



**Optimierung der Synthese eines neuen photolabil geschützten
Nitroxid-Spin-Labels für RNA und DNA**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Alexander Kaiser

aus Langen

Frankfurt am Main, 2023

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

Datum der Disputation:

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
abs.	absolutiert
ACE	ACetoxyEthyl orthoester
AK	Arbeitskreis
Äq.	Äquivalent
Art.-Nr.	Artikelnummer
B ₂ pin ₂	Bis(pinakolato)diboran
ber.	berechnet
C	Cytosin
cHex	Cyclohexan
CPG	<i>controlled porous glass</i>
Cu(OTf) ₂	Kupfer(II)-trifluormethansulfonat
cw.	<i>continuous wave</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEER	<i>double electron-electron resonance</i>
DIM	Diiodmethan
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMT	Dimethoxytritylether
DNA	<i>deoxyribunucleic acid</i>
DNP	Dinitrophenol
ds	<i>double-stranded</i>
EE	Ethylacetat
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
Et ₂ O	Diethylether
FA	Ameisensäure, engl. <i>formic acid</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
G	Guanin
ges.	gesättigt
H ₂	Wasserstoff
HBr	Bromwasserstoff
HCl	Salzsäure
HF	Fluorwasserstoff
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
Hz	Hertz
KOAc	Kaliumacetat
konz.	konzentriert
mCPBA	<i>meta-chloroperoxybenzoic acid</i>
MeLi	Methyl lithium
MeMgBr	Methylmagnesiumbromid
MeOH	Methanol

Mg	Magnesium
MMt	Monomethoxytrityl
mRNA	messenger-RNA
NBOM	2-Nitrobenzyloxymethyl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NC-SDSL	<i>non covalent</i> -SDSL
NEt ₃	Triethylamin, Triethylamin
NEt ₃ ·3HF	Triethylamintrihydrofluorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
·OAc	Acetat
Pac	Phenoxyacetyl
PacCl	Phenoxyacetylchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PELDOR	<i>pulsed electron-electron double resonance</i>
PhMgBr	Phenylmagnesiumbromid
ppm	<i>parts per million</i>
R _f	Retentionsfaktor
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
Rück.	Rückfluss
SDSL	Site-directed spin labeling
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smp.	Schmelzpunkt
snRNA	<i>Small nuclear RNA</i>
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
TMT	Trimethoxytrityl
TPA	2,2,5,5-Tetramethyl-pyrrolin-1-oxyl-3-acetylen
tRNA	<i>transfer RNA</i>
txDNA	<i>triplex DNA</i>
U	Uracil
zers.	zersetzt

Kurzfassung

Elektronenspinresonanz (ESR) -Spektroskopie wird immer mehr zur Analyse von Strukturen und Dynamiken von Nukleinsäuren verwendet, um Informationen über ihre Funktionen zu erhalten. Hierzu müssen jedoch vor der EPR (engl. *electron paramagnetic resonance*) -Messung paramagnetische Zentren in die Nukleinsäure integriert werden. In dieser Doktorarbeit wurde die Synthese eines neuen, starren Spin-Labels **1** für die Anwendung in DNA und RNA als paramagnetisches Zentrum erarbeitet. Da ein freies Radikal während der Festphasensynthese zu Komplikationen führen könnte, wurde die Synthese so geplant, dass das Nitroxid mit einer photolabil abspaltbaren Gruppe geschützt ist, basierend auf früheren Arbeiten des Arbeitskreises. Zusätzlich wurde ein Dummymolekül **2** synthetisiert, welches nur den starren Charakter in Form eines Benzolrings besitzt, ohne EPR-aktive Fähigkeiten. Beide Nukleotide wurden per Festphasensynthese in die Mitte eines 14mers integriert und der Spin-Label erfolgreich durch Photoinduktion entschützt. Hierbei konnte jedoch nur eine Abspalteffizienz von 70 % ermittelt werden, weshalb eine Isolierung des Radikals per HPLC für weitere PELDOR-Messungen notwendig gewesen wäre. Die Stränge mit dem geschützten Spin-Label **1** und Dummymolekül **2** wurden mit ihren Gegensträngen assembliert und die Schmelzpunkte der Duplexe gemessen. Im Vergleich zu den unmodifizierten Strängen zeigten die Duplexe Destabilisierungen von 8–9 °C. Eine solch hohe Abweichung vom nativen Schmelzpunkt schränkt die Anwendungen des neu entwickelten, starren Spin-Label als EPR-Sonde in der Mitte von DNA- und RNA-Sequenzen ein.

Abstract

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is increasingly used to analyze the structure and dynamics of nucleic acids to obtain information about their functions. For this purpose, however, paramagnetic centers must be integrated into the nucleic acid before the ESR (ger. *Elektronenspinresonanz*) measurement. In this doctoral thesis the synthesis of a new, rigid spin label **1** for use in DNA and RNA as paramagnetic center was developed. Since a free radical could lead to complications during the solid phase synthesis, the synthesis was designed in such a way that the nitroxide is protected with a photolabile cleavable group, as happened in previous work of the group. In addition, a dummy molecule **2** was synthesized, which only has the rigid character in the form of a benzene ring, without EPR-active abilities. Both nucleotides were integrated into the middle of a 14mer by solid phase synthesis and the spin label was successfully deprotected by photoinduction. However, only a cleavage efficiency of 70 % could be determined, which is why the isolation of the radical by HPLC would have been necessary for further PELDOR measurements. The strands of the protected spin label **1** and the dummy molecule **2** were assembled with their anti-strands and the melting points of the duplexes were measured. Compared to the unmodified strands, the duplexes showed destabilization of 8–9 °C. Such a high deviation from the native melting point limits the applications of the newly developed, rigid spin label as an EPR probe in the middle of DNA and RNA sequences.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Theorie	3
2.1.	Nukleinsäuren	3
2.2.	RNA	6
2.3.	Strukturaufklärung von Nukleinsäuren	7
2.4.	Electron paramagnetic resonance (EPR) Spektroskopie	8
2.5.	Site-directed spin labeling (SDSL) für Nukleinsäuren	10
2.6.	Festphasensynthese von Nukleinsäuren	11
2.7.	Festphasensynthese von Spin-markierten Nukleinsäuren	14
2.8.	Schutzgruppen-Strategien für Nitroxid-Radikale	19
2.9.	Starrer und flexibler Spin-Label	22
3.	Aufgabenstellung	24
4.	Ergebnisse und Diskussion	28
4.1.	Syntheseroute des Iod-Nitril-Nukleosids 36	28
4.2.	Syntheseroute des Borolan-Amin-Isoindolin 37	37
4.3.	Syntheseroute des Nukleotids 1	52
4.4.	Schmelzpunktmessung der DNA/RNA-Duplexe	55
4.5.	EPR-Messung des Nukleotids 1	62
5.	Zusammenfassung und Ausblick	63
6.	Experimenteller Teil	65
6.1.	Allgemeine synthetische Arbeitsmethoden	65
6.2.	Synthesen bis 36	68
6.3.	Synthesen bis 37	76
6.4.	Synthesen bis 1	87

6.5.	Synthesen bis 2	92
6.6.	Synthese, Isolierung, Quantifizierung und Analyse von DNA- und RNA-Duplexen	96
6.7.	Schmelzpunktmessung für DNA- und RNA-Duplexe	99
7.	Literaturverzeichnis	103
8.	Anhang.....	121
	Eidesstattliche Erklärung	121
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

Nukleinsäuren sind seit geraumer Zeit Mittelpunkt der modernen Biologie. Während DNA im Zellkern den Träger des Erbguts darstellt, spielt RNA eine große Rolle in vielen biologischen Prozessen, wie der Regulierung der Genexpression.^[1] Bei diesen Prozessen nimmt die RNA verschiedene dreidimensionale Strukturen ein, welche während des Vorgangs hochdynamische und strukturverändernde Umlagerungen durchlaufen.^[2,3] Verständnis über diese Umlagerungen in Erfahrung zu bringen ist daher von allergrößter Bedeutung. Es existieren verschiedene experimentelle Methoden für die Ermittlung dieser dynamischen Strukturen, wie die Röntgenkristallographie, NMR-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*), FRET (engl. *Förster resonance energy transfer*) oder auch EPR (engl. *electron paramagnetic resonance*). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der *cw* (engl. *continuous wave*) EPR-Messung.^[4,5] Die Weiterentwicklung dieser Methode durch gepulste dipolare Spektroskopie, wie PELDOR (engl. *pulsed electron-electron double resonance*), auch DEER (engl. *double electron-electron resonance*) genannt, kann Distanzen von 15–160 Å messen.^[4,6] Zudem lassen sich Informationen zu der Orientierung der paramagnetischen Zentren ermitteln und Dynamiken im Piko- bis Mikrosekundenbereich beobachten.^[7] Da Nukleinsäuren, wie auch andere Biomoleküle, keine paramagnetischen Zentren besitzen, müssen sie durch gezielte Markierungen in das Molekül eingeführt werden.^[8,9] Manche Nukleinsäuren besitzen Bindestellen für Metallionen, wie Mn^{2+} , welches zur Studie von Haarnadelstrukturen (engl. *hairpin loop*) verwendet wurde.^[10] Jedoch werden simplere Spin-Label, wie Nitroxide, eher verwendet, da sie leicht zugänglich sind, durch bekannte organische Synthesechemie einfach modifiziert werden können und unter biologisch relevanten Bedingungen, mit Ausnahme der Reduktion durch milde Reduktionsmittel, wie Thiolen, stabil sind.^[7,11] EPR-Messungen sind von den Freiheitsgraden der Spin-Label und Moleküle abhängig, da zu hohe Freiheitsgrade zu Messungenauigkeiten führen.^[12,13] Um dies zu verhindern werden PELDOR-Proben eingefroren und bei Tieftemperaturen von ≤ 80 K gemessen.^[14] Bei wässrigen Lösungen muss hierbei Glycerin hinzugegeben werden. Beides führt zu Unsicherheiten zwischen den gemessenen, gefrorenen Daten und dem natürlichen Zustand des Biomoleküls.^[15] Daher ist es ein Ziel der EPR-Forschung Messungen bei Temperaturen > 80 K, am besten bei Raumtemperatur, durchführen zu können. Dies soll

1. Einleitung

durch die Verwendung starrer Spin-Label erreicht werden, welche sich nicht unabhängig vom Biopolymer bewegen, an welchem sie angebracht sind.^[13,16]

Angelehnt an die Arbeit von Barhate *et al.*^[13] und ihrem **Ç** Molekül (**Abbildung 1**) ist das Ziel dieser Doktorarbeit einen starren Spin-Label **A** (A-Spin) zu entwickeln. Dieser soll in einen RNA-Duplex eingebaut werden, mit der Absicht PELDOR-Spektroskopie-Messungen bei physiologischen Bedingungen durchzuführen. Zur Vereinfachung der Synthese, und zum Verhindern der Abstoßung durch die 2'-OH Gruppe mit dem Spin-Label, wurde ein DNA-Nukleotid anstelle eines RNA-Nukleotids als Grundgerüst verwendet. Kankia *et al.* haben bewiesen, dass ein DNA/RNA-Hybrid, wie ein reiner RNA-Duplex, die „A“-Konformation ausbildet,^[17] daher ist es möglich die Nukleotide auszutauschen, ohne eine Konformationsänderung zu befürchten.

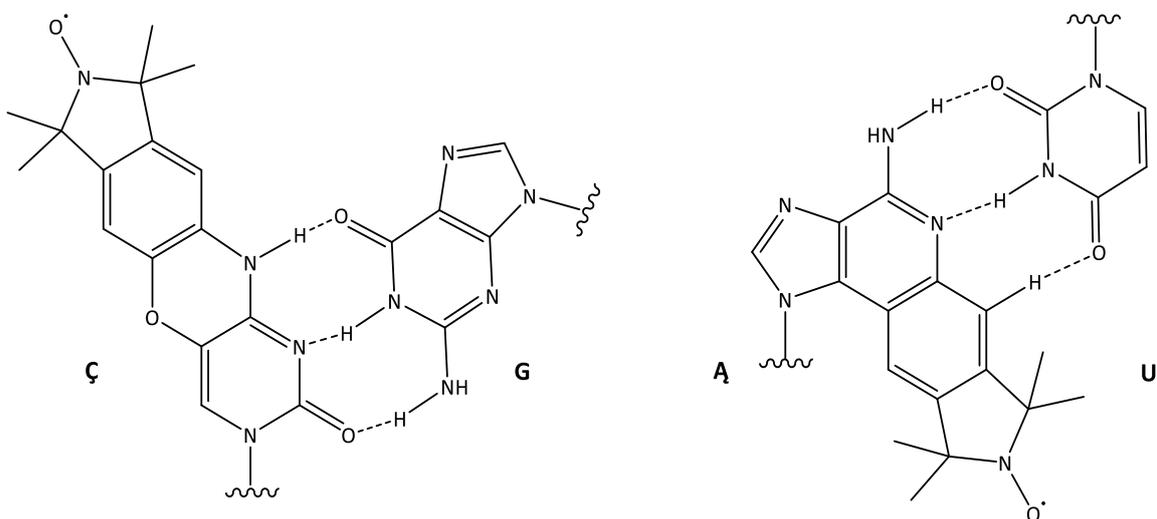


Abbildung 1: Das von Barhate *et al.* entwickelte Basenpaar C-Spin Ç zur Messung von PELDOR-Experimenten und der Zielspinlabel dieser Doktorarbeit als Basenpaar mit Uridin.^[13]

2. Theorie

2.1. Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind essenziell für lebende Organismen, da sie, neben vielen anderen Aufgaben, die genetische Information speichern, transportieren und von einer Generation auf die Nächste übertragen.^[4,18,19]

Friedrich Miescher isolierte 1869 eine phosphorreiche, schwefelarme, unbekannte Substanz aus dem Zellkern (engl. *cell nuclei*) von Leukozyten, welche er „nuclein“ nannte.^[20–22] Albrecht Kossel, späterer Gewinner des Nobelpreises für Medizin, entdeckte 1896, dass Mieschers „nuclein“ aus vier Basen und Zucker zusammengesetzt ist.^[22,23] Entgegen der damals herrschenden Meinung, dass die komplexen Proteine Träger der Erbinformation sind, postulierten Oswald T. Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty, dass sie hingegen die DNA für den Träger halten.^[21] Erwin Chargaff *et al.* untersuchten 1948 die Zusammensetzung der DNA verschiedener Spezies. Während die Menge der Basen variierte, blieb das Verhältnis zwischen Guanin und Cytosin bzw. Adenin und Thymin jedoch stets konstant.^[21,24] 1952 präsentierte Rosalind Franklin das erste hochaufgelöste kristallographische DNA-Faser-Foto.^[25] Ein Jahr später, und fast ein Jahrhundert nach der Entdeckung des „nuclein“, entschlüsselten James Watson und Francis Crick 1953 die wahre Struktur der DNA-Doppelhelix.^[21,22,26]

Die Helix besteht aus Nukleosiden, welche in der Regel über den 5'-Terminus des Ersten und 3'-Terminus des folgenden Nukleosids über Phosphorsäurediester verknüpft sind.^[18] Das Nukleosid selbst ist eine D-Furanoseeinheit, welche über eine β -glykosidische Bindung kovalent mit einem aromatischen Heterozyklus, der Nukleobase, verknüpft ist. **Abbildung 2** zeigt die grundlegenden Bausteine und den prinzipiellen Aufbau der am wichtigsten natürlich vorkommenden Nukleinsäuren Ribonukleinsäure (RNA, engl. *ribonucleic acid*) und 2'-Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*), welche sich über den 2'-Rest der D-Furanose unterscheiden. Die Purin-Basen Adenin und Guanin, als auch das Pyrimidin Cytosin kommen sowohl in DNA als auch in RNA vor. Thymin wird im Falle der RNA durch Uracil ersetzt. Watson und Crick hielten fest, dass die Basenpaarung immer zwischen einer Purinbase und einer Pyrimidinbase über Wasserstoffbrücken erfolgt (**Abbildung 3**).^[26] Sie ermittelten, basierend auf Chargaffs Befund,^[21] dass Adenin mit Thymin zwei

2. Theorie

Wasserstoffbrücken und Guanin mit Cytosin drei Wasserstoffbrücken ausbildet.^[19,26] Hierbei bildet sich für eine ideale Interaktion eine rechtsgängige Helix aus, bei der die beiden Stränge antiparallel verlaufen. Die Stabilität der Helix wird durch die π - π -Wechselwirkung zwischen den aromatischen Systemen der im Duplex liegenden Nucleobasen weiter gesteigert, während das nach außen gerichtete Phosphatrückgrat die Wasserlöslichkeit erhöht.

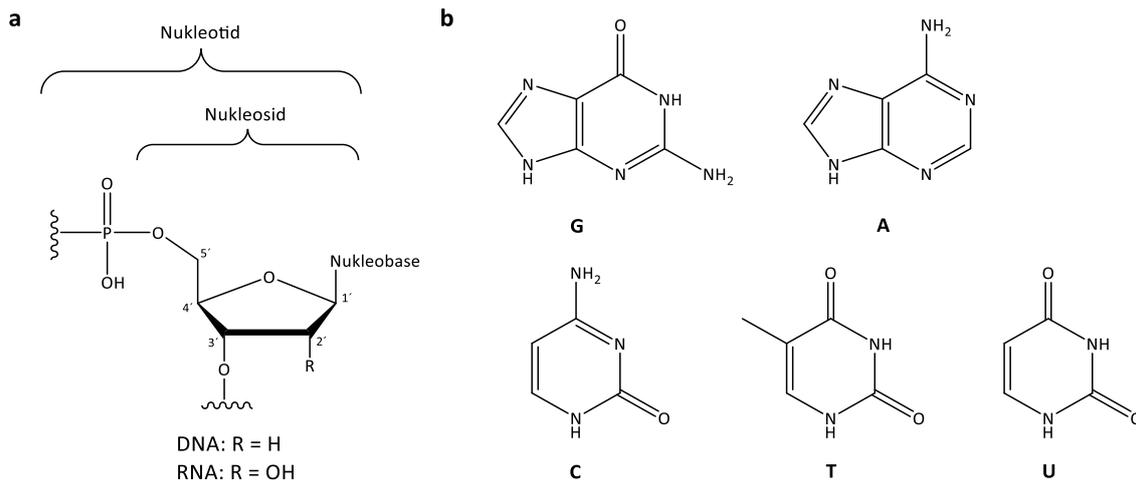


Abbildung 2: (a) Prinzipieller Aufbau von DNA und RNA; (b) Strukturformeln der Nucleobasen; oben: Purine Guanin (G) und Adenin (A), unten: Pyrimidine Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U).

Durch die Geometrie der Basenpaare und die daraus resultierende Stellung der Reste zueinander bilden sich zwei Vertiefungen in der Doppelhelix aus, welche als große Furche und kleine Furche bezeichnet werden (**Abbildung 3**).^[27]

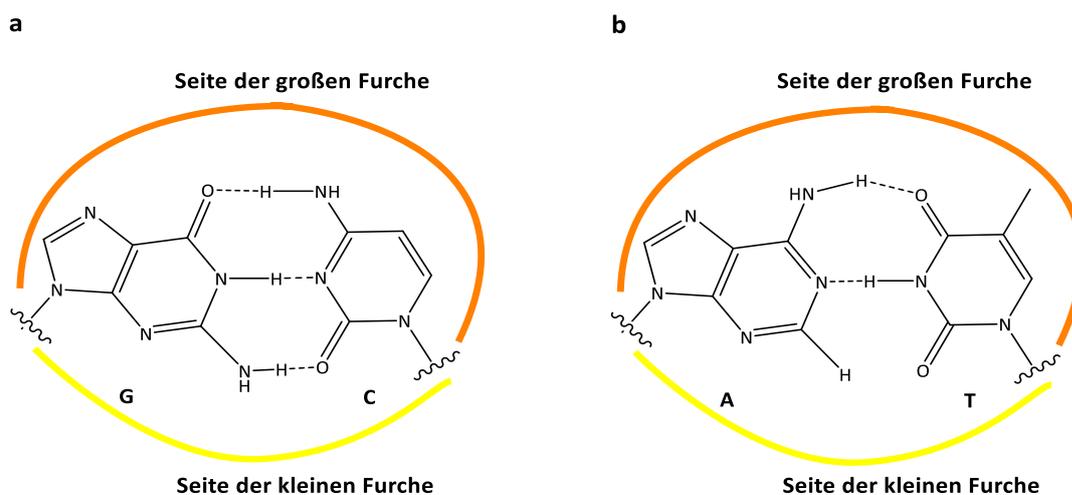


Abbildung 3: (a) Verknüpfung der Basenpaare Guanin (G) und Cytosin (C) über drei Wasserstoffbrücken; (b) Verknüpfung der Basenpaare Adenin (A) und Thymin (T) über zwei Wasserstoffbrücken. Ausbildung der großen Furche und kleinen Furche durch die resultierende Geometrie.

2. Theorie

Durch ihr flexibles Rückgrat kann die DNA verschiedene Helixformen einnehmen.^[27] Unter physiologischen Bedingungen liegt der größte Teil der DNA in der B-Form vor, welche Watson und Crick 1953 aufklärten.^[25,27] Die A-Form bildet sich bei weniger hydratisierten DNA-Strängen aus und ist auch bei RNA-Doppelsträngen und einigen RNA-DNA-Hybriden zu finden. Sie ist breiter und kürzer als die B-DNA-Helix. Der Strukturunterschied kommt durch die Faltung der Riboseinheit. Während bei der B-Form das C-2'-Atom außerhalb der Ebene, der übrigen vier Ringatome liegt (C-2'-Endo-Konformation), liegt bei der A-Form das C-3'-Atom außerhalb der Ebene (C-3'-Endo-Konformation) (**Abbildung 4 a**). Bei RNA-Helices führt die sterische Hinderung durch das 2'-Sauerstoffatom zur Ausbildung der A-Form. Die unterschiedlichen Formen und damit verbundenen Strukturen der Furchen ermöglichen es, *dsDNA* selektiv anhand der kleinen Furche zu erkennen, während *dsRNA* nicht gebunden wird.^[28] Die dritte Form wird als Z-Form bezeichnet.^[27,29] Diese ist eine linksgängige Helix bei der die Purin- und Pyrimidinbasen unterschiedliche Konformationen eingehen (**Abbildung 4 b**). Durch die dadurch resultierende Veränderung des Zucker-Phosphat-Rückgrates, besitzt die Z-Form nur eine einzige tiefe, enge Furche.

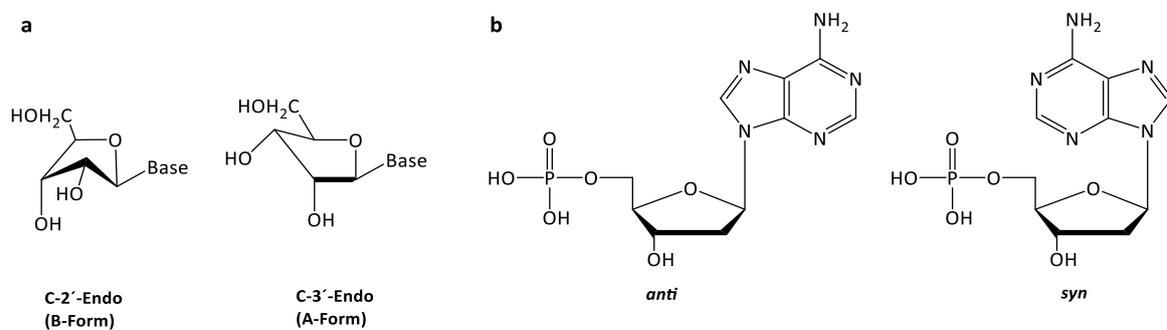


Abbildung 4: Konformation der DNA-Nukleotide. (a) C-2'-Endo-Konformation der B-Form links und C-3'-Endo-Konformation der A-Form; (b) Stellung der Nuklease: *anti* (links) und *syn* (rechts).^[27]

Während DNA als Speicher der genetischen Information auch die Blaupausen für Proteine und RNA beinhaltet, besitzt RNA durch die 2'-Hydroxygruppe am Zucker eine viel größere Möglichkeit alternative Strukturen einzugehen, chemische Funktionalitäten auszubilden und schlussendlich eine Vielzahl von Funktionen zu übernehmen.^[4,18,30]

2.2. RNA

RNA spielt eine große Rolle in zellulären Prozessen und der Genexpression. Bei der Genexpression wird die DNA im Zellkern als Vorlage verwendet und beim Vorgang der Transkription die *messenger*-RNA (*mRNA*), als Einzelstrang, dem sogenannten Transkript, gebildet.^[30,31] Die *mRNA*, welche nun die genetische Sequenz trägt, verlässt nach einigen Prozessierungsschritten den Zellkern und gelangt in das Zytoplasma, wo es im Ribosom, einem Makromolekül aus Proteinen und ribosomaler RNA (*rRNA*), in Aminosäuren und durch Synthese eines Polypeptides zu Proteinen translatiert wird.^[32,33] Während der Translation wandert die *mRNA* durch das Ribosom und wird „abgelesen“. Dies geschieht durch das Binden von *transfer*-RNA (*tRNA*) an die *mRNA*.^[30,31,32] *tRNAs* besitzen eine Kleeblattstruktur, welche sich in ihrem Akzeptorstamm für eine spezifische Aminosäure und dem Anticodonarm für das komplementäre Codon der *mRNA* unterscheiden. (**Abbildung 5**)

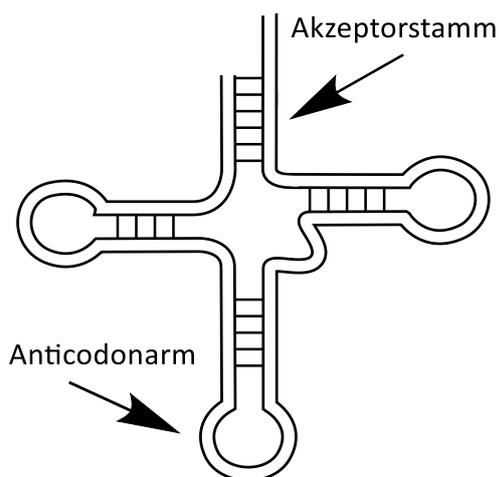


Abbildung 5: Die Struktur der *transfer*-RNA (*tRNA*). *tRNA* hat eine Kleeblattstruktur, einen Akzeptorstamm für eine spezifische Aminosäure und einen Anticodonarm zur Erkennung des *mRNA*-Codons.^[31]

Ein Codon besteht aus drei nebeneinander liegenden Nucleotiden, wobei jedes Codon nur eine einzige Aminosäure repräsentiert.^[31] Zusätzlich zu den 61 Codons, welche die Aminosäuren repräsentieren, existieren noch die drei Stop-Codons UAA, UAG und UGA. Sobald eines dieser Codons das Ribosom passiert, wird die Translation gestoppt, da es keine *tRNA* mit dem passenden Anticodon gibt. Hierbei verwenden alle lebenden Organismen denselben genetischen-Codon-Code, wodurch dieser universell ist. Zusätzlich existieren Sequenzen, welche den Beginn der Transkription auf der DNA

markieren, und die Polymerase zielgenau dort positionieren, oder die Geschwindigkeit der Transkription beschleunigen oder verlangsamen und somit die Transkriptionsrate regulieren.

In den letzten Jahrzehnten hat sich herausgestellt, dass RNA nicht nur eine Rolle in der Weiterleitung von genetischen Informationen spielt, sondern auch einen regulierenden Part bei der Genexpression übernimmt.^[30,31,34] Beim sogenannten Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) werden doppelsträngige RNAs durch die Endonuklease Dicer in kürzere *dsRNAs*, sogenannte *small-RNA* oder *siRNA*, überführt.^[30,35] Diese werden entwunden und ein Strang, der Leitstrang, bildet mit Argonautenproteinen den *RNA-induced silencing complex* (RISC) aus, auf der Suche nach einer komplementären RNA. Die gefundene RNA wird beim Kontakt mit dem RISC über Schneiden, Abbau oder das Verhindern der Interaktion mit dem Ribosom deaktiviert und damit die Translation behindert.^[30,31,35] Kleine nukleare RNAs (engl. *Small nuclear RNAs*; *snRNAs*) spielen beim Prozess des Spleißens eine zentrale Rolle, bei dem die prä-*mRNA* gebunden und alle nicht-kodierenden Introns entfernt werden, wodurch die nur aus Exons bestehende *mRNA* gebildet wird.^[36] *mi(cro)RNAs* sind kurze, einzelsträngige RNA-Moleküle mit Basenlängen von 21–24 Paaren.^[30,31,37] Sie reguliert fast 50 % der *mRNA* in Wirbeltieren über die Bildungen eines „*silencing complex*“, welcher ein Argonautenprotein im Kern beinhaltet.^[30,37,37,38] Des Weiteren kann hingegen eine RNAi-Dysfunktion unter anderem zu neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen, sowie verschiedenen Krebsformen führen.^[39]

Aufgrund der großen Variation verschiedener Funktionen der RNA von der Beeinflussung lebenswichtiger Prozesse bis hin zu Krankheiten, stellt die RNA mit ihren vielen Subtypen ein potentes Ziel für die Strukturaufklärung dar. Eine Übertragung des Wissens auf die Wirkstoffentwicklung über z. B. die gezielte Manipulation der Genregulation auf RNA-Ebene weckt Hoffnung auf bisher nicht entdeckte Therapie-Möglichkeiten.

2.3. Strukturaufklärung von Nukleinsäuren

Im Verlauf der letzten paar Jahrzehnte wurden verschiedene biochemische und biophysikalische Techniken für die Strukturaufklärung der Nukleinsäuren entwickelt. Die Röntgenkristallographie liefert die Anordnung der Atome im Raum und somit die

dreidimensionale Struktur, was sie als eine der präzisesten Methoden ausweist.^[40,41] Das Züchten verwendbarer Einkristalle kann jedoch komplex und zeitaufwendig sein.^[42,43] Zudem können diese Strukturen teilweise nur als Momentaufnahme einer biologischen, dynamischen Struktur dienen, weshalb zur korrekten Strukturaufklärung auch andere Methoden verwendet werden sollten, wie die NMR-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*).^[44] Diese kann unter biologisch relevanten Bedingungen gemessen werden und liefert Informationen zu hochaufgelösten, atomaren Strukturen und Dynamiken.^[3,4] Leider stellt die geringe Sensitivität die NMR-Spektroskopie vor ein Problem. Besonders bei viskosen Proben oder sehr großen Biomolekülen, werden große Mengen Substanz oder lange Messzeiten benötigt.^[43,45] Hierbei stellen Moleküle mit dem Hang zu Selbstaggregation, welche daher in geringen Konzentrationen gemessen werden müssen, ein besonderes Problem dar. EPR (engl. *electron paramagnetic resonance*) und FRET (engl. *Förster resonance energy transfer*) finden daher als zusätzliche Methoden zur Informationsgewinnung über Dynamiken und Strukturaufklärung immer mehr Verwendung. FRET ist eine einfache Methode um im nanomolaren Konzentrationsbereich komplexe Moleküldynamiken mit Abständen von 10–100 Å zwischen zwei und mehreren Chromophoren zu betrachten.^[43,46] Aufgrund der hohen Sensitivität von FRET sind nur geringe Mengen der Probe von Nöten und es bietet sich sogar die Möglichkeit von Einzelmolekülmessungen.^[47] Der große Nachteil von FRET ist jedoch die Photophysik der verwendeten Fluorophoren und ihrer Interaktion mit der Umgebung. Dies führt zu Unsicherheit über die Position und Orientierung des Fluorophors relativ zum Biomolekül und kann bei Langzeitmessungen sogar die Chromophore schaden und die Messung zusätzlich erschweren.

Die EPR-Spektroskopie (engl. *Electron paramagnetic resonance*) ist eine weitere Methode für die Erforschung von Strukturen und Dynamiken von Nukleinsäuren und wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

2.4. Electron paramagnetic resonance (EPR) Spektroskopie

Der russische Physiker Evgenii Konstantinovich Zavoisky entdeckte im Jahre 1944 das Phänomen der EPR-Spektroskopie.^[48] Bei Substanzen mit einem ungepaarten Elektron, wirkt sich das Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes auf das Energieniveau des ungepaarten elektronischen Spins aus, und spaltet dieses in ein niedriges und hohes

Energieniveau auf, was als Zeemann-Effekt bezeichnet wird.^[49,50] Die Differenz zwischen den Energieniveaus ändert sich linear mit der Stärke des angelegten Feldes. Durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung, deren Energie genau der Differenz der Energieniveaus entspricht, werden die Elektronen vom unteren in das obere Energieniveau überführt. Dies wird als Absorption der Mikrowellenintensität gemessen. Die EPR-Spektroskopie kann daher paramagnetische Zentren wie freie Radikale oder paramagnetische Metallionen detektieren.^[13] In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass EPR eine sehr effektive Methode für die Untersuchung von Strukturen und Dynamiken von Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren darstellt.^[7,51–54]

Zu Beginn einer EPR Studie steht die konventionelle *cw* (engl. *continuous wave*) EPR-Messung.^[50,55] Diese kann Aufschluss über Strukturen und mittels Linienverbreiterung auch Dynamiken von Biomolekülen über Distanzen von bis zu 25 Å liefern.^[4,5,54] Für längere Distanzen von 15–160 Å wird die gepulste EPR-Methode PELDOR (engl. *pulsed electron-electron double resonance*), auch DEER (engl. *double electron-electron resonance*) genannt, verwendet.^[4,55,56] Neben der Beobachtung von Strukturen und Dynamiken innerhalb des Moleküls können auch Aussagen über die Wechselwirkung des Moleküls mit seiner Umgebung, wie mit Lösungsmitteln oder anderen Liganden, am paramagnetischen Zentrum getroffen werden.^[13,49,55,57]

Die EPR-Spektroskopie liefert wichtige komplementäre Informationen zu den anderen bestehenden Analysemethoden.^[13] Aufgrund ihrer hohen Sensitivität (mikromolare Konzentrationen), der Tatsache, dass sie nicht durch die Größe der Biomoleküle oder die optischen Eigenschaften der Probe limitiert ist, ergänzt sie die anderen Methoden, wo diese ihre Grenzen erreichen.^[7,55,58] Leider besitzen nur die wenigsten Biomoleküle paramagnetische Zentren auf natürliche Weise, was ihre Untersuchung erschwert oder vorerst unmöglich macht.^[8,49] Jedoch führt dies auch dazu, dass in späteren Messungen der diamagnetische Hintergrund der Probe diese nicht beeinflusst, was die EPR-Spektroskopie zu einer sehr attraktiven Methode zur Untersuchung von Biomakromolekülen in Membranen oder ganzen Zellen macht.^[50,55] Für die Untersuchung von diamagnetischen Molekülen müssen diese vor der EPR-Messung mit ungepaarten Elektronen markiert werden.^[55] Diese sogenannte Spin-Markierung (engl. *spin-labeling*) erweitert die möglichen Ziele für die EPR-Spektroskopie auf beinahe alle

biologischen Systeme.^[58] Verschiedene Systeme stehen als paramagnetische Markierung zur Auswahl, zum Beispiel Metallionen wie Gd(III) (**Abbildung 6 a**)^[59,60] oder Mn(II)^[61], die Verwendung eines Kohlenstoffradikals (**Abbildung 6 b**)^[62] oder auch die am meisten verwendete, und seit langer Zeit bekannte Methode des Nitroxid-Radikals.^[59,63] Nitroxide sind meist kleine organische Moleküle, welche durch Delokalisierung des ungepaarten Elektrons zwischen dem Stickstoffatom und dem Sauerstoffatom, flankiert durch sterisch anspruchsvolle Reste, das Radikal stabilisieren (**Abbildung 6 c**).^[64]

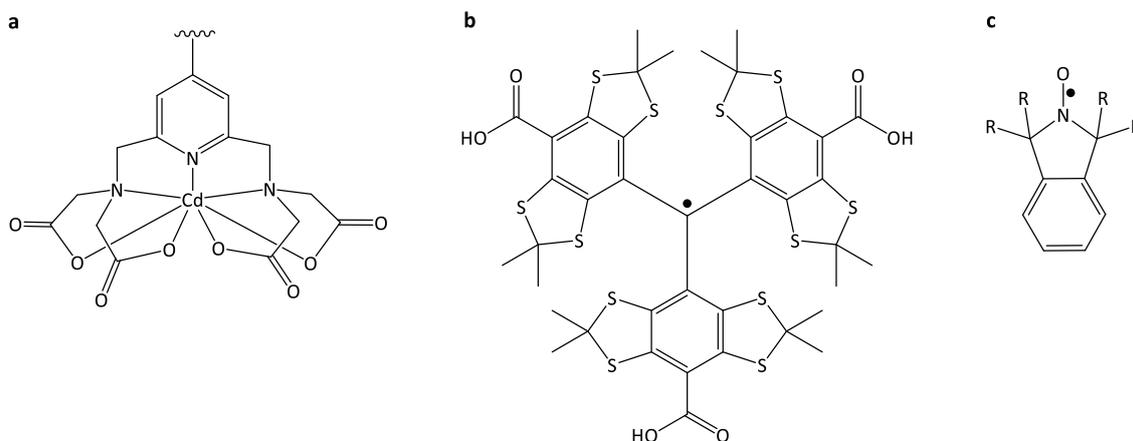


Abbildung 6: Beispiele für paramagnetische Verbindungen für den EPR Einsatz: (a) PyMTA-Gd(III), (b) Ein Kohlenstoffbasiertes Tritylradikal, (c) Ein Isoindolin Nitroxid-Radikal.

2.5. Site-directed spin labeling (SDSL) für Nukleinsäuren

Um eine Nukleinsäure mittels EPR-Spektroskopie untersuchen zu können, müssen ein oder mehrere Spin-Label an spezifischen Stellen gebunden werden. Das Verfahren um dies zu ermöglichen heißt SDSL (engl. *site-directed spin labeling*).^[7,49,65] Das Einfügen der Spin-Label kann über eine nicht-kovalente^[66] oder kovalente Bindung erfolgen (**Abbildung 7**). Die NC-SDSL (engl. *non-covalent-SDSL*) Strategie verwendet nicht kovalente Bindungsarten, wie Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Spin-Label und der Nukleinsäure (**Abbildung 7 a**). Die kovalente Bindung des Spin-Labels an die Nukleinsäure kann vor oder nach der Festphasensynthese des Oligos erfolgen.^[7] Die post-synthetische Markierung kann chemisch oder enzymatisch erfolgen, wobei in beiden Fällen ein reaktiver Rest an einer oder mehreren spezifischen Positionen an der Nukleinsäure vorhanden sein muss, an

welchem das Spin-Label-Reagenz kuppeln kann (**Abbildung 7 b**). Dies kann entweder an der Base^[67], am Zucker^[68] oder am Phosphat-Rückgrat geschehen.^[69] Die dritte SDSL-Strategie findet vor oder bei der Phosphoramidit-Synthese statt.^[7] Hierbei werden an der Base mit Spin-Labeln funktionalisierte Nucleotide bei der Festphasensynthese in den Strang eingebaut (**Abbildung 7 c**).^[13,51,52] Alternativ wird das Phosphorrückgrat nach der Synthese, aber vor dem Abspalten vom Träger, funktionalisiert.^[70] Die Phosphoramidit-Methode wird im Verlaufe dieser Arbeit genauer besprochen.

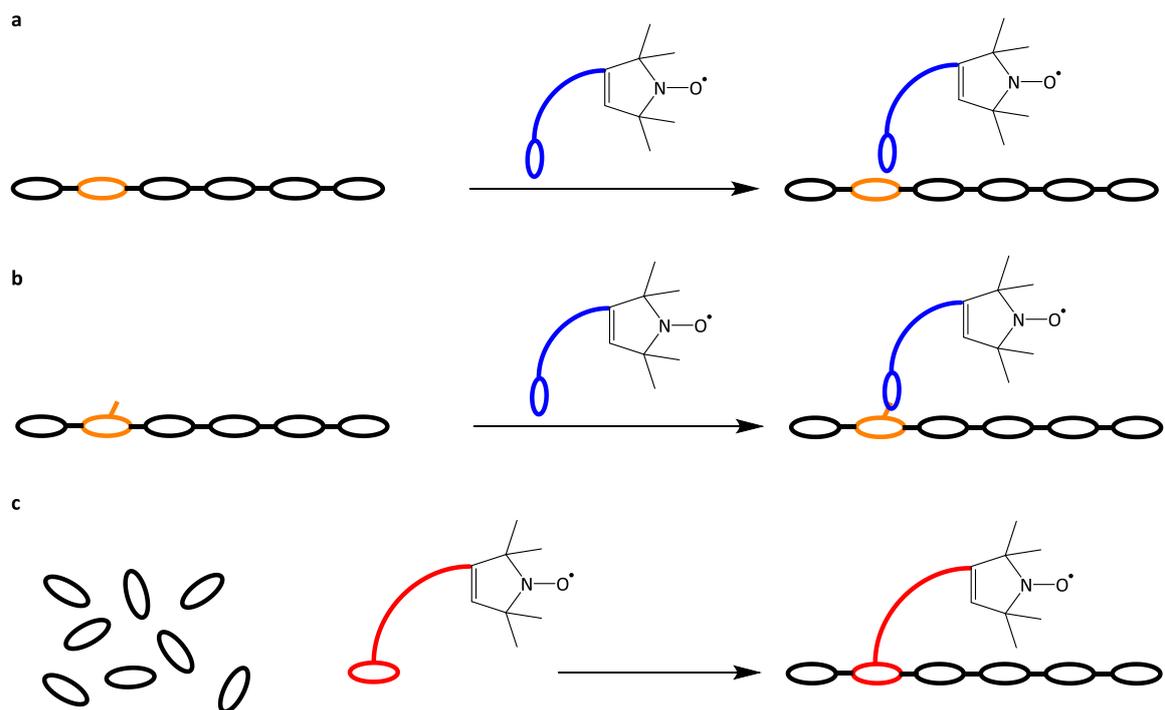
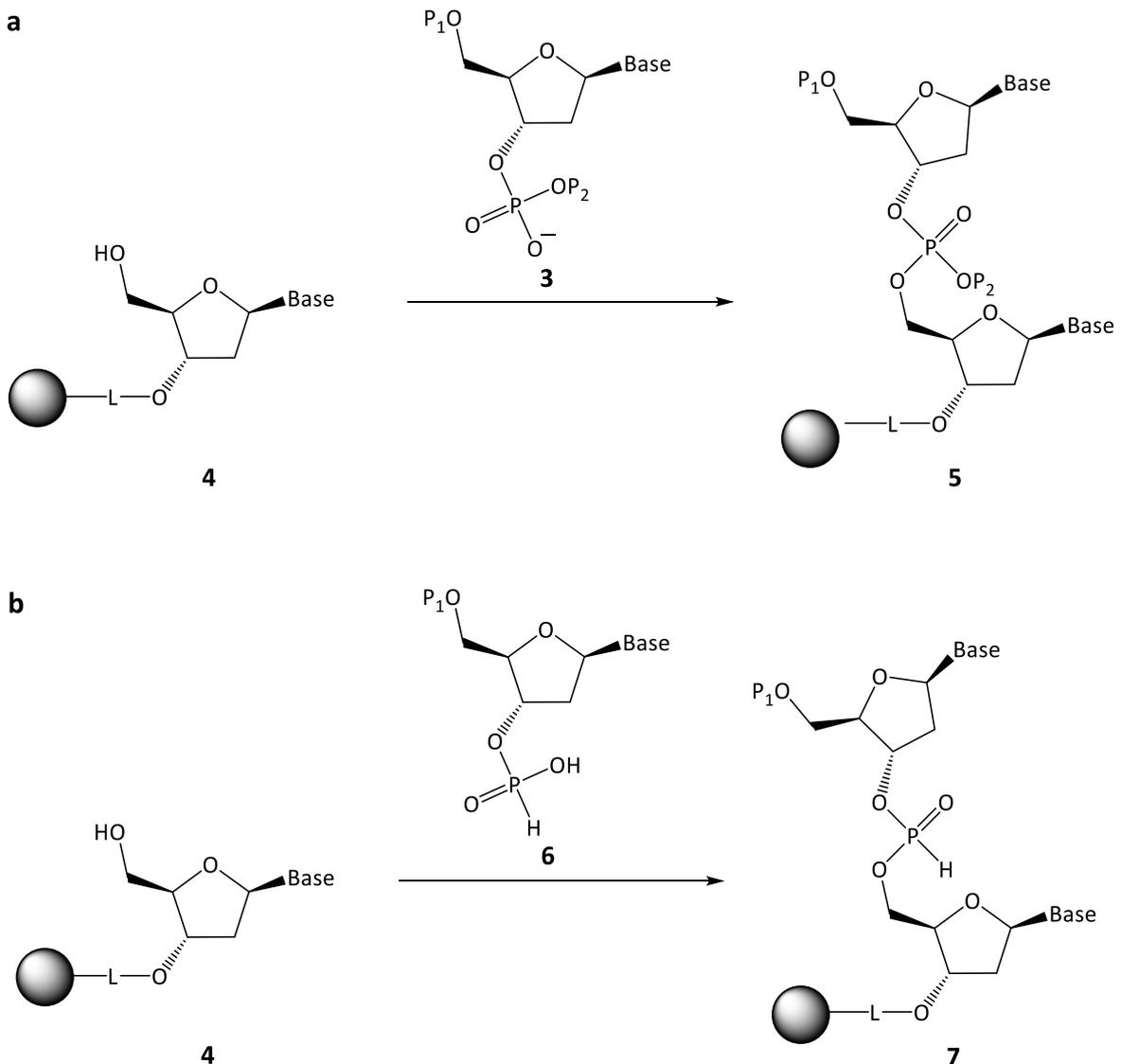


Abbildung 7: Ein allgemeines Schema der drei Hauptstrategien des *site-directed spin labeling* (SDSL) von Nucleinsäuren, mit einem Pyrrrolidin-basiertem Spin-Label als repräsentatives Nitroxid und Nucleotide als Glieder, die eine Oligokette ausbilden. (a) nicht-kovalentes Spin-Labeling, (b) Post-synthetisches Spin-Labeling, (c) Phosphoramidit-Methode.^[40]

2.6. Festphasensynthese von Nucleinsäuren

Letsinger und *Mahadevan* versuchten sich 1966 an der ersten automatisierten Synthese von Oligonucleotiden, unter Verwendung einer Festphase.^[71] Diese entwickelten sich weiter zu drei Oligonucleotid-Synthesemethoden.^[72] Von diesen stellte sich die Phosphortriester-Methode, als die qualitativ schlechteste Route dar. Hierbei wird der Phosphor als Diester (**3**) für die Kupplung funktionalisiert und durch die Kupplung mit der 5'-Hydroxylgruppe des Partnermoleküls (**4**) zum Triester (**5**) überführt (**Schema 1 a**). Die zweite Anwendung ist die Phosphonat-Methode, bei welchem der Phosphor als

H-Phosphonat (**6**) für die Kupplung funktionalisiert wird und durch die Kupplung ein 5'-geschütztes Dinukleotid Phosphonat (**7**) bildet (**Schema 1 b**). Dieses Verfahren besitzt jedoch im Vergleich zur letzten Methode, der Phosphoramidit-Methode, eine geringe Ausbeute.

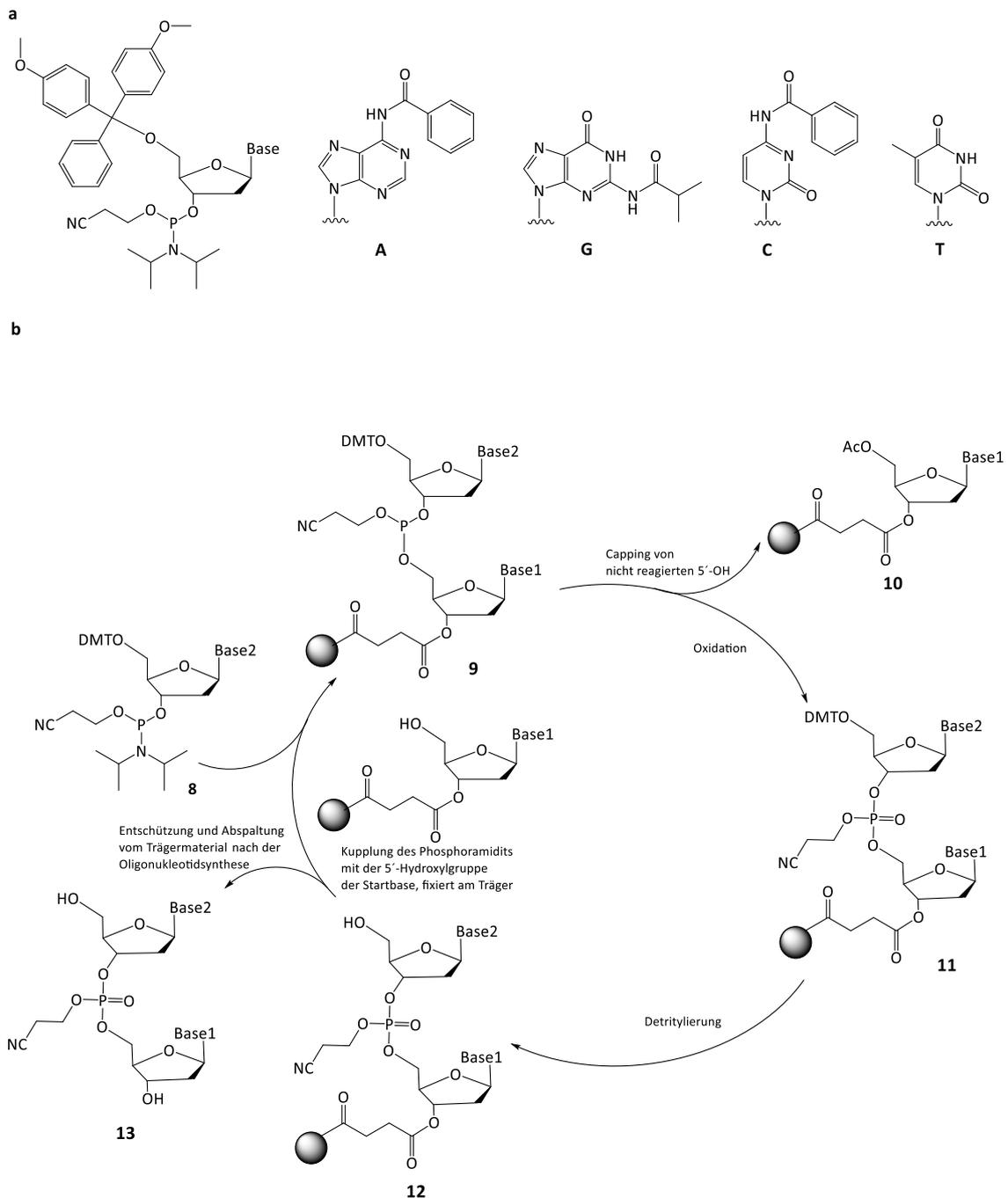


Schema 1: Erster Schritt der Festphasensynthese: (a) Phosphortriester-Methode; (b) Phosphonat-Methode.^[72]

Die Phosphoramidit-Methode wird daher heutzutage am ehesten für die Synthese von Oligonukleotiden sowohl in Lösung, als auch auf Festphase, verwendet.

In **Schema 2** wird die Phosphoramidit-Methode schematisch dargestellt. Vor Beginn der automatisierten Oligonukleotid-Festphasensynthese müssen die Phosphoramidit-Bausteine funktionalisiert werden, um Nebenreaktionen zu minimieren (**Schema 2 a**).^[40,72,73] Die exozyklische Amino-Gruppe der Nucleobasen A, C und G wird durch Amide

geschützt, während die Schützung von T und U zwar untersucht, aber nicht für nötig befunden wurde.^[73,74] Die 5'-Hydroxylgruppe wird Trityl-basiert geschützt, wobei sich der Dimethoxytritylether (DMT) als beste Schutzgruppe neben Trityl, Trimethoxytrityl (TMT) oder Monomethoxytrityl (MMt) herausstellte, da es die gewünschte Stabilität während der Synthese aufweist und unter verschiedenen sauren Bedingungen leicht abzuspalten ist.^[72] Die 3'-Hydroxylgruppe wird zuletzt namensgebend zum Phosphoramidit phosphoryliert.^[73,75] Die Oligonukleotidsynthese erfolgt vom 3'- zum 5'-Ende, wobei die erste Base über einen Ester auf einem Trägermittel fixiert ist, wodurch die Oligonukleotid-Kette wachsen kann, während die überschüssigen Chemikalien weggespült werden (**8, Schema 2 b**).^[40,73,76] Durch eine Tetrazol-katalysierte Reaktion wird nun das erste Phosphoramidit an die entschützte 5'-Hydroxylgruppe gekuppelt, wodurch die Oligokette wächst (**9, Schema 2 b**). Nicht gekuppelte 5'-entschützte Oligomere werden mittels Acetylierung gecappt, um die Bildung unspezifischer Sequenzen zu verhindern (**10, Schema 2 b**). Die Phosphitbrücke wird mit einer wässrigen Iod-Lösung zum Phosphat oxidiert (**11, Schema 2 b**) und das neue 5'-Ende detrityliert, wodurch die Vorbereitungen für den nächsten Zyklus abgeschlossen sind (**12, Schema 2 b**). Nach Beenden der automatisierten Festphasensynthese und erfolgreicher Synthese der gewünschten Sequenz, werden, durch Erhitzen in wässriger Ammoniaklösung, die exozyklischen Aminogruppen und das Phosphat entschützt und das Oligomer durch Esterhydrolyse vom Trägermaterial abgespalten (**13, Schema 2 b**).



Schema 2: (a) Struktur der verwendeten, geschützten Phosphoramidite in der automatisierten DNA-Synthese; (b) Automatisierter DNA-Oligonukleotidsynthese-Zyklus der Phosphoramidit-Methode.^[40,73]

2.7. Festphasensynthese von Spin-markierten Nucleinsäuren

Hopkins *et al.* publizierten den ersten erfolgreichen Einbau einer Spin-markierten Nucleinsäure mittels der automatisierten chemischen Synthese über die Phosphoramidit-Methode.^[77,78] Sie entwickelten die Spin-markierte Thymidin-analoge Nucleinsäure **14**^[77] und 2'-Desoxycytidin-analoge Nucleinsäure **15**^[78], welche sie in DNA

einbauen (**Abbildung 8**). Diese wurden ohne große Veränderung der Sekundärstruktur, durch Eingliedern in die Große Furche, inkorporiert und zeigten nur minimale Abweichbewegungen im Vergleich zur DNA. Drescher *et al.* studierten mit diesen später G-Quadruplexe mittels PELDOR.^[79] Gannet *et al.* entwickelten daraufhin einen Nitroxid-Spin-Label mit einer Sechsringbasis **16** und zeigten anhand des Einbaus in *dsDNA* und *txDNA* (engl. *triplex DNA*) und Messung von *cw*-EPR, dass dieser die Stränge nicht weitgehend destabilisierte und sich auch nahezu nicht unabhängig der DNA bewegte.^[80] Die Nukleoside **17** und **18**^[81], sowie **19** und **20**^[82] besitzen im Gegensatz zu den vorherigen Verbindungen das Nitroxid an der exozyklischen Aminogruppe der Base und wurden auch mittels der Phosphoramidit-Methode in Sequenzen eingebaut (**Abbildung 8**). Diese wurden, neben der Messung von Abständen u. a. auch für die Detektion von Diskrepanzen und Identifikation der Basenpaar-Partner in *dsDNA* verwendet.^[82–84]

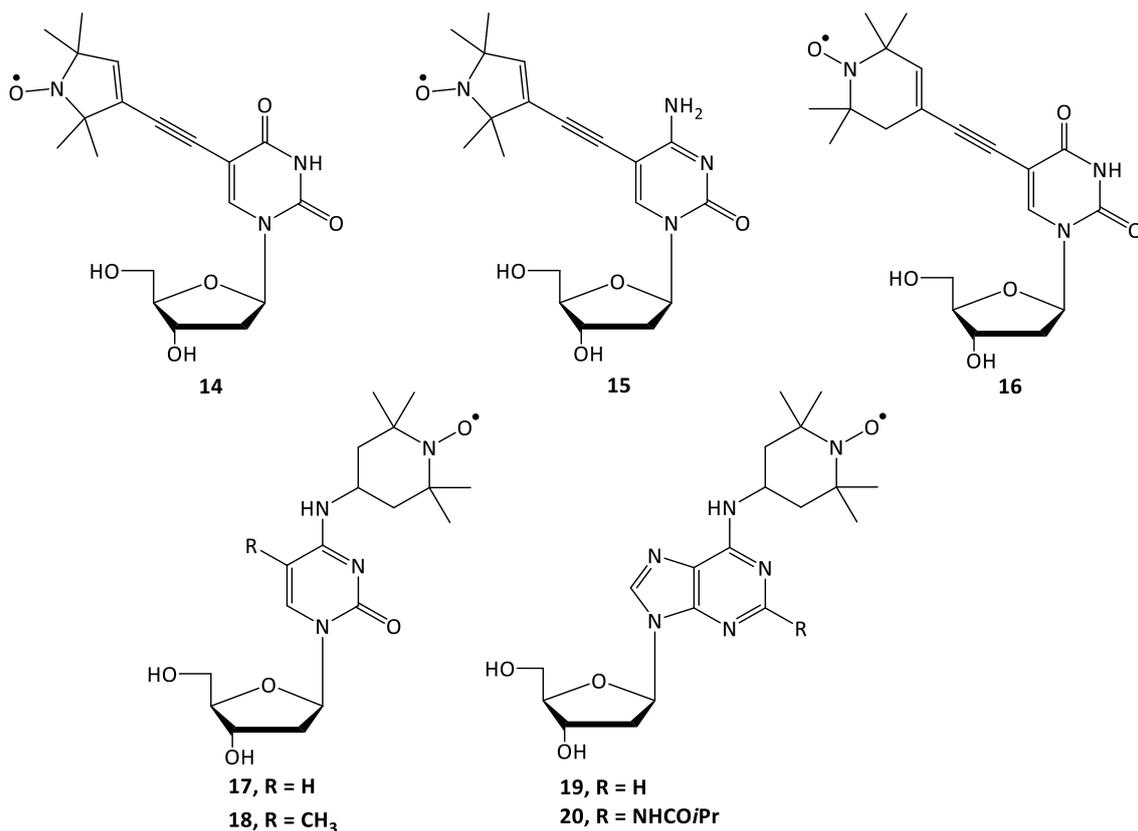
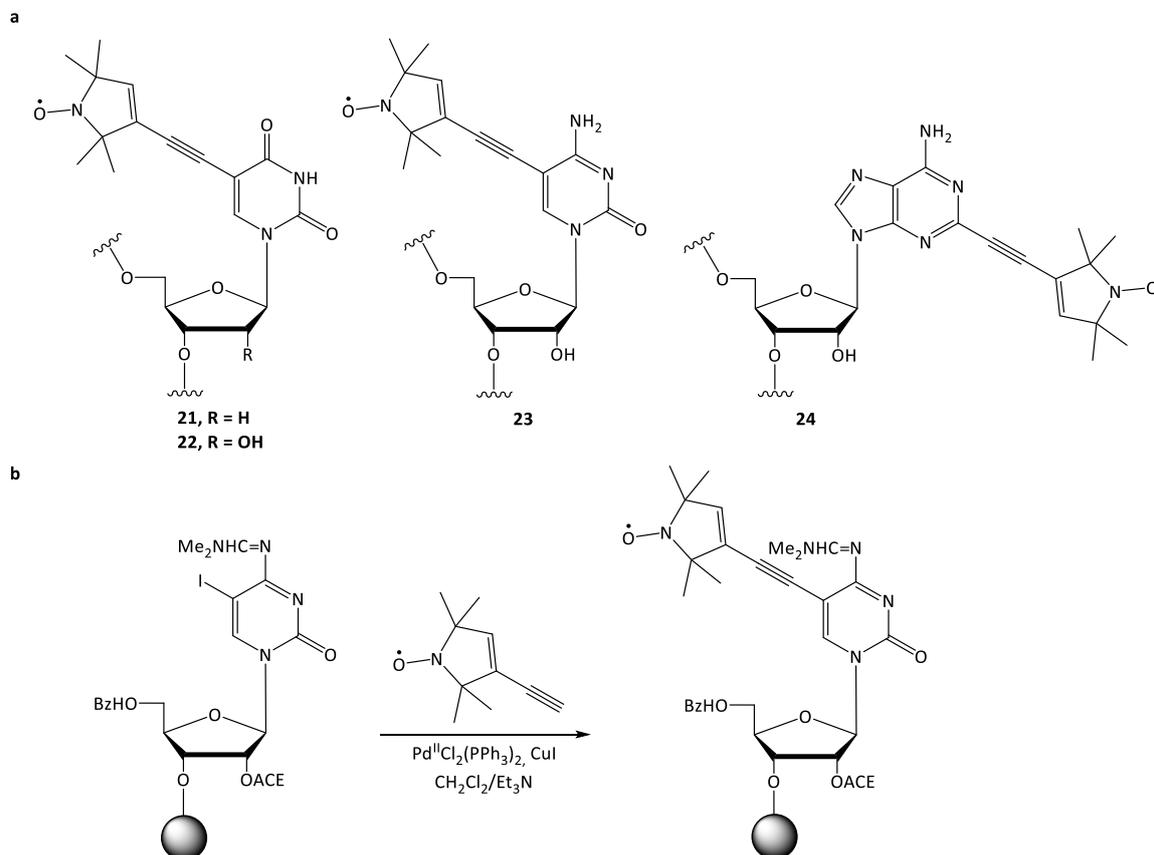


Abbildung 8: Beispiele für Spin-markierte Nucleoside, welche mittels der Phosphoramidit-Methode in Oligonucleotide eingebaut wurden.

Engels *et al.* entwickelten eine Alternativmethode für die Verbindungen **21**^[85] und **22-24**^[86] (**Schema 3 a**), bei welcher die zuvor funktionalisierten Nucleobasen auf der

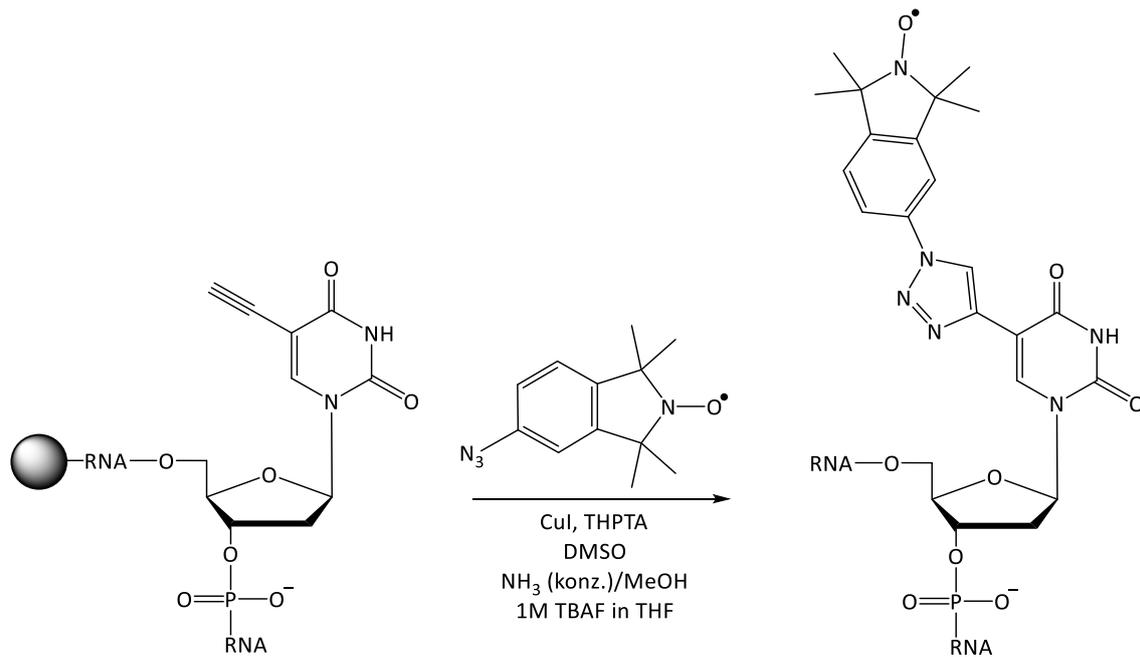
2. Theorie

Säule während der Oligonukleotid-Festphasensynthese mit dem Spin-Label über eine Palladium-katalysierte Sonogashira Reaktion gekuppelt wird (**Schema 3 b**). Diese konnten daraufhin zur genauen Messung von großen Distanzen in DNA und RNA mittels PELDOR verwendet werden.^[85–87]



Schema 3: (a) Beispiele für Spin-markierte Nucleoside, bei denen der Spin-Label während der Festphasensynthese auf der Säule durch eine Kupplungsreaktion inkorporiert wurde. (b) Ein Beispiel für die von Engels *et al.* entwickelte Kupplungsmethode während der Festphasensynthese von Oligonucleotiden.^[86]

Famulok *et al.* entwickelten eine alternative, postsynthetische Spin-Markierungsmethode, bei welcher der Spin-Label mittels Click-Chemie auf der Säule mit der funktionalisierten Base gekuppelt wird.^[6] Diese zeigte im Vergleich zur Engels-Methode eine effizientere Kupplung und lieferte in PELDOR-Messungen gute Informationen über die Abstände und Orientierungen der Spin-Label.



Schema 4: Ein Beispiel für die von Famulok *et al.* entwickelte Kupplungsmethode während der Festphasensynthese von Oligonukleotiden.^[6]

Sigurdsson und seine Kollegen haben viele verschiedene Spin-Label zur Markierung von Nucleinsäuren mit Hilfe der Phosphoramidit-Methode publiziert. Die Spin-Label **Ç**^[13] und **Çm**^[88], als Analoga von Cytidin (C), wurden in RNA und DNA inkorporiert, wobei sie mit Guanin (G) -Basenpaaren akkurate Abstandsmessungen innerhalb der Duplexe erzielten (**Abbildung 9**). Durch die Starrheit der Spin-Label konnten zudem die relativen Orientierungen zweier Label via PELDOR-Messungen ermittelt werden, was Einsicht in die Struktur und Dynamiken von Nucleinsäuren lieferte.^[40,89,90] Um die Stabilität der Nitroxide gegenüber den Bedingungen innerhalb einer Zelle zu testen, wurden **Ç** und **Çm** zur Reduktion mit Ascorbinsäure versetzt, was zu einer nahezu vollständigen Reduktion nach 60 Minuten führte.^[91] Um das Molekül gegenüber der reduzierenden Wirkung zu stärken wurden von Juliusson *et al.* die Spin-Label **EÇ** und **EÇm** mit Tetraethylresten anstatt Tetramethylresten synthetisiert. Ein Stabilitätstest mit Ascorbinsäure zeigte, dass nach 16 Stunden noch ca. 90 % des Nitroxid vorlagen. Röntgenstrukturanalysen des Spin-Label **Ç** zeigten eine gewisse Flexibilität des eigentlich angedachten starren Molekülgerüsts, was die Einsetzbarkeit von **Ç** und **Çm** beeinträchtigen könnte.^[92] Um diesem entgegenzuwirken entwickelten Segler *et al.* die analogen Spin-Label **Ĉ** und **Ĉm**, bei welchen der Sauerstoff der Oxazin-Brücke zwischen dem Cytidin und dem Benzolrest entfernt wurde, wodurch ein aromatisches Ringsystem ausgebildet wird. Das neue

System wies eine erhöhte Starrheit gegenüber den vorherigen Spin-Labeln **Ç** und **Çm** auf, deren Anwendung in DNA und RNA jedoch noch geprüft werden musste. Auch der Spin-Label **A** sollte daher, aufgrund seines großen aromatischen Systems, eine Starrheit aufweisen, welche genaue EPR-Messungen ermöglichen sollte.

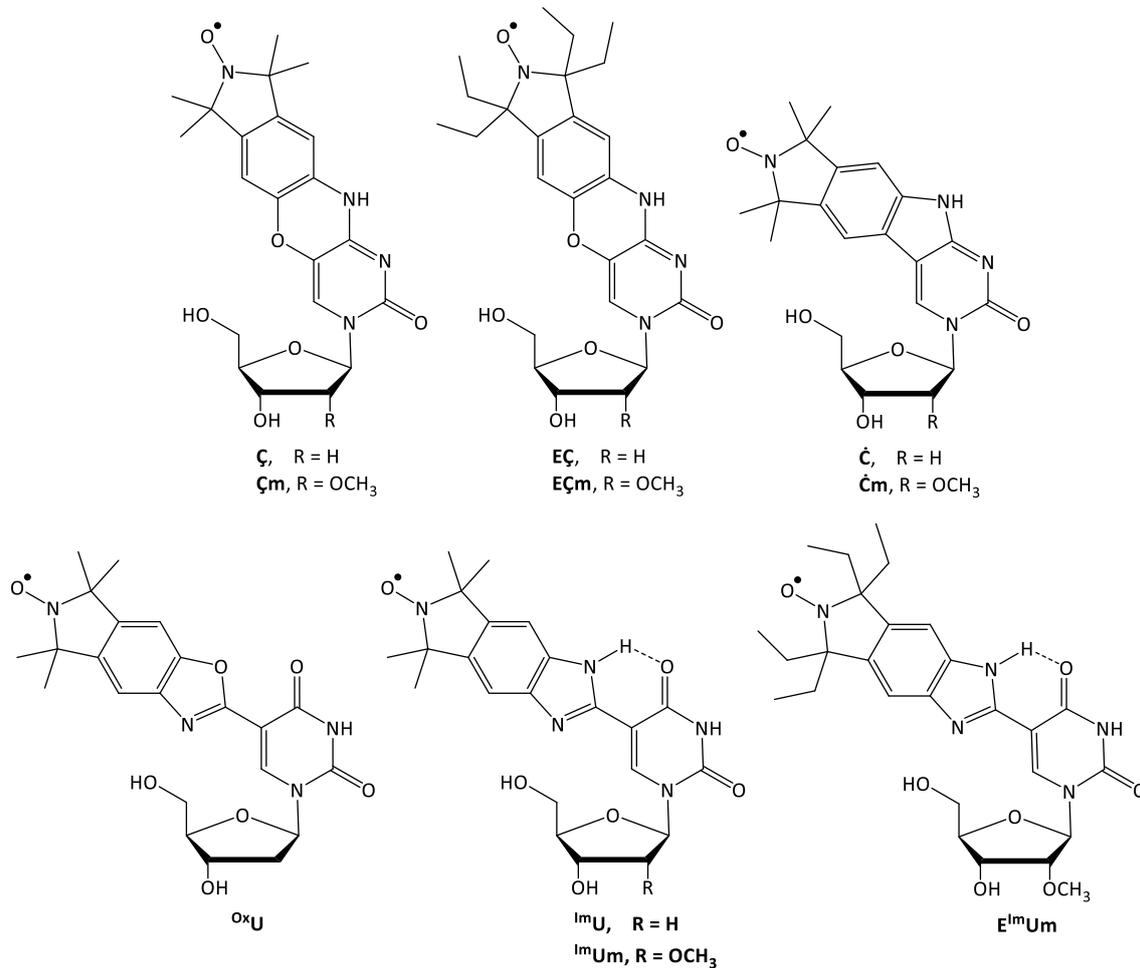


Abbildung 9: Von Sigurdsson *et al.* publizierte Strukturen der starren und halbstarren Spin-Label.^[13,56,88,91–95]

Eine alternative, halbstarre Spin-Label Strategie von Sigurdsson *et al.* sind OxU , ImU und ImUm , welche für das Markieren von Oligonukleotiden mittels der Phosphoramidit-Methode eingesetzt wurden (**Abbildung 9**).^[56] Diese basieren auf dem *conformationally unambiguous spin labelling* von Godt *et al.*, bei welchem die Spin-Probe eine interne Rotationsachse um eine Einfachbindung besitzt, welche die räumliche Orientierung des Nitroxids, relativ zum markierten Molekül nicht ändert.^[56,96] ImU und ImUm zeigten hierbei eine geringere Mobilität im Vergleich zu OxU , was auf die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem NH des Benzimidazol und O4 der Uracil-Base zurückzuführen ist.^[40,56,93,94] Messungen ergaben zudem für ImUm im

Vergleich zum starren Spin-Label **Ç** in der gleichen DNA-Sequenz bei Temperaturen von 20 °C ähnliche cw EPR Spektren, welche bei -10 °C sogar deckungsgleich wurden.^[56] Der analoge Tetraethyl-Spin-Label **E^{lm}Um** wurde in einen RNA-Duplex eingebaut und konnte wichtige Informationen über die Komprimierung dieses Duplexes liefern.^[95]

Ein großer Nachteil der Inkorporation von Spin-Labeln in Oligonukleotide mittels der Phosphoramidit-Methode ist, dass die Nitroxid-Radikale durch Nebenreaktionen während der Ketten-Synthese in das ungewünschte EPR-inaktive Amin überführt werden^[97,98], was z. B. während des Oxidationsschritts mit Iod passieren kann.^[99,100] Die Trennung solcher Gemische kann schwierig sein, sodass unter Umständen eine Mischung aus dem Spin-markierten Material und dem reduzierten Nebenprodukt in geringen Mengen entsteht.^[40,100] Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen die reduzierenden Nebenreaktionen zu minimieren, durch Austausch von Substanzen für die Oligonukleotid-Synthese, wie der Gebrauch von Dichloressigsäure, als schwächere Säure zum Abspalten der Trityl-Gruppe im Vergleich zu Trichloressigsäure und der Einsatz von *tert*-Butylhydroperoxid anstatt Iod für die Oxidation.^[100,101] Ein Alternativansatz ist der Einsatz von Radikalschutzgruppen, welcher im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

2.8. Schutzgruppen-Strategien für Nitroxid-Radikale

Ungewünschte Nebenreaktionen während der Oligofestphasensynthese führen zur reduzierten, EPR-inaktiven Aminform des Spin-Labels, welche nur schwer vom Radikal abzutrennen ist.^[40,98–100] Daher wurden Schutzgruppen für Nitroxid-Radikale entwickelt, welche während der Oligonukleotidsynthese stabil sind und danach eine leichte Entschützung ermöglichen. Verschiedene temporäre Schützungen wurden durch Reduktion und Acylierung^[102,103,104,105] (**25, Abbildung 10**), Silylierung^[105,106] (**26, Abbildung 10**) oder Alkylierung^[107] (**27, Abbildung 10**) des erzeugten Hydroxylamins durchgeführt.^[97] Die Acylgruppe wird durch Nucleophile wie Ammoniak, Methylamin oder Hydroxid-Ionen abgespalten, welche auch in der Oligonukleotidsynthese verwendet werden. Aso *et al.* publizierten zudem den Einbau von 2-N-*tert*-Butylaminoxyl-2'-desoxyadenosin (**28, Abbildung 10**) in DNA als acetyliertes Hydroxylamin, dessen Nitroxid jedoch eine sehr abweichende Struktur zu den sonst im Spin-Labeling verwendeten Nitroxiden hat.^[108] Die Silylierung mit der

tert-Butyldimethylsilyl-Gruppe (TBDMS) wurde beim Schutz der Hydroxylamine von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy (TEMPO) während einer Nitroxid-Nitroxid-Biradikal-Synthese verwendet, jedoch resultierten aus der Abspaltung der TBDMS-Gruppe nur bis zu 50 % Nitroxide.^[106] Die bei der Alkylierung gebildete R₂N-O-CH₃ Gruppe wird von **27** durch *meta*-Chlorperbenzoesäure (engl. *meta*-chloroperoxybenzoic acid, *m*CPBA) abgespalten, welche jedoch auch das Stickstoffatom im Heterozyklus der Nucleobase oxidieren kann und so für den Einsatz bei Oligonucleotiden unpassend macht.^[107]

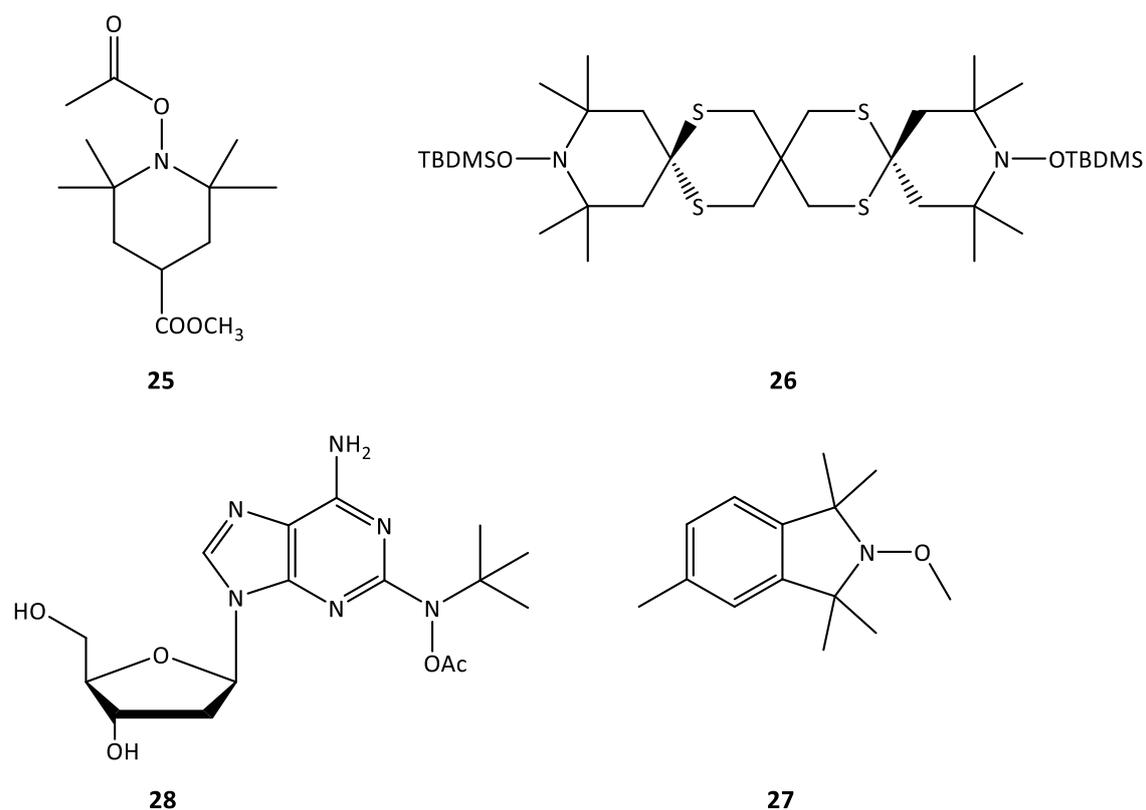


Abbildung 10: Schutzgruppen-Strategien für **25**,^[104] **28**,^[108] **26**^[106] und **27**.^[107]

Göbel *et al.* entwickelten eine neue Schutzstrategie, basierend auf der Alkylierung von Hydroxylaminen, bei der die photolabilen Schutzgruppen nach vollendeter Festphasensynthese mittels Lichteinstrahlung abgespalten werden.^[52] Hierbei bildet sich zuerst Hydroxylamin aus und wird durch den Luftsauerstoff zum Radikal oxidiert.^[97] Während die Schutzgruppen die Festphasensynthese gut überstanden, zeigten erste Entschützungen von **29** (**Abbildung 11**), dass nicht das gewünschte Nitroxid, sondern das Amin als Hauptprodukt der Photolyse gefunden wurde.^[83] Die Verwendung einer Coumarinderivat-Schutzgruppe führte zu guten Ausbeuten des Nitroxids nach der

Photolyse,^[97] dessen Einbau als Phosphoramidit (**30**, **Abbildung 11**) gute EPR-Ergebnisse erzielte und sogar direkt nach der Bestrahlung, ohne weitere Aufarbeitung, für PELDOR Messungen genutzt werden konnte.^[83] Leider stellte sich die Coumarin-Photolyse als pH-abhängige Reaktion heraus, welche in neutralen bis leicht sauren Medien das Amin als Hauptprodukt ergab.^[52] Ein neuerer Ansatz mit 2-Nitrobenzyloxymethyl (NBOM), bei welchem die photolabile Gruppe und die NO-Bindung durch einen Acetal-Linker verbunden sind, wurde entwickelt. Eine gute Stabilität während der Festphasensynthese wurde erwartet, da NBOM schon zuvor zum Schutz von Hydroxygruppen während der Synthese mit guten Ergebnissen verwendet wurde.^[109] Kurze RNA Stränge mit dem neuen Phosphoramidit **31** (**Abbildung 11**) wurden synthetisiert und in eine virale 59mer Stem-Loop-Struktur gekuppelt und erfolgreich mittels PELDOR vermessen.^[11,52] In neuesten Studien wurde TEMPO durch das Nitroxid 2,2,5,5-Tetramethyl-pyrrolin-1-oxyl-3-acetylen (TPA) ersetzt, welches durch seine erhöhte Starrheit und verringerte sterische Hinderung Vorteile gegenüber TEMPO besitzt.^[51] Der Einbau des Phosphoramidit **32** (**Abbildung 11**) in einen doppelsträngigen 27mer Neomycin-registrierenden Riboswitch war erfolgreich und wurde mittels PELDOR vermessen.

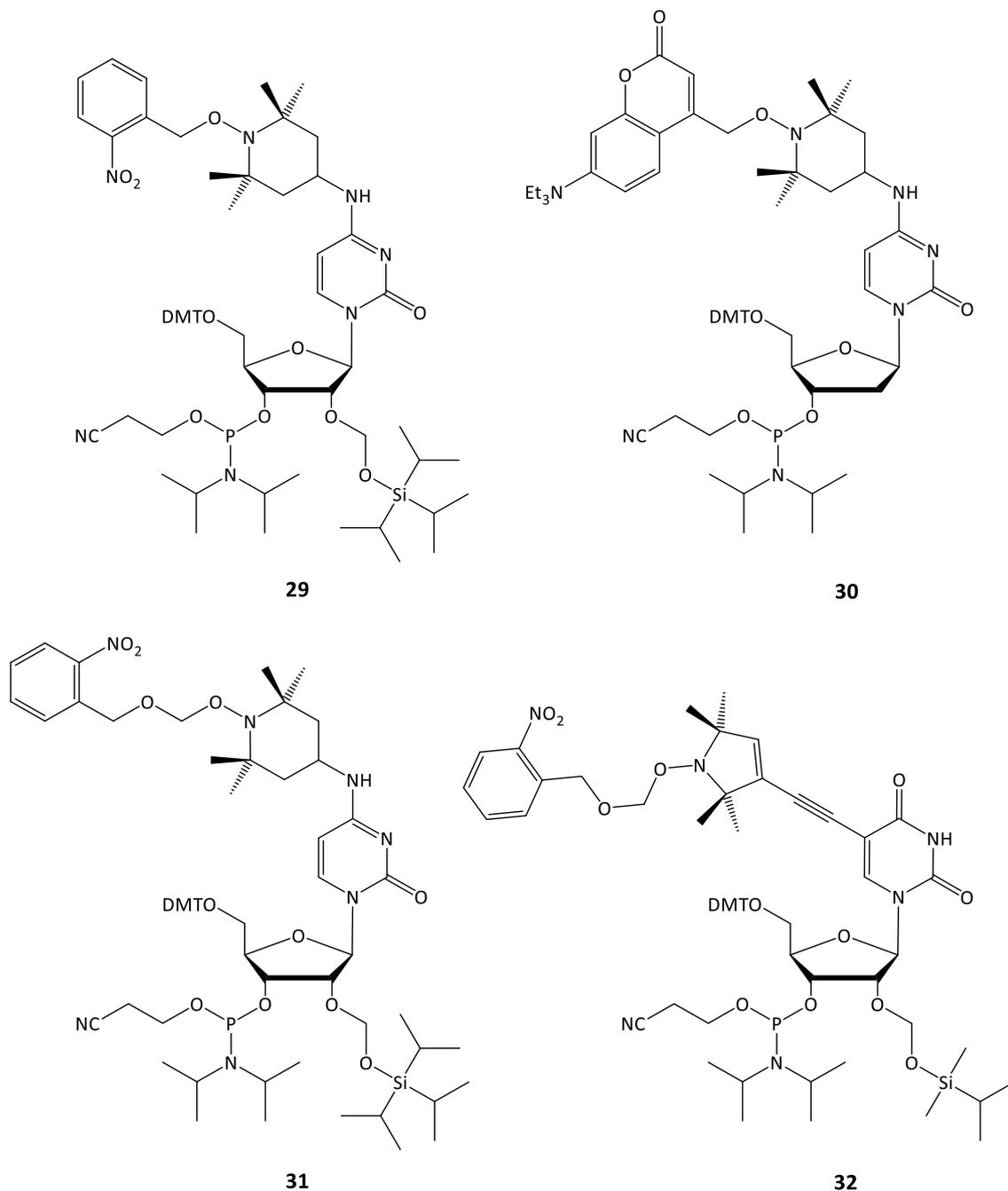


Abbildung 11: Photolabile Schutzgruppen-Strategie für 29,^[83] 30,^[83] 31^[52] und 32.^[51]

2.9. Starrer und flexibler Spin-Label

Viele bisher publizierte Nitroxid-basierte Spin-Label zur Untersuchung von Nukleinsäuren sind flexibel oder halbflexibel (**Abbildung 12**). Diese Markierungen sind mit der Nukleinsäure über eine Kette verbunden, welche eine Flexibilität bis zu einem gewissen Grad zulässt und so eine unabhängige Bewegung von dem Biopolymer, an das es gebunden ist, ermöglicht. Durch die freie Bewegung der Spin-Label wird die

EPR-Analyse erschwert und führt dazu, dass diese Sonden nicht optimal für die Struktur- und Dynamikaufklärung von Nucleinsäuren sind.^[13,40]

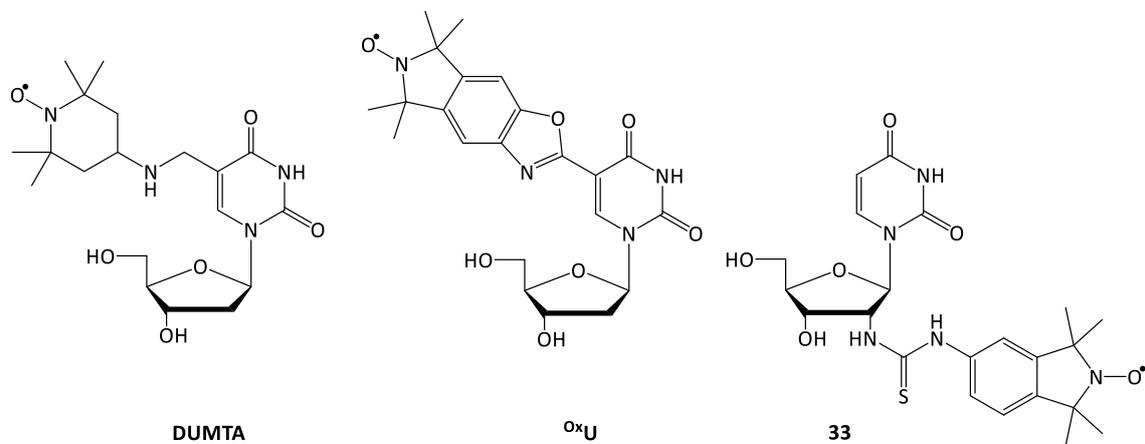


Abbildung 12: Beispiele für flexible (**DUMTA**)^[110] und halbflexible Spin-Label (**OXU**)^[111] und **33**^[112].

Starre Spin-Label werden nicht über eine Kette, sondern fest an die Nucleinsäure gebunden, um unabhängige Bewegungen des Spin-Labels zur Nucleinsäure zu verhindern. Hierdurch resultiert eine weitaus präzisere Messung der Distanzen und Orientierung des Labels innerhalb der Nucleinsäure mittels EPR.^[13,113] Hopkins *et al.* entwickelten den ersten starren Spin-Label **Q** (**Abbildung 13**).^[114] Zur Ermittlung von sequenzabhängigen Dynamiken von DNA wurde diese nicht natürliche Nucleobase mit 2-Aminopurin (**2AP**) in einer Doppelhelix DNA gepaart.^[115] Sigurdsson *et al.* entwickelten den zuvor erwähnten starren Spin-Label **Ç** (**Abbildung 1**), welcher ein stabiles und passendes Basenpaar mit der natürlichen Base G einnimmt^[116] und durch seinen starren Charakter akkurate Abstands- und Orientierungsmessungen in dsDNA ermöglicht.^[16,90,117]

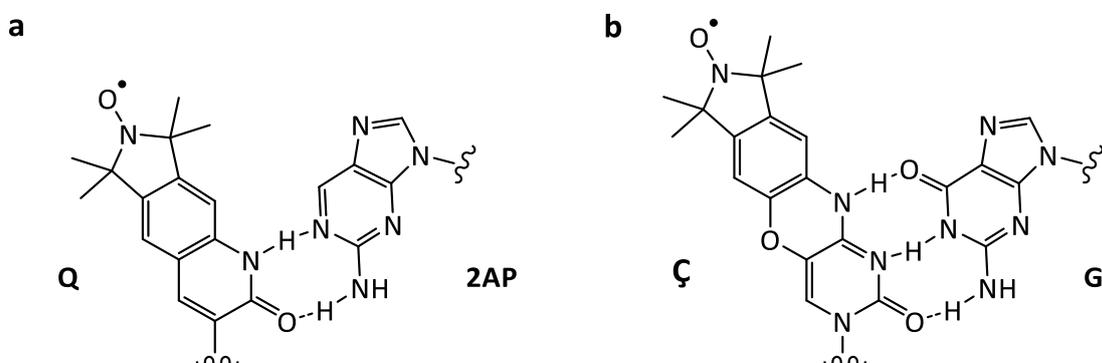
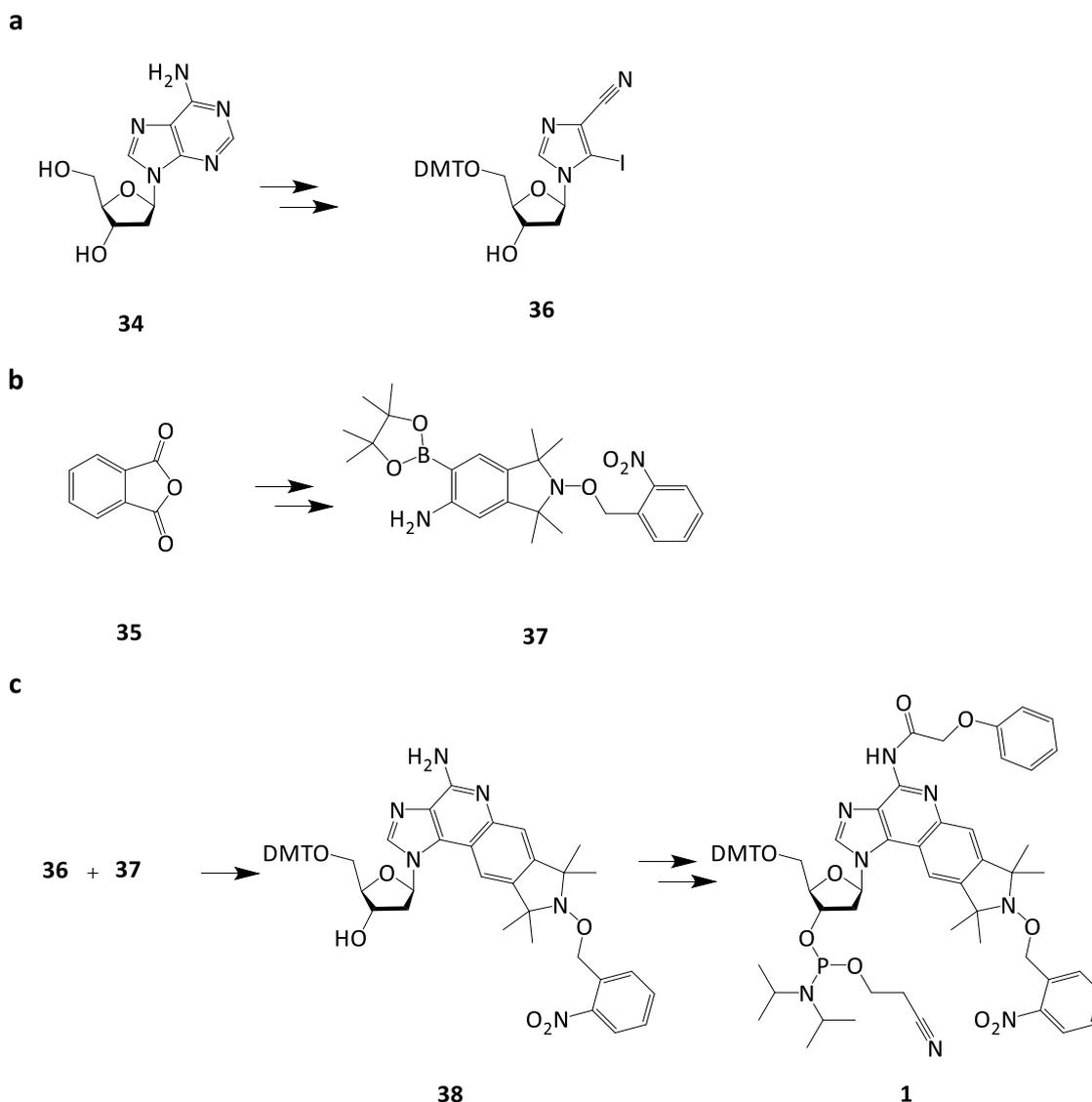


Abbildung 13: (a) Der starre Spin-Label **Q** mit seinem Basenpartner **2AP**.^[115] (b) Der starre Spin-Label **Ç** mit seinem Basenpartner **G**.^[117]

3. Aufgabenstellung

Die EPR-Spektroskopie stellt sich immer mehr als wichtige Methode zur Untersuchung von lokalen Dynamiken in Biomakromolekülen heraus.^[97] Da die meisten Biomoleküle kein paramagnetisches Zentrum besitzen, müssen zur Analyse Radikale als Sonden in das Molekül integriert werden.^[8] Die gängigste Variante hierfür ist die Anwendung eines Nitroxid-Radikals (**Abbildung 6 c**). Da starre Nitroxide weniger unabhängige Bewegung vom Zielbiomolekül aufweisen und hierdurch eine akkuratere Messung des Abstands und der Orientierung zwischen den Spin-Labeln aufweisen^[13] war es Ziel dieser Arbeit, einen starren Nitroxid-Spin-Label herzustellen. Dieser sollte später für EPR- und Schmelzpunktmessungen in eine RNA eingebaut werden. Als Grundgerüst wurde jedoch ein DNA-Gerüst verwendet, da nach Kankia *et al.* dies keine nennenswerte Auswirkung auf die Konformation der RNA hat.^[17] Aufgrund der Instabilität des Radikals während der Festphasensynthese war die Einführung einer Schutzgruppe notwendig. Anhand der bestehenden Forschung aus dem AK Göbel bezüglich Radikalschutzgruppen^[52] wurde sich bei dieser Arbeit für eine photolabile Schutzgruppe entschieden, da diese während der Synthese einfach zu handhaben und mittels Lichteinstrahlung leicht abzuspalten ist. Auf Basis nicht veröffentlichter Arbeiten aus dem Arbeitskreis Göbel wurde ein Adenosin-Derivat **A** (**Schema 5 c**) mit vier Methylresten als Zielmolekül ausgewählt. Die kommerziell leicht erwerbbaaren Substanzen Desoxyadenosin (**34**) und Phthalsäureanhydrid (**35**) dienen als Ausgangsstoffe dieser Synthese (**Schema 5 a/b**). Nach mehreren Stufen sollte der Zuckerbaustein **36** und der Isoindolinbaustein **37** über eine Suzuki-Reaktion und intramolekularer Zyklisierung gekuppelt und anschließend zum Spin-Label **1** funktionalisiert werden (**Schema 5 c**).^[118–120]

3. Aufgabenstellung

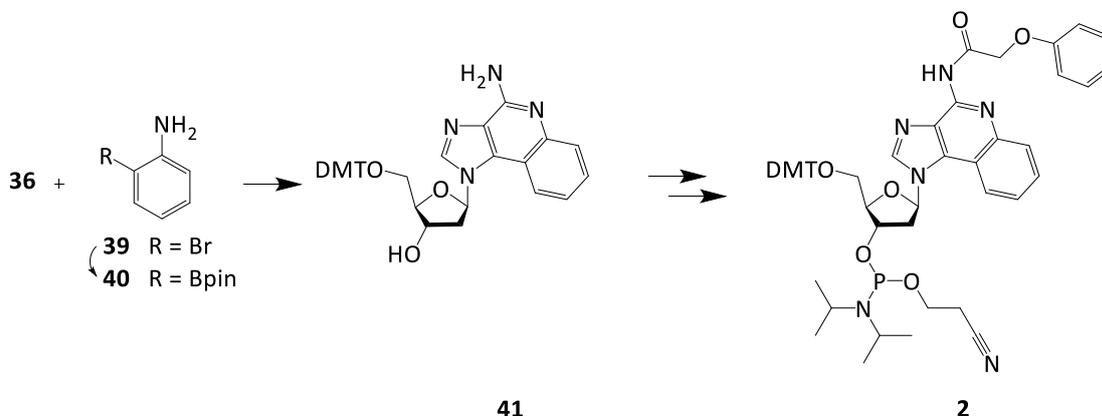


Schema 5: (a) Darstellung des Zuckerbausteins **36** aus Desoxyadenosin (**34**) über mehrere Stufen. (b) Darstellung des Isoindolinbausteins **37** aus Phthalsäureanhydrid (**35**) über mehrere Stufen. (c) Suzuki-Kupplung von **36** und **37** zum Adenosin-Derivat **38** und anschließende Funktionalisierung zum Spin-Label **1**.

Der Vollsynthese des Spin-Label **1** sollte die Synthese des Spin-Label **2** vorangestellt werden (**Schema 6**). Bei dieser sollte der Isoindolinbaustein **37** durch das kommerziell leicht erwerbbaare Edukt 2-Bromanilin ersetzt werden. Dieses sollte über eine Miyaura-Borylierung funktionalisiert, über eine Suzuki-Reaktion und intramolekularer Zyklisierung mit dem Zuckerbaustein **36** gekuppelt und anschließend zum Spin-Label **2** funktionalisiert werden. Diese verkürzte Synthese sollte als Testreaktion für die sensiblen Borylierungs- und Kreuzkupplungsschritte dienen. Da Spin-markierte Nukleotide im Vergleich zu natürlichen Nukleotiden zudem eine Verringerung der

3. Aufgabenstellung

Duplex-Stabilität erzeugen könnten, sollte anhand des Spin-Labels **2** zusätzlich über Schmelzpunktmessungen der Duplexe die Stabilität dieser gemessen werden.



Schema 6: Borylierung des Bromanilins **39** zum Borolan **40** und nachfolgende Suzuki-Kupplung von **36** und **40** zum Adenosin-Derivat **41** mit anschließender Funktionalisierung zum Spin-Label **2**.

Die Stabilitätstests sollten bei Schmelzpunktabweichung der modifizierten Duplexe vom natürlichen Duplex Hinweise über die möglichen Probleme liefern. Für die Stabilitätstests sollte der modifizierte DNA-Strang mit dem Spin-Label **2** einmal mit einem RNA-Gegenstrang (A-Form) und einmal mit einem DNA-Gegenstrang (B-Form) gepaart und der Schmelzpunkt mit dem des unmodifizierten Stranges verglichen werden. Zusätzlich sollte die Schmelzpunkt der Duplexe, welcher mit dem Spin-Label **A** modifiziert worden war, gemessen und mit den **2** modifizierten Strängen verglichen werden. Hierbei wären drei Arten möglicher sterischer Repulsion potentiell zu erwarten (**Abbildung 14**): 1) Eine Kollision des Benzolrings mit der 2'-CH₂-Gruppe, welche insbesondere in der B-Form, also im Duplex mit DNA, zu erwarten wäre (**Abbildung 14 a**). 2) Eine Repulsion innerhalb des Basenpaars, da die Aryl-C-H-Gruppe trotz positiver Partialladung kein zu NH gleichwertiger H-Brücken Donor sein könnte (**Abbildung 14 b**). 3) Sterische Probleme mit den Methylresten, welche erkennbar durch eine zusätzliche Destabilisierung nach Einbau des Spin-Labels **A** wären (**Abbildung 14 c**).

3. Aufgabenstellung

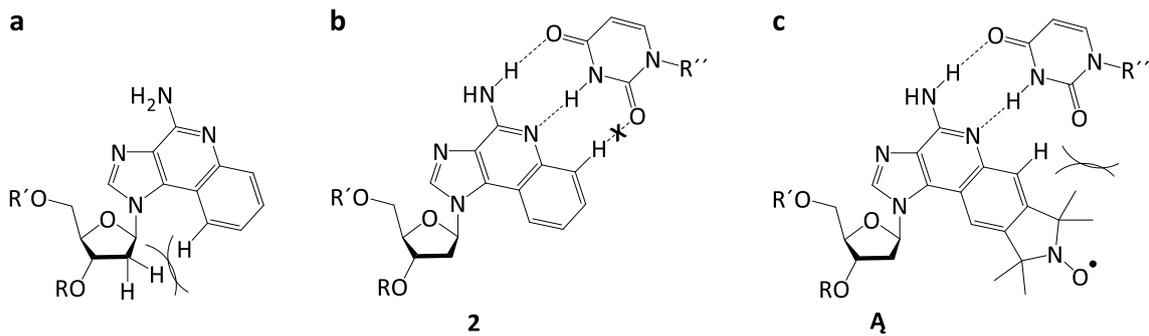
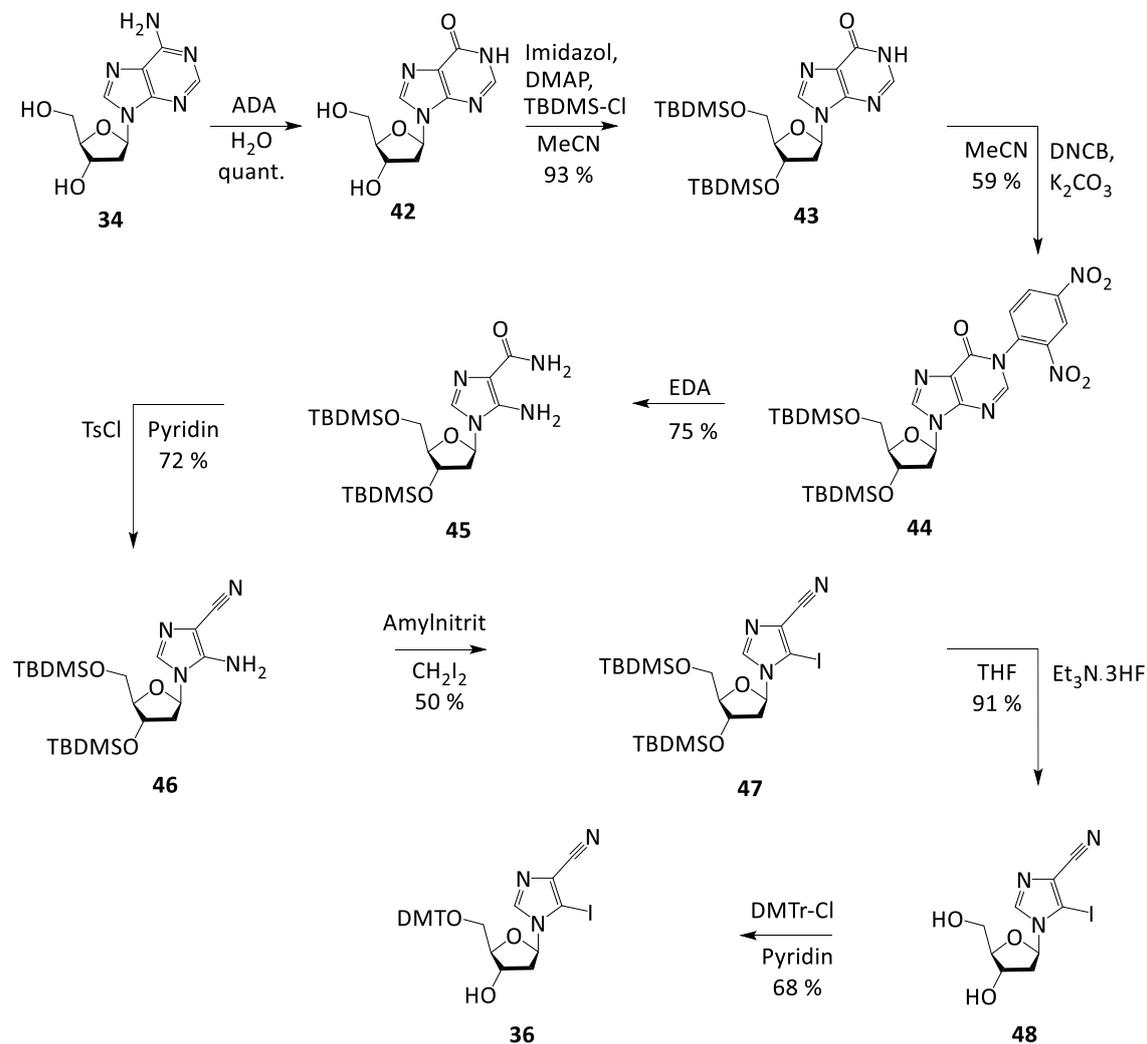


Abbildung 14: (a) Abstoßung zwischen dem 2'-H des Zuckers und dem Ar-H der Base. (b) Abstoßende Wechselwirkung zwischen dem Ar-H der Base des **2** und der Partnerbase, anstatt attraktiver Wechselwirkung. (c) Repulsion zwischen den Methylresten des Spin-Label **A** und der Partnerbase.

4. Ergebnisse und Diskussion

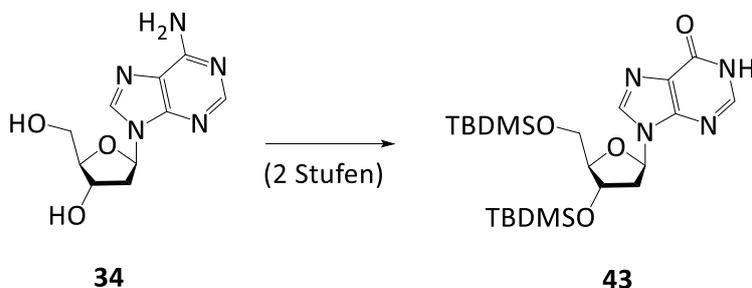
4.1. Syntheseroute des Iod-Nitril-Nukleosids **36**

Schema 7: Syntheseroute zum Iod-Nitril-Nukleosid **36**.

Adenosin-Desaminase setzte Desoxyadenosin (**34**) quantitativ zum Desoxyinosin **42** um. Nach der Schützung der zwei Hydroxygruppen mit TBDMS-Cl zu **43** und Aktivierung der Nucleobase **44** an Position 1 mit 2,4-Dinitrochlorbenzol, bildete sich über eine Ringöffnung des **44** das Carboxamid **45** aus. Dieses wurde zum Nitril **46** und danach zum Iodid **47** für die kommende Suzuki-Kupplung funktionalisiert. Nach der basischen Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen wurde der Zucker **48** an der 5'-Hydroxygruppe mit DMTr-Cl geschützt und das finale Iod-Nitril-Nukleosid **36** gebildet (Schema 7).

4. Ergebnisse und Diskussion

Der Kernschritt der Synthese des Phosphoramidits **A** beruht auf der Kupplungsreaktion zwischen dem Isoindolinborolan **37** und dem Iod-Nitril-Nukleosid **36** mittels einer Suzuki-Reaktion und anschließender intramolekularer Zyklisierung (**Schema 5 c**). Die Darstellung dieser zwei Reaktanten erfolgte aus kostengünstigen Startverbindungen in großen Maßstäben.



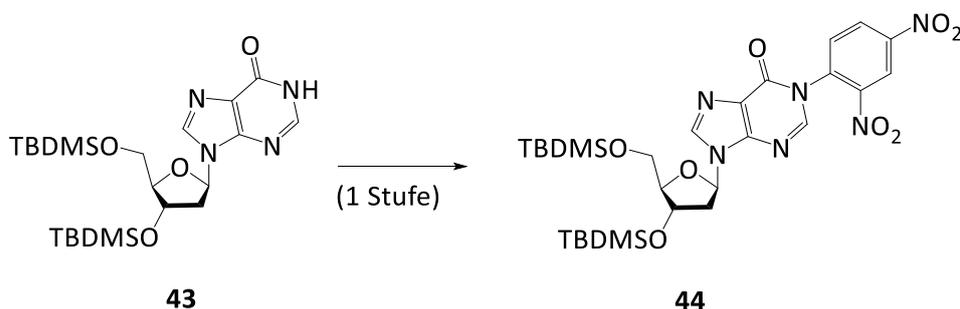
Schema 8: Synthese von **43** ausgehend von **34**.

Für **36** wurde Desoxyadenosin (**34**) als Ausgangssubstanz gewählt, welches in einer quantitativen Reaktion durch wenige Mikrogramm des Enzyms Adenosin-Desaminase in Ansätzen bis zu 25 g ohne erforderliche Reinigungsschritte zum Desoxyinosin (**42**) umgesetzt wurde. Um Produktverlust zu verhindern wurde hierbei die Reaktion in einem tarierten Kolben durchgeführt und das Reaktionsmedium Wasser zunächst bei 60 °C am Rotationsverdampfer und im Anschluss an der Vakuumpumpe für 1–2 Tage entfernt. Diese enzymatische Reaktion stellt eine hocheffiziente und empfehlenswerte Methode zur Darstellung von **42** dar. Bei kleineren Ansatzgrößen von unter 5 g kann sogar auf diese enzymatische Umwandlung verzichtet werden, da Desoxyinosin (**42**)^[121] bei solchen Mengen einen ähnlichen Einkaufspreis wie Desoxyadenosin (**34**)^[122] hat und dadurch Zeit, Energie und Kosten gespart werden können.

Die milde Silylierung der Hydroxygruppen des Desoxyinosin (**42**) mit *tert*-Butyldimethylchlorsilan bei Raumtemperatur über Nacht zum Silylether **43** erfolgte in Ansätzen bis zu 23 g mit Ausbeuten von 93 %. Dies war nötig um die Hydroxygruppen vor den weiteren Reaktionsschritten zu schützen und jedwede Nebenreaktionen zu vermeiden. Bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches am Rotationsverdampfer musste auf ein Vermindern des Druckes in kleinen Schritten geachtet werden, da durch die Schaumbildung ein Siedeverzug innerhalb der Apparatur möglich war, welcher zu Ausbeuteverlust führen konnte. Vereinzelt waren nach dem Auswaschen des

4. Ergebnisse und Diskussion

Reaktionsgemisches mit wässriger, 5 %iger Zitronensäure-Lösung noch Spuren des Reagenz Imidazol im Gemisch nachzuweisen, welche unter den verwendeten Bedingungen zur säulenchromatographischen Aufreinigung nicht abgetrennt werden konnten. Daher wurde vor der Säulenchromatographie ein $^1\text{H-NMR}$ aufgenommen um jedwede Imidazol-Spuren zu entdecken und in diesen Fällen die organische Phase mit wässriger, 10 %iger Zitronensäure-Lösung nochmals zu waschen. Hierdurch wurde eine lösungsmittelintensive und zeitaufwendige Säulenchromatographie vermieden, welche keine Imidazol-Abtrennung zur Folge gehabt hätte.



Schema 9: Synthese von **44** ausgehend von **43**.

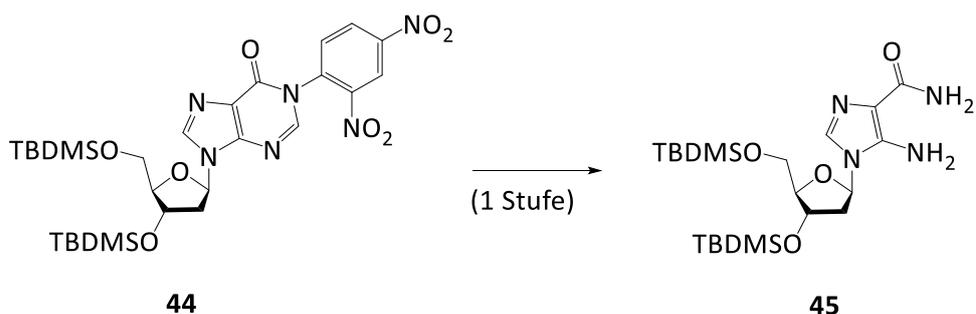
Als Vorbereitung auf die anschließende Ringöffnung wurde über eine nukleophile Substitution am 2,4-Dinitrochlorbenzol durch **43** das tertiäre Amin **44** gebildet.^[12,123] Bei dieser Reaktion kam es erstmals zu Problemen aufgrund maximaler Ausbeuten von nur 59 % und heftigen dermalen Reaktionen der Hände bei Kontakt mit dem Reaktionsgemisch. Im Gegensatz zu der säulenchromatographischen Reinigung während der Masterarbeit^[12] von *Alexander Kaiser* mit einem Lösungsmittelwechsel von DCM auf cHex/EE, wurde während der Dissertation nur das Laufmittelgemisch cHex/EE in einem unpolaren Verhältnis verwendet. Hierdurch konnte ein möglicher Säulenbruch während der Reinigung durch die Wärmeentwicklung^[124] beim Wechsel der Laufmittel vermieden werden. Das neue unpolare Laufmittelgemisch führte weiterhin zu sauberen Proben. Eine Adsorption des Reaktionsgemisches auf Kieselgel bei den verwendeten Reaktionsansätzen führte nicht zu trockenem, auftragbarem Kieselgel und das Packen der Säule wurde erschwert. Daher musste das ölige Reaktionsgemisch langsam, in wenig EE, auf die Säule aufgetragen werden. Hierbei durfte nicht zu viele EE verwendet werden, um die Separation der Verbindungen weiterhin zu gewährleisten. Vereinzelt kam es zu einem grünem Nebenprodukt, welches mit dem Produkt auf der

4. Ergebnisse und Diskussion

Säule lief und nicht abgetrennt werden konnte. In diesen Fällen wurde das Produktgemisch nach einmaliger säulenchromatographischer Reinigung weiter umgesetzt und in den Folgeschritten gereinigt. Bei Hautkontakt mit dem Reaktionsgemisch kam es nach wenigen Tagen zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch Bildung von dyshidrotischen Ekzemen an der ganzen Hand (**Abbildung 15**), die erst mit der Zeit nach Einsatz von entzündungshemmenden Salben abklagen. Um zu extreme Reaktionen und damit verbundenen Arbeitsausfall zu verhindern, wurden zwei Nitrilhandschuhe übereinander getragen und die Kontaktdauer mit der Substanz auf ein Minimum reduziert. Welche Verbindung explizit in dem Gemisch die Ekzeme ausgelöst hatte, war nicht zu ermitteln.

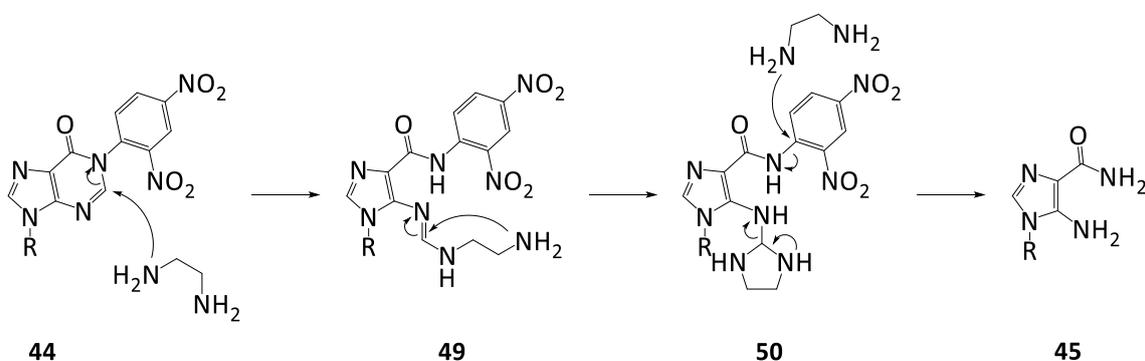


Abbildung 15: Reaktion der Hände unter Ausbildung von Ekzemen nach Kontakt mit dem Reaktionsgemisch der nukleophilen Substitution.



Schema 10: Synthese von **45** ausgehend von **44**.

Die 2,4-Dinitrochlorbenzol-Gruppe besitzt einen stark elektronenziehenden Charakter,^[125] durch welchen es möglich war, die Ringöffnung zum Carboxamid **45** mit Ausbeuten bis zu 75 % durchzuführen. Diese Reaktion lieferte die Möglichkeit mit einem moderaten Zeitaufwand von 3 Std. die für die weitere Funktionalisierung benötigten Carboxid- und Aminogruppe in moderater Ausbeute darzustellen. Hierbei spielte die Ringöffnung mit Ethylendiamin eine zentrale Rolle, da nur mit diesem die Ringöffnung mit anschließender Bildung des Carboxamids **45** erfolgte (**Schema 11**).^[126] Hierbei bildete sich durch den Diamin-Angriff am C² das Intermediat **49** aus, welches zum Tetrahydroimidazoladdukt **50** cyclisierte und unter Eliminierung von Dihydroimidazol und DNP das Ringöffnungsprodukt **45** bildete.^[127]

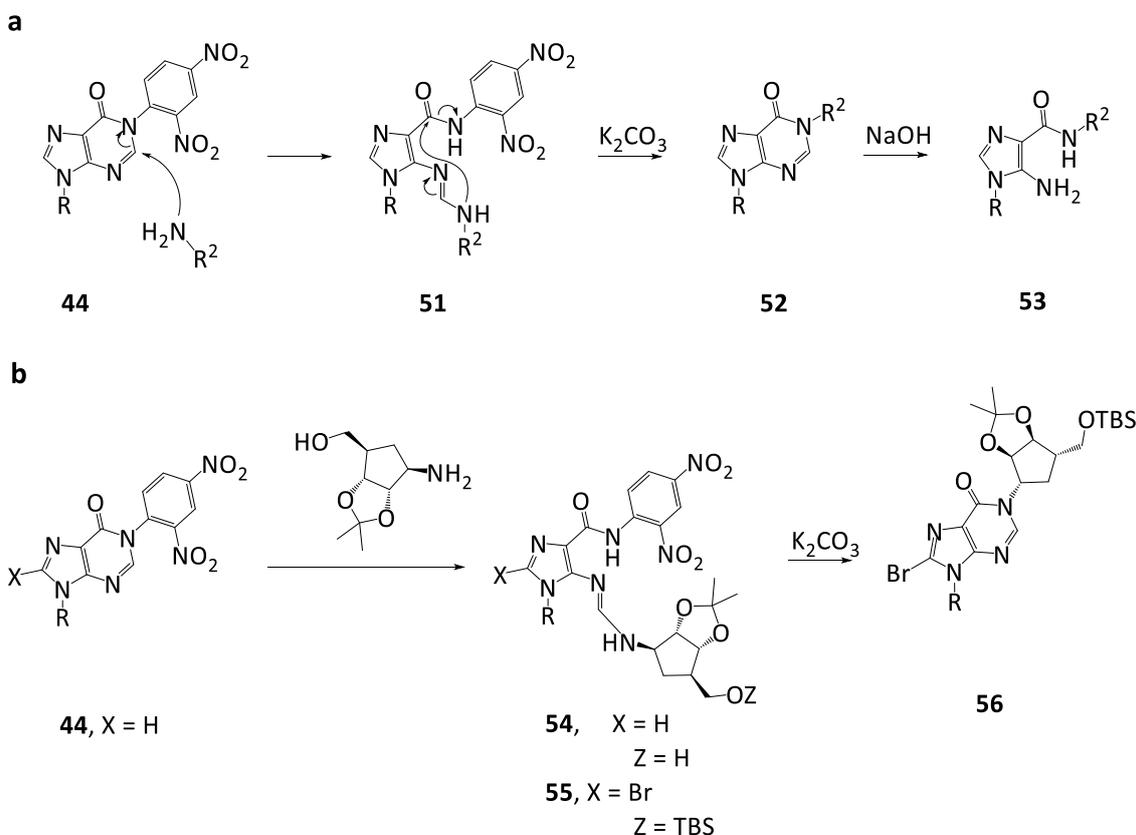


Schema 11: Mechanismus der Ringöffnung und Darstellung des Carboxamids **45** ausgehend vom Hypoxanthin **44** nach Leškovskis *et al.*^[127]

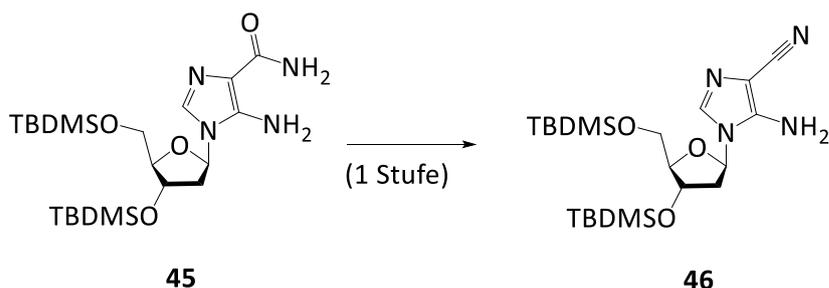
Die Verwendung von Alkylaminen hingegen bildet das N-1-Alkylinosin **52** aus, welches durch Behandlung mit NaOH in das 4N-Alkyl **53** überführt werden kann (**Schema 12 a**).^[125] Größere Alkyl-Reste verhindern einen erneuten Ringschluss zu N-1-Alkylinosinen und bilden das Ringöffnungsprodukt **54**, welches, wie Fukuoka *et al.* zeigten, z. B. zur Bromverbindung **55** funktionalisiert werden kann, bevor ein Ringschluss

4. Ergebnisse und Diskussion

zum N-1-Alkylinosin **56** durch K_2CO_3 , unter DNP-Abspaltung induziert werden kann (Schema 12 b).^[123]



Schema 12: Verwendung alternativer Alkylamine zur Ringöffnung des Hypoxanthin **44**. (a) Angriff des Alkylamins auf **44** bildet über das Intermediat **51** das N-1-Alkylinosin **52** aus und mit NaOH das 4N-Alkyl **53** nach Leškovskis *et al.*^[125,127] (b) Größere Alkylreste verhindern den Ringschluss und bilden das Ringöffnungsprodukt **54**, welches nach Fukuoka *et al.* zur Bromverbindung **55** funktionalisiert werden kann, um mit K_2CO_3 das N-1-Alkylinosin **56** auszubilden.^[123]

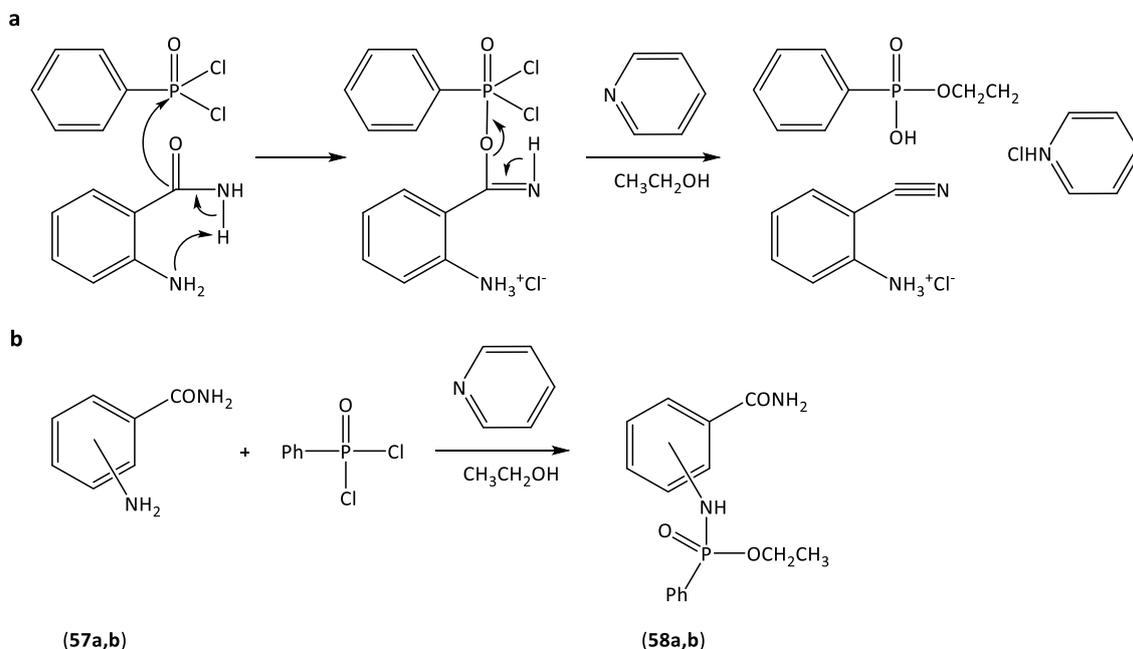


Schema 13: Synthese von **46** ausgehend von **45**.

Die Umsetzung des Carboxamids **45** zum Nitril **46** verlief gut mit einer akzeptablen Ausbeute von 72 %. Basierend auf den Arbeiten von Munegumi *et al.* könnte die Aminogruppe chemoselektiv wirken und die Umsetzung des 2-Aminobenzamid **45** zum 2-Aminonitril **46** durch seinen basischen Charakter unterstützen.^[128] Das Amin könnte hierbei ein Proton der benachbarten Amidgruppe übernehmen und so, am Beispiel des

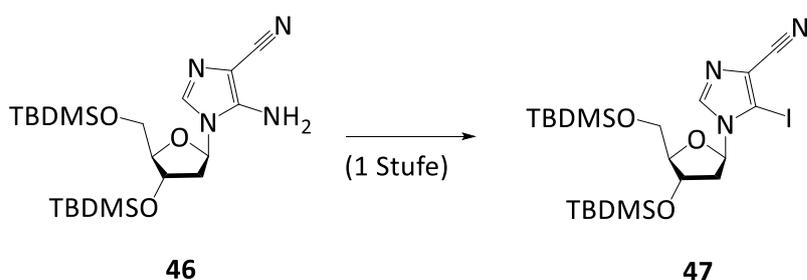
4. Ergebnisse und Diskussion

P,P-Dichlorphenylphosphinoxid die Bildung der P-O-Bindung begünstigen (**Schema 14 a**). Unterstützend zu dieser These zeigten Munegumi *et al.* dass 3- und 4-Aminobenzamide (**57a,b**) nicht zum Nitril umgesetzt werden, sondern ein Phosphonylamid (**58a,b**) bilden (**Schema 14 b**).



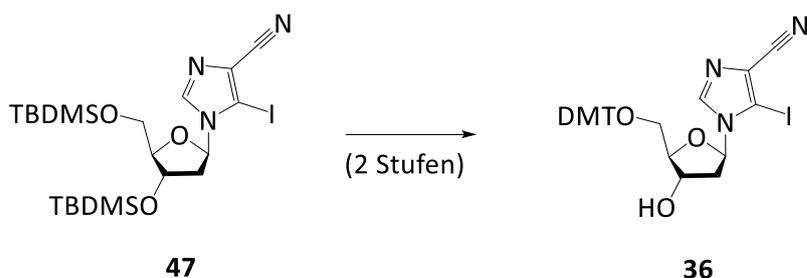
Schema 14: Experimente zum Verhalten von Aminobenzamiden mit P,P-Dichlorphenylphosphinoxid von Munegumi *et al.*. **(a)** Möglicher Mechanismus des 2-Aminobenzamid mit P,P-Dichlorphenylphosphinoxid und Umsetzung zum Nitril durch den unterstützenden, basischen Charakter der Aminogruppe. **(b)** Umsetzung von 3- und 4-Aminobenzamid (**57a,b**) mit P,P-Dichlorphenylphosphinoxid zu den Phosphonylamiden **58a,b**.^[128]

Das Pyridin, welches zum Puffern des entstehenden Chlorwasserstoffs benötigt wurde, konnte vor der säulenchromatographischen Reinigung durch Koevaporierung mit Toluol entfernt werden, was diese vereinfachte.



Schema 15: Synthese von **47** ausgehend von **46**.

In der Masterarbeit von *Alexander Kaiser* wurde das Iodid **47** aus dem Amin **46** durch eine Sandmeyer-ähnliche Reaktion dargestellt.^[12] Hierbei ergaben sich jedoch nur Ausbeuten von bis zu 16 % und der Einsatz des DIM/Iod-Gemisches erhöhte den Laufmittelumsatz der Säule um ca. 20 L, da dieses erst sehr unpolar abgetrennt werden musste. Aus diesem Grund sollte im Laufe dieser Arbeit eine neue Vorschrift erarbeitet werden um diesen Schritt effizienter und grüner zu machen. Das in der Masterarbeit verwendete Lösungsmittel DCM wurde, orientiert an den Arbeiten von *Erlacher et al.*, komplett weggelassen und die Reaktion in reinem Diiodmethan gerührt.^[129] Hierdurch konnte eine höhere Reaktionstemperatur von 100 °C erreicht werden, was durch die geringe Löslichkeit desamins **46** in Diiodmethan auch nötig war. Sobald sich **46** bei 100 °C gelöst hatte, wurde dem Reaktionsgemisch langsam Isopentylnitrit hinzugeführt und das Gemisch bei dieser Temperatur gerührt. Nach der Reaktion konnte das DIM nicht abdestilliert werden, weshalb das gesamte Reaktionsgemisch langsam auf die Säule aufgetragen wurde. Hierbei war ein langsames Auftragen sehr wichtig, da das Gemisch durch die hohe Dichte^[130] des DIM die Kieselgelgrenze sehr leicht unterlief und so eine Trennung erschwerte. Sobald das gesamte Gemisch aufgetragen war, wurde das DIM mit den entstandenen Iodresten langsam mit dem Laufmittelgemisch DCM/cHex 1:1 abgetrennt. Unter diesen unpolaren Bedingungen blieb das Produkt auf der Baseline der Säule liegen und das DIM-Iod-Gemisch war bereits nach ca. einem halben Liter abgetrennt, was sehr gut an der Violett-färbung der Laufmittelfront zu erkennen war. Sobald DIM und Iod abgetrennt waren, wurde für die eigentliche Säule auf das Laufmittelgemisch cHex/EE gewechselt, wobei auch hier der Laufmittelwechsel nur langsam ohne Druck geschehen durfte, da sonst ein Säulenbruch entstand. Durch die angepasste Vorschrift konnte die Ausbeute dieses Schrittes von 16 % auf akzeptable 50 % erhöht und der Lösungsmittelverbrauch drastisch gesenkt werden.



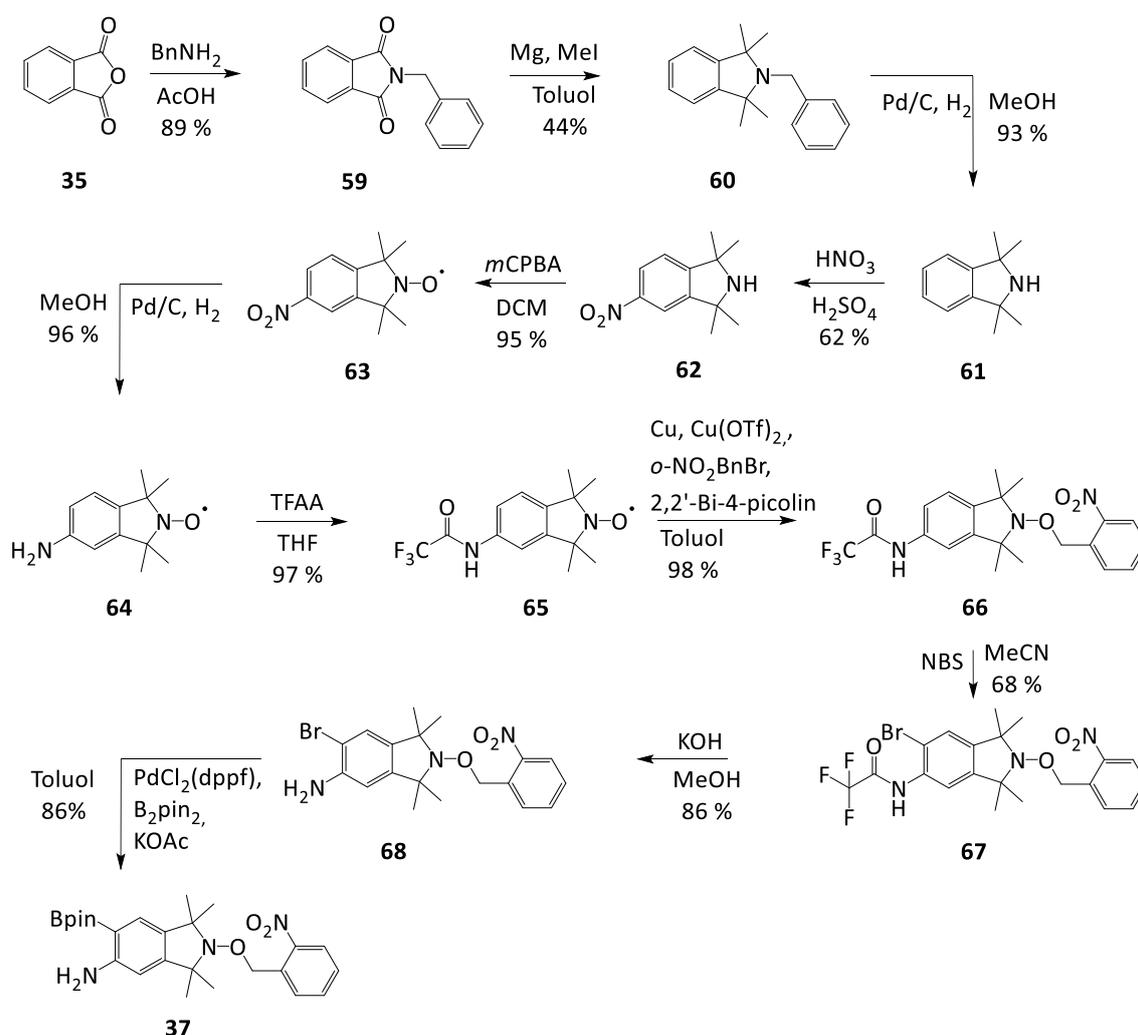
Schema 16: Synthese von **36** ausgehend von **47**.

Die wohlbekanntes Silyletherabspaltung^[131] der TBDMS-Schutzgruppe mit $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ Addukt zum Produkt **48** verlief wie in der Masterarbeit^[12] mit 91 % Ausbeute nahezu quantitativ ohne Vorkommnisse. Bei der Auftragung des Reaktionsgemisches auf das Silicagel musste darauf geachtet werden, dass das überschüssige HF nicht zu heftig mit diesem reagierte. Da sich zudem ein UV inaktives Nebenprodukt bildete, wurden die DC-Platten zusätzlich in einem Iodbad kontrolliert.

Als Vorbereitung auf die Festphasensynthese wurde der Zucker **48** an der 5'-Position selektiv mit der DMT-Schutzgruppe unter Bildung von **36** trityliert. Die Selektivität dieser Reaktion kam hierbei durch die große sterische Hinderung der DMT-Schutzgruppe und die höhere Reaktivität des primären Alkohols.

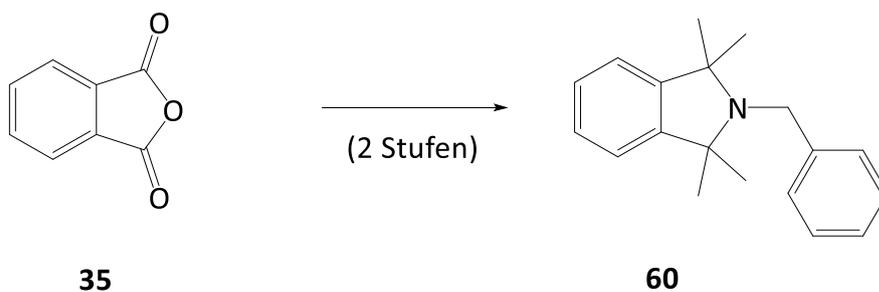
Bei der Aufarbeitung musste darauf geachtet werden, das Produkt keinen Temperaturen über $30\text{ }^\circ\text{C}$ auszusetzen, da sonst das Gleichgewicht des schwach sauren HCl-Pyridin-Puffers gestört werden würde, was zur Freisetzung von HCl geführt hätte, welche u. a. die Schutzgruppe wieder abspalten könnte. Daher wurde auch die Neutralisation mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung in einem Wasserbad durchgeführt, da es hierbei zur Wärmeentwicklung kam. Für die säulenchromatographische Aufarbeitung musste das saure Silicagel mit NEt_3 deaktiviert und das Reaktionsgemisch leicht verdünnt auf die Säule aufgetragen werden. Eine Adsorption des Gemisches auf das Silicagel zum Auftragen führte, selbst bei deaktiviertem Kieselgel, zu hohem Ausbeuteverlust.

4.2. Syntheseroute des Borolan-Amin-Isoindolin 37



Schema 17: Syntheseroute zum Borolan-Amin-Isoindolin 37.

Phthalsäureanhydrid (**35**) wurde mit Benzylamin (**39**) zu **59** umgesetzt und die Carbonylgruppen über eine Grignard-Reaktion vierfach methyliert. Nach der Hydrierung des geschützten Amins **60** zu **61** wurde mittels HNO_3 eine Nitrogruppe an Position 5 eingeführt und durch die Umsetzung von **62** mit *m*CPBA das Radikal **63** erzeugt. Die Nitrogruppe wurde anschließend vorsichtig unter Bildung des Amins **64** hydriert und mit TFAA geschützt. **65** wurde zur Kupplung der photolabilen Schutzgruppe mit 2-Nitrobenzylbromid umgesetzt und anschließend zu **67** bromiert. Nach der Bildung des Amins **68** in basischem Milieu, wurde im letzten Schritt über eine Miyaura Borylierung das Borolan **37** dargestellt (**Schema 17**).



Schema 18: Synthese von **60** ausgehend von **35**.

Die Darstellung des Phthalimids **59** nach der Literaturvorschrift^[12,102] aus den preiswerten Edukten Phthalsäureanhydrid (**35**) und Benzylamin (**69**) erfolgte in Ansätzen bis zu 55 g mit einer Ausbeute von 89 %. Die Aufarbeitung erwies sich als sehr einfach, durch die Präzipitation des Produkts unter Kühlung in einem Eisbad und anschließender Umkristallisierung aus EtOH. Besonders durch die gute Löslichkeit der als Lösungsmittel verwendeten Essigsäure in Ethanol, erwies sich die Umkristallisation als ideale Aufreinigungsmethode.

Die Darstellung des Tetramethylisoindolins **60** erfolgte über eine Grignard-Reaktion an den Carbonylgruppen des Phthalimids **59**.

Das Grignard-Reagenz wurde durch die tropfenweise Zugabe des Iodmethans, gelöst in Et₂O, zu Mg-Spänen in situ dargestellt und vorgelegt. Hierbei musste einer Schaumbildung entgegengewirkt werden, da sonst zu viel Mg aus der Lösung entfernt werden würde, was wiederum die Ausbeute verringern könnte. Für eine optimale Umsetzung refluxierte das Gemisch für 60 Minuten. Während bei dem Tetraethylanalogon in diesem Schritt für eine erhöhte Ausbeute Bromethan hinzugegeben wurde^[12], führte eine erneute Zugabe von Iodmethan, nach Start der Grignard-Reagenzbildung, zu einem nicht abtrennbaren Nebenprodukt mit teils Ethylseitenketten anstatt Methyl (**Abbildung 16**).

4. Ergebnisse und Diskussion

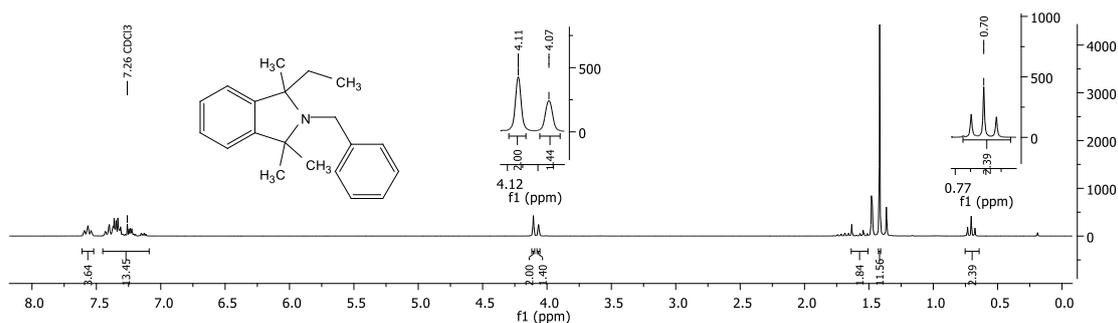
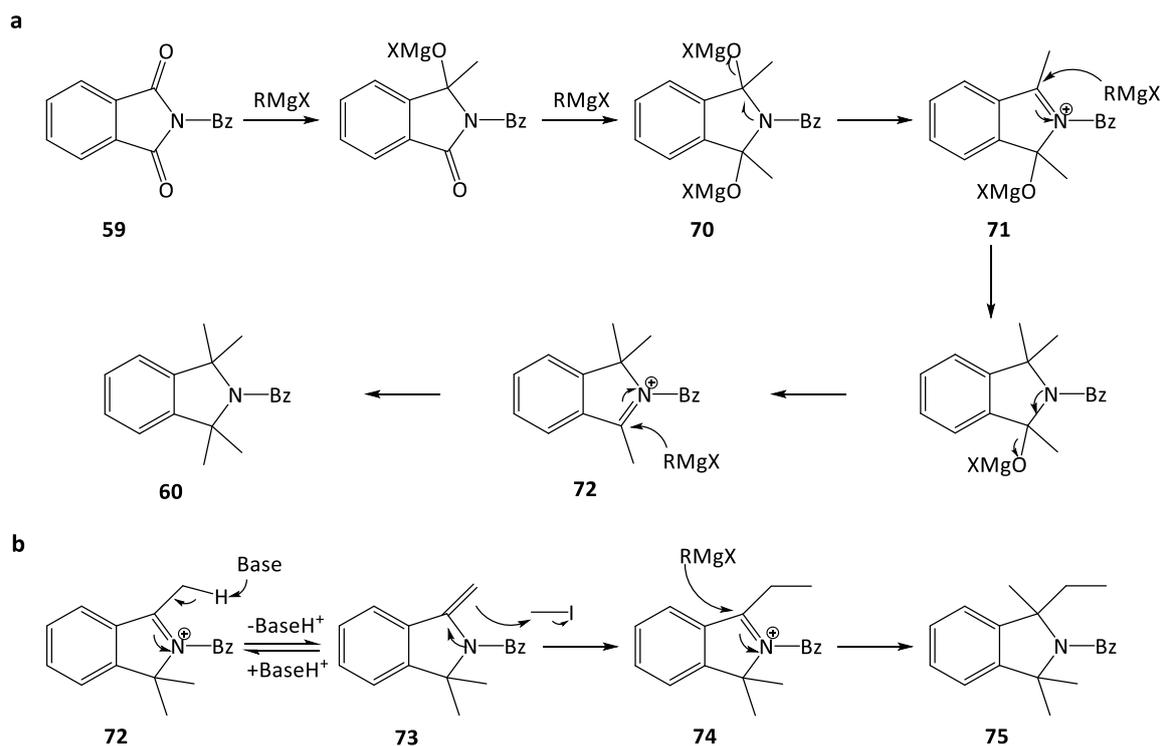


Abbildung 16: NMR-Spektrum des Produktgemisches nach zusätzlicher Zugabe von Iodmethan. Ein doppelter Satz von Singulets bei 4.11 ppm und 4.07 ppm und ein Triplet bei 0.70 ppm sprechen für die Bildung eines zweiten Produkts mit Ethylresten anstatt Methyl.

Im NMR-Spektrum des Produktgemisches ist zu erkennen, dass sich eine Verdopplung der Signale ergibt, besonders zu sehen bei 4.11 ppm und 4.07 ppm, an welchen normalerweise nur ein einzelnes Singulett für das CH₂ sein sollte. Ein Hinweis darauf, dass sich eine Ethylgruppe ausgebildet hat, liefert das Triplet bei 0.70 ppm, welches die CH₃-Gruppe des Ethyls in Wechselwirkung mit seinem CH₂ Nachbarn aufzeigt.

Die Darstellung von **60** benötigt hohe Reaktionstemperaturen aufgrund der sterischen Hinderung während der vierfachen Umsetzung mit dem Magnesiummethyljodid.^[132] Hierzu wurde der Ether über eine Dean-Stark-Apparatur durch Toluol ersetzt. Mit einem Destillationsthermometer wurde darauf geachtet, dass jedwede Reste an Ether entfernt worden sind, da diese einen Ausbeuteverlust bedeuteten hätten. Das Imid **59**, gelöst in heißem Toluol, wurde anschließend schnell zu dem Grignard-Reagenz hinzugegeben, da eine langsame Zugabe der Phthalimid-Lösung zur Präzipitation eines nicht mehr löslichen Feststoffes an der Wand des Kolbens führte.

4. Ergebnisse und Diskussion



Schema 19: (a) Möglicher Mechanismus der vierfachen Grignard-Reaktion nach Jayawardena *et al.*^[132] (b) Möglicher Mechanismus zur Bildung des Ethyl-Methyl-Nebenprodukts.

Auch wenn diese Reaktion des vierfachen Grignard über 30 Jahre alt ist und von vielen Gruppen auf der Welt verwendet wird, wurden noch nicht viele Mühen unternommen den Mechanismus aufzuklären. Der bisher akzeptierte, und von Jayawardena *et al.* postulierte Mechanismus (**Schema 19 a**) könnte jedoch zur Klärung der Bildung des Ethyl-Methyl-Nebenprodukts herangezogen werden.^[132] Im Mechanismus bildet sich zuerst unter Addition eines Äquivalents Methylmagnesiumhalogenid an einer der Carbonylgruppen des Imid, gefolgt von der Addition des zweiten Äquivalents an der gegenüberliegenden Carbonylgruppe das Bis-Alkoxid Zwischenprodukt **70**. Dieser bevorzugte Angriff der Alkylmagnesiumhalogenide an den Positionen 1 und 3 des Fünfrings wurden von Braslau *et al.* beobachtet, als sie N-Benzylphthalimid zuerst mit zwei Äquivalenten MeMgBr und anschließend vier Äquivalenten PhMgBr behandelten.^[133] Durch die Eliminierung von OMgX bildet sich das Imin **71** aus, welches mit weiteren Methylmagnesiumhalogeniden reagiert und über ein weiteres Iminiumionintermediat **72** das Tetramethylgrignardprodukt **60** bildet.^[132]

Der hypothetische Mechanismus in **Schema 19 b** könnte die Bildung des Ethylrest erklären. Hierbei würden die Methylgruppen des **72** stetig in einem deprotonierten und protonierten Gleichgewicht sein, begründet durch die Wechselwirkung mit dem stark

basischen Charakter des Grignard-Reagenzes. Nicht umgesetztes Methylidid, was durch die erneute Zugabe von Methylidid zusätzlich vorhanden wäre, könnte nun von dem Nukleophil **73** angegriffen werden und eine Kettenverlängerung zum Ethylrest durchführen. Anschließend würde sich wie im akzeptierten Mechanismus von Jayawardena *et al.* durch erneute Reaktion mit dem Methylmagnesiumhalogenid das Ethyl-Methyl-Nebenprodukt **75** ausbilden.

Nach dem Refluxieren, Entfernen der Hälfte des Volumens und Zugabe von *n*-Hexan kühlte das Gemisch ab und wurde bei 0 °C langsam mit gesättigter NH₄Cl-Lösung versetzt. Hierdurch reagierten jegliche Magnesium- und Grignard-Reagenz-Reste kontrolliert ab und es bildete sich eine Phasengrenze aus, welche beim Abdekantieren der *n*-Hexan-Phase sehr hilfreich war.

Die organische Lösung wurde danach noch gefiltert, da sich sonst unlöslicher Feststoff auf der Säule für die säulenchromatographische Aufreinigung festsetzte und die Fließgeschwindigkeit des Eluenten stark verringerte.

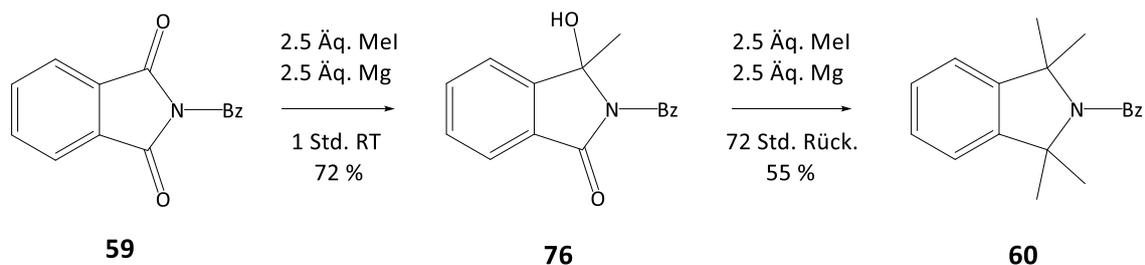
Im Gegensatz zum Tetraethylanalogon mussten sowohl die Säule als auch die Platten für die Dünnschichtchromatographie mit Triethylamin behandelt werden, da der Produktpot sonst unter der UV-Lampe nach sehr kurzer Zeit nicht mehr zu erkennen war, und so unbewusst in den Abfall hätte entsorgt werden können.

Die Ausbeute konnte insgesamt auf 44 % erhöht werden. (lit.^[134,135] 25–40 %).

Aufgrund der geringen Ausbeute wurden Alternativreaktionen ausgetestet. Angelehnt an die altbekannte Alkylierung mit MeLi^[136] wurde das Phthalimid **59** bei -40 °C in Toluol langsam mit sechs Äquivalenten einer 3.1 M MeLi-Lösung versetzt, bei dieser Temperatur eine Stunde gerührt und wärmte dann auf Raumtemperatur auf. Nach der Aufarbeitung lieferte die Dünnschichtchromatographie jedoch nur ein lilafarbenes Gemisch, welches weder Edukt, noch Produkt enthielt. Diese Testreaktion wurde daher verworfen.

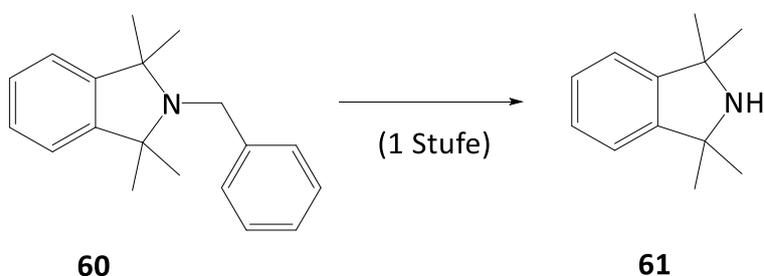
Auf Basis der Arbeiten von Jayawardena *et al.*^[132] und Haugland *et al.*^[137] wurde die Grignard-Reaktion durch eine zweistufige Synthesevorschrift testweise ersetzt. Hierbei wurde in einer einfachen Grignard-Reaktion zuerst der Alkohol **76** isoliert und anschließend in einer dreifachen Grignard-Reaktion zum Tetramethylisoindolin **60** umgesetzt (**Schema 20**).

4. Ergebnisse und Diskussion



Schema 20: Zweistufige Grignard-Alternativroute mit Ausbeuten aus eigenen Experimenten nach Haugland *et al.* über das Hydroxyamid **76**.^[132,137]

In einem kleinen Maßstab ergab diese Route eine Gesamtausbeute von 40 % eines noch unreinen Produkts. Diese Alternativroute wurde jedoch verworfen, da zum einen durch die zwei Säulen ein erhöhter Lösemittelabfall entstand und zum anderen auf diese Weise die reine Reaktionsdauer von 6 Stunden auf über 72 Stunden erhöht wurde.



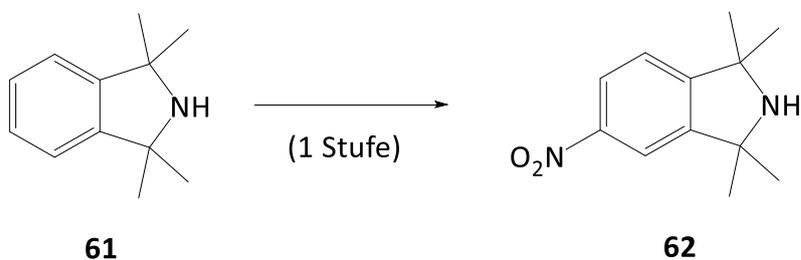
Schema 21: Synthese von **61** ausgehend von **60**.

Die Debenzylierung des Tetramethylisindolin **60** mittels Palladium-katalysierter Hydrogenolyse erfolgte in Ausbeuten bis zu 93 %.

Die nur sehr kurze UV-Aktivität von **60** auf NEt_3 unbehandelten DC-Platten, ließ ein säurelabiles Verhalten von **60** vermuten, weshalb die Hydrolyse im Gegensatz zur Literatur^[135] nicht in Essigsäure, sondern, angelehnt an die Arbeit von Mileo *et al.*^[134], in MeOH durchgeführt wurden. Hierdurch ergab sich jedoch ein verringertes Löslichkeitsverhalten von **60**. Während bei Mileo *et al.* und früheren Arbeiten meinerseits^[12] diese Reaktion in hohen Ausbeuten im Autoklaven durchgeführt wurde, limitierte die Autoklavengröße die maximale Ansatzgröße auf 1 g. Daher wurde die Debenzylierung in dieser Arbeit in einem Kolben mit H_2 -Ballon durchgeführt. Hierdurch ergab sich zwar eine erhöhte Reaktionsdauer, da nun über Nacht, anstatt für nur 3 Std. gerührt werden musste, jedoch konnte die Ansatzgröße auf 6.5 g erhöht werden. Die Ansatzgröße könnte auch weiter erhöht werden, doch müsste immer auf eine ausreichende Durchmischung der Reaktionslösung mit der H_2 -Atmosphäre durch starkes

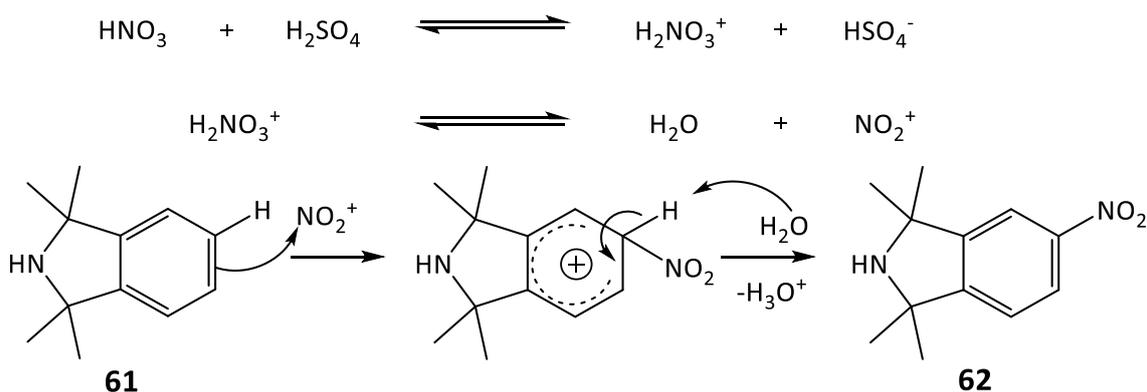
4. Ergebnisse und Diskussion

Rühren und eine ausreichende Menge an H₂ in den Ballons geachtet werden. Zudem musste im Gegensatz zur Autoklavenreaktion nicht mehr geheizt werden, da die Reaktion mit dem H₂-Ballon auch bei Raumtemperatur ablief, was die Sicherheit erhöhte.



Schema 22: Synthese von **62** ausgehend von **61**.

Die Nitrierung des Isoindolins **61** mit konz. Salpetersäure und konz. Schwefelsäure erfolgte angelehnt an die Vorschrift von Mileo *et al.*^[134] mit einer moderaten Ausbeute von bis zu 62 %.



Schema 23: Reaktionsmechanismus der Nitrierung von **61** mit konz. Salpetersäure und konz. Schwefelsäure..^[12,138]

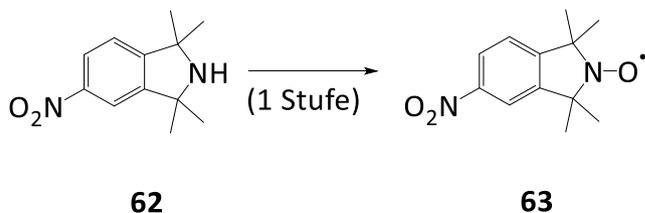
Die elektrophile aromatische Substitution, erfolgte bevorzugt an Position 5 oder 6 durch die sterische Hinderung der Methylgruppen, welche eine Nitrierung an Position 4 und 7 verhinderten. Aufgrund des starken –M- und –I-Effekts der Nitrogruppe kam es zu keiner weiteren Substitutionsreaktion am Aromaten (**Schema 23**).^[12]

Bei der Nitrierung musste darauf geachtet werden, dass aufgrund des niedrigen Volumens der Säuren, das gesamte Edukt in Lösung war, da sonst keine Umsetzung stattfinden konnte und die säulenchromatographische Auftrennung durch die ähnlichen R_f-Werte des Edukts und Produkts erschwert worden wäre.

4. Ergebnisse und Diskussion

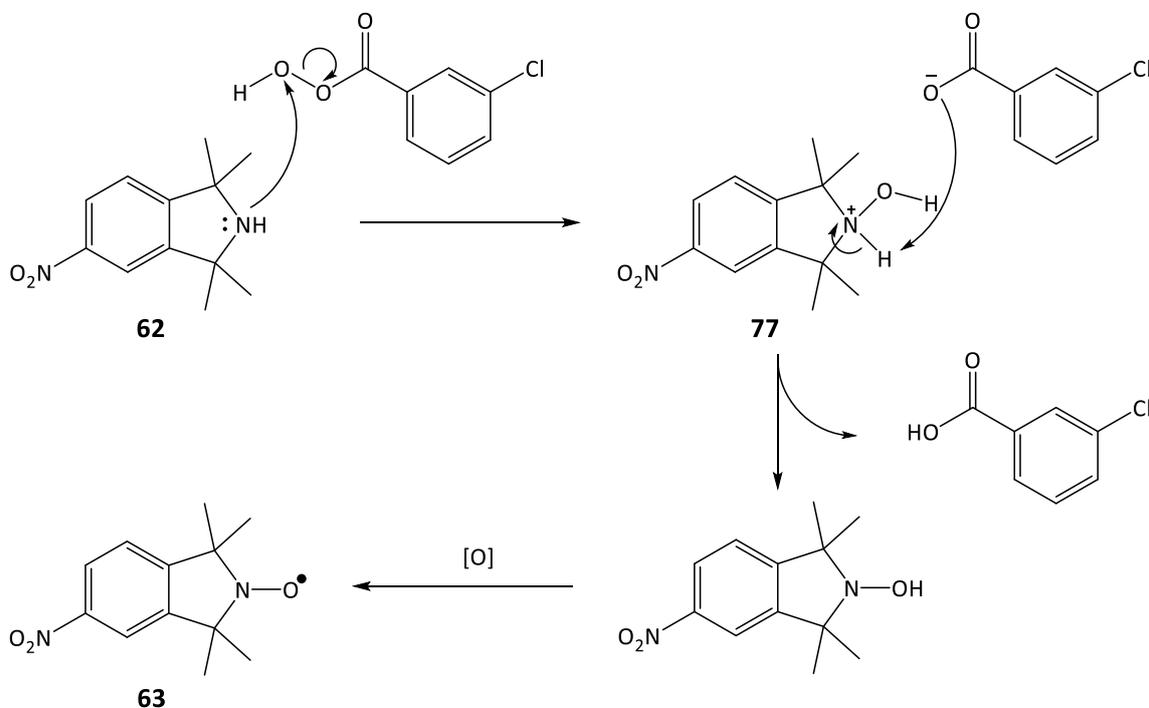
Allgemein musste bei dieser Reaktion sehr auf die Temperatur geachtet werden. Zu schnelles Zusammengeben der Säuren führte trotz Eisbad zu sehr exothermen Reaktionen, was zur Entwicklung von Nitrosegasen und schlussendlich durch zu geringe Mengen Reagenz zu Ausbeuteverlust führte. Während der Reaktion bedurfte es einer erhöhten Temperatur, um das Edukt **61** in Lösung zu bekommen. Jedoch durfte hierbei eine Ölbadtemperatur von 125 °C nicht überschritten werden, da auch hier eine ungewollte Nebenreaktion, erkennbar an den Nitrosegasen, stattfand und zu Ausbeuteverlust führte.

4. Ergebnisse und Diskussion



Schema 24: Synthese von **63** ausgehend von **62**.

Vor der Hydrierung der Nitrogruppe zum Amin musste **62** mit *m*-Chlorperbenzoesäure zum Nitroxid **63** oxidiert werden, um eine unerwünschte Oxidation der aromatischen Aminogruppe zu vermeiden. Diese Reaktion erfolgte innerhalb von 30 Minuten in Ausbeuten bis zu 93 % nahezu quantitativ.



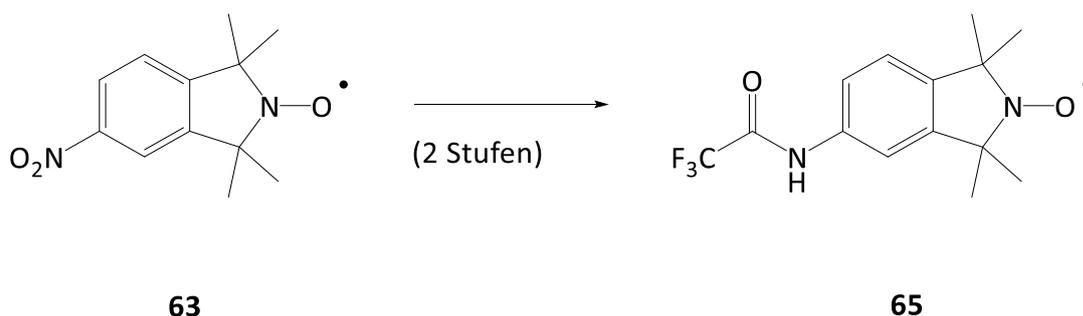
Schema 25: Oxidation von **62** mit *m*CPBA zu **63**, angelehnt an den postulierten Mechanismus von Chalmers *et al.*^[139]

Hierbei reagiert das Amin des Isoindolin **62** mit dem Sauerstoff der *m*CPBA unter Bildung des Zwischenprodukts **77** und 3-Chlorbenzoat. Durch eine basische Reaktion wird 3-Chlorbenzoesäure und ein Hydroxylamin gebildet, welches sofort mit Luftsauerstoff zum Nitroxid **63** abreagiert (**Schema 25**).

Bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches musste auf eine ausreichende Kühlung während der Neutralisation mit 25 %iger KOH-Lösung geachtet werden, da es sonst zu

4. Ergebnisse und Diskussion

einer zu heftigen exothermen Reaktion, erkennbar an einer Lilafärbung des Reaktionsgemisches, kam, welche die Ausbeute auf bis zu 62 % verringert.



Schema 26: Synthese von **65** ausgehend von **63**.

Die Nitrogruppe des Nitroxids **63** wurde im Autoklaven mit H₂ bei 5 bar und Raumtemperatur zum Amin hydriert. Im Gegensatz zur Hydrierung zum Amin **61** wurde diese Hydrierung in maximal 1 g Ansätzen durchgeführt. Zu lange Reaktionszeiten führten zur Bildung des Nebenprodukts **78** (**Abbildung 17**), welches nicht mehr in die Synthesepipeline reintegriert werden konnte. Die Kontrolle des Reaktionsfortschritts per Dünnschichtchromatographie war daher sehr entscheidend. Das Reaktionsgemisch rührte anschließend bei offenem Kolben weiter, damit das gebildete 2-Hydroxyisindolin **79** (**Abbildung 17**) durch den Luftsauerstoff zum Radikal reoxidiert wurde. Trotz der schnellen Bildung des Nebenprodukts konnte die Hydrierung zum Amin **64** mit Ausbeuten bis 96 % durchgeführt werden.

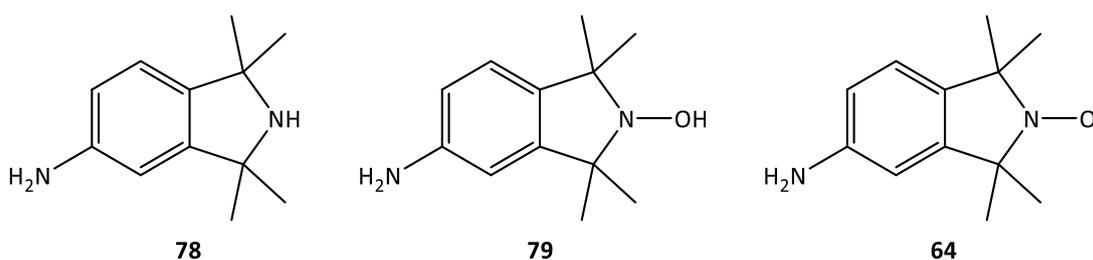
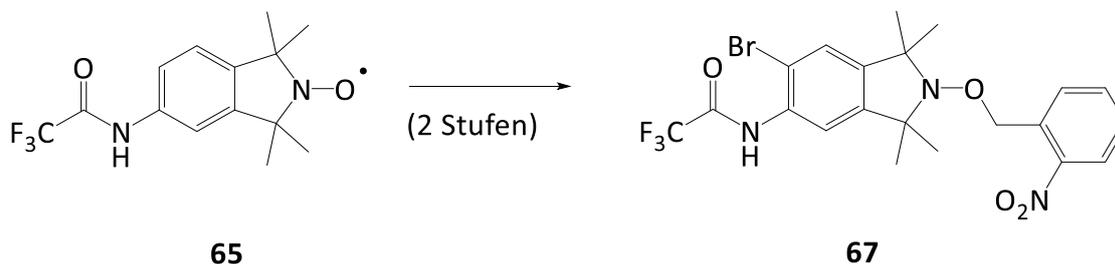


Abbildung 17: Das Nebenprodukt **78** und Hydroxyisindolin **79** bei der Hydrierung zum Amin **64**.

Die Aminogruppe von **64** wurde anschließend mit Trifluoressigsäureanhydrid geschützt, um zu verhindern, dass sie in den kommenden Reaktionsschritten mit der photolabilen Schutzgruppe gekuppelt oder durch NBS bromiert werden wäre.^[140] Mit 3 Std. Reaktionszeit bei Raumtemperatur, nahezu quantitativer Ausbeute von bis zu 97 % und

4. Ergebnisse und Diskussion

unproblematischer, säulenchromatographischer Reinigung stellt diese Reaktion einen schnellen und effizienten Weg für die notwendige Schützung des Amins dar.



Schema 27: Synthese von **67** ausgehend von **65**.

Die photolabile Schutzgruppe wurde über eine Kupferkatalysierte Kreuzkupplungsreaktion zwischen dem Radikal **65** und 2-Nitrobenzylbromid, basierend auf den Arbeiten von Weinrich *et al.* aus dem Arbeitskreis Göbel, eingeführt.^[52,83,141] Hierbei konnten durch die Verwendung einer Kombination aus Kupferpulver, Cu(OTf)₂ und 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin in abs. Toluol im Rückfluss über 17 Std. eine Ausbeute von bis zu 98 % erzielt werden, die weit über den Literatursausbeuten mit anderen Katalysatoren wie Pd oder Ag liegt.^[12,97,142]

Als erster Teil der Vorbereitung auf die Suzuki-Kupplung der zwei Bausteine, wurde unter Verwendung von NBS Brom über eine elektrophile aromatische Substitution an Position 6 des Acetamids (**66**) eingeführt. Während diese Reaktion im Tetraethylanalogon, nur Ausbeuten bis zu 39 % erzielte,^[12] konnten für das Bromid **67** Ausbeuten bis zu 68 % erzielt werden. Diese Ausbeuteerhöhung lässt sich auf die verringerte Reaktionstemperatur von 80 °C und die verkürzte Reaktionsdauer von 10 Std. zurückführen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass durch zu lange und zu heftige Reaktionsbedingungen das Produkt zersetzt wird. Die unter den neuen Bedingungen erzielten Eduktansätze von 1–1.5 g zeigten die besten Ausbeuteergebnisse. Gleichzeitig konnte die Reaktion mit ähnlich guten Ausbeuten auf 5 g hochskaliert werden. Um Lösungsmittel für die säulenchromatographische Reinigung und Arbeitszeit zu sparen, könnte diese Reaktion in Zukunft bei gleichen Bedingungen auch in größeren Ansätzen durchgeführt werden. In einem Testversuch zur Erhöhung der Ausbeute wurde unter den neuen Temperatur- und Reaktionsdauer-Bedingungen das Acetamid **66** mit 3 Äq NBS anstatt vorheriger 1.5 Äq versetzt. Leider

4. Ergebnisse und Diskussion

zeigte sich auf der Dünnschichtchromatographie, dass das Produkt nur in sehr geringem Mengen vorhanden war und sich ein neues Hauptprodukt, welches tiefer lief, bildete. Mittels DC-MS lässt sich vermuten, dass es sich hierbei um eine doppelt bromierte Variante des Bromids **67** handelt (**MS (ESI)**: berechnet für $C_{21}H_{20}Br_2F_3N_3O_4Na$ $[M+Na]^+$ 615.96, gefunden: 615.91 (70) $[M+Na]^+$). Eine Vermutung ist, dass sich aufgrund der sterischen Hinderung das 4,6-Dibromid **80** und nicht das 6,7-Dibromid **81** gebildet hat, jedoch konnte zur Bestätigung dieser Hypothese keine konkrete Literatur gefunden werden (**Abbildung 18**).

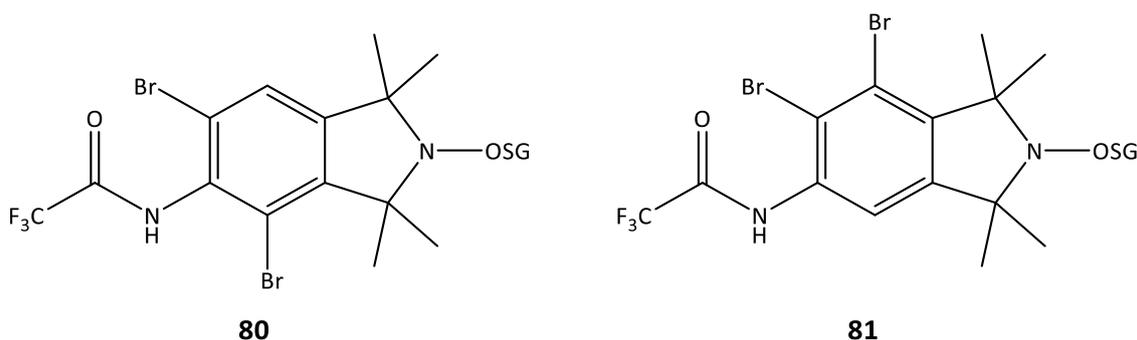
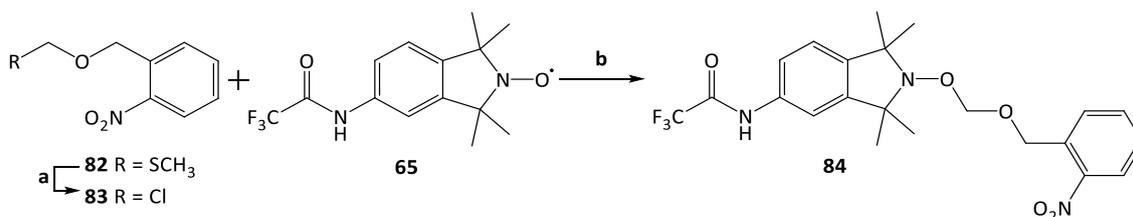


Abbildung 18: Mögliche Strukturformeln des doppelt bromierten Produkts nach der Reaktion von **66** mit 3 Eq. NBS.

Um auch weitere photolabile Schutzgruppen nicht außer Acht zu lassen, wurde über einen Alternativpfad nachgedacht, angelehnt an die Arbeiten von Weinrich *et al.* **65** wurde mit dem NBOM-Analogon **83** mittels einer Cu-katalysierten Radikalreaktion mit Ausbeuten bis zu 74 % gekuppelt (**Schema 28**).^[52]



Schema 28: Darstellung von **66**-TSG nach Weinrich *et al.* (a) TSG1, SO₂Cl₂, 1 Std., RT; (b) **83**, **65**, Cu, Cu(OTf)₂, 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin, Toluol, 20 Std., Rückfluss.^[52]

In der darauffolgenden Bromierung von **84** konnte das gewünschte Bromid **85** jedoch nicht dargestellt und die Schutzgruppe selbst nur als Nitrobenzylalkohol isoliert werden (**Abbildung 19**).

4. Ergebnisse und Diskussion

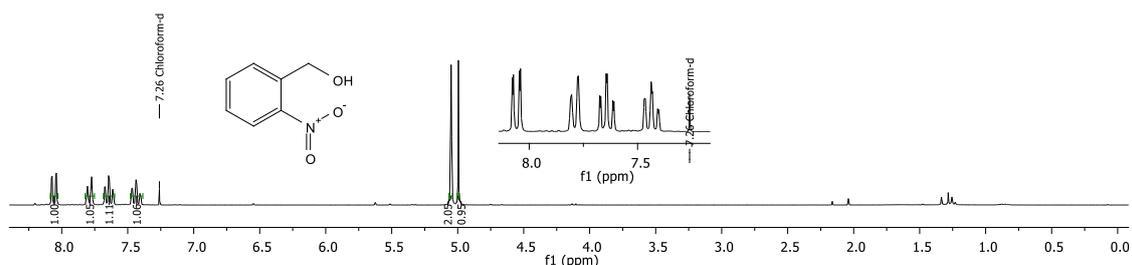
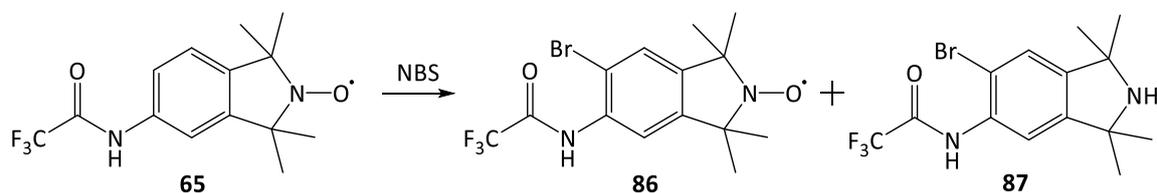


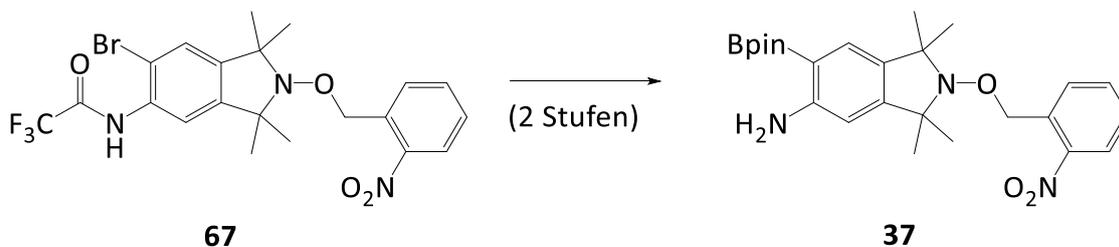
Abbildung 19: NMR-Spektrum des isolierten, reinen Benzylalkohols nach der Bromierung von **84**.

Grund hierfür könnte die Bildung von Bromwasserstoffsäure während der Bromierung sein.^[143] Da das Acetal der NBOM-Schutzgruppe zwar gegen Nukleophile, nicht aber gegen starke Säuren stabil ist,^[52] könnte im Verlauf der Reaktion die starke Säure HBr^[144] das Edukt **84** zersetzen. Es wurde versucht die unerwünschte Reaktion durch alternative Bedingungen wie Brom und Natriumacetat in Essigsäure^[145] oder einer Iodierung^[146] anstatt der Bromierung zu umgehen, jedoch führten auch diese Ansätze nicht zum gewünschten Produkt. Um das Acetal den sauren Bedingungen der Bromierung nicht aussetzen zu müssen, wurde versucht das ungeschützte Radikal **65** unter den milden Bedingungen mittels NBS zum Bromid **86** zu bromieren. Zwar gelang dies, jedoch in so geringen Ausbeuten und mit dem Amin **87** als Hauptprodukt, dass auch diese Syntheseroute verworfen werden musste (**Schema 29**).



Schema 29: Bromierung des Radikals **65** zum Bromid **86** und dem bromierten Amin **87** mit NBS.

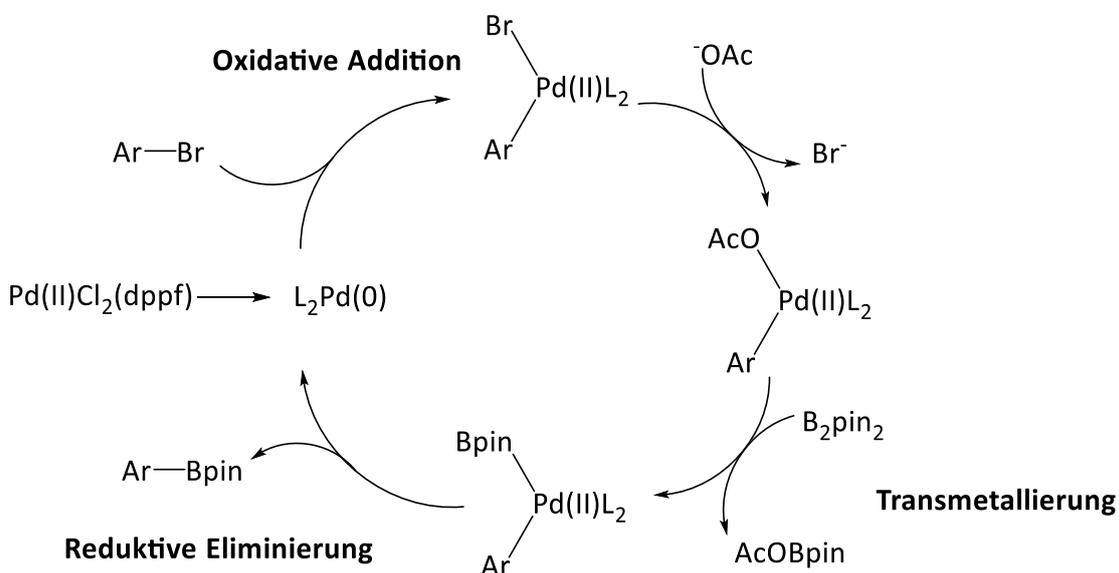
Schlussendlich konnte für die in dieser Arbeit präsentierte Syntheseroute nur das Nitrobenzyl als photolabile Schutzgruppe verwendet werden, da es gegenüber dem essentiellen Bromierungsschritt stabil war.



Schema 30: Synthese von **37** ausgehend von **67**.

Das Acetamid **67** wurde unter milden alkalischen Bedingungen mit Ausbeuten bis zu 86 % zum Amin **68** deblockiert. Dieser Schritt wurde vor der anschließenden Miyaura-Borylierung^[147] durchgeführt, um den elektronenziehenden Charakter der Amid-Gruppe^[148] durch den elektronenschiebenden Charakter der Amin-Gruppe zu ersetzen.^[149] Dieser elektronische Effekt erhöhte die Reaktivität des Bromatoms und erleichterte die kommende Borylierung.

Das Bromid **68** wurde nun, als Vorbereitung auf die anschließende Suzuki-Kupplung, mit Bis(pinakolato)diboran in einer Miyaura-Borylierung in Ausbeuten bis 86 % umgesetzt. Als ein entscheidender Schlüsselschritt dieser Synthese wird ihr Reaktionszyklus näher betrachtet (**Schema 31**).



Schema 31: Miyaura-Borylierung-Zyklus nach Vries *et al.* und Eastgate *et al.*^[150,151]

Der Zyklus beginnt mit der Überführung des Palladium-Katalysators in seine Pd(0)-Form. Durch die oxidative Addition des Bromids **68** (Ar-Br) an den Katalysator (L₂Pd(0)) bildet sich daraufhin das ArPd(II)L₂Br-Addukt aus. Die Base (KOAc) kann nun entweder mit dem Bor-Atom der Borspezies (B₂pin₂) zum Hydroxyborat reagieren, dieses negativ laden und

so eine Reaktion mit dem Addukt initiieren oder selbst mit dem Pd(II)-Addukt, durch Austausch mit dem Halogen reagieren.^[152,153] Die Bildung des Hydroxyborats liegt besonders bei der Suzuki-Kupplung mit stärkeren Basen vor.^[154] Miyaura *et al.* zeigten anhand eines ¹¹B-NMR jedoch, dass eine schwache Base wie KOAc unter den gegebenen Bedingungen nicht mit einer Borspezies reagiert^[152], was bedeutet, dass im hier vorliegenden Mechanismus das Halogen des ArPd(II)L₂Br-Addukt durch ⁻OAc ausgetauscht wird. Die so gebildete Pd-O-Bindung ist nun viel reaktiver als die vorherige Pd-Br-Bindung und kann durch Transmetallierung das ArPd(II)L₂Bpin Intermediat bilden. Über die abschließende reduktive Eliminierung werden nun das Borolan-Amin-Isoindolin **37** (Ar-Bpin) und der Pd(0)L₂-Komplex gebildet.^[150,151]

Während der säulenchromatographischen Aufarbeitung war es von äußerster Wichtigkeit das Edukt vom Produkt zu trennen, da es sonst zu Komplikationen in der folgenden Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung kommen könnte. Dies stellte sich jedoch als Herausforderung heraus, da beide Stoffe unter den üblichen Laufmittelkombinationen einen sehr ähnlichen R_f-Wert besaßen. Erst durch die Laufmittelkombination cHex/Aceton konnte eine ausreichend unpolare Mischung für die gewollte Reinheit erzielt werden (R_f(**68**) = 0.46; R_f(**37**) = 0.53).

Im Laufe dieser Arbeit kam es bei der Verwendung von K₂CO₃ und K₃PO₄ als Basen für die Miyaura-Borylierung zur Bildung des Homokupplungsprodukts **88** (**Abbildung 20**), welches Anhand von NMR- und Masse-Daten (**MS (ESI)**: berechnet für C₃₈H₄₅N₆O₆ [M+H⁺]⁺ 681.23, gefunden: 680.33 (100) [M+H⁺]⁺; berechnet für C₃₁H₃₉N₅O₄• [M+H⁺]⁺ 544.29, gefunden: 545.16 (92) [M+H⁺]⁺) ermittelt werden konnte, was auch Arbeitsgruppen wie Miyaura *et al.* beobachteten.^[152,155] Es war daher entscheidend, schwache Basen wie KOAc für die Miyaura-Borylierung zu verwenden, da diese eine Suzuki-Kupplung nicht unterstützten und so eine Homokupplung unterbanden. Außerdem musste auf eine sauerstofffreie Durchführung und genaue Temperaturkontrolle von maximal 80 °C^[152] geachtet werden, da beides zur Zersetzung während der Reaktion und Verlust von Produkt, als auch Edukt führte.

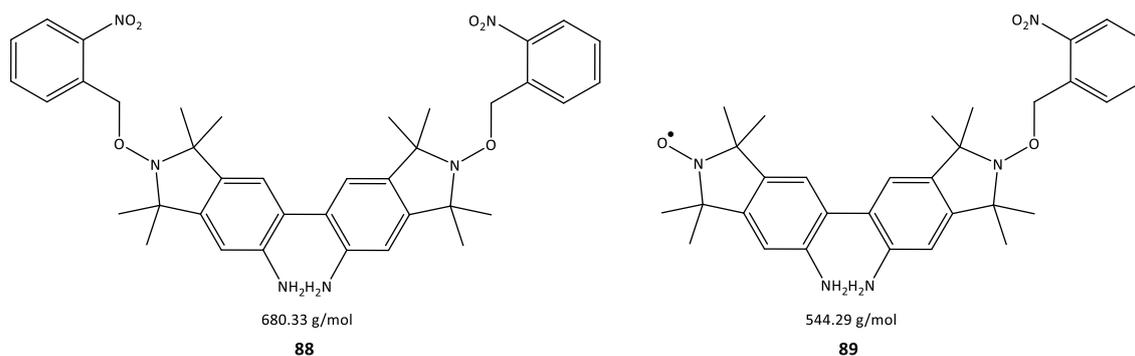


Abbildung 20: Homokupplungsprodukte der Miyaura-Borylierung mit K_3PO_4 als Base.

4.3. Syntheseroute des Nukleotids 1

Nachdem das Iod-Nitril-Nukleosid **36** und das Borolan-Aminisoindolin **37** nun vollständig synthetisiert wurden, erfolgte der entscheidende Schritt der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung. Hierbei wurde sich an den Bedingungen früherer Gruppen orientiert.^[119,156–158] Unter ähnlichen Bedingungen wie der Miyaura-Borylierung wurde nun K_2CO_3 als stärkere Base verwendet, um das Borolan **37** für die Reaktion zu aktivieren und eine erfolgreiche Kupplung einzuleiten. Hier war es von entscheidender Bedeutung, jedwede Reste des Bromids **68** aus dem Edukt entfernt zu haben, da dieses schneller umgesetzt wurden als das Iod-Nukleosid **36**. Dies hätte zur Folge, dass zuerst das Homokupplungsprodukt gebildet und im schlimmsten Fall das Iod-Nukleosid unreaktiv isoliert wurde. Während andere Gruppen an analogen Molekülen nur die geöffnete Form **90** der Kreuzkupplung isolieren konnten und diese mittels HCl in die Ringform überführen konnten^[118,119,156–158], war es in dieser Arbeit möglich, unter den gegebenen Reaktionsbedingungen das Ringschlussprodukt **38** in einer Eintopf-Reaktion in hohen Ausbeuten bis 86 % zu isolieren (**Abbildung 21**).^[120,158]

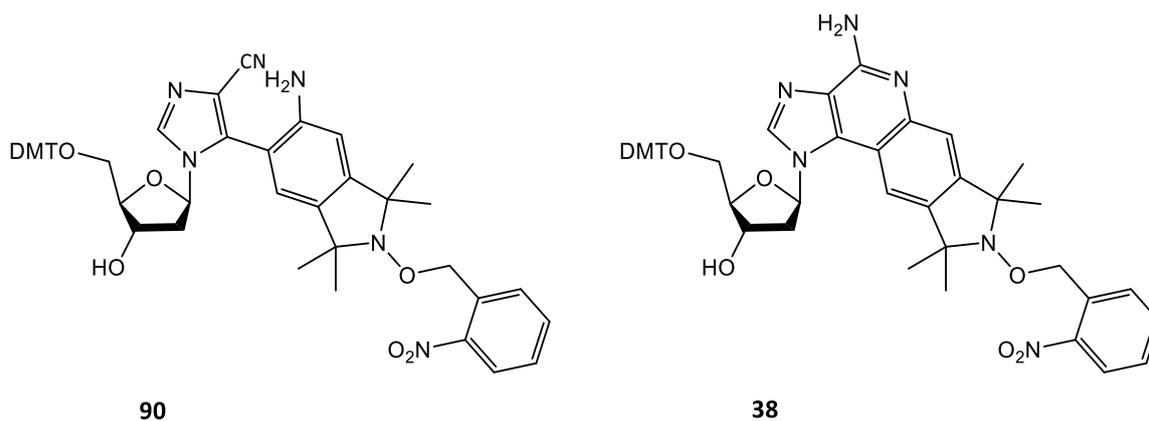
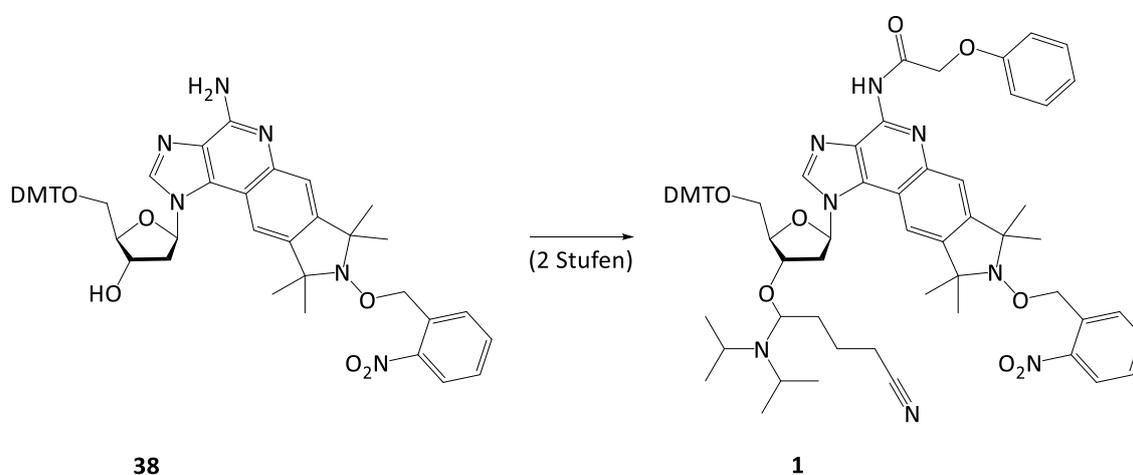


Abbildung 21: Produkte der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung als geöffnete Ringform **90** und geschlossene Eintopf-Ringform **38**.^[118–120,156–158]



Schema 32: Synthese von **1** ausgehend von **38**.

Nach der erfolgreichen Kupplung und dem anschließenden Ringschluss zum Nucleosid **38** musste die freie, exozyklische Aminogruppe vor der Festphasensynthese geschützt werden um jedwede Nebenreaktionen zu unterbinden. Dabei wurde sich an der Arbeit von Matsuda *et al.* orientiert und das Amin mit Phenoxyacetylchlorid (PacCl) zum Acetamid **91** in Ausbeuten bis 85 % umgesetzt.^[159]

Für die Darstellung des Phosphoramidits **1** wurde **91** mit N,N-Diisopropylchlorphosphoramidit umgesetzt. Hierbei war, wie bei der Schützung des Amin, darauf zu achten, dass genügend Base vorhanden war, um den entstandenen Chlorwasserstoff zu neutralisieren und eine Zersetzung des Produkts zu verhindern. Das Produktgemisch wurde zum Schluss über eine kurze, mit NEt₃ behandelte Säule säulenchromatographisch aufgereinigt. Die zwei neu gebildeten Spots wurden vereint

4. Ergebnisse und Diskussion

und zum Ende hin in Benzol lyophilisiert. Das Phosphoramidit konnte auf diese Weise in hoher Ausbeute bis 94 % dargestellt werden. Anhand des ^{31}P -Spektrums konnte die Reinheit bestimmt werden (**Abbildung 22**). Hierbei war der erwartete Doppelpeak auf die Chiralität des P-Atoms zurückzuführen.^[160] Zusätzlich ließ sich erkennen, dass es sich um ein H-Phosphonat reines Produkt handelte, da dieses, als mögliches Nebenprodukt, sonst bei 8 und 10 ppm zu sehen gewesen wären.

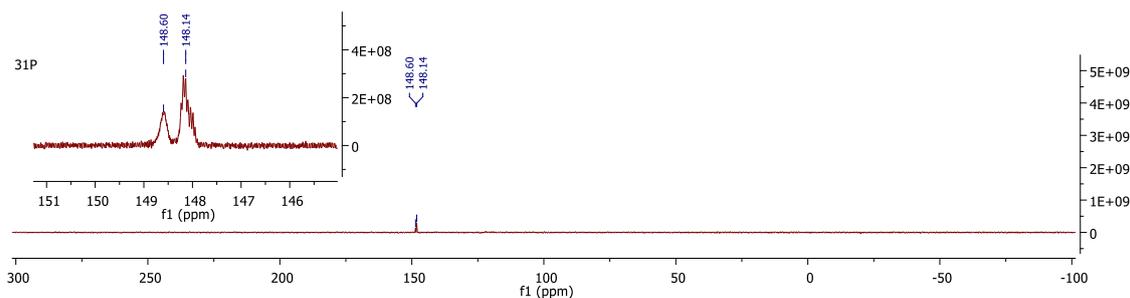
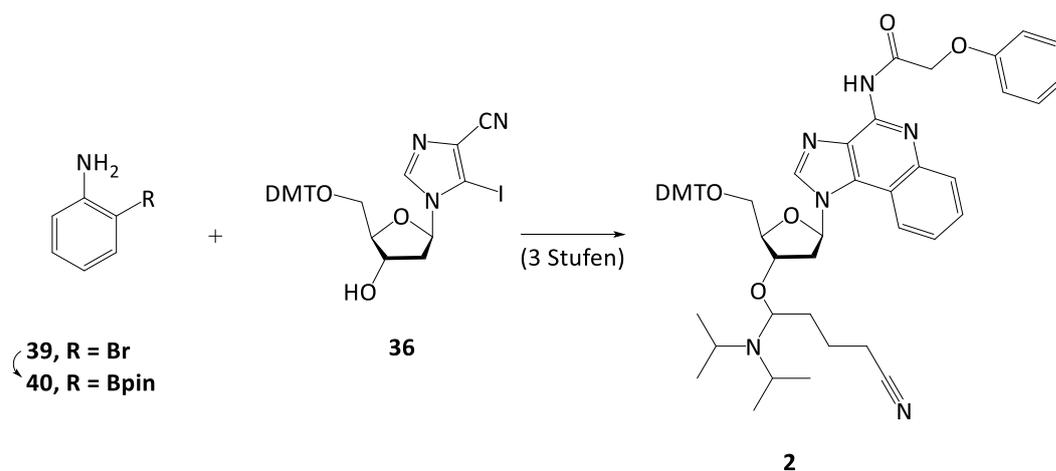


Abbildung 22: ^{31}P -Spektrum des reinen Phosphoramidits **1**.



Schema 33: Synthese von **2** ausgehend von **92** zu **40** mit **36**.

Die Syntheseroute zum Phosphoramidit wurde zuvor ausgehend von Bromanilin (**39**), als billigem Edukt getestet und stellte eine schnelle Variante zur Darstellung des Phosphoramidit **2** da. Dieses war ein wichtiger Indikator für die Stabilität der später gebildeten Duplexe und konnte einen Hinweis auf mögliche sterische Probleme durch die künstliche Base liefern. Ausgehend von Bromanilin verlief die Miyaura-Borylierung erfolgreich, sodass das Borolan-Anilin direkt mit dem Iod-Nitril-Nukleosid **36** in einer Suzuki-Miyaura-Reaktion gekuppelt werden konnte. Auch hier erfolgte der Ringschluss direkt im Eintopf der Kreuzkupplungsreaktion, womit das Nukleosid **41** in hoher

Ausbeute isoliert wurde. Die Schützung des exozyklischenamins mit PacCl und der 3'-OH mit N,N-Diisopropylchlorphosphoramidit zum finalen Phosphoramidit **2** erfolgte auch ohne Probleme in zufriedenstellenden Ausbeuten. Durch diese kurze, erfolgreiche Syntheseroute, konnte die oben beschriebene Synthese zum Nukleotid **1** in Angriff genommen werden.

4.4. Schmelzpunktmessung der DNA/RNA-Duplexe

Mit den nun synthetisierten Oligonukleotiden **1** und **2** konnte die Festphasensynthese als nächster Schritt angegangen werden. Die unmodifizierte DNA-Oligosequenz „uDNA“ (II) und ihre komplementären Gegenstränge als RNA-Strang „aRNA“ (I) und DNA-Strang „aDNA“ (III) wurden synthetisiert. In der Mitte des Stranges, an Position X wurden das Benz-Nukleotid (**2**) im Strang „mDNA-Benz“ (IV) und das Tetramethyl-Nukleotid (**1**) im Strang „mDNA-Tetramethyl“ (V) eingebaut (**Abbildung 23**).

Tabelle 1: Synthetisierte Sequenzen nummeriert mit den entsprechenden Abkürzungen im Fließtext. „a“ steht für „anti“, also Gegenstrang; „u“ steht für „unmodifizierten“ Strang mit natürlichen Nucleotiden; „m“ steht für „modifizierten“ Strang mit künstlichem Nucleotid an Position X bzw. X'.

Nummer	Sequenz	Abkürzung
(I)	5' -CACGAUACGAGGUC-3'	aRNA
(II)	3' -GTGCTATGCTCCAG-5'	uDNA
(III)	5' -CACGATACGAGGTC-3'	aDNA
(IV)	3' -GTGCT X TGCTCCAG-5'	mDNA-Benz
(V)	3' -GTGCT X' TGCTCCAG-5'	mDNA-Tetramethyl

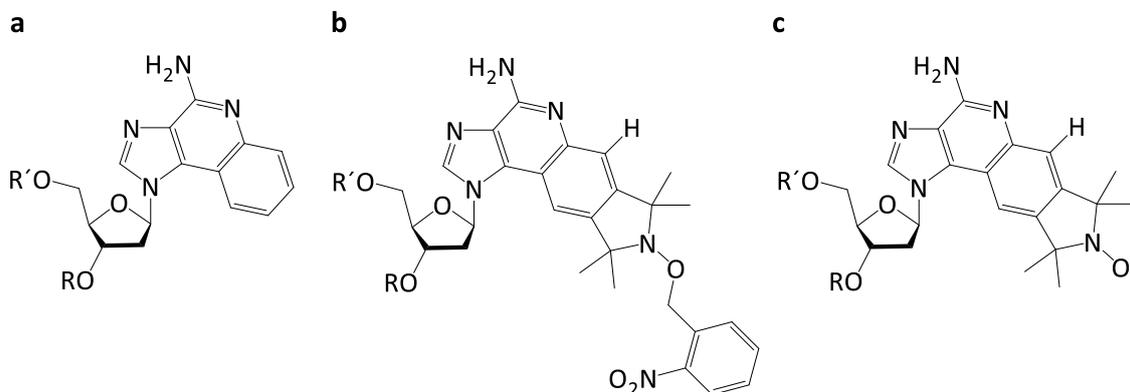


Abbildung 23: (a) Strang IV „mDNA-Benz“ mit dem Nucleotid **92**. (b) Strang V „mDNA-Tetramethyl“ mit dem Nucleotid **93**. (c) Strang VI „mDNA-A“ mit dem Ziel-Nucleotid **A**.

Die Synthese der Stränge **(I)**-**(V)** verlief problemlos, wobei die Nukleotide **1** und **2** mit verringerter Effizienz eingebaut wurden und daher eine längere Einbauzeit benötigten. Die Abspaltung der Stränge vom Träger verlief unter milden Standardbedingungen. Die Entschützung des exozyklischen Amins des Spin-markierten Nukleosids konnte unter diesen milden Bedingungen (32 % Ammoniak/EtOH in 3:1, über Nacht bei 37 °C) nicht erfolgreich durchgeführt werden, was anhand der Masse des mit **1** markierten Stranges ermittelt wurde. Diese wies auf die noch immer mit Pac geschützte Amin-Gruppe hin (**MS (ESI)**: berechnet für $C_{162}H_{198}N_{51}O_{89}P_{13}$ $[M+H^+]^+$ 4683.91, gefunden: 4684.55 $[M+H^+]^+$). Um diese zu entschützen wurde das Oligonukleotid zuerst testweise für 3 Std. bei 50 °C 32 % Ammoniak ausgesetzt. Ein HPLC-Lauf dieses Gemisches ergab eine teilweise Abspaltung der Pac-Schutzgruppe, jedoch konnten noch über 50 % des geschützten Edukts isoliert werden. Daher wurden die Stränge nun über Nacht in 32 % Ammoniak bei 50 °C gelagert. Durch die anschließenden HPLC-Läufe konnte der entschützte Strang verlustfrei und ohne restliches Edukt isoliert werden (**MS (ESI)**: berechnet für $C_{154}H_{192}N_{51}O_{87}P_{13}$ $[M+H^+]^+$ 4549.87, gefunden: 4550.50 $[M+H^+]^+$).

Um den Schmelzpunkt des nativen 14mer Duplex als Referenz zu ermitteln, wurden die Stränge **(II)** uDNA und **(I)** aRNA bzw. **(II)** uDNA und **(III)** aDNA in einem 1:1 Verhältnis in einem PBS-Puffer bei pH = 7.4 mit $c = 1 \mu\text{M}$ vereint und für eine Stunde auto-assembliert. Der Schmelzpunkt der Doppelstränge wurde anschließend an einem Thermo-Fischer Photometer ermittelt. Hierzu wurde die Absorption bei verschiedenen Temperaturen gemessen und mittels der Software OriginPro 2016 in einer Grafik dargestellt (**Abbildung 24**). Über den angelegten DoseRep-Fit und Ermittlung des Wendepunktes aus Logx0 des Fits konnten der Schmelzpunkt von 60.4 °C für den Doppelstrang **(II)** uDNA und **(I)** aRNA und von 58.2 °C für **(II)** uDNA und **(III)** aDNA ermittelt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

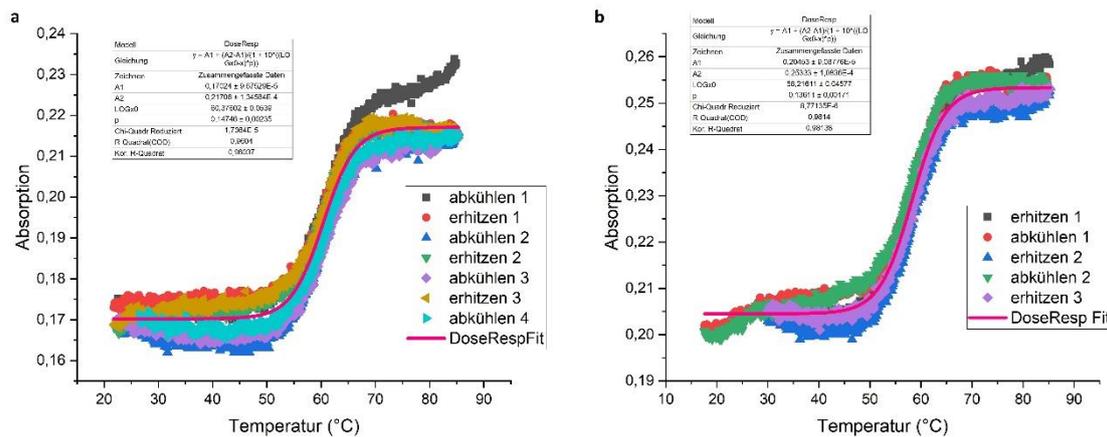


Abbildung 24: Absorptionskurven der zwei Doppelstränge am Thermo-Fischer Photometer in einem PBS-Puffer bei pH = 7.4 und c = 1 μ M: (a) Stränge (II) und (I) mit 7 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie); (b) Stränge (II) und (III) mit 5 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie).

Dies zeigte auf, dass die RNA- und DNA-Stränge ähnliche Schmelzpunkte haben und ein DNA-Gegenstrang verwendet werden konnte.

Um die Auswirkungen des Nukleotid **92 (Abbildung 23 a)** auf die Stabilität der Duplexe zu untersuchen wurden wie im nativen Experiment bei gleichem pH und gleicher Konzentration die Stränge (IV) mDNA-Benz mit (I) aRNA bzw. (III) aDNA auto-assembliert und die Schmelzpunkte mittels des Thermo-Fischer Photometers und OriginPro 2016 ermittelt (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Strangkombination für die Untersuchung der Auswirkung des Nukleotid **92** auf die Stabilität des Duplex anhand der Schmelzpunktdifferenz zum nativen Duplex am Thermo-Fischer Photometer.

Strangkombination	Schmelzpunkt [°C]	ΔT zum nativen Duplex [°C]
(II) uDNA + (III) aDNA	58.2±0.04	
(IV) mDNA-Benz + (III) aDNA	49.3±0.36	8.9
(II) uDNA + (I) aRNA	60.4±0.05	
(IV) mDNA-Benz + (I) aRNA	52.7±0.09	7.7

Diese hohe Destabilisierung lässt darauf schließen, dass sich die neue Duplexform für die Anwendung unter natürlichen Bedingungen schon spürbar von der nativen Form entfernt hat. Gründe hierfür könnten sterische Hinderungen bei der Einlagerung der neuen Base in die große Furche der B-Form beim DNA-Duplex und in die kleine Furche der A-Form beim RNA-DNA-Hybriden sein. Dies könnte auf eine Abstoßung zwischen

4. Ergebnisse und Diskussion

dem Ar-H der Base und dem 2'-H hindeuten (**Abbildung 25 a**). Zudem besteht die Wahrscheinlichkeit dass bei der Basenpaarung anstatt einer attraktiven Wechselwirkung eine repulsive Wechselwirkung zwischen dem Ar-H und dem Sauerstoff der Partnerbase ausgebildet wird (**Abbildung 25 b**).

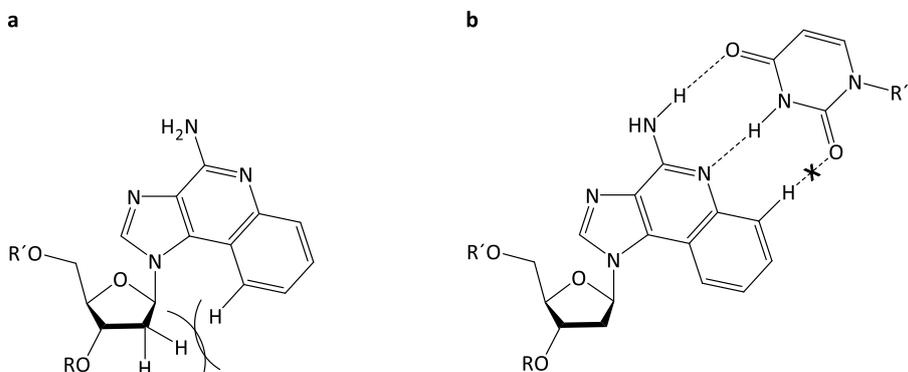


Abbildung 25: (a) Hypothetische Abstoßung zwischen dem 2'-H und dem Wasserstoffatom des Benzolrings der Base im Nucleotid **92**; (b) Hypothetische repulsive Wechselwirkung zwischen dem Wasserstoffatom des Benzolrings der Base im Nucleotid **92** und dem Sauerstoffatom der Partnerbase.

Eine solche Deformation und damit verbundene Destabilisierung der neuen Duplexe im Vergleich zu ihren nativen Gegenstücken würde den Wert des Tetramethyl-Nucleotid **93** deutlich mindern.

Die Messungen mit dem Nucleotid **92** am Thermo-Fischer Photometer erfolgten chronologisch gesehen jedoch erst nach den Messungen mit dem Nucleotid **93**. Grund hierfür war, dass anstatt dem Thermo-Fischer Photometer zuerst ein JASCO Photometer verwendet wurde, welches im späteren Verlauf der Arbeit nicht mehr zur Verfügung stand und die Messungen daher wiederholt werden mussten. Am JASCO Photometer wurden die native Form und die Mutante mit dem Nucleotid **92** zuerst gemessen und der Schmelzpunkt mittels OriginPro 2016 ermittelt (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Strangkombination für die Untersuchung der Auswirkung des Nucleotid **92** auf die Stabilität des Duplex anhand der Schmelzpunktdifferenz zum nativen Duplex am JASCO Photometer.

Strangkombination	Schmelzpunkt [°C]	ΔT zum nativen Duplex [°C]
(II) uDNA + (III) aDNA	55.4±0.01	
(IV) mDNA-Benz + (III) aDNA	49.0±0.36	6.4
(II) uDNA + (I) aRNA	58.6±0.02	
(IV) mDNA-Benz + (I) aRNA	54.0±0.09	4.6

4. Ergebnisse und Diskussion

Diese Destabilisierungswerte von nur 4.6 °C bzw. 6.4 °C waren im Rahmen einer noch akzeptablen vorliegenden Duplex-Form, was die Durchführung weiterer Experimente sinnvoll erscheinen ließ. So zeigten auch die Spin-Label von Höbartner *et al.* destabilisierende Auswirkungen von 5-6 °C.^[161]

Um auszuschließen, dass der pH-Wert den Schmelzpunkt zu stark beeinflusst,^[162] wurde der Doppelstrang aus (IV) mDNA-Benz und (III) aDNA bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Hierzu wurde der PBS-Puffer mittels 0.5 M HCl- und 1 M KOH-Lösung neu eingestellt. Über OriginPro 2016 wurden die Werte gemittelt und über die 1. Ableitung die pH-Werte von 7.1 bis 9.68 verglichen (**Abbildung 26**).

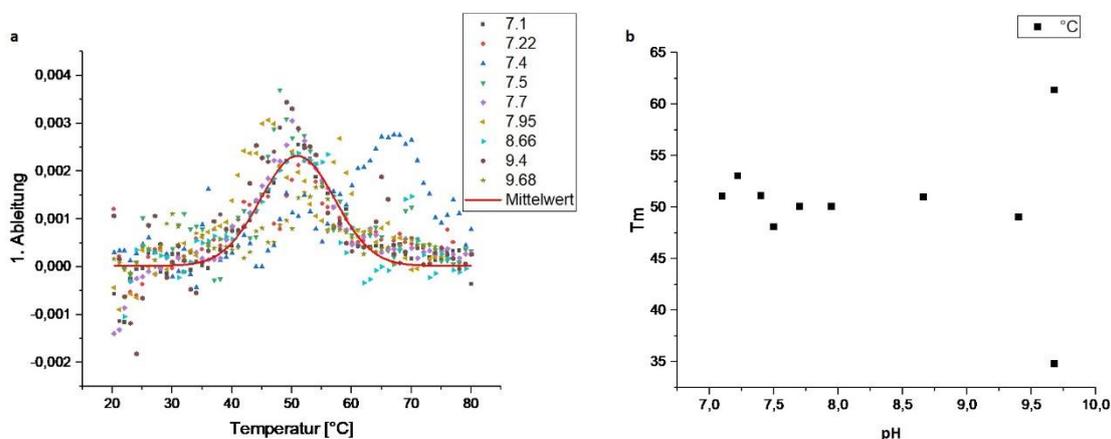


Abbildung 26: Vergleich des Doppelstrang aus (IV) mDNA-Benz und (III) aDNA bei verschiedenen pH-Werten: (a) 1. Ableitung der Absorptionskurven zur Ermittlung des Wendepunktes bzw. Schmelzpunktes am JASCO Photometer; (b) Schmelzpunkt T_m gegen den pH-Wert des PBS-Puffers.

Hierbei zeigte sich, dass der Schmelzpunkt zwar in einem pH-Bereich von 7.0 bis 9.5 geringe Schwankungen aufwies, sich diese aber im Rahmen der natürlichen pH-Änderung bewegten.^[162] Der 5 °C Unterschied zwischen pH = 7.25 und pH = 7.5 ließ zudem darauf schließen, dass es sich hierbei um Messfehler handelt und man eher von Messdaten ähnlich der anderen pH-Werten ausgehen sollte. Der Schmelzpunkt konnte daher bei unterschiedlichen pH-Werten in Näherung als konstant angesehen werden. Eine Veränderung des pH-Werts des Messpuffers hätte somit keine entscheidende Auswirkung auf die Stabilität des mit dem künstlichen Nukleotid markierten Duplex. Die Stabilitätstests wurden somit bei dem neutralen pH = 7.4 fortgesetzt, um den Nutzen des Spin-Label unter natürlichen Bedingungen besser darzustellen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Auf Basis der am JASCO-Photometer gemessenen, relativ geringen Destabilisierung durch den Benzolring und der pH-Unabhängigkeit des Schmelzpunktes, konnte nun der Strang (V) mDNA-Tetramethyl mit dem Tetramethylnukleotid **93** (**Abbildung 23 b**) in Duplexen gemessen werden. Die Messungen erfolgten hierbei ausschließlich am Thermo-Fischer Photometer (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Strangkombination für die Untersuchung der Auswirkung des Nukleotid **93** auf die Stabilität des Duplex anhand der Schmelzpunktdifferenz zum nativen Duplex am Thermo-Fischer Photometer.

Strangkombination	Schmelzpunkt [°C]	ΔT zum nativen Duplex [°C]
(II) uDNA + (III) aDNA	58.2±0.04	
(V) mDNA-Tetramethyl + (III) aDNA	48.9±0.15	9.3
(II) uDNA + (I) aRNA	60.4±0.05	
(V) mDNA-Tetramethyl + (I) aRNA	52.3±0.17	8.1

Es zeigte sich, dass auch das Tetramethylnukleotid **93** eine starke Destabilisierung des Duplex erzeugte. Im Vergleich mit dem Benzylnukleotid **92**, und im Falle der Thermo-Fischer Messungen, ist dieser zusätzliche Destabilisierungsanstieg jedoch nur geringer als 0.5 °C, sowohl bei dem RNA-, als auch dem DNA Gegenstrang. Dies lässt vermuten, dass der Hauptaspekt der Destabilisierung nicht die sterische Hinderung durch die Tetramethylgruppen ist (**Abbildung 27**), sondern eine suboptimale Basenpaarung besteht und somit eine repulsive Wechselwirkung zwischen dem Ar-H des Spin-Labels und dem Sauerstoff der Partnerbase ausgebildet wird (**Abbildung 25 b**).

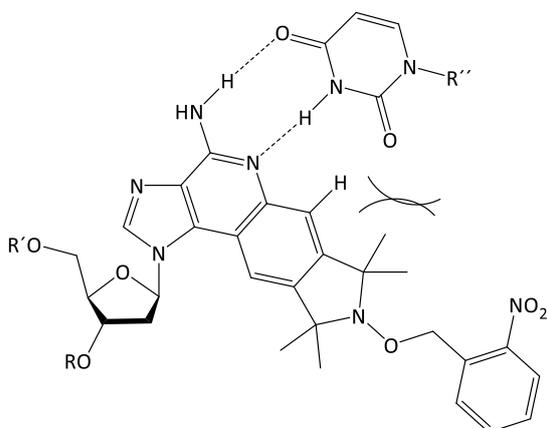


Abbildung 27: Hypothetische Abstoßung zwischen den Methylresten des Nukleotid **93** und dem Partner-Duplex.

4. Ergebnisse und Diskussion

In einem abschließenden Experiment wurde der Strang (V) mDNA-Tetramethyl zum Freilegen des Radikals bestrahlt und mittels HPLC aufgereinigt. Hierbei konnten der entschützte Strang mit freiem Sauerstoffradikal (VI) mDNA- \dot{A} und der Strang mit freiem Amin (VII) mDNA-Tetramethyl-Am isoliert werden. Der neu isolierte Radikal-Strang (VI) mDNA- \dot{A} wurde nun mit seinen Gegensträngen (I) aRNA bzw. (III) aDNA wie gewohnt auto-assembliert. Nach Auswertung der Absorptionskurven am Thermo-Fischer Photometer ergaben sich für den Duplex mit dem Gegenstrang (I) aRNA eine Destabilisierung von $\Delta T = 10.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ und mit den Gegenstrang (III) aDNA eine Destabilisierung von $\Delta T = 12.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Strangkombination für die Untersuchung der Auswirkung des Ziel-Nukleotids \dot{A} auf die Stabilität des Duplex anhand der Schmelzpunktdifferenz zum nativen Duplex am Thermo-Fischer Photometer.

Strangkombination	Schmelzpunkt [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT zum nativen Duplex [$^{\circ}\text{C}$]
(II) uDNA + (III) aDNA	58.2 \pm 0.04	
(VI) mDNA- \dot{A} + (III) aDNA	45.9 \pm 0.29	12.3
(II) uDNA + (I) aRNA	60.4 \pm 0.05	
(VI) mDNA- \dot{A} + (I) aRNA	50.3 \pm 0.23	10.1

Hierbei ist zu erkennen, dass die Entschützung des Radikals nicht, wie erhofft eine Minderung, bedingt durch das Fehlen der sterischen Hinderung durch die Schutzgruppe, sondern eine Erhöhung der Destabilisierung erzeugte. Nach längerer Recherche konnte hierfür jedoch keine konkrete Begründung gefunden werden, da die Destabilisierung oft durch den Einbau des Spin-Labels und seine sterische Hinderung erklärt wird und nicht durch die Anwesenheit eines Radikals.^[163] Die gemessenen Messkurven zu diesen Duplexen (**Abbildung 34**) wiesen zudem auffällig schlechtere Werte auf, als die Schmelzkurven der Duplex-Kombinationen (I) bis (V). Während (I) bis (V) direkt synthetisiert werden konnten, musste der Radikalstrang (VI) erst über Photolyse, und damit verbundene Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe, dargestellt und anschließend nochmals per HPLC gereinigt werden. Die dadurch nur geringe Menge an (VI) könnte zu erhöhten Schwankungen während der Schmelzpunktmessung geführt haben. Daher sollten die Messungen der Duplexe mit (VI) mDNA- \dot{A} nochmals wiederholt werden, um die erhöhte Destabilisierung nach freilegen des Radikals genauer zu charakterisieren.

4.5. EPR-Messung des Nukleotids 1

Für die Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe wurde der synthetisierte Strang (V) mDNA-Tetramethyl bestrahlt und das Hydroxylamin an der Luft zum Radikal oxidiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Ausmessung der Probe mittels cw (engl. *continuous wave*) EPR-Spektroskopie und die Analyse über HPLC. Es zeigte sich im EPR-Spektrum (**Abbildung 28**), dass die Probe aktiv war und somit die Entschützung und Reoxidierung funktioniert hatte. Leider konnten nur 70 % des Ausgangsstoffs an Radikal in der Probe gemessen werden. Die Messung wurde bei verschiedenen pH-Werten wiederholt, um eine pH-Abhängigkeit der Entschützung auszuschließen.^[97] Sowohl bei pH = 7.4 als auch pH = 8.5 konnte die EPR-aktive Spezies zu 70 % in Bezug auf die Ausgangsstoffmenge ermittelt werden, womit eine pH-Abhängigkeit der Entschützung ausgeschlossen wurde. Mittels HPLC konnte aufgezeigt werden, dass nach der Entschützung kein geschütztes Edukt mehr vorlag, sondern dieses zu 70 % Radikal und 30 % Amin umgewandelt wurde. Dies bedeutet, dass für zukünftige PELDOR-Messungen mit diesem Nukleotid eine Aufreinigung des Entschützungsgemisches von Nöten sein wird.

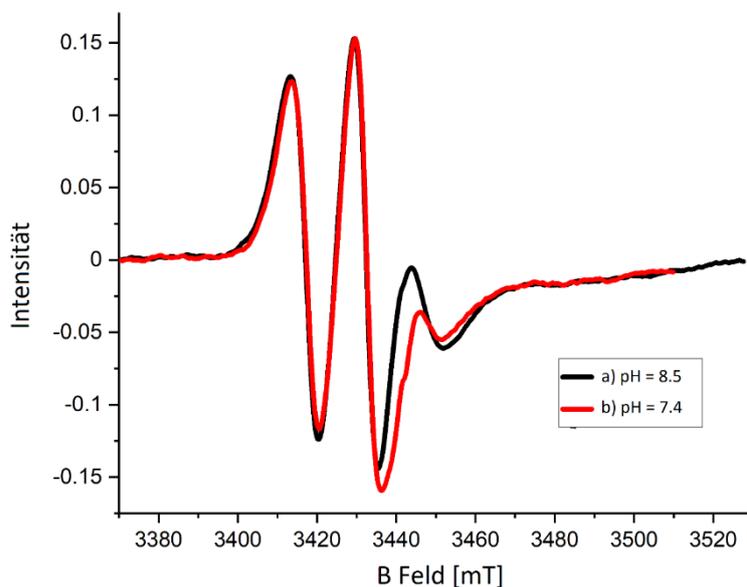


Abbildung 28: cw-Spektrum von Strang (V) mDNA-Tetramethyl bei pH = 8.5 und pH = 7.4 während der Photolyse.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, ausgehend von den günstigen Ausgangsverbindungen Desoxyadenosin und Phthalsäureanhydrid, ein neues photolabil geschütztes Nukleotid **1** und sein Dummypartner **2** synthetisiert werden. Positiv zu bemerken ist, dass einige Schritte im Vergleich zu ähnlichen literaturbekannten Reaktionen in Einfachheit, Reinheit oder Ausbeute verbessert wurden. So konnte die Ausbeute der wichtigen Umwandlung des Amins **46** zum Iodid **47** durch den Ersatz des vorherigen DCM/DIM-Gemisches durch reines DIM von 15 % auf akzeptable 50 % erhöht werden, was nicht nur Zeit, sondern auch zukünftige Chemikalienmengen einspart. Nicht nur hierbei, sondern auch bei der Nitrierung zu **61** oder auch der Oxidierung zu **63** war es von äußerster Wichtigkeit eine korrekte Temperaturkontrolle durchzuführen, da es sonst zu hohen Ausbeuteverlusten durch ungewollte Nebenreaktionen kommen konnte. Eine sehr interessante Beobachtung war die Kontrolle der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung durch die Anwendung verschieden starker Basen. Während schwache Basen wie KOAc nur zur Miyaura-Borilierung führten, begünstigten starke Basen wie K_3PO_4 die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung. Die Zusammenführung des Zucker-Bausteins **36** und des Isoindolin-Bausteins **37** funktionierte sehr gut, sodass das Nukleotid **1** durch die Schützung der exozyklischen Aminogruppe und Phosphorylierung des 3'-OH dargestellt werden konnte.

Die Synthese der 14mer DNA bzw. RNA Sequenzen mit den neuen Nukleotiden **1** und **2** funktionierten mit zufriedenstellenden Ausbeuten, nur die Abspaltung der Pac-Gruppe benötigte etwas harschere Bedingungen von 50 °C in 32 % Ammoniak über Nacht. Die photolabile Schutzgruppe in Strang (V) mDNA-Tetramethyl konnte nun abgespalten und das Nitroxid an Luft reoxidiert werden. Anhand von EPR-Spektren und einer HPLC-Analyse ergab sich jedoch eine Abspalteffizienz von nur 70 %. Dies bedeutet, dass für künftige PELDOR-Messungen eine Aufreinigung des Spaltgemisches zur Isolierung des Radikal-Strangs von Nöten ist.

Anhand des Schmelzpunkts der verschiedenen Duplexe wurde anschließend die mögliche Anwendung des Nukleotids weiter analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass der Benzolring sowohl in **2** als auch in **1** eine erhebliche Destabilisierung des Duplex erzeugte. Somit ist das neue photolabil geschützte Nukleotid als EPR-Sonde in der Mitte

von Sequenzen nur bedingt geeignet. Zukünftige Experimente könnten das neue Spin-Label nicht in der Mitte, sondern an den Enden der Sequenzen ähnlich anderer Arbeiten^[92,94,164] einbauen, wo die Destabilisierung eine geringere Auswirkung hat, oder die Sequenz für eine bessere Stabilisierung verlängern.^[164] Bei ausreichenden Duplexstabilitäten könnten hiermit dann PELDOR-Messungen durchgeführt werden. Ähnlich starre, sterisch anspruchsvolle Nukleotide zeigten auch ähnliche Schmelzpunkte für ihre Duplexe^[120], dennoch wurden sie für weitere Markierungsexperimente verwendet. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um EPR-Sonden, sondern um Fluoreszenzmarker. Da auch das neue Spin-Label **1** ein großes π -System besitzt, könnte eine komplett neue Herangehensweise die Anwendung als Fluoreszenzmarker sein. Genaue Absorptionsmessungen müssten noch durchgeführt werden, jedoch zeigte das Spin-Label sehr stark fluoreszierende Eigenschaften unter der UV-Lampe während der Säulenchromatographie. Hierbei würde die Synthese um einiges kürzer ausfallen, da das EPR-aktive Nitroxid nicht mehr benötigt wird und geschützt werden muss, was Zeit und Chemikalien spart.

Zusammenfassend wurde über eine 22-stufige Synthese ein neues photolabil geschütztes Spin-Label synthetisiert, in ein 14mer integriert, erfolgreich entschützt und mittels EPR-Spektroskopie vermessen. Schmelzpunktmessungen zeigten jedoch eine große Destabilisierung und deuten darauf hin, dass **1** und Nukleotide mit ähnlich Benzolringen nur eingeschränkt als EPR-aktive Nukleotide geeignet sind.

6. Experimenteller Teil

6.1. Allgemeine synthetische Arbeitsmethoden

Wasserfreie Lösungsmittel

Sämtliche Reaktionen mit sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Inertgasatmosphäre (Argon) durchgeführt. Die verwendeten trockenen Lösungsmittel wurden bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt und nicht weiter getrocknet.

Hydrierungen unter erhöhtem Druck

Eine Autoklavenhülse wurde mehrere Minuten lang mit Argon gespült. Anschließend erfolgte die Zugabe der zu reduzierenden Substanz, des Lösemittels und des Katalysators. Jedwede Reaktantreste am Hülsenrand wurden mit wenigen Millilitern des Lösemittels in das Reaktionsgemisch runtergespült. Im Anschluss wurde die Apparatur geschlossen und mit Argon auf einen Druck von fünf Bar befüllt. Das Gas wurde anschließend wieder abgelassen und der Gasaustausch insgesamt 3-mal durchgeführt. Dieser Vorgang wurde mit H₂ wiederholt und erst dann der gewünschte Druck eingestellt. Nach beendeter Reaktion und Abkühlen der Apparatur auf RT, wurde der Druck abgelassen und zum Schluss noch 3-mal mit Argon befüllt, bevor die Apparatur geöffnet werden konnte.

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur am DPX250- (¹H: 250 MHz), AV300- (¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz, ¹⁹F: 282 MHz), AV400- (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz, ¹¹B: 128 MHz, ³¹P: 161 MHz), AV500- (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz, ³¹P: 202 MHz) und AV600- (¹H: 600 MHz, ¹³C: 150 MHz) der Firma *Bruker* aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und beziehen sich beim ¹H-Signal auf Aceton-d₆ (quin, δ = 2.05 ppm), CDCl₃ (s, δ = 7.26 ppm), DMSO-d₆ (quin, δ = 2.50 ppm) oder CD₃CN (quin, δ = 1.94 ppm). Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hz angegeben mit den Feinstrukturen s für Singulett, bs für breites Singulett, ps für Pseudosingulett, d für Dublett, dd für Dublett von Dublett, dt Dublett von Triplet, t für Triplet, td für Triplet von Dublett, q für Quartett und m für Multiplet. Die für die Zuordnung relevanten

Protonen sind kursiv dargestellt. Die chemischen Verschiebungen δ der ^{13}C -Signale sind Protonen-entkoppelt und in ppm angegeben. Sie beziehen sich auf Aceton- d_6 (sep, $\delta = 29.84$ ppm), CDCl_3 (t, $\delta = 77.0$ ppm) oder DMSO- d_6 (sept, $\delta = 39.5$ ppm). Die ^{19}F -Signale und ^{31}P -Signale sind Protonen-entkoppelt und wurden nicht normiert.

Präparative Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde das Kieselgel 60 (0.04–0.063 mm, Macherey-Nagel) verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Platten aus Aluminiumfolie, beschichtet mit Kieselgel 60 und dem UV-Indikator UV₂₅₄ der Firma *Macherey-Nagel*, verwendet. Die Sichtbarmachung erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma *Konrad Benda* (Typ NU-6KL) bei 254 nm bzw. 366 nm. Alle R_f-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Die Aufnahme der FT-IR-Spektren erfolgte an einem Spectrum Two Spektrometer der Firma *PerkinElmer*, ausgestattet mit einer UATR Two Einheit zur direkten Messung von Reinstoffen. Die Signale wurden auf ganze Zahlen gerundet und die Wellenzahl in cm^{-1} angegeben. Die Kennzeichnung der Bandenintensitäten erfolgte mit *s* für strong, *m* für medium oder *w* für weak.

Massenspektroskopie

Die ESI-Massenspektren wurden mit den Geräten LCMS 2020 der Firma *Shimadzu*, Surveyor MSQ der Firma *ThermoFisher* und Voyager-DE STR der Firma *Perceptive Biosystems* (heute: *Applied Biosystems*) aufgenommen. Für die Aufnahme der HRMS-Spektren wurde das Gerät LTQ Orbitrap XL der Firma *ThermoScientific* verwendet.

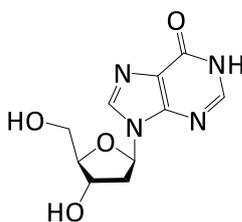
Schmelzpunktmessung für Feststoffe

Die Messung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Gerät von *Schorpp* MPM-H2 (unkorrigiert).

Messung von pH-Werten

Zur Messung von pH-Werten von Puffern für die HPLC-Anlage und die Abhängigkeit des Duplexschmelzpunkts vom pH-Wert wurde ein mit einer Glaselektrode ausgestattetes CG 841 pH-Meter von *Schott* verwendet.

6.2. Synthesen bis 36

6.2.1. 2'-Desoxyinosin (**42**)^[165]

252.23 g/mol

42

Eine Suspension aus Desoxyadenosin (**34**) (25.66 g, 101.30 mmol, 1.0 Äq) in H₂O (550 mL) wurde mit Adenosin-Desaminase (100 µL, 10.00 mg/mL, aus einem Kalbsdarm, Roche, Art.-Nr.: 10102105001^[166]) versetzt und 48 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der farblose Feststoff unter vermindertem Druck getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Analytik

Charakterisierung farbloser Feststoff.

Ausbeute 25.56 g (101.34 mmol, quant.).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 12.16 (bs, 1 H, NH), 8.30 (s, 1 H, C⁸-H), 8.06 (s, 1 H, C²-H), 6.31 (t, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1 H, C¹-H), 5.32 (bs, 1 H), 4.97 (bs, 1 H), 4.38 (bs, 1H), 3.88–3.84 (m, 1 H, C⁴H), 3.57–3.49 (m, 2 H, C⁵-H), 2.66–2.58 (m, 1 H, C^{2'}H), 2.33–2.25 (m, 1 H, C^{2'}-H).

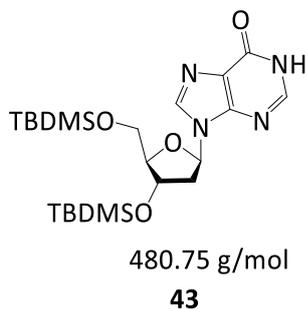
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 158.6, 147.9, 145.8, 138.5, 124.4, 87.9, 83.5, 70.6, 61.6.

IR [cm⁻¹]: 3452w (O-H), 3298w (br.), 2937w, 2809w, 1709s, 1688s (C=O, Lactam), 1592w, 1364w, 1311m, 1204s, 1082s, 848m.

Smp.: 220 °C (Zers.); Lit. 220 °C (Zers.).^[167]

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₁₀H₁₁N₄O₄ [M-H]⁻ 251.08, gefunden: 251.10 (100) [M-H]⁻.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₁₀H₁₂N₄O₄+H⁺ [M+H]⁺ 253.09313, gefunden: 253.09304 [M+H]⁺.

6.2.2. 3',5'-O-Bis(tert-butyldimethylsilyl)2'-desoxyinosin (43)

Eine Suspension aus Desoxyinosin (**42**) (23.10 g, 91.58 mmol, 1.0 Äq), Imidazol (62.35 g, 915.8 mmol, 10.0 Äq) und 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (11.19 g, 91.58 mmol, 1.0 Äq) in abs. Acetonitril (250 mL) wurde nach der Zugabe von *tert*-Butyldimethylchlorsilan (41.41 g, 274.40 mmol, 3.0 Äq) über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Der weiße Feststoff wurde komplett in DCM gelöst und mit wässriger, 5 %iger Zitronensäure-Lösung und danach mit H₂O gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 9:1).

Analytik

Charakterisierung farbloser, kristalliner Feststoff.

Ausbeute 41.17 g (85.64 mmol, 93 %)

R_f: 0.85 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 12.35 (s, 1 H, NH), 8.25 (s, 1 H, C²-H), 8.04 (s, 1 H, C⁹-H), 6.30 (t, ³J_{HH} = 6.4 Hz, 1 H, C¹-H), 4.60–4.57 (m, 1 H, C³-H), 3.87–3.84 (m, 1 H, C⁴-H), 3.78–3.64 (m, 2 H, C⁵-H), 2.82–2.75 (m, 1 H, C²-H), 2.36–2.30 (m, 1 H, C²-H), 0.89 (s, 9 H, CH₃), 0.85 (s, 9 H, CH₃), 0.11 (s, 6 H, SiCH₃), 0.03 (s, 3 H, SiCH₃), 0.01 (s, 3 H, SiCH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 159.5, 148.7, 145.1, 138.7, 125.1, 88.2, 84.6, 71.8, 62.8, 41.7, 26.1, 25.9, 18.6, 18.1, -4.5, -4.7, -5.3, -5.4.

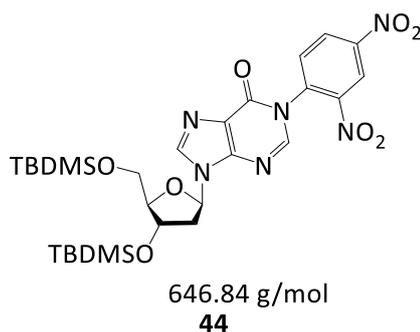
IR [cm⁻¹]: 2929*m*, 2853*m*, 1976*w*, 1698*s*, 1588*m*, 1470*m* (C-H, Methyl), 1335*m*, 1200*m*, 1107*s*, 829*s*.

Smp.: 240 °C.

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für $C_{22}H_{41}N_4O_4Si_2$ $[M+H]^+$ 481.29, gefunden: 481.84 (64) $[M+H]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $C_{22}H_{40}N_4O_4Si_2+Na^+$ $[M+Na]^+$ 503.24803, gefunden: 503.24737 $[M+Na]^+$.

6.2.3. 3',5'-O-Bis(tert-butyldimethylsilyl)-1-(2,4-dinitrophenyl)2'-desoxyinosin (**44**)



Eine Suspension aus **43** (40.85 g, 94.56 mmol, 1.0 Äq), 2,4-Dinitrochlorbenzol (34.25 g, 169.10 mmol, 2.0 Äq) und Kaliumcarbonat (23.37 g, 169.10 mmol, 2.0 Äq) in abs. Acetonitril (500 mL) wurde 4 Std. refluxiert.

Die dunkelbraune Lösung wurde filtriert und das Filtrat, nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, in DCM gelöst und mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 2:1).

Analytik

Charakterisierung gelber Schaum.

Ausbeute 32.07 g (49.58 mmol, 59 %)

R_f : 0.58 (cHex/EE 1:1)

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 8.98 (s, 1 H, C^3 -H), 8.66–8.62 (m, 1 H, C^5 -H), 8.18–8.16 (m, 1 H, C^2 -H), 8.03 (s, 1 H, C^8 -H), 7.77–7.70 (m, 1 H, C^6 -H), 6.43–6.41 (m, 1 H, C^1 -H), 4.61 (ps, 1 H, C^3' -H), 4.04 (ps, 1 H, C^4 -H), 3.86–3.78 (m, 2 H, C^5' -H), 2.55–2.45 (m, 2 H, C^2' -H), 0.91 (s, 18 H, CH_3), 0.11–0.09 (m, 12 H, $SiCH_3$).

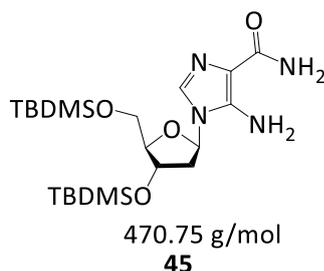
^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 155.4, 148.3, 147.3, 146.5, 145.0, 139.3, 135.9, 132.0, 128.9, 124.2, 121.4, 88.4, 84.6, 71.9, 62.9, 41.9, 26.1, 18.1, -4.5, -4.7, -5.3, -5.4.

IR [cm^{-1}]: 2953w, 2852w, 1709m, 1539s (N-O, Nitro), 1342m, 1225m, 837s.

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_8\text{Si}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ 647.29, gefunden: 647.33 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_8\text{Si}_2+\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ 669.24949, gefunden: 669.24856 $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$.

6.2.4. 5-Amino-1-[3',5'-O-bis(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl]imidazol-4-carboxamid (45)



Eine Suspension aus **44** (31.95 g, 49.39 mmol, 1.0 Äq) in Ethylendiamin (230 mL) wurde 3 Std. bei 60 °C gerührt.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung bei 0 °C mit H_2O versetzt und mit EE (5x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 1:2).

Analytik

Charakterisierung gelber Schaum.

Ausbeute 17.33 g (36.81 mmol, 75 %)

R_f : 0,15 (cHex/EE 1:2)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm]: 7.31 (s, 1 H, $\text{C}^2\text{-H}$), 6.80–6.66 (m, 2 H, $\text{O}=\text{C-NH}_2$), 5.91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 1 H, $\text{C}^1\text{-H}$), 5.84 (bs, 2 H, C-NH_2), 4.46–4.44 (m, 1 H, $\text{C}^4\text{-H}$), 3.82–3.81 (m, 1 H, $\text{C}^3\text{-H}$), 3.703.67 (m, 2 H, C^5H_2), 2.46–2.41 (m, 1 H, $\text{C}^2\text{-H}$), 2.25–2.17 (m, 1 H, $\text{C}^2\text{-H}$), 0.89–0.88 (2s, 18 H, CH_3), 0.10–0.05 (m, 12 H, SiCH_3).

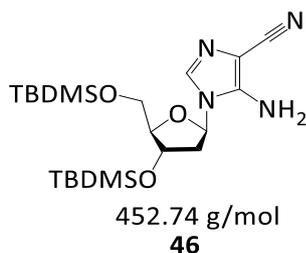
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm]: 166.7, 142.7, 127.3, 112.8, 86.9, 82.8, 71.9, 62.7, 25.8, 25.7, 18.0, 17.8, -4.8, -4.9, -5.5, -5.6.

IR [cm^{-1}]: 3468w (N-H, prim. Amin), 3442w, 3346w, 2926m, 1661m ($\text{C}=\text{O}$, prim. Amid), 1619m (N-H, Amin), 1465m, 1252m, 1109m, 832s.

MS (ESI): berechnet für $C_{21}H_{42}N_4O_4Si_2Na$ $[M+Na^+]^+$ 493.26, gefunden: 493.29 (100) $[M+Na^+]^+$, 471.29 (13) $[M+H]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $C_{21}H_{42}N_4O_4Si_2K^+$ $[M+K^+]^+$ 509.23762, gefunden: 509.23766 $[M+K^+]^+$.

6.2.5. 5-Amino-1-[3',5'-O-bis(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl]imidazol-4-carbonitril (**46**)



Eine Lösung aus **45** (17.20 g, 36.54 mmol, 1.0 Äq) in abs. Pyridin (200 mL) wurde mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (8.36 g, 43.84 mmol, 1.2 Äq) versetzt und anschließend für 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt.

Die orangene Lösung wurde mit Ethanol (15 mL) gequench und mit viel Toluol (3x) koevaporiert. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen, mit H₂O (2x) gewaschen und nach dem Trocknen über MgSO₄ säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 97:3).

Analytik

Charakterisierung weiße Nadeln.

Ausbeute 12.30 g (27.17 mmol, 72 %)

R_f: 0.50 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]: 7.39 (s, 1 H, C²-H), 6.26 (s, 2 H, NH₂), 5.91 (t, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1 H, C^{1'}-H), 4.46–4.41 (m, 1 H, C^{4'}-H), 3.84–3.78 (m, 1 H, C^{3'}-H), 3.72–3.64 (m, 2 H, C^{5'}-H), 2.46–2.19 (m, 2 H, C^{2'}-H), 0.88–0.87 (2s, 18 H, CH₃), 0.09–0.04 (m, 12 H, SiCH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 146.5, 130.9, 115.9, 95.2, 88.2, 86.2, 72.01, 62.9, 39.9, 26.1, 25.9, 18.7, 18.1, -4.5, -4.7, -5.3, -5.35.

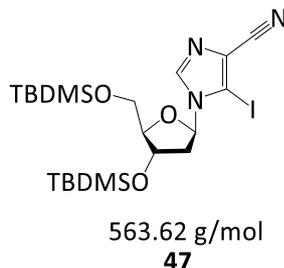
IR [cm⁻¹]: 3335w, 2931w, 2209m (C≡N, Nitril), 1651w, 1619w, 1582m, 1470m, 1252m, 1077s, 843s.

Smp.: 75 °C.

MS (ESI): berechnet für $C_{21}H_{41}N_4O_3Si_2$ $[M+H]^+$ 453.26, gefunden: 453.30 (54) $[M+H]^+$, 491.26 (52) $[M+K]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $C_{21}H_{40}N_4O_3Si_2+Na^+$ $[M+Na]^+$ 475.25312, gefunden: 475.25358 $[M+Na]^+$.

6.2.6. 5-Iod-1-[3',5'-O-bis(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl]imidazol-4-carbonitril (**47**)



Eine Suspension aus **46** (1.75 g, 3.87 mmol, 1.0 Äq) in Diiodmethan (35 mL) wurde bei 100 °C tropfenweise mit Isopentylnitrit (2.20 mL, 0.870 g/mL, 16.2 mmol, 4.2 Äq) versetzt und für 1 Std. bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (cHex \rightarrow cHex/EE 5:1).

Analytik

Charakterisierung gelber Feststoff.

Ausbeute 1.08 g (1.92 mmol, 50 %)

R_f: 0.77 (cHex/EE 7:3)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 8.11 (s, 1 H, C²-H), 5.96 (t, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1 H, C¹-H), 4.55–4.49 (m, 1 H, C⁴-H), 4.02–3.98 (m, 1 H, C³-H), 3.89–3.74 (m, 2 H, C⁵-H), 2.49–2.39 (m, 1 H, C^{2'}-H), 2.26–2.16 (m, 1 H, C^{2'}-H), 0.91 (s, 18 H, CH₃), 0.10 (s, 12 H, SiCH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 139.7, 122.8, 114.5, 89.3, 88.5, 78.8, 71.2, 62.4, 43.1, 26.1, 25.8, 18.5, 18.1, -4.5, -4.7, -5.3, -5.4.

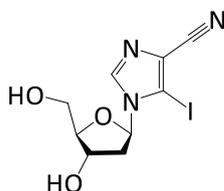
IR [cm⁻¹]: 2953w, 2862w, 2230w, 1252m, 827s, 678s (C-I).

Smp.: 120 °C

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für $C_{21}H_{39}IN_3O_3Si_2$ $[M+H]^+$ 564.15, gefunden: 564.23 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $C_{21}H_{38}IN_3O_3Si_2+Na^+$ $[M+Na^+]^+$ 586.13886, gefunden: 586.13817 $[M+Na^+]^+$.

6.2.7. 5-Iod-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)imidazol-4-carbonitril (**48**)



335.10 g/mol
48

Eine Lösung aus **47** (2.30 g, 4.08 mmol, 1.0 Äq) und Triethylamin-Trihydrofluorid (2.20 mL, 37 %, 38.8 mmol, 9.5 Äq) in abs. THF (50 mL) wurde in einem Glaskolben bei Raumtemperatur für 20 Std. gerührt.

Das Gemisch wurde nach Entfernen des Lösungsmittels, säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 95:5).

Analytik

Charakterisierung farbloser Feststoff.

Ausbeute 1.24 g (3.70 mmol, 91 %)

R_f: 0.77 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 8.33 (s, 1 H, C²-H), 6.08 (t, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 1 H, C^{1'}-H), 4.64–4.55 (m, 2 H, C^{4'}-H, C^{3'}-O-H), 4.23 (t, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 1 H, C^{5'}-O-H), 4.07–4.03 (m, 1 H, C^{3'}-H), 3.80–3.76 (m, 2 H, C^{5'}-H), 2.58–2.53 (m, 2 H, C^{2'}-H).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 141.0, 122.7, 115.6, 90.0, 89.5, 82.7, 71.7, 62.4, 42.5

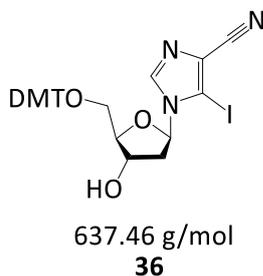
IR [cm⁻¹]: 3458m, 3261m, 2932w, 2878w, 2252m, 1486m, 1332m, 1087s, 944s, 641s (C-I).

Smp.: 97 °C.

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₉H₁₁IN₃O₃ $[M+H^+]^+$ 335.98, gefunden: zers.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₉H₁₀IN₃O₃+H⁺ $[M+H^+]^+$ 335.98396, gefunden: 335.98392 $[M+H^+]^+$.

6.2.8. 5-Iod-1-[5'-O-bis(methoxyphenyl)phenyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl]imidazol-4-carbonitril (**36**)



Ein Gemisch aus **48** (1.23 g, 3.67 mmol, 1.0 Äq) und 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.50 g, 4.43 mmol, 1.2 Äq) in abs. Pyridin (34 mL) wurde über Nacht unter Argon bei Raumtemperatur gerührt.

Nach dem langsamen Quenchen mit MeOH und gesättigter NaHCO₃-Lösung im Wasserbad, wurde das Gemisch mit EE (1x) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittels unter vermindertem Druck, bei einer Wasserbadtemperatur von max. 30 °C entfernt und mit Toluol koevaporiert. Das Produkt wurde zum Schluss säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 1:1 + 1 % NEt₃).

Analytik

Charakterisierung farbloser Schaum.

Ausbeute 1.59 g (2.49 mmol, 68 %)

R_f: 0.59 (cHex/EE 1:3+1 % NEt₃).

¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 8.11 (s, 1 H, C²-H), 7.43–7.41 (m, 2 H, Ar-H), 7.31–7.20 (m, 7 H, Ar-H), 6.87–6.85 (m, 4 H, Ar-H), 6.12 (t, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 1 H, C^{1'}-H), 4.68–4.64 (m, 2 H, C^{4'}-H, C^{3'}-O-H), 4.17–4.14 (m, 1 H, C^{3'}-H), 3.78 (s, 6 H, CH₃), 3.35–3.27 (m, 2 H, C^{5'}-H), 2.69–2.61 (m, 2 H, C^{2'}-H).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 159.7, 145.9, 140.5, 136.7, 130.9, 128.9, 128.6, 127.6, 123.3, 115.6, 113.9, 89.43, 87.8, 87.1, 83.0, 71.7, 64.4, 55.5, 41.6.

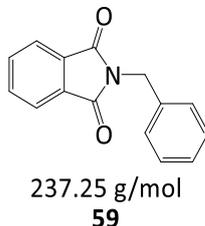
IR [cm⁻¹]: 3341w, 2926w, 2235w, 1900w, 1608m, 1502s, 1454m, 1300m, 1247s, 1172s, 1029s, 827s, 582s.

MS (ESI): berechnet für C₃₀H₂₉IN₃O₅ [M+H⁺]⁺ 638.11, gefunden: zers.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₃₀H₂₈IN₃O₅+K⁺ [M+K⁺]⁺ 676.07052, gefunden: 676.08200 [M+K⁺]⁺.

6.3. Synthesen bis 37

6.3.1. N-Benzylphthalimid (59)^[168]



Eine Suspension aus Phthalsäureanhydrid (55.25 g, 373.0 mmol, 1.0 Äq) in Essigsäure (425 mL) wurde nach der Zugabe von Benzylamin (52.9 mL, 485.30 mmol, 1.3 Äq) für 1.5 Std. bei 125 °C gerührt.

Das Gemisch wurde in einem Eisbad abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Analytik

Charakterisierung farbloser, kristalliner Feststoff.

Ausbeute 78.57 g (331.2 mmol, 89 %)

R_f: 0.80 (cHex/DCM 1:5)

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆), δ [ppm]: 7.85–7.81 (m, 4 H, Ar-*H*), 7.39–7.38 (m, 2 H, Ar-*H*), 7.33–7.31 (m, 2 H, Ar-*H*), 7.26–7.25 (m, 1 H, Ar-*H*), 4.83 (s, 2 H, CH₂).

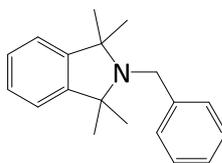
¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-*d*₆), δ [ppm]: 168.6, 136.0, 135.2, 133.1, 129.5, 128.9, 128.5, 123.9, 42.0.

IR [cm⁻¹]: 3060*w*, 1762*m*, 1705*s*, 1468*m*, 1332*s*, 1059*s*, 717*s*.

Smp.: 110 °C; Lit. 111113 °C.^[169]

MS (ESI): *m/z* [%] = berechnet für C₁₅H₁₂NO₂ [M+H⁺]⁺ 238.08, gefunden: 238.17 (61) [M+H⁺]⁺.

HRMS (MALDI): *m/z* = berechnet für C₁₅H₁₁NO₂+Na⁺ [M+Na⁺]⁺ 260.06820, gefunden: 260.06813 [M+Na⁺]⁺.

6.3.2. 2-Benzyl-1,1,3,3-tetramethylisoindolin (60)^[135]265.18 g/mol
60

Mit Et₂O (100 mL) überschichtete Magnesiumspäne (9.22 g, 379.34 mmol, 6.0 Äq) wurden tropfenweise mit einer Lösung aus Iodmethan (24.0 mL, 379.34 mmol, 6.0 Äq) in 100 mL Et₂O versetzt. Nach einstündigem Refluxieren des Gemisches wurde das Volumen mittels einer Dean-Stark-Apparatur auf die Hälfte reduziert und mit 100 mL Toluol versetzt. Der restliche Et₂O wurde abdestilliert und eine Lösung aus Phthalimid **59** (15.00 g, 63.22 mmol, 1.0 Äq) in 100 mL Toluol auf einmal hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Std. refluxiert und nach Einengen des Volumens auf die Hälfte mit cHexan (200 mL) versetzt.

Bei 0 °C wurden die reaktiven Reste mit einer gesättigten NH₄Cl-Lsg. tropfenweise gequenchet. Das violette Gemisch rührte anschließend 1 Std. bei Raumtemperatur. Die organische Phase wurde abdekantiert und die wässrige Phase noch 4-mal mit cHex auf die gleiche Weise extrahiert. Die vereinigten violetten, organischen Phasen wurden filtriert, über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (cHex + 1 % NEt₃).

Analytik

Charakterisierung farbloser, kristalliner Feststoff.

Ausbeute 7.35 g (27.69 mmol, 44 %), Lit. 39 %.^[170]

R_f: 0.72 (cHex)

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆), δ [ppm]: 7.48 (d, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 2 H, Ar-H), 7.307.28 (m, 2 H, Ar-H), 7.22–7.19 (m, 5 H, Ar-H), 4.02 (s, 2 H, CH₂), 1.31 (s, 12 H, CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-*d*₆), δ [ppm]: 148.7, 144.4, 129.2, 128.8, 127.7, 127.3, 122.1, 65.9, 46.9, 28.77.

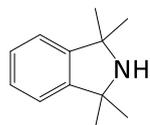
IR [cm⁻¹]: 2965*m*, 1810*w*, 1453*m*, 1195*m*, 744*s*.

Smp.: 56 °C, Lit. 61.061.4 °C.^[170]

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für $C_{19}H_{24}N$ $[M+H]^+$ 266.19, gefunden: 266.33 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $C_{19}H_{23}N+H^+$ $[M+H]^+$ 266.19033, gefunden: 266.19048 $[M+H]^+$.

6.3.3. 1,1,3,3-Tetramethylisoindolin (61)



175.14 g/mol
61

Eine Lösung aus **60** (6.54 g, 24.64 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (280 mL) wurde unter Argon mit Pd/C (10 %, 420 mg, 395 μ mol, 0.15 Äq) versetzt und rührte anschließend über Nacht bei Raumtemperatur unter H_2 -Atmosphäre.

Nach Filtrieren des Gemisches über Celite® wurde dieses säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 3:1 + 1 % NEt_3).

Analytik

Charakterisierung farbloser Feststoff.

Ausbeute 4.00 g (22.82 mmol, 93 %), Lit. 95 %.^[170]

R_f: 0.30 (cHex/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 7.20–7.13 (m, 4 H, Ar-*H*), 1.34 (s, 12 H, *CH*₃).

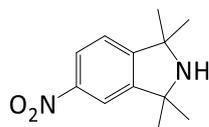
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 148.8, 126.8, 121.3, 62.1, 32.0.

IR [cm^{-1}]: 2958s, 1667w, 1449m, 1167m, 758s.

Smp.: 31 °C, Lit. 36.036.5 °C.^[170]

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für $C_{12}H_{18}N$ $[M+H]^+$ 176.14, gefunden: 176.03 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $C_{12}H_{17}N+H^+$ $[M+H]^+$ 176.14338, gefunden: 176.14320 $[M+H]^+$.

6.3.4. 1,1,3,3-Tetramethyl-5-nitroindolin (62)^[134]220.12 g/mol
62

Eine Lösung aus **61** (3.00 g, 17.12 mmol, 1.0 Äq) in konz. H₂SO₄ (11 mL) wurde bei 0 °C tropfenweise mit konz. HNO₃ (1.86 mL, 41.08 mmol, 2.4 Äq) versetzt und anschließend bei einer Ölbadtemperatur von 120–130 °C für 2 Std. gerührt.

Das Gemisch kühlte auf Raumtemperatur ab und wurde vorsichtig bei 0 °C mit H₂O verdünnt und mittels einer 25 %igen KOH-Lösung ein pH von 14 eingestellt. Der hierbei ausgefallene Feststoff wurde in H₂O gelöst und die wässrige Phase mit Et₂O (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden, nach dem Trocknen über MgSO₄, säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 5:1 + 1% NEt₃).

Analytik

Charakterisierung gelber Feststoff.

Ausbeute 2.33 g (10.58 mmol, 62 %), Lit. 75 %.^[134]

R_f: 0.42 (cHex/EE 1:2)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 8.13 (dd, ³J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 8.3 Hz, 1 H, C⁶-H), 7.96 (d, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1 H, C⁴-H), 7.23 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 1 H, C⁷-H), 1.84 (s, 1 H, NH), 1.49 (s, 6 H, CH₃), 1.47 (s, 6 H, CH₃).

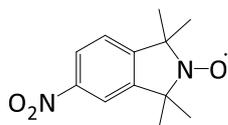
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 156.2, 150.8, 148.2, 123.4, 122.3, 117.3, 63.1, 62.9, 31.9, 31.8.

IR [cm⁻¹]: 3309w, 2966m, 1600w, 1520s, 1462m, 1336s, 1109w, 740s.

Smp.: 103 °C, Lit. 104105 °C.^[171]

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₁₂H₁₇N₂O₂ [M+H⁺]⁺ 221.13, gefunden: 221.19 (100) [M+H⁺]⁺.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₁₂H₁₆N₂O₂+H⁺ [M+H⁺]⁺ 221.12845, gefunden: 221.12843 [M+H⁺]⁺.

6.3.5. 1,1,3,3-Tetramethyl-5-nitroindolinyl-2-oxyl (63)^[134]

235.11 g/mol

63

Eine Lösung aus **62** (4.06 g, 18.43 mmol, 1.0 Äq) in DCM (75 mL) wurde nach der Zugabe von *m*-Chlorperbenzoesäure (77 %, 6.20 g, 27.65 mmol, 1.5 Äq) für 10 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Die orangene Lösung wurde weiter mit DCM verdünnt und bei 0 °C mit 25 %iger KOH-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nach dem Trocknen über MgSO₄ säulenchromatographisch gereinigt (DCM/cHex 5:1).

Analytik

Charakterisierung orangener Feststoff.

Ausbeute 4.11 g (17.47 mmol, 95 %), Lit. 90 %.^[134]

R_f: 0.56 (cHex/DCM 1:5)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 8.04 (d, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1 H, C⁶-H), 7.90 (s, 1 H, C⁴-H), 7.18–7.14 (m, C⁷-H + Phenylhydrazin-H), 1.37 (s, 6 H, CH₃), 1.35 (s, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 152.6, 148.0, 147.0, 123.3, 122.7, 117.6, 67.4, 67.2, 26.5, 26.34.

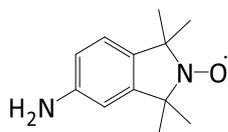
IR [cm⁻¹]: 2979w, 2926w, 1598w, 1528s, 1454m, 1348s, 1109m, 740s.

Smp.: 122 °C

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₁₂H₁₅N₂O₃ [M]⁺ 235.11, gefunden: 235.05 (44) [M]⁺.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₁₂H₁₅N₂O₃ [M]⁺ 235.10772, gefunden: 235.10774 [M]⁺.

6.3.6. 1,1,3,3-Tetramethyl-5-aminoisoindolinyl-2-oxyl (**64**)^[170]



205.13 g/mol

64

Die orange Lösung aus **63** (1.00 g, 4.25 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (40 mL) wurde mit Pd/C (10 %, 20.00 mg, 191.28 μ mol, 0.04 Äq) versetzt und für 45 Min. bei 30 °C und 5 bar H₂-Druck gerührt. An der Luft reoxidierte das Zwischenprodukt danach zu **64**.

Das Gemisch wurde über Celite® filtriert und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 7:3).

Analytik

Charakterisierung orangener Feststoff.

Ausbeute 835 mg (4.07 mmol, 96 %), Lit. 86 %.^[170]

R_f: 0.71 (cHex/EE 1:1)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 6.80 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1 H, C⁷-H), 6.48 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1 H, C⁶-H), 6.35 (s, 1 H, C⁴-H), 1.31 (s, 6 H, CH₃), 1.30 (s, 6 H, CH₃).

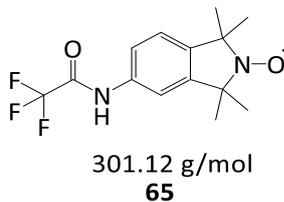
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 146.0, 145.8, 135.2, 122.4, 114.6, 108.3, 67.5, 67.1, 26.7, 26.4.

IR [cm⁻¹]: 3436w, 3346m, 2969m, 2044w, 1624s, 1497s, 1326s, 1125m, 816s.

Smp.: 155 °C, Lit. 192-194 °C.^[170]

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₁₂H₁₈N₂O· [M+H]⁺ 206.14 , gefunden: 206.06 (18) [M+H]⁺.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₁₂H₁₇N₂O· [M]⁺ 205.13354, gefunden: 205.13345 [M]⁺.

6.3.7. 2,2,2-Trifluor-N-(1,1,3,3-tetramethyl-2-oxyl-isoindolin-5-yl)acetamid (65)

Die orange Lösung aus **64** (2.76 g, 13.45 mmol, 1.0 Äq) in abs. THF (35 mL) wurde langsam mit Trifluoressigsäureanhydrid (5.75 mL, 41.15 mmol, 3.0 Äq) versetzt und danach bei Raumtemperatur für 3 Std. gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM verdünnt und mit ges. NaHCO₃-Lösung langsam gequenchet. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 5:1).

Analytik

Charakterisierung gelber Feststoff.

Ausbeute 3.91 g (12.98 mmol, 97 %)

R_f: 0.51 (cHex/EE 7:3)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 8.02 (s, 1 H, C⁴-H), 7.32 (s, 1 H, NH), 7.28–7.26 (m, 1 H, C⁶-H), 7.04–7.03 (m, 1 H, C⁷-H), 1.34 (s, 12 H, CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 154.8, 146.2, 143.1, 128.5, 122.8, 120.2, 119.6, 114.5, 68.2, 68.0, 26.5, 26.4.

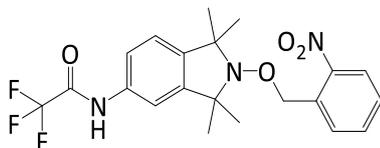
¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 75.63.

IR [cm⁻¹]: 3298w, 2985w, 1714m, 1608w, 1454w, 1146s, 843m.

Smp.: 190 °C

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₁₄H₁₆F₃N₂O₂: [M]⁺ 301.11584, gefunden: 301.11586 [M]⁺.

6.3.8. 2,2,2-Trifluor-N-(1,1,3,3-tetramethyl-2-((2-nitrobenzyl)oxy)isoindolin-5-yl)acetamid (66)



437.16 g/mol
66

Eine Suspension aus **65** (2.45 g, 8.13 mmol, 1.0 Äq), Kupferpulver (879 mg, 13.82 mmol, 1.7 Äq), Cu(OTf)₂ (176 mg, 488 μmol, 0.06 Äq), 2-Nitrobenzylbromid (2.25 g, 10.41 mmol, 1.28 Äq) und 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin (255 mg, 1.38 mmol, 0.17 Äq) in abs. Toluol (45 mL) wurde 17 Std. bei einer Ölbadtemperatur von 123 °C gerührt.

Das Gemisch kühlte auf Raumtemperatur ab, wurde über Celite® filtriert und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 95:5 → 8:2).

Analytik

Charakterisierung farbloser Feststoff.

Ausbeute 3.50 g (8.00 mmol, 98 %)

R_f: 0.53 (cHex/EE 8:2)

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 10.18 (s, 1 H, NH), 8.04 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1 H, C³-H), 7.89 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1 H, C⁶-H), 7.82–7.77 (m, 1 H, C⁵-H), 7.65–7.61 (m, 1 H, C⁴-H), 7.59–7.57 (m, 2 H, C⁴-H, C⁶-H), 7.23 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 1 H, C⁷-H), 5.31 (s, 2 H, CH₂), 1.42 (s, 12 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 155.8, 155.5, 149.7, 146.7, 143.4, 136.8, 134.2, 133.9, 131.7, 129.8, 125.2, 123.1, 121.3, 118.4, 115.2, 76.0, 68.4, 68.2, 25.4.

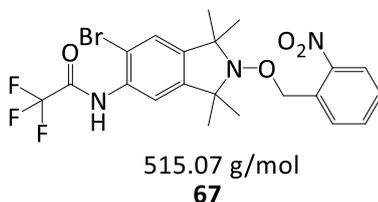
¹⁹F-NMR (282 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 76.20.

IR [cm⁻¹]: 3287w, 2974w, 1709s, 1608w, 1523s, 1491w, 1151s, 726s.

Smp.: 100 °C

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₂₁H₂₃F₃N₃O₄ [M+H⁺]⁺ 438.16, gefunden: 438.22 (100) [M+H⁺]⁺.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₂₁H₂₂F₃N₃O₄+H⁺ [M+H⁺]⁺ 438.16352, gefunden: 438.16327 [M+H⁺]⁺.

6.3.9. N-(6-Brom-1,1,3,3-tetramethyl-2-((2-nitrobenzyl)oxy)isoindolin-5-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid (67)

66 (1.38 g, 3.15 mmol, 1.0 Äq) und *N*-Bromsuccinimid (620 mg, 3.47 mmol, 1.1 Äq) wurden in abs. Acetonitril (30 mL) für 10 Std. bei einer Ölbadtemperatur von 80 °C gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 95:5).

Analytik

Charakterisierung farbloser Feststoff.

Ausbeute 1.10 g (2.13 mmol, 68 %)

R_f: 0.51 (cHex/Aceton 8:2)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 11.2 (s, 1 H, NH), 8.02 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 1 H, C³-H), 7.80–7.76 (m, 2 H, C⁵-H, C⁶-H), 7.64–7.60 (m, 2 H, C⁴-H, C⁷-H), 7.34 (s, 1 H, C⁴-H), 5.17 (s, 2 H, CH₂), 1.35 (s, 12 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 148.6, 146.2, 145.2, 133.5, 132.7, 131.9, 131.2, 129.4, 126.4, 124.3, 122.8, 119.9, 74.6, 67.11, 67.08, 29.4, 24.5.

¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 74.11.

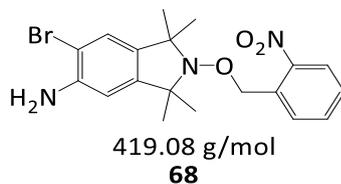
IR [cm⁻¹]: 3367w, 2963w, 1709s, 1598m, 1523s, 1406m, 1337s, 1183s, 1146s, 726s, 593s.

Smp.: 97 °C

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₂₁H₂₂BrF₃N₃O₄ [M+H]⁺ 516.07, gefunden: 516.13 [M+H]⁺.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₂₁H₂₁BrF₃N₃O₄+H⁺ [M+H]⁺ 516.07403, gefunden: 516.07388 [M+H]⁺.

6.3.10. 6-Brom-1,1,3,3-tetramethyl-2-((2-nitrobenzyl)oxy)isoindolin-5-amin (68)



Eine Lösung aus **67** (1.13 g, 2.18 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (28 mL) wurde mit KOH (1.83 g, 32.70 mmol, 15.0 Äq), gelöst in H₂O (4.71 g), versetzt und rührte anschließend für 72 Std. bei Raumtemperatur.

Das Gemisch wurde mit DCM verdünnt und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2x) extrahiert und die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/DCM 2:1).

Analytik

Charakterisierung hellgelber Feststoff.

Ausbeute 783 mg (1.86 mmol, 86 %)

R_f: 0.46 (cHex/Aceton 8:2).

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 8.03 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1 H, C³-H), 7.87 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1 H, C⁶-H), 7.79–7.77 (m, 1 H, C⁵-H), 7.63–7.61 (m, 1 H, C⁴-H), 7.18 (s, 1 H, C⁷-H), 6.67 (s, 1 H, C⁴-H), 5.28 (s, 2 H, CH₂), 4.83–4.80 (m, 2 H, NH₂), 1.40–1.33 (m, 12 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]: 148.5, 144.9, 144.8, 133.9, 133.4, 132.2, 131.1, 129.2, 125.1, 124.2, 108.0, 106.7, 74.4, 66.8, 66.5, 29.4, 24.8.

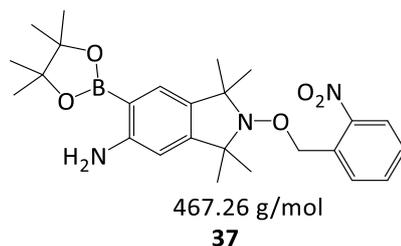
IR [cm⁻¹]: 3452w, 3357w, 2926w, 1736w, 1619w, 1518m, 1443w, 1332s, 715s, 614w.

Smp.: 139 °C

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₁₉H₂₃BrN₃O₃ [M+H⁺]⁺ 420.09, gefunden: 420.63 [M+H⁺]⁺.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₁₉H₂₂BrN₃O₃+H⁺ [M+H⁺]⁺ 420.09173, gefunden: 420.09158 [M+H⁺]⁺.

6.3.11. 1,1,3,3-Tetramethyl-2-((2-nitrobenzyl)oxy)-6-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)isoindolin-5-amin (37)



Eine Suspension aus **68** (1.70 g, 4.04 mmol, 1.0 Äq), Pd(dppf)Cl₂·DCM (290 mg, 364 μmol, 0.09 Äq), Bis(pinacolato)diboron (3.08 g, 12.13 mmol, 3.0 Äq) und KOAc (1.98 g, 20.22 mmol, 5.0 Äq) in abs. Toluol (86 mL) wurde 23 Std. bei einer Ölbadtemperatur von 80 °C gerührt.

Nach dem Filtrieren über Celite® wurde das Gemisch säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 95:5).

Analytik

Charakterisierung gelber Feststoff.

Ausbeute 1.62 g (3.47 mmol, 86 %)

R_f: 0.53 (cHex/Aceton 8:2).

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 8.03 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1 H, C³-H), 7.88 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1 H, C⁶-H), 7.81–7.77 (m, 1 H, C⁵-H), 7.64–7.60 (m, 1 H, C⁴-H), 7.26 (s, 1 H, C⁷-H), 6.42 (s, 1 H, C⁴-H), 5.28 (s, 2 H, CH₂), 5.25 (bs, 2 H, NH₂), 1.34 (s, 24 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 155.7, 151.0, 149.6, 134.18, 134.15, 133.2, 131.6, 130.1, 129.7, 125.1, 107.8, 84.2, 76.0, 68.1, 67.7, 25.8, 25.2.

¹¹B-NMR (128 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 33.29.

IR [cm⁻¹]: 3484w, 3378w, 2969w, 1730w, 1629m, 1523s, 1443m, 1374m, 1316s, 1135s, 1055m, 721w.

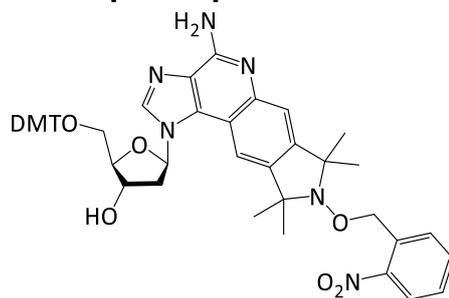
Smp.: 162 °C

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₂₅H₃₅BN₃O₅ [M+H⁺]⁺ 468.26, gefunden: 468.95 [M+H⁺]⁺.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₂₅H₃₄BN₃O₅+H⁺ [M+H⁺]⁺ 468.26643, gefunden: 468.26575 [M+H⁺]⁺.

6.4. Synthesen bis 1

6.4.1. Kupplung der Hauptkomponenten 36 und 37 zum Nukleosid 38



850.37 g/mol
38

Eine Suspension aus Pd(OAc)₂ (46.00 mg, 204 μmol, 0.11 Äq) und PPh₃ (140.0 mg, 533 μmol, 0.3 Äq) in abs. Dioxan (10 mL) rührte 5 Min. bei RT unter einem Ar-Strom. Nach der Zugabe von **36** (1.15 g, 1.85 mmol, 1.0 Äq), **37** (1.26 g, 2.70 mmol, 1.5 Äq), gelöst in abs. Dioxan (26 mL), und 0.3 M K₂CO₃-Lösung (18 mL) wurde das Reaktionsgemisch entgast und unter Lichtausschluss bei einer Ölbadtemperatur von 90 C für 5 Std. gerührt.

Das Gemisch wurde zwischen H₂O und EE verteilt und die wässrige Phase noch 3-mal mit EE extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 1:3 + 1 % NEt₃).

Analytik

Charakterisierung farbloser Schaum.

Ausbeute 1.36 g (1.59 mmol, 86 %)

R_f: 0.40 (cHex/EE 1:3 + 1 % NEt₃).

¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 8.04 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 1 H, C³-H), 7.98–7.97 (m, 1 H, C²-H), 7.89 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 1 H, C⁶-H), 7.80–7.77 (m, 1 H, C⁵-H), 7.64–7.61 (m, 1 H, C⁴-H), 7.48–7.46 (m, 2 H, Ar-H), 7.35–7.22 (m, 7 H, Ar-H), 7.04 (s 1 H, Ar-H), 6.91–6.86 (m, 4 H, Ar-H), 6.72–6.70 (m, 1 H, Ar-H), 5.94–5.81 (m, 1 H, C^{1'}-H), 5.31 (s, 2 H, CH₂), 4.73–4.71 (m, 2 H, NH₂), 4.54–4.46 (m, 2 H, C^{3'}-H, C^{3'}-O-H), 4.10–4.01 (m, 2 H, C^{4'}-H, EE), 3.79 (2s, 6 H, O-CH₃), 3.39–3.26 (m, 2 H, C^{5'}H₂), 2.27–2.54 (m, 1 H, C^{2'}-H), 2.43–2.22 (m, 1 H, C^{2'}-H), 1.46–1.37 (m, 12 H, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Aceton- d_6), δ [ppm]: 159.7, 149.5, 147.9, 147.7, 146.1, 146.0, 136.7, 134.2, 131.0, 129.8, 129.0, 128.6, 127.6, 125.2, 116.1, 114.0, 110.7, 109.5, 109.4, 87.5, 87.1, 76.0, 72.3, 68.3, 67.9, 65.1, 64.7, 60.5, 55.5, 43.0, 41.7.

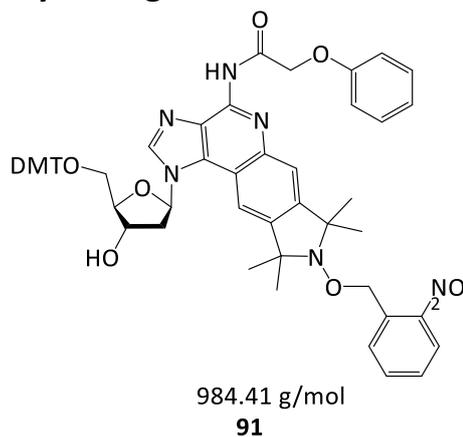
IR [cm^{-1}]: 3505w, 3357w, 2926m, 1730w, 1608m, 1507s, 1449m, 1364m, 1247s, 1178s, 1029s, 832s.

Smp.: 60 °C

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für $\text{C}_{49}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 851.38, gefunden: 852.75 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für $\text{C}_{49}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_8+\text{H}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 851.37627, gefunden: 851.37548 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.4.2. Phenoxyacetylierung von **38** zu **91**



Eine Lösung aus **38** (391 mg, 460 μmol , 1.0 Äq) in abs. Acetonitril (4 mL) unter Argon wurde bei 0 °C zuerst mit dest. NEt_3 (150 μL , 1.08 mmol, 2.35 Äq) und danach mit Phenoxyacetylchlorid (100 μL , 727 μmol , 1.58 Äq) versetzt. Anschließend rührte das Gemisch für 6 Min. bei 0 °C und danach 10 Min. bei RT. Das Gemisch wurde daraufhin nochmals bei 0 °C mit dest. NEt_3 (150 μL , 1.08 mmol, 2.35 Äq) und anschließend PacCl (100 μL , 727 μmol , 1.58 Äq) versetzt und rührte weitere 20 Min. bei RT. Zum Schluss wurde 4-mal alle 10 Min. eine 28%ige, methanolische NaOMe -Lösung (1 mL) hinzugegeben.

Das Gemisch wurde zwischen Brine und EE verteilt und die wässrige Phase noch 3-mal mit EE extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet,

das Lösungsmittel bei max. 30 °C entfernt und zum Schluss säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 1:1+1 % NEt₃).

Analytik

Charakterisierung farbloser Schaum.

Ausbeute 385 mg (391 μmol, 85 %)

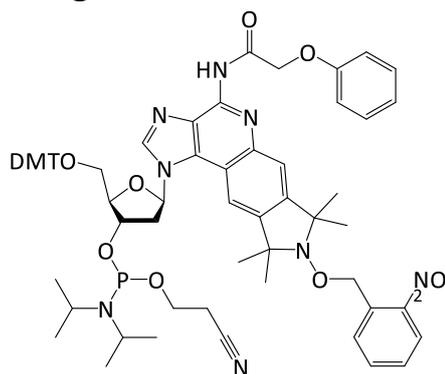
R_f: 0.58 (cHex/EE 1:2 + 1 % NEt₃).

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 8.93–8.86 (2s, 1 H, N-H), 8.09–8.01 (m, 2 H, Ar-H), 7.91–7.79 (m, 2 H, Ar-H), 7.65–7.63 (m, 1 H, Ar-H), 7.48–7.45 (m, 3 H, Ar-H), 7.35–7.19 (m, 10 H, Ar-H), 7.02–6.79 (m, 7 H, Ar-H), 5.90–5.73 (m, 1 H), 5.33 (s, 2 H, N-O-CH₂), 4.58–4.49 (m, 3 H), 4.04–4.02 (m, 1 H), 3.79–3.78 (2d, 6 H, O-CH₃), 3.35–3.13 (m, 3 H), 2.64–2.54 (m, 1 H), 2.38–2.33 (m, 1 H), 1.54–1.40 (m, 12 H, CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 167.4, 167.1, 159.68, 159.65, 158.3, 146.1, 136.8, 134.3, 130.99, 130.97, 130.93, 130.5, 130.4, 129.0, 128.9, 128.68, 128.63, 127.6, 127.6, 125.2, 122.6, 115.6, 115.5, 113.97, 113.93, 87.6, 87.4, 87.3, 87.1, 86.5, 85.8, 76.1, 72.4, 72.1, 68.6, 68.3, 68.2, 68.0, 64.8, 60.5, 55.5, 42.9, 41.0.

IR [cm⁻¹]: 3373w, 2921m, 2857w, 2230w, 1730w, 1698w, 1608w, 1507s, 1449m, 1369m, 1252s, 1178s, 1034s, 832s, 747s.

HRMS (MALDI): m/z = berechnet für C₅₇H₅₆N₆O₁₀+H⁺ [M+H⁺]⁺ 985.41307, gefunden: 985.41492 [M+H⁺]⁺.

6.4.3. Phosphitylierung von **91** zum Nukleotid **1**

1184.51 g/mol

1

Eine Lösung aus **91** (385 mg, 391 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) in abs. DCM (7.5 mL) wurde bei 0 °C mit dest. NEt_3 (280 μL , 2.01 mmol, 5.5 $\text{\AA}q$) und anschließend 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit (180 μL , 810 μmol , 2.07 $\text{\AA}q$) versetzt. Das Reaktionsgemisch rührte 30 Min. bei 0 °C und danach 30 Min. bei RT.

Das Gemisch wurde bei 0 °C mit ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt und rührte 5 Min. bei 0 °C und zum Schluss weitere 15 Min. bei RT. Das Gemisch wurde zwischen Brine und DCM verteilt, die wässrige Phase mit DCM (3x) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel bei max. 30 °C entfernt und zum Schluss säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 3:1+3 % NEt_3 \rightarrow 1:1+3 % NEt_3).

Analytik

Charakterisierung farbloser Schaum.

Ausbeute 385 mg (325 μmol , 83 %)

R_f : 0.38 und 0.31 (cHex/EE 2:1 + 3 % NEt_3).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN), δ [ppm]: 8.52–8.40 (2s, 1 H, N-H), 8.00 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 1 H, C³-H), 7.89–7.86 (m, 1 H, Ar-H), 7.82–7.71 (m, 2 H, C⁶-H, C⁵-H), 7.58–7.55 (m, 1 H, C⁴-H), 7.43–7.37 (m, 2 H, Ar-H), 7.34–7.16 (m, 11 H, Ar-H), 7.05–6.93 (m, 1 H, Ar-H), 6.88–6.71 (m, 6 H, Ar-H), 5.66–5.55 (m, 1 H, C^{1'}-H), 5.26 (s, 2 H, N-O-CH₂), 4.52–4.41 (m, 3 H), 4.07–3.98 (m, 1 H), 3.76 (s, 6 H, O-CH₃), 3.70–3.58 (m, 2 H), 3.55–3.46 (m, 2 H, CH-iPr), 3.30–3.09 (m, 2 H), 2.57–2.29 (m, 4 H), 1.46–1.36 (m, 12 H, CH₃), 1.15–0.96 (m, 12 H, iPr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 167.6, 164.2, 159.8, 158.2, 149.8, 143.5, 136.7, 136.6, 134.4, 132.1, 131.0, 130.7, 130.6, 130.0, 128.9, 127.9, 126.1, 125.4, 122.9, 115.7,

6. Experimenteller Teil

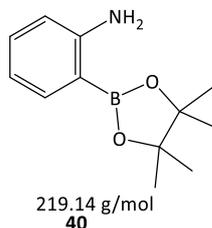
115.6, 114.8, 114.1, 87.5, 87.3, 87.2, 86.6, 86.4, 85.9, 76.1, 74.4, 68.7, 68.3, 64.3, 56.0, 44.0, 24.9, 24.7, 21.0.

³¹P-NMR (161 MHz, CH₃CN-d₃), δ [ppm]: 148.60, 148.14.

IR [cm⁻¹]: 3388*w*, 2964*m*, 2927*m*, 2230*w*, 1731*w*, 1699*m*, 1609*m*, 1508*s*, 1449*m*, 1364*m*, 1253*s*, 1173*s*, 1029*s*, 976*m*, 827*m*.

6.5. Synthesen bis 2

6.5.1. 2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (40)



Eine Suspension aus 2-Bromanilin (0.95 mL, 8.72 mmol, 1.0 Äq), Pd(dppf)Cl₂·DCM (640 mg, 784 μmol, 0.09 Äq), Bis(pinacolato)diboron (2.88 g, 11.3 mmol, 1.3 Äq) und KOAc (2.57 g, 26.2 mmol, 3.0 Äq) in abs. Toluol (100 mL) wurde 23 Std. bei 90 °C gerührt. Nach dem Filtrieren über Celite[®] wurde das Gemisch säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 9:1).

Analytik

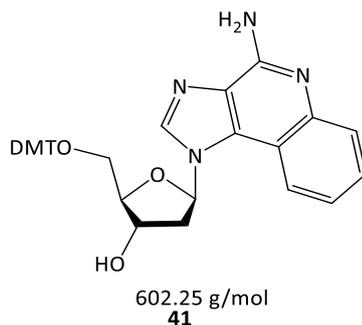
Charakterisierung gelber Feststoff.

Ausbeute 1.01 g (4.59 mmol, 53 %)

R_f: 0.77 (cHex/EE 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.61 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1 H, C³-H), 7.24–7.20 (m, 1 H, C⁵-H), 6.69–6.66 (m, 1 H, C⁴-H), 6.50 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1 H, C⁶-H), 4.73 (bs, 2 H, NH₂), 1.34 (s, 12 H, CH₃).

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₁₂H₁₉BNO₂ [M+H]⁺ 220.15, gefunden: 220.10 [M+H]⁺.

6.5.2. Kupplung von 36 mit 40 zum Nucleosid 41

Eine Suspension aus Pd(OAc)₂ (9.92 mg, 44.2 μmol, 0.05 Äq) und PPh₃ (34.8 mg, 133 μmol, 0.15 Äq) in abs. Dioxan (18 mL) rührte 10 Min. bei RT unter einem Ar-Strom. Nach der Zugabe von **36** (564 mg, 885 μmol, 1.0 Äq), **40** (291 mg, 1.33 mmol, 1.5 Äq), und 0.3 M Na₂CO₃-Lösung (8.9 mL) wurde das Reaktionsgemisch bei einer Ölbadtemperatur von 90 °C gerührt.

Das Gemisch wurde zwischen H₂O und EE verteilt und die wässrige Phase noch 2-mal mit EE extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 1:1->1:4).

Analytik

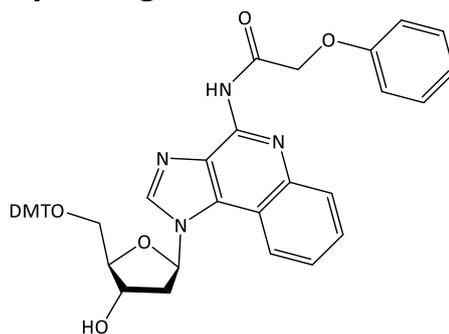
Charakterisierung gelber Schaum.

Ausbeute 463 mg (768 μmol, 87 %)

¹H-NMR (250 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 8.01–7.94 (m, 1 H, Ar-H), 7.47–7.41 (m, 2 H, Ar-H), 7.35–7.06 (m, 9 H, Ar-H), 6.92–6.68 (m, 6 H, Ar-H), 6.00–5.79 (m, 1 H, C^{1'}-H), 4.79 (bs, 2 H, NH₂), 4.59–4.37 (m, 2 H, C^{3'}-H, C^{3'}-O-H), 4.02–3.96 (m, 1 H, C^{4'}-H, EE), 3.80 (s, 6 H, O-CH₃), 3.34–3.26 (m, 2 H, C^{5'}H₂), 2.71–2.47 (m, 2 H, C^{2'}-H).

¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆), δ [ppm]: 170.9, 159.7, 136.7, 131.0, 129.0, 128.7, 128.6, 113.9, 55.5, 20.8, 14.5.

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für C₃₇H₃₅N₄O₇ [M+FA-H⁺]⁻ 647.25, gefunden: 647.30 [M+FA-H⁺]⁻.

6.5.3. Phenoxyacetylierung von 41 zu 94

736.29 g/mol

94

Eine Lösung aus **41** (142 mg, 235 μmol , 1.0 Äq) in abs. Acetonitril (1 mL) unter Argon wurde bei 0 ° zuerst mit dest. NEt_3 (36 μL , 259 μmol , 1.1 Äq) und danach mit Phenoxyacetylchlorid (36 μL , 259 μmol , 1.1 Äq) versetzt. Das Gemisch rührte anschließend für 3 Min. bei 0 °C und danach 4 Min. bei RT. Das Gemisch wurde daraufhin nochmals mit dest. NEt_3 (36 μL , 259 μmol , 1.1 Äq) und anschließend mit PacCl (36 μL , 259 μmol , 1.1 Äq) versetzt und rührte weitere 10 Min. bei RT. Zum Schluss wurde 4-mal alle 10 Min. eine 28 %ige, methanolische NaOMe -Lösung (1 mL) hinzugegeben.

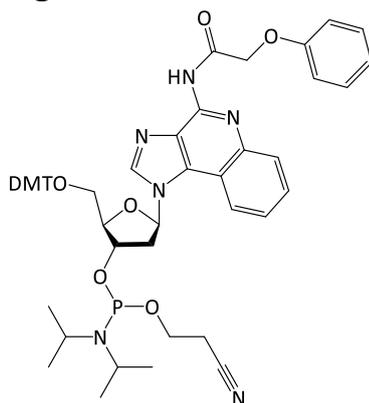
Das Gemisch wurde zwischen Brine und EE verteilt und die wässrige Phase noch 3-mal mit EE extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel bei max. 30 °C entfernt und zum Schluss säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 1:2).

Analytik

Charakterisierung gelber Schaum.

Ausbeute 86.5 mg (118 μmol , 50 %)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Aceton- d_6), δ [ppm]: 8.89–8.81 (2s, 1 H, N-H), 8.28–8.02 (m, 2 H, Ar-H), 7.64–7.54 (m, 1 H, Ar-H), 7.46–7.17 (m, 13 H, Ar-H), 7.03–6.75 (m, 7 H, Ar-H), 5.89–5.72 (m, 1 H), 4.61–4.38 (m, 4 H), 4.02–3.93 (m, 1 H), 3.79–3.78 (2d, 6 H, O- CH_3), 3.34–3.14 (m, 2 H), 2.60–2.46 (m, 1 H), 2.38–2.27 (m, 1 H).

6.5.4. Phosphitylierung von **94** zum Nukleotid **2**936.40 g/mol
2

Eine Lösung aus **94** (341 mg, 463 μmol , 1.0 Äq) in abs. Acetonitril (5 mL) wurde bei 0 °C mit Hünig-Base (320 μL , 1.85 mmol, 4.0 Äq) und anschließend mit 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit (224 μL , 1.07 mmol, 2.3 Äq) versetzt. Das Reaktionsgemisch rührte 30 Min. bei 0 °C und danach 2 Std. bei RT.

Die Reaktionslösung wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt und rührte 5 Min. bei RT. Das Gemisch wurde zwischen Brine und EE verteilt, die wässrige Phase mit EE (3x) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel bei max. 30 °C entfernt und zum Schluss säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE 1:1+3 % NEt_3).

Analytik

Charakterisierung farbloser Schaum.

Ausbeute 406 mg (434 μmol , 94 %)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6), δ [ppm]: 8.88–8.84 (2s, 1 H, N-H), 8.10–8.03 (m, 2 H, $\text{C}^3\text{-H}$), 7.64–7.54 (m, 1 H, Ar-H), 7.48–7.13 (m, 13 H, Ar-H), 7.03–6.79 (m, 7 H, Ar-H), 5.90–5.72 (m, 1 H, $\text{C}^1\text{-H}$), 4.62–4.47 (m, 3 H), 4.17–4.07 (m, 1 H), 3.80–3.78 (m, 6 H, O- CH_3), 3.74–3.65 (m, 2 H), 3.59–3.50 (m, 2 H, CH-*i*Pr), 3.35–3.21 (m, 2 H), 2.71–2.46 (m, 4 H), 1.15–1.13 (m, 6 H, *i*Pr), 1.07–1.03 (m, 6 H, *i*Pr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Aceton- d_6), δ [ppm]: 159.7, 145.9, 131.0, 130.97, 130.93, 130.5, 130.4, 129.0, 128.71, 128.65, 115.55, 115.52, 113.98, 113.95, 68.2, 67.9, 64.3, 55.5, 24.82, 24.76.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, $\text{CH}_3\text{CN-}d_3$), δ [ppm]: 148.38.

MS (ESI): m/z [%] = berechnet für $C_{53}H_{58}N_6O_8P$ $[M+H]^+$ 937.40, gefunden: 937.40 $[M+H]^+$.

6.6. Synthese, Isolierung, Quantifizierung und Analyse von DNA- und RNA-Duplexen

Synthese der Oligonukleotide

DNA- und RNA-Oligonukleotide wurden auf einem PerSeptive Expedite Synthesizer unter der Verwendung von Standardprotokollen in 1 μ mol-Maßstäben synthetisiert. 3 % Trichloressigsäure in DCM (deblock solution) wurden von Sigma erworben, während Essigsäureanhydrid in THF (Cap A), N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B) und Iod in Pyridin/H₂O/THF (oxidizer) von JT Baker erworben wurden. Die Synthesesäulen wurden selbst mit CPG befüllt, welches, wie die 5-Benzylthio-1-H-tetrazol-Aktivator-Lösung in absolutem MeCN, von Link Technologies erworben wurde. Unmodifizierte RNA/DNA-Phosphoramidit-Monomere (fast deprotecting), wie auch Acetonitril, welches als Lösungsmittel verwendet wurde, wurden ebenfalls von Link Technologies erworben.

Isolierung und Reinigung

Die Abspaltung des Oligonukleotids vom Träger sowie die Entfernung der Schutzgruppen der Nucleobasen erfolgten durch die Behandlung mit 32 % NH₃ bei 50 °C über Nacht. Nach Entfernung des Lösungsmittels in einer SpeedVac (Christ oder Savant) wurde der Rückstand mittels RP-HPLC gereinigt.

RP-HPLC wurde auf einem JASCO LC-900 HPLC-System durchgeführt, das mit einem JASCO UV-975 Detektor (Detektion bei 254 nm) und einer semipräparativen Phenomenex Jupiter 4 μ m Proteo 90 Å (250 x 10 mm) Säule ausgestattet war. Die verwendete Säule wurde im Säulenofen auf 60 °C temperiert. Wasser wurde zuvor mit DEPC behandelt und autoklaviert.

Phenomenex Jupiter: A: 1 M TEAA-Puffer (pH 7.0), B: MeOH, Gradient: 5–40 %; Flussrate: 4 mL/min.

Alle Konjugate wurden nach der Reinigung lyophilisiert (Lyophilisator Alpha 3-4 LSCbasic von Christ).

Quantifizierung

Die Konzentrationen der Oligonukleotid-Lösungen wurden mittels UV-Spektrometrie auf einer Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific) über das Lambert-Beersche Gesetz ermittelt. Extinktionskoeffizienten wurden nach Literatur^[172] über das Model des nächsten Nachbarn berechnet.

Massenspektrometrie

Oligonukleotid-Konjugate wurden mittels ESI-Massenspektrometrie über ein LCMS-Instrument der Firma Bruker mit einem microTOF-Q II Analysator charakterisiert. Das LCSytem bestand dabei aus einer Agilent HPLC der Serie 1200 mit MeOH/0.005 M TEAAPuffer (Gradient 0–60 %).

MS-Resultate der Oligonukleotide

- (I) 5´-CACGAUACGAGGUC-3´ aRNA
MS (ESI): m/z = 4468.6 (+H⁺) ; ber.: 4467.6.
- (II) 3´-GTGCTATGCTCCAG-5´ uDNA
MS (ESI): m/z = 4254.6 (+H⁺) ; ber.: 4253.7.
- (III) 5´-CACGATACGAGGTC-3´ aDNA
MS (ESI): m/z = 4272.6 (+H⁺) ; ber.: 4271.7.
- (IV) 3´-GTGCT~~X~~TGCTCCAG-5´ mDNA-Benz
MS (ESI): m/z = 4303.6 (+H⁺) ; ber.: 4302.7.
- (V) 3´-GTGCT~~X~~´TGCTCCAG-5´ mDNA-Tetramethyl
MS (ESI): m/z = 4550.5 (+H⁺) ; ber.: 4549.9.
- (VI) 3´-GTGCT~~A~~TGCTCCAG-5´ mDNA-A₂
MS (ESI): m/z = 4414.5 (+H⁺) ; ber.: 4413.8.

(VII) 3' -GTGCT**X'** -5'

mDNA-Tetramethyl-Am

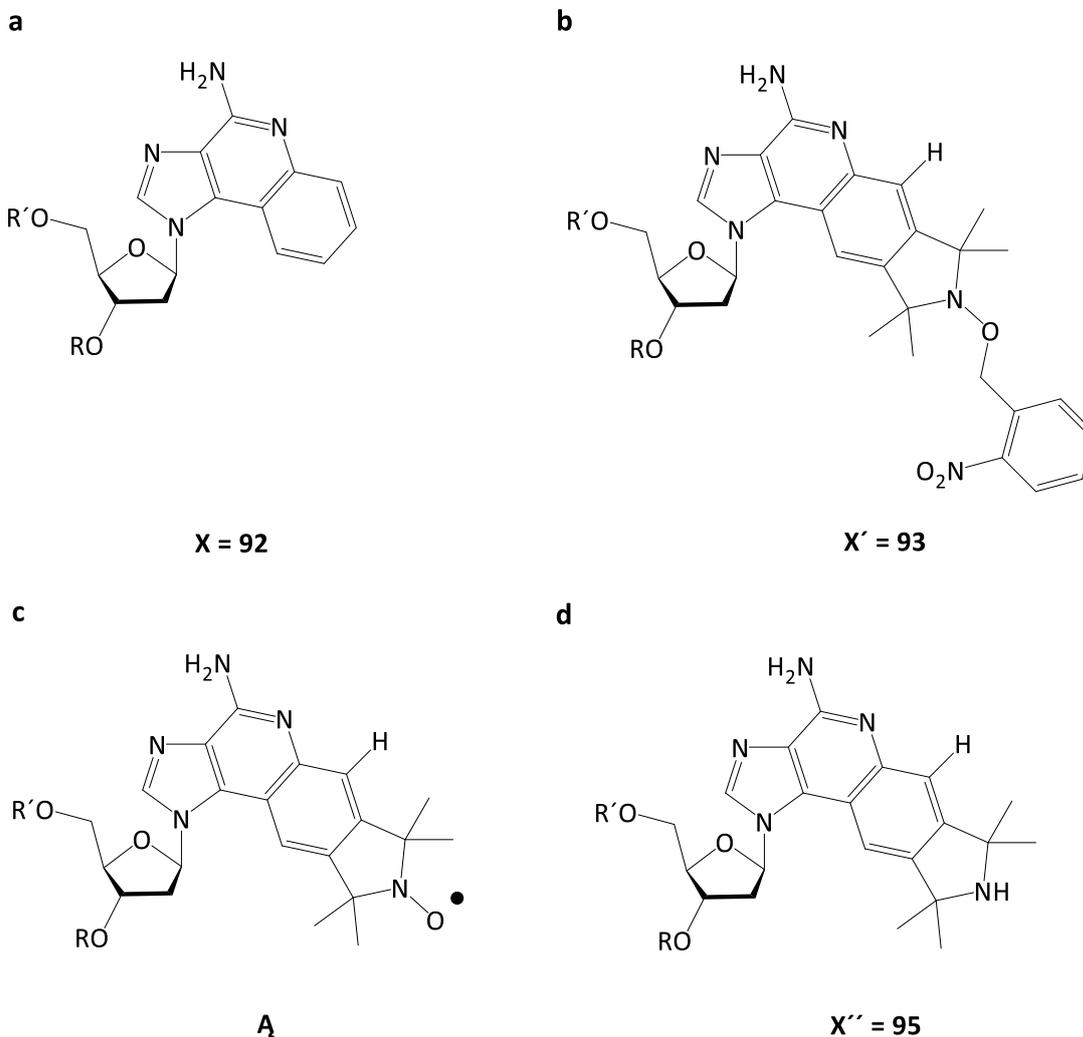
MS (ESI): $m/z = 4399.5 (+H^+)$; ber.: 4398.8.

Abbildung 29: (a) Strang IV „mDNA-Benz“ mit dem Nukleotid **92**. (b) Strang V „mDNA-Tetramethyl“ mit dem Nukleotid **93**. (c) Strang VI „mDNA-A“ mit dem Ziel-Nukleotid **A**. (d) Strang VII „mDNA-Am“ mit dem Nukleotid **95**.

Photochemische Entschützung

Die photochemische Entschützung der DNA wurde in einer Rundglasküvette (Carl Roth, 50 mm × 10 mm Durchmesser) durchgeführt. Ein selbstgebautes Setup bestehend aus drei lichtemittierenden Dioden wurde verwendet (Nichia NCCU033, 365 nm, jedes mit 100 mW optical output power).^[97]

EPR Messungen

cw-EPR Spektroskopie: Nach der Bestrahlung wurde das *continuous wave (cw)* EPR-Spektrum an einem X-Band (9.6 GHz) Bruker EMXnano Spektrometer, ausgerüstet mit einem Standardhohlraum bei Raumtemperatur mit den folgenden experimentellen Parametern gemessen: 2.00 mW Mikrowellenstärke, 1.5 G Amplitudenmodulation, 100 KHz Frequenzmodulation, 1.8 ms Zeitkonstante, Abtastzeit von 20 s und 4 im Durchschnitt.^[173]

6.7. Schmelzpunktmessung für DNA- und RNA-Duplexe

Die Schmelzkurven wurden an einem JASCO V-650 UV-VIS-Zweistrahlenspektrometer^[173] oder einem Evolution300 (ThermoScientific)^[174] gemessen. 1-ml-Proben wurden mit einer Konzentration von 1 μ M in Puffer (1xPBS, pH 7,4) hergestellt. Änderungen in der Absorption wurden bei 260 nm nachgewiesen. Es wurde ein Temperaturgradient von 1 °C pro Minute verwendet. Um Hystereseeffekte zu vermeiden, wurden die Schmelztemperaturen von mindestens fünf unabhängig gemessenen Heiz- und Kühlzyklen zu einer sigmoidalen Funktion (DoseResp) vereint. Der experimentelle Fehler wurde über die Standardabweichung bestimmt.

Tabelle 6: Synthetisierte Sequenzen nummeriert mit den entsprechenden Abkürzungen im Fließtext. „a“ steht für „anti“, also Gegenstrang; „u“ steht für „unmodifizierten“ Strang mit natürlichen Nukleotiden; „m“ steht für „modifizierten“ Strang mit künstlichem Nukleotid an Position X bzw. X'.

Nummer	Sequenz	Abkürzung
(I)	5´-CACGAUACGAGGUC-3´	aRNA
(II)	3´-GTGCTATGCTCCAG-5´	uDNA
(III)	5´-CACGATACGAGGTC-3´	aDNA
(IV)	3´-GTGCT X TGCTCCAG-5´	mDNA-Benz
(V)	3´-GTGCT X 'TGCTCCAG-5´	mDNA-Tetramethyl
(VI)	3´-GTGCT X '´TGCTCCAG-5´	mDNA-A ₁

Die folgenden Abbildungen stellen die Messdaten der verschiedenen Schmelzpunktmessungen da und die Ermittlung des Schmelzpunktes über LOGx0 der Funktion.

6. Experimenteller Teil

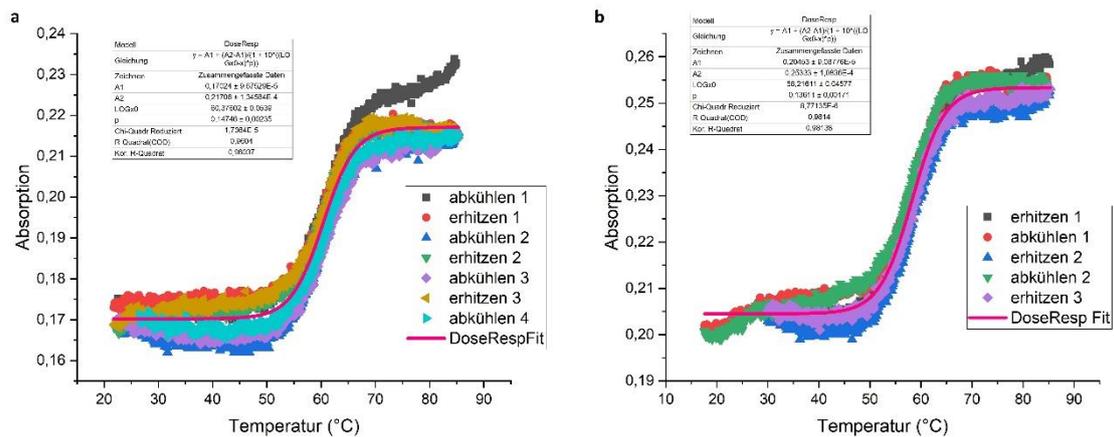


Abbildung 30: Absorptionskurven der zwei Doppelstränge am Thermo-Fischer Photometer in einem PBS-Puffer bei pH = 7.4 und c = 1 µM: (a) Stränge (II) und (I) mit 7 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie); (b) Stränge (II) und (III) mit 5 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie).

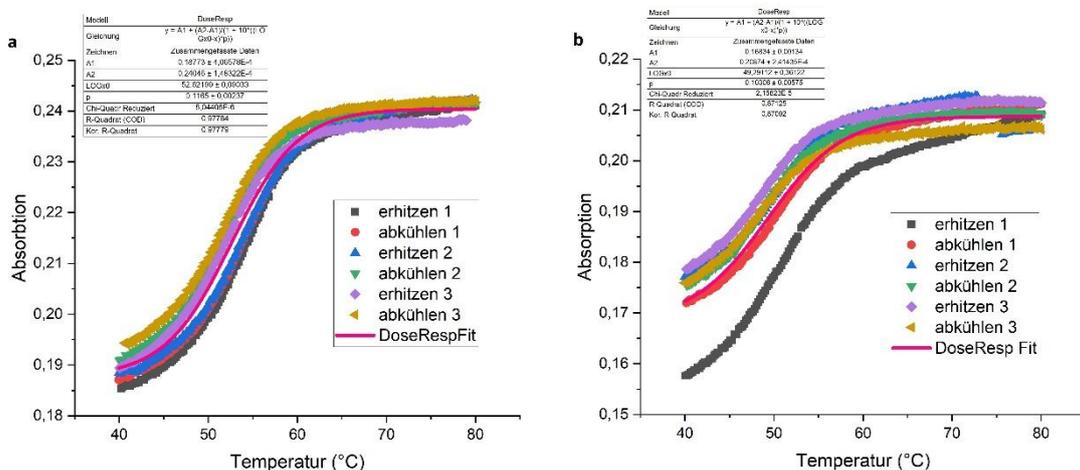


Abbildung 31: Absorptionskurven der zwei Doppelstränge am Thermo-Fischer Photometer in einem PBS-Puffer bei pH = 7.4 und c = 1 µM: (a) Stränge (IV) und (I) mit 6 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie); (b) Stränge (IV) und (III) mit 6 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie).

6. Experimenteller Teil

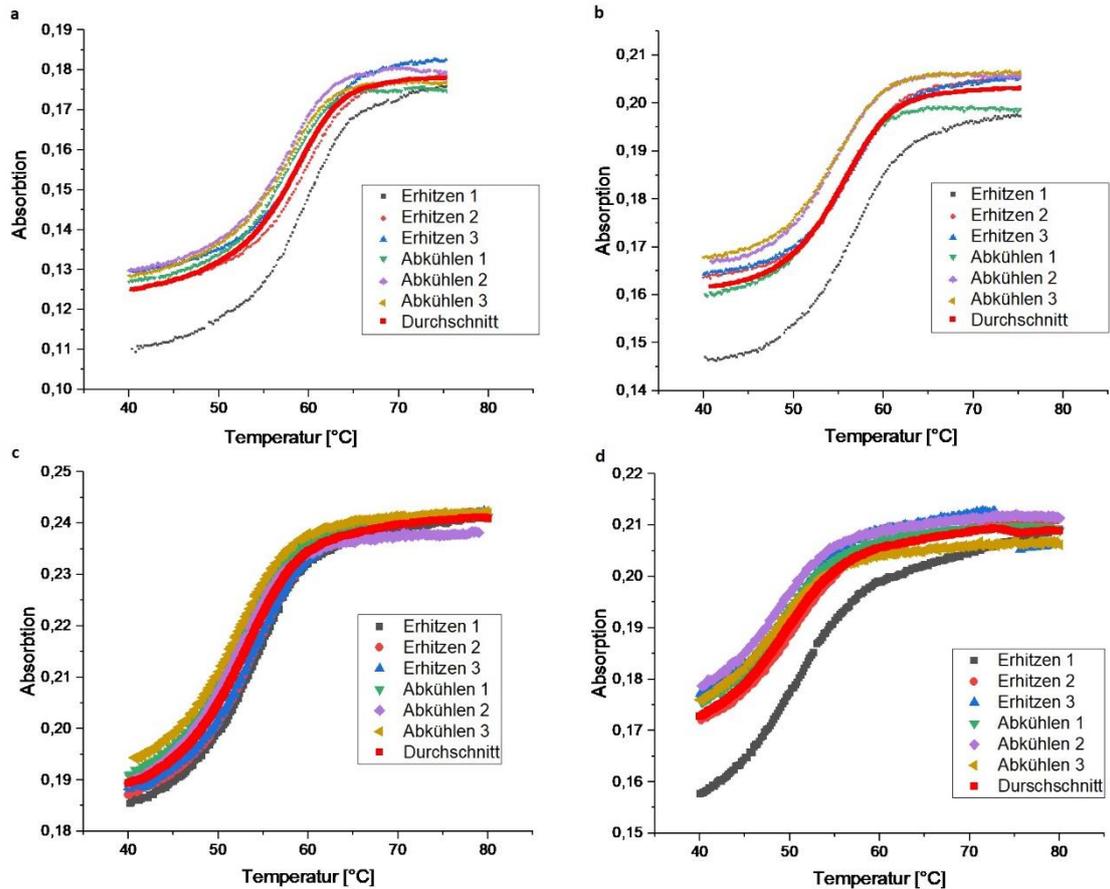


Abbildung 32: Absorptionskurven der vier Doppelstränge am Jasco Photometer in einem PBS-Puffer bei pH = 7.4 und $c = 1 \mu\text{M}$: (a) Stränge (II) und (I) mit 6 Messungen und dem Mittelwert (Rote, durchgezogene Linie); (b) Stränge (II) und (III) mit 6 Messungen und dem Mittelwert (Rote, durchgezogene Linie); (c) Stränge (IV) und (I) mit 6 Messungen und dem Mittelwert (Rote, durchgezogene Linie); (d) Stränge (IV) und (III) mit 6 Messungen und dem Mittelwert (Rote, durchgezogene Linie).

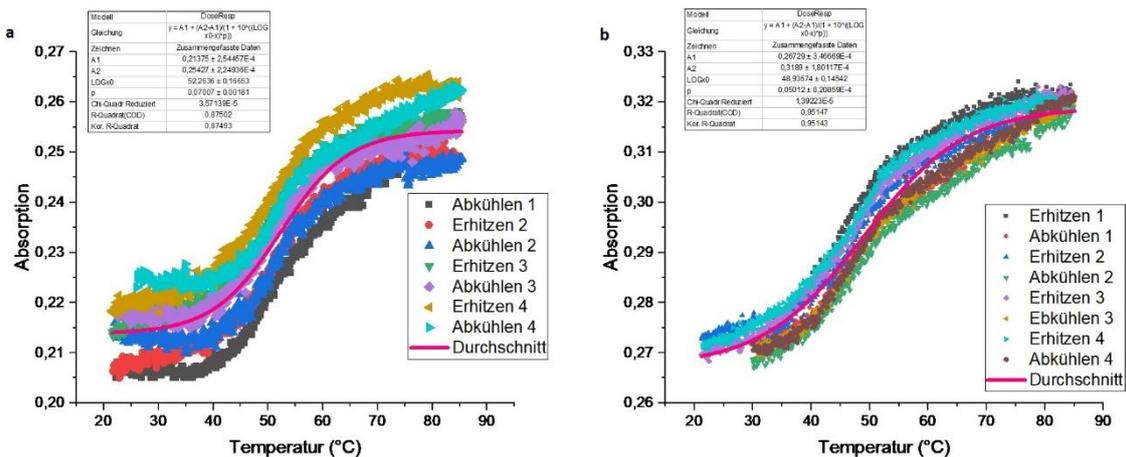


Abbildung 33: Absorptionskurven der zwei Doppelstränge am Thermo-Fischer Photometer in einem PBS-Puffer bei pH = 7.4 und $c = 1 \mu\text{M}$: (a) Stränge (V) und (I) mit 7 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie); (b) Stränge (V) und (III) mit 8 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie).

6. Experimenteller Teil

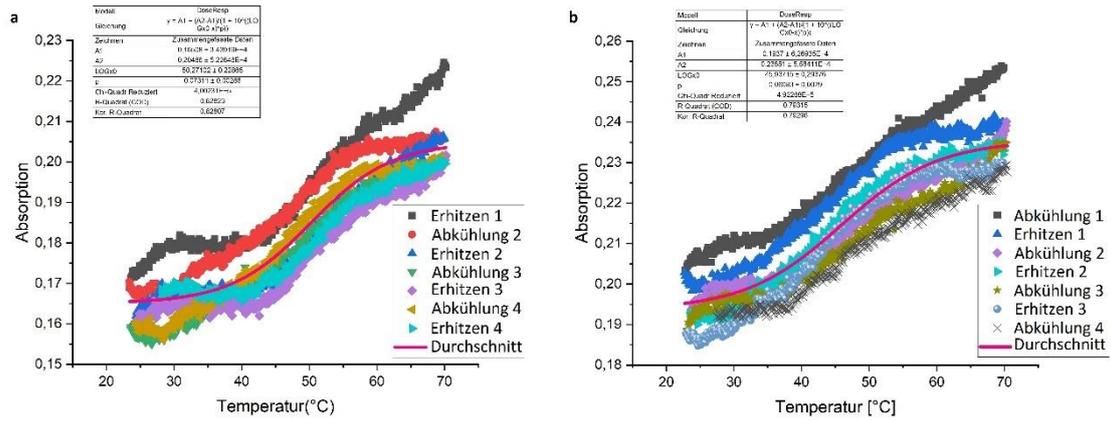


Abbildung 34: Absorptionskurven der zwei Doppelstränge am Thermo-Fischer Photometer in einem PBS-Puffer bei $\text{pH} = 7.4$ und $c = 1 \mu\text{M}$: (a) Stränge (VI) und (I) mit 7 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie); (b) Stränge (VI) und (III) mit 7 Messungen und dem Mittelwert (Pinke, durchgezogene Linie).

7. Literaturverzeichnis

- [1] K. Chen, B. S. Zhao, C. He, *Cell chemical biology* **2016**, *23*, 74.
- [2] M. Kerzhner, D. Abdullin, J. Więcek, H. Matsuoka, G. Hagelueken, O. Schiemann, M. Famulok, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2016**, *22*, 12113.
- [3] M. Getz, X. Sun, A. Casiano-Negroni, Q. Zhang, H. M. Al-Hashimi, *Biopolymers* **2007**, *86*, 384.
- [4] H. Y. Juliusson, A.-L. J. Segler, S. T. Sigurdsson, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 3799.
- [5] N.-K. Kim, A. Murali, V. J. DeRose, *Chemistry & biology* **2004**, *11*, 939.
- [6] M. Kerzhner, D. Abdullin, J. Więcek, H. Matsuoka, G. Hagelueken, O. Schiemann, M. Famulok, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2016**, *22*, 12113.
- [7] S. A. Shelke, S. T. Sigurdsson, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 2291.
- [8] A. Potapov, H. Yagi, T. Huber, S. Jergic, N. E. Dixon, G. Otting, D. Goldfarb, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 9040.
- [9] C. Altenbach, T. Marti, H. G. Khorana, W. L. Hubbell, *Science (New York, N.Y.)* **1990**, *248*, 1088.
- [10] I. Kaminker, M. Bye, N. Mendelman, K. Gislason, S. T. Sigurdsson, D. Goldfarb, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2015**, *17*, 15098.
- [11] T. Weinrich, E. A. Jaumann, U. M. Scheffer, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Beilstein journal of organic chemistry* **2018**, *14*, 1563.

- [12] Alexander Kaiser, *Master Thesis*, Goethe Universität Frankfurt am Main, **2016**.
- [13] N. Barhate, P. Cekan, A. P. Massey, S. T. Sigurdsson, *Angewandte Chemie* **2007**, *119*, 2709.
- [14] A. A. Lomzov, E. A. Sviridov, A. V. Shernuykov, G. Y. Shevelev, D. V. Pyshnyi, E. G. Bagryanskaya, *The journal of physical chemistry. B* **2016**, *120*, 5125.
- [15] V. Meyer, M. A. Swanson, L. J. Clouston, P. J. Boratyński, R. A. Stein, H. S. Mchaourab, A. Rajca, S. S. Eaton, G. R. Eaton, *Biophysical journal* **2015**, *108*, 1213.
- [16] M. Gränz, N. Erlenbach, P. Spindler, D. B. Gophane, L. S. Stelzl, S. T. Sigurdsson, T. F. Prisner, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2018**, *57*, 10540.
- [17] B. I. Kankia, L. A. Marky, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8759.
- [18] S. Minchin, J. Lodge, *Essays in biochemistry* **2019**, *63*, 433.
- [19] A. Travers, G. Muskhelishvili, *The FEBS journal* **2015**, *282*, 2279.
- [20] K. Hall, N. Sankaran, *British journal for the history of science* **2021**, *54*, 99.
- [21] R. Dahm, *Human genetics* **2008**, *122*, 565.
- [22] R. Dahm, *Developmental biology* **2005**, *278*, 274.
- [23] A. Kossel, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1897**, *22*, 176.

- [24] E. Chargaff, E. Vischer, R. Doniger, C. Green, F. Misani, *Journal of Biological Chemistry* **1949**, *177*, 405.
- [25] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Acta Cryst* **1953**, *6*, 673.
- [26] J. D. WATSON, F. H. CRICK, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [27] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**.
- [28] a) M. Bolz, *Dissertation*, Goethe-Universität, Frankfurt am Main; b) D. M. Chenoweth, J. L. Meier, P. B. Dervan, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013**, *52*, 415.
- [29] a) J. Zhao, A. Bacolla, G. Wang, K. M. Vasquez, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2010**, *67*, 43; b) A. H. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, *Nature* **1989**, *1979*, 680.
- [30] P. A. Sharp, *Cell* **2009**, *136*, 577.
- [31] J. S. Dorman, M. J. Schmella, S. W. Wesmiller, *Biological research for nursing* **2017**, *19*, 7.
- [32] T. A. Steitz, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2008**, *9*, 242.
- [33] G. Z. Yusupova, M. M. Yusupov, J. Cate, H. F. Noller, *Cell* **2001**, *106*, 233.
- [34] M. A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G. J. Hannon, R. Parker, *Genes & development* **2006**, *20*, 515.
- [35] H. Siomi, M. C. Siomi, *Nature* **2009**, *457*, 396.

- [36] M. T. Bohnsack, K. E. Sloan, *Biological chemistry* **2018**, 399, 1265.
- [37] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Genome research* **2009**, 19, 92.
- [38] F. Afonso-Grunz, S. Müller, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2015**, 72, 3127.
- [39] M. Lu, Q. Zhang, M. Deng, J. Miao, Y. Guo, W. Gao, Q. Cui, *PloS one* **2008**, 3, e3420.
- [40] Haraldur Yngvi Júlíusson, University of Iceland, Reykjavik, **2020**.
- [41] S. R. Holbrook, *Annual review of biophysics* **2008**, 37, 445.
- [42] A. Ducruix, R. Giegé (Eds.) *Practical Approach*, v. 210, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
- [43] S. Preus, L. M. Wilhelmsson, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2012**, 13, 1990.
- [44] D. R. Cooper, P. J. Porebski, M. Chruszcz, W. Minor, *Expert Opinion on Drug Discovery* **2011**, 6, 771.
- [45] J. H. Lee, Y. Okuno, S. Cavagnero, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2014**, 241, 18.
- [46] M. F. Juette, D. S. Terry, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, Q. Zheng, S. C. Blanchard, *Current opinion in chemical biology* **2014**, 20, 103.
- [47] S. C. Blanchard, *Current opinion in structural biology* **2009**, 19, 103.
- [48] K. M. Salikhov, N. E. Zavoiskaya, *Reson* **2015**, 20, 963.

- [49] R. Biswas, H. Kühne, G. W. Brudvig, V. Gopalan, *Science progress* **2001**, *84*, 45.
- [50] M. M. Roessler, E. Salvadori, *Chemical Society reviews* **2018**, *47*, 2534.
- [51] F. Kaiser, B. Endeward, A. Collauto, U. Scheffer, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2022**, e202201822.
- [52] T. Weinrich, E. A. Jaumann, U. Scheffer, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2018**, *24*, 6202.
- [53] I. D. Sahu, E. J. Hustedt, H. Ghimire, J. J. Inbaraj, R. M. McCarrick, G. A. Lorigan, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2014**, *249*, 72.
- [54] H. Ghimire, E. J. Hustedt, I. D. Sahu, J. J. Inbaraj, R. McCarrick, D. J. Mayo, M. R. Benedikt, R. T. Lee, S. M. Grosser, G. A. Lorigan, *The journal of physical chemistry. B* **2012**, *116*, 3866.
- [55] A. J. Fielding, M. G. Concilio, G. Heaven, M. A. Hollas, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2014**, *19*, 16998.
- [56] D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2013**, *49*, 999.
- [57] Y. Lin, R. Nielsen, D. Murray, W. L. Hubbell, C. Mailer, B. H. Robinson, M. H. Gelb, *Science (New York, N.Y.)* **1998**, *279*, 1925.
- [58] I. D. Sahu, R. M. McCarrick, G. A. Lorigan, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5967.

- [59] Y. Yang, F. Yang, X.-Y. Li, X.-C. Su, D. Goldfarb, *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 1050.
- [60] M. Kaushik, T. Bahrenberg, T. V. Can, M. A. Caporini, R. Silvers, J. Heiliger, A. A. Smith, H. Schwalbe, R. G. Griffin, B. Corzilius, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2016**, *18*, 27205.
- [61] a) D. Banerjee, H. Yagi, T. Huber, G. Otting, D. Goldfarb, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 157; b) D. Akhmetzyanov, J. Plackmeyer, B. Endeward, V. Denysenkov, T. F. Prisner, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2015**, *17*, 6760.
- [62] a) Z. Yang, Y. Liu, P. Borbat, J. L. Zweier, J. H. Freed, W. L. Hubbell, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 9950; b) I. Dhimitruka, M. Velayutham, A. A. Bobko, V. V. Khramtsov, F. A. Villamena, C. M. Hadad, J. L. Zweier, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 6801.
- [63] T. J. Stone, T. Buckman, P. L. Nordio, H. M. McConnell, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1965**, *54*, 1010.
- [64] A. R. FORRESTER, R. H. THOMSON, *Nature* **1964**, *203*, 74.
- [65] a) G. Z. Sowa, P. Z. Qin in *Prog Nucleic Acid Res Mol* 2008, pp. 147–197; b) S. A. Shelke, S. T. Sigurdsson in *Modified Nucleic Acids*, Springer, Cham, **2016**, pp. 159–187.
- [66] a) S. A. Shelke, S. T. Sigurdsson, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2010**, *49*, 7984; b) S. A. Shelke, S. T. Sigurdsson, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2012**, *13*, 684.

- [67] a) P. Z. Qin, K. Hideg, J. Feigon, W. L. Hubbell, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6772; b) U. Jakobsen, S. A. Shelke, S. Vogel, S. T. Sigurdsson, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 10424.
- [68] a) T. E. Edwards, T. M. Okonogi, B. H. Robinson, S. T. Sigurdsson, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1527; b) R. H. Pscheidt, B. D. Wells, *Journal of Biological Chemistry* **1986**, *261*, 7253.
- [69] a) N. A. Kuznetsov, A. D. Milov, V. V. Koval, R. I. Samoiloa, Y. A. Grishin, D. G. Knorre, Y. D. Tsvetkov, O. S. Fedorova, S. A. Dzuba, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2009**, *11*, 6826; b) A. M. Popova, T. Kálai, K. Hideg, P. Z. Qin, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8540.
- [70] K. Makino, A. Murakami, S. Nagahara, Y. Nakatsuji, T. Takeuchi, *Free radical research communications* **1989**, *6*, 311.
- [71] Robert L. Letsinger, V. Mahadevan, *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *1966*, 5319.
- [72] P. Seneci, *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies*, Wiley-Interscience, S.I., **2000**.
- [73] C. B. Reese, *Organic & biomolecular chemistry* **2005**, *3*, 3851.
- [74] a) C. B. Reese, P. A. Skone, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 1263; b) K. L. Agarwal, A. Yamazaki, P. J. Cashion, H. G. Khorana, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1972**, *11*, 451.
- [75] S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder, G. R. Galluppi, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 661.
- [76] R. Eritja, *Int J Pept Res Ther* **2007**, *13*, 53.

- [77] A. Spaltenstein, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1299.
- [78] P. L. Fischhaber, A. W. Reese, T. Nguyen, J. J. Kirchner, E. J. Hustedt, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *Nucleosides and Nucleotides* **1997**, *16*, 365.
- [79] M. Azarkh, V. Singh, O. Okle, D. R. Dietrich, J. S. Hartig, M. Drescher, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2012**, *13*, 1444.
- [80] P. M. Gannett, E. Darian, J. Powell, E. M. Johnson, C. Mundoma, N. L. Greenbaum, C. M. Ramsey, N. S. Dalal, D. E. Budil, *Nucleic acids research* **2002**, *30*, 5328.
- [81] W. Bannwarth, D. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 977.
- [82] C. Giordano, F. Fratini, D. Attanasio, L. Cellai, *Synthesis* **2001**, *2001*, 565.
- [83] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 491.
- [84] P. Cekan, S. T. Sigurdsson, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 18054.
- [85] O. Schiemann, N. Piton, Y. Mu, G. Stock, J. W. Engels, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5722.
- [86] N. Piton, Y. Mu, G. Stock, T. F. Prisner, O. Schiemann, J. W. Engels, *Nucleic acids research* **2007**, *35*, 3128.

- [87] I. Krstić, O. Frolow, D. Sezer, B. Endeward, J. E. Weigand, B. Suess, J. W. Engels, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1454.
- [88] C. Höbartner, G. Sicoli, F. Wachowius, D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 7749.
- [89] a) P. Cekan, A. L. Smith, N. Barhate, B. H. Robinson, S. T. Sigurdsson, *Nucleic acids research* **2008**, *36*, 5946; b) A. L. Smith, P. Cekan, G. P. Brewood, T. M. Okonogi, S. Alemayehu, E. J. Hustedt, A. S. Benight, S. T. Sigurdsson, B. H. Robinson, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 2664; c) A. Marko, D. Margraf, P. Cekan, S. T. Sigurdsson, O. Schiemann, T. F. Prisner, *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **2010**, *81*, 21911; d) C. M. Grytz, S. Kazemi, A. Marko, P. Cekan, P. Güntert, S. T. Sigurdsson, T. F. Prisner, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2017**, *19*, 29801.
- [90] O. Schiemann, P. Cekan, D. Margraf, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 3342.
- [91] H. Y. Juliusson, S. T. Sigurdsson, *The Journal of organic chemistry* **2020**, *85*, 4036.
- [92] A.-L. J. Segler, S. T. Sigurdsson, *The Journal of organic chemistry* **2021**, *86*, 11647.
- [93] D. B. Gophane, B. Endeward, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2014**, *20*, 15913.
- [94] D. B. Gophane, B. Endeward, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Organic & biomolecular chemistry* **2018**, *16*, 816.

- [95] A. Collauto, S. von Bülow, D. B. Gophane, S. Saha, L. S. Stelzl, G. Hummer, S. T. Sigurdsson, T. F. Prisner, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2020**, *59*, 23025.
- [96] M. Sajid, G. Jeschke, M. Wiebcke, A. Godt, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2009**, *15*, 12960.
- [97] I. Seven, T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, S. Brüß, I. Krstić, T. F. Prisner, A. Heckel, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 4037.
- [98] A. Hatano, N. Terado, Y. Kanno, T. Nakamura, G. Kawai, *Synthetic Communications* **2019**, *49*, 136.
- [99] P. M. Gannett, E. Darian, J. Powell, E. M. Johnson, C. Mundoma, N. L. Greenbaum, C. M. Ramsey, N. S. Dalal, D. E. Budil, *Nucleic acids research* **2002**, *30*, 5328.
- [100] N. Piton, Y. Mu, G. Stock, T. F. Prisner, O. Schiemann, J. W. Engels, *Nucleic acids research* **2007**, *35*, 3128.
- [101] a) P. Cekan, A. L. Smith, N. Barhate, B. H. Robinson, S. T. Sigurdsson, *Nucleic acids research* **2008**, *36*, 5946; b) S. A. Scaringe, *Methods (San Diego, Calif.)* **2001**, *23*, 206.
- [102] K. E. Fairfull-Smith, F. Brackmann, S. E. Bottle, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 1902.
- [103] a) D. R. Alessi, J. E. Corrie, P. G. Fajer, M. A. Ferenczi, D. D. Thomas, I. P. Trayer, D. R. Trentham, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8043; b) Y. Sato, H. Hayashi, M. Okazaki, M. Aso, S. Karasawa, S. Ueki, H. Suemune, N. Koga, *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **2008**, *46*, 1055.

- [104] A. T. Yordanov, K. Yamada, M. C. Krishna, A. Russo, J. Yoo, S. English, J. B. Mitchell, M. W. Brechbiel, *Journal of medicinal chemistry* **2002**, *45*, 2283.
- [105] J. F. W. Keana, G. S. Heo, G. T. Gaughan, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2346.
- [106] E. L. Dane, B. Corzilius, E. Rizzato, P. Stocker, T. Maly, A. A. Smith, R. G. Griffin, O. Ouari, P. Tordo, T. M. Swager, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 1789.
- [107] B. A. Chalmers, J. C. Morris, K. E. Fairfull-Smith, R. S. Grainger, S. E. Bottle, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2013**, *49*, 10382.
- [108] M. Kurita, Y. Higuchi, J. W. Mirc, S. Matsumoto, K. Usui, H. Suemune, M. Aso, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2016**, *17*, 2346.
- [109] a) M. E. Schwartz, R. R. Breaker, G. T. Asteriadis, J. S. deBear, G. R. Gough, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, *2*, 1019; b) S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2286.
- [110] R. S. Keyes, E. V. Bobst, Y. Y. Cao, A. M. Bobst, *Biophysical journal* **1997**, *72*, 282.
- [111] D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 999.
- [112] S. Saha, A. P. Jagtap, S. T. Sigurdsson, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51*, 13142.

- [113] a) E.J. Hustedt, A.I. Smirnov, C.F. Laub, C.E. Cobb, A.H. Beth, *Biophysical journal* **1997**, *74*, 1861; b) C. Elsässer, B. Monien, W. Haehnel, R. Bittl, *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **2005**, *43 Spec no*, S26-33; c) S. T. Sigurdsson, *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83*, 677.
- [114] a) T. R. Miller, S. C. Alley, A. W. Reese, M. S. Solomon, W. V. McCallister, C. Mailer, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9377; b) T. R. Miller, P. B. Hopkins, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 981.
- [115] T. M. Okonogi, S. C. Alley, A. W. Reese, P. B. Hopkins, B. H. Robinson, *Biophysical journal* **2002**, *83*, 3446.
- [116] T. E. Edwards, P. Cekan, G. W. Reginsson, S. A. Shelke, A. R. Ferré-D'Amaré, O. Schiemann, S. T. Sigurdsson, *Nucleic acids research* **2011**, *39*, 4419.
- [117] A. Marko, V. Denysenkov, D. Margraf, P. Cekan, O. Schiemann, S. T. Sigurdsson, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13375.
- [118] N. Oumata, P. H. Nguyen, V. Beringue, F. Soubigou, Y. Pang, N. Desban, C. Massacrier, Y. Morel, C. Paturel, M.-A. Contesse et al., *PloS one* **2013**, *8*, e72112.
- [119] C. Shi, Z. Xiong, P. Chitpepu, C. C. Aldrich, J. R. Ohlfest, D. M. Ferguson, *ACS medicinal chemistry letters* **2012**, *3*, 501.
- [120] S. Siraiwa, A. Suzuki, R. Katoh, Y. Saito, *Organic & biomolecular chemistry* **2016**, *14*, 3934.

- [121] "2'-Deoxyinosine 890-38-0 | TCI Deutschland GmbH", can be found under <https://www.tcichemicals.com/AT/de/p/D3584>, **2022**.
- [122] "2'-Deoxyadenosine 16373-93-6 | TCI Deutschland GmbH", can be found under <https://www.tcichemicals.com/DE/de/p/D0046>, **2022**.
- [123] M. Fukuoka, S. Shuto, N. Minakawa, Y. Ueno, A. Matsuda, *Nucleic acids symposium series* **1999**, 11.
- [124] P. G. McCracken, J. M. Smith, *AIChE J.* **1956**, 2, 498.
- [125] G. Oliviero, S. D'Errico, N. Borbone, J. Amato, V. Piccialli, G. Piccialli, L. Mayol, *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 2010, 1517.
- [126] a) B. Catalanotti, L. de Napoli, A. Galeone, L. Mayol, G. Oliviero, G. Piccialli, M. Varra, *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, 1999, 2235; b) W. M. Odijk, G.-J. Koomen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1987**, 733.
- [127] K. Leškovskis, J. M. Zaķis, I. Novosjolova, M. Turks, *European Journal of Organic Chemistry* **2021**, 2021, 5027.
- [128] T. Munegumi, E. Kimura, A. Sodeyama, A. Sakurah, *Asian Journal of Chemistry* **2008**, 20, 3079.
- [129] M. D. Erlacher, K. Lang, B. Wotzel, R. Rieder, R. Micura, N. Polacek, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 4453.
- [130] "Diiodmethan", can be found under <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Diiodmethan&oldid=212395414>, **2021**.
- [131] A. Fukuhara, M. Tsukamoto, *Tetrahedron* **2015**, 71, 3878.

- [132] V. C. Jayawardena, K. E. Fairfull-Smith, S. E. Bottle, *Aust. J. Chem.* **2013**, *66*, 619.
- [133] R. Braslau, V. Chaplinski, P. Goodson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9857.
- [134] E. Mileo, E. Etienne, M. Martinho, R. Lebrun, V. Roubaud, P. Tordo, B. Gontero, B. Guigliarelli, S. R. A. Marque, V. Belle, *Bioconjugate chemistry* **2013**, *24*, 1110.
- [135] K. S. Chan, K. W. Mak, M. K. Tse, S. K. Yeung, B. Z. Li, Y. W. Chan, *Journal of Organometallic Chemistry* **2008**, *693*, 399.
- [136] D. Liotta, G. Zima, M. Saindane, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1258.
- [137] M. M. Haugland, A. H. El-Sagheer, R. J. Porter, J. Peña, T. Brown, E. A. Anderson, J. E. Lovett, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 9069.
- [138] F. Albericio, S. Alefelder, M. Amblard, V. Antonenko, E. Atherton, G. Barany, G. Becker, N. L. Benoiton, D. Besser, M. Beyermann et al., *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry Vol. E 22a, 4th Edition Supplement*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2004**.
- [139] B. A. Chalmers, J. C. Morris, K. E. Fairfull-Smith, R. S. Grainger, S. E. Bottle, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2013**, *49*, 10382.
- [140] Chris H. Senanayake/Laura E. Fredenburgh/Robert A. Reamer/Robert D. Larsen/Thomas R. Verhoeven/Paul J. Reider.
- [141] K. Molawi, A. Studer, *Chem. Commun.* **2007**, 5173.
- [142] R. Ding, B. Yu, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 2427.

- [143] R. E. Pearson, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 354.
- [144] R. P. Bell, *The Proton in Chemistry*, Springer, New York, NY, **1973**.
- [145] Y. Zhan, X. Zhao, W. Wang, *Dyes and Pigments* **2017**, *146*, 240.
- [146] a) W.-W. Sy, B. A. Lodge, A. W. By, *Synthetic Communications* **1990**, *20*, 877; b) G. K. Mulholland, Q.-H. Zheng, *Synthetic Communications* **2001**, *31*, 3059.
- [147] J. J. Li (Ed.) *Name reactions. A collection of detailed reaction mechanisms ; [more than 300 reactions]*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2006**.
- [148] E. M. Espinoza, J. A. Clark, J. B. Derr, D. Bao, B. Georgieva, F. H. Quina, V. I. Vullev, *ACS omega* **2018**, *3*, 12857.
- [149] K. T. Hylland, S. Øien-Ødegaard, M. Tilset, *European Journal of Organic Chemistry* **2020**, *2020*, 4208.
- [150] S. Barroso, M. Joksch, P. Puylaert, S. Tin, S. J. Bell, L. Donnellan, S. Duguid, C. Muir, P. Zhao, V. Farina et al., *The Journal of organic chemistry* **2021**, *86*, 103.
- [151] C. S. Wei, E. M. Simmons, Y. Hsaio, M. D. Eastgate, *Top Catal* **2017**, *60*, 620.
- [152] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508.
- [153] M. C. D'Alterio, È. Casals-Cruañas, N. V. Tzouras, G. Talarico, S. P. Nolan, A. Poater, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2021**, *27*, 13481.

- [154] K. Matos, J. A. Soderquist, *The Journal of organic chemistry* **1998**, *63*, 461.
- [155] a) J. Takagi, K. Takahashi, T. Ishiyama, N. Miyaoura, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8001; b) G. A. Molander, S. L. J. Trice, S. M. Kennedy, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 8678.
- [156] C. E. Schiaffo, C. Shi, Z. Xiong, M. Olin, J. R. Ohlfest, C. C. Aldrich, D. M. Ferguson, *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57*, 339.
- [157] P. Larson, T. A. Kucaba, Z. Xiong, M. Olin, T. S. Griffith, D. M. Ferguson, *ACS medicinal chemistry letters* **2017**, *8*, 1148.
- [158] C. Bi, J. Chadwick, M. L. Davies, A. J. DelMonte, P. Geng, A. W. Glace, R. A. Green, J. A. Gurak, M. W. Haley, B. L. He et al., *The Journal of organic chemistry* **2023**, *88*, 384.
- [159] N. Minakawa, Y. Kawano, S. Murata, N. Inoue, A. Matsuda, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2008**, *9*.
- [160] a) International Labmate, "HPLC Analysis of Phosphoramidites using RP or NP Conditions", can be found under <https://www.labmate-online.com/news/chromatography/1/ymc-europe-gmbh/hplc-analysis-of-phosphoramidites-using-rp-or-np-conditions/57700>, **2022**; b) "Phosphoramidit-Synthese", can be found under <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Phosphoramidit-Synthese&oldid=234222659>, **2023**.

- [161] a) L. Büttner, J. Seikowski, K. Wawrzyniak, A. Ochmann, C. Höbartner, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2013**, *21*, 6171; b) G. Sicoli, F. Wachowius, M. Bennati, C. Höbartner, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2010**, *49*, 6443.
- [162] E. N. Galyuk, A. S. Fridman, V. I. Vorob'ev, S. G. Haroutiunian, S. A. Sargsyan, M. M. Hauruk, D. Y. Lando, *Journal of biomolecular structure & dynamics* **2008**, *25*, 407.
- [163] a) P. H. Nguyen, A. M. Popova, K. Hideg, P. Z. Qin, *BMC biophysics* **2015**, *8*, 6; b) Aaron Siewert, *Dissertation*, Würzburg, **2021**; c) D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Beilstein journal of organic chemistry* **2015**, *11*, 219.
- [164] F. Wojciechowski, A. Groß, I. T. Holder, L. Knörr, M. Drescher, J. S. Hartig, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51*, 13850.
- [165] L. P. Kotra, K. K. Manouilov, E. Cretton-Scott, J. P. Sommadossi, F. D. Boudinot, R. F. Schinazi, C. K. Chu, *Journal of medicinal chemistry* **1996**, *39*, 5202.
- [166] "Adenosine Deaminase (ADA) from calf intestine", can be found under
<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/roche/10102105001>,
2023.
- [167] A. H. Roush, R. F. Betz, *Journal of Biological Chemistry* **1958**, *233*, 261.
- [168] K. S. Chan, X. Z. Li, S. Y. Lee, *Organometallics* **2010**, *29*, 2850.

- [169] T. T. Hoang, H. T. Nguyen, T. T. Le, D. T. Le, T. Truong, N. T. Phan, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 8241.
- [170] M.-C. Frantz, E. M. Skoda, J. R. Sacher, M. W. Epperly, J. P. Goff, J. S. Greenberger, P. Wipf, *Organic & biomolecular chemistry* **2013**, *11*, 4147.
- [171] H. Tönjes, K. Heidenbluth, R. Scheffler, *J. Prakt. Chem.* **1964**, *26*, 218.
- [172] D. M. Gray, S. H. Hung, K. H. Johnson, *Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes*, **1995**.
- [173] F. Kaiser, B. Endeward, A. Collauto, U. Scheffer, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2022**, *28*, e202201822.
- [174] Y. Becker, S. Roth, M. Scheurer, A. Jakob, D. A. Gacek, P. J. Walla, A. Dreuw, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2021**, *27*, 2212.

8. Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entnommen worden sind, wurden als solche gekennzeichnet.

Zeichnungen, Schemata oder Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Die vorliegende Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Frankfurt am Main, den

Alexander Kaiser