrücken kommen Wasserstoffdonor und Wasserstoffakzeptor vor. Vom eine partielle negative Ladung besitzenden Wasserstoffakzeptor wird der Wasserstoff des Wasserstoffdonors angezogen. Die Wasserstoffdonoratome sind in der DNA-Doppelhelix ein Stickstoffatom mit kovalent gebundem Wasserstoff, d.h. sie sind NH-Gruppen im Ring der Basen und die exocyclischen NH<sub>2</sub>-Gruppen als H-Donoren. Als Wasserstoffakzeptoratom wirkt ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom, d.h. sie sind Stickstoffatom im Ring der Basen und Keto(CO)-Gruppen als H-Akzeptoren.



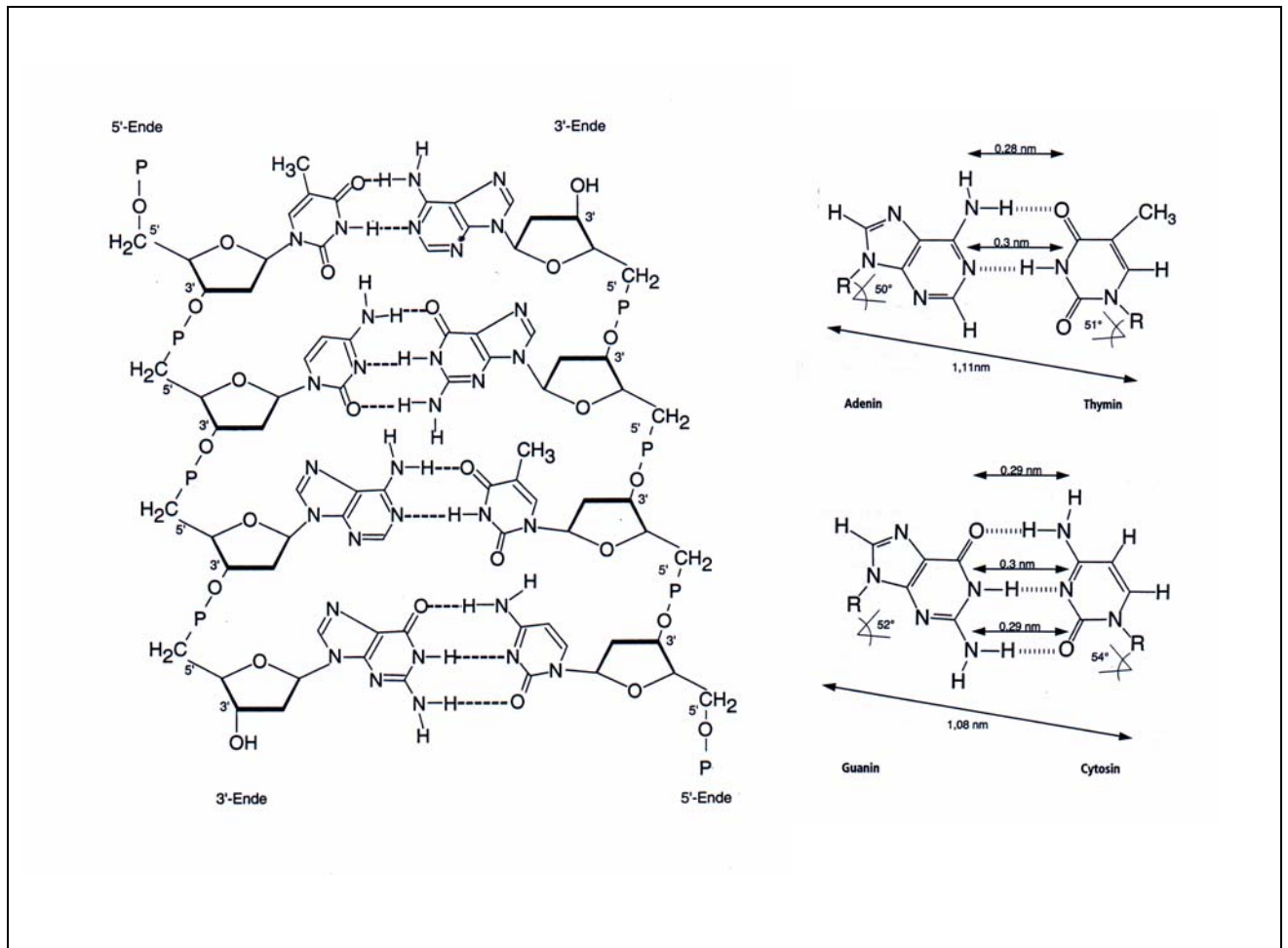


Abbildung 2.4 : Watson-Crick Basenpaare durch der Wasserstoffbrücken

Die Bindungsstärke (ca. 6-10kJ/mol) der Wasserstoffbrücken ist stärker als *van der Waals*-Bindungen und schwächer als kovalente Bindungen und der Abstand zwischen Donor und Akzeptor einer Wasserstoffbrücke liegt zwischen 2,8-3,0 Å. Aber die Vielzahl der Nucleobasen nehmen an der Wasserstoffbrückenbindungen entlang der DNA-Doppelhelix teil, so daß die DNA-Doppelhelix stabil ist, obwohl die Wasserstoffbindungen schwächer als die normalen chemischen Bindungen sind.

Durch die Wasserstoffbrücken halten die Adenin und Thymin(A/T) in der DNA und Adenin und Uracil(A/U) in der RNA bzw. Guanin und Cytosin(G/C) in beiden als komplementäre Nucleobasen zusammen. Die A/T- und A/U- Basenpaare bilden zwei Wasserstoffbrücken. Im Vergleich hierzu bildet das G/C-Basenpaar drei Wasserstoffbrücken und ist kompakter. Deswegen sind die G/C-Basenpaarungen an der Stabilität der Doppelhelix mehr als die A/T- und A/U- Basenpaarungen beteiligt.



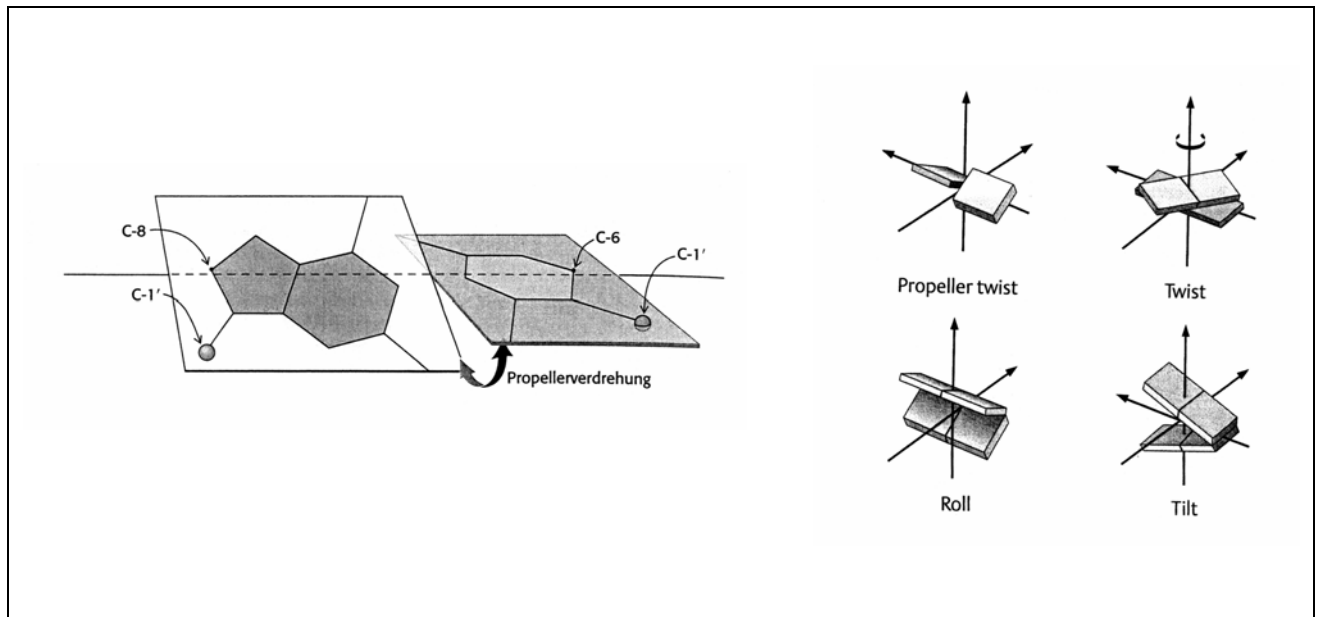
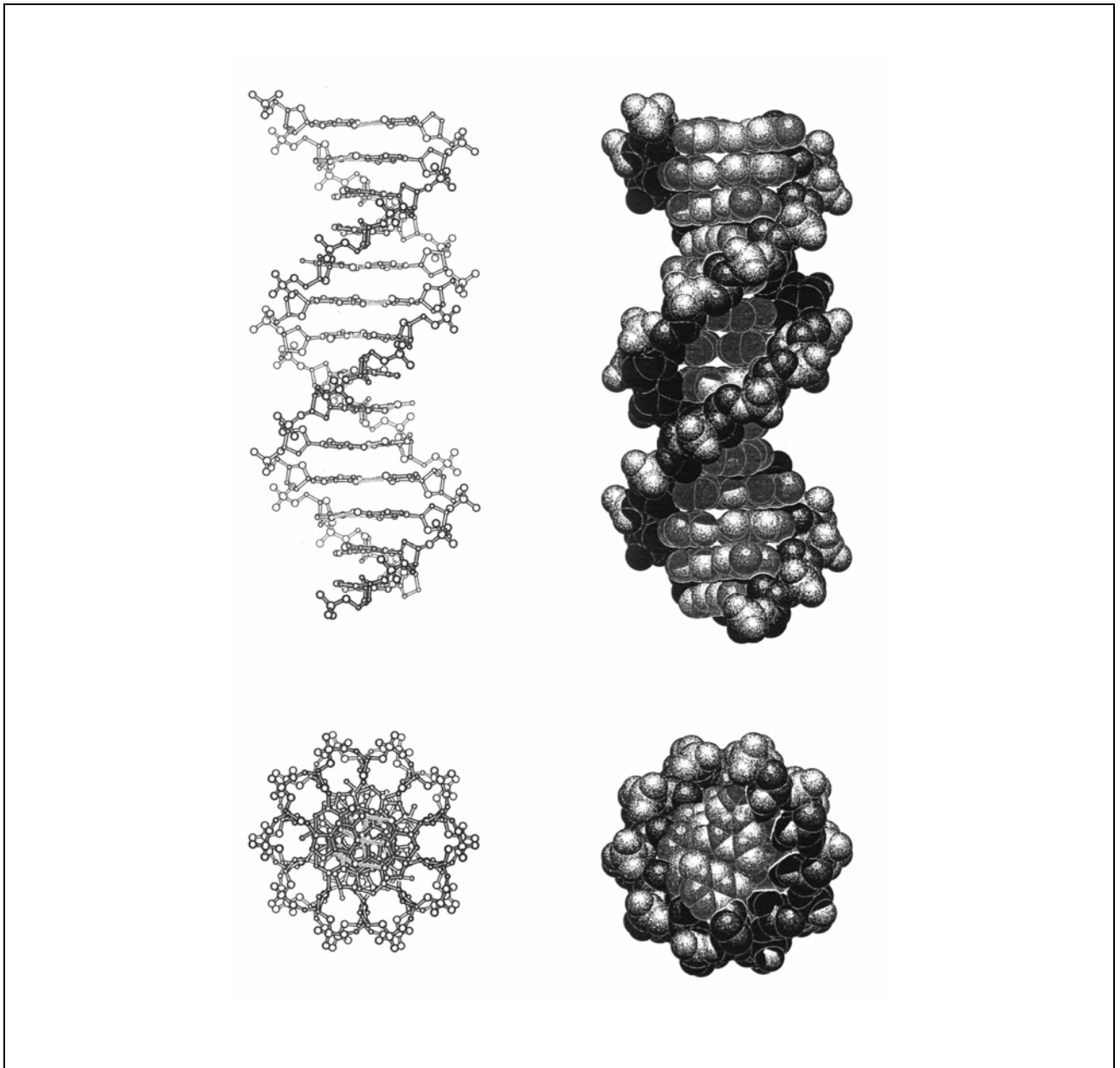


Abbildung 2.6 : Bewegungsmöglichkeiten von Nukleotiden und Nukleotidpaaren relativ zur Helix Achse

## 2-3 DNA Strukturen

### 2-3-1 Struktur von B-Form der DNA(B- DNA )

Die Struktur von B-DNA ist ein typisches Modell der Watson-Crick-DNA Doppelhelix (Abbildung 2.7). Die Doppelhelix ist rechtsgängig aus antiparallelen Strängen und wird durch Wasserstoffbrücken und  $\pi$ - $\pi$ -Basenstapelungswechselwirkungen stabilisiert. Die große Furche ist dabei breit und sehr tief sowie die kleine Furche sehr tief und eng. Zudem hat die Struktur eine Vorzugskonformation bei einer hohen Wasserkonzentration, die eng mit der strukturellen Stabilität zusammenhängt. In der großen und kleinen Furche kommen viele Wassermoleküle vor. Die Zuckerkonformation ist *C2'-endo*. Der Helixdurchmesser der B-DNA beträgt 2,37 nm und die Höhe pro Basenpaar 0,34 nm, die Ganghöhe 3,54 nm und die Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung 10,4. Im Vergleich mit der Helixachse sind die Basenpaare um  $1^\circ$  geneigt.



*Abbildung 2.7 : Struktur von B-DNA*

### **2-3-2 Struktur von A-Form der DNA (A-DNA)**

In der Struktur von A-DNA gibt es meisten RNAs und die RNA-DNA-Doppelhelix (Abbildung 2.8). Durch Dehydratisierung der B-DNA wird A-DNA erhalten, d.h. die Struktur hat eine Vorzugskonformation bei einer niedrigen Wasser-Konzentration.

Die A-DNA ist kürzer als die B- und Z-DNA, hat eine breitere Gestalt als B-DNA und ist rechtsgängig aus antiparallelen Strängen, die durch Watson-Crick-Basenpaarung aufgebaut werden.

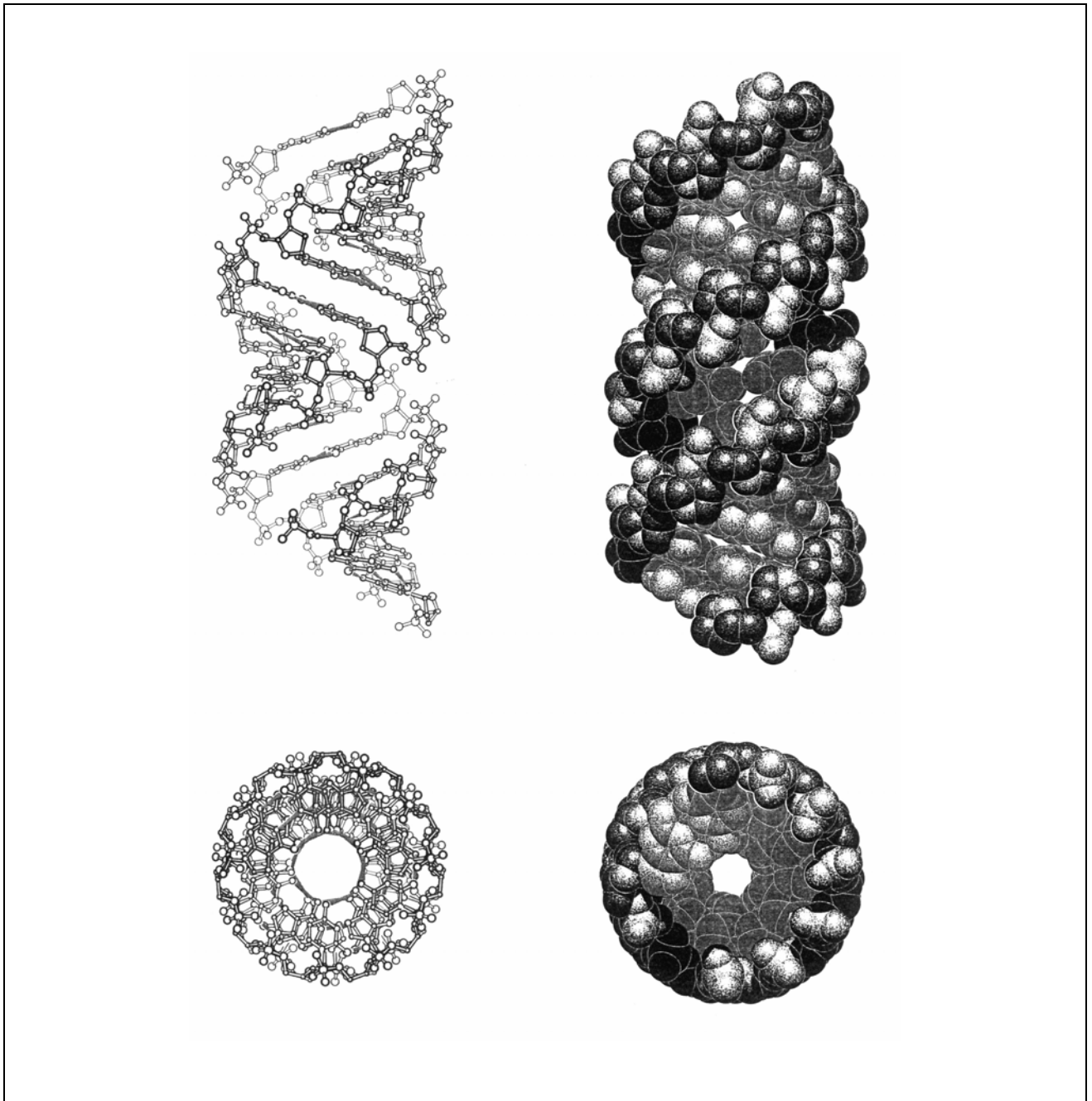


Abbildung 2.8 : Struktur von A-DNA

Die große Furche ist dabei eng und sehr tief sowie die kleine Furche ist sehr breit und flach. Die Zuckerkonformation ist *C3'-endo*. Der Helixdurchmesser der A-DNA beträgt 2,55 nm und die Höhe pro Basenpaar 0,23 nm, die Ganghöhe 2,53 nm und die Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung 11. In Vergleich mit der Helixachse sind die Basenpaare um  $19^\circ$  stark geneigt.

### 2-3-3 Struktur von Z-Form der DNA (Z-DNA)

Im Gegensatz zu der A- und B-DNA ist die Z-DNA linksgängig aufgebaut aus antiparallelen Strängen, die durch Watson-Crick-Basenpaarung zusammengehalten werden. Die auffallende Charakterisierung ist, daß die Phosphatgruppen im Rückgrat zickzack verlaufen (Abbildung 2.9).

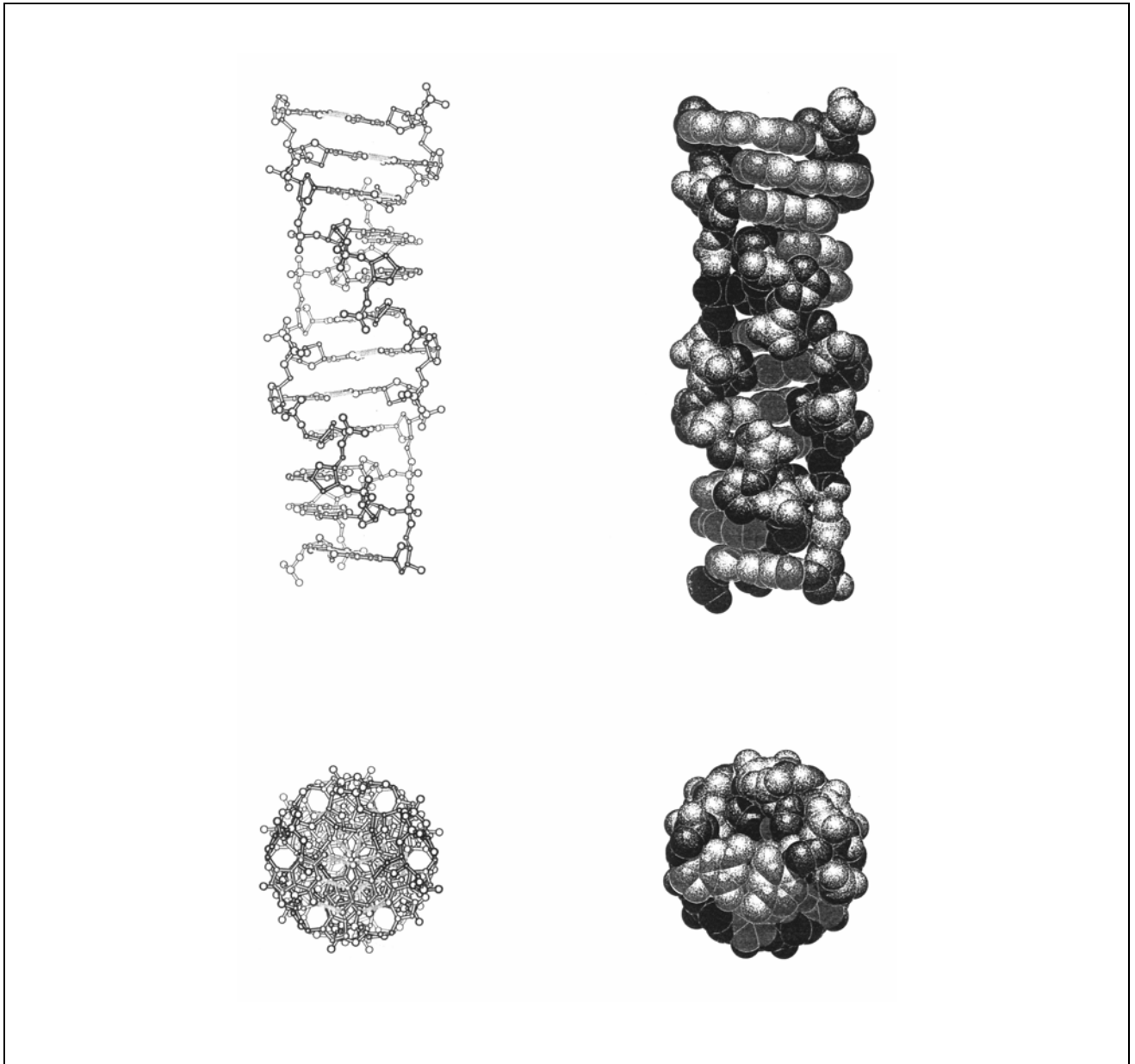


Abbildung 2.9 : Struktur von Z-DNA

Die Z-DNA ist länger als die A- und B-DNA. Die große Furche ist dabei flach und die kleine Furche ist sehr eng und tief. Der Helixdurchmesser der Z-DNA beträgt 1,84 nm und

die Höhe pro Basenpaar 0,38 nm, die Ganghöhe 4.56 nm und die Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung 12. In Vergleich mit der Helixachse sind die Basenpaare um 9° stark geneigt.

In Tabelle 2.1 sind die Charakterisierungen von B-, A- und Z-DNA zusammengefaßt.

	B	A	Z
Gestalt	zwischen A- und Z- Typ	am breitesten	am schmalsten
Höhe pro Basenpaar	0,34 nm	0,23 nm	0,38 nm
Helixdurchmesser	2,37 nm	2,55 nm	1,84 nm
Drehsinn	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Konformation der glykosidischen Bindung	<i>anti</i>	<i>anti</i>	abwechselnd <i>anti</i> und <i>syn</i>
Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung	10,4	11	12
Ganghöhe	3,54 nm	2,53 nm	4,56 nm
Neigung der Basenpaare zur Helixachse	1°	19°	9°
große Furche	breit und ziemlich tief	eng und sehr tief	flach
kleine Furche	eng und ziemlich tief	sehr breit und flach	sehr eng und tief

Tabelle 2.1 : Vergleich von B-, A- und Z-DNA (Stryer 2003)

## 2-4 Strukturen von RNA

Im Gegensatz zu DNA, die vier verschiedene 2'-Desoxyribonukleotide wie Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin und Desoxythimin besitzt, Struktur von B-Form als Doppelhelix hat und durch Wasserstoffbrücken und  $\pi$ - $\pi$ -Basenstapelungs wechselwirkung stabilisiert wird, hat RNA, die in Zellen vorkommt, Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil an Stelle des Thymin und Struktur von A-Form als Einzelstrang. Die Bildung von B-Form ist unmöglich, da eine Hydroxylgruppe an der 2'-

Position vorhanden ist. Sie würde bei der B-Form zu nahe an die Phosphatgruppe und an die nächste Nukleobase herankommen. Zudem ist RNA ein Einzelmolekül. Ohne den Gegenstrang kann die Helix durch Bindung der zwei komplementären Bereiche im Einzelstrang ausgebildet werden. RNA kann in drei Haupttypen eingeteilt werden, die messenger RNA (mRNA), die transfer RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA). Außerdem gibt es die kleinen regulatorischen RNAs (siRNA und miRNA). RNA macht ca. 5-10% der Gesamtzellmasse aus. mRNA, tRNA und rRNA betragen ca 2-5% aller RNA, 10-15% und 80-85% in der Zelle<sup>27</sup>. Jede Art der RNA stellt eine charakteristische molare Masse und eine typische Basenzusammensetzung in Tabelle 2.2 dar.

RNA Typ	Sedimentationskoeffizient	molare Masse	Anzahl der Nukleotidreste	prozentualer Anteil an der Gesamt-RNA
mRNA	6S-25S	25000-1000000	75-3000	2-5
tRNA	-4S	23000-30000	75-90	10-15
rRNA	5S	-35000	-100	80-85
	16S	-550000	-1500	
	23S	-1100000	-3100	

Tabelle 2.2 : Eigenschaften der RNA-Typen aus *E.coli*<sup>28</sup>

### 2-4-1 Sekundärstruktur von RNA<sup>29,30</sup>

RNA-Doppelhelix kann sich durch die Selbstkomplementarität von Einzelsträngen ausbilden, d.h. sie besitzt eine Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur kann sich durch Wechselwirkung der Sekundärstrukturelemente ausbilden. Die Sekundär- und Tertiärstruktur sind oft für die Funktion entscheidend. Da die Sekundär- und Tertiärstruktur durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, ist diese besser als der ohne Selbstkomplementarität ausgebildete Einzelstrang konserviert. Wenn die Struktur der RNA<sup>31,32</sup> eine Sekundärstruktur ist, kommen darin Haarnadelschleife (*hairpin loops*), Stamm (*stem*), Interne Schleife (*internal loops*), Auswölbung (*bulges*) und Kreuzungen (*junctions*) vor (Abbildung 2.10).



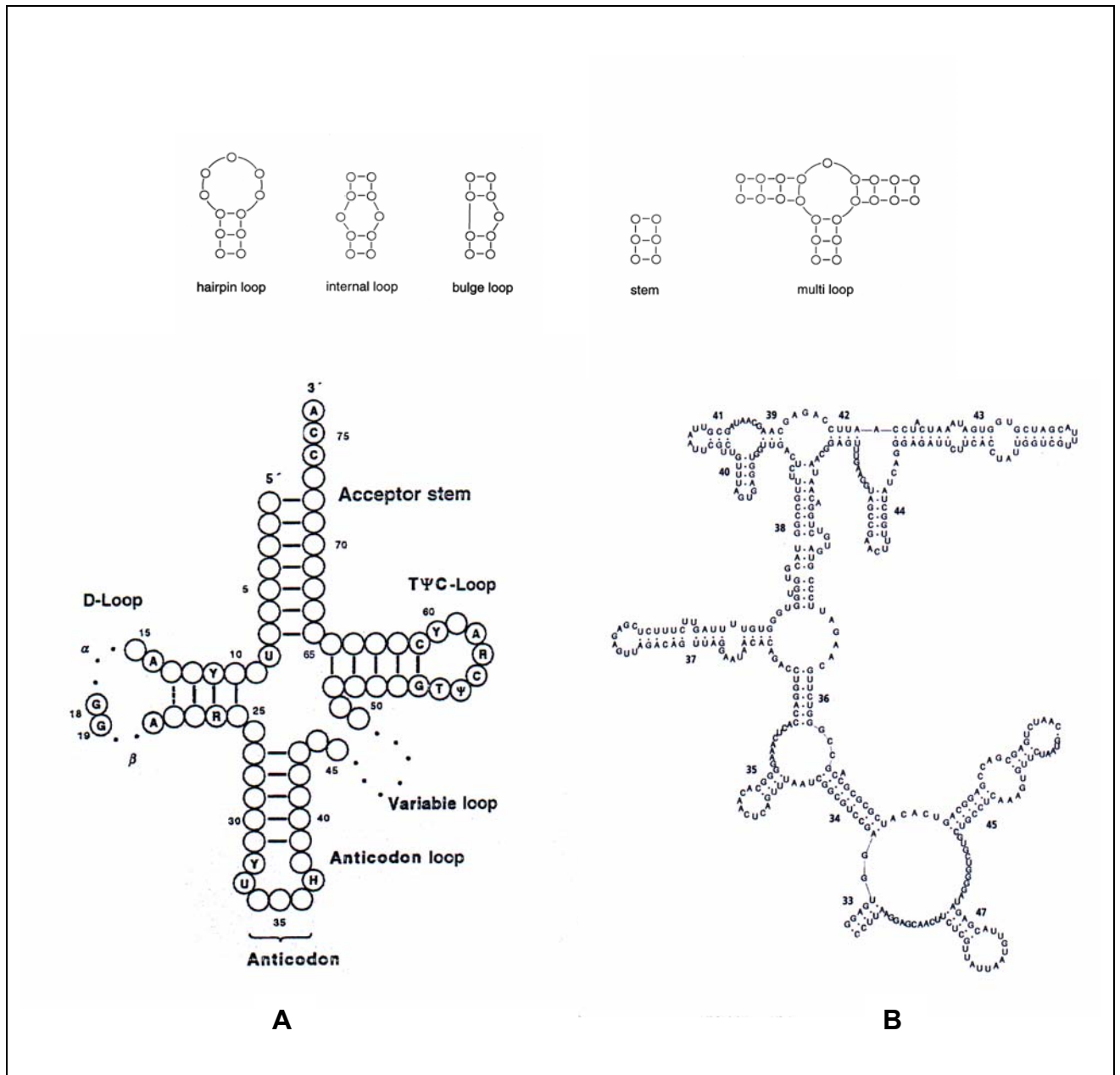


Abbildung 2.10 : Sekundärstruktur von RNA, A : tRNA

Die Haarnadelschleife (*hairpin loops*) als eine kurze Schleife besteht aus vier bis sieben Nukleotiden, die keine Basenpaare ausbilden, am Ende von doppelhelicalen Regionen stehen und in der die Änderung der Richtung der Doppelhelix entsteht. Die Interne Schleife (*internal loops*) kommt auch in ungepaarten Nukleotiden liegenden Bereichen vor. Aber im Vergleich mit der Haarnadelschleife ändert die Schleife keine Richtung und anschließend verbindet sie sich mit dem Stamm (*stem*) zur Doppelhelix. Im Stamm (*stem*) bilden sich die selbstkomplementären Basenpaarungen zur A-Form ohne den Gegenstrang aus. Zudem gibt es andere Schleifen als die Auswölbung (*bulges*) und

Kreuzungen(*junctions*) in der Sekundärstruktur. Die Auswölbung(*bulges*) bildet sich an der einen Seite des Paares wie bei der Doppelhelix aus. Die Kreuzungen(*junctions*) sind mit mehreren Stämmen - wie oben erwähnt – verbunden.

## 2-4-2 Tertiärstruktur von RNA

Wie oben erwähnt, bildet sich die Tertiärstruktur durch Wechselwirkung aus zwei oder mehr Sekundärstrukturelementen aus (Abbildung 2.11).

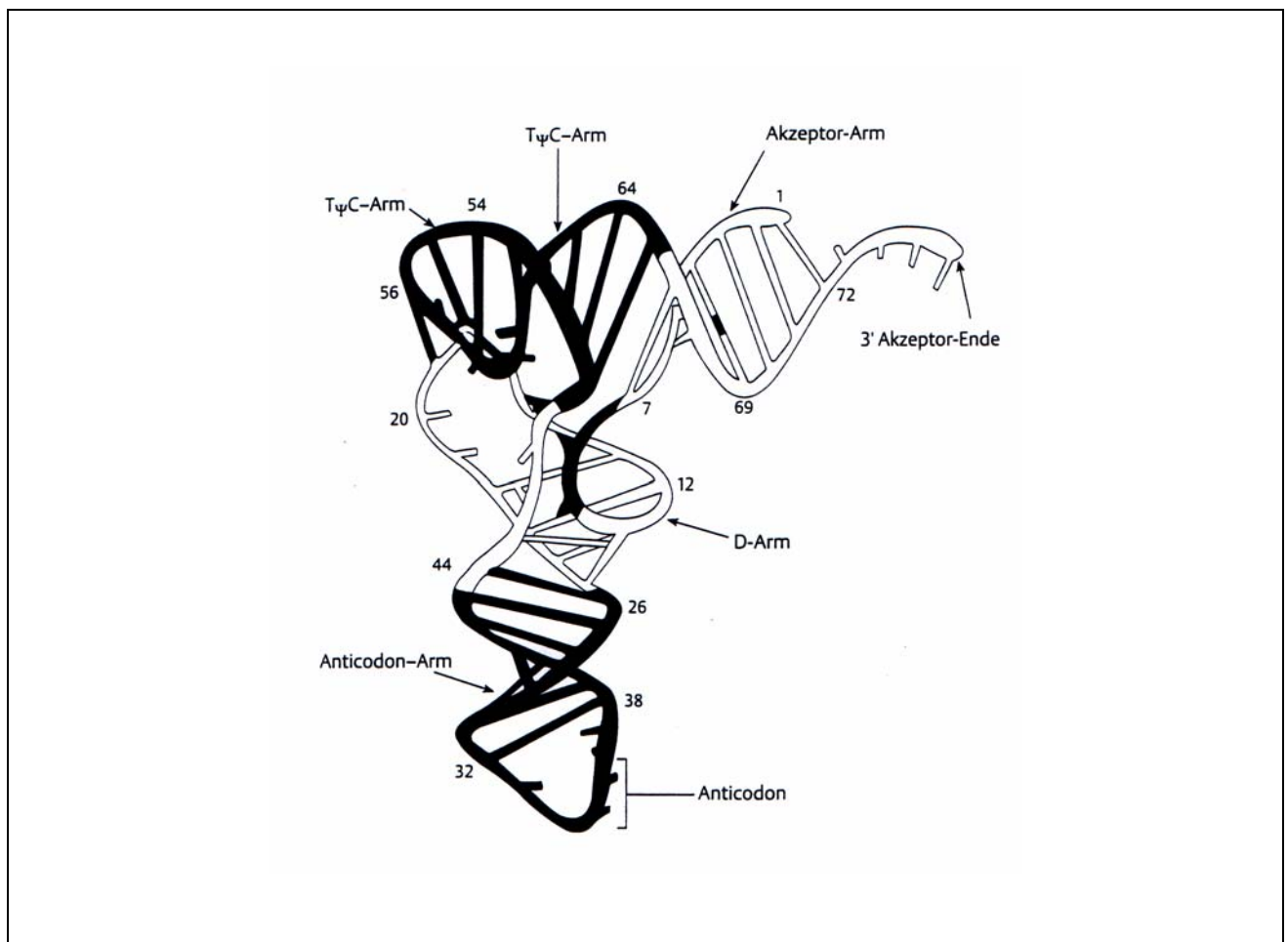


Abbildung 2.11 : Tertiärstruktur von tRNA

Die Struktur wie bei der DNA wird durch die komplementären Bindungen von Wasserstoffbrücken und Basenstapelungswechselwirkungen stabilisiert. Zum Beispiel ist der in ribosomaler RNA, Intron und RNase P vorkommende Pseudoknoten eine der bekanntesten Formen der Tertiärstruktur. Bei dem durch die Wechselwirkung (Basenpaarung) der Ribonukleotide von Haarnadelschleifen mit einem

komplementäre Sequenzen besitzenden und ungepaarten anderen Bereich von Einzelsträngen ein neuer Stamm und eine zweite Haarnadelschleife ausgebildet. Die Struktur als Tertiärstruktur ist sehr stabil.

## **2-5 Die Expression der genetischen Information**

Von Francis Crick wurde das sogenannte zentrale Dogma der Molekularbiologie aufgestellt<sup>13,14</sup>. Diese Aufstellung ist der Fluß der genetischen Information vom Gen zum Protein (Abbildung 2.12).

Die Synthese von Proteinen verläuft in den Schritten der Transkription und Translation. Die Schritte liefern drei Hauptarten von RNA, die messenger-RNA (mRNA), ribosomale RNA und transfer-RNA.

Bei der Transkription werden vier verschiedenen Ribonukleotide ( A, U, G und C ) mit Hilfe der DNA als Matrize und DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-Polymerase) polymerisiert. Die RNA-Polymerase ist das ausführende Enzym der Transkription und benutzt Triphosphat-Ribonukleotide als Ribonukleotidbausteine, wie Adenosintriphosphat (ATP), Guanosintriphosphat (GTP), Cytidintriphosphat (CTP) und Uridintriphosphat (UTP), für Synthese von mRNA und baut diese Monophosphate in die RNA-Kette ein. Die genetische Information wird durch Basenpaarung von Nukleotidssequenzen eines Stranges einer DNA-Doppelhelix im Zellkern in die mRNA übersetzt<sup>33</sup>.

mRNA ist eine Matrize zur Synthese von Protein und trägt die Information aus dem Zellkern in das Cytoplasma und dient als Bauplan zur Synthese von Proteinen am Ribosom. Das Protein wird anschließend mittels tRNA synthetisiert. Das Ribosom ist ein rRNA-Proteinkomplex, ein Ribonukleoprotein. rRNA bildet Strukturelemente von Ribosomen und spielt eine katalytische Rolle in der Translation. tRNA ist ein Adaptormolekül zwischen mRNA und Aminosäuren. Alle tRNAs besitzen ein Aminosäure-Akzeptor-Ende, es sich am 3'-Ende als eine Bindungsstelle für Aminosäuren befindet und ein Antikodon, drei Basen, mit dem die an der 3'-Ende von tRNA verknüpften Aminosäuren im Schritt der Translation sicher eingebaut werden. Der Transport von Aminosäuren kann mit tRNA in aktivierter Form zum Ribosom durchgeführt werden. Die Struktur von tRNA wird in Abbildung 2.10 von Kapitel 2.4.1 und Abbildung 2.11 von Kapitel 2.4.2 dargestellt.

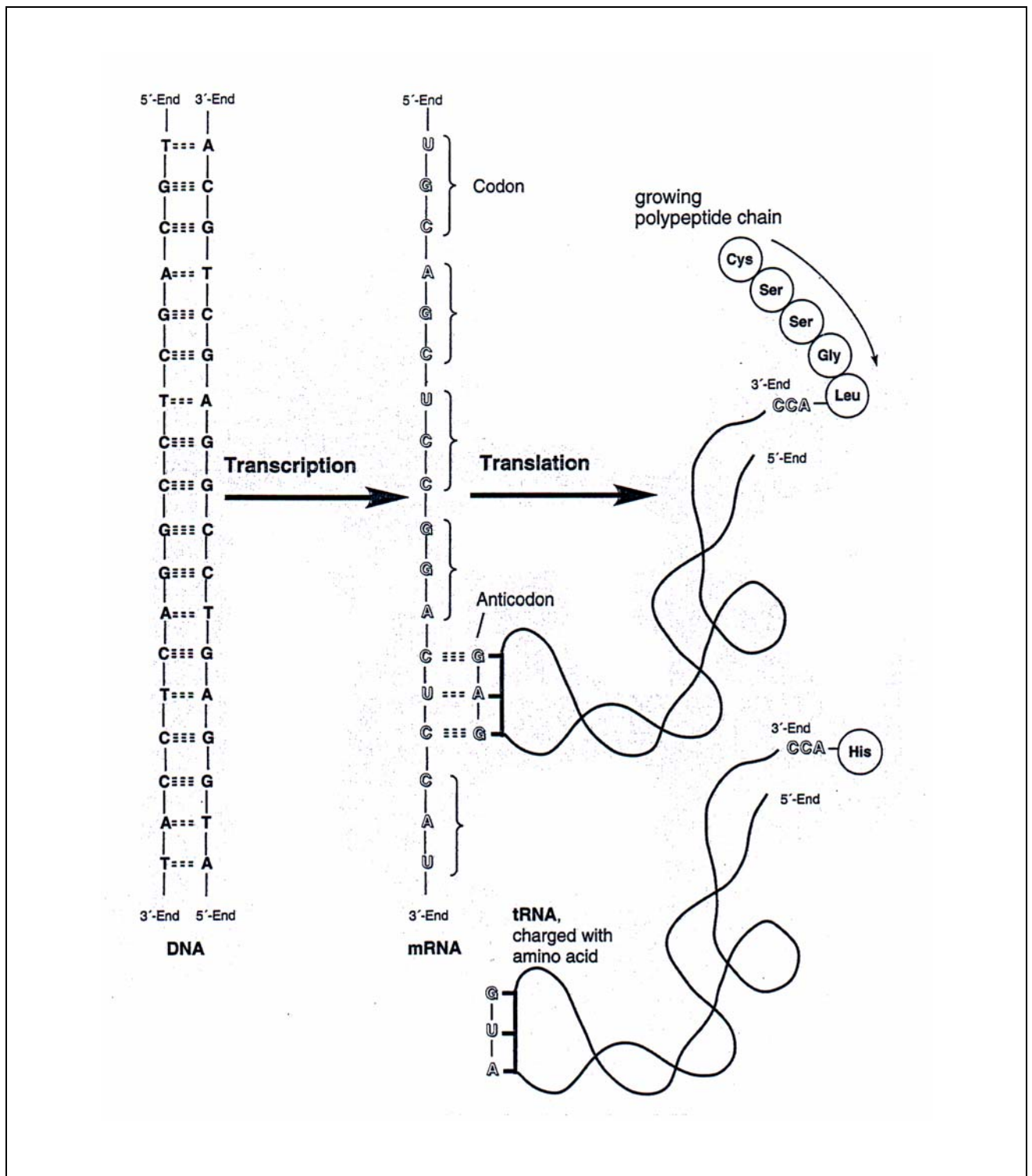


Abbildung 2.12 : Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Im Schritt der Translation wird die in der mRNA kodierte Information in eine Proteinsequenz übersetzt. Die Funktion, die spezifische Übersetzung der mRNA in die in der Natur vorkommenden 20 verschiedenen Aminosäuren von Proteinen, wurde in den frühen 60er Jahren erforscht. Da die Kodons von mRNA Aminosäuren nicht erkennen können, wird das Antikodon als Adapterfunktion für die vorkommenden tRNAs am

Ribosom verwendet. Es ist bekannt, daß Basentriplets (Kodons) mRNA durch eine Verknüpfung zwischen den Kodons und Antikodons in die entsprechende Aminosäure übersetzen können<sup>10,11,34</sup>. Um den Abbruch einer Sequenz zu codieren, codieren Basentriplets die Aminosäuren. Ein wichtiges Kodon ist AUG. Das ist ein Startkodon und codiert zudem für Methionin. Deswegen beginnen alle genetische Informationen mit diesem Kodon AUG, bzw. alle Translationen beginnen mit Methionin als eine Aminosäure. Die Proteinkette wird durch Umlagerung von Aminoacyl-tRNA verlängert, d.h. die Aminoacylgruppen von tRNA verknüpfen weiter auf die nächste gebundene neue Aminoacylgruppe von tRNA. Die Proteinsynthese wird durch die Terminationskodons, UAA, UAG und UGA, beendet.

# 3 Synthese von Oligonukleotiden

## 3.1 Synthesemethoden von Oligonukleotiden

Oligonukleotide bestehen aus Nukleotideinheiten zwischen ca. 10 und 50 bestehenden kürzeren Nukleinsäure-Fäden. Zum chemischen Aufbau der Oligonukleotide wiederholen sich die Kondensation einzelner Nukleotide, bis die gewünschte Länge der Sequenz erreicht ist. Die Verknüpfung der Nukleotideinheiten erfolgt in 3' → 5' Richtung.

Die Synthesemethoden von Oligonukleotiden sind Phosphordiester<sup>35</sup>-, Phosphortriester<sup>36</sup>-, H-Phosphonat<sup>37</sup>- und Phosphoramidit-Methode (Phosphit-Triester-Methode)<sup>38-46</sup>. In den 70er Jahren wurde die Festphasensynthese der Oligonukleotiden von Letsinger entwickelt<sup>47,48</sup>. Dabei konnte Letsinger durch Anwendung der Festphasensynthese ähnlich wie Merrifield<sup>49</sup> für Peptidsynthese die Oligonukleotidsynthese erreichen.

### 3.1.1 Die Phosphoramidit-Methode nach Caruthers

Die Phosphoramidit-Methode nach Caruthers ist heute eine der wichtigsten Methoden, um Oligonukleotide über die automatisierte Festphasensynthese herzustellen (Abbildung 3.1).

Die Festphasensynthese hat im Vergleich mit der Synthese in Lösung viele Vorteile.

Die Vorteile sind:

- kurze Reaktionszeit für die Verknüpfung jeder monomerbausteine
- höhere Ausbeute als andere Methoden
- Herstellung der geringen Nebenprodukt
- keine Nebenreaktion
- Automatisierung von Syntheseprozess
- Möglichkeit der gleichzeitigen Synthese von mehreren Oligonukleotiden an einem Syntheseautomaten

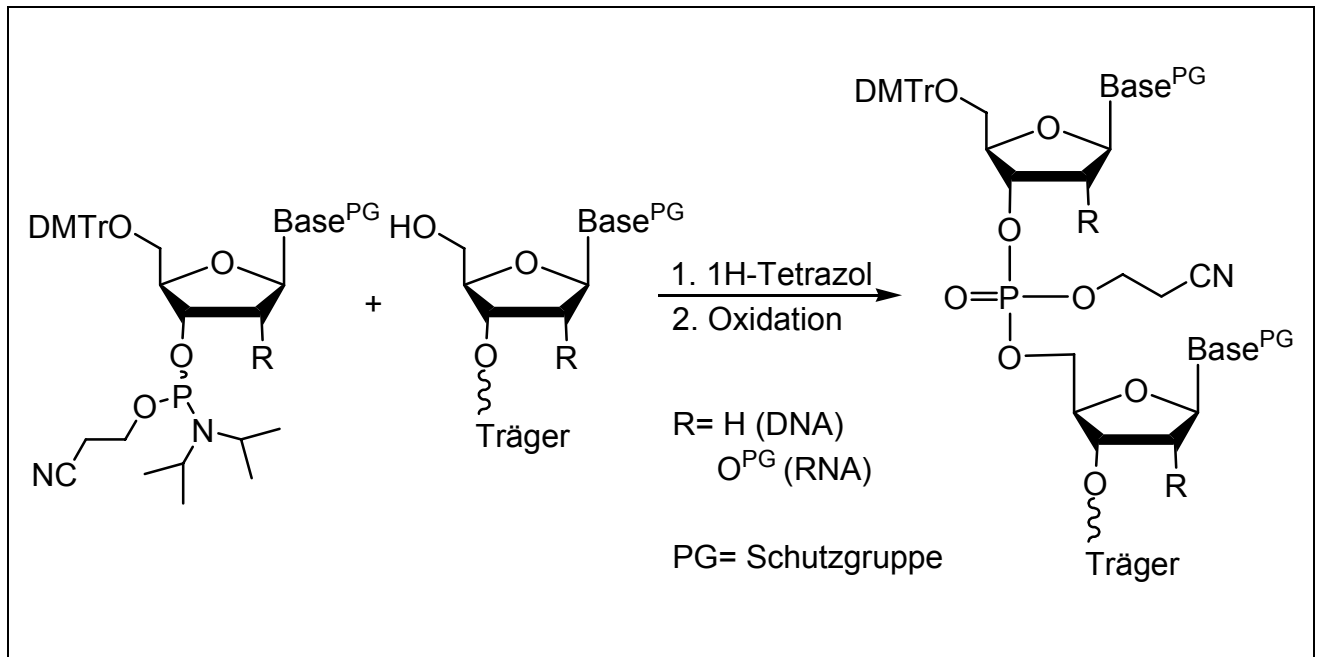


Abbildung 3.1 : Phosphoramidit-Methode zur Synthese von Oligonukleotiden

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen in jedem Syntheseschritt müssen die Nukleotide bei den verwendeten Reaktionsbedingungen an den Nucleobasen und an nicht beteiligten Hydroxylgruppen geschützt sein. Das geschützte Nucleosidphosphoramidit wird dabei in Gegenwart eines Aktivators wie 1H-Tetrazol<sup>50</sup> mit der 5'-Hydroxylfunktion eines an einen Träger gebundenen Nucleosids umgesetzt. Als ein Träger wird das *controlled-pore-glass* (CPG) verwendet, das ein Glaskügelchen definierter Porengröße (500 oder 1000 Å) als eine feste Phase ist. Die polymere Matrix löst sich nicht im verwendeten Lösungsmittel Acetonitril und ist ein inerte Stoff. Nach jedem Kupplungsschritt wird der Phosphatdiester durch Oxidation hergestellt.

### 3.1.2 Der Syntheseyklus der Phosphoramiditsynthese nach Caruthers

Der Syntheseyklus der Phosphoramiditsynthese ist in fünf Teilschritte zu unterteilen. In der folgenden Abbildung 3.2 ist der Syntheseyklus dargestellt :

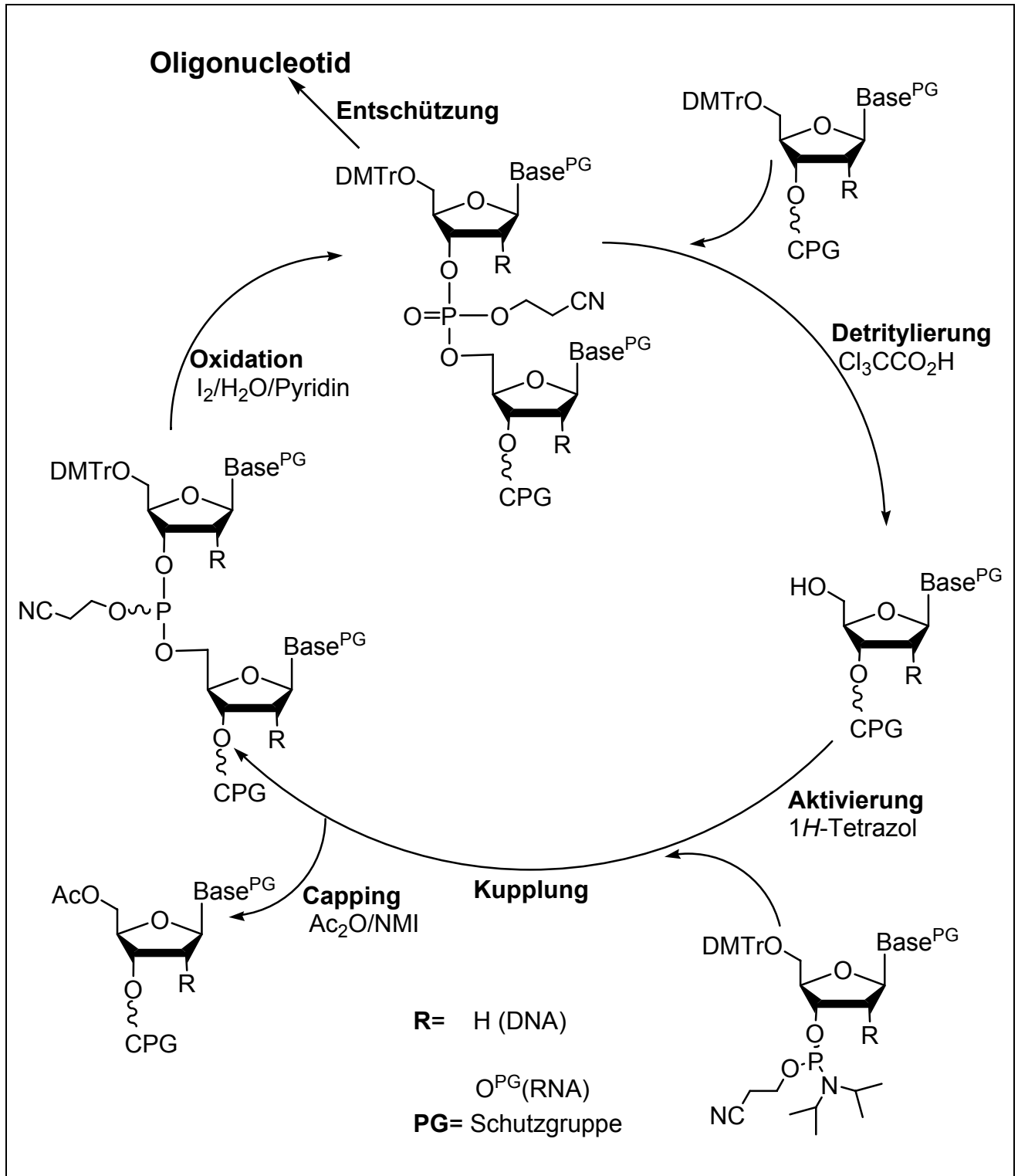


Abbildung 3.2 : Oligonukleotid-Festphasensyntheseyklus nach Caruthers



1. Im ersten Schritt der Oligonukleotidsynthese wird die Dimethoxytritylgruppe an der 5'-Position mit 3%iger Trichloressigsäure in Methylenchlorid abgespalten.
2. Im zweiten Schritt wird das Amidit mit 1H-Tetrazol aktiviert.
3. Im dritten Schritt handelt es sich um die Kupplung und um die Maskierung von nicht abreagierten Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid und 2,6-Lutidin in THF und 1-Methylimidazol in THF, das sogenannte *capping*.
4. Im vierten Schritt wird das Phosphat durch Oxidation mit Iod in Wasser, Pyridin und THF hergestellt.
5. Im fünften Schritt beginnt ein neuer Zyklus

Nach der kompletten Synthese wird konz. Ammoniaklösung zur Abspaltung von CPG als Träger und zur Entfernung von Schutzgruppen verwendet.

## 4 Aufgabenstellung

### 4.1 erste Aufgabe

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuartiger Pyren gelabelter RNA. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten 1-Ethynylpyren **4** und 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren **23** an der 5-Position von Base und 2-Cyanoethoxymethyl(CEM)-Schutzgruppe an der 2'-Position eingeführt werden. Danach sollten Phosphoramiditbausteine **18** und **25** als Zielverbindungen synthetisiert werden (Abbildung 4.1).

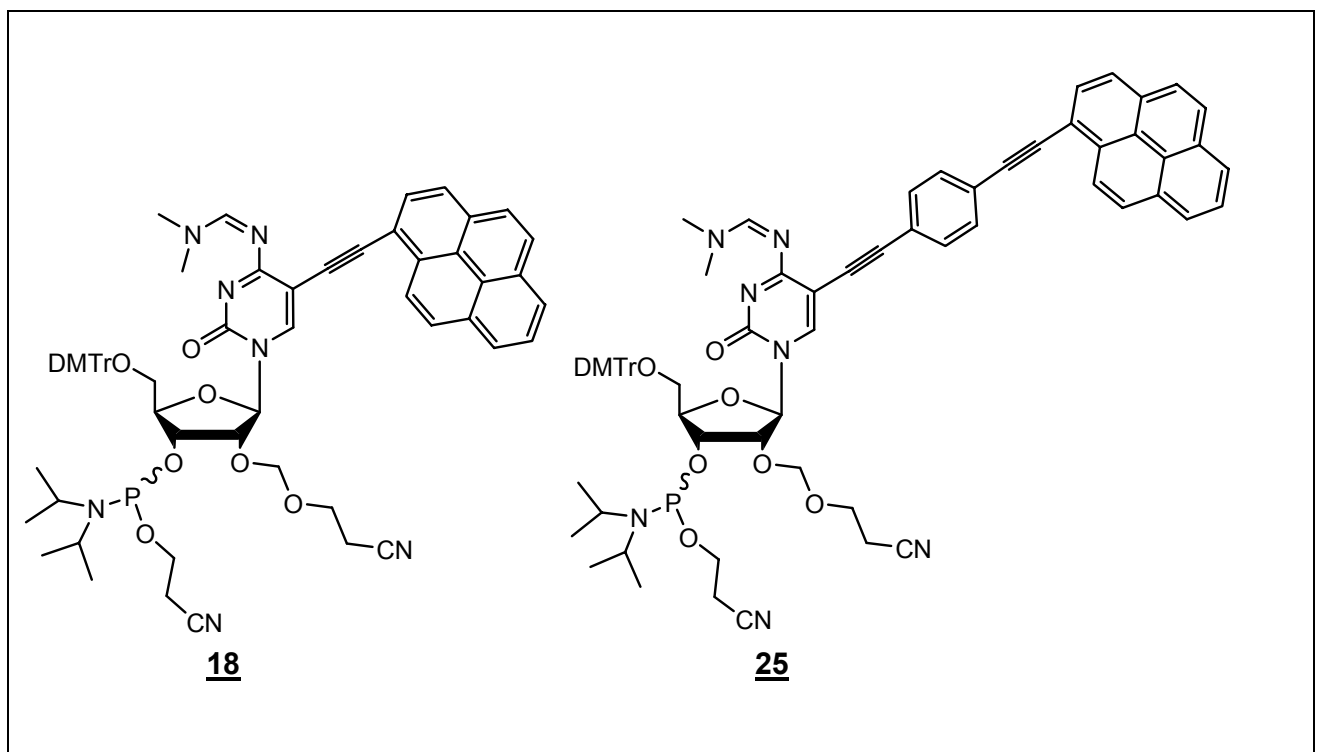


Abbildung. 4.1: Darstellung der Phosphoramidite-Nukleoside <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenyl ethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)- Dilsopropylphosphros amidite] **18** und <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl) -5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)- Dilsopropylphosphrosamidit] **25**

Die 12mer RNA-Stränge werden mittels automatisierter Festphasensynthese eingebaut. Die Oligonukleotide sollten nach erfolgter Aufreinigung und Charakterisierung mittels UV- und CD-Spektroskopie untersucht werden, um die Bildung von RNA Duplex und den Einfluß der modifizierten Nucleotide mit den Alkynylgruppen auf die Stabilität der Duplexe zu bestimmen. Anschließend sollte die Wechselwirkung zwischen den Alkynylgruppen als Fluorophor und dem Oligonucleotid-Duplex untersucht werden.

#### 4.2 zweite Aufgabe

in Rahmen der Doktorarbeit sollte die Abspaltung durch die Photoreaktion an der 2'-Position untersucht werden. Um diese Abspaltung durchzuführen, sollten [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl-(nbm) und [(R)-1-(o-Nitrobenzyl)ethoxy]methyl-((R)-npeom) Schutzgruppen an der 2'-Position eingeführt und Phosphoramiditverbindungen **31** und **36** als Zielverbindungen synthetisiert werden (Abbildung 4.2).

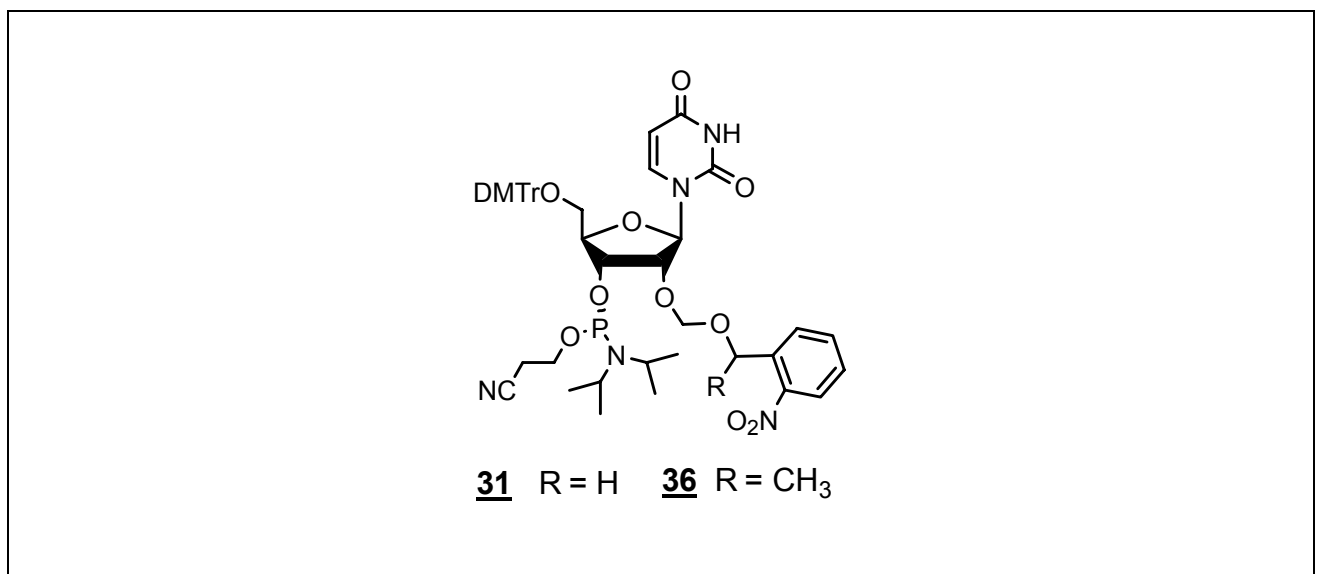


Abbildung. 4.2 : Darstellung der Phosphoramidite-Nucleoside 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[(2-nitrobenzyl)oxy]methyl}uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)-Diisopropylphosphoramidite] **31** und 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[(1-(o-nitrobenzyl)ethoxy]methyl}-uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)-diisopropylphosphoramidite] **36**

24mer DNA sollte mittels automatisierter Festphasensynthese eingebaut werden. [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl-(nbm) an der 2'-Position sollte durch die Photoreaktion mit dem

Stickstoff-Laser abgespalten werden. Die abgespaltene DNA sollte mittels UV-Spektroskopie nachgewiesen werden.

### 4.3 dritte Aufgabe

Aldehyd-Verbindungen sind reaktive Verbindung, so daß es unmöglich ist, daß Nucleinsäuren in der natürlichen Form Aldehyde tragen. Um das Problem zu vermeiden, sollte die Acetalschutzgruppe **40** in Rahmen der Doktorarbeit eingeführt werden.

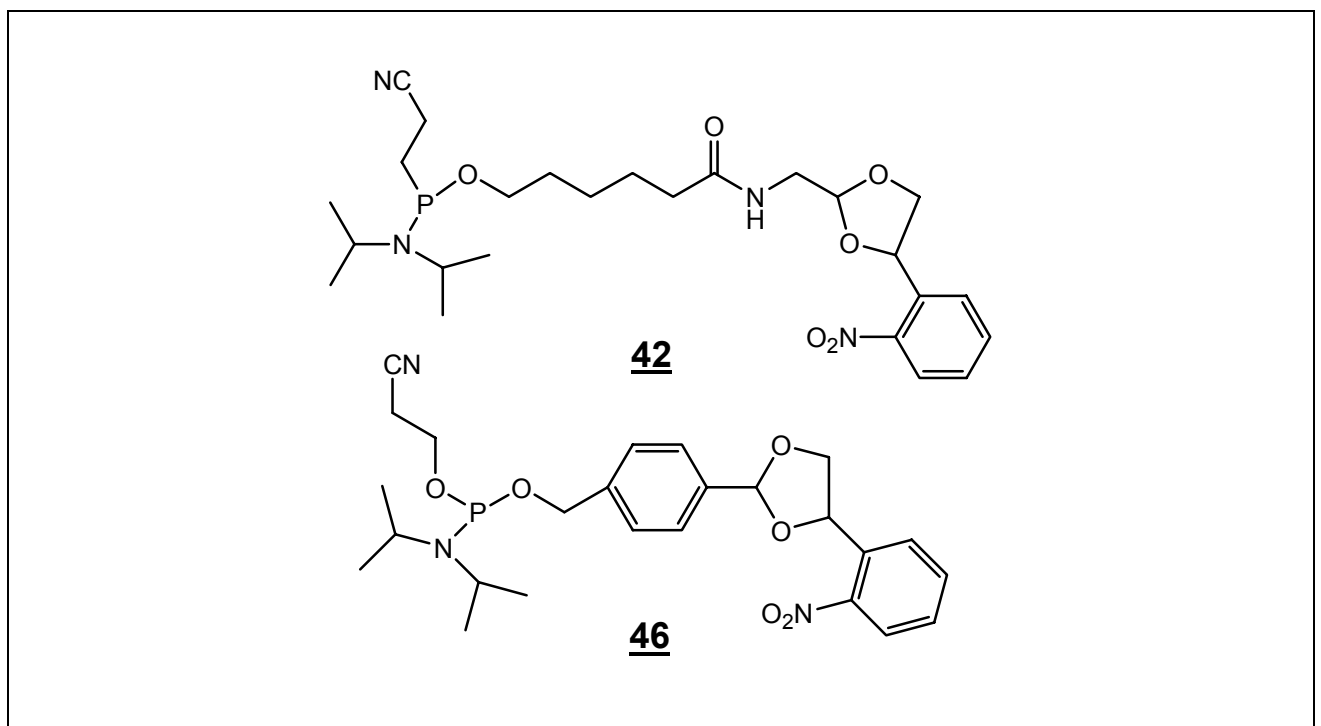


Abbildung. 4.2 : Darstellung der Phosphoramidite-Nucleoside Diisopropyl-phosphoramidous acid 2-cyano-ethyl ester 5-[[4-(2-nitro-phenyl)-[1,3]dioxolan-2-ylmethyl]-carbamoyl]-pentyl ester **42** und Diisopropyl-phosphoramidous acid 2-cyano-ethyl ester 4-[4-(2-nitro-phenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-benzyl ester **46**

Um dieses Ziel zu erreichen, sollten 6-Hydroxy-hexanoic acid [4-(2-nitro-phenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-amid **16** {4-[4-(2-Nitro-phenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-phenyl}-methanol synthetisiert werden. Die Phosphoramiditbausteine **42** und **46** sollten als

Zielverbindungen synthetisiert (Abbildung 4.3) und in die 19mer DNA mittels automatisierter Festphasensynthese eingebaut werden.

# 5 Pyren-gelabelte RNA

## 5.1 Einführung von Fluorophoren bei Nukleinsäuren

Im Laufe der letzten Jahre wurden Methoden zur Untersuchung und homogenen Analysen von Nukleinsäuren basierend auf der Wechselwirkung von Fluorophoren in Intra- und Intermolekülen entwickelt.

Die Methoden wurden auf die Untersuchung einer Struktur und physikalisch-chemischer Eigenschaft von Nukleinsäuren mittels Fluoreszenz-Energieübertragung, Detektion einer speziellen Nukleotidsequenz angewendet. Sie beruht auf der Energieübertragung, einer Sequenzierung von Nukleinsäuren, die ein Donor-Akzeptor Paar eines Fluorophores benutzen und eine Detektion durch Hybridisierung von Nukleinsäuren basierend auf der Veränderung von excimerer und monomerer Fluoreszenz des Pyrens<sup>51</sup>.

### 5.1.1 Pyren als Fluorophor

Die Fluoreszenz wird durch die Wellenlänge einer Anregung (Exzitation) und Emission, Quantenausbeute, Zerfallszeit, und Polarisation charakterisiert. Zudem geben Fluoreszenz-Spektren von Anregung und Emission Informationen über Energieübertragung. Fluoreszenz-Phänomene eines Fluorophores ist im Wellenlängenbereich vom Ultraviolett-Sichtbar (UV/VIS)- bis hin zum Infrarot (IR)-Bereich oder von 300 bis 800nm zu beobachten und eine Verschiebung der Anregungs- und Emissionsmaxima von 15 bis 40nm. Bei Wellenlängen von z.B. 300 bis 500nm erfolgt eine Anregung (Exzitation) des Fluorophores und anschließend eine Emission des Fluorophores durch die Detektion des Fluoreszenzlichtes bei Wellenlängen von etwa 500 bis 700nm beobachtet. Zudem haben Lösungsmittel und Temperatur Anteil an die Fluoreszenzfähigkeit.

Vorteile der Fluoreszenz-Methode sind eine bessere Sensitivität als andere Methoden, d.h. diese Methode kann die sehr empfindliche Fluoreszenz-Intensität in der chemischen Mikro-Umgebung beobachten und die Messung unter milden Bedingungen durchführen. Als Fluorophor bezeichnet man einen durch Anregung von Licht einfach und effizient aktivierten Teil einer die Fluoreszenz abstrahlten Farbstoffverbindung.

Zum Labeln von Nukleinsäuren wurden verschiedene Fluorophore benutzt, wie Fluorescein-, Rhodamin-, Acridin-, Dansyl-, Coumarin-, Phenazin-, Oxazin- und Cyanin-Farbstoffe und polyaromatische Verbindungen (z.B. Derivate von Perylen, Pyren und Antracen)<sup>52</sup>(Abbildung 5.1). Vorbedingungen für gute Fluorophore sind eine starke Absorption, eine hohe Quantenausbeute und eine große Verschiebung von Absorptions- und Emissionsmaxima ( Stokes-Shift).

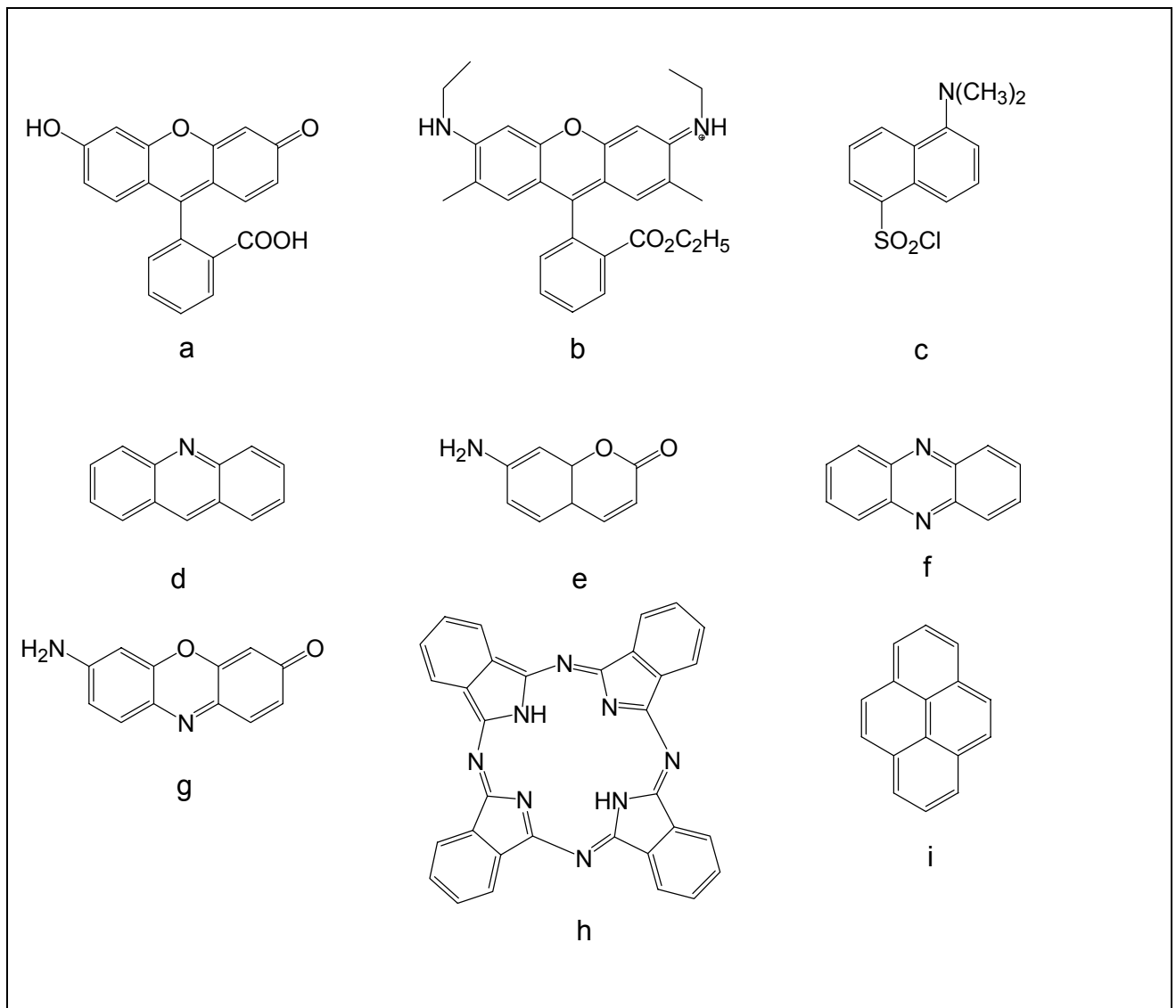


Abbildung 5.1 : bekannte Fluorophore : (a) Fluorescein, (b) Rhodamin-Derivat (Rhodamin 6G), (c) Dansyl, (d) Acridin, (e) Coumarin, (f) Phenazin, (g) Oxazin, (h) Cyanin-Derivat (Phthalocyanin) und (i) polyaromatische Verbindung (Pyren)

Pyren besitzt günstige photochemische Eigenschaften wie eine hohe Stabilität, planare Struktur, lange Singulett-Lebendauer und hohe Quantenausbeute, so daß es zu den

attraktivsten Fluorophoren für die Entwicklung fluoreszierender Oligonukleotidproben zählt<sup>51,52</sup>. Verschiedene Pyren-gelabelte Oligonukleotide wurden als Interkalator<sup>53</sup> und Probe entwickelt, die Monomer oder Excimer der Fluoreszenz bei der Hybridisierung zeigen.

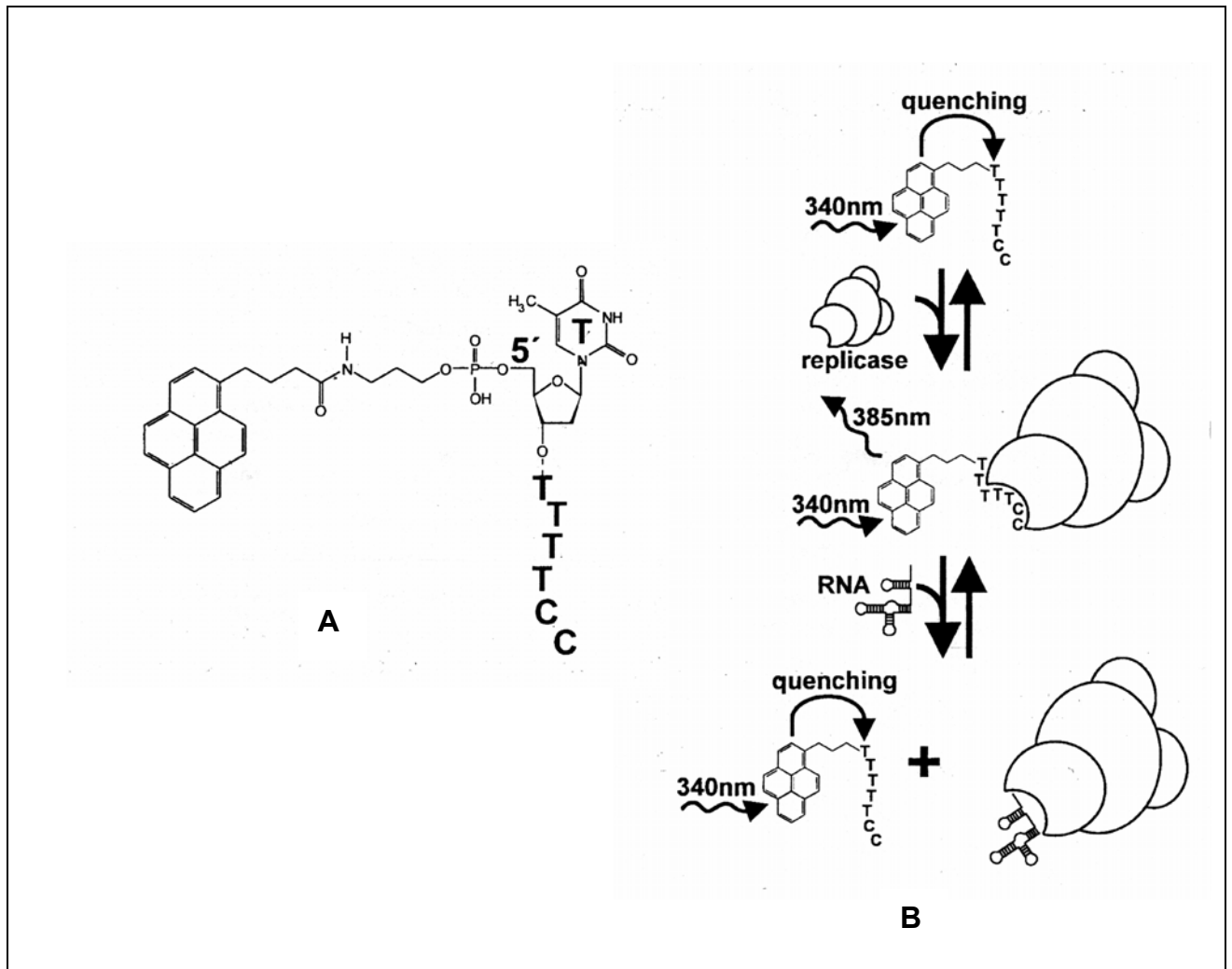
## 5.1.2 Einführung von Pyren-Derivaten am Zucker

### 5.1.2.1 Modifikationen der Pyren-Derivate an der 5'-Position vom Zucker

Die 5'-Pyren gelabelten RNA Oligomere (Nukleotide) sind stabil und sensitiv auf die Umgebung, die durch Formation von sekundären und tertiären Strukturen verändert. Zudem bringt Pyren in der 5'-Position mit kurzem Linker günstige Informationen der Fluoreszenz als eine ideale Probe zur Bildung und Dynamik von RNA-Substrat bei<sup>54,55</sup>.

Walter et al verwendeten 1997 5'-Pyren gelabelte DNA-Proben dazu, mit verschiedenen Nukleinsäuren Wechselwirkung von *Q $\beta$ -replicase* zu untersuchen. Das Heptpyrimidin enthaltende Oligodeoxynukleotid wurde durch 5'-Aminopropyl Linker zu Pyren-butansäure als einem Fluorophordetektor verknüpft ( Ausbildung 5.2 ). Und damit sie das Quenchen der Fluoreszenz durch Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Nukleobasen beobachteten<sup>56</sup>, wurden eine pyrimidinreiche Sequenz der Probe und ein mittellanger Linker eingeführt. Der Grund ist, daß die Sequenz und der Linker bevorzugt das Quenchen des Fluorophors durch Elektronen-Transfer vom angeregten Pyren zur nächsten Base, Thymin zeigt. Anschließend wurde die eine komplementär Sequenz besitzende RNA, wie *Q $\beta$  replicase*, zu der Probe eingesetzt. Da die reversible Bildung zwischen Probe und *Q $\beta$  replicase* den Pyren-Fluorophor gegen Quench-Wechselwirkung mit den Pyrimidinen der Probe abschirmt, hat die Fluoreszenz zugenommen. Zuletzt nach Zugabe einer replizierbaren RNA wurde die Probe durch Konkurrenz mit der RNA aus der Basenpaarung zwischen der Probe und *Q $\beta$  replicase* entlassen. Deswegen werde das Quenchen der Fluoreszenz durch Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Nukleobasen wieder beobachtet.





Ausbildung 5.2 : 5'-Pyren gelabelte DNA-Probe, **A** : Verbindung von Pyren-butansäure durch Linker am 5'-Phosphat **B** : die reversible Bildung zwischen Probe und Qβ replicase

### 5.1.2.2 Modifikationen von Pyren-Derivaten an der 2'-Position vom Zucker

Zuckerteile, besonders die 2'-Position, sind ein attraktiver Ort für Modifizierung des Nucleotides. An der 2'-Position des Nucleosides wurden heterocyclische und polyaromatische Verbindungen als Fluorophore, wie Dansyl<sup>57</sup>, Anthracen<sup>58</sup>, Anthraquinon<sup>59</sup>, Fluorescein<sup>60</sup>, Porphyrin<sup>61</sup> und Pyren vorgestellt. Die an der 2'-Position des Nucleosides substituierten polyaromatischen Liganden befinden sich in der kleinen Furche des Oligonucleotides und können die Stabilität des Duplex beeinflussen.

Murakami et al berichteten 2001, daß *mismatch*-Basenpaarung in RNA erstmalig anhand der Fluoreszenz von Pyren-modifizierten Ribonukleotiden erkannt wurde<sup>62,63</sup> (Abbildung 5.3).

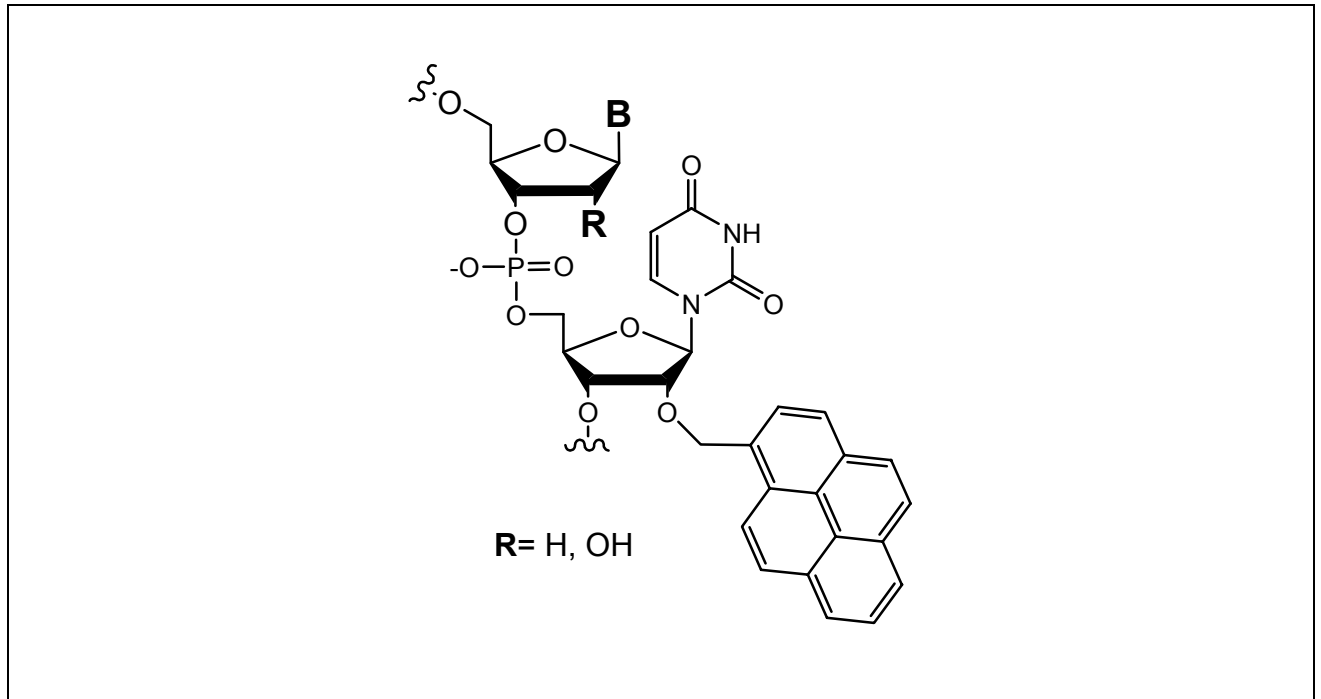
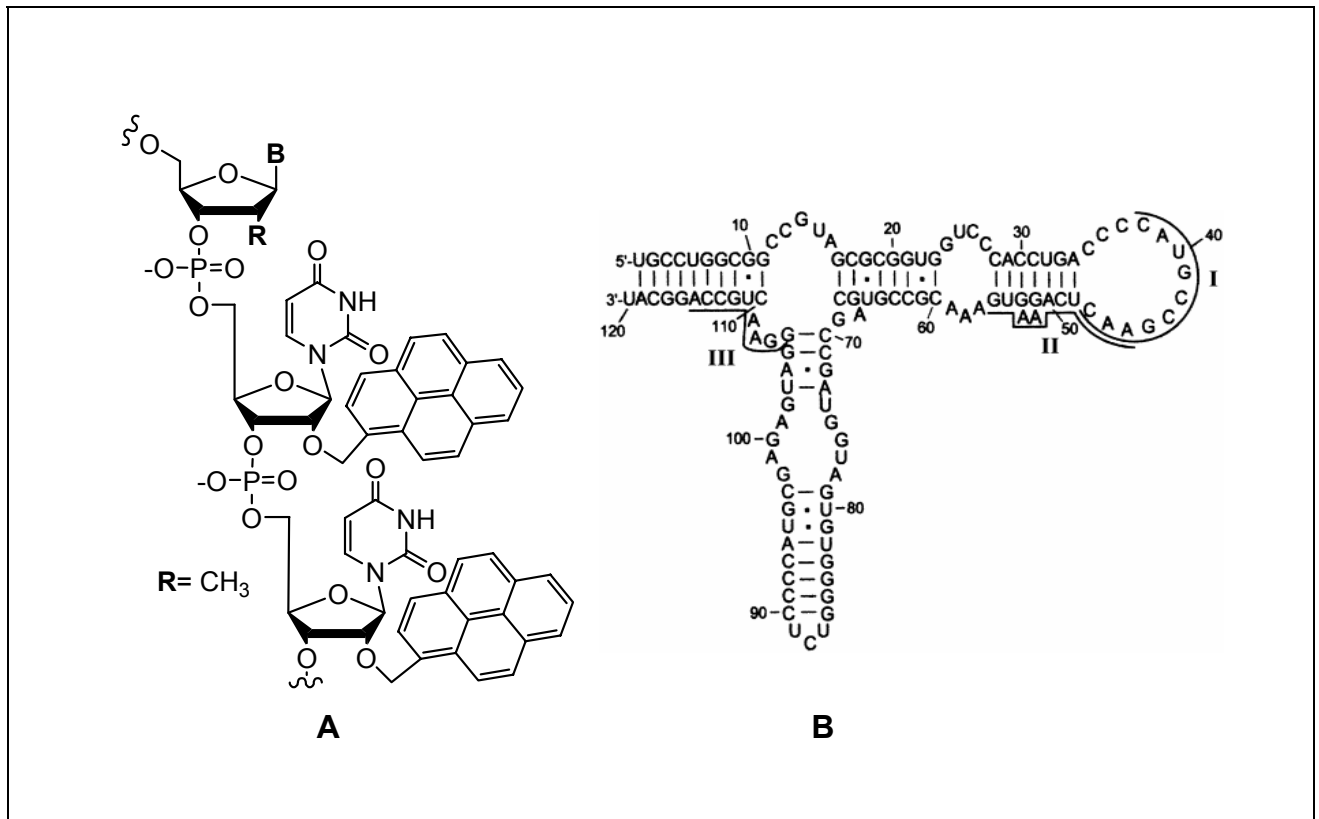


Abbildung 5.3 : Einführung von Methylpyren an der 2'-Position

Die Fluoreszenz der an der 2'-Position Methylpyren gelabelten Nukleotide wurde durch Auswahl der Sequenz von Probe und Existenz der *mismatch*-Basenpaarung sehr sensitiv beeinflusst. Besonders sind die Basenpaare an der Nähe von Methylpyren wichtiger als andere, da Nukleobasen effektiv *quenchen* bezüglich der Fluoreszenz von Pyren und die mehr als dritte Base von Pyren entfernten Basen von *mismatch*-Basenpaarungen keinen wichtigen Einfluß über Duplex(oder Doppelhelix)-Fluoreszenz haben.

Anschließend berichteten sie 2002, daß die Bis-Pyren konjugierte neue 2'-O-Methyloligonukleotiden (OMUpy2) synthetisiert wurden, damit sie die Struktur von RNA mit Duplex(oder Doppelhelix)-Fluoreszenz effektiv erkennen<sup>64</sup> (Abbildung 5.4).



Ausbildung 5.4 : Struktur von Bispyren-konjugiertes 2'-O-Methyloligoribonukleotid (A) und Sekundärstruktur von 5S-rRNA (B)<sup>65</sup>

*E. coli* 5S-rRNA wurde dazu verwendet, daß OMU<sub>py</sub>2 einzelsträngige Bereiche des nativ gefalteten RNA-Moleküls effektiv detektierte. *E. coli* 5S-rRNA enthält 5S-rRNA (120 Nukleotiden(nt)), das ein Teil der Untereinheit(*subunit*) von 50S Ribosom ist und eine sekundäre Struktur besitzt<sup>65</sup>. Zur Untersuchung von Bereich I(38-47nt), II(45-56nt) und III(106-115) wurde das komplementäre OMU<sub>py</sub>2-I, OMU<sub>py</sub>2-II und OMU<sub>py</sub>2-III synthetisiert. Nach Zugabe von OMU<sub>py</sub>2-I, OMU<sub>py</sub>2-II und OMU<sub>py</sub>2-III in 5S-rRNA wurden drei Bereiche anhand der Fluoreszenz von Pyren-modifizierten Ribonukleotiden analysiert.

Wegen der Bildung der Hybridisierung von OMU<sub>py</sub>2-I und Bereich I konnte eine Emission in der Nähe von 480nm beobachtet werden. Aber in den anderen Bereichen (II und III) wurde Hybridisierung nicht gebildet, so daß die Fluoreszenz nicht merkbar oder zu schwach beobachtet wird. Wenn die Hybridisierung nicht gebildet wird oder *mismatch*-Sequenz an der Nähe von OMU<sub>py</sub>2 besitzt, kann die Intensität der Fluoreszenz nicht merkbar oder zu leicht beobachtet werden.

Das bedeutet, daß der Bereich I an für Antisense-Molekülen leicht zugänglich ist, aber Bereich II und III nicht. So kann man abschließend sagen, daß die Bis-Pyren konjugierten

neuen 2'-O-Methyloligonukleotide (OMUpy2) nützliche Proben sind, um Hybridisierung mit der komplementären RNA zu detektieren und um Zugänglichkeit der nativ gefalteten RNA zum Oligonukleotid auszuwerten. Da die Probe hoch spezifisches Bindevormögen zur RNA besitzt, könnte sie zur Detektion von endogenen RNAs in lebenden Zellen nützlich sein.

Zudem berichteten Yamana et al 2005, daß die in der Nähe von 2'- Multi-Pyren konjugierten 2'-O-Methyloligonukleotiden sich außerhalb der Duplex-RNA befanden, so daß die Duplex-RNA stabil war und starke Anregung und Emission beobachtet wurde<sup>66</sup>. Deswegen wurde die Möglichkeit, deren die große Polyaromatische Fluorophore in Zucker ohne die sterische Behinderung substituiert werden, nachgewiesen.

Andere Untersuchungen über die gefaltete RNA wurde von Silvermann et al durch Magnesiumion ( $Mg^{2+}$ ) verwendete Gleichgewicht-Titration durchgeführt<sup>67,68</sup>. Sie basiert darauf, daß sich die Fluoreszenz-Intensität des Chromophors gegenüber der Änderung der Umgebung (z.B. Zugabe von  $Mg^{2+}$ ) im Biomolekül sensitiv ändert.

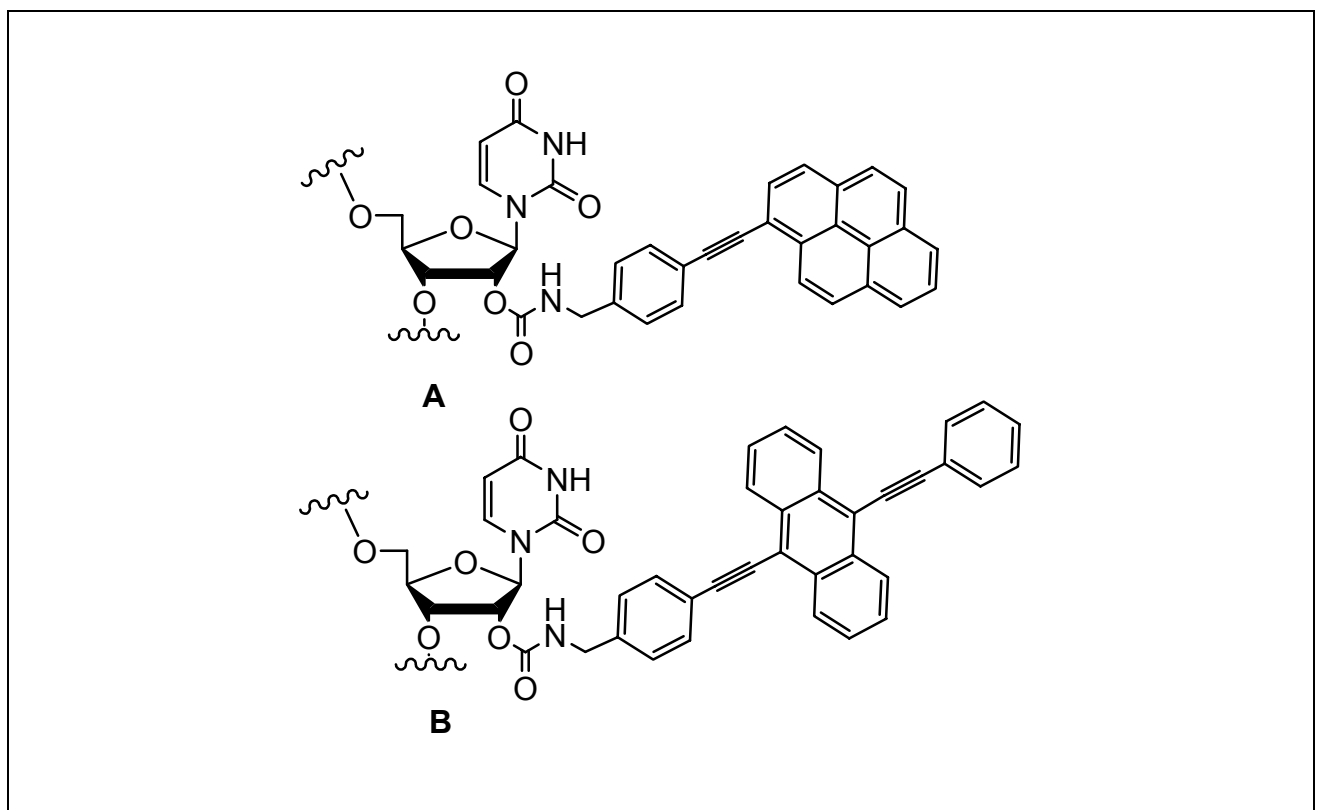


Abbildung 5.5 : Einführung von 1-phenylethynylpyren(PEPy(A)) und 9,10-bis(phenylethynyl) anthracen(BPEA(B)) an der 2'-Position

Korshun et al berichteten 2003 eine Untersuchung über Struktur und Fluoreszenz mit Pyrenemethyl *ara*-Uridin-2'-carbammat enthaltenden Oligonucleotide in duplex DNA<sup>69</sup> und 2004 Synthese und Untersuchung von Fluoreszenz über die 1-phenylethynylpyren- und 9,10-bis(phenylethynyl)anthracen- uridin-2'-carbamates als Fluorophor enthaltenen Oligonucleotide<sup>70</sup>. Die 1-phenylethynylpyren(PEPy) und 9,10-bis(phenylethynyl)anthracen(BPEA) als Donor und Akzeptor befinden sich in der kleinen Furche der DNA und die Intensitäten der Fluoreszenz durch die verschiedenen Distanzen zwischen PEPy und BPEA stark oder schwach beobachtet wurden (Abbildung 5.5).

### 5.1.3 Modifikationen von Acetylene-Pyren an der Nukleobase von Pyrimidinen

Viele Nucleosid-Analoga wurden an der 5 Position der Pyrimidine substituiert. An der 5-Position der Nukleobase wurden heterocyclische und polyaromatische Reste als Fluorophore wie Anthracen<sup>71</sup>, Fluorescein<sup>72</sup>, 1,10-Phenanthrolin<sup>73</sup>, Perylen<sup>74</sup> und Pyren vorgestellt.

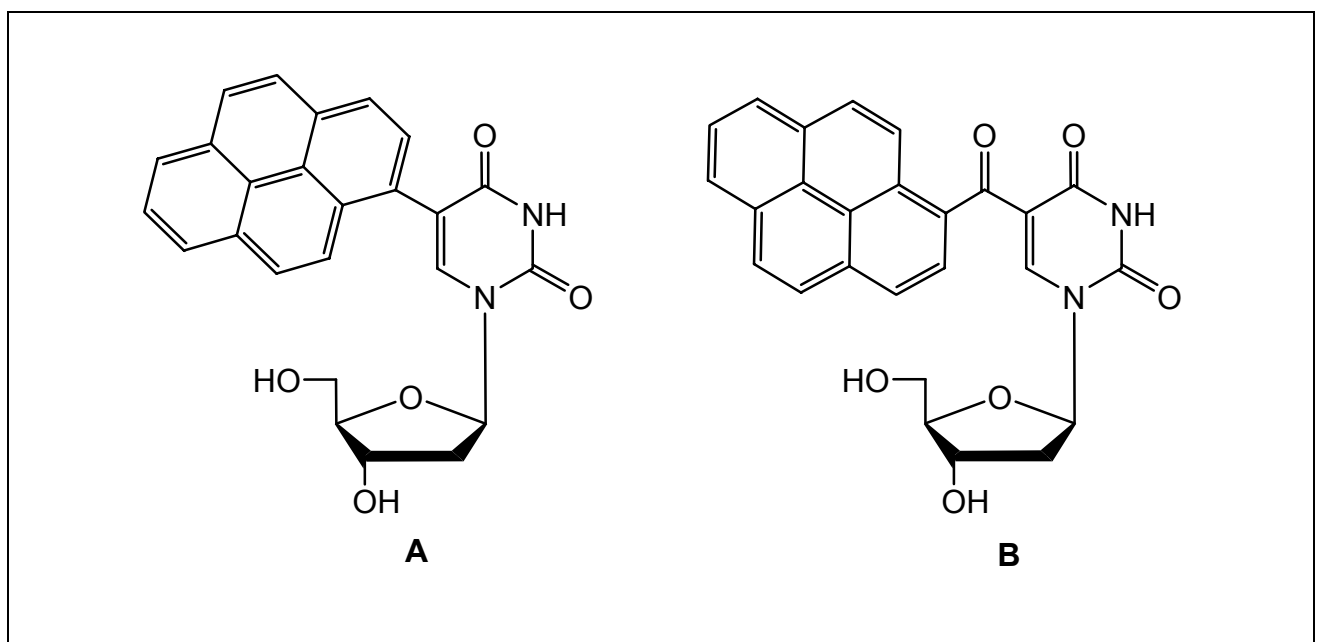


Abbildung 5.6 : Einführung von 5-(1-Pyrenyl)- 2'-deoxyuridin (A) und 5-(1-Pyrenoyl)-2'-deoxyuridin (B)

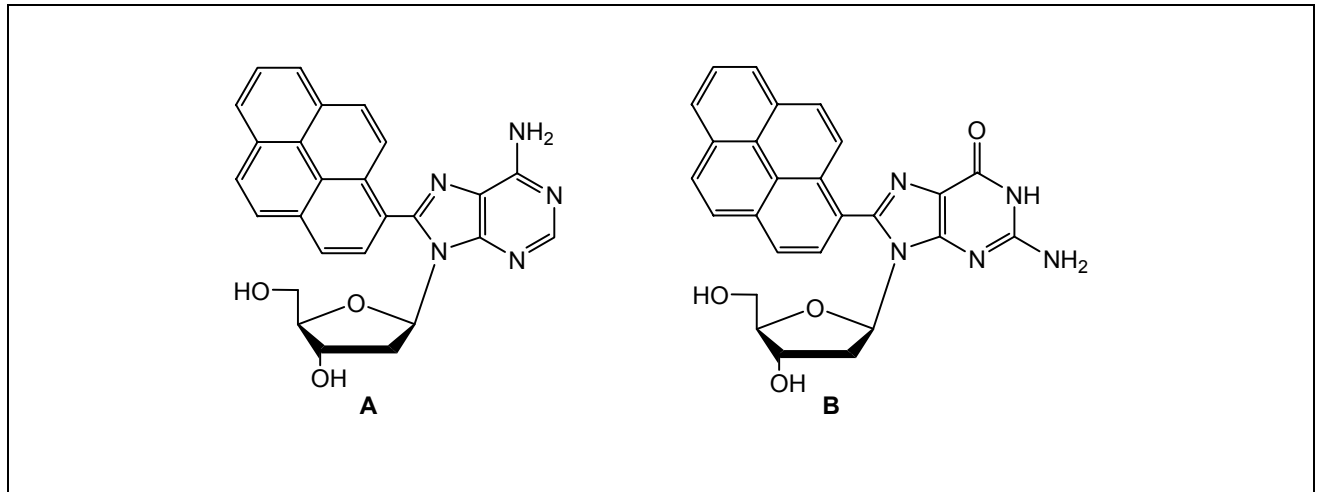
Durch Stille-Kupplung des Pyren-1-ylstannans mit einem an der 3'- und 5'-Position geschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin-Derivat synthetisierten Netzel et al.(1995) Pyren-

modifizierte Pyrimidin-Drivate, 5-(1-Pyrenyl)- und 5-(1-Pyrenoyl)-2'-deoxyuridin und beobachteten Ladungstransfer in 5-(1-Pyrenyl)-2'-deoxyuridin<sup>75</sup> (Abbildung 5.6).

Von Wagenknecht et al. (2002 und 2003) wurden die Pyren modifizierten Pyrimidin- und Purin-Drivate, 5-(1-Pyrenyl)-2'-deoxy-uridin und -cytidin und 8-(1-Pyrenyl)-2'-deoxy-adenosin und -guanosin, durch die Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung der Pyren-1-ylboronsäure synthetisiert und damit spektroskopische Phänomene des reduktiven Elektronen-Transfer in DNA untersucht<sup>76,77</sup> (Abbildung 5.7).

Im Vergleich zur Synthesemethode von Netzel ist der Vorteile dieser Methode, keine Schutzgruppe zu brauchen und in wässrigen Lösungsmitteln arbeiten zu können. Da die Oligodeoxynukleotide durch C-C Einzelbindung zu Pyren als ein Detektor des Fluorophors verknüpft wurde, führte die Struktur zur Wechselwirkung wie Ladungstransfer zwischen Pyren und den nächsten Basen in der Nähe der Pyren modifizierten Base.

Aber um die Phänomen effektiv zu reduzieren, die Pyren-Gruppe von Base-Stapel abzutrennen und eine starke elektronische Kupplung zu erhalten, braucht man einen geeigneten Spacer, der länger als die C-C Einzelbindung ist und eine strukturelle Rigidität besitzt<sup>78</sup>.



*Abbildung 5.7 : Einführung von 8-(1-Pyrenyl)-2'-deoxyadenosin (A) und 8-(1-Pyrenyl)-2'-guanosin (B)*

Als Lösung synthetisierten Berlin et al. (1996) durch Sonogashira Kupplung 5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-Deoxyuridin als ein neues Fluoreszenz-Nukleosid<sup>79</sup> und anschließend durch Festphasensynthese Pyren modifizierte Nukleotide<sup>80,81</sup> und Wagenknecht et al. während der Festphasensynthese auch durch Sonogashira Kupplung mit 1-Ethynylpyren

und 5-Iod-2'-deoxy-uridin, und –cytidin bzw. 8-brom-2'-deoxy-adenosin und –guanosin enthaltende Nukleotide<sup>78</sup> (Abbildung 5.8).

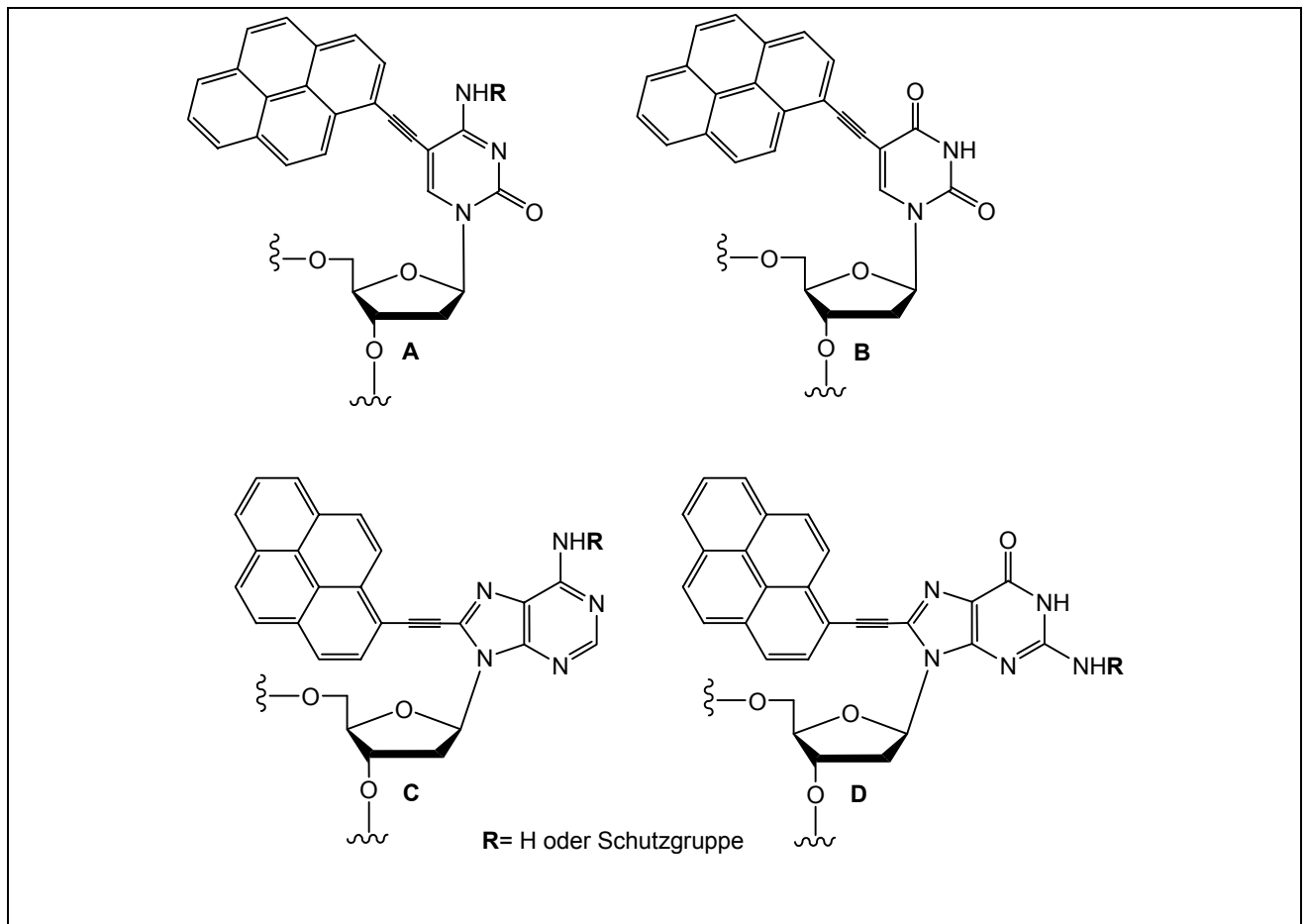


Abbildung 5.8 : Einführung von 1-Ethynylpyren an der 5-Position der Pyrimidinbasen (C und U) und 8-Position der Purinbasen (A und G)

Die Dreifachbindung ist rigid und geeignet zur Elektronendelokalisierung von den konjugierten Fluorophor und der Nucleobase. Vor allem wurden Watson-Crick-Basenpaarungen der Nucleotide durch den 1-Ethynylpyren-Fluorophor gering beeinflusst, da das Fluorophor die Eigenschaft einer sterischen Rigidität besitzt. Die Eigenschaft der Absorption und Fluoreszenz des durch 1-Ethynylpyren verknüpften Base(X=A,C,G und U) enthaltenden DNA-duplex hängt von der Base ab<sup>82</sup>. Da die elektronische Kupplung zwischen der Pyren-Gruppe und modifizierten Base(C und G) schwach ist, wird eine Emission der typischen Pyren-Struktur im DNA-duplex beobachtet. Dagegen besitzen die modifizierte Base(C und G) enthaltenden anderen DNA-duplex durch eine starke

elektronische Wechselwirkung zwischen zwei Chromophoren ein breites und unstrukturiertes Fluoreszenz-Band.

Kim et al. berichteten 2004, daß Einzel-*match* und-*mismatch*-Basenpaarungen in DNA anhand der verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten von 1-Ethynylpyren-modifizierten Nukleotiden zu unterscheiden wären<sup>83</sup>. Die Pyren-Gruppe in Einzel-*mismatch*-Basenpaarung zeigt eine Wechselwirkung mit einer oder mehreren Basen an der Außenseite der Helix, so daß die Fluoreszenz reduziert wird. Dagegen nimmt die Fluoreszenz in der Einzel-*match*-Basenpaarung zu, da die Pyren-Gruppe sich in der Außenseite der Helix befindet und deswegen eine Einschubung und ein Stapel mit Basen unmöglich ist.

Zudem berichteten sie 2005, daß Stabilisierung und Fluoreszenz von Duplexen durch Basenpaarung von  $U^P-U^P$ ,  $U^P-A^P$  und  $A^P-A^P$  mit dem an der 5 und 8-Position 1-Ethynylpyren-modifizierten Deoxy-uridin(  $U^P$  ) und-adenosin(  $A^P$  ) untersucht wurden<sup>84</sup>. Die Fluoreszenz-Eigenschaft der erhaltenen Nucleobase-Analoga bilden eine starke und stabile Wechselwirkung vom *interstrand*-Stapel, eine  $\pi - \pi$  – Wechselwirkung zwischen den zwei Pyrenen und Wechselwirkung zwischen Pyren und der benachbarten Base in *match* und *mismatch*-DNA-duplexen, so daß der DNA-duplex trotz des Verlusts der Wasserstoffbrückenbindung an der modifizierten Basenpaarung stabil ist.



## 5.2 Chemische Synthese

### 5.2.1 Synthese der halogenierten Verbindungen 1-Brom-pyren 1 und Iodpyren 2

Um Acetylenaromaten darzustellen, ist die Einführung von Halogenen in aromatische Verbindung wichtig. 1-Brompyren 1 kann durch die elektrophile Substitution eines aromatischen Rings mit Brom und Metallkatalysator als Lewis-Säuren oder N-Bromsuccinimid ( NBS ) in apolaren Lösungsmitteln wie Tetrachlorkohlenstoff  $\text{CCl}_4$  synthetisiert werden. Aber die Ausbeute ist nicht hoch, da viele Nebenprodukte, Di-, Tri-, und Tetra-brompyren, in dieser Reaktion entstehen. Zudem wegen der drastischen und gefährlichen Natur von Brom wird eine sehr sorgfältige Kontrolle der Reaktionsbedingungen erfordert. Deswegen werden neue synthetische Methode gesucht ( Abbildung 5.9).

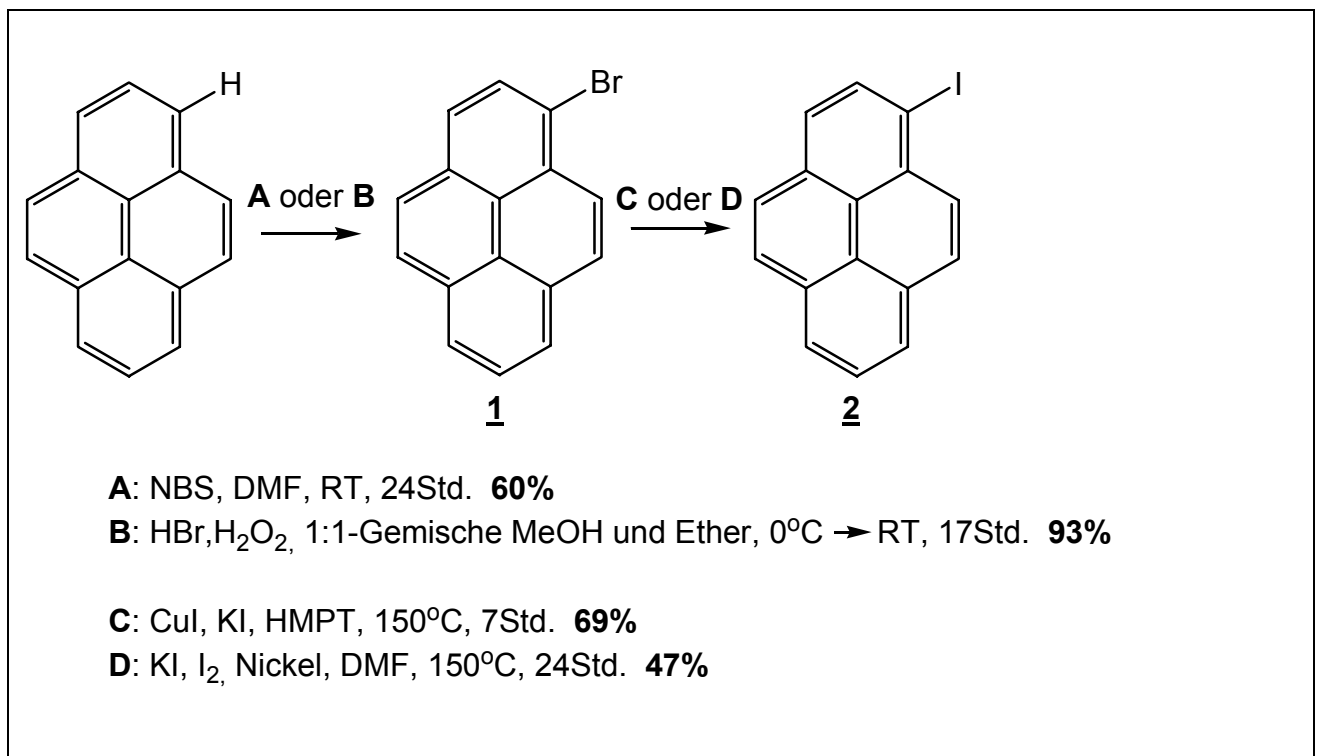


Abbildung 5.9 : Synthese der halogenierten Verbindungen 1-Brompyren 1 und Iodpyren 2

Eine Verwendung von NBS in polaren Lösungsmitteln wie abs N,N-Dimethylformamid (DMF) ist weniger bekannt. Für Monobromierungen bei reaktiven aromatischen Verbindungen ist die Verwendung von NBS in DMF ein sanfte, selektive und im Vergleich mit NBS in CCl<sub>4</sub> sehr effektive Methode<sup>85-88</sup>. 1-Brompyren **1** wurde in abs N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst, nach dem Tropfen von NBS in DMF bei Raumtemperatur 24 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Umkristallisation konnte die Verbindung **1** mit einer Ausbeute von 60% isoliert werden.

Eine andere Methode ist die Verwendung einer positiven Halogenart mit einem geeigneten Oxidationsmittels. Zur Oxidation von Bromwasserstoffsäure wurde Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel gewählt<sup>89-91</sup>. Pyren wurde in einer Mischung um 1:1-Methanol/Diethylether gelöst, auf 0°C abgekühlt, nach Zugabe von Bromwasserstoffsäure und Wasserstoffperoxid langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur 17 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Umkristallisation konnten Produkt **1** mit einer Ausbeute von 93% isoliert werden. Bei Acetylen-Synthesen haben Iod-Aromaten eine bessere Reaktivität und Reaktionsbedingungen als Brom. Deswegen wurde Iodpyren **2** aus 1-Brompyren **1** durch zwei Methoden synthetisiert.

Erste Methode ist eine Verwendung von Kuper(I)-iodid und Kaliumiodid in Hexamethylphosphorsäuretriamid(HMPT)<sup>92</sup>. Pyren wurde in HMPT gelöst, nach Zugabe Kuper(I)-iodid und Kaliumiodid bei 150°C 7 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Umkristallisation konnte Produkt **2** mit einer Ausbeute von 69% isoliert werden. Wegen des sehr giftigen Stoffs ( HMPT ) wurde andere Methode gesucht.

Die andere Methode ist die Verwendung von Kuper(I)-iodid, Iodid und Nickel als Katalysator in abs DMF<sup>93</sup>. Pyren wurde in abs DMF gelöst, nach Zugabe Kuper(I)-iodid, Iodid und Nickel als Katalysator bei 150°C 24 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Produkt **2** mit einer Ausbeute von 47% isoliert werden.

### **5.2.2 Synthese von 2-Methyl-4-pyren-1-yl-but-3-yn-2-ol **3****

Acetylen-Aromaten werden durch Sonogashira Reaktion dargestellt. Die Sonogashira Reaktion besteht aus zwei Schritten( Abbildung 5.10).

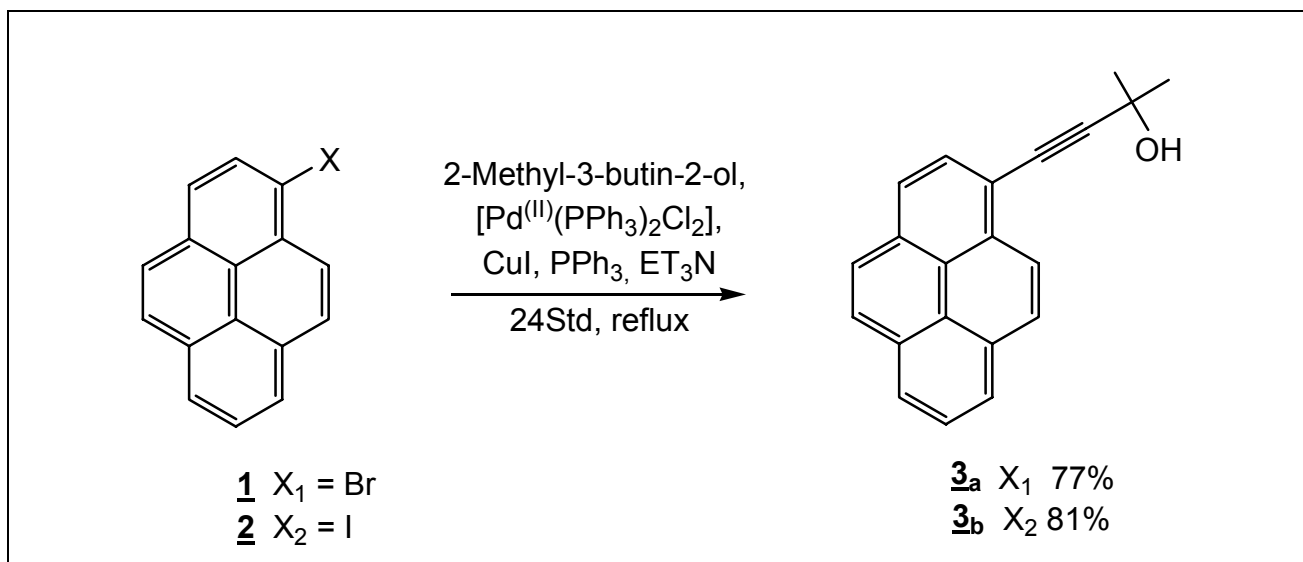


Abbildung 5.10 : Synthese der 2-Methyl-4-pyren-1-yl-but-3-yn-2-ol **3**

Der erste Schritt besteht aus einer Alkinylierung der Brom- oder Iod-Verbindung. Der zweite Schritt besteht aus einer Entschützung der Acetylen-Gruppe. Ethinyl-trimethylsilan ist zur Acetylen-Synthese ein bekanntes Reagenz<sup>94-96</sup>. Aber es ist sehr teuer. Obwohl Ethinyl-trimethylsilan als ein Acetylen-Reagenz bei Reaktion leicht und effizient reagiert und eine gute Ausbeute liefert, wurde 2-Methyl-3-butin-2-ol gewählt<sup>97-105</sup>. Die Gründe sind, daß 2-Methyl-3-butin-2-ol billiger und leichter als Ethinyl-trimethylsilan ist, und die Ausbeuten im Vergleich mit Ethinyl-trimethylsilan nicht schlecht sind. Halogen-Aromaten wurden in Triethylamin gelöst, nach Zugabe von Bis-(triphenylphosphin)-Palladium(II)-dichlorid, Kupfer(I)iodid, Triphenylphosphin und 2-Methyl-3-butin-2-ol 24 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten Acetylen-Verbindungen **3<sub>a,b</sub>** mit einer Ausbeute von 77% und 81% isoliert werden.

### 5.2.3 Synthese von 1-Ethynylpyren **4**

Um 1-Ethynylpyren **4** darzustellen, wird eine Entschützung der Hydroxypropyl-Gruppe benötigt. Zur Reaktion wurden Natriumhydrid NaH<sup>102</sup>, Natriumhydroxid NaOH<sup>100,103,104</sup> oder Kaliumhydroxid KOH<sup>99,104,105</sup> als Entschützungsreagenzien verwendet. In der Reaktion wurde NaOH als Entschützungsreagenz eingeführt, da das leichter und effektiver ist als NaH (Abbildung 5.11).

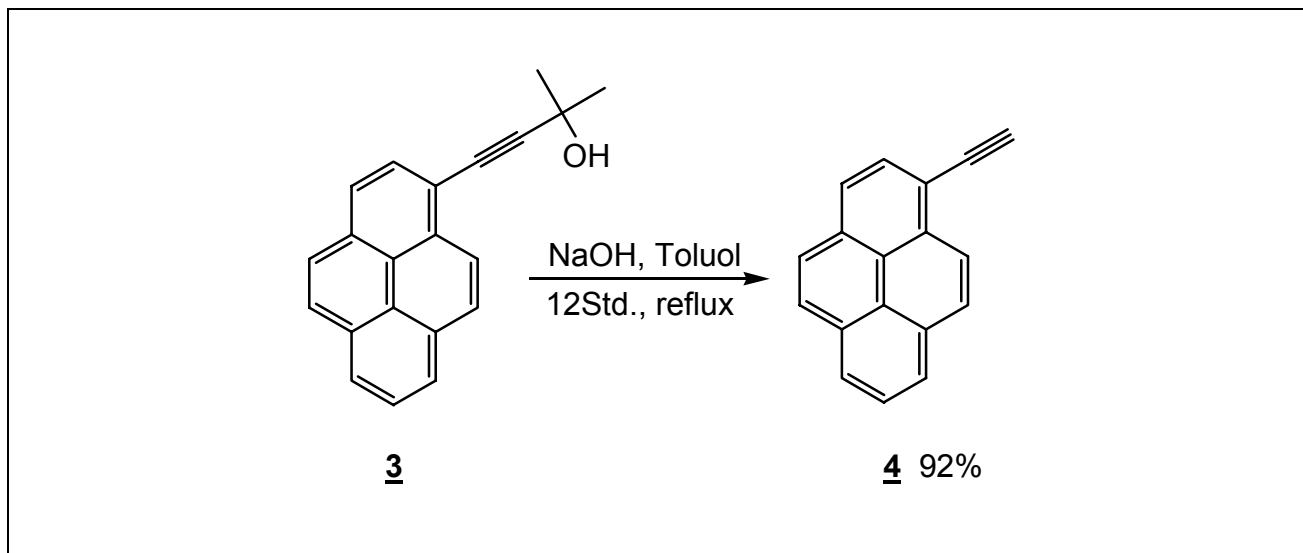


Abbildung 5.11 : Synthese von 1-Ethynylpyren 4

Bei der Verwendung von Alkoholen wie Propanol oder 1-Butanol als Lösungsmittel ist die Aufreinigung schwierig, da NaOH in Alkohol leicht gelöst werden kann. Deswegen wurde Toluol eingeführt. Verbindung 3 wurde in Toluol gelöst, nach Zugabe von NaOH 12 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Produkt 4 mit einer Ausbeute von 92% isoliert werden.

### 5.2.3.1 Mechanismus von 1-Ethynylpyren 4

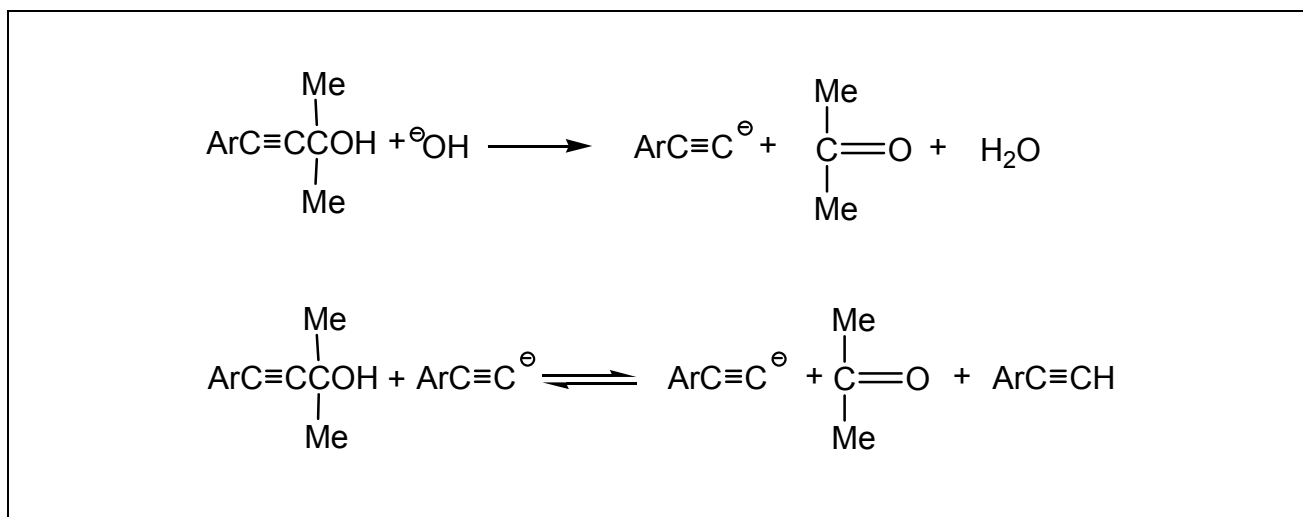


Abbildung 5.12 : Mechanismus der Entschützung der Hydroxypropyl-Gruppe

Der Mechanismus der Entschützung von Hydroxypropyl-Gruppe läßt sich in drei Schritte unterteilen<sup>103</sup> (Abbildung 5.12).

Der erste Schritt besteht aus einer Deprotonierung der Hydroxyl-Protons in der 2-Hydroxypropyl-Gruppe. Der zweite Schritt besteht aus einer Entfernung von Aceton(Deacetonierung) und Bildung von aromatischem Acetylid. Der reversible Schritt besteht aus einer Abstraktion (Deprotonierung) von anderem Hydroxyl-Proton durch eine Protonierung von aromatischem Acetylid in der 2-Hydroxypropyl-Gruppe und Bildung von aromatischem Acetylen.

#### 5.2.4 Synthese von 2', 3', 5'-Tri-O-Acetyl-5-Iod-Cytidin 6

Zur Darstellung von 5-Iodcytidin muß Cytidin durch Acetylierung an der 5', 3'- und 2'-Position geschützt werden (Abbildung 5.13).

Das geschützte Nukleosid 2', 3', 5'-Tri-O-Acetyl-Cytidin,hydrochlorid<sup>106-107</sup> 5 wurde mit Essigsäurechlorid bei Raumtemperatur in Essigsäure synthetisiert. Nach der Aufreinigung mittels Umkristallisation konnte Nukleosid 5 mit einer Ausbeute von 92% isoliert werden. Nukleosid 5 wurde in einer Mischung eines 1:1-Gemisches aus Essigsäure / Tetrachlorkohlenstoff suspendiert, nach Zugabe von Iod und Iodsäure als Katalysator bei 40°C 4 Tage gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte 2', 3', 5'-Tri-O-Acetyl-5-Iod-Cytidin<sup>107</sup> 6 mit einer Ausbeute von 75% isoliert werden.

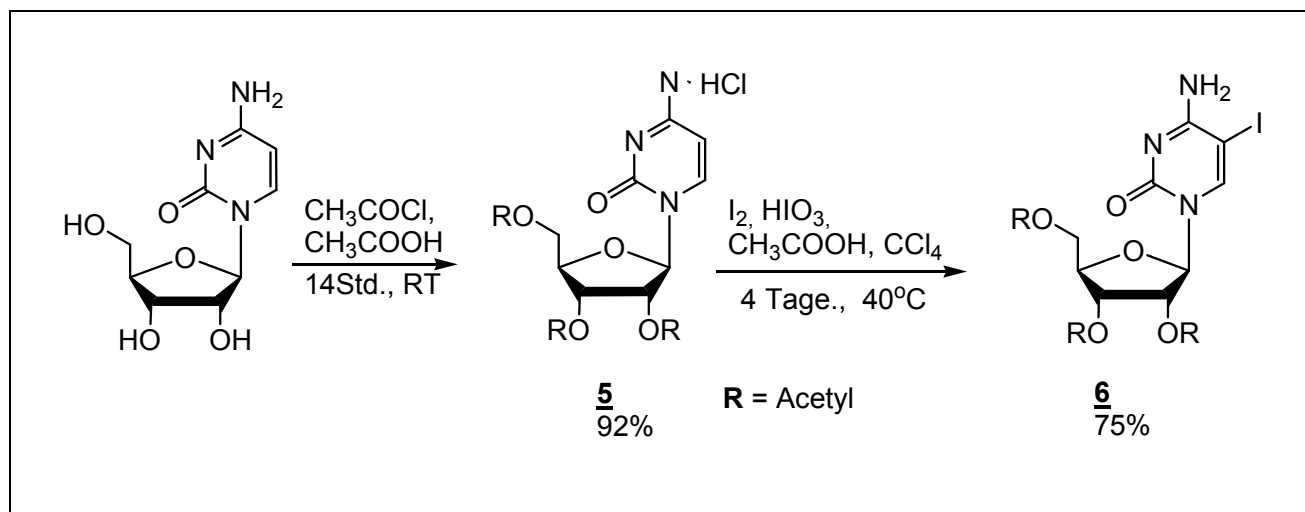


Abbildung 5.13 : Synthese von 2', 3', 5'-Tri-O-Acetyl-5-Iod-Cytidin 6

## 5.2.5 Entschützung von Acetylgruppen an der 5′-, 3′- und 2′-Position

Zur weiteren Schützung der 5′- und 2′-Position und Phosphoramidierung der 3′-Position wird die Entschützung der Acetylgruppen benötigt.

Eine Methode ist eine Benutzung von ammoniakalischem Methanol, das durch Einleiten von Ammoniakgas in Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  hergestellt wird<sup>108</sup>. Vorteile dieser Methode sind die hohe Ausbeute und keine Nebenreaktion. Aber die Aufreinigung durch Säulenchromatographie des entschützten Nucleosides ist unmöglich, weil Acetamid während der Reaktion entsteht. Um das Problem zu überwinden, wurde die mit Natriummethanolat in Methanol benutzte andere Methode eingeführt<sup>109</sup> (Abbildung 5.14). Die Aufreinigung durch Säulenchromatographie ist einfach und effektiv.

Die Nucleoside wurden in Methanol gelöst und nach Zugabe von Natriumethoxid 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten Nucleoside 5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **8**, 5-Iod-Cytidin **13** mit einer Ausbeute von 56.7% und 94% isoliert werden.

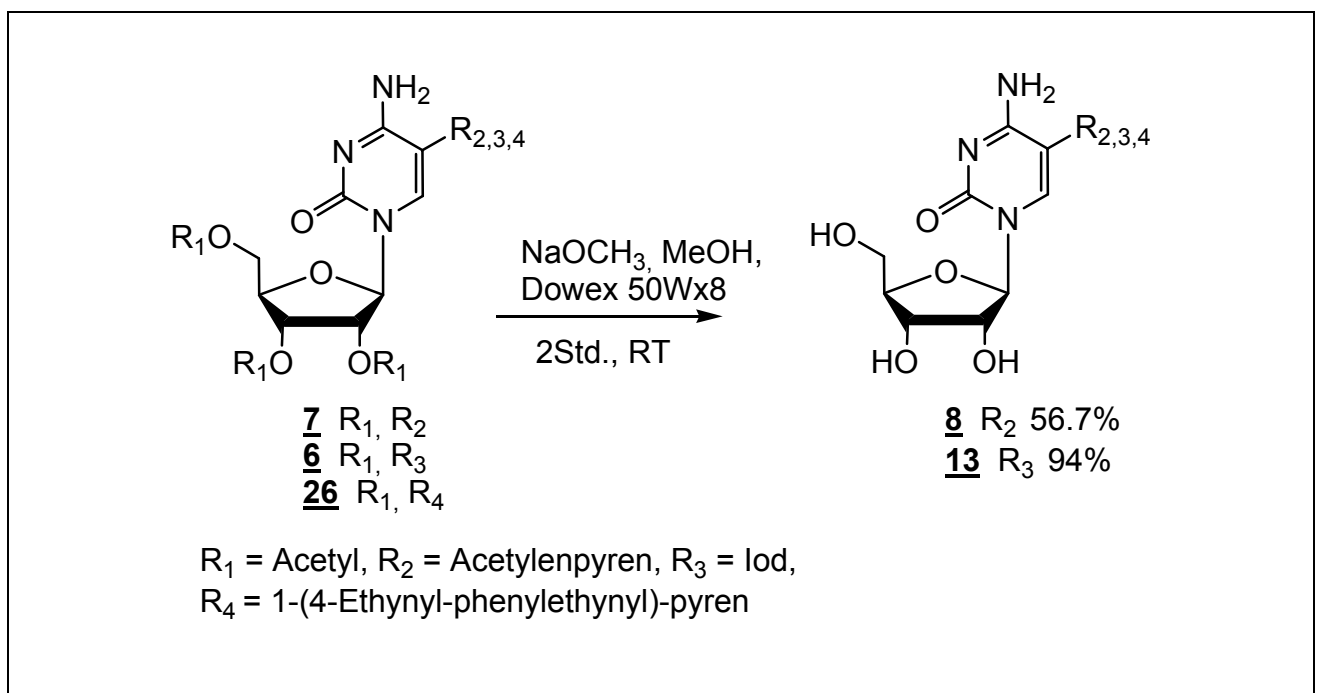


Abbildung 5.14 : Entschützung von Acetylgruppen an der 5′-, 3′- und 2′-Position

## 5.2.6 Einführung der Amino-Schutzgruppe

Damit das ungeschützte Nucleosid mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl) geschützt werden kann, muß die Aminogruppe von der Nucleobase geschützt werden. Es beruht darauf, daß die Aminogruppe auch als 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe<sup>110-115</sup> hergestellt werden kann. N,N-Dimethylformamidin-Schutzgruppe zählt zu den bekannten Amino-Schutzgruppen (Abbildung 5.15).

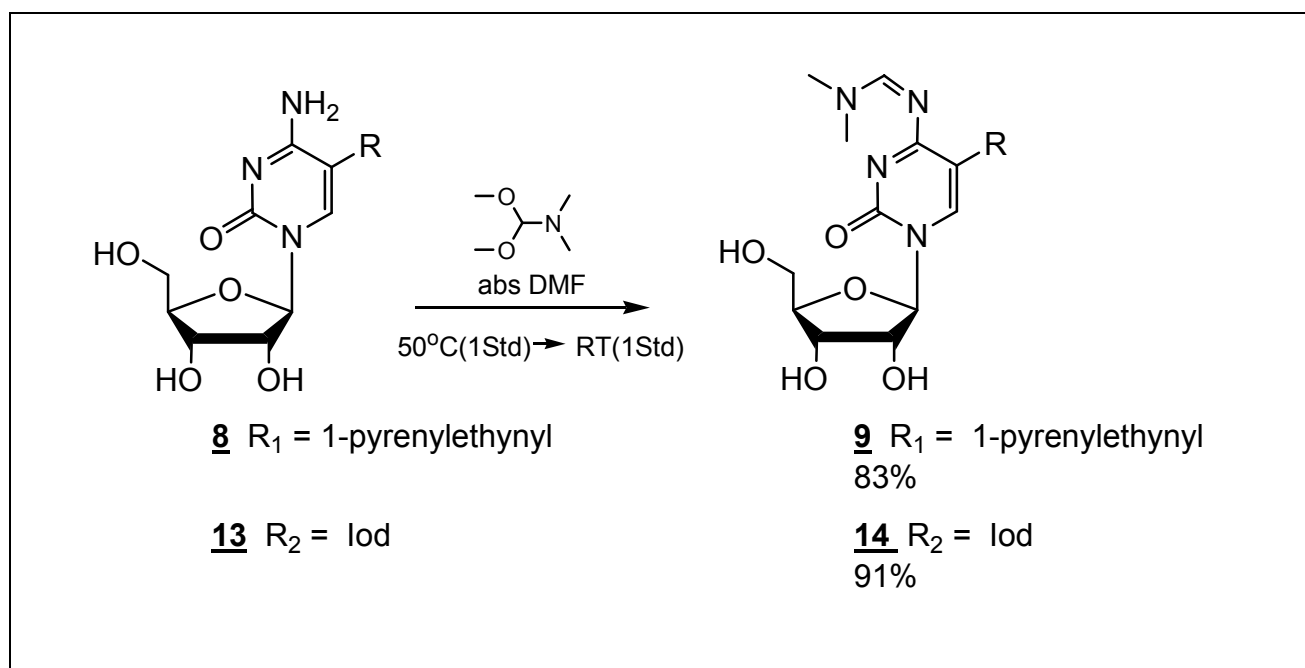


Abbildung 5.15 : Synthese von Nucleoside **9** und **14**

Ungeschützte Nucleosid **8** und **13** wurden in abs N,N-Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe von N,N-Dimethylformamid-dimethyl acetal 2 Stunden bei 50°C gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten Nucleoside **9** und **14** mit einer Ausbeute von 83% und 91% isoliert werden.

## 5.2.7 Einführung der Dimethoxytriphenylmethyl-Gruppe an der 5'-Position

Zur Phosphoramidierung der 3'-Position wird eine Schutzgruppe in der 5'-Position benötigt. Die Voraussetzung der Schutzgruppe ist, daß die Schutzgruppe bei den DNA- / RNA-Synthesen leicht abgespalten werden kann und eine höhere Selektivität zur 5'-





Aufreinigung. Zur Überwindung der Probleme wird eine neue und geeignete 2'-OH Schutzreagenz benötigt. Bei der 2-Cyanoethyl chlormethyl ether (CEM-Cl)<sup>117</sup> handelt es sich um eine neuartige Schutzgruppe (Abbildung 5.17).

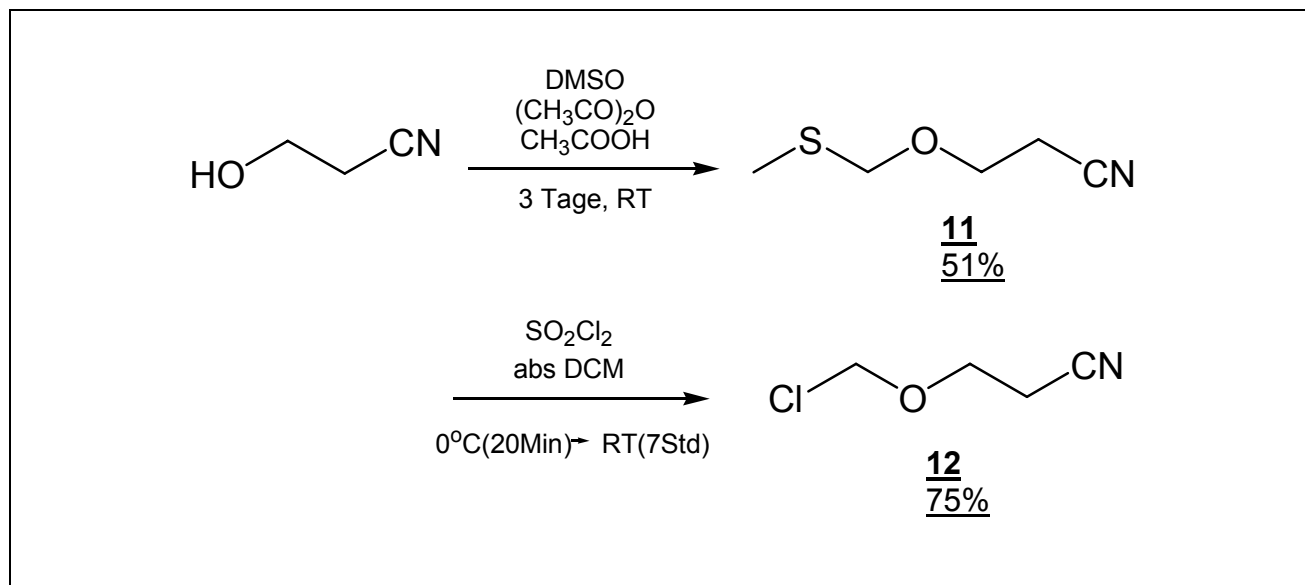


Abbildung 5.17 : Synthese von 2-Cyanoethyl chlormethyl ether (CEM-Cl) **12**

Verbindung **11** wurde durch Pummerer Reaktion synthetisiert. 3-Hydroxy-propionitril wurden in Dimethylsulfoxid gelöst, nach Zugabe von Essigsäure und Essigsäureanhydrid 3 Tage gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Destillation konnte Verbindung **11** mit einer Ausbeute von 51% isoliert werden. Die Darstellung erfolgt durch Lösen der Verbindung **11** in Dichlormethan und Zugabe von Sulfurylchlorid bei 0°C. Anschließend wird auf Raumtemperatur erwärmt und 7 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Destillation konnte Verbindung **12** mit einer Ausbeute von 75% isoliert werden.

### 5.2.9 Einführung von 2-Cyanoethoxymethyl(CEM)-Schutzgruppe an der 2'-Position

Während der Festphasensynthese von RNA wird eine stabile Schutzgruppe an der 2'-OH Position benötigt. Tert-Butyldimethylsilyl(TBDMS)<sup>118,119</sup> ist bis zum heutigen Tagen eine der gängigsten 2'-OH Schutzgruppe.

Bei dem mit Tert-Butyldimethylsilyl(TBDMS) geschützten Nucleosiden treten folgende Probleme auf:

1. Die Wanderung der TBDMS-Schutzgruppe
2. geringe Ausbeute durch der Isomerisierung von 2'- und 3'-Position und sterische Hinderung von 5'-Schutzgruppen und Nukleobase
3. Die Schwierigkeit der Aufreinigung durch Säulenchromatographie
4. relativ lange Kupplungszeiten
5. teure Reagenzien

Zur Überwindung des Problems wird eine neue und geeignete 2'-OH Schutzgruppe benötigt. Bei der 2-Cyanoethoxymethyl(CEM)-Schutzgruppe<sup>117</sup> handelt es sich um eine neuartige Schutzgruppe, die für die Darstellung von RNA Phosphoramiditen verwendet wird (Abbildung 5.10). Diese neue 2'-Schutzgruppe unterbindet effektiv die Probleme von TBDMS in Nukleosiden. Sie weist mehrere Vorteile gegenüber der für RNA standardmäßig verwendeten TBDMS-Schutzgruppe auf.

Die Vorteile von CEM- Schutzgruppe sind:

1. Keine Wanderung
2. Die erleichterte Aufreinigung durch Säulenchromatographie
3. Das Minimum der sterischen Hinderung (Durch die Verknüpfung über eine sterisch kleine und flexible Methyleinheit wird die sterische Abschirmung des 3'-O-Phosphoratoms deutlich reduziert.)
4. relativ kurz Kupplungszeiten
5. billiges Reagenz

Die Darstellung<sup>120,121</sup> erfolgt durch lösen des zu schützenden Nukleosids **15** in 1,2-Dichlorethan und Zugabe von Diisopropylethylamin und Dibutylzinndichlorid. Anschließend wird auf 70°C erwärmt und 2-Cyanoethyl chloromethyl ether(CEM-Cl) zugesetzt . Nach einer Stunde bei 70°C wird die Reaktion beendet und beide Isomere isoliert. Es wurden 49 % des 2'-geschützten Isomeren und 28 % des 3'-geschützten Isomeren erhalten.

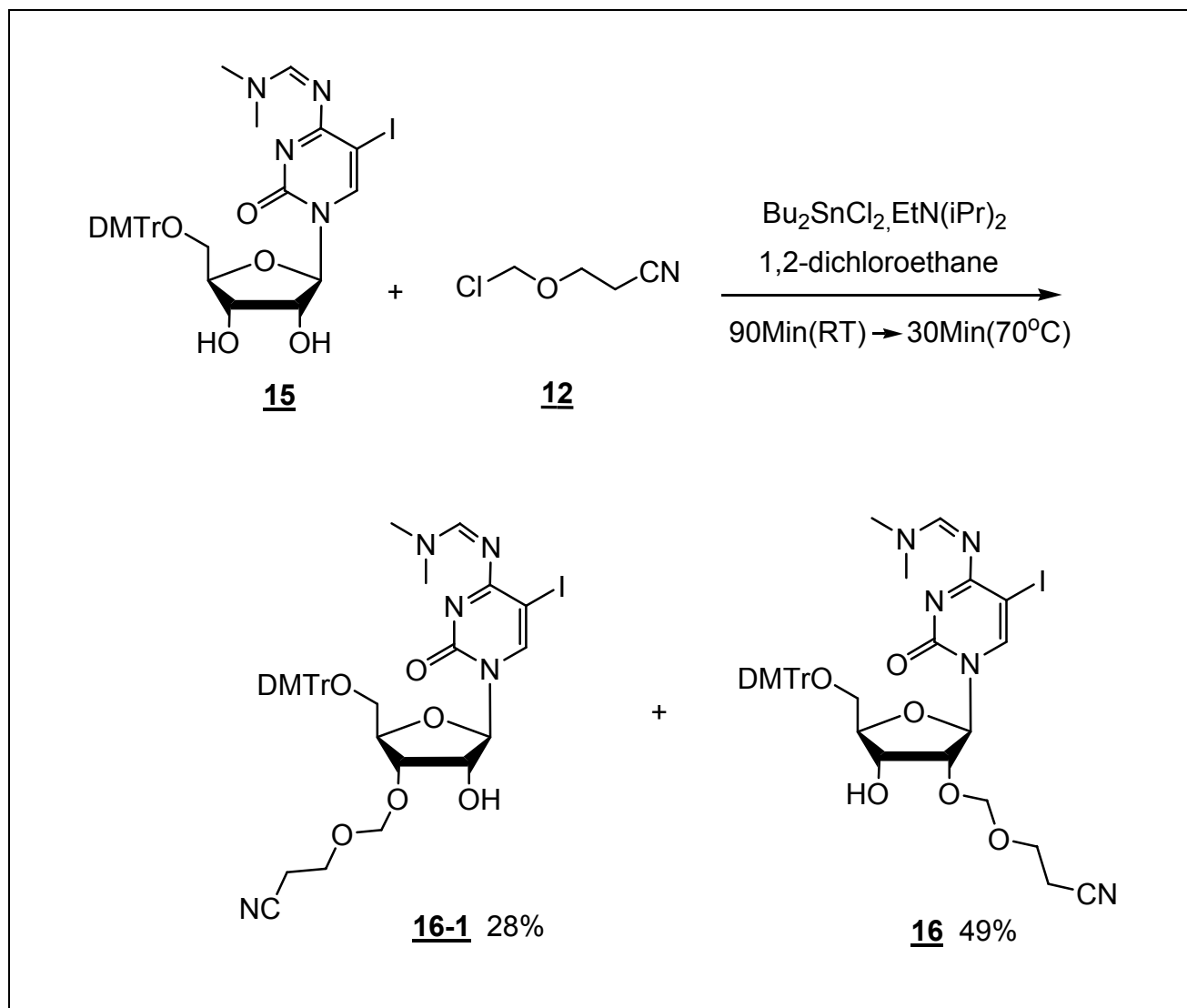


Abbildung 5.18 : Synthese von Nucleoside **16** und **16-1** mit 2-Cyanoethoxy methyl (CEM)-Schutzgruppe an der 2'-Position

### 5.2.10 Synthese von Alkynyl-Nucleosiden

Um Alkynyl-Nucleoside mit terminalen Acetylenen effektiv zu synthetisieren<sup>51,79,81,122-124</sup>, führt man die Sonogashira-Reaktion ein, da milde Bedingungen bei der Reaktion von Nucleosid benötigt werden.

Zur optimalen Synthese ist die Iod- Verbindung besser als die Brom-Verbindung.

Der Grund ist, daß nur Iod-Verbindungen als Edukt durch Sonogashira-Reaktion bei Raumtemperatur reagieren. Aber wegen der geringeren Reaktivität werden Brom-Verbindungen bei zwischen 40 und 60°C umgesetzt. Bei höheren Reaktionstemperaturen werden Nebenprodukte wie Acetylendimere beobachtet.

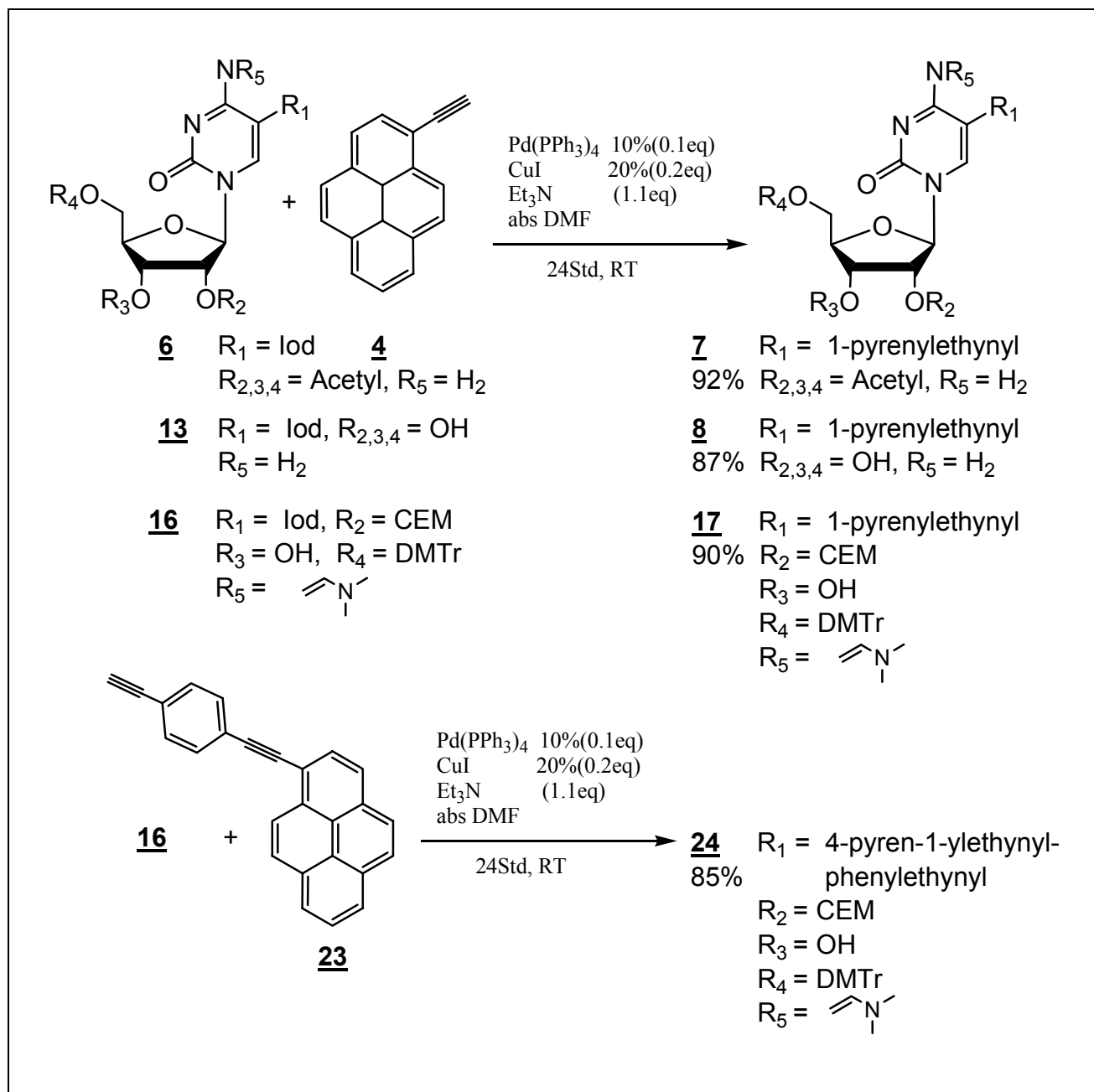


Abbildung 5.19 : Synthese von Alkynyl-Nukleoside **7**, **8**, **17** und **24**

Nukleoside **6**, **13** und **16** wurden in abs N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst, nach Zugabe von Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium, Kupfer(I)iodid, Triethylamin und Alkynyl-Verbindung 50 oder 71 24 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten Nukleoside **7**, **8**, **17** und **24** mit einer Ausbeute von 92%, 87%, 90% und 85% isoliert werden.

In Tabelle 5.1 sind die Verbindungen von **7**, **8**, **17** und **24** zusammengefasst.



Nr.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Ausbeute
7	1-pyrenylethynyl	Acetyl	Acetyl	Acetyl	H <sub>2</sub>	92 %
8	1-pyrenylethynyl	OH	OH	OH	H <sub>2</sub>	87 %
17	1-pyrenylethynyl	CEM	OH	DMTr		90 %
24	4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl	CEM	OH	DMTr		85 %

Tabelle 5.1 : Funktions- oder Schutzgruppen an der 2′-, 3′-, 5′- und 5-Position und Ausbeute von Nukleosiden 7, 8, 17 und 24

### 5.2.11 Einführung der 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit - Gruppe an der 3′-Position

Zur erfolgreichen Festphasensynthese von DNA und RNA werden Nukleoside benötigt, die mit 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit<sup>117,120,125</sup> an der 3′-Position modifiziert werden. 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit ist das Standard-Phosphitylierungsreagenz für DNA und RNA Phosphoramiditbausteine (Abbildung 5.20). Bei der Synthese ist auf Trockenheit aller Lösungsmittel und Reagenzien und auf Ausschluß von Sauerstoff zu achten. Die 2′- und 5′-geschützten Nukleoside werden in eine Mischung von Dichlormethan und Acetonitril im Verhältnis 1 zu 1 gelöst, mit N,N-Ethyldiisopropylamin versetzt, auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit werden weitere 10 Minuten bei dieser Temperatur, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Zur Vermeidung der Bildung von H-Phosphonaten wird kurze Reaktionszeit bei Raumtemperatur benötigt. Die als zwei Diastereomere synthetisierten Phosphoramidite 18 und 25 werden nach einer kurzen Säulenchromatographie erhalten. Aber die Isomere müssen mittels einer Säulenchromatographie nicht getrennt werden. Die Isomere können in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Die Ausbeuten der Phosphoramidite 18 und 25 waren mit 47% und 58%. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte sowohl über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie als auch über <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie.

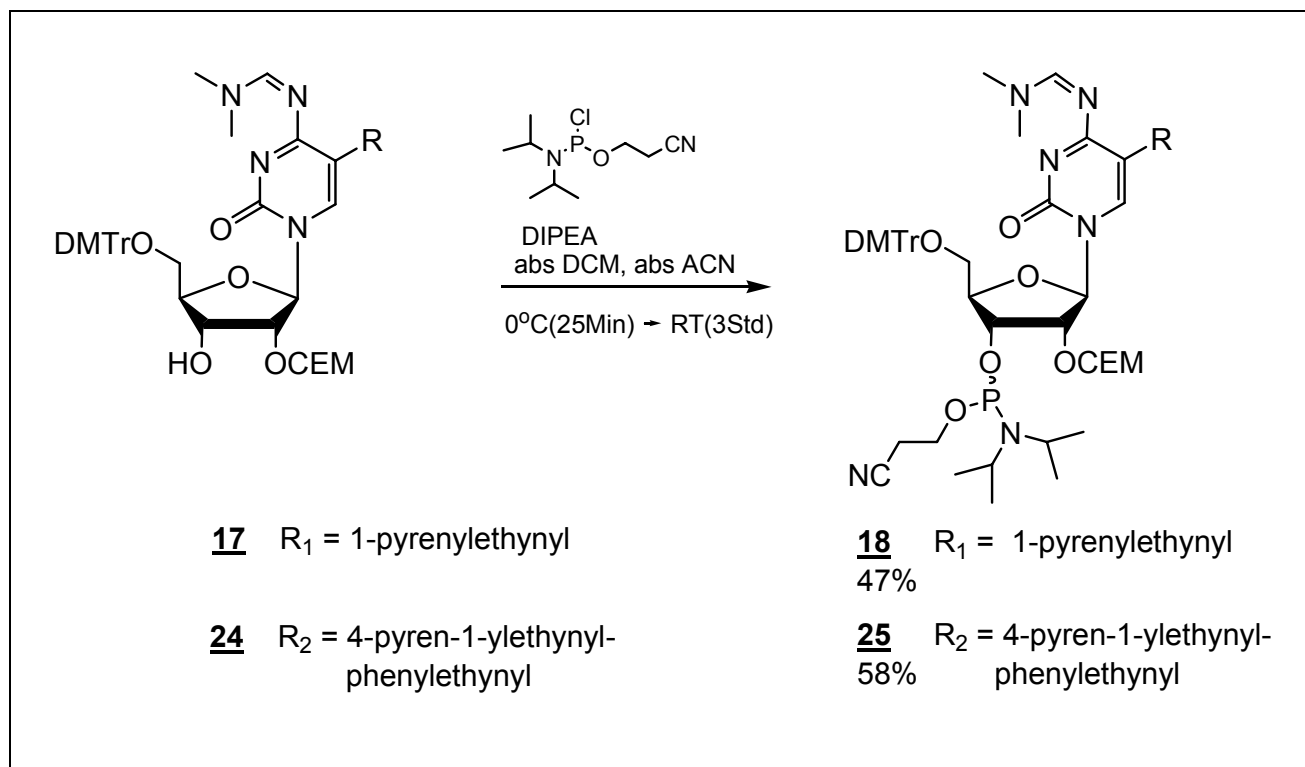


Abbildung 5.20 : Synthese von Phosphor-Verbindungen **18** und **25**

## 5.2.12 Syntheseübersichten

Abbildung 5.21 und Tabelle 5.2 zeigt die Syntheseübersicht des 1-Ethynyl-pyren **4**

Abbildung 5.22 zeigt die Syntheseübersicht des 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren **23**

Abbildung 5.23 zeigt die Syntheseübersicht des 2-Cyanoethylchlormethylether **12**

Abbildung 5.24 zeigt die Syntheseübersicht des <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **10**

Abbildung 5.25 zeigt die Syntheseübersicht der Phosphoramidit-Verbindungen : <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)- Diisopropylphosphoramidite] **18** und <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)- Diisopropylphosphoramidite] **25**

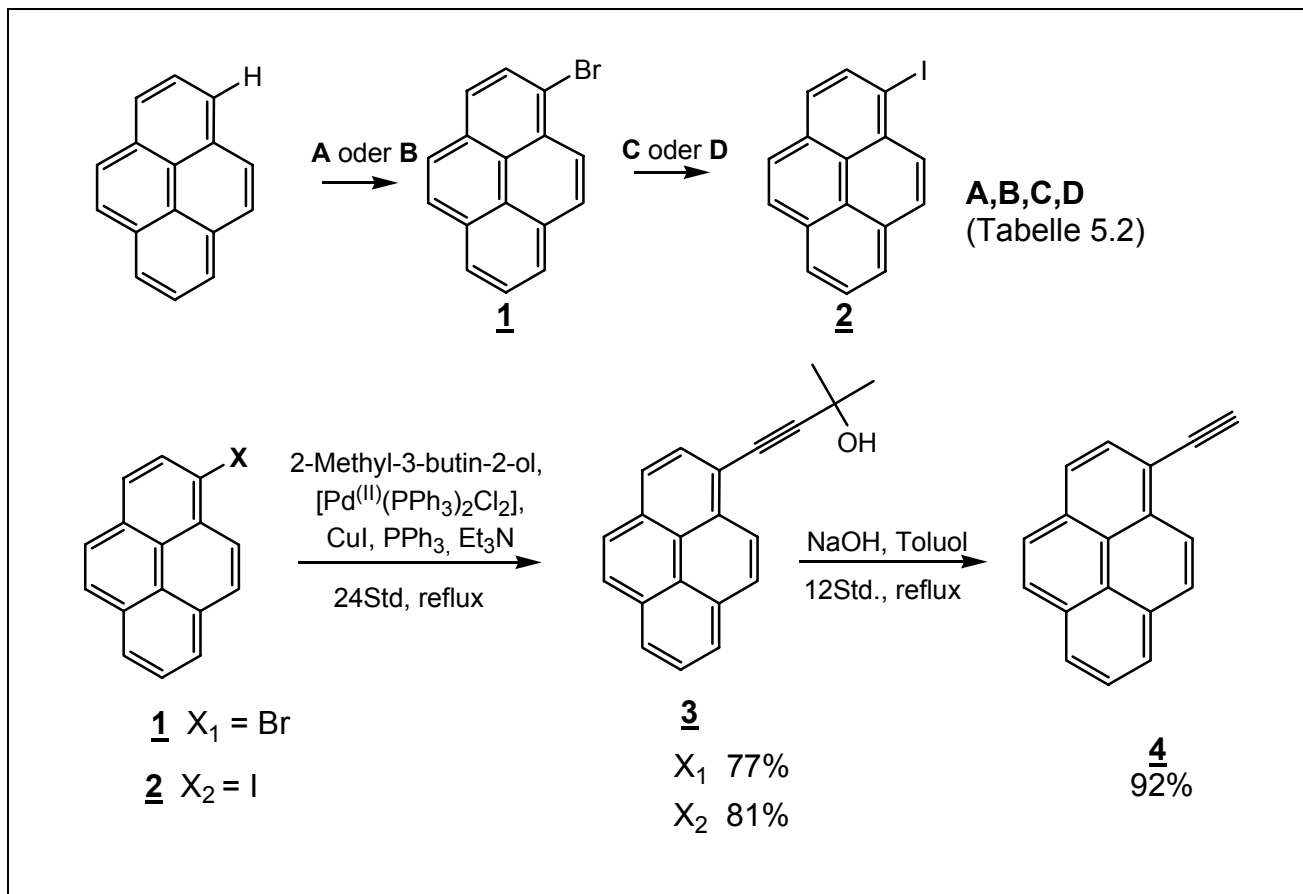


Abbildung 5.21 : Synthese des 1-Ethynyl-pyren **4**

Verbindung	Methode	Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur und Reaktionszeit	Ausbeute
1	A	NBS	DMF	24Std., RT	60%
1	B	HBr, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1:1-Gemische MeOH und Ether	17Std., 0°C RT	93%
2	C	CuI, KI	HMPT	7Std., 150°C	69%
2	D	KI, I <sub>2</sub>	DMF	24 Std., 150 °C	47%

Tabelle 5.2 : synthetische Methoden für 1-Bromo-pyren **1** und 1-Iod-pyren **2**



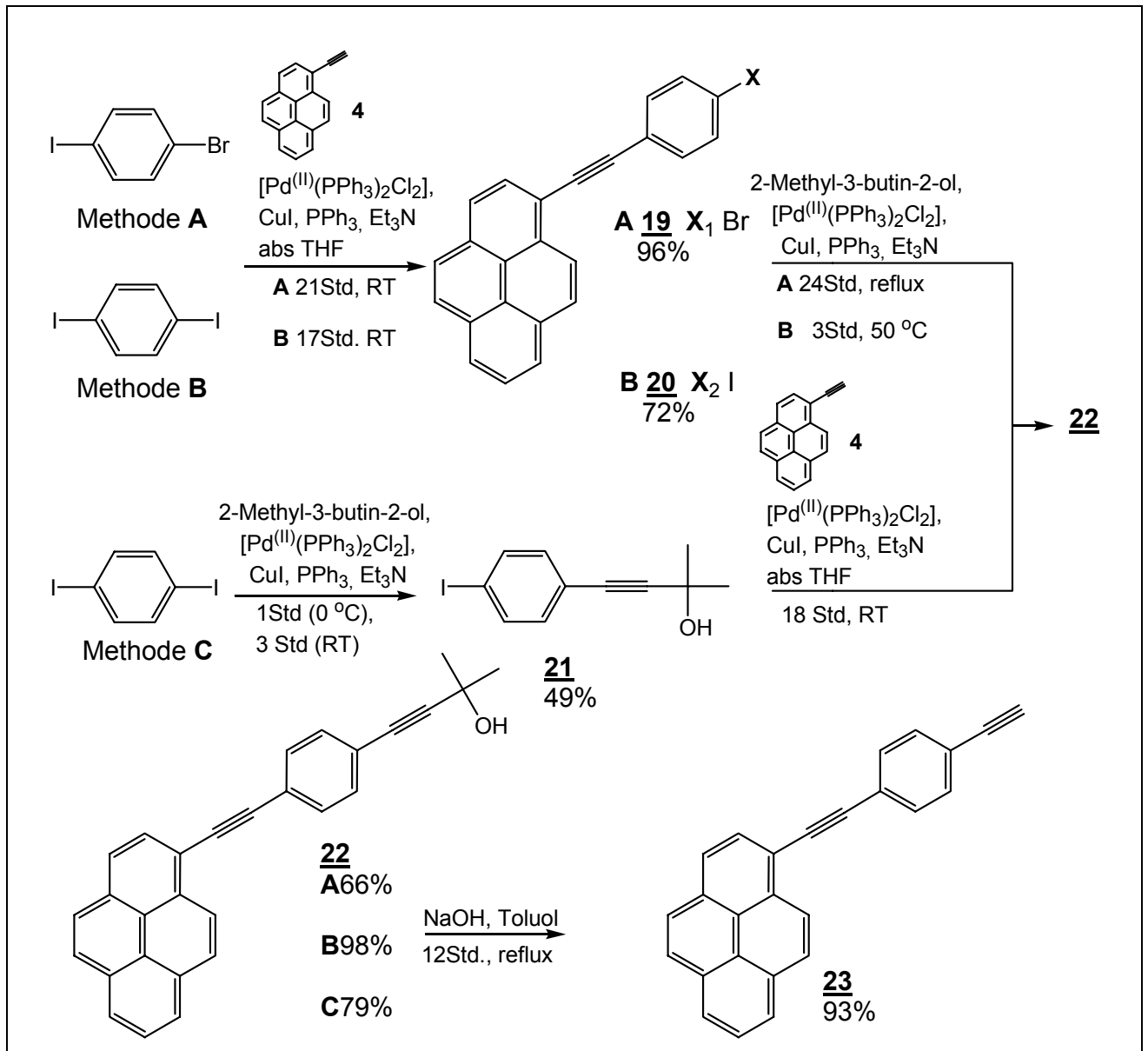


Abbildung 5.22 : Synthese des 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren **22**

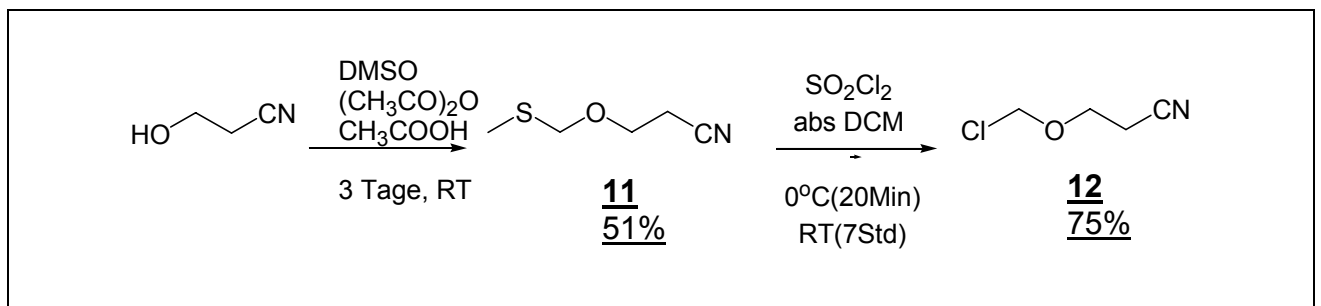


Abbildung 5.23 : Synthese des 2-Cyanoethylchloromethylether **12**

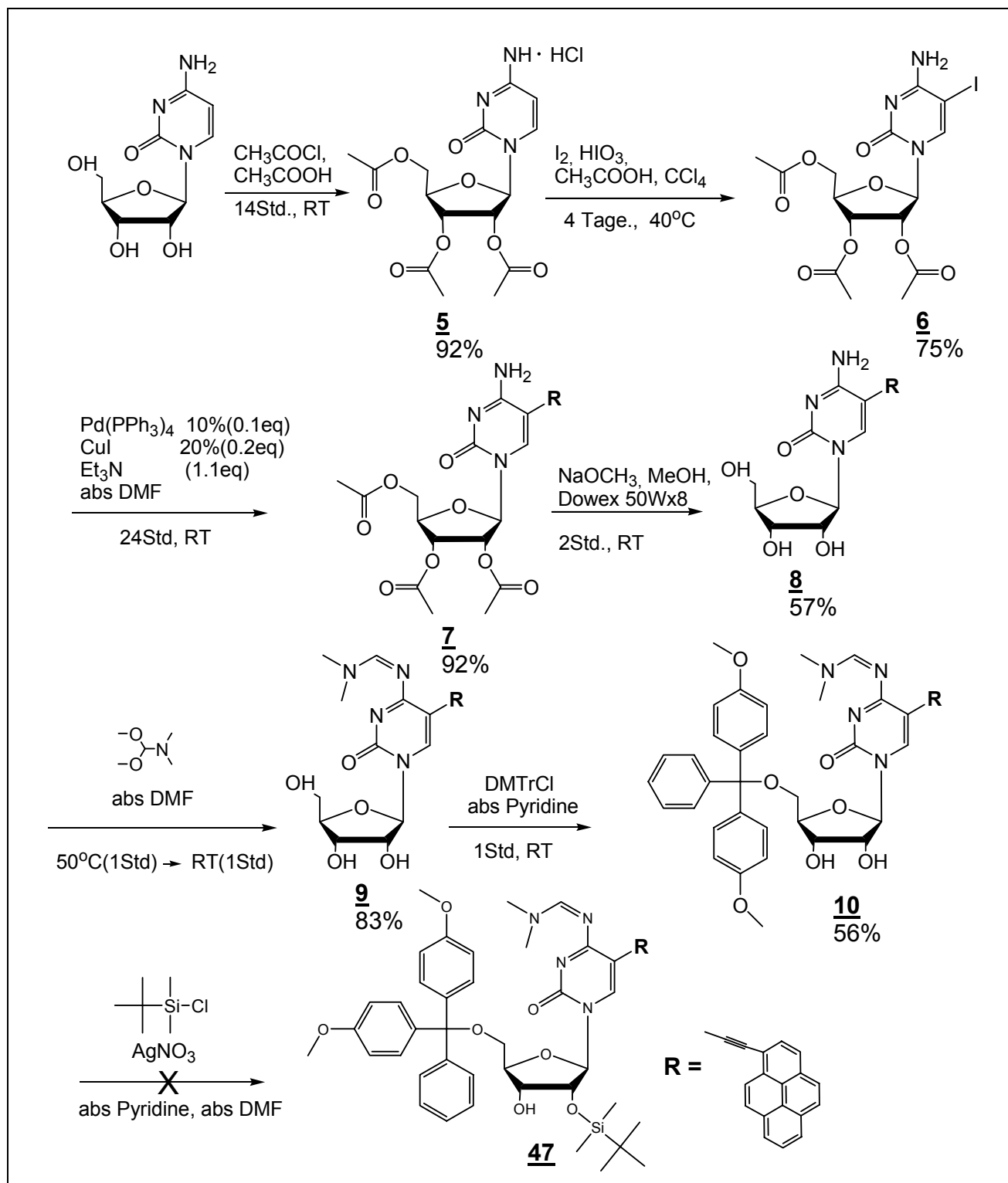


Abbildung 5.24 : Synthese des <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **10**

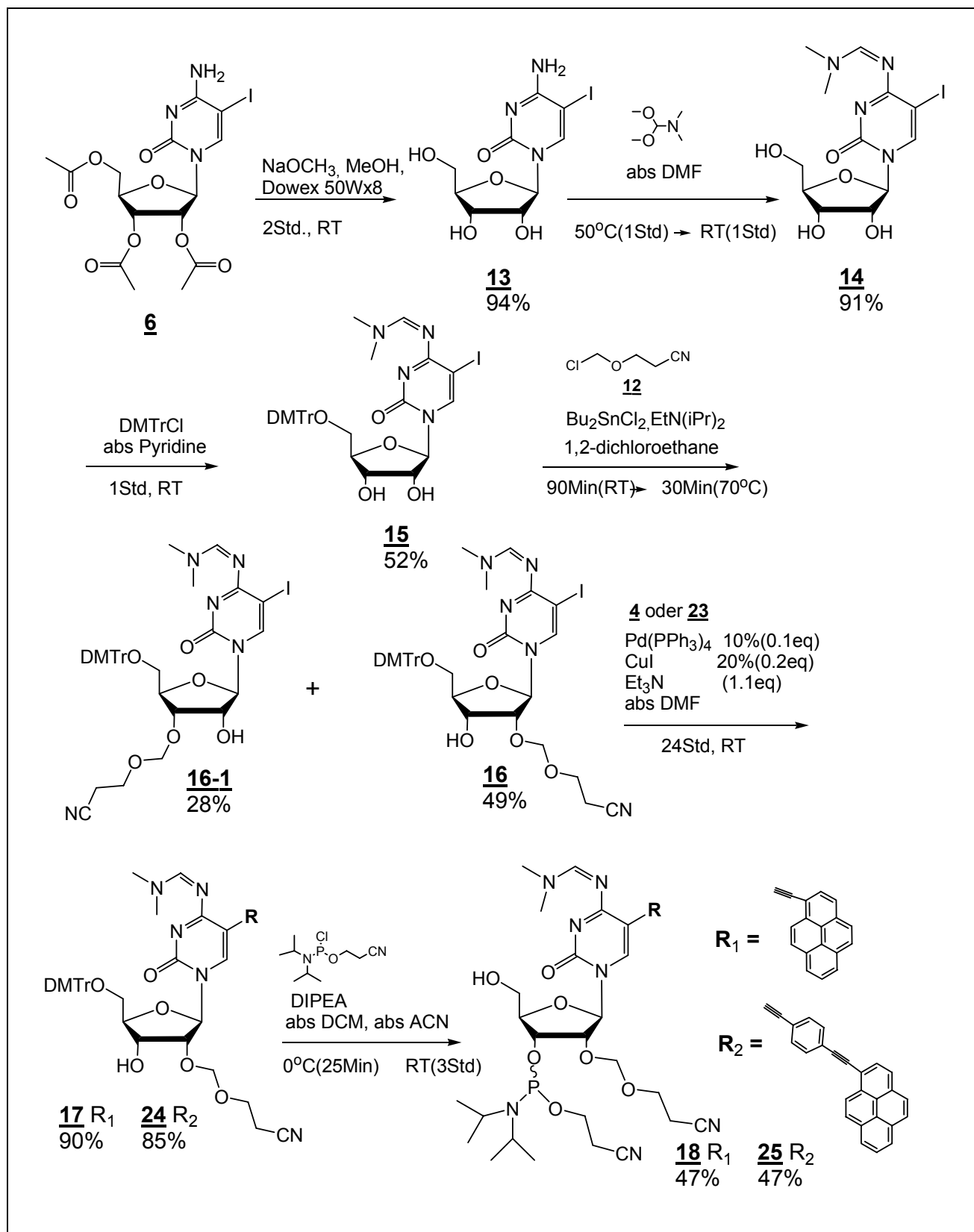


Abbildung 5.25 : Synthese der Phosphoramidit-Verbindungen **18** und **25**

## 5.3 Synthese von RNA-Oligonukleotiden

### 5.3.1 Synthese von RNA-Oligonukleotiden ohne oder mit einfachem Einbau modifizierter Nucleotide

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode an Modell Expedite 8909 Synthesizer von PerSeptive Biosystem hergestellt. Als Trägermaterial wurde CPG-Träger mit einer Porengröße von 500 Å im 1 µmol Maßstab eingesetzt. Die Standardnucleosidphosphoramidite und Synthesereagenzien (siehe Chemikalienliste) sind kommerziell erhältlich. Als Aktivator wurde 4,5-Dicyanoimidazol (DCI Aktivator) eingesetzt. Die Standardkupplungszeiten der 10 Minuten für RNA-Bausteine wurde für alle modifizierten Nucleotide übernommen. Bei der Festphasensynthese von allen Oligonukleotiden wurde die Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMTr) des finalen Baustein abgespalten. Abbildung 5.26 zeigt Abkürzungen für die in RNA eingebauten modifizierten Nucleotide.

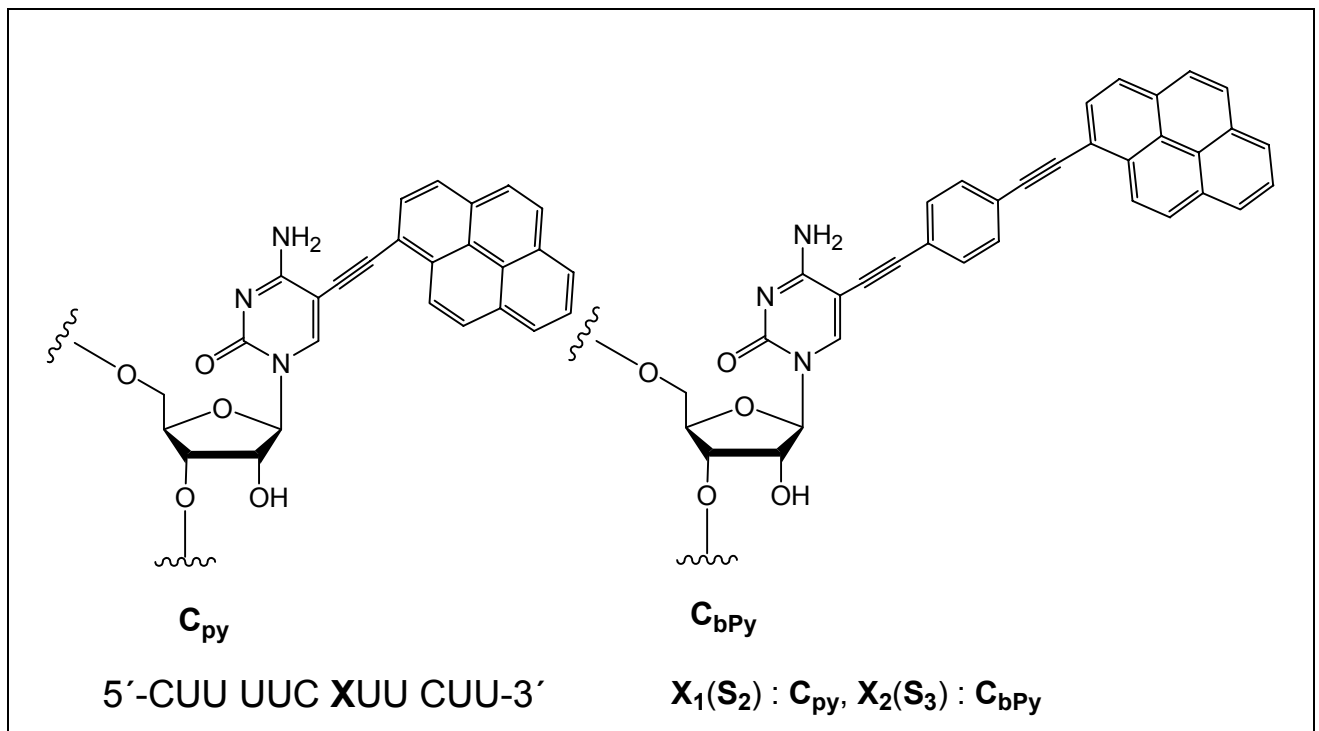


Abbildung 5.26 : Abkürzung und Sequenz des modifizierten Nucleotides **S<sub>2</sub>** und **S<sub>3</sub>** für die RNA-Synthese

In dieser Arbeit wurden nur RNA Oligonukleotide untersucht, die Duplexe bilden können. Uridin-reicher Strang und Adenosin-reicher Gegenstrang wurden synthetisiert. Alle anderen Stränge gleichen diesen beiden in ihrer Sequenz mit Ausnahme der in der Mitte der Stränge befindlichen Stelle, wo die modifizierten Nukleotide eingebaut werden. (Tabelle 5.3)

Uridin reiche Stränge		Adenosin reiche Stränge	
<b><u>S1</u></b>	5'-CUU UUC CUU CUU-3'	<b><u>S4</u></b>	5'-AAG AAG GAA AAG-3'
<b><u>S2</u></b>	5'-CUU UUC C <sub>py</sub> UU CUU-3'	<b><u>S5</u></b>	5'-AAG AAA GAA AAG-3'
<b><u>S3</u></b>	5'-CUU UUC C <sub>bpy</sub> UU CUU-3'	<b><u>S6</u></b>	5'-AAG AAC GAA AAG-3'
		<b><u>S7</u></b>	5'-AAG AAU GAA AAG-3'

Tabelle 5.3 : Oligonukleotide ohne oder mit einfachem Einbau modifizierter Nukleotide

### 5.3.2 Aufreinigung von Oligonukleotiden

Nachdem das Oligonukleotid durch die Festphasensynthese synthetisiert worden ist, muss die Abspaltung vom CPG-Material, Entfernung der Schutzgruppen, Aufreinigung der Oligonukleotide und Entsalzung durchgeführt werden. Da Schutzgruppen an der 2'-Hydroxygruppe bei RNA vorkommen, ist die Methode zur Aufreinigung von RNA im Vergleich mit DNA nicht gleich. Die Methode zur Aufreinigung von DNA wird in Kapitel 6.3.2 beschrieben.

Die Aufreinigung von RNA ist in vier Teilschritten zu unterteilen.

1. Im ersten Schritt wird die Gemischlösung von Ammoniak und Ethanol (3:1) verwendet, um das CPG-Material abzuspalten. Die  $\beta$ -Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphat und die Schutzgruppe an den exocyclischen Aminogruppen von Nukleosid werden auch quantitativ abgespalten, während das CPG-Material vom Oligonukleotid abgespalten wird. Nach Filtration wird diese Oligonukleotid-Lösung in der SpeedVac bis zur Trockne eingeeengt.
2. Im zweiten Schritt werden zwei Methoden zur Entschützung von Schutzgruppen an der 2'-Hydroxygruppe verwendet. Zur Entschützung von TBDMS-Schutzgruppe wurde die erste Methode verwendet. 2-Cyanoethoxymethylschutzgruppe (CEM) wurde mit beiden Methoden entschützt.

-Die erste Methode<sup>126,127</sup>

Die Methode ist die Verwendung von gemischter Lösung (3eq *N*-Methyl-2-pyrrolidon, 1,5eq Triethylamin und 2eq Triethylamin-Trihydrofluorid-Lösung). Das Oligonukleotid wurde mit 300µl dieser Lösung versetzt, 1,5 Stunden bei 65°C inkubiert und bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 1.2ml *n*-Butanol wurde die Reaktionslösung 30 Minuten bei -77 °C abgekühlt und 30 Minuten bei 0 °C und 12000..rpm..zentrifugiert.

-Die zweite Methode

Die Methode ist die Verwendung von Lösung (1M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in THF, 10% *n*-Propylamin und 1% 2-Mercaptoethylether). Das Oligonukleotid wurde mit 2,5ml dieser Lösung versetzt und 8 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2,5ml sterilem TRIS-Puffer (pH 8,0) wurde diese Oligonukleotid-Lösung in der SpeedVac bis zur Trockne eingeengt. Wegen des sehr salzhaltigen Oligonukleotides wurde es mittels Sephadex G25-Säulen entsalzt und in der SpeedVac evaporiert.

3. Im dritten Schritt wurde das entschützte Oligonukleotid mittels Anionenaustauscher-HPLC aufgereinigt. In Kapitel 9.3.3.1 wird diese Aufreinigung beschrieben.
4. Im vierten Schritt wurde das mittels Sephadex G25-Säulen entsalzt.

Die unmodifizierten Oligonukleotide wurden mittels der ersten Methode ganz entschützt (Abbildung 5.27). Aber nach der Entschützung mit beiden Methoden wurde noch die 2-Cyanoethoxymethylschutzgruppe vorkommende und entschützte Oligonukleotide **S2** und **S3** bei der HPLC-Aufreinigung detektiert (Abbildung 5.28 und 29). Die CEM-schutzgruppe konnte durch beide Methoden nicht ganz entschützt werden.

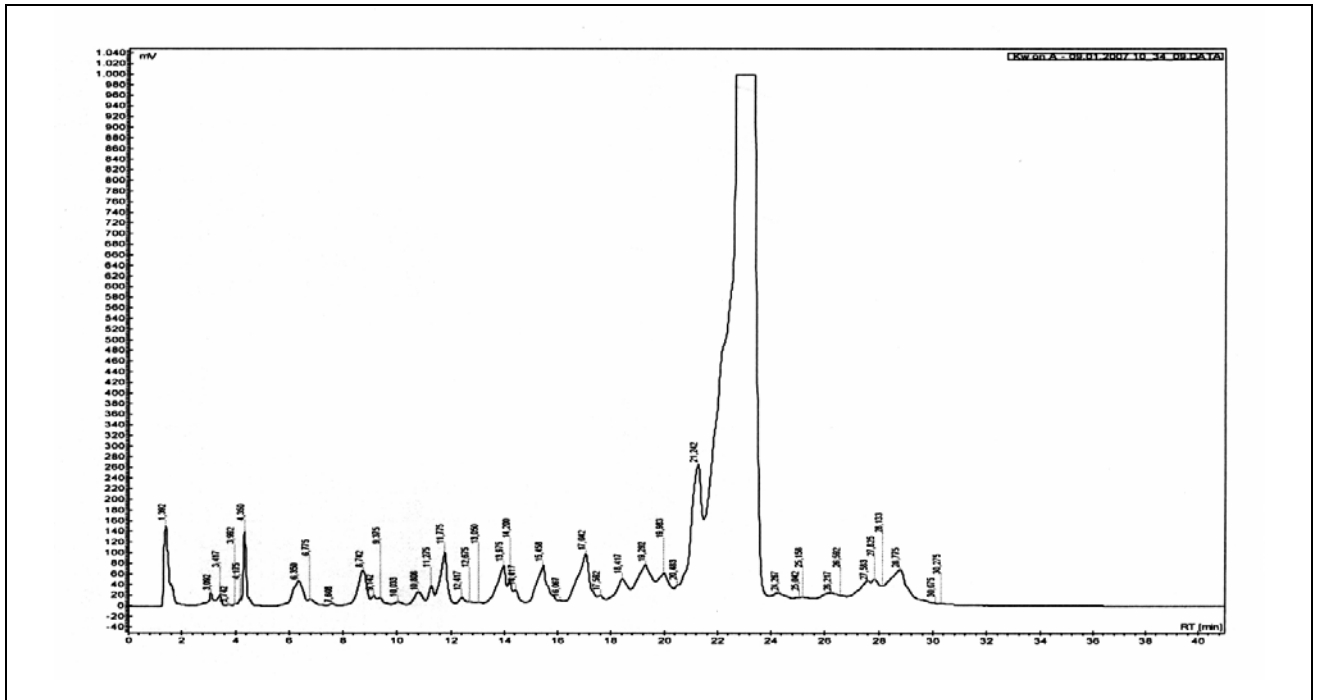


Abbildung 5.27 : Chromatogramm von Anionenaustauscher-HPLC **S5** nach Synthese und Entschützung

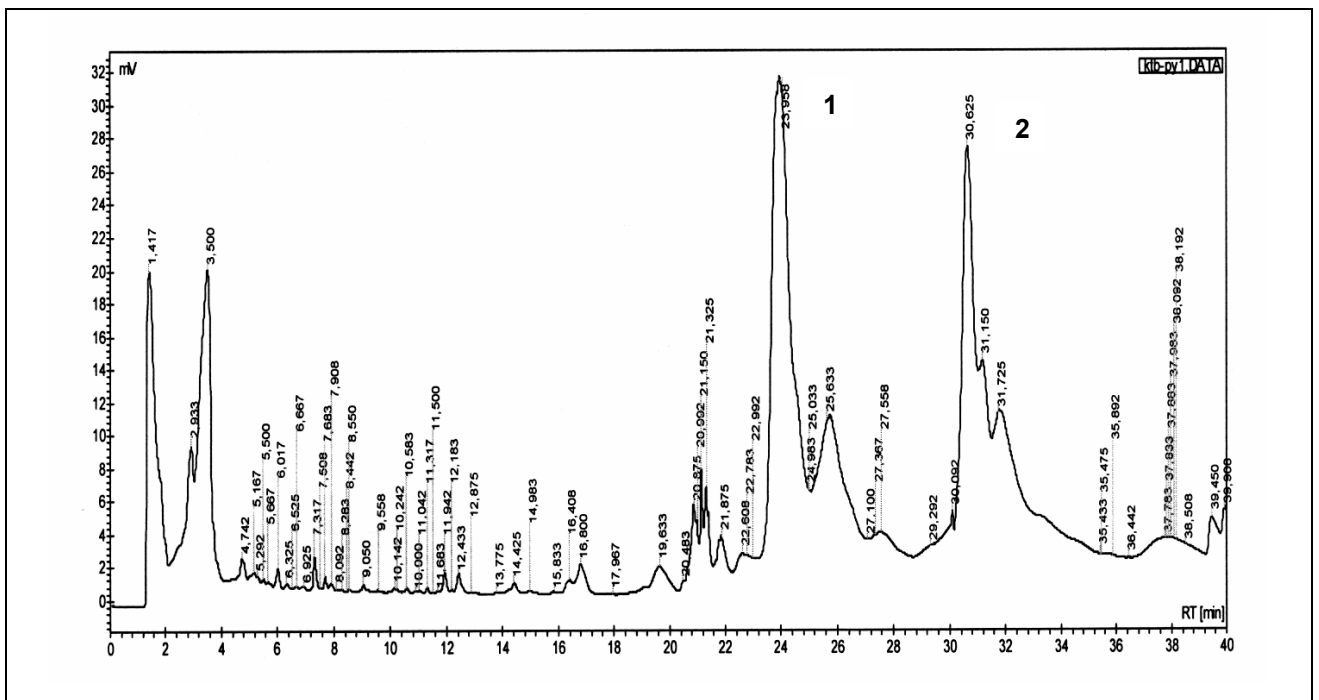


Abbildung 5.28 : Chromatogramm von Anionenaustauscher-HPLC **S2** nach Synthese und Entschützung, **1** : das entschützte Oligonukleotid, **2** : das partiell geschützte Oligonukleotid

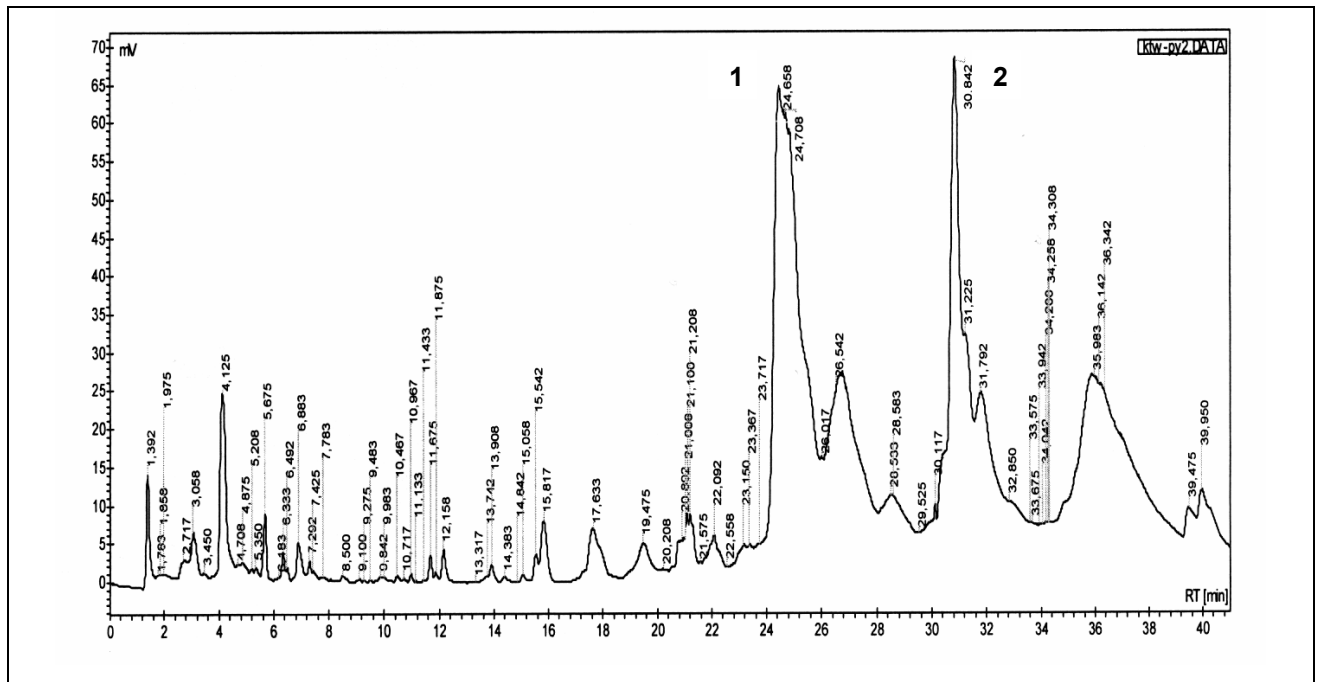


Abbildung 5.29 : Chromatogram von Anionenaustauscher-HPLC **S3** nach Synthese und Entschützung, **1** : das entschützte Oligonukleotid, **2** : das partiell geschützte Oligonukleotid

### 5.3.3 Charakterisierung von Oligonukleotiden

#### 5.3.3.1 Massenspektroskopie an mono- und unmodifizierten RNA 12meren

Zur Charakterisierung von hergestellten Oligonukleotiden wird die Massenspektrometrie eingesetzt.

Elektrospray-Ionisations-(ESI) und matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisations-(matrix-assisted desorption/ionisation, MALDI) Massenspektrometrie ermöglichen die unfragmentierte Massenbestimmung der Oligonukleotide mit hoher Empfindlichkeit. In dieser Arbeit wurden alle modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotide nur mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht.

- Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Bei dieser Methode wird die Probe in einem polaren und flüchtigen Lösungsmittel gelöst, durch eine Stahlkapillare geleitet und in einem elektrische Feld zerstäubt und ionisiert<sup>128</sup>.



Nach Entfernung von anhaftenden Lösungsmittelmolekülen durch einen warmen Gasstrom werden die Ionen aus der Atmosphärendruckquelle in das Hochvakuum des Massenspektrometers extrahiert.

Ein Problem bei der Massenspektrometrie von Oligonukleotiden ist die Anwesenheit von Salzen. Vor allem bildet Natrium Addukte mit dem negativ geladenen Rückgrat und stört den Ionisationsprozess. Zur Lösung des Problems tauscht man die Natriumionen gegen Ammoniumionen aus<sup>129</sup>. Der Grund ist, daß Ammonium im Hochvakuum in H<sup>+</sup> und Ammoniak dissoziiert.

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

Diese Methode ist durch eine sehr schonende Ionisation charakterisiert. Dadurch können die Molekulargewichte der sehr empfindlichen oder instabilen Moleküle ohne Fragmentierung gemessen werden<sup>130,131</sup>. Zudem wird die Probe mit einer Matrix im Überschuß kokristallisiert und mit einem IR- oder UV-Laserpuls im Hochvakuum des Spektrometers verschossen. Zunächst werden dabei die Matrixmoleküle angeregt. Die Matrixmoleküle für Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm sind 2,4,6-Trihydroxyacetophenon oder 3-Hydroxypicolinsäure. Die Probenmoleküle werden dabei durch Unterstützung der Matrixmoleküle mit der absorbierten Lichtenergie verdampft und ionisiert.

MALDI als gepulste Desorption-/Ionisationsmethode wird gewöhnlich mit einem Flugzeitmassenspektrometer (engl.: Time of flight, TOF) kombiniert, das die Ionen in einem elektrischen Feld mit der gleichen Energie beschleunigt und dann gemäß ihres Masse-/Ladungsverhältnisses zeitlich auftrennt.

Im Vergleich mit ESI-Massenspektrometrie ist MALDI weniger empfindlich gegenüber Salzkontaminationen der Probe.

In dieser Arbeit wurden die Massen von RNA-Oligonukleotiden nur mittels MALDI/TOF-Massenspektrometrie bestimmt<sup>132</sup>. Abbildung 5.30, zeigt das MALDI-Spektrum des unmodifizierten Stranges **S4** und Abbildung 5.31 und 32 zeigen die MALDI-Spektren der modifizierten Strängen **S2** und **S3**. In Tabelle 5.3 sind die berechneten und gefundenen Massen der synthetisierten RNA-Strängen angegeben.

Die unmodifizierten Stränge **S4-7** wurden in einer sehr hohen Reinheit erhalten. Bei dem MALDI-Spektrum des unmodifizierten Stranges **S3** wurde das Signal für das Natriumaddukt erkannt.

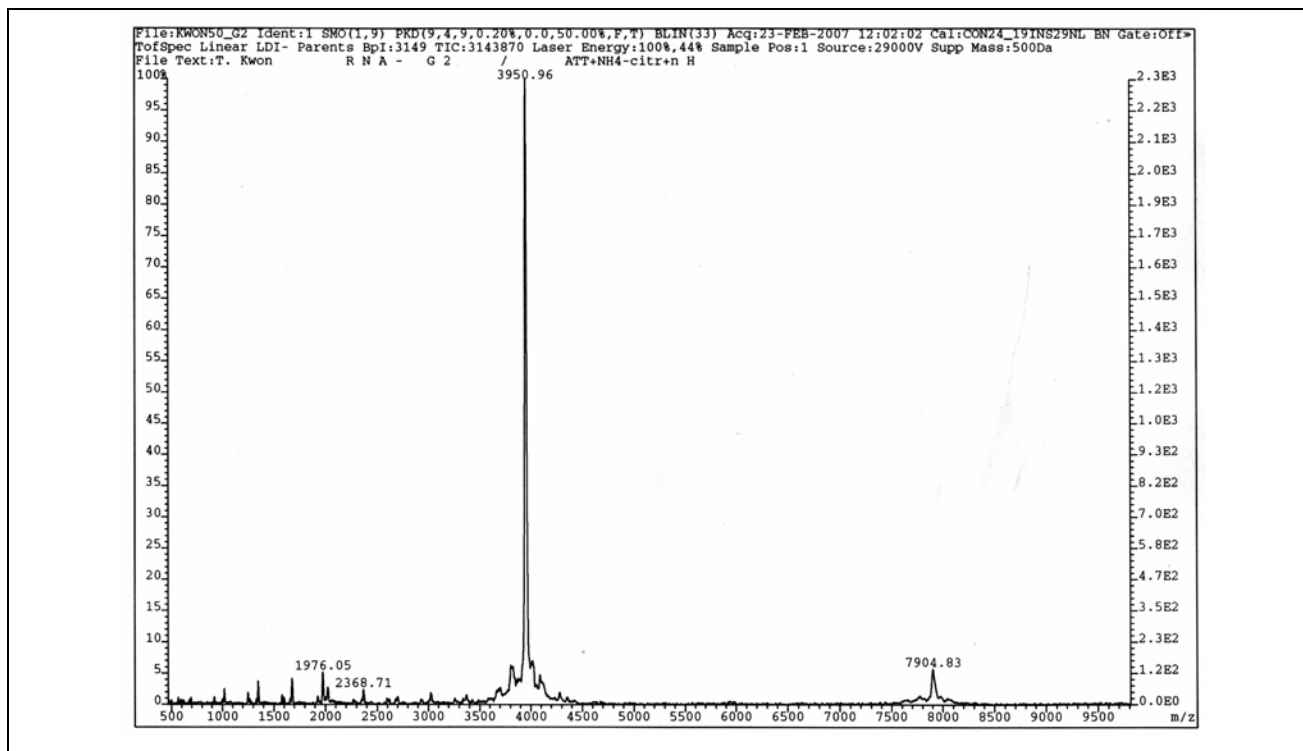


Abbildung 5.30 : MALDI-Spektrum des unmodifizierten RNA 12mers S4 (berechnete Masse : 3952,55 Dalton, gefundene Masse : 3950,96 Dalton)

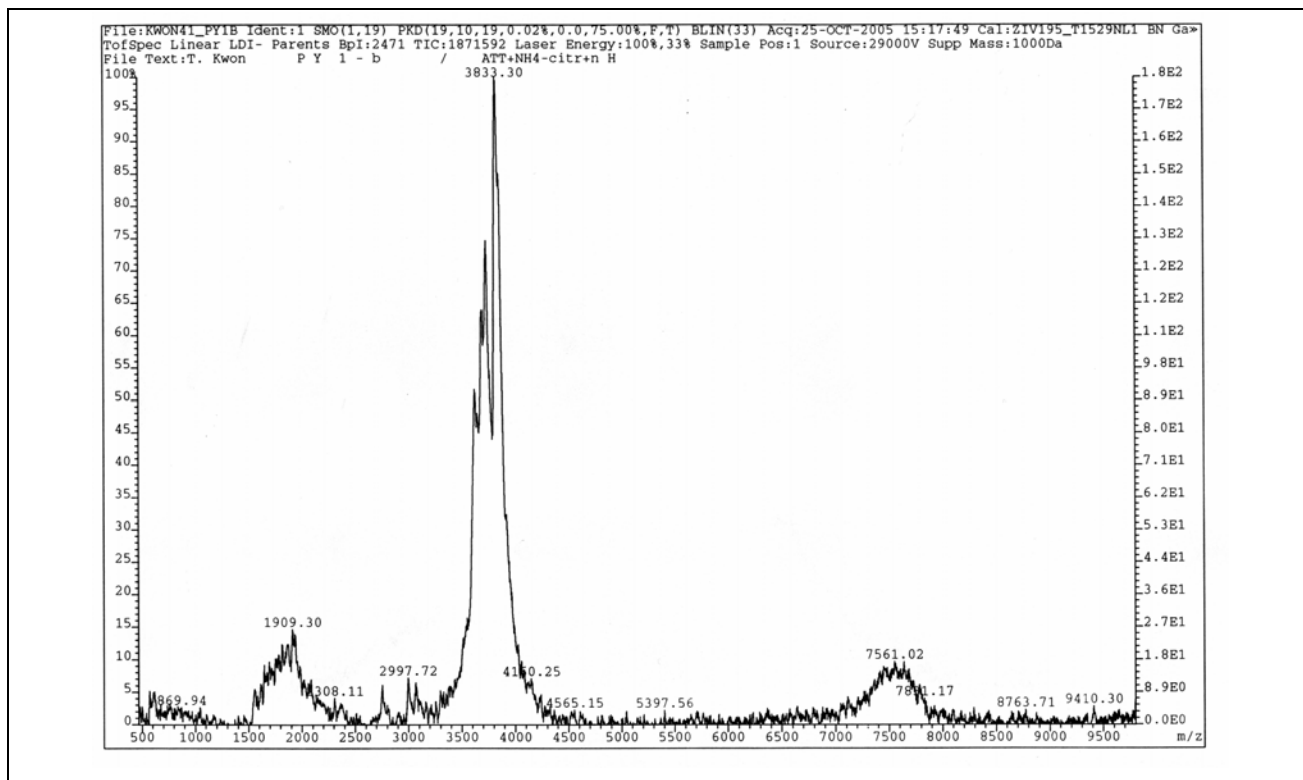


Abbildung 5.31 : MALDI-Spektrum des unmodifizierten RNA 12mers S2 (berechnete Masse : 3832,37 Dalton, gefundene Masse : 3833,30 Dalton)

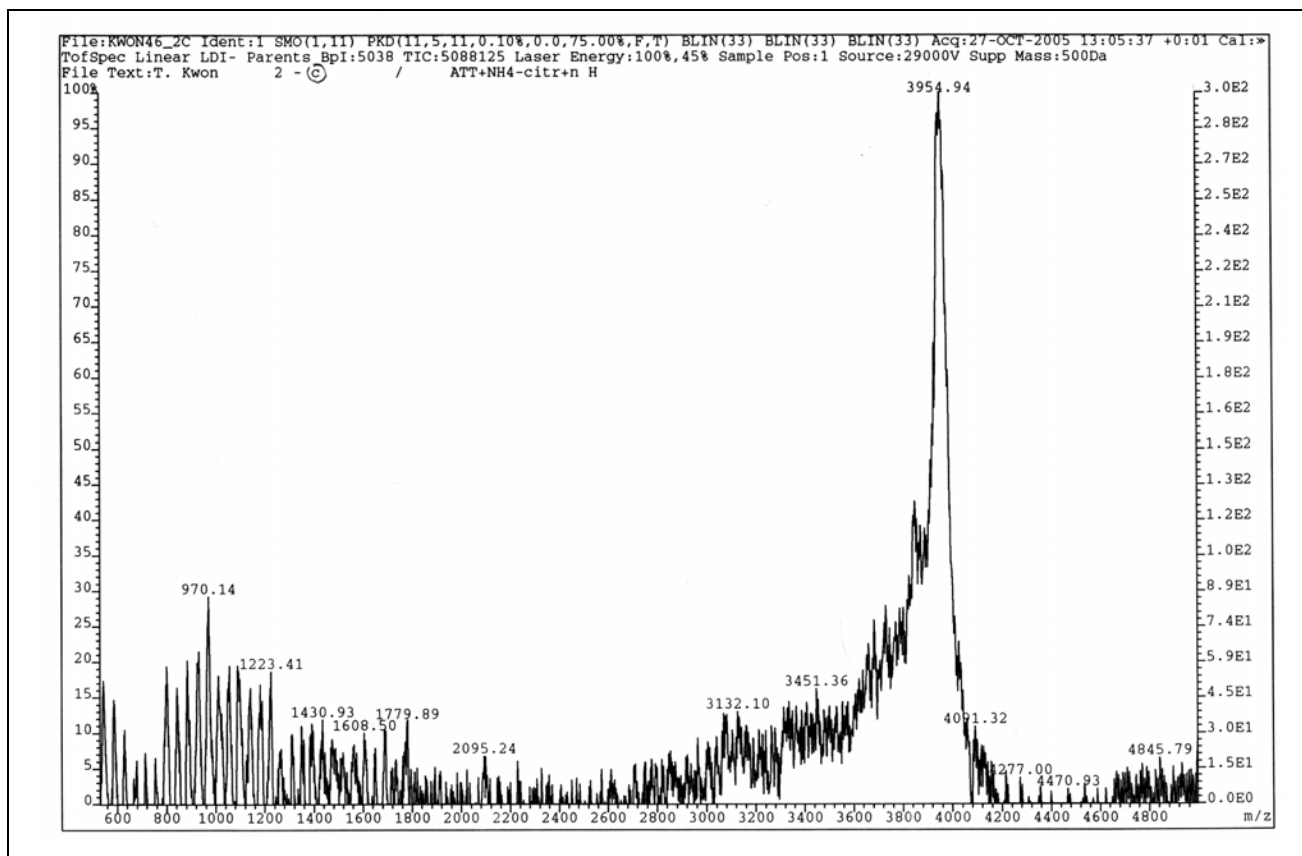


Abbildung 5.32 : MALDI-Spektrum des unmodifizierten RNA 12mers S3 (berechnete Masse : 3932,49 Dalton, gefundene Masse : 3954,94 Dalton)

Strang	Sequenz	Berechnete Masse [Da]	Gefundene Masse [Da]
<u>S1</u>	5'-CUU UUC CUU CUU-3'	3608,12	3607,25
<u>S2</u>	5'-CUU UUC C <sub>py</sub> UU CUU-3'	3832,37	3833,30
<u>S3</u>	5'-CUU UUC C <sub>bpy</sub> UU CUU-3	3932,49	3954,94
<u>S4</u>	5'-AAG AAG GAA AAG-3'	3952,55	3950,96
<u>S5</u>	5'-AAG AAA GAA AAG-3'	3936,55	3936,02
<u>S6</u>	5'-AAG AAC GAA AAG-3'	3912,52	3911,80
<u>S7</u>	5'-AAG AAU GAA AAG-3'	3913,51	3910,81

Tabelle 5.4 : Masse und Sequenz der synthetisierten RNA-Stränge

### 5.3.3.2 Thermodynamische Untersuchungen ( $T_m$ -Wert) an mono- und unmodifizierten RNA 12mer Duplexen

Die Stabilität von RNA Duplexen wurde mittels UV/VIS-Spektrometrie an einem CARY 1-Spektrometer der Firma Varian untersucht. Als ein charakteristischer Parameter für die thermodynamische Stabilität von Oligonukleotid-Duplex definiert der  $T_m$ -Wert die Temperatur des Überganges des Duplex in die Einzelstränge.

Die Bestimmung von  $T_m$ -Wert basiert darauf, daß ein Oligonukleotid des Einzelstranges aus einer geordneten Struktur in den ungeordneten Zustand übergeht. Die Erhöhung der optischen Dichte ist nicht linear, sondern sigmoidal. Die x-Koordinate [ $^{\circ}\text{C}$ ] am Wendepunkt dieser Kurve liefert den  $T_m$ -Wert.

Die Länge und Sequenz des Oligonukleotid-Duplex üben einen großen Einfluß auf den Schmelzpunkt aus. Die Doppelhelix wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basenpaaren, den Watson-Crick Basenpaaren stark beeinflusst. Durch die Wasserstoffbrücken halten die Adenin und Uracil(A/U) in der RNA bzw. Guanin und Cytosin(G/C) die beiden komplementären Nukleobasen zusammen. Das A/U- Basenpaar bilden zwei Wasserstoffbrücken. Im Vergleich mit dem bilden G/C-Basenpaare drei Wasserstoffbrücken und sind kompakter, so daß die G/C-Basenpaarungen an der Stabilität der Doppelhelix mehr als die A/U- Basenpaarungen beteiligt sind. Je länger eine Sequenz ist und je reicher an G C-Basenpaaren, desto stabiler ist der Duplex. Zudem hängt der Schmelzpunkt von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung ab.

Als Puffer zur Messung wurde ein Phosphat-Puffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat in DEPC Wasser bei pH 7,0 verwendet. In Abbildung 5.33 ist die Schmelzkurve des modifizierten RNA 12mer-Duplex **S2/S6** gezeigt. Der Schmelzpunkt ist durch den Pfeil markiert und beträgt  $32,3^{\circ}\text{C}$ . Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte durch computerunterstützte Anpassung unter Verwendung von Programm SigmaPlot 8.0. Die Methode zur Messung der  $T_m$ -Werte wird in Kapitel 9.3.4.1 beschrieben.

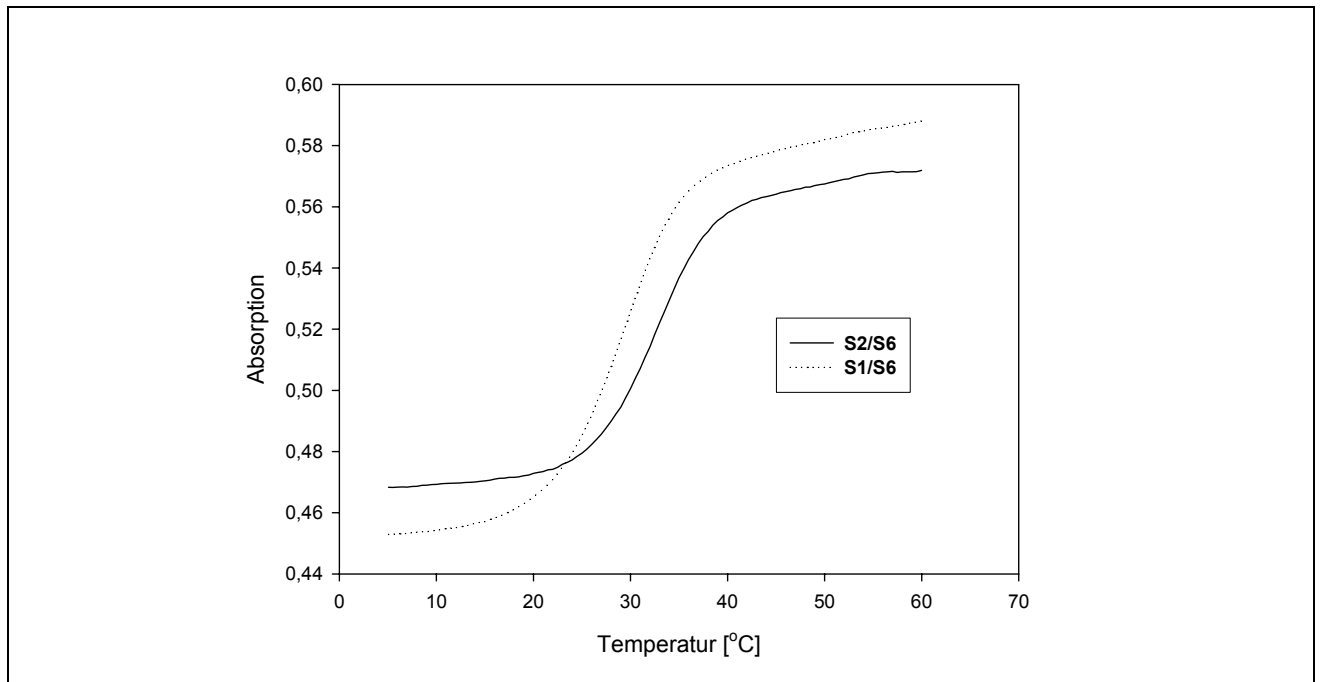


Abbildung 5.33 : Charakteristische, sigmoide Schmelzkurve und  $T_m$ -Wert von modifizierten Duplex **S2/S6**

Die ersten Messungen wurden an unmodifizierten Strängen durchgeführt. Dazu wurde Cytosin mit allen vier natürlichen Nucleobasen gepaart und die Schmelzpunkte der Duplexe gemessen, die das Watson-Crick *match*-Basenpaar (C/G) und die drei Watson-Crick *mismatch*-Basenpaare (C/U, C/A und C/C) an dieser Stelle vergleicht.

Weitere Messungen wurden mit das 1-Ethynylpyren- ( $C_{py}$ ) und 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren-cytidin ( $C_{BPy}$ ) durchgeführt. Dazu wurden diese mit den vier natürlichen Basen gepaart und die Schmelzpunkte gemessen. Die  $T_m$ -Werte von Basenpaaren aus Cytidinanalogen Nucleosiden (C,  $C_{py}$  und  $C_{BPy}$ ) und natürlichen Nucleobasen sind in Tabelle 5.5 und Abbildung 5.34 dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz	$T_m$ -Wert[°C]	$\Delta T_m$
<b>S1/S4</b>	5'-CUU UUC CUU CUU-3' 3'-GAA AAG GAA GAA-5'	52,5±0,1	/
<b>S1/S5</b>	5'-CUU UUC CUU CUU-3' 3'-GAA AAG AAA GAA-5'	32,3±0,2	/
<b>S1/S6</b>	5'-CUU UUC CUU CUU-3' 3'-GAA AAG CAA GAA-5'	28,8±0,2	/
<b>S1/S7</b>	5'-CUU UUC CUU CUU-3'	29,6±0,1	/

	3'-GAA AAG <b>UAA</b> GAA-5'		
<b>S2/S4</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>py</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>GAA</b> GAA-5'	56,4±0,2	+3,9
<b>S2/S5</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>py</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>AAA</b> GAA-5'	38,2±0,2	+5,9
<b>S2/S6</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>py</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>CAA</b> GAA-5'	32,3±0,3	+3,5
<b>S2/S7</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>py</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>UAA</b> GAA-5'	34,0±0,1	+4,4
<b>S3/S4</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>bpy</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>GAA</b> GAA-5'	56,5±0,1	+4,0
<b>S3/S5</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>bpy</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>AAA</b> GAA-5'	37,3±0,2	+5,0
<b>S3/S6</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>bpy</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>CAA</b> GAA-5'	31,6±0,2	+2,8
<b>S3/S7</b>	5'-CUU UUC <b>C<sub>bpy</sub></b> UU CUU-3' 3'-GAA AAG <b>UAA</b> GAA-5'	33,3±0,1	+3,7

*Tabelle 5.5 : T<sub>m</sub>-Werte der synthetisierten RNA-Duplexe*

Im allen Fälle von **S2/S4-S2/S7** und **S3/S4-S3/S7** wurde eine Stabilisierung von ca. 4-6 °C beobachtet. Diese Erhöhung der Stabilität kann durch eine Hydrophobe-Wechselwirkung erklärt werden. Bei **S3/S4-S3/S7** sind die Länge des Linkers zwischen dem Pyren und Cytidin länger als **S2/S4-S2/S7**. Trotzdem unterscheiden sich die T<sub>m</sub>-Werte der **S3/S4-S3/S7** nur geringfügig von **S2/S4-S2/S7**. Der Grund ist, daß das Pyren und Linker sich außerhalb des Duplexes befinden, so daß die sterische Hinderung einen geringen Einfluß auf der Stabilität der Duplexe ausübt.

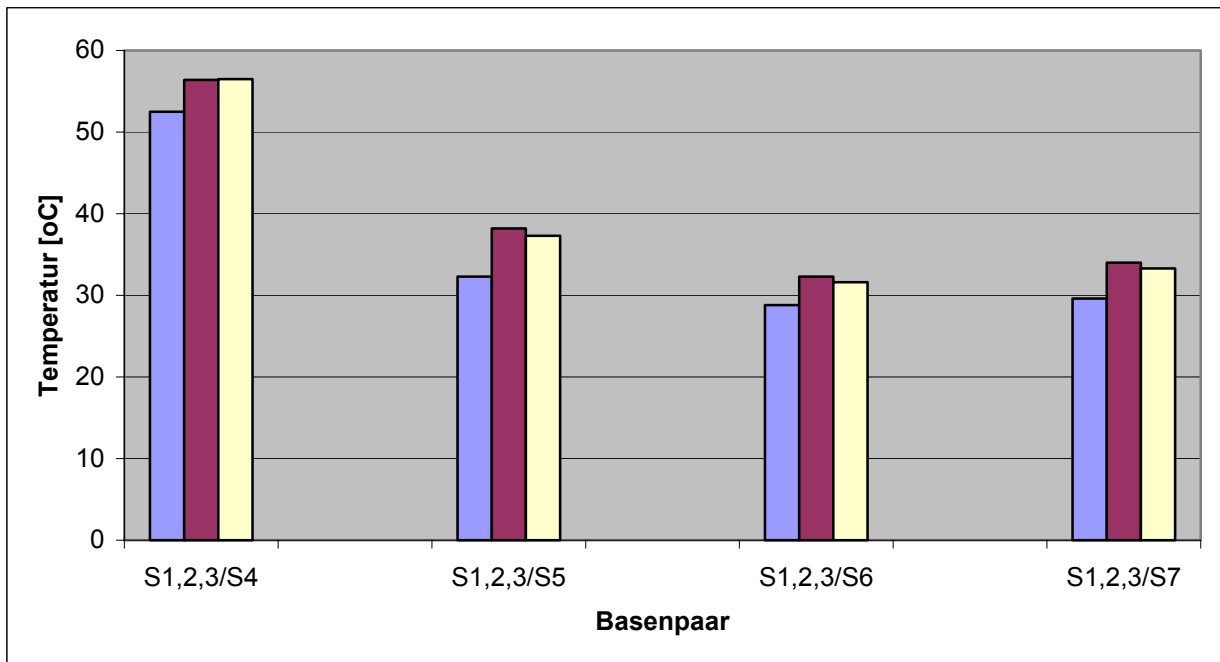


Abbildung 5.34 . Der Vergleich der  $T_m$ -Werte der un- und modifizierten Duplexe

### 5.3.3.3 CD-Spektroskopie an RNA 12 meren

Die CD-Spektroskopie kann zur Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine und Nucleinsäuren in Lösung angewendet werden. Deswegen wurden die CD-Spektren zur Untersuchung der modifizierten RNA-Duplexe auf die Struktur einer A-Helix RNA aufgenommen und analysiert. Die Circular Dichroismus(CD)-Spektroskopie ist eine optische Methode zur Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstrukturen chiraler Biomakromoleküle. Sie beruht darauf, daß das links- und rechts-zirkular polarisierte Licht durch die chiralen oder optisch aktiven Substanzen verschieden absorbiert wird. In CD-Spektren wird die Ellipzität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Die resultierenden Werte werden je nach Vorzeichen als positiver bzw. negativer Cotton-Effekt bezeichnet.

Die CD-Spektroskopie besitzt bei diesen Messungen einen großen Vorteil, der in der Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen in der Struktur der zu untersuchenden Moleküle liegt, der einfachen Durchführbarkeit der Messung, der geringen Probenmengen und der nicht destruktiven Natur der Messung.

Die durch CD-Spektren gelieferten Informationen sind keine genauen Strukturinformationen, sondern nur strukturabhängige Gesamtbilder. Im Vergleich mit Spektren bekannter Strukturen kann die Intensität und die Lage einzelner Banden nur interpretiert werden. Es können jedoch zuverlässige Aussagen über die Sekundär- und

Tertiärstrukturen der Nukleinsäuren gemacht werden, da die entsprechende A-, B- und Z-Form von Helices charakteristische Spektren aufweisen<sup>2</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu CD-Untersuchungen JASCO J-710 Spektrometer mit einem Peltier thermoregulierbaren Küvettenhalter verwendet. Zudem da eine Kondensation der Luftfeuchtigkeit an der Glasswand der Küvette möglich war, wurden die Messungen unter kontinuierlichem Stickstoffgas-Strom durchgeführt. Details zur Durchführung der Messungen sind in Kapitel 9.3.5 aufgeführt.

Die CD-Spektren der mit 1-Ethynylpyren ( $C_{py}$ ) und 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren ( $C_{BPy}$ ) gelabelten RNAs wurden im Vergleich mit dem unmodifizierten Duplex **S1/S4** aufgenommen. Alle CD-Spektren zeigen den charakteristischen Kurvenverlauf einer A-Helix (Abbildung 5.35 und 5.36).

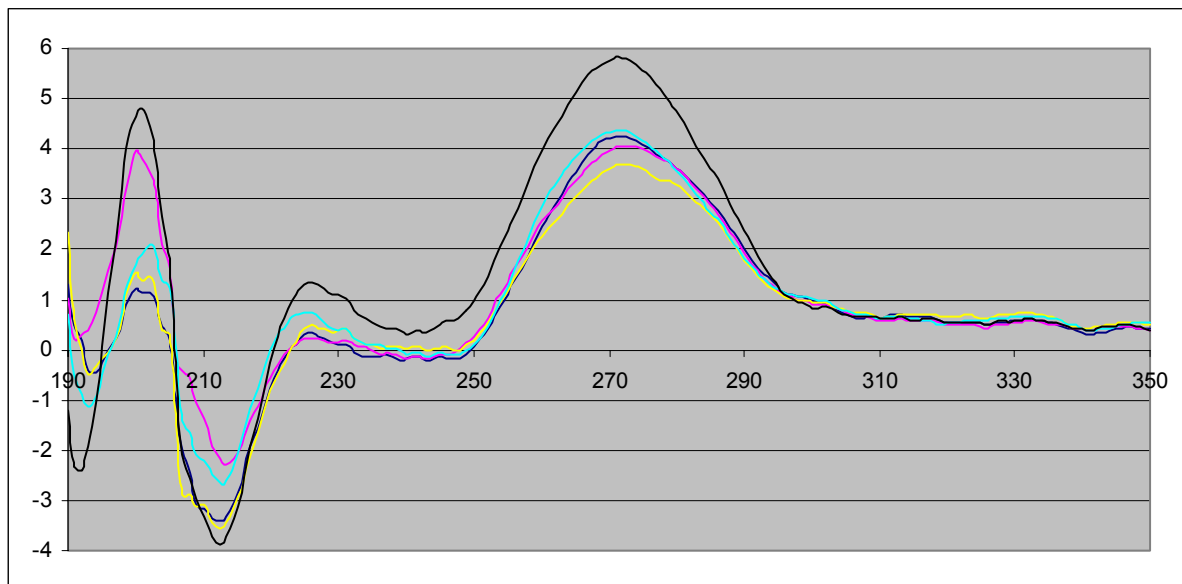


Abbildung 5.35 : CDspektren von **S2/S4-S2/S7** und **S1/S4** :

*schwarz-S1/S4, gelb-S2/S4, blau-S2/S5, rot-S2/S6 und türkis-S2/S7*

Die A-Helix weist dabei ein charakteristisches Maximum bei ca. 270 nm auf und ein Minimum bei ca. 215 nm auf.

Im Vergleich mit dem unmodifizierten Duplex **S1/S4** wurden die Maximal- und Minimalwellenlängen von **S2/S4-S2/S7** und **S3/S4-S3/S7** geringfügig unterschieden beobachtet. Der minimale Unterschied vom Hauptmaximum bedeutet eine geringe Veränderung der Duplex-Struktur.



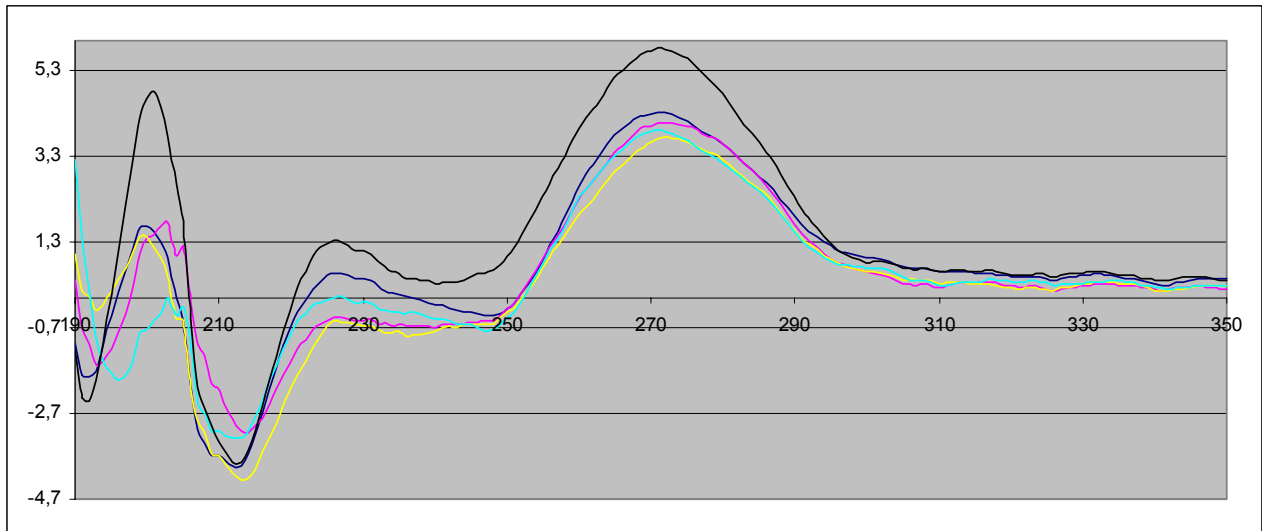


Abbildung 5.36 : CDspektren von **S3/S4-S3/S7** und **S1/S4** :

*schwarz-S1/S4, gelb-S3/S4, blau-S3/S5, rot-S3/S6 und türkis-S3/S7*

### 5.3.3.4 Fluoreszenz-Spektroskopie an RNA 12 meren

Die Fluoreszenz wird durch die Wellenlänge der Anregung (Exzitation) und Emission, sowie Quantenausbeute, Zerfallszeit, und Polarisation charakterisiert. Zudem geben Fluoreszenz-Spektren von Anregung und Emission Informationen über Energieübertragung. Vor allem müssen die Fluorophore, die in den bindenden  $\pi$ -Orbitalen delokalisierte Elektronen als aromatische Ringstrukturen besitzen, zur Untersuchung benötigt. Die Fluoreszenz hängt von der Wellenlänge ab. Details zu der Fluoreszenz und den Fluorophoren sind in Kapitel 5.1.1 aufgeführt.

Die Prozesse der Fluoreszenz können durch ein Jablonski Diagramm erklärt werden (Abbildung 5.37)

Die durch Absorption bei gewissen Wellenlängen angeregten Elektronen bewegen sich aus dem Grundstand  $S_0$  in einen der angeregten Singulettzustand  $S_1$  oder  $S_2$ . anschließend wird das angeregte Elektron in dem Grundstand  $S_0$  zurückkehren. Man spricht von Fluoreszenz. Zudem geht ein Teilchen durch *intersystem crossing* aus dem Singulett- in den Triplett-Zustand  $T_1$  über. Anschließend wird das angeregte Elektron in den Grundstand  $S_0$  zurückkehren. Das ist Phosphoreszenz.

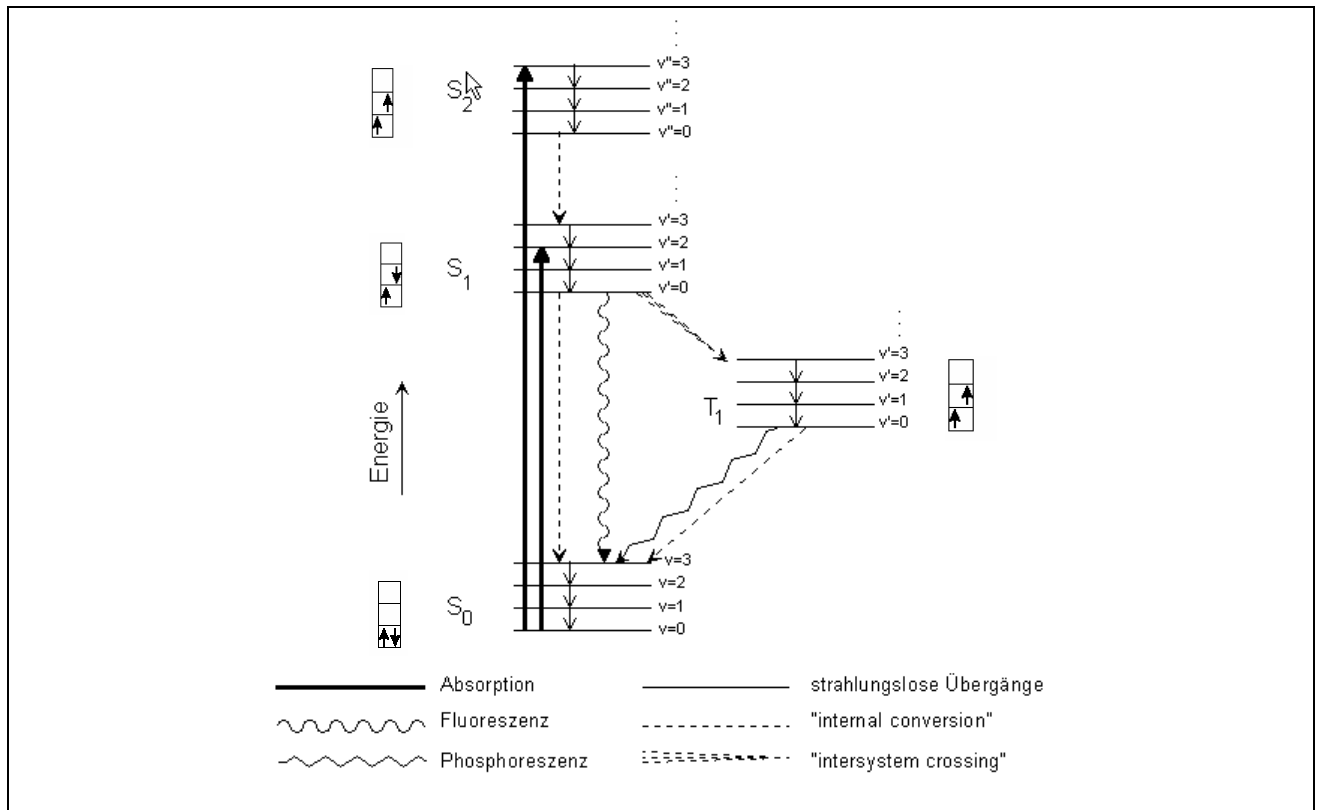


Abbildung 5.37 : Jablonski Diagram

Die Fluoreszenz-Spektren wurden an einem Hitachi F-4500 Fluoreszenz-Spektrophotometer aufgenommen.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur, mit derselben Konzentration in demselben Phosphat-Puffer wie bei den UV-Spektroskopie Untersuchungen durchgeführt. Details zur Durchführung der Messungen sind in Kapitel 9.3.6 aufgeführt.

Die Fluoreszenzspektren von mit 1-Ethynyl-pyren gelabelten RNA-Duplexe **S2/S4-S2/S7** wurden mit dem einzelnen Strang **S2** vergleicht (Abbildung 5.38).

Die Maxima befinden sich bei ca. 400 nm und bei ca. 440 nm. In **S2/S4-S2/S7** konnten Elektronen-Transfer Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und der benachbarten Base stattfinden, so daß die Fluoreszenz verhindert wurden und die Intensität reduziert. Die Fluoreszenz-Intensität können bei den benachbarten Pyrimidine leichter als bei den benachbarten Purine reduziert werden. Die Fluoreszenz-Intensität von **S2/S4** wurde bei ca. 410 nm und bei ca. 430 nm stärker als andere Duplexe.

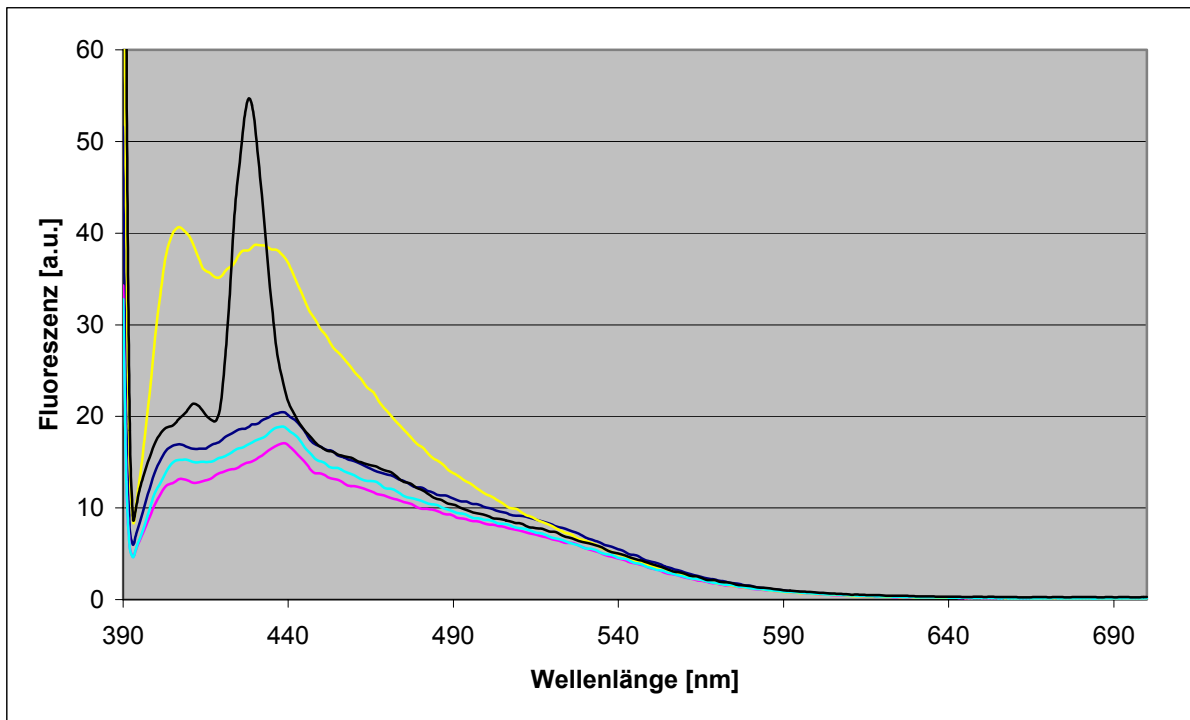


Abbildung 5.38 : Fluoreszenzspektren von **S2/S4-S2/S7** und **S2** :  
*schwarz-S2, gelb-S2/S4, blau-S2/S5, rot-S2/S6 und türkis-S2/S7*

Bei dem Vergleich der Fluoreszenzspektren **S3/S4-S3/S7** mit dem Einzelstrang **S3** konnten nur geringfügige Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 5.39).

Die Maxima befinden sich bei ca. 400 nm und bei ca. 440 nm. Wie in Abbildung 5.39 graphisch dargestellt, übten die RNA-Duplexe **S3/S4-S3/S7** einen sehr geringen Einfluß von Elektronen-Transfer Wechselwirkungen zwischen Pyren und den Nukleobasen aus. Der Linker in **S3** ist länger als in **S2**, so daß das angeregte Pyren und die benachbarten Nukleobasen sehr gering kontaktiert werden.

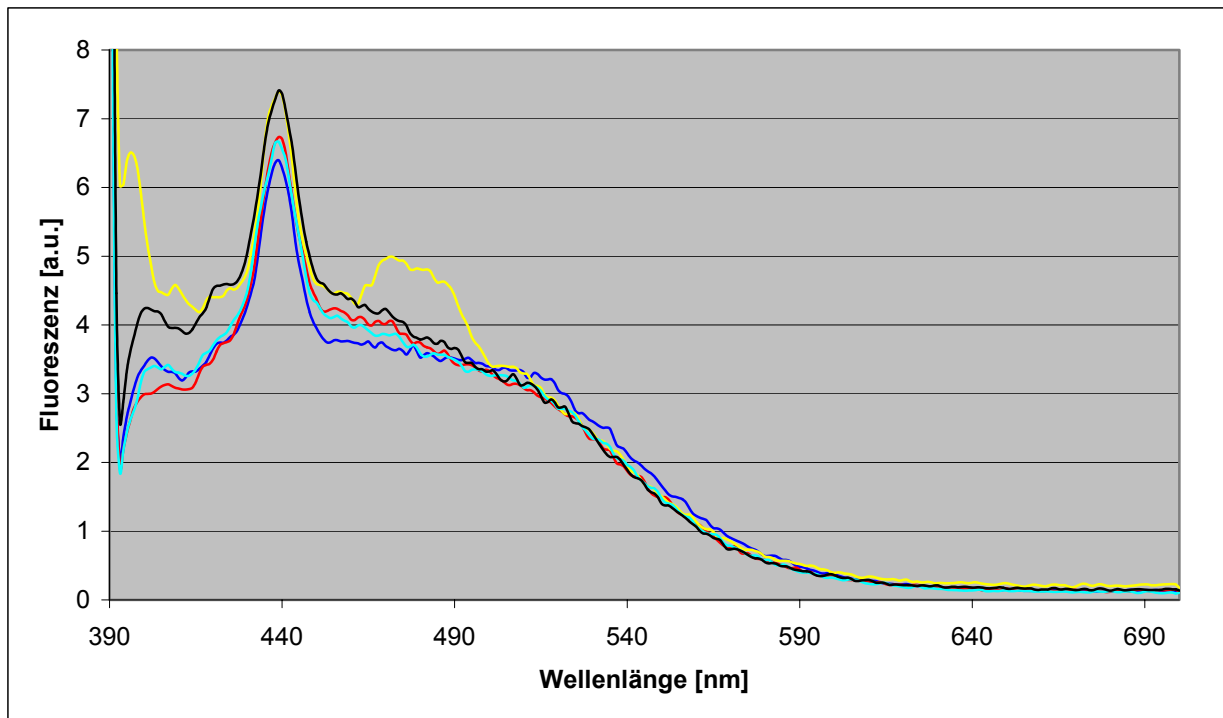


Abbildung 5.39 : Fluoreszenzspektren von **S3/S4-S3/S7** und **S3** :  
 schwarz-S3, gelb-S3/S4, blau-S3/S5, rot-S3/S6 und türkis-S3/S7

## 6. Synthese von *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe (nbm und (R)-npeom) an der 2'-Desoxynukleinsäure und Abspaltung durch Photoreaktion

### 6.1 Einführung von *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen (nbm) an der 2'-Desoxynukleinsäure (DNA)

#### 6.1.1 Schutzgruppe an der 2'-Position

Zur Schützung der 2'-Hydroxygruppe während der RNA-Festphasensynthese werden Schutzgruppen verwendet.

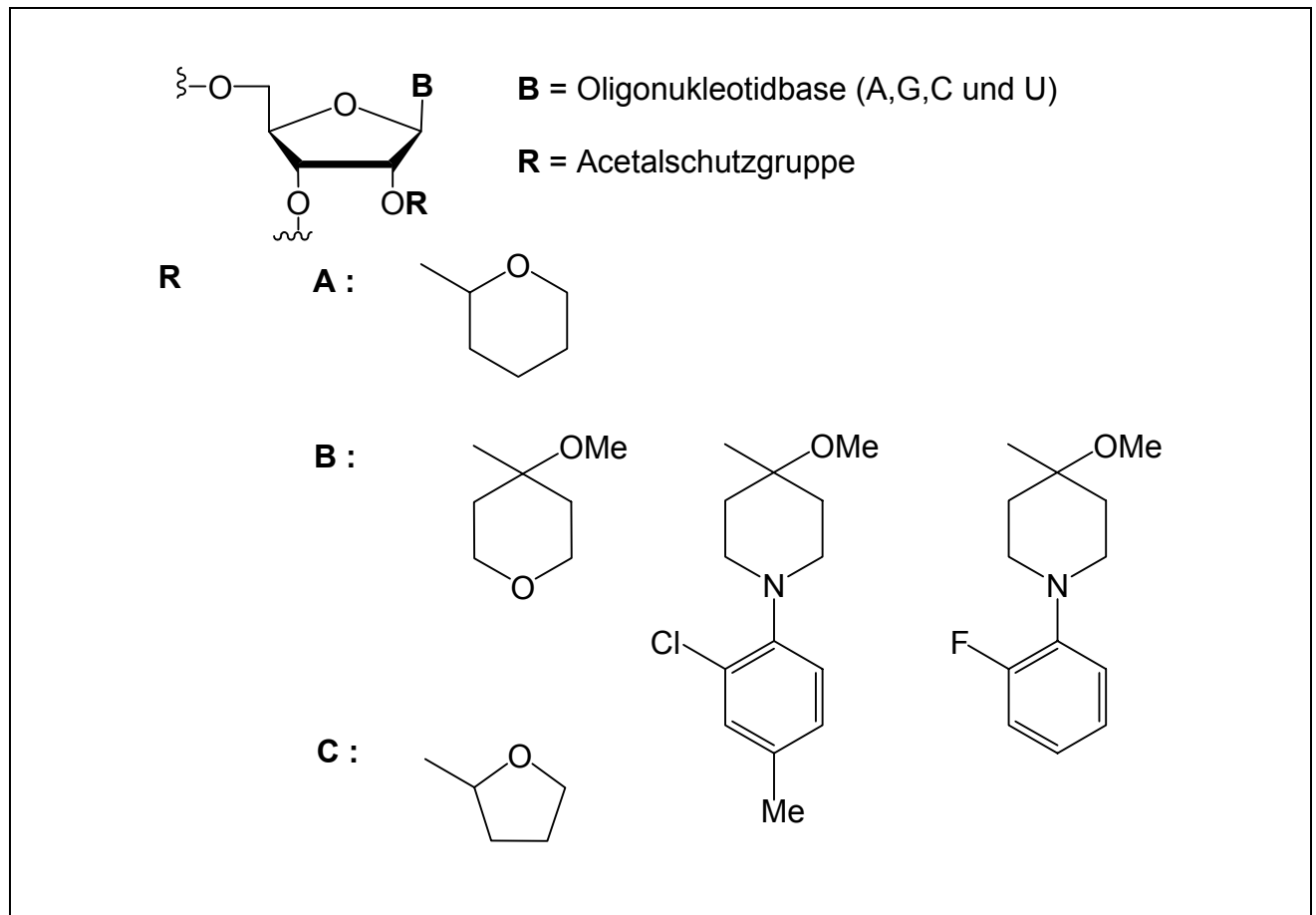
Die Voraussetzungen sind:

1. Keine Wanderung von 2'-Position zu 3'-Position
2. eine geringe Isomere zwischen 2'- und 3'-Position
3. Eine erleichterte Aufreinigung durch Säulenchromatographie
4. ein Minimum sterischer Hinderung
5. Relativ kurze Kupplungszeiten
6. Eine hohe Stabilisierung während der RNA-Festphasensynthese
7. Eine leicht Entschützung und hohe Ausbeute unter milde Bedingungen in einem Schritt

Die bekannten Schutzgruppen<sup>133,134</sup> bestehen aus Ketal und Acetal in Form von Methoxytetrahydropyranyl<sup>135-138</sup>-, tetrahydropyranyl<sup>139-141</sup>- und tetrahydrofuranyl<sup>142</sup>-Substituent oder Ether wie *t*-Butyldimethylsilyl(TBDMS)<sup>143-147</sup>-, *o*-Nitrobenzyl<sup>150</sup>-, *p*-Methoxybenzyl<sup>151</sup>-Derivativ (Abbildung 6.1, 6.2 und 6.3).

Von Reese et al<sup>152</sup> wurde Acetal in Form von Tetrahydropyran-2-yl(Thp) als eine erste Säure-labile Schutzgruppe an der 2'-Position synthetisiert. Aber Thp führt zu diastereoisomerer Mischung von geschütztem Intermediaten. Deswegen werden 4-Methoxytetrahydropyran-2-yl (Mthp)<sup>136</sup> und diese Derivate, 1-(2-chloro-4-methylphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl (Ctmp)<sup>153</sup> und 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl (Fpmp)<sup>137,138</sup>, als achiral zum Schutz an der 2'-Position effektiver und einfacher als Thp

benutzt. Ctmp ist eine erste Acetal-Schutzgruppe in Form von 1-Arylpiperidin-4-on. Im Vergleich mit Ctmp besitzt Fpmp eine ähnliche Eigenschaft.



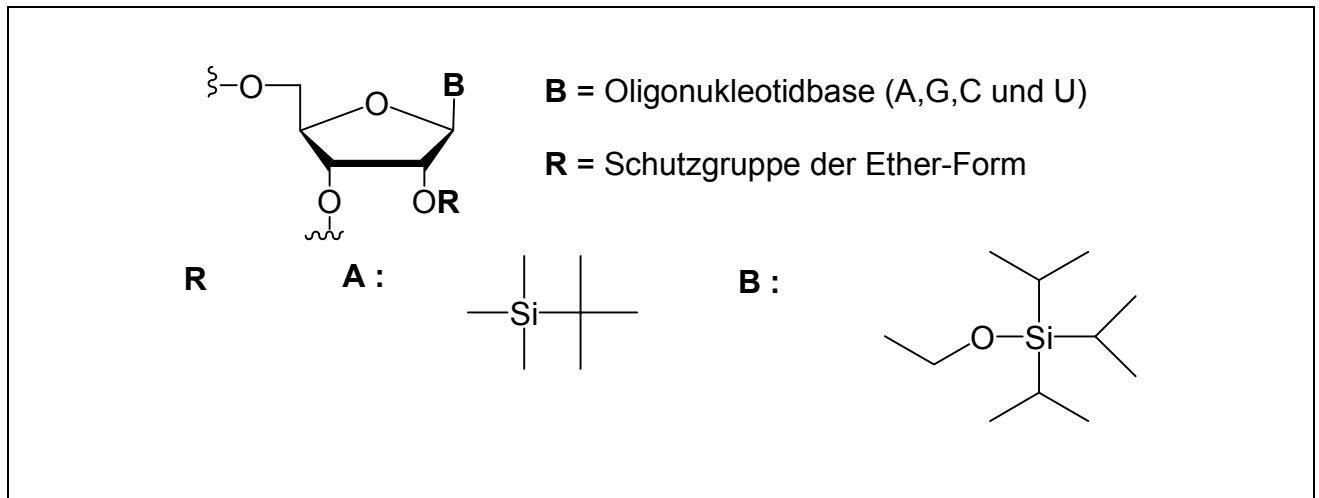
*Ausbildung 6.1 : Einführung der Säure-gelabelten Schutzgruppen an der 2'-Position*

**A**: Tetrahydropyran-2-yl-Schutzgruppe (Thp), **B**: 4-Methoxytetrahydropyran-2-yl (Mthp) und Derivate, 1-(2-chloro-4-methylphenyl)-4-methoxy piperidin-4-yl-Schutzgruppe (Ctmp) und 1-(2-Fluorophenyl)-4-methoxy piperidin-4-yl-Schutzgruppe (Fpmp) **C**: tetrahydrofuran-2-yl-Schutzgruppe

Diese Acetal-Schutzgruppen sind stabil unter basischen Bedingungen. Alle Säure-labilen Schutzgruppen werden unter milden Bedingungen der Säurehydrolyse entschützt.

Tert-Butyl-dimethylsilyl-Schutzgruppe (TBDMS) ist bis zum heutigen Tagen eine der gängigsten 2'-OH Schutzgruppen. Bei den mit TBDMS geschützten Nucleosiden treten Probleme auf, wie die Wanderung zwischen 2'- und 3'-Position, sterische Hinderung und Schwierigkeit der Aufreinigung. Um Nachteile von TBDMS zu überwinden, wurde die Triisopropylloxymethyl-Schutzgruppe (TOM)<sup>148,149</sup> entwickelt. Im Vergleich mit TBDMS besitzt TOM Vorteile, wie keine Wanderung, eine relativ kurze Kupplungszeit und hohe

Ausbeute. Aber TOM ist wegen der wasserabweisenden(hydrophoben) Eigenschaft von Silylgruppen bei der Analyse und Aufreinigung mit HPLC nicht ideal.



Ausbildung 6.2 : Einführung der Ether-Schutzgruppen an der 2'-Position

**A**: Tert-Butyl-chlordimethylsilyl-Schutzgruppe (TBDMS), **B**: Triisopropyl oxymethyl-Schutzgruppe (TOM)

### 6.1.2 Einführung der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe

*o*-Nitrobenzylgruppe<sup>150</sup> ist eine bekannte photospaltbare(gelabelte) Schutzgruppe von Hydroxy-Verbindungen wie Alkohol, Phenol, Carbonsäure, Aminosäure und Kohlenhydrat<sup>154</sup>. Zur Synthese von Ribonukleotid wurde [1-(*o*-Nitrobenzyl)oxy]methyl-(nbm) und [(*R*)-1-(*o*-Nitrobenzyl)ethoxy]methyl-(*R*)-npeom)Schutzgruppe an der 2'-Position von Ribonukleosiden erst verwendet in 1975<sup>155,156</sup> und 1999<sup>157</sup> (Abbildung 6.3).

Bei dem mit *o*-Nitrobenzyl ether (nbm) geschützten Oligoribonukleosid und Oligoribonukleotid treten folgende Vorteile auf<sup>148</sup> :

1. *o*-Nitrobenzyl ether ist stabil gegenüber Säure und Base
2. Keine Wanderung
3. Keine Isomere und diastereomere Mischung wegen der Abwesenheit von Chiralitätszentrum
4. Die erleichterte Aufreinigung durch Säulenchromatographie
5. Das Minimum einer sterischen Hinderung durch die Verknüpfung über eine sterisch kleine und flexible Methyleinheit
6. Die relativ kurze Kupplungszeit

## 7. Die leichte Entschützung unter milder Säure-Bedingungen

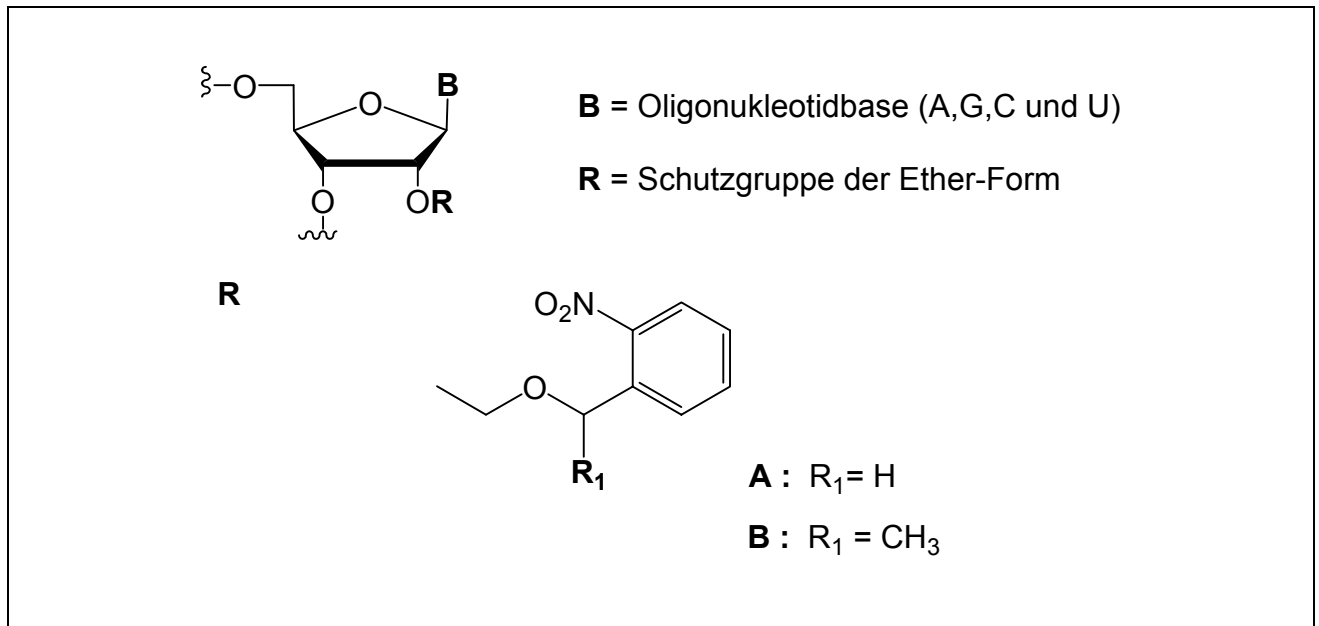


Abbildung 6.3 : Einführung der **A** : [1-(*o*-Nitrobenzyl)oxy]methyl- (nbm) und **B** : [(*R*)-1-(*o*-Nitrobenzyl)ethoxy]methyl-Schutzgruppe ((*R*)-npeom) als Ether-Schutzgruppen

Aber ein Nachteil ist eine geringe Ausbeute von Ribonukleotid trotz der vielen Vorteile.

Gough et al. berichteten erst 1992, daß die nbm-Schutzgruppe am Ribonukleotid durch Photoabspaltung mit langwelligem Ultraviolett(UV)-Licht (Pyrex-gefilterte Hg-Lampe(250W)) unter milden Säure-Bedingungen(in *t*-BuOH:Wasser=1:1, pH 3.7) effizient abgespaltet werden konnten<sup>158</sup>.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Entschützung ist sehr schnell bis ca. 1 Std und danach sehr langsam und Reaktionszeit hängt von der Länge der Sequenz ab. Da *o*-Nitrosobenzaldehyd als Nebenprodukt die Photoabspaltung von Ribonukleotid verhindert, verwendeten Pitsch et al. 1997 die wässrigen und organischen zwei Phasen(Wasser(10mM Natriumphosphat, 10mM Natriumcitrat, pH 3.9) und 1,2-Dichlor ethan) zur Extraktion von *o*-Nitrosobenzaldehyd und konnten den Reaktionsablauf durch UV-Spektren und HPLC-Plot beobachteten<sup>120</sup> (Abbildung 6.4).



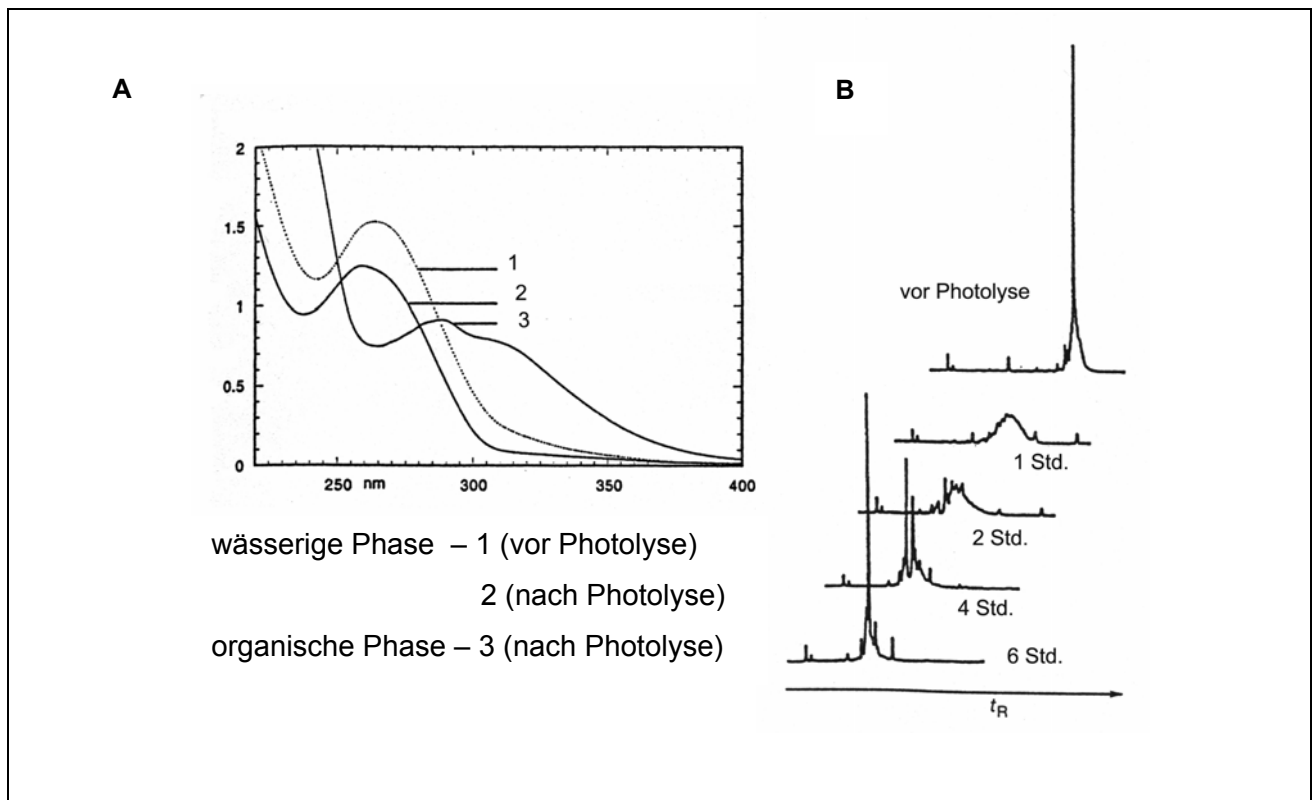


Abbildung 6.4 : Die Photospaltung der *ent-r(ACGGUCUCACGAGC)*-Sequenz in zwei Phasen<sup>120</sup>

**A** : UV-Spektren der beiden Phasen (die starke Absorption (ca 320 nm) des Nebenproduktes in der organischen Phase) **B** : Reverse-Phase-HPLC (RP-HPLC)-Monitoring in der wässrigen Phase

Zudem berichteten sie, daß die npeom-Schutzgruppen am Ribonukleotid 1999 mit Pyrex-gefilterter Hg-Lampe(250W) unter andere Bedingungen (pH 8.0<sup>150</sup>) effizient abgespaltet werden konnte und 2000 unter milder Säure- Bedingung (in 20mM wässig. Essigsäure, pH 3.1)<sup>159</sup>.

Der Mechanismus der Entschützung von *o*-Nitrobenzylether Derivate läßt sich in fünf Schritte unterteilen<sup>160,161</sup> (Abbildung 6.5). Der erste Schritt besteht aus der photochemischen Bildung des *aci*-Nitro-Zwischenproduktes als *o*-Chinoide Spezies in angeregten Zustand als Singulettts oder Triplett. In dem zweiten Schritt wird das Zwischenprodukt zum Anion deprotoniert. In dem dritten Schritt wird dieses Zwischenprodukt protoniert. Der vierte Schritt ist die Cyclisierung zum bicyclischen Zwischenprodukt. Der letzte Schritt besteht aus der Ringöffnung und Abspaltung des Alkoholates zu 2-Nitrosobenzaldehyd. Das cyclische Zwischenprodukt wurde noch nicht

experimentell nachgewiesen. Zudem können bei der Photoabspaltung alle experimentellen Daten durch diesen Mechanismus nicht immer erklärt werden.

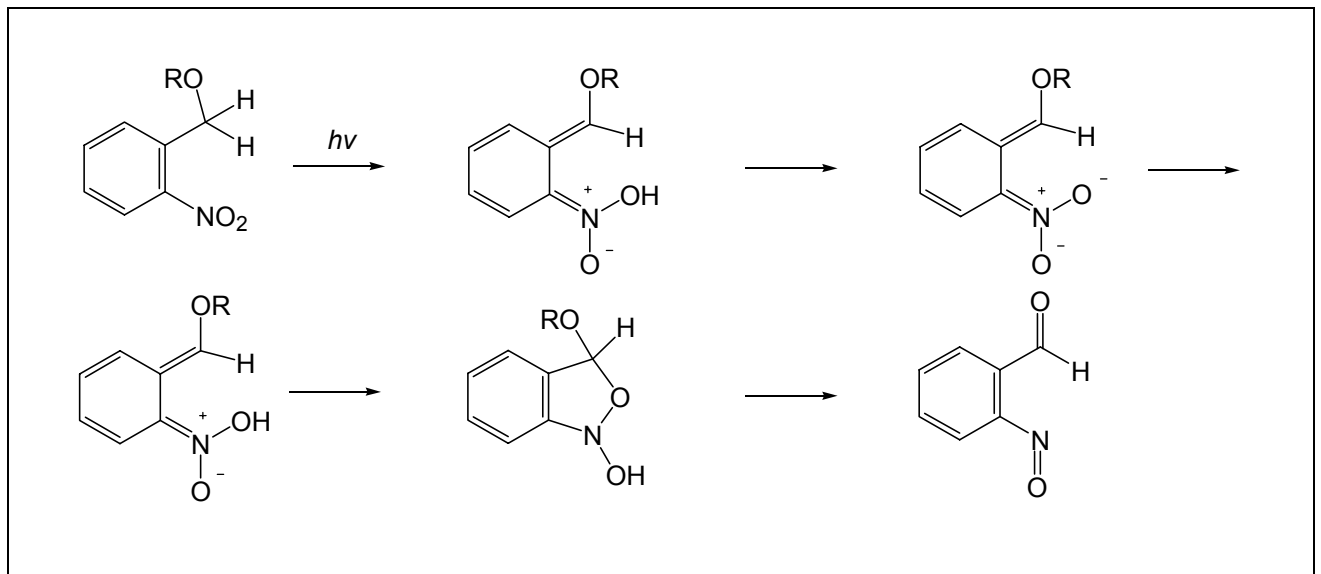


Abbildung 6.5 : Der Mechanismus der Entschützung von o-Nitrobenzylether Derivaten

## 6.2 Chemische Synthese

### 6.2.1 Reduktion von 2-Nitroacetophenon

1-(O-nitrophenyl)ethanol **32** wurde aus 2-Nitroacetophenon durch Reduktion erhalten. Bei der Reduktion von Carbonylverbindungen werden Natriumborhydrid( $\text{NaBH}_4$ ) und Lithiumaluminiumhydrid ( $\text{LiAlH}_4$ ) als Reagentien am häufigsten verwendet. Bei Reduktion von Aldehyd und Keton werden Natriumborhydrid( $\text{NaBH}_4$ ) meist verwendet. Zudem da die Reduktion mit Natriumborhydrid in wässriger oder alkoholischer Lösungsmittel unproblematisch durchgeführt werden können, ist sie leichter als mit Lithiumaluminiumhydrid. Um Alkohol-Verbindungen in milden Reaktionsbedingungen einfach und effektiv zu synthetisieren, wurde die Reduktion mit auf Alumina adsorbiertem Natriumborhydrid durchgeführt<sup>162</sup> (Abbildung 6.6).

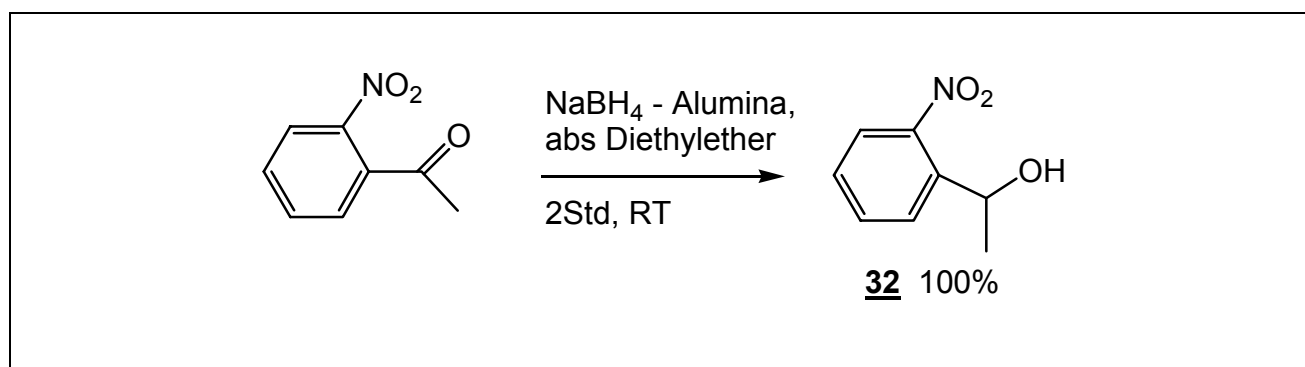


Abbildung 6.6 : Synthese von 1-(O-nitrophenyl)ethanol **32**

2-Nitroacetophenon wurde in Diethylether gelöst, Zugabe auf Alumina adsorbiertem Natriumborhydrid 2 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Verbindung **32** mit einer Ausbeute von 99% isoliert werden. Eine weitere Methode ist die Reduktion mit Natriumhydrid und  $\text{FeCl}_3$  in Tetrahydrofuran<sup>163</sup>.

### 6.2.2 Synthesen von O,S-Acetal-Verbindungen **27** und **33**

Halogenalkyl Ether-Verbindungen sind nützliche Intermediäre in organischen Synthesen. Um diese Verbindungen zu synthetisieren, werden O,S-Acetal-Verbindungen als Edukte

eingeführt. Drei Methoden (A, B und C) werden zu Synthese von Methylthiomethylether-Verbindungen verwendet und sind in Abbildung 6.7 dargestellt.

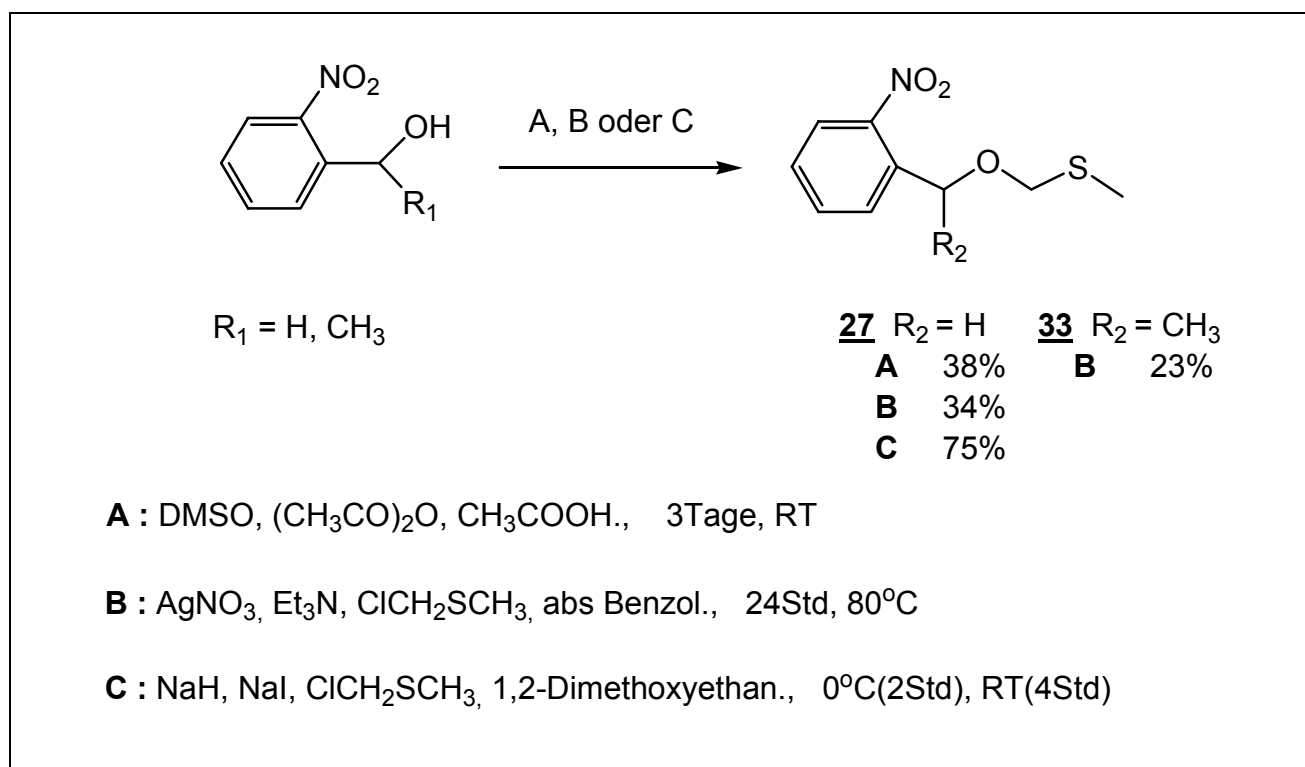


Abbildung 6.7 : Synthesen von O,S-Acetal-Verbindungen 27 und 33

- Erste Methode (A) :  
 Erste Methode (A) ist eine Verwendung von Dimethylsulfoxid, Essigsäure und Essigsäureanhydrid<sup>168-171</sup>. Ein Vorteil ist, daß Neben-Produkte in dieser Reaktion nur gering entstehen. O,S-Acetal-Verbindungen wurde durch Pummerer Reaktion synthetisiert. Als Alkohol-Verbindung wurden 2-Nitro-benzylalkohle in Dimethylsulfoxid gelöst und nach Zugabe von Essigsäure und Essigsäureanhydrid 3 Tage gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Verbindung 27 mit einer Ausbeute von 38% isoliert werden.
  
- Zweite Methode (B) :  
 Zweite Methode (B) ist eine Verwendung von Chlormethyl-methylsulfid, Silbernitrat und Triethylamin in Benzol und Cyclohexan<sup>168</sup>. Sie wird durch eine Hilfe einer elektrophiler Katalyse von Silber-Ion und Triethylamin als Base unter milden und nicht oxidativen Bedingungen durchgeführt und ist auch für primäre-, sekundäre-

Alkohole geeignet und quartäre nicht. Alkohol-Verbindungen wurden in abs Benzol gelöst, nach Zugabe von von Chlormethyl-methylsulfid, Silbernitrat und Triethylamin auf 80°C erhitzt und 24 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten Verbindung **27** und **33** mit einer Ausbeute von 34% und 23% isoliert werden.

- Dritte Methode (C) :

Dritte Methode (C) ist eine Verwendung von Chlormethyl-methylsulfid und Natriumhydrid<sup>1-4</sup>. Da bei dieser Methode Natriumhydrid als Base verwendet wird, ist sie nur für primäre Alkohole und Phenole geeignet<sup>168</sup>. Natriumhydrid wurde in 1,2-Dimethoxyethan bei 0°C gelöst, nach Zugabe von 2-Nitro-benzylalkohl, Natriumiodid und Chlormethyl-methylsulfid bei dieser Temperatur 2 Stunden gerührt, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und 4 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Verbindung **27** mit einer Ausbeute von 75% isoliert werden.

### 6.2.3 Halogenierung von O,S-Acetal-Verbindungen

Halogenierung von O,S-Acetal-Verbindungen wurde mit Sulfurylchlorid durchgeführt<sup>172</sup> ( Abbildung 6.8 ). O,S-Acetal-Verbindungen **27** und **33** wurden in Dichlormethan gelöst und nach Zugabe von Sulfurylchlorid 1 Stunde gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Kugelrohrfen konnten Produkte **28** und **34** mit einer Ausbeute von 91 und 68% isoliert werden.

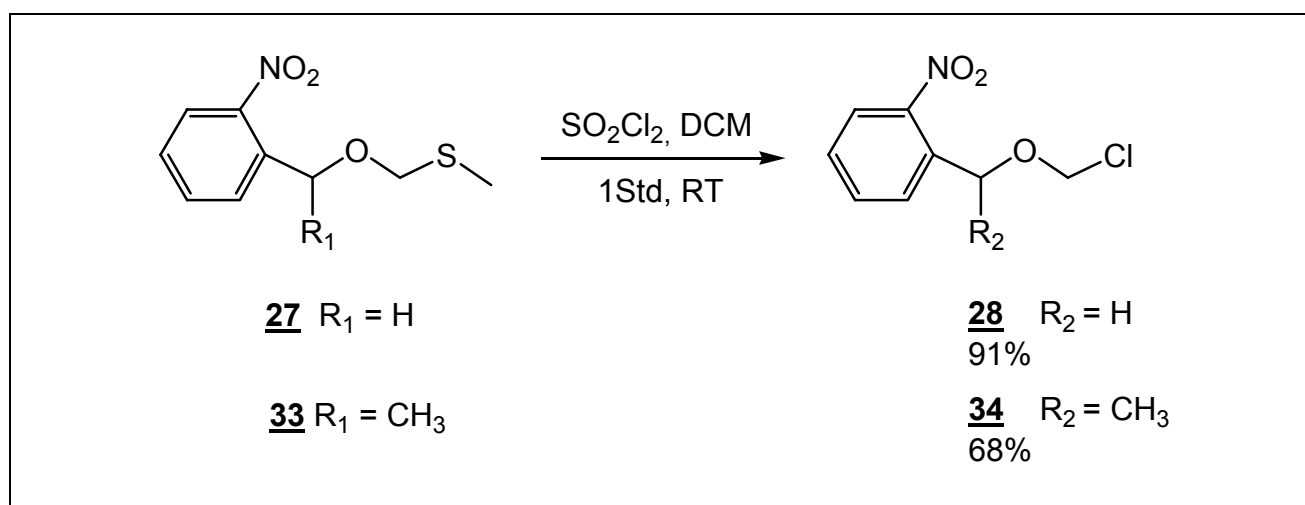


Abbildung 6.8 : Halogenierung von O,S-Acetal-Verbindungen **27** und **33**

## 6.2.4 Einführung der Dimethoxytriphenylmethyl-Gruppe an der 5'-Position

Zur Phosphoramidierung der 3'-Position wird eine Schutzgruppe in der 5'-Position von Uridin benötigt. Deswegen wurde Nucleosid 3 durch Schützung von DMTr synthetisiert (Abbildung 6.9).

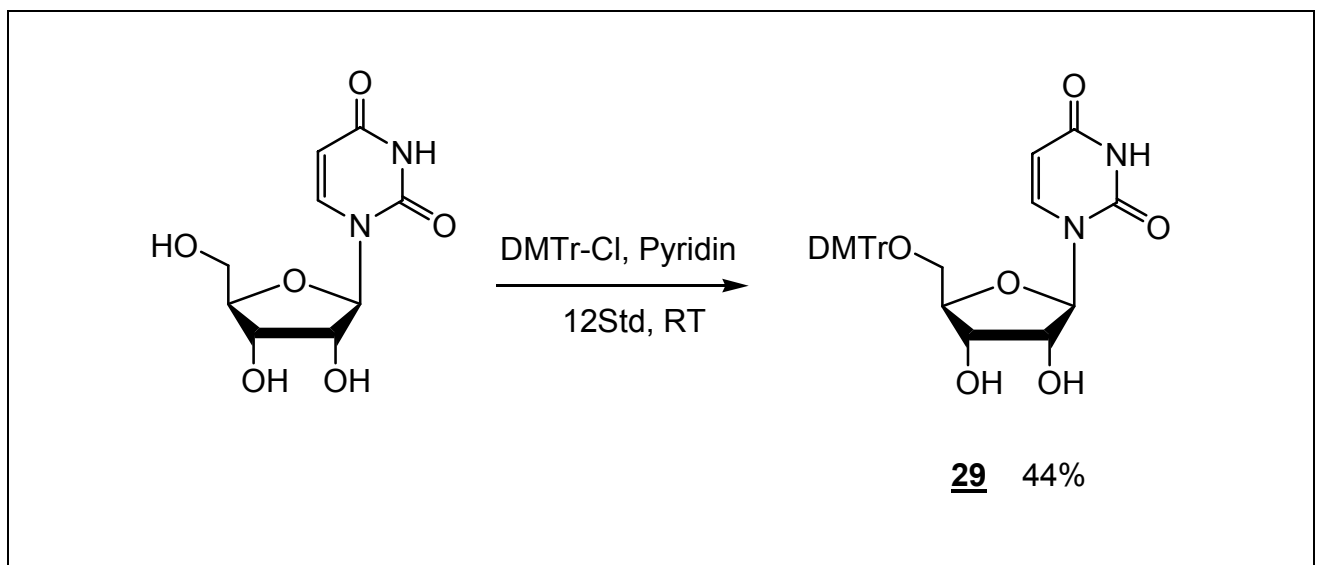


Abbildung 6.9 : Dimethoxytritylierung

Die Einführung der 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe(DMTr) wurde bereits in Kapitel 5.2.7 ausführlicher beschrieben. In der Reaktion wurden Triethylamin, N,N-Dimethylaminopyridin oder N,N-Diisopropylethylamin als Basen nicht benutzt. Uridin wird in Pyridin gelöst und mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl) versetzt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Nucleosid **29** mit einer Ausbeute von 44% isoliert werden.

## 6.2.5 Einfügung von [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl (nbm) **30-1** und das Derivat **35-1** als Schutzgruppen an der 2'-Position

Während der Festphasensynthese von RNA wird eine stabile Schutzgruppe an der 2'-OH Position benötigt. Die Schutzgruppen vom Silyl-ether und Acetal Typen wurden erforscht und damit als gängigste 2'-OH Schutzgruppe synthetisiert. [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl-

Schutzgruppe(nbm) wurde 1992 von G. R. Gough-Gruppe publiziert<sup>173</sup>, wegen der minimalen sterischen Hinderung bei Substitution der 2'-OH Position, war in guten Kupplungsausbeuten zu synthetisieren und unter milden photochemischen Bedingungen spaltbar<sup>120,121,157</sup> (Abbildung 6.10).

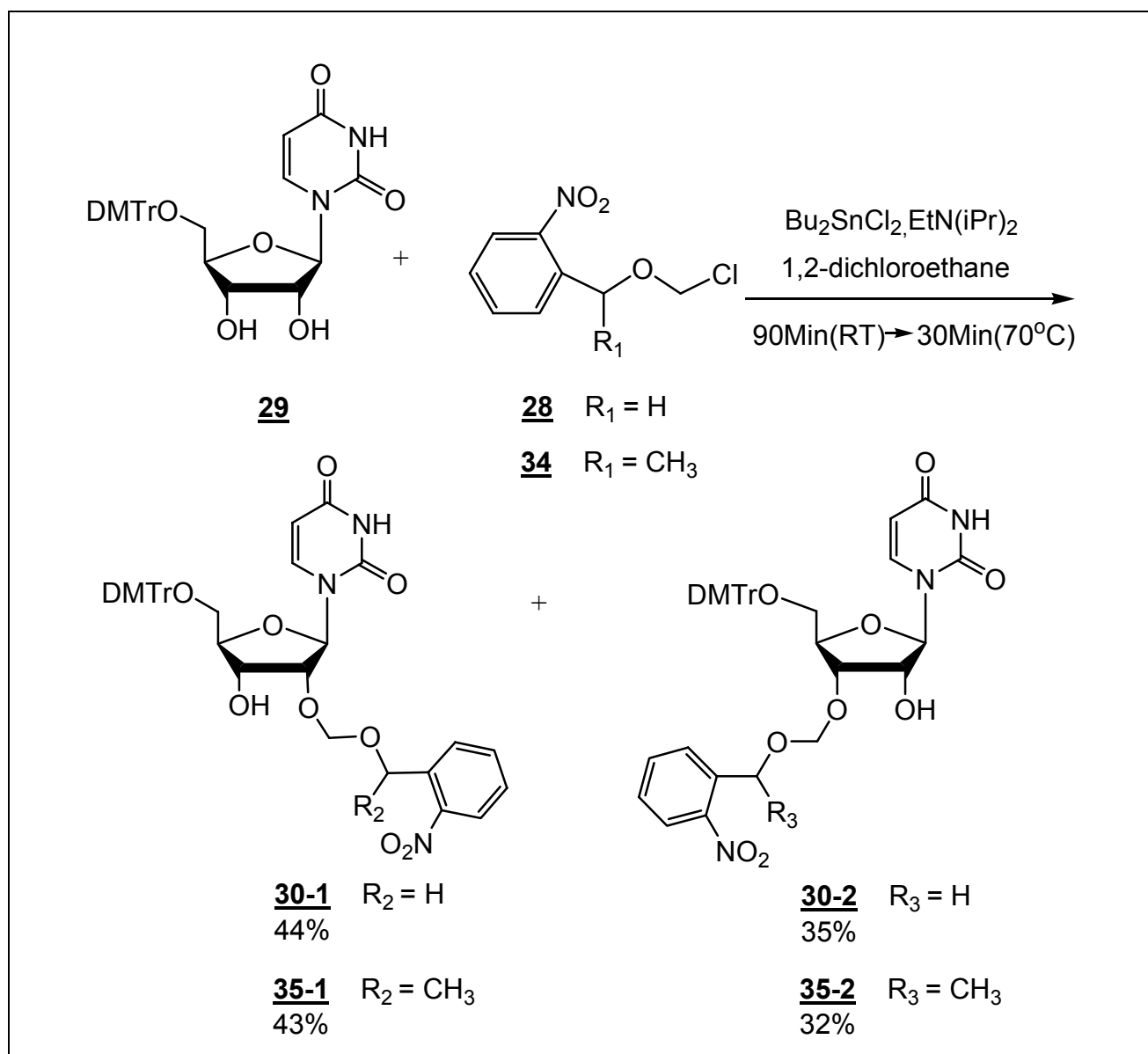


Abbildung 6.10 : Einfügung von [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl (nbm) **30-1** und das Derivat **35-1** als Schutzgruppen an der 2'-Position

Die Reaktion verläuft über zyklischen Übergangszustand, bei dem die Aktivierung des Übergangsmetalls wie Zinn durch Komplexbildung mit dem *cis*-Diol-System der Ribose stattfindet<sup>158</sup>. Die Reaktion lässt sich in zwei Schritte unterteilen. Der erste Schritt der Reaktion besteht aus einer Bildung des zinnhaltigen zyklischen Derivates an der 2'- und

3'- Position. Der zweite Schritt der Reaktion besteht aus einer Substitution von [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl-Schutzgruppe(nbm) an der 2'- Position. Zudem werden die an der 3'-Position [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl-Schutzgruppe substituierten Isomeren beobachtet. Nukleosid **3** wurde in 1,2-Dichlorethan gelöst, nach der Zugabe von Diisopropylethylamin und Dibutylzinndichlorid bei Raumtemperatur 1,5 Stunden gerührt, auf 70°C erwärmt, nach der Zugabe von O-Nitrobenzyl chloromethyl ether **28** oder das Derivat **34** bei dieser Temperatur 1 Stunde gerührt. Es wurden 44 % und 43% des 2'-geschützten Isomeren ( **30-1** und **35-1** ) und 34 % und 32% des 3'-geschützten Isomeren ( **30-2** und **35-2** ) erhalten.

## 6.2.6 Einführung der 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit - Gruppe an der 3'-Position

Zur erfolgreichen Festphasensynthese von DNA werden Nukleoside **31** und **36** benötigt, die mit 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit<sup>117,120,125</sup> an der 3'-Position phosphityliert. 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit ist das Standard-Phosphitylierungsreagenz für DNA und RNA Phosphoramiditbausteine.

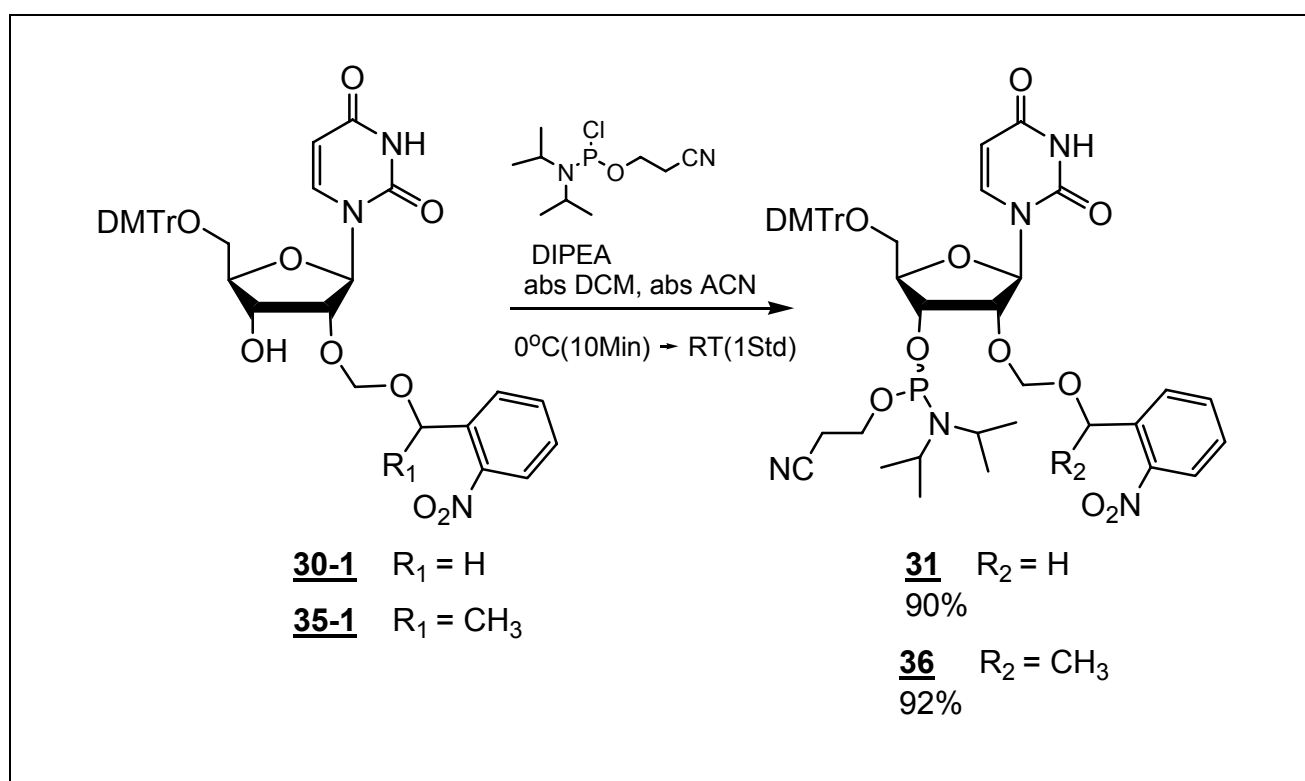


Abbildung 6.11 : Synthese von Phosphoramidit-Verbindungen **31** und **36**



Bei der Synthese ist auf Trockenheit aller Lösungsmittel und Reagenzien und auf Ausschluß von Sauerstoff zu achten. Die 2'- und 5'-geschützten Nukleoside **30-1** und **35-1** werden in einer Mischung von Dichlormethan und Acetonitril im Verhältnis 1 zu 1 gelöst, mit N,N-Ethyldiisopropylamin versetzt, auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit werden weitere 10 Minuten bei dieser Temperatur gerührt, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Zur Vermeidung der Bildung von H-Phosphonaten wird eine kurze Reaktionszeit bei Raumtemperatur benötigt. Die als zwei Diastereomere synthetisierten Phosphoramid-Nukleoside **31** und **36** werden durch Säulenchromatographie erhalten. Aber die Isomere müssen mittels einer Säulenchromatographie nicht getrennt werden. Die Isomere können in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Die Ausbeuten von Phosphoramid-Nukleoside **31** und **36** waren bei 90% und 92%. Die Charakterisierung der Produkten erfolgte sowohl über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie als auch über <sup>31</sup>P-NMR- Spektroskopie.

## 6.2.7 Syntheseübersichten

Abbildung 6.12 zeigt die Syntheseübersicht der o-Nitrobenzylmethylthiomethyl ether **28** und 1-(o-Nitrophenyl)ethylmethylthiomethylether **34**

Abbildung 6.13 zeigt die Syntheseübersicht der Phosphoramidit-Verbindungen 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(2-nitrobenzyl)oxy]methyl} uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)-Diisopropylphosphrosamidite **31** und 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(1-(o-nitrobenzyl)ethyl)oxy]methyl} uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)- diispropylphosphoramidite] **36**

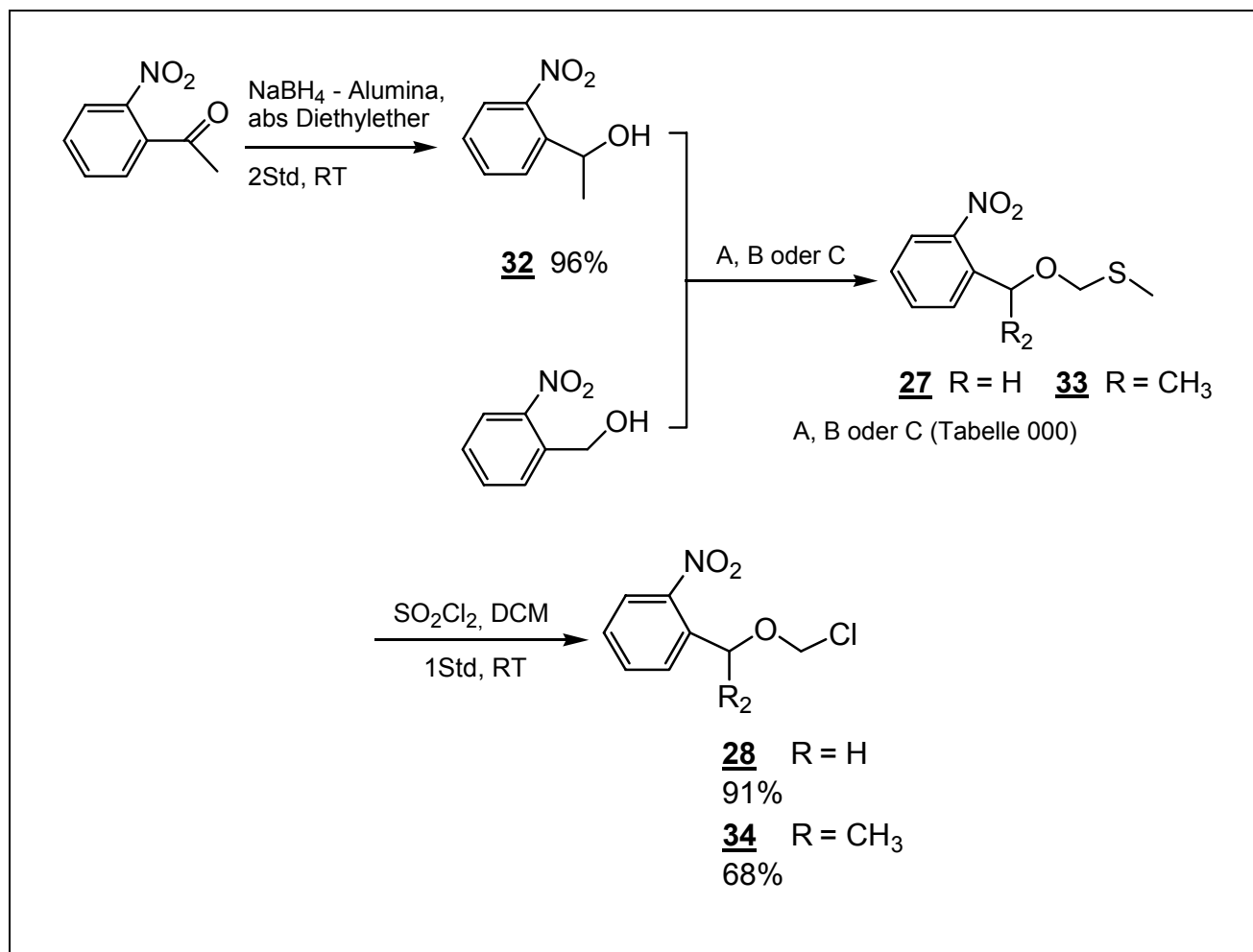


Abbildung 6.12 : Synthese der *o*-Nitrobenzylmethylthiomethylether **28** und 1-(*o*-Nitrophenyl)ethylmethylthiomethylether **34**

Verbindung	Methode	Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur und Reaktionszeit	Ausbeute
<b>27</b>	A	(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> COOH, DMSO		3 Tage, RT	38 %
<b>27</b>	B	AgNO <sub>3</sub> , Et <sub>3</sub> N, ClCH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	abs Benzol	24 Std., 80 °C	34 %
<b>27</b>	C	NaH, NaI, ClCH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	abs 1,2-Dimethoxyethan	2 Std. (0 °C), 4 Std. (RT)	75%
<b>33</b>	B	AgNO <sub>3</sub> , Et <sub>3</sub> N, ClCH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	abs Benzol	24 Std., 80 °C	23 %

Tabelle 6.1 : synthetische Methoden der *o*-Nitrobenzylmethylthiomethylether **27** und 1-(*o*-Nitrophenyl)ethylmethylthiomethylether **33**

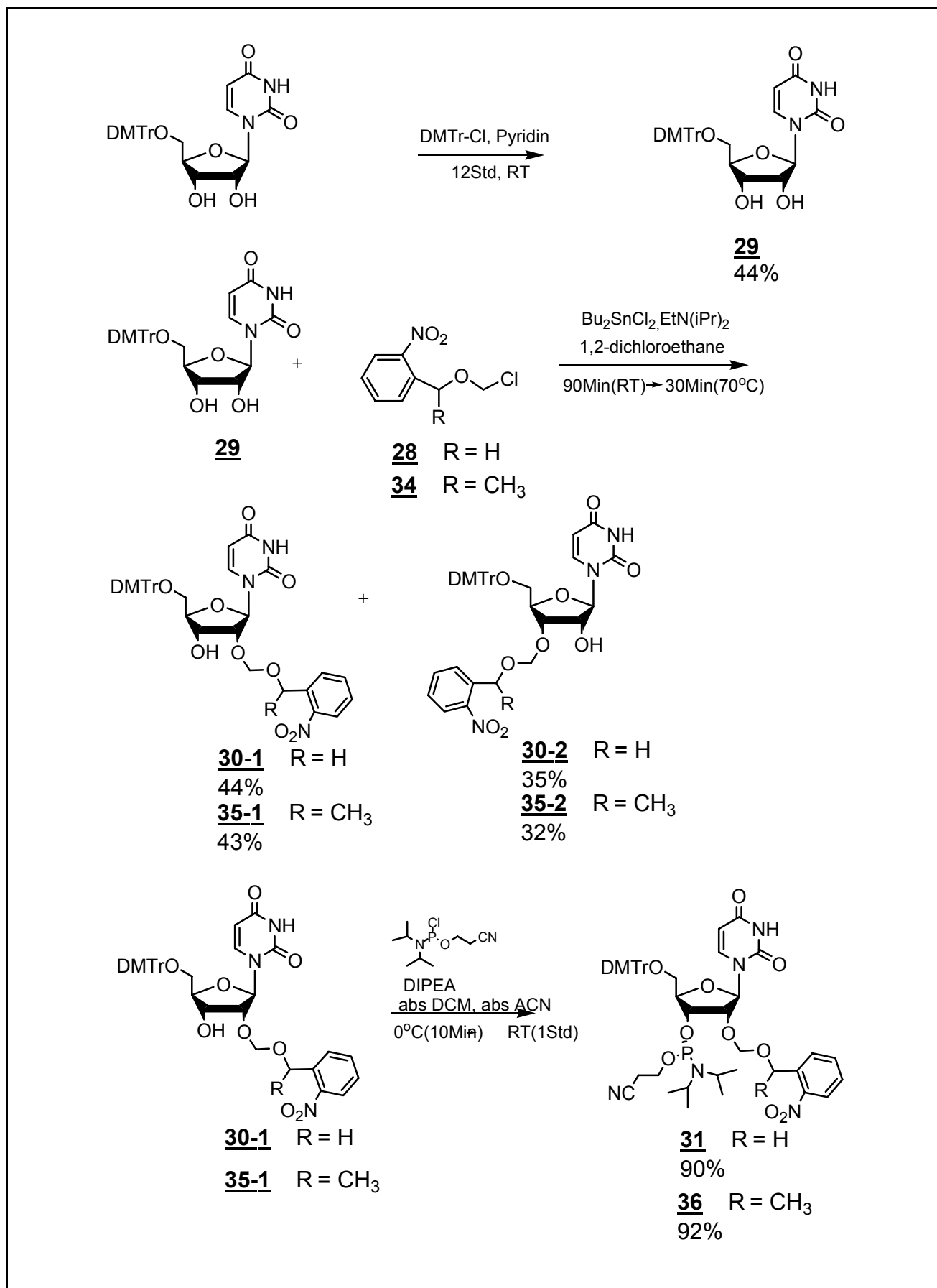


Abbildung 6.13 : Synthese der Phosphoramidit-Verbindungen **31** und **36**

## 6.3 Synthese des Oligodesoxynukleotides S8

### 6.3.1 Synthese des Oligodesoxynukleotid S8 mit Einbau von modifiziertem Nukleotid

Das in dieser Arbeit synthetisierte Oligodesoxynukleotid wurde nach der Phosphoramidit-Methode an Modell Expedite 8909 Synthesizer von PerSeptive Biosystem hergestellt. Als Trägermaterial wurde der eine Porengröße von 500 Å besitzende CPG-Träger im 1 µmol Maßstab eingesetzt. Die Standardnucleosidphosphoramidite und Synthesereagenzien (siehe Chemikalienliste) sind kommerziell erhältlich. Als Aktivator wurde 4,5-Dicyanoimidazol (DCI Aktivator) eingesetzt. Die Standardkupplungszeiten der 10 Minuten für DNA-Bausteine wurde für das modifizierte Nukleotid übernommen. Bei der Festphasensynthese aller Oligodesoxynukleotide wurde die Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMTr) des finalen Bausteins nicht abgespalten.

Abbildung 6.14 zeigt Abkürzung und Sequenz für das in DNA eingebaute modifizierte Nukleotid.

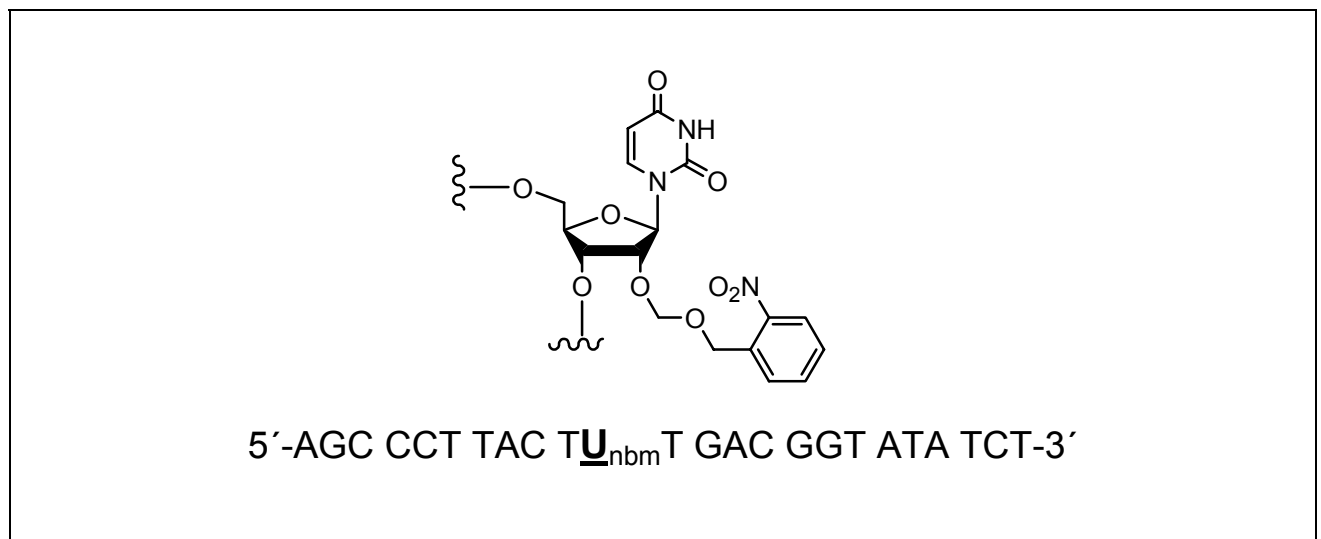


Abbildung 6.14 : Abkürzung und Sequenz des modifizierten Nukleotides S8 für die DNA-Synthese

## 6.3.2 Aufreinigung des Oligodesoxynukleotides

Nach der Synthese des Oligodesoxynukleotids durch die Festphasensynthese muß die Abspaltung vom CPG-Material und Aufreinigung des Oligodesoxynukleotids durchgeführt werden. Da die 2'-Hydroxygruppe in DNA nicht vorkommt, ist die Methode zur Aufreinigung von DNA im Vergleich mit RNA nicht gleich. Zudem wird Millipore-Wasser anstatt DEPC-Wasser bei diese Aufreinigung verwendet, da DNA stabiler als RNA ist.

Die Aufreinigung von DNA ist in zwei Teilschritten zu unterteilen.

1. Im ersten Schritt wurde konz. Ammonia verwendet, um das CPG-Material abzuspalten. Die  $\beta$ -Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphat wurde auch quantitativ abgespalten, während das CPG-Material von Oligodesoxynukleotid abgespalten wurde. Nach Filtration wurde diese Oligodesoxynukleotid -Lösung in der SpeedVac bis zur Trockne eingengt.
2. Im zweiten Schritt wurde das Oligodesoxynukleotid mittels *reverse-phase*-HPLC aufgereinigt.(Abbildung 6.15)

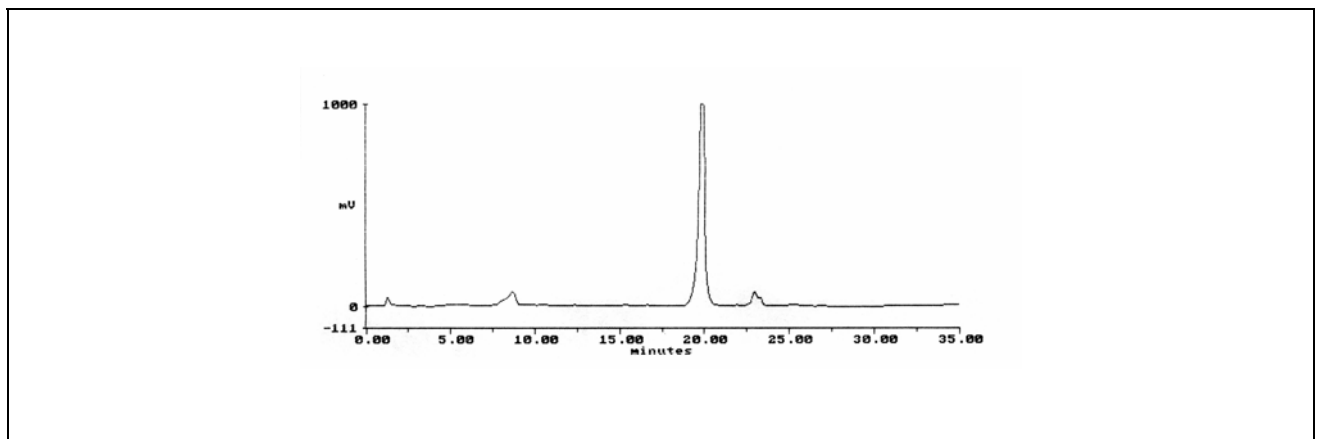


Abbildung 6.15 : HPLC-Chromatogramm des Oligodesoxynukleotids **S8**

## 6.3.3 Charakterisierung des Oligodesoxynukleotids

### 6.3.3.1 Massenspektrometrie

Zur Charakterisierung dieses hergestellten Oligodesoxynukleotids wurde auch die Massenspektrometrie eingesetzt. Elektrospray-Ionisations-(ESI) und matrixunterstützte

Laser-Desorption/Ionisations-(matrix-assisted desorption/ionisation, MALDI) Massenspektrometrie ermöglichen die unfragmentierte Massenbestimmung der Oligonukleotide mit hoher Empfindlichkeit. In dieser Arbeit wurden das modifizierte Oligodesoxynukleotid **S8** nur mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht. (Tabelle 6.2 und Abbildung 6.16)

Oligodesoxynukleotid	berechnete Mass	mit MALDI Mass gefundene Mass
S8	7442,9	7440,7

Tabelle 6.2 : Masse des synthetisierten S8-Oligodesoxynukleotids

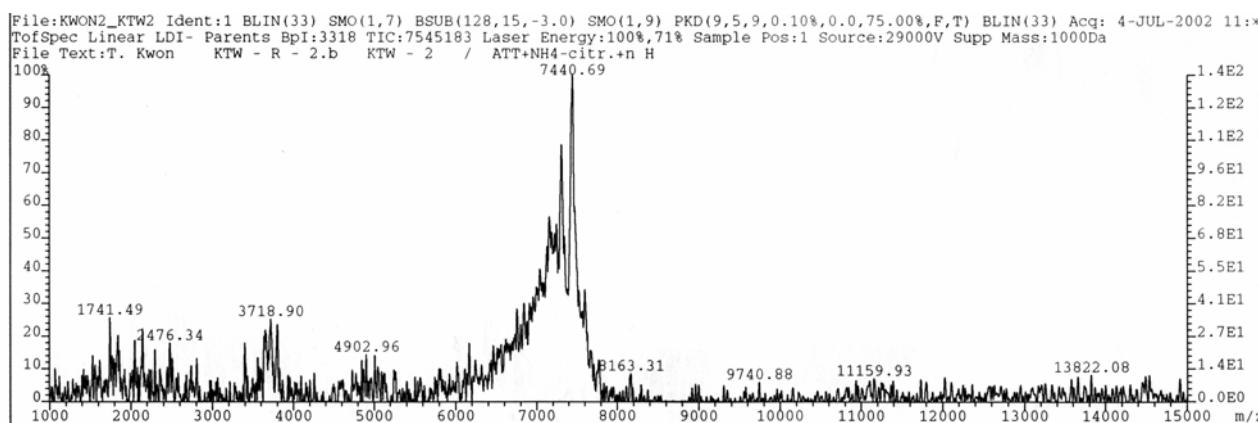


Abbildung 6.16 : MALDI-Spektrum des Oligodesoxynukleotid **S8**

### 6.3.4 Photoabspaltung der [1-(*o*-Nitrobenzyl)oxy]methyl-Schutzgruppe (*nbm*) in dem Oligodesoxynukleotid **S8**

#### 6.3.4.1 Verwendung des Stickstofflaser zur Photoabspaltung

Gough et al. berichteten 1992 zu erst, daß die *nbm*-Schutzgruppen am Ribonukleotid durch Photoabspaltung mit langwelligem Ultraviolett(UV)-Licht (Pyrex-gefilterte Hg-Lampe(250W)) unter milder Säure-Umgebung(in *t*-BuOH:Wasser=1:1, pH 3.7) effizient abgespaltet werden. Pitsch et al. verwendeten 1997 die wässrigen und organischen zwei Phasen(Wasser(10mM Natriumphosphat, 10mM Natriumcitrat, pH 3.9) und 1,2-Dichlor ethan) zur Photoabspaltung und Extraktion von *o*-Nitrosobenzaldehyd, das als

Nebenprodukt die Photoabspaltung verhindert. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Photoabspaltung ist erst sehr schnell bis ca. 1 Std und danach sehr langsam und die Reaktionszeit hängt von Länge der Sequenz ab.

Die in dieser Arbeit abgespaltenen Oligodesoxynukleotide wurden am Modell CL-02 von ATL-Lasertechnics hergestellt. Dieser Stickstofflaser als ein Ultraviolett(UV)-Moleküllaser soll anstatt der Pyrex-gefilterten Hg-Lampe(250W) zur Photoabspaltung verwendet werden. Eine Küvette der Schichtdicke 1 cm wurde mit 1 ml des Millipore-Wassers gefüllt. Bei diesem Laser entsteht die Strahlung durch Übergänge zwischen  $C^3\Pi_u$  und  $B^3\Pi_g$ . Die stärkste Linie liegt als Hauptlinie im UV-Bereich bei 337 nm-Wellenlänge (Abbildung 6.17).

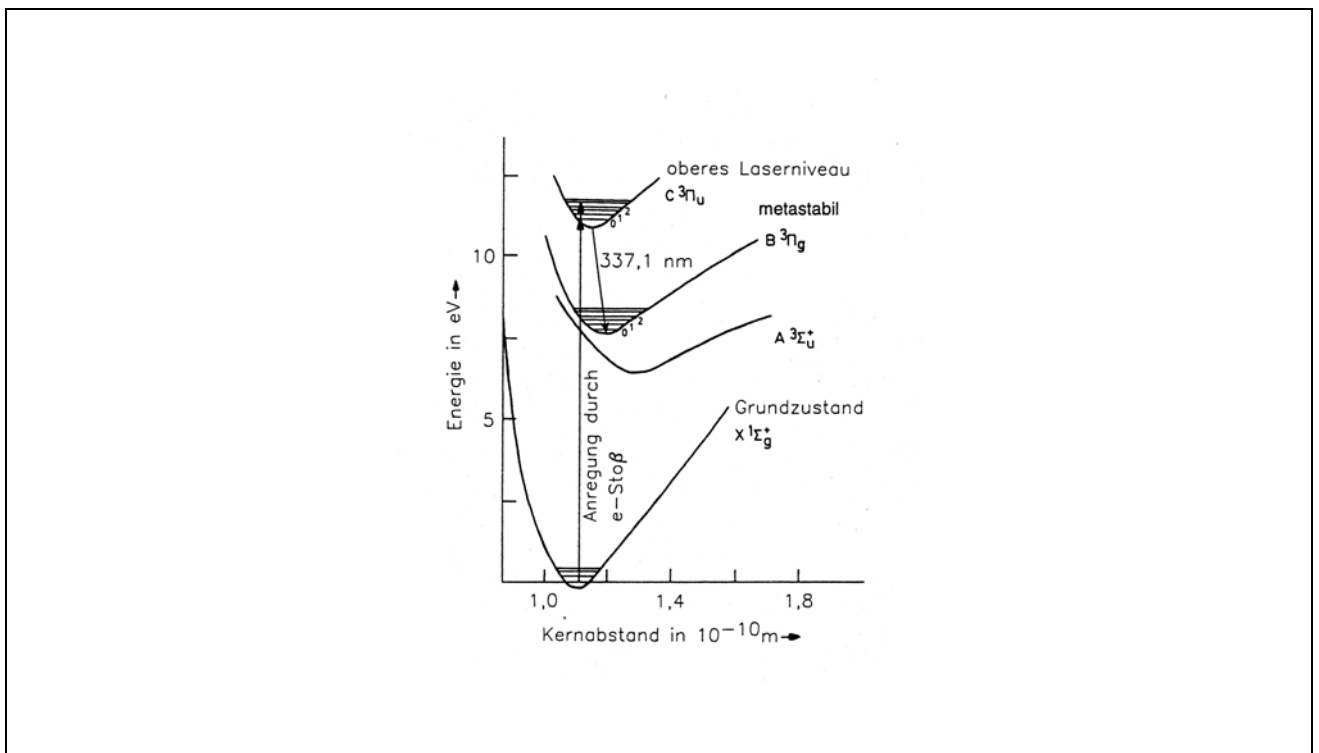


Abbildung 6.17 : Termschema des Stickstofflasers

Das System des Lasers funktioniert relativ einfach, so daß er in Laboratorien selbst gebaut wird. Zudem ist die Methode auch einfach.

Die Experimente wurden unter Wiederholfrequenz (2 Hz) in Millipore-Wasser anstatt der milden Säure-Umgebung (ca. pH 3.7-3.9) durchgeführt. Der Ablauf der Abspaltung wurde pro 10 min. mittels UV-Spektrometrie gemessen (Abbildung 6.18). Der Mechanismus der Abspaltung der o-Nitrobenzylether Derivate wurde in Kapitel 6.1.2 ausführlicher beschrieben.



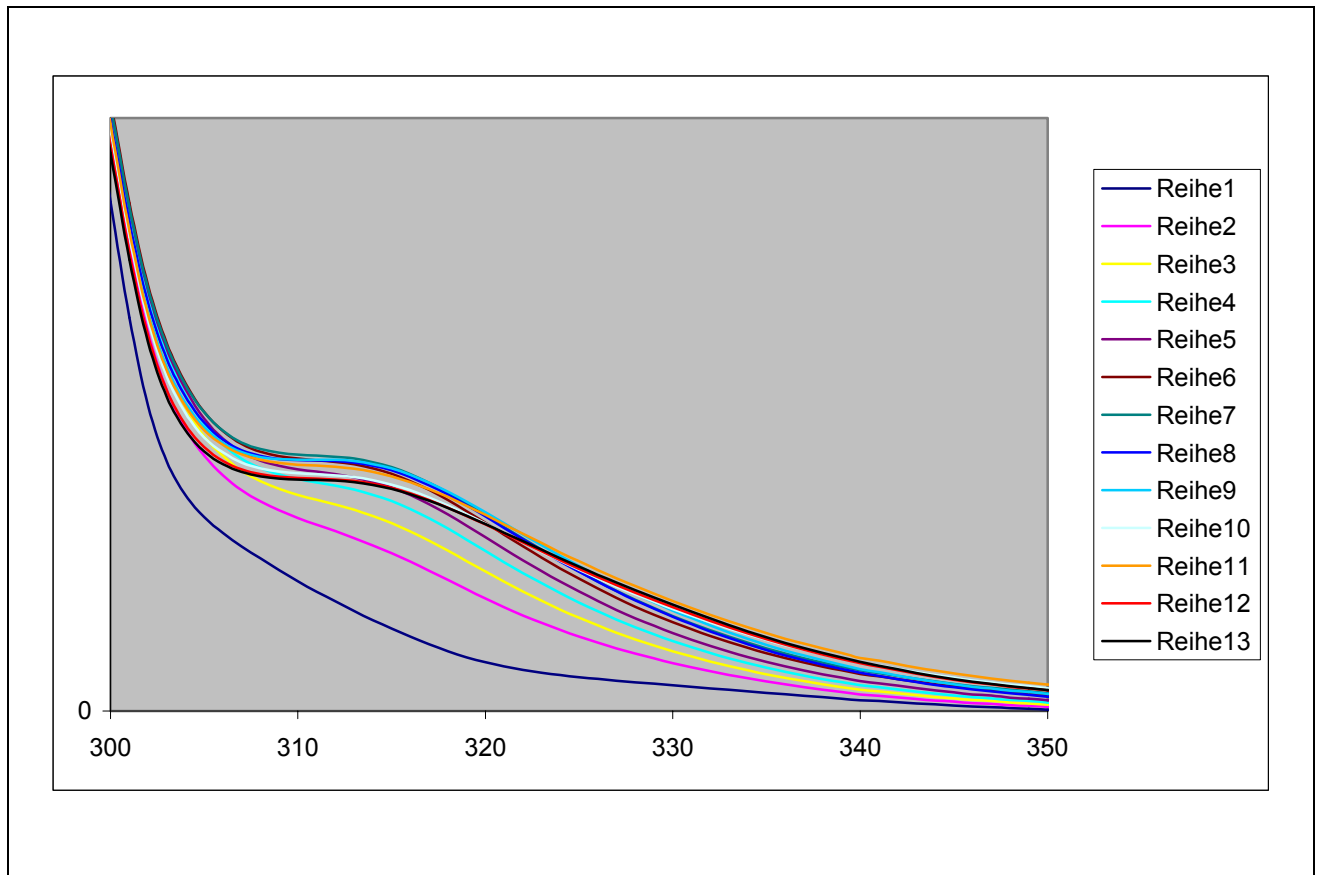


Abbildung 6.18 : Ablauf der Abspaltung der [1-(o-Nitrobenzyl)oxy]methyl-Schutzgruppe (nbm) mittels UV-Spektrum des Oligodesoxynukleotids **S8**

Mit diesem Stickstofflaser wurde das Oligodesoxynukleotid **S8** gut abgespalten. Zudem wurde die UV-Absorption durch den bei der Abspaltung erhaltenen 2-Nitrosobenzaldehyd beeinflusst. Aber da der 2-Nitrosobenzaldehyd sehr instabil war und sich unter der Beeinflussung von Wärme und Licht leicht zersetzt, nahm die UV-Absorption 1 Stunde später ab.

# 7 Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotide

## 7.1 Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotide

### 7.1.1 Einführung des Aldehydes zur Konjugation

Da Aldehyd eine reaktive Gruppe ist, wird die Reaktion des Aldehydes dafür verwendet, daß Biomoleküle mit Fluorophoren, Reporter-Gruppen, Proteinen, Nukleinsäuren und kleinen Biomolekülen konjugiert oder auf Oberflächen immobilisiert werden können<sup>174-176</sup> (Abbildung 7.1).

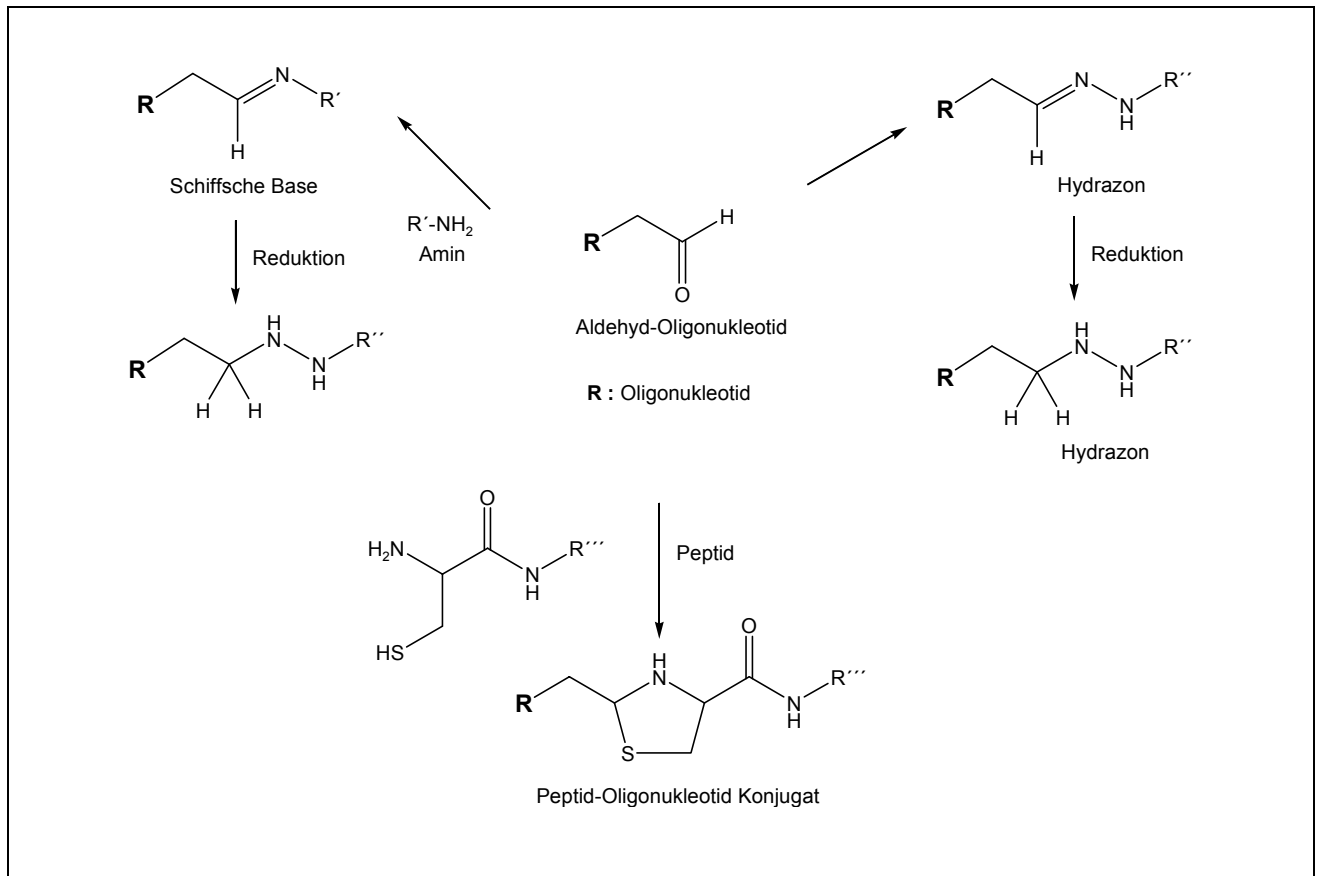


Abbildung 7.1 : Reaktion von Aldehyd Oligonucleotiden

Aber es ist unmöglich, daß Nukleinsäuren in der natürlichen Form Aldehyde tragen. Deswegen sind sie für eine gezielte Modifikation besonders geeignet.

Reed et al. verwendeten 2001 die cyclischen Acetale zur Konjugation von 5'-Benzaldehyd modifizierten Oligonukleotiden<sup>179</sup> (Abbildung 7.3-A). Saito et al. berichteten 2002, daß Oligonukleotide mit 3-Formylindol Nucleosid synthetisiert werden können<sup>180</sup> (Abbildung 7.3-B).

### 7.1.2 Acetal-modifizierte Oligodesoxynukleotide

Aldehyde als reaktive Spezies werden bei längerer Lagerung leicht zersetzt, z. B. die Oxidation an der Luft. Zudem entstehen bei der Oxidation mit Natriumperodat zur Synthese des Aldehydes viele Probleme. Zur Lösung der Probleme wird die Einführung einer Schutzgruppe benötigt.

Die Voraussetzungen der Schutzgruppe des Aldehydes sind :

- eine leichte Handhabung
- stabil unter Bedingungen der Standardmethoden der Synthese von Oligonukleotiden
- eine einfache Entschützung unter milden Bedingungen
- stabil bei längerer Lagerung

Diese Voraussetzungen werden durch die Einführung des Acetals als Schutzgruppe befriedigt (Abbildung 7.4).

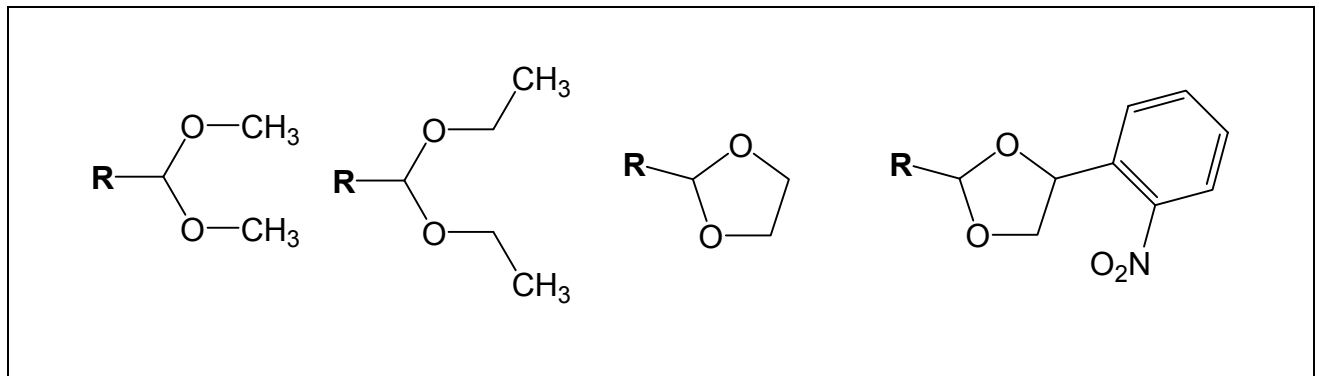


Abbildung 7.4 : Einführung des Acetals als Schutzgruppe

Acetale bestehen aus zwei Alkoxygruppen (-OR) und werden oft als Schutzgruppen der Carbonylgruppen benutzt. Die Schutzgruppen sind stabil gegenüber Basen und werden mit wässrigen Säuren entschützt.

Aldehydgruppen in Oligonukleotiden sind durch eine Oxidation eines vicinalen Diols mit Natriumperodat möglich<sup>177,178</sup>.

Die erste Methode ist die Oxidation von RNA-Bausteinen mit Natriumperodat am 3'-Ende eines Oligonukleotides. Aber der Nachteil dieser Methode ist die Opferung eines Nucleotides am 3'-Ende von Oligonukleotiden für die Konjugation (Abbildung 7.2).

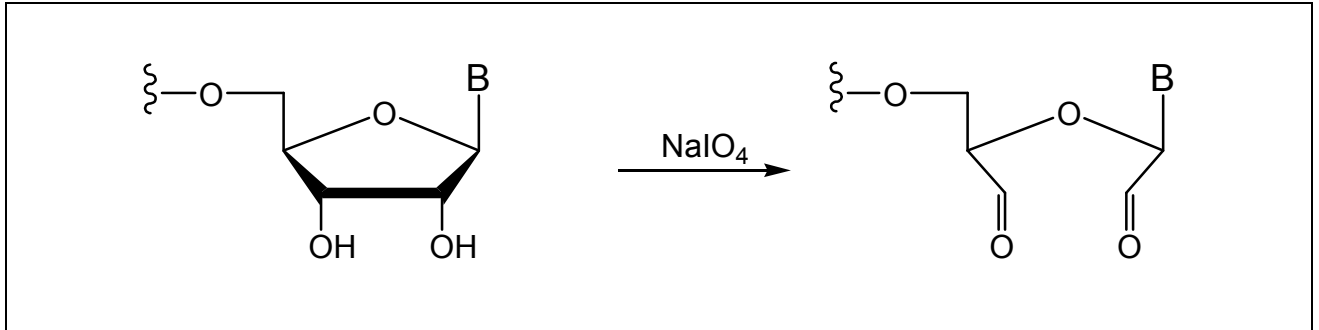


Abbildung 7.2 : Opferung eines Nucleotides am 3'-Ende von Oligonukleotiden

Die zweite Methode ist die Kupplung von vicinalen Diolen und anschließend die Oxidation zum Aldehyd am 5'-Ende von Oligonukleotiden. Die dritte Methode ist die Synthese eines modifizierten Nucleotides, das an einer Seitenkette ein vicinale Diole tragen. Das große Problem dieser Methoden ist die Unmöglichkeit der selektiven Oxidation der 3'- oder 5'-Gruppe. Zudem wenn andere Gruppe des Biomoleküls mit Periodat oxidiert werden, können diese Methoden nicht benutzt werden.

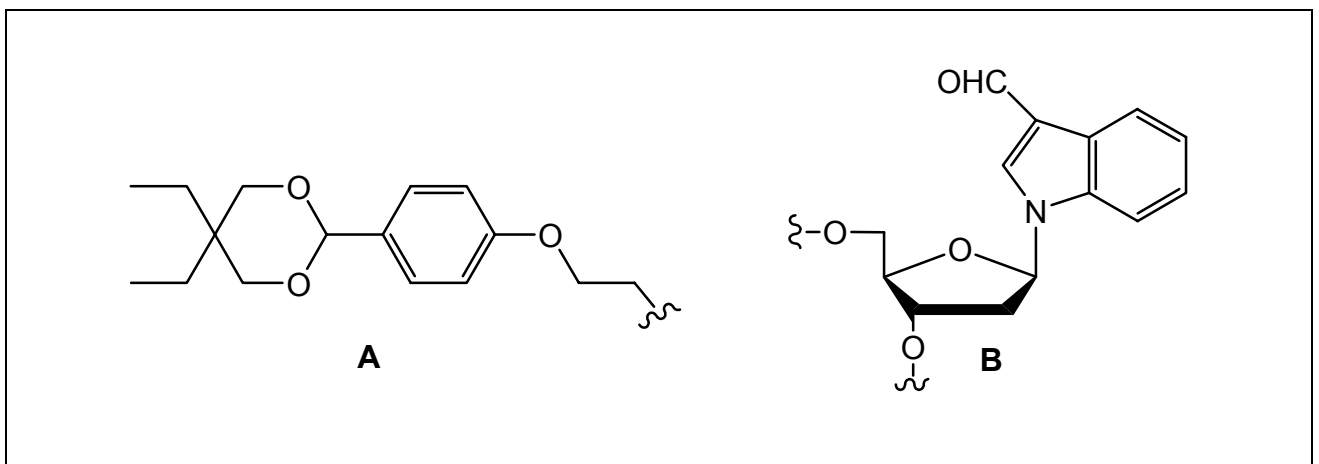


Abbildung 7.3 : Einführung der cyclische Acetalschutzgruppe von 5'-Benzaldehyd modifiziertem Oligonukleotid (A) und 3-Formylindol modifiziertem Oligonukleotid (B)

## 7.2 Chemische Synthese

### 7.2.1 Synthese von Acetalverbindung 37

Die Acetalgruppen tragende reaktive Verbindung 37 wurde durch eine Umsetzung von Amino-Acetalen erhalten<sup>182-184</sup> (Abbildung 7.4).

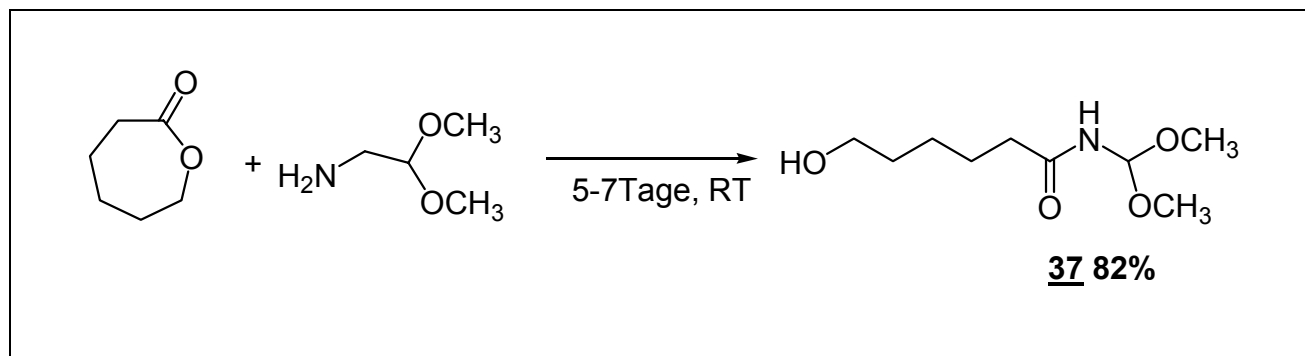


Abbildung 7.4 : Synthese von Acetalverbindung 37

Die einfache Additionsreaktion wurde aus einem billigen und nützlichen Edukt wie Caprolacton unter milden Bedingungen (Raumtemperatur) ohne Base und Lösungsmittel durchgeführt und nur sehr geringe Nebenprodukte erhalten. Zudem wurde die Reaktionszeit von mindestens 5-7 Tagen zwecks der perfekten Umsetzung von Amino-Acetalen benötigt. Dank des großen Unterschiedes zwischen den Siedpunkten von Edukt, Produkt und Nebenprodukt konnte die Verbindung 37 mittels einer fraktionierten Destillation effektiv isoliert werden und in guter Ausbeute von 82% erhalten werden. Die in Gegenwart von Pyridin als Base durchgeführte Reaktion<sup>181</sup> wird unter Bedingungen (100°C) benötigt und mehrere Nebenprodukte als zuvor erhalten.

### 7.2.2 Acetalisierung von Aldehyd-Verbindung

Die Acetalisierung von Aldehyd und Keton zählt zu den bekanntesten Protektionsmethoden. Die Reaktion wird in Gegenwart einer Säure durchgeführt. Aber Probleme der Reaktion sind lange Reaktionszeiten, Siedetemperatur, Nebenprodukte und keine Selektivität. Zur Überwindung der Probleme wurde eine neue Methode benötigt.

Deswegen wurde die Acetalgruppen tragende Verbindung **43** mit Iodid als Katalysator in Methanol erhalten<sup>185</sup> (Abbildung 7.5).

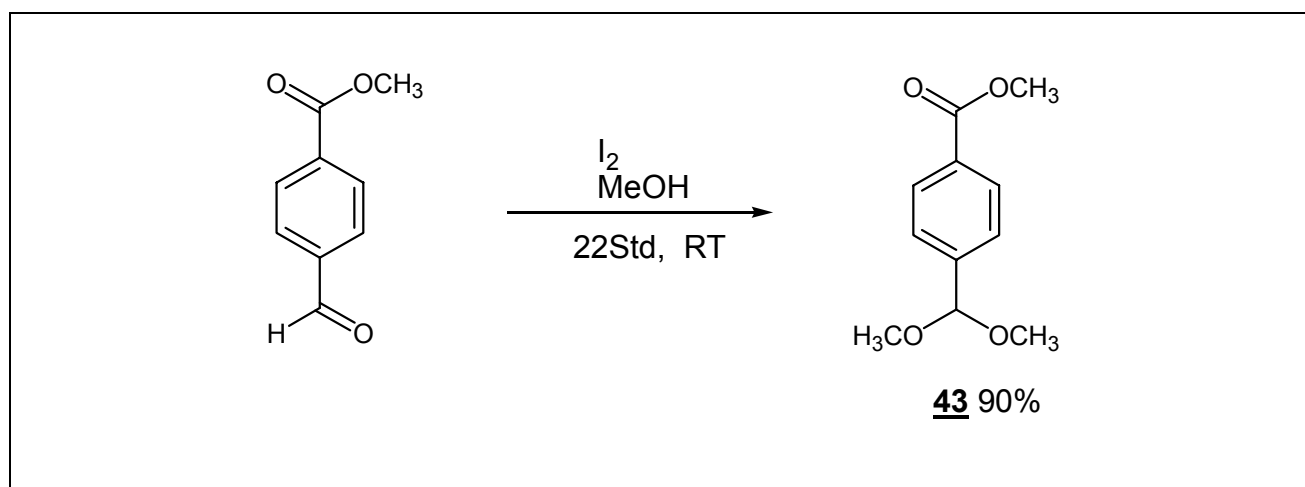


Abbildung 7.5 : Synthese von Acetal-Verbindung **43**

Die Vorteile sind eine kurze Reaktionszeit, milde Bedingungen und gute Ausbeute.

Aldehyd-Verbindung (4-Formyl-benzoesäure-methylester) wurde in Methanol gelöst, nach Zugabe von Iodid 22 Stunden gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (Alumina) konnte Acetal-Verbindung **43** mit einer Ausbeute von 90% isoliert werden.

### 7.2.3 Synthese von Epoxid-Verbindung **39**

Zur Synthese von *o*-Nitrophenylethylenglykol **40** wurde *o*-Nitrophenylethylenoxid **39** durch zwei Methoden erhalten.

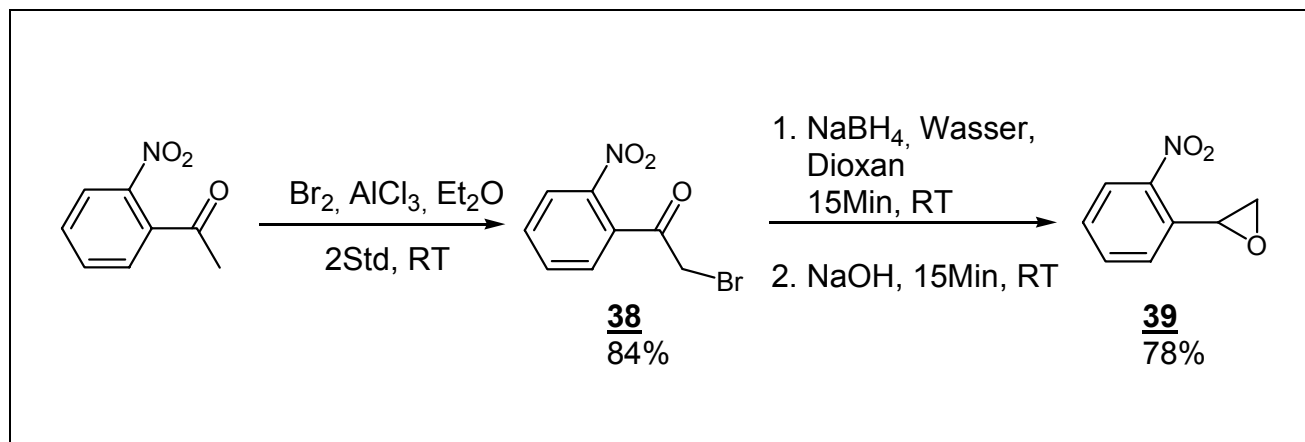
1. Die erste Synthesemethode von Epoxid :

Die erste Methode lässt sich in zwei Schritte unterteilen (Abbildung 7.6).

-Der erste Schritt :

Der erste Schritt besteht aus einer Bildung von Bromierung von Keton. Zur Synthese von *o*-Nitrophenacyl bromid ist die Verwendung mit Brom und Aluminiumchlorid<sup>186,187</sup> leichter und effektiver als die Verwendung von Brom und Essigsäure<sup>188,189</sup> oder Brom und Dioxan<sup>190</sup>. Durch diese synthetische Methode kann man eine höhere Ausbeute erhalten. *o*-Nitroacetophenon wurden in Diethylether gelöst, nach Zugabe von

Aluminiumchlorid und Brom gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte *o*-Nitrophenacyl bromid **38** mit einer Ausbeute von 84% isoliert werden.



Ausbildung 7.6 : Synthese von *o*-Nitrophenylethylenoxid **39** aus Keton

-Der zweite Schritt :

Der zweite Schritt besteht aus einer Bildung des Epoxids von  $\alpha$ -Brom-Keton. *o*-Nitrophenylethylenoxid wurde durch Reaktion zweier Schritte erhalten<sup>187,190-192</sup>. Der erste Schritt ist, daß Natriumborhydrid zur Reduktion von *o*-Nitrophenacyl bromid **38** verwendet wurde. Der zweite Schritt ist eine Synthese mit Natriumhydroxid zur Epoxid-Verbindung **39**. *o*-Nitrophenacyl bromid **38** wurde in Dioxan gelöst, nach Zugabe von Natriumborhydrid 30 Minuten gerührt und ohne Aufreinigung nach Zugabe von Natriumhydroxid 30 Minuten gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte *o*-Nitrophenylethylenoxid **39** mit einer Ausbeute von 78% isoliert werden.

2. Zweite Synthesemethode von Epoxid :

Sulfonium Ylide sind bekannte Reagenzien zur Synthese von Epoxiden. Instabile Sulfonium Ylide werden in wasserfreien homogenem Medium durch Wechselwirkung von starken Basen und Sulfonium Salz synthetisiert<sup>193</sup>. Die Ylide können auch unter Bedingungen von flüßig-flüßigem Phasentransfer mit Trimethylsulfoniumiodid synthetisiert werden, einem bekanntesten Sulfonium Salz. Aber sie muß in der Gegenwart von einem Phasentransfer-Katalysator durchgeführt werden<sup>194</sup>. Wegen der

sehr langen Reaktionszeit bei der Synthese von Keton und schwierige Aufreinigung des Epoxids wurde eine einfache und effektive andere Methode eingeführt, die unter zwei Phasen mit Trimethylsulfoniumiodid, Kaliumhydroxid und Wasser in Acetonitril durchgeführt wurde<sup>195-198</sup> (Abbildung 7.7).

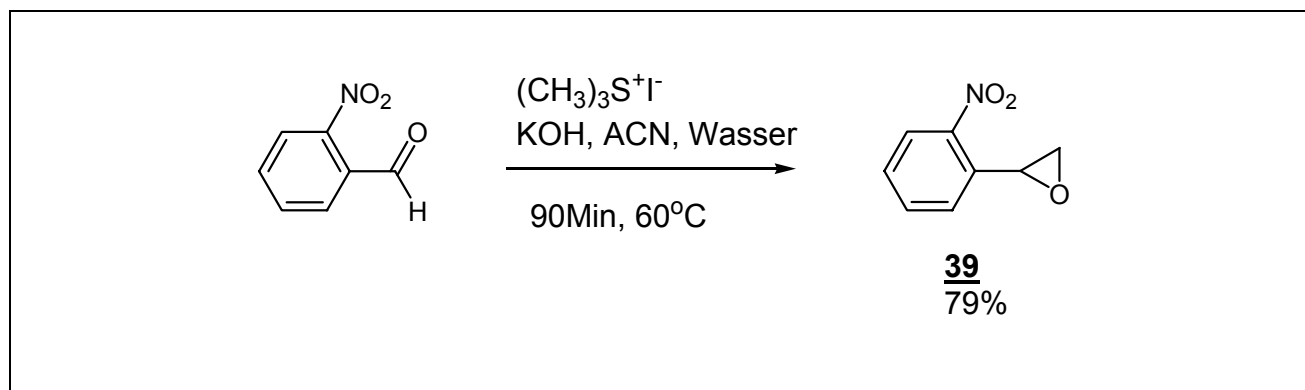


Abbildung 7.7 : Synthese von o-Nitrophenylethylenoxid **39** aus Aldehyd

Durch die Methode wurden Epoxid-Verbindungen aus aromatisch und heteroaromatische Aldehyden in sehr guten Ausbeuten erhalten<sup>197</sup>. 2-Nitro-benzaldehyd wurden in Acetonitril gelöst, nach Zugabe von Trimethylsulfoniumiodid, Kaliumhydroxid und Wasser auf 60°C erhitzt und bei dieser Temperatur gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Epoxid-Verbindung **39** mit einer Ausbeute von 79% isoliert werden.

#### 7.2.4 Reduktion von Carbonylverbindung **43**

Bei der Reduktion von Carbonylverbindungen werden Natriumborhydrid(NaBH<sub>4</sub>) und Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH<sub>4</sub>) als Reagenzien am häufigsten verwendet. Die Reduktion von Estergruppen tragenden Verbindungen wird mit Metall-Hydrid-Reagenzien erhalten (Abbildung 7.8).

Eine bekannte Methode zur Reduktion ist die Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH<sub>4</sub>) in abs Diethylether oder Tetrahydrofuran<sup>199,200</sup> und eine andere Methode ist die Verwendung von Natriumborhydrid(NaBH<sub>4</sub>) in tert.-Butanol und Methanol<sup>201</sup>.



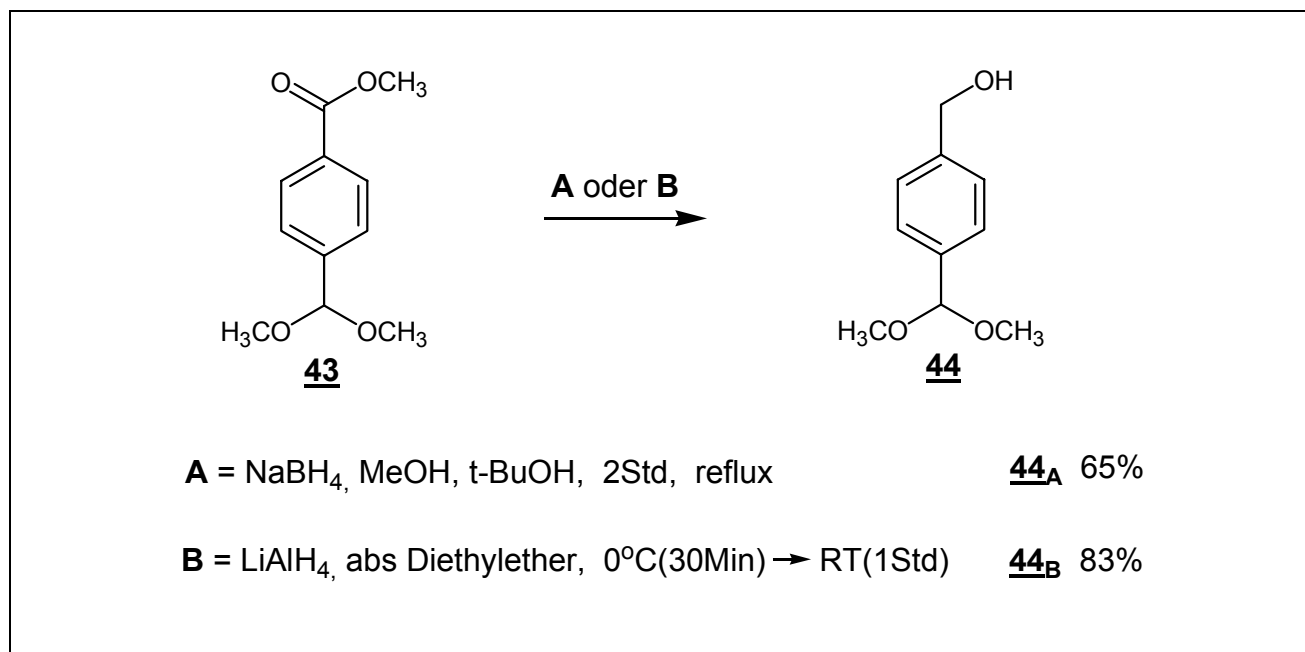


Abbildung 7.8 : Reduktion von Carbonylverbindung **43**

Erste Methode:

Carbonylverbindung **43** wurde in abs Diethylether gelöst, auf 0°C abgekühlt, nach Zugabe von LiAlH<sub>4</sub> auf Raumtemperatur erwärmt und gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Produkt **44** mit einer Ausbeute von 83% isoliert werden.

Zweite Methode:

Carbonylverbindung **43** wurde in tert.-Butanol gelöst, nach Zugabe von NaBH<sub>4</sub> mit Rückflußkühler zum Sieden erhitzt und nach Zugabe von Methanol bei dieser Temperatur gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte Produkt **44** mit einer Ausbeute von 65% isoliert werden.

### 7.2.5 Synthese von Glykol-Verbindung aus Epoxid-Verbindung **39**

Glykol-Verbindungen werden durch Öffnung des Rings von Epoxid-Verbindungen synthetisiert. Dafür werden zwei Methoden verwendet. Eine erste Methode ist die Verwendung von Säuren wie Chlorwasserstoff oder Schwefelsäure, die als Katalysator zur Hydrolyse von Epoxid dienen. Aber wegen der Zunahme in der Gegenwart der Säuren an Nebenprodukt ist die Synthese von o-Nitrophenylethylenglykol **40** bei dieser Methode

nicht so gut<sup>2</sup>. Deswegen wurde eine zweite Methode benötigt, die Kaliumcarbonat als Basenkatalysator verwendet<sup>190,204</sup> (Abbildung 7.9).

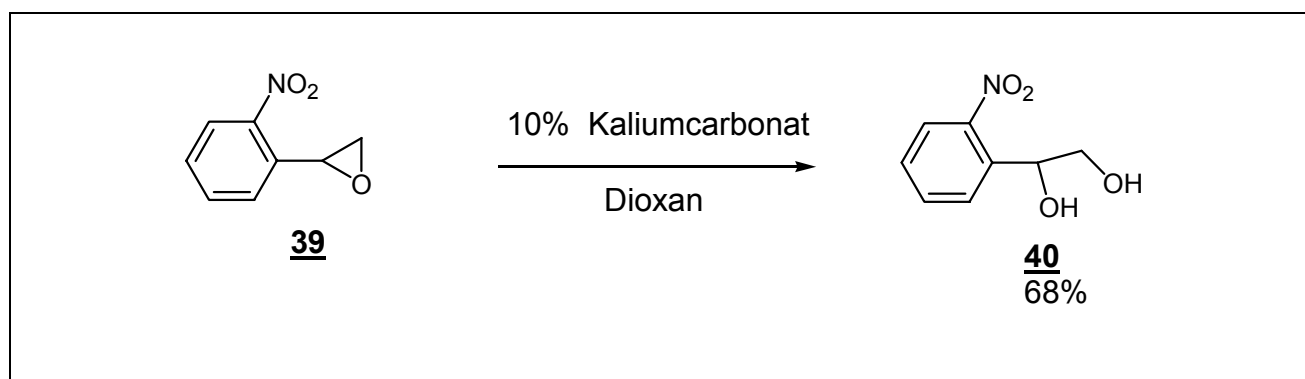


Abbildung 7.9 : Synthese von *o*-Nitrophenylethylenglykol **40**

Da *o*-Nitrophenylethylenglykol **40** gegen Lichte empfindlich ist, mußte es davor geschützt werden. *o*-Nitrophenylethylenoxid **39** wurden in Dioxan gelöst, nach Zugabe von 10% Kaliumcarbonat 19 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten Glykol-Verbindungen mit einer Ausbeute von 68% isoliert werden.

### 7.2.6 Synthese von cyclischen Acetal-Verbindung **41** und **45**

Zur Synthese von cyclischen Acetal- oder Ketal-Verbindungen wurde die Acetalgruppe tragende Verbindungen und Nitrophenylethylenglykol **40** in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat cyclisiert<sup>190,203,204</sup> (Abbildung 7.10).

Ein Vorteil ist, daß sie als Schutzgruppen gegenüber Basen und Licht stabil sind. Die Acetalgruppen tragende Verbindungen und Nitrophenylethylenglykol **40** wurde in Benzol gelöst, nach der Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat 21 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten Acetal-Verbindungen **41** und **45** mit einer Ausbeute von 58% und 89% isoliert werden.

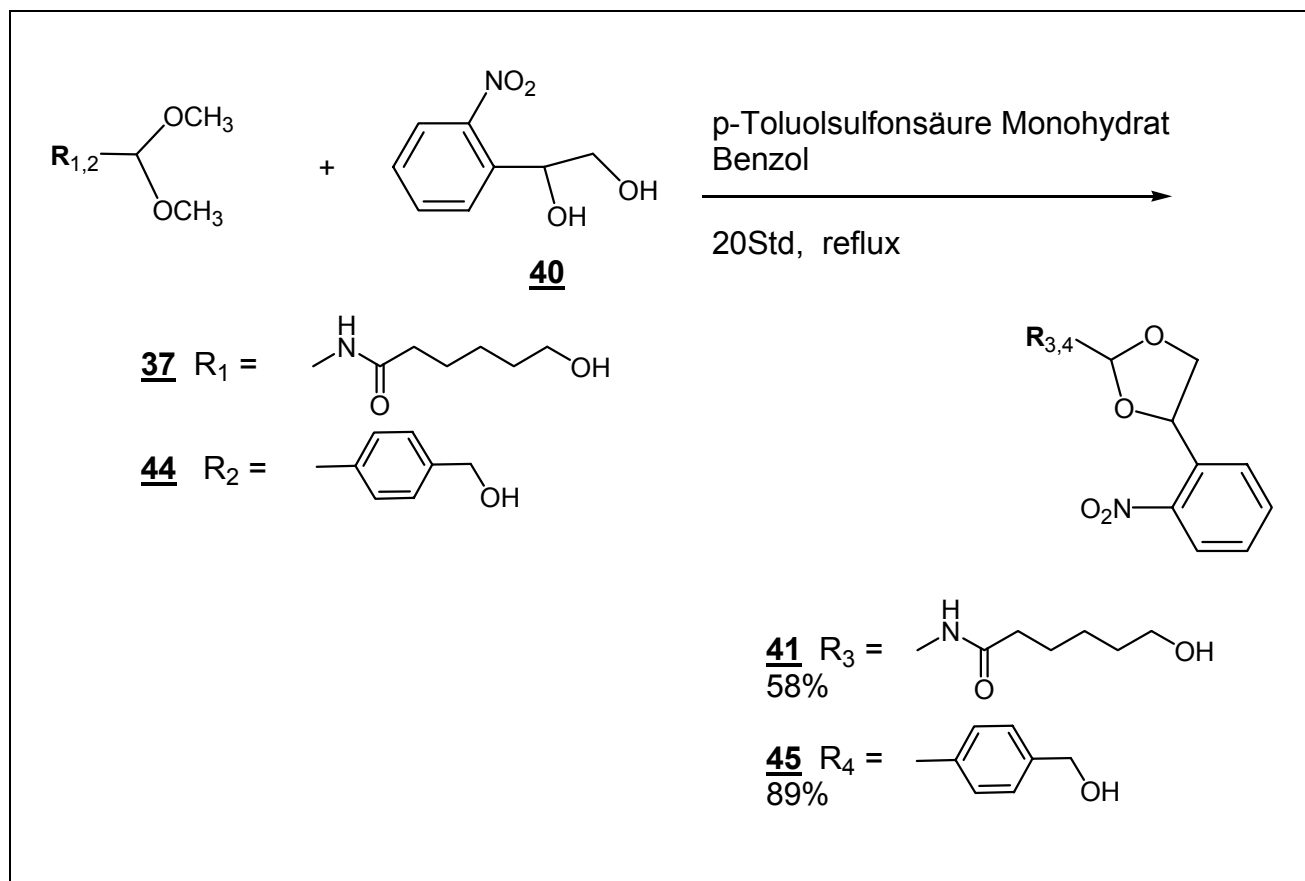


Abbildung 7.10 : Synthese von cyclischen Acetal-Verbindungen **41** und **45**

## 7.2.7 Einführung der 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit - Gruppe von cyclischen Acetal-Verbindungen **42** und **46**

Zur erfolgreichen Festphasensynthese von DNA werden cyclische Acetal-Verbindungen **42** und **46** benötigt, die mit 2-Cyanoethyl-diisopropylchlor-phosphoramidit<sup>117,120,125</sup> synthetisiert werden (Abbildung 7.11). 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit ist das Standard-Phosphitylierungsreagenz für DNA und RNA Phosphoramiditbausteine. Bei der Synthese ist auf Trockenheit aller Lösungsmittel und Reagenzien und auf Ausschluß von Sauerstoff zu achten. Die cyclischen Acetal-Verbindungen **41** und **45** werden in eine Mischung von Dichlormethan und Acetonitril im Verhältnis 1 zu 1 gelöst, mit N,N-Ethyldiisopropylamin versetzt, auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit werden weitere 10 Minuten bei dieser Temperatur, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Zur Vermeidung der Bildung von H-Phosphonaten wird kurze Reaktionszeit bei Raumtemperatur benötigt. Die als die zwei Diastereomeren synthetisierten

Phosphoramidit Acetal-Verbindungen **42** und **46** wurden nach einer kurzen Säulenchromatographie erhalten.

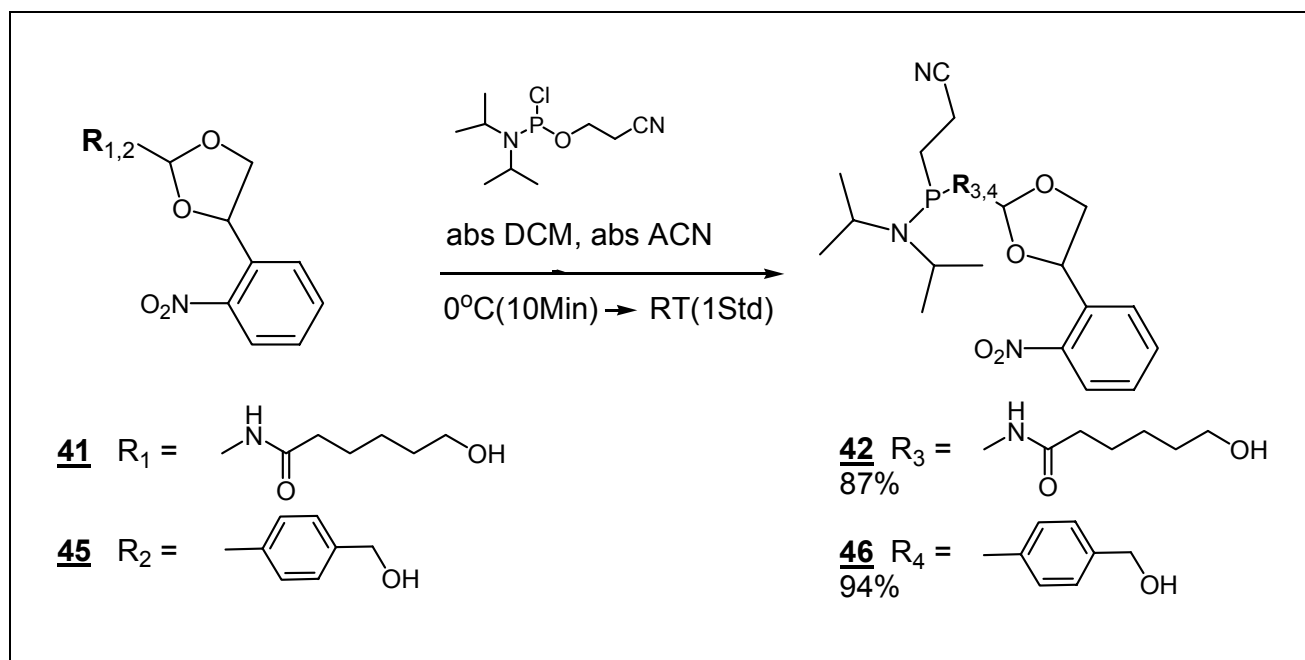


Abbildung 7.11 : Synthese von Phosphor-Verbindungen **42** und **46**

Die Isomere müssen mittels einer Säulenchromatographie nicht getrennt werden. Die Isomere können so in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Die Ausbeuten von Phosphoramidite-Nukleosiden **42** und **46** waren 87% und 94%. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte sowohl über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie als auch über  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie.

## 7.2.8 Syntheseübersichten

Abbildung 7.12 zeigt die Syntheseübersicht der Phosphoramidit-Verbindung : Diisopropyl-phosphoramidous acid 2-cyano-ethyl ester 5-[[4-(2-nitro-phenyl)-[1,3]dioxolan-2-ylmethyl]-carbamoyl]-pentyl ester **42**

Abbildung 7.13 zeigt die Syntheseübersicht der Phosphoramidit-Verbindung **20** : Diisopropyl-phosphoramidous acid 2-cyano-ethyl ester 4-[4-(2-nitro-phenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-benzyl ester **46**



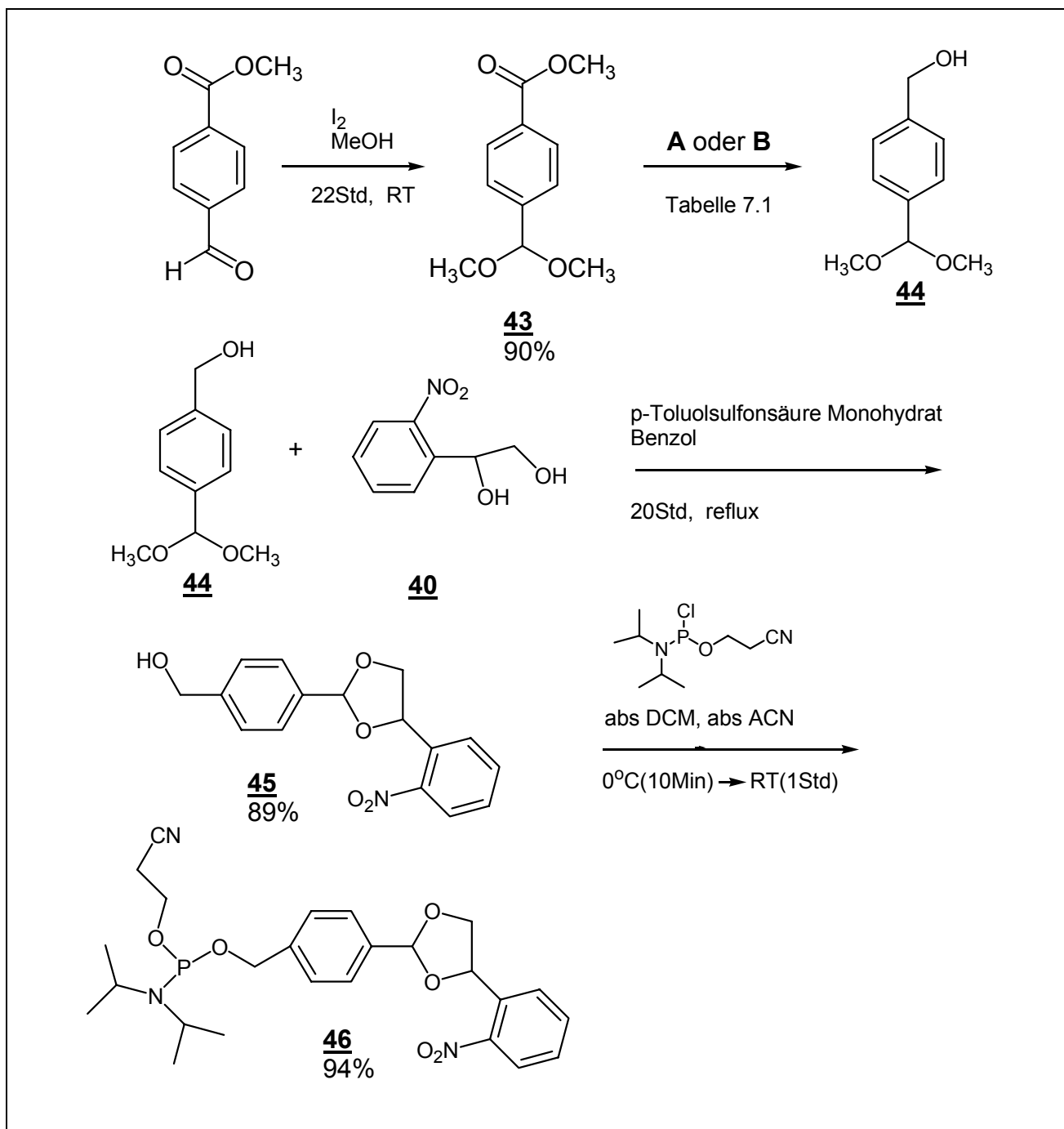


Abbildung 7.13 : Synthese der Phosphoramidit-Verbindung **46**

Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur und Reaktionszeit	Ausbeute
NaBH <sub>4</sub> , t-BuOH	MeOH	2Std, reflux	65 %
LiAlH <sub>4</sub>	abs Diethylether	0°C(30Min), RT(1Std)	83 %

Tabelle 7.1 : Synthese der Phosphoramidit-Verbindung **44**

## 7.3 Synthese des Acetal-modifizierten Oligodesoxynukleotides

### 7.3.1 Synthese des Oligodesoxynukleotid S9 und S10 mit Einbau von modifiziertem Nukleotid

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligodesoxynukleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode am Modell Expedite 8909 Synthesizer von PerSeptive Biosystem hergestellt. CPG-Träger (500 Å Porengröße) wurde als Trägermaterial im 1 µmol Maßstab eingesetzt. 4,5-Dicyanoimidazol wurde als DCI Aktivator eingesetzt. Die Standardkupplungszeiten der 10 Minuten für DNA-Bausteine wurde für das modifizierte Nukleotid übernommen. Aber es war problematisch, daß Phosphoramidit-Verbindungen **31** und **36** schlecht in Acetonitril gelöst wurden. Deswegen wurden die Nukleosid-Bausteine vor der Synthese abfiltriert. In Abbildung 7.14 zeigen Abkürzung und Sequenz für die in DNA eingebauten modifizierten Nukleotide.

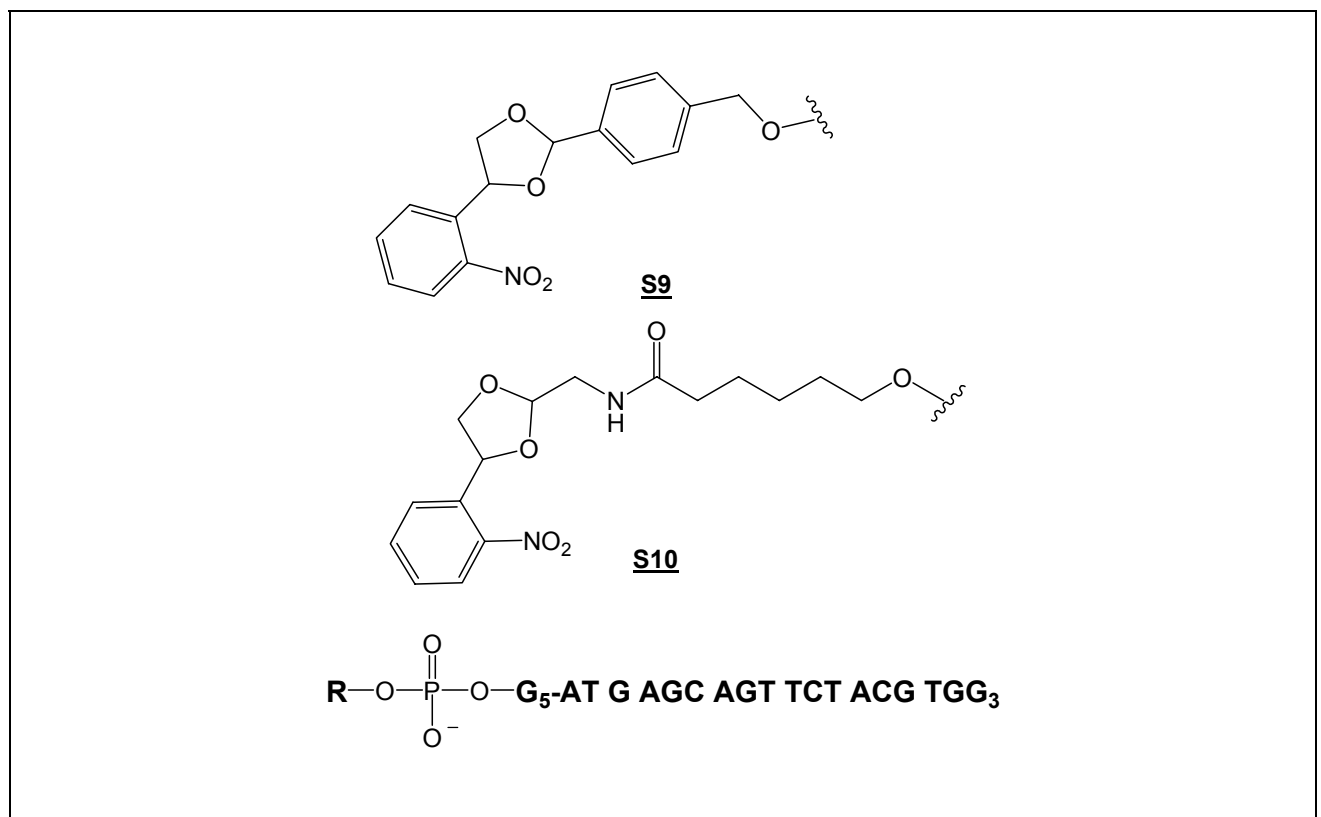


Abbildung 7.14 : Abkürzung und Sequenz des modifizierten Nukleotides S8 für die DNA-Synthese



## 7.3.2 Aufreinigung der Oligodesoxynukleotide

Nach der Synthese der Oligodesoxynukleotide durch die Festphasensynthese muß die Abspaltung vom CPG-Material und Aufreinigung der Oligodesoxynukleotide durchgeführt werden. Die Aufreinigung von DNA ist in zwei Teilschritte zu unterteilen.

3. Im ersten Schritt wurde 25%ige Ammoniak-Lösung verwendet, um das CPG-Material abzuspalten. Die  $\beta$ -Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphat wurde auch quantitativ abgespalten, während das CPG-Material vom Oligodesoxynukleotid abgespalten wurde. Nach Filtration wurde diese Oligodesoxynukleotid -Lösung in der SpeedVac bis zur Trockne eingeeengt.
4. Im zweiten Schritt wurde das Oligodesoxynukleotid mittels *reverse-phase*-HPLC aufgereinigt.

## 7.3.2 Charakterisierung von Oligodesoxynukleotid

### 7.3.3.1 Massenspektrometrie

Zur Charakterisierung der diesem hergestellten Oligodesoxynukleotide wurde auch die Massenspektrometrie eingesetzt. In dieser Arbeit wurden das modifizierte Oligodesoxynukleotid **S9** und **S10** nur mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht ((Tabelle 7.2 und Abildung 7.15).

Oligodesoxynukleotid	berechnete Masse	mit MALDI Mass gefundene Masse
<b>S9</b>	6283,20	6368,28 [M-5H+4Na] (Acetal)
	6118,23	6120,88 [M] (Aldehyd)
<b>S10</b>	6246,14	6289,19 [M-4H+3Na] (Acetal)
	6081,18	6145,60 [M-3H+2Na] (Aldehyd)

Tabelle 7.2 : Mass der synthetiserten Oligodesoxynukleotide- **S9** und **S10**

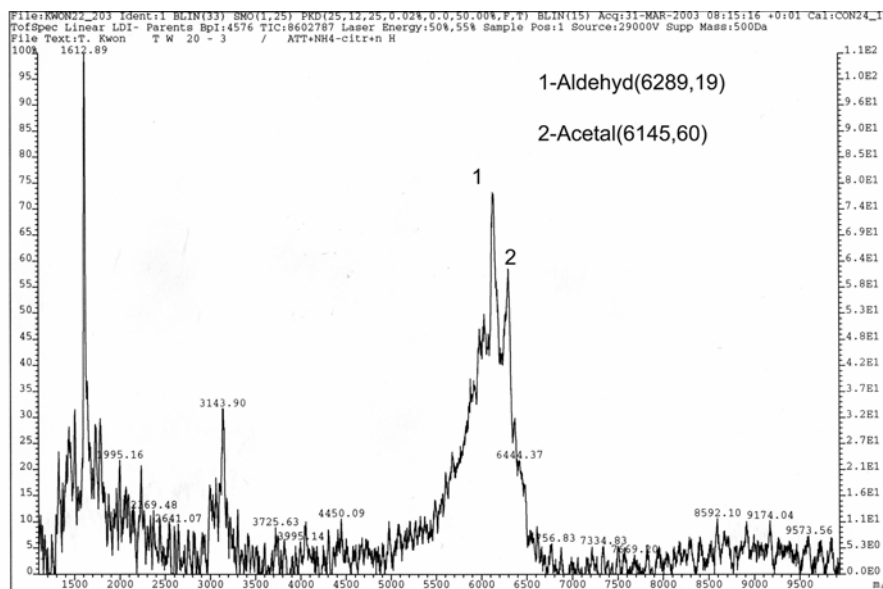
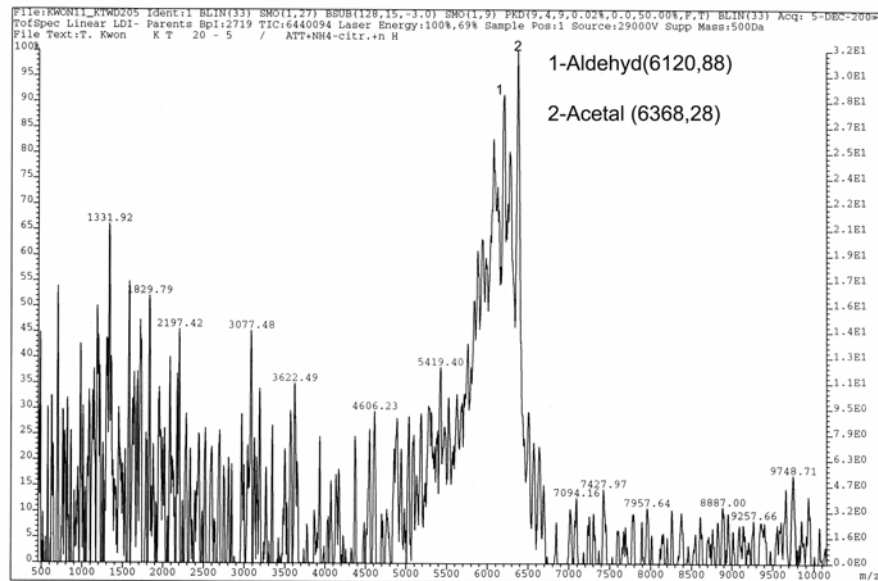


Abbildung 7.15 : MALDI-Spektrum der Oligodesoxynucleotide- **S9** und **S10**

Bei den Oligodesoxynucleotiden **S9** und **S10** wurde die Molare Massen des entsprechenden Acetals und Aldehyds detektiert. Aber diese als Acetal an der 5'-Position modifizierte Oligodesoxynucleotide besitzen Probleme.

Die Probleme sind :

1. Die Phosphoramid-Verbindungen **31** und **36** als Bausteine wurden in Acetonitril schlecht gelöst.
2. Mittels *reverse-phase-HPLC* war die Aufreinigung von den Oligodesoxynucleotiden schwer.
3. sehr niedrige Ausbeute

4. Die Freisetzung des Aldehyds war durch die Behandlung mit Säure nicht einfach und konnte nicht durch die *reverse-phase-HPLC* und MALDI-Spektrometrie nachgewiesen werden (Karstin, Doktorarbeit 2004).

Deswegen eignen sich die als Acetale an 5'-Position modifizierten Oligodesoxynukleotide **S9** und **S10** nicht für die Freisetzung des Aldehyds.

# 8 Zusammenfassung

## 8.1 Synthese und Analyse von Pyren gelabelten Oligonukleotiden

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die mit 1-Ethynyl-pyren und 1-(4-Ethynyl-phenylthiynyl)-pyren gelabelten Cytidine synthetisiert, um die Fluoreszenz der RNA-Duplexe zu untersuchen.

Die Synthese der Cytidin-Phosphorverbindungen **18** und **25** konnte in 9 Schritten ausgehend vom Cytidin erfolgreich durchgeführt werden ( Abbildung 8.1)

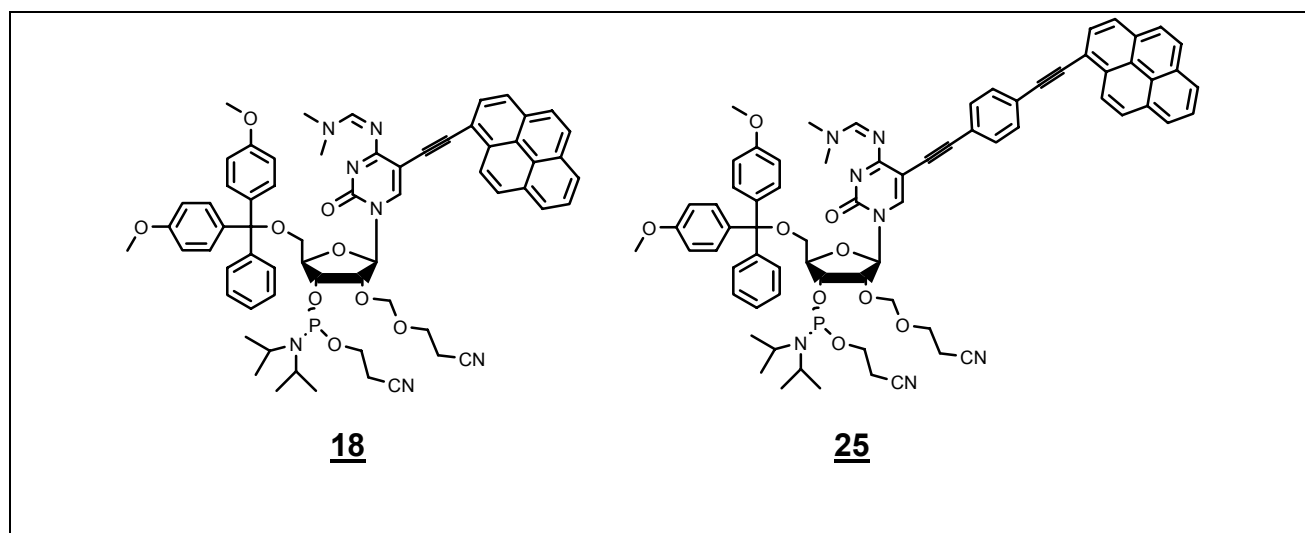


Abbildung 8.1 : Synthese von Cytidin-Phosphorverbindungen **18** und **25** als Zielbausteinen

Die Schlüsselschritte der Synthese waren die Synthese von Pyren-Analoga als Fluorophore, Substitution dieser Analoga an der C5-Cytidin sowie Einführung von 2-Cyanoethoxymethyl(CEM)-Schutzgruppe an der 2'-Position vom Zucker. Diese Synthese und Substitution von Pyren-Analoga wurde durch Sonogashira-Kupplung mit Palladium(0) und Palladium(II)-Katalysatoren erfolgreich durchgeführt. Die CEM-Schutzgruppe unterbindet effektiv die Probleme von TBDMS in Nukleosiden.

Die mit Pyren-Analoga gelabelten Oligonukleotide **S2** und **S3** wurden nach der Phosphoramiditmethode in der RNA-Festphasensynthese hergestellt. Diese Oligonukleotide wurden mit allen vier natürlichen Basen gepaart und die Stabilität von

12mer RNA-Duplexe mittels UV- und CD-Spektroskopie gemessen. Bei allen RNA-Duplexen wurde eine Stabilisierung von ca. 3-6°C beobachtet. Diese Erhöhung der Stabilität kann durch eine hydrophobe Wechselwirkung erklärt werden. Da Pyren und Linker sich außerhalb des Duplexes befinden, üben die sterische Hinderung einen geringen Einfluß auf der Stabilität der Duplexe aus. Trotz des Unterschiedes der Länge des Linkers zwischen dem Pyren und Cytidin wurde der Unterschied der  $T_m$ -Werten im Vergleich dieser beiden RNA-Duplexen und den unmodifizierten RNA-Duplexen nur geringfügig beobachtet( Abbildung 8.2).

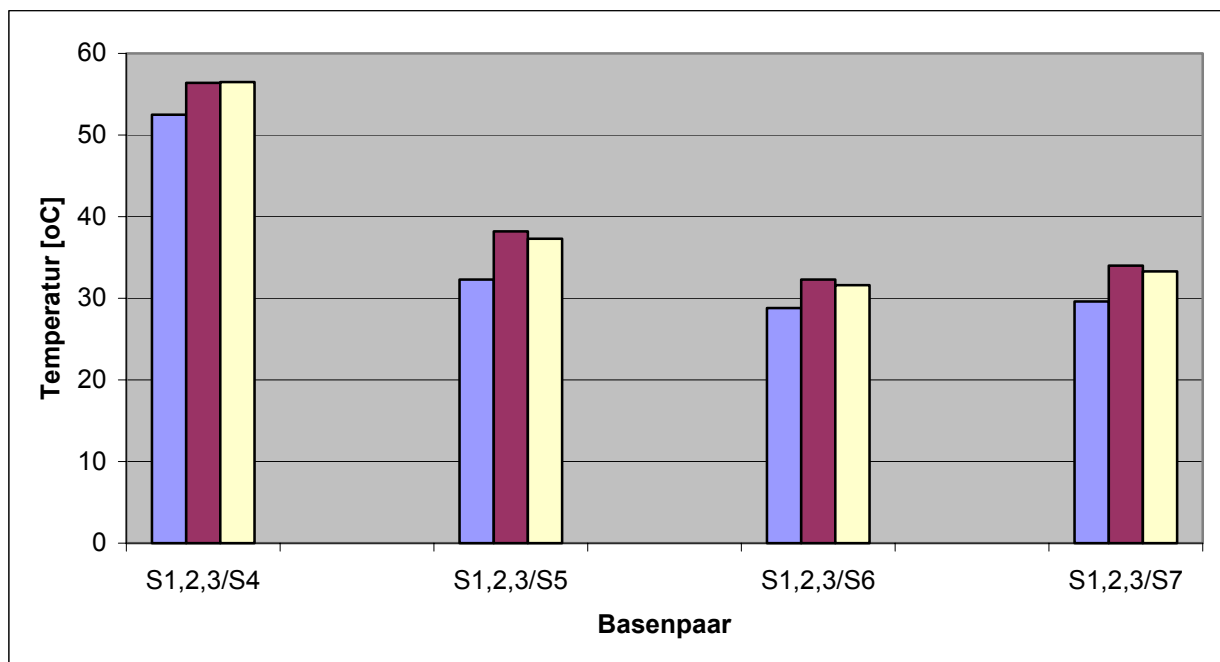


Abbildung 8.2 : Vergleich der  $T_m$ -Werte der un- und modifizierten Duplexe

Alle CD-Spektren zeigen den charakteristischen Kurvenverlauf einer A-Helix.

Im Vergleich mit den unmodifizierten RNA-Duplexen wurden die Maximal- und Minimalwellenlängen dieser Duplexe als geringfügig unterschiedlich beobachtet. Der minimale Unterschied der Hauptmaxima bedeuten eine geringe Veränderung der Duplex-Struktur.

Bei der Fluoreszenz-Messung von 1-Ethynylpyren-cytidin besitzen RNA-Duplexen reduzierte die Fluoreszenz-Intensität, da Elektronen-Transfer Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren und den benachbarten Basen stattfindet hat. Die Intensität war im Vergleich mit 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren gelabelten RNA-Duplexe und den einzelnen Strang geringfügig unterschiedlich, da das angeregte Pyren und die benachbarten Nukleobasen nur sehr gering oder garnicht kontaktiert werden.

Durch die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Informationen von Pyren gelabelten Oligonukleotiden eröffnen sich neue und interessante Arbeitsgebiete :

- Mit anderen Fluorophoren wie Fluorescein, können neue und fluoreszierende Oligonukleotide synthetisiert werden, um Untersuchungen in der Molekularbiologie, Diagnostik und für strukturelle Studien durchzuführen.
- Durch diesen Synthesen und Untersuchungen kann die Wechselwirkung zwischen Fluorophoren und benachbarten Nucleobasen aufgezeigt werden.

## 8.2 Synthese von *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe (nbm und (R)-npeom) an der 2'-Desoxynucleinsäure und Abspaltung durch Photoreaktion

In Rahmen der Doktorarbeit wurden [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl-(nbm) und [(R)-1-(*o*-Nitrobenzyl)ethoxy]methyl-((R)-npeom) Schutzgruppen an der 2'-Position eingeführt, um die Abspaltung durch die Photoreaktion an der 2'-Position zu untersuchen. Die Synthese der Uridin-Phosphorverbindungen **31** und **36** konnte in 3 Schritten ausgehend vom Uridin erfolgreich durchgeführt werden ( Abbildung 8.3).

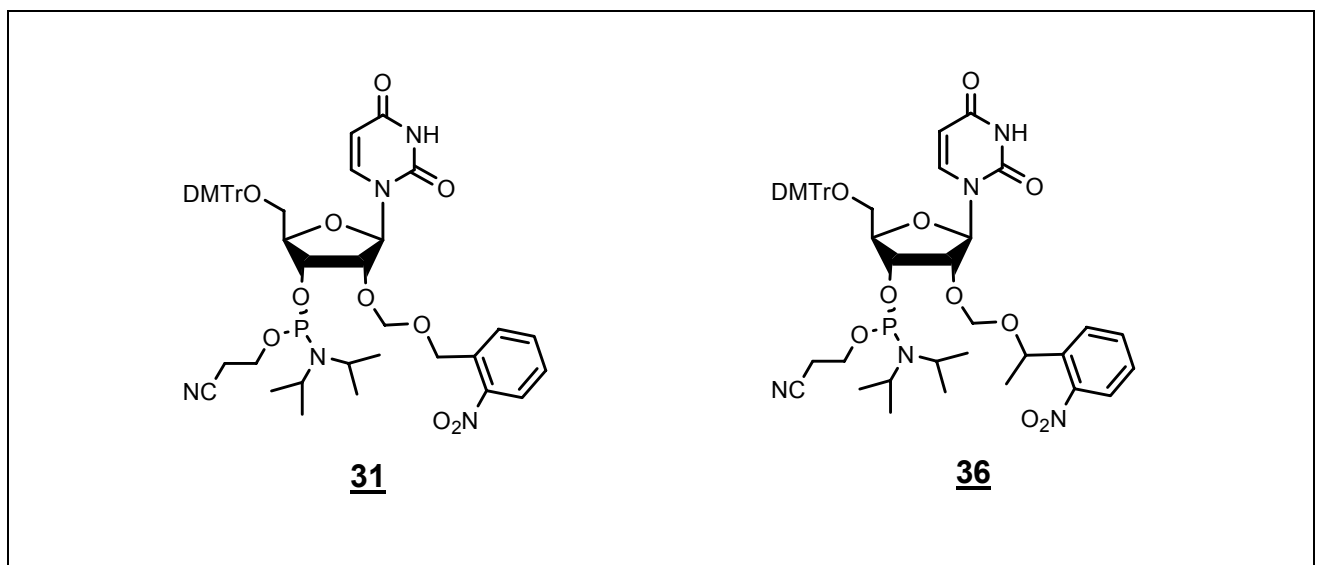


Abbildung. 8.3 : Darstellung der Phosphoramidite-Nucleoside **31** und **36**

Die nbm- und -(R)-npeom-Schutzgruppe besitzenden Nucleoside haben wichtige Vorteile wie keine Wanderung zwischen 2'- und 3'-Position , eine minimale sterische Hinderung, eine leichte Aufreinigung bei Oligonucleotid-Synthesen und eine leichte Entschützung.

Bei dem mit *o*-Nitrobenzyl ether (nbm) geschützten Phosphoramidit und Oligoribonukleotid treten folgende Vorteile auf :

8. *O*-Nitrobenzyl ether sind gegenüber Säure und Base stabil.
9. Keine Wanderung
10. Keine Isomere und diastereoisometre Mischung
11. Die erleichterte Aufreinigung durch Säulenchromatographie
12. Das Minimum einer sterischen Hinderung durch die Verknüpfung über eine sterisch kleine und flexible Methyleneinheit
13. Die relativ kurzen Kupplungszeiten
14. Die leichte Entschützung unter milde Säure-Bedingungen im letzten Schritt der Synthese

Das 24mer Oligodesoxynukleotid **S8** wurde mittels automatisierter Festphasensynthese eingebaut. [(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl-Schutzgruppe (nbm) an der 2'-Position wurde durch die Photoreaktion mit dem Stickstoff-Laser gut abgespalten. Die Experimente wurden in Milliporewasser wie DNA-Umgebung anstatt der milde Säure-Umgebung (ca. pH 3.7-3.9) durchgeführt. Die abgespalteten DNA wurde mittels UV- Spektroskopie bewiesen. Zudem übt die Abspaltung des erhaltenen 2-Nitrosobenzaldehyd als Nebenprodukt einen wichtigen Einfluß auf die UV-Absorption aus. Aber der 2-Nitrosobenzaldehyd war sehr instabil und zersetzt sich leicht unter die Beeinflussung von Wärme und Licht, so daß die Intensitäten der UV-Absorption 1 Stunde später wieder abgenommen hat.

### **8.3 Synthese von Acetal-modifizierte Oligodeoxynukleotide zur Aldehyd-Schutzung**

In Rahmen der Doktorarbeit wurde die Acetalschutzgruppe **40** eingeführt. Aldehyd-Verbindungen sind eine reaktive Gruppe, so daß es unmöglich ist, daß Nukleinsäuren in der natürlichen Form Aldehyde tragen.

Die Vorteile der Acetal-Schutzgruppe als Aldehyd-Schutzgruppe sind :

- eine leichte Handhabung
- stabil unter Bedingungen der Standardmethoden der Oligonukleotid-Synthese
- stabil bei längerer Lagerung

Die Phosphoramiditbausteine **42** und **46** wurden als Zielverbindungen synthetisiert (Abbildung 8.4) und die an 5'-Position Acetal-Schutzgruppe modifizierten Oligodesoxynukleotide 19mere mittels automatisierter Festphasensynthese eingebaut.

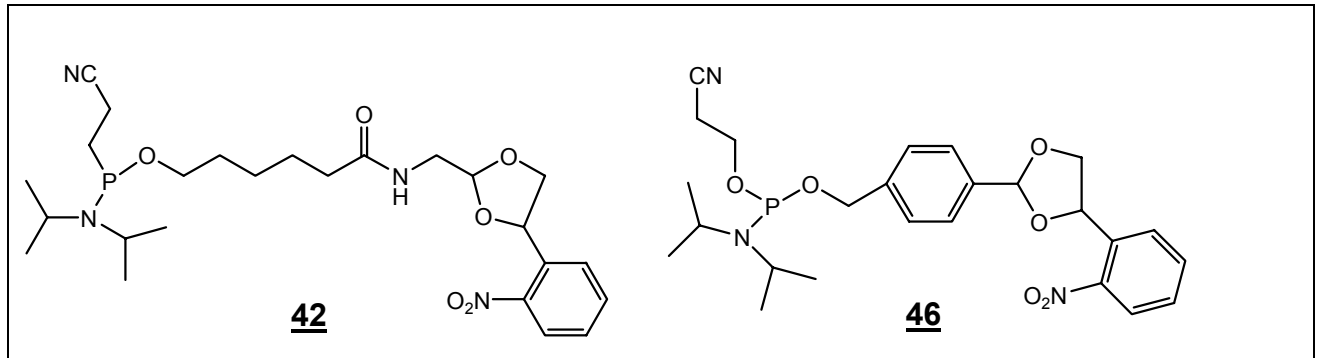


Abbildung. 8.4 : Darstellung der Phosphoramidite **42** und **46**

Aber diese Oligodesoxynukleotide besitzen Probleme:

- Die Phosphoramidit-Verbindungen **42** und **46** als Bausteine waren in Acetonitril schlecht löslich.
- Mittels *reverse-phase-HPLC* war die Aufreinigung nach der Synthese von Oligodesoxynukleotiden schwer.
- sehr niedrige Ausbeute
- die erschwerte Freisetzung des Aldehyds unter Säure-Umgebung und Analyse durch *reverse-phase-HPLC* und Massenspektrometrie



# 9 Experimenteller Teil

## 9.1 Allgemeines

### 9.1.1 Chromatographie

Für die Chromatographie (DC und FC) wurden folgende Lösungsmittel eingesetzt:

- Acetonitril p.a.
- Chloroform p.a.
- Ethylacetat techn. Qualität, über Calciumoxid getrocknet und destilliert
- *n*-Hexan techn. Qualität, bei Normaldruck destilliert
- Methanol techn. Qualität, über Kaliumcarbonat getrocknet und destilliert
- Methylenchlorid techn. Qualität, über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
- Tetrahydrofuran p.a.

#### 9.1.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554; 0,2 mm Schichtdicke). Alle  $R_f$ -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

Die 4,4'-Dimethoxytritylgruppe substituierten Verbindungen konnten mit Salzsäuredämpfen oder Hitze detektiert werden. Es erfolgte eine Orangefärbung.

#### 9.1.1.2 Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie, FC)

Die Flash-Säulenchromatographie<sup>1</sup> wurde mit Kieselgel 60 (Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 ASTM) als Trennmaterial durchgeführt. Es standen Säulen verschiedener Durchmesser zur Verfügung (2-15 cm). Die Trennungen wurden entweder isokratisch oder mit Stufengradienten durchgeführt. Die entsprechenden Details sind in Kapitel 10.2 bei den Synthesen der Einzelverbindungen beschrieben.

## 9.1.2 Spektroskopie

### 9.1.2.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf den Geräten AM 250, DPX 250 und AMX 400 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  (ppm) wurde auf das jeweilige Lösungsmittelsignal geeicht. Für die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden Aceton- $\text{d}_6$  (2,05 ppm für die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren / 30,5 und 205,1 ppm für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren),  $\text{CDCl}_3$  ( 7,26 ppm / 77,7 ppm),  $\text{DMSO-d}_6$  (2,5 ppm / 39,5 ppm) und Tetrahydrofuran- $\text{d}_8$  (1,72 und 3,57 ppm / 25,2 und 67,2 ppm) verwendet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K gemessen.

### 9.1.2.2 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer der Firma Varian (Modell Cary 1) aufgenommen.

### 9.1.2.3 IR-Spektroskopie

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

### 9.1.2.4 Massenspektrometrie

Für die Identität und Reinheit wurden Electronspray Ionisation (ESI) und MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) verwendet. Für ESI-Spektren stand eine VG Platform II mit Quadrupol Analysator der Firma *Fisons Instruments* zur Verfügung. MALDI-Spektren wurden auf einem Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) entweder im linearen oder im Reflectronmodus gemessen.

### 9.1.2.5 Schmelzpunktbestimmung

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

### 9.1.3 Verwendete Chemikalien

Aceton-d<sub>6</sub> ; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO [64,12] ; euriso-top Nr. 0291, 99,8%D, Sdp. 55°C, d = 0,87

Acetonitril ; C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N [41,05] ; Roth Nr. 8825.2, 99,5 %, für die HPLC, Sdp. 81-82°C, d = 0,78

Acetonitril ; C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N [41,05] ; Fluka Nr. 00695, puriss., ≥ 99,5 %, absolut, über Molekularsieb, H<sub>2</sub>O ≤ 0,01 %, Sdp. 82°C, d = 0,782

Acetylchlorid ; CH<sub>3</sub>COCl [78,50] ; Fluka Nr. 00990, puriss.p.a., ≥ 99,0, Sdp. 52°C, d = 1.104

Aluminiumchlorid ; NH<sub>4</sub>Cl [53,49] ; Fluka Nr. 09702, purum p.a., ≥ 99 %

Aminoacetaldehyd-dimethylacetal ; C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> [105,14] ; Fluka Nr. 06579, purum., ≥ 97.0 %, Sdp.(95mmHg) 135-139°C, d = 0,965

Benzol ; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> [78,12] ; Fluka Nr. 12552, puriss. p.a., Sdp. 80°C, d = 0,879

Benzol ; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> [78,12] ; Fluka Nr. 12553, puriss., ≥ 99,5 %, absolut, über Molekularsieb, H<sub>2</sub>O ≤ 0,005 %, Sdp. 80°C, d = 0,879

Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid ; C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>P<sub>2</sub>Pd [701,90] ; Fluka Nr. 15253, puriss., ≥ 99,5 %

Brom ; Br<sub>2</sub> [159,81] ; Lancaster Nr. 14140, 99+ %, absolut, Sdp. 58-59°C, d = 3,110

1-Brom-4-Iod-benzol ; C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>BrI<sub>2</sub> [282,91] ; Lancaster Nr. X008800G0010, 98%

N-Bromsuccinimid ; C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>BrNO<sub>2</sub> [177,98] ; Fluka Nr. 18350, purum., ≥ 95,0

Bromwasserstoffsäure ; HBr [80,91] ; Fluka Nr. 18720, purum.p.a., ≥ 62,0 %, d = 1,45

Bromwasserstoffsäure ; HBr [80,91] ; Fluka Nr. 18730, purum.p.a., ≥ 48,0 %, d = 1,45

n-Butanol ; C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>CO [74,12] ; Fluka Nr. 19420, puriss.p.a., ACS Reagenz ≥ 99,5 %(GC), Sdp. 116-118°C, d = 0,81

Tert.-Butanol ; C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>CO [74,12] ; Fluka Nr. 19460, puriss.p.a., ACS Reagenz ≥ 99,0 %, Sdp. 83°C, d = 0,775

6-Caprolacton monomer ; C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> [114,14] ; Fluka Nr. 21540, purum., ≥ 99,0 %, Sdp.(10mmHg) 96-97°C, d = 1,03

Chloroform-d<sub>1</sub> ; CDCl<sub>3</sub> [120,38] ; Deutero Nr. B 8013, 99,8%D, Sdp. 60°C, d = 1,50  
Chlormethylmethylsulfid ; CH<sub>3</sub>SCH<sub>2</sub>Cl [96,58] ; Lancaster Nr. X10858G0010, 95%  
Cytidin ; C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [243,22] ; Pharma Waldhof Nr. 310150, 99,8 %

Dibutylzinndichlorid ; C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>Sn [303,83] ; Fluka Nr. 34920, pract. ≈97 %

Dichlormethan = Methylenchlorid ; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [84,93] ; Fluka Nr. 66749; puriss., > 99,5 %, über Molekularsieb, H<sub>2</sub>O ≤ 50 ppm, Sdp. 40°C, d = 1,325

1,2-Dichloroethan ; C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> [98,96] ; Fluka Nr. 03527, puriss., absolut, über Molekularsieb, ≥ 99,5 %, H<sub>2</sub>O < 0,005 %, Sdp. 84°C, d = 1,253

Diethylether ; C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O [74,12] ; Fluka Nr. 31685, puriss., ≥ 99,5 %, über Molekularsieb, stabilisiert mit 2,6-Di-*tert.*-butyl-*p*-kresol, Sdp. 35-36°C, d = 0,713

1,2-Dimethoxy-ethan ; C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> [90,12] ; Fluka Nr. 38568, puriss., getrocknet, über Molekularsieb, ≥ 99,5 %, H<sub>2</sub>O < 0,005 %, Sdp. 85°C, d = 0,867

4,4'-Dimethoxy-triphenylchlormethan ; C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>2</sub> [338,84] ; Merck Nr. 8.1861616

4-Dimethylamino-pyridin (DMAP) ; C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub> [122,17] ; Fluka Nr. 29224, puriss., ≥ 99,0 %

*N,N*-Dimethylformamid (DMF) ; C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO [73,10] ; Fluka Nr. 40248, puriss., > 99,5 %, aminfrei, über Molekularsieb, H<sub>2</sub>O ≤ 0,01 %, Sdp. 153-155°C, d = 0,948

*N,N*-Dimethylformamid (DMF) ; C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO [73,10] ; Fluka Nr. 40228, puriss., > 99,8 %, aminfrei, über Molekularsieb, H<sub>2</sub>O ≤ 0,005 %, Sdp. 153-155°C, d = 0,948

*N,N*-Dimethylformamid-dimethyl acetal ; C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> [119,16] ; Fluka Nr. 40271, purum., ≥ 95,0 %, Sdp. (720mmHg) 102-103°C, d = 0,897

Dimethylsulfoxid (DMSO) ; C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS [78,13] ; Fluka Nr. 41648, puriss., absolut, über Molekularsieb, H<sub>2</sub>O ≤ 0,01 %, Sdp. 190-192°C, d = 1,100

Dimethylsulfoxid-d<sub>6</sub> (DMSO-d<sub>6</sub>) ; C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>OS [84,17] ; Deutero Nr. B 9007, 99,8%D, Sdp. 190°C, d = 1,19

Dioxan ; C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> [88,11] ; Riedel-de Haën Nr. 33147, für Analyse, ≥ 99,5 %

Dioxan ; C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> [88,11] ; Fluka Nr. 42510, puriss., absolut, über Molekularsieb, ≥ 99,5 %, Sdp. 100-102°C, d = 1,034

Dowex 50wx8 ; Fluka Nr. 21,750-6, 100-200 Mesh

Dowex 50wx8 ; Fluka Nr. 21,751-4, 200-400 Mesh

Essigsäure ; C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [60,05] ; Riedel-de Haën Nr. 33209, ≥ 99,8 %, Sdp. 117-118°C, d = 1,049

Essigsäureanhydrid ;  $C_4H_6O_3$  [102,09] ; Fluka Nr. 45830, puriss. p.a., Sdp. 138-140°C, d = 1,08

Ethanol ;  $C_2H_6O$  [46,07] ; Riedel-de Haën Nr. 32205, absolut,  $\geq 99,8\%$ , Sdp. 78-79°C, d = 0,788

Ethylacetat ;  $C_8H_8O_2$ [88,11] ; Lancaster Nr. X10925M1000, 99%, Sdp. 76-77°C, d = 0,900

*N,N*-Ethyl-diisopropylamin ;  $C_8H_{19}N$  [129,24] ; Fluka Nr. 03440, purum.,  $\geq 98,0\%$ , Sdp. 126-128°C, d = 0,755

4-Formyl-benzoesäure-methylester ;  $C_9H_8O_3$  [164,16] ; Fluka Nr. 47717, techn.  $\geq 90\%$   
Sdp. 265°C

*n*-Hexan ;  $C_6H_{14}$  [86,17] ; Fluka Nr. 52766, puriss., absolut, über Molekularsieb,  $H_2O \leq 0,01\%$ , Sdp. 69°C, d = 0,659

3-Hydroxypropionitril = 2-Cyanethanol ;  $C_3H_5NO$  [71,08] ; Fluka Nr. 56270, puriss.,  $\geq 99\%$ , Sdp. 106-108°C, d = 1,045

Iod ;  $I_2$  [253,81]; Fluka Nr. 57660, purum.,  $\geq 99,5\%$

Iodsäure ;  $HIO_3$  [175,91] ; Fluka Nr. 58060, puriss.p.a., ACS Reagenz,  $\geq 99,5\%$

Kaliumcarbonat ;  $K_2CO_3$  [129,24] ; Fluka Nr. 60109, puriss.p.a., ACS Reagenz, wasserfrei  $\geq 99,0\%$

Kaliumhydroxid ; KOH [56,11] ; Fluka Nr. 60370, puriss. p.a., Plätzchen,  $\geq 86\%$

Kaliumhydroxid ; KOH [56,11] ; Fluka Nr. 60380, purum, Pulver,  $\geq 85\%$

Kupfer(I)-Iodid ; CuI [190,45] ; Riedel-de Haën Nr. 03140, purum.,  $\geq 99,5\%$

Magnesiumsulfat ;  $MgSO_4$  [120,37] ; Riedel-de Haën Nr. 13143, reinst, getrocknet

2-Mercaptoethylether ;  $C_4H_{10}OS_2$  [138,25] ; Aldrich Nr. M3809, 95 %, Sdp. 217°C, d = 1,114

Methanol ;  $CH_4O$  [32,04] ; Riedel-de Haën Nr. 32213,  $> 99,8\%$ , max. 0,05 %  $H_2O$ , Sdp. 64-65°C, d = 0,792

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

2-Methyl-3-butin-2-ol ;  $C_5H_9NO$  [99,13] ; Fluka Nr. 69118, puriss.,  $> 99,0\%$ , Sdp. 202°C, d = 1,028

Natriumborhydrid ;  $\text{NaBH}_4$  [37,82] ; Acros Nr. 20005, 99 %  
Natriumchlorid ;  $\text{NaCl}$  [58,44] ; Merck Nr. 1540, > 99,5 %  
Natriumethoxid ;  $\text{NaOCH}_3$  [54,02] ; Fluka Nr. 71750, purum., > 97,0 %  
Natriumhydrid ;  $\text{NaH}$  [24,00] ; Fluka Nr. 62863, purum., rieselfähig, angefeuchtet mit Öl,  
55-65 %  
Natriumhydrid ;  $\text{NaH}$  [24,00] ; Aldrich Nr. 223441-50G, trocken, 95 %  
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [156,01] ; Fluka Nr. 71500, purum  
p.a., kristallisiert  
Natriumhydrogencarbonat ;  $\text{NaHCO}_3$  [84,01] ; Fluka Nr. 71630, purum, > 98 %  
Natriumhydroxid ;  $\text{NaOH}$  [40,00] ; Grüssing Nr. 12155, 99 %  
2'-Nitroacetophenon ;  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$  [165,15] ; Fluka Nr. 72600, techn., > 90 %,  
2'-Nitroacetophenon ;  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$  [165,15] ; Acros Nr. 12832, 95 %,   
2-Nitro-benzaldehyd ;  $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$  [151,12] ; Acros Nr. 12840, 99+ %  
2-Nitro-benzylalkohol ;  $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$  [153,14] ; Acros Nr. 12851, 97 %  
  
Propylamin ;  $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$  [59,11] ; Fluka Nr. 82098, puriss., > 99,5 % (GC), Sdp. 48°C, d =  
0,719  
Pyren ;  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}$  [202,26] ; Lancaster Nr. X07089G0250, 95 %  
Pyridin ;  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$  [79,10] ; Fluka Nr. 82704, puriss., > 99,8 %,  $\text{H}_2\text{O}$  < 50 ppm, über  
Molekularsieb, Sdp. 116°C, d = 0,983  
  
Salzsäure ;  $\text{HCl}$  [36,46] ; Riedel-de Haën Nr. 30721, p.a., mind. 37 %  
Schwefelsäure ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [98,07] ; Merck Nr. 100731, 95-97 %, Sdp. 330°C, d = 1,84  
Silbernitrat ;  $\text{AgNO}_3$  [169,88] ; Fluka Nr. 85228, puriss. p.a.,  $\geq 99,5$  %  
Sulfurylchlorid ;  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  [134,96] ; Acros Nr. 16945, 98.50 %, Sdp. 69,1°C, d = 1,352  
  
Tetrachlorkohlenstoff ;  $\text{CCl}_4$  [153,82] ; Acros Nr. 14817, Sdp. 76°C, d = 1,59  
Tetrabutylammoniumfluorid ;  $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{FN}$  [261,46] ; TCI Nr. T1125, (1 mol/L Tetrahydrofuran  
Lösung)  
Tetrahydrofuran ;  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$  [72,11] ; Fluka Nr. 87371, puriss., absolut, über Molekularsieb,  $\geq$   
99,5 %  
Tetrahydrofuran- $\text{d}_8$  ;  $\text{C}_4\text{D}_8\text{O}$  [80,15] ; eurriso-top Nr. H 2731, 99,5%D, Sdp. 64°C, d =  
0,99

Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium ;  $C_{72}H_{60}P_4Pd$  [1155,56] ; Fluka Nr. 87645, purum.,  $\geq 97,0 \%$ (Pd)

Toluol ;  $C_7H_8$  [92,14] ; Fluka Nr. 89682, purum,  $\geq 99 \%$ , Sdp. 110-112°C,  $d = 0,866$

Toluol ;  $C_7H_8$  [92,14] ; Riedel-de Haën Nr. 32249, puriss.p.a.,  $\geq 99,7 \%$ , Sdp. 110-112°C,  $d = 0,866$

Toluol ;  $C_7H_8$  [92,14] ; Fluka Nr. 89677, puriss., absolut, über Molekularsieb,  $\geq 99,7 \%$ ,  $H_2O \leq 0,005$ , Sdp. 110-112°C,  $d = 0,866$

*p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat ;  $C_7H_8O_3S \cdot H_2O$  [190,22] ; Fluka Nr. 89760, puriss.,  $\approx 99 \%$

Triethylamin (TEA) ;  $C_6H_{15}N$  [101,19] ; Fluka Nr. 90340, puriss. p.a.,  $\geq 99,5 \%$ , Sdp. 88-89°C,  $d = 0,726$

Triethylamin-Trihydrofluorid ;  $C_6H_{15}N \cdot 3HF$  [161,21] ; Fluka Nr. 90355, purum., Fluorwasserstoff 37 % in Triethylamin, Sdp. 70°C(15 mmHg),  $d = 0,989$

Triethylamin-Trihydrofluorid ;  $C_6H_{15}N \cdot 3HF$  [161,21] ; Aldrich Nr. 344648, Fluorwasserstoff 37 % in Triethylamin, Sdp. 70°C(15 mmHg),  $d = 0,989$ , 98%

Trimethylsulfoniumiodid ;  $C_3H_9IS$  [204,07] ; Fluka Nr. 92762, purum.,  $\geq 98,0 \%$

Triphenylphosphin ;  $C_{18}H_{15}P$  [262,30] ; Fluka Nr. 93092, purum,  $\approx 97 \%$

Uridin ;  $C_9H_{12}N_2O_6$  [244,20] ; Pharma Waldhof Nr. 340152, 99,8 %

Wasserstoffperoxid;  $H_2O_2$  [34,01] ; Fluka Nr. 95300, puriss. p.a., ACS Reagenz,  $\geq 30 \%$ ,  $d = 1,11$

## 9.2 Synthetisierte Verbindungen

### 9.2.1 Liste der synthetisierten Verbindungen

1-Brompyren **1**

1-Iodpyren **2**

2-Methyl-4-pyren-1-yl-but-3-yn-2-ol **3**

1-Ethynylpyren **4**

2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Cytidin,hydrochlorid **5**

2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Iodcytidin **6**

2',3',5'-Tri-O-Acetyl-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **7**

5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **8**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **9**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **10**

2-Cyanoethylchloromethyl ether **11**

2-Cyanoethylchlormethyl ether **12**

Iodcytidin **13**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-Iodcytidin **14**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-Iodcytidin **15**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-Iodcytidin  
**16**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin **17**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)- Dilsopropylphosphoramidit] **18**

1-(4-Brom-phenylethynyl)-pyren **19**

1-(4-Iodo-phenylethynyl)-pyren **20**



4-(4-Iodo-phenyl)-2-methyl-but-3-yn-2-ol **21**

2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol **22**

1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren **23**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin **24**

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)-Dilsopropylphosphoramidit] **25**

2',3',5'-Tri-O-Acetyl-5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-Cytidin **26**

*o*-Nitrobenzylmethylthiomethylether **27**

*o*-Nitrobenzylchlormethylether **28**

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- Uridin **29**

1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(2-nitrobenzyl)oxy]methyl}uracil **30**

1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(2-nitrobenzyl)oxy]methyl}uracil-3'-[(2-Cyanoethyl)-Dilsopropylphosphoramidite] **31**

1-(*o*-Nitrophenyl)ethanol **32**

1-(*o*-Nitrophenyl)ethylmethylthiomethylether **33**

1-(*o*-nitrophenyl)ethylchloromethylether **34**

1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(1-(*o*-nitrobenzyl) ethoxy]methyl}uracil **35**

1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(1-(*o*-nitrobenzyl) ethoxy]methyl}-uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)- diispropyl-phosphoramidit] **36**

6-Hydroxyhexansäuredimethoxymethylamid **37**

2-Brom-1-(2-nitro-phenyl)-ethanon **38**

2-(2-Nitrophenyl)-oxiran **39**

1-(2-Nitrophenyl)-ethan-1,2-diol **40**

6-Hydroxyhexansäure-[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-amid **41**

Diisopropyl-2-ethoxycyano-l-pentoxy-5-{[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-methyl]-carbamoyl}-phosphoramidit **42**

4-Dimethoxymethylbenzoesäuremethylester **43**

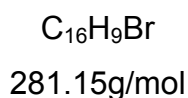
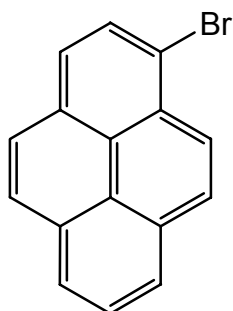
(4-Dimethoxymethylphenyl)-methanol **44**

{4-[4-(2-Nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-phenyl}-methanol **45**

Diisopropyl-2-ethoxycyano-l-methoxy-5-[[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-methyl]-benzyl}-phosphoramidit **46**

## 9.2.2 Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen

### 1-Brompyren 1



#### Methode A

3g (14.83mmol) Pyren wurden in 60ml eines 1:1-Gemisches Methanol/Diethylether gelöst, auf 0°C abgekühlt und mit 2.13ml (1.1eq, 16.32mmol) 62% Bromwasserstoffsäure versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.45ml (14.83mmol) 30% Wasserstoffperoxid innerhalb von 20 Minuten. Die Reaktionslösung wurde 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat mehrfach extrahiert, mit Wasser und Salzwasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde aus 100ml Methanol umkristallisiert. Das Produkt 1-Brompyren 1 wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 3.77g(93%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.39(Hex)

$^1\text{H-NMR}$ : (250 MHz ,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.26-7.26(m, 9H, arom.H)

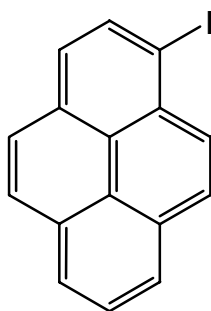
ESI(+): m/z 282.2( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

### Methode B

3g Pyren (14.83mmol) wurden in 100ml abs N,N-Dimethylformamid gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2.60g (14.83mmol) N-Bromsuccinimid in 20ml abs N,N-Dimethylformamid innerhalb von 10 Minuten. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit 500ml Wasser gequenchet, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, mit 100ml Wasser mehrfach gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Rückstand wurde aus 100ml Methanol umkristallisiert. Das Produkt 1-Brompyren **1** wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 2.51g(60%)

### 1-Iodpyren **2**



$\text{C}_{16}\text{H}_9\text{I}$

328.15g/mol

## Method C

1,5g (5.34mmol) 1-Brompyren **1** wurden in 20ml eines Hexmethyl-phosphorsäuretriamid gelöst. Nach der Zugabe von 5.08g (26,68mmol) Küfer(I)-iodid und 9,39g (56,55mmol) Kaliumiodid wurde die Reaktionslösung 7 Stunden bei 150°C gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit verdünnter Salzsäure gequenchet, mit Benzol mehrfach extrahiert, mit 100ml Wasser mehrfach gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Rückstand wurde aus 30ml eines 2:1-Gemisches Ethanol/Benzol umkristallisiert. Das Produkt 1-Iodpyren **2** wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 1,21g(69%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.39(Hex)

Smp. : 82°C

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz , CDCL<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.31-7.80(m, 9H, arom.H)

ESI(+): m/z 327.9

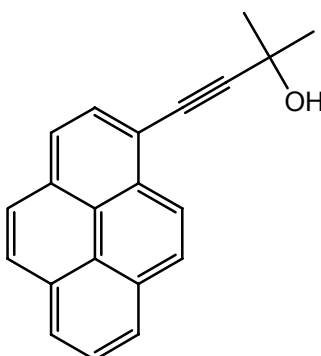
## Method D

8g (28,45mmol) 1-Brompyren **1** wurden in 80ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Nach der Zugabe von 8,35g (142,27mmol) Nickel, 9,45g (56,91mmol) Kaliumiodid und 0,36g (1,42mmol) Iod wurde die Reaktionslösung 24 Stunden bei 150°C gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg mehrfach gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Rückstand wurde aus 30ml eines 2:1-Gemisches Ethanol/Benzol umkristallisiert. Das Produkt 1-Iodpyren **2** wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 1,21g(69%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.39(Hex)

### 2-Methyl-4-pyren-1-yl-but-3-yn-2-ol **3**



$C_{21}H_{16}O$   
284.35g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 1g (3.56mmol) 1-Brompyren **1** wurden in 10ml Triethylamin gelöst, mit 1.4mg (0.002mmol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid, 5.9mg (0.03mmol) Kupfer(I)-Iodid, 14.7mg (0.06mmol) Triphenylphosphin und 0.42ml (1.2eq, 4.27mmol) 2-Methyl-3-butin-2-ol versetzt, 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt, mit Ethylacetat mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient von Ethylacetat/Hexan 1:5 zu Ethyl-acetat/Hexane 1:2. Das Produkt 2-Methyl-4-pyren-1-yl-but-3-yn-2-ol **3** wurde als orangefarbiges Pulver erhalten.

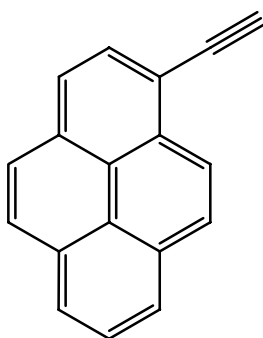
Ausbeute: 0.78g(77%)

DC:  $R_f$ : 0.51(EtOAc:Hex=1:2)

$^1H$ -NMR: (250 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.45-8.42(d, 1H,  $J = 9.0$ Hz, arom.H); 8.16-7.92(m, 8H, arom.H);  
1.47(s, 6H, 2x $CH_3$ )

ESI(+): m/z 267.1([M-OH]<sup>+</sup>); 282.1([M-2H]<sup>+</sup>)

### 1-Ethynylpyren 4



C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>

226.27g/mol

0.62g (2.18mmol) 2-Methyl-4-pyren-1-yl-but-3-yn-2-ol 3 (2.18mmol) wurden in 40ml Toluol gelöst, mit 1.5g Natriumhydroxid versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur wurde das ausgefallene Natriumhydroxid abfiltriert und der Rückstand mit Ethylacetat extrahiert, mit 40ml Wasser zweimal gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan/Hexan 1:5) Das Produkt 1-Ethynylpyren 4 wurde als gelbliches Pulver erhalten.

Ausbeute: 0.45g(92%)

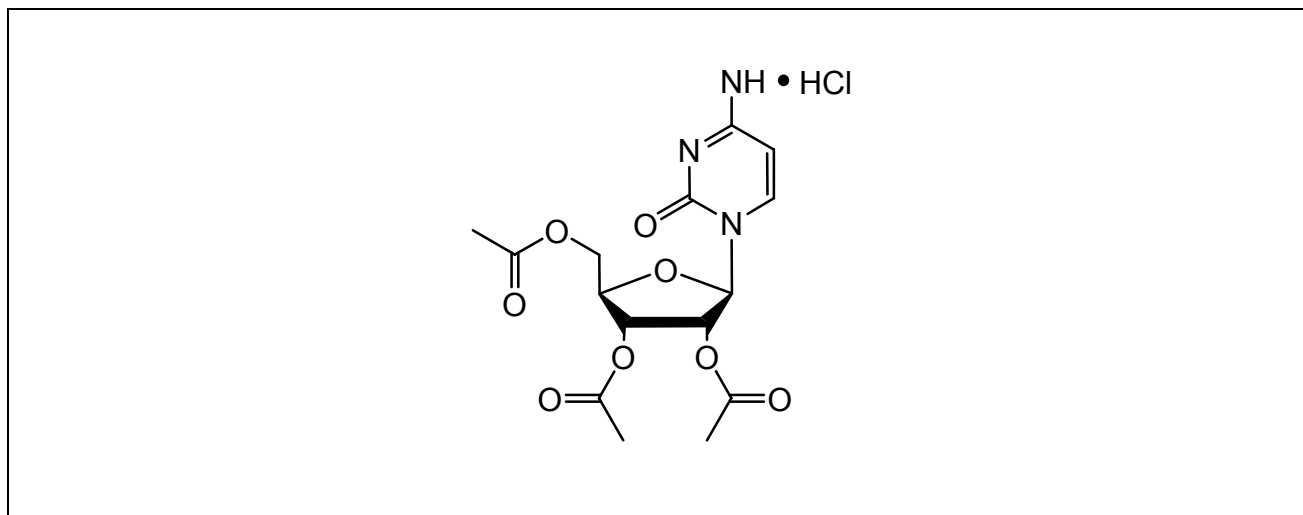
DC: R<sub>f</sub>: 0.71(EtOAc:Hex=1:2)

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.54-8.50(d, 1H, J= 9.0Hz, arom.H); 8.17-7.93(m, 8H, arom.H); 3.55(s, 1H, Alkynyl-H)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

132.4-124.4(m,arom.C); 82,8(alkyne-C); 82,5(alkyne-C)

**2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Cytidin,hydrochlorid 5**



$C_{15}H_{20}ClN_3O_8$

405.79g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 8.34g (34.29mmol) Cytidin wurden in 110ml Essigsäure gelöst, mit 14.6ml (6eq,168.47mmol) Acetylchlorid versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trokne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisierung aus Ethanol. Das Produkt 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Cytidin,hydrochlorid 5 wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 12.79g( 92%)

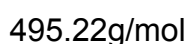
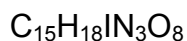
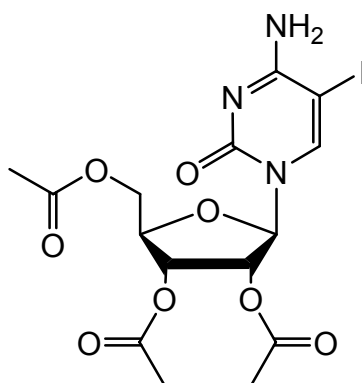
DC:  $R_f$ : 0.73(DCM:MeOH=4:1)

$^1H$ -NMR: (250 MHz ,DMSO- $d_6$  )  $\delta$ [ppm]

9.92(s,1H,NH<sub>2</sub>); 8.82(s,1H,NH<sub>2</sub>); 8.00(d, 1H, J=2.8Hz, H6); 6.24(d,1H, J=7.8Hz, H5); 5.91(d, 1H, J=4.3Hz, H1'); 5.50-5.34(m, 2H, H2', H3'); 4.35-4.19(m, 3H, H4', H5'); 2.06-2.04(m, 9H, carbonyl-CH<sub>3</sub>)



## 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Iodcytidin 6



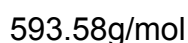
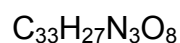
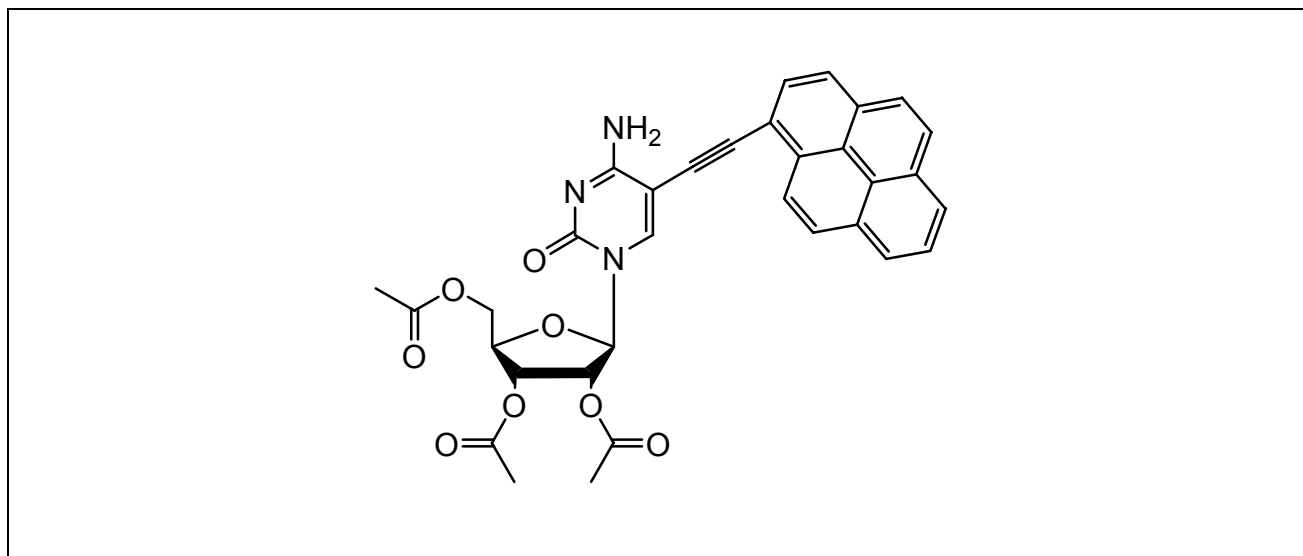
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 12.79g (31.52mmol) 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Cytidin,hydrochlorid 5 wurden in 180ml eines 1:1-Gemisches aus Essigsäure/Tetrachlorkohlenstoff suspendiert, mit 4.84g (0.6eq, 19.07mmol) Iod und 4.99g (0.9eq, 28.37mmol) Iodsäure versetzt und 4 Tage bei 40°C gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Suspension am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, in 200ml Dichlormethan gelöst, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Dichlormethan). Das Produkt 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Iodcytidin 6 wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 11.71g(75%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.29(DCM :MeOH=20 :1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
7.82(s, 1H, H6); 6.02(d, 1H, J= 4.0Hz, H1'); 5.32-5.22(m, 2H, H2', H3');  
4.32(s, 3H, H4', H5'); 2.17-2.01(m, 9H, carbonyl-CH3)

## 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin 7



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.87g (1.77mmol) 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Iodcytidin 6 wurden in 35ml abs N,N-Dimethylformamid gelöst, mit 20.4mg (10%mol, 0.18mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium, 67mg (20%mol, 0.35mmol) Kupfer(I)iodid, 0.59ml (2.4eq, 4.24mmol) Triethylamin und 0.4g (1.1eq, 1.76mmol) 1-Ethynylpyren 4 versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde DMF im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulen-chromatographie in einem Gradient aus Dichlormethan/Methanol 10:1 zu Dichlormethan/Methanol 4:1. Das Produkt 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin 7 wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 0.96g (92%)

DC:  $R_f$ : 0.36(DCM:MeOH=95:5)

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

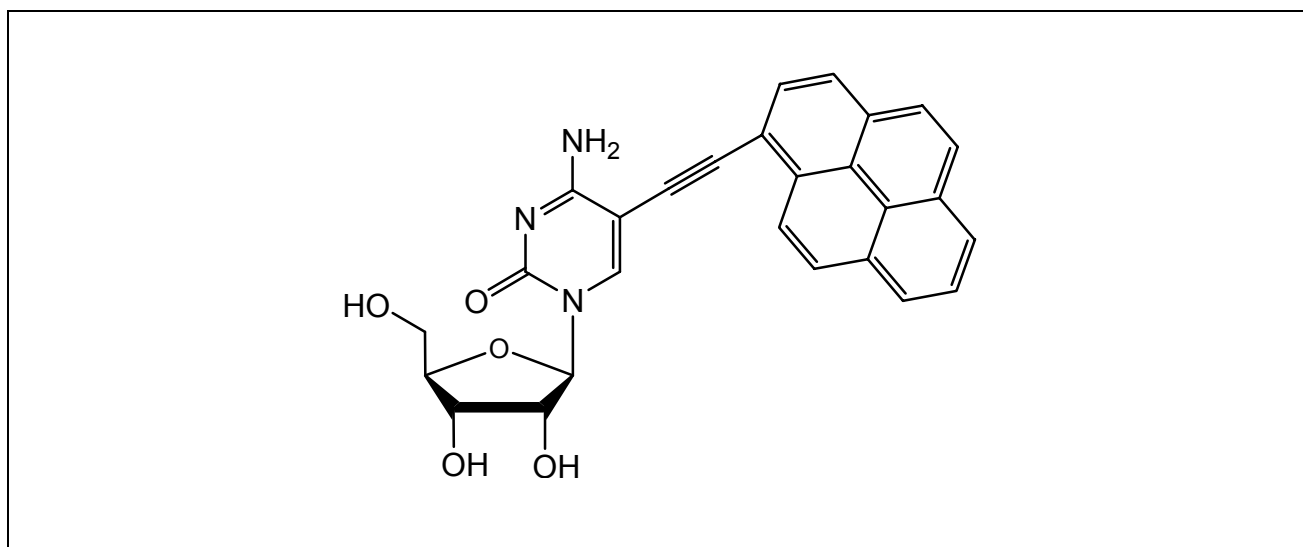
8.63-7.96(m, 10H, H6, arom.H); 6.16(d, 1H, J= 2.8Hz, H1'); 5.51(q, 1H, J= 3.0Hz, H2'); 5.49(m, 1H, H3'); 4.45-4.29(m, 3H, H4', H5'); 2.53(s, 9H, carbonyl-CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]

170.1(d, J= 42Hz, carbonyl-C); 164.0(C4); 162.3(C2); 147.0(C6); 131.3-123.4(m, arom.C); 116.8(C5); 92.9(alkyne-C); 90.1(alkyne-C); 86.1(C1'); 79.5(C4'); 72.4(C2'); 69.8(C3'); 62.9(C5'); 20.7(d, carbonyl-CH<sub>3</sub>)

ESI(+): m/z 594.1([M+H]<sup>+</sup>)

### 5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin 8



C<sub>27</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

467.47g/mol

#### Methode A

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenk Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1.05g (1.77mmol) 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin 7 wurden in 40ml Methanol gelöst, mit 1.08g (19.99mmol) Natriumethoxid versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe mehrerer Spatelspitzen eines schwachsauren Ionenaustauschers (Dowex 50wx8, Korngröße 200) wurde die Reaktionslösung

neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde über Celite 500 abfiltriert, mit Methanol gewaschen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan/MeOH 10:1) Das Produkt 5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **8** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.47g(57%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.23(DCM:MeOH=10:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
8.80-7.94(m, 10H, H<sub>6</sub>, arom.H); 5.88(d, 1H, J=3.4Hz, H1'); 5.53-5.44(m, 2H, 2' OH, 3' OH); 5.10(s, 1H, 5' OH); 4.16-3.68(m, 5H, H2', H3', H4', H5')

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
163.1(C<sub>4</sub>); 153.8(C<sub>2</sub>); 145.8(C<sub>6</sub>); 130.8-123.4(m, arom.C); 117.1(C<sub>5</sub>); 92.6(alkyne-C); 90.1(alkyne-C); 87.5(C1'); 84.0(C4'); 74.4(C2'); 68.6(C3'); 59.8(C5')

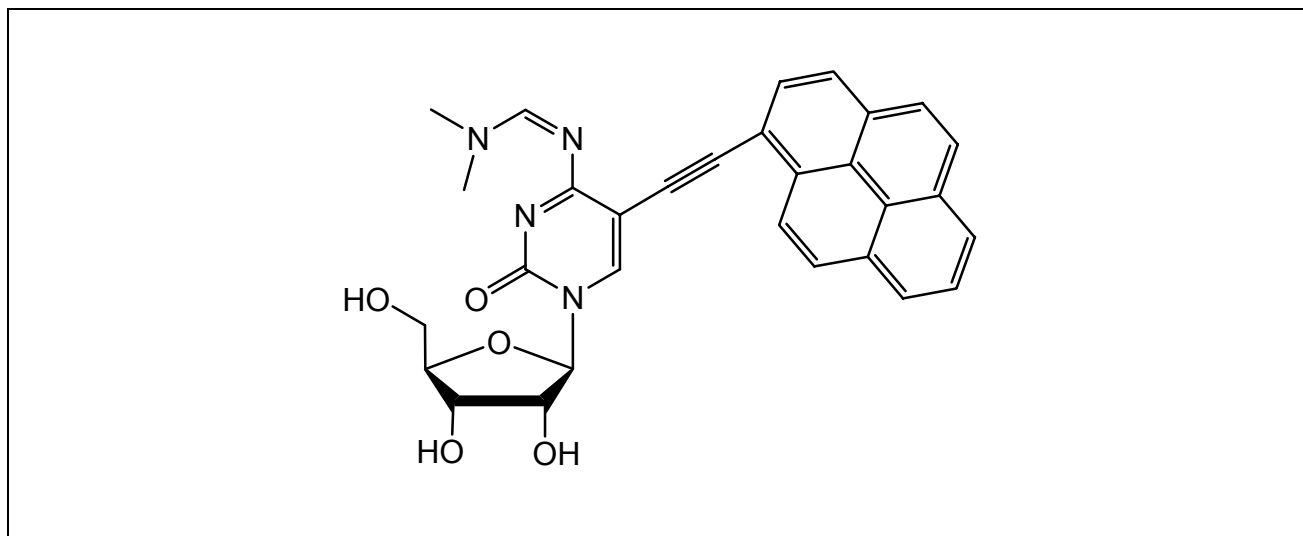
ESI(+): m/z: 569.2([M+H]<sup>+</sup>)

## Methode B

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.57g (1.54mmol) Iodcytidin **13** wurden in 30ml abs *N,N*-Dimethylformamid gelöst, mit 178mg (10%mol, 0.15mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium, 59mg (20%mol, 0.31mmol) Kupfer(I)-iodide, 0.52ml (2.4eq, 3.76mmol) Triethylamin und 0.42g (1.2eq, 1.85mmol) 1-Ethynylpyren **4** versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde *N,N*-Dimethylformamid im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Dichlormethan/Methanol 10:1 zu Dichlormethan/Methanol 4:1. Das Product 5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **27** wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 0.630g(87%)

**<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin 9**



$C_{30}H_{26}N_4O_5$

522.55g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.21g (0.45mmol) 5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **8** wurden in 5ml abs *N,N*-Dimethylformamid gelöst, mit 0.9ml (15eq, 6.74mmol) *N,N*-dimethylformamid-dimethylacetal (15eq, 6.74mmol) versetzt und 2 Stunden bei 50°C gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde *N,N*-Dimethylformamid im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan/Methanol 10:1) Das Produkt <sup>4</sup>*N*-Dimethylformamidin-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **9** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.20g(83%)

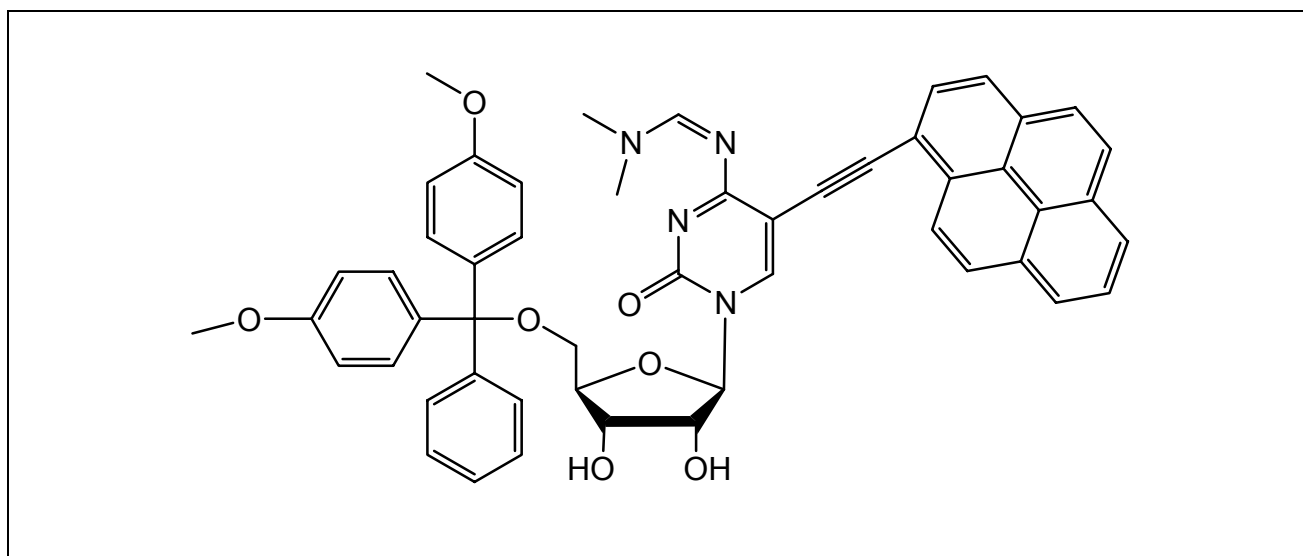
DC: R<sub>f</sub>: 0.38(DCM:MeOH=10:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
8.89-8.08(m, 10H, H<sub>6</sub>, arom.H); 5.90(d, 1H, J=3.3Hz, H1'); 4.16-3.88(m, 5H, H<sub>2</sub>', H<sub>3</sub>', H<sub>4</sub>', H<sub>5</sub>'); 3.39-3.11(m, 6H, N-CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
169.3(C<sub>4</sub>); 162.4(C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 158.8(C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 153,7(C<sub>2</sub>); 146.2(C<sub>6</sub>);  
130.8-123.4(m, arom.C); 97.6(C<sub>5</sub>); 91.0(alkyne-C), 90.1(alkyne-C);  
84.0(C1'); 79.2(C4'); 74.6(C2'); 68.4(C3'); 59.7(C5'); 36.8-34.4(t, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

ESI(+): m/z 523.2([M+H]<sup>+</sup>)

**<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin 10**



C<sub>51</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

824.92g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkcolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.21g (0.41mmol) <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **9** wurden in 8ml abs Pyridin gelöst, mit 0.17g (0.49mmol) 4,4'-Dimethoxy-triphenylchlormethan versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktion mit 1ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne

eingengt. Die Aureinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan/MeOH 95:5) Das Produkt <sup>4</sup>N-Dimethyl-formamidin-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(1-Pyrenylethynyl)-Cytidin **10** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.189g(56%)

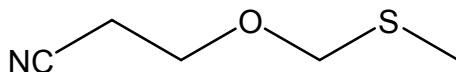
DC: R<sub>f</sub>: 0.29(DCM:MeOH=95:5)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, Aceton-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
8.41-6.62(m, 22H, H<sub>6</sub>, arom.H); 5.81(d, 1H, J=3.4Hz, H1'); 4.40-4.00(m, 5H, H2', H3', H4', H5'); 3.55-3.19(m, 12H, N-CH<sub>3</sub>, 2xOCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, Aceton-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
170.3(C<sub>4</sub>); 158.8(C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 156,2(C<sub>2</sub>); 145.0(C<sub>6</sub>); 136.0(arom.C );  
131,2-124.2(m, arom.C); 113.2 (arom.C ); 98.9(C<sub>5</sub>); 94.1(alkyne-C),  
91.7(alkyne-C); 87,6(DMTr(C)); 84.3(C1'); 78.4(C4'); 75.9(C2');  
68.8(C3'); 63,2(C5'); 54,6(OCH<sub>3</sub>); 40,75(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 34.8(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

ESI-MS(+): m/z: 825.5([M+H]<sup>+</sup>)

### 2-Cyanoethylchloromethyl ether **11**



C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NOS

131.20g/mol

32g (0.45mol) 3-Hydroxypropionitril wurden in 450ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit Essigsäure und Essigsäureanhydrid versetzt und 3 Tage bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung in einer Lösung aus 990g Natriumbicarbonat und 4.5l Wasser langsam zugetropft, mit Ethyl-

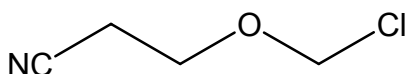
acetat mehrfach extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Zur Aufreinigung wurde der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt 2-Cyanoethyl chloromethyl ether **11** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 30.11g(51%)

$^1\text{H-NMR}$ : (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
4.62(s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3.72(t, 2H,  $J= 6.3\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 2.61(t, 2H,  $J= 6.3\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ );  
2.11(s, 1H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ : (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
117.8( $\text{CN}$ ); 75.4( $\text{OCH}_2\text{S}$ ); 62.3( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 18.7( $\text{CH}_2\text{CN}$ ); 13.9( $\text{SCH}_3$ )

### 2-Cyanoethylchloromethyl ether **12**



$\text{C}_4\text{H}_6\text{ClNO}$

119.55g/mol

27.45g (0.21ml) 2-Cyanoethylchloromethyl ether **11** wurden in 500ml Dichlormethan gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 16.9ml (0.21mol) Sulfurylchlorid innerhalb von 10 Minuten bei  $0^\circ\text{C}$ . Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung 7 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und zur Aufreinigung im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt 2-Cyanoethylchloromethyl ether **12** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

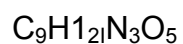
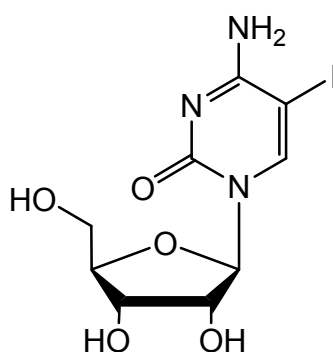
Ausbeute: 16.92g(76%)



$^1\text{H-NMR}$ : (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
5.44(s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ); 3.86(t, 2H,  $J= 6.3\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 2.66(t, 2H,  $J= 6.3\text{Hz}$ ,  $\text{CNCH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ : (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
117.1( $\underline{\text{CN}}$ ); 81.9( $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$ ); 64.7( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 18.4( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$ );

### Iodcytidin 13



369.11g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Schutzgas durchgeführt. 3g (6.06mmol) 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Iodcytidin 6 wurden in 30ml Methanol gelöst, mit 0.81g (14.99mmol) Natriumethoxid versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe mehrerer Spatelspitzen eines schwachsauren Ionenaustauschers (Dowex 50wx8, Korngröße 200) wurde die Reaktionslösung neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde über Celite 500 abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan/MeOH 1:1) Das Produkt Iodcytidin 13 wurde als weißer Schaum erhalten.

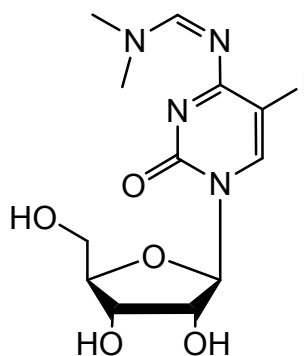
Ausbeute: 2.109g(94%)

DC: 0.2(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
8.66(d, 1H, H6); 5.83(d, 1H, H1'); 4.33-3.47(m, 5H, H2', H3',  
H4', H5')

ESI(-): m/z: 368.9([M-H]<sup>+</sup>)

### <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-Iodcytidin **14**



C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>IN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

424.19g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.5g (1.36mmol) 5-Iodcytidin **13** wurden in 10ml abs *N,N*-dimethylformamid gelöst, mit 1.45ml (8eq, 10.88mmol) *N,N*-dimethylformamid-dimethyl acetal versetzt und 2 Stunden bei 50°C gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde abs *N,N*-dimethylformamid im Ölpunpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan/Mehtanol 5:1) Das Produkt <sup>4</sup>*N*-Dimethyl-formamidin-Iodcytidin **14** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.52g(91%)

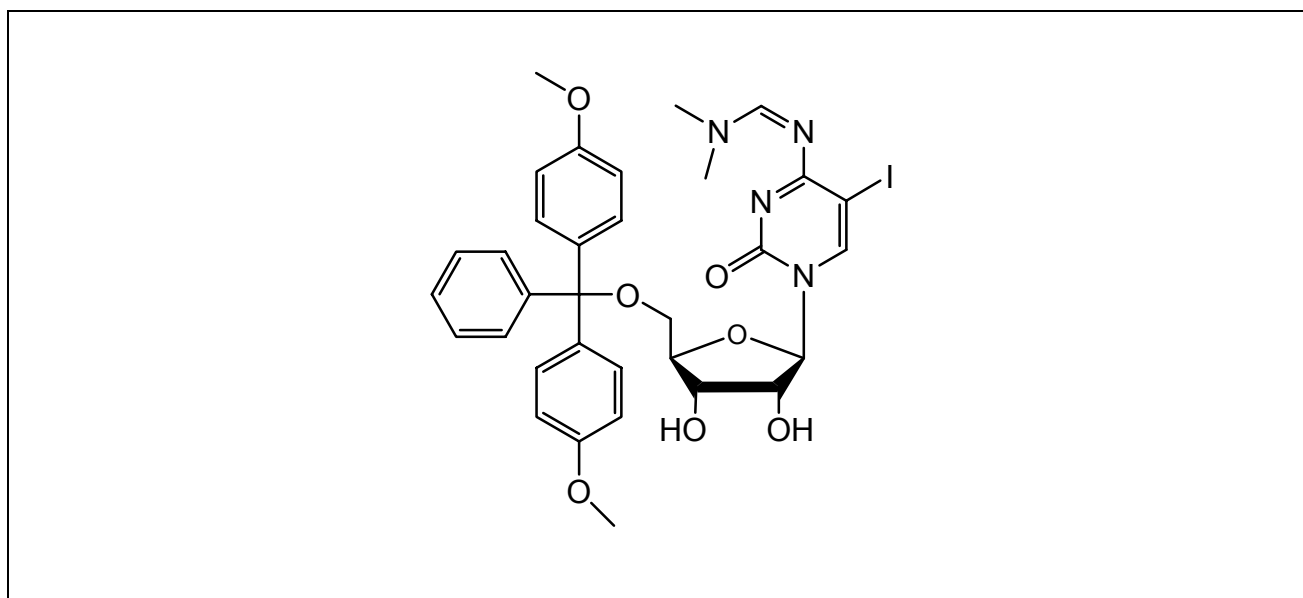
DC: 0.49(DCM:MeOH=5:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
8.60(d, 1H, J= 6.3Hz, H6), 5.75(d, 1H, J= 2.3Hz, H1'), 4.00-3.57(m, 5H, H2', H3', H4', H5'); 3.21(s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 3.14(s, 3H, N-CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
168.0(C4); 163.6(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 158.3(C2); 154.4(C6); 147.7(C5); 89.8(C1'); 84.0(C4'); 74.5(C2'); 68.6(C3'); 59.7(C5')

ESI(-): m/z: 422.8([M-H]<sup>-</sup>); 468.9([M+2Na-H]<sup>-</sup>)

**<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-Iodcytidin 15**



C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>I<sub>N</sub><sub>4</sub>O<sub>7</sub>

726.56g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.56g (1.32mmol) <sup>4</sup>N-Dimethyl-formamidin-Iodcytidin **14** und 32mg (0.26mmol) 4-Dimethylamino-pyridin (DMAP) (0.26mmol) wurden in 10ml abs Pyridin gelöst, mit 0.49g (1.45mmol) 4,4'-Dimethoxy-triphenylchlormethan (1.45mmol) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit 1ml Methanol gequench und 30 Minuten gerührt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan/Methanol 95:5) Das Produkt <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-Iodcytidin **15** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.50g(52%)

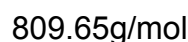
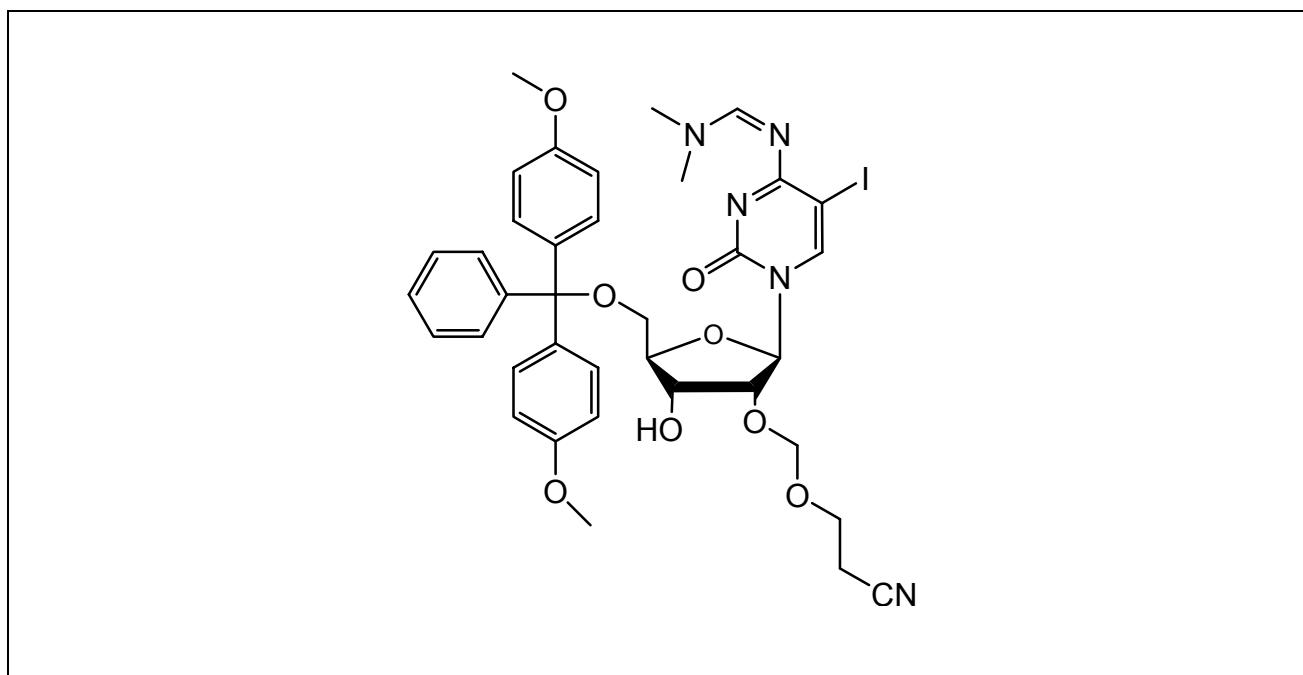
DC: 0.31(DCM:MeOH=5:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
8.61(s, 1H, CH-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 8.10(s, 1H, H6); 7.46-7.21(m, 10H, arom.H und NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6.93(d, 4H, J= 8.8Hz, arom.H); 5.82(d, 1H, J= 5.3Hz, H1'); 5.49(d, 1H, J= 5.5Hz, H2'); 5.10(d, 1H, J= 5.5Hz, H3'); 4.14-4.02(m, 3H, H4', H5'); 3.14(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.12(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
168.2(C4); 166.6(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 163.0(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 154.4(C2); 147.7(C6); 144.7(arom.C); 135.5(arom.C); 129.7(arom.C); 127.9(arom.C); 127.9(d, J=17.6Hz, arom.C); 126.7(arom.C); 113.3(arom.C); 89.9(DMTr(C)), 85.8(C1'); 82.6(C4'); 73.9(C2'); 69.8(C3'); 63.2(C5'); 55.0(OCH<sub>3</sub>); 34.9(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

ESI(+): m/z: 727.2([M]<sup>+</sup>)

**<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-  
Iodcytidin 16**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.53g (0.73mmol) <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-Iodcytidin **15** (0.73mmol) wurden in 10ml 1,2-Dichloroethan gelöst, mit 0.44ml (3.5eq, 2.57mmol) *N,N*-Ethyl-diisopropylamin und 0.27g (1.2eq, 0.89mmol) Dibutylzinn-dichlorid versetzt und 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3ml (0.95mmol) 2-Cyanoethylchloromethyl ether **12** in 1,2-Dichlorethan innerhalb von 30 Minuten bei 70°C. Die Reaktionslösung 30 Minuten gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gequenchet, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesium-sulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie.(Acetonitril/Methanol 30:1) Das Produkt <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxy trityl)-Iodcytidin **16** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.29g(49%)

DC: 0.43(CH<sub>3</sub>CN:MeOH=30:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

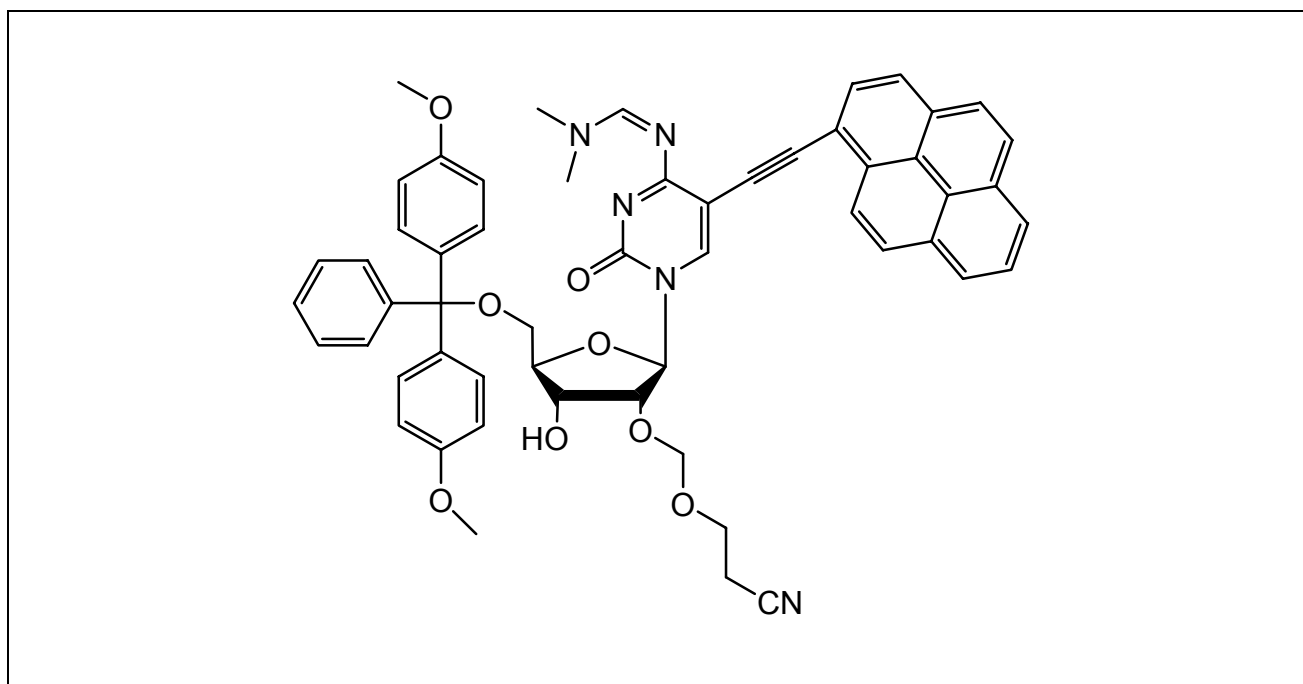
8.66(s, 1H, NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 8.15(s, 1H, H<sub>6</sub>); 7.42-7.08(m, 9H, arom.H); 6.77(d, 4H, J= 8.8Hz, arom.H); 5.94(d, 1H, J= 2Hz, H<sub>1</sub>' ); 5.10(d, 1H, J= 6.8Hz, OCH<sub>2</sub>O); 4.89(d, 1H, J= 6.5Hz, OCH<sub>2</sub>O); 4.35-4.24(m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>' ); 4.06(m, 1H, H<sub>4</sub>' ); 3.82-3.66(m, 10H, H<sub>5</sub>' , OCH<sub>3</sub> und CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 3.12(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.08(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.62-2.51(m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]

167.7(C<sub>4</sub>); 158.0(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 157.6(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 154.3(C<sub>2</sub>); 145.1(C<sub>6</sub>); 143.5(arom.C); 135.0(arom.C); 129.1(arom.C); 128.1(arom.C); 127.1(arom.C); 126.8(arom.C); 116.9(CN); 112.8(arom.C); 94.2(OCH<sub>2</sub>O); 88.3(DMTr(C)); 85.8(C<sub>1</sub>' ); 82.0(C<sub>4</sub>' ); 79.1(C<sub>2</sub>' ); 68.1(C<sub>3</sub>' ); 62.4(C<sub>5</sub>' ); 61.0(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 54.2(OCH<sub>3</sub>); 40.5(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 34.5(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 17.9(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)

ESI(-): m/z: 810.1([M]<sup>+</sup>)

**<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin 17**



C<sub>55</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>

908.01g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.61g (0.75mmol) <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxy-methyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxy trityl)-Iodcytidin 16 wurden in 15ml abs N,N-Dimethylformamid gelöst, mit 87mg (10%mol, 0.08mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium 29mg (20%mol, 0.15mmol) Kupfer(I)-iodid, 0.25ml (2.4eq, 3.40mmol)Triethylamin und 0.19g (1.1eq, 0.83mmol) 1-Ethynylpyren 4 versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde N,N-Dimethylformamid im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie.( Dichlormethan/Mehtanol 95:5) Das Produkt <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin 17 wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.24g(90%)

DC: 0.26(DCM:MeOH=95:5)

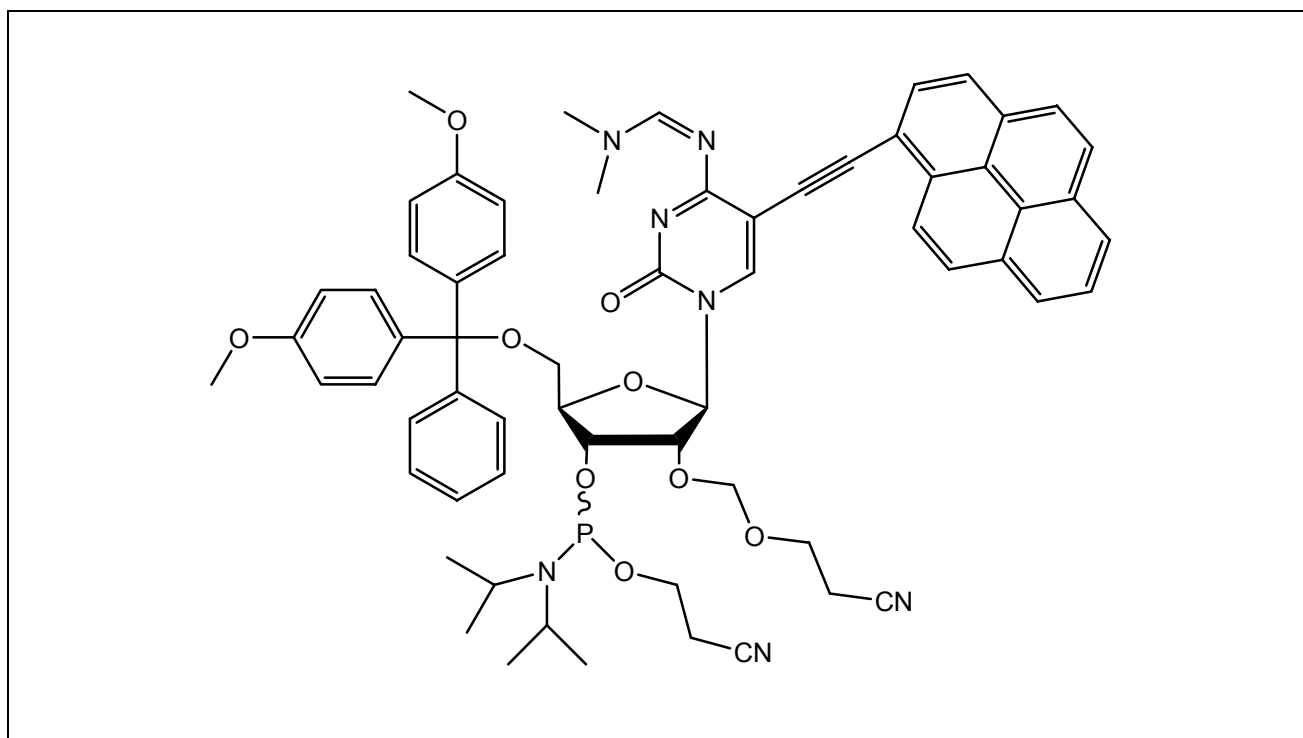
<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.22-7.90(m, 11H, atom.H und H6); 7.58-7.10(m, 10H, arom.H und NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6.80(d, 4H, J= 5Hz, arom.H); 5.96(m, 1H, H1'); 4.97(m, 2H, OCH<sub>2</sub>O); 4.34-4.24(m, 13H, H2', H3', H4', H5', 2xOCH<sub>3</sub> und CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.91(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.81(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.73-2.59(m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
167.7(C4); 157.6(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 157.5(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 154.3(C2); 145.1(C6); 138.5-123.2(m, arom.C); 116.9(CN); 112.8(arom.C); 94.2(OCH<sub>2</sub>O); 88.3(DMTr(C), 84.0(C1'); 79.2(C4'); 74.6(C2'); 68.4(C3'); 59.7(C5'); 61.0(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 54.2(OCH<sub>3</sub>); 40.5(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 34.5(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 17.9(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)

ESI(+): m/z: 908.4([M]<sup>+</sup>)



**<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)-Dilsopropylphosphoramidit] 18**



$C_{64}H_{66}N_7O_9P$

1108.22g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.1g (0.11mmol) <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin 17 und 0.1ml (5eq,0.55mmol) *N,N*-Ethyldiisopropylamin wurden in 4ml eines 1:1-Gemisches aus abs Dichlormethan und abs Acetonitril gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.03ml (0.13mmol) 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramid innerhalb von 15 Minuten bei 0°C. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei 0°C und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gequenchet, mit Dichlor-methan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Ethylacetat zu Ethylacetat/ Acetonitril 8:1. Das Produkt <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-Pyrenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)-Dilsopropylphosphoramidit] 18 wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.06g(47%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.33, 0.38(DCM:MeOH=95:5)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

8.23-7.95(m, 11H, arom.H und H6); 7.39-7.09(m, 10H, arom.H und NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6.78(d, 4H, J= 10Hz, arom.H); 5.93(d, 1H, J= 5HZ, H1'); 5.00-4.74(m, 2H, OCH<sub>2</sub>O); 4.45-3.60(m, 15H, H2', H3', H4', H5', 2xOCH<sub>3</sub> und CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.91(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.81(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.80-2.59(m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 1.31-1.18(m, 12H, 2xCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

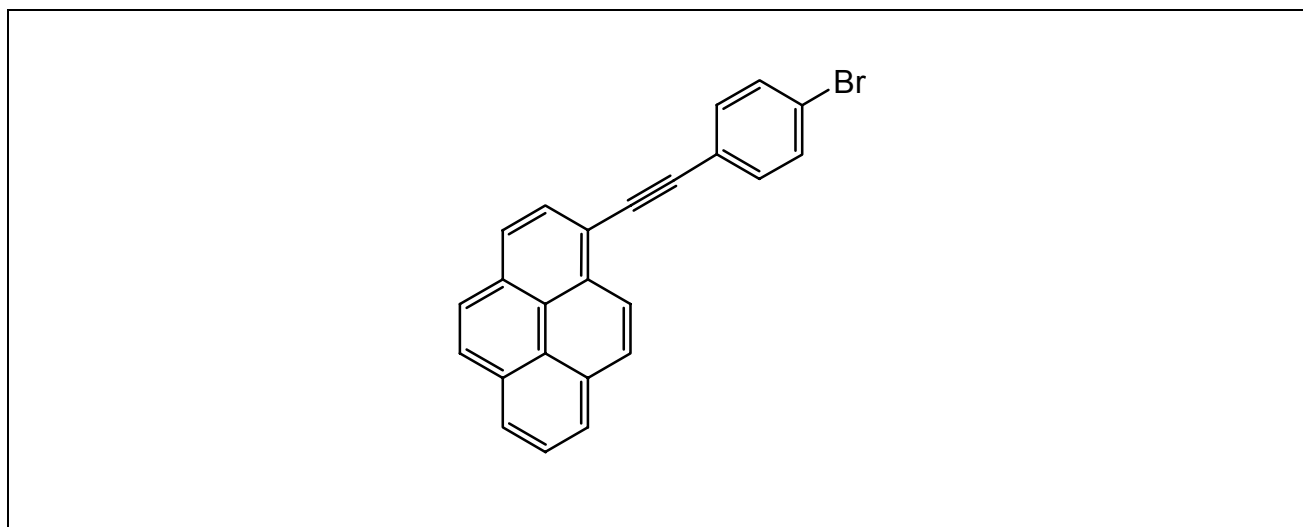
<sup>31</sup>P-NMR: (162MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

150.7, 149.4 Verhältnis 1:1.8

ESI(+): m/z: 1108.5

## Methode A

### 1-(4-Brom-phenylethynyl)-pyren 19



C<sub>24</sub>H<sub>13</sub>Br

381.26g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Schutzgas durchgeführt. 1g (3.54mmol) 1-Brom-4-Iod-benzol wurden in 30ml eines 2:1-Gemisches aus Triethylamin/abs Tetrahydrofuran gelöst, mit 50mg (0.002mmol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid, 27mg (0.14mmol) Kupfer(I)-Iodid und 0.93g (4.10ml) 1-Ethynylpyren **4** versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Dichlormethan/Hexan 1:5). Das Produkt 1-(4-Brom-phenylethynyl)-pyren **19** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 1.292g(95.8%)

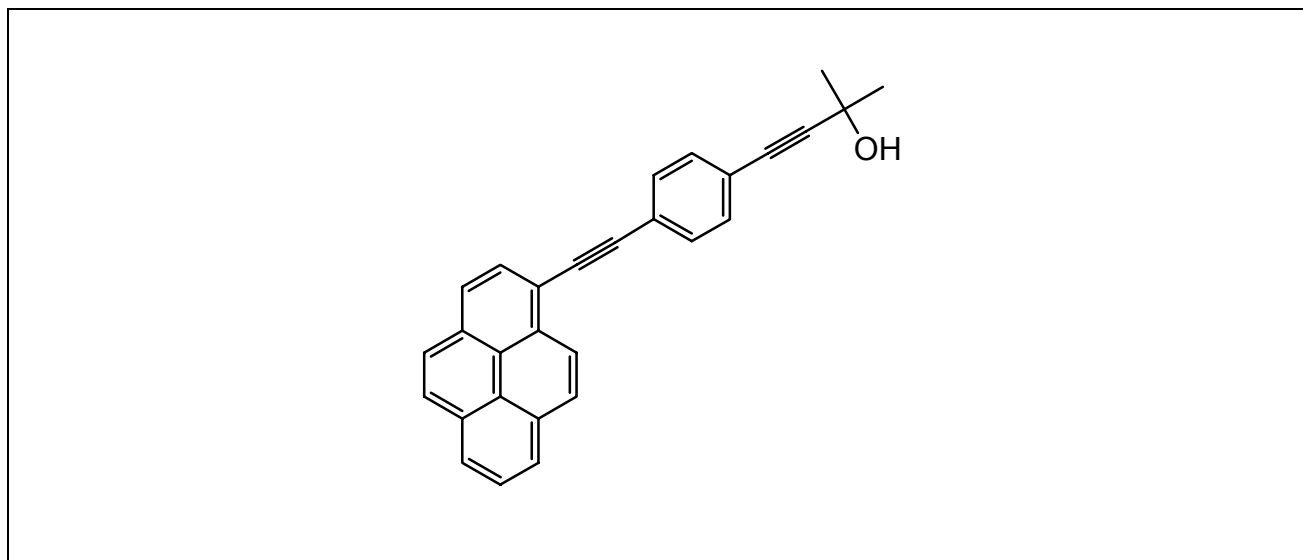
DC: R<sub>f</sub>: 0.28(DCM:Hex=1:10)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.46(d, 1H, J= 9.3Hz arom.H); 8.07-7.83(m, 8H, arom.H); 7.50(s, 4H, arom.H)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
131.3-121.4(m, arom.C); 116.2(arom.C); 92.9(alkyne-C);  
88.8(alkyne-C)

MALDI: m/z 382.16([M+H]<sup>+</sup>)

## 2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol 22



$C_{29}H_{20}O$   
384.47g/mol

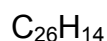
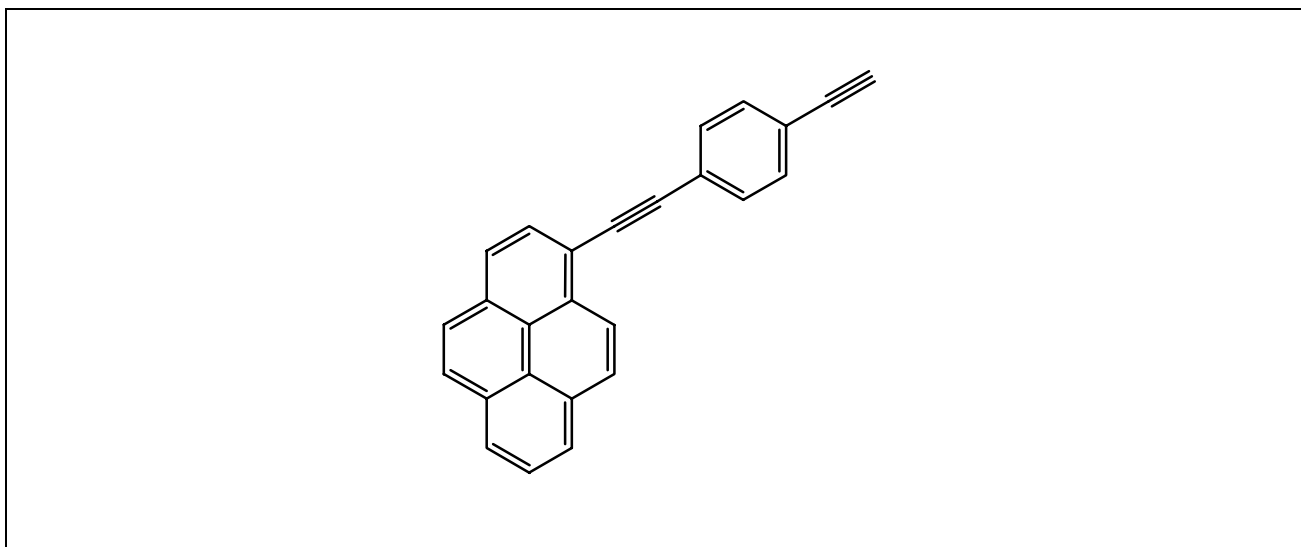
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenk Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1.03g (2.71mmol) 1-(4-Brom-phenylethynyl)-pyren **19** wurden in 40ml eines 3:1-Gemisches aus Triethylamin/abs Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.1mg (0.001mmol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid, 5mg (0.02mmol) Kupfer(I)-Iodid, 11mg (0.04mmol) Triphenylphosphin und 0.32ml (1.2eq, 3.25mmol) 2-Methyl-3-butyn-2-ol versetzt und 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie.(Dichlormethan) Das Produkt 2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol **22** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.70g(66%)

$^1H$ -NMR: (250MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.59(d, 1H, J= 9.3, arom.H); 8.18-7.93(m, 8H, arom.H); 7.60(d, 2H, J= 8.5Hz, arom.H); 7.43(d, 2H, J= 8.8Hz, arom.H); 1.59(s, 6H, alkyne-( $CH_3$ )<sub>2</sub>)

ESI(+): m/z m/z 384.8([M]<sup>+</sup>); 366.8([M-OH]<sup>+</sup>)

### 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren 23



326.39g/mol

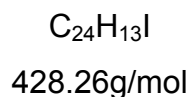
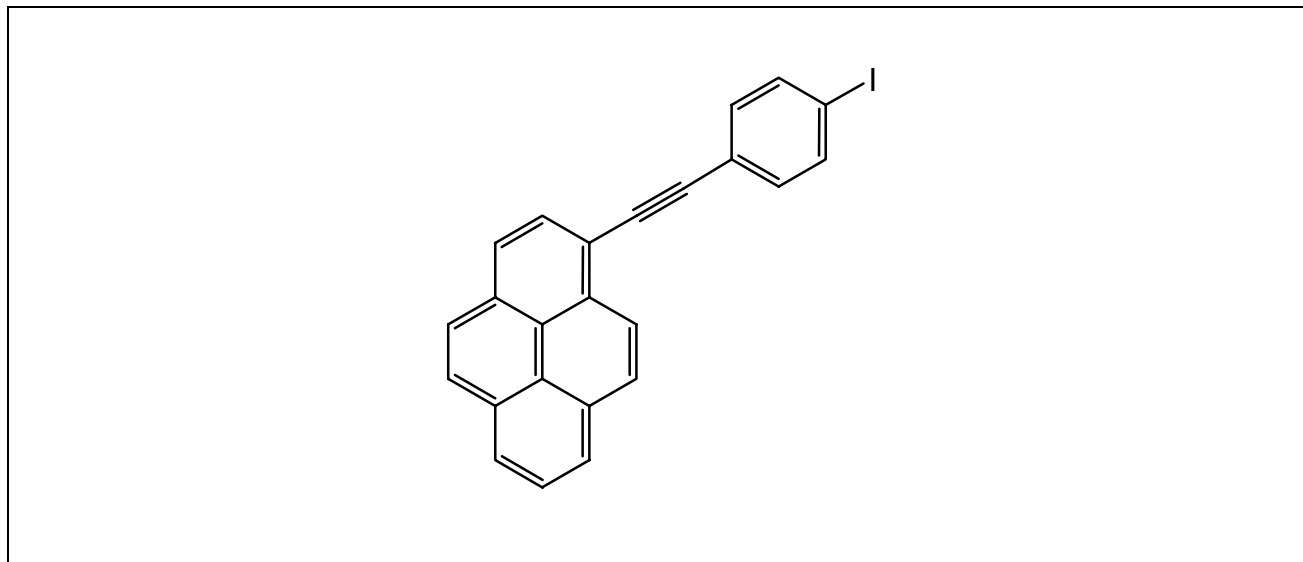
0.68g (1.77mmol) 2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol 22 wurden in 40ml Toluol gelöst, mit Natriumhydroxid versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur wurde das ausgefallene Natriumhydroxid abfiltriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 40ml Wasser zweimal gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan) Das Produkt 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren 23 wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.53g(93%)

$^1\text{H-NMR}$ : (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.60(d, 1H,  $J= 9.3\text{Hz}$ , arom.H); 8.20-7.94(m, 8H, arom.H); 7.63(d, 2H,  $J= 8.5\text{Hz}$ , arom.H); 7.51(d, 2H,  $J= 8.5\text{Hz}$ , arom.H); 3.15(s, 1H, alkyne-H)

## Methode B

### 1-(4-Iodo-phenylethynyl)-pyren 20



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Schutzgas durchgeführt. 2.19g (6.63mmol) 1,4-Diodobenzol wurden in 40ml eines 1:1-Gemisches aus Triethylamin/abs Tetrahydrofuran gelöst, mit 31mg (0.04mmol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid, 17mg (0.09mmol) Kupfer(I)-Iodid und 0.5g (2.21ml) 1-Ethynylpyren 4 versetzt und 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Dichlormethan/Hexan 1:10). Das Produkt 1-(4-Iodo-phenylethynyl)-pyren 20 wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.68g(72%)

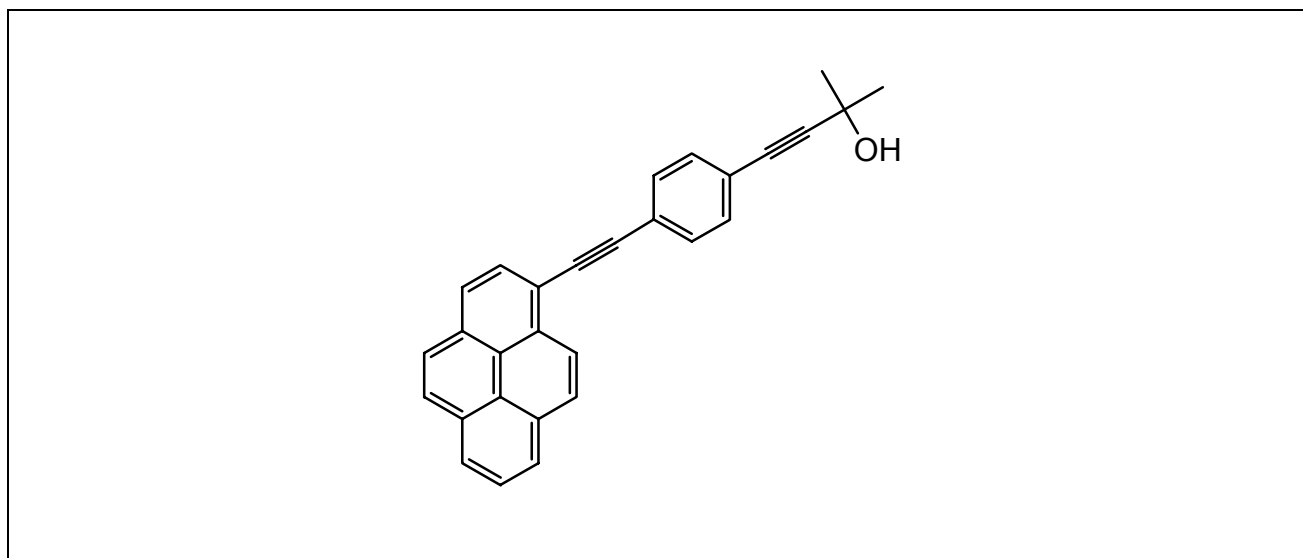
DC: R<sub>f</sub>: 0.35(DCM:Hex=1:10)

$^1\text{H-NMR}$ : (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.46(d, 1H,  $J = 9.2\text{Hz}$ , arom.H); 8.07-7.83(m, 8H, arom.H); 7.50(s, 4H, arom.H)

$^{13}\text{C-NMR}$ : (63MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
131.3-121.4(m, arom.C); 92.9(alkyne-C); 88.8(alkyne-C)

ESI(+): m/z 428.0( $[\text{M}]^+$ )

### 2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol 22



$\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{O}$   
384.47g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenk Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.65g (1.52mmol) 1-(4-Brom-phenylethynyl)-pyren **19** wurden in 40ml eines 1:1-Gemisches aus Triethylamin/abs Tetrahydrofuran gelöst, mit 47mg (0.07mmol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid, 15mg (0.08mmol) Kupfer(I)-Iodid und 0.36ml (2.4eq, 3.64mmol) 2-Methyl-3-butyn-2-ol versetzt und 3 Stunden bei  $50^\circ\text{C}$  gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie.(

Dichlormethan /Hexan 5:1) Das Produkt 2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol **22** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.575g(98%)

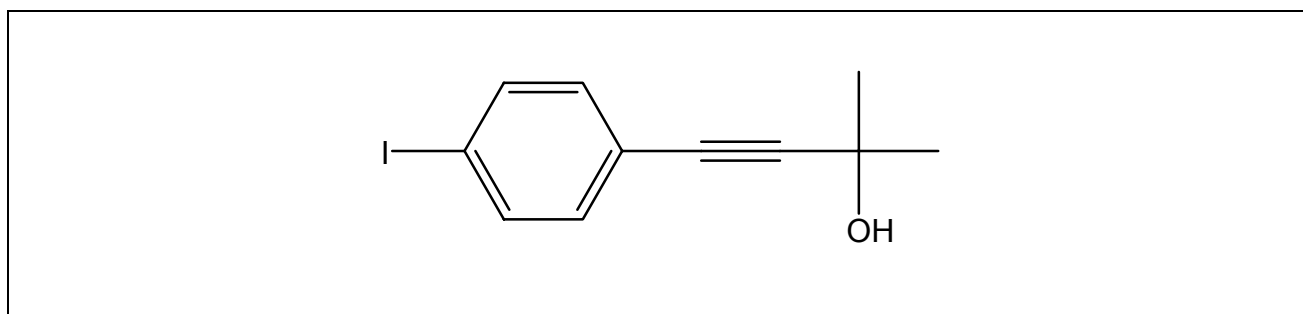
$^1\text{H-NMR}$ : (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]

8.59(d, 1H, arom.H), 8.18-7.93(m, 8H, arom.H), 7.60(d, 2H, arom.H), 7.43(d, 2H, arom.H), 1.59(s, 6H, alkyne- $(\text{CH}_3)_2$ )

ESI(+): m/z m/z 384.8( $[\text{M}]^+$ ); 366.8( $[\text{M-OH}]^+$ )

### Methode C

4-(4-Iodo-phenyl)-2-methyl-but-3-yn-2-ol **21**



$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{IO}$

286.11g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkcolben unter Schutzgas durchgeführt. 2g (6.06mmol) 1,4-Diodobenzol wurden in 15ml eines 2:1-Gemisches aus Triethylamin/abs Tetrahydrofuran gelöst und mit 85mg (0.12mmol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid und 46mg (0.24mmol) Kupfer(I)-iodid versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.59ml (1eq, 8.14mmol) 2-Methyl-3-butyn-2-ol innerhalb von 1 Stunde bei  $0^\circ\text{C}$ . Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch



Säulenchromatographie.(Dichlormethan/Hexan 7:3) Das Produkt 4-(4-Iodo-phenyl)-2-methyl-but-3-yn-2-ol **21** wurde als orangefarbener Schaum erhalten.

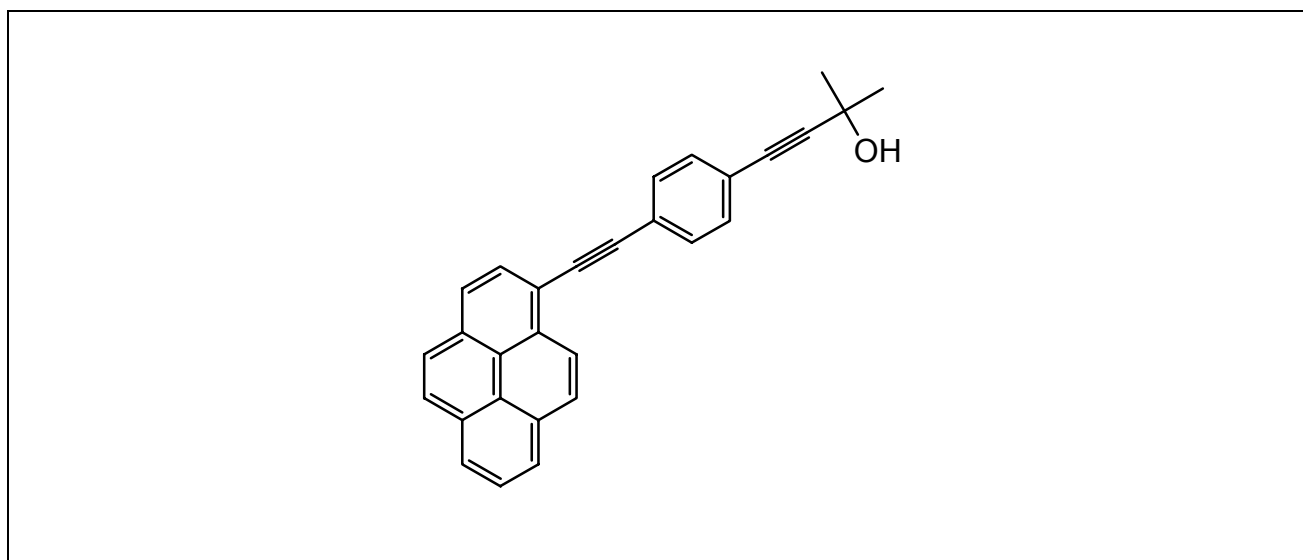
Ausbeute: 0.850g(49%)

$^1\text{H-NMR}$ : (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]

7.61(d, 2H, arom.H), 7.19(d, 2H, arom.H), 1.48(s, 6H,  $\text{CH}_3$ )

ESI(+): m/z 260.9( $[\text{M-OH}]^+$ )

### 2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol **22**



$\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{O}$

384.47g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkcolben unter Schutzgas durchgeführt. 1g (3.50mmol) 4-(4-Iodo-phenyl)-2-methyl-but-3-yn-2-ol **21** wurden in 20ml eines 1:1-Gemisches aus Triethylamin/abs Tetrahydrofuran gelöst, mit 49mg (0.07mmol) Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)-dichlorid, 27mg (0.14mmol) Kupfer(I)-Iodid und 0.95g (1.2eq, 4.19ml) 1-Ethynylpyren **4** versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. Die

Säulenchromatographie wurde in einem Gradient von Dichlormethan/Hexen 3:1 zu Dichlormethan/Hexen 5:1. Das Produkt 2-Methyl-4-(4-pyren-1-ylethynyl-phenyl)-but-3-yn-2-ol **22** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

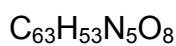
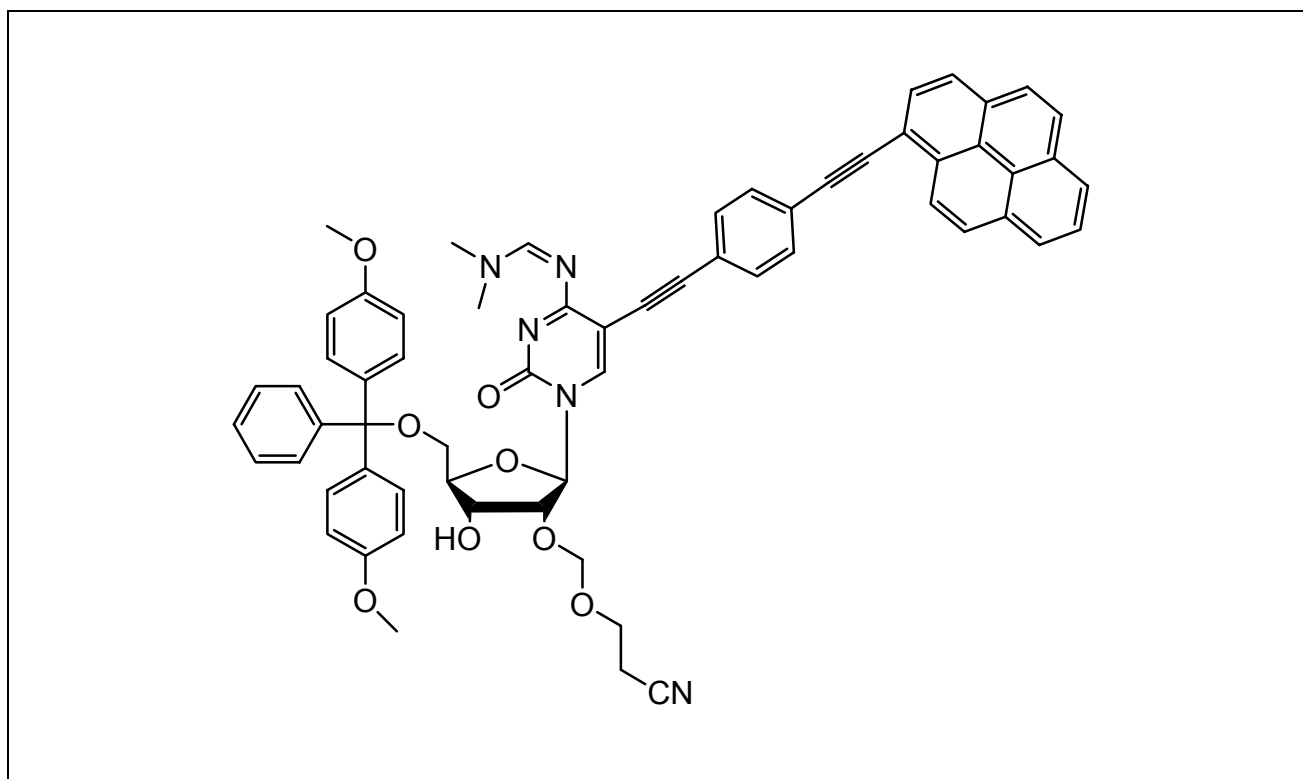
Ausbeute: 1.062g(79%)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

8.59(d, 1H, arom.H), 8.18-7.93(m, 8H, arom.H), 7.60(d, 2H, arom.H), 7.43(d, 2H, arom.H), 1.59(s, 6H, alkyne-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

ESI(+): m/z 384.8([M]<sup>+</sup>); 366.8([M-OH]<sup>+</sup>)

<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin **24**



1008.12g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.3g (0.37mmol) <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxy-methyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxy trityl)-Iodcytidin **16** wurden in 20ml abs *N,N*-Dimethylformamid gelöst, mit 43mg (10%mol, 0.04mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium, 14mg (20%mol, 0.07mmol) Kupfer(I)-iodid, 0.13ml (2.4eq, 0.89mmol) Triethylamin und 0.17g (0.52mmol) 1-(4-Ethynylphenylethynyl)pyren **23** versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde *N,N*-Dimethylformamid im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Dichlormethan zu Dichlormethan /Methanol 95:5. Das Produkt <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin **24** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.318g(85%)

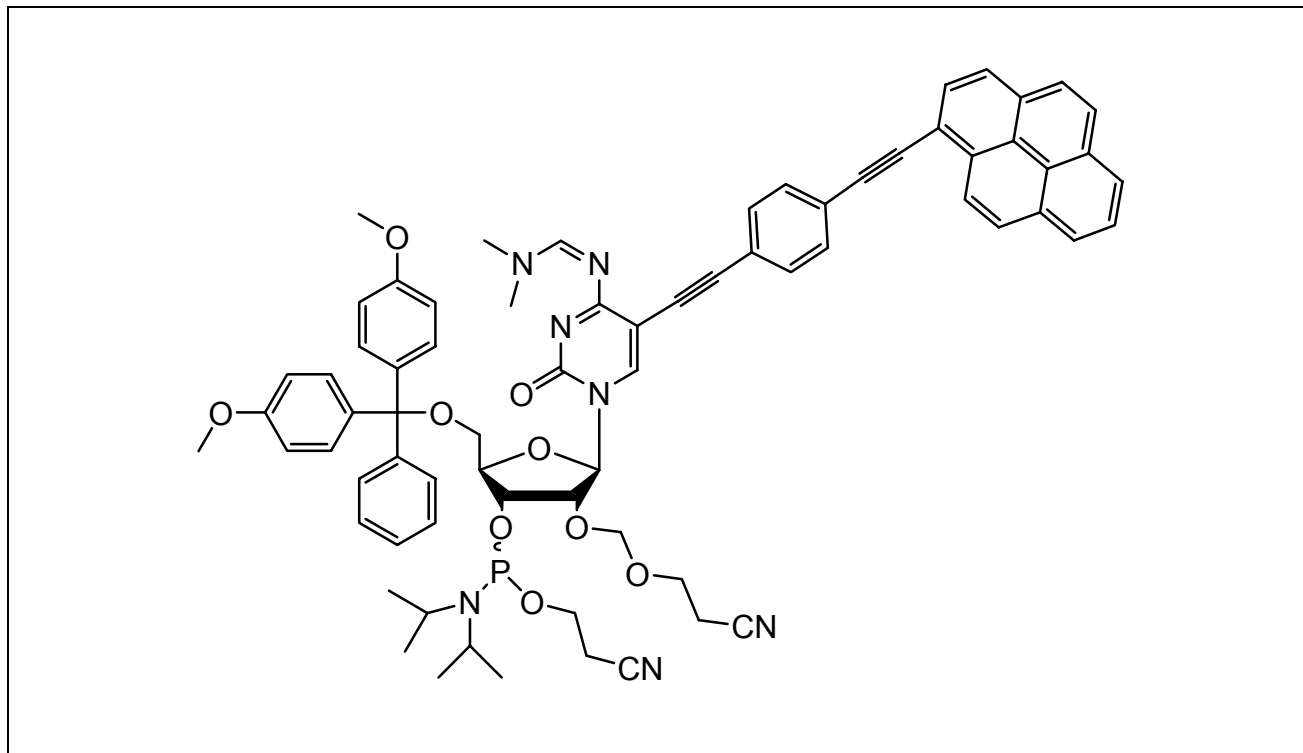
DC: R<sub>f</sub>: 0.21(EtOAc:CH<sub>3</sub>CN=8:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.18-7.90(m, 10H, arom.H und H6); 7.63-7.05(m, 13H, arom.H und NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6.77(d,4H, J= 7.5Hz, arom.H); 5.95(dd, 1H, J= 2.5Hz, H1'); 5.09-4.86(m, 2H, OCH<sub>2</sub>O); 4.50-3.74(m, 7H, H2', H3', H4', H5' und CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 3.72(s, 4H, OCH<sub>3</sub>); 3.64(s, 2H, OCH<sub>3</sub>); 3.37(s, 4H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.25(s, 2H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.68-2.58(m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
165.3(C4); 159.6(NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 153.2(C2); 148.3(C6); 140.3-119.5(m, arom.C); 116.9(CN); 95.2(OCH<sub>2</sub>O); 86.4(DMTr(C), 84.7(C1'); 78.7(C4'); 75.1(C2'); 65.5(C3'); 62.2(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 60.1(C5'); 54.0(OCH<sub>3</sub>); 38.7(N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 20.9(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)

ESI(+): m/z: 1008.3([M]<sup>+</sup>)

**<sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)-Dilsopropylphosphoramidit] 25**



$C_{72}H_{70}N_7O_9P$

1208.34g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.33g (0.33mmol) <sup>4</sup>N-Dimethyl-formamidin-2'-O-(2-cyanoethoxy-methyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-cytidin 24 und 0.28ml (5eq, 1.63mmol) *N,N*-Ethyl-diisopropylamin wurden in 4ml eines 1:1-Gemisches aus abs Dichlormethan und abs Acetonitril gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.09ml (0.39mmol) 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit innerhalb von 15 Minuten bei 0°C. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei 0°C und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gequenchet, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Ethylacetat zu Ethylacetat/Acetonitril 8:1. Das Produkt <sup>4</sup>N-Dimethylformamidin-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) -5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-

cytidin 3'-[(2-Cyanoethyl)- Dilsopropylphosphoramidit] **25** wurde als gelblicher Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.058g(47.3%)

DC: 0.32, 0.45(EtOAc:CH<sub>3</sub>CN=8:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

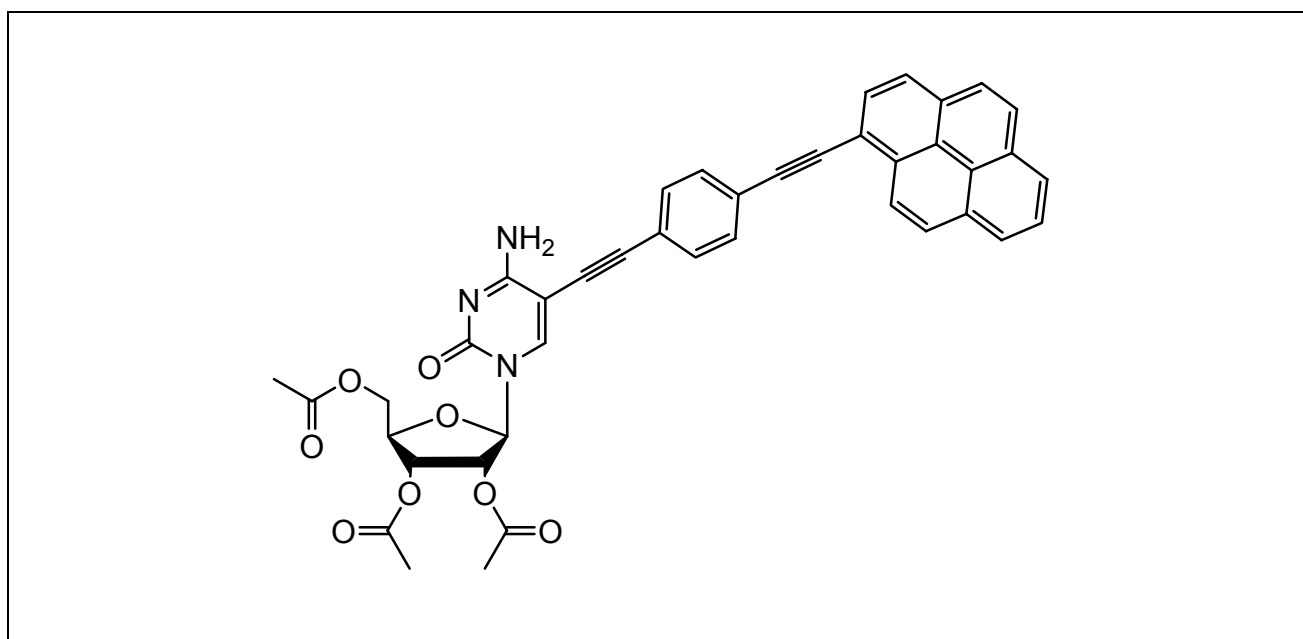
8.16-7.67(m, 10H, atom.H und H6); 7.39-6.63(m, 18H, arom.H und NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6.01(dd, 1H, J= 2.5Hz, H1'); 5.02-4.75(m, 2H, OCH<sub>2</sub>O); 4.39-3.23(m, 15H, H2', H3', H4', H5', CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN und 2xOCH<sub>3</sub>); 3.13(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.09(s, 3H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.71-2.65(m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 1.26-1.10(m, 12H, 2xCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

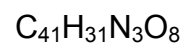
<sup>31</sup>P-NMR: (162MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

152.5, 151.0 Verhältnis 1:2.1

ESI(+): m/z: 1208.7([M]<sup>+</sup>)

### **2',3',5'-Tri-O-Acetyl-5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-Cytidin 26**





693.70g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.74g (1.49mmol) 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-Iodcytidin **63** wurden in 35ml abs *N,N*-Dimethylformamid gelöst, mit 172mg (10%mol, 0.15mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium, 57mg (20%mol, 0.30mmol) Kupfer(I)-iodid, 0.50ml (2.4eq, 6.80mmol) Triethylamin und 0.53g (1.1eq, 1.64mmol) 1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren **71** versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde *N,N*-Dimethylformamid im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Dichlormethan/Methanol 10:1 zu Dichlormethan/Methanol 4:1. Das Produkt 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-5-(4-pyren-1-ylethynyl-phenylethynyl)-Cytidin **26** wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 0.85g (82%)

DC:  $R_f$ : 0.29(DCM:MeOH=95:5)

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

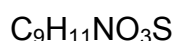
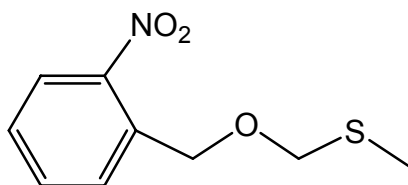
8.68(d, 2H,  $J = 9.3\text{Hz}$ , NH); 8.44-7.64(m, 14H, H6, arom.H); 5.94(d, 1H,  $J = 9.3\text{Hz}$ , H1'); 5.54(t, 1H,  $J = 4.3\text{Hz}$ , H2'); 5.42(t, 1H,  $J = 6\text{Hz}$ , H3'); 4.42-4.24(m, 3H, H4', H5'); 2.12(s, 9H, carbonyl- $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ : (63MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ [ppm]

170.0(d,  $J = 42.8\text{Hz}$ , carbonyl-C); 164.0(C4); 162.3(C2); 147.0(C6); 131.6-122.6(m, arom.C); 116.4(C5); 94.91(alkyne-C); 93.8(alkyne-C); 89.8(C1'); 78.9(C4'); 72.6(C2'); 69.5(C3'); 62.9(C5'); 20.9(d,  $J = 17\text{Hz}$ , carbonyl- $\text{CH}_3$ )

MALDI: m/z 695.3([M+H] $^+$ ); 718.0([M+Na+H] $^+$ ); 733.5([M+K+H] $^+$ )

## **o-Nitrobenzylmethylthiomethylether 27**



213.25 g/mol

### Methode A

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.96g (40mmol) Natriumhydrid wurden bei 0°C in 20ml 1,2-Dimethoxy-ethan gelöst und 3.06g (20mmol) 2-Nitrobenzylalkohol langsam zugegeben. Nach Zugabe von 1.68ml (20mmol) Chloromethylmethylsulfid wurde die Reaktionslösung 2 Stunden bei 0°C und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit 30ml Wasser gequenchet und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie.(DCM / Hex = 1:1) Das Produkt o-Nitrobenzylmethylthiomethylether 27 wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten.

### Methode B

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. In 20ml abs Benzol wurden 3.24g (19.07mmol) Silbernitrat und 2.9ml (20.80mmol) Triethylamin zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2.66g (17.34mmol) 2-Nitrobenzylalkohol und 1.74ml (20.80mmol) Chloromethyl-methylsulfid in 20ml abs Benzol innerhalb von 5 Minuten und das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei 80°C geführt. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur wurde der ausgefallene Katalysator über Celite 500 abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Diethylether mehrfach extrahiert, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis



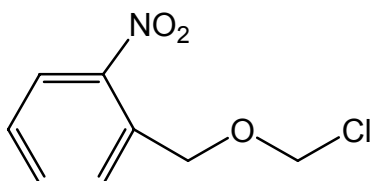
zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie.(DCM / Hex= 2:3) Das Produkt *o*-Nitrobenzylmethylthiomethylether **27** wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: Methode A 3.18g (75%)  
B 1.25g (34%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.15 (DCM : Hex = 1 : 2)

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
7.42-8.07(m,4H,Ar-H); 4.98(s,2H,Ar-CH<sub>2</sub>-O); 4.77(s,2H,-O-CH<sub>2</sub>-S);  
2.19(s,3H,-S-CH<sub>3</sub>)

### ***o*-Nitrobenzylchloromethylether **28****



C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>3</sub>

201.61g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 2.42g (11.35mmol) *o*-Nitrobenzylmethylthiomethylether **27** wurden in 30ml abs. Dichlormethan gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.93ml (11.35mmol) Sulfurylchlorid innerhalb von 10 Minuten bei Raumtemperatur und es wurde 1 Stunde gerührt. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Rückstand wurde mittels Kugelrohrföfen im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt *o*-Nitrobenzylchloromethylether **28** wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten.

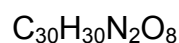
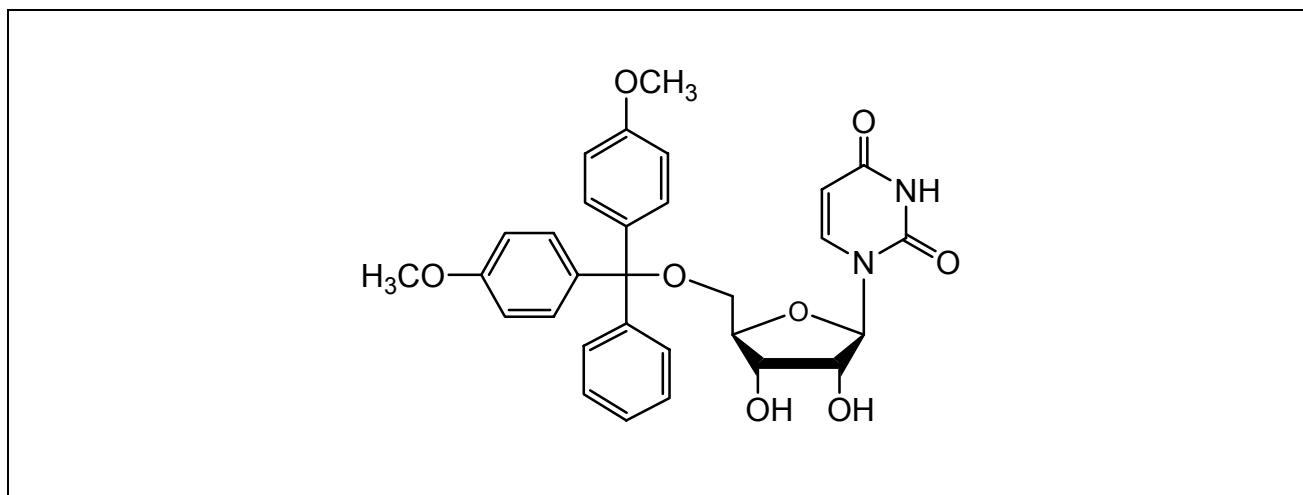
Ausbeute: 2.09 g (91%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.07 (DCM)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.12(d, 1H, J= 8.1, arom.H); 7.76-7.63(m, 2H, arom.H); 7.52-7.45(m, 2H, arom.H); 5.63(s, 2H-O-CH<sub>2</sub>-Cl); 5.15(s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-O)

ESI(-): m/z 217.5[M+NH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>

### 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- Uridin 29



546.57g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.2g (8.19mmol) Uridin wurden in 20ml abs Pyridin gelöst, mit 3.79g (11.2mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylchloromethan versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit 20ml wässr. ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gequenchet, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie(Acetonitril / Methanol 95:5). Das Produkt 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-Uridin 29 wurde als weißer Schaum erhalten.



Reaktionslösung mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg gequenchet, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Ethylacetat / Hexan 2:3 zu Ethyl-acetat / Hexan 1:9. Das Produkt 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[(2-nitrobenzyl)oxy]methyl}uracil **30** wurde als weißer Schaum erhalten.

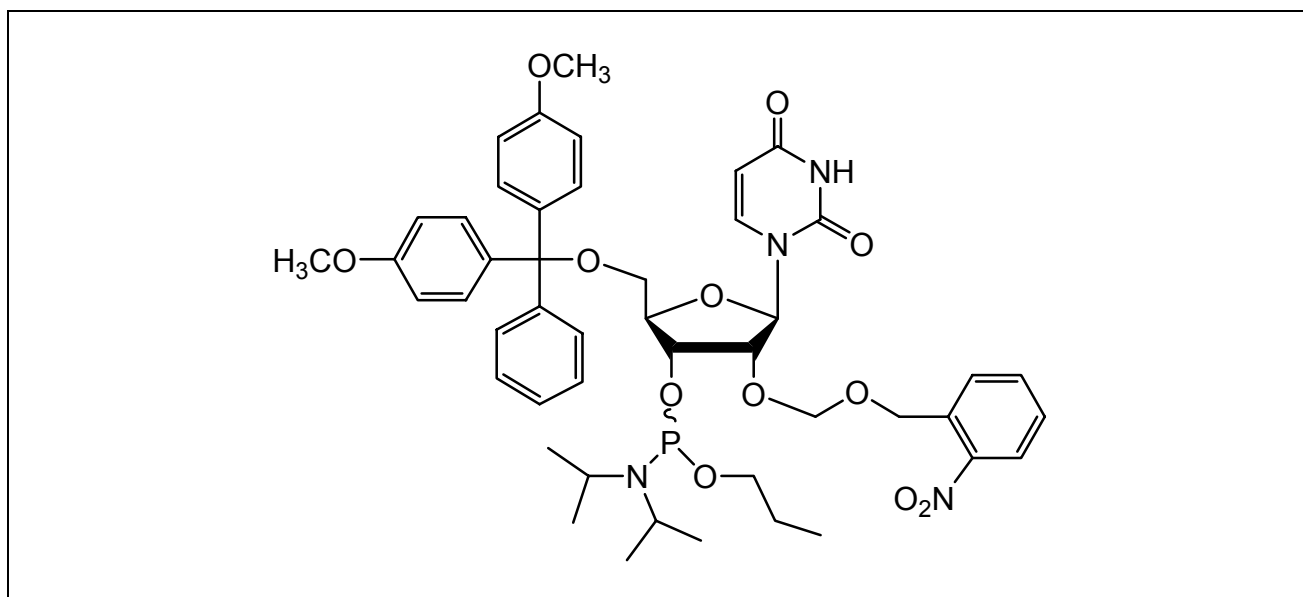
Ausbeute: 1.02 (44%)

DC:  $R_f$ : 0.61( EtOAc:Hex=9:1)

$^1\text{H-NMR}$ : (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]:  
8.11-8.07(m, 1H, , arom.H); 7.94(d, 1H,  $J= 8.1\text{Hz}$ , H6); 7.72-7.66(m, 12H, arom.H); 6.86-6.81(m, 4H, arom.H); 6.04(d, 1H,  $J= 2.3\text{Hz}$ , H1'); 5.28(dd, 1H,  $J= 2.4\text{Hz}$ ,  $J= 2.1\text{Hz}$ , H5); 5.18-5.00(m, 4H,  $\text{ArCH}_2\text{O}$  und  $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 4.61(m, 1H, H2'); 4.38(m, 1H, H3'); 4.17-4.07(m, 3H, H4'und H5'); 3.80(s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ );

ESI(-):  $m/z$  746.5 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$

**1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[[2-nitrobenzyl]oxy]methyl}uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)-Dilsopropylphosphoramidite] 31**



$C_{47}H_{54}N_5O_9P$

863.95 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.25g (0.35mmol) 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[[2-nitrobenzyl]-oxy]methyl}uracil **30** wurden in 5ml eines 1:1-Gemisches aus abs Dichlormethan und abs Acetonitril gelöst, mit 0.31ml (5eq, 1.76mmol) *N,N*-Ethyldiisopropylamin versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.1ml (0.39mmol) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramid innerhalb von 15 Minuten bei 0°C, 10 Minuten bei 0°C und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lsg gequenchet, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Ethylacetat / Acetonitril 3:7 zu Ethylacetat / Acetonitril 3:2. Das Produkt 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[[2-nitrobenzyl]oxy]methyl}uracil 3'-[(2-Cyanoethyl) Dilsopropylphosphoramidite] **31** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.27 g (90%)

DC:  $R_f$ : 0.5, 0.42(EtOAc: Hex = 3:2)

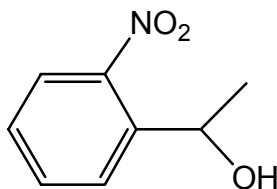
MALDI-MS: m/z 798,4 (M+H<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR: (400Hz,CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.11(dd, 1H, J= 1.2Hz, arom.H); 8.01(dd,1H, J= 8.2Hz, H6); 7.81(d, 1H, J= 7.8Hz, arom.H); 7.65(t, 1H, J= 7.7Hz, arom.H)); 6.87-6.83(m, 4H, arom.H); 7.49-7.26(m, 10H, arom.H); 6.11(dd, 1H, J= 3.7Hz und J= 3.2Hz, H1'); 5.25(dd,1H, J= 8.1Hz, H5); 5.11-5.03(m, 4H, OCH<sub>2</sub>O und ArCH<sub>2</sub>O); 4.59-4.47(m, 2H,H2'und H3'); 4.30(d,0.5H, J= 6.2Hz, H4'); 4.24(q,0.5H, J= 2.0Hz und J= 2.6Hz, H4'); 3.92(m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 3.82 und 3.81 (2s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.70-3.43(m, 5H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, H5', OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.65(t, 1H, J= 6.2Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.48(t, 1H, J= 6.3Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 1.16-1.13(q, 8H, J= 5.1Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.04(d, 4H, J= 6.8Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

<sup>31</sup>P-NMR: (162MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
151.4, 150.4 Verhältnis 1.2:1

ESI(-): 887[M+Na]<sup>-</sup>

### 1-(o-Nitrophenyl)ethanol 32



C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>

167.16g/mol

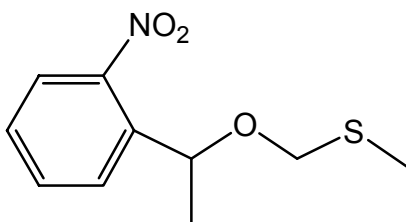
Zu 3g Natriumborhydrid wurden innerhalb von 5 Minuten bei Raumtemperatur 3ml Wasser zugetropft, mit 30g Aluminiumoxid versetzt, 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und 18 Stunden an der Ölpumpe getrocknet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5.44g (32.94mmol) 2-Nitroacetophenon in 60ml Diethylether innerhalb von 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2 Stunden gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das ausgefallene Reduktionsreagenz abfiltriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Diethylether) Das Produkt 1-(o-Nitrophenyl)ethanol **32** wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 5.50g (99%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.14 (DCM : Hex = 3 : 1)

<sup>1</sup>H-NMR: (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
7.30-7.83(m, 4H, Ar-H); 5.30-5.37 (q, 1H, J= 6.3Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)); 2.42 (br, 1H, -OH); 1.50 (d, 3H, J= 6.3Hz, -CH<sub>3</sub>)

### 1-(o-Nitrophenyl)ethylmethylthiomethylether **33**



C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S

227.28g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 5.52g (33mmol) 1-(o-Nitrophenyl)ethanol **32** und 3.3ml (40mmol) Chloromethylmethylsulfid wurden in 20ml abs Benzol gelöst. Die Reaktionslösung wurde in Suspension aus 6.17g (36mmol) Silbernitrat und 5.52ml (40mmol) Triethylamin (40mmol) in 12ml abs Benzol innerhalb von 5 Minuten bei Raumtemperatur getropft und 24 Stunden bei 60°C gerührt.

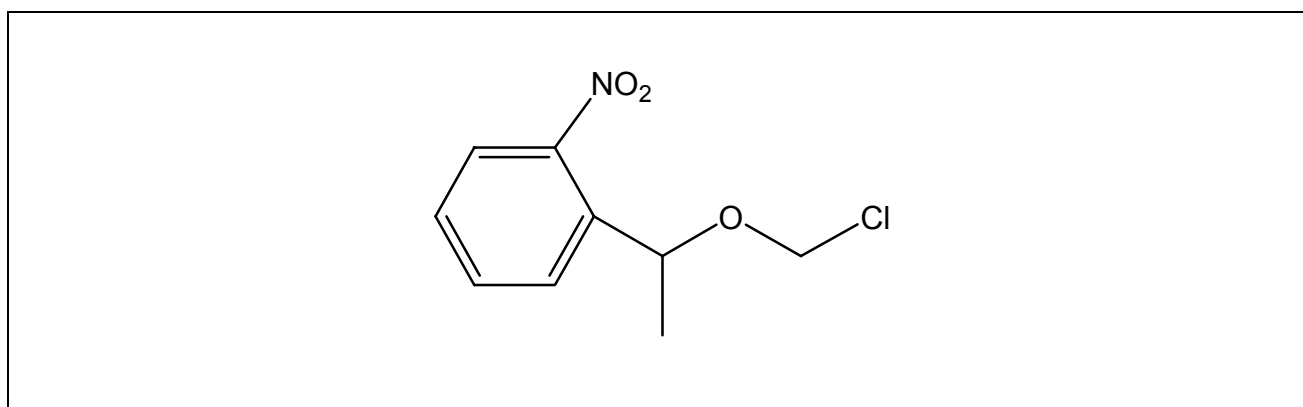
Nach beendeter Umsetzung wurde der ausgefallene Katalysator über Celite 500 abfiltriert, und der Rückstand mit Diethylether mehrfach gewaschen, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan / Hexan 1:2) Das Produkt 1-(*o*-Nitrophenyl)ethylmethylthiomethylether **33** wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 1.70g (23%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.50(DCM : Hex = 3 : 1)

<sup>1</sup>H-NMR: (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
7.39-7.90(m,4H,Ar-H); 5.42(q, 1H, J= 6.4Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)-O); 4.62(d, 2H, J= 11.5Hz, -O-CH<sub>2</sub>-S); 4.31(d, 2H, J= 11.5Hz, -O-CH<sub>2</sub>-S); 2.10(s, 3H, -S-CH<sub>3</sub>); 1.50(d, 3H, J= 6.4Hz, Ar-CH(CH<sub>3</sub>)-)

### 1-(*o*-nitrophenyl)ethylchloromethylether **34**



C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>Cl

215.64g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 1.57g (6.91mmol) 1-(*o*-Nitrophenyl)ethylmethylthiomethylether **33** wurden in 25ml abs Dichlormethan gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.57ml (6.91mmol)



Sulfurylchlorid innerhalb von 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1 Stunden gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Rückstand wurde mittels Kugelrohrfen im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt 1-(*o*-Nitrophenyl)ethylchloromethylether **34** wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten.

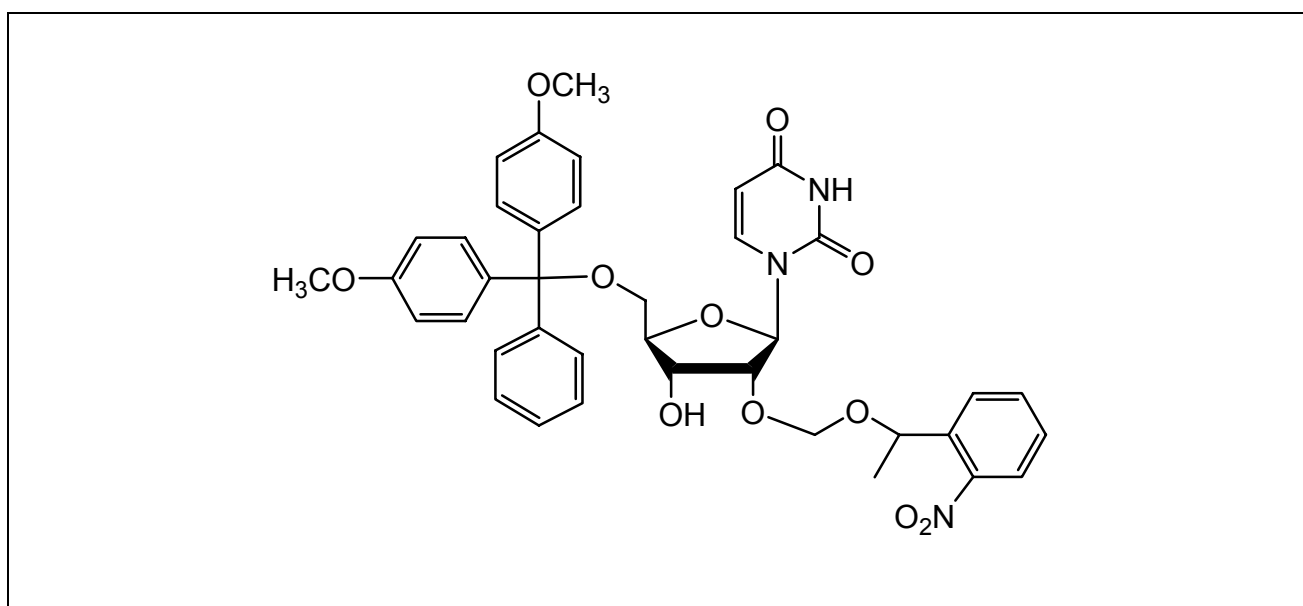
Ausbeute: 2.09g (91%)

DC:  $R_f$ : 0.07(DCM)

$^1\text{H-NMR}$ : (250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]

7.34-7.91(m,4H,Ar-H); 5.52(q,2H,  $J= 7.4\text{Hz}$ , -O-CH $_2$ -Cl); 5.18(d,1H,  $J= 6.6\text{Hz}$ , -CH(CH $_3$ )-O); 1.54(d,3H,  $J= 6.4\text{Hz}$ , -CH(CH $_3$ )-O-)

**1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(1-(*o*-nitrobenzyl) ethoxy)methyl]uracil **35****



$\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{11}$

725.75g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 1.31g (2.40mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytritylmethyl)-Uridin **29** wurde in 12ml 1,2-Dichlorethan gelöst, mit 2.1ml (5eq, 12mmol) *N,N*-Ethyldiisopropylamin und 0.88g (1.2eq,

2.88mmol) Dibutylzinnchlorid versetzt und 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.57g (1.1eq, 2.65mmol) 1-(o-nitrophenyl)ethylchloromethylether **34** in 4ml 1,2-Dichlorethan innerhalb von 90 Minuten bei Raumtemperatur und 30 Minuten bei 70°C gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gequench, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Ethyl-acetat / Hexan 1:1 zu Ethylacetat / Hexan 2:1 . Das Produkt 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[(1-(o-Nitrobenzyl)ethyl)oxy]methyl}uracil **35** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 740mg (42.5%)

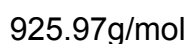
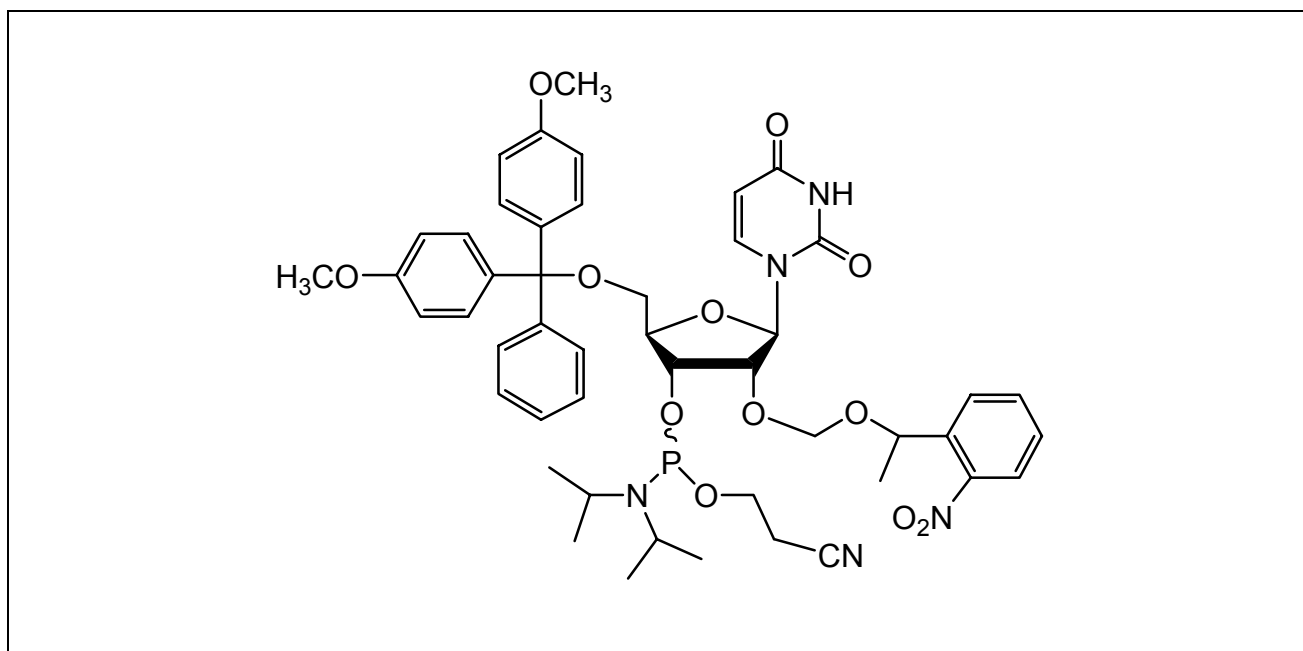
DC: R<sub>f</sub>: 0.68 (EtOAc: Hex = 9:1)

<sup>1</sup>H-NMR: (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]

7.88-7.98(m, 1H, arom.H); 7.78(d, 1H, J= 7.9Hz, H6); 7.23-7.66(m, 12H, arom.H); 6.88-6.82(m, 4H, arom.H); 6.02(d, 0.5H, J= 2.8Hz, H1'); 5.91 (d, 0.5H, J= 2.2Hz, H1'); 5.44(dd, 1H,J= 6.3Hz, ArCH); 5.29(m, 1H, H5); 5.03(2d, 1H, J= 6.9Hz, OCH<sub>2</sub>O); 4.96(2d, 1H, J= 6.9Hz, OCH<sub>2</sub>O); 4.55(m, 1H, H2'); 4.34(m, 1H, H3'); 4.10(m, 1H, H4'); 3.81(s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>); 3.55(m, 2H, H5'); 1.57(t, 3H, J= 5.7Hz, ArCH(CH<sub>3</sub>))

MALDI : m/z 748[M+Na]<sup>+</sup>

**1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(1-(o-nitrobenzyl) ethoxy)methyl]-uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)- diisopropyl-phosphorsamidit] 36**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.2g (0.276mmol) 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(1-(o-nitrobenzyl)ethoxy)methyl]uracil **35** und 0.24ml (5eq, 1.38mmol) *N,N*-Ethyl-diisopropylamin wurden in 3ml eines 1:1-Gemisches aus abs Dichlormethan und abs Acetonitril gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.07ml (0.331mmol) 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit innerhalb von 15 Minuten bei 0°C. Nach 10 Minuten Rühren wurde noch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gequench, mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie in einem Gradient aus Ethylacetat/Acetonitril 3:7 zu Ethyl-acetate/ Acetonitril 3:2. Das Produkt 1-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-}[(1-(o-Nitrobenzyl)ethyl)oxy)methyl]uracil 3'-[(2-Cyanoethyl)- diisopropylphosphorsamidit] **36** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 177mg (92%)

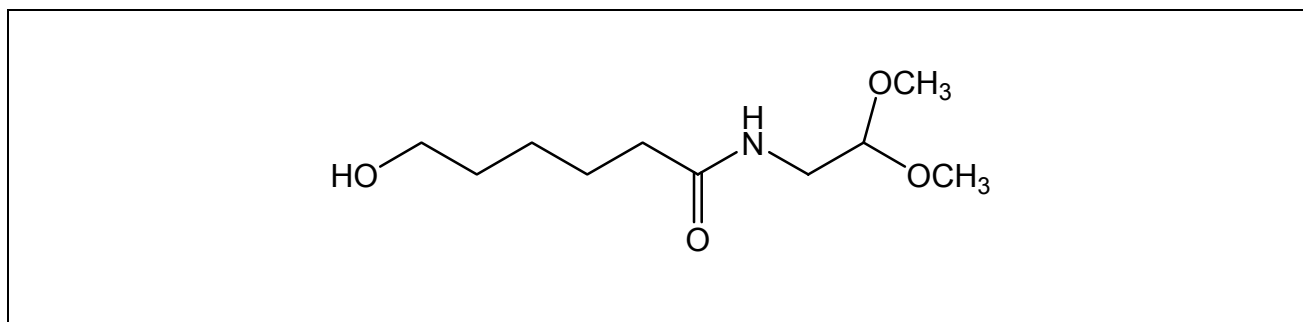
DC: R<sub>f</sub>: 0.35, 0.27 (EtOAc: Hex = 3:2)

<sup>1</sup>H-NMR: (400Hz,CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.00-7.56(m, 5H, arom.H und H6); 7.44-7.23(m, 9H, arom.H); 6.88-6.83(m, 4H, arom.H); 6.11(q, 0.5H, J= 2.4Hz, H1'); 6.00 (dd, 0.5H, J= 2.2Hz, H1'); 5.47-5.14(m, 3H, ArCH, H5 und OCH<sub>2</sub>O ); 4.97(m, 1H, OCH<sub>2</sub>O); 4.68-4.40(m, 2H, H2' und H3'); 4.25-4.10(m, 2H, H4' und OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 3.80(s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>); 3.65-3.39(m, 5H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, H5', OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.78-2.61(m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 1.57(m, 3H, ArCH(CH<sub>3</sub>))  
1.29-1.11(m, 12H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

<sup>31</sup>P-NMR: (162MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm] 151.2, 150.5 Verhältnis 1.3:1

MALDI: m/z 948[M+Na]<sup>+</sup>

### 6-Hydroxyhexansäuredimethoxymethylamid 37



C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>

219.28g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 5.13ml (47.56mmol) Aminoacetaldehyddimethylacetal wurden mit 46.47ml (438mmol) 6-Caprolacton monomer versetzt und 10 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt 6-Hydroxyhexansäuredimethoxymethylamid 37 wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 8.24g (79%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.21(Aceton:Hex=1:1)

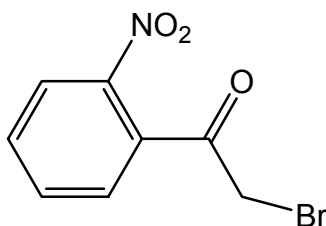
<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
5.59(b, 1H, NH); 4.32(t, 1H, J=5.2Hz, H7); 3.61(t, 2H, J=6.7Hz, H1a,b);  
3.39(m, 8H, H6a,b,2xOCH<sub>3</sub>); 2.17(t, 2H, J=7.3Hz, H5a,b); 1.72-1.54(m,  
4H, H4a,b,H2a,b); 1.45-1.34(m, 2H, H3a,b)

<sup>13</sup>C-NMR: (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
173.4(CO); 102.6(C7); 62.2(C1); 54.3(C2,OCH<sub>3</sub>); 40.8(C6); 36.3(C4);  
32.2(C2); 24.3(C3, C4)

ESI(+): m/z 219.9([M]<sup>+</sup>)

## Methode A

### 2-Brom-1-(2-nitro-phenyl)-ethanon 38



C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>3</sub>

244.04g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 2.22g (13.45mmol) 2'-Nitroacetophenon und Aluminiumchlorid wurden in 20ml Diethylether gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.69ml (13.45mmol) Brom in 20ml Diethylether innerhalb von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Das Reaktionsgemisch

wurde 2 Stunden gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg und Salzwasser neutralisiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Produkt 2-Brom-1-(2-nitrophenyl)-ethanon **38** wurde als gelbes Pulver erhalten.

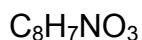
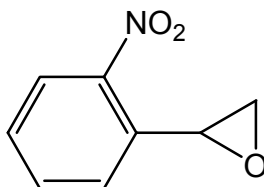
Ausbeute: 3.02g (92%)

DC:  $R_f$ :0,63(Diethylether:Hex = 1:1)

Sp: 55-56°C

$^1\text{H-NMR}$ : (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.17(d, 1H,  $J=9.2\text{Hz}$ , arom.H); 7.75-7.38(m, 3H, arom.H); 4.23(s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ )

### 2-(2-Nitrophenyl)-oxiran **39**



165.15g/mol

3.35g (13.744mmol) 2-Brom-1-(2-nitrophenyl)-ethanon **38** wurden in 10ml Dioxan gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.58g (15.283mmol) Natriumborhydrid in 10ml Wasser innerhalb von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten gerührt, mit 10ml 1.35M Natriumhydroxid versetzt und 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch mit Diethylether mehrfach extrahiert, mit Salzwasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch

Säulenchromatographie. (Diethylether / Hexan 1:5) Das Produkt 2-(2-Nitro-phenyl)-oxiran **39** wurde als gelbes Pulver erhalten.

Ausbeute: 1.69g (78%)

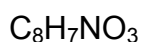
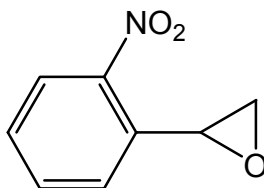
DC:  $R_f$ : 0.37(Diethylether:Hex = 1:1)

Smp. : 64-65°C

$^1\text{H-NMR}$ : (250 MHz ,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.10(d, 1H,  $J=9.1\text{Hz}$ , arom.H); 7.89-7.37(m, 3H, arom.H); 4.43(q, 1H,  $J=2.6\text{Hz}$ , CHc); 3.24(q, 1H,  $J=4.5\text{Hz}$ , CHb); 2.61(q, 1H,  $J=2.6\text{Hz}$ ,  $J=8.2\text{Hz}$ , CHa)

## Methode B

### 2-(2-Nitrophenyl)-oxiran **39**



165.15g/mol

3.02g (20mmol) 2-Nitro-benzaldehyd wurden in 40ml Acetontril gelöst und mit 4.08g (20mmol) Trimethylsulfoniumiodid, 2.24g (40mmol) Kaliumhydroxid und 0.1ml (5mmol) Wasser versetzt und 90 Minuten bei 60°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether mehrfach extrahiert, mit Wasser mehrfach gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die

Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Diethylether/Hexan 1:4) Das Produkt 2-(2-Nitro-phenyl)-oxiran **39** wurde als gelbes Pulver erhalten.

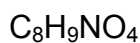
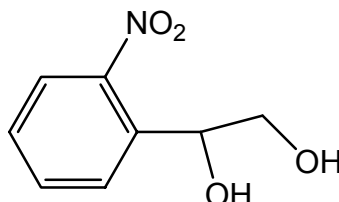
Ausbeute: 2.57g (79%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.39(Diethylether:Hex=1:4)

Smp. : 65°C

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz , CDCl<sub>3</sub>) δ[ppm]  
8.10(d, 1H, J=9.1Hz, arom.H); 7.89-7.37(m, 3H, arom.H); 4.43(q, 1H, J=2.6Hz, CHc); 3.24(q, 1H, J=4.5Hz, CHb); 2.61(q, 1H, J=2.6Hz, J=8.2Hz, CHa)

### 1-(2-Nitrophenyl)-ethan-1,2-diol **40**



183.16g/mol

1.68g (10.17mmol) 2-(2-Nitrophenyl)-oxiran **39** wurde in 5ml Dioxan gelöst, mit 10%iger 16.27ml (1.18mmol) Kaliumcarbonat versetzt und 19 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit Natriumchlorid gequench und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 40ml Wasser zweimal gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Ethylacetat / Hexan 1:2) Das Produkt 1-(2-Nitrophenyl)-ethan-1,2-diol **40** wurde als gelbes Pulver erhalten.



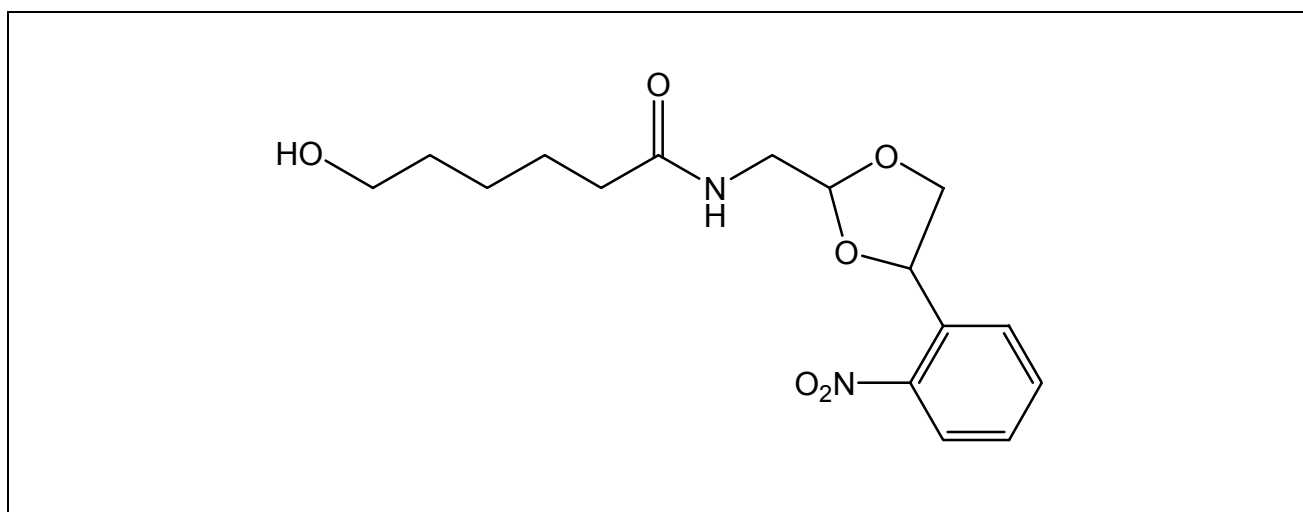
Ausbeute: 1.27g (68%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.58(Diethylether)

Smp. : 95-96°C

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz , Aceton) δ[ppm]  
7.79-7.35(m, 3H, arom.H); 5.17(q, 1H, J=3.7Hz, Ha); 4.56(d, 1H, J=4.0Hz, OH); 3.85(t, 1H, J=5.2Hz, OH); 3.67-3.43(m, 2H, Hb,Hc)

### 6-Hydroxyhexansäure-[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-amid 41



C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

338.36g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas und Lichtausschluss durchgeführt. 1.08g (4.925mmol) 6-Hydroxyhexansäure-dimethoxymethylamid 37 wurden in 100ml abs Benzol gelöst und mit 1.698g (1.9eq, 9.271mmol) 1-(2-Nitrophenyl)-ethan-1,2-diol 40 versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 94mg (0.493mmol) p-Toluolsulfonsäure Monohydrat. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden mit Rückflußkühler und Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg

gequencht, mit Ethylacetat extrahiert, über Magnesium-sulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Ethylacetat) Das Produkt 6-Hydroxyhexansäure[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-amid **41** wurde als gelber Schaum erhalten.

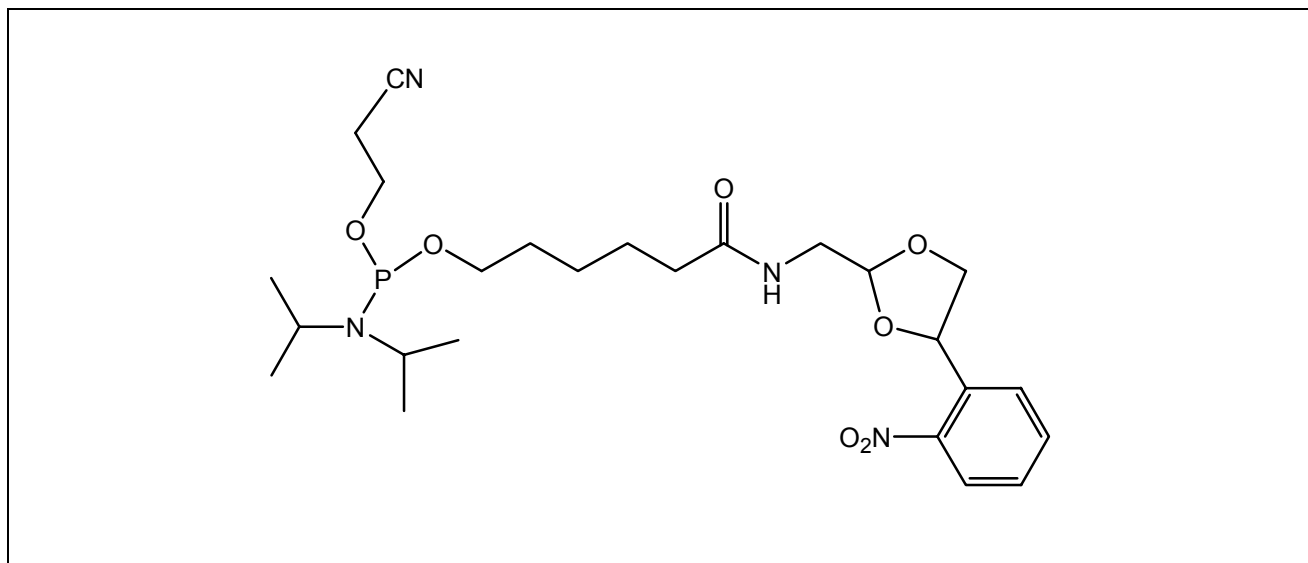
Ausbeute: 0.97g(58%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.33, 0.15(EtOAc)

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz , Aceton) δ[ppm]  
8.01-7.67(m, 4H, arom.H); 5.52(m, 1H, NH); 5.27(t,1H, J=4.1Hz, H8);  
5.00(t,1H, J=4.1Hz, H8); 4.53(t,1H, J=7.6Hz, H7); 4.35(t,1H, J=7.7Hz,  
H7); 3.94-3.35(m, 6H, H1, H6 und H9); 2.14(m, 2H, H5); 1.50-1.25(m, 6H,  
H2, H3 und H4)

ESI(+): m/z: 338.9([M]<sup>+</sup>)

**Diisopropyl-2-ethoxycyano-l-pentoxo-5-{[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-methyl]-  
carbamoyl}-phosphoramidit **42****



C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P

538.57g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schenkkelben unter Schutzgas durchgeführt. 0.406g (1.20mmol) 6-Hydroxyhexansäure[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-amid **41** wurden in 3ml eines 1:1-Gemisches aus abs Dichlormethan und abs Acetonitril gelöst und mit 1.05ml (5eq,6mmol) *N,N*-Ethyl-diisopropylamin versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.32ml (1.44mmol) 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit innerhalb von 15 Minuten bei 0°C. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei 0°C gerührt und 3 Stunden bei Raumtemperatur. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gequenchet, mit Ethylacetat mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Ethylacetat) Das Produkt Diisopropyl-2-ethoxycyano-1-pentoxo-5-[[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-methyl]-carbamoyl]-phosphoramidit **42** wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.56g(87%)

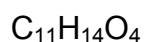
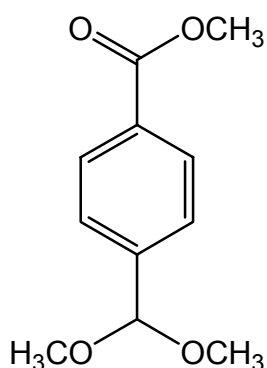
DC: R<sub>f</sub>: 0.85, 0.66(EtOAc); 0.66, 0.24(Diethylether)

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz , Aceton) δ[ppm]  
8.16-7.61(m, 4H, arom.H); 4.10-3.52(m, 10H, H1, H6, H9, 2xCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.84-2.62(m, 3H, H5 und OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.32-2.22(m, 1H, H5); 1.72-1.18(m, 18H, H2, H3, H4 und 4xCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

<sup>31</sup>P-NMR: (162 MHz , Aceton) δ[ppm]  
148.0

ESI(+): m/z 638.4([M+ Triethyl amin]<sup>+</sup>)

#### 4-Dimethoxymethylbenzoesäuremethylester 43



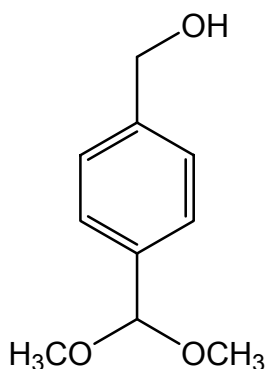
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 1g (6.09mmol) 4-Formylbenzoesäuremethylester wurden in 20ml Methanol gelöst und mit 0.16g (0.61mmol) Iod versetzt und 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan mehrfach extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Aluminiumoxid, Ethylacetat/Hexan 1:9) Das Produkt 4-Dimethoxymethylbenzoesäuremethylester 43 wurde als gelbliche Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 1.09g (90%)

DC:  $R_f$ : 0.33(EtOAc:Hex=1:10)

$^1\text{H-NMR}$ : (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ [ppm]  
8.03(d, 2H,  $J=5.0\text{Hz}$ , arom.H); 7.35(d, 2H,  $J=4.7\text{Hz}$ , arom.H); 5.37(s, 1H,  $\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ ); 3.85(s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 3.24(s, 6H,  $\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ )

### (4-Dimethoxymethylphenyl)-methanol 44



C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

182.22g/mol

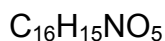
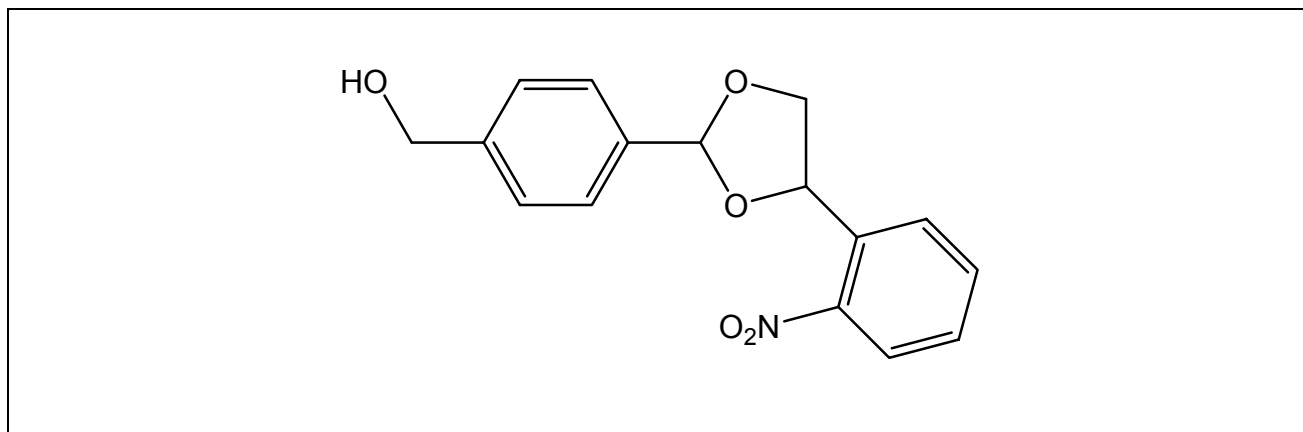
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas durchgeführt. 5.41g (25.74mmol) 4-Dimethoxymethylbenzoesäuremethylester 43 wurden in 103ml tert.-Butanol gelöst, mit 2.43g (64.35mmol) Natriumborhydrid versetzt und mit Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20.6ml Methanol innerhalb von 1 Stunde. Die Reaktionslösung wurde 90 Minuten bei dieser Temperatur gerührt, auf 0°C abgekühlt und mit 250ml Wasser versetzt. Nach beendeter Umsetzung wurde Reaktionslösung mit Diethylether mehrfach extrahiert und mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan / Ethylacetat 10:1) Das Produkt (4-Dimethoxymethylphenyl)-methanol 44 wurde als gelbliche Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 3.06g (65%)

DC: R<sub>f</sub>: 0.24(EtOAc:DCM=1:10)

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
7.31(s, 4H, arom.H); 5.46(s, 1H, CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.52(s, 2H, CH<sub>2</sub>OH);  
3.13(s, 6H, CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**{4-[4-(2-Nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-phenyl}-methanol 45**



301.29g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgas und Lichtausschluss durchgeführt. 0.5g (2.72mmol) (4-Dimethoxymethylphenyl)-methanol 44 und 1g (2eq, 5.44mmol) 1-(2-Nitrophenyl)-ethan-1,2-diol 40 wurde in 35ml abs Benzol gelöst, mit 52mg (0.27mmol) p-Toluolsulfonsäure Monohydrat (0.27mmol) versetzt und 20 Stunden mit Rückflußkühler und Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lsg gequench, mit Ethylacetat extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Ethylacetat/Hexan 1:1) Das Produkt {4-[4-(2-Nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-phenyl}-methanol 45 wurde als gelber Schaum erhalten.

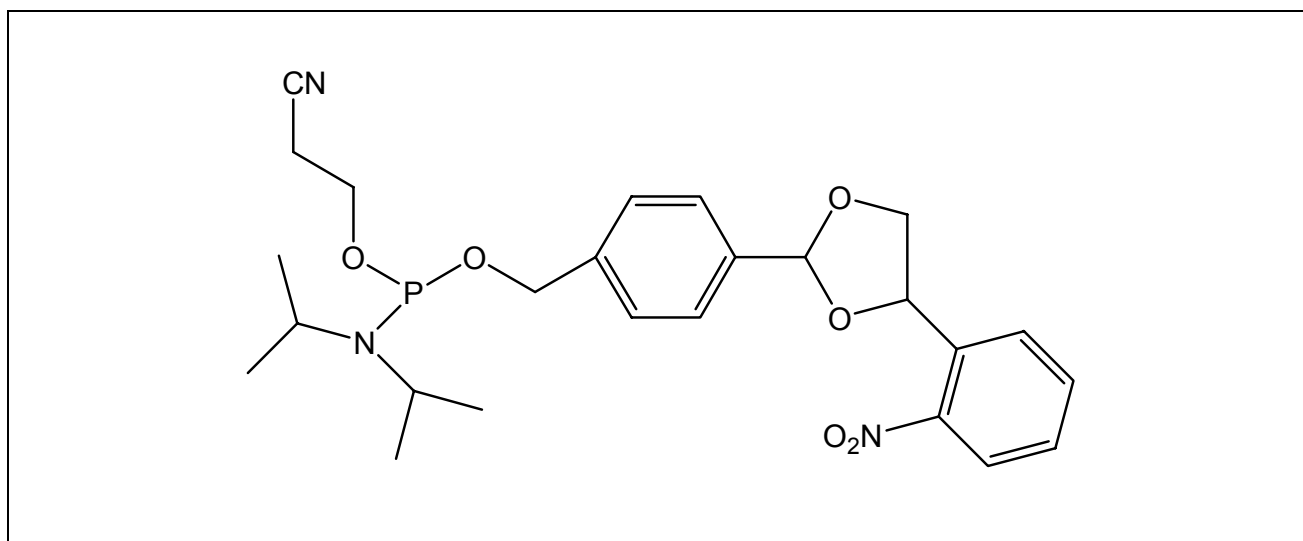
Ausbeute: 0.73g (89%)

DC:  $R_f$ : 0.50(EtOAc:Hex=1:1)

$^1H$ -NMR: (250 MHz, Aceton- $d_6$ )  $\delta$ [ppm]  
8.04 - 7.28(m, 8H, arom.H); 5.69(m, 1H, OCH); 4.67 – 4.45(m, 3H, CH<sub>2</sub>OH und OCHO); 4.16 – 3.71(m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH)

ESI(+): m/z 301.7([M]<sup>+</sup>)

**Diisopropyl-2-ethoxycyano-1-methoxy-5-{[4-(2-nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-methyl]-benzyl}-phosphoramidit 46**



$C_{25}H_{32}N_3O_6P$

501.51g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Schutzgas durchgeführt. 0.5g (1.66mmol) {4-[4-(2-Nitrophenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-phenyl}-methanol 45 und 1.44ml (5eq,8.28mmol) *N,N*-Ethyl-diisopropylamin wurden in 3ml eines 1:1-Gemisches aus abs Dichlormethan und abs Acetonitril gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.44ml (1.99mmol) 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit innerhalb von 15 Minuten bei 0°C. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei 0°C gerührt und 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach beendeter Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit 1ml *n*-Butanol gequench, mit Ethylacetat mehrfach extrahiert, mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lsg gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie. (Dichlormethan /Ethylacetat 10:1) Das Produkt Diisopropyl-phosphoramidous acid 2-cyano-ethyl ester 4-[4-(2-nitro-phenyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-benzyl ester 46 wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0.78g (94%)

DC:  $R_f$ : 0.76, 0.82(EtOAc:DCM=1:10)

<sup>1</sup>H-NMR: (250 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
8.16 - 7.45(m, 8H, arom.H); 5.80(m, 1H, OCH); 4.87 – 4.64(m, 3H, CH<sub>2</sub>OH und OCHO); 4.16 – 3.71(m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) und OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.71(m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 1.28(m, 12H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

<sup>31</sup>P-NMR: (162MHz, Aceton-d<sub>6</sub>) δ[ppm]  
149.90, 149.86 Verhältnis 1.6 : 1

ESI(+): m/z 502.3([M+H]<sup>+</sup>)



## **9.3 Oligonukleotidsynthese**

### **9.3.1 Eingesetzte Pufferlösungen**

#### **9.3.1.1 Eingesetzte Pufferlösungen für die Anionenaustausch-HPLC (RNA-Aufreinigung)**

- Puffer A: DEPC-Wasser mit LiOH auf pH 8,0 eingestellt
- Puffer B: 1 M Lithiumchlorid (LiCl)-Lösung

##### **DEPC-Wasser**

1 ml Diethylpyrocarbonat wird zu 1 L Millipore Wasser (deionisierte-Wasser) gegeben, über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und 40 min bei 120 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung mit ges., wässriger steriler LiOH-Lösung auf pH 8,0 eingestellt.

##### **1 M Lithiumchlorid (LiCl)-Lösung**

1 mol (42,39 g) Lithiumchlorid wird in 1 L DEPC-Wasser (deionisierte-Wasser) gelöst, über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und 40 min bei 120 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung mit ges., wässriger sterier LiOH-Lösung auf pH 8,0 eingestellt.

#### **9.3.1.2 Eingesetzte Pufferlösungen für Reverse-Phase-HPLC (RP-HPLC)(DNA-Aufreinigung)**

- Puffer A: 0.1 M TEAA (Triethylammoniumacetat)-Lösung
- Puffer B: Acetonitril

##### **0.1 M TEAA (Triethylammoniumacetat)-Lösung**

140 ml Triethylamin wird unter Eiskühlung mit 58 ml Essigsäure und 600 ml Millipore Wasser (deionisiertes Wasser) versetzt, mit Millipore Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1L aufgefüllt und mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH 7,0 eingestellt. Für Reverse-Phase-HPLC-Läufe wird die Stammlösung vor Gebrauch zehnfach mit Millipore Wasser verdünnt.

### **9.3.1.3 Eingesetzte Pufferlösungen für die Aufnahme der UV-Schmelzkurven, CD-Spektren und Fluoreszenz-Spektren**

- Phosphatpuffer der Zusammensetzung 140 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in DEPC Wasser (pH 7,0)

#### **Phosphatpuffer (pH 7,0)**

818 mg Natriumchlorid (14,0 mmol, NaCl), 66 mg Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat (0,423 mmol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O) und 207 mg Natriumdihydrogen phosphat Dihydrat (0,577 mmol, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O) werden in 100 ml DEPC-Wasser gelöst. Die Lösung wird mit LiOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt.

### **9.3.2 Synthese der Oligonukleotide**

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligodesoxynukleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode an Modell Expedite 8909 Synthesizer von PerSeptive Biosystem hergestellt. Der CPG-Träger von PerSeptive Biosystems (Porengröße 500 Å) wurde im 1 µmol Maßstab eingesetzt. Die Standardkupplungszeit von 10 min. für DNA- und RNA-Bausteine wurde für alle modifizierten Nukleotide übernommen. Die Standardkupplungszeiten der 10 Minuten für DNA- und RNA-Bausteine wurde für das modifizierte Nukleotid übernommen. Bei der Festphasensynthese von RNA-Oligodesoxynukleotiden wurde die Dimethoxytriphenyl-methylgruppe (DMTr) des finalen Baustein (*DMT-off Modus*) abgespalten und bei der Festphasensynthese von RNA-Oligodesoxynukleotiden die terminale DMTr-Schutzgruppe (*DMT-on Modus*) nicht.

Die Festphasensynthese der RNA-Oligonukleotide wurde wie in Kapitel 5.3 beschrieben durchgeführt und die Festphasensynthese der DNA-Oligonucleotide wurde wie in Kapitel 6.3 beschrieben.

### **9.3.2.1 Festphasensynthese der RNA-Oligonukleotid**

#### **9.3.2.1.1 Festphasensynthese der TBDMS-Schutzgruppe an der 2'-Position geschützten RNA-Oligonukleotid**

Die RNA-Oligonukleotide wurden bei 30°C über Nacht mit einer Lösung von Ammoniak und Ethanol (3:1) entschützt und vom Träger abgespalten. Nach Sterilfiltration über Nalgene 0,2 µm Spritzenfilter wird diese Oligonukleotid-Lösung in der SpeedVac bis zur Trockne eingeengt. Danach wurde 300µl gemischte Lösung (3eq *N*-Methyl-2-pyrrolidon, 1,5eq Triethylamin und 2eq Triethylamin-Trihydrofluorid-Lösung) zu den Oligonukleotiden zugesetzt und 1,5 Stunden bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 1.2ml *n*-Butanol wurde die Lösung 30 Minuten bei -77 °C abgekühlt und 30 Minuten bei 0 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Es folgte die Aufreinigung mittels Anionenaustausch-HPLC.

#### **9.3.2.1.2 Festphasensynthese der CEM-Schutzgruppe an der 2'-Position geschützten RNA-Oligonucleotid**

Die RNA-Oligonukleotide wurden bei 30°C über Nacht mit einer Lösung von Ammoniak und Ethanol (3:1) entschützt und vom Träger abgespalten. Nach Sterilfiltration über Nalgene 0,2 µm Spritzenfilter wurde diese Oligonukleotid-Lösung an SpeedVac bis zur Trockne eingeengt. Danach wurden 2,5ml gemischte Lösung (1M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in THF, 10% *n*-Propylamin und 1% 2-Mercaptoethylether) zu den Oligonukleotiden zugesetzt und 8 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2,5ml sterilem TRIS-Puffer (pH 8,0) wurde diese Oligonukleotid-Lösung in der SpeedVac bis zur Trockne eingeengt. Die sehr salzhaltigen Oligonukleotide wurden mit Sephadex G25-Säulen entsalzt und in der SpeedVac bis zur Trockne eingeengt. Es folgte die Aufreinigung mittels Anionenaustausch-HPLC.

### **9.3.2.2 Festphasensynthese der DNA-Oligonucleotid**

Die DNA-Oligonukleotid wurde bei Raumtemperatur über Nacht mit konz. Ammonia entschützt und vom Träger abgespalten. Die Oligonukleotid-Lösungen wurden in der

SpeedVac bis zur Trockne eingeengt. Das Oligodesoxynukleotid wurde mittels *reverse-phase*-HPLC aufgereinigt.

### 9.3.3 Aufreinigung der Oligonukleotide

#### 9.3.3.1 Aufreinigung von RNA durch Anionenaustausch-HPLC

Die RNA-Oligonukleotide wurden mittels Anionenaustausch-HPLC aufgereinigt. Die HPLC Anlage von JASCO bestand aus PU-980 Pumpe, LG-980-02-Mixer, UV-970 Detektor, Säulenofen und Computer zur Verfügung. Als präparative Säule wurde die Dionex NucleoPac™ PA100 Säule (250 × 9 mm) mit einer Flußrate von 5 ml/min. benutzt. Zur Aufreinigung wurden lineare Gradienten von 0% bis 70% Puffer B in A verwendet (Puffer A: DEPC-Wasser (pH 8,0), Puffer B: 1 M LiCl (pH 8,0). in 40 min.). Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Nach erfolgter Trennung wurde das Oligonukleotid mit Sephadex G25-Säulen entsalzt und in der SpeedVac bis zur Trockne eingeengt.

#### 9.3.3.2 Aufreinigung von DNA durch *reverse-phase*-HPLC

Die DNA-Oligonukleotide wurden mittels *reverse-phase*-HPLC aufgereinigt. Die HPLC Anlage von JASCO bestand aus L-6220 Intelligent Pumpe, D6000 Interface, L-4250 UV-VIS Detektor und Computer. Als präparative Säule wurde RP18 mit einer Flußrate von 4 ml/min. benutzt. Zur Aufreinigung von Acetal-Schutzgruppen wurden die linearen Gradienten von 0% bis 40% Puffer B in A verwendet (Puffer A: **0.1 M TEAA** (pH 7,0), Puffer B: Acetonitril. in 40 min.). Zur Aufreinigung der Nitrobenzol-Schutzgruppe wurden lineare Gradienten von 30% bis 60% Puffer B in A verwendet (Puffer A: **0.1 M TEAA** (pH 7,0), Puffer B: Acetonitril. in 30 min.). Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Nach erfolgter Trennung wurde das Oligonukleotid in der SpeedVac bis zur Trockne eingeengt.

### 9.3.4 Quantifizierungen

Die aufgereinigte DNA wurde in 1 ml Millipore Wasser gelöst. Bei RNA wurde in 1 ml DEPC Wasser gelöst. In 10 mm Quarzküvette wurden 1000 µl Millipore bzw. DEPC

Wasser aufgefüllt und 10 µl des Oligonukleotids in die Quarzküvette gegeben. Die optische Dichte wurde bei 260 nm gemessen. Der Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor (100) multipliziert. Das Ergebnis ist die Ausbeute in OD<sub>260</sub>-Einheiten. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich dieser OD-Wert in Konzentration übersetzen (Gleichung [10.1]).

$$[10.1] \quad \mathbf{OD}_{260} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

ε : molarer Extinktionskoeffizient der Oligonukleotide

c : gesuchte Konzentration (mol/L)

d : Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Die gesuchte Konzentration der Lösung kann auch aus dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden (Gleichung [10.1]).

$$[10-2] \quad c = OD_{260} / \epsilon \cdot d$$

Der molare Extinktionskoeffizient lässt sich aus den bekannten Extinktionskoeffizienten bei den einzelnen Nukleotiden bestimmen. Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten wird die Wechselwirkung der Chromophore mit ihren nächsten Nachbarn berücksichtigt. Der Extinktionskoeffizient kann mit der Gleichung [10.3] berechnet werden. Die einzelnen Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 10.1 angegeben.

$$[10.3] \quad \epsilon (\text{ACGU} \dots) = 2 [\epsilon (\text{AC}) + \epsilon (\text{CG}) + \epsilon (\text{GU}) + \dots] - [\epsilon (\text{C}) + \epsilon (\text{G}) + \epsilon (\text{U}) + \dots]$$

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 10.1 : Extinktionskoeffizienten für monomere und dimere Nukleotide bei 260 nm, 25°C, pH 7,0 und einer Ionenstärke von 0,1.*

### 9.3.4.1 Bestimmung der $T_m$ -Werte

Die UV-Schmelzkurven wurden in einem Zweistrahl UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit Peltier-gesteuertem, thermostatisierbarem Küvettenhalter gemessen. Ein Phosphat-Puffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat wurde als Puffer zur Messung in DEPC Wasser verwendet (pH 7,0).

#### Messung der $T_m$ -Werte

1. Vorbereitungsschritt zur Messung : Eine Küvette der Schichtdicke 1 cm wurde als eine Referenzküvette mit 1 ml des Puffers gefüllt und in den Referenzstrahl gestellt. Eine weitere Küvette der gleichen Schichtdicke wurde als eine Probenküvette mit dem gleichen Puffer befüllt und in den Strahlengang eingebracht. Nach dem Nullabgleich bei 260 nm bei 20 °C wurde eine Konzentration von je 2  $\mu$ M der beiden Stränge in die Probenküvette pipettiert.
2. Die Messung begann mit einer Denaturierung. Dazu wurden die Küvetten für 10 min. auf 80°C bzw. 70°C für unmodifizierte bzw. modifizierte Stränge erhitzt, anschließend zur Renaturierung mit 5°C/min. bis 10°C oder 20°C abgekühlt und bei dieser Temperatur für 10 Minuten gehalten.
3. Die Aufnahme der Schmelzkurve wurde bei 260nm und mit einer Heizrate von 0,5°C/min. durchgeführt. Alle 30 Sekunden wurde ein Datenpunkt registriert.

4. Nach beendeter Messung wurden die Probenküvetten auf 20°C abgekühlt.

Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt. Für alle Messungen unterhalb 20°C wurde die Küvettenkammer mit Stickstoff gespült, um Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenoberflächen zu vermeiden.

### 9.3.5 CD-Spektroskopie der Oligonukleotide

Die CD-Spektren wurden in einem JASCO J-710 Spektropolarimeter mit einem Peltier-gesteuertem, thermostatisierbarem (Neslab RTE-100) Küvettenhalter gemessen. Eine Küvette der Schichtdicke 0,2 cm wurde mit den gleichen Proben, die zuvor in der UV-Spektroskopie eingesetzt worden waren, gefüllt.

Die Spektren wurden jeweils fünfmal bei 20°C im Bereich von 350 nm bis 200 nm akkumuliert. Das Spektropolarimeter-Gerät wurde unter Bedingungen (*resolution* 1 nm, *scan speed* 50 nm/min., *response* 1 sekunde und *band width* 1,0 nm) eingestellt. Von den so aufgenommenen Spektren wurde immer das bei gleicher Temperatur registrierte Spektrum des Puffers subtrahiert. Das Spektrum des Phosphat Puffer wurde mit *baseline correct* substrahiert.

### 9.3.6 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektren wurden an einem Hitachi F-4500 Fluoreszenz-Spektrophotometer gemessen. Eine Küvette wurde mit dem gleichen Puffer, Phosphat Puffer, das in der UV- und CD-Spektroskopie eingesetzt wurde, gefüllt. Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat in DEPC Wasser (pH 7,0) verwendet. Es wurden 2 µM Pyren-gelabelter RNA in diesem Phosphatpuffer in einer Fluoreszenz-Küvette einpipettiert. Das Emission-Spektrum wurde bei einer Einstrahlwellenlänge von 395 nm im Bereich 700-300 nm bei Raumtemperatur fünfmal gemessen. Folgende Parameter wurden eingestellt : slit Ex/Em : 10/10 nm bzw. 5/5 nm, 700V.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty M.; Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, **1944**, 79, 137-158
2. Chargaff, E.; Structure and function of nucleic acids as cell constituents, *Fed. Proc.*, **1951**, 10, 654-659
3. Brown, D. M.; Todd, A. R.; Nucleotides, part X. Some observations on structure and chemical behaviour of nucleic acids, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 52-58
4. Franklin, R. E.; Gosling, R. G.; Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate, *Nature*, **1953**, 171, 740-741
5. Wilkins, M. H. F.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R.; Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acid, *Nature*, **1953**, 172, 738-740
6. Wilkins, M. H. F.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R.; Helical Structure of Crystalline Deoxypentose Nucleic Acid, *Nature*, **1953**, 172, 759-762
7. Watson, J.D.; Crick, F.H.C.; Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **1953**, 171, 737-738
8. Watson, J. D.; Crick, F. H. C.; Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*, **1953**, 171, 964-967
9. Meselson, Matthew; Stahl, Franklin W.; The replication of DNA in a Escherichia coli, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **1958**, 44, 671-682



10. 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
11. Khorana, H. G.; Polynucleotide synthesis and the genetic code, *Fed. Proc.*, **1965**, 24, 1473-1487
12. Nirenberg, Marshall W.; The genetic code, *Nobel Lectures: Physiologie or medicine*, **1973**, Elsevier, New York, 372-395
13. Crick, Francis H. C.; On protein synthesis, *Symp Soc. Exp. Biol.*, **1958**, 12, 138-163
14. Crick, Francis H. C.; Central dogma of molecular biology, *Nature*, **1970**, 227, 561-563
15. Kelly, T. J. jr.; Smith, H. O.; A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*, II. Base Sequence and recognition site. *J Mol. Biol.*, **1970**, 51, 393-409
16. Smith, H. O.; Wilcox, K. W.; A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*, I. Purification and general properties, *J. Mol. Biol.*, **1970**, 51, 379-391
17. Maxam, A. M.; Gilbert, W.; A new method of sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 560-564
18. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 5463-5467
19. Saiki, R. K.; Scharf, S. J.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N.; Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, **1985**, 230, 1350-1354
20. Mullis, K. B.; Eine Nachtfahrt und die PCR. *Spektrum der Wissenschaft*, **1990**, 60-67
21. Newton, C. R.; Graham, A.; PCR. Spektrum Verlag, 2 ed, **1997**

22. International Human Genome Sequencing Consortium; Initial sequencing and analysis of the human genome., *Natur*, **2001**, 409, 860-922
23. Marshall, E.; Rival genome sequencers celebrate a milestone together, *Science*, **2000**, 288, 2294-2295
24. Bradley, A.; Mining the mouse genome. *Natur*, **2002**, 420, 512-514
25. Adams, M. D. et al.; The genome sequence of *Drosophila melanogaster*., *Science*, **2000**, 287, 2185-2195
26. Jan Koolman, Klaus-Heinrich Röhme; *Taschenatlas der Biochemie*; **2003**; 80-81
27. Blackburn, G.M.; Gait, M.J.; Nucleic acids in chemistry and biology, 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, **1996**
28. Albert L. Lehninger; übers. und bearb. Dieter Neubert; Ferdinand Hucho; Grundkurs Biochemie, de Gruyter, New York Berlin, **1984**, Kapital 7,124
29. M. Leontis; J. Tam; Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA* **2001**, 7, 499-512.
30. E. Westhof; B. Fritsch; RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure*, **2000**, 8, 55-65.
31. Holbrook, S. R. " RNA structure and function" *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Hrsg.: Simons, R. W.; Grunberg-Manago, M.; Cold Spring Harbor, NY **1998**, 147-174
32. Puglisi, E. V.; Puglisi, J. D. "RNA structure and function" *CSHL Press*, Hrsg.: Simons, R. W.; Grunberg-Manago, M.; Cold Spring Harbor, NY **1998**, 117-146
33. Jacob, F.; Monod, J.; Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 318-356

34. Ochoa, S.; Synthetic polynucleotides and the genetic code. *Fde. Proc.* **1963**, 22, 62-74
35. Khorana, H. G.; Total synthesis of a gene, *Science*, **1979**, 203, 614-625
36. Narang, S. A.; Brousseau, R.; Hsiung, H. M.; Michniewicz, J. J.; Chemical synthesis of deoxynucleotides by the modified triester method, *Methods Enzymol.*, **1980**, 65, 610-628
37. Garegg, P. J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R.; Nucleoside-H-phosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4055-4058
38. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H.; Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 1859-1862
39. Sinha, N. D.; Biernat, J.; Köster, H.; Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholinomono-chloro phosphoramidites, new phosphorylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides, *Tetrahedron. Lett.*, **1983**, 24, 5843-5846
40. McBride, L. J.; Caruthers, M. H.; An investigation of several deoxynucleoside phosphor-amidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 245-248
41. Gait, M. J.; (Hrsg.) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford **1984**
42. Caruthers, M. D.; Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses, *Science*, **1985**, 230, 281-285
43. Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Dodds, D. L.; Fisher, E. F.; McBride, L. J.; Matteucci, M.; Stabinski, Z.; Tang, J.-Y.; Chemical synthesis of deoxynucleotides by the phosphoramidite method, *Methods Enzymol.*, **1987**, 154, 287-313

44. Eckstein, F. (Hrsg.); *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1991**
45. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P.; Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 2223-2311
46. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P.; The synthesis of modified oligonucleotides by phosphoramidite approach and their applications, *Tetrahedron*, **1993**, 49, 6123-6194
47. Letsinger, R. L.; Finnan, J. L.; Heaver, G. A.; Lunsford, W. B.; Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 3278-3279
48. Letsinger, R. L.; Lunsford, W. B.; Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3655-3661
49. Merrifield, R. B.; Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154
50. Dahl, B. H.; Nielsen, J.; Dahl, O.; Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents, *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 1729-1743
51. D. Malakhov; E. V. Malakhova ; S. V. Kuznitsova ; I. V. Grechishnikova; I. A. Prokhorenko; M. V. Dkotonohszyi; V. A. Korshun; Yu. A. Berlin; Synthesis and Fluorescent Properties of 5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine-containing Oligodeoxynucleotides. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2000**, 26, 34-44.
52. Christian Wojczewski; Karen Stolze; Joachim W. Engels; Fluorescent Oligonucleotides-Versatile Tools as Probes and Primers for DNA and RNA Analysis. *Synlett*, **1999**, 1667-1678.
53. Françoise M. Winnik; Photophysics of Preassociated Pyrenes in Aqueous Polymer Solutions and in Other Organized Media. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 587-614.

54. Philip C. Bevilacqua; Ryszard Kierzek; Kenneth A. Johnson; Douglas H. Turner; Dynamics of Robozyme Binding of Substrate Revealed by Fluorescence-Detected Stopped-Flow Methods., *Science*, **1992**, 258, 1355-1358.

55. Ryszard Kierzek; Yi Li; Douglas H. Turner; Philip C. Bevilacqua; 5'-Amino Pyrene Provides a Sensitive, Nonperturbing Fluorescent Probe of RNA Secondary and Tertiary Structure Formation., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 4985-4992.

56. Regine Preuß; Johannes Dappridh; Nils G. Walter; Probing RNA-Protein Interactions Using Pyrene-labeled Oligodeoxynucleotides: Q  $\beta$  Recognizing Pyrimidine Residues., *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 600-613.

57. Kazushige Yamana; Tuneo Mitsui; Haruhisa Hayashi; Hidehiko Nakano; An uridine derivative containing a hydrophobic fluorescent probe at the 2'-position: Synthesis and its incorporation into oligonucleotides., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 5815-5818.

58. Kazushige Yamana; Rie Aota; Hidehiko Nakano; Oligonucleotides having covalently linked anthracene at specific sugar residue: Differential binding to DNA and RNA and fluorescence properties., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 8427-8430.

59. William H. Connors; Sukunath Narayanan; Olga P. Kryatova; Clemens Richert; Synthesis of Oligonucleotides with a 2'-Cap at the 3'-Terminus via Reversed Phosphoramidites., *Org. Lett.*, **2003**, 5, 247-250.

60. Kazushige Yamana; Tsuneo Mitsui; Hidehiko Nakano; Synthesis and properties of oligonucleotide duplexes containing donor and acceptor fluorophores at 2'-positions., *Tetrahedron*, **1999**, 55, 9143-9150.

61. Dubey, I.; Pratiavel, G.; Meunier, B.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 3088-3095.

62. Kazushige Yamana; Hirofumi Zako; Kentarou Asazuma; Reiko Iwase; Hidehiko Nakano; Akira Murakami; Fluorescence Detection of Specific RNA Sequences Using 2'-Pyrene-Modified Oligoribonucleotides., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 1104-1106.

63. Kazushige Yamana; Reiko Iwase; Hiroto Tsuchida; Hirofumi Zako; Tetsuji Yamaoka; Akira Murakami; 2'-Pyrene midifide oligonucleotide provides a highly sensitive fluorescent probe of RNA., *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 2387-2392.

64. Atsushi Mahara; Reiko Iwase; Takashi Sakamoto; Kazushige Yamana; Tetsuji Yamamoto; Akira Murakami; Bispyrene-Conjugated 2'-O-Methyloligonucleotide as a Highly Specific RNA-Recognition Probe., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3648-3650.

65. P. C. Bevilacqua; R. Kierzek; K. A. Johnson; . H. Turner; Dynamics of Ribozyme Binding of Substrate Revealed by Fluorescence-Detected Stopped-Flow Methods., *Science*, **1992**, 258, 1355-1358.

66. Mirsunobu Nakamura; Yukinori Ohtodhi; Kazushige Yamana; Helical pyrene-array along the outside of duplex RNA., *Chem. Commun.*, **2005**, 5163-5165.

67. Scott K. Silverman; Thomas R. Cech; RNA Tertiary Folding Monitored by Fluorescence of Covalently Attached Pyrene., *Biochemistry*, **1999**, 38, 14224-14237.

68. Mary K. Smalley; Scott K. Silverman; Fluorescence of covalently attached pyrene as a general RNA folding probe., *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 152-166.

69. Natalia N. Dioubankova; Andrei D. Malakhov; Dmitry A. Stetsenko; Michael J. Gait; Pavel E. Volynsky; Roman G. Efremov; ; Vladimir A. Korshun; Pyrenemethyl *ara*-Uridine-2'-carbamate: A Strong Interstrand Excimer in the Major Groove of a DNA Duplex., *ChemBiochem*, **2003**, 4, 841-847.

70. Natalia N. Dioubankova; Andrei D. Malakhov; Zakhar O. Shenkarev; Vladimir A. Korshun; Oligonucleotides containing new fluorescent 1-phenylethynylpyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene uridine-2'-carbamates: synthesis and properties., *Tetrahedron*, **2004**, 60, 4617-4626.

71. Jonathan L. Sessler; Ruizheng Wang; Design, Synthesis, and Self-Assembly of Artificial Dinucleotide Duplexes., *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 4079-4091.

72. Lars H. Thresen; Guan-Sheng Jiao; Wade C. Haaland; Michael L. Metzker; Kevin Burgess; Rigid, Conjugated, Fluoresceinated Thymidine Triphosphates: Syntheses and Polymerase Mediated Incorporation into DNA Analogues., *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 4603-4610.

73. Dennis J. Hurley; Susan E. Seaman; Jan C. Mazura; Yitzhak Tor; Fluorescent 1,10-Phenanthroline-Containing Oligonucleotides Distinguish between Perfect and Mismatched Base Pairing., *Org. Lett.*, **2002**, 4, 2305-2308.

74. Mikhail V. Skorobogaty; Andrei D. Malakhov; Anna A. Pchelintseva; Alexander A. Turban; Stanislav L. Bondarev; Vladimir A. Korshun; Fluorescent 5-Alkynyl-2'-Deoxyuridines: High Emission Efficiency of a Conjugated Perylene Nucleoside on a DNA Duplex., *ChemBiochem*, **2006**, 7, 810-816.

75. Thomas L. Netzel; Min Zhao; Kambiz Nafisi; Jeb Headrick; Matthew S. Sigman; Bruce E. Eaton; Photophysics of 2'-Deoxyuridine (dU) Nucleosides Covalently Substituted with Either 1-Pyrenyl or 1-Pyrenoyl: Observation of Pyrene-to-Nucleoside Charge-Transfer Emission in 5-(1-Pyrenyl)-dU., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9119-9128.

76. Nicole Amann; Evgeni Pandurski; Torsten Fiebig; Hans-Achim Wagenknecht; Ein Modellnucleosid für die Elektroneninjektion in die DNA: 5-Pyrenyl-2'-desoxyribose., *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 3084-3087.

77. Elbe Mayer; Linda Valis; Robert Huber; Nicole Amann; Hans-Achim Wagenknecht; Preparation of Pyrene-Modified Purine and Pyrimidine Nucleosides via Suzuki-Miyaura Cross-Couplings and Characterization of their Fluorescent Properties., *Synthesis*, **2003**, 2335-2340.

78. Manuela Rist; Nicole Amann; Hans-Achim Wagenknecht; Preparation of 1-Ethynylpyrene-Modified DNA via Sonigashira-Type Solid-Phase Couplings and Characterization of the Fluorescence Properties for Electron-Transfer Studies., *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 2498-2504.

79. V. A. Korshun; E. V. Manasova; K. V. Balakin; I. A. Prokhorenko; A. G. Buchatskii; Yu. A. Berlin; 5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-Deoxyuridine, a Novel Fluorescent Nucleoside Analogue. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **1996**, 22, 807-809.

80. D. Malakhov; E. V. Malakhova; S. V. Kuznitsova; I. V. Grechishnikova; I. A. Prokhorenko; M. V. Dkotonohszi; V. A. Korshun; Yu. A. Berlin; Synthesis and Fluorescent Properties of 5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine-containing Oligodeoxynucleotides. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2000**, 26, 34-44.

81. V. A. Korshun; I. A. Prokhorenko; S. V. Gontarev; M. V. Skorobogaty; K. V. Balakin; E. V. Manasova; A. D. Malskhov; Yu. A. Berlin; New Pyrene Derivatives for Fluorescent Labeling of Oligonucleotides. *Nucleosides & Nucleotides*, **1997**, 16(7-9), 1461-1464.

82. Elbe Mayer; Linda Valis; Clemens Wagner; Manuela Rist; Nicole Amann; Hans-Achim Wagenknecht; 1-Ethynylpyrene as a Tunable and Versatile Molecular Beacon for DNA., *ChemBiochem*, **2003**, 4, 841-847.

83. Gil Tae Hwang; Young Jun Seo; Su Jeong Kim; Byeang Hyeon Kim; Fluorescent oligonucleotide incorporation of 5-(1-ethynylpyrenyl)-2'-deoxyuridine: sequence-specific fluorescence changes upon duplex formation., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 3543-3546.

84. Gil Tae Hwang; Young Jun Seo; Byeang Hyeon Kim; Pyrene-labeled deoxyuridine and deoxyadenosine: fluorescent discriminating phenomena in their oligonucleotides., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 1475-1477.

85. Reginald H. Mitchell; Yee-Hing Lai; Richard V. Williams; N-Bromosuccinimide-Dimethylformamide: A Mild, Selective Nuclear Monobromination Reagent for Reactive Aromatic Compounds. *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 4733-4735.

86. M. Carmen Carreno; Jose L. Garcia Ruano; Gema Sanz; Miguel A. Toledo; Antonio Urbano; N-Bromosuccinimide in Acetonitrile: A Mild and Regiospecific Nuclear Brominating Reagent for Methoxybenzenes and Naphthalenes, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 5328-5331



87. Reginald H Mitchell; Xin Jin; The synthesis of a cyclophane containing two bridged annulene units, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 4357- 4360
88. Reginald H. Mitchell; Yongsheng Chen; Ji Zhang; N-Bromosuccinimide-Chloroform, A more convenient Method to Nuclear Brominate Reactive Aromatic Hydrocarbons. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1997**, 29, 715-720.
89. Punita V. Vyas; Anjani K. Bhatt; Gadde Ramachandraiah; Ashutosh V. Bedekar; Environmentally benign chlorination and bromination of aromatic amines, hydrocarbons and naphthols. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 4085-4088.
90. Nivrutti B. Barhate; Anil S. Gajare; Radhika D. Wakharkar; Ashutosh V. Bedekar; Simple and Efficient Chlorination and Bromination of Aromatic Compounds With Aqueous TBHP (or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and a Hydrohalic Acid. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 6349-6350.
91. Nivrutti B. Barhate; Anil S. Gajare; Radhika D. Wakharkar; Ashutosh V. Bedekar; Simple and Practical Halogenation of Arenes, Alkenes and Alkynes with Hydrohalic Acid/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( or TBHP ). *Tetrahedron*, **1999**, 55, 11127-11142.
92. Hitomi Suzuki; Akiko Kondo; Masahiko Inouye; Takuji Ogawa; An Alternative Synthetic Method for Polycyclic Aromatic Iodides. *Synthesis*, **1986**, 121-122.
93. S. H. Yang; C. S. Li; C. H. Cheng; Halide exchange reactions between aryl halides and alkali halides catalyzed by nickel metal, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 5328-5331
94. Muriel Hissler; Anthony Harriman; Abderrahim Khatyr; Raymond Ziessel; Intramolecular Triplet Energy Transfer in Pyrene-Metal Polypyridine Dyads: A Strategy for Extending the Triplet Lifetime of the Metal Complex. *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 3366-3381.
95. Martha A. De la Rosa; Esperanza Velarde; Angel Guzman; Cross-Coupling Reactions of Monosubstituted Acetylenes and Aryl Halides Catalyzed by Palladium on Charcoal. *Synth. Commun.*, **1990**, 20, 2059-2064.

96. S. Takahashi; Y. Kuroyama; K. Sonigashira; N. Hagihara; A Convenient Synthesis of Ethynylarenes and Diethynylarenes. *Synthesis*, **1980**, 627-630.
97. Carlos E. Godinez; Gerardo Zepeda; Miguel A. Garcia-Garibay; Molecular Compasses and Gyroscopes. II. Synthesis and Characterization of Molecular Rotors with Axially Substituted Bis[2-(9-triptycyl)ethynyl]arenes. *J. Amer. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 4701-4707.
98. Kelli Schmieder; Marcia Levitus; Hung Dang; Miguel A. Garcia-Garibay; Photophysical Properties of Coplanar and Twisted 1,4-Bis(9-ethynylantracenyl)benzene. Rotational Equilibration in the Excited States of Diarylalkynes. *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 1551-1556.
99. Geoffrey T. Crisp; Yu-Lin Jiang; A Convenient Route to Condensed-Ring Aromatic Acetylenes. *Synth. Commun.*, **1998**, 28, 2571-2576.
100. Stephanie Leroy; Tirapattur Soujanya; Frederic Fages; Zinc(II)-operated intramolecular charge transfer fluorescence emission in pyrene-2,2'-bipyridine conjugated molecular rods. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 1665-1667.
101. G. Mal'kina; L. Brandsma; S. F. Vasilevsky; B. A. Trofimov; An Improved Procedure for the Preparation of Aryl- and Hetarylacetylenes. *Synthesis*, **1986**, 121-122.
102. Stephen J. Havens; Paul M. Hergenrother; Synthesis of Arylacetylenes by the Sodium Hydride Catalyzed Cleavage of 4-Aryl-2-methyl-3-butyn-2-ols. *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1763-1765.
103. Edward T. Sabourin; Anotoli Onopchenko; A Convenient Synthesis of 4-Ethynylphthalic Anhydride via 2-Methyl-3-butyn-2-ol. *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 5135-5137.
104. Anastasios P. Meliasaris; Morton H. Litt; Economical and Convenient Synthesis of *p*-Ethynylbenzoic Acid and *p*-Ethynylbenzole Chloride. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 6998-6999.

105. Abhijit Sarkar; Shuji Okada; Hachiro Nakanishi; A Convenient Synthesis of Aromatic-Ring-Substituted Diacetylenes. *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 138-141.
106. Robert G. Breiner; William C. Rose; Joseph A. Dunn; Joan E. MacDiarmid; Thomas J. Bardos; Synthesis of Nucleoside Phosphoraziridines as Potential Site-Directed Antineoplastic Agents. *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2596-2602.
107. Miroslav Bobek; I. Kawai; R. A. Sharma; S. Grill; G. Dutschman; Y-C. Cheng; Acetylenic Nucleosides. 4. 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-5-ethynylcytosine. Improved Synthesis and Evaluation of Biochemical and Antiviral Properties. *J. Med. Chem.*, **1987**, 30, 2154-2157.
108. Neilson, T.; Werstiuk, E.S.; Oligoribonucleotide synthesis. II. Preparation of 2'-O-tetrahydropyranyl derivatives of adenosine and cytidine necessary for insertion in stepwise synthesis. *Can. J. Chem.*, **1971**, 49, 493-499.
109. Reinhard; Regioselective Acetylations of Sialic Acid  $\alpha$ -Ketosides, *Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, 193-203
110. Jianxing Zjang; Hui-Min Chang; Robert R. Kane; Reductive Monoalkylation of Amines via Amidine Intermediates. *Synlett*, **2001**, No.5, 643-645.
111. Stephen G. Kerr; Thomas I. Kalman; N<sup>4</sup>-(Dialkylamino)methylene Derivatives of 2'-Deoxycytidine and Arabinocytidine: Physicochemical Studies for Potential Prodrug Applications. *J. Pharm.Sci.*, **1994**, 83, 582-586.
112. Stephane Vincent; Charles Mioskowski; Luc Lebeau; Hydrolysis and Hydrogenolysis of Formamidines as Protective Groups for Primary Amines. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 991-997.
113. Frank Seela; Karin Mersmann; Jane A. Grasby; Michael J. Gait; 12. 7-Deazaadenosine : Oligoribonucleotide Building Block Synthesis and Autocatalytic Hydrolysis of Base-Modified Hammerhead Ribozymes. *Helv. Chim. Acta*, **1993**, 76, 1809-1819.

114. Ulrike von Krosigk; Steven A. Benner; Expanding the Genetic Alphabet: Pyrazine Nucleosides That Support a Donor-Donor-Acceptor Hydrogen-Bonding Pattern, *Helv. Chim. Acta.*, **2004**, 1299-1324
115. Elisabeth Moyroud; Ewa Biala; Peter Strazewski; Synthesis and Enzymatic Digestion of an RNA Nonamer in Both Enantiomeric Forms. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 1475-1484.
116. Akimitsu Okamoto; Keiichiro Kanatani; Yuji Ochi; Yoshio Saito; Isao Saito; A novel fluorescent guanine derivative distinguishable of three structures, single strand, duplex, and quadruplex, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 6059-6062
117. Tadaaki Ohgi; Yutaka Masutomi; Kouichi Ishiyama; Hidetoshi Kitagawa; Yoshinobu Shiba; Junichi Yano; A New RNA Synthetic Method with a 2'-O-(2-Cyanothoxymethyl) Protecting Group. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 3477-3480.
118. Ogilvie, K.K.; Sadana, K.L.; Thompson, E.A.; The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 2861-63
119. Ogilvie, K.K.; Beaucage, S.L.; Schifman, A.L.; Theriault, N.Y.; Sadana, K.L.; The synthesis of oligoribonucleotides. II. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry, *Can. J. Chem.*, **1978**, 56, 2768-2780
120. Stefan Pitsch; An Efficient Synthesis of Enantiomeric Ribonucleic Acids from D-Glucose. *Helv. Chim. Acta*, **1997**, 80, 2286-2314.
121. Alfred Stutz; Stefan Pitsch; Automated RNA-Synthesis with Photocleavable Sugar and Nucleobase Protecting Groups. *Synlett*, **1999**, 930-934.
122. Duncan Graham; John A. Parkinson; Tom Brown; DNA duplexes stabilized by modified monomer residues: synthesis and stability. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 1131-1138.

123. Morris J. Robins; Philip J. Barr ; 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.
124. Natalia N. Dioubankova; andrei D. Malakhov; Zakhar O. Shenkarev; Vladimir A. Korshun; Oligonucleotides containing new fluorescent 1-phenylethynylpyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene uridine-2'-carbamates: synthesis and properties. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 4617-4626.
125. N. D. Sinha; J. Biernat; H. Köster;  $\beta$ -Cyanoethyl N,N- Dialkylamino/N-Morpholinomono-chloro Phosphoramidites, New Phosphitylating ease of Deprotection and Work-Up of Synthesized Oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 5843-5846.
126. Gasparutto, D.; Livache, T.; Bazin, H.; Dupla, A. M.; Guy, A.; Khorlin, A.; Molko, D.; Roget, A.; Teoule, R.; Chemical synthesis of a biologically active natural t-RNA with its minor bases, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 5152-5166
127. Westman, E.; Strömberg, R.; Removal of *t*-butyldimethylsilyl protection in RNA-synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA·3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF), *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 2430-2431
128. Yamashita M.; Fenn J. B.; Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88, 4451
129. Stults, J. T.; Marsters, J. C.; Improved electrospray ionization of oligodeoxynucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, 5, 359-363
130. Karas, M.; Hillenkamp, F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-2301
131. Tanaka, K.; Waki, H.; Iod, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **1988**, 2, 151-153

132. 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
133. Colin B. Reese; The chemical synthesis of oligo- and poly-nucleotides : a personal commentary., *Tetrahedron*, **2002**, 58, 8893-8920.
134. Serge L. Beaucage; Radhakrishnan P. Iyer; Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach., *Tetrahedron*, **1992**, 48, 2223-2311.
135. S. S. Jones; B. Rayner; C. B. Reese; A. Ubasawa; M. Ubasawa; Synthesis of the 3'-terminal decaribonucleoside nonphosphate of yeast alanine transfer ribonucleic acid., *Tetrahedron*, **1980**, 36, 3075-3085.
136. C. B. Reese; R. Saffhill; J. E. Sulston; 4-Methoxytetrahydropyran-4-yl : A Symmetrical Alternative To The Tetrahydropyranyl Protecting Group., *Tetrahedron*, **1970**, 26, 1023-1030.
137. M. Vaman Rao; Colin B. Reese; Volker Scheimann; Pak Sang Yu; Use of the 1-(2-Fluorophenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl(Fpmp) Protecting Group in the Solid-Phase Synthesis of Oligo- and Poly-ribonucleotides., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 43-55.
138. Daniel C. Caapaldi; Colin B. Reese; Use of the 1-(2-fluorophenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl (Fpmp) and related protecting groups in oligoribonucleotide synthesis : stability of internucleotide linkages to aqueous acid., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 2209-2216.
139. Takashi Kamimura; Masahiko Tsuchiya; Kenichi Urakami; Koji Koura; Mitsuo Sekine; Kazuko Shinozaki; Kinichiro Miura; Tsujiaki Hata; Synthesis of a dodecaribonucleotide, GUAUCAAUAAUG, by use of "fully" protected ribonucleotide building blocks., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 4552-4557.

140. B. E. Griffin; M. Jarman; C. B. Reese; The Synthesis of Oligoribonucleotides-IV : Preparation of Dinucleoside Phosphates from 2',5'-Protected Ribonucleoside Derivatives., *Tetrahedron*, **1968**, 24, 639-662.
141. Hiroshi Takaku; Masatoshi Yoshida; Tadaaki Nomoto; A Convenient Synthesis of the 3'-Terminal Nonaoligoribonucleotide of Rous Sarcoma Virus 35S RNA via the Modified Phosphotriester Approach., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 1399-1403.
142. Eiko Ohtsuka; Akio Yamane; Takefumi Doi; Morio Ikehara; Chemical synthesis of the 5'-half molecule of *E.coli* tRNA<sup>GLY</sup>. *Tetrahedron*, **1984**, 40, 47-57.
143. Ogilvie, K. K.; Beaucage, S. L.; Schifman, A. L.; Theriault, N. Y.; Sadana, K. L.; The synthesis of oligoribonucleotides. II. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry., *Can. J. Chem.*, **1978**, 56, 2768-2780
144. Ogilvie, K. K.; Sadana, K. L.; Thompson, E. A.; The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides., *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 2861-63
145. Gholaam H. Hakimelahi; Zbigniew A. Proba; Kelvin K. Ogilvie; New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleosides., *Can. J. Chem.*, **1982**, 60, 1106-1113.
146. N. Usman; K.K. Ogilvie; M. -Y. Jiang; R. J. Cedergren; Automated Chemical Synthesis of Long Oligoribonucleotides Using 2'-O-Silylated Ribonucleoside 3'-O-Phosphoramidites on a Controlled-Pore Glass Support : Synthesis of a 43-Nucleotide Sequence Similar to the 3'-Half Molecule of an *Escherichia coli* Formylmethionine., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 7845-7854.
147. Kelvin K. Ogilvie; Gholaam H. Hakimelahi; Zbigniew A. Proba; Danny P. C. McGee; Silylated Derivatives of Arabinonucleosides., *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 1997-2000.
148. Stefan Pitsch; Patrick A. Weiss; Xiaolin Wu; Damian Ackermann; Thomas Honegger; Fast and Reliable Automated Synthesis of RNA and Partially 2'-O-Protected Precursors

(Caged RNA) base on Two Novel, Orthogonal 2'-O-Protecting Group., *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 1753-1761.

149. Stefan Pitsch; Patrick A. Weiss; Luzi Jenny; Alfred Stutz; Xiaolin Wu; Reliable Chemical Synthesis of Oligoribonucleotides (RNA) with 2'-O-[(Triisopropylsilyloxy)methyl(2'-O-tom)-Protected Phosphoramidites., *Helv. Chim. Acta*, **2001**, 84, 3773-3795.

150. E. Ohtsuka; K. Fujiyama; M. Ikehara; Studies on transfer ribonucleic acids and related compounds. XL. Synthesis of an eicosaribonucleotide corresponding to residues 35-54 of tRNA<sup>fMet</sup> from *E. coli*., *Nucleic Acids Res.*, **1981**, 9, 3503-3522.

151. Hiroshi Takaku; Kazuo Kamaike; Hiromichi Tsuchiya; Oligonucleotide synthesis. Part 21. Synthesis of ribooligonucleotides using the 4-methoxybenzyl group as a new protecting group for the 2'-hydroxyl group., *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 51-56. 6

152. Beverly E. Griffin; C. B. Reese; Oligoribonucleotide synthesis via 2',5'-protected ribonucleoside derivatives, *Tetrahedron Lett.*, **1964**, 5, 2925-2931

153. Colin B. Reese; Halina T. Serafinowska; Giovanni Zappia; An acetal group suitable for the protection of 2'-hydroxy functions in rapid oligoribonucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 2291-2294

154. R. W. Bunkley; T. W. Flechtner; in Synthetic Organic Photochemistry, ed. W. M. Horspool, *Plenum*, New York, **1984**, Ch. 7, 375-423.

155. E. Ohtsuka; S. Tanaka; M. Ikehara; Studies on transfer ribonucleic acids and related compounds. IX<sup>(1)</sup> Ribooligonucleotide synthesis using a Photosensitive *o*-nitrobenzyl protection at the 2'-hydroxyl group., *Nucleic Acids Res.*, **1974**, 1, 1351-1357.

156. David G. Bartholomew; Arthur D. Broom; One-step Chemical Synthesis of Ribonucleosides bearing a Photolabile Ether Protecting Group., *Chem. Commun.*, **1975**, 38.



157. J. A. Hayes; M. J. Brunden; P. T. Gilham; G. R. Gough; High-yield Synthesis of Oligonucleotides using *o*-Nitrobenzyl Protection of 2'-Hydroxyls., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 2407-2410.
158. M. E. Schwartz; R. R. Breaker; G. T. Asteriadis; J. S. deBear; G. R. Gough; Rapid Synthesis of Oligoribonucleotides Using 2'-O-(*o*-Nitrobenzyloxymethyl)-Protected Monomers., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, 2, 1019-1024.
159. Alfred Stutz; Claudia Höbartner; Stefan Pitsch; Novel Fluoride-Labile Nucleobase-Protecting Groups for the Synthesis of 3'(2')-O-Aminoacylated RNA Sequences., *Helv. Chim. Acta*, **2000**, 83, 2477-2503.
160. Ian R. Dunkin; Jerzy Gebicki; Mariusz Kiszka; David Sanin-Leira; Photoautomerism of *o*-nitrobenzyl compounds : *o*-quinonoid *aci*-nitro species studied by matrix isolation and DFT calculation., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2001**, 1414-1425.
161. John E. T. Corrie; Dynamic Studies in Biology., ed. M. Goeldner; R. Givens; *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, New York, **2005**, Ch. 1, 6-7.
162. Enzo Santaniello; Federico Ponti, Ada Manzocchi; Reduction of Carbonyl Compounds by Sodium Borohydride Adsorbed on Alumina. *Synthesis*, **1978**, 00, 891-892.
163. Tamotsu Fujisawa; Kikuo Sugimoto; Hiromichi Ohta; Iron Chloride-Sodium Hydride System as New Reducing Reagents of Carbonyl Compounds. *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 1667-1668.
164. Tore Benneche; Per Strande; Kjell Undheim; A New Synthesis of Chloromethyl Benzyl Ethers. *Synthesis*, **1983**, 00, 762-763.
165. Robert A. Holton; Robert G. Davis; Protection of Phenols as Methylthiomethyl Ethers. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 00, 533-534.
166. E. J. Corey; Mark G. Bock; Protection of Primary Hydroxyl Groups as Methylthiomethyl Ethers. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 00, 3269-3270.

167. Serge David; Jacques Eustache; Cycloaddition as a Possible Path to Disaccharide Synthesis: Stereochemical Course of the Reaction of Butyl Glyoxylate with a Chiral, Protected Dienyl Ether of Glucose. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, **1974**, 00, 2274-2278.
168. Kenji Suzuki; Hunji Inanaga; Masaru Yamaguchi; A Mild and Convenient Method for the Preparation of Methylthiomethyl Ether: Protection of Hydroxyl Groups. *Chem. Lett.*, **1979**, 00, 1277-1278.
169. P. M. Pojer; S. J. Angyal; Methylthiomethyl Ethers : General Synthesis and Mild Cleavage. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 00, 3067-3068.
170. Peter M. Pojer; Stephen J. Angyal; Methylthiomethyl Ethers : Their Use in the Protection and Methylation of Hydroxyl Groups. *Aust. J. Chem.*, **1978**, 31, 1031-1040.
171. Roger F. Butterworth; Stephen Hanessian; Selected Methods of Oxidation in Carbohydrate Chemistry. *Synthesis*, **1971**, 00, 70-88.
172. Tore Benneche; Per Strande; Kjell Undheim; A New Synthesis of Chloromethyl Benzyl Ethers. *Synthesis*, **1983**, 762-763.
173. M. E. Schwartz; R. R. Breaker; G. T. Asterladis; J. S. deBear; G. R. Gough; Rapid Synthesis of Oligoribonucleotides using 2'-O-(o-Nitrobenzyloxymethyl)-Protected Monomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, 2, 1019-1024.
174. Edward N. Timofeev; Svetlana V. Kochetkova; Andrei D. Mirzabekov; Vladimir L. Florentiev; Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 3142-3148.
175. G. T. Hermanson; Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego, **1996**.
176. Stefan Raddatz; Jochen Mueller-Ibeler; Joachim Kluge; Ludger Wäß; Gerhard Burdinski; John R. Havens; Tom J. Onofrey; Daguang Wang; Markus Schweitzer; Hydrazide oligonucleotides : new chemical modification for chip array attachment and conjugation. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 4793-4802.

177. Marc Lemaitre; Bernard Bayard; Bernard Lebleu; Specific antiviral of a Poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 648-652.

178. Emmanuelle Trevison; Annabelle Renard; Eric Defrancq; Jean Lhomme; The Oxyamino-Aldehyde Coupling Reaction : An Efficient Method for the Derivatization of Oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 8687-8690.

179. Mikhail A. Podyminogin; Eugeny A. Lukhtanov; Michael W. Reed; Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide proves to semicarbazide-coated glass. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29, 5090-5098.

180. Akimitsu Okamoto; Kazuki Tainaka; Isao Saito; A facile incorporation of the aldehyde function into DNA : 3-formylindole nucleoside as an aldehyde-containing universal nucleoside. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 4581-4583.

181. Lennart Kenne; Per Unger; Thomas Wehler; Synthesis and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Some *N*-Acylated Methyl 4-Amino-4,6-dideoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosides. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans I*, **1988**, 1183-1186.

182. Jian Zhang; Pavol Kovac; N-(2,2-Dimethoxyethyl)-, and N-(4,4-Diethoxybutyl)-6-hydroxy Hexanamides as New Linking Agents for Carbohydrates and Proteins. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 1091-1094.

183. Jian Zhang; Alfred Yergey; Jeffrey Kowalak; Pavol Kovac; Linking Carbohydrates to Proteins using N-(4,4-Diethoxyethyl)-6-hydroxy Hexanamide. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 11783-11792.

184. Scheritzer Markus; Reactive Monomers for the Oligonucleotide and Polynucleotide Synthesis. Modified Oligonucleotides and Polynucleotides, and a Method for Producing the Same. PCT, WO01/70751 A1

185. Manas K. Basu; Susanta Samajdar; Frederick F. Becker; Bimal K. Banik; A New Molecular Iodine-Catalyzed Acetalization of Carbonyl Compounds. *Synlett.*, **2002**, 00, 319-321.
186. Jacques Hébert; Denis Gravel; *o*-Nitrophenylethylene Glycol: a Photosensitive Protecting Group for Aldehydes and Ketones, *Can. J. Chem.*, **1974**, 52, 187-189
187. Wendell Wierenga; Allen W. Harrison; Bruce R. Evans; Connie G. Chidester; Antibacterial Benzisoxazolones. An Unusual Rearrangement Product from *o*-Nitrostyrene Oxide en Route to the Photoable Carbonayl Protecting Group (*o*-Nitrophenyl)ethylene Glycol. *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 438-442.
188. Heinrich Gevekoht; Darstellung der drei Nitroacetophenone. *Liebigs Ann. Chem.*, **1883**, 221, 323
189. Williaam Lloyd Evans; Benjamin T. Brooks; On the Oxidation of meta-Nitrobenzoyl Carbinol. *J. Am. Chem. Soc.*, **1908**, 33, 406.
190. D. Gravel; J. Hebert; D. Thotsbsl; *o*-Nitrophenylethylene glycol as photoremovable protective group for aldehydes and ketones: syntheses, scope, and limitations. *Can. J. Chem.*, **1983**, 61, 400-410.
191. Cyrus O. Guss; The Reactions of *m*- and *o*-Nitrostyrene Oxide with Phenol. *J. Org. Chem.*, **1952**, 17, 678-684.
192. Richard Fuchs; Calvin A. VanderWerf; Direction of Ring Opening the Reduction of *p*-Substituted Styrene Oxides with Lithium Borohydride. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 1631-1634.
193. E. J. Cory; Michael Chayovsky; Methylsulfinyl Carvanion (CH<sub>3</sub>-SO-CH<sub>2</sub><sup>-</sup>). Formation and Applications to Organic Synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 1345-1353.

194. Andreas Merz; Gottfried Märkl; Phase-transfer-catalyzed Production of Sulfur Ylides in an Aqueous System. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1973**, 12, 845-846.
195. E. Borredon; M. Delmas; A. Gaset; Biomass as a Source of Monomers: II-Synthesis of 2-Furyloxirane. *Biomass*, **1983**, 3, 67-74.
196. H. Bouda; M.E. Borredon; M. Delmas; A. Gaset; Aldehydes and Ketones Epoxidation with Trimethylsulfonium Bromide in a slightly Hydrated Solid-Liquid Medium. *Synth. Comm.*, **1987**, 17(5), 503-513.
197. Elisabeth Borredon; Michel Delmas; Antoine Gaset; Epoxydation D'Aldehydes et de cetones par un Procédé de Transfert Solide - Liquide. *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 5283-5286.
198. E. Borredon; F. Clavellinas; M. Delmas; A. Gaset; V. Sinisterra; Epoxide Synthesis in Interfacial Solid - Liquid Conditions. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 501-504.
199. Zhengming Guo; Robert D. Sindelar; A New Preparation of Esters from Carbonyl Compounds following Lithium Aluminum Hydride Reduction. *Synth. Comm.*, **1998**, 28(6), 1031-1039.
200. Dieter Seebach; Roger E. Marti; Tobias Hintermann; Polymer- and Dendrimer-Bound Ti-TADDOLates in Catalytic (and Stoichiometric) Enantioselective: Are pentacoordinate cationic Ti complexes the catalytically active species?. *Helv. Chim. Acta.*, **1996**, 79, 1710-1740.
201. Kenso Soai; Hidekazu Oyamada; Atsuhiko Ookawa; Sodium Borohydride-t-Butyl Alcohol-Methanol as an efficient system for the selective Reduction of Esters. *Synth. Comm.*, **1982**, 12(6), 463-467.
202. L. M. Yagupolskii; M. A. Butlerovskii; R. V. Belinskaya; V. I. Ivanova; *m*- and *p*-Aminophenylethyleneglycols. *Chem. Abstr.*, **1961**, 55, 441.
203. Toshikazu Takata; Toshiro Ariga; Takeshi Endo; Cationic Ring-Opening

Polymerizations of Five-Membered Spiro Orthocarbinates: Unsubstituted and 2,8-Diaryl-1,4,6,9-tetraoxaspiro[4.4]nonanes. *Macromolecules*, **1992**, 25, 3829-3833.

204. Koji Arimitsu; Kunihiro Ichimura; Phototriggered Acid Proliferation to Enhance Photosensitivity of Chemically Amplified Photoresists. *Macromol. Chem. Phys.*, **2001**, 202, 453-460.

# 11 Anhang

## 11.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Adenosin
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ATP	Adenosintriphosphat
BPEA	bis(phenylethynyl)anthracen
br	breit
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Cytidin
°C	Grad Celsius
c	gesuchte Konzentration (mol/L)
ca.	circa
C <sub>BPy</sub>	1-(4-Ethynyl-phenylethynyl)-pyren-cytidin
CD	Circular Dichroismus
CEM	2-Cyanoethoxymethyl
CEM-Cl	2-Cyanoethyl chlormethyl ether
cm	Zentimeter
CPG	controlled pore glass (engl.)
C <sub>py</sub>	1-Ethynylpyren
Ctmp	1-(2-chloro-4-methylphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl
CTP	Cytidin triphosphat
δ	Chemische Verschiebung
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
d	Dublett

DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIPEA	Diisopropylethylamin
dest.	Destilliert
$\Delta G^0$	Freie Standardreaktionsenthalpie
$\Delta H^0$	Standardreaktionsenthalpie
d.h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimethylsulfoxid sechsfach deuteriert
DMTr	Dimethoxytriphenylmethyl, Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$\Delta S^0$	Reaktionsentropie
dt	Dublett von Triplett
E	Extinktion (engl.: absorbance)
engl.	englisch
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient der Oligonukleotide
eq.	Äquivalente
ESI(-)	Elektrospray-Ionisation im negativen Modus
ESI(+)	Elektrospray-Ionisation im positiven Modus
Et	Ethyl
et al.	et alii (und andere)
FC	Flash-Chromatographie
fl.	flüssig
Fpmp	1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl
FT	Fourier Transformation
g	Gramm
ges.	gesättigt(e)



GTP	Guanosintriphosphat
HMPT	Hexamethyl-phosphorsäuretriamid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
Hz	Hertz
<i>i</i> Pr	Isopropyl
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie
K	Kelvin
kcal	Kilokalorien
konz.	konzentriert
$\lambda$	Wellenlänge
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung
M	molar
m	Multipllett
MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl.: matrix assisted laser desorption/ionization)
max.	maximal
Me	Methyl
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
Mthp	4-Methoxytetrahydropyran-2-yl
N	normal
nbm	[(2-Nitrobenzyl)oxy]methyl
NBS	N-Bromsuccinimid
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
(R)-npeom	[(R)-1-(o-Nitrobenzyl)ethoxy]methyl
Nr.	Nummer
o	ortho
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte bei 260 nm, Extinktion bei 260 nm
ODN	Oligodesoxynukleotid
p	para
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PEPy	1-phenylethynylpyren
ppm	parts per million
q	Quartett
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (engl.: reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s	Sekunde(n)

S <sub>0</sub>	Grundstand
S <sub>1</sub>	Singulettzustand
S <sub>2</sub>	Singulettzustand
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
S <sub>N</sub>	Nukleophile Substitution
Std.	Stunde
sym.	symmetrisch
T	Thymin, Thymidin
T	Temperatur
T <sub>1</sub>	Triplett-Zustand
t	Triplett
TBDMS	<i>tert.</i> Butyldimethylsilyl
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
techn.	technisch
tert.	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
Thp	Tetrahydropyran-2-yl
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (engl.: melting temperature)
TMS	Trimethylsilyl
TOF	Flugzeit (engl.: time of flight)
TOM	Triisopropylsilyloxymethyl
tRNA	transfer Ribonucleinsäure
U	Uracil, Uridin
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbar (engl.: visible)
z.B.	zum Beispiel

## 11.2 Curriculum Vitae

Name	<b>Taewoo Kwon</b>
Geburtsdatum / -ort	28. November 1966 in Kyungnam ( Süd-Korea)
Staatsangehörigkeit	Süd-Koreanisch
Familienstand	verheiratet. 2 Kinder
<b>Studium</b>	
12/2001-12/2005	<b>Doktorarbeit</b> J.W.Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, AK Prof. Engels Thema : Synthese und Charakterisierung Pyren-gelabelter Oligonukleotide
03/1995-02 1997	<b>Diplomarbeit</b> A-Jou Universität, institut für Organische Chemie, AK Prof. Kay Thema : Synthesis of 4,7-Dibromo-12,15- Bis(malono-nitrile)[2.2]Paracyclophane
03/1986-02/1995	Studium der Chemie(Bachelor) A-Jou Universität
<b>Schule</b>	
03/1982-02/1985	Kwangsung-High School
03/1979-02/1982	Sungmoon-Middle School
03/1973-02/1979	Seokyo-Grundschule
<b>Ausbildung und Berufstätigkeit</b>	
12/2001-12/2005	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie (OCCB) der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

### 11.3 Publikationen

Taewoo Kwon, Nelly Piton, Christian Grünewald and Joachim W. Engels, Synthesis of Pyrene labelled RNA for Fluorecence Measurements, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids*, **2007**, in Druck

Christian Grünewald, Taewoo Kwon, Nelly Piton, Ute Förster, Josef Wachtveitl and Joachim W. Engels, RNA as scaffold for pyrene excimer, *Bioorg.Med.Chem.*, **2007**, in Druck

### 11.4 Poster

Martina M.Adams,Jan W.Bats,Taewoo Kwon and Joachim W.Engels, Microwave-Assisted Synthesis and Biological Activity of Fluoroquinolone-nucleosides, TRIoH, 21-23, 2005, Frankfurt am Main, Deutschland

Christian Grünewald, Nelly Piton, Taewoo Kwon,and Joachim W. Engels, Synthesis of 2-(1-ethynylpyrenyl)-adenosine modified RNA, Roundtable of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, September. 2006, Bern, Schweiz