



# Regulation der Aktivität eines Anti-Thrombin-Aptamers und des *glmS*-Ribozyms mit Licht

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Maximilian C. R. Buff**  
aus Bergisch Gladbach

Frankfurt am Main, 2010  
(D30)



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

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Heckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. W. Engels

Datum der Disputation: 15. Dezember 2010





---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>XI</b>
<b>Abstract</b>	<b>XV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Verwendung photolabiler Schutzgruppen in der biochemischen Forschung</i>	<i>1</i>
1.1.1 Photolabile Schutzgruppen	3
1.1.2 Reversible Photoschalter	5
1.1.3 Lichtaktivierbare Nukleinsäuren	6
<i>1.2 Oligonukleotid-Festphasensynthese</i>	<i>11</i>
<i>1.3 Transport von Nukleinsäuren in lebende Zellen</i>	<i>19</i>
1.3.1 Mechanische Methoden	19
1.3.2 Diffusion	20
1.3.3 Fusion mit der Zellmembran	21
1.3.4 Endozytotischer Aufnahmemechanismus	22
<b>2 Allgemeiner Teil</b>	<b>29</b>
<i>2.1A Ein ausschaltbares Aptamer</i>	<i>29</i>
2.1A.1 Einleitung	29
2.1A.2 Vorarbeiten	32
2.1A.3 Aufgabenstellung / Planung	35
2.1A.4 Durchführung und Ergebnisse	36
2.1A.5 Zusammenfassung und Ausblick	42
<i>2.1B Abhängigkeit der Aptameraktivität von der Position der Erweiterung (3' vs. 5')</i>	<i>43</i>
2.1B.1 Einleitung, Aufgabenstellung, Planung	43
2.1B.2 Durchführung und Ergebnisse	44
2.1B.3 Zusammenfassung und Ausblick	51

---

2.2 <i>Lichtgesteuerte Genregulation mit dem glmS-Ribozym</i>	53
2.2.1 Einleitung	53
2.2.2 Zielsetzung / Planung	57
2.2.3 Durchführung und Ergebnisse	58
2.2.4 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	75
2.3 <i>Nukleobasen mit neuartigen photolabilen Schutz-gruppen (pHP und NDBF)</i>	77
2.3.1 Einleitung	77
2.3.2 Vorarbeiten	80
2.3.3 Zielsetzung / Planung	83
2.3.4 Durchführung und Ergebnisse	85
2.3.5 Zusammenfassung und Ausblick	94
2.4 <i>Die photolabile Schutzgruppe als Crosslinker</i>	97
2.4.1 Einleitung	97
2.4.2 Motivation und Zielsetzung	98
2.4.3 Durchführung und Ergebnisse	100
2.4.4 Zusammenfassung	112
<b>3 Experimenteller Teil</b>	<b>115</b>
3.1 <i>Material und Methoden</i>	115
3.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Geräte	115
3.1.2 Analytik	116
3.1.3 Oligonukleotid-Festphasensynthese	117
3.1.4 siRNA-Konjugate mit bifunktionalem Crosslinker	119
3.1.5 Biochemische Methoden	121
3.2 <i>Synthesevorschriften und analytische Daten</i>	123
3.2.1 Synthese von NPE-Amin	123
3.2.2 Synthese des NPE-geschützten Desoxycytidinderivats	125
3.2.3 Synthese des NPE-geschützten Desoxyadenosinderivats	130
3.2.4 Synthese von NPP-Alkohol	135
3.2.5 Synthese der NPP-geschützten Glucosamin-6-phosphat-Derivate	136
3.2.6 Synthese der iPrPac-Gruppe	151
3.2.7 Synthese der pHP-Gruppe (p-Hydroxyphenacyl-Gruppe)	152
3.2.8 Synthese der NDBF-Gruppe (Nitrodibenzofuranyl-Gruppe)	155
3.2.9 Synthese des pHP-geschützten Desoxyguanosinderivats	159

---

3.2.10	Synthese des NDBF-geschützten Desoxyguanosinderivats	164
3.2.11	Synthese der NPP-NH <sub>2</sub> -Gruppe	168
3.2.12	Synthese des dT-NPP-NH <sub>2</sub>	175
3.2.13	Synthese des dG-NPP-NH <sub>2</sub>	181
3.2.14	Synthese des dT-NPP-Chol	185
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>189</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>193</b>
<b>Wissenschaftliche Publikationen</b>		<b>201</b>
<b>Lebenslauf</b>		<b>203</b>

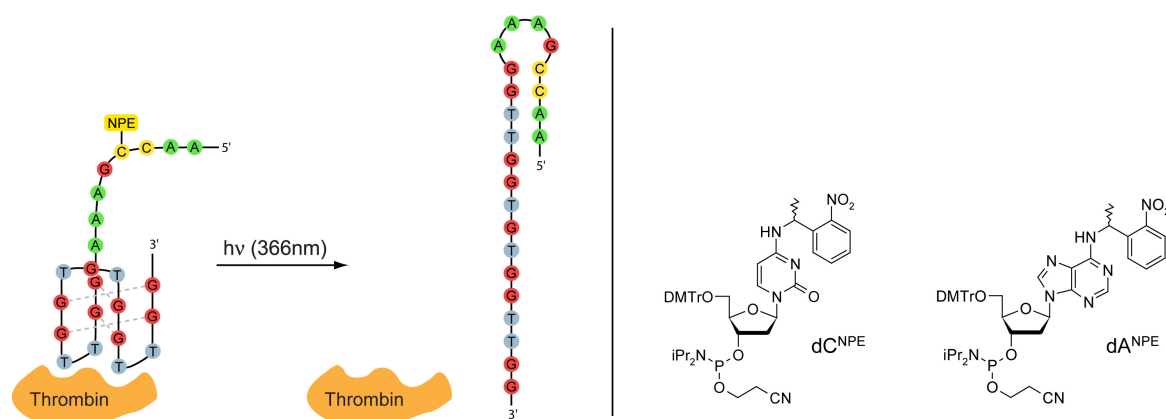


## Zusammenfassung

Photolabile Schutzgruppen wurden, neben ihrer ursprünglichen Verwendung als orthogonale Schutzgruppen in der organischen Synthese, in den letzten dreißig Jahren vermehrt dafür eingesetzt sogenannte lichtaktivierbare Verbindungen („caged compounds“) herzustellen. Dazu wird eine biologisch aktive Verbindung an einer funktionsbestimmenden Stelle mit einer photolabilen Schutzgruppe („cage“) versehen. Durch Belichten kann die photolabile Schutzgruppe entfernt und damit die biologische Aktivität wieder hergestellt werden. Durch die Verfügbarkeit von hochentwickelten Technologien für die Manipulation von Licht (z. B. konfokales Lasermikroskop) kann die biologisch aktive Form der lichtaktivierbaren Verbindung orts- und zeitaufgelöst freigesetzt werden. Dadurch werden sehr detaillierte Experimente zur Klärung biochemischer Fragestellungen möglich.

Da Nucleinsäuren auf vielfältige Art und Weise an biologischen Prozessen beteiligt sind, besteht ein großes Interesse daran, lichtaktivierbare Derivate dieser Verbindungsklasse zu entwickeln, um biologische Prozesse mit Licht zu kontrollieren. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich unter anderem mit der Entwicklung von Nucleotidbausteinen für die automatisierte Oligonucleotidfestphasensynthese, die an der Nucleobase eine photolabile Schutzgruppe tragen. Auf diese Weise lassen sich die photolabilen Modifikationen gezielt an entscheidender Stelle in eine Nucleinsäure einbauen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Variante des Anti-Thrombin-Aptamers **HD1** entwickelt, die vor Belichten aktiv war und sich durch Belichten deaktivieren ließ. Dazu wurde das Wildtyp-Aptamer am 5'-Ende um eine GAAA-Schleife und eine Gegenstrangregion, bestehend aus vier Nucleotiden, erweitert. Dies reichte für eine vollständige Inaktivierung des Aptamers aus. In die Gegenstrangregion wurde ein photolabil geschütztes Nucleotid eingebaut, das die Bildung einer Haarnadelstruktur vorübergehend verhindert.



Dazu wurde ein Desoxycytidin-Derivat synthetisiert, das an seiner N<sup>4</sup>-Position mit einer 1-(2-Nitrophenyl)ethyl-Gruppe modifiziert war. Durch die Maskierung der Antisense-Region wies das Aptamer vor Belichtung blutgerinnungshemmende Aktivität auf, allerdings in geringerem Maße als

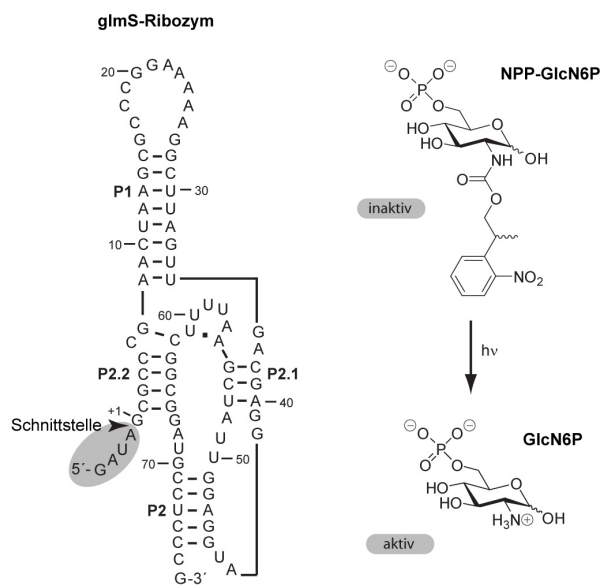
das Wildtyp-Aptamer. Durch Belichten wurde die Gegenstrangregion freigesetzt und dadurch die aktive Konformation des Aptamers zerstört, sodass es keine blutgerinnungshemmende Wirkung mehr besaß.

In einem daran anknüpfenden Projekt sollte eine mit Licht ausschaltbare **HD1**-Variante mit verbessertem Schaltverhalten entwickelt werden, deren Aktivität vor dem Belichten mit der des Wildtyp-Aptamers vergleichbar ist. Tests zeigten, dass eine 5'-Erweiterung des Aptamers stets einen Aktivitätsverlust zur Folge hatte. Getestet wurden verschiedene Linker-Sequenzen, D-Spacer (Abasic Sites) und nicht nukleotidische Linker wie Glykollinker oder alkyliche Linker. Eine Erweiterung am 3'-Ende brachte dagegen fast immer Aptamervarianten hervor, deren Aktivität die des Wildtypaptamers überstiegen. Um diese verbesserten Aptamervarianten zu deaktivieren, war eine Antisense-Region bestehend aus bis zu neun Nukleotiden nötig. Für eine photolabil geschützte Variante wurde zusätzlich ein Desoxyadenosinderivat mit N<sup>6</sup>-1-(2-Nitrophenyl)ethylmodifikation synthetisiert. Es zeigte sich, dass eine photolabile Schutzgruppe nicht ausreichte um die Antisense-Region zu neutralisieren. Aptamervarianten mit vier oder fünf photolabilen Schutzgruppen in der Antisenseregion waren vor dem Belichten aktiver als das Wildtyp-Aptamer **HD1** und konnten durch Belichten vollständig deaktiviert werden.

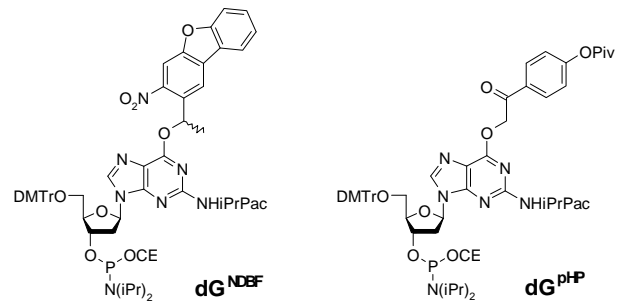
In einem weiteren Projekt dieser Arbeit wurde eine photolabil geschützte Glukosamin-6-phosphat-Variante synthetisiert, um eine lichtabhängige Spaltung des *glmS*-Ribozyms aus *Bacillus subtilis* zu induzieren. Dazu wurde GlcN6P an der Aminofunktion über eine Carbonyllinker mit einer 2-(2-Nitrophenyl)propylgruppe modifiziert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass mit dieser Verbindung durch Belichten die Spaltung eines *glmS*-EGFP-mRNA-Konstrukts induziert werden konnte. In HeLa-Zellen wurde untersucht, ob sich dieses System zur

Regulation der EGFP-Expression eignet. Da erste Versuche erfolglos blieben, wurde eine lipophile, zellgängige Variante des photolabil geschützten GlcN6Ps synthetisiert. Versuche, in denen dieses Derivat getestet wird, werden zur Zeit von unseren Kooperationspartnern durchgeführt.

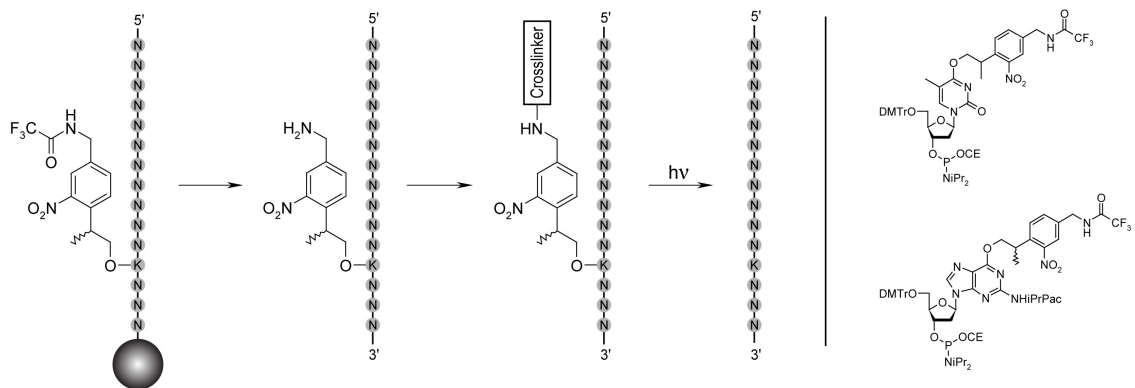
In einem weiteren Projekt wurden Desoxyguanosinderivate für die DNA-Festphasensynthese synthetisiert, die an ihrer O<sup>6</sup>-Position mit einer *p*-Hydroxyphenacylgruppe bzw. mit einer 1-(3-Nitro-dibenzofuran-2-yl)ethylgruppe modifiziert wurden. Diese wurden in ein Desoxyoligonukleotid eingebaut und es konnte gezeigt werden, dass die photolabilen Schutzgruppen durch Belichten



abgespalten werden. Beide photolabilen Modifikationen waren allerdings unter den basischen DNA-Abspaltbedingungen zu instabil, als dass sie sich für den routinemäßigen Einsatz zur Herstellung lichtaktivierbarer Nucleinsäuren eignen würden.



Im letzten Teil der Arbeit wurde eine photolabile Schutzgruppe entwickelt, die über einen zusätzlichen Aminolinker verfügt [2-(4-(Aminomethyl)-2-nitrophenyl)-propanol]. Die Aminofunktionalität war für die Dauer der DNA/RNA-Festphasensynthese mit einer Trifluoracetylgruppe geschützt, die unter den basischen Abspaltbedingungen ebenfalls entfernt wird. Mit dieser photolabilen Schutzgruppe wurden ein Thymidinderivat an der O<sup>4</sup>-Position und ein Desoxyguanosinderivat an der O<sup>6</sup>-Position modifiziert.



Das Desoxyguanosinderivat wurde erfolgreich in der Oligonucleotidfestphasensynthese eingesetzt. Die photolabile Schutzgruppe konnte durch Belichten vollständig von der synthetisierten Nucleinsäure abgespalten werden. Darüber hinaus gelang es, über die Aminofunktionalität die bifunktionalen Crosslinker SMCC und SMPB mit der Nucleinsäure zu verknüpfen. Auf diese Weise ist eine reversible Verknüpfung der Nucleinsäure mit einem nahezu beliebigen Bindungspartner möglich. Durch Belichten kann die Nucleinsäure in ihrer ursprünglichen Form wiederhergestellt werden.



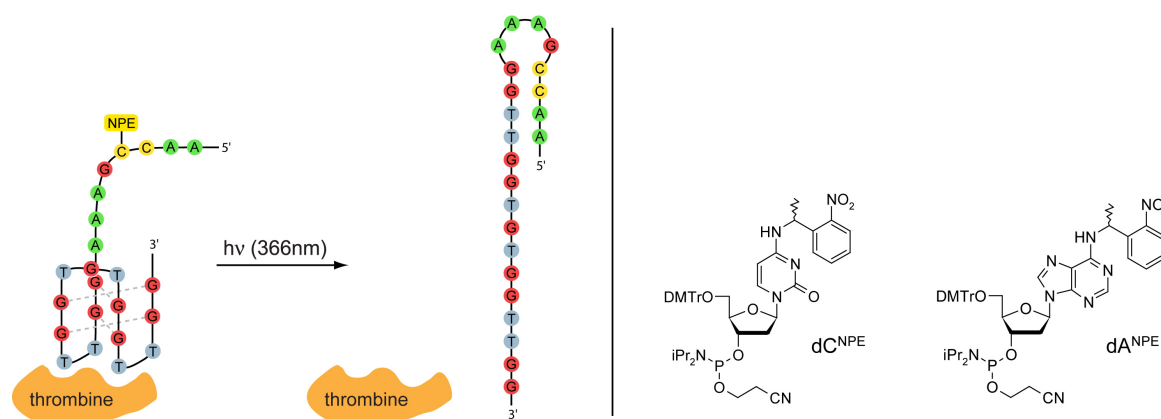


## Abstract

Beside their original usage as orthogonal protecting groups in organic synthesis, photolabile protecting groups have become a useful tool for the development of light activatable molecules. To obtain these “caged compounds” a biologically active molecule is modified with a photolabile protecting group (“cage”) at a function-determining position. Irradiation with light can cleave the photolabile protecting group and restore the biological activity of the caged molecule. Due to the availability of sophisticated technology for the manipulation of light (e.g. confocal laser microscopes) it is possible to release the biologically active form of the light activatable compound with spatial and temporal control. This technology enables life scientists to design very detailed experiments for the investigation of biochemical issues.

Since nucleic acids take part in a wide range of biological processes, this compound class is an interesting target for the caging approach. Light activatable derivatives of nucleic acids represent a versatile instrument to gain control over biological processes with light. Our group is engaged in the development of nucleotide precursors, bearing a photolabile protecting group at the nucleobase, for the automated solid phase synthesis of oligonucleotides. With this approach it is possible to introduce the photoactivatable nucleotides at a defined position within the oligonucleotide.

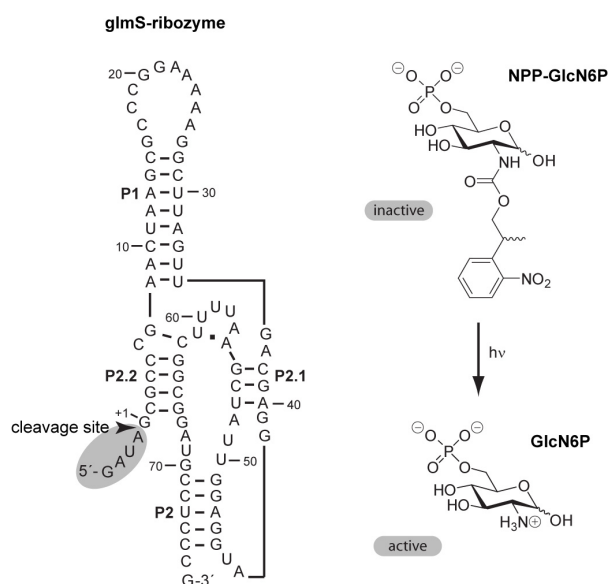
In the first part of this thesis a variant of the anti thrombin aptamer **HD1** was developed, that was active before irradiation and could be deactivated with light. For this purpose the wildtype aptamer was extended at the 5'-end with a GAAA-loop and an antisense region consisting of four nucleotides. This resulted in a complete depletion of the aptamer activity. A photoactivatable nucleotide was then introduced in the antisense region to prevent the formation of a hairpin structure. Therefore a deoxycytidine derivative caged at the N<sup>4</sup>-position with a 1-(2-nitrophenyl)ethyl group was synthesized.



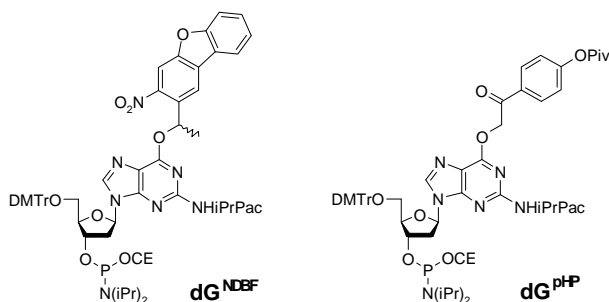
Due to the caged antisense region the aptamer led to a prolonged blood clotting time before irradiation. However, the activity of the prolonged and caged aptamer variant did not reach the activity of the wildtype aptamer. Upon irradiation the antisense region was released and this resulted in a destruction of the active conformation of the aptamer and the loss of its anticoagulative effect.

A following project was dedicated to the development of an **HD1** variant that could be deactivated with light with a better switching behaviour. The activity of the caged aptamer before irradiation should match the activity of the wildtype aptamer. Preliminary studies showed that a 5'-elongation of the aptamer led always to a significant loss of activity. Different linker sequences were tested, including D-Spacer (abasic sites) and nonnucleotidic linkers like glycol derived linkers or alkyl linkers. In contrast, an elongation at the 3'-end always led to aptamer variants that were even more active than the wildtype aptamer. To deactivate these improved aptamers it was necessary to apply an antisense region consisting of up to nine nucleotides. For the preparation of a photolabile protected aptamer variant a deoxyadenosine derivative was synthesized in addition to the caged deoxycytidine derivative, caged at the N<sup>6</sup>-position with a 1-(2-nitrophenyl)ethyl group. One caged nucleotide proved to be ineffective in masking the 9mer antisense region. Aptamer variants with four or five photolabile protected nucleotides in the antisense region finally showed a better activity than the wildtype aptamer **HD1** before irradiation and could be completely deactivated with light.

In an additional project of this thesis a photolabile protected glucosamin-6-phosphat derivative was synthesized in order to get an instrument for the light-dependent induction of the cleavage reaction of the *glmS*-ribozyme from *bacillus subtilis*. A 2-(2-nitrophenyl)propyl group was attached to the amino function of the GlcN6P via a carbonyl linker. *In vitro* it could be shown that this compound was able to induce the cleavage of a *glmS*-EGFP-mRNA construct upon irradiation. In HeLa cells it was investigated if this system would be suitable for the regulation of EGFP-expression. Since the first experiments led to negative results, a lipophilic, cell penetrating variant of caged GlcN6P was synthesized. Experiments with this derivative are currently performed by our collaboration partners.

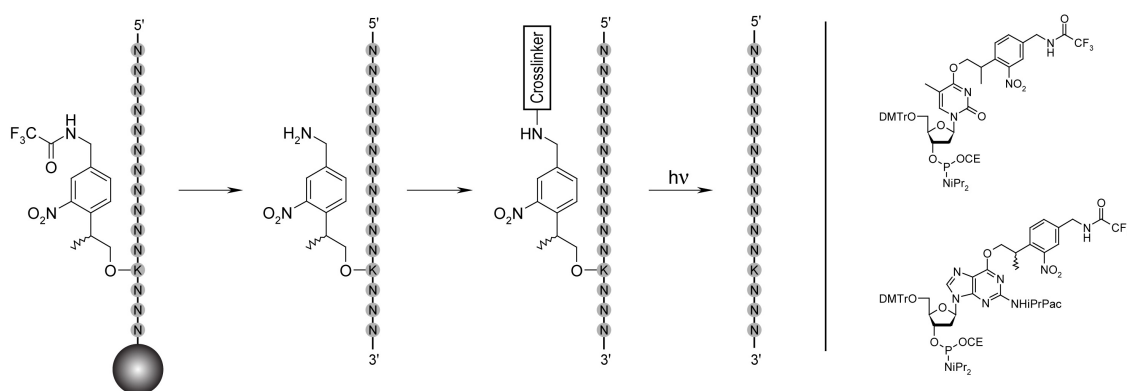


In an additional project two deoxyguanosine derivatives for DNA solid phase synthesis were synthesized, modified at the O<sup>6</sup>-position with a *p*-hydroxyphenacyl group and a 1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl group respectively. These derivatives were applied for solid phase synthesis and it could be



shown that the photolabile protecting groups were cleaved from the oligonucleotide upon irradiation. However, both photolabile protecting groups were not very stable on the O<sup>6</sup>-position of deoxyguanosin during the basic DNA cleavage step, what leads to the conclusion that these photolabile protecting groups may be not suitable for the routine synthesis of light activatable oligonucleotides.

In the last part a photolabile protecting group with an additional amino linker was developed [2-(4-(aminomethyl)-2-nitrophenyl)propanol]. During the DNA/RNA solid phase synthesis the amino function was protected with a trifluoroacetyl group that also could be removed after synthesis during the basic cleavage conditions. A thymidine derivative and a deoxyguanosine derivative were synthesized that were modified with this photolabile protecting group at the O<sup>4</sup>-position (T) and the O<sup>6</sup>-position (dG) respectively.



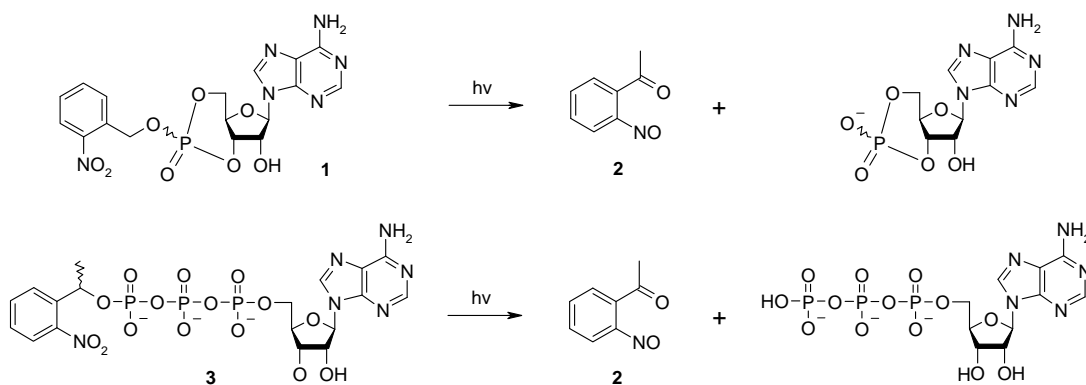
The deoxyguanosine derivative was successfully applied for oligonucleotide synthesis. Upon irradiation the photolabile protecting group could be entirely removed from the oligonucleotide. Furthermore it was possible to connect the amino function of the photolabile protected oligonucleotide to the bifunctional crosslinkers SMCC or SMPB. In this way it is possible to create a reversible linkage between the nucleic acid and almost any kind of binding partner. By irradiation the nucleic acid can be restored in its native form.



# 1 Einleitung

## 1.1 Verwendung photolabiler Schutzgruppen in der biochemischen Forschung

Mit Hilfe photolabiler Schutzgruppen lassen sich biologisch aktive Verbindungen so modifizieren, dass sie vorübergehend ihre biologische Wirksamkeit einbüßen. Durch Bestrahlung mit Licht können die photolabilen Schutzgruppen irreversibel wieder abgespalten werden, wodurch die Aktivität des verwendeten Wirkstoffmoleküls wieder hergestellt wird.<sup>[1]</sup> Diese Technik zur Untersuchung biochemischer Fragestellungen wurde vor etwa 30 Jahren entwickelt. Bereits 1977 wurde von Engels *et al.* ein photolabil geschütztes cAMP-Derivat (**1**) synthetisiert. Während die photolabil geschützte Form in Experimenten mit cAMP-abhängiger Proteinkinase inaktiv war, konnte durch Belichten die biologische Aktivität vollständig wiederhergestellt werden.<sup>[2]</sup> Hoffman *et al.* synthetisierten 1978 ein *o*-nitrobenzyl-modifiziertes ATP-Derivat (**3**) zur Untersuchung der Na,K-ATPase.<sup>[3]</sup>



**Abb. 1: oben: photolabil geschütztes cAMP nach Engels;<sup>[2]</sup> unten: photolabil geschütztes ATP nach Hoffman.<sup>[3]</sup>**

In dieser Studie wurde ebenfalls der Begriff „caged compound“ geprägt, der bis heute im englischen Sprachraum für die Bezeichnung von lichtaktivierbaren, biologisch wirksamen Verbindungen verwendet wird. Auf die Problematik des Begriffs „caging“ für die Verwendung photolabiler Schutzgruppen zur Herstellung lichtaktivierbarer Verbindungen wird immer wieder hingewiesen, da damit irrtümlicherweise Einschlußverbindungen im topologischen Sinne assoziiert werden könnten, wo hingegen die meisten lichtaktivierbaren Verbindungen durch kovalente Modifikation einer entscheidenden, funktionsbestimmenden Stelle mit einer photolabilen Schutzgruppe erhalten werden.<sup>[4,5]</sup> Jedoch ist andererseits jedem, der sich mit der Verwendung lichtaktivierbarer

Verbindungen näher befasst, bewusst, dass der Begriff „caging“ nicht allzu wörtlich gemeint ist, und darüber hinaus bietet dieser Begriff eine klare Abgrenzung der Verwendung photolabiler Schutzgruppen zur Herstellung lichtaktivierbarer Wirkstoffe gegenüber der Verwendung photolabiler Schutzgruppen zu rein synthetischen Zwecken.

Die Verwendung lichtaktivierbarer Wirkstoffe für die Untersuchung biochemischer Vorgänge bietet zahlreiche Vorteile. Zum einen handelt es sich bei Licht um ein orthogonales Signal, das heißt, bis auf spezialisierte Zellen, wie z.B. Photorezeptoren oder bestimmte Pflanzenzellen, bleiben im Idealfall die übrigen Stoffwechselforgänge im zu untersuchenden biologischen System unbeeinflusst. Verwendet man eine geeignete Wellenlänge (z.B. langwelliges UV-Licht) so ist die Bestrahlung weitgehend unschädlich für das zu untersuchende biologische System. Darüber hinaus sind viele in der Forschung verwendete Modellorganismen wie Zebrafische (*D. rerio*), Fadenwürmer (*C. Elegans*) oder Essigfliegen (*D. melanogaster*) während ihrer gesamten Lebensdauer oder für die Zeit bestimmter Entwicklungsstadien transparent, und damit lichtzugänglich. Auch in größeren Tieren inklusive dem Menschen sind einige spezielle Gewebe, wie z.B. das Auge oder die oberen Hautschichten mit Licht zu erreichen. Durch die Verwendung hochentwickelter Technologien wie z.B. konfokaler Lasermikroskope ist eine sehr exakte räumliche Steuerung der Bestrahlung einer zu untersuchenden Probe möglich. Über Intensität und Dauer der Bestrahlung kann zusätzlich die Dosis des freigesetzten Wirkstoffmoleküls genau gesteuert werden. Da ein zur Bestrahlung verwendeter Laserstrahl eine biologische Probe vollständig durchdringt, wird die lichtaktivierbare Verbindung auch unter- und oberhalb der Fokusebene freigesetzt.<sup>[6]</sup> Durch Verwendung von Zweiphotonenanregung, deren Übergangswahrscheinlichkeit nicht linear, sondern quadratisch von der Photonendichte abhängt, könnte eine Freisetzung der biologisch wirksamen Verbindung mit dreidimensionaler Ortsauflösung erreicht werden, da die notwendige Photonendichte ausschließlich an dem Punkt erreicht würde, an dem sich die Spitzen der beiden Lichtkegel des fokussierten Laserstrahls treffen. Diese Technologie würde die Gestaltung biochemischer Experimente mit unvergleichlicher Präzision ermöglichen.<sup>[7]</sup>

Neben ATP wurden inzwischen zahlreiche andere Verbindungen mit Hilfe photolabiler Schutzgruppen in eine inaktive, lichtaktivierbare Form überführt. Dazu gehören Neurotransmitter wie Glutamat<sup>[8]</sup> oder NO,<sup>[9]</sup> Ca<sup>2+</sup>-Ionen,<sup>[10]</sup> die mit Hilfe eines lichtspaltbaren Chelators freigesetzt werden können, Steroide,<sup>[11]</sup> Lipide,<sup>[12]</sup> Zucker<sup>[13]</sup> und Aminosäuren.<sup>[14]</sup> Aber auch Polypeptide bis hin zu ganzen Proteinen wurden mit photolabilen Schutzgruppen ausgestattet.<sup>[15]</sup> Für eine ausführliche Beschreibung sei auf entsprechende Übersichtsartikel in der Literatur verwiesen.<sup>[1,4,6]</sup>

### 1.1.1 Photolabile Schutzgruppen

Die für die Herstellung lichtaktivierbarer Verbindungen mit Abstand am häufigsten verwendete photolabile Schutzgruppe ist die *o*-Nitrobenzylgruppe und ihre Derivate.<sup>[16]</sup> Ursprünglich wurde sie in der organischen Synthese als orthogonale Schutzgruppe verwendet.<sup>[17]</sup> Ein Nachteil der *o*-Nitrobenzylgruppe besteht darin, dass bei der Photolyse als Nebenprodukt Nitrosobenzaldehyd (**8**) entsteht, der durch seine hohe Reaktivität innerhalb biologischer Systeme nicht unbedenklich ist. Durch Einführung einer Methylgruppe in benzylicher Position erhält man die 1-(2-Nitrophenyl)ethylgruppe (NPE). Diese weist eine höhere Einschützungs geschwindigkeit auf. Auch ist das entstehende Nitrosoketon etwas weniger reaktiv als der Nitrosobenzaldehyd. Ein Nachteil besteht darin, dass ein zusätzliches stereogenes Zentrum eingeführt wird.<sup>[5]</sup>

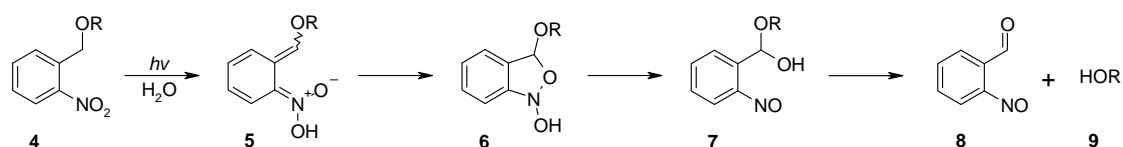


Abb. 2: Photolysereaktion der *o*-Nitrobenzylgruppe.<sup>[1,18]</sup>

Der Mechanismus der Photolysereaktion ist in Abb. 2 dargestellt. Durch Belichtung und intramolekulare Umlagerung eines benzylichen Protons wird die *aci*-Nitroverbindung **5** gebildet. Ein Sauerstoffatom der Nitrogruppe geht über das zyklische Benzisoxazolidin **6** auf den benzylichen Kohlenstoff über (**7**). Anschließend wird durch Eliminierung die entsprechende Abgangsgruppe (**9**) freigesetzt.<sup>[1,18]</sup>

Pfleiderer *et al.*<sup>[19]</sup> entwickelten Variante der NPE-Gruppe die eine zusätzliche Methylengruppe zwischen dem benzylichen Kohlenstoffatom und der Abgangsgruppe aufweist. Diese NPP-Gruppe (2-(2-Nitrophenyl)propyl-) weist eine höhere Photolysegeschwindigkeit auf und bietet darüber hinaus den Vorteil, dass als Nebenprodukt das biologisch weniger bedenkliche *o*-Nitrostyrol-Derivat **13** entsteht. Der Photolysemechanismus ist in Abb. 3 zusammengefasst.<sup>[20]</sup> Ähnlich wie bei der *o*-Nitrobenzylgruppe wird auch hier durch Belichtung zunächst die *aci*-Nitroverbindung **11** gebildet. Anschließend kann der Reaktionsmechanismus nach zwei verschiedenen Wegen ablaufen. Handelt es sich bei der photolabil geschützten Substanz um eine gute Abgangsgruppe, so ist der  $\beta$ -Eliminierungsmechanismus über die deprotonierte Form der *Aci*-Verbindung **12** bevorzugt. Handelt es sich dagegen um eine schlechte Abgangsgruppe, so erfolgt hauptsächlich die Bildung der Nitroverbindung **16**, ohne dass die Abgangsgruppe freigesetzt wird.

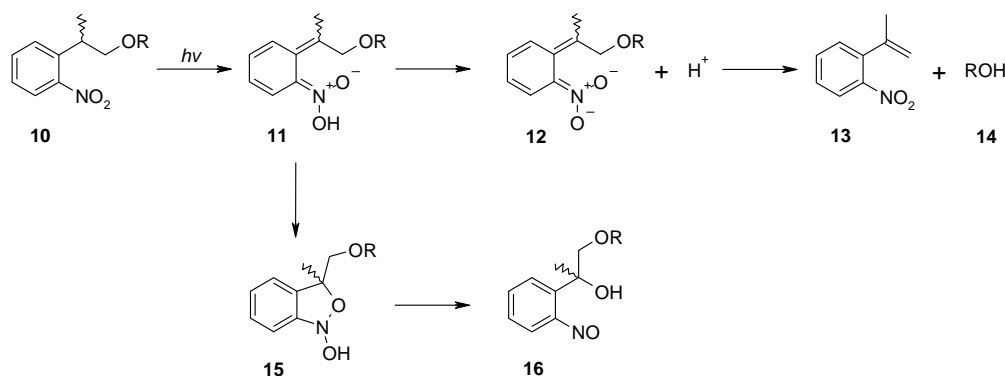


Abb. 3: Photolysemechanismus der 2-(2-Nitrophenyl)propylgruppe (NPP)<sup>[20]</sup>

Es wurden zahlreiche Varianten der nitrobenzylartigen Schutzgruppen synthetisiert. Durch verschiedene Substituenten am Phenylring lassen sich die Eigenschaften der photolabilen Schutzgruppe beeinflussen. Durch elektronenreiche Substituenten wie z.B. Methoxygruppen kann das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen verschoben werden. Mit der bathochromen Verschiebung geht häufig eine Verschlechterung der Quantenausbeute einher. Zusätzlich wird durch die Methoxysubstituenten die Wasserlöslichkeit der photolabil geschützten Verbindung erhöht. In Abb. 4 sind einige synthetisierte Varianten der *o*-Nitrobenzylgruppe zusammengefasst.<sup>[5]</sup>

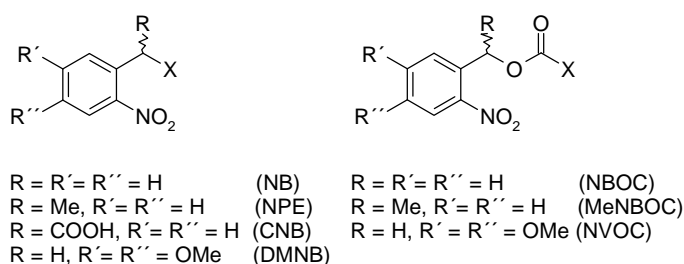
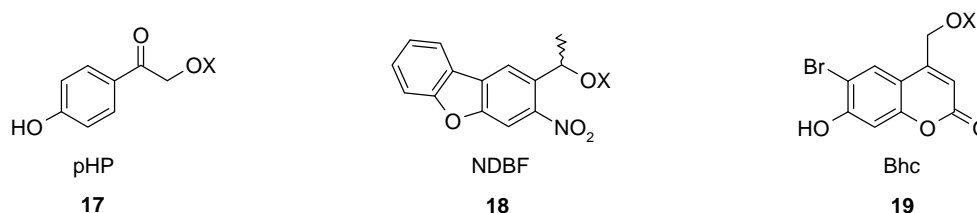


Abb. 4: Übersicht über verschiedene Varianten der *o*-Nitrobenzylgruppe. X = Abgangsgruppe.

Die photolabile Schutzgruppe hat einen wichtigen Einfluss auf die Eigenschaften der lichtaktivierbaren Verbindung. Sie kann zum Beispiel die Wasserlöslichkeit, Zellgängigkeit und biologische Verträglichkeit der photolabil geschützten Verbindung verändern. Daher wurden seit den ersten Experimenten mit lichtaktivierbaren Verbindungen zahlreiche weitere photolabile Schutzgruppen entdeckt und entwickelt, um den unterschiedlichsten Anforderungen gerecht zu werden. Beispielhaft sei hier die *p*-Hydroxyphenacylgruppe (pHP) **17** erwähnt. Sie wurde 1996 von Givens *et al.* vorgestellt und für die Herstellung lichtaktivierbarer Derivate von ATP, GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und verschiedener Peptide verwendet.<sup>[21,22]</sup> Aufgrund der *p*-Hydroxygruppe sind pHP-geschützte Verbindungen, als auch das Photolyseprodukt *p*-Hydroxyphenylelessigsäure wasserlöslich. Darüber hinaus ist die *p*-Hydroxyphenylelessigsäure biologisch unbedenklicher als die Nitroso- und Nitroverbindungen, die bei der Photolyse der Nitrobenzylchromophore entstehen. Das



Absorptionsmaximum der pHP-Gruppe lässt sich ebenfalls durch Methoxysubstituenten zu höheren Wellenlängen verschieben, allerdings nimmt dadurch auch bei der pHP-Gruppe die Quantenausbeute der Photolysereaktion deutlich ab.<sup>[23]</sup> Um die Kinetik schneller biochemischer Vorgänge zu untersuchen, ist es notwendig, dass die lichtinduzierte Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe mit einer höheren Geschwindigkeit erfolgt, als der beobachtete Prozess. Daher ist auch die Entwicklung von Chromophoren mit hoher Effizienz der photolytischen Spaltung interessant. Von Momotake *et al.*<sup>[24]</sup> wurde das *o*-Nitrodibenzofuran-Chromophor **18** (NDBF) vorgestellt, das im Gegensatz zur NPE- bzw. NPP-Gruppe über einen deutlich höheren Absorptionskoeffizienten im langwelligen UV-Bereich verfügt und eine sehr hohe Quantenausbeute für die Entschützungsreaktion vorweisen kann. Daneben bieten auch auf dem Cumaringerüst basierende Chromophore gute Absorptionseigenschaften, hohe Quantenausbeuten und eine extrem schnelle Photolysegeschwindigkeit. Beispielhaft ist in Abb. 5 das 6-Brom-7-hydroxycumarin **19** gezeigt.<sup>[25]</sup> Sowohl die NDBF-Gruppe als auch die Bhc-Gruppe verfügen über einen überdurchschnittlich hohen Zweiphotoneneinfangquerschnitt.

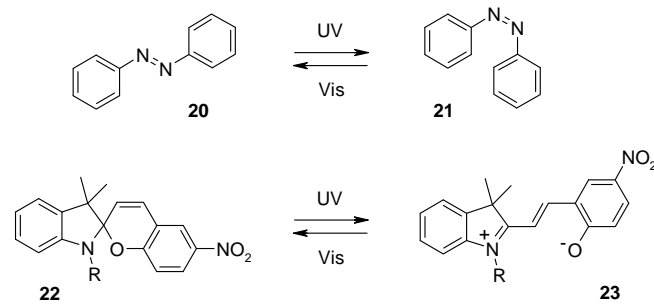


**Abb. 5: p-Hydroxyphenacylgruppe (pHP), 2-(2-Nitrodibenzofuranyl)ethylgruppe (NDBF), 6-Brom-7-hydroxycumarin (Bhc). X = Abgangsgruppe.**

Neben den hier vorgestellten photolabilen Schutzgruppen existieren zahlreiche andere interessante Chromophore. Für eine genauere Beschreibung sei hier auf den ausführlichen Übersichtsartikel von G. Mayer und A. Heckel verwiesen.<sup>[4]</sup>

### 1.1.2 Reversible Photoschalter

Neben den photolabilen Schutzgruppen, die durch Belichtung irreversibel abgespalten werden, existieren photoreaktive Moleküle, die je nach Wellenlänge des verwendeten Lichts zwischen zwei Konformationen hin und hergeschaltet werden können. Zwei Beispiele sind in Abb. 6 gezeigt. Azobenzol kann wellenlängenabhängig zwischen der E- und der Z-Form geschaltet werden.<sup>[26]</sup> Das Spiropyran **22** geht bei Bestrahlung mit UV-Licht in die Merocyaninform **23** über, wobei sich nicht nur die Konformation sondern auch die Polarität ändert.<sup>[27]</sup>



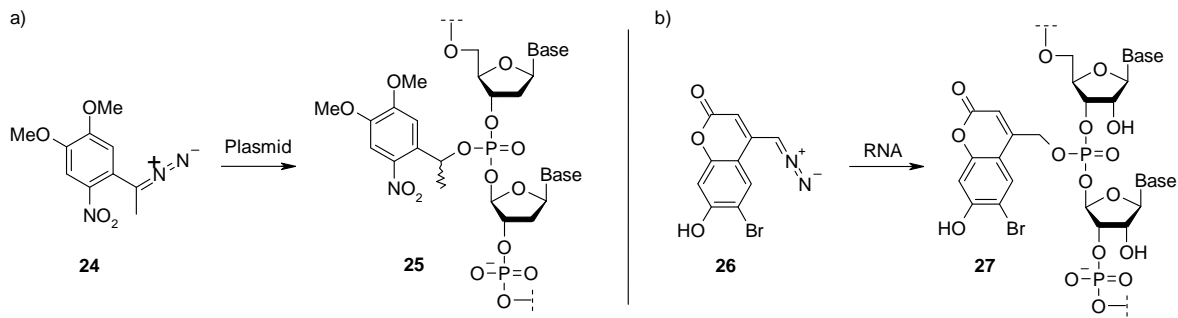
**Abb. 6: Beispiele für reversible Photoschalter.**

Durch Modifikation mit solchen Photoschaltern können biologisch wirksame Moleküle erhalten werden, die durch Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen reversibel zwischen einer aktiven und einer inaktiven Form hin und hergeschaltet werden können. Die Schwierigkeit besteht darin, dass auch die aktive Form mit dem entsprechenden Photoschalter modifiziert ist. Dadurch ist es deutlich schwieriger ein eindeutiges An/Aus-Verhalten zu erreichen, als es mit der Verwendung irreversibel abspaltbarer photolabiler Schutzgruppen möglich ist.

### 1.1.3 Lichtaktivierbare Nukleinsäuren

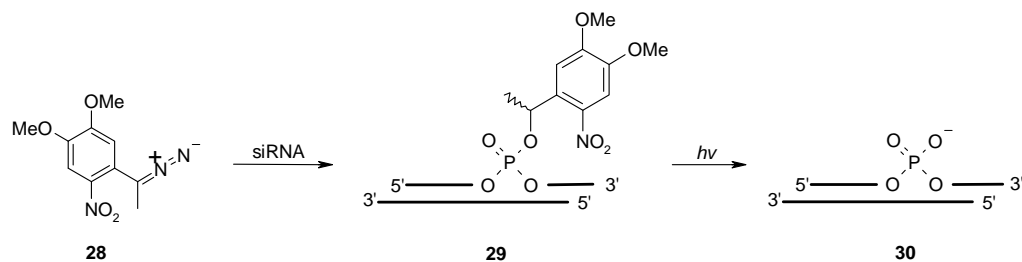
Nukleinsäuren sind über die Speicherung der genetischen Information hinaus an vielen Stoffwechselprozessen lebender Organismen beteiligt. So dienen sie in Form der mRNA zum Transport der genetischen Information zu den Ribosomen und nehmen in Form der ribosomalen RNA und der tRNA auch direkt an der Expression der genetischen Information teil. Darüber hinaus sind Nukleinsäuren sowohl an natürlichen Mechanismen, als auch an künstlichen Technologien zur Genregulation beteiligt. (z.B. RNA-Interferenz,<sup>[28]</sup> microRNAs,<sup>[29]</sup> Riboswitches,<sup>[30]</sup> Antisense-Strategie,<sup>[31]</sup> DNA/RNA-Decoys<sup>[32]</sup>). Mit Hilfe von Aptameren<sup>[33]</sup> ist auch die Modulation von Proteinfunktionen möglich. Da Nukleinsäuren auf so vielfältige Art und Weise an den Stoffwechselprozessen lebender Zellen beteiligt sind, sie darüber hinaus aufgrund ihres modularen Aufbaus synthetisch zugänglich sind, eignen sie sich auf hervorragende Art und Weise, gezielt eingesetzt und eventuell durch geschickte Modifikation, künstlichen Einfluss auf die verschiedenen Stoffwechselebenen zu nehmen, entweder therapeutischer Art, oder im Sinne des Informationsgewinns. Eine ideale Technik zur exakteren Kontrolle von Nukleinsäureaktivität bietet die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen.

Ein erster Vorstoß in diese Richtung wurde von Haselton *et al.* unternommen.<sup>[34]</sup> Um Genexpression mit Licht zu steuern, wurde Plasmid-DNA mit dem Gen für Luciferase unter benzylierenden Bedingungen statistisch mit Nitroveratrylgruppen (3,4-Dimethoxy-1-nitrophenyl)-ethylgruppen) modifiziert. (Abb. 7 a)



**Abb. 7: statistische Modifikation mit photolabilen Schutzgruppen a) von plasmidischer DNA nach Haselton *et al.*<sup>[34]</sup>; b) von mRNA nach Okamoto *et al.*<sup>[35]</sup>**

Dabei wurden vermutlich hauptsächlich die Phosphatgruppen des Rückgrats mit photolabilen Schutzgruppen versehen. Ein Plasmid trug dabei durchschnittlich 270 photolabile Schutzgruppen. Nach der Transfektion der Plasmide in Rattenhaut konnte die Expression von Luciferase durch Bestrahlung der Haut mit Licht aktiviert werden. Von Okamoto *et al.* wurde für GFP codierende mRNA mit Bhc-Gruppen modifiziert.<sup>[35]</sup> (Abb. 7 b) Auch hier wurde das RNA-Rückgrat statistisch benzyliert. Die translatorische Aktivität der verwendeten mRNA konnte sowohl *in vitro* als auch in Zebrafischembryos durch Belichten, allerdings nur teilweise, wiederhergestellt werden.



**Abb. 8: Herstellung lichtaktivierbarer siRNA nach Friedman *et al.*<sup>[36]</sup>**

Auf ähnliche Weise wurde von Friedman *et al.* lichtaktivierbare siRNA erhalten, indem die siRNA-Doppelstränge wie bei Haselton mit Nitroveratrylgruppen modifiziert wurden.<sup>[36]</sup> (Abb. 8) Als das durch die siRNA zu regulierende Gen wurde GFP gewählt, da auf diese Weise durch Fluoreszenzmessungen eine Quantifizierung der RNA-Interferenz möglich ist. Die Experimente wurden in HeLa-Zellen durchgeführt. Durch die unspezifische Photoschätzung des Phosphatrückgrats konnte die siRNA-Aktivität nicht vollständig aufgehoben werden, war aber deutlich schwächer als bei der unmodifizierten siRNA. Durch Belichten der Proben konnte die Aktivität der siRNA wieder hergestellt werden. Je mehr photolabile Schutzgruppen die RNA-Doppelstränge allerdings besaßen, desto mehr trat der Effekt auf, dass die vollständige Aktivität der siRNA durch Lichteinstrahlung nicht erreicht werden konnte. Der Effekt, dass die Aktivität des modifizierten Oligonukleotids durch Belichten nur teilweise wiederhergestellt werden kann, ist in allen drei hier vorgestellten Ansätzen zu

beobachten. Zurückzuführen ist das auf die unspezifische Einführung der photolabilen Schutzgruppen. Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass außer den Phosphatgruppen des Oligonukleotid-Rückgrats auch andere Positionen alkyliert werden, die ihrerseits für eine photolytische Spaltung keine geeigneten Abgangsgruppen darstellen. Bei den Experimenten von Friedman tritt außerdem das Phänomen auf, dass die biologische Aktivität durch die Modifikation mit photolabilen Schutzgruppen nicht vollständig aufgehoben wird. Durch den relativ unkomplizierten synthetischen Zugang und die Eignung auch für große Nucleinsäuremoleküle wie Plasmide ist die statistische Modifikation von Nucleinsäuren mit photolabilen Schutzgruppen trotz einiger Nachteile eine sehr nützliche und wirkungsvolle Methode.

Um die beschriebenen Nachteile wie unvollständige Maskierung der biologischen Aktivität bzw. unvollständige Wiederherstellung der biologischen Aktivität zu vermeiden, können mit höherem synthetischen Aufwand photolabile Schutzgruppen an definierten Positionen und funktionellen Gruppen der Nucleinsäure eingeführt werden. Zum einen kann dadurch sichergestellt werden, dass der Einbau photolabiler Schutzgruppen nur an solchen funktionellen Gruppen erfolgt, die auch wieder vollständig photolytisch freigesetzt werden können. Darüber hinaus kann man die Position der photolabilen Schutzgruppe so wählen, dass sie eine bestimmte Wechselwirkung oder Reaktion gezielt verhindert. Dadurch kann mit wenigen photolabilen Schutzgruppen ein stärkerer Effekt erzielt werden als durch statistische Modifikation mit photolabilen Schutzgruppen. Diesen Weg wählten McMillan *et al.*<sup>[37]</sup> als sie ein Adenosinphosphoramidit, dessen 2'-OH mit einer Nitrobenzylgruppe geschützt war, für die Synthese eines Hammerheadribozym-Substrats verwendeten. Das Hammerheadribozym bewirkt die Spaltung der Substrat-RNA indem es einen nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe eines bestimmten Nucleotids auf die benachbarte Phosphodiesterbindung katalysiert. Ist die entsprechende 2'-OH-Gruppe mit einer photolabilen Schutzgruppe modifiziert, kann die Spaltung durch Bestrahlung induziert werden. Diese Technik zur Herstellung lichtaktivierbarer Nucleinsäuren wurde von der Arbeitsgruppe Pitsch aufgegriffen.<sup>[38]</sup> Bei der Entwicklung neuer Schutzgruppen für die 2'-OH-Gruppe während der RNA-Festphasensynthese wurde auch die photolabile (1-(2-Nitrophenyl)-ethoxy)methylgruppe (NPEOM) getestet. Über die synthetische Nützlichkeit hinaus konnten Pitsch *et al.* zeigen, dass sich auf diese Weise ebenfalls lichtaktivierbare RNA, wiederum in Form eines Hammerheadribozym-Substrats, herstellen ließ.

Die sequenzspezifische Bindung und Erkennung komplementärer Nucleinsäuresequenzen stellt eine zentrale Fähigkeit von Nucleinsäuren dar und begründet die Vielseitigkeit ihrer biologischen Funktionen. Daher verfolgt unsere Arbeitsgruppe die Strategie, photolabile Schutzgruppen an funktionellen Gruppen der Nucleobasen einzuführen, um die Fähigkeit zur Watson-Crick-Basenpaarung vorübergehend einzuschränken. Durch dieses Vorgehen kann sowohl eine lichtabhängige Steuerung der Wechselwirkung zwischen Nucleinsäuren und Makromolekülen wie

zum Beispiel Proteinen erreicht werden, als auch eine lichtabhängige Steuerung von Prozessen, die auf der Erkennung komplementärer Nukleinsäuresequenzen beruhen.

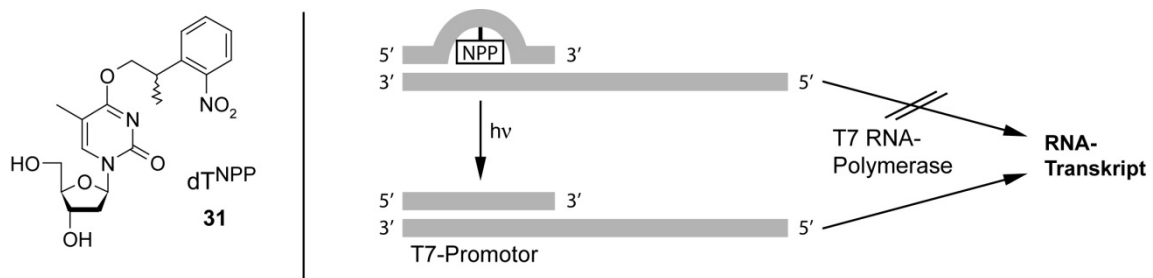


Abb. 9: Lichtinduzierte Transkription nach Heckel *et al.*<sup>[39]</sup>

Heckel *et al.* modifizierten 2005 die O<sup>4</sup>-Position von Thymidin mit verschiedenen photolabilen Schutzgruppen. Durch Synthese der entsprechenden Phosphoramidite konnten die photolabil geschützten Thymidinderivate in DNA eingebaut werden. In Schmelzpunktstudien zeigte sich, dass dadurch eine deutliche Duplexdestabilisierung erreicht werden konnte. Die photolabil geschützten Nukleotide können im Prinzip wie temporäre Fehlpaarungen aufgefasst werden. Heckel *et al.* konnten in dieser Studie ebenfalls zeigen, dass durch Einbau eines O<sup>4</sup>-NPP-modifizierten Thymidins in einen T7-Promotor eine Transkription der entsprechenden DNA verhindert werden konnte. Durch Belichten konnte die Transkriptionsaktivität vollständig wiederhergestellt werden.<sup>[39]</sup> (Abb. 9) Die Tatsache, dass bereits eine photolabile Schutzgruppe an der richtigen Stelle ausreichte, um die Transkription vollständig zu unterbinden, demonstriert eindrucksvoll die Stärke dieses rationalen Ansatzes. Ein Jahr später wurde von Heckel *et al.* eine Studie vorgestellt, in der durch gezielten Einbau photolabiler Schutzgruppen an entscheidender Stelle eine lichtaktivierbare siRNA erhalten wurde, die vor der Bestrahlung keine Aktivität aufwies. Durch Belichten konnte die RNA-Interferenzaktivität vollständig regeneriert werden.<sup>[40]</sup>

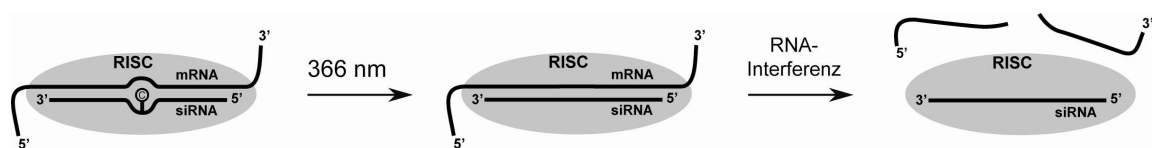


Abb. 10: lichtaktivierbare siRNA nach Heckel und Mikat.<sup>[40]</sup> © = photolabile Schutzgruppe.

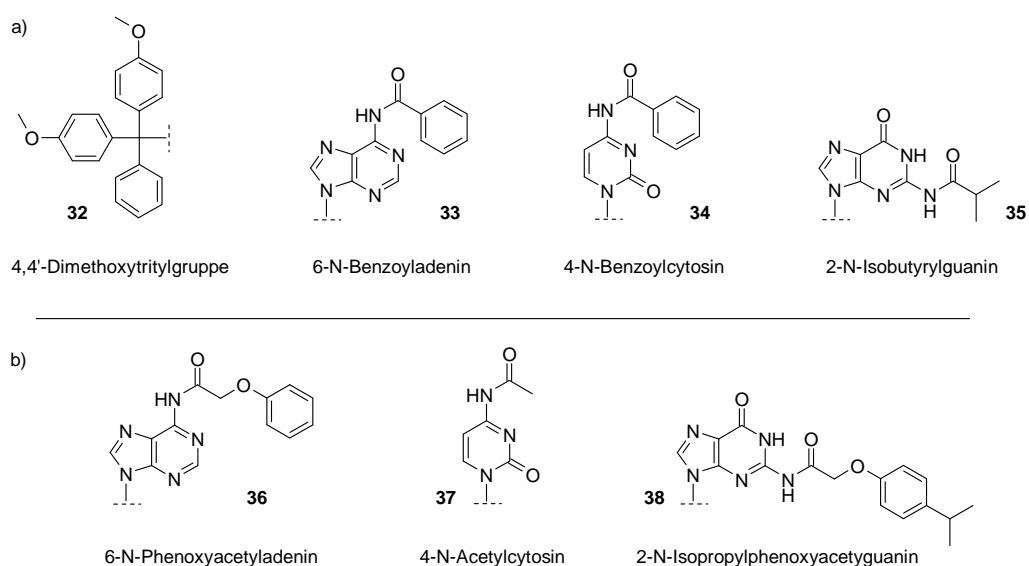
Auch andere Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Entwicklung lichtaktivierbarer Nukleinsäuren, deren Nukleobasen mit photolabilen Schutzgruppen modifiziert sind. Die Arbeitsgruppen Schwalbe und Pitsch verwendeten ein O<sup>6</sup>-NPE-geschütztes Guanosinderivat um eine bistabile RNA in einer der beiden möglichen Konformationen zu stabilisieren.<sup>[41]</sup> Durch Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe konnte sich der Gleichgewichtszustand wieder einstellen. Dieses System wurde verwendet um die RNA-Faltungskinetik mittels NMR-Spektroskopie zu verfolgen. Diese Technologie

wurde von Silverman *et al.* weiterentwickelt und führte zu einem kompletten Satz an der Nucleobase photolabil geschützter RNA-Nucleotidvorläufer.<sup>[42]</sup> Diese dienten ebenfalls dazu RNA-Faltungskinetiken zu messen. Dmochowski *et al.* verwendeten ein photolabil geschütztes Cytidinderivat dessen photolabile Schutzgruppe zusätzlich mit einem Fluoreszenz-Quencher versehen war.<sup>[43]</sup> Dieses Nucleotid wurde in ein DNA-Oligonucleotid in unmittelbarer Nachbarschaft eines fluoreszenzmarkierten Nucleotids eingebaut. Dadurch kann der Entschützungsprozess optisch verfolgt werden. Mit diesem System konnte eine Primer-Verlängerungsreaktion durch eine DNA-Polymerase mit Licht induziert werden. Die Arbeitsgruppe Deiters entwickelte die 6-Nitropiperonyloxymethylgruppe (NPOM).<sup>[44]</sup> Durch Einbau von N<sup>1</sup>-NPOM-geschütztem Desoxyguanosin in einem DNAzym mit Peroxidaseaktivität konnte dessen Reaktivität lichtabhängig induziert werden.<sup>[45]</sup> Mit Hilfe von NPOM-geschütztem Thymidin konnten Deiters *et al.* ein lichtaktivierbares Antisensenucleotid synthetisieren und dessen lichtinduzierbare Wirkung auf die Expression eines Reportergens demonstrieren.<sup>[46]</sup>

## 1.2 Oligonukleotid-Festphasensynthese

Die moderne, automatisierte Oligonukleotid-Festphasensynthese ermöglicht es, kurze DNA- bzw. RNA-Einzelstränge aus bis zu 200 Nukleotiden mit beliebiger Sequenz herzustellen. Dadurch werden moderne biochemische Methoden wie z.B. die PCR (Polymerasekettenreaktion) erst möglich, da sie auf die Verfügbarkeit von synthetisch hergestellten Primern angewiesen sind. Darüber hinaus lassen sich modifizierte Oligonukleotide herstellen, die in der Natur nicht vorkommen, solange die Modifikation mit den Synthesebedingungen kompatibel ist.<sup>[47]</sup>

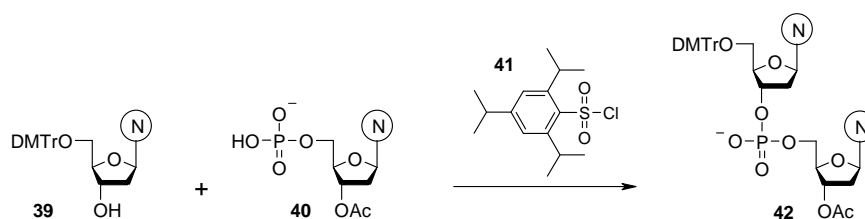
Für das Gelingen dieser Technik waren zwei Entdeckungen von Entscheidender Bedeutung: Khorana führte die 4,4'-Dimethoxytritylgruppe **32** als orthogonale Schutzgruppe für die 5'-OH-Gruppe der verwendeten Nucleotidbausteine ein, so dass nach erfolgreicher Verknüpfung zweier Nucleotide in Lösung selektiv das 3'-Ende oder das 5'-Ende entschützt und für die Verknüpfung mit einem weiteren Nucleotid verwendet werden konnte.<sup>[48]</sup> Dadurch wurde ein sukzessiver Aufbau beliebiger Sequenzen ermöglicht. Die zweite wichtige Errungenschaft war die Adaption der von Merrifield entwickelten Festphasensynthese für die Herstellung von Oligonucleotiden durch Letsinger *et al.*<sup>[49]</sup>



**Abb. 11:** a) Dimethoxytritylschutzgruppe für die 5'-OH-Gruppe und Schutzgruppen für die exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen;<sup>[50]</sup> b) Schutzgruppen der Ultramild-Strategie nach Schulhof *et al.*<sup>[51]</sup>

Die Bindungsknüpfung zwischen zwei Nucleotiden erfolgt durch einen nukleophilen Angriff entweder der 3'-OH-Gruppe oder der 5'-OH-Gruppe des einen Reaktionspartners auf ein entsprechendes elektrophiles Phosphat- oder Phosphit-Derivat des anderen Reaktionspartners. Dabei muss ausgeschlossen werden, dass andere funktionelle Gruppen der Nucleotidbausteine mit nukleophilem Charakter, wie die exozyklischen Aminogruppen der Basen Adenin, Cytosin und Guanin, zu Nebenreaktionen führen. Dazu werden diese Aminofunktionen mit speziellen Schutzgruppen

versehen, die nach erfolgter Oligonukleotidsynthese mit Ammoniak bzw. Methylamin wieder abgespalten werden können.<sup>[52]</sup> In Abb. 11 a) sind die für die Nucleobasen typischerweise verwendeten Schutzgruppen gezeigt: Die Benzoylgruppe im Falle von Adenin (**33**) und Cytosin (**34**) und die Isobutyrylgruppe für Guanin (**35**). Die Isobutyrylgruppe auf der N<sup>2</sup>-Position von Guanin ist dabei am stabilsten und bestimmt die für die Abspaltung der Schutzgruppen mit Ammoniak oder Methylamin benötigten Bedingungen, meist mehrere Stunden bei erhöhter Temperatur in konzentrierter wässriger Ammoniaklösung.<sup>[50]</sup> Möchte man modifizierte Nucleotidbausteine für die Synthese verwenden, deren Modifikationen unter diesen relativ energischen Abspaltbedingungen nicht stabil sind, so stellen die von Schulhof *et al.*<sup>[51]</sup> vorgestellten, sogenannten ultramilden Schutzgruppen eine interessante Alternative dar. Die entsprechenden Strukturen von N<sup>6</sup>-Phenoxyacetyladenin **36**, N<sup>4</sup>-Acetylcytosin **37** und N<sup>2</sup>-Isopropylphenoxyacetylguanin **38** sind in Abb. 11 b) dargestellt. Diese ultramilden Schutzgruppen können in konzentrierter Ammoniaklösung bei Raumtemperatur innerhalb von 2 Stunden abgespalten werden. Noch mildere Abspaltreagenzien stellen z.B. 0,05 M Kaliumcarbonat in Methanol<sup>[53]</sup> oder *tert*-Butylamin in einem Methanol/Wasser-Gemisch dar.<sup>[54]</sup> Für die Knüpfung der Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nucleotiden wurden im Laufe der Zeit verschiedene Methoden entwickelt. (Abb. 12). Khorana *et al.* stellten 1957 die *Phosphodiester*-Methode vor, die darauf beruht, dass ein 5'-geschütztes Desoxyribonucleosid (**39**) mit einem 3'-geschützten Desoxyribonucleosid-5'-phosphat (**40**) zur Reaktion gebracht wurde.<sup>[55]</sup> Als Kupplungsreagenz diente neben DCC oder Tosyl-Cl das 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS-Cl) **41**.<sup>[56]</sup> Einen Nachteil dieser Methode stellen die ungeschützten Phosphodiestergruppen dar, die im Verlauf der Oligonucleotidsynthese zu unerwünschten Nebenreaktionen führen können. Dennoch gelang Khorana durch blockweise Synthese der Aufbau längerer DNA-Sequenzen.<sup>[57]</sup>

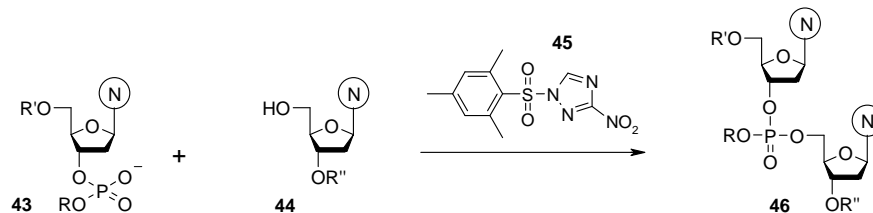


**Abb. 12: Die Phosphodiestermethode nach Khorana *et al.***<sup>[56]</sup>

Bei der *Phosphotriester*-Methode wird ein Nucleosid-Phosphat verwendet, dessen Phosphatgruppe eine zusätzliche Schutzgruppe aufweist. Die entstehenden Phosphotriester sind vor Nebenreaktionen geschützt, wodurch mit dieser Methode höhere Kupplungseffizienzen erreicht werden können. Als Schutzgruppen für die Phosphodiesterbindung wurde die 2,2,2-Trichlorethylgruppe und verschiedene Arylgruppen getestet.<sup>[58]</sup> Letsinger *et al.* untersuchten auch die Eignung der 2-Cyanoethylgruppe.<sup>[49,59]</sup> Diese erwies sich allerdings als zu labil für die Oligonucleotidsynthese in Lösung. Bei der modernen Oligonucleotidfestphasensynthese ist sie jedoch die Schutzgruppe der Wahl. Als effektives Kupplungsreagenz für die *Phosphotriester*-methode leistet das 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-

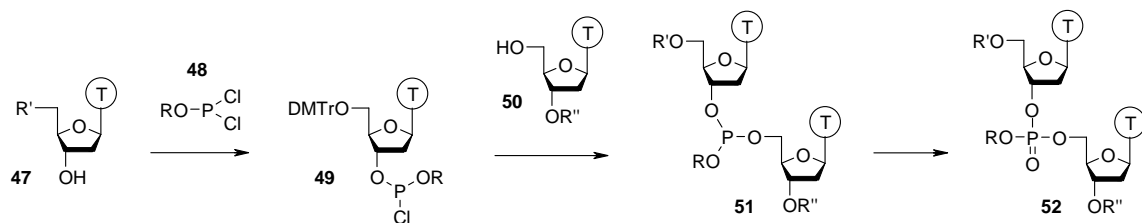


1,2,4-1*H*-triazol (MSNT, *Reese*-Reagenz) **45** gute Dienste.<sup>[60,61]</sup> Beobachtete Nebenreaktionen sind zum einen in geringem Maße die Reaktion der freien OH-Gruppe mit dem Kupplungsreagenz. Schwerer wiegt die Tatsache, dass die O<sup>6</sup>-Position des Desoxyguanosins sowohl empfindlich für eine Phosphorylierung, als auch für eine Substitution durch Nitrotriazol ist.<sup>[52]</sup>



**Abb. 13: Die Phosphotriestermethode nach Reese *et al.***<sup>[60]</sup>

Die *Phosphitriester*-Methode kann als Vorläufer der *Phosphoramidit*-Methode angesehen werden. Letsinger und Lunsford entdeckten, dass Phosphor-(III)-Acylierungsreagenzien deutlich reaktiver waren als die entsprechenden Phosphor-(V)-Derivate. Ein 5'-geschütztes Thymidinderivat (**47**) wurde dazu mit 2-Chlorphenylphosphorodichloridit **48** zum entsprechenden Phosphorochloridit **49** umgesetzt. Dieses wurde anschließend mit einem 3'-geschützten Thymidinderivat (**50**) zur Reaktion gebracht, wobei der Phosphitriester **51** entstand. Im Anschluss erfolgte die Oxidation des Phosphits zum Phosphat (**52**) mit wässriger Iodlösung. Durch die hohe Reaktivität des Phosphitylierungsreagenzes entstand bei dieser Methode nicht nur das gewünschte 3'-5'-Produkt, sondern darüber hinaus die beiden Homodimere mit 3'-3'- und 5'-5'-Verknüpfung.<sup>[62]</sup>



**Abb. 14: Die Phosphitriestermethode nach Letsinger *et al.***<sup>[62]</sup>

Die *Phosphitriester*-Methode wurde von Beaucage und Caruthers zur *Phosphoramidit*-Methode weiterentwickelt.<sup>[63]</sup> Heute wird zur Phosphitylierung z.B. das Reagenz Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit eingesetzt. Durch die unterschiedliche Reaktivität der Abgangsgruppen Chlorid bzw. der Diisopropylaminogruppe, kann zunächst das 3'-Phosphoramidit eines beliebigen Nukleotids hergestellt und isoliert werden. Die erhaltenen Phosphoramidite (**53**) sind relativ stabil und können als Feststoff gelagert werden. Die eigentliche Kondensationsreaktion wird durch eine schwache Säure katalysiert. Als solche werden vorwiegend verschiedene Tetrazolderivate eingesetzt.<sup>[64]</sup> Durch diese wird die Diisopropylgruppe zunächst protoniert und dadurch in eine gute Abgangsgruppe überführt. Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff durch das Tetrazolid. Der

entstehenden Aktivester (**55**) kann leicht mit der freien 5'-OH-Gruppe eines Nucleotids oder einer Oligonucleotidkette reagieren. Anschließend erfolgt die Oxidation des Phosphits (**57**) zum Phosphat (**58**). Die Phosphoramidit-Methode liefert sehr hohe Kupplungsausbeuten (> 98 %) und ermöglicht dadurch die Synthese relativ langer Oligonucleotide.<sup>[47]</sup>

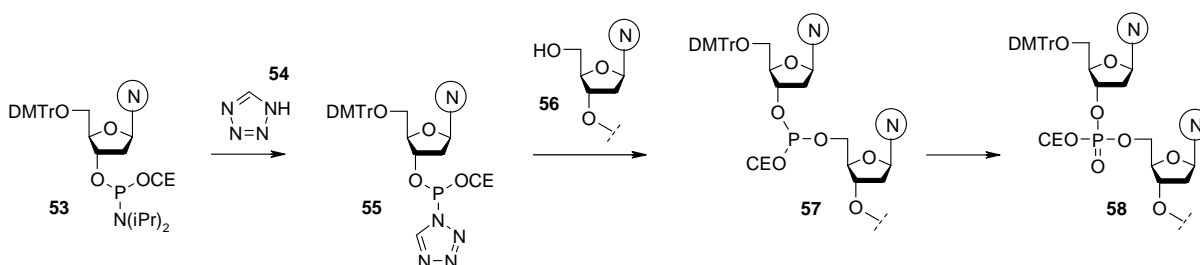


Abb. 15: Die Phosphoramiditmethode (CE = Cyanoethyl).

Die *H*-Phosphonat-Methode wurde zum ersten Mal von Todd *et al.*<sup>[65]</sup> in Lösung beschrieben und später von Matteuci *et al.*<sup>[66]</sup> und Garegg *et al.*<sup>[67]</sup> für die Oligonucleotidfestphasensynthese adaptiert. Die *H*-Phosphonatmethode ist vorwiegend für die Festphasensynthese geeignet, da die gebildeten *H*-Phosphonatester relativ hydrolyseempfindlich sind.<sup>[47]</sup> In *H*-Phosphonaten hat der Phosphor die Oxidationsstufe +3 und weist eine Koordinationszahl von 4 auf. Das 3'-*H*-Phosphonat eines Nucleosids (**59**) wird mit Pivaloylchlorid (**60**) in ein gemischtes Anhydrid (**61**) überführt, welches mit der freien 5'-OH-Gruppe eines festphasengebundenen Nucleotids (**62**) zum *H*-Phosphonatester (**63**) reagiert.<sup>[66]</sup> Eine Oxidation ist zwischen den Kupplungsschritten nicht erforderlich. Erst nach vollständiger Synthese wird die Oxidation aller Phosphonatestergruppen zu Phosphodiestergruppen in einem Schritt durchgeführt. Bei der Aktivierung des *H*-Phosphonats mit Pivaloylchlorid müssen die Reaktionsparameter exakt aufeinander abgestimmt sein, da es sonst zu zweifacher Acylierung kommen kann. Diese Nebenreaktion tritt aufgrund der sterischen Abschirmung durch die 2'-O-Schutzgruppe in deutlich geringerem Maße bei der RNA-Oligonucleotidsynthese auf. Daher eignet sich die *H*-Phosphonatmethode gut für die RNA-Synthese, vor allem, weil der Kondensationsschritt ähnlich schnell und effektiv verläuft wie im Falle der DNA-Synthese.<sup>[47]</sup>

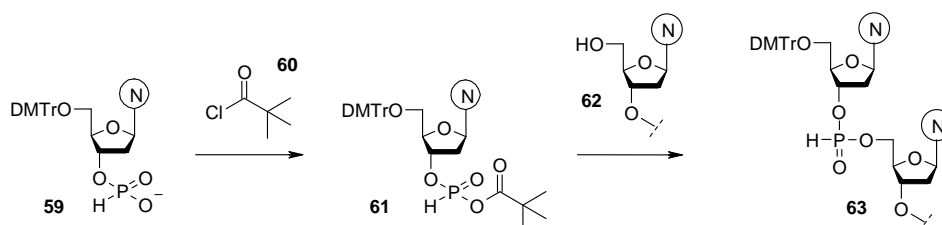
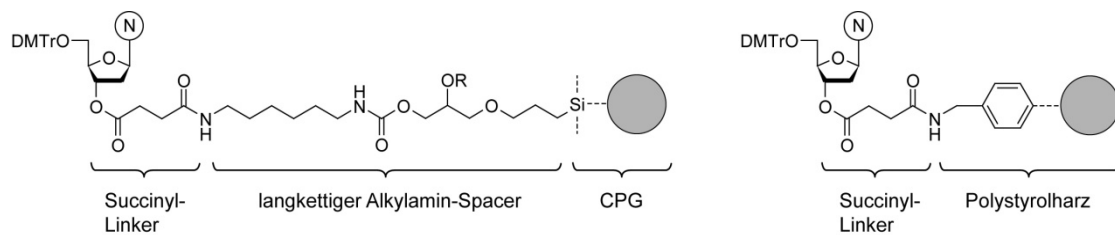


Abb. 16: Die *H*-Phosphonatmethode

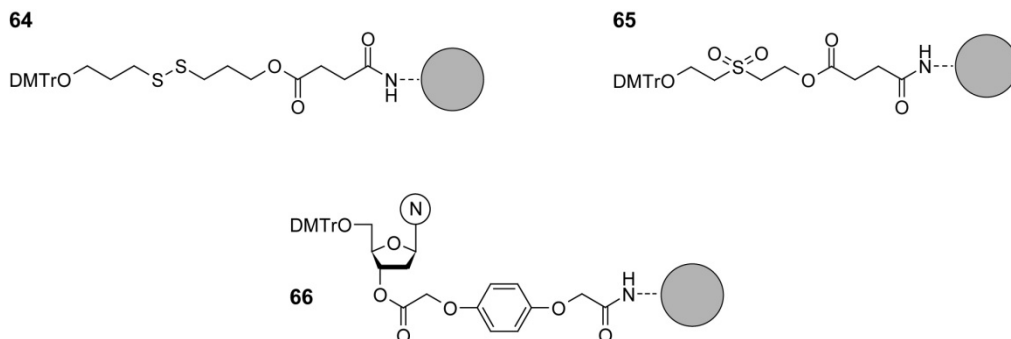
In der automatisierten Oligonucleotid-Festphasensynthese wird das erste Nucleotid über die 3'-OH-Gruppe an die feste Phase gebunden. Im Gegensatz zur natürlichen Nucleinsäuresynthese durch

Polymerasen verläuft die künstliche Nukleinsäurefestphasensynthese in 3'-5'-Richtung. Als Trägermaterial dient meist „Controlled Pore Glas“ (CPG)<sup>[68]</sup> oder stark quervernetztes Polystyrol.<sup>[69]</sup> Da diese Materialien keine Quelleigenschaften besitzen, garantieren sie die Zugänglichkeit der Synthesestellen für die Synthesereagenzien bei verschiedenen verwendeten Lösungsmitteln. Die maximal mögliche Länge der Oligonukleotide wird durch die Porengröße der Materialien und damit dem Platz, der den wachsenden Nukleinsäureketten zur Verfügung steht, definiert. Das meistens verwendete CPG-Material mit einer Porengröße von 500 Å lässt z.B. eine Länge von ca. 60 Nukleotiden zu. Danach sinken die Kupplungsausbeuten stark ab.



**Abb. 17: Anknüpfung des ersten Nukleotidbausteins an CPG bzw. Polystyrol.<sup>[47]</sup>**

Das Festphasenmaterial wird zunächst an der Oberfläche derivatisiert um bestimmte funktionelle Gruppen zur Verfügung zu stellen. Die Anknüpfung des ersten Nukleotids erfolgt meistens über einen Succinyl-Linker, der nach erfolgter Synthese bei der basischen Aufarbeitung gespalten wird (Abb. 17). Es können auch spezielle Verknüpfungen verwendet werden, die bei der Aufarbeitung das Oligonukleotid mit einer bestimmten Modifikation am 3'-Ende freisetzen, zum Beispiel mit einer Thiolgruppe<sup>[70]</sup> (**64**) oder einem Phosphat<sup>[71]</sup> (**65**). Erwähnenswert ist auch noch die Anknüpfung des Oligonukleotids über den auf Hydrochinon basierenden, sogenannten Q-Linker (**66**), der mit Ammoniak bereits innerhalb weniger Minuten vollständig gespalten wird und auch mit milderen Abspaltungsreagenzien verwendet werden kann.<sup>[72]</sup> Er eignet sich daher bestens für die Verwendung mit den ultramilden Schutzgruppen für die exozyklischen Aminofunktionen.



**Abb. 18: Oben: Über die Wahl der verwendeten Linker zum Festphasenmaterial ist eine 3'-Derivatisierung des Oligonukleotids möglich.<sup>[70,71]</sup> Unten: Der sogenannte Q-Support ist unter sehr milden Bedingungen spaltbar.<sup>[72]</sup>**

In Abb. 19 ist ein typischer Synthesesyklus für die Oligonukleotidsynthese nach der Phosphoramidit-Methode gezeigt. Der Zyklus beginnt mit der Abspaltung der Dimethoxytritylgruppe von der 5'-OH-Gruppe des ersten, mit der festen Phase verbundenen Nucleosids. Dazu wird eine verdünnte Lösung von Dichloressigsäure in Dichlormethan verwendet. Durch die starke Farbigkeit des Tritylkations kann dieses zur fotometrischen Bestimmung der Kopplungsausbeute (ab dem zweiten Nucleotid) verwendet werden. Daneben findet auch eine konduktometrische Bestimmung der Tritylkonzentration Verwendung. Beim nächsten Schritt handelt es sich um die Verknüpfung der nun freien 5'-OH-Gruppe der festphasengebundenen Nucleotidkette mit dem Phosphoramidit des nächsten einzubauenden Nucleotidvorläufers. Dazu wird die entsprechende Phosphoramiditlösung zusammen mit einer Lösung des Aktivators (z.B. Ethylthiotetrazol) vermischt und zur festen Phase transportiert.

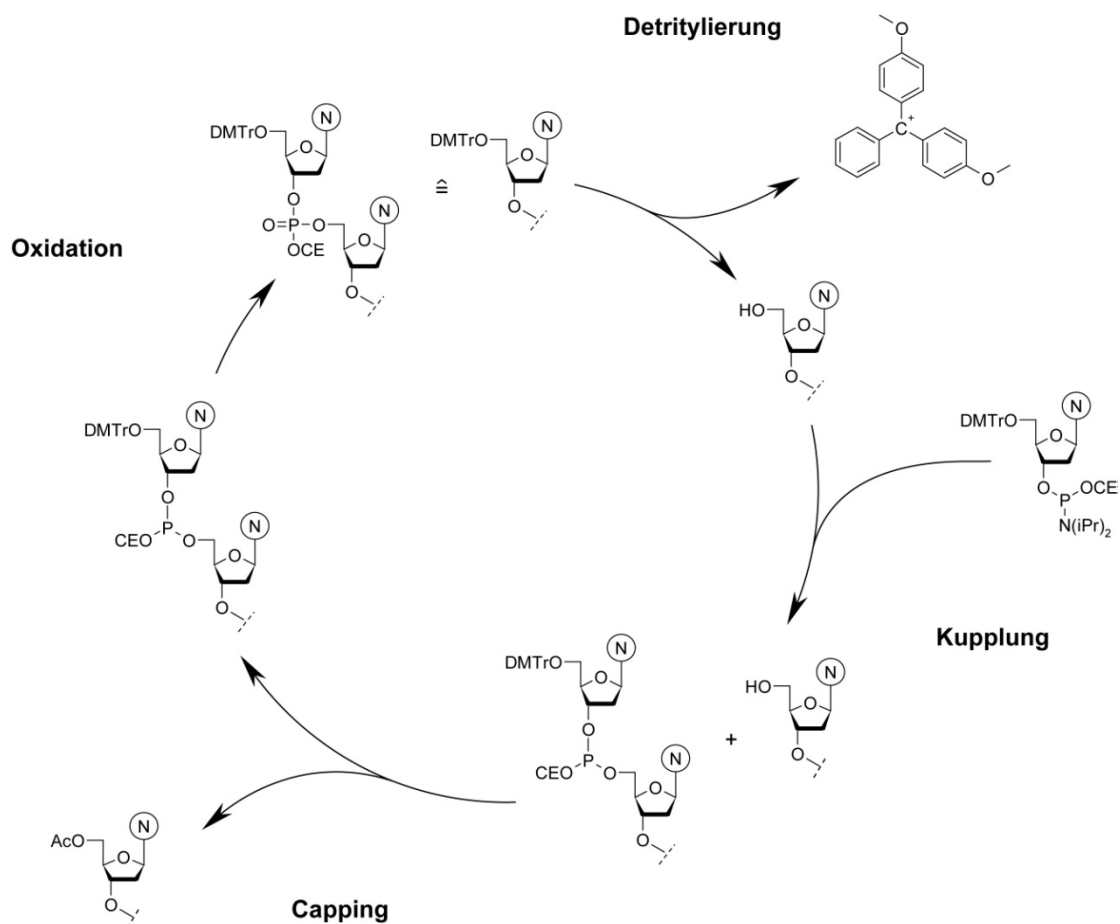


Abb. 19: Synthesesyklus der Phosphoramiditmethode

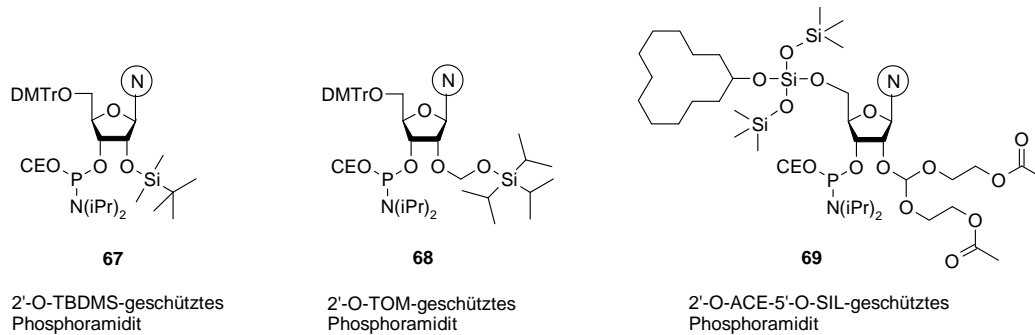
Im Anschluss erfolgt ein sogenannter Capping-Schritt, bei dem alle nicht abgereagten 5'-OH-Gruppen mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von 1-Methylimidazol acetyliert werden, um eine Verlängerung der (n - 1)-Nucleotidketten im anschließenden Synthesesyklus zu verhindern. Wird mit ultramilden Schutzgruppen gearbeitet, ist es notwendig das entsprechende Säureanhydrid im Capping-Schritt zu verwenden, da sonst unter den Capping-Bedingungen eine Umacylierung an den exozyklischen Aminofunktionen stattfinden kann. Im letzten Schritt erfolgt die Oxidation des neugebildeten

Phosphitriesters zum Phosphotriester. Als Oxidationsmittel dient eine Lösung von Iod in einer Mischung aus Pyridin und Wasser. Dieser Syntheszyklus wird mit den Phosphoramiditen der gewünschten Nukleotide so oft wiederholt, bis das entsprechende Oligonukleotid vollständig synthetisiert ist. Im Anschluß an die Synthese erfolgt die Aufarbeitung in konzentrierter, wässriger Ammoniaklösung oder in einer wäßrigen oder ethanolischen Lösung von Methylamin. Dadurch wird zum einen der Succinyllinker gespalten und das Oligonukleotid von der festen Phase getrennt. Die Cyanoethylschutzgruppen der Phosphodiesterbrücken werden ebenfalls über einen  $\beta$ -Eliminierungsmechanismus abgespalten. Die längste Reaktionszeit erfordert die Entschützung der exozyklischen Aminogruppen insbesondere des Guanosins. Verzichtet man nach der letzten Kupplung auf die Abspaltung der Tritylgruppe und damit auf die Ausbeutebestimmung, erreicht man, dass nur das Vollängenprodukt eine Tritylgruppe trägt. Die Abbruchsequenzen dagegen tragen durch den Capping-Schritt eine Acetylgruppe am 5'-Ende. Durch den damit verbundenen Polaritätsunterschied ist eine bequeme Aufreinigung des gewünschten Produkts über Umkehrphasen-HPLC möglich. Im Anschluss kann die Tritylgruppe in essigsaurer Lösung abgespalten werden.

Bei der Synthese von RNA-Oligonukleotiden besteht die zusätzliche Notwendigkeit, die 2'-OH-Gruppe mit einer orthogonalen Schutzgruppe auszustatten, um einerseits während der RNA-Synthese eine ungewollte Verzweigung der Nukleotidkette an den 2'-OH-Gruppen zu vermeiden. Andererseits muss die gewählte Schutzgruppe auch unter den Bedingungen der basischen Aufarbeitung stabil sein, um die RNA nicht einer basenkatalysierten Hydrolyse auszuliefern. Meistens wird heutzutage die *tert*-Butyldimethylsilylgruppe (TBDMS) verwendet (67).<sup>[73]</sup> Diese Silylgruppe ist unter den Synthesebedingungen ausreichend stabil und widersteht auch der basischen Aufarbeitung. In einem zusätzlichen Aufarbeitungsschritt kann die TBDMS-Gruppe mit Hilfe von Fluoridionen entfernt werden (z.B. in Form einer Tetrabutylammoniumfluoridlösung in THF). Die TBDMS-Gruppe hat allerdings den Nachteil, dass sie sterisch sehr anspruchsvoll ist, und daher die Effizienz der Kupplungsreaktion herabsetzt, was zu längeren Kupplungszeiten und schlechteren Ausbeuten führt. Eine Alternative wurde von der Arbeitsgruppe Pitsch in Form der Triisopropylsilyloxymethylgruppe (TOM) entwickelt (68).<sup>[38]</sup> Die TOM-Gruppe ermöglicht bessere Kupplungsausbeuten und kürzere Reaktionszeiten und wird ebenfalls durch Fluorid-Ionen abgespalten.

Einen völlig anderen Ansatz stellt die Verwendung der *Bis*-(2-Acetoxyethoxy)methylgruppe (ACE) dar, die von Scaringe *et al.*<sup>[74]</sup> vorgestellt wurde (69). Dabei handelt es sich um einen Orthoester der Ameisensäure, der unter leicht sauren Bedingungen hydrolysiert werden kann. Daher eignet sich die ACE-Gruppe nicht für die normale Schutzgruppenstrategie der Phosphoramidit-Methode, bei der die 5'-O-Dimethoxytritylgruppe während der Oligonukleotidsynthese sauer abgespalten wird. Für die Schützung der 5'-OH-Gruppe musste eine orthogonale Schutzgruppe gefunden werden. In ihrer Originalveröffentlichung identifizierten Scaringe *et al.* die Cyclododecyloxy-*bis*-(trimethylsilyloxy)silylgruppe (SIL) als geeignete Schutzgruppe, die mit einer

Triethylammoniumfluorid-Lösung abgespalten wird. In den *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Vol.1, Kapitel 2.10* wird für die Schätzung der 5'-OH-Gruppe die ähnliche Benzhydroxy-*bis*(trimethylsilyloxy)silylgruppe verwendet.



**Abb. 20: Verschiedene Schutzgruppen für die 2'-OH-Gruppe für die RNA-Festphasensynthese.**

Die Besonderheit der ACE-Gruppe liegt darin, dass die Acetylgruppen bei der basischen Aufarbeitung abgespalten werden. Dadurch wird die ACE-Gruppe deutlich empfindlicher gegenüber leicht sauren Bedingungen. Durch die beiden Hydroxygruppen der ACE-Gruppe ist allerdings auch das 2'-O-ACE-geschützte RNA-Oligonukleotid wasserlöslich und kann über Anionenaustausch-HPLC aufgereinigt werden. Eine Lagerung der RNA kann im geschützten Zustand erfolgen, dadurch ist die RNA vor Hydrolyse und vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Die Abspaltung der ACE-Gruppe kann dann unmittelbar vor Verwendung der RNA in leicht saurem Puffer (pH = 3,8) durchgeführt werden.

## 1.3 Transport von Nukleinsäuren in lebende Zellen

Will man biologische Vorgänge künstlich durch bestimmte Wirkstoffe beeinflussen, so ist es entscheidend, dass der Wirkstoff in ausreichender Menge zu seinem Bestimmungsort gelangt. Für polare, oder sogar geladene Moleküle stellt die Lipiddoppelschicht der Zellmembran ein fast unüberwindliches Hindernis dar. Beschäftigt man sich mit der Entwicklung von Wirkstoffen, so wird man Strukturen den Vorzug geben, die zwar noch ausreichend wasserlöslich sind, die aber die Zellmembran durch passive Diffusion überwinden können. Für bestimmte, eventuell auch in der Natur vorkommende Moleküle, die man künstlich zur Beeinflussung von biologischen Systemen verwenden möchte, ist die Struktur bereits vorgegeben, und man muss einen Weg finden, diese Moleküle durch die Zellmembran zu transportieren, ohne durch eventuell vorgenommene Modifikationen ihre biologische Wirksamkeit nachteilig zu beeinflussen. Das Problem der hohen Polarität und dadurch geringen Membrangängigkeit trifft auch insbesondere auf Nukleinsäuren zu, die durch ihr Phosphodiesterückgrat unter physiologischen Bedingungen eine stark negative Ladung aufweisen. Um synthetische, eventuell modifizierte Nukleinsäuren dennoch ins Zytoplasma zu transportieren, wurden verschiedene Methoden entwickelt, von denen die wichtigsten im Folgenden kurz beschrieben sind. Einige dieser Methoden eignen sich aufgrund ihrer relativ starken zellschädigenden Wirkung nur für die Anwendung in Zellkultur. Während einige Transfektionsmethoden speziell auf den Transport von Nukleinsäuren zugeschnitten sind, eignen sich andere darüber hinaus auch für den Transport anderer Verbindungen bis hin zu kleinen organischen Wirkstoffmolekülen.

Eine weit verbreitete Transfektionsmethode stellt die Nutzung viraler Vektoren dar. Dafür muss die zu transfizierende Sequenz in das virale Genom kloniert werden. Aus diesem Grund eignen sich virale Vektoren nicht zur Transfektion von kurzen, synthetisch hergestellten, chemisch modifizierten Oligonukleotiden, z.B. photolabil geschützten Nukleinsäuren, da die eigentlich wirksame Nukleinsäure (z.B. mRNA oder siRNA) erst in der Zelle durch Transkription hergestellt wird.

### 1.3.1 Mechanische Methoden

#### **Mikroinjektion**

Bei der Mikroinjektion wird eine geringe Menge der nukleinsäurehaltigen Lösung über eine dünne Glaskapillare direkt in die Zelle bzw. den Zellkern gespritzt. Ein Vorteil der Methode ist, dass auch mitotisch ruhende Zellen transfiziert werden können, da die DNA direkt in den Zellkern gespritzt werden kann, wodurch die Kernmembran überwunden wird. Wird die Injektion zum Zeitpunkt des Einzellstadiums der Embryonalentwicklung eines Modellorganismus, wie zum Beispiel Zebrafischen, durchgeführt, kann eine Verteilung der injizierten Nukleinsäure im gesamten Gewebe des

entstehenden Embryos erreicht werden.<sup>[35]</sup> In Analogie dazu ist auch eine Injektion zum Zeitpunkt des synzytialen Stadiums von Insekteneiern mit dem gleichen Ziel denkbar.

Nachteile der Mikroinjektion sind der relativ große technische Aufwand und die geringe Menge an Zellen, die in einer bestimmten Zeit transfiziert werden können.<sup>[75]</sup>

### **Beschuss (particle delivery)**

Ursprünglich wurde die Genkanone für die Transfektion von Pflanzenzellen entwickelt, da die Zellwand der Pflanzenzellen mit anderen Transfektionsmethoden kaum zu durchdringen ist. Die zu transfizierende DNA/RNA wird dazu auf winzige Wolfram- oder Goldpartikel aufgebracht und diese werden, beschleunigt durch Treibgas wie zum Beispiel Helium, mit hoher Geschwindigkeit auf die Zellen geschossen.<sup>[76]</sup> Die Transfektion durch Beschuss kann aber auch auf andere als pflanzliche Zellen, sowohl in Zellkultur als auch am lebenden Tier angewendet werden. Die Eindringtiefe ist allerdings nicht besonders hoch, so dass sich dieses System vorwiegend zur oberflächlichen Transfektion wie zum Beispiel der Haut eignet.<sup>[77]</sup> Bemerkenswert ist die Möglichkeit mit dieser Methode auch Zellorganellen wie Chloroplasten oder Mitochondrien zu transfizieren.<sup>[78]</sup>

## **1.3.2 Diffusion**

### **Elektroporation**

Durch Anlegen eines hohen elektrischen Feldes (einige kV) können sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Zellen mit DNA transfiziert werden.<sup>[79]</sup> Dabei ist eine gewisse Feldstärke notwendig, um initial Porenbildung in der Zellmembran zu induzieren. Ergänzt man diesen ersten Puls hoher Feldstärke durch einen weiteren Puls niedrigerer Feldstärke, lässt sich die Transfektionseffizienz deutlich erhöhen, was für einen elektrophoretischen Transport der DNA in die Zellen spricht. Die DNA ist bei diesem Prozess vermutlich aktiv an der Bildung bzw. Erweiterung der initialen Poren beteiligt, da eine Zugabe der DNA nach erfolgtem ersten Puls nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz lieferte.<sup>[80]</sup> Die entstandenen Poren sind bis zu einigen Minuten stabil. Da bei der Elektroporation bis zu 50 % der Zellen lysieren, ist dieses Verfahren lediglich für die Anwendung in Zellkultur geeignet, bietet dort aber eine sehr effektive und relativ einfache Möglichkeit der Transfektion.<sup>[75]</sup>

### **Hydrodynamische Injektion**

Hydrodynamische Injektion beschreibt die Injektion eines großen Volumens nukleinsäurehaltiger isotonischer Lösung innerhalb kurzer Zeit und mit hohem Druck. Ursprünglich wurde bei Injektionen von Plasmid-DNA-haltiger Lösung in die Pfortader der Leber in Mäusen entdeckt, dass durch dieses



Verfahren die unmodifizierte DNA in die Leberzellen aufgenommen wurde.<sup>[81]</sup> Inzwischen wird dieses Verfahren in vereinfachter Form angewandt, indem die nukleinsäurehaltige Lösung über die Schwanzvene der Mäuse bzw. Ratten injiziert wird.<sup>[82]</sup> Das Volumen der Injektionslösung beträgt dabei ca. 10 % des Gewichts des Versuchstiers und wird innerhalb von ca. 5 Sekunden appliziert. Erstaunlicherweise wird mit diesem Verfahren hauptsächlich eine Transfektion der Leberzellen erreicht. Neben plasmidischer DNA wurden auf diese Weise auch siRNA, Peptide, Proteine und sogar ganze T7-Phagen in Leberzellen eingeschleust.<sup>[83]</sup> Der Mechanismus der Aufnahme ist noch nicht geklärt. Es wird sowohl die Entstehung von Endosomen durch den hydrostatischen Druck in Betracht gezogen, die instabil sind und in der Zelle zerfallen und ihren (eventuell nukleinsäurehaltigen) Inhalt ins Zytoplasma abgeben. Daneben wird auch über die Entstehung transienter Poren in der Zellmembran diskutiert.<sup>[84]</sup> Um die hydrodynamische Injektion auch für größere Säugetiere nutzbar zu machen, wurde eine computergesteuerte Injektionsapparatur entwickelt, die in Echtzeit den Druck innerhalb des punktierten Gefäßes misst und diesen als Steuersignal für die Injektionsgeschwindigkeit verwendet. Durch die vorübergehende Blockierung bestimmter Blutgefäße mit Kathetern konnten in Schweinen gezielt bestimmte Organe adressiert werden.<sup>[85]</sup>

### 1.3.3 Fusion mit der Zellmembran

#### Liposomen

Liposomen sind ein interessantes Werkzeug zur Transfektion. Der wässrige Innenraum des Liposoms entspricht topologisch dem Zytoplasma. Fusioniert ein Liposom mit der Zellmembran, so wird die eingeschlossene wässrige Phase und die in ihr gelösten Substanzen in das Zytoplasma abgegeben. Stellt man die Liposomen in einer nukleinsäurehaltigen Lösung her, so wird ein Teil der Nukleinsäurelösung in den Liposomen eingeschlossen und kann durch Fusion der Liposomen mit der Zellmembran in die Zelle eingeschleust werden. Enthält die Membran des Liposoms bestimmte Lipide, die eine positiv geladene polare Kopfgruppe tragen, kann die Wahrscheinlichkeit einer Fusion erhöht werden. Zusätzlich können die Liposomen mit Antikörper tragenden Lipiden ausgestattet werden, die die Akkumulation und damit auch die Transfektionseffizienz in einem bestimmten Gewebe erhöhen. Eine Modifikation der Liposomen mit einer Polyethylenglykolhülle kann die Zirkulationsdauer im Blutkreislauf erhöhen. Vorteile von Liposomen sind zum einen die gute biologische Verträglichkeit, darüber hinaus aber auch die Tatsache, dass die zu transfizierende Beladung (z.B. RNA) innerhalb der Liposomen vor Einflüssen des umgebenden Mediums geschützt sind. Die Herstellung von nukleinsäurehaltigen Liposomen ist allerdings relativ aufwändig, weswegen die Transfektion von Lipoplexen stärker verbreitet ist.<sup>[86]</sup>

Die Transfektion durch Fusion von Liposomen mit der Zellmembran kann nicht klar abgegrenzt werden von den endozytotischen Aufnahmemechanismen, da zum einen die Liposomen teilweise erst endozytotisch aufgenommen werden und dann mit der Membran des Endosoms fusionieren bzw.

durch die Fusion die Membran des Endosoms destabilisiert wird, so dass nicht nur der Inhalt des Liposoms, sondern auch der Inhalt des Endosoms ins Zytoplasma gelangt. Zusammen mit der Lipoplex-basierten Transfektion wird die Transfektion mit Liposomen unter dem Begriff Lipofektion zusammengefasst. Dabei findet aber meist keine deutliche Unterscheidung zwischen dem auf Fusion beruhenden Transfektionsmechanismus und der Verwendung von positiv geladenen Liposomen lediglich zur Komplexierung, die anschließend endozytotisch aufgenommen werden, statt.

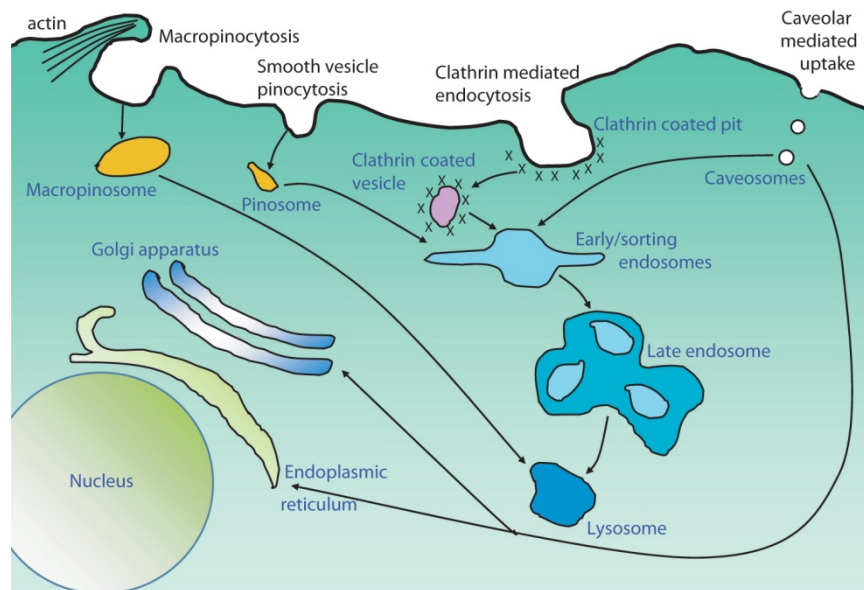
### **Erythrozyten-Ghosts**

Die Verwendung von Erythrozyten-Ghosts stellt eine spezielle Form der liposomenvermittelten Transfektion dar. Erythrozyten stellen im Prinzip große Liposomen dar. Dass reife Erythrozyten keinen Zellkern und keine Organellen mehr besitzen, begünstigt deren Verwendung zur Transfektion von Nukleinsäuren. Um die Erythrozyten zu beladen werden sie in hypotonischer, nukleinsäurehaltiger Lösung inkubiert. Durch Osmose schwellen die Erythrozyten an und in der Zellmembran entstehen Poren, durch die die Nukleinsäuren in die Erythrozyten diffundieren können. Durch Wiederherstellen des isotonen Zustandes wird die Zellmembran wieder verschlossen.<sup>[87]</sup> Eine effektivere Beladung der Erythrozyten kann durch gleichzeitige Anwendung von Elektroporation in hypotonischem Medium erreicht werden.<sup>[88]</sup> In Zellkultur können die Erythrozyten-Ghosts durch Elektrofusion mit den Zielzellen fusioniert werden.<sup>[89]</sup> *In vivo* konnte gezeigt werden, dass in Erythrozyten verpackte DNA eine deutlich erhöhte Verweildauer im Blutkreislauf aufweist als nackte DNA.<sup>[88]</sup> Expression von Plasmiden, die in Erythrozyten verpackt wurden, konnte aber nur in Zellen des Blutsystems und nicht in anderen Organen nachgewiesen werden. Diese Einschränkung kann aber auch ein Vorteil sein: In einer Studie wurden antivirale Verbindungen in Erythrozyten-Ghosts verpackt. Die Erythrozytenmembran wurde anschließend so modifiziert, dass sie speziell von Makrophagen erkannt und aufgenommen wurden. Dadurch konnten speziell die Makrophagen adressiert werden und die virale Aktivität vom HI-Virus bzw. Herpes-Simplex-Virus innerhalb der Makrophagen gesenkt werden.<sup>[90]</sup>

### **1.3.4 Endozytotischer Aufnahmemechanismus**

Endozytose beschreibt einen wichtigen Stoffwechselfvorgang, bei dem Zellen Teile des sie umgebenden Mediums inklusive gelöster Stoffe oder Makromoleküle in ihr Inneres aufnehmen. Die Endosomen verschmelzen zum Teil mit Lysosomen, die Enzyme zum Abbau der im Endosom enthaltenen Stoffe liefern. Es sind mehrere Endozytoseformen bekannt. Phagozytose beschreibt die Aufnahme von großen Partikeln wie z.B. Bakterien oder ganzen Zellen durch Makrophagen. Pinozytose beschreibt die Aufnahme des umgebenden Mediums mit den zufällig darin gelösten Stoffen bis hin zu Makromolekülen.

Abb. 21 zeigt einige bekannte Pinozytosewege: 1. Der „klassische“ Clathrin-abhängige Endozytoseweg, bei dem Clathrin-umhüllte Vesikel entstehen. 2. Der Caveolin-abhängige Endozytoseweg, bei dem vorgeformte flaschenförmige Einstülpungen der Zellmembran abgeschnürt werden. Beide Wege sind zusätzlich abhängig von der GTPase Dynamin, die die Abschnürung der Vesikel bewirkt. 3. Ein oder mehrere Clathrin-unabhängige Endozytoseformen und 4. die ebenfalls Clathrin- und Dynamin-unabhängige Makropinozytose. Daneben gibt es auch rezeptorvermittelte Endozytose. Bekannte Rezeptoren sind zum Beispiel der Transferrinrezeptor und der LDL-Rezeptor. Je nach Aufnahmemechanismus wird der Rezeptor entweder wiederverwendet oder abgebaut.<sup>[91,92]</sup>



**Abb. 21: Übersicht der verschiedenen Pinozytosewege [modifiziert nach Juliano *et al.*]<sup>[91]</sup>**

Auch Nukleinsäuren werden pinozytotisch aufgenommen. Da die Nukleinsäuren aber innerhalb der Endosomen abgebaut werden und nur zum Teil ins Zytoplasma gelangen, wurden verschiedenen Methoden entwickelt um entweder die Effektivität der endozytotischen Aufnahme zu erhöhen, oder um zusätzlich die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die Nukleinsäuren das Endosom verlassen und ins Zytoplasma gelangen. Wie die Nukleinsäuren die endosomale Membran überwinden ist nicht für alle verwendeten Methoden vollständig geklärt.

### Die Calciumphosphat-Präzipitation

Die Calciumphosphat-Präzipitation ist eine der ältesten Methoden zur Transfektion und weit verbreitet, da sie mit einfachen Mitteln durchzuführen ist. Eine calciumchloridhaltige Nukleinsäurelösung wird mit Phosphat-Puffer gemischt, so dass sich ein Niederschlag aus feinverteiltem Calciumphosphat bildet, der die Nukleinsäuren teilweise mit einschließt. Diese

Suspension wird dann auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, die das Präzipitat vermutlich endozytotisch aufnehmen. Wie der Mechanismus genau funktioniert, ist noch nicht bekannt.<sup>[75,93]</sup>

### **Magnetisch unterstützte Transfektion**

Hierbei handelt es sich um eine relativ neue Transfektionsmethode. Zur Transfektion werden magnetische Eisenoxid-Nanopartikel verwendet, die mit einer positiv geladenen Polymerschicht beschichtet sind. Die Nukleinsäuren werden von den Partikeln komplexiert, und die beladenen Magnetpartikel werden auf die Zellen gegeben. Durch einen Magneten unterhalb des Transfektionsgefäßes werden die magnetischen, mit Nukleinsäure beladenen Eisenpartikel auf die Zellen befördert, die diese endozytotisch aufnehmen. Die Eisenpartikel werden von der Zelle mit der Zeit abgebaut.<sup>[94]</sup>

### **Kationische Polymere**

Um die endozytotische Aufnahme der negativ geladenen Nukleinsäuren zu erleichtern, wurden zahlreiche Studien durchgeführt, bei denen kationische Polymere verwendet wurden, um die Nukleinsäuren zu komplexieren. Durch die nun positive Nettoladung des gesamten Komplexes wird die Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran verbessert. Als Komplexierungsreagenzien wurden unter anderem DEAE-Dextran<sup>[95]</sup>, Polyethylenamin<sup>[96]</sup>, kationische Block-Copolymere<sup>[97]</sup> und kationische Dendrimere<sup>[98]</sup> verwendet. Durch den niedrigen pH-Wert innerhalb der Endosomen wird eine weitere Protonierung der Polymere erreicht. Man geht davon aus, dass durch das zusätzlich benötigte Einströmen von Protonen und damit verbunden auch Gegenionen und Wasser, die Endosomen anschwellen, und dadurch deren Membran durchlässig für die komplexierten Nukleinsäuren wird.<sup>[99]</sup>

### **Zellpenetrierende Peptide (Cell penetrating peptides, CPPs)**

Die ersten zellpenetrierenden Peptide leiten sich von natürlichen Proteindomänen ab, wie z.B. HIV-Tat, Antennapedia-homeoprotein oder humanes Calcitonin<sup>[100]</sup>, die einen Transport des entsprechenden Proteins durch die Zellmembran ermöglichen. Die für die Translokation verantwortlichen Proteindomänen weisen einen hohen Anteil basischer Aminosäuren wie Lysin oder Arginin auf. Nach diesem Muster wurden zahlreiche synthetische CPP-Varianten entwickelt, die aus ca. 9-30 Aminosäuren bestehen und ebenfalls einen hohen Anteil basischer Aminosäuren besitzen. Nachdem festgestellt wurde, dass die zellpenetrierenden Eigenschaften hauptsächlich auf den polykationischen Eigenschaften der CPPs beruhen, wurden poly-Lysin- bzw. poly-Arginin-Sequenzen synthetisiert, die ebenfalls erfolgreich in die Zellen aufgenommen wurden.<sup>[91]</sup>

In frühen Studien wurde vermutet, dass die CPPs einen endozytoseunabhängigen Weg durch die Zellmembran finden.<sup>[101]</sup> Es zeigte sich aber in neueren Studien, dass auch die CPPs über verschiedene Formen der Endozytose aufgenommen werden.<sup>[102]</sup> Durch Verknüpfung mit CPPs konnten verschiedenen Verbindungen wie Proteine, peptidische Nukleinsäure (PNA), Plasmide oder Quantenpunkte<sup>[103]</sup> in Zellen eingeschleust werden. Ein großer Teil dieser Verbindungen befand sich dabei in zytoplasmatischen Vesikeln, während ein geringer Teil auch im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte. Wie genau die zu transportierenden Verbindungen die endosomale Membran überwinden ist allerdings noch nicht geklärt.<sup>[104]</sup>

Für die Transfektion von Nukleinsäuren mit CPPs gibt es im Prinzip zwei Möglichkeiten. Aufgrund der polykationischen Eigenschaften der CPPs unter physiologischen Bedingungen können sie mit negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe bilden, die aufgrund ihrer positiven Überschussladung mit Glukosaminoglykanen auf der Zelloberfläche wechselwirken und eine endozytotische Aufnahme des gesamten Komplexes bewirken. Die andere Möglichkeit besteht darin, die CPPs kovalent mit der zu transportierenden Nukleinsäure zu verknüpfen. Um die Wirkung der Nukleinsäure nicht zu beeinträchtigen erfolgt die Verknüpfung meist über eine Disulfidbrücke, die im Zytoplasma gespalten wird, oder, bei siRNA, am Begleitstrang, der nicht für den RNAi-Mechanismus benötigt wird.<sup>[105,106]</sup> Ein Nachteil der kovalenten Methode könnte darin bestehen, dass bei einem äquimolaren Verhältnis die negative Ladung der verwendeten Nukleinsäure in den allermeisten Fällen die positive Ladung des Peptids überwiegen wird, wodurch eventuell die Wirkung der CPPs abgeschwächt wird.

## Lipoplexe

Viele kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien basieren auf dem Prinzip der Lipoplexbildung. Als Lipoplexe bezeichnet man amorphe Komplexe aus negativ geladenen Nukleinsäuren und kationischen Lipiden. Es können auch kationische Liposomen zur Komplexbildung verwendet werden. Die zu transportierenden Nukleinsäuren befinden sich dann nicht innerhalb der Liposomen sondern werden auf deren Oberfläche komplexiert. Eines der ersten Lipide, das zur Lipoplexbildung verwendet wurde ist das *N*[1-(2,3-dioleyl-oxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DOTMA).<sup>[107]</sup> Einige bekannte Strukturen von Lipoplexen sind in Abb. 22 a) gezeigt. Es kann sich eine lamellare Struktur ausbilden, bei der die Nukleinsäuren abwechselnd mit Lipiddoppelschichten gestapelt sind ( $L_{\alpha}$ ). Daneben existiert eine inverse hexagonale Phase ( $H_{II}$ ) innerhalb der die Nukleinsäurestränge von inversen Micellen der Lipide umgeben sind, und eine komplexierte hexagonale Phase ( $H_I$ ), die aus einer hexagonalen Anordnung von röhrenförmigen Lipidmicellen besteht, deren Zwischenräume von Nukleinsäuresträngen besetzt werden.<sup>[108,109]</sup>

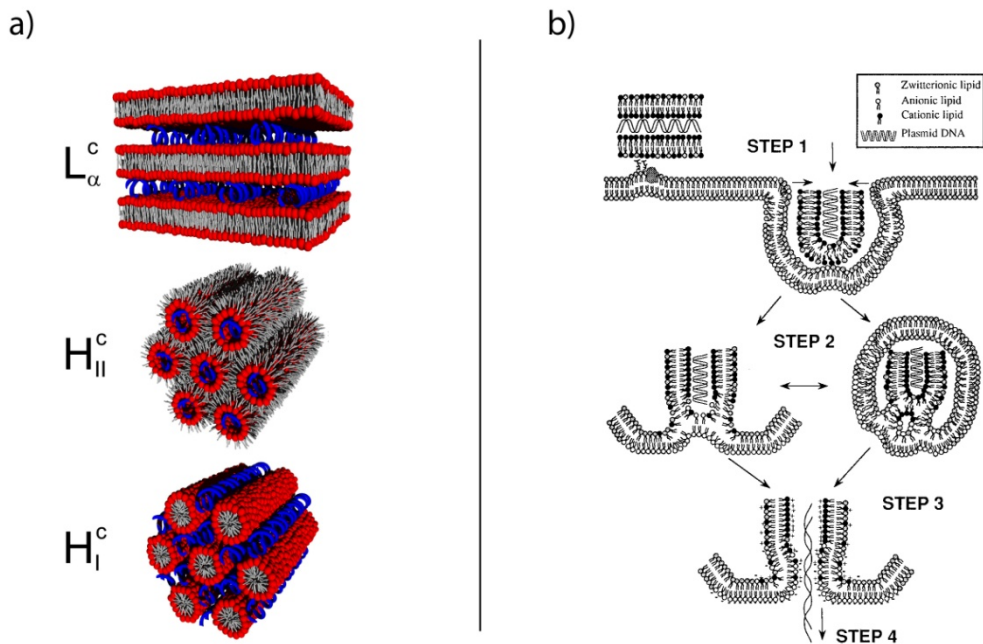


Abb. 22: a) Verschiedene Strukturen von Lipoplexen nach Tresset<sup>[108]</sup>; Lipide: kationische Kopfgruppe = rot, unpolare Rest = grau; DNA = blau. b) Schematische Darstellung der lipoplexvermittelten Transfektion nach Xu *et al.*<sup>[110]</sup>

Die Lipoplexe weisen eine positive Nettoladung auf. Dadurch können sie mit der negativ geladenen Zelloberfläche wechselwirken und werden endozytotisch aufgenommen. Die komplexierten Nucleinsäuren gelangen ins Zytoplasma, da die Lipide der Lipoplexe mit der Endosomenmembran fusionieren und diese Destabilisieren. Um diesen Prozess zu erleichtern, können den Lipoplexen fusionserleichternde Lipide, wie z.B. L-Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) zugegeben werden. Der Mechanismus der Fusion ist schematisch in Abb. 22 b) wiedergegeben. Dadurch dass sich die kationischen Lipide der Lipoplexe mit den anionischen Lipiden der endosomalen Membran vermischen, geht die komplexierende Wirkung verloren und die Nucleinsäure wird ins Zytoplasma abgegeben.<sup>[110,111]</sup>

Da die Lipide der Lipoplexe die Lipidzusammensetzung der Zellmembran stark beeinflussen, weisen sie oft zytotoxische Effekte auf. Daher ist die lipoplexvermittelte Transfektion hauptsächlich für die Verwendung in Zellkultur geeignet.<sup>[112]</sup>

### Rezeptorvermittelte Transfektion

Auch zelleigene Rezeptoren können zur Endozytoseerleichterung verwendet werden. Der Transferrinrezeptor ist auf fast allen Zellen vorhanden und dient der Bindung und endozytotischen Aufnahme des Eisentransportproteins Transferrin. Erweitert man das Transferrin um einen Polylysinrest, so kann dieser DNA komplexieren, die zusammen mit dem Transferrin endozytotisch aufgenommen wird.<sup>[113]</sup> Darüber hinaus ist es auch möglich, Nucleinsäurekonjugate mit Antikörpern

herzustellen, die an spezifische Antigene auf der Zelloberfläche binden. Dadurch ist es möglich, bestimmte Zellen zu adressieren.<sup>[91]</sup> Eine sehr elegante Methode stellt auch die Herstellung einer siRNA-Aptamer-Chimäre dar, die von McNamara *et al.* entwickelt wurde. Die Aptamerdomäne wurde gegen ein Antigen auf Prostata-Krebszellen selektiert und konnte die Krebszellen selektiv transfizieren. Durch die gegen plk-1 gerichtete siRNA wurde schließlich Apoptose ausgelöst.<sup>[114]</sup>

### **Verknüpfung mit Cholesterin**

Konjugate aus Nukleinsäuren und Cholesterin ermöglichen ebenfalls einen verbesserten Transport der Nukleinsäuren in lebende Zellen. Soutschek *et al.* konnten bei Experimenten in ganzen Mäusen zeigen, dass eine cholesteryl-modifizierte siRNA bei intravenöser Verabreichung einen RNAi-Effekt in Leber und Dünndarm hervorrufen konnte.<sup>[115]</sup> Bei genauerer Untersuchung des Transfektionsmechanismus stellte sich heraus, dass das Cholesteryl-siRNA-Konjugat zunächst mit LDL- und HDL-Partikel assoziierte und anschließend zusammen mit den Lipoproteinpartikeln endozytotisch aufgenommen wurde. Daher handelt es sich um eine Art indirekte rezeptorvermittelte Transfektion. Die Verknüpfung mit anderen lipophilen Verbindungen wie langkettigen Fettsäuren oder Gallensäuren führte ebenfalls zu einer Assoziation der siRNA mit den Lipoproteinpartikeln. Bemerkenswert ist, dass das siRNA-Cholesteryl-Derivat effektiver in Leberzellen aufgenommen wurde als LDL-Partikel für sich, so dass evtl. neben dem LDL-rezeptorvermittelten Endozytosemechanismus ein weiterer, vielleicht rezeptorabhängiger Weg existiert, über den das siRNA-Cholesterin-Konjugat selektiv in die Zelle aufgenommen wird. Eine Lokalisation der siRNA in der Nähe der Zellmembran durch die Assoziation mit den LDL-Partikeln würde einen solchen Weg zusätzlich unterstützen.<sup>[116]</sup>





## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1A Ein ausschaltbares Aptamer<sup>[117]</sup>

#### 2.1A.1 Einleitung

Aptamere sind sehr vielseitige Hilfsmittel, um biologische Funktionen zu beeinflussen, da sie im Prinzip mit hoher Affinität und Spezifität gegen jedes beliebige Biomolekül selektiert werden können und im Idealfall deren biologische Wirksamkeit unterdrücken. Noch interessanter werden diese speziellen Nukleinsäuren für den Naturforscher, wenn man sie um die Möglichkeit erweitert, ihre Bindungsaffinität mit Licht zu beeinflussen. Die Wirksamkeit eines Aptamers kann auf diese Art und Weise in einem komplexeren, lichtzugänglichen, biologischen System, z. B. Fruchtfliegen- oder Zebrafischembryo, aber auch an lichtzugänglichen Stellen größerer Organismen (z.B. Haut, Augen) an einem bestimmten Ort, zu einem bestimmten Zeitpunkt und mit einer bestimmten Dosis freigesetzt werden. Dadurch erhält man sowohl die Möglichkeit, detailliertere Experimente zur Klärung biologischer Fragestellungen durchzuführen, als auch eine präzisere Dosiskontrolle bei einer möglichen therapeutischen Anwendung von Aptameren.

#### **Blutgerinnung, Thrombin, Antikoagulantien**

Thrombin (Faktor IIa) ist das zentrale Gerinnungsenzym der Blutgerinnungskaskade. Es handelt sich dabei um eine hochspezifische Serinprotease aus der Gruppe der Chymotrypsine. Thrombin wird proteolytisch aus Prothrombin gebildet und spaltet im Blut lösliches Fibrinogen zu Fibrin, das zu einem dreidimensionalen, unlöslichen Netzwerk aggregiert und dabei Blutzellen mit einschließt. Der entstehende Thrombus sorgt bei der Verletzung eines Blutgefäßes dafür, dass die Blutung rasch gestoppt wird. Zusätzlich zu der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin bewirkt Thrombin durch mehrere autokatalytische Rückkopplungsmechanismen eine verstärkte Freisetzung von Thrombin aus Prothrombin.<sup>[118]</sup>

Thrombin ist ein 37 kDa schweres Protein, das aus einer schweren und einer leichten Aminosäurekette besteht, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Neben dem aktiven Zentrum verfügt Thrombin an seiner Oberfläche über zwei Bereiche, sogenannte Exosite I und Exosite II, die unter anderem durch elektrostatische Wechselwirkung mit anderen Molekülen die Funktion von Thrombin beeinflussen. Beide Exosites weisen durch zahlreiche basische Aminosäurereste eine positive Ladung auf. Exosite I bindet Fibrinogen, welches dann am aktiven Zentrum gespalten wird. Exosite II

hingegen bindet Heparin, welches dann Antithrombin rekrutiert, das seinerseits das aktive Zentrum von Thrombin blockiert und somit die katalytische Aktivität von Thrombin inhibiert.<sup>[119]</sup>

Eine exakte Regulation der Blutgerinnung ist für den Organismus essentiell. Personen, die einen erblich bedingten Mangel eines Gerinnungsfaktors aufweisen, neigen zu übermäßig starken Blutungen, so dass schon kleinere Verletzungen lebensgefährlich sein können (Mangel an Faktor VIII: Hämophilie a; Mangel an Faktor IX: Hämophilie b).

Andererseits kann aber auch ein Blutgerinnsel an der falschen Stelle im schlimmsten Fall tödliche Folgen haben. Gerade nach operativen Eingriffen besteht ein erhöhtes Thromboserisiko. Löst sich ein venöser Thrombus, so kann er über die Blutbahn bis in eine Lungenarterie gelangen und diese verstopfen. Dadurch kommt es zu einer lebensgefährlichen Lungenembolie. Um das Thromboserisiko zu senken, können Substanzen verabreicht werden, die eine hemmende Wirkung auf das Blutgerinnungssystem haben. Um bereits bestehende Thromben im Falle einer Thromboembolie aufzulösen, werden zusätzlich fibrinolytisch wirksame Substanzen verabreicht.

Es gibt zwei Ansätze, die Bildung von Thrombosen zu verhindern: Zum einen können sogenannte indirekte Antikoagulantien (Blutgerinnungshemmer) die Synthese verschiedener Blutgerinnungsfaktoren in der Leber unterdrücken. Bei den indirekten Antikoagulantien handelt es sich um Vitamin-K-Antagonisten, da die Synthese diverser Blutgerinnungsfaktoren Vitamin-K-abhängig ist. Meistens handelt es sich um Derivate des 4-Hydroxycumarins, da diese die geringsten Nebenwirkungen unter den bekannten Vitamin-K-Antagonisten aufweisen. Die Wirkung der indirekten Blutgerinnungshemmer tritt zeitverzögert ein, da sie eine Neusynthese der entsprechenden Gerinnungsfaktoren verhindern, die Funktionsfähigkeit der bereits vorhandenen Gerinnungsfaktoren allerdings nicht beeinträchtigen. Daher ist die Latenzzeit abhängig von der plasmatischen Halbwertszeit der Gerinnungsfaktoren. Die Latenzzeit beträgt je nach Cumarinderivat zwischen 24 und 60 Stunden. Die Wirkungsdauer liegt zwischen 48 und 144 Stunden. Daher sind die entsprechenden Präparate vor allem zur langfristigen Thromboseprophylaxe geeignet.

Direkte Antikoagulantien dagegen beeinflussen die Wirkung bestimmter Gerinnungsfaktoren durch direkte Wechselwirkung. Dadurch setzt ihre gerinnungshemmende Wirkung sofort ein. Eines der gebräuchlichsten direkten Antikoagulantien ist unfraktioniertes Heparin. Dabei handelt es sich um ein unverzweigtes Polysaccharidderivat aus der Gruppe der Glykosaminoglykane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 17 kDa. Heparin besteht aus alternierenden,  $\alpha$ -1-4-verknüpften Iduronsäure- und Glucosamin-Einheiten. Je Disaccharideinheit trägt Heparin ca. 2,5 Sulfatreste in Form des entsprechenden Esters bzw. Amids. Es ist das am stärksten negativ geladene Polymer, das in Säugetieren vorkommt. Es tritt hauptsächlich in den Arterienwänden auf und verhindert vermutlich die Entstehung von Blutgerinnseln. Durch seine starke negative Ladung bindet es an die Exosite II des Thrombins und rekrutiert Antithrombin aus dem Blutplasma, das seinerseits das aktive Zentrum von Thrombin blockiert und damit die Gerinnungsaktivität von Thrombin inhibiert. Heparin wird parenteral appliziert. Seine blutgerinnungshemmende Wirkung setzt sofort ein. Aufgrund

seiner relativ kurzen plasmatischen Halbwertszeit von ca. 45 Minuten ist seine Wirkung gut zu dosieren. Es kann daher gut zur Behandlung akuter Thrombosegefahr während eines operativen Eingriffs oder zur kurzfristigen Behandlung akuter Thromboembolien eingesetzt werden, um eine weitere Gerinnung zu verhindern. Weitere Flexibilität kommt Heparin als Wirkstoff zu, durch die Existenz eines bekannten Gegenmittels. Protamin ist ein basisches Protein, das die Wirkung des Heparins sofort aufzuheben vermag.<sup>[120]</sup>

Neben Heparin existieren andere antikoagulativ wirksame Substanzen. Das Polypeptid Hirudin (7 kDa, 65 Aminosäuren) ist der stärkste bekannte Thrombininhibitor mit einer  $K_i$  von  $2,7 \times 10^{-14}$  M. Hirudin kommt im Speichel des medizinischen Blutegels vor. Es bindet an die Exosite I und das aktive Zentrum von Thrombin und unterdrückt so dessen Proteasefunktion. Rekombinantes Hirudin wird sowohl zur Behandlung von Herzkrankgefäßerkrankungen als auch zur Thromboseprophylaxe angewendet.<sup>[121]</sup> Ein Nachteil des Hirudins, wie auch der meisten anderen Antikoagulantien besteht darin, dass kein wirksames Gegenmittel wie im Falle des Heparins bekannt ist. Da Blutgerinnungshemmer immer auch das Risiko erhöhen, dass unerwünschte Blutungen auftreten, erhöht die Existenz eines schnell wirksamen Antidots die Anwendungssicherheit eines Antikoagulans erheblich.<sup>[122]</sup>

Die Verwendung von Aptameren als Antikoagulantien bietet den Vorteil, dass Nukleinsäuren nicht toxisch sind, keine Immunreaktion hervorrufen und im Prinzip gegen jedes beliebige Zielprotein selektiert werden können. Damit sind sie nicht nur als Antikoagulantien von therapeutischem Interesse.<sup>[123]</sup>

Von Bock *et al.*<sup>[124]</sup> wurde 1992 ein DNA-Aptamer selektiert, das an die Exosite I (Bindungsstelle für Fibrinogen) von Thrombin bindet, dadurch die Bindung von Fibrinogen verhindert und so die Gerinnungsaktivität von Thrombin inhibiert. Es handelt sich um ein DNA-15-mer mit der palindromischen Sequenz 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Aptamer die Blutgerinnungszeit in Langschwanzmakaken deutlich verlängerte. Dabei setzte die volle Wirkung bereits 10 Minuten nach Beginn der Aptamerinfusion ein und die Blutgerinnung erreichte ebenso schnell nach Beendigung der Infusion wieder ihre Ausgangswerte.<sup>[125]</sup> Das Aptamer **HD1** wurde 2005 in einer klinischen Studie der Stufe I auf seine Eignung als Antikoagulans getestet (ARC 183). Die Archemix Corporation und Nuvelo Inc. veröffentlichten Ergebnisse dieser Studie, die dem Aptamer ein gutes Dosis-Wirkungs-Profil und einen raschen Wirkungseintritt bzw. rasches Abklingen der Wirkung nach Beenden der Aptamerinfusion bescheinigte. Allerdings waren die erforderlichen Dosen, die benötigt wurden um die gewünschte antikoagulatorische Wirkung zu erhalten, zu hoch.<sup>[126]</sup>

Rusconi *et al.* stellten 2002 ein blutgerinnungshemmendes RNA-Aptamer (**9.3t**) vor, das gegen den Faktor XIa selektiert wurde. Um eine ausreichende Stabilität *in vivo* zu gewährleisten, wurde das Aptamer mit 2'-Fluoropyrimidinnukleotiden und einem invertierten dT am 3'-Ende modifiziert. Um die biologische Halbwertszeit bezüglich der Ausscheidung über die Nieren zu erhöhen, wurde das Aptamer am 5'-Ende mit einem Polyethylenglykolrest verknüpft. Das Aptamer konnte effektiv die

Blutgerinnungszeit von menschlichem Plasma erhöhen. Zusätzlich wurde ein Gegenstrang, komplementär zum Aptamer **9.3t** synthetisiert. Wurde dieses spezifische Antidot zu mit **9.3t** versetztem Plasma gegeben, konnte es die ursprüngliche Blutgerinnungsaktivität vollständig wiederherstellen.<sup>[127,128]</sup> 2006 wurde in einer klinischen Studie der Phase Ia (REG1, Regado Biosciences) die Anwendbarkeit dieser Strategie aus blutgerinnungshemmendem Aptamer und spezifischem Antidot im menschlichen Organismus demonstriert.<sup>[129]</sup>

Da die Herstellung nukleinsäurebasierter Antikoagulantien allerdings deutlich teurer ist als Heparin, wird deren Anwendung vermutlich beschränkt sein auf Patienten, die aufgrund einer heparininduzierten Thrombozytopenie (Mangel an Thrombozyten aufgrund von immunologischer Reaktion auf Heparin) auf andere Antikoagulantien angewiesen sind.<sup>[123]</sup>

## 2.1A.2 Vorarbeiten

Um die Möglichkeit zu demonstrieren, die Aktivität von Aptameren durch das Einführen von photolabilen Schutzgruppen lichtaktivierbar zu machen, wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Alexander Heckel in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Prof. Günter Mayer (LIMES, Universität Bonn) und Prof. Bernd Pötzsch (Universitätsklinik Bonn) das Anti-Thrombin-Aptamer **HD1** ausgewählt, das 1992 von Bock *et al.* vorgestellt wurde<sup>[124]</sup>, da es sich um eine kurze Nukleinsäuresequenz handelt, die bereits intensiv untersucht worden ist. Sie ist synthetisch leicht zugänglich, und die Kristallstruktur des Aptamer-Thrombin-Komplexes ist literaturbeschrieben<sup>[130]</sup> (PDB ID 1HAO) Somit besteht die Möglichkeit, die Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Protein gezielt durch den Einbau von photolabilen Schutzgruppen an den entscheidenden Stellen vorübergehend zu modifizieren.

Das **HD1**-Aptamer hat die Sequenz 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'. Es bindet an die Exosite I von Thrombin mit einer Bindungskonstante im Bereich von 25 nM.<sup>[124,131]</sup> Durch NMR-Studien in Lösung konnte von Wang *et al.* gezeigt werden, dass das Aptamer **HD1** eine zweilagige, antiparallele G-Quadruplexstruktur ausbildet. Auf der einen Seite der Quadruplexstruktur existieren zwei T-T-Schleifen, auf der anderen Seite eine TGT-Schleife. Zwischen den beiden T-T-Schleifen wird ein zusätzliches T-T-Basenpaar ausgebildet, das parallel zu den G-Quadruplexlagen ausgerichtet ist. (Abb. 23)<sup>[132,133]</sup>

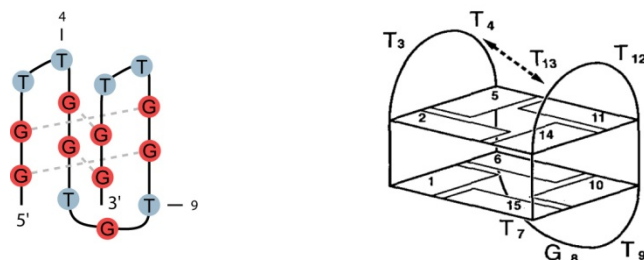


Abb. 23: Struktur des HD1-Aptamers nach Schultze *et al.*<sup>[133]</sup>

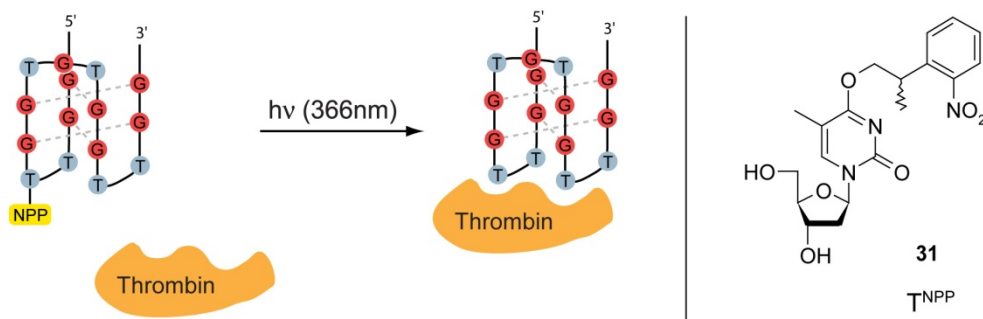
Von Padmanabhan *et al.*<sup>[130]</sup> wurde 1996 eine röntgenographische Analyse vorgestellt, in der ein Komplex aus dem Aptamer **HD1** und Thrombin kristallisiert und untersucht wurde. In dieser Studie wurden die Daten von Röntgendiffraktion und NMR-Studien benutzt um ein Modell des Komplexes **HD1**-Thrombin zu entwickeln. Aus den kristallographischen Daten ging hervor, dass im Kristall die beiden Moleküle derart angeordnet waren, dass Ketten entstehen, in denen jeweils ein Aptermolekül an der einen Seite die Exosite I eines benachbarten Thrombins bindet und an der anderen Seite die Exosite II des anderen benachbarten Thrombins. Begründet liegt das vermutlich in der starken Wechselwirkung zwischen dem anionischen Phosphodiester-Rückgrat des Aptamers und dem kationischen Charakter der beiden Exosites des Thrombins.

Allerdings konnte in Mutationsstudien gezeigt werden, dass **HD1** in Lösung an die Exosite I von Thrombin bindet und so die Bindung von Fibrinogen verhindert.<sup>[131]</sup>

Die NMR-Modelle der Aptamerstruktur ließen sich bemerkenswerter Weise auf zwei unterschiedliche Arten mit den aus den Röntgenexperimenten resultierenden Elektronendichten in Einklang bringen, so dass aus dieser Studie zwei unterschiedliche Strukturmodelle des Komplexes resultieren, in denen das Aptamer jeweils eine unterschiedliche Orientierung bezüglich des Thrombins hat. Im einen Fall bindet das Aptamer über die Seite mit der TGT-Schleife an das Thrombin (PDB ID 1HAP), im anderen Fall über die Seite, die durch zwei TT-Schleifen verbrückt ist (PDB ID 1HAO).<sup>[130]</sup>

Die Arbeitskreise Heckel und Mayer demonstrierten 2004 zum ersten Mal die Möglichkeit, Aptameraktivität mit Licht zu regulieren.<sup>[134]</sup> In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Bindungsfähigkeit des Aptamers und damit seine inhibitorische Wirkung durch die gezielte Einführung einer photolabilen Schutzgruppe mit Licht induziert werden kann. Dazu musste vorher untersucht werden, welches der beiden Strukturmodelle zutreffend ist, um die richtige Stelle für eine Modifikation mit einer photolabilen Schutzgruppe auszuwählen. In Mutationsstudien konnte festgestellt werden, dass ein Austausch des Thymins an Position T4 durch Desoxyadenosin zu einem Aptamer führte, das keine Bindung mit Thrombin zeigte und auch keinen Einfluss mehr auf die Blutgerinnungszeit hatte. Daher wurde die Position T4 ausgewählt, um ein Thyminderivat einzuführen, das an der O<sup>4</sup>-Position eine 2-(2-Nitrophenyl)propylgruppe (NPP) trägt (Abb. 24). In Filterbindungsstudien und Blutgerinnungstests zeigte sich, dass der Einbau dieses photolabil geschützten Thymins dazu führte, dass die Bindung zu Thrombin und auch die Fähigkeit, die Blutgerinnungszeit zu verlängern, aufgehoben wurde. Der Einbau eines photolabil geschützten Thymins an Position T9 hatte keinen solchen Effekt, was eine Bestätigung für die Annahme ist, dass diese Seite des Aptamers nicht in die Bindung mit dem Thrombin involviert ist. Durch Belichten des photolabil geschützten Aptamers (366 nm) konnte die Bindungsfähigkeit mit Thrombin wiederhergestellt werden. Ebenso war eine belichtete Probe des Aptamers wieder dazu in der Lage, die Blutgerinnungszeit zu verlängern. Allerdings zeigte sich auch, dass durch Belichtung bei pH = 7,4 die Aktivität des Aptamers nicht zu 100 % wieder hergestellt werden konnte, da die Entschützungs-

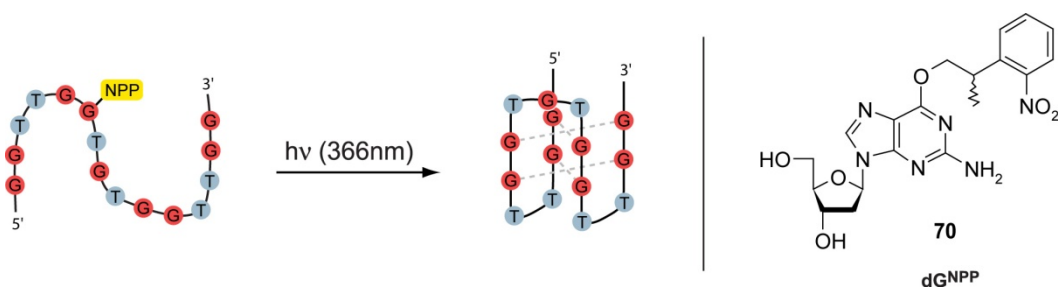
reaktion offensichtlich nicht vollständig verläuft. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Aptameraktivität durch die Auswahl einer Stelle für eine photolabile Modifikation nach rationalen Kriterien auf der Grundlage von Strukturinformationen lichtaktivierbar zu machen.



**Abb. 24:** Das Aptamer trägt an Position T4 eine photolabile Schutzgruppe. Durch Belichten kann die inhibitorische Aktivität wieder hergestellt werden. <sup>[134]</sup>

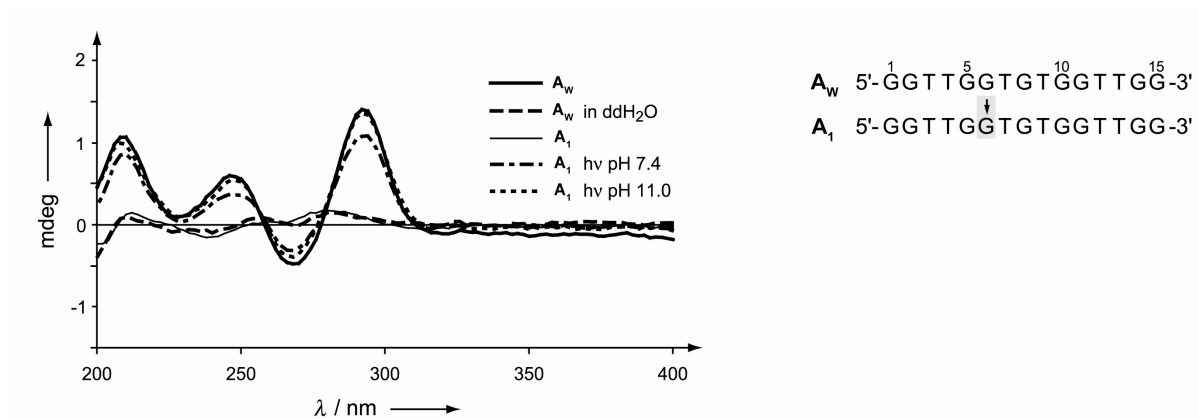
Die im vorigen Absatz beschriebene Studie nutzte als Grundlage die bekannte Kristallstruktur des Aptamer-Thrombin-Komplexes. Es stellte sich die Frage, ob Aptameraktivität auch gezielt lichtregulierbar gemacht werden kann, ohne dass die Struktur des Komplexes aus Aptamer und Zielmolekül bekannt ist.

Da die Wechselwirkung zwischen dem Aptamer und seinem Zielmolekül abhängig ist von der dreidimensionalen Struktur beider Moleküle, sollte es möglich sein, die Wechselwirkung zwischen beiden Molekülen zu verhindern, indem man eine photolabile Modifikation so einbaut, dass das Aptamer die dafür benötigte Struktur nicht mehr einnehmen kann. In einer weiteren Studie untersuchten die Arbeitsgruppen Heckel und Mayer diese Strategie. <sup>[135]</sup> Das Aptamer **HD1** bildet in Lösung in entsprechendem Puffer eine zweilagige, antiparallele G-Quadruplexstruktur, die auch im Aptamer-Thrombin-Komplex erhalten bleibt. Dieses Strukturelement kann mittels CD-Spektroskopie (Zirkulardichroismus) beobachtet werden, da G-Quadruplexe charakteristische Absorptionsbanden im CD-Spektrum erzeugen. Durch den Einbau eines photolabil geschützten Desoxyguanosinrestes (NPP an O<sup>6</sup>) an Position G6, sollte vorübergehend die Bildung eines stabilen G-Quadruplexes verhindert werden. (Abb. 25)



**Abb. 25:** Durch Modifikation von G6 wird die G-Quadruplexbildung vorübergehend verhindert. Durch Belichten kann die G-Quadruplexstruktur wieder hergestellt werden. <sup>[135]</sup>

Tatsächlich konnte in den aufgenommenen CD-Spektren beobachtet werden, dass das photolabil geschützte Aptamer  $A_1$  im CD-Spektrum ein ähnliches Absorptionsmuster zeigt wie das Aptamer **HD1** ( $A_w$ ) in entionisiertem Wasser, da sich bei Abwesenheit sämtlicher Kationen keine G-Quadruplexstruktur ausbilden kann. Die anderen Spektren wurden in PBS-Puffer bei pH = 7,4 gemessen. Nach dem Belichten zeigt das Aptamer  $A_1$  das Spektrum eines intakten G-Quadruplexes, allerdings ist auch hier zu erkennen, dass erst eine Belichtung bei höherem pH eine vollständige Entschützung ermöglicht. (Abb. 26)



**Abb. 26: CD-Spektren des Wildtyp-Aptamers  $A_w$  und der photolabil geschützten Variante  $A_1$  vor und nach dem Belichten. Zu sehen ist, dass durch Belichten die G-Quadruplexstruktur wiederhergestellt werden kann. Vor dem Belichten zeigt  $A_1$  ein ähnliches Absorptionsverhalten wie das Wildtyp-Aptamer  $A_w$  in entionisiertem Wasser (kein G-Quadruplex).**

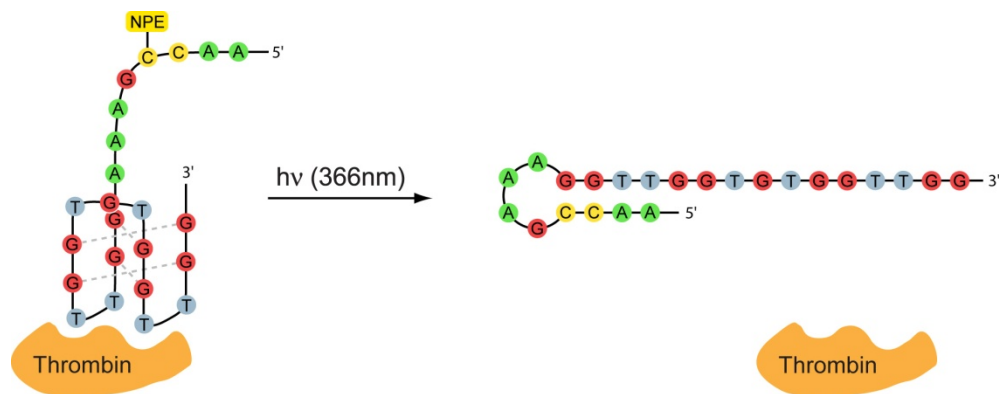
In Filterbindungsstudien konnte darüber hinaus keine Bindung zwischen der photolabil geschützten Aptamervariante und Thrombin detektiert werden. Damit war es gelungen, eine Methode zu entwickeln, die Wechselwirkung zwischen dem Aptamer und dem entsprechenden Zielmolekül lichtaktivierbar zu machen, ohne dass dafür die Bindungsstelle zwischen den beiden Molekülen bekannt sein musste. Lediglich die Strukturinformationen über das kleinere Molekül waren ausreichend eine erfolgreiche Synthesestrategie zu entwickeln.

### 2.1A.3 Aufgabenstellung / Planung

In der vorliegenden Arbeit bestand die Aufgabe nun darin, die vorhergehend beschriebenen Strategien, Aptameraktivität mit Licht zu beeinflussen, um die Möglichkeit zu erweitern, die Aktivität des Aptamers mit Licht auszuschalten.

Ähnlich wie in der bereits beschriebenen Studie, bei der ein Antisense-Nukleotid verwendet wurde, um die Aktivität eines Aptamers zu antagonisieren,<sup>[127,128]</sup> sollte in dieser Studie die intrinsische Eigenschaft von Nukleinsäuren genutzt werden, bei entsprechender Komplementarität Doppelstränge zu bilden.

In dieser Arbeit sollte das DNA-Aptamer **HD1** um eine entsprechende Antisense-Region verlängert werden. Die Antisense-Region sollte mit einer photolabilen Schutzgruppe derart modifiziert sein, dass eine Doppelstrangbildung vorübergehend nicht möglich ist. Dadurch hat das Aptamer vor dem Belichten seine normale Aktivität. Nach dem Belichten jedoch bildet die aktivierte Antisense-Region mit einem Teil der Aptamer-Region eine Haarnadelstruktur, wodurch die aktive Aptamerkonformation zerstört wird und das Aptamer seine Aktivität verliert. (Abb. 27)



**Abb. 27:** Das Aptamer HD1 ist über einen GAAA-Linker am 5'-Ende um eine komplementäre Sequenz verlängert, die eine photolabile Schutzgruppe trägt. Nach Belichten bildet sich durch Watson-Crick-Basenpaarung eine Haarnadelstruktur aus. Die aktive Aptamerkonformation ist zerstört und das Aptamer ist inaktiv.

Hierbei handelt es sich um ein Konzept, das auch auf andere Nukleinsäuremoleküle angewendet werden kann. Ein zusätzlicher Vorteil bezüglich des **HD1**-Modells liegt darin, dass dieses Antikoagulans durch die beschriebene Erweiterung sein eigenes Antidot in optimaler Dosis bereits mit sich führt und dieses nicht zusätzlich appliziert werden muss.

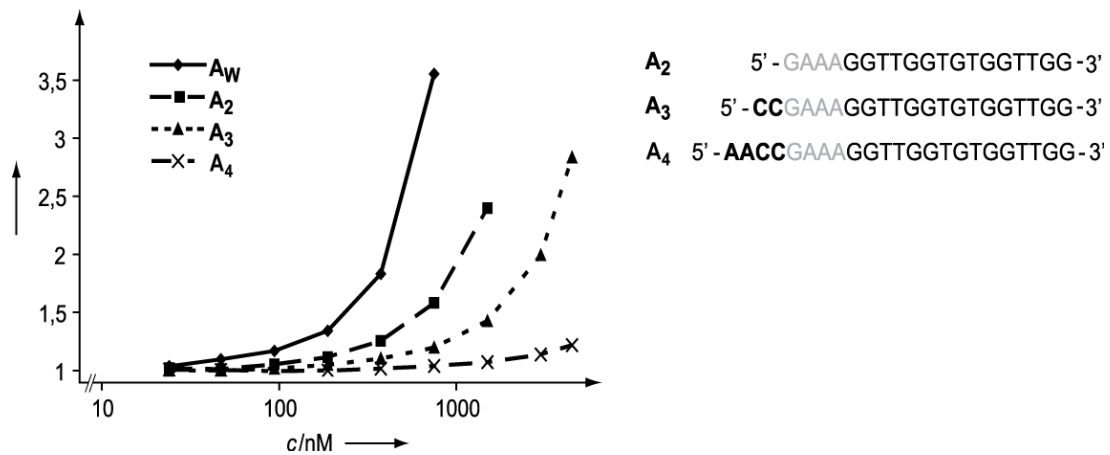
Dieses Projekt war ein Gemeinschaftsprojekt der Arbeitskreise Heckel, Mayer und Pötzsch. Die Durchführung der einzelnen Schritte war folgendermaßen verteilt: Die Synthese der photolabil geschützten Nukleotidvorläufer für die DNA-Festphasensynthese, die DNA-Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der photolabil geschützten DNA wurde von mir durchgeführt. Die Filterbindungsstudien wurden im Arbeitskreis Mayer durchgeführt und die Blutgerinnungsstudien im Arbeitskreis Pötzsch.

## 2.1A.4 Durchführung und Ergebnisse

Zunächst musste getestet werden, welche Länge die Antisense-Region haben muss, damit sie die Aptameraktivität vollständig aufhebt. Dazu wurde das **HD1**-Aptamer willkürlich am 5'-Ende um eine GAAA-Schleife, die einen stabilen GNRA-Tetraloop bildet (N = beliebiges Nukleotid, R = Purin), und verschieden lange komplementäre Regionen verlängert. Bereits die Verlängerung um die



GAAA-Schleife verursachte einen deutlichen Aktivitätsrückgang bezüglich des Wildtypaptamers ( $A_2$  und  $A_w$ , Abb. 28). Bei einer zusätzlichen Antisense-Region von vier Nukleotiden war bereits so gut wie keine blutgerinnungsverlängernde Aktivität mehr detektierbar. Auch in Filterbindungsstudien konnte keine Bindung zwischen  $A_4$  und Thrombin detektiert werden (Abb. 32).

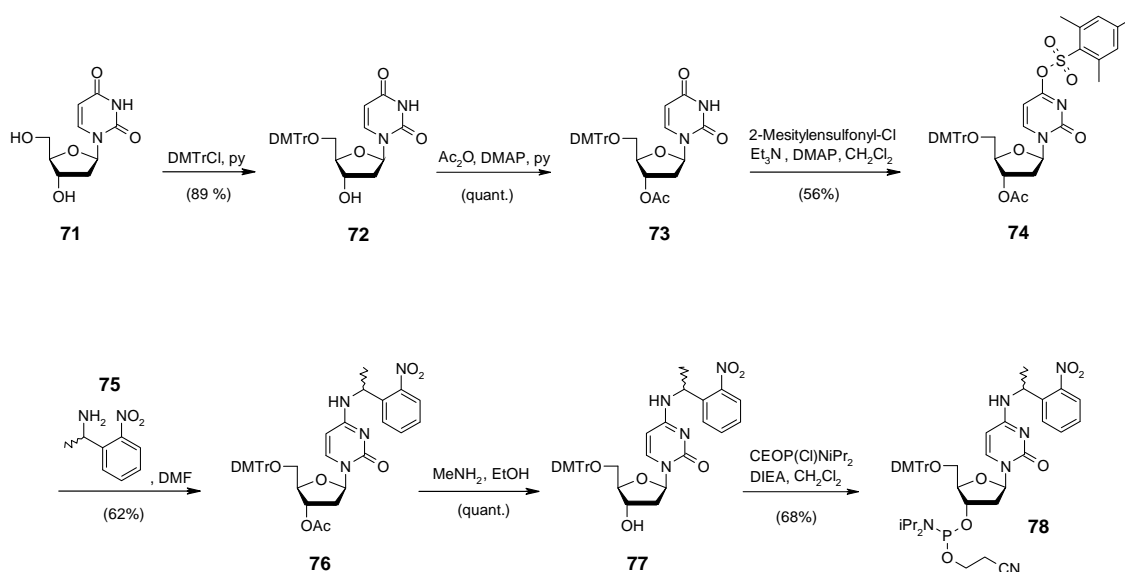


**Abb. 28: Ergebnisse der Blutgerinnungstests mit den unterschiedlichen Verlängerungen am 5'-Ende**

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die photodeaktivierbare Aptamervariante eine Antisenseregion von vier Nukleotiden besitzen. Eines der beiden Desoxycytidine sollte die photolabile Schutzgruppe tragen, da vermutlich die Destabilisierung eines GC-Basenpaares gegenüber einem AT-Basenpaar den größtmöglichen Effekt haben sollte.

Da der Arbeitskreis Heckel zu diesem Zeitpunkt noch nicht über einen photoaktivierbaren Desoxycytidinvorläufer verfügte, sollte dieser synthetisiert werden. Silverman *et. al.* hatten in einer RNA-Faltungsstudie 2005 die Synthese von photoaktivierbarem Cytidin beschrieben.<sup>[42]</sup> In einer analogen Syntheseroute sollte aus dem entsprechenden 2'-Desoxyvorläufer das photoaktivierbare  $dC^{NPE}$  hergestellt werden. Die Synthese ist in Abb. 29 dargestellt. Die Synthese ging von kommerziell erhältlichem 2'-Desoxyuridin **71** aus. Die 5'-OH-Gruppe wurde mit einer 4,4'-Dimethoxytritylgruppe geschützt. Die Reaktion erfolgte in wasserfreiem Pyridin mit einem leichten Überschuss an Dimethoxytritylchlorid mit einer Ausbeute von 89 %. Die 3'-OH-Gruppe wurde vorübergehend acetyliert mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von DMAP in Pyridin. Die Umsetzung verlief quantitativ. Anschließend erfolgte die Aktivierung der O<sup>4</sup>-Position mit 2-Mesitylsulfonylchlorid in Gegenwart von Triethylamin und DMAP in Dichlormethan. Die Reaktion verlief mit mäßiger Ausbeute (56 %). Das aktivierte Nukleosid **74** ist so stabil, dass es säulenchromatographisch gereinigt werden konnte. Allerdings zersetzt es sich mit der Zeit und kann nicht lange gelagert werden, daher sollte die Umsetzung zeitnah erfolgen. Durch Substitution des aktivierten O<sup>4</sup> mit 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin **75** in DMF bei 90°C erhielt man das photoaktivierbare Desoxycytidinderivat **76** mit 62 % Ausbeute. Anschließend erfolgte die quantitative Deacetylierung der 2'-OH-Funktion mit Methylamin in Ethanol, gefolgt von der Phosphoramidierung mit

Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und Diisopropylethylamin in wasserfreiem Dichlormethan. Das photoaktivierbare Phosphoramidit **78** wurde mit 68 % Ausbeute erhalten.



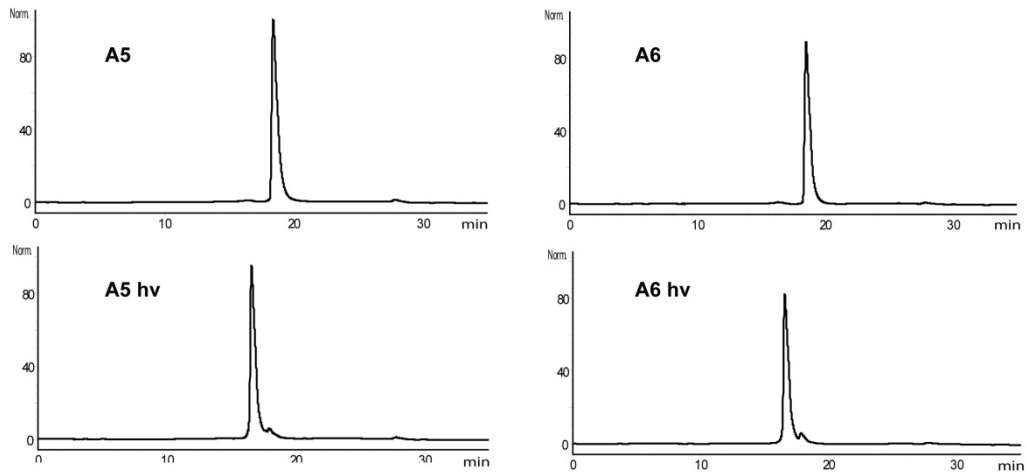
**Abb. 29: Synthese des photoaktivierbaren Desoxycytidinphosphoramidits für die DNA-Festphasensynthese. CE = Cyanoethyl.**

Das Phosphoramidit **78** wurde dann für die DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode unter Standardbedingungen verwendet. Die synthetisierten Sequenzen sind in Abb. 30 gezeigt. Die letzte Dimethoxytritylschutzgruppe wurde nicht abgespalten um die Aufreinigung per HPLC zu erleichtern. Die Abspaltung der DNA von der festen Phase erfolgte mit Ammoniaklösung (33 % in Wasser) bei 65°C.



**Abb. 30: Sequenzen der Aptamerderivate mit lichtaktivierbarer Gegenstrangregion.**

Anschließend wurde eine Umkehrphasen-HPLC durchgeführt gefolgt von der Abspaltung der Tritylgruppe mit Essigsäure (80 % in Wasser). Darauf folgte eine weitere Umkehrphasen-HPLC um die photolabil geschützte DNA von evtl. schon entschützter DNA zu trennen. In Abb. 31 sind analytische HPLC-Chromatogramme der beiden synthetisierten Sequenzen jeweils vor und nach Belichtung in PBS-Puffer (pH = 7,4; 366 nm, 3 min, 3 x UV-LED (Nichia NCCU033 je 100mW) betrieben bei je 0,5 A) gezeigt.



**Abb. 31: HPLC-Chromatogramme der synthetisierten, photodeaktivierbaren Aptamervarianten. Oben vor dem Belichten, unten nach dem Belichten.**

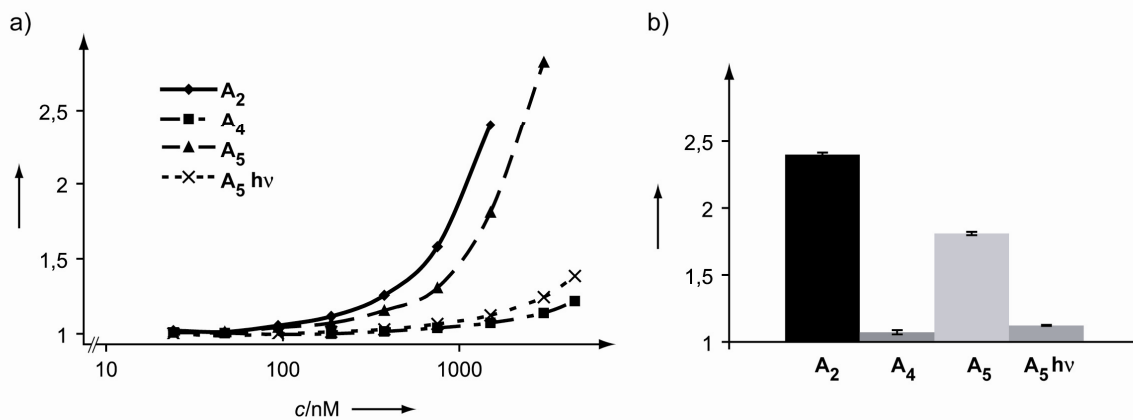
Man sieht eine deutliche Änderung der Retentionszeit nach dem Belichten. Darüber hinaus erkennt man, dass die Photoreaktion sehr sauber abläuft was nicht unbedingt zu erwarten gewesen wäre, da in der Literatur häufig von Schwierigkeiten bei photolytischen C-N-Bindungsspaltungen berichtet wird.<sup>[136]</sup> Im Falle des photoaktivierbaren Desoxycytidinderivats ist vermutlich die geringere Nukleophilie der exozyklischen Aminogruppe im Gegensatz zu aliphatischen Aminen ausschlaggebend für die gute Photospaltbarkeit.

	vor Belichtung	nach Belichtung
<b>A<sub>w</sub></b>	124 ± 16	n.b.
<b>A<sub>2</sub></b>	155 ± 23	n.b.
<b>A<sub>3</sub></b>	333 ± 44	n.b.
<b>A<sub>4</sub></b>	> 5000	n.b.
<b>A<sub>5</sub></b>	166 ± 12	> 5000
<b>A<sub>6</sub></b>	297 ± 44	>500

**Abb. 32: Dissoziationskonstanten (in nM) der verschiedenen DNA-Sequenzen aus den Filterbindungsstudien (n.b. = nicht bestimmt).**

In Filterbindungsstudien wurde die Bindungskonstante zwischen den synthetisierten, mit Licht deaktivierbaren DNA-Sequenzen **A<sub>5</sub>** und **A<sub>6</sub>** und Thrombin ermittelt (Abb. 32). Die Sequenz mit der photolabilen Schutzgruppe an C4 (**A<sub>5</sub>**) bindet nur geringfügig schwächer an Thrombin als **A<sub>2</sub>** (**HD1** mit GAAA-Schleife) und noch geringer als das Wildtyp-Aptamer **A<sub>w</sub>**. Nach Belichtung lässt sich, wie geplant, keine Bindung mehr detektieren. **A<sub>6</sub>** binden vor dem Belichten kaum an Thrombin und auch

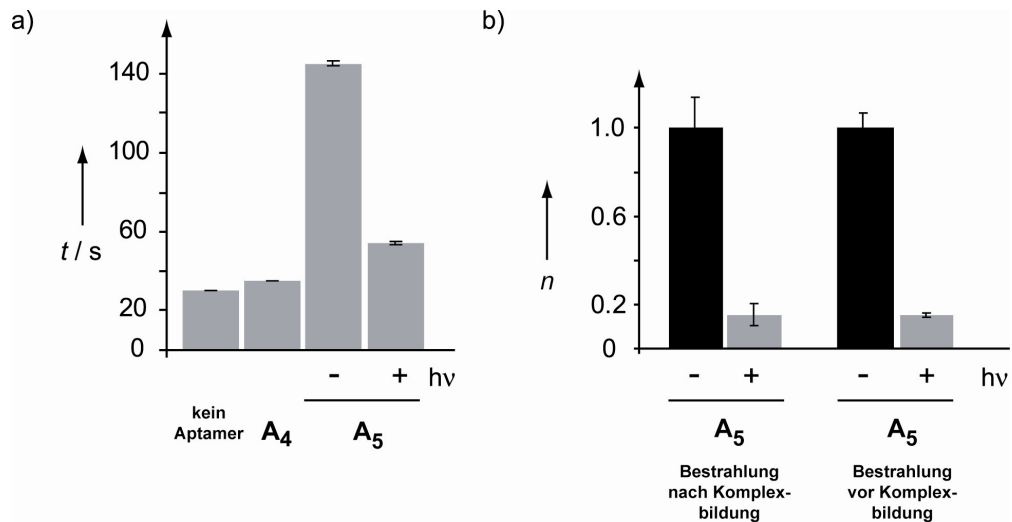
durch Belichtung lässt sich keine große Änderung erzielen. Dies zeigt deutlich, wie wichtig es ist, die richtige Position für die photoaktivierbare Nukleobase zu finden.



**Abb. 33: a) Ergebnisse der Blutgerinnungsstudien mit den Aptameren A<sub>2</sub>, A<sub>4</sub> und A<sub>5</sub> vor und nach der Bestrahlung. Die relative Verlängerung der Blutgerinnungszeit ist gegen die Aptamerkonzentration aufgetragen. b) Zum besseren Vergleich die Werte  $t_{rel}$  bei einer Aptamerkonzentration von 1500 nM**

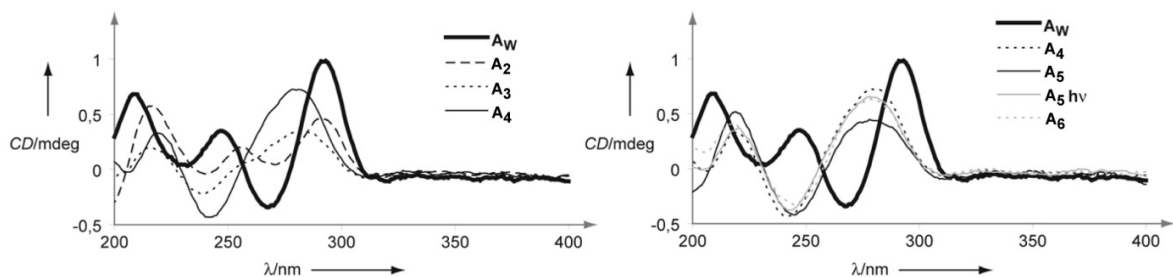
In den Blutgerinnungsstudien zeigte sich, dass die Aptamersequenz A<sub>5</sub> dazu in der Lage war, die Blutgerinnungszeit in Abhängigkeit von der Konzentration zu verlängern. Als Vergleich dienten die Sequenzen A<sub>2</sub> und A<sub>4</sub>. Das mit Licht deaktivierbare Aptamer A<sub>5</sub> war dabei nur geringfügig weniger aktiv als die Aptamervariante A<sub>2</sub> (HD1 mit GAAA-Schleife). Nach dem Belichten hatte A<sub>5</sub> keinen Einfluß mehr auf die Blutgerinnungszeit, ähnlich wie A<sub>4</sub>. Lediglich bei sehr hohen Konzentrationen konnte noch eine gewisse Restaktivität detektiert werden (Abb. 33). Der Tatsache, dass A<sub>5</sub> eine geringere Aktivität zeigt, als das ursprüngliche Aptamer HD1, kann dadurch begegnet werden, dass eine höhere Dosis verwendet wird.

Für die beschriebenen Experimente wurde das Aptamer zuerst belichtet und dann in den entsprechenden Anwendungen eingesetzt. Für eine Anwendung *in vivo* ist es allerdings notwendig zu wissen, ob durch Bestrahlung ein bereits bestehender Aptamer-Thrombin-Komplex zerstört werden kann. Dafür wurde zuerst der Komplex aus A<sub>5</sub> und Thrombin geformt und anschließend belichtet. In Abb. 34 a) erkennt man, dass im Blutgerinnungstest das zum Vergleich eingesetzte Aptamer A<sub>4</sub> keinen Einfluß auf die Blutgerinnungszeit hat im Vergleich mit dem Kontrollexperiment ohne Aptamer. A<sub>5</sub> zeigt eine deutliche Verlängerung der Blutgerinnungszeit vor dem Belichten und kann durch Bestrahlung auch im bereits vorgeformten Aptamer-Thrombin-Komplex inaktiviert werden. In Abb. 34 b) sind die entsprechenden Filterbindungsexperimente gezeigt, aus denen ebenfalls hervorgeht, dass die Inaktivierung des Aptamers durch Belichtung auch im Komplex funktioniert.



**Abb. 34:** a) Blutgerinnungstest in dem der vorgeformte Aptamer-Thrombin-Komplex belichtet wurde und Kontrollexperiment mit A<sub>4</sub> bzw. ohne Aptamer (Aptamerkonzentration: 3  $\mu$ M) b) Filterbindungsstudien in denen A<sub>5</sub> vor und nach Komplexbildung bestrahlt wurde. (y-Achse: relative gebundene Menge von A<sub>5</sub>, Konzentration von Thrombin: 150 nM)

Um Strukturinformationen über die verschiedenen Aptamersequenzen zu erhalten, wurden ebenfalls CD-Spektren gemessen (Abb. 35). Es ist zu erkennen, dass bereits das um die GAAA-Schleife verlängerte Aptamer A<sub>2</sub> eine im Vergleich zu A<sub>w</sub> deutlich geringere für G-Quadruplexe charakteristische Absorption zeigt. Die um verschiedene Antisense-Längen erweiterten Aptamere A<sub>3</sub> und A<sub>4</sub> zeigen erwartungsgemäß ein anderes Spektrum. Auffallend ist, dass das mit Licht deaktivierbare Aptamer A<sub>5</sub> sowohl vor als auch nach dem Belichten kein typisches G-Quadruplexspektrum zeigt obwohl es in den Blutgerinnungsstudien inhibitorische Aktivität hat.



**Abb. 35:** CD-Spektren der verschiedenen Aptamersequenzen (in PBS + 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7,4)

Da die CD-Spektren in Abwesenheit von Thrombin gemessen wurden, könnte das dafür sprechen, dass die Modifikation durch die GAAA-Schleife und die photolabil geschützte Antisense-Region die Bildung der G-Quadruplexstruktur der Aptamervariante A<sub>5</sub> verhindert und erst durch die Bindung an Thrombin die aktive Konformation induziert wird. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der in den Filterbindungsstudien ermittelten, geringeren Bindungsaffinität von A<sub>5</sub> im Vergleich zum Wildtyp-Aptamer HD1 (A<sub>w</sub>).

### 2.1A.5 Zusammenfassung und Ausblick

In der durchgeführten Studie konnte erfolgreich gezeigt werden, dass es möglich ist, die Aktivität eines Aptamers mit Licht auszuschalten. Dieses Ziel wurde mit Hilfe einer intramolekularen Antisense-Strategie und dem Einbau einer photolabilen Schutzgruppe an entscheidender Stelle erreicht.

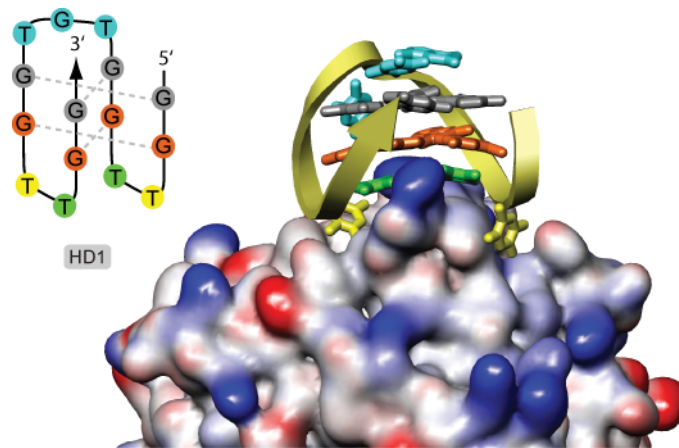
Die Möglichkeit, auf diesem Wege die Aktivität des blutgerinnungshemmenden Aptamers **HD1** zu regulieren, ist nicht nur von medizinischem Interesse. Darüber hinaus ist diese Strategie allgemein anwendbar auf Aptamere und andere Nukleinsäuremoleküle, deren dreidimensionale Struktur funktionsbestimmend ist. Dadurch steht neben der bereits beschriebenen Möglichkeit, Aptamere mit Licht zu aktivieren<sup>[134]</sup>, eine weitere, ergänzende Möglichkeit zur Verfügung, Proteinaktivität indirekt durch die Verwendung von photolabil geschützten Oligonukleotiden mit Licht zu regulieren. In diesem Fall kann die Proteinaktivität mit Licht orts- und zeitaufgelöst eingeschaltet werden.

Trotz der erfolgreichen Demonstration dieser Strategie einer photolabil geschützten, intramolekularen Gegenstrangregion hat sich auch gezeigt, dass das synthetisierte, deaktivierbare Aptamer eine deutlich geringere Aktivität aufwies als das Wildtyp-Aptamer. In einer jeweiligen Anwendung kann dies durch höhere Aptamerkonzentrationen kompensiert werden. Dennoch bestand das Interesse, nach den Ursachen für dieses Phänomen zu suchen, bzw. Wege zu finden, diesen Umstand zu verbessern. Auf diese Weise entstand das Projekt, das im folgenden Kapitel beschrieben ist.

## 2.1B Abhängigkeit der Aptameraktivität von der Position der Erweiterung (3' vs. 5')<sup>[137]</sup>

### 2.1B.1 Einleitung, Aufgabenstellung, Planung

Da die photodeaktivierbare HD1-Variante A<sub>S</sub>, die im vorigen Projekt entwickelt wurde, eine deutliche geringere blutgerinnungshemmende Aktivität aufwies, als das Wildtyp-Aptamer A<sub>w</sub>, stellte sich die Frage nach den Ursachen für den Aktivitätsverlust. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, einen Weg zu finden, die für das Ausschalten mit Licht notwendige Modifikation des Aptamers so zu verändern, dass es nichts von seiner Aktivität bezüglich des Wildtyp-Aptamers einbüßt. In Abb. 36 ist eine graphische Darstellung der Struktur des Komplexes aus HD1-Aptamer und Thrombin gezeigt (PDB: 1HAO).



**Abb. 36: Graphische Darstellung des an Thrombin gebundenen Aptamers HD1 (PDB: 1HAO). Die Thrombinoberfläche wurde entsprechend ihrer Ladung gefärbt: rot = negativ, blau = positiv. Im Sinne der Übersichtlichkeit sind in dieser Darstellung die Nukleotide nicht entsprechend ihrer Nukleobase sondern nach topologischen Kriterien farblich markiert.**

Zu erkennen ist, dass das 5'-Ende des Aptamers (sowie auch das 3'-Ende) im Komplex von der Thrombinoberfläche weg gerichtet sind. Daher kann ein sterisches Problem durch die Verlängerung am 5'-Ende des Aptamers bezüglich der Thrombinoberfläche vermutlich ausgeschlossen werden.

Da bereits die Verlängerung um die GAAA-Schleife die Aktivität auf 34 % senkte, wäre eine mögliche Erklärung, dass die Adenosinreste mit den Thymidinresten des Aptamers wechselwirkten und so die ursprüngliche Struktur des Aptamers destabilisierten. Auch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Basen könnten einen Einfluss auf die Struktur des Aptamers haben. Darüber hinaus bewirkte die zusätzliche Erweiterung des Aptamers um die photolabil geschützte Antisense-Region einen zusätzlichen Aktivitätsverlust. Das könnte einerseits die Fortsetzung des schon bei der GAAA-Erweiterung beobachteten Trends sein, andererseits ist auch eine nicht ausreichende Maskierung der Antisense-Region durch lediglich eine photolabile Schutzgruppe eine mögliche Erklärung.

Daher zerfällt das zu bearbeitende Problem in zwei Teile: erstens sollte ein Linker zwischen Aptamer und Antisense-Region gefunden werden, der die Aktivität des Aptamers erhält und zweitens sollte im Anschluss daran wieder unter Anwendung der lichtinduzierten Antisense-Strategie ein photodeaktivierbares Aptamer entwickelt werden, das vor Belichtung genauso gut wirkt wie das Wildtyp-Aptamer und nach Belichtung praktisch keine Aktivität mehr zeigt.

Dieses Projekt wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit den Arbeitskreisen Prof. Günter Mayer (LIMES, Universität Bonn) und Prof. Bernd Pötzsch (Universitätsklinik Bonn) durchgeführt. Die praktische Durchführung der einzelnen Schritte war wie im vorigen Projekt aufgeteilt: Die Synthese der photolabil geschützten Nukleotidvorläufer für die DNA-Festphasensynthese, die DNA-Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der photolabil geschützten DNA wurde von mir durchgeführt. Die Filterbindungsstudien wurden im Arbeitskreis Mayer durchgeführt und die Blutgerinnungsstudien im Arbeitskreis Pötzsch. Die unmodifizierten Oligonukleotide wurden bei *Microsynth*, Balgach (Schweiz, [www.microsynth.ch](http://www.microsynth.ch)) gekauft.

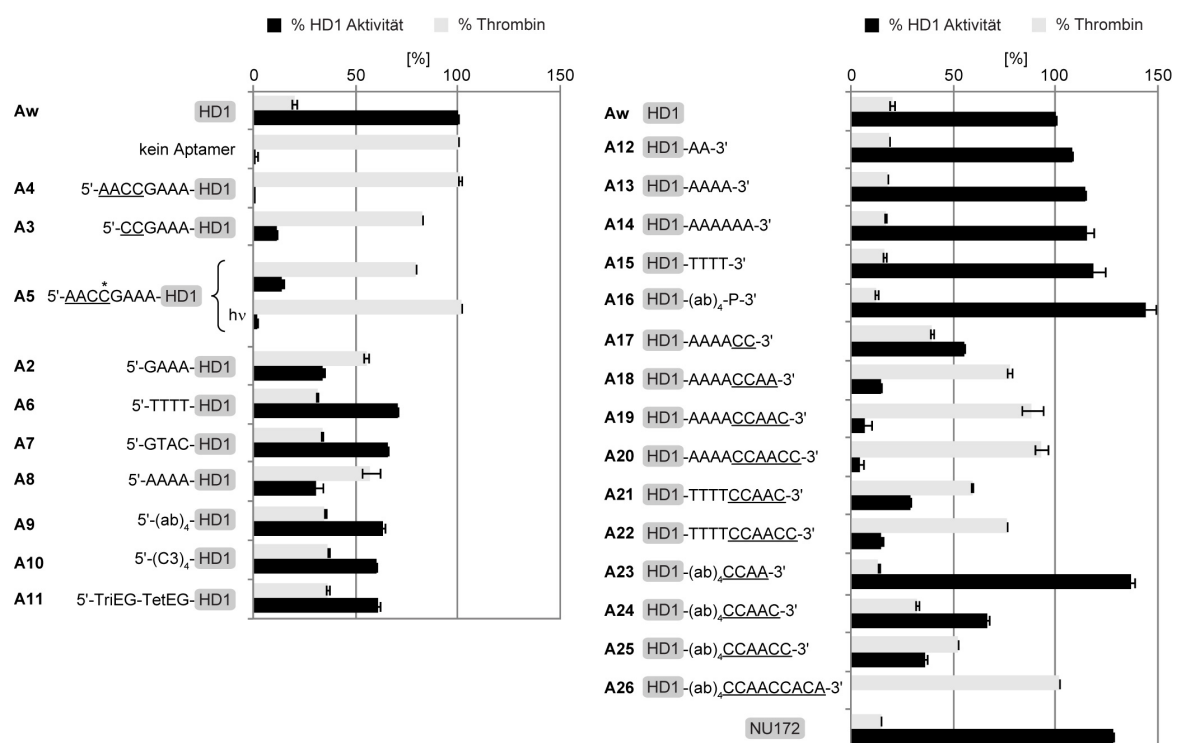
## 2.1B.2 Durchführung und Ergebnisse

In Abb. 37 sind die Ergebnisse der Blutgerinnungsstudien mit den verschiedenen Aptamervarianten zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in zwei verschiedenen Skalen dargestellt. Die eine Skala gibt die Aptameraktivität der verschiedenen Aptamervarianten bezüglich des Wildtypamptamers  $A_w$  in Prozent an (schwarze Balken). Die andere Skala zeigt den prozentualen Anteil der restlichen Thrombinaktivität in Gegenwart der verschiedenen Aptamervarianten (graue Balken). Beide Skalen sind reziprok zueinander. Unter den gewählten Messbedingungen (siehe Experimenteller Teil) zeigte die Anwendung des unmodifizierten Aptamers **HD1** ( $A_w$ ) eine restliche Thrombinaktivität von 20 %. Aptamer **A<sub>4</sub>** dagegen mit einer vier Nukleotide langen Antisense-Region und der GAAA-Schleife am 5'-Ende zeigte, wie zu erwarten, keine Anti-Thrombin-Aktivität mehr. Aptamer **A<sub>3</sub>**, mit einer nur zwei Nukleotide langen Antisense-Region zeigte noch 12 % der ursprünglichen **HD1**-Aktivität, da die komplementäre Sequenz nicht lang genug war, um die Anti-Thrombin-Aktivität vollständig zu unterdrücken. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorigen Studie. Das in der vorigen Studie entwickelte, photodeaktivierbare Aptamer **A<sub>5</sub>** hat vor dem Belichten nur eine Aktivität von 14 % verglichen mit **HD1**. Nach Belichten zeigt es so gut wie keine Aktivität mehr, vergleichbar mit **A<sub>4</sub>**. Dies zeigt, dass die Photoentschützung sauber abläuft, was auch schon die HPLC-Chromatogramme in der vorigen Studie zeigten. Das um den GAAA-Linker erweiterte Aptamer **A<sub>2</sub>** wies lediglich eine Anti-Thrombin-Aktivität von 34 % auf, verglichen mit **HD1**. Um herauszufinden, ob eine Wechselwirkung der Adenosinreste der GAAA-Schleife mit den Thyminresten der Aptamerdomäne der Grund für diesen Aktivitätsverlust war, wurden verschiedene Sequenzen für die Linker-Region getestet (Aptamer **A<sub>6</sub>**: TTTT und Aptamer **A<sub>7</sub>**: GTAC). Die Aktivität konnte dadurch etwas verbessert werden, allerdings wurde der Wert von **HD1** nicht erreicht.



Ein Aptamer mit einer AAAA-Schleife (**A<sub>8</sub>**) hatte eine ähnlich geringe Aktivität wie **A<sub>2</sub>**, was einen negativen Effekt der Desoxyadenosin-Reste bestätigt. Allerdings kann eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Adenosinresten und den Thyminresten der Aptamerdomäne nicht die einzige Erklärung sein, da auch durch die Verwendung anderer Linker-Sequenzen die vollständige Aktivität nicht wiederhergestellt werden konnte. Um zu untersuchen, ob eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen den Basen des Linkers und der Aptamerdomäne einen negativen Einfluß auf die Aptameraktivität haben könnte, wurden verschiedene nicht nukleosidische Linker getestet: Abasic Sites (**A<sub>9</sub>**), aliphatische Linker (**A<sub>10</sub>**) und Linker auf Ethylenglykolbasis (**A<sub>11</sub>**). Allerdings konnte in keinem der Fälle die vollständige **HD1**-Aktivität erreicht werden.

Nur um die Möglichkeit auch auszuprobieren, wurden auch Aptamere mit Linker am 3'-Ende getestet. Überraschenderweise führten zwei zusätzliche Desoxyadenosinreste am 3'-Ende (**A<sub>12</sub>**) zu einer etwas höheren Aktivität als **HD1**. Die blutgerinnungshemmende Wirkung konnte noch erhöht werden durch das Hinzufügen von weiteren Desoxyadenosinresten (**A<sub>13</sub>** und **A<sub>14</sub>**). Bei ca. sechs Desoxyadenosinresten war ein lokales Maximum der Aktivität erreicht. In einer Studie von Mayer *et al.* zeigte eine **HD1**-Variante mit einer 3'-dA<sub>15</sub>-Erweiterung ähnliche Aktivität wie **HD1**.<sup>[138]</sup>

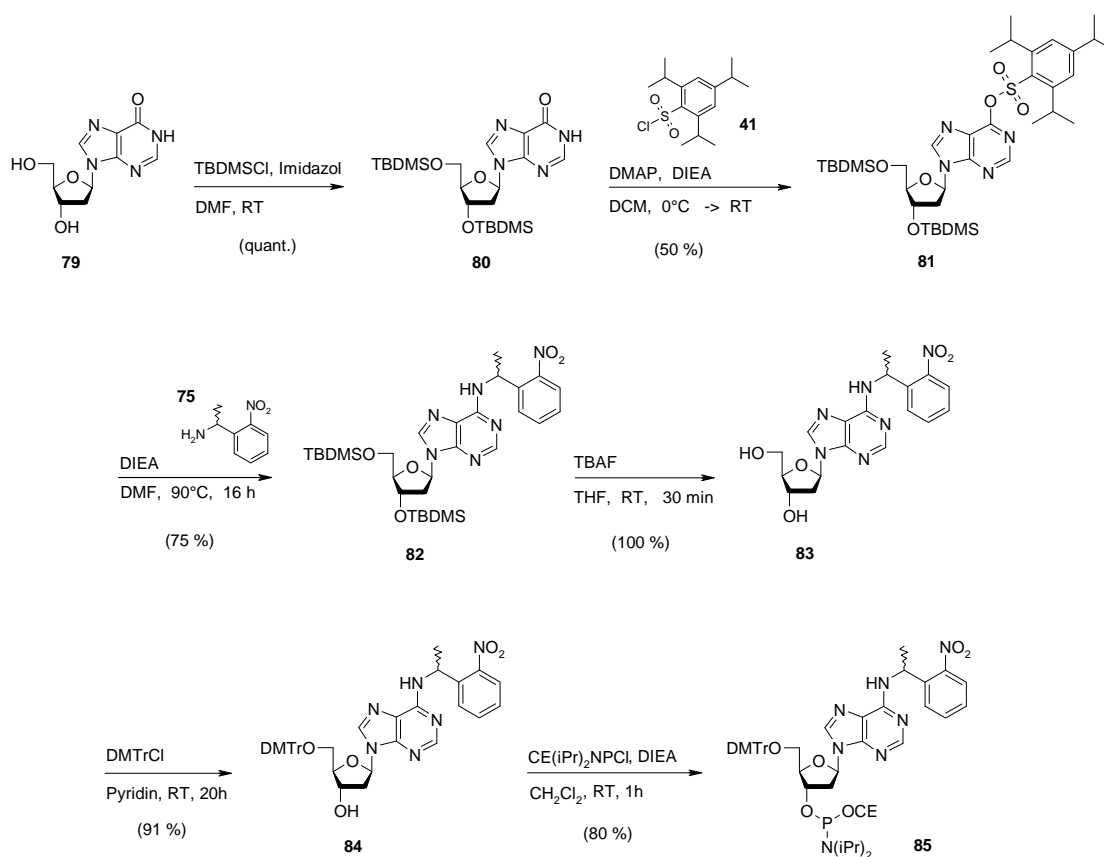


**Abb. 37: Ergebnisse der Blutgerinnungstests mit den verschiedenen Aptameren mit (hv) oder ohne Bestrahlung. Die Blutgerinnungszeiten (schwarz) wurden auf den Wert von HD1 normiert. Die reziproke Skala (grau) zeigt die restliche Thrombinaktivität. Die Sequenz von Aptamer NU172 (in dieser Studie zu Vergleichszwecken genutzt) ist CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG. (\* = photolabile Schutzgruppe, ab = abasic site, C3 = Propyl-Spacer-Nukleotid, TriEG = Triethylenglykol-Nukleotid, TetEG = Tetraethylenglykol-Nukleotid).**

Mit vier Thymidinresten am 3'-Ende erzielte das Aptamer **A<sub>15</sub>** ebenfalls eine höhere Aktivität als **HD1**. Wurden die Nukleoside am 3'-Ende durch vier Abasic Sites ersetzt (Aptamer **A<sub>16</sub>**, aus synthetischen Gründen mit einer Phosphatgruppe am 3'-Ende) so hatte das erhaltene Aptamer eine ca. 1,5-fache Aktivität verglichen mit **HD1**. Damit hat das Aptamer **A<sub>16</sub>** sogar eine stärkere blutgerinnungshemmende Wirkung als ein anderes Anti-Thrombin-Aptamer, **NU172** (Archemix Corporation), das ebenfalls an die Exosite I von Thrombin bindet und gegenwärtig in einer klinischen Studie der Phase II untersucht wird<sup>[139]</sup> und das zu Vergleichszwecken in dieser Studie mit getestet wurde. Dieser völlig unterschiedliche Einfluß einer Erweiterung am 5'-Ende im Gegensatz zu einer Erweiterung am 3'-Ende auf die Aktivität des Aptamers ist unerwartet, da in der zuvor beschriebenen Kristallstruktur (Abb. 36) zu erkennen ist, dass die beiden Enden des Aptamers nahe bei einander liegen und beide von der Thrombinoberfläche weg gerichtet sind.

Nach dieser unerwarteten Entdeckung deutlich besserer Aptamervarianten wurde getestet, ob deren Aktivität ebenfalls mit Hilfe der Gegenstrang-Strategie, diesmal am 3'-Ende, ausgeschaltet werden konnten. Im Falle des 3'-dA<sub>4</sub>-Linkers wurden verschieden lange Antisense-Regionen hinzugefügt (**A<sub>17</sub>**, **A<sub>18</sub>**, **A<sub>19</sub>** und **A<sub>20</sub>**). Es zeigte sich, dass fünf Gegenstrangnukleotide benötigt wurden, um die Aktivität des Aptamers auf Hintergrundniveau zu senken. Mit vier Thymidin-Resten als Linker am 3'-Ende (**A<sub>21</sub>** und **A<sub>22</sub>**) konnte selbst mit sechs Gegenstrang-Nukleotiden noch Antithrombinaktivität detektiert werden. Im Falle der Abasic Sites als 3'-Linker wurden neun Antisense-Nukleotide benötigt um das Aptamer vollständig auszuschalten (**A<sub>23</sub>**, **A<sub>24</sub>**, **A<sub>25</sub>** und **A<sub>26</sub>**). Das ist nicht verwunderlich, da auch von einer höheren Antithrombinaktivität ausgegangen wurde.

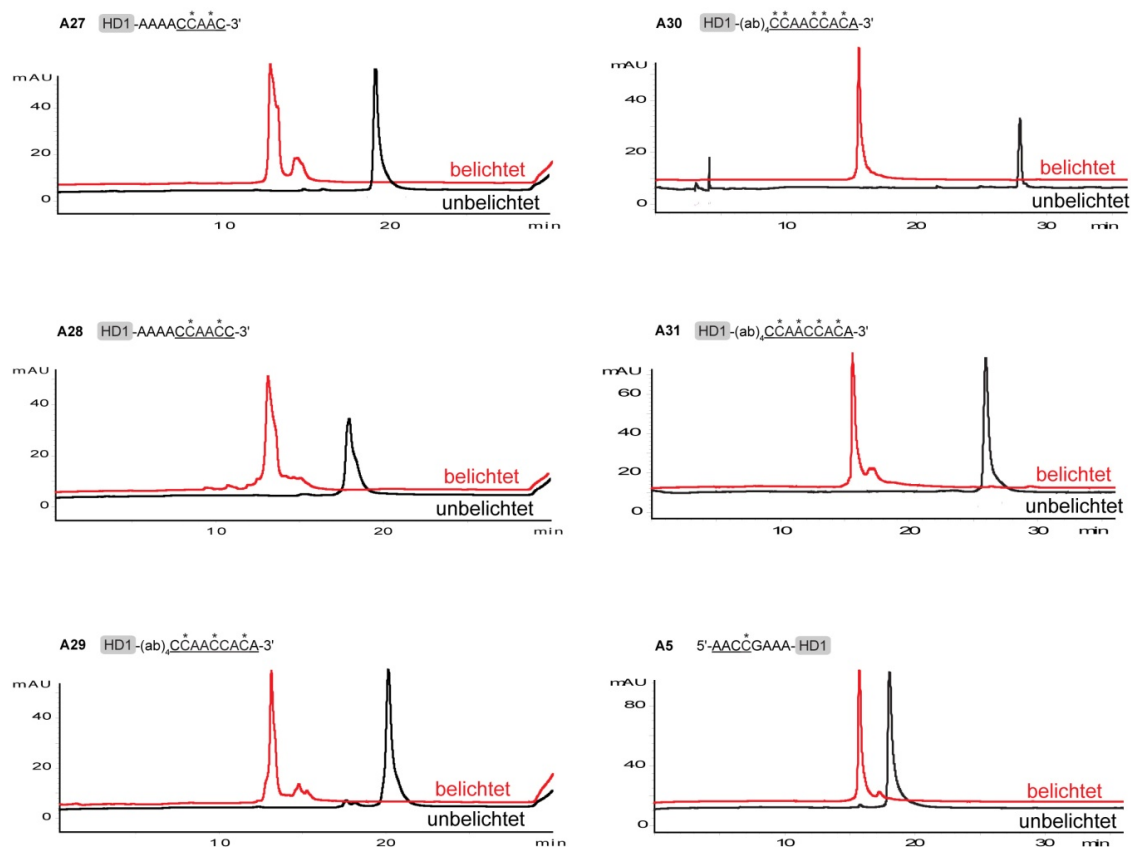
Da durch den Wechsel vom 5'-Ende zum 3'-Ende der Linker nicht mehr limitierender Faktor bezüglich der Aptameraktivität vor der Bestrahlung war, musste nun eine Strategie für die Einführung von photolabilen Schutzgruppen in die Gegenstrangregion gefunden werden, die eine vollständige, vorübergehende Maskierung der Antisense-Aktivität gewährleistet. Da die Antisense-Region im Falle der 3'-erweiterten Aptamere länger ausfallen musste, und schon im vorigen Projekt nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eventuell eine photolabile Schutzgruppe nicht ausreichte um die Antisense-Aktivität der vier Nukleotide umfassenden Gegenstrangregion vollständig zu unterdrücken, sollte in diesem Fall mehr als ein photoaktivierbares Nukleotidderivat in das Aptamer eingebaut werden. Da die Gegenstrangregion aus Desoxyadenosinresten und Desoxycytidinresten besteht, sollte zusätzlich zum bereits vorgestellten, photoaktivierbaren dC<sup>NPE</sup>-Derivat ein photoaktivierbares Desoxyadenosinderivat synthetisiert werden, damit die Positionen der photoaktivierbaren Nukleotide innerhalb der Gegenstrangregion frei gewählt werden konnten. Die Synthese eines N<sup>6</sup>-NPE-geschützten Desoxyadenosinderivats (NPE = 1-(2-Nitrophenyl)ethyl) erfolgte analog einer Synthese von N<sup>6</sup>-NPE-geschütztem Adenosin durch Silverman *et. al.*<sup>[42]</sup> Der Syntheseweg ist in Abb. 38 gezeigt. Die Synthese ging von kommerziell erhältlichem Desoxyinosin **79** aus (ChemGenes, USA), das unter Standardbedingungen an der 3'- und 5'-Position mit *tert*-Butyldimethylsilylgruppen (TBDMS) geschützt wurde. Die Umsetzung erfolgte quantitativ. Anschließend wurde das O<sup>6</sup> mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid **41** in eine Abgangsgruppe umgewandelt.



**Abb. 38: Synthese des photoaktivierbaren Desoxyadenosinphosphoramidits für die DNA-Festphasensynthese.**

Die Umsetzung erfolgte in Gegenwart von *N,N*-Dimethylaminopyridin und Diisopropylethylamin in Dichlormethan. Dieser Syntheseschritt war recht verlustreich, da man ein Regioisomerenmischung aus O<sup>6</sup>- bzw. N<sup>1</sup>-sulfonyliertem Desoxyinosin erhielt. Die N<sup>1</sup>-sulfonylierte Komponente wurde säulenchromatographisch abgetrennt. Das O<sup>6</sup>-aktivierte Inosinderivat **81** wurde mit dem Aminderivat der NPE-Gruppe (**75**) in Gegenwart einer Base (Diisopropylethylamin) in DMF mehrere Stunden erhitzt. Man erhielt mit 75 % Ausbeute das photoaktivierbare Desoxyadenosinderivat **82**. Anschließend wurden die TBDMS-Gruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (TBAF) quantitativ abgespalten. Das erhaltenen Nukleotidderivat **83** wurde an der 5'-OH-Gruppe mit einem leichten Überschuß von Dimethoxytritylchlorid in wasserfreiem Pyridin mit einer 4,4'-Dimethoxytritylgruppe geschützt (91 %). Anschließend erfolgte die Amiditierung mit Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und Diisopropylethylamin in wasserfreiem Dichlormethan. Das photoaktivierbare Phosphoramidit **85** wurde mit 80 % Ausbeute erhalten.

Das photoaktivierbare Desoxyadenosin-Phosphoramidit **85** wurde dann zusammen mit dem photoaktivierbaren dC<sup>NPE</sup>-Phosphoramidit für die DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode unter Standardbedingungen verwendet (Details siehe Experimenteller Teil). In Abb. 39 sind die Chromatogramme der verschiedenen synthetisierten, photolabil geschützten Aptamervarianten vor und nach Belichtung gezeigt.

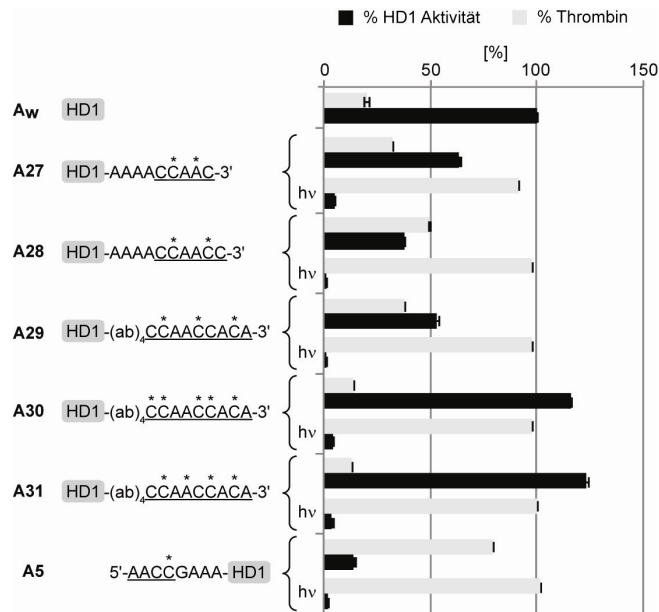


**Abb. 39: HPLC-Chromatogramme der synthetisierten, photodeaktivierbaren Aptamervarianten vor und nach Belichtung. (\* = photolabile Schutzgruppe)**

Die photoaktivierbaren Nukleotide sind als C\* bzw. A\* gekennzeichnet. Die Gegenstrang-Region ist unterstrichen. Man erkennt an der verschiedenen Retentionszeit vor und nach dem Belichten, dass alle hergestellten Aptamervarianten photoreaktiv sind. Je mehr photolabile Schutzgruppen ein DNA-Strang trägt, desto größer ist erwartungsgemäß der Retentionszeitunterschied. Die Chromatogramme auf der linken Seite von Abb. 39 wurden mit einer stärker benutzten Chromatographiesäule erhalten. Dadurch ist die Peakform unsymmetrischer und breiter. Dennoch erkennt man in allen Fällen, dass die Photoreaktion zu einem Hauptprodukt führt, selbst wenn ein Nukleinsäurestrang bis zu fünf photolabile Schutzgruppen enthält. Allerdings ist auch zu erkennen, dass in einigen Fällen geringe Mengen Nebenprodukt gebildet werden. Diese Beobachtung, dass die Qualität der Photoreaktion nicht nur von der verwendeten photolabilen Schutzgruppe und von der verwendeten Base abhängt, sondern auch von der Position der photoaktivierbaren Base innerhalb einer bestimmten Nukleinsäure, wurde auch schon in vorangegangenen Studien beobachtet.<sup>[134,135]</sup>

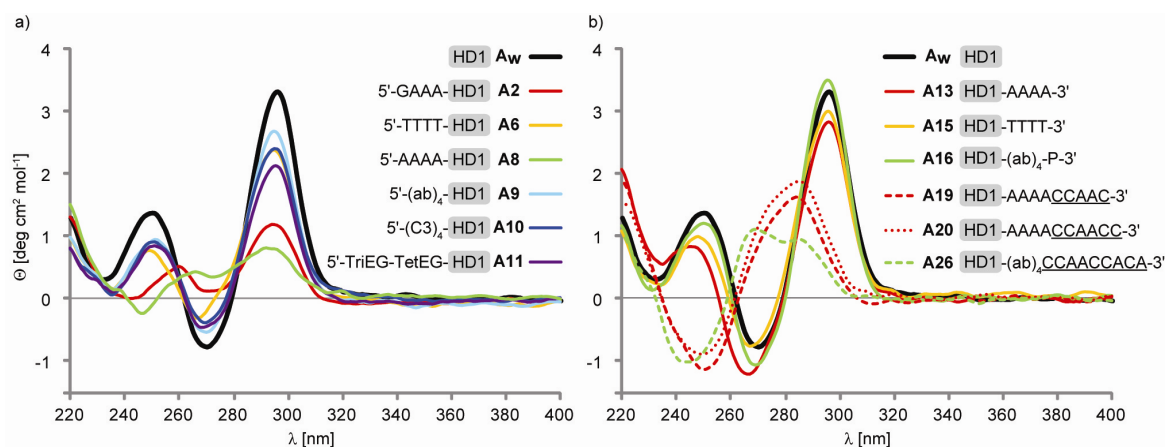
Die synthetisierten, photolabil geschützten Aptamervarianten wurden dann auf ihre Antithrombinaktivität getestet. Die Ergebnisse der Blutgerinnungsstudien vor und nach Belichtung sind in Abb. 40 zusammengefasst. Aptamer **A<sub>27</sub>** mit Adenosin-Linker und einer aus fünf Nukleotiden bestehenden Antisense-Region, in der zwei Basen photolabile Schutzgruppen tragen, zeigte vor dem Belichten nur 64 % **HD1**-Aktivität. Das ist ein klarer Hinweis darauf, dass zwei photolabil geschützte Nukleobasen nicht ausreichen um die Antisense-Aktivität der Gegenstrangregion vollständig zu

unterdrücken. Dies zeigt sich noch deutlicher bei Aptamer **A<sub>28</sub>**, dessen Antisense-Region sechs Nukleotide umfasst und zwei photolabile Schutzgruppen trägt. Bei den Aptamervarianten mit Abasic-Site-Linker reichten selbst drei photolabile Schutzgruppen nicht aus, um die neun Nukleotide umfassende Antisense-Region vollständig zu neutralisieren (**A<sub>29</sub>**). Mit vier (**A<sub>31</sub>**) bzw. fünf (**A<sub>30</sub>**) photolabilen Schutzgruppen erhielten wir dann allerdings Aptamere, die vor dem Belichten sogar eine höhere Antithrombinaktivität aufwiesen als **HD1** und die sich durch Belichten vollständig deaktivieren ließen.



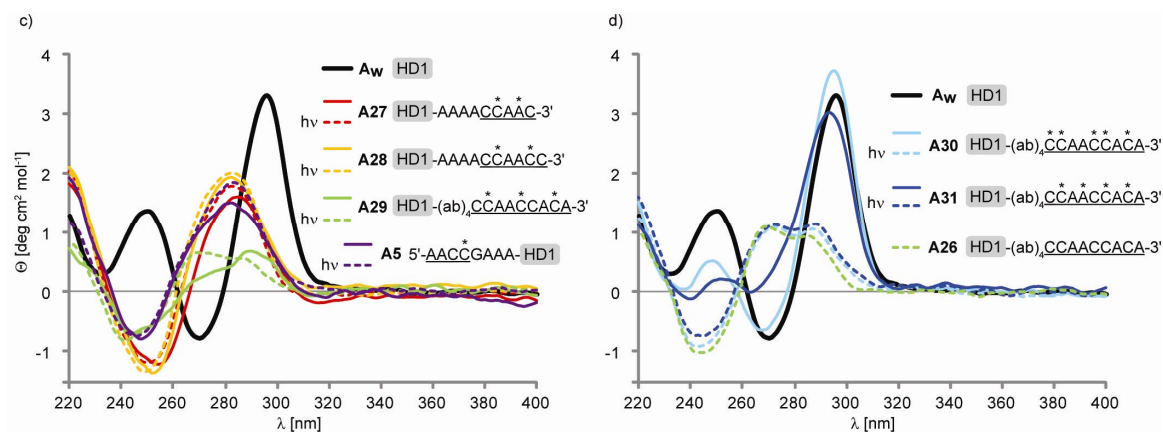
**Abb. 40: Blutgerinnungstests der photodeaktivierbaren Aptamervarianten. Die Blutgerinnungszeiten wurden auf die Zeit von HD1 normiert (schwarz). Die graue, reziproke Skala gibt die restliche Thrombinaktivität an. (\* = photolabile Schutzgruppe)**

Um zusätzlich zu den funktionellen Studien auch strukturelle Informationen über unsere photolabil geschützten Aptamervarianten zu erhalten, wurden CD-Spektren der verschiedenen Nukleinsäuren vor und nach dem Belichten gemessen. Abb. 41 a) zeigt die CD-Spektren der am 5'-Ende erweiterten Aptamere. Das Wildtyp-Aptamer **HD1**, zum Vergleich, zeigt das für eine antiparallele G-Quadruplexstruktur typische Spektrum mit einem starken Maximum bei ca. 290 nm und einem Minimum bei ca. 270 nm.<sup>[140]</sup> Die Aptamere **A<sub>6</sub>**, **A<sub>9</sub>**, **A<sub>10</sub>** und **A<sub>11</sub>** zeigen ein Spektrum das dem von **HD1** sehr ähnlich ist, allerdings mit geringerer Intensität. Die CD-Spektren der Aptamere **A<sub>2</sub>** und **A<sub>8</sub>** dagegen weichen deutlich vom **HD1**-Spektrum ab und deuten damit auf eine Struktur dieser Aptamere in Lösung hin, die sich von **HD1** unterscheidet. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der Blutgerinnungsstudien, in denen die Aptamere **A<sub>6</sub>**, **A<sub>9</sub>**, **A<sub>10</sub>** und **A<sub>11</sub>** deutliche Antithrombinaktivität zeigten, allerdings nicht so gut wie **HD1**, während die Aptamere **A<sub>2</sub>** und **A<sub>8</sub>** die schlechtesten Ergebnisse lieferten.



**Abb. 41:** CD-Spektren der aufgeführten Aptamervarianten (ab = Abasic Site, C3 = Propyl-Spacer-Nukleotid, TriEG = Triethylenglykol-Nukleotid, TetEG = Tetraethylenglykol-Nukleotid).

In Abb. 41 b) sind die CD-Spektren einiger am 3'-Ende erweiterten Aptamere zu sehen. Die Aptamere **A13**, **A15** und **A16**, jeweils ohne Antisense-Region, zeigen CD-Spektren, die dem von **HD1** sehr nahe kommen. Dabei hat das Aptamer **A16**, das die höchste Antithrombinaktivität aufweist, die höchste Intensität des G-Quadruplex-typischen Absorptionsmusters. Die CD-Spektren der am 3'-Ende erweiterten Aptamere mit Antisense-Region, **A19**, **A20** und **A26**, unterscheiden sich dagegen deutlich. Dies bestätigt die Annahme, dass die Antisense-Region eine andere Konformation der Aptamere in Lösung bewirkt, und ist somit eine Erklärung für den erwünschten Verlust der Antithrombinaktivität.



**Abb. 42:** CD-Spektren der aufgeführten Aptamervarianten vor und nach ( $h\nu$ ) Belichtung. ( $A^* = dA^{NPE}$ ,  $C^* = dC^{NPE}$ , ab = Abasic Site, C3 = Propyl-Spacer-Nukleotid, TriEG = Triethylenglykol-Nukleotid, TetEG = Tetraethylenglykol-Nukleotid).

Die CD-Spektren der photodeaktivierbaren Aptamere **A27**, **A28** und **A29** (Abb. 42 c)) und auch das CD-Spektrum des in der vorigen Studie entwickelten Aptamers **A5** weichen erstaunlicherweise deutlich vom **HD1**-Spektrum ab und ändern sich auch durch Belichtung nur wenig, obwohl die genannten Aptamervarianten vor dem Belichten in den Blutgerinnungsexperimenten deutliche Antithrombinaktivität aufwiesen. Möglicherweise wird durch adaptive Bindung an Thrombin das

Konformationsgleichgewicht auf die Seite der aktiven G-Quadruplexstruktur verschoben.<sup>[141]</sup> Eine solche Konformationsänderung wurde bereits von Hamaguchi *et. al.* genutzt um auf der Grundlage von **HD1** einen Aptamer-Beacon zu entwickeln, der zur Detektion von Thrombin genutzt werden kann, da es in dessen Anwesenheit von einer Haarnadelkonformation in die G-Quadruplexstruktur übergeht.<sup>[142]</sup> Auf jeden Fall ist dies ein weiterer starker Hinweis darauf, dass die Anzahl der verwendeten photolabilen Schutzgruppen nicht ausreicht, um die Antisense-Aktivität der Gegenstrangregion vollständig zu unterdrücken.

In Abb. 42 d) schließlich sind die CD-Spektren der Aptamere **A<sub>30</sub>** und **A<sub>31</sub>** jeweils vor und nach dem Belichten zusammengefasst. Vor dem Belichten zeigen beide Aptamere deutlich das Signal einer G-Quadruplexstruktur. Nach dem Belichten sind die CD-Spektren deutlich verändert und gleichen dem von Aptamer **A<sub>26</sub>**, was übereinstimmend mit den HPLC-Chromatogrammen die vollständige Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen bestätigt. Die Beobachtungen aus den CD-Spektren stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Blutgerinnungsstudien.

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen zeigen auch, dass die Aptamere mit 5'-Modifikation in Abwesenheit von Thrombin in Lösung eine andere Struktur aufweisen als die Aptamere mit 3'-Modifikation (jeweils ohne Gegenstrang). Dieser Unterschied war nicht von vornherein zu erwarten, da in der antiparallelen G-Quadruplexstruktur das 5'-Ende und das 3'-Ende relativ nahe beieinander liegen.

### 2.1B.3 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieses Projektes war es, die Ursachen für den Aktivitätsverlust des photodeaktivierbaren Aptamers **A<sub>5</sub>** gegenüber dem Wildtypaptamer **HD1** (**A<sub>w</sub>**) zu analysieren und die gewonnenen Erkenntnisse dafür zu nutzen, eine verbesserte, mit Licht deaktivierbare Antithrombin-Aptamervariante zu entwickeln, deren Antithrombinaktivität vor dem Belichten der von **HD1** gleichkommt. Dabei wurde zunächst der Einfluss des Linkers auf die Aktivität des Aptamers untersucht. Den größten Einfluss hatte dabei unerwarteter Weise nicht die Art des Linkers (verschiedene Sequenzen, Abasic Sites, aliphatische oder Glykol-Derivate) sondern der Unterschied ob die **HD1**-Sequenz am 5'-Ende oder am 3'-Ende erweitert wurde. Die am 3'-Ende erweiterten Aptamere zeigten dabei sogar eine deutlich höhere Antithrombinaktivität als **HD1**. Das Aptamer mit Abasic Sites als 3'-Erweiterung (**A<sub>16</sub>**) übertraf selbst das ebenfalls an die Exosite I bindende, blutgerinnungshemmende Aptamer **NU172** (Archemix Corporation), das gegenwärtig in einer klinischen Studie der Phase II untersucht wird,<sup>[139]</sup> und stellt damit zusätzlich ein potentielles Antikoagulan dar. Im zweiten Schritt wurde eine photolabil geschützte Antisense-Region eingeführt. Im Falle einer aus neun Nukleotiden bestehenden Antisense-Region waren vier (**A<sub>31</sub>**) bis fünf (**A<sub>30</sub>**) photolabil geschützte Nukleotide notwendig, um die Antisenseaktivität vollständig zu unterdrücken. Hier zeigt sich, dass verhältnismäßig mehr photolabil geschützte Nukleotide notwendig sind, um

Doppelstrangbildung zu verhindern, da hier der räumliche Anspruch der photolabilen Schutzgruppe vermutlich nur mäßig zum Tragen kommt. Bei einer flächigen Wechselwirkung hingegen, z. B. zwischen dem Aptamer **HD1** und Thrombin reicht schon eine photolabile Schutzgruppe an entscheidender Stelle aus, um die Bindung zu verhindern.<sup>[134]</sup> Mit den Aptameren **A<sub>30</sub>** und **A<sub>31</sub>** konnten wir zwei Aptamere herstellen, die vor dem Belichten eine höhere Aktivität aufwiesen als **HD1**, und deren Antithrombinaktivität sich durch Belichtung vollständig ausschalten ließ. Damit stellt das beschriebene System eine deutliche Verbesserung gegenüber der in Kapitel **2.1A** beschriebenen Studie dar.

Die gemessenen CD-Spektren zeigen eine Korrelation zwischen der Ausprägung der G-Quadruplexstruktur in Lösung und der Antithrombinaktivität der verschiedenen Aptamervarianten. Auf den gefundenen unterschiedlichen Einfluss zwischen 5'- und 3'-Erweiterung gibt es bereits Hinweise in anderen Studien.<sup>[143]</sup> Auch in dieser Studie konnten die entsprechenden Ursachen nicht vollständig erklärt werden. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen werden gegenwärtig in einer Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Harald Schwalbe (Universität Frankfurt) NMR-Experimente in Lösung von verschiedenen Aptamervarianten durchgeführt.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie zeigt auch die Vorteile der Verwendung irreversibel abspaltbarer photolabiler Schutzgruppen auf, nämlich, dass man einfacher zu einem eindeutigen An-Aus-Verhalten vor bzw. nach dem Belichten gelangt, als dies mit reversiblen Photoschaltern möglich ist.<sup>[144]</sup>

Das nahezu digitale Schaltverhalten unserer photoaktivierbaren Antisense-Region ermöglicht deren Verwendung in einem komplexeren experimentellen System, ohne dessen Effektivität nachteilig zu beeinflussen. Dadurch werden kompliziertere Experimente überhaupt erst machbar.

In einer aktuell noch andauernden Studie, die Bestandteil der Doktorarbeit von Timo Mack ist, soll eine photodeaktivierbare Aptamervariante kovalent über einen photospaltbaren Linker mit Thrombin verknüpft werden. Dadurch kann das vorübergehend inaktivierte Thrombin systemisch appliziert werden, ohne die Gefahr, dass durch hohe Verdünnung der Komplex dissoziieren kann und dadurch Thrombinaktivität freigesetzt würde. Lokal könnte dann an lichtzugänglichen Stellen (z.B. Haut, Netzhaut) oder durch Lichtleitfasern in Blutgefäßen lokal Thrombinaktivität freigesetzt werden und dadurch ein lokaler Thrombus induziert werden, sollte dies medizinisch erwünscht sein.<sup>[145]</sup>



## 2.2 Lichtgesteuerte Genregulation mit dem *glmS*-Ribozym

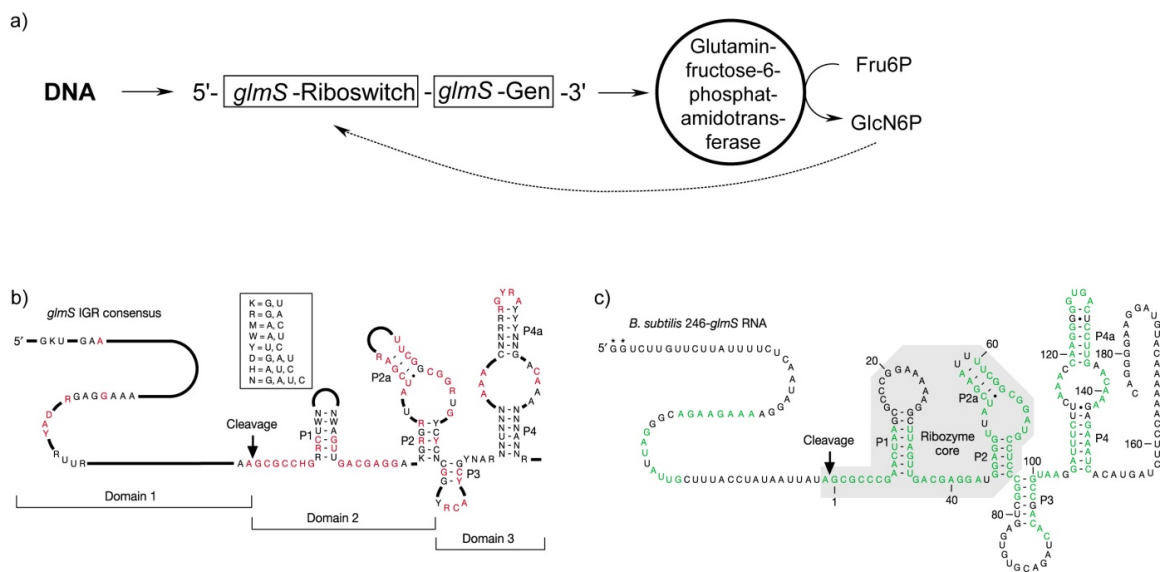
### 2.2.1 Einleitung

In diesem Kapitel wird der Versuch beschrieben, einen Riboswitch mit Licht zu kontrollieren und dadurch die durch den Riboswitch regulierte Translation ebenfalls lichtabhängig zu machen. Bei Riboswitches handelt es sich um nicht kodierende RNA-Elemente, die meistens in der 5'-UTR (Untranslatierte Region) bakterieller mRNA zu finden sind.<sup>[30]</sup> Durch Bindung der entsprechenden Effektormoleküle kommt es zu einer Konformationsänderung der Riboswitches, wodurch die Transkription oder die Translation der entsprechenden mRNA reguliert wird.<sup>[146]</sup> Um Riboswitches zur künstlichen Kontrolle von Genexpression zu verwenden, ist es notwendig, zu verhindern, dass die angestrebte Regulation mit der natürlich vorhandenen Konzentration des entsprechenden Effektormoleküls interferiert. Um das zu erreichen, kann entweder ein bakterieller Riboswitch für die Expressionskontrolle in Eukaryonten verwendet werden, in deren Stoffwechsel das entsprechende Effektormolekül nicht vorkommt, oder es können synthetische Riboswitches verwendet werden, deren Aptamerdomäne auf synthetische kleine organische Moleküle reagiert.<sup>[147]</sup>

Da die mRNA, die den Riboswitch enthält, durch Transkription in den verwendeten Organismen immer wieder neu hergestellt wird, ist es nicht möglich, diese gezielt mit photolabilen Schutzgruppen zu modifizieren. Es sei denn, die photoaktivierbare mRNA wird der Zelle von außen zugeführt. Dies ermöglicht es allerdings nicht die Translation eines endogenen Gens mit Licht zu beeinflussen. Eine sinnvolle Strategie, um die Regulationsaktivität von Riboswitches mit Licht zu kontrollieren, ist, ein photolabil geschütztes Derivat des entsprechenden Effektormoleküls zu verwenden und lichtinduziert freizusetzen. Diese Strategie wurde bereits dazu verwendet, die Spaltung sogenannter Aptazyme mit Licht zu induzieren. Bei Aptazymen handelt es sich um Hammerhead-Ribozyme, die mit unterschiedlichen Aptamerdomänen ausgestattet wurden, um deren Spaltung abhängig zu machen von den Molekülen, die durch die Aptamerdomänen erkannt werden. Modifiziert man die entsprechenden Effektormoleküle mit photolabilen Schutzgruppen, so kann man die Aptazym-Aktivität mit Licht regulieren.<sup>[148]</sup> Sen *et al.* berichteten von einem Aptazym, dessen Aptamerdomäne zwischen den beiden isomeren Formen von Dihydropyren, einem reversiblen Photoschalter, differenzieren kann, und dessen Aktivität durch abwechselnde Bestrahlung mit UV-Licht und sichtbarem Licht reversibel kontrolliert werden kann.<sup>[149]</sup> Da die meisten synthetischen Aptazyme auf eine  $Mg^{2+}$ -Konzentration angewiesen sind, die deutlich über der physiologischen Konzentration liegt, eignen sie sich nur bedingt für eine Anwendung *in vivo*. Abhilfe könnten erweiterte Hammerhead-Ribozym-Varianten schaffen, die unter physiologischen Bedingungen ausreichende Aktivität aufweisen.<sup>[150,151]</sup>

## Der *glmS*-Riboswitch

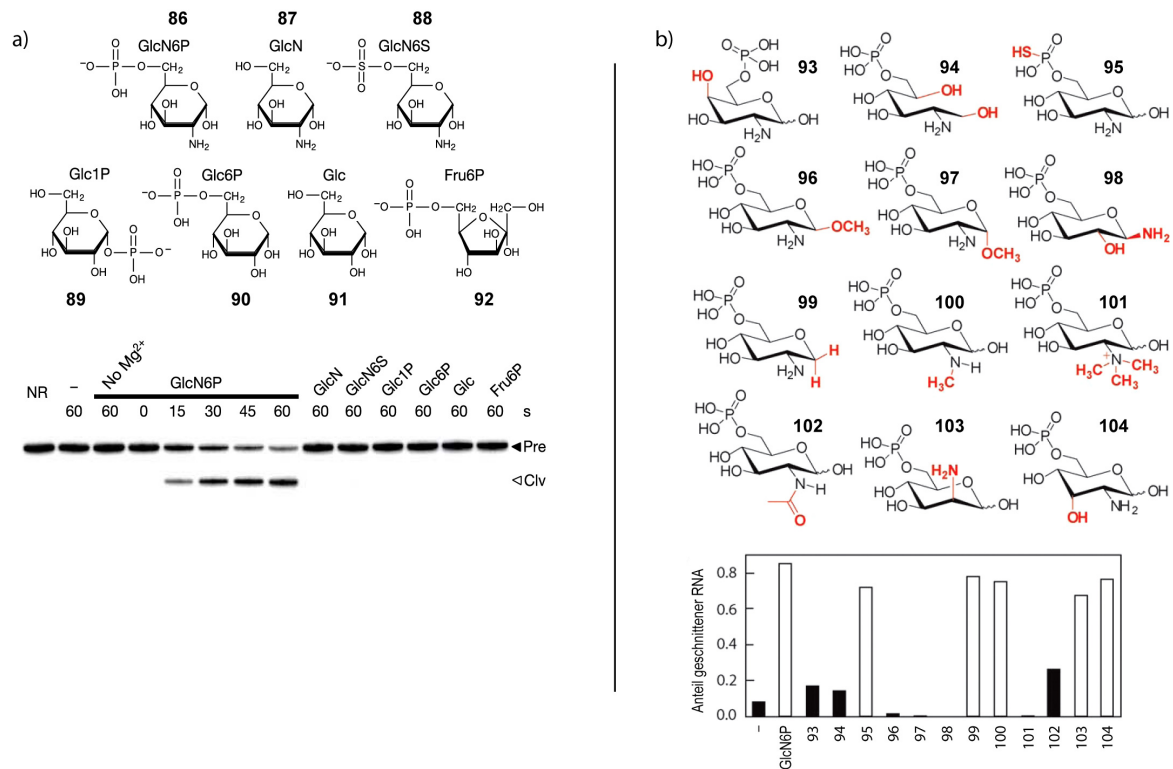
Bei der Untersuchung des Genoms von *Bacillus subtilis* fand die Arbeitsgruppe um Ronald Breaker ein neues, die Translation regulierendes, RNA-Element in der 5'-UTR des *glmS*-Gens.<sup>[152]</sup> Das *glmS*-Gen kodiert das Enzym Glutaminfructose-6-phosphat-amidotransferase, das die Synthese von Glukosamin-6-phosphat (GlcN6P, **86**) aus Fructose-6-phosphat und Glutamin katalysiert. Glukosamin-6-phosphat ist ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Zellwandsynthese in gram-positiven Bakterien. Es zeigte sich, dass das neu entdeckte Regulationselement auf die Anwesenheit von GlcN6P mit einer autokatalytischen Spaltung der mRNA reagierte. Dadurch kann die Expression des *glmS*-Gens durch negative Rückkopplung entsprechend der vorhandenen GlcN6P-Konzentration reguliert werden. Der Zusammenhang ist in Abb. 43 a) dargestellt.



**Abb. 43:** a) Der *glmS*-Riboswitch in der 5'-UTR des *glmS*-Gens reagiert auf die Anwesenheit von GlcN6P mit autokatalytischer Spaltung der mRNA, wodurch die Expression des *glmS*-Gens eingeschränkt wird. b) konservierte Sequenz des *glmS*-Riboswitches in verschiedenen gram-positiven Bakterien.<sup>[152]</sup> c) Sequenz des *glmS*-Riboswitches aus *Bacillus subtilis*.<sup>[152]</sup>

Der *glmS*-Riboswitch wurde noch in 17 weiteren gram-positiven Bakterienarten in der 5'-UTR des *glmS*-Gens gefunden. Die konservierten Bereiche sind in Abb. 43 b) dargestellt. In Abb. 43 c) ist die Sequenz des *glmS*-Riboswitches aus *Bacillus subtilis* gezeigt.<sup>[152]</sup> Der grau hinterlegte Bereich zeigt das minimale Motiv des Riboswitches, das noch eine Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der GlcN6P-Konzentration aufweist. Das *glmS*-Ribozym ist der einzige bekannte, natürlich vorkommende, katalytische Riboswitch.

Breaker *et al.* konnten zeigen, dass das *glmS*-Ribozym spezifisch auf die Anwesenheit von GlcN6P reagiert. Analoge Substanzen führten nicht zu einer Spaltung der RNA (Abb. 44 a)). In Gegenwart von 200  $\mu$ M GlcN6P sank die Halbwertszeit der RNA von 4 Stunden in Abwesenheit von GlcN6P auf 15 Sekunden.<sup>[152]</sup>

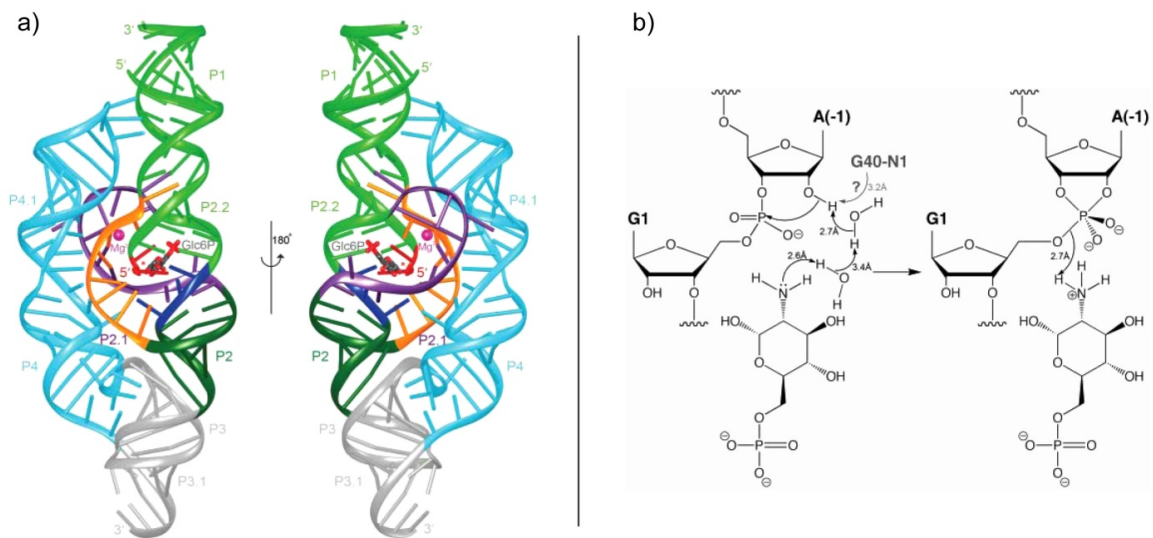


**Abb. 44:** a) Der *glmS*-Riboswitch reagiert spezifisch auf die Anwesenheit von GlcN6P (nach Winkler *et al.*<sup>[152]</sup>) b) Test verschiedener GlcN6P-Derivate auf ihre Fähigkeit, das *glmS*-Ribozym zu aktivieren (nach Lim *et al.*<sup>[153]</sup>)

Verschiedene Studien befassten sich mit der Frage, ob das GlcN6P nur die Rolle eines allosterischen Liganden spielt, oder ob es direkt an der katalytischen Reaktion der RNA-Spaltung beteiligt ist. Dabei zeigte sich, dass die Aminofunktion für die RNA-Spaltung essentiell ist, und dass das gebundene GlcN6P in unmittelbarer Nähe zum katalytischen Zentrums des Ribozyms liegt, was dafür spricht, dass das GlcN6P die Rolle eines Coenzym spielt, das direkt am Katalysemechanismus beteiligt ist.<sup>[154,155]</sup> Breaker *et al.* testeten verschiedene GlcN6P-Derivate um die Voraussetzungen für die Aktivierung des Ribozyms genauer zu verstehen. Die Ergebnisse zeigten, dass das freie Elektronenpaar der Aminogruppe als möglicher Protonenakzeptor oder, in protonierter Form, als Protonendonator essentiell ist (Abb. 44 b)). Ist die Aminogruppe einfach methyliert, so zeigt die entsprechende Verbindung (**100**) fast die gleiche Aktivität wie GlcN6P. Eine acylierte Aminogruppe dagegen (Verbindung **102**) setzt die Aktivität bereits deutlich herab und ein dreifach methyliertes quartäres Ammoniumion (Verbindung **101**) ist vollständig inaktiv.<sup>[153]</sup>

Einen genaueren Einblick in die Funktionsweise des *glmS*-Ribozyms brachten kristallographische Untersuchungen. Etwa zeitgleich wurden von Ferré-D'Amaré *et al.* und von Strobel *et al.* einige Kristallstrukturen verschiedener Derivate des *glmS*-Ribozyms veröffentlicht.<sup>[156,157]</sup> Beide Studien beschreiben übereinstimmend, dass die Strukturen des Ribozyms mit und ohne gebundenen Liganden und auch nach erfolgter Spaltung nur minimal voneinander abweichen. Das Modell einer präorganisierten Bindungstasche für das GlcN6P und die ähnliche Struktur vor und nach der

Spaltungsreaktion wurde schon in einer Studie mittels Hydroxylradikal-Footprinting entwickelt und wird durch die Erkenntnisse der Kristallstrukturanalysen bestätigt.<sup>[158]</sup>



**Abb. 45:** a) Struktur des *glmS*-Ribozyms mit gebundenem Glukose-6-phosphat.<sup>[156]</sup> b) Von Ferré-D'Amaré *et al.* vorgeschlagener Katalysemechanismus.<sup>[156]</sup>

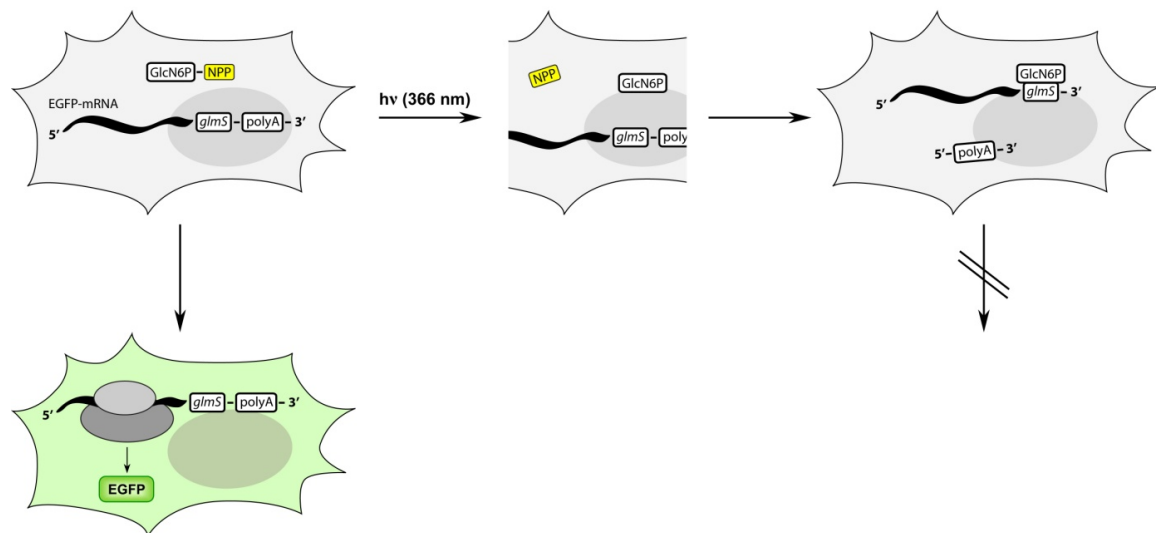
In Abb. 45 a) ist die Struktur einer *glmS*-Ribozymvariante aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* mit gebundenem, zu GlcN6P isosterelem, Glukose-6-phosphat aus der Studie von Ferré-D'Amaré *et al.* gezeigt. Das Ribozym besteht aus drei coaxial nebeneinander liegenden Stapeln von RNA-Helices. Das gebundene Glc6P liegt in unmittelbarer Nähe zur Phosphodiesterbrücke an der die Spaltung der RNA stattfindet. In Abb. 45 b) ist der von Ferré-D'Amaré *et al.* postulierte Mechanismus der Spaltungsreaktion gezeigt. Dabei vermitteln zwei Wassermoleküle die Basizität der Aminogruppe des GlcN6P um die 2'-OH-Gruppe des A(-1) zu aktivieren. Es erfolgt der nukleophile Angriff der 2'-OH-Gruppe auf die Phosphatgruppe und die Abspaltung der 5'-OH-Gruppe des G(1), die ihr Proton wiederum von der protonierten Aminogruppe des GlcN6P erhält. Ferré-D'Amaré *et al.* erhielten allerdings keine Kristalle mit gebundenem GlcN6P. Strobel *et al.* dagegen konnten in ihrer Struktur eines *glmS*-Ribozyms mit gebundenem GlcN6P die beiden Wassermoleküle nicht finden und sehen den Beitrag des GlcN6Ps eher in der Aktivierung des 5'-Sauerstoffes. Dafür spricht auch der pKs-Wert von 8,2 der Aminogruppe des GlcN6Ps, was dazu führt, dass die Aminogruppe unter physiologischen Bedingungen vorwiegend protoniert vorliegt.<sup>[157]</sup> Das zyklische Phosphat des 5'-Spaltungsproduktes wurde schon von Breaker *et al.* nachgewiesen.<sup>[152]</sup>

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass Winkler *et al.* Hinweise darauf fanden, dass die regulatorische Wirkung des *glmS*-Riboswitches in Prokaryonten darauf beruht, dass die 5'-OH-Gruppe des 3'-Spaltungsproduktes ein Signal zum gezielten Abbau der mRNA durch bestimmte RNAsen darstellen könnte.<sup>[159]</sup>

Für künstliche Genregulation ist das *glmS*-Ribozym möglicherweise das ideale Werkzeug, da ein Molekül GlcN6P durch seine katalytische Aktivität mehrere *glmS*-Ribozyme spalten kann. Dadurch kann ein stärkeres Signal erreicht werden, als bei Riboswitches, deren regulatorische Wirkung lediglich auf einer Konformationsänderung in Anwesenheit eines gebundenen Effektormoleküls beruht.

## 2.2.2 Zielsetzung / Planung

Dieses Projekt handelt von der Entwicklung eines Systems, mit dem sich die Expression eines Reportergens in eukaryontischen Zellen lichtgesteuert regulieren lässt. Als regulatorisches Element wurde der *glmS*-Riboswitch ausgewählt. Der *glmS*-Riboswitch reagiert auf GlcN6P durch autokatalytische Spaltung der mRNA wodurch in Prokaryonten die Synthese von GlcN6P gesteuert wird. GlcN6P ist eine wichtige Vorstufe für die Zellwand-Biosynthese in Bakterien. In Eukarionten dient Glukosamin (GlcN) als Ausgangsverbindung für die Synthese von Glukosaminoglykanen und N-glykosylierten Proteinen, wobei GlcN6P nur als temporäres Zwischenprodukt auftritt. Da die Proteinmodifikation mit Glykanen hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat stattfindet, ist ein GlcN6P-abhängiger Riboswitch eventuell für die exogene Kontrolle eukaryontischer Genexpression innerhalb des Zytoplasmas geeignet.



**Abb. 46:** Schematische Darstellung des geplanten Experiments: Das photolabil geschützte GlcN6P wird nicht vom *glmS*-Riboswitch erkannt und EGFP wird exprimiert. Durch Belichten wird GlcN6P freigesetzt. Dieses bindet an den *glmS*-Riboswitch und induziert die Abspaltung der polyA-Sequenz am 3'-Ende der mRNA. Infolgedessen wird kein EGFP mehr exprimiert und die Fluoreszenz der Zellen nimmt ab.

Als Reportergen wurde EGFP (Enhanced Green Fluorescing Protein) ausgewählt. Der *glmS*-Riboswitch sollte in die 3'UTR der *EGFP*-mRNA integriert werden. Durch Belichtung einer photolabil geschützten Variante von GlcN6P würde eine autokatalytische Spaltung der mRNA innerhalb der 3'-UTR induziert, wodurch der poly-A-Schwanz abgetrennt würde. Durch die nun fehlende, proteinvermittelte Assoziation der 3'- und 5'-Enden der mRNA sollte diese schlechter vom Ribosom erkannt werden und dadurch die Translation verhindert werden. Denkbar wäre auch eine Integration des *glmS*-Riboswitches in die 5'-UTR des *EGFP*-Gens, allerdings bestünde die Gefahr, dass die stabile Sekundärstruktur des Ribozyms an sich schon die Translation erschweren könnte. Daher sollte der Riboswitch zunächst nur in die 3'-UTR integriert werden. (Abb. 46)

Da die Ergebnisse vorangegangener Studien<sup>[153]</sup> darauf hindeuteten, dass die Aminofunktion des GlcN6P eine essentielle Rolle bei der autokatalytischen Spaltung des *glmS*-Ribozyms spielt, und auch die veröffentlichten Kristallstrukturen<sup>[156,157]</sup> des *glmS*-Ribozyms darauf hindeuten, dass die Aminogruppe des GlcN6P mit einer Säure-Base-Reaktion direkt am Spaltungsmechanismus beteiligt ist, erschien uns diese Position ideal für eine Modifikation mit einer photolabilen Schutzgruppe, so dass das entsprechende GlcN6P-Derivat nicht mehr dazu in der Lage sein sollte, die Ribozym-Spaltung zu induzieren.

Anschließend sollte das synthetisierte, lichtaktivierbare GlcN6P-Derivat zunächst auf seine Fähigkeit untersucht werden, lichtabhängig die Spaltung einer das *glmS*-Ribozym enthaltenden RNA zu induzieren. Sollte dies gelingen, sollte der *glmS*-Riboswitch in die 3'-UTR des *EGFP*-Gens eingefügt werden und mit entsprechenden RNA-Transkripten sollten ebenfalls *in vitro* lichtabhängige Spaltungsversuche durchgeführt werden. Bei entsprechendem Erfolg würden dann die Experimente in Zellkultur erfolgen.

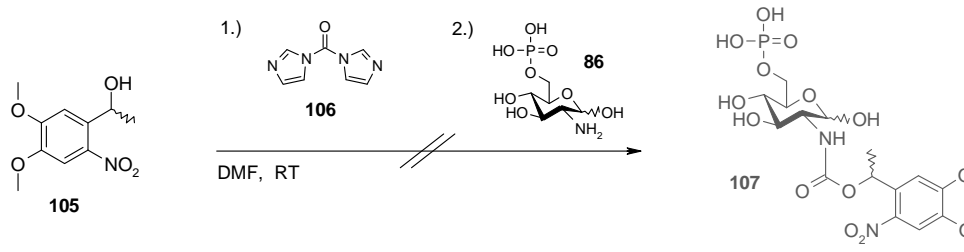
Die beschriebene Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Prof. Günter Mayer (LIMES, Universität Bonn) durchgeführt. Die Synthese des photoaktivierbaren GlcN6P war dabei meine Aufgabe, während die Herstellung der *glmS*-Konstrukte, die lichtabhängigen Aktivitätstests und die Zellkulturversuche durch den Arbeitskreis Mayer erfolgten.

### 2.2.3 Durchführung und Ergebnisse

#### Synthese einer lichtaktivierbaren GlcN6P-Variante

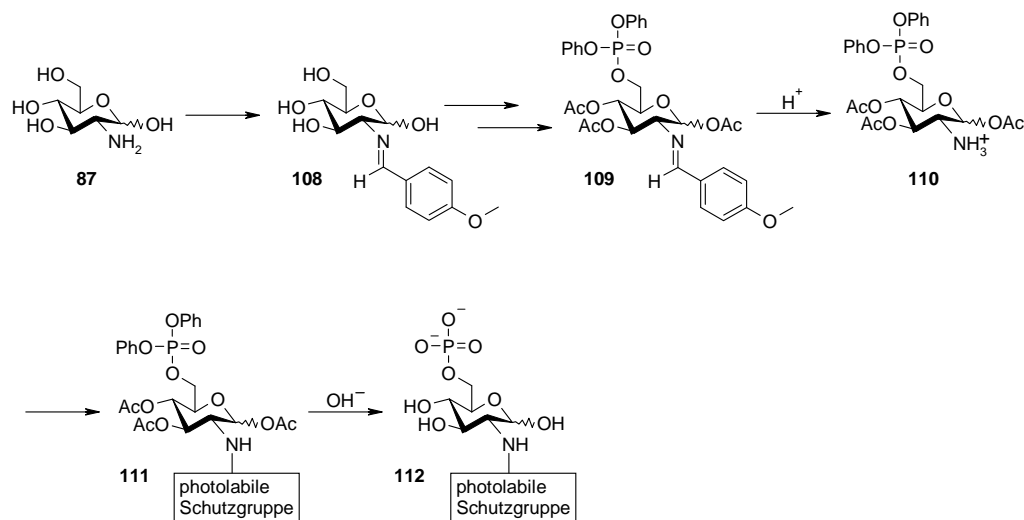
Als erstes wurde der Versuch unternommen, unter der Ausnutzung der größeren Nukleophilie der Aminogruppe gegenüber den Hydroxygruppen das gewünschte photolabil geschützte GlcN6P-Derivat eventuell direkt aus GlcN6P und einem entsprechenden Vorläufer einer photolabilen Schutzgruppe herzustellen. Dadurch würde ein mehrstufiger Syntheseweg mit aufwendiger Schutzgruppenchemie

umgangen. Bochet *et al.* berichteten von Experimenten in denen sie verschiedene Alkohole mit 1,1'-Carbonyldiimidazol zum entsprechenden Imidazolid umsetzten und *in situ* mit einem Amin abfingen. Sie erhielten die entsprechenden Carbamate in über 85 % Ausbeute.<sup>[160]</sup> Um diese Vorgehensweise auf unser Synthesvorhaben zu übertragen, wurde 1-(2-Nitro-4,5-dimethoxyphenyl)ethanol (**105**, Abb. 47) mit Carbonyldiimidazol **106** in wasserfreiem DMF umgesetzt. Nach zwei Stunden wurde Glukosamin-6-phosphat **86** hinzugefügt. Leider konnte jedoch das gewünschte Produkt nicht erhalten werden. Eine DC-Untersuchung der Reaktionsmischung zeigte keine Umsetzung. Es wurde DBU hinzugefügt, aber auch dadurch konnte keine Reaktion erzwungen werden.



**Abb. 47:** Umsetzung von 1-(2-Nitro-4,5-dimethoxyphenyl)ethanol **105** mit Carbonyldiimidazol **106** und GlcN6P **86** führt nicht zum gewünschten Produkt.

Da GlcN6P über eine Vielzahl an funktionellen Gruppen verfügt, und eine direkte Modifikation der Aminogruppe in Gegenwart der anderen funktionellen Gruppen in einem ersten Versuch nicht zum Erfolg führte, sollte die photoaktivierbare GlcN6P-Variante schrittweise aufgebaut werden. Der Synthesepan lehnt sich dabei an eine von Maley *et al.* veröffentlichte Synthese von *N*-Acetylglukosamin-6-phosphat an.<sup>[161]</sup> Der geplante Syntheseweg ist in Abb. 48 gezeigt.



**Abb. 48:** Synthesepan für die Herstellung eines lichtaktivierbaren Glukosamin-6-phosphat-Derivats.

Der Vorteil dieser Syntheseroute liegt darin, dass das Grundgerüst des GlcN6P bereits zu Beginn der Synthese aufgebaut wird, das Phosphat und die Hydroxygruppen aber in geschützter Form vorliegen, so dass die GlcN6P-Derivate weiterhin in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Das ermöglicht auch im weiteren Verlauf der Synthese Reaktionen, die wasserfreie Bedingungen erfordern. Im ersten Schritt soll die Aminogruppe des Glukosamins selektiv geschützt werden. Anschließend erfolgt die Einführung der phenylgeschützten Phosphatgruppe. *In situ* werden die Hydroxygruppen acetyliert. Anschließend kann unter sauren Bedingungen die Aminogruppe selektiv freigesetzt und mit einer photolabilen Schutzgruppe modifiziert werden. Im letzten Schritt würde die Freisetzung des Phosphats und der OH-Gruppen unter alkalischen Bedingungen erfolgen.

Die ersten Schritte der Synthese bis zur Isolierung der Aminofunktion erfolgten nach Literaturvorschrift (Abb. 49). Glukosamin **87** wurde mit Anisaldehyd **113** zum Imin umgesetzt.<sup>[162]</sup> Die Reaktion lieferte das 2-*N*-(4-Methoxybenzyliden)-*D*-glukosamin **108** mit 85 % Ausbeute. Anschließend wurde in wasserfreiem Pyridin die 6'-OH-Gruppe selektiv mit Phosphorsäurediphenylesterchlorid modifiziert, und nach 15 Stunden Reaktionszeit wurden durch Zugabe von Essigsäureanhydrid *in situ* die verbleibenden OH-Gruppen acetyliert.<sup>[161]</sup> Dabei ist es wichtig, dass die Zugabe des Phosphorsäurediphenylesterchlorid bei niedrigen Temperaturen (-20°C) erfolgt, damit selektiv die 6'-OH-Gruppe phosphoryliert wird. Das geschützte GlcN6P-Derivat **109** wurde mit moderater Ausbeute von 41 % erhalten. Durch Zugabe von Salzsäure zu einer siedenden Lösung von Verbindung **109** in Aceton wurde die Aminogruppe entschützt. Das entsprechende GlcN6P-Derivat wurde als Hydrochlorid **110** mit 84 % Ausbeute erhalten.

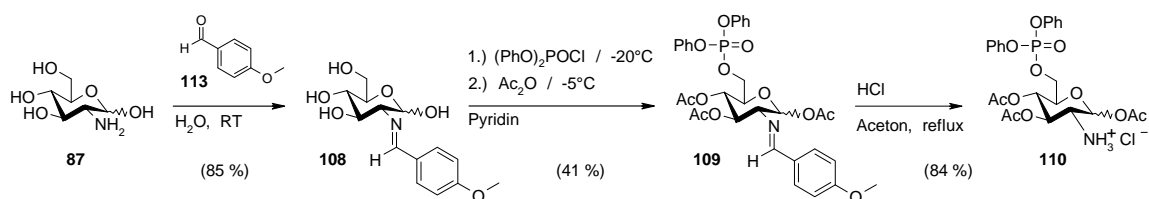
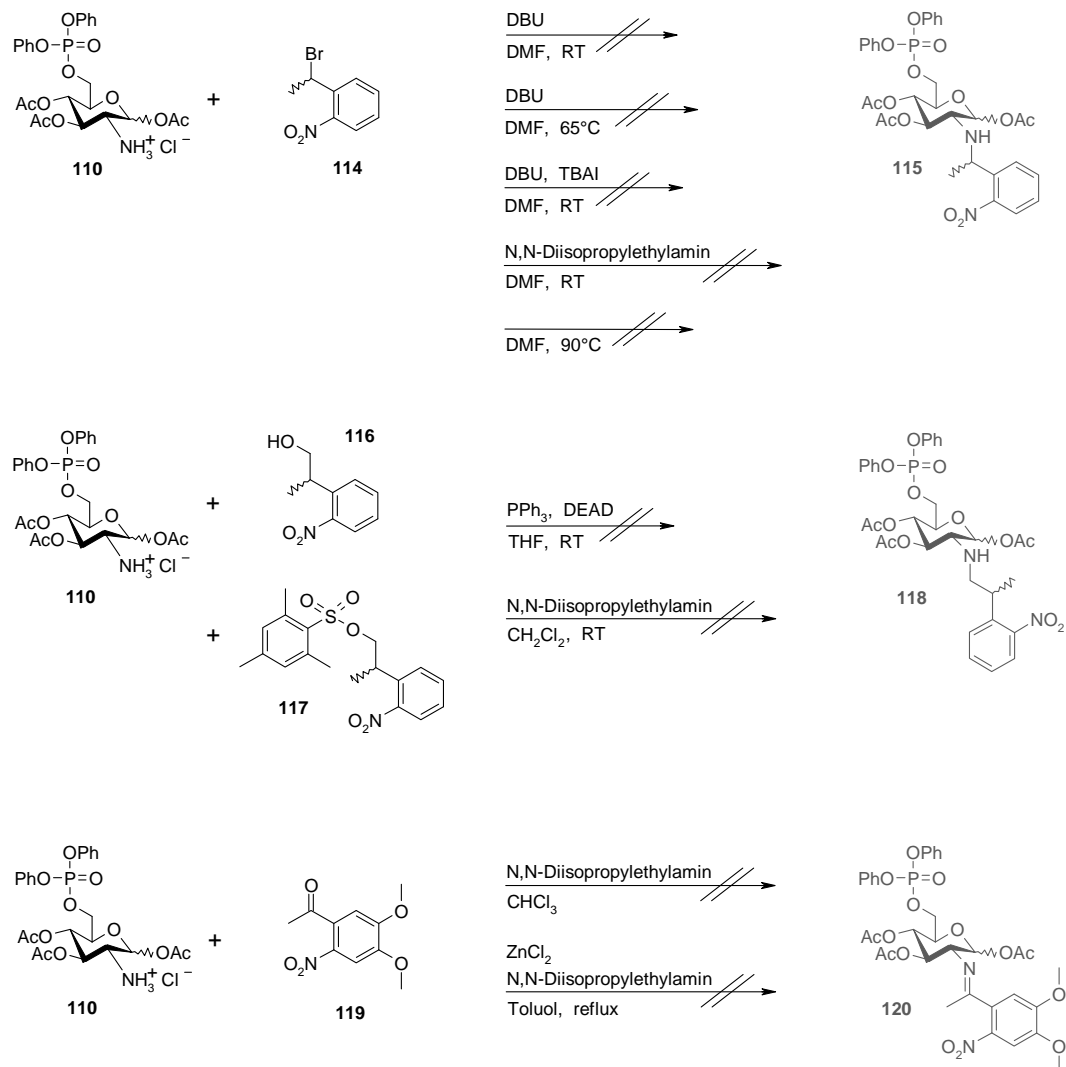


Abb. 49: Synthese des GlcN6P-Derivats **110** mit isolierter Aminofunktion.

Im Anschluß wurde nun versucht, die photolabile Schutzgruppe in einer nukleophilen Substitutionsreaktion einzuführen. *o*-Nitroethylbenzol lässt sich mit NBS (*N*-Bromsuccinimid) leicht an der benzylicen Position bromieren. Das NPE-Bromid **114** wurde in verschiedenen Reaktionsansätzen als Elektrophil eingesetzt (Abb. 50). In Gegenwart von DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en) in DMF konnte bei verschiedenen Temperaturen keine Reaktion beobachtet werden. Auch durch Zugabe von katalytischen Mengen TBAI (Tetrabutylammoniumiodid) konnten die Ausgangsverbindungen nicht zur Reaktion gebracht werden. Der Wechsel zu einer anderen Base (*N,N*-Diisopropylethylamin) ergab auch kein positives Ergebnis. In einem letzten Versuch wurde, ähnlich wie bei der Synthese von NPE-geschütztem dC (Kapitel 2.1A.4), das geschützte GlcN6P-Derivat **110** ohne Zugabe einer Base mit dem NPE-Bromid **114** in DMF auf 90°C erhitzt. Auch hier kam es zu keiner Reaktion. Da sich die Kohlenstoffkette beider Substituenten des zu



synthetisierenden Amins bei den verwendeten Ausgangsstoffen am  $\alpha$ -Kohlenstoff verzweigt, hielten wir es für möglich, dass die Reaktion aus sterischen Gründen nicht erfolgte. Daher wechselten wir den Schutzgruppenvorläufer und versuchten ein NPP-geschütztes GlcN6P-Derivat (**118**) zu synthetisieren.

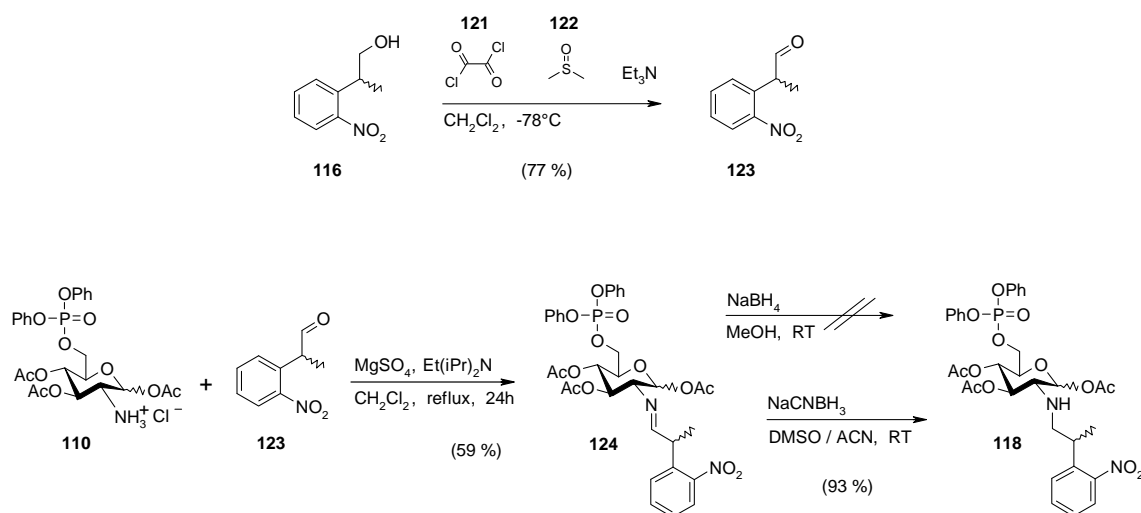


**Abb. 50:** Versuche, die isolierte Aminogruppe mit verschiedenen Vorläufern unterschiedlicher photolabiler Schutzgruppen zu modifizieren.

Zunächst wurde versucht, den NPP-Alkohol **116** mit Triphenylphosphin (PPh<sub>3</sub>) und Diethylazodicarboxylat (DEAD) zu aktivieren und mit dem geschützten GlcN6P-Derivat **110** umzusetzen. Dieser Versuch blieb leider erfolglos. Auch ein Mesitylsulfonyl-Derivat des NPP-Alkohols (**117**) zeigte keine Reaktivität gegenüber dem Amin des GlcN6P-Derivats **110**.

Schließlich versuchten wir, 2-Nitro-4,5-dimethoxyacetophenon (**119**) und GlcN6P-Derivat **110** in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylamin zum Imin **120** reagieren zu lassen, aus dem durch anschließende Reduktion das photolabil geschützte Amin erhalten werden sollte. Nach einer Literaturvorschrift versuchten wir diese Reaktion auch in Gegenwart von katalytischen Mengen ZnCl<sub>2</sub> in Toluol mit Hilfe

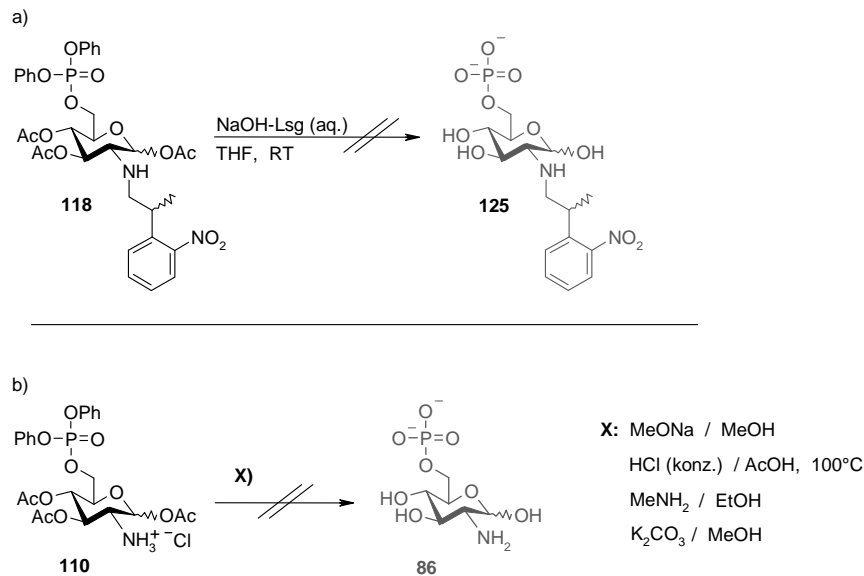
eines Wasserabscheiders zum Abtrennen des entstehenden Wassers.<sup>[163]</sup> Keiner der beiden Ansätze lieferte das gewünschte Produkt. Letztlich führte diese Strategie dennoch zum



**Abb. 51: Swern-Oxidation von NPP-Alkohol 116 zum Aldehyd 123 und anschließende Modifikation des GlcN6P-Derivats 110 zur photolabil geschützten Verbindung 118.**

Erfolg, indem wir die Tatsache ausnutzten, dass Aldehyde eine deutlich höhere Reaktivität aufweisen als Ketone. In einer Swern-Oxidation wurde NPP-Alkohol 116 mit Oxalylchlorid 121 und DMSO 122 zum entsprechenden Aldehyd 123 oxidiert (77 % Ausbeute). Mit dem NPP-Aldehyd (123) gelang die Synthese der Imino-Verbindung 124 in Gegenwart von  $\text{N,N}$ -Diisopropylethylamin und trockenem Magnesiumsulfat (59 % Ausbeute) (Abb. 51). Die darauf folgende Reduktion gelang nicht mit Natriumborhydrid. Mit dem weniger reaktiven Natriumcyanoborhydrid konnte schließlich die gewünschte Verbindung 118 mit guter Ausbeute (93 %) erhalten werden.

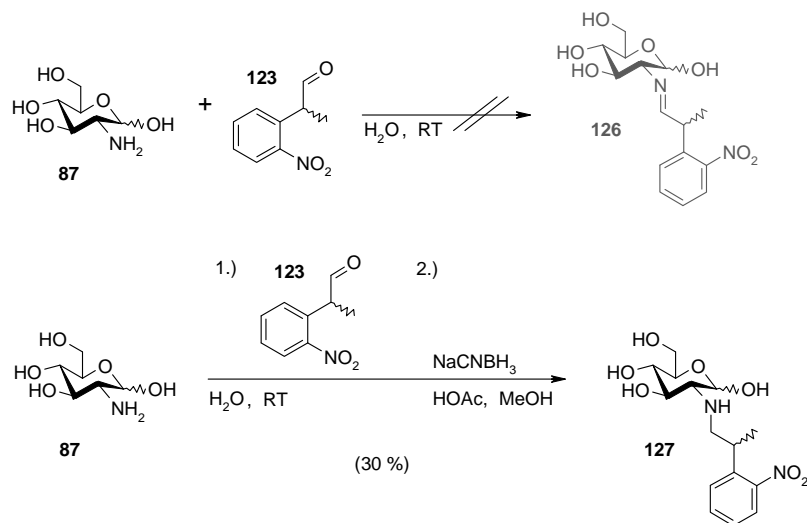
Im letzten Schritt sollte die simultane Abspaltung der Phenylgruppen und der Acetylgruppen erfolgen (Abb. 52 a). Nach einer abgewandelten Literaturvorschrift wurde die Reaktion mit Natronlauge in THF bei Raumtemperatur durchgeführt.<sup>[164]</sup> Leider konnte aus der Reaktionsmischung nicht das gewünschte Produkt isoliert werden. Um den Verbrauch der photolabil geschützten GlcN6P-Variante 118 niedrig zu halten, wurden Abspaltungstests unter verschiedenen Bedingungen mit der Vorstufe 110 durchgeführt, die in größeren Mengen verfügbar war (Abb. 52 b)). Leider konnten weder unter den verschiedenen getesteten basischen Bedingungen noch entsprechend einer Literaturvorschrift<sup>[165]</sup> mit  $\text{HCl}$  in Aceton die Phenylgruppen von der Phosphatgruppe entfernt werden. In der Literaturvorschrift zur Herstellung von  $N$ -Acetylglukosamin-6-phosphat werden die Phenylgruppen hydrogenolytisch mit  $\text{PtO}_2$  unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre in Ameisensäure entfernt.<sup>[161]</sup> Dies war in unserem Fall nicht möglich, da die Nitrogruppe der NPP-Gruppe unter diesen Bedingungen zum Amin reduziert worden wäre.



**Abb. 52: Entschützungsversuche, die Phenylgruppen vom Phosphat zu entfernen, scheiterten.**

Da die Phenylgruppen unter den getesteten, mit dem photolabil geschützten GlcN6P-Derivat kompatiblen Bedingungen nicht entfernt werden konnten, musste über eine andere Synthesestrategie nachgedacht werden. Um die Notwendigkeit von Schutzgruppen für die Phosphatgruppe zu umgehen, könnte ein Syntheseweg verfolgt werden, in dem die Phosphorylierung erst am Ende der Synthese erfolgt.

Aufgrund der Analogie zwischen der Synthese eines Imins aus der Aminogruppe des GlcN6Ps mit NPP-Aldehyd **123** und der Anisaldehyd-Schätzung der Aminogruppe im ersten Schritt der oben beschriebenen Synthese (Abb. 49), sollte in einem Vorversuch geklärt werden, ob die Modifikation mit einer photolabilen Schutzgruppe direkt aus Glukosamin **87** und NPP-Aldehyd **123** möglich ist (Abb. 53).



**Abb. 53: Synthese von *N*-NPP-geschütztem Glukosamin (127).**

Die Iminoverbindung **126** konnte zwar massenspektrometrisch nachgewiesen werden, jedoch war eine Isolierung aus der Reaktionsmischung nicht möglich. In einem zweiten Ansatz wurde daher im ersten Schritt das Imin synthetisiert. Die Reaktionslösung wurde dann mit Methanol verdünnt, mit Essigsäure angesäuert und durch Zugabe von Natriumcyanoborhydrid wurde das Imin *in situ* zum photolabil geschützten Glukosamin-Derivat **127** reduziert. Die Synthese gelang mit einer nur geringen Ausbeute von 30 %. Bevor erneut mit der Synthese einer photoaktivierbaren GlcN6P-Variante begonnen wurde, wurden mit den bereits hergestellten photolabil geschützten GlcN-Derivaten **118** und **127** Belichtungstests durchgeführt. Dabei konnte die photolabile Schutzgruppe durch Belichtung mit UV-Licht (366 nm) nur unvollständig abgespalten werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der literaturbeschriebenen Beobachtung überein, dass die photolytische C-N-Bindungsspaltung aufgrund der schlechten Eigenschaften eines Amins als Abgangsgruppe nicht immer vollständig verläuft.<sup>[136]</sup>

Um sicherzustellen, dass das GlcN6P vollständig durch Belichten aus dem photolabil geschützten GlcN6P-Derivat freigesetzt werden kann, sollte im Zuge eines neuen Syntheseversuches die photolabile Schutzgruppe über einen Carbonyllinker mit der Aminogruppe des GlcN6P verknüpft werden. Diese Vorgehensweise bietet zudem den Vorteil, dass die Basizität des freien Elektronenpaares am Stickstoff herabgesetzt wird. Dadurch wird ergänzend zum sterischen Anspruch der photolabilen Schutzgruppe auch durch Veränderung der elektronischen Eigenschaften des GlcN6P-Derivats die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass das photolabil geschützte GlcN6P-Derivat die Spaltung des *glms*-Ribozyms nicht mehr katalysieren kann. Der entsprechende Synthesepfad ist in Abb. 54 zusammengefasst.

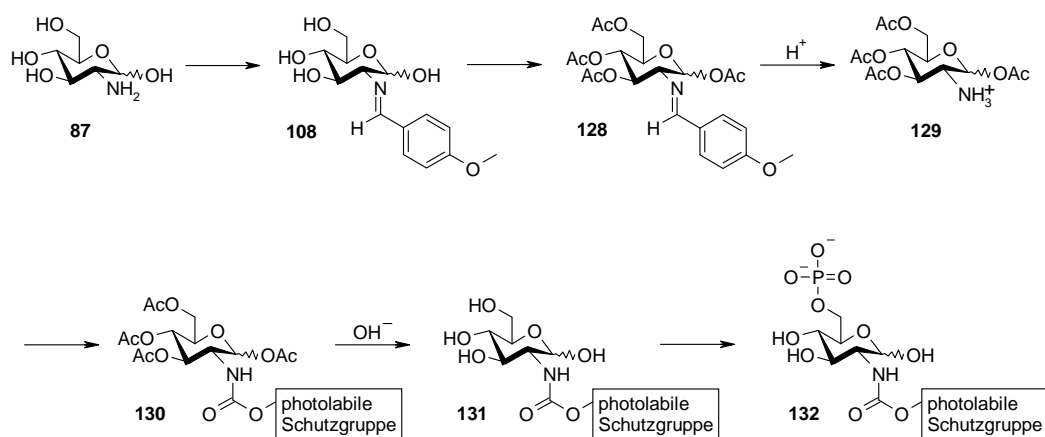


Abb. 54: Verbesserter Synthesepfad

Im ersten Schritt wird die Aminogruppe des Glukosamins **87** mit Anisaldehyd geschützt (**108**). Darauf folgt die Acetylierung der OH-Gruppen (**128**). Anschließend erfolgt die säurekatalysierte Freisetzung der Aminogruppe (**129**). Diese soll dann über einen Carbonyl-Linker mit dem Alkohol der photolabilen Schutzgruppe verknüpft werden (**130**). Danach würden die Acetylgruppen unter

alkalischen Bedingungen abgespalten (**131**) und im letzten Schritt erfolgt die selektive Phosphorylierung der 6'-OH-Gruppe (**132**).

Die Synthese bis zur Isolierung der Aminofunktion ist in Abb. 55 zusammengefasst. Der erste Schritt, die Schützung der Aminofunktion mit Anisaldehyd, war der gleiche wie in der vorangegangenen Synthese. Anschließend erfolgte die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin. Man erhielt das geschützte GlcN-Derivat **128** mit 89 % Ausbeute. Im Anschluß erfolgte wie oben die Freisetzung der Aminogruppe mit Salzsäure in siedendem Aceton. Auch diese Reaktion verlief mit guter Ausbeute (88 %).

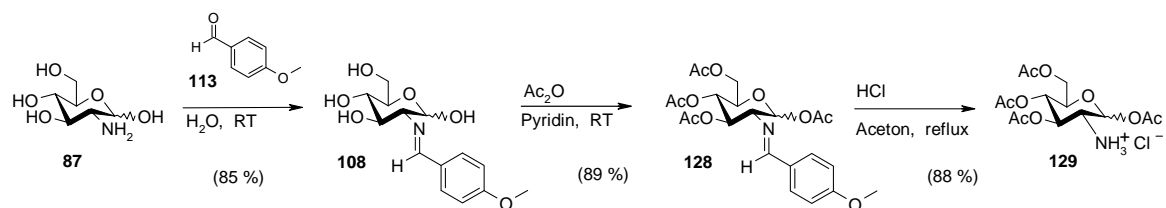


Abb. 55: Synthese des GlcN-Derivats **129** mit isolierter Aminofunktion.

Die isolierte Aminogruppe von Verbindung **129** sollte nun über einen Carbonyllinker mit NPP-Alkohol **116** derivatisiert werden. Die weniger flüchtigen und weniger gefährlichen Phosgen-analogen Reagenzien Carbonyldiimidazol **106** und Carbonyldi-(1,2,4-triazol) **133** waren unter den getesteten Bedingungen nicht reaktiv genug. Eine Umsetzung mit Phosgen **134** führte schließlich zum Erfolg. Dazu wurde ein leichter Überschuss (1,5 Äquiv.) Phosgen in Lösung vorgelegt, und in Gegenwart von DMAP und Triethylamin wurde zuerst Verbindung **129** (1 Äquiv.) zugegeben und nach 15 Minuten mit einem Überschuss (3 Äquiv.) NPP-Alkohol **116** abgefangen (Abb. 56). Das photolabil geschützte GlcN-Derivat **135** konnte mit 79 % Ausbeute isoliert werden.

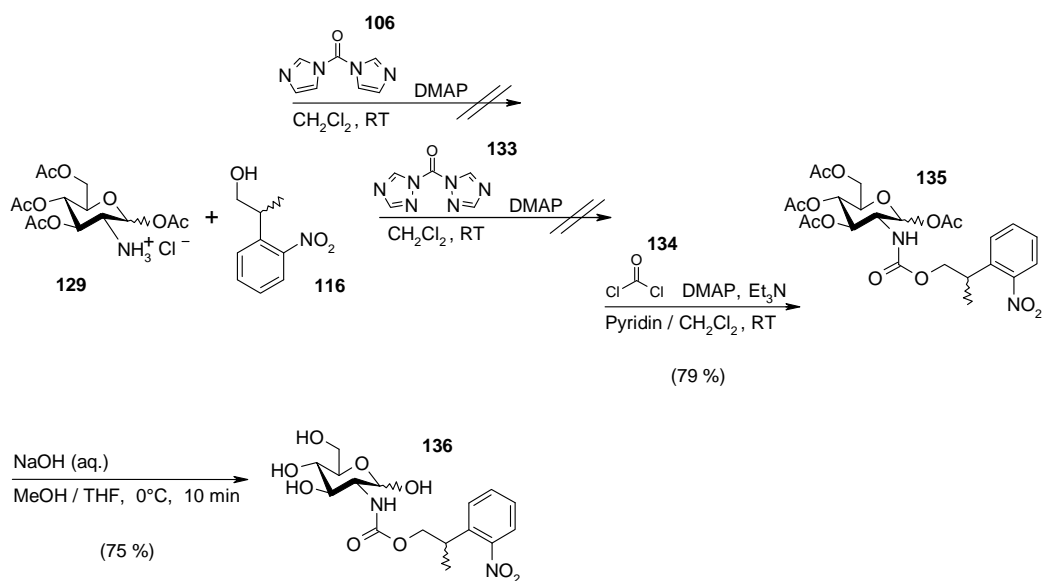
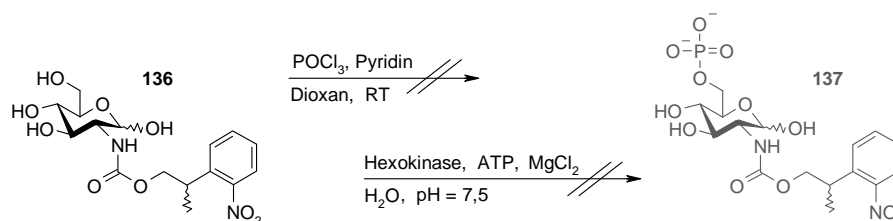


Abb. 56: Einführung der photolabilen Schutzgruppe und anschließende Deacetylierung.

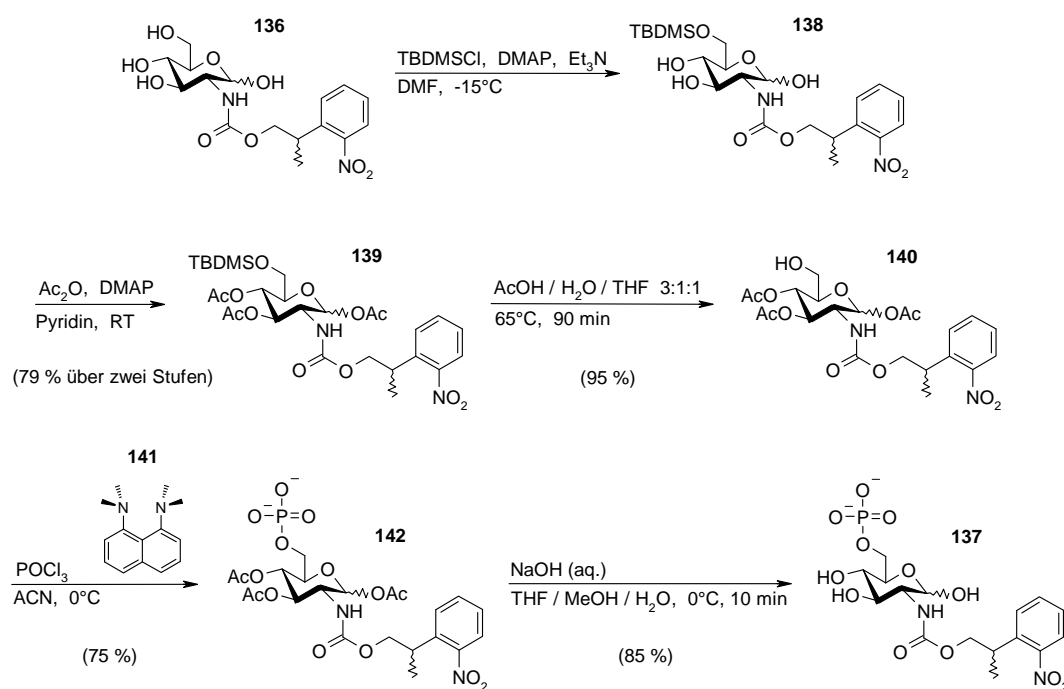
Im Anschluss wurden die Acetylgruppen mit wässriger Natronlauge in einer Mischung aus Methanol und THF entfernt. Um das Carbamat nicht zu gefährden wurde die Reaktion bei 0°C durchgeführt und nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten mit Essigsäure neutralisiert. Das photolabil geschützte Glukosamin **136** wurde mit 75 % Ausbeute erhalten. Nun wurde versucht, die 6'-OH-Gruppe selektiv zu phosphorylieren. Letsinger *et al.* berichteten von einer Methode, mit Phosphorylchlorid und geringen Mengen Pyridin in Dioxan die 5'-OH-Gruppe eines dT-Derivats in Gegenwart der 3'-OH-Gruppe selektiv zu phosphorylieren.<sup>[166]</sup> Angewendet auf unser GlcN-Derivat **136** konnte auf diese Weise allerdings keine Phosphorylierung erzielt werden (Abb. 57).



**Abb. 57: Phosphorylierungsversuche mit Phosphorylchlorid und Hexokinase.**

Wir versuchten, die 6'-OH-Gruppe enzymatisch mit Hexokinase aus Bierhefe in Gegenwart von ATP zu phosphorylieren. Hexokinase ist ein Enzym, das unter Spaltung eines Moleküls ATP Glukose zu Glukose-6-phosphat umwandelt. In einer Studie von Chenault *et al.* wurde die Hexokinase auf ihre Substratspezifität hin untersucht und es zeigte sich, dass das Enzym relativ tolerant gegenüber Modifikationen in 2'- und 3'-Position war.<sup>[167]</sup> Wir inkubierten entsprechend einer Literaturvorschrift<sup>[168]</sup> das photolabil geschützte GlcN-Derivat **136** in wässriger Lösung mit Hexokinase in Gegenwart von ATP und Magnesiumchlorid. Der pH-Wert muss im Verlauf der Reaktion mehrfach kontrolliert und evtl. wieder auf pH = 7,5 eingestellt werden. Auch nach mehreren Tagen zeigte sich keine Umsetzung. In einem parallel durchgeführten Kontrollexperiment mit unmodifiziertem Glukosamin war die Reaktion bereits nach 24 h vollständig. Offensichtlich verhindert die photolabile Modifikation, dass das modifizierte GlcN-Derivat **136** von der Hexokinase als Substrat erkannt wird. Daher beschlossen wir, auf chemischem Weg mit stärkeren Phosphorylierungsmethoden die Phosphatgruppe einzuführen. Dazu musste die 6'-OH-Gruppe isoliert werden. Dies geschah mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in Gegenwart von DMAP und Triethylamin in DMF bei -15°C. Die niedrige Temperatur ist erforderlich um die primäre OH-Gruppe selektiv zu silylieren.<sup>[169,170]</sup> Anschließend wurden die verbliebenen OH-Gruppen mit Essigsäureanhydrid und DMAP als Katalysator in Pyridin acetyliert. Man erhielt das geschützte GlcN-Derivat **139** mit einer Ausbeute von 79 % über zwei Stufen. Die TBDMS-Gruppe wurde daraufhin wieder abgespalten. Dazu wurde Verbindung **139** in einer Mischung aus Essigsäure, Wasser und THF für 90 Minuten auf 65°C erhitzt. Das GlcN-Derivat **140** mit isolierter 6'-OH-Gruppe wurde mit 95 % Ausbeute erhalten. Die Einführung der Phosphatgruppe erfolgte nach einer Literaturvorschrift mit Phosphorylchlorid in

Gegenwart von Protonenschwamm (**141**) in wasserfreiem Acetonitril. Das entstehende 6'-Dichlorophosphatintermediat wird mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer) zum Phosphat aufgearbeitet. Aufgrund der hohen Polarität der phosphorylierten Verbindung **142** wurde die chromatographische Aufreinigung mittels MPLC über RP-C18 Umkehrphasenmaterial durchgeführt. Zur Elution wurde TEAB-Puffer mit steigendem Anteil Acetonitril verwendet (siehe Experimenteller Teil). Die phosphorylierte Verbindung **142** wurde mit 75 % Ausbeute erhalten.



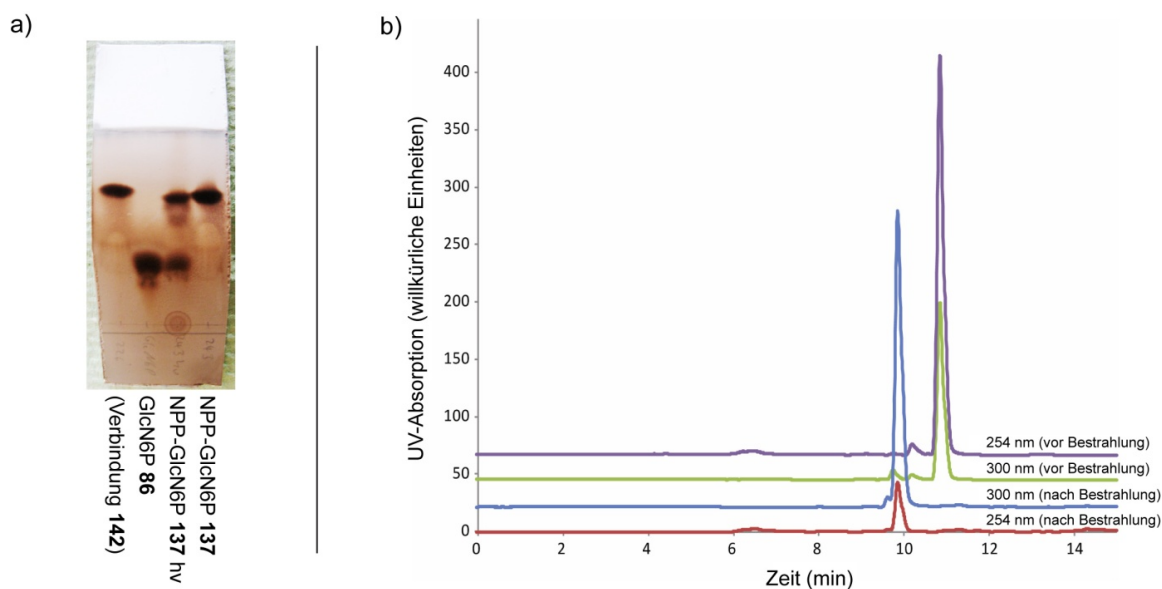
**Abb. 58: Isolierung der 6'-OH-Gruppe, Phosphorylierung und Abspaltung der Acetylgruppen.**

Im letzten Schritt erfolgte die Abspaltung der Acetylgruppen mit wässriger Natronlauge in einer Mischung aus THF, Methanol und Wasser. Auch diese Deacetylierung wurde bei 0°C durchgeführt und nach 10 Minuten durch Zugabe von Essigsäure beendet. Die Aufreinigung des photolabil geschützten GlcN6P-Derivats **137** erfolgte wiederum über RP-Chromatographie. Durch die Verwendung von TEAB-Puffer im Elutionsmittel verblieben nach Trocknen des Produktes im Hochvakuum laut NMR-Spektrum noch ca. 1,3 Triethylammoniumionen pro Phosphatgruppe als Gegenion. Das photoaktivierbare GlcN6P-Derivat **137** konnte mit 85 % Ausbeute isoliert werden. Die Gesamtausbeute lag bei 19 % über 10 Stufen.

### Lichtentschützungsexperimente mit NPP-GlcN6P (**137**)

Um nachzuweisen, dass sich aus dem photoaktivierbaren GlcN6P-Derivat **137** lichtinduziert unmodifiziertes GlcN6P freisetzen lässt, wurde eine Lösung von Verbindung **137** in PBS-Puffer mit UV-Licht bestrahlt und anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht (366 nm, 3 min,

3 x UV-LED (Nichia NCCU033 je 100mW) betrieben bei je 0,5 A). Das Chromatogramm wurde in Anisaldehyd-Färbereagenz getaucht (siehe Experimenteller Teil) und mit einem Heißluftfön entwickelt. Das Dünnschichtchromatogramm ist in Abb. 59 a) gezeigt. Es ist gut zu erkennen, dass durch Belichten von NPP-GlcN6P (**137**) unmodifiziertes GlcN6P freigesetzt wurde.



**Abb. 59: a) Dünnschichtchromatographischer Nachweis des lichtinduziert freigesetzten GlcN6Ps. b) HPLC-Chromatogramme einer Lösung von NPP-GlcN6P (**137**) vor und nach Belichten: Das photolabil geschützte GlcN6P-Derivat lässt sich durch Belichten vollständig entschützen.**

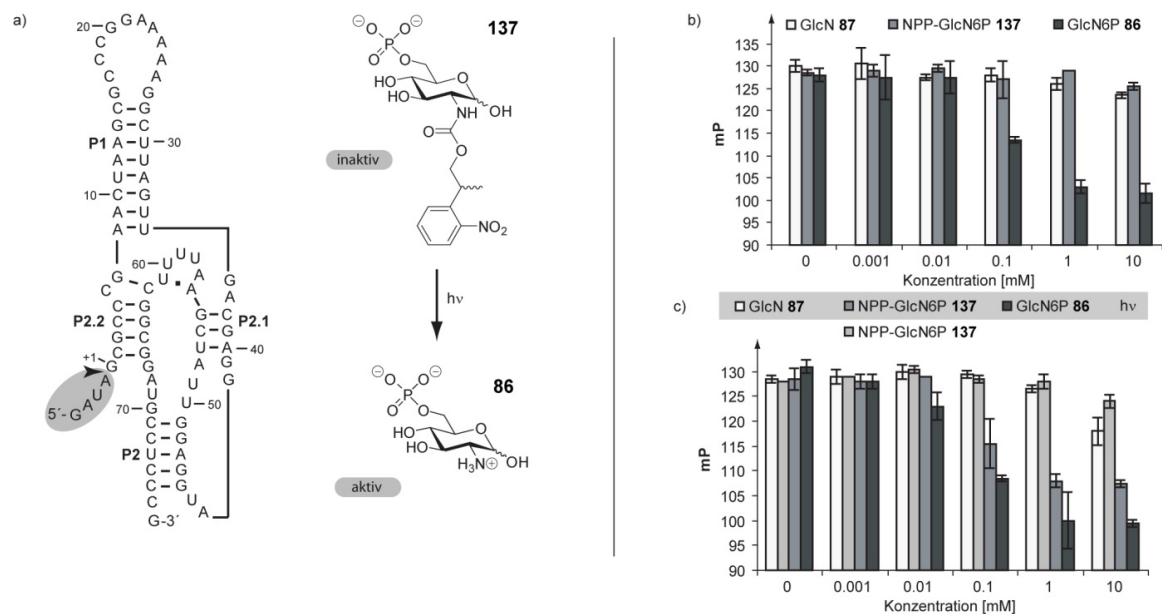
Dieser Test zeigte aber auch einen deutlichen Nachteil der verwendeten NPP-Gruppe auf: Das Photolyseprodukt der NPP-Gruppe (2-(2-Nitrophenyl)propen, **13**) ist so schlecht wasserlöslich, dass es im Verlauf der Belichtung als Niederschlag ausfiel und die Lösung trübte. Dadurch konnte keine vollständige Entschützung erreicht werden. Um zu zeigen, dass es sich dabei nur um ein Konzentrationsproblem und kein generelles Problem bei der Photoentschützung handelt, wurde eine verdünntere Lösung des photolabil geschützten GlcN6Ps **137** vor und nach Belichtung mit HPLC untersucht. Die Chromatogramme sind in Abb. 59 b) zusammengefasst. Da das unmodifizierte GlcN6P keine Absorption im UV-Bereich zeigt, konnte nur das photoaktivierbare NPP-GlcN6P **137** (11 min) und das Photolyseprodukt der NPP-Gruppe (9,8 min) detektiert werden. Nach drei Minuten Bestrahlung (s.o.) war das photolabil geschützte GlcN6P vollständig verschwunden und es konnte nur noch das Abspaltungsprodukt der photolabilen Schutzgruppe mit deutlich verschiedener UV-Absorptionscharakteristik detektiert werden. Zusammen mit dem dünnschichtchromatographischen Nachweis des freigesetzten GlcN6Ps konnte damit gezeigt werden, dass sich das von uns synthetisierte photolabil geschützte GlcN6P-Derivat **137** vollständig lichtinduziert zu GlcN6P umwandeln lässt.



### *In-vitro*-Studien zur lichtinduzierten Spaltung des *glmS*-Ribozyms

Die Studien zur lichtinduzierten Spaltung des *glmS*-Ribozyms unter Verwendung der photolabil geschützten GlcN6P-Variante **137** wurden von Monika Pofahl und Bernhard Wulffen aus dem Arbeitskreis Mayer durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob das photolabil geschützte GlcN6P **137** dazu in der Lage ist, lichtabhängig die autokatalytische Spaltung des *glmS*-Ribozyms zu induzieren, wurde ein literaturbeschriebenes Testverfahren verwendet, in dem die ligandenabhängige Spaltung eines Ribozyms mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisation verfolgt werden kann.<sup>[150]</sup> Ein *glmS*-Ribozym mit Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende wurde dazu mit steigenden Konzentrationen Glukosamin-6-phosphat (**86**), Glukosamin (**87**) und photolabil geschütztem Glukosamin-6-phosphat **137** inkubiert.

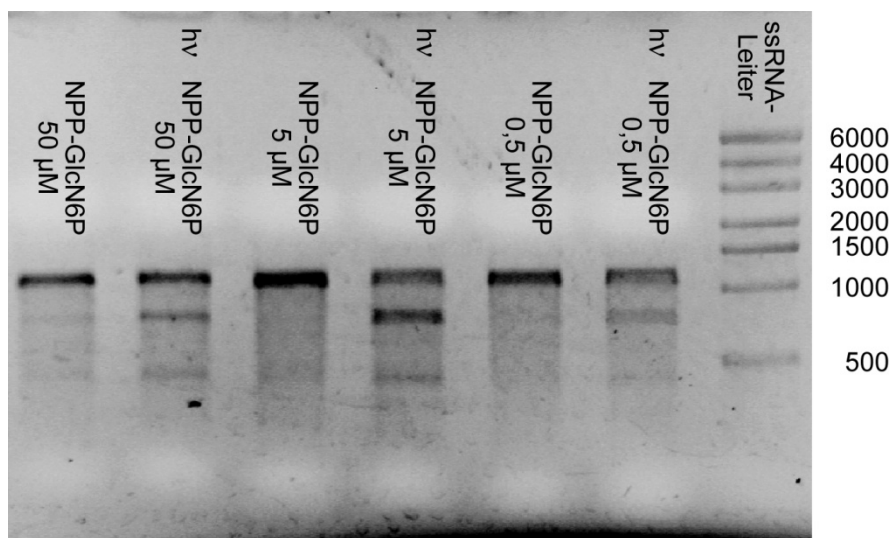


**Abb. 60: a) Verkürzter *glmS*-Ribswitch. b) und c) Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisationsmessungen in denen das *glmS*-Ribozym mit unterschiedlichen Glukosamin-Derivaten inkubiert wurde. Beide Experimente wurden mit derselben Mikrotiterplatte durchgeführt. Für die Belichtungstests wurden die entsprechenden Mikrobekälter mit einer UV-Handlampe (366 nm) für 45 Minuten bestrahlt (grau hinterlegte Proben).**

Das bei der Spaltung des Ribozyms freiwerdende, fluoreszenzmarkierte 5'-Spaltungsprodukt umfasst nur vier Nukleotide und unterscheidet sich dadurch deutlich in Größe und Molekulargewicht vom gesamten *glmS*-Ribozym (Abb. 60 a). Dadurch kann bei einer Spaltung des Ribozyms eine deutliche Änderung der gemessenen Fluoreszenzpolarisationswerte beobachtet werden. In Abb. 60 b) ist zu erkennen, dass nach 15 Minuten Inkubationszeit bei 25°C nur GlcN6P (**86**) eine Spaltung des *glmS*-Ribozyms herbeiführt. GlcN (**87**) und das photolabil geschützte GlcN6P-Derivat **137** führten zu keiner Spaltung. In Abb. 60 c) sind die Ergebnisse nach 45 Minuten Bestrahlung mit einer UV-Handlampe (366 nm) gezeigt. Bei Bestrahlung wurde aus dem photolabil geschützten GlcN6P-Derivat **137** freies GlcN6P (**86**) freigesetzt und dies führte zu einer ähnlichen konzentrationsabhängigen Spaltung des

*glmS*-Ribozym wie unmodifiziertes GlcN6P (**86**). Das unbelichtete photoaktivierbare GlcN6P-Derivat **137** führte auch nach 45 Minuten Inkubationszeit nicht zu einer Spaltung des Ribozym. GlcN (**87**) bewirkte dagegen bei hohen Konzentrationen eine teilweise Spaltung des Ribozym. Dies deckt sich mit literaturbekannten Beobachtungen.<sup>[154]</sup>

Als nächstes wurde getestet, ob in Gegenwart von photoaktivierbarem NPP-GlcN6P **137** durch Belichtung auch eine Spaltung von *EGFP*-mRNA erreicht werden kann, die den *glmS*-Riboswitch in ihrer 3'-UTR beinhaltet. Die verwendete ssRNA besaß die Struktur *EGFP-glmS-polyA* mit einer Gesamtlänge von 1253 Basen. Die RNA wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen NPP-GlcN6P **137** jeweils vor oder nach Belichtung inkubiert. Die Ergebnisse wurden mit Agarosegelelektrophorese analysiert. Das Gel ist in Abb. 61 gezeigt.



**Abb. 61:** Ergebnisse der *in vitro* mRNA-Spaltungstests. Jedes Experiment wurde mit 1,3 pmol *EGFP-glmS-polyA*-RNA durchgeführt.

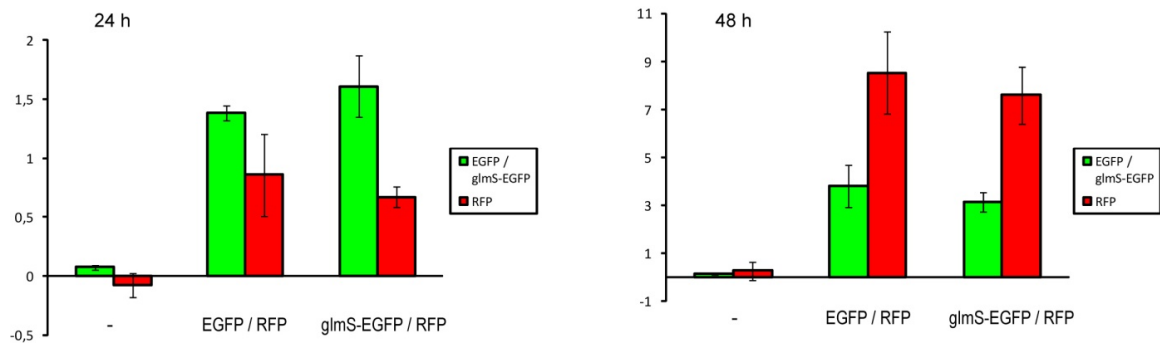
Es ist zu erkennen, dass in Gegenwart der photolabil geschützten GlcN6P-Variante **137** durch Belichtung eine Spaltung der RNA in den *EGFP*-Teil und den kürzeren *glmS-polyA*-Teil induziert werden konnte.

### Zellkulturexperimente mit NPP-GlcN6P in HeLa-Zellen

Die Zellkulturexperimente wurden mit hilfreicher Unterstützung durch Vera Mikat (AK Heckel) und Bernhard Wulffen (AK Mayer, LIMES, Universität Bonn) durchgeführt.

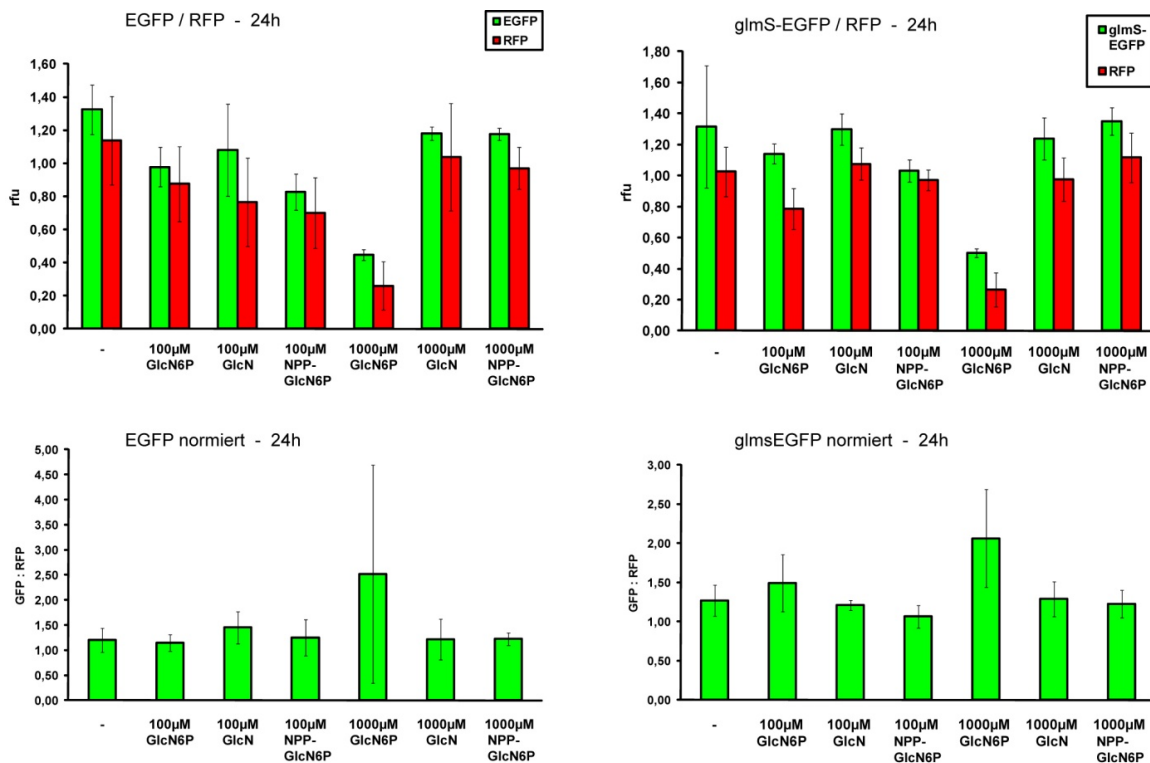
Ermutigt durch die positiven Ergebnisse der *in-vitro*-Studien, versuchten wir nun, lichtinduziert die Expression von EGFP in Zellkultur herunter zu regulieren. Dazu wurde ein Plasmid mit dem *EGFP*-Gen und dem *glmS*-Riboswitch in dessen 3'-UTR verwendet (*glmS-EGFP*). Das Plasmid wurde von unseren Kooperationspartnern im AK Mayer (Universität Bonn) hergestellt. Als Vergleich diente das

unmodifizierte *EGFP*-Plasmid pEGFP-N1 (*Clontech*). Die beiden Plasmide wurden jeweils zusammen mit dem Plasmid pCMVDsRed-Express (*Clontech*), das das Gen für RFP (rot fluoreszierendes Protein) trägt, transfiziert. Die Intensität der RFP-Fluoreszenz sollte zur Normierung der gemessenen EGFP- und *glmS*-EGFP-Werte dienen.



**Abb. 62: Expression von EGFP und *glmS*-EGFP in HeLa-Zellen.**

Als Transfektionsreagenz diente *Metafectene* der Firma *Biontex* (Martinsried). Die HeLa-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und nachdem sie 100 % optische Konfluenz erreicht hatten, wurde pro well eine Transfektionslösung aus 400 ng *RFP*-Plasmid, 200 ng *EGFP*- oder *glmS*-EGFP-Plasmid, 2,4  $\mu$ L *Metafectene* und 60  $\mu$ L Medium zugegeben. Für jede Kombination wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden lysiert und nach Abzentrifugieren der festen Zellbestandteile wurde das Lysat für Fluoreszenzmessungen verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 62 zusammengefasst. Die mit *glmS*-EGFP transfizierten Zellen zeigen ähnliche Fluoreszenzwerte wie die zur Kontrolle mit *EGFP* transfizierten Zellen. Dies ist ein wichtiges Zwischenergebnis, da damit ausgeschlossen werden kann, dass der natürliche GlcN6P-Spiegel zu hoch sein könnte und von vornherein einen Abbau der *glmS*-EGFP-mRNA bewirkte. Im nächsten Schritt wurden dann mit der Transfektionslösung unterschiedliche Mengen GlcN, GlcN6P und photolabil geschütztes GlcN6P-Derivat **137** zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 24 Stunden lysiert und die Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 63 zusammengefasst. Die Zellen exprimieren unabhängig von der zugegebenen Substanz ähnliche Mengen an EGFP bzw. *glmS*-EGFP. Bei den normierten Diagrammen im unteren Teil von Abb. 63 weicht der Wert für 1000  $\mu$ M GlcN6P nach oben ab, allerdings ist auch die Standardabweichung sehr groß. Sieht man sich die direkten Messwerte für EGFP / *glmS*-EGFP bzw. RFP an, so ist zu erkennen, dass in Gegenwart von 1000  $\mu$ M GlcN6P sowohl die Expression der GFP-Varianten als auch von RFP sehr geringe Werte aufweist. Dadurch ist die Messungenauigkeit deutlich größer und der normierte Wert nicht sehr aussagekräftig.



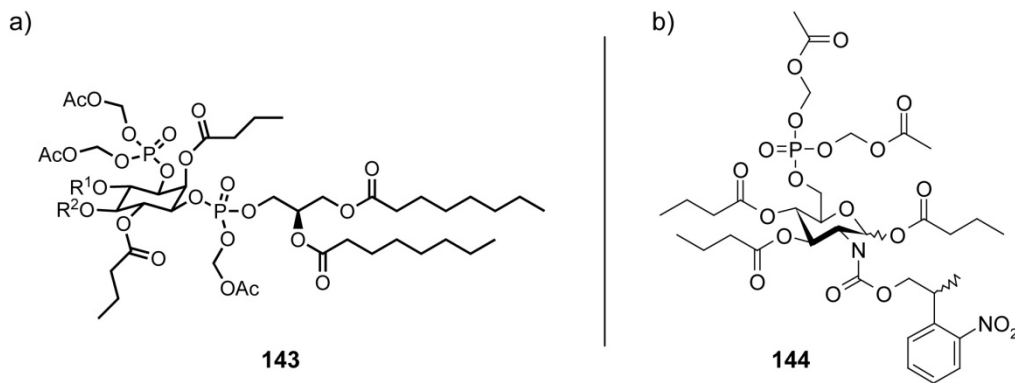
**Abb. 63: Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen. HeLa-Zellen wurden mit EGFP bzw. glmS-EGFP transfiziert, in Gegenwart verschiedener Mengen GlcN, GlcN6P und NPP-GlcN6P (137). In den unteren Diagrammen wurde die EGFP- / glmS-EGFP-Fluoreszenz auf die RFP-Fluoreszenz normiert.**

Die Tatsache, dass ein Rückgang der Fluoreszenz auch für RFP zu beobachten ist, und darüber hinaus auch die mit *EGFP* ohne *glmS*-Riboswitch transfizierten Vergleichsproben für 1000 µM GlcN6P einen Fluoreszenzrückgang aufweisen, spricht dafür, dass es sich hierbei nicht um den gewünschten regulatorischen Effekt durch den *glmS*-Riboswitch handelt, sondern dass sich die hohe GlcN6P-Konzentration negativ auf das Zellwachstum auswirkt. Das Problem liegt vermutlich in der Tatsache begründet, dass es sich bei GlcN6P und auch bei unserer photolabil geschützten Variante um Moleküle mit starker Polarität handelt, die die Zellmembran nicht überwinden können. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Verbindungen zusammen mit dem Transfektionsreagenz appliziert, da die Möglichkeit bestand, dass die GlcN6P-Derivate aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppe zusammen mit den Nukleinsäuren vom Transfektionsreagenz komplexiert und in die Zellen eingeschleust würden. Offensichtlich war das Transfektionsreagenz jedoch nicht dazu in der Lage, die organischen Wirkstoffmoleküle in ausreichender Menge in die Zellen zu transportieren. Daher musste ein anderer Weg gefunden werden, das photoaktivierbare GlcN6P in die Zellen zu transportieren.

### Synthese einer membranpermeablen, photolabil geschützten GlcN6P-Variante

Um polare Wirkstoffmoleküle, die von sich aus die Zellmembran nicht überwinden können, dennoch in Zellen transportieren zu können, gibt es verschiedene Strategien (siehe Einleitung). Eine

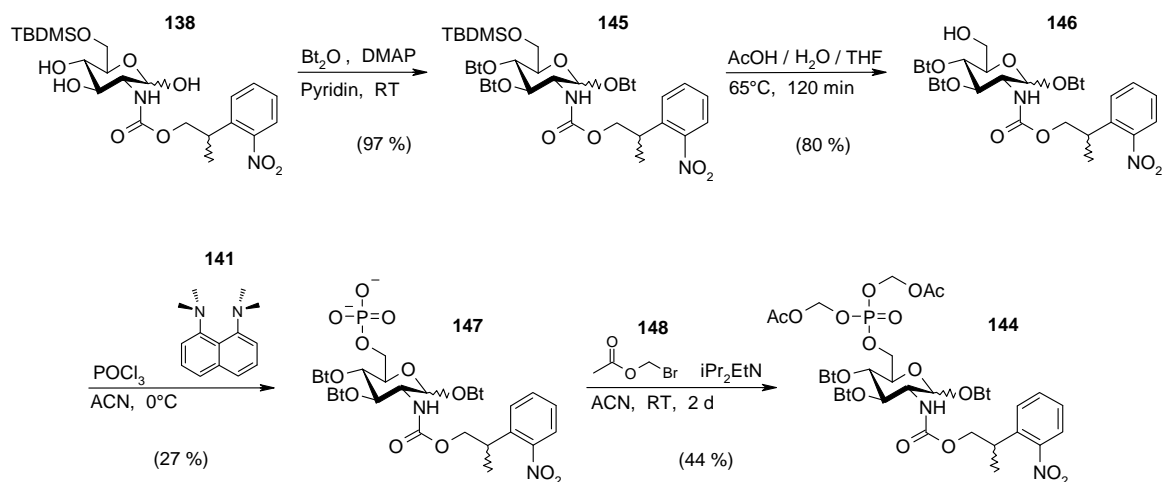
Möglichkeit besteht darin, die Verbindungen so zu modifizieren, dass sie unpolarer werden und durch die Zellmembran diffundieren können. Schultz *et al.* beschreiben die Synthese von membrangängigen Phosphoinositiden.<sup>[171]</sup> Ein Beispiel ist in Abb. 64 a) gezeigt.



**Abb. 64:** a) Membrangängiges Phosphoinositid (143) nach Schultz *et al.*<sup>[171]</sup> ( $R^1$  und  $R^2 = PO(OCH_2OAc)_2$ ) b) Struktur einer lipophilen, zellgängigen Variante eines photolabil geschützten GlcN6P-Derivats (144).

Die Phosphatgruppen wurden mit Acetyloxymethylgruppen maskiert, die OH-Gruppen mit Butyrylgruppen geschützt. Die so modifizierten Phosphoinositide können durch passive Diffusion durch die Zellmembran in die Zelle gelangen. Durch die in der Zellmembran vorhandenen unspezifischen Esterasen werden die Esterfunktionalitäten enzymatisch gespalten und das Wirkstoffmolekül in seiner wirksamen Form freigesetzt. Die Verwendung von Butyrylgruppen statt Acetylgruppen zur Schützung der Hydroxyfunktionen ist notwendig, da die Butyrylgruppen in der Zelle deutlich langsamer hydrolysiert werden. Sind die OH-Gruppen während der enzymatischen Hydrolyse der Acetoxymethylester ungeschützt, kann nach Angabe der Autoren eine intramolekulare Wanderung der Phosphatgruppen beobachtet werden.<sup>[171]</sup>

Inspiziert von dieser Möglichkeit, beschlossen wir die Synthese eines photaktivierbaren GlcN6P-Derivats, dessen Phosphat- und Hydroxyfunktionen ebenfalls als Acetyloxymethylester bzw. Butyrate geschützt sein sollten. Die Struktur ist in Abb. 64 b) gezeigt. Die Synthese konnte analog der Synthese des NPP-geschützten GlcN6P-Derivats **137** erfolgen. Die ersten Stufen bis zur selektiven Silylierung der 6'-OH-Gruppe waren identisch. Der weitere Verlauf ist in Abb. 65 gezeigt. Die freien Hydroxygruppen wurden statt mit Essigsäureanhydrid mit Buttersäureanhydrid verestert. Das Produkt **145** konnte nahezu quantitativ isoliert werden. Im nächsten Schritt wurde wiederum die TBDMS-Gruppe in essigsaurer Lösung bei erhöhter Temperatur entfernt. Das photolabil geschützte GlcN-Derivat **146** mit isolierter OH-Gruppe wurde mit 80 % Ausbeute erhalten. Die Phosphorylierung mit Phosphorylchlorid und Protonenschwamm **141** lieferte diesmal das phosphorylierte Produkt **147** nur mit geringer Ausbeute von 27 %.



**Abb. 65:** Synthese einer lipophilen photolabil geschützten GlcN6P-Variante.

Im letzten Schritt wurde die sorgfältig im Hochvakuum getrocknete Verbindung **147** unter wasserfreien Bedingungen mit Acetyloxymethylbromid (**148**) zur vollständig geschützten Verbindung **144** umgesetzt (44 % Ausbeute). Da die beiden letzten Syntheseschritte mit deutlich schlechteren Ausbeuten verliefen, als im Falle der zuvor synthetisierten, photoaktivierbaren GlcN6P-Variante **137**, betrug die Gesamtausbeute ausgehend von Glukosamin diesmal nur 3,6 % über 10 Stufen.

### Test des lipophilen, photolabil geschützten GlcN6P-Derivats in Zellkultur

Die Zellkulturexperimente mit der lipophilen photoaktivierbaren GlcN6P-Variante **144** wurden von Monika Pofahl aus dem Arbeitskreis Mayer durchgeführt.<sup>[172]</sup>

Um auf den Schritt der Transfektion verzichten zu können, wurde von Monika Pofahl eine HeLa-Zelllinie hergestellt, die eine stabile Expression von *glmS*-EGFP aufweist. Dass die Fluoreszenz dieser Zellen gut zu detektieren ist, ist eine weitere Bestätigung dafür, dass die eventuell natürlich vorhandene Konzentration von GlcN6P im Zytosol nicht mit dem *glmS*-EGFP-Konstrukt interferiert.

Da die lipophile photoaktivierbare GlcN6P-Variante **144** nicht wasserlöslich ist, wurde die Verbindung zunächst in DMSO gelöst und mit Ringerlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt, so dass der DMSO-Anteil der auf die Zellen gegebenen Lösung 0,2 % entsprach. Um das GlcN6P-Derivat **144** in wässriger Lösung besser verfügbar zu machen, wurde der Lösung 0,02 % des Blockpolymers *Pluronic F127* (BASF) hinzugefügt. Die zellgängige GlcN6P-Variante wurde in Konzentrationen zwischen 500  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  auf die Zellen angewendet. Leider zeigte sich auch nach Belichtung kein detektierbarer Einfluss auf die Intensität der *glmS*-EGFP-Fluoreszenz.

Als Nebenwirkung der Behandlung mit lipophilem NPP-GlcN6P (**144**) konnte beobachtet werden, dass die Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche des Kulturgefäßes gestört wurde, und die Zellen bereits nach kurzer Zeit im Medium schwammen.

## 2.2.4 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Um unter Verwendung des *glmS*-Riboswitches ein Verfahren zu entwickeln, mit dem sich die Translation eines Reporter-Gens, in diesem Fall EGFP, lichtgesteuert regulieren lässt, wurde zunächst eine photoaktivierbare GlcN6P-Variante (**137**) synthetisiert. Da die Aminogruppe des GlcN6Ps am autokatalytischen Spaltungsmechanismus des *glmS*-Ribozyms beteiligt ist,<sup>[153,156,157]</sup> wurde diese Stelle für die Modifikation mit einer photolabilen Schutzgruppe ausgewählt. Aufgrund der vielen funktionellen Gruppen war für die Synthese des NPP-GlcN6P **137** eine ausgefeilte Schutzgruppenstrategie notwendig, was schließlich zu einer 10-stufigen Syntheseroute führte. Da die photolytische Freisetzung von Aminogruppen problematischer ist, als die lichtinduzierte Entschützung von OH-Gruppen, wurde die photolabile Schutzgruppe über einen Carbonyllinker mit der Aminogruppe des GlcN6Ps verknüpft. Es wurde nachgewiesen, dass das NPP-GlcN6P **137** durch UV-Bestrahlung vollständig zu GlcN6P (**86**) gespalten werden konnte. Das photoaktivierbare GlcN6P-Derivat **137** war dazu in der Lage, lichtinduziert ein verkürztes *glmS*-Ribozym und auch eine *EGFP*-mRNA zu spalten, die den *glmS*-Riboswitch in ihrer 3'-UTR beinhaltet. Der Versuch, auf diese Weise die Expression von *glmS*-EGFP in HeLa-Zellen mit Licht zu beeinflussen, gelang nicht. Da wir vermuteten, dass das Problem in der Polarität des photolabil geschützten GlcN6Ps und der damit verbundenen schlechten Membrangängigkeit lag, wurde eine lipophile photolabil geschützte GlcN6P-Variante (**144**) synthetisiert. Die Zellkulturversuche mit dieser Verbindung schlugen ebenfalls fehl.

Das Scheitern der Experimente in Zellkultur kann verschiedene Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass auch die lipophile photolabil geschützte GlcN6P-Variante unter den verwendeten Bedingungen nicht in ausreichend hoher Konzentration in die Zellen gelangt. Es wäre auch denkbar, dass die Expression des *glmS*-EGFP möglicherweise nicht durch die Spaltung der 3'-UTR der *glmS*-*EGFP*-mRNA verhindert wird. Darüber hinaus ist nicht bekannt, wie schnell das freigesetzte GlcN6P in den Zellen verstoffwechselt wird. Liegt die Halbwertszeit des GlcN6Ps deutlich unter der von EGFP, so kann ein vorübergehender Abbau der kontinuierlich transkribierten *glmS*-*EGFP*-mRNA möglicherweise nicht in Form eines deutlichen Fluoreszenzrückganges beobachtet werden.

Um eine kurzzeitige Änderung in der Translationseffizienz zu detektieren, könnte man entweder zur transienten Transfektion zurückkehren und versuchen, während der beginnenden EGFP-Expression eine lichtinduzierte Spaltung der mRNA herbeizuführen. Befindet sich noch wenig EGFP in den Zellen, ist eine Änderung der Expressionseffizienz sicher leichter zu detektieren. Oder es müsste ein Reportergen mit einer kürzeren Halbwertszeit als der von EGFP verwendet werden. Die Verwendung von EGFP bietet allerdings den großen Vorteil, dass es durch einfache Fluoreszenzmessungen nachgewiesen werden kann, und es eine Vielzahl an Methoden und Geräten zu diesem Zweck gibt. Daher sollten zunächst die anderen Möglichen Ursachen für die negativen Ergebnisse der Zellkulturexperimente ausgeschlossen werden.

Um herauszufinden, ob eine Spaltung der *glmS-EGFP*-mRNA innerhalb der 3'-UTR ausreichend ist, um die Translation zu verhindern, werden gegenwärtig von Bernhard Wulffen (AK Mayer) *in-vitro*-Translationsexperimente durchgeführt. Sollte sich herausstellen, dass die Translation auf diese Weise nicht effizient vermindert werden kann, so wären Konstruktionen denkbar in denen der *glmS*-Riboswitch entweder alternativ oder ergänzend auch in der 5'-UTR des *EGFP*-Gens vorhanden wäre. Dies birgt allerdings das Risiko, dass die relativ stabile Sekundärstruktur des Ribozyms innerhalb der 5'-UTR auch ohne GlcN6P-induzierte Spaltung zu einer geringeren Effizienz der Translation führen könnte.

Bisher ist nicht klar, ob die lipophile photoaktivierbare GlcN6P-Variante in ausreichender Menge in die Zellen gelangt. Um dieses Problem zu umgehen, sind bei entsprechend positivem Ergebnis der *in-vitro*-Translationsstudien im Arbeitskreis Mayer Experimente geplant, bei denen das photolabil geschützte GlcN6P **137** direkt per Mikroinjektion in Embryonen von *Drosophila melanogaster* injiziert wird.

Darüber hinaus wäre es denkbar, das photoaktivierbare GlcN6P-Derivat mit molekularen Transportern wie Cholesterin oder zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) zu verknüpfen, um die Aufnahme in die Zellen zu erleichtern. Dafür wäre es notwendig, das zum Transport verwendete Molekül wieder spurlos zu entfernen, um das GlcN6P in der Zelle unverändert zur Verfügung zu stellen. Diese Problemstellung inspirierte uns unter anderem zur Entwicklung einer photolabilen Schutzgruppe, die über einen zusätzlichen Aminolinker verfügt, und dadurch als lichtspaltbarer bifunktionaler Crosslinker dienen kann. Dieses Projekt ist im Abschnitt **2.4** dieser Arbeit beschrieben.



## 2.3 Nukleobasen mit neuartigen photolabilen Schutzgruppen (pHP und NDBF)

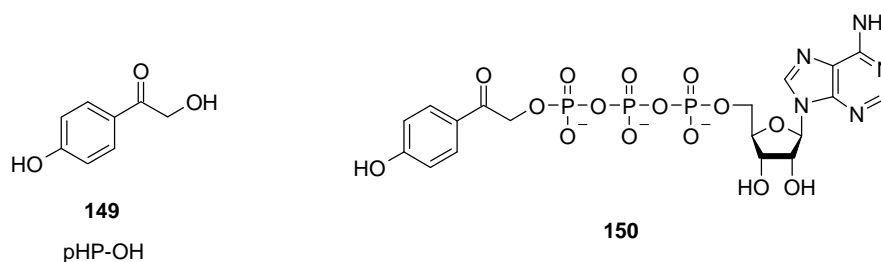
### 2.3.1 Einleitung

Durch die Verwendung photolabiler Schutzgruppen lassen sich biologisch wirksame Moleküle derart modifizieren, dass sie vorübergehend inaktiv sind. Durch Bestrahlung mit Licht der passenden Wellenlänge können orts- und zeitaufgelöst, auch innerhalb transparenter Modellorganismen, die photolabilen Schutzgruppen wieder abgespalten und dadurch die biologische Aktivität der verwendeten Substanz wieder hergestellt werden. Diese Einsatzmöglichkeit macht photolabile Schutzgruppen zu einem nützlichen Werkzeug zur Klärung biochemischer Fragestellungen. Die vielfältigen Einsatzgebiete stellen allerdings auch unterschiedlichste Anforderungen an die Eigenschaften der verwendeten photolabilen Schutzgruppen. Beispielhaft sei hier Löslichkeit, biologische Verträglichkeit der entstehenden Abspaltprodukte und die Fähigkeit eine bestimmte Funktionalität freizusetzen bzw. synthetische Zugänglichkeit des entsprechenden Schutzgruppenvorläufers (z.B. Aminogruppe) genannt. Diese und andere Anforderungen wurden auch von Pelliccioli und Wirz in einem Aufsatz über photolabile Schutzgruppen formuliert.<sup>[1]</sup> Es ist auch klar, dass praktisch keine photolabile Schutzgruppe allen Anforderungen gleichermaßen gerecht wird. Daher ist es für einen Arbeitskreis wie den unseren, der mit dem Einsatz photolabiler Schutzgruppen versucht, verschiedensten biochemischen Fragestellungen nachzugehen, wichtig, sich nicht auf die Verwendung einer bestimmten photolabilen Schutzgruppe zu beschränken, sondern verschiedene photolabile Schutzgruppen zu testen und eventuell weiterzuentwickeln um für ein jeweiliges Experiment aus einer Vielfalt an Möglichkeiten die passende photolabile Schutzgruppe auswählen zu können.

#### Die *p*-Hydroxyphenacyl-Gruppe (pHP)

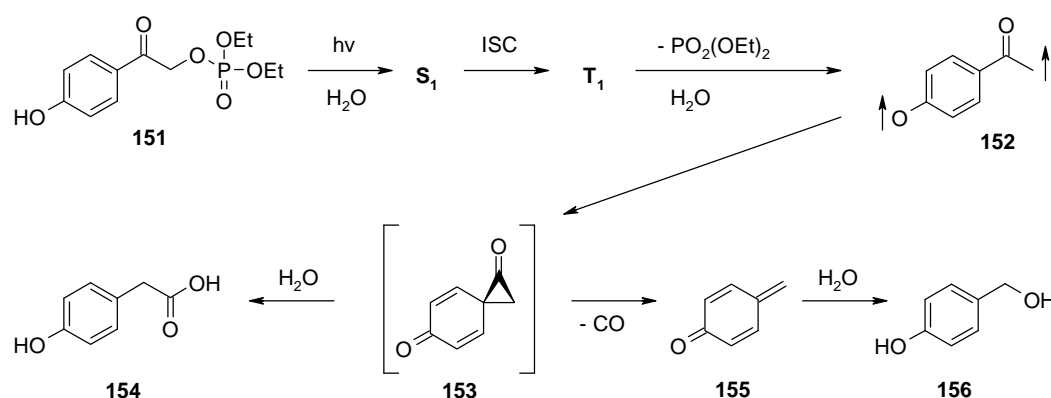
Die *p*-Hydroxyphenacyl-Gruppe wurde 1996 von Givens *et al.* vorgestellt und zunächst dazu verwendet, lichtinduziert ATP aus pHP-ATP (**150**, Abb. 66) freizusetzen.<sup>[21]</sup> Darüber hinaus wurde die Anwendbarkeit für die Freisetzung des Neurotransmitters GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und kleinen Peptiden demonstriert.<sup>[22]</sup> Die pHP-Gruppe ist in Abb. 66 in Form des entsprechenden Alkohols dargestellt (**149**). Die *p*-Hydroxyphenacyl-Gruppe hat gegenüber den meistens als photolabile Schutzgruppe verwendeten *o*-Nitrobenzyl-Derivaten einige Vorteile. Zum einen bewahrt sie den mit ihr photolabil geschützten Verbindungen durch ihre *p*-Hydroxyfunktion eine gewisse Wasserlöslichkeit. Darüber hinaus ist auch das Hauptprodukt der Photolysereaktion, die *p*-Hydroxyphenylelessigsäure, wasserlöslich und im Gegensatz zu den Nitrosoverbindungen, die bei der Photolyse der *o*-Nitrobenzyl-derivate entstehen, biologisch deutlich unbedenklicher. Bei der

Modifikation von chiralen Molekülen mit einer pHP-Gruppe wird zudem kein zusätzliches Stereozentrum eingeführt, wodurch keine weiteren Stereoisomere entstehen.



**Abb. 66:** Die *p*-Hydroxyphenacylgruppe (pHP) in Form des Alkohols (149) und pHP-geschütztes ATP (150).

Die pHP-Gruppe ist synthetisch leicht zugänglich aus *p*-Hydroxyacetophenon. Durch die hypsochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums der *p*-Hydroxyphenyllessigsäure gegenüber des Spektrums der pHP-Gruppe kann auch bei höherer Konzentration der photolabil geschützten Verbindung bei ausreichender Bestrahlung mit einer vollständigen Entschützung gerechnet werden.<sup>[6]</sup> Die Quantenausbeute für die Freisetzung von ATP aus pHP-ATP wird mit 0,37 angegeben.<sup>[21]</sup> (Zum Vergleich: die *o*-Nitrobenzylgruppe erreicht Quantenausbeuten zwischen 0,14 für photolabil geschütztes Glutamat und 0,65 für photolabil geschütztes Inositoltriphosphat.<sup>[24]</sup>) Das Absorptionsmaximum der pHP-Gruppe liegt bei 330 nm, sie hat aber bis 350 nm noch gute Absorptionseigenschaften. Durch Methoxysubstituenten an Position 3 und 5 des Phenylrings kann das Absorptionsmaximum zu 370 nm verschoben werden. Eine Anregung ist dann auch noch bei 400 nm möglich. Die Photolyse der Methoxyderivate der pHP-Gruppe verläuft allerdings mit deutlich geringeren Quantenausbeuten (0,03 bis 0,04).<sup>[23]</sup>



**Abb. 67:** Mechanismus der lichtinduzierten Freisetzung von Diethylphosphat aus dem entsprechenden pHP-Ester nach Givens *et al.*<sup>[173]</sup>

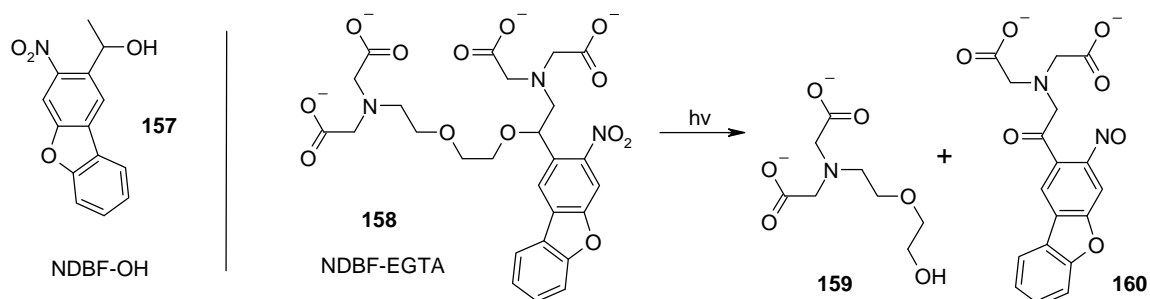
Nachteil der pHP-Gruppe ist zum einen die *p*-Hydroxyfunktion, die z.B. im Verlauf einer DNA/RNA-Festphasensynthese mit einer kompatiblen Schutzgruppe versehen werden muss und auch in

komplexeren Synthesen photolabil geschützter Verbindungen eine passende Schutzgruppenstrategie erfordert. Darüber hinaus sind photolabile Derivate der pHP-Gruppe vermutlich durch die  $\alpha$ -Ketogruppe reaktiver als die entsprechenden Derivate der *o*-Nitrobenzylgruppen.

Der postulierte Mechanismus der lichtinduzierten Abspaltung der pHP-Gruppe ist in Abb. 67 gezeigt. Die biradikalische Verbindung **152** konnte allerdings erst 2008 nachgewiesen werden.<sup>[173]</sup> Das System wird zunächst lichtinduziert in einen Singulettzustand angeregt. Anschließend geht das System durch Inter-System-Crossing in einen Triplettzustand über, aus dem die Abgangsgruppe abgespalten wird, und die biradikalische Zwischenstufe **152** entsteht. Diese geht wahrscheinlich in die experimentell noch nicht nachgewiesene Spiroverbindung **153** über, die in wässrigem Medium zur *p*-Hydroxyphenylelessigsäure (**154**) hydrolysiert wird, in Medium mit geringem Wassergehalt durch Decarbonylierung teilweise zu *p*-Hydroxybenzylalkohol (**156**) reagiert.<sup>[173]</sup>

### Die Nitrodibenzofuran-Gruppe (NDBF)

Die Nitrodibenzofuran-Gruppe ist eine relativ neue photolabile Schutzgruppe. Sie wurde 2006 von Ellis-Davies *et al.* vorgestellt, und dazu verwendet, ein Derivat von EGTA (Ethylenglykol-*bis*-( $\beta$ -aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure), ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator, photolytisch zu spalten und dadurch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen freizusetzen (Abb. 68).<sup>[24]</sup>



**Abb. 68:** Die NDBF-Gruppe in Form des entsprechenden Alkohols **157**; lichtinduzierte Spaltung des Calciumchelators NDBF-EGTA (**158**).<sup>[24]</sup>

Die Quantenausbeute der Photolysereaktion wurde mit  $\phi = 0,7$  bestimmt. Zusammen mit dem hohen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (330 nm) = 18400 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ergibt sich eine deutlich höhere photochemische Effizienz ( $\epsilon \cdot \phi$ ) als bei verschiedenen *o*-Nitrobenzylderivaten (Typische Werte für photoaktivierbare Verbindungen mit dem *o*-Nitrobenzylchromophor liegen für  $\epsilon$  und  $\phi$  zwischen 430 und 970 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bzw. 0,14 und 0,65). Die Photolyse der NDBF-Gruppe verlief 16 bis 160 mal effektiver als mit anderen *o*-Nitrobenzylderivaten. Darüber hinaus bestimmten die Autoren den Zweiphotoneneinfangquerschnitt der NDBF-Gruppe mit 0,6 GM bei 710 nm.<sup>[24]</sup> Damit zeichnet sich dieses Chromophor nicht nur als hocheffiziente photolabile Schutzgruppe im nahen UV-Bereich aus, sondern ermöglicht in Zukunft evtl. auch dreidimensional orts aufgelöste lichtgesteuerte Aktivierung von Nukleinsäuren in lebenden Organismen.

### 2.3.2 Vorarbeiten

Um die Eignung verschiedener photolabiler Schutzgruppen zu testen, Watson-Crick-Basenpaarung zu erschweren und dadurch die modifizierte Nukleinsäure vorübergehend in ihrer biologischen Wirkung zu hemmen, wurden bereits 2005 im Arbeitskreis Heckel verschiedene photolabil geschützte Thymidinderivate hergestellt (Abb. 69). Die Wahl fiel dabei auf verschiedene Derivate der Nitrobenzylgruppe. Die modifizierten Thymidinderivate wurden in Poly-T-Stränge eingebaut, und anschließend wurde mit der erhaltenen DNA unter anderem DNA-Schmelzpunktstudien durchgeführt.<sup>[39]</sup> Dabei zeigte sich, dass sich die Derivate mit einem Methylsubstituenten in benzylicher Position (**162** und **31**) durch Bestrahlung schneller entschützen ließen. Nur das Oligonukleotid mit T<sup>NPP</sup> **31** konnte dabei vollständig entschützt werden. Bei den anderen Modifikationen wurde in geringen Mengen ein nicht näher untersuchtes Nebenprodukt gebildet, das auch durch längeres Bestrahlen nicht weiter reagierte. Die methylsubstituierten Thymidinderivate führten in den Schmelzpunktstudien auch zu einer etwas stärkeren Duplexdestabilisierung.

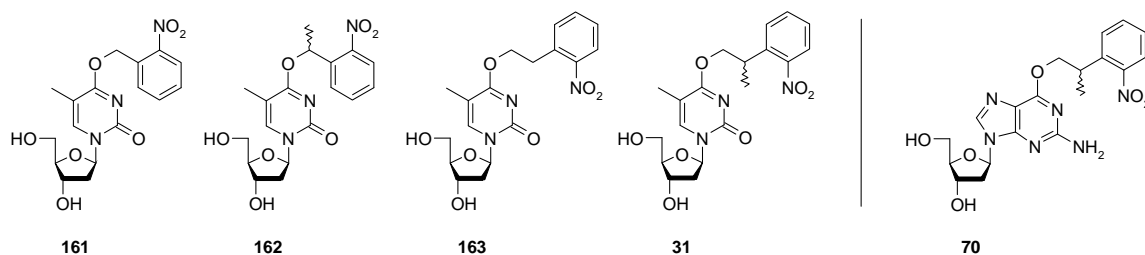


Abb. 69: photolabil geschützte Thymidinderivate; dG<sup>NPP</sup>.

Da in diesen Experimenten die 2-(2-Nitrophenyl)propyl-Gruppe (NPP) die besten Ergebnisse lieferte, wurde sie auch verwendet um ein photolabil geschütztes Derivat von Desoxyguanosin herzustellen (**70** Abb. 69).<sup>[135]</sup> In darauffolgenden Studien mit den photolabil geschützten Derivaten dT<sup>NPP</sup> und dG<sup>NPP</sup> zeigte sich aber auch, dass die Qualität der lichtinduzierten Entschützungsreaktion auch von der Position innerhalb der modifizierten Nukleinsäure und damit in gewissem Maße sequenzabhängig ist.<sup>[134,135]</sup>

Im Zuge dieser Arbeit kamen dann die photolabil geschützten Derivate dC<sup>NPE</sup> (**78**) und dA<sup>NPE</sup> (**85**) hinzu, die in den Kapiteln **2.1A** und **2.1B** vorgestellt wurden.

#### Synthese der *p*-Hydroxyphenacylgruppe (pHP-OH)

Die *p*-Hydroxyphenacylgruppe wurde im Arbeitskreis Heckel bereits 2005 von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit<sup>[174]</sup> in Form des entsprechenden Alkohols dargestellt. Über die Hydroxyfunktion sollte es möglich sein, die pHP-Gruppe zur photolabilen Modifikation von Thymidin oder auch

Desoxyguanosin zu verwenden. Für die DNA/RNA-Festphasensynthese musste die *p*-Hydroxygruppe mit einer Schutzgruppe versehen werden, die den Bedingungen der Festphasensynthese standhalten würde, aber sich während der ammoniakalischen Abspaltung der Nukleinsäure von der festen Phase ebenfalls abspalten ließe, um die Hydroxyfunktion wieder freizusetzen. Die Pivaloylgruppe schien für dieses Vorhaben geeignet zu sein. Die Synthese des pHP-Derivats ist in Abb. 70 beschrieben.

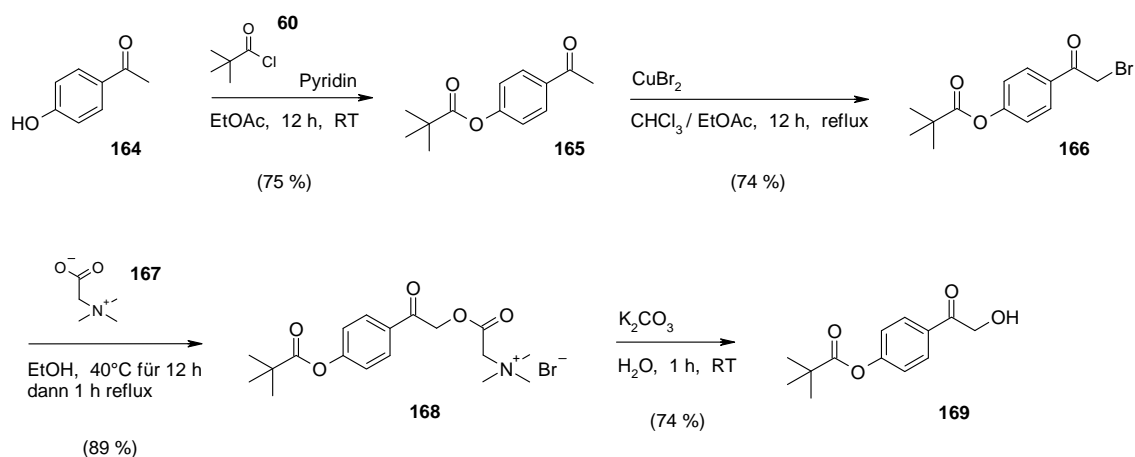


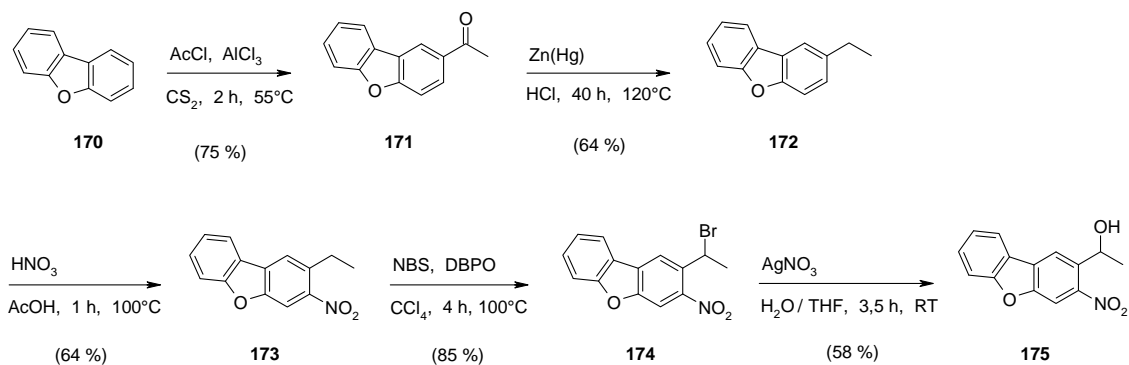
Abb. 70: Synthese der pHP-Schutzgruppe.

Die Synthese beginnt mit der Acylierung der *p*-Hydroxygruppe von *p*-Hydroxyacetophenon (**164**) mit Pivaloylchlorid (**60**) und Pyridin in Ethylacetat. Die Ausbeute betrug 75 %. Anschließend wurde Verbindung **165** nach dem Verfahren, das auch Givens *et al.* angewendet haben, mit Kupfer(II)-Bromid an der C2-Position bromiert (74 %).<sup>[21]</sup> Um zu vermeiden, dass es zu einer Tautomerie zwischen der C1-Carbonylgruppe und der an C2 einzuführenden OH-Gruppe kommt, wurde das Bromid **166** nicht alkalisch hydrolysiert, sondern unter milden Bedingungen nach einer abgewandelten Vorschrift von Wittmann und Ziegler<sup>[175]</sup> mit Betain (**167**) zum Betainaddukt **168** umgesetzt (89 % Ausbeute) und anschließend mit einer stöchiometrischen Menge Kaliumcarbonat in wässriger Lösung zum Alkohol **169** hydrolysiert (74 %).

### Synthese der Nitrodibenzofurangruppe (NDBF-OH)

Im Rahmen der Doktorarbeit von Timo Mack<sup>[145]</sup> wurde die Nitrodibenzofurangruppe in Form des entsprechenden Alkohols (**175**) dargestellt. Die Synthese von 2-Ethyl-3-nitrodibenzofuran (**173**) erfolgte nach Borsche *et al.*<sup>[176]</sup> Dazu wurde Dibenzofuran zunächst mit Acetylchlorid in Gegenwart von Aluminiumtrichlorid in einer *Friedel-Crafts*-Acylierung zu 2-Acetyldibenzofuran (**171**) umgesetzt. Die Ausbeute betrug 75 %. Anschließend wurde das Keton mit einer *Clemmensen*-Reduktion reduziert. Dazu wurde Verbindung **171** mit Zinkamalgam in Salzsäure mehrere Tage erhitzt. 2-Ethylidibenzofuran (**172**) wurde mit 64 % Ausbeute erhalten. Die Reduktion der Carbonylgruppe ist für die regiospezifische Nitrierung notwendig.<sup>[24]</sup> Anschließend erfolgte die

Nitrierung mit Salpetersäure in Eisessig bei 100°C. Verbindung **173** konnte mit 64 % Ausbeute isoliert werden. Die Bromierung wurde entsprechend der Synthese von Ellis-Davies *et al.* durchgeführt.<sup>[24]</sup> Dazu wurde Verbindung **173** mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) und Dibenzoylperoxid (DBPO) als Radikalstarter mit einer Ausbeute von 85 % zum entsprechenden Bromid **174** umgesetzt. Die Bromierung findet dabei ausschließlich an der benzylicischen Position statt, da das intermediär entstehende Radikal durch den Arylrest stabilisiert ist. Das Bromid wurde dann mit Silbernitrat in wässriger Lösung zum Alkohol **175** hydrolysiert mit einer Ausbeute von 58 %.



**Abb. 71: Synthese der NDBF-Gruppe.**

Die Synthese der NDBF-Gruppe wurde von Timo Mack durchgeführt. Die Synthesevorschriften sind aber der Vollständigkeit halber im experimentellen Teil dieser Arbeit mit aufgeführt.

Die NDBF-Gruppe wurde zusammen mit anderen photolabilen Schutzgruppen in Form der entsprechenden Alkohole und Amine hergestellt um das so genannte „convertible nucleotide“ Verfahren zu testen. Dabei sollten einzelne Nukleotidvorläufer derart modifiziert werden, dass sie sich nach der DNA-Festphasensynthese postsynthetisch mit den entsprechenden Vorläufern der photolabilen Schutzgruppen modifizieren liessen. Dazu wird z.B. das O<sup>4</sup> von Thymidin durch Triazol ersetzt und kann nach der Phosphoramiditmethode in ein Oligonukleotid eingebaut werden. Nach der Festphasensynthese kann dann die Triazolgruppe durch einen Alkohol oder ein Amin substituiert werden. (Swann *et. al.*<sup>[177]</sup>) Durch dieses Verfahren könnten viele photolabile Schutzgruppen getestet werden, ohne dass die Synthese der jeweiligen Nukleotidvorläufer notwendig wäre.

Leider erwies sich diese Methode als nicht so universell einsetzbar, wie gewünscht. Die postsynthetische Modifikation der Nucleinsäuren gelang nicht für alle photolabilen Schutzgruppen und erfordert evtl. aufwendige Optimierungen für verschiedene photolabile Schutzgruppenvorläufer, so dass sich praktisch kein synthetischer Vorteil ergab. (Für eine detaillierte Beschreibung siehe Doktorarbeit von Timo Mack.<sup>[145]</sup>)

### 2.3.3 Zielsetzung / Planung

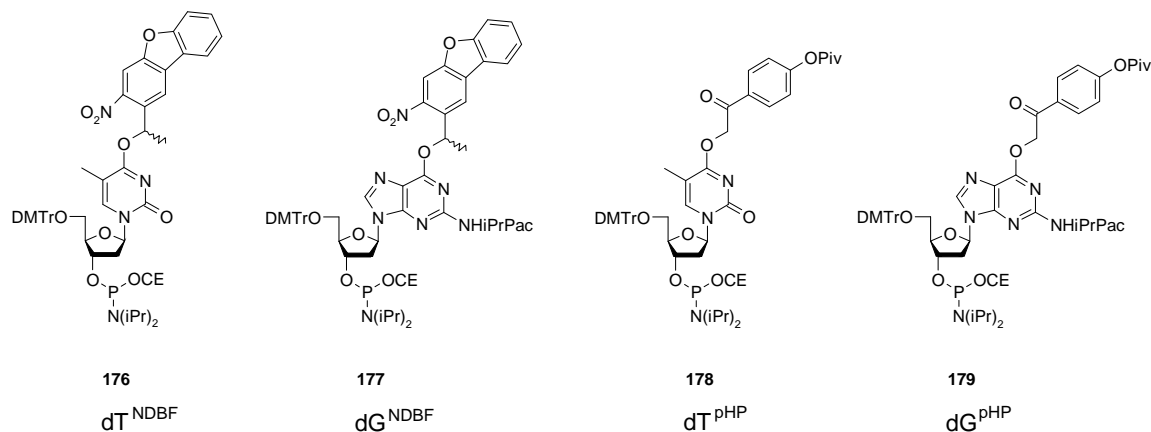
Ziel dieses Projektes war es, zusätzlich zu den in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Nitrobenzylderivaten (vor allem NPE (1-(2-Nitrophenyl)ethyl-) und NPP (2-(2-Nitrophenyl)propyl-)) weitere photolabile Schutzgruppen auf ihre Eignung zu testen, lichtaktivierbare Nucleinsäuren herzustellen. Da der Weg über die „convertible nucleotide“-Methode nicht die gewünschten Ergebnisse brachte, sollten nun auf klassisch organisch-synthetischem Weg die mit den entsprechenden photolabilen Schutzgruppen modifizierten Nucleotidbausteine für die DNA-Festphasensynthese hergestellt werden.

Da der synthetische Aufwand nicht unerheblich sein würde, galt es, unter der Vielzahl an Möglichkeiten die zu untersuchenden photolabilen Schutzgruppen so auszuwählen, dass sie die bereits verwendeten NPE- und NPP-Derivate in ihren Eigenschaften optimal ergänzen würden.

Die Wahl fiel zum einen auf die Nitrodibenzofuran-Gruppe (NDBF). Mit dem NDBF-Chromophor sollte die lichtinduzierte Abspaltung deutlich effizienter verlaufen. Darüber hinaus könnten durch Verwendung der NDBF-Gruppe Experimente ausgearbeitet werden, in denen die lichtinduzierte Abspaltung durch Zwei-Photonen-Anregung stattfindet. Dadurch könnte die Wirkung der vorübergehend inaktivierten Verbindung dreidimensional orts aufgelöst freigesetzt werden. Durch die Verwandtschaft zwischen der NDBF-Gruppe und der NPE-Gruppe und den vermutlich analog verlaufenden Photolysemechanismus bestand natürlich weiterhin das Problem, dass es sich bei dem Abspaltprodukt um ein biologisch nicht unbedenkliches Nitroso-Derivat handelte. Andererseits bedeutete diese Analogie auch hohe Erfolgsaussichten, sowohl die Synthese der photoaktivierbaren Nucleotidvorläufer, als auch die DNA-Synthese, sowie die Photoreaktion selbst.

Die zweite photolabile Schutzgruppe, die getestet werden sollte, war die *p*-Hydroxyphenacylgruppe (pHP). Die pHP-Gruppe weicht in ihrer chemischen Struktur deutlich von den *o*-Nitrobenzylderivaten ab. Das erhöht zum einen den Syntheseaufwand, da die *p*-Hydroxygruppe eine zusätzliche Schutzgruppe erforderlich macht. Darüber hinaus bergen die zusätzlichen funktionellen Gruppen ( $\alpha$ -Ketogruppe, *p*-Hydroxygruppe inklusiver entsprechender Schutzgruppe) das Risiko, dass sie den verwendeten Bedingungen, sowohl bei der Synthese der Nucleotidvorläufer, als auch während der DNA-Festphasensynthese evtl. nicht standhalten würden. Die Vorteile der pHP-Gruppe dagegen sind zum einen die Ungiftigkeit der bei der Photolyse entstehenden Abspaltprodukte. Zusätzlich bietet die pHP-Gruppe den Vorteil einer erhöhten Wasserlöslichkeit, sowohl der photolabil modifizierten Verbindung als auch des Abspaltproduktes. Dies kann bei höheren Konzentrationen der durch Licht zu aktivierenden Verbindung durchaus von Bedeutung sein. Bei Belichtungstests des photolabil geschützten Glukosamin-6-phosphats aus Kapitel 2.2 war die Konzentration des 2-(*o*-Nitrophenyl)-1-propens (Abspaltprodukt der NPP-Gruppe) teilweise so hoch, dass es in wässriger Lösung ausfiel und durch Trübung der Lösung eine vollständige lichtinduzierte Entschützung unmöglich machte.

Um den synthetischen Aufwand weiter einzugrenzen, sollten zunächst nur Thymidin und Desoxyguanosin mit den ausgewählten Schutzgruppen modifiziert werden. Dadurch mussten die Schutzgruppenvorläufer nur in der Form des entsprechenden Alkohols hergestellt werden um beide Nucleoside zu modifizieren. Da die photolabil geschützten Nucleotidvorläufer nach der Phosphoramiditmethode in ein Oligonucleotid eingebaut werden sollten, wurde am 3'-Sauerstoff eine geschützte Phosphoramidit-Gruppe benötigt. Die 5'-OH-Gruppe musste mit einer 4,4'-Dimethoxytritylgruppe geschützt werden. Für die Schützung der exozyklischen Aminogruppe des Desoxyguanosins fiel die Wahl auf die Isopropylphenoxyacetylgruppe.<sup>[178]</sup> Die Abspaltung dieser Schutzgruppe ist unter besonders milden Bedingungen möglich. Da wir nicht wussten wie stabil die neuen photolabilen Modifikationen sein würden, wollten wir uns diese Möglichkeit offenhalten. In Abb. 72 sind die zu synthetisierenden Zielstrukturen gezeigt.



**Abb. 72: Strukturen der zu synthetisierenden Phosphoramidite. Die Thymidin-Derivate wurden von Timo Mack hergestellt.<sup>[145]</sup>**

Um die Eignung der neuen photolabilen Modifikationen für die DNA/RNA-Festphasensynthese zu testen, um ihre Fähigkeit, DNA-Doppelstränge zu destabilisieren, zu quantifizieren und um weitere photochemische Eigenschaften zu bestimmen, sollten die zu synthetisierenden photolabil geschützten Phosphoramidite in eine 25mer Nucleinsäuresequenz eingebaut werden. Es wurde eine DNA-Sequenz gewählt, die einen Schmelzpunkt im Bereich von 80°C aufweist und keine selbstkomplementären Bereiche enthält, um die Bildung von störenden Sekundärstrukturen auszuschließen. Für jedes photoaktivierbare Nucleosid sollten zwei Oligonucleotide hergestellt werden; eines mit nur einer photolabilen Modifikation an der mittleren Position und ein weiteres mit insgesamt drei photolabilen Modifikationen, eine in der Mitte und jeweils eine fünf Nucleotide links und rechts davon (Abb. 73). Die DNA-Stränge mit drei photolabilen Modifikationen sollten einen Eindruck davon vermitteln, ob auch beim Einbau von mehr als einer photolabilen Schutzgruppe eine vollständige Wiederherstellung der unmodifizierten Nucleinsäure durch Belichten erreicht werden kann. Die erhaltenen Nucleinsäuren sollten zum einen für Belichtungstests verwendet werden, und zusätzlich mit den entsprechenden Gegensträngen für DNA-Schmelzpunktmessungen herangezogen werden. Um einen Vergleich für die



Stärke der Duplexdestabilisierung mit bereits bestehenden Systemen zu haben, sollten neben den entsprechenden unmodifizierten DNA-Strängen auch DNA-Oligonukleotide mit den photoaktivierbaren Nukleosiden dT<sup>NPP</sup> (**31**) und dG<sup>NPP</sup> (**70**), die schon in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe verwendet wurden<sup>[39,134,135]</sup>, synthetisiert und vermessen werden.

**180** 5'-GGG CGG (G/T) CG CGT XTA CAC (G/T) AC ACA C-3'  
**181** 5'-GGG CGG XCG CGT XTA CAC XAC ACA C-3'

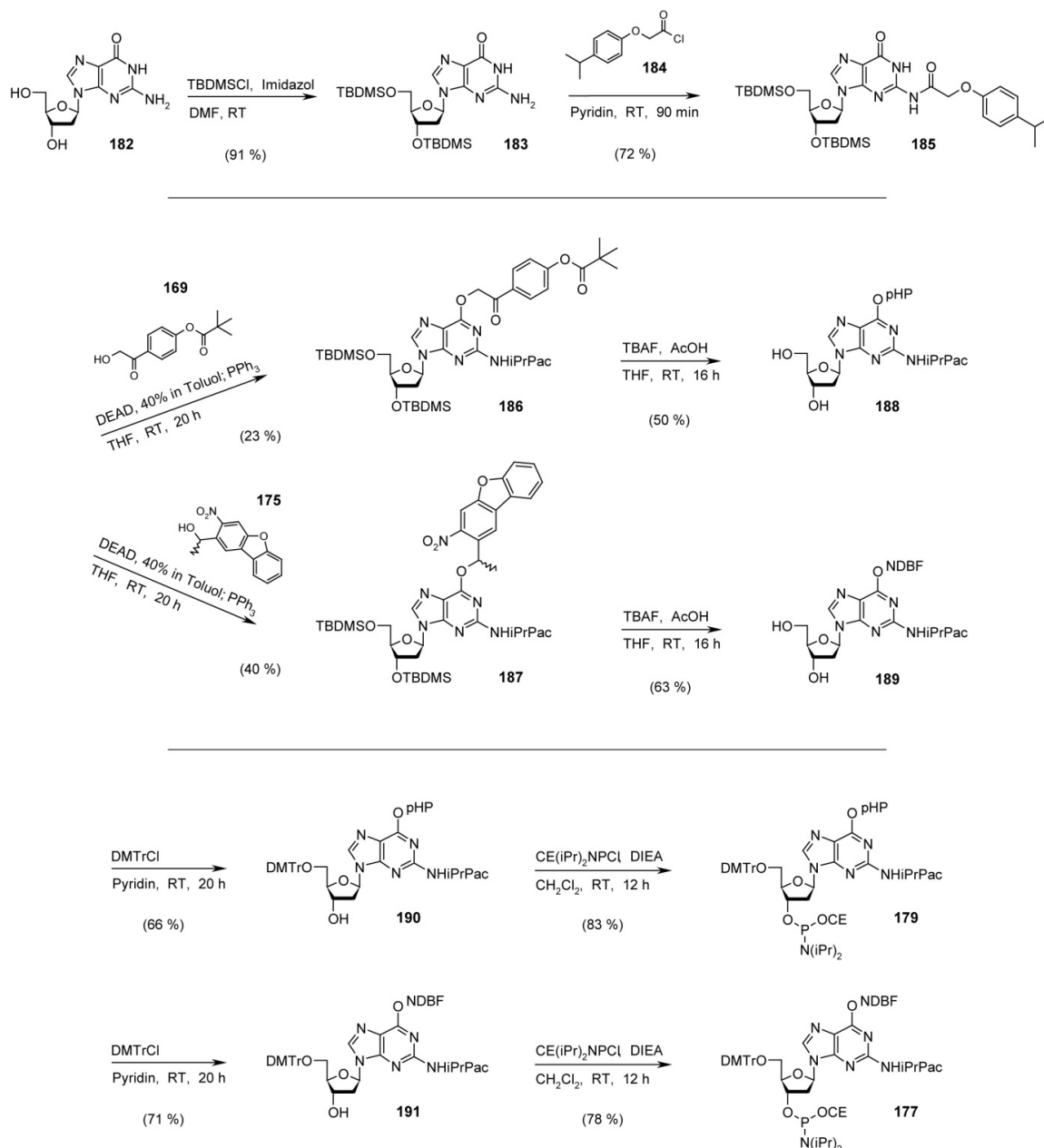
**Abb. 73: Testsequenzen für die geplanten Schmelzpunktbestimmungen. X = photolabil geschütztes Nukleosid.**

Um möglichst schnell Ergebnisse zu erhalten, wurde die Durchführung dieses Projekts auf zwei Doktoranden aufgeteilt. Von mir wurde die Synthese der Desoxyguanosin-Derivate durchgeführt, Timo Mack<sup>[145]</sup> synthetisierte die Thymidin-Derivate. Die DNA-Synthese, Aufreinigung und Belichtungstests der DNA und die Interpretation der Ergebnisse wurden von beiden Doktoranden in gleichem Anteil durchgeführt.

## 2.3.4 Durchführung und Ergebnisse

### Synthese von O<sup>6</sup>-NDBF-Desoxyguanosin und O<sup>6</sup>-pHP-Desoxyguanosin

Um Desoxyguanosin an der O<sup>6</sup>-Position mit den beiden photolabilen Schutzgruppen pHP und NDBF zu modifizieren, wurde der Weg gewählt, der auch schon für die NPP-Gruppe erfolgreich war.<sup>[135]</sup> Da die Synthese der pHP- und NDBF-geschützten Desoxyguanosinvariante analog durchgeführt wurde, sind beide Wege in Abb. 74 zusammengefasst. Zunächst wurden die beiden Hydroxygruppen von Desoxyguanosin (**182**) unter Standardbedingungen TBDMS-geschützt. Die Ausbeute betrug 91 %. Anschließend erfolgte die Schützung der exozyklischen Aminofunktion des Desoxyguanosins mit Isopropylphenoxyacetylchlorid (iPrPac-Cl, **184**)<sup>[178,179]</sup> in Pyridin bei Raumtemperatur. Um bei dieser Reaktion gute Ausbeuten zu erhalten ist eine optimale Reaktionsführung sehr wichtig, da es bei zu langen Reaktionszeiten zu einer Zersetzung des anfänglich gebildeten Produktes kommt. In unserem Fall erfolgte die Zugabe von iPrPac-Cl bei 0°C. Die Reaktion wurde zwei Stunden bei 0°C und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, dann bei 0°C durch Zugabe von Methanol abgebrochen. Nach anschließender Aufarbeitung wurde auf diesem Weg eine Ausbeute von 72 % erzielt.



**Abb. 74: Synthese von  $\text{dG}^{\text{pHP}}$  und  $\text{dG}^{\text{NDBF}}$ . (DEAD = Diethylazodicarboxylat; DIEA = Diisopropylethylamin; DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl-; iPrPac = Isopropylphenoxyacetyl-; TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid; TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl-)**

Für die O<sup>6</sup>-Alkylierung des geschützten Desoxyguanosinderivats **185** mit den entsprechenden photolabilen Schutzgruppenvorläufern **169** und **175** wurde nach Johnson *et. al.*<sup>[180]</sup> die Mitsunobu-Reaktion<sup>[181]</sup> verwendet. Im Falle des pHP-Derivats **186** verlief die Alkylierung mit mäßigen 23 %. Die Alkylierung mit dem NDBF-Vorläufer lieferte eine etwas bessere Ausbeute von 40 % (**187**). Diese Ergebnisse sind etwas enttäuschend, da, zum Vergleich, die Alkylierung mit 2-(2-Nitrophenyl)propanol (NPP-OH) unter gleichen Bedingungen mit einer Ausbeute von 74 % verlief. Sollten die Reaktionsprodukte **186** und **187** unter Mitsunobu-Bedingungen nicht stabil sein und sollte es dadurch zu konkurrierenden Nebenreaktionen kommen, so könnte evtl. eine Anpassung der

Reaktionszeit die Effizienz der Alkylierung noch etwas verbessern. Die genauen Ursachen für die geringen Ausbeuten wurden allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die O<sup>6</sup>-alkylierten Desoxyguanosinderivate **186** und **187** wurden dann in essigsaurer THF-Lösung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) versetzt um die TBDMS-Gruppen zu entfernen. Die Gegenwart von Essigsäure ist erforderlich, um die Nucleophilie der Fluoridionen herabzusetzen, da diese sonst die iPrPac-Gruppe nucleophil angreifen und abspalten würden. Die desilylierten Verbindungen wurden mit 50 % (O<sup>6</sup>-pHP-dG, **188**) und 63 % (O<sup>6</sup>-NDBF-dG, **189**) Ausbeute erhalten. Anschließend erfolgte die Tritylschätzung der 5'-OH-Gruppe mit einem leichten Überschuß 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin. 5'-DMTr-O<sup>6</sup>-pHP-dG (**190**) wurde mit 66 %, 5'-DMTr-O<sup>6</sup>-NDBF-dG (**191**) mit 71 % Ausbeute erhalten. Im letzten Syntheseschritt wurden die photolabil geschützten Desoxyguanosinderivate mit Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit zu den entsprechenden Phosphoramiditen umgesetzt. Die Zielverbindungen wurden mit 83 % (dG<sup>pHP</sup>, **179**) bzw. 78 % (dG<sup>NDBF</sup>, **177**) erhalten.

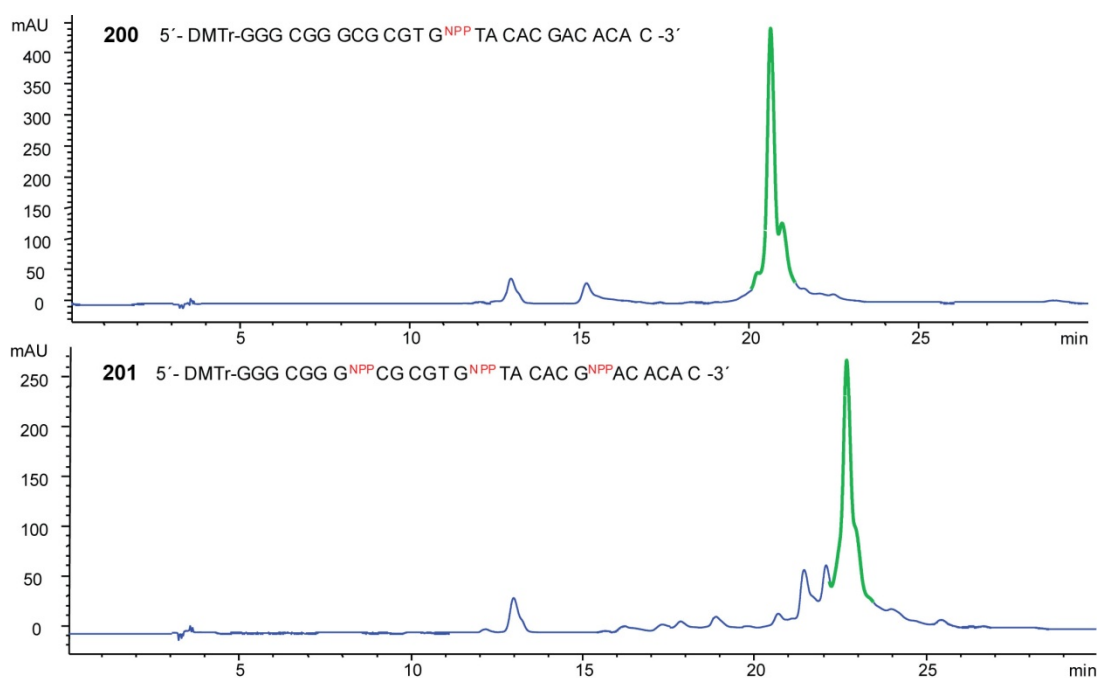
### DNA-Festphasensynthese mit pHP- und NDBF-geschützten Desoxyguanosin- und Thymidinderivaten

Die synthetisierten Phosphoramidite dG<sup>pHP</sup> (**179**), dT<sup>pHP</sup> (**178**), dG<sup>NDBF</sup> (**177**) und dT<sup>NDBF</sup> (**176**) wurden, genauso wie die zum Vergleich dienenden Phosphoramidite der photolabil geschützten Nucleotidvorläufer dG<sup>NPP</sup> (**70**) und dT<sup>NPP</sup> (**31**), in die geplanten Testsequenzen eingebaut. Die DNA-Synthese erfolgte auf einem ABI 392 RNA/DNA Synthesizer nach der Phosphoramidit-Methode. Als Aktivator diente Ethylthiotetrazol. Die Synthesen wurden auf ABI LV200 Polystyrol Synthesesäulen durchgeführt. Die exozyklischen Aminogruppen der Phosphoramidite der unmodifizierten Nucleotide waren folgendermaßen geschützt: dA Benzoyl; dC Acetyl; dG dmf.

<b>192</b>	5'-GGG CGG GCG CGT G <sup>pHP</sup> TA CAC GAC ACA C-3'
<b>193</b>	5'-GGG CGG G <sup>pHP</sup> CG CGT G <sup>pHP</sup> TA CAC G <sup>pHP</sup> AC ACA C-3'
<b>194</b>	5'-GGG CGG TCG CGT T <sup>pHP</sup> TA CAC TAC ACA C-3'
<b>195</b>	5'-GGG CGG T <sup>pHP</sup> CG CGT T <sup>pHP</sup> TA CAC T <sup>pHP</sup> AC ACA C-3'
<b>196</b>	5'-GGG CGG GCG CGT G <sup>NDBF</sup> TA CAC GAC ACA C-3'
<b>197</b>	5'-GGG CGG G <sup>NDBF</sup> CG CGT G <sup>NDBF</sup> TA CAC G <sup>NDBF</sup> AC ACA C-3'
<b>198</b>	5'-GGG CGG TCG CGT T <sup>NDBF</sup> TA CAC TAC ACA C-3'
<b>199</b>	5'-GGG CGG T <sup>NDBF</sup> CG CGT T <sup>NDBF</sup> TA CAC T <sup>NDBF</sup> AC ACA C-3'
<b>200</b>	5'-GGG CGG GCG CGT G <sup>NPP</sup> TA CAC GAC ACA C-3'
<b>201</b>	5'-GGG CGG G <sup>NPP</sup> CG CGT G <sup>NPP</sup> TA CAC G <sup>NPP</sup> AC ACA C-3'
<b>202</b>	5'-GGG CGG TCG CGT T <sup>NPP</sup> TA CAC TAC ACA C-3'
<b>203</b>	5'-GGG CGG T <sup>NPP</sup> CG CGT T <sup>NPP</sup> TA CAC T <sup>NPP</sup> AC ACA C-3'

**Abb. 75: Synthetisierte DNA-Oligonucleotide mit verschiedenen photolabilen Schutzgruppen.**

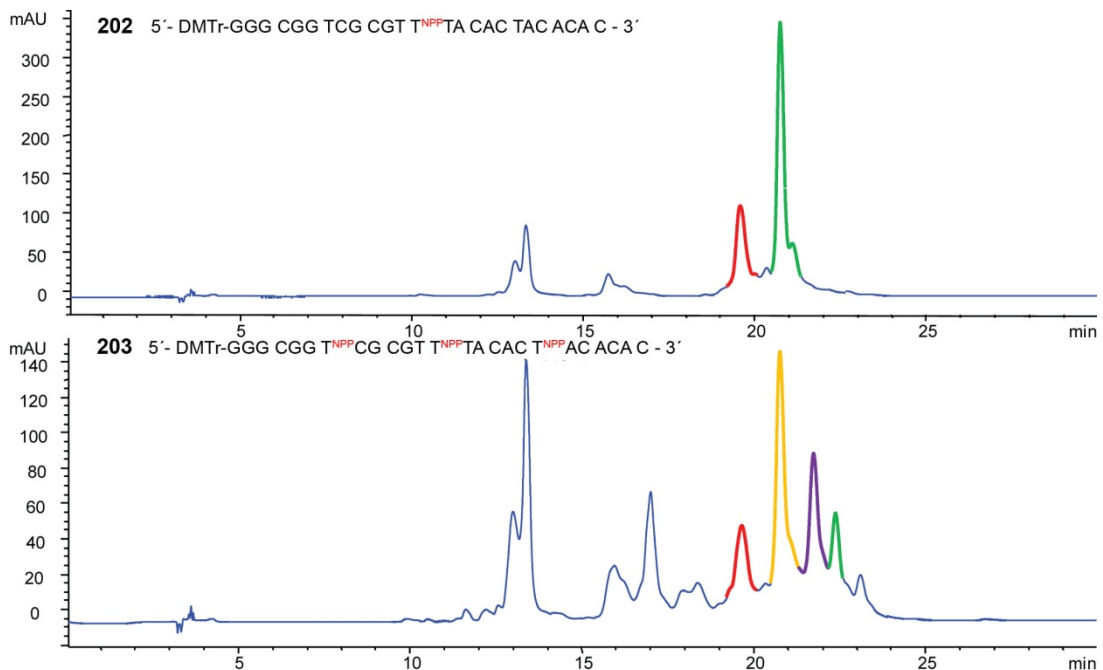
Die Synthesen der DNA-Sequenzen erfolgten „DMTr-ON“, das heißt, die Dimethoxytritylgruppe des letzten eingebauten Nukleosids wurde nicht abgespalten, um eine bessere HPLC-Aufreinigung zu ermöglichen. Die synthetisierten Sequenzen sind in Abb. 75 zusammengefasst. Um verschiedene Abspaltbedingungen testen zu können, wurde zunächst jeweils eine Spatelspitze des Festphasenmaterials der verschiedenen DNA-Synthesen mit dem entsprechenden Abspaltreagenz inkubiert und nach anschließender Filtration mit RP-HPLC analysiert. Die Abspaltung erfolgte mit konzentriertem wässrigem Ammoniak. Da aus vorherigen Experimenten bekannt war, dass einige photolabile Modifikationen an der O<sup>4</sup>-Position beim Thymin bei erhöhten Temperaturen während der Abspaltung nicht stabil sind, wurden die Proben fünf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.



**Abb. 76: RP-HPLC-Chromatogramme der mit dG<sup>NPP</sup> modifizierten DNA-Sequenzen (200 und 201). Das Vollängenprodukt mit allen photolabilen Schutzgruppen ist grün markiert.**

In Abb. 76 sind die Chromatogramme der dG<sup>NPP</sup>-modifizierten DNA-Stränge zu sehen. Die Sequenzen mit einem dG<sup>NPP</sup> (**200**) bzw. drei dG<sup>NPP</sup> (**201**) liefern Chromatogramme in denen jeweils ein Hauptprodukt zu erkennen ist (20,7 min für **200** und 22,8 min für **201**). Es sind kaum Abbruchsequenzen vorhanden (im Bereich 12-15 min). Das zeigt, dass die Synthese gut verlaufen ist. Darüber hinaus existiert kein Signal für die Synthetisierte DNA ohne photolabile Schutzgruppen. Das heißt, unter den verwendeten Abspaltbedingungen ist die photolabile Modifikation stabil und die photoaktivierbare DNA kann vollständig abgespalten und entschützt werden. Gut zu erkennen ist auch, dass die Sequenz mit drei NPP-Gruppen eine erhöhte Retentionszeit verglichen mit der einfach NPP-derivatisierten Sequenz aufweist. In Abb. 77 erkennt man im Chromatogramm für die Sequenz mit einem dT<sup>NPP</sup> (**202**) zusätzlich zum gewünschten Produkt (20,8 min, grün) ein weiteres Signal bei

19,6 min (rot) das der DNA ohne die photolabile Schutzgruppe entspricht. Offensichtlich sind die gewählten Abspaltbedingungen für das  $dT^{NPP}$  bereits zu aggressiv.

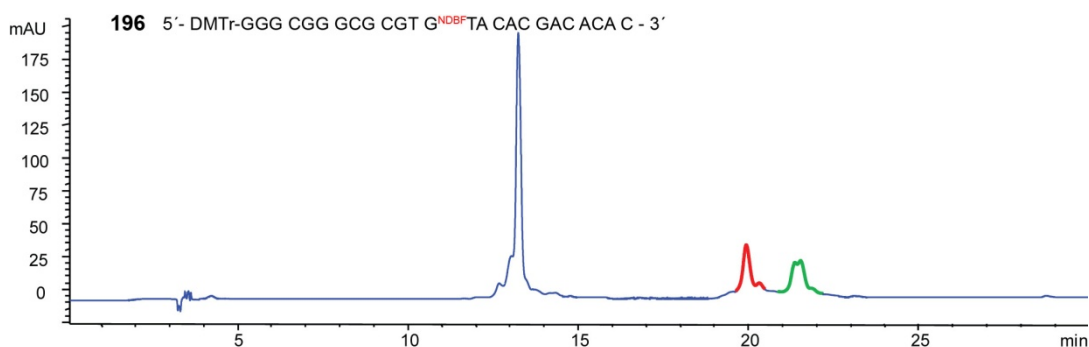


**Abb. 77: RP-HPLC-Chromatogramme der  $dT^{NPP}$ -geschützten DNA-Sequenzen (202 und 203). Das grün markierte Signal repräsentiert das gewünschte Produkt mit einer (202, oben) bzw. drei (203, unten) photolabilen Schutzgruppen. Rot zeigt die DNA ohne photolabile Schutzgruppe. Im unteren Chromatogramm repräsentiert gelb die DNA mit einer, violett die DNA mit zwei photolabilen Schutzgruppen.**

Im Falle der dreifach  $dT^{NPP}$ -modifizierten DNA (203) zeigt sich dieses Problem noch deutlicher. Das Signal für das dreifach photolabil geschützte Produkt (22,5 min, grün) ist zwar vorhanden, aber die Abbauprodukte denen eine (21,8 min, violett), zwei (20,9 min, gelb) oder gar alle (19,8 min, rot) photolabilen Schutzgruppen fehlen, überwiegen. Die Abbruchsequenzen erscheinen auch dominanter. Das liegt allerdings daran, dass das synthetisierte Vollängenprodukt sich auf vier Signale verteilt. Insgesamt kann man sagen, dass die Synthese gut funktioniert hat, sich aber im Falle der dreifach  $dT^{NPP}$ -modifizierten DNA mit den verwendeten Abspaltbedingungen kaum nennenswerte Mengen des gewünschten Produktes isolieren lassen würden.

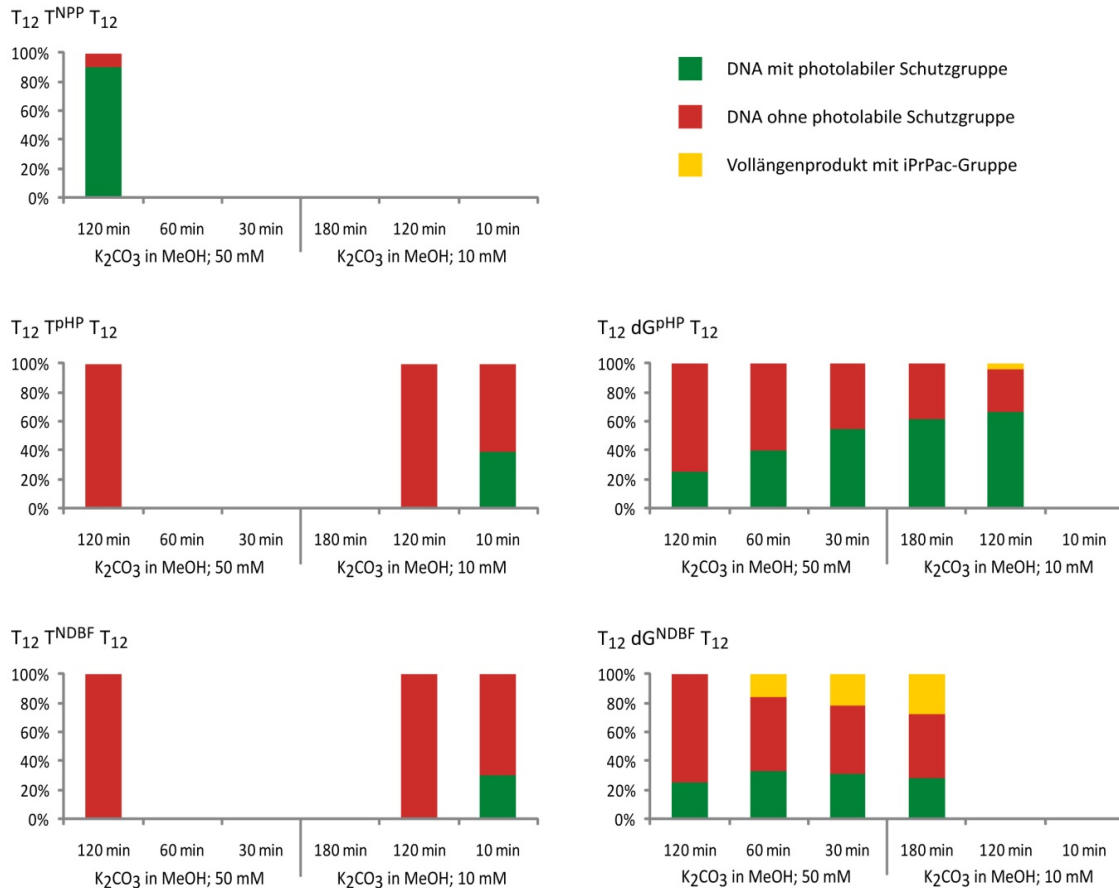
Für die pHP- bzw. NDBF-modifizierten Stränge sahen die Abspaltversuche leider deutlich schlechter aus. Beispielhaft ist in Abb. 78 das Chromatogramm für die Sequenz **196** mit einer  $dG^{NDBF}$ -Modifikation gezeigt. Bei 21,5 min (grün) ist das Signal für das photolabil geschützte Produkt zu erkennen. Es besteht aus einer Doppelspitze, die evtl. von den beiden Diastereomeren herrührt, die durch das zusätzliche stereogene Zentrum der NDBF-Gruppe entstehen. Ein ebenso großes Signal bei 20 min (rot) entspricht der DNA ohne photolabile Schutzgruppe. Bei 13,2 min existiert ein großes Signal, das den Abbruchsequenzen entspricht. Die Synthese ist also deutlich schlechter verlaufen als im Falle der NPP-modifizierten Nukleotidvorläufer. Für die dreifach  $dG^{NDBF}$ -modifizierte Sequenz (197) können im Chromatogramm verschiedene Signale detektiert werden, die DNA-Strängen mit

unterschiedlicher Anzahl photolabiler Schutzgruppen entsprechen. Durch die Komplexität des Chromatogramms lässt sich allerdings das Produktsignal nicht eindeutig identifizieren. Für die pHP- und NDBF-geschützten Thymidine sowie für das pHP-geschützte Desoxyguanosin lassen sich in den entsprechenden Chromatogrammen ausschließlich die Signale für die DNA ohne photolabile Schutzgruppe detektieren. Offensichtlich sind die photolabilen Modifikationen unter den verwendeten Abspaltbedingungen nicht ausreichend stabil. Es wurden andere, evtl. schonendere Abspaltungsbedingungen getestet: Eine Mischung von wässriger und ethanolischer Methylaminlösung (1:1) für zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. konzentrierte wässrige Ammoniaklösung / Methanol 1:3 für vier Stunden bei Raumtemperatur. Hier trat allerdings das Problem auf, dass die Reaktionszeiten für die verwendeten Reagenzien nicht ausreichten, um die DNA vollständig zu entschützen. Im Falle der Ammoniak-Methanol-Mischung verlief selbst die Abspaltung der DNA von der festen Phase unvollständig, was sich in äußerst geringer Signalintensität in den Chromatogrammen äußerte.



**Abb. 78:** RP-HPLC-Chromatogramm der DNA-Sequenz mit einem dG<sup>NDBF</sup>-Nukleotid. Das grüne Signal repräsentiert die DNA mit photolabiler Schutzgruppe, das rote Signal die DNA ohne photolabile Schutzgruppe.

Um die neuen photolabil geschützten Nukleotidvorläufer doch noch in DNA testen zu können, mussten noch mildere Abspaltungsbedingungen verwendet werden. Dazu war allerdings die verwendete Testsequenz nicht geeignet, da die verwendeten Schutzgruppen auf den exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen unter milderen Bedingungen nicht mehr vollständig entfernt werden können. Daher wurden die photolabil geschützten Nukleotidvorläufer an den gleichen Positionen (13 bzw. 7, 13 und 19) in eine 25mer Poly-T-Sequenz eingebaut, da T keine exozyklische Aminofunktion besitzt, die während der DNA-Festphasensynthese geschützt sein muss. Da die Synthese mit den pHP- bzw. NDBF-geschützten Phosphoramiditen offensichtlich nicht sehr effizient verlaufen war, wurden diese photolabil geschützten Phosphoramidite mit einem speziellen Kopplungszyklus in die DNA eingebaut, bei dem die Reaktionszeit auf sieben Minuten verlängert wurde. Für die Abspaltungstests sollte methanolische Kaliumcarbonatlösung (50 mM) zur Anwendung kommen. Dieses Reagenz wird bei der sogenannten Ultramildstrategie verwendet. Die Abspaltungsdauer beträgt drei Stunden bei Raumtemperatur.



**Abb. 79: Ergebnisse der Abspaltungstests für die poly-T-Sequenzen mit jeweils einer photolabilen Modifikation. Der Anteil für das 25mer mit photolabiler Schutzgruppe ist jeweils grün markiert, der Anteil ohne photolabile Schutzgruppe rot. Im Falle der photolabil geschützten Desoxyguaninnukleotide ist Anteil der Vollängenprodukte, die vermutlich noch die iPrPac-Gruppe tragen, gelb markiert.**

Da unsere poly-T-Testsequenzen über keine geschützten exozyklischen Aminofunktionen verfügen, wurden auch kürzere Abspaltungszeiten und eine Kaliumcarbonatlösung geringerer Konzentration (10 mM in MeOH) getestet. Die Abspaltungstests wurden wie zuvor mit einer Spatelspitze des Festphasenmaterials in den verschiedenen Entschützungsreagenzien durchgeführt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben filtriert und mit RP-HPLC analysiert. Aus den Chromatogrammen wurde durch Integration der Fläche der verschiedenen Signale das Verhältnis zwischen den verschiedenen Abspaltungsprodukten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 79 zusammengefasst. Da die photolabilen Schutzgruppen auch unter diesen milden Bedingungen nur teilweise stabil waren, sind nur die Ergebnisse für die einfach modifizierte DNA-Sequenzen gezeigt. Die Chromatogramme der dreifach photolabil geschützten waren teilweise so komplex, dass eine Auswertung nicht möglich war. In Abb. 79 erkennt man, dass die zum Vergleich verwendete Sequenz mit dT<sup>NPP</sup> nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden in 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. (MeOH) fast ausschließlich das gewünschte, photolabil geschützte Produkt lieferte (90 %).

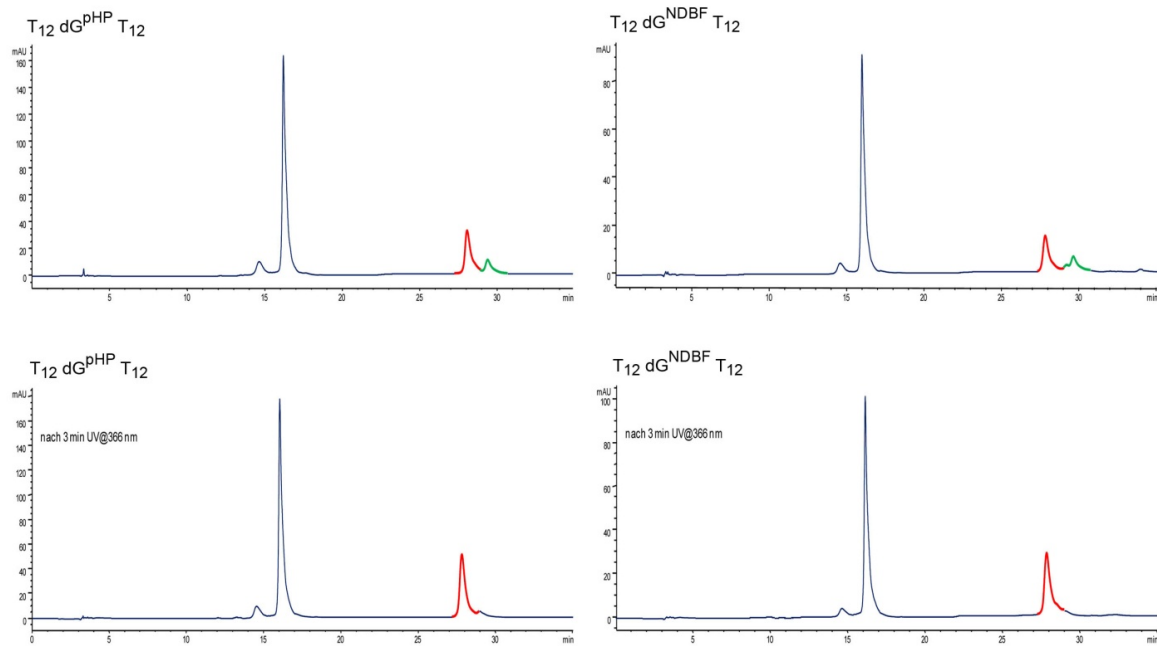
Die beiden Sequenzen mit den photolabil geschützten Thymidin-Derivaten dT<sup>pHP</sup> bzw. dT<sup>NDBF</sup> lieferten nach zweistündiger Abspaltung in 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. (MeOH) ausschließlich das

Vollängenprodukt ohne photolabile Schutzgruppe. Auch bei Verwendung der 10 mM  $K_2CO_3$ -Lsg. in MeOH für zwei Stunden änderte sich daran nichts. Erst als die Inkubationszeit in diesem Reagenz auf 10 Minuten reduziert wurde, ließ sich im Chromatogramm das gewünschte photolabil geschützte Produkt nachweisen mit einem Anteil von 39 % für  $dT^{pHP}$  bzw. 30 % für  $dT^{NDBF}$ .

Die photolabilen Modifikationen waren erwartungsgemäß etwas stabiler in den  $O^6$ -modifizierten Desoxyguanosinderivaten. Für zwei Stunden 50 mM  $K_2CO_3$ -Lsg. in MeOH ließ sich im Falle von  $dG^{pHP}$  immerhin 25 % photolabil geschütztes Produkt nachweisen. Mit zunehmend milder werdenden Bedingungen wächst auch der Anteil an DNA, die noch die photolabile Modifikation trägt. Mit 10 mM  $K_2CO_3$ -Lsg. (MeOH) für zwei Stunden kann der Anteil an  $dG^{pHP}$  modifizierter DNA auf den in dieser Studie besten Wert von 66 % gesteigert werden. Allerdings ist unter diesen Abspaltungsbedingungen zum ersten Mal auch ein Signal bei höherer Retentionszeit zu erkennen (4 %), das vermutlich dem Vollängenprodukt entspricht, bei dem die exozyklische Aminofunktion des dG noch die iPrPac-Gruppe trägt.

Für die DNA-Sequenz mit  $dG^{NDBF}$  wird nach zwei Stunden 50 mM  $K_2CO_3$  in MeOH ebenfalls ein Anteil von 25 % detektiert, bei dem die photolabile Modifikation noch vorhanden ist. Mit zunehmend milder werdenden Abspaltungsbedingungen kann zwar das Verhältnis zwischen DNA mit NDBF-Gruppe und DNA ohne NDBF-Gruppe zu Gunsten der photolabil geschützten DNA verbessert werden, allerdings durchläuft der absolute Anteil photolabil geschützter DNA bei 60 Minuten  $K_2CO_3$ -Lsg. in MeOH ein Maximum von 33 % und nimmt bei milderer Bedingungen wieder ab, da die iPrPac-Gruppe nicht mehr vollständig abgespalten wird. Hier zeigt sich deutlich, dass die Reaktivität der Schutzgruppen auf den exozyklischen Aminofunktionen stark von der elektronischen und räumlichen Struktur weiterer Modifikationen an den Nukleobasen, in unserem Falle der photolabilen Schutzgruppen, abhängig sind. Es wurde im Anschluß versucht, mit 10 mM methanolischer  $K_2CO_3$ -Lsg. eine präparative DNA-Abspaltung der verschiedenen photolabil geschützten Sequenzen durchzuführen. Dabei konnte allerdings kaum DNA isoliert werden. Obwohl die DNA-Synthese im 200 nmol Maßstab durchgeführt wurde, lag die Menge der jeweils isolierten DNA meist unter 1 nmol. Die Ursache dafür mag zum einen daran liegen, dass der Succinyllinker, mit dem der synthetisierte DNA-Strang an das Festphasenmaterial gebunden ist, unter den verwendeten milden Abspaltungsbedingungen nicht ausreichend schnell gespalten wird. Darüber hinaus sind kommerziell erhältliche DNA-Synthesesäulen für die „Ultramildstrategie“ mit CPG-Material bestückt (*ChemGenes, Glen Research*). Für die Synthese der poly-T-Sequenzen wurde allerdings Polystyrolharz als Trägermaterial verwendet. Eventuell ist dieses Material für die Abspaltung mit einem ionischen Reagenz wie Kaliumcarbonat in Methanol weniger geeignet als für die Abspaltung mit aminbasierten Reagenzien.





**Abb. 80: RP-HPLC-Chromatogramme der dG<sup>pHP</sup>- bzw dG<sup>NDBF</sup>-modifizierten poly-T-Sequenz vor (oben) und nach (unten) dem Belichten.**

Bereits im Zuge der ersten Abspaltungstests wurde ein Teil der abgespaltenen Proben in einer Belichtungsapparatur mit UV-Licht bestrahlt (366 nm, 3 min, 3 x UV-LED (Nichia NCCU033 je 100mW) betrieben bei je 0,5 A) und anschließend mit RP-HPLC untersucht. Die Chromatogramme vor und nach der Belichtung sind in Abb. 80 gezeigt. Trotz des geringen Anteils an DNA, die noch die photolabile Modifikation trägt, erkennt man deutlich, dass sowohl im Falle von dG<sup>pHP</sup> als auch dG<sup>NDBF</sup> das Signal, das der photolabil geschützten DNA entspricht, nach dem Belichten zu Gunsten des Signals der unmodifizierten DNA verschwindet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die photolabil geschützte DNA zwar in den Chromatogrammen der Abspaltungstests nachgewiesen werden konnte, und dass die Belichtungstests zeigten, dass die pHP- und die NDBF-Gruppe sich durch UV-Bestrahlung abspalten ließen. Leider ließ sich mit den benötigten milden Abspaltbedingungen jedoch keine brauchbare Mengen der photolabil geschützten DNA isolieren.

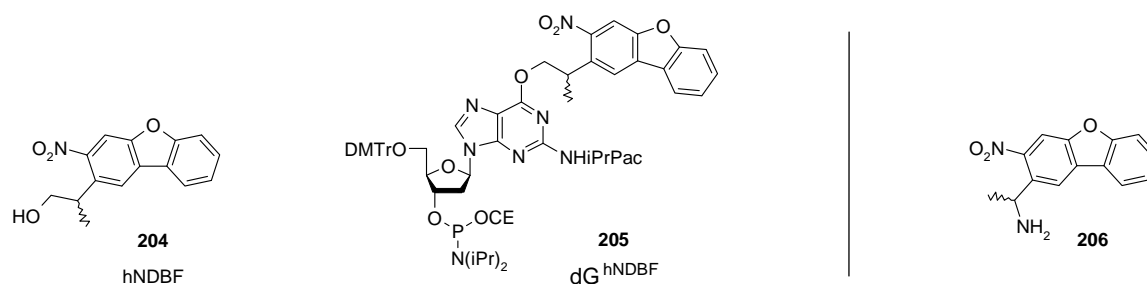
Im Rahmen dieser Arbeit wurde das beschriebene Projekt nicht weiter bearbeitet. Inzwischen wurden allerdings von Timo Mack<sup>[145]</sup> und Cem Özcoban<sup>[182]</sup> weitere Fortschritte, zumindest bezüglich der Nutzung des NDBF-Chromophors erzielt.

### 2.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie sollten ergänzend zu den in unserer Arbeitsgruppe verwendeten *o*-Nitrobenzylderivaten NPE und NPP die *p*-Hydroxyphenacylgruppe (pHP) und die *o*-Nitrodibenzofurangruppe (NDBF) auf ihre Eignung getestet werden, DNA vorübergehend an ausgewählten Nucleobasen zu modifizieren, so dass die DNA lichtaktivierbar wird. Dazu wurden erfolgreich die benötigten Phosphoramidite  $dG^{pHP}$  (**179**) und  $dG^{NDBF}$  (**177**) und die entsprechenden Thymidinderivate  $T^{pHP}$  und  $T^{NDBF}$  (**178** und **176**, synthetisiert von Timo Mack<sup>[145]</sup>) synthetisiert. Die photolabil geschützten Phosphoramidite wurden für die DNA-Festphasensynthese eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Kupplungseffizienz der photoaktivierbaren Nucleotidvorläufer geringer war, als die der unmodifizierten Phosphoramidite. Dennoch konnte die Synthese der Vollängenprodukte mit moderaten Kupplungsausbeuten durchgeführt werden. Bei den Abspaltungsversuchen allerdings zeigte sich, dass die eingesetzten photolabilen Schutzgruppen pHP und NDBF der Standardabspaltung mit Ammoniak nicht standhielten. Bei der Verwendung eines milderen Abspaltungsreagenz, Kaliumcarbonat in Methanol, konnte gezeigt werden, dass sich mit kürzer werdenden Reaktionszeiten und geringer werdender Konzentration von Kaliumcarbonat, der Anteil an DNA erhöhen lässt, der noch die jeweilige photolabile Modifikation trägt. Allerdings ließen sich mit dem verwendeten System keine brauchbaren Mengen DNA von der festen Phase abspalten. Bei den modifizierten Desoxyguanosinderivaten kommt das Problem hinzu, dass mit zunehmend milderen Abspaltungsbedingungen die *iPrPac*-Gruppe vom N<sup>2</sup> des dG nicht mehr vollständig entfernt werden kann. Für die verwendeten photolabil geschützten Nucleotidderivate lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Die an der O<sup>4</sup>-Position pHP- bzw. NDBF- geschützten Thymidinderivate sind so labil, dass sich vermutlich kaum Bedingungen finden lassen werden, bei denen die photolabile Schutzgruppe stabil ist, die Schutzgruppen der exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen aber vollständig abgespalten werden. Daher eignen sich die untersuchten Thymidinderivate nicht zur Herstellung photoaktivierbarer DNA. Das NDBF-geschützte Desoxyguanosinderivat ist zwar etwas stabiler, allerdings lässt sich bei milderen Reaktionsbedingungen die *iPrPac*-Gruppe nicht mehr vollständig entfernen, was zu Lasten der Ausbeute an photolabil geschütztem Vollängenprodukt geht. Daher ist vermutlich auch das  $dG^{NDBF}$ -Derivat nicht für die Synthese photoaktivierbarer DNA geeignet. Einzig für das pHP-geschützte Desoxyguanosin lassen sich evtl. Bedingungen finden, bei denen die *iPrPac*-Gruppe vollständig entfernt wird, aber der Anteil an DNA mit photolabiler Schutzgruppe noch ausreichend groß ist. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass auch die anderen, unmodifizierten Nucleobasen mit „ultramild“ abspaltbaren Schutzgruppen geschützt sind. (z.B. dA-Phenoxyacetyl, dC-Acetyl, dG-Isopropylphenoxyacetyl).<sup>[47]</sup> Darüber hinaus muss die Synthese auf CPG-Material durchgeführt werden. Am besten mit einem sogenannten Q-Support, bei dem der Nucleinsäurestrang über ein *O,O'*-Diacetylhydrochinon-Derivat mit der festen Phase verknüpft ist. Von diesem Festphasenmaterial lässt sich die DNA mit 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Methanol innerhalb einer Minute abspalten.<sup>[72]</sup>

Ob die pHP-Gruppe darüber hinaus für die photolabile Modifikation der N<sup>4</sup>-Position von Cytidin bzw. die N<sup>6</sup>-Position von Adenosin geeignet sein könnte, ist ungewiß, da bisher keine Studien veröffentlicht sind, in denen die pHP-Gruppe auf ihre Eignung getestet wurde, Aminofunktionen photolytisch freizusetzen. Durch die hohe Wasserlöslichkeit und die Ungiftigkeit der pHP-Gruppe und ihrer Abspaltprodukte bleibt sie allerdings eine interessante Alternative zur photolabilen Modifikation kleiner organischer Wirkstoffmoleküle.

Dass die NDBF-Gruppe selbst an der O<sup>6</sup>-Position von Guanosin unter normalen Abspaltungsbedingungen (konz. Ammoniak) nicht stabil sein würde, hatten wir aufgrund der Analogie zur NPE-Gruppe nicht erwartet. Um die besseren photochemischen Eigenschaften des NDBF-Chromophors, vor allem seine Fähigkeit zur Zweiphotonenanregung, dennoch für die photolabile Modifikation von Nukleinsäuren nutzbar zu machen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die zum Teil schon in unserer Arbeitsgruppe untersucht werden.



**Abb. 81: Im Arbeitskreis Heckel synthetisierte Nitrodibenzofuranderivate.**

Kürzlich wurde von Deiters *et. al.* ein Thymidinderivat vorgestellt, dessen N<sup>3</sup>-Position über eine Methylenbrücke mit dem NDBF-Alkohol modifiziert wurde.<sup>[183]</sup> Das entsprechende Phosphoramidit war unter den getesteten Bedingungen (16 h konz. Ammoniak bei 65°C; 16 h MeNH<sub>2</sub> in EtOH bei 55°C) stabil. Ob das für die photolabile Modifikation auch innerhalb eines synthetisierten DNA-Stranges gilt, muss sich noch zeigen.

Von Timo Mack wurde ein um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe erweitertes, homologes NDBF-Derivat (hNDBF, **204**, Abb. 81) synthetisiert, das nun der NPP-Gruppe analog ist.<sup>[145]</sup> Da die hNDBF-Gruppe nicht mehr über die benzyliche Position mit dem freizusetzenden Heteroatom verknüpft wird, sind ihre Derivate vermutlich stabiler als die der NDBF-Gruppe. Die hNDBF-Gruppe wurde von Cem Özcoban im Rahmen seiner Diplomarbeit<sup>[182]</sup> erfolgreich dazu verwendet, die O<sup>6</sup>-Position von Desoxyguanosin zu modifizieren. Das resultierende Phosphoramidit **205** wurde anschließend für die DNA-Festphasensynthese verwendet und war unter den verwendeten Abspaltungsbedingungen stabil. Die erhaltenen DNA konnte auf ihre photochemischen Eigenschaften untersucht werden, und es zeigte sich, dass die lichtinduzierte Abspaltung nicht nur schneller ablief als bei der NPP- oder NPE-Gruppe, sondern dass die hNDBF-Gruppe im Gegensatz zur NPP- und NPE-Gruppe auch noch Licht mit einer Wellenlänge von 420 nm absorbiert. Dadurch könnte die hNDBF-Gruppe in Gegenwart einer NPP-

oder NPE-Gruppe selektiv abgespalten werden, wodurch sich verschieden Regionen einer Nukleinsäure nacheinander aktivieren ließen. Die hNDBF-Gruppe könnte ebenfalls stabil genug für die Modifikation der O<sup>4</sup>-Position von Thymidin sein.

Von Timo Mack wurde ebenfalls ein Aminoderivat der NDBF-Gruppe (**206**) synthetisiert. Damit könnte die N<sup>6</sup>-Position von Adenosin bzw. die N<sup>4</sup>-Position von Cytidin mit der NDBF-Gruppe modifiziert werden. Ist die NDBF-Gruppe über ein Stickstoffatom mit dem zu modifizierenden Molekül verbunden, so ist sie evtl. stabiler gegenüber den Abspaltungsbedingungen im Rahmen der DNA-Synthese. Diese Möglichkeit ist ebenfalls Gegenstand aktueller Untersuchungen. Sollte diese Strategie nicht zum Erfolg führen, könnte auch ein Aminoderivat der hNDBF-Gruppe zur Modifikation von Adenosin und Cytidin verwendet werden.

## 2.4 Die photolabile Schutzgruppe als Crosslinker

### 2.4.1 Einleitung

In der synthetischen Chemie bezeichnet der Ausdruck konvergente Synthese den Aufbau einer komplexen Zielstruktur, indem Teile dieser Struktur in parallelen Syntheserouten aufgebaut und am Schluss zur Zielverbindung kombiniert werden. Auf diese Weise kann eine höhere Komplexität der Gesamtstruktur synthetisch leichter zugänglich gemacht werden.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgt auch die als sogenanntes Crosslinking bezeichnete Strategie in den Lebenswissenschaften, bei der verschiedene Moleküle über einen Crosslinker kovalent miteinander verknüpft werden um die Eigenschaften der einzelnen Komponenten zu kombinieren. Das Erreichen höherer Komplexität ist in diesem Zusammenhang gleichbedeutend mit der Möglichkeit, Molekülkonstruktionen aus biologischen oder synthetischen Komponenten zu erstellen, die speziell auf die Anforderungen bestimmter Experimente zugeschnitten sind. Auf diese Weise werden viele Experimente zur Aufklärung biologischer Funktionen oder aber deren Beeinflussung erst möglich.<sup>[184]</sup> Zusätzliche Flexibilität kann dadurch erreicht werden, dass die Verbindung der beiden Einzelkomponenten durch Bestrahlung mit Licht wieder gelöst werden kann. Als Beispiel sei eine Studie von Goldmacher *et al.* genannt, in deren Verlauf die Autoren ein, die Ribosomen schädigendes, Toxin über einen lichtspaltbaren Crosslinker mit einem Antikörper gegen den menschlichen Transferrinrezeptor bzw. mit der B-Kette von Rizin, die an Oligosaccharide auf der Zelloberfläche bindet, verknüpften. Das Toxin wurde dadurch an bestimmten Stellen der Zelle festgehalten und konnte erst durch lichtinduzierte Spaltung des Crosslinkers freigesetzt werden und seine volle zytotoxische Wirkung entfalten.<sup>[185]</sup> Hierbei handelt es sich im Prinzip um eine Variante des „Cagings“, wobei allerdings nicht durch die Modifikation mit der photolabilen Schutzgruppe selbst, sondern durch die Eigenschaften des verknüpften Moleküls eine vorübergehende Inaktivierung des eigentlichen Wirkstoffmoleküls erreicht wurde.

Die Gruppe um Ivan Dmochowski nutzte einen mit einer photolabilen Schutzgruppe modifizierten Cytidinrest um ein Oligodesoxynukleotid vorübergehend zu inaktivieren. Die photolabile Schutzgruppe war zusätzlich mit einem Fluoreszenz-Quencher (DABSYL) verbunden und diente dazu, die Fluoreszenz eines an einem benachbarten Cytidinrest gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes zu unterdrücken.<sup>[186]</sup> Diese Konstruktion bietet den Vorteil, dass man die lichtinduzierte Freisetzung der DNA unmittelbar anhand der Fluoreszenz mit z.B. einem Konfokalmikroskop beobachten kann. Es wurde gezeigt, dass mit diesem System eine Primer-Verlängerungsreaktion durch das Klenow-Fragment mit Licht induziert werden konnte.<sup>[43]</sup>

Wie in der Einleitung erwähnt, besteht das Problem, dass viele biologisch wirksame Moleküle aufgrund ihres stark polaren Charakters nicht die Zellmembran passieren können. Das gilt in besonderem Maße für Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Polyphosphatrückgrats unter physiologischen

Bedingungen stark anionische Eigenschaften aufweisen und für die eine Lipiddoppelschicht dadurch ein unüberwindliches Hindernis darstellt. Da aber die meisten biochemischen Prozesse, an denen Nukleinsäuren beteiligt sind, innerhalb der Zelle stattfinden, ist es notwendig, will man diese Prozesse künstlich beeinflussen, die dafür vorgesehenen, eventuell synthetisch hergestellten Nukleinsäuren in die Zellen zu transportieren. Wie in der Einleitung beschrieben, existieren verschiedene Methoden um diesen Zweck zu erfüllen. Eine interessante Möglichkeit besteht darin, das zu transportierende Molekül mit sogenannten molekularen Transportern wie z.B. CPPs (Cell Penetrating Peptides) oder Cholesterin zu verknüpfen. Damit die Wirksamkeit des zu transportierenden Moleküls aber nicht nachteilig durch die Modifikation mit dem Transporter beeinflusst wird, kann es notwendig sein, das Wirkstoffmolekül innerhalb der Zelle wieder vom Transporter zu trennen. Handelt es sich bei dem in die Zelle einzuschleusenden Molekül um eine siRNA, so ist es möglich, den molekularen Transporter mit dem Begleitstrang zu verknüpfen, so dass der Leitstrang in seiner unmodifizierten Form für den RNA-Interferenz-Mechanismus zur Verfügung steht. Dieses Prinzip wurde erfolgreich von Vornlocher *et al.* dazu verwendet um die Expression von Apolipoprotein B durch RNA-Interferenz in ganzen Mäusen zu unterdrücken. Nach intravenöser Applikation der cholesterinmodifizierten siRNA, ließ sich ein deutlicher Rückgang der Apolipoprotein-B-mRNA in Leber und Dünndarm nachweisen.<sup>[115]</sup>

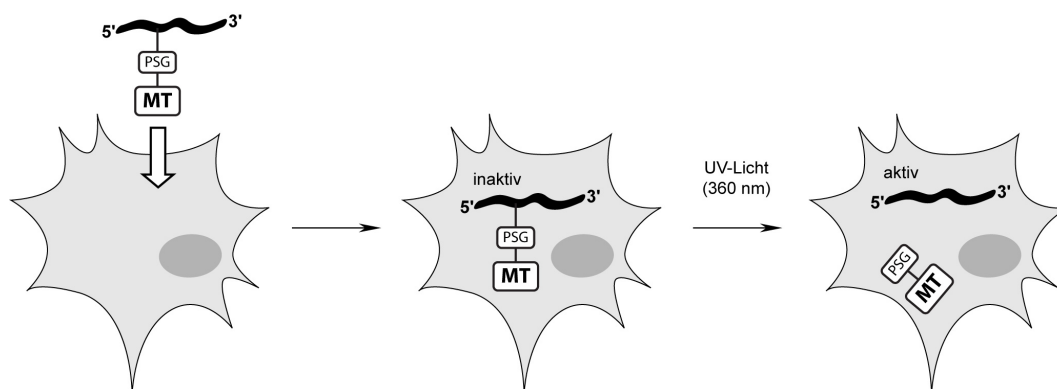
Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Verbindung zwischen Transporter und zu transportierendem Molekül über eine Disulfidbrücke herzustellen. Durch die reduzierenden Bedingungen innerhalb des Zytoplasmas wird die Disulfidbindung nach Aufnahme in die Zelle wieder gespalten und das Wirkstoffmolekül freigesetzt.<sup>[104]</sup> Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, das zu transportierende Molekül mit einer Sulfhydrylgruppe modifiziert werden muss. Diese Modifikation bleibt auch nach der reduktiven Spaltung der Disulfidbindung bestehen. Im Falle von endständig modifizierten Nukleinsäuren stellt das wahrscheinlich in den meisten Fällen kein größeres Problem dar, für ein kleines organisches Wirkstoffmolekül bedeutet aber eine solche Modifikation möglicherweise den völligen Verlust seiner biologischen Wirkung.

Eine weitere elegante Methode stellt die Verknüpfung des Transporters und des zu transportierenden Moleküls über einen lichtspaltbaren Crosslinker dar. In der Zelle kann das Wirkstoffmolekül dann durch Belichtung freigesetzt werden. Dieser Ansatz wurde von Allbritton *et al.* verwendet, wobei verschiedene Kinase-Substrate über einen photospaltbaren Crosslinker mit dem CPP TAT verknüpft wurden. Nach Belichtung der Zellen, die mit dem Konjugat inkubiert wurden, konnte eine Phosphorylierung des Substrats nachgewiesen werden.<sup>[187]</sup>

## 2.4.2 Motivation und Zielsetzung

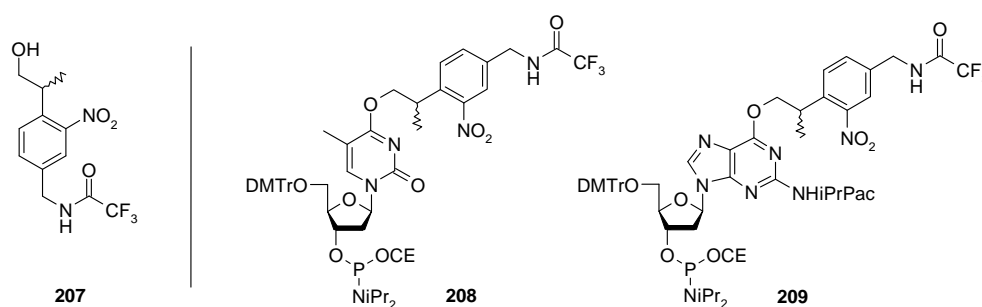
In unserer Arbeitsgruppe erforschen wir die Möglichkeiten, mit photolabil geschützten, vorübergehend inaktivierten Nukleinsäuren biologische Funktionen unter die Kontrolle von Licht zu bringen. Daher besteht auch für uns ein großes Interesse daran, über ein möglichst vielfältiges Spektrum an Methoden

zu verfügen, die modifizierten Nucleinsäuren auch in das Innere von lebenden Zellen einzuschleusen. Eine sehr ansprechende Lösung bestünde darin, die photolabile Schutzgruppe gleichzeitig als Anknüpfungspunkt für molekulare Transporter zu verwenden.



**Abb. 82: Schematische Darstellung des geplanten Experiments: ein Konjugat aus lichtaktivierbarer Nucleinsäure und molekularem Transporter (MT) wird in die Zelle aufgenommen. Durch Belichtung wird die photolabile Schutzgruppe (PSG) zusammen mit dem Transporter spurlos entfernt und dadurch die Nucleinsäure aktiviert.**

Durch die Aktivierung der Nucleinsäure mit Licht würde das Transportmolekül zusammen mit der photolabilen Schutzgruppe spurlos entfernt und die Nucleinsäure in unmodifizierter Form freigesetzt. Die zusätzliche Größe eines solchen Konstrukts könnte sich auch positiv auf die inaktivierenden Eigenschaften einer solchen photolabilen Modifikation auswirken. Da der Transporter mit Hilfe der photolabilen Schutzgruppe spurlos wieder entfernt werden kann, ließe sich ein solches Verfahren auch auf kleine Moleküle wie zum Beispiel das Glukosamin-6-phosphat aus Abschnitt 2.2 übertragen.



**Abb. 83: NPP-Gruppe mit zusätzlichem, trifluoracetyl-geschütztem Aminolinker (207); Phosphoramidite des O<sup>4</sup>-geschützten Thymidins (208) bzw. O<sup>6</sup>-geschützten Desoxyguanosins (209) mit der erweiterten NPP-Gruppe.**

Wir entschlossen uns, die bereits von uns verwendete NPP-Gruppe um eine Aminofunktionalität zu erweitern, so dass sie als lichtspaltbarer Crosslinker zur Verknüpfung einer photoaktivierbaren Nucleinsäure mit einem molekularen Transporter dienen kann. Die Aminogruppe sollte nicht direkt an den elektronenarmen aromatischen Kern gebunden sein, da sie ansonsten eventuell nicht nukleophil

genug wäre um in wässriger Lösung mit einem NHS-Ester zu reagieren bevor dieser hydrolysiert. Darüber hinaus muss die Aminofunktion für die Dauer der DNA/RNA-Festphasensynthese geschützt werden. Die Wahl fiel auf die Trifluoracetylgruppe, da diese den Synthesebedingungen standhält, jedoch bei der basischen Aufarbeitung mit abgespalten wird.<sup>[47,188]</sup> Die resultierende Zielstruktur (**207**) ist in Abb. 83 gezeigt (im weiteren Verlauf NPP-NH<sub>2</sub> abgekürzt). Anschließend sollte die NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe dazu verwendet werden nach im Arbeitskreis bekannten Syntheserouten die O<sup>4</sup>-Position von Thymidin und die O<sup>6</sup>-Position von Desoxyguanosin zu modifizieren und die entsprechenden Phosphoramidite herzustellen (Abb. 83).

Im Anschluss würde der Einbau dieser modifizierten Nukleotidbausteine in ein Oligonukleotid erfolgen (**210**, Abb. 84). Im Anschluß an die Festphasensynthese folgte die basische Aufarbeitung, durch die auch die Trifluoracetylgruppe entfernt würde. Die photolabil geschützte Nukleinsäure **211** könnte dann über die freie Aminogruppe mit einem homo- oder heterobifunktionalen Crosslinker verknüpft werden (**212**), der wiederum die kovalente Verbindung mit einem CPP ermöglicht (**213**).

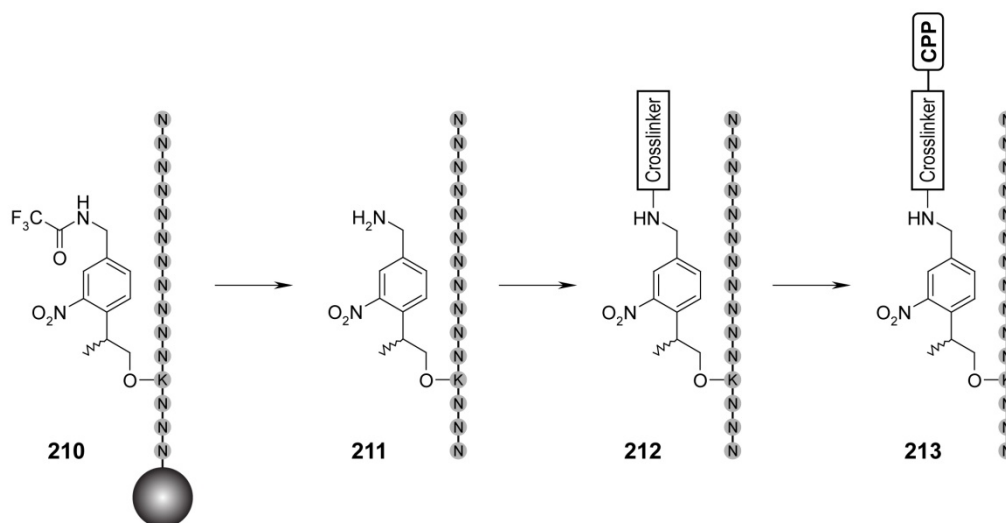


Abb. 84: geplante Synthese einer photolabil modifizierten Nukleinsäure, die über eine zusätzliche Aminofunktion an der photolabilen Schutzgruppe zunächst mit einem Crosslinker und dann mit einem molekularen Transporter verknüpft werden könnte. (N = beliebiges Nukleotid; K = G oder T).

### 2.4.3 Durchführung und Ergebnisse

#### Synthese der NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe

Die Synthese der NPP-NH<sub>2</sub> Gruppe erfolgte ausgehend von kommerziell erhältlichem 4-Ethyl-3-nitrobenzaldehyd (**214**). Die Aldehydfunktion sollte später zum Amin derivatisiert werden. Aus Erfahrung wussten wir, dass die Hydroxymethylierung der Ethylgruppe mit Formaldehyd nur bei elektronenarmen aromatischen Systemen funktioniert.<sup>[145]</sup> Daher wurde zunächst die



formylsubstituierte Verbindung **214** eingesetzt. Die Hydroxyformylierung erfolgte mit Formaldehyd (**215**) in Gegenwart von *tert*-Butylkalium in einer Mischung aus DMSO und *tert*-Butanol bei erhöhter Temperatur.

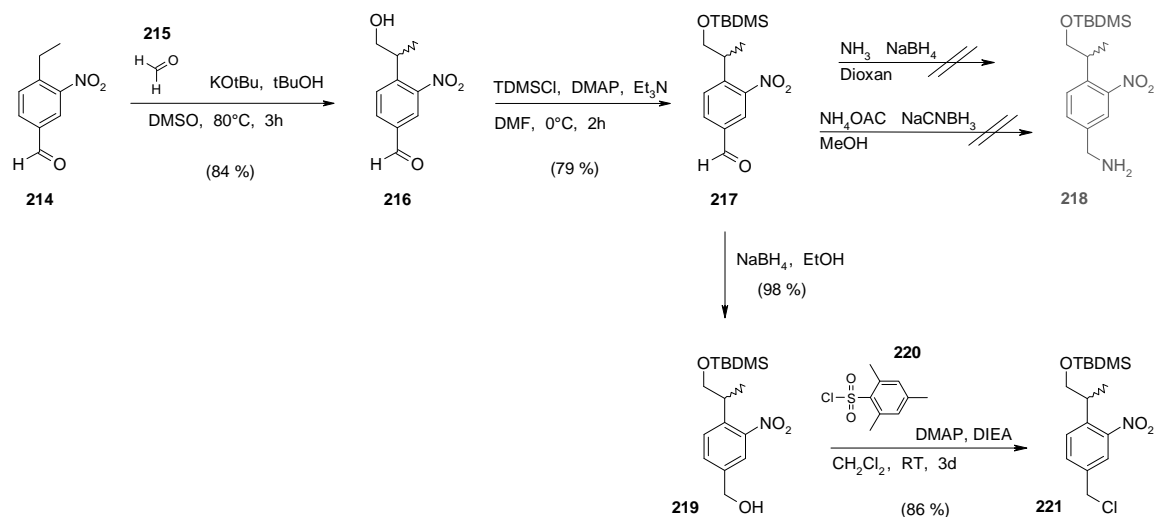


Abb. 85: Die ersten vier Stufen der NPP-NH<sub>2</sub>-Synthese.

Die Ausbeute betrug 84 % (**216**). Im nächsten Schritt wurde die neu gebildete OH-Gruppe geschützt indem sie mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in Gegenwart von *N,N*-Dimethylaminopyridin und Triethylamin zum entsprechenden Silylether **217** umgesetzt wurde (79 %). Der Versuch, die Aldehydgruppe direkt durch reduktive Aminierung zum Amin **218** umzusetzen, schlug fehl. Daher beschlossen wir, den Aldehyd zunächst zum Alkohol zu reduzieren, diesen dann in eine Abgangsgruppe umzuwandeln und durch ein Stickstoffnucleophil zu substituieren. Die Reduktion mit Natriumborhydrid in Ethanol zum entsprechenden Alkohol **219** verlief nahezu quantitativ. Der Alkohol wurde dann mit Mesitylsulfonylchlorid **220** in Gegenwart von *N,N*-Dimethylaminopyridin und Diisopropylethylamin zur Reaktion gebracht. Bemerkenswerterweise entstand dabei nicht das erwartete Sulfonat sondern das Chlorid **221**. Vermutlich ist durch die benzyliche Position das Sulfonat so reaktiv, dass es *in situ* durch das zuvor entstandene Chloridion wieder substituiert wurde. Das Chlorid **221** konnte mit 86 % Ausbeute isoliert werden.

In Abb. 86 ist der zweite Teil der Synthese gezeigt. Verbindung **221** wird mit Natriumazid in DMF bei erhöhter Temperatur zur Reaktion gebracht. Das Substitutionsprodukt **222** konnte mit 96 % Ausbeute isoliert werden. Im nächsten Schritt wird das Azid **222** mit Triphenylphosphin zunächst zum Phosphazen umgesetzt und dann *in situ* durch Zugabe von Wasser und mehrstündiges Erhitzen zur Aminoverbindung **218** hydrolysiert (90 % Ausbeute). Diese wurde quantitativ mit Trifluoressigsäureanhydrid **223** in Gegenwart von Diisopropylethylamin zu Verbindung **224** umgesetzt. Ausgehend von Verbindung **221** wurde noch ein zweiter Syntheseweg ausprobiert um zu Verbindung **224** zu gelangen.

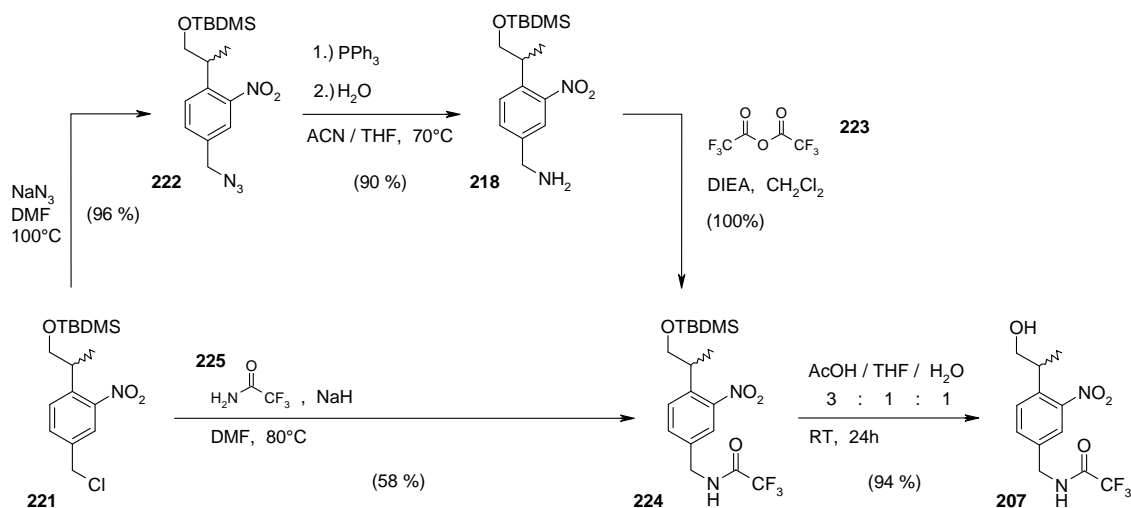


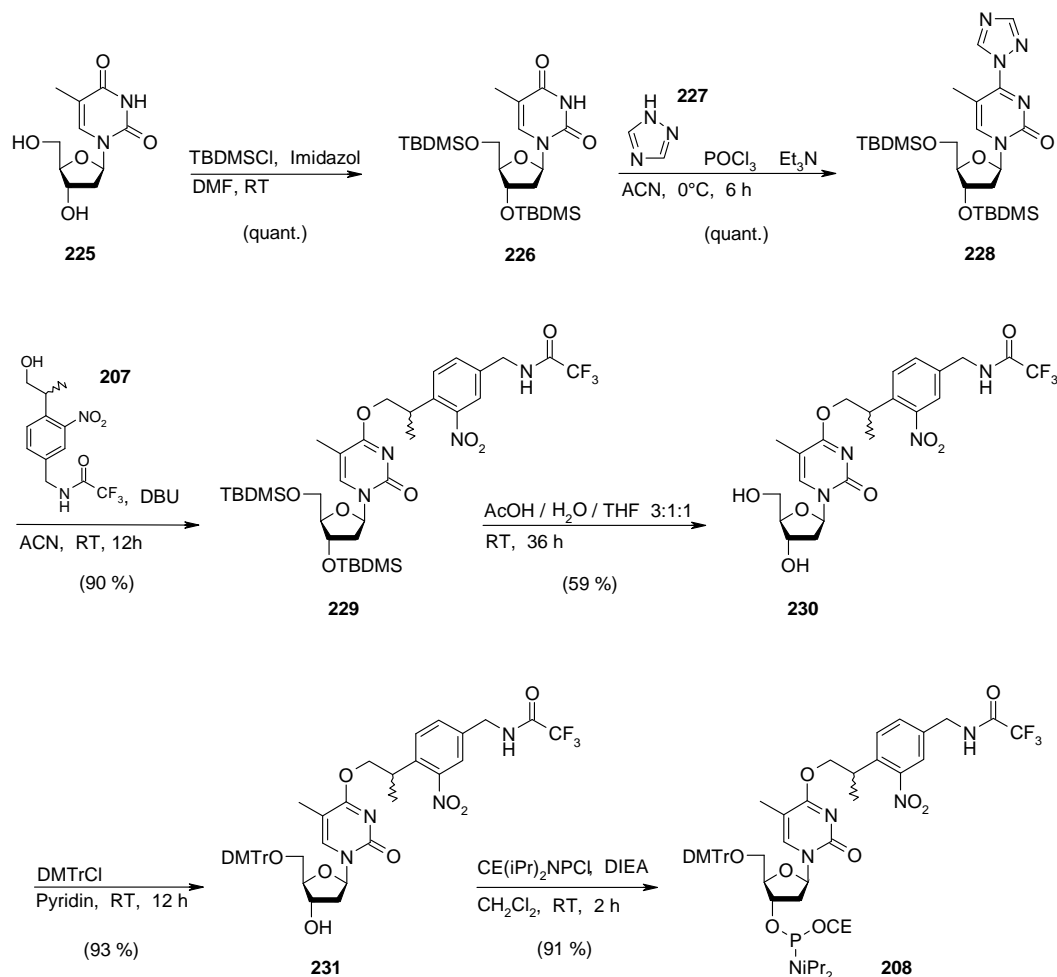
Abb. 86: Zweiter Teil der NPP-NH<sub>2</sub>-Synthese.

Dafür wurde Trifluoracetamid verwendet, das mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit dem Chlorid **221** zur Reaktion gebracht wurde. Auf diesem Weg erspart man sich zwei Syntheseschritte. Jedoch ist die erzielte Ausbeute mit 58 % deutlich geringer als der Weg über das Azid (88 % über drei Stufen), so dass der mehrstufige Weg zu bevorzugen ist. Im letzten Schritt wurde die TBDMS-Gruppe unter essigsäuren Bedingungen entfernt und Verbindung **207** wurde mit 94 % Ausbeute erhalten. Die Abspaltung der TBDMS-Gruppe wurde nicht mit Tetrabutylammoniumfluorid-Lsg. durchgeführt, da die Trifluoracetylgruppe relativ empfindlich gegenüber Nucleophilen ist.

### Synthese des NPP-NH<sub>2</sub>-geschützten Thymidin-Phosphoramidits **208**

Thymidin (**225**) wurde unter Standardbedingungen mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und Imidazol zum zweifachen Silylether **226** umgesetzt. Um die O<sup>4</sup>-Position für einen nukleophilen Angriff zu aktivieren wurde Verbindung **226** dann mit Triazol und Phosphorylchlorid in Gegenwart von Triethylamin zum Triazolderivat **228** umgesetzt. Dieses konnte dann mit der neu entwickelten photolabilen Schutzgruppe NPP-NH<sub>2</sub> (**207**) modifiziert werden. Als starke, nicht nukleophile Base wurde DBU verwendet. Die Reaktion gelang mit 90 % Ausbeute (**229**). Im nächsten Schritt erfolgte die Abspaltung der Silylgruppen mit Essigsäure. Auch hier wurde bewusst kein Tetrabutylammoniumfluorid verwendet, um durch die relativ nukleophilen Fluoridionen die Trifluoracetylgruppe nicht zu gefährden. Das Produkt **230** wurde lediglich mit 59 % Ausbeute isoliert. Essigsäure ist ein sehr mildes Reagenz zur Abspaltung von TBDMS-Gruppen. Die Entschützung von sekundären OH-Gruppen erfordert recht lange Reaktionszeiten. Bei der Aufarbeitung wurde auch ein Thymidinderivat isoliert, das laut NMR-Spektrum noch eine TBDMS-Gruppe trug. Dieser Syntheseschritt könnte daher vermutlich durch längere Reaktionszeiten oder höhere Reaktionstemperaturen noch optimiert werden. Im Anschluss erfolgte die Dimethoxytritylschützung der 5'-OH-Gruppe mit einem leichten Überschuss an 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin. Das

tritylierte Produkt **231** wurde mit 93 % Ausbeute erhalten. Im letzten Schritt wurde Verbindung **231** mit Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit zum entsprechenden Phosphoramidit **208** umgesetzt. Diese Reaktion verlief ebenfalls mit einer guten Ausbeute von 91 %.



**Abb. 87:** Synthese des NPP-NH<sub>2</sub>-geschützten Thymidinphosphoramidids (**208**) für die Oligonukleotidfestphasensynthese.

### Synthese des NPP-NH<sub>2</sub>-geschützten Desoxyguanosin-Phosphoramidids (**209**)

Die Synthese des NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierten Desoxyguanosinderivats erfolgte analog der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Synthesen. Das TBDMS- und iPrPac-geschützte Guanosinderivat **185** wurde an der O<sup>6</sup>-Position mittels einer *Mitsunobu*-Reaktion mit dem Alkohol der NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe (**207**) alkyliert. Die Reaktion lieferte das Produkt **232** mit 57 % Ausbeute. Anschließend erfolgte die Abspaltung der TBDMS-Gruppen mit essigsaurer TBAF-Lösung. In einer Testreaktion zeigte sich, dass durch Ansäuern der Reaktionslösung mit Essigsäure die Nukleophilie der Fluoridionen so weit herabgesetzt werden konnte, dass sowohl die Trifluoracetylgruppe als auch die Isopropylphenoxyacetylgruppe stabil waren. Das desilylierte Produkt **233** wurde mit 71 % Ausbeute erhalten. Dann wurde die 5'-OH-Gruppe mit einem leichten Überschuss an 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin trityliert (78 %

Ausbeute) und die tritylierte Verbindung **234** wurde im letzten Schritt mit Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit zum entsprechenden Phosphoramidit **209** umgesetzt (83 % Ausbeute).

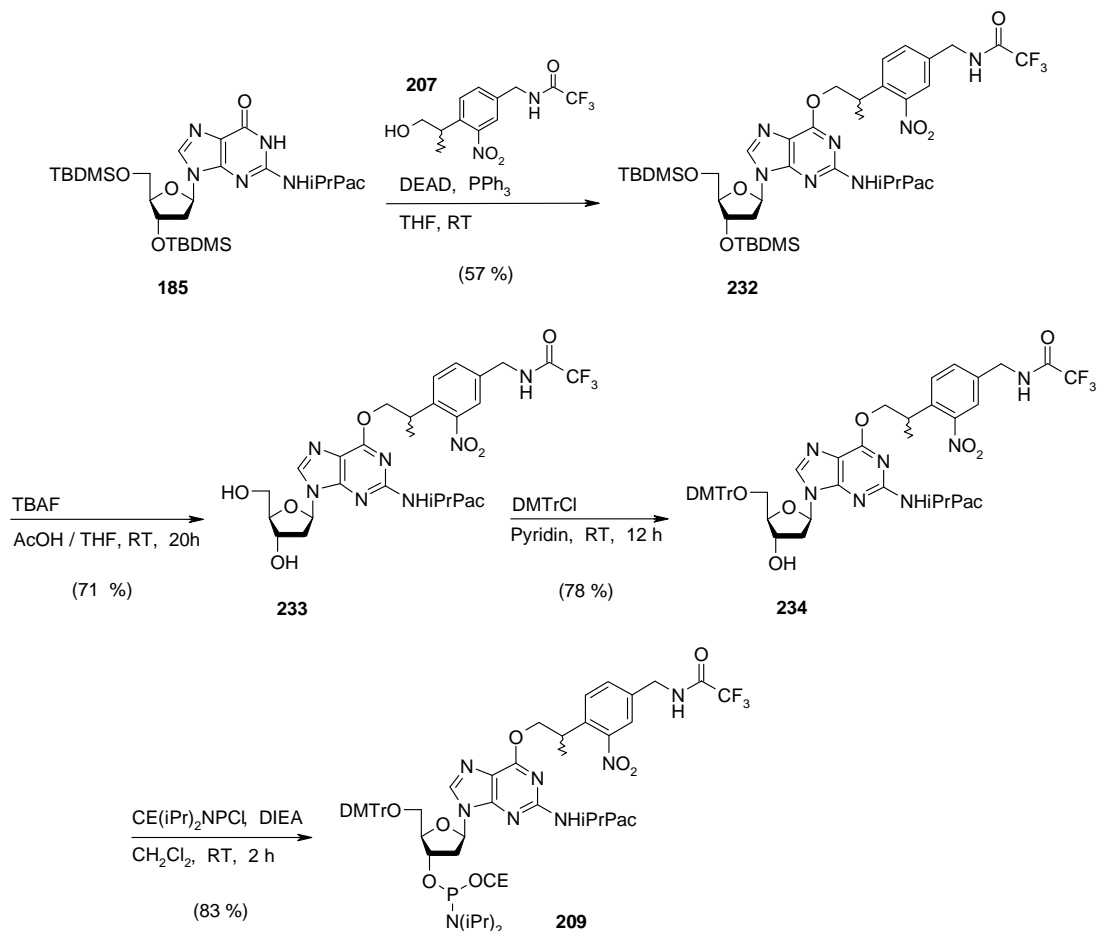


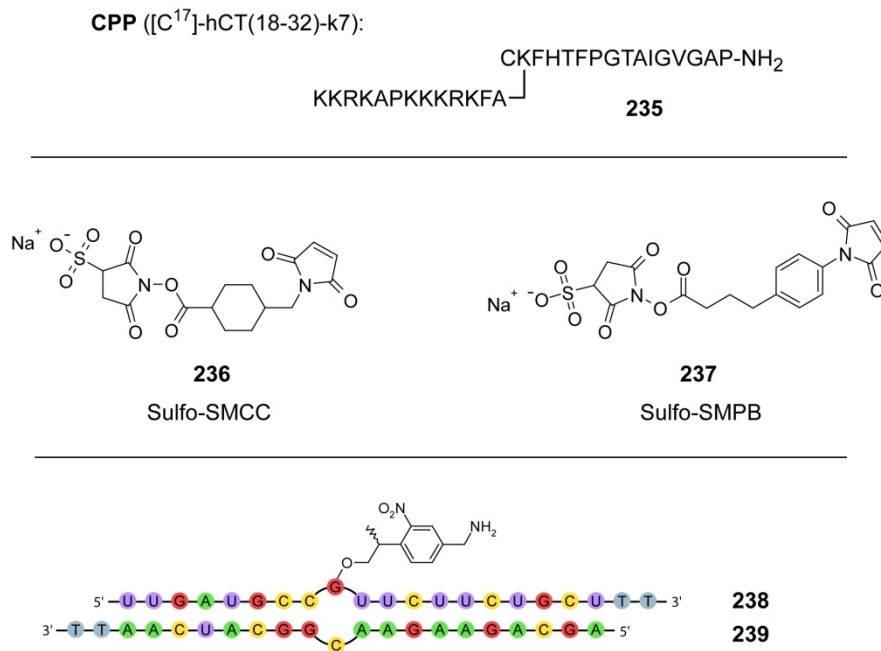
Abb. 88: Synthese des NPP-NH<sub>2</sub>-geschützten Desoxyguanosinphosphoramididits (**209**) für die Oligonukleotidfestphasensynthese.

### Erprobung der NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe als photospaltbarer Crosslinker für Nukleinsäuren

Als nächstes wollten wir testen, ob die von uns hergestellten Nucleotidbausteine mit der um einen Aminolinker erweiterten NPP-Gruppe dazu geeignet sind, Nucleinsäuren herzustellen, die zum einen durch die photolabile Schutzgruppe lichtaktivierbar sind, und die sich darüber hinaus mit einem molekularen Transporter, speziell einem CPP (Cell Penetrating Peptide), verknüpfen lassen.

Ein zellpenetrierendes Peptid wurde uns von Frau Dr. Ines Neundorf (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt. Die Peptid-Sequenz (**235**) ist in Abb. 89 gezeigt. Das Peptid ist vom humanen Calcitonin abgeleitet und verzweigt sich an einem Lysinrest. Über einen Cysteinrest kann das Peptid mit Maleimidgruppen reagieren. Viele kommerziell erhältlichen bifunktionalen Crosslinker sind mit Maleimidgruppen ausgestattet, so dass über einen solchen Crosslinker eine einfache Verknüpfung mit anderen Makromolekülen erfolgen kann.

Für die Verknüpfung des CPPs mit der Nukleinsäure sollten zwei verschiedenen heterobifunktionale Crosslinker getestet werden: Sulfo-SMCC (**236**) und Sulfo-SMPB (**237**) (beide: *Pierce, Thermo Fisher Scientific*). Die beiden Crosslinker sind in Abb. 89 gezeigt. Beide Crosslinker verfügen über einen aminreaktiven NHS-Ester, der für die Anknüpfung unserer mit NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierten Nukleinsäure vorgesehen ist. Die Sulfonsäuregruppe dient der Erhöhung der Löslichkeit in wässrigen Medien. Bei der zweiten reaktiven Funktionalität der beiden Crosslinker handelt es sich um ein Maleimid, das zur Anknüpfung des CPPs mit Hilfe der Cystein-SH-Gruppe dienen soll. Da NHS-Ester in wässrigen Lösungen nur wenige Stunden stabil sind, ist es notwendig, zuerst die Bindung zwischen dem aminofunktionalisierten Molekül, in unserem Fall die modifizierte Nukleinsäure, zu knüpfen, und dann im zweiten Schritt erfolgt nach eventueller Aufreinigung die Verknüpfung mit dem thiolmodifizierten Molekül. Laut Hersteller ist der NHS-Ester des SMCC-Linkers aufgrund des sterisch anspruchsvollen Cyclohexylrings länger in wässriger Lösung stabil, und auch die über den SMCC-Linker verbrückten Konstrukte weisen eine höhere Stabilität und Lagerfähigkeit auf. Andererseits ist dadurch der SMCC-Linker weniger reaktiv und erfordert längere Reaktionszeiten.

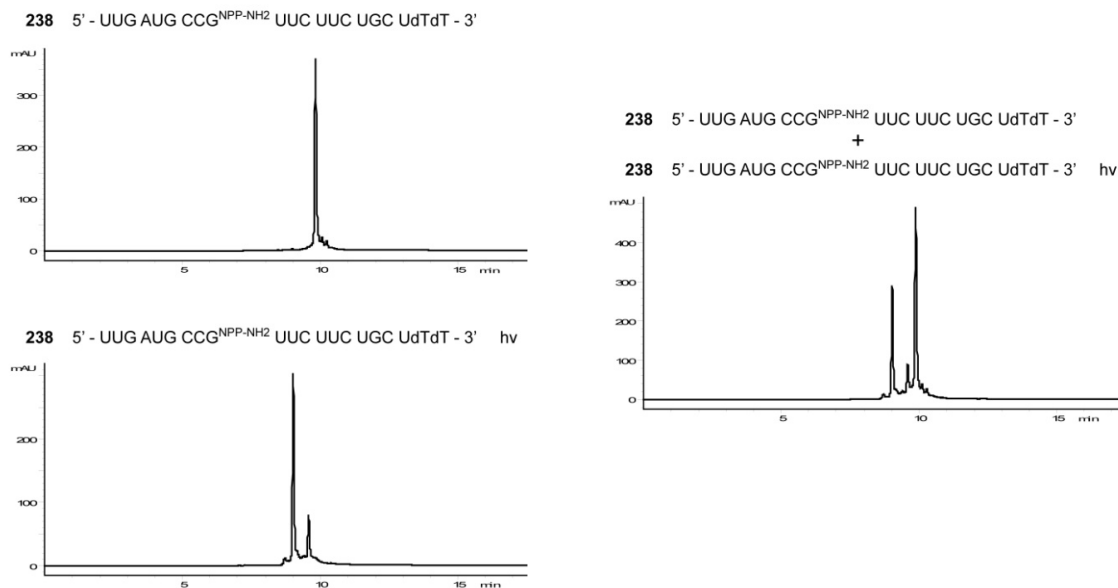


**Abb. 89:** oben: das zellpenetrierende Peptid hCT-k7 das uns von der Arbeitsgruppe Dr. Ines Neundorf (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt wurde; mitte: die heterobifunktionalen Crosslinker Sulfo-SMCC und Sulfo-SMPB, die in dieser Studie verwendet werden sollten; unten: schematische Darstellung der geplanten, mit NPP-NH<sub>2</sub> photolabil geschützten siRNA.

Da für das Guanosin-Derivat **209** eine höhere Stabilität der NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe als bei dem Thymidin-Derivat **208** zu erwarten war (siehe Kapitel 2.3), entschlossen wir uns zunächst nur das NPP-NH<sub>2</sub>-geschützte Desoxyguanosin für den Einbau in eine Nukleinsäure zu verwenden. Als Testsystem sollte das von Vera Mikat (AK Heckel) erfolgreich entwickelte RNAi-Experiment dienen, bei dem ein

siRNA-Strang durch Modifikation mit einer photolabilen Schutzgruppe zur lichtabhängigen Verminderung der Expression von EGFP in HeLa-Zellen angewendet wurde.<sup>[40]</sup> In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass der Einbau eines einzelnen Desoxynukleotids vom RNA-Interferenzmechanismus toleriert wird und sich nicht negativ auf den Regulationseffekt auswirkt. Das NPP-NH<sub>2</sub>-Desoxyguanosinderivat sollte in die gleiche siRNA-Sequenz eingebaut werden, die von Vera Mikat verwendet worden war. Der Einbau des Nukleotids mit der photolabilen Schutzgruppe sollte dazu an Position 9 des Leitstranges erfolgen (**238**, Abb. 89). Der Leitstrang (und auch der Begleitstrang) der siRNA sollte darüber hinaus noch zwei dT-Nukleotide am 3'-Ende tragen, um die Stabilität *in vivo* zu erhöhen.

Die Synthese der RNA wurde von der Firma *IBA* (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde das von uns synthetisierte Phosphoramidit **209** eingeschickt und in einem 1 µmol-Syntheseansatz verwendet. Das eingesetzte Guanosinphosphoramidit trug eine Acetylgruppe als Schutzgruppe für die exozyklische Aminofunktion, damit die Abspaltung auch bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnte. Das Festphasenmaterial wurde uns durch die Firma *IBA* zugeschickt und von uns wurde die Abspaltung und Aufreinigung der RNA durchgeführt. Der unmodifizierte Begleitstrang **239** wurde ebenfalls bei der Firma *IBA* bestellt, jedoch aufgereinigt und in Lösung.



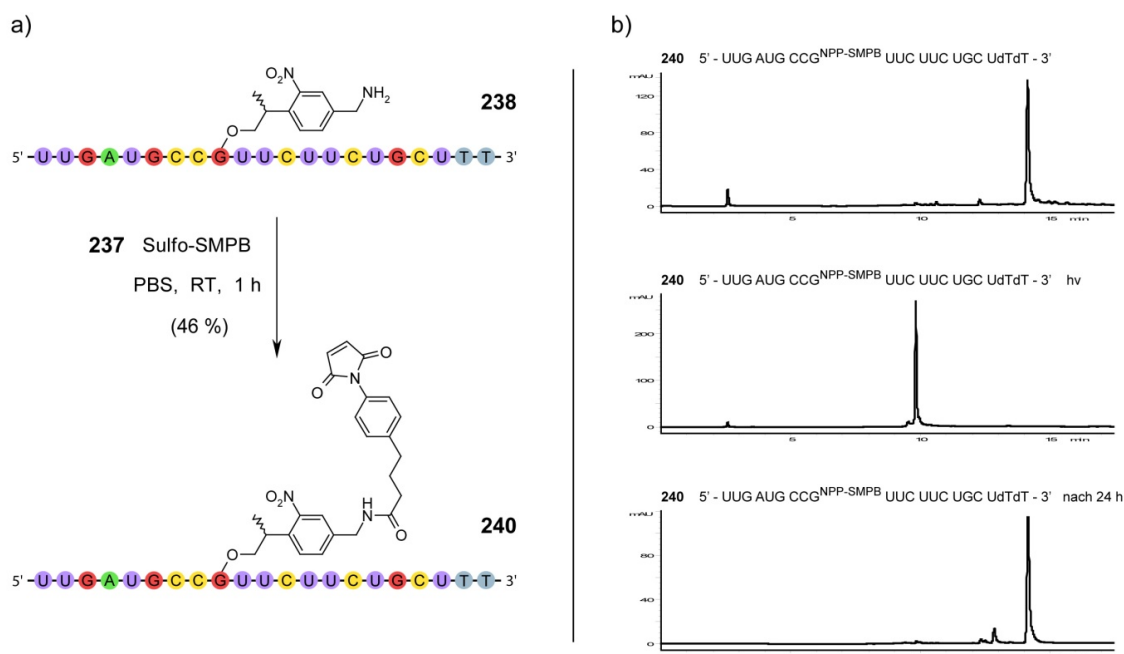
**Abb. 90:** links oben: die unbelichtete NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierte RNA; links unten: durch Belichten lässt sich die photolabile Schutzgruppe abspalten; rechts: Mischung aus belichteter und unbelichteter RNA: bei der lichtinduzierten Spaltung entsteht in geringen Mengen ein Nebenprodukt (9,7 min).

Für die Abspaltung wurde das Festphasenmaterial für 4 Stunden in einer Mischung aus ethanolischer Methylaminlösung (33 %ig) und wässriger Methylaminlösung (40 %ig) inkubiert. Nach anschließender Filtration wurde die RNA-Lösung im Vakuumkonzentrator zur Trockene eingedampft. Zur Entfernung der 2'-TBDMS-Gruppen wurde der Rückstand in TBAF-Lösung (1M in THF)

aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Entsalzung der Lösung über Gelfiltrationssäulen (NAP-5, *GE Healthcare*) und eine HPLC-Aufreinigung im Anionenaustauschchromatographie-Verfahren. Die gesammelten Fraktionen wurden wieder entsalzt und einer RP-HPLC-Reinigung unterzogen, um eventuell RNA ohne die photolabile Schutzgruppe vom gewünschten Produkt abzutrennen. Es konnten insgesamt fast 400 nmol der photolabil geschützten RNA **238** isoliert werden. In Abb. 90 ist ein Chromatogramm vor und nach Belichtung gezeigt. Gut zu erkennen ist die Verschiebung zu kürzeren Retentionszeiten. Die photolabile Schutzgruppe kann also durch Belichtung sauber abgespalten werden. Das zusätzliche Signal bei 9,7 Minuten entspricht einem bei der Photolyse gebildeten Nebenprodukt, und nicht dem eventuell unvollständig entschützten Ausgangsmaterial, wie das Chromatogramm einer Mischung aus belichteter und unbelichteter RNA zeigt. Massenspektroskopisch wurde nachgewiesen, dass die Trifluoracetylgruppe im Zuge des Aufreinigungsverfahrens entfernt wurde, und die photolabile Schutzgruppe nur die freie Aminogruppe trägt (Berechnet: (m/z) 6714,06; gefunden: (ESI) 6713,17).

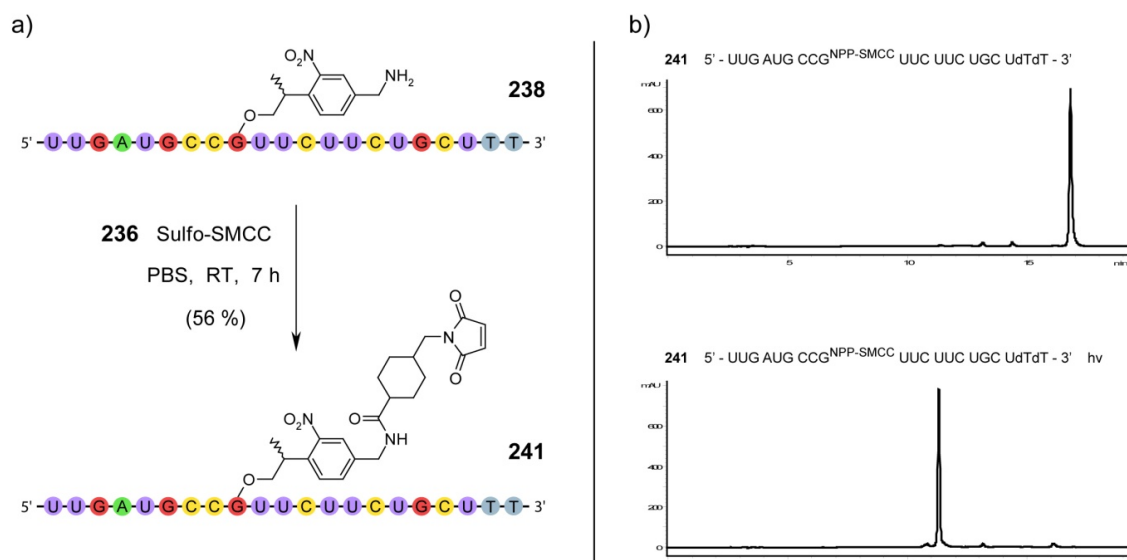
### Reaktion der NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierten RNA mit Sulfo-SMPB und Sulfo-SMCC

Nach dem erfolgreichen Einbau des NPP-NH<sub>2</sub>-geschützten Desoxyguanosinderivats in einen RNA-Oligonukleotid sollte nun getestet werden, ob sich die photolabile Schutzgruppe zur Anknüpfung eines bifunktionalen Crosslinkers eignet.



**Abb. 91:** a) Reaktion der NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierten RNA **238** mit Sulfo-SMPB; b) RP-HPLC-Chromatogramme; oben: RNA mit photolabiler Schutzgruppe und Crosslinker (3,6 min: Sulfo-SMPB); mitte: nach Belichten erhält man die unmodifizierte RNA; unten: nach 24 h hat ein kleiner Teil des Maleimids bereits mit Wasser reagiert (12,8 min).

Zuerst wurde der heterobifunktionale Crosslinker Sulfo-SMPB (**237**) ausprobiert. Dazu wurde die photolabil geschützte RNA (**238**) mit einem fünfzigfachen Überschuss Sulfo-SMPB in PBS-Puffer inkubiert. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur zeigte ein analytisches HPLC-Chromatogramm, dass die eingesetzte RNA vollständig umgesetzt worden war. Die Reaktionsmischung wurde dann über eine Gelfiltrationskartusche (NAP-5) gereinigt, um überschüssiges Sulfo-SMPB abzutrennen. Anschließend erfolgte die präparative Aufreinigung mittels RP-HPLC. Die produkthaltigen Fraktionen wurden lyophilisiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das obere Chromatogramm in Abb. 91 b) zeigt das Konjugat aus RNA und SMPB (**240**). Das zusätzliche Signal bei 3,6 Minuten entspricht einem Rest Sulfo-SMPB, der aber durch eine weitere HPLC-Aufreinigung abgetrennt werden konnte. Das mittlere Chromatogramm zeigt eine belichtete Probe. Die photolabile Schutzgruppe inklusive dem Crosslinker wurde vollständig abgespalten und man erhielt die unmodifizierte RNA. Das untere Chromatogramm wurde von einer Probe aufgenommen, die bereits 24 Stunden alt war. Man erkennt ein zusätzliches kleines Signal bei ca. 12,8 Minuten. Dabei könnte es sich um einen Teil des RNA-NPP-SMPB-Konjugats handeln, bei dem die Maleimid-Gruppe bereits mit Wasser reagiert hat. Dies zeigt, dass die SMPB-modifizierte RNA zwar ein oder zwei Tage gelagert werden kann, jedoch innerhalb kurzer Zeit zur Reaktion mit dem Sulfhydryl-haltigen Kopplungspartner verwendet werden sollte. Es konnten ca. 2,3 nmol der SMPB-modifizierten RNA isoliert werden. Das entspricht ca. 46 % der eingesetzten RNA (5 nmol). Die Identität des RNA-NPP-SMPB-Konstrukts **240** wurde massenspektroskopisch nachgewiesen (Berechnet: (m/z) 6955; gefunden (ESI) 6955). Die Konjugation der NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierten RNA **238** mit Sulfo-SMCC **236** wurde analog durchgeführt. Die RNA wurde ebenfalls mit einem fünfzigfachen Überschuss des Crosslinkers in PBS-Puffer inkubiert.



**Abb. 92:** a) Reaktion der NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierten RNA **238** mit Sulfo-SMCC; b) RP-HPLC-Chromatogramme; oben: RNA mit photolabiler Schutzgruppe und Crosslinker; unten: nach Belichten erhält man die unmodifizierte RNA.



Die Reaktionslösung wurde diesmal allerdings erst nach 7 Stunden analysiert, und das HPLC-Chromatogramm zeigte, dass noch ca. 30 % der RNA nicht umgesetzt worden war. Hierin zeigt sich die sterische Abschirmung durch den Cyclohexylrest des SMCC-Linkers. Die Reaktionsmischung wurde dennoch aufgearbeitet. Überschüssiges Sulfo-SMCC wurde über eine Gelfiltrationskartusche entfernt und anschließend wurde das Konjugationsprodukt mittels präparativer RP-HPLC isoliert. Die produktthaltigen Fraktionen wurden portioniert lyophilisiert und bei -20°C gelagert. Die Identität des RNA-NPP-SMCC-Konstrukts **241** wurde massenspektroskopisch nachgewiesen (Berechnet: (m/z) 6933; gefunden (ESI) 6933). In Abb. 92 b) oben ist das Chromatogramm des RNA-NPP-SMCC-Konjugats **241** gezeigt. Das untere Chromatogramm zeigt die belichtete Probe. Durch Belichtung wird auch hier die photolabile Schutzgruppe inklusive SMCC-Linker vollständig abgespalten. In diesem Ansatz wurden 20 nmol der NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierte RNA **238** eingesetzt und es konnten ca. 11,3 nmol des RNA-NPP-SMCC-Konstrukts isoliert werden. Das entspricht etwa 57 % der eingesetzten Stoffmenge.

Vergleicht man die beiden Experimente, so wurde in beiden Fällen eine Ausbeute von ungefähr 50 % erzielt. Das erscheint merkwürdig aufgrund der Tatsache, dass eine HPLC-Analyse der unaufgereinigten Reaktionslösung des SMCC-Ansatzes (nicht gezeigt) noch ca. 30 % unmodifizierte RNA zeigt. Im SMPB-Ansatz wurde die eingesetzte RNA dagegen laut HPLC (nicht gezeigt) vollständig umgesetzt. Hier zeigt sich, dass für Synthesen im nmol-Maßstab die Verluste durch Aufarbeitung und Aufreinigung der Probe deutlich ins Gewicht fallen und die Vorteile durch die größere eingesetzte RNA-Menge im SMCC-Ansatz die unvollständige Umsetzung mehr als ausgleicht.

### **Kupplungsversuche mit einem zellpenetrierenden Peptid (CPP)**

Es sollte nun getestet werden, ob sich die RNA-Crosslinker-Konstrukte zur Verknüpfung mit dem in der Arbeitsgruppe Neundorf eingesetzten zellpenetrierenden Peptid **235** eignen. Als erstes testeten wir die Eignung verschiedener HPLC-Methoden für die Analytik. Dabei zeigte sich, dass mit RP-18-Material entweder für die RNA gute Ergebnisse erzielt wurden (Triethylammoniumacetatpuffer pH = 7,4 mit steigenden Mengen Acetonitril) oder für das Peptid (0,1 %ige TFA-Lösung mit steigenden Mengen Acetonitril), jedoch konnte die jeweils andere Verbindung mit den individuellen Elutionsmitteln nicht analysiert werden. Die Anionenaustauschchromatographie eignet sich auch gut für die Analyse der RNA (Säule: DNA-PAC 100 (Dionex); 25 mM Tris-HCl pH = 8 mit steigenden Mengen Hochsalzpuffer). Da das verwendete Peptid keine anionischen Funktionalitäten aufweist, eluiert es mit der Totzeit der Säule. Da beide Substanzen bei der Anionenaustauschchromatographie einen scharfen Peak lieferten, entschieden wir uns für diese Methode. Die RNA wurde bei 260 nm detektiert, das Peptid bei 220 nm.

Eine Lösung des CPPs **235** wurde jeweils unmittelbar vor den Konjugationsexperimenten 30 Minuten mit immobilisiertem TCEP (*Tris(carboxyethyl)phosphinhydrochlorid*) inkubiert um sicherzustellen, dass die Sulfhydrylgruppe des Cysteins in reduzierter Form vorliegt.

In einem ersten Experiment wurde die NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierte RNA **238** mit einem fünfzigfachen Überschuss Sulfo-SMPB (**237**) inkubiert, und nach einer Stunde über eine NAP-5-Gelfiltrationskartusche aufgereinigt um den größten Teil des überschüssigen Crosslinkers zu entfernen. Anschließend wurde ein Äquivalent des reduzierten Peptids **235** hinzugefügt und die Mischung 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Mit HPLC konnte nur das Konjugat aus RNA und Crosslinker (**240**) nachgewiesen werden. Da wir vermuteten, dass eventuell noch vorhandenes Sulfo-SMPB aufgrund des eingesetzten großen Überschusses das Peptid abfängt, entschlossen wir uns, das RNA-Crosslinker-Konstrukt zuerst mittels HPLC aufzureinigen, zu lyophilisieren und anschließend für die noch folgenden Kupplungsexperimente einzusetzen.

Das aufgereinigte RNA-SMPB-Derivat **240** wurde analog mit einem Äquivalent des reduzierten Peptids inkubiert. Ein analytisches HPLC-Chromatogramm enthielt überhaupt kein Signal. Noch nicht einmal das RNA-SMPB-Konstrukt konnte detektiert werden. Das Experiment wurde mit einem deutlichen Überschuss (50 Äquivalente) des Peptids wiederholt. Hier konnte lediglich das Peptid nachgewiesen werden.

Durch die starke, gegensätzliche Ladung der beiden Reaktionspartner ist es möglich, dass sich ein unlöslicher Komplex bildet. In der Literatur gibt es Beispiele, wo die Autoren entweder durch erhöhte Salzkonzentrationen<sup>[189]</sup> in der Reaktionslösung oder durch Zugabe von chaotropen Reagenzien wie Formamid<sup>[190]</sup> oder Harnstoff<sup>[105]</sup> sowohl im Reaktionsmedium als auch im Laufmittel für die HPLC-Analytik diesem Problem entgegengewirkt haben. Wir testeten alle drei Möglichkeiten und führten Kupplungsversuche mit 1,5 M Natriumchlorid in der Reaktionslösung durch, sowie mit 40 % Formamid bzw. 6 M Harnstoff, sowohl im Reaktionsmedium als auch im Laufmittel für die HPLC-Analytik. Jedoch konnte auch bei diesen Vorgehensweisen keine RNA-haltige Fraktion nachgewiesen werden.

In einem Kontrollexperiment wurde die NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierte RNA ohne Crosslinker mit dem Peptid inkubiert. Im HPLC-Chromatogramm konnten beide Substanzen detektiert werden. Daher setzten wir erneut zwei Kopplungsexperimente mit 40 % Formamid an. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde eine Probe direkt mit HPLC analysiert. Die andere Probe wurde zuerst belichtet und dann analysiert. Während die erste Probe wie zuvor kein Signal im HPLC-Chromatogramm ergab, konnte bei der belichteten Probe ein Signal, das der unmodifizierten RNA entspricht, detektiert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass sich tatsächlich das kovalente Konjugat gebildet hat, aber mit den verwendeten Aufreinigungsmethoden nicht isoliert werden konnte.

### Synthese einer cholesterylmodifizierten NPP-Gruppe (**244**) und einem entsprechenden Thymidin-Derivat ( $dT^{NPP-Chol}$ , **246**)

Da auch Cholesterin einen interessanten molekularen Transporter darstellt,<sup>[115]</sup> wurde ebenfalls ein Derivat der NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe hergestellt, das mit einem Cholesterylrest modifiziert ist. Die Synthese ist in Abb. 93 gezeigt. Das NPP-NH<sub>2</sub>-Derivat **218** wurde mit Cholesterylchloroformiat (**242**) in Gegenwart von DMAP und Diisopropylethylamin in einer Mischung aus Dichlormethan und Pyridin zum entsprechenden Carbamat **243** umgesetzt. Die Reaktion verlief mit 91 % Ausbeute. Im zweiten Schritt erfolgte die Abspaltung der TBDMS-Gruppe. Dazu wurde eine Mischung aus Essigsäure, THF und Wasser verwendet unter diesen milden Bedingungen musste die Reaktion 7 Tage gerührt werden, bis dass Verbindung **243** vollständig umgesetzt war. Die cholesterylmodifizierte NPP-Gruppe **244** konnte mit 83 % Ausbeute isoliert werden. Um zu testen, ob die Carbamat-Gruppe auch den Abspaltbedingungen nach der Oligonukleotidsynthese standhalten würde, wurde Verbindung **244** in einer Mischung aus wässriger Methylaminlösung und Methanol gelöst. Auch nach 24 Stunden bei Raumtemperatur zeigte ein DC keine Veränderung. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Cholesterylmodifikation den Abspaltbedingungen standhalten wird.

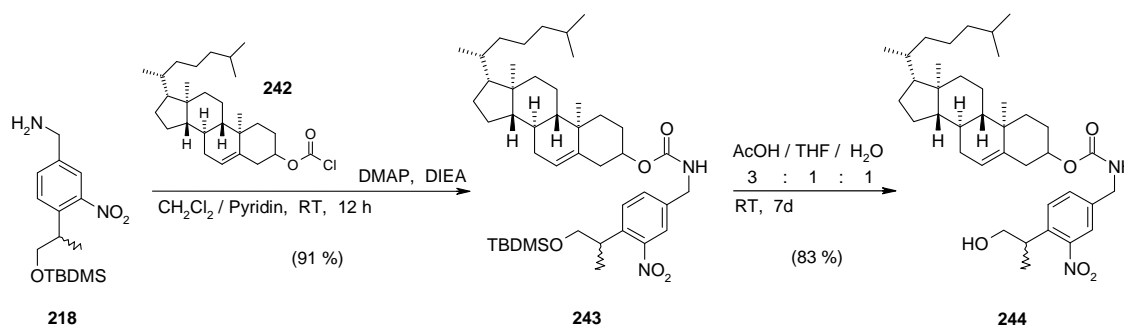
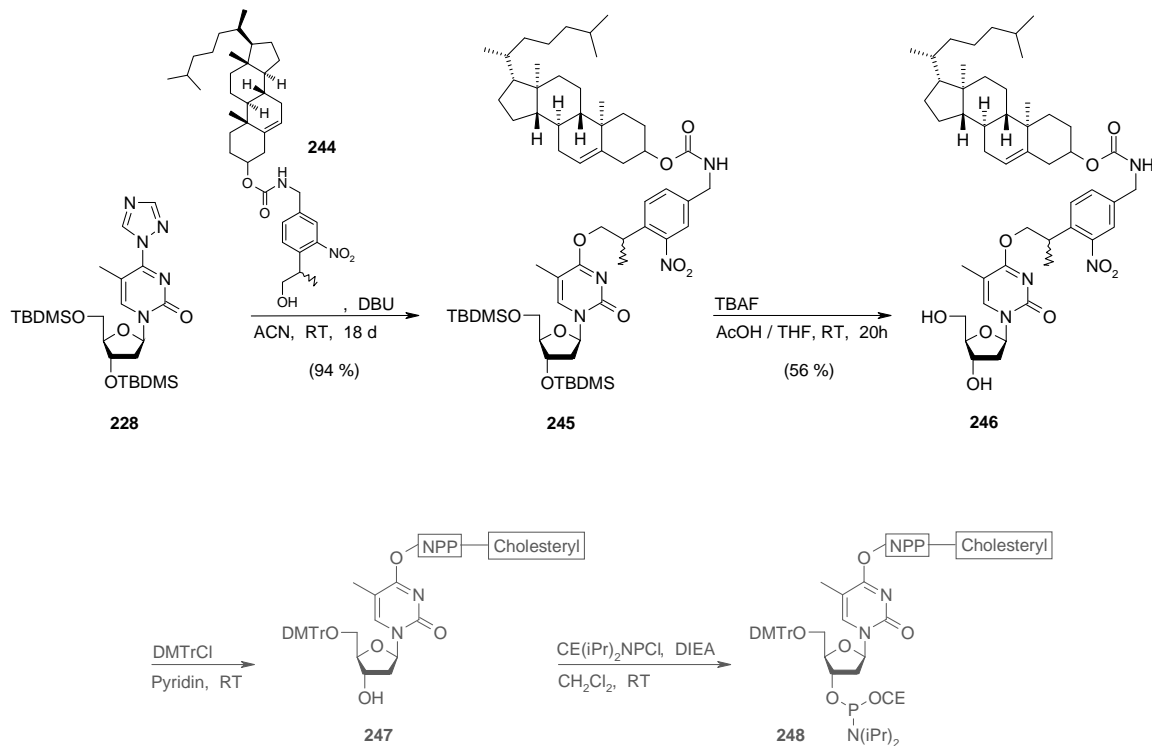


Abb. 93: Synthese der cholesterylmodifizierten NPP-Gruppe.

Die NPP-Cholesteryl-Gruppe **244** wurde dazu verwendet, ein entsprechend O<sup>4</sup>-modifiziertes Thymidin zu synthetisieren. Der Syntheseweg ist in Abb. 94 gezeigt. Das Thymidinderivat **228** wurde in Gegenwart von DBU als nicht nukleophiler Base mit dem cholesterylmodifizierten NPP-Derivat **244** umgesetzt. Die Reaktion wurde 18 Tage bei Raumtemperatur gerührt und lieferte das Thymidin-Derivat **245** mit 94 % Ausbeute. Als nächstes erfolgte die Abspaltung der TBDMS-Gruppen mit TBAF in essigsaurer Lösung. Durch die Essigsäure sollte die Nukleophilie der Fluoridionen gemindert werden um das Carbamat nicht zu gefährden. Eventuell wäre eine längere Reaktionszeit erforderlich gewesen um eine bessere Ausbeute zu erzielen. So wurde das Thymidinderivat **246** mit 56 % Ausbeute erhalten. Die letzten beiden Syntheseschritte bis zum Phosphoramidit wurden im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt. Es folgt noch die Dimethoxytrityl-Schätzung der 5'-OH-Gruppe schließlich die Synthese des entsprechenden Phosphoramidits.

Da die Arbeitsgruppe über viel Erfahrung auf dem Gebiet der Synthese von modifizierten Phosphoramiditen für die Oligonukleotid-Festphasensynthese verfügt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Synthese der Phosphoramidits **248** in Zukunft erfolgreich durchgeführt werden kann.



**Abb. 94: Synthese eines O<sup>4</sup>-NPP-cholesteryl-modifizierten Thymidinderivats.**

#### 2.4.4 Zusammenfassung

Um eine photolabile Schutzgruppe zu erhalten, die gleichzeitig als lichtspaltbarer Crosslinker dienen kann, wurde ein NPP-Derivat synthetisiert, das über einen zusätzlichen Aminolinker verfügt. Die trifluoracetylgeschützte Variante **207** wurde dazu verwendet einen Thymidinbaustein und einen Desoxyguanosinbaustein für die DNA/RNA-Festphasensynthese herzustellen, die an der O<sup>4</sup>-Position (dT) bzw. O<sup>6</sup>-Position (dG) die photolabile Schutzgruppe / lichtspaltbaren Crosslinker tragen. Der Desoxyguanosinbaustein **209** wurde für die Herstellung des Leitstranges einer lichtaktivierbaren siRNA verwendet **238**. Über die zusätzliche Aminofunktion der photolabilen Schutzgruppe konnte der RNA-Strang mit zwei heterobifunktionalen Crosslinkern (SMPB und SMCC) modifiziert werden. Die entsprechenden Reaktionsprodukte konnten isoliert werden und erwiesen sich als einigermaßen lagerfähig.

Der Versuch, die so modifizierte RNA mit einem zellpenetrierenden Peptid zu verknüpfen, war leider nicht erfolgreich. Das Hauptproblem bestand vermutlich darin, dass ein eventuell entstehendes kovalentes Reaktionsprodukt unter den verwendeten Reaktions- und Aufreinigungsbedingungen

aufgrund der starken gegensätzlichen Ladung der beiden Reaktionspartner einen unlöslichen Komplex bildet. Nach Belichtung der Reaktionsmischung ließ sich unmodifizierte RNA nachweisen. Ebenso konnte in einer Mischung aus Peptid und RNA ohne Crosslinker mittels HPLC sowohl das Peptid als auch die RNA nachgewiesen werden. Das spricht dafür, dass sich der kovalente Komplex tatsächlich gebildet hat, aber von uns bisher nicht isoliert werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich nicht mehr alle Möglichkeiten ausschöpfen, einen solchen Komplex eventuell doch noch zu isolieren. Zum Beispiel verwendeten Chiu *et al.* für die Aufreinigung eines kovalenten Konstrukts aus siRNA und Peptid denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.<sup>[106]</sup> Auch die Verwendung von HPCL-Gelfiltrationssäulen zur Aufreinigung ähnlicher Komplexe wurde beschrieben.<sup>[189]</sup> Auch könnte versucht werden, die Löslichkeit des Komplexes zu verbessern, indem man das Ladungsverhältnis zwischen dem RNA-Teil und dem Peptid-Teil ändert. So könnte ein anderes Peptid ausprobiert werden, oder zunächst der RNA-Leitstrang mit dem entsprechenden Gegenstrang hybridisiert werden, bevor die Verknüpfung mit dem Peptid stattfindet.

Darüber hinaus kann eine NPP-NH<sub>2</sub>-modifizierte Nukleinsäure natürlich auch dazu verwendet werden, lichtspaltbare Konjugate mit anderen interessanten Modifikationen herzustellen, wie zum Beispiel mit Fluorophoren oder sequenzspezifisch bindenden synthetischen Polyamiden.<sup>[191]</sup> Es könnte mit der photolabilen Schutzgruppe auch ein kleines organisches Wirkstoffmolekül mit einem molekularen Transporter modifiziert werden, der sich in der Zelle durch Belichtung wieder spurlos entfernen ließe. Wahrscheinlich wäre eine Kombination aus einem zellpenetrierenden Peptid und einem kleinen Wirkstoffmolekül deutlich leichter aufzureinigen.

Die NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe wurde zudem auch mit einem Cholesterylrest verknüpft. Mit dieser Kombination aus photolabiler Schutzgruppe und molekularem Transporter könnte zum Beispiel versucht werden, das Glukosamin-6-phosphat aus Kapitel 2.2 zu modifizieren, und dadurch dessen Aufnahme in lebende Zellen zu erleichtern. Die Cholesteryl-Variante der NPP-Gruppe **244** wurde darüber hinaus dazu verwendet die O<sup>4</sup>-Position von Thymidin zu modifizieren (**246**). Die Synthese des Phosphoramidits wurde zwar nicht fertiggestellt, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass die letzten beiden Synthesestufen erfolgreich durchgeführt werden könnten. Mit einem entsprechenden Nukleotidbaustein könnte dann schon im Verlauf der Festphasensynthese eine Nukleinsäure mit einem Transportmolekül ausgestattet werden, wodurch eine postsynthetische Modifikation unnötig wäre.



# 3 Experimenteller Teil

## 3.1 Material und Methoden

### 3.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Geräte

#### Chemikalien

Die kommerziell erworbenen Chemikalien wurden wie vom Hersteller geliefert ohne weitere Aufreinigung in den Synthesen eingesetzt. Die verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Acros-Organics*, *TCI* und *ChemGenes* bezogen.

Unmodifizierte Oligonukleotide wurden bei der *IBA GmbH* (Göttingen) und der *Microsynth AG* (Balgach, Schweiz) bestellt.

#### Lösungsmittel

Für die Synthesen wurden, wenn nicht anders angegeben, Lösungsmittel der Reinheit *pro analysi* verwendet. Die Lösungsmittel wurden von den Firmen *Riedel de Haen*, *Merck*, *Fluka* und *KMF* bezogen. Wasserfreie Lösungsmittel über Molsieb stammen von der Firma *Fluka*. Mit Ausnahme der Phosphoramidite, die mit Lösungsmitteln der Qualität *p.a.* säulenchromatographisch gereinigt wurden, wurden für die Säulenchromatographie Lösungsmittel in technischer Qualität verwendet. Für sämtliche wässrigen Lösungen bzw. Puffer wurde MilliQ-Wasser aus einem Milli-Q Plus Gerät (*Millipore Corp.*) mit Filterkartuschen der *Siemens AG* verwendet.

#### Präparative Säulenchromatographie

Die synthetisierten Verbindungen wurden, wenn nicht anders angegeben, säulenchromatographisch gereinigt. Hierzu wurde als stationäre Phase Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 0,04-0,063 mm der Firmen *Macherey-Nagel GmbH&Co.KG* oder *Merck KGaA* verwendet.

#### Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf DC-Kieselgelplatten 60 mit Fluoreszenzindikator (254 nm) der Firma *Merck KGaA* durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge 254. Darüber hinaus, standen für das Anfärben der entwickelten Dünnschichtchromatogramme folgende Färbereagenzien zur Verfügung: Anisaldehydreagenz: 10 mL *p*-Anisaldehyd, 5 ml Eisessig, 420 mL Ethanol und 15 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Vanillinreagenz: 6 g Vanillin, 400 mL Ethanol und 8 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Kaliumpermanganatlösung: 1,5 g KMnO<sub>4</sub>, 12 g NaOH,

300 mL Wasser; Ninhydrinreagenz: 0,6 g Ninhydrin, 2 mL Eisessig, 13 mL Wasser und 285 mL n-Butanol; Cer-Molybdänreagenz: 2,5 g Cer(IV)sulfat, 6,25 g Ammoniumheptamolybdat, 225 mL Wasser, 25 mL konz. Schwefelsäure. Die DC-Platten wurden durch Eintauchen in die jeweilige Färbelösung und anschließendes Erhitzen mit einem Heißluftgebläse angefärbt.

### HPLC

Agilent Technologies Serie 1200, mit quaternärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen, Fraktionensammler und Multi-Wavelength Detektor. Laufmittel A: 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH = 7,4); Laufmittel B: Acetonitril.

### MPLC

MPLC-Anlage bestehend aus 2 Pumpen C-601, Pump Manager C-615, UV-Photometer C-635 und Fraction Collector C-660 der Firma *Büchi* (Essen). Fertigsäulen Lobar Lichrorep RP-18 der Firma *Merck KGaA* (Darmstadt)

### UV-Belichtung

Zur Belichtung der photolabil geschützten Oligonukleotide wurde neben einer normalen, kommerziell erhältlichen UV-Handlampe eine Bestrahlungsapparatur mit 3 UV-LEDs (*NICHIA Corp.* Model NCCU033(T), 366 nm), die mit einer Stromstärke von je 0,5 A betrieben wurden, verwendet. Die Belichtungsdauer betrug 3 min. Die Belichtungstests wurden in PBS-Puffer durchgeführt.

### Speedvac

Zum Aufkonzentrieren wässriger Oligonukleotidlösungen bzw. zum vollständigen Entfernen des Lösungsmittels wurde ein Vakuumkonzentrator 5301 der *Eppendorf AG* (Hamburg) verwendet.

## 3.1.2 Analytik

### NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden auf Spektrometern der Firma *Bruker* gemessen: AM 400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 101 MHz,  $^{31}\text{P}$ : 162 MHz); AM 300 ( $^1\text{H}$ : 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 75,5 MHz); DMX 500 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz); AM250 ( $^1\text{H}$ : 250 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 62,5 MHz); ARX300 ( $^1\text{H}$ : 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 75 MHz,  $^{31}\text{P}$ : 121 MHz); AV400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $^{31}\text{P}$ : 162 MHz). Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben und Kopplungskonstanten  $J$  in Hz. Für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie wurde die Verschiebung des Lösungsmittels als interner Standard verwendet.<sup>[192]</sup> Für die Zuordnung der Signale wurden zusätzlich 2D-NMR-Experimente durchgeführt und ausgewertet. Als Lösungsmittel dienten deuteriertes DMSO, Aceton, Chloroform, Acetonitril und



Methanol, jeweils mit einem Deuterierungsgrad von  $\geq 99,8\%$ . Für die  $^{31}\text{P}$ -Spektren diente 85%ige Phosphorsäure als externer Standard.  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren wurden Protonen-Breitband entkoppelt (cpd, *composite pulse decoupling*) aufgenommen. Die Multipletts wurden wie folgt bezeichnet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = unbestimmtes Multiplett, br = breites Singulett.

### Massenspektroskopie

Zur massenspektrometrischen Analytik der synthetisierten Verbindungen wurden folgende Spektrometer verwendet. FAB-Spektren: Concept 1H der Firma *Kratos*; EI-Spektren: MS-50 der Firma *A.E.I.* oder MAT 95 XL der Firma *ThermoQuest*; ESI: VG mit Quadrupol-Analysator der Firma *Fisons*; HRMS-Spektren: micrOTOF-Q Gerät der Firma *Bruker Corporation* oder MALDI Orbitrap XL der Firma *Thermo*. Für die MALDI-Spektren wurde  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure als Matrix verwendet. Das micrOTOF-Q Gerät wurde ebenfalls zur Analytik der synthetisierten Oligonukleotide verwendet. Daneben diente eine Nano-ESI Mariner Biospectrometry Workstation der Firma *PerSeptive Biosystems* zur massenspektroskopischen Untersuchung von Oligonukleotiden.

### Elementaranalyse

Zur Elementaranalyse wurden die Geräte VarioEL V2.8 oder Vario Micro Cube der *Elementar Analysysteme GmbH* verwendet. Analysiert wurden die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff. Die Angabe erfolgte in Prozent.

### UV-Spektroskopie

Für die UV-spektroskopische Untersuchung und Quantifizierung der Oligonukleotide standen ein Evolution 300 UV-Vis-Spektrophotometer der *Thermo Scientific Inc.* und ein Biophotometer plus der *Eppendorf AG* zur Verfügung.

### CD-Spektroskopie

Zur Aufnahme der CD-Spektren wurde ein CD-Spektrometer J-715 der Firma *Jasco* verwendet. Die Schichtdicke der verwendeten Küvette betrug 1 mm. Für die Messungen wurde 1 nmol des jeweiligen Oligonukleotids in 110  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer gelöst. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

## 3.1.3 Oligonukleotid-Festphasensynthese

Für die Synthese der photolabil geschützten DNA-Oligonukleotide wurde ein ABI 392 RNA/DNA-Synthesizer der Firma *Applied Biosystems* verwendet. Die eingesetzten Reagenzien wurden von den Firmen *Mallinckrodt Baker Inc.*, *Chemgenes Corporation* und *Applied Biosystems* bezogen.

Unmodifizierte Oligonukleotide wurden von *Ella Biotech GmbH* gekauft. Die Synthesen erfolgten auf ABI LV200 Polystyrol Säulen. Es wurden folgende Reagenzien verwendet: Detritylierung: 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan; Aktivator: 0,25 M 5-Ethylthiotetrazol in Acetonitril; Capping: CapA: 10 % Essigsäureanhydrid in THF, CapB: 10 % Methylimidazol in THF; Oxidation: 0,02 M Iod in THF/Pyridin/Wasser. Die Phosphoramidite wurden in einer Konzentration von 0,1 M in Acetonitril eingesetzt. Die exozyklischen Aminofunktionen der Nukleobasen waren mit folgenden Schutzgruppen geschützt: dA-benzoyl, dC-acetyl, dG-dmf. Die letzte Tritylgruppe wurde nicht abgespalten um die Aufreinigung zu erleichtern.

Zur Abspaltung und Entschützung der DNA wurde das Festphasenmaterial entweder mit 250  $\mu\text{L}$  konzentrierter wässriger Ammoniaklösung (32 %) für 4 Stunden bei 65°C inkubiert, oder mit 250  $\mu\text{L}$  AMA (40 % Methylamin in Wasser / 32 %  $\text{NH}_3$ -Lsg. 1:1) bei Raumtemperatur über Nacht. Das Festphasenmaterial wurde über Ultrafree<sup>®</sup>-MC Zentrifugationsfilter (*Millipore Corp.*) mit 22  $\mu\text{m}$  Porengröße abfiltriert und die DNA-Lösung über HPLC gereinigt. Verwendet wurde eine Nucleosil C-18 RP-Säule 250 x 4,6 mm. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Gradient: 2 min 5 % ACN, 28 min 5-35 % ACN gegen 0,1M TEAA-Puffer (pH = 7,4). Anschließend wurden die produkthaltigen Fraktionen im Vakuumkonzentrator eingedampft und der Rückstand zur Abspaltung der Tritylgruppe mit 80 %iger Essigsäure (125  $\mu\text{L}$ ) für 20 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine weitere RP-HPLC-Aufreinigung. Die produkthaltigen Fraktionen wurden eingedampft, der Rückstand in einer definierten Menge Wasser gelöst und bei 254 nm im UV-Spektrometer die Konzentration bestimmt.

**A5: 5'-d(AACC<sup>NPE</sup>-GAAA-GGTTGGTGTGGTTGG)-3'**

Trityl-Monitor: 55,2 %; Abspaltung:  $\text{NH}_3$

isolierte DNA-Menge: 15,6 nmol

MS (ESI):  $m/z$  berechnet: 7348,8; gefunden 7348,0.

**A6: 5'-d(AAC<sup>NPE</sup>C-GAAA-GGTTGGTGTGGTTGG)-3'**

Trityl-Monitor: 63,0 %; Abspaltung:  $\text{NH}_3$

isolierte DNA-Menge: 19,1 nmol

MS (ESI):  $m/z$  berechnet: 7348,8; gefunden 7348,0.

**A27: 5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG-AAAA-CC<sup>NPE</sup>AA<sup>NPE</sup>C)-3'**

Trityl-Monitor: 47,1 %; Abspaltung: AMA

isolierte DNA-Menge: 13,4 nmol

MS (ESI):  $m/z$  berechnet: 7767,4; gefunden 7767,2.

**A28: 5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG-AAAA-CC<sup>NPE</sup> AAC<sup>NPE</sup> C)-3'**

Trityl-Monitor: 65,2 %; Abspaltung: AMA

isolierte DNA-Menge: 6,25 nmol

MS (ESI): *m/z* berechnet: 8056,4; gefunden 8056,6.

**A29: 5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG-AAAA-CC<sup>NPE</sup> AAC<sup>NPE</sup> CAC<sup>NPE</sup> A)-3'**

Trityl-Monitor: 71,3 %; Abspaltung: AMA

isolierte DNA-Menge: 18,2 nmol

MS (ESI): *m/z* berechnet: 8588,5; gefunden 8588,3.

**A30: 5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG-AAAA-C<sup>NPE</sup> C<sup>NPE</sup> AAC<sup>NPE</sup> C<sup>NPE</sup> AC<sup>NPE</sup> A)-3'**

Trityl-Monitor: 72,9 %; Abspaltung: NH<sub>3</sub>

isolierte DNA-Menge: 17,9 nmol

MS (ESI): *m/z* berechnet: 8886,6; gefunden 8886,1.

**A31: 5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG-AAAA-CC<sup>NPE</sup> AA<sup>NPE</sup> CC<sup>NPE</sup> AC<sup>NPE</sup> A)-3'**

Trityl-Monitor: 80,1 %; Abspaltung: NH<sub>3</sub>

isolierte DNA-Menge: 23,3 nmol

MS (ESI): *m/z* berechnet: 8741,8; gefunden 8742,3.

**3.1.4 siRNA-Konjugate mit bifunktionalem Crosslinker****238: 5'-r(UUG AUG CCG<sup>NPP-NH2</sup> UUC UUC UGC U)dTdT-3'**

Die Synthese der RNA wurde von der Firma *IBA* (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde das von uns synthetisierte Phosphoramidit **209** eingeschickt und in einem 1 µmol-Syntheseansatz verwendet. Das eingesetzte Guanosinphosphoramidit trug eine Acetylgruppe als Schutzgruppe für die exozyklische Aminofunktion. Das Festphasenmaterial wurde uns durch die Firma *IBA* zugeschickt und von uns wurde die Abspaltung und Aufreinigung der RNA durchgeführt. Dazu wurde das Festphasenmaterial für 4 Stunden in einer Mischung aus ethanolischer Methylaminlösung (33 %ig) und wässriger Methylaminlösung (40 %ig) inkubiert. Nach anschließender Filtration wurde die RNA-Lösung im Vakuumkonzentrator zur Trockene eingedampft. Zur Entfernung der 2'-TBDMS-Gruppen wurde der Rückstand in TBAF-Lösung (1M in THF) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Entsalzung der Lösung über Gelfiltrationssäulen (NAP-5, *GE Healthcare*) und eine HPLC-Aufreinigung im Anionenaustauschchromatographie-Verfahren. Es wurde eine PAC-100 Säule der Firma *Dionex* verwendet. Niedrigsalzpuffer: 20 mM Tris-HCl pH = 8; Hochsalzpuffer: 20 mM Tris-HCl pH = 8 mit 500 mM Natriumperchlorat. Der Gradient begann für 2 Minuten isokratisch mit Niedrigsalzpuffer und stieg dann innerhalb von 38 Minuten auf 75 %

Hochsalzpuffer. Die Flussrate betrug 1,5 mL/min. Die Säule wurde auf 80°C erhitzt. Die gesammelten Fraktionen wurden wieder entsalzt und einer RP-HPLC-Reinigung unterzogen, um eventuell RNA ohne die photolabile Schutzgruppe vom gewünschten Produkt abzutrennen. Gradient: 2 min 0 % ACN, 13 min 0-23 % ACN gegen 0,1 M Ammoniumacetatpuffer (pH = 7). Die Flussrate betrug 1 mL/min, die Säule (Nucleosil C-18, 250 x 4,6 mm) wurde auf 55°C erhitzt. Es konnten insgesamt fast 400 nmol der photolabil geschützten RNA **238** isoliert werden.

MS (ESI):  $m/z$  berechnet: 6714,1; gefunden: 6713,1 (M-H<sup>+</sup>).

#### **240: 5'-r(UUG AUG CCG<sup>NPP-SMPB</sup> UUC UUC UGC U)dTdT-3'**

Es wurde ein Reaktionsansatz zusammenpipettiert aus:

7,5 µL Wasser

5 µL 10 x PBS-Puffer (pH = 7,45)

12,5 µL RNA-Lösung (**238**) (400 µM in Wasser) (entspricht 5 nmol RNA)

25 µL einer frischen Lösung von Sulfo-SMPB (10 mM) in Wasser / DMSO 8:2

Der Ansatz wurde 1 Stunde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur stengelassen und anschließend über RP-HPLC aufgereinigt: Nucleosil C-18, 270 x 4,6 mm, 55°C, 1 mL/min. Gradient: 2 min 5 % ACN, 15 min 5-27 % ACN, gegen Ammoniumacetatpuffer (0,1 M; pH = 6,5). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach Entnahme einer analytischen Probe wurde das RNA-Crosslinker-Konjugat lyophilisiert.

Ausbeute: 2,3 nmol

MS (ESI):  $m/z$  berechnet: 6955; gefunden: 6955.

#### **241: 5'-r(UUG AUG CCG<sup>NPP-SMCC</sup> UUC UUC UGC U)dTdT-3'**

Es wurde ein Reaktionsansatz zusammenpipettiert aus:

30 µL Wasser

20 µL 10 x PBS-Puffer (pH = 7,45)

50 µL RNA-Lösung (**238**) (400 µM in Wasser) (entspricht 20 nmol RNA)

100 µL einer frischen Lösung von Sulfo-SMCC (10 mM) in Wasser / DMSO 8:2

Der Ansatz wurde 7 Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur stengelassen und anschließend in zwei Portionen über RP-HPLC aufgereinigt: Nucleosil C-18, 270 x 4,6 mm, 55°C, 1 mL/min. Gradient: 2 min 5 % ACN, 15 min 5-27 % ACN, gegen Ammoniumacetatpuffer (0,1 M; pH = 6,5). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach Entnahme einer analytischen Probe wurde das RNA-Crosslinker-Konjugat lyophilisiert.

Ausbeute: 11,3 nmol

MS (ESI):  $m/z$  berechnet: 6933; gefunden: 6933.

### 3.1.5 Biochemische Methoden

Die Filterbindungsstudien, RNA-Transkription und Fluoreszenzpolarisationsmessungen wurden von unseren Kooperationspartnern im Arbeitskreis Prof. Günter Mayer (LIMES, Universität Bonn) durchgeführt. Die Blutgerinnungsexperimente wurden von Dr. Jens Müller aus der Arbeitsgruppe Prof. Bernd Pötzsch (Universitätsklinik Bonn) durchgeführt.

#### Filterbindungsstudien

Für die Filterbindungsexperimente wurden die Nukleinsäurestränge am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphat modifiziert. Dazu wurde  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und T4 Polynukleotidkinase (*Stratagene*, Amsterdam, Niederlande) für 45 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  verwendet. Anschließend wurde die Reaktionsmischung über G25 Mikrosphin Columns (*GE Healthcare*, München) von überschüssigem  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP befreit und die erhaltene Nukleinsäure wurde mit einem 12 %igen Polyacrylamidgel auf ihre Reinheit kontrolliert. Zur Messung der Dissoziationskonstanten wurden die radioaktiv markierten Aptamersequenzen in einer endgültigen Konzentration von 0,5 nM mit steigender Menge (0-1  $\mu\text{M}$ ) Rinder-Thrombin inkubiert. Die Experimente wurden in PBS-Puffer (pH = 7,3) durchgeführt, der zusätzlich 2  $\mu\text{M}$  tRNA enthielt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  wurde die Reaktionsmischung durch eine nasse 0,45  $\mu\text{m}$  Nitrozellulosemembran (*Schleicher und Schüll*, Dassel) filtriert und mit 0,8 mL PBS-Puffer nachgewaschen. Nach dem Trocknen wurde zum Auslesen der Radioaktivität ein Phosphorimager FUJIFILM FLA-3000 mit AIDA Imagequant Software (*Fujifilm*, Düsseldorf) verwendet. Die Dissoziationskonstanten wurden unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie des Aptamer-Thrombin-Komplexes ermittelt.

#### Blutgerinnungsstudien

Die blutgerinnungshemmende Wirkung der Aptamersequenzen wurde in einem Plasma-basierten Blutgerinnungsassay (Thrombin-Zeit (TT)) unter Verwendung eines ACL Top Coagulation Analyser (*IL*, Kirchheim) bestimmt. Dazu wurde menschliches  $\alpha$ -Thrombin (*CellSystems*, St. Katharinen) in Analysepufer (1 x PBS, pH = 7,3, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  BSA) mit einer Konzentration von 10 NIH U/mL (75 nM). Diese Thrombinlösung wurde mit Aptamerlösung in einer endgültigen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  versetzt. 75  $\mu\text{L}$  der Reaktionsmischung wurden in eine vorgewärmte Küvette des Koagulometers pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute bei  $37^\circ\text{C}$  wurden 75  $\mu\text{L}$  menschliches Plasma hinzugefügt und die Blutgerinnungszeit gemessen. Für eine vergleichbare Bestimmung der blutgerinnungshemmenden Wirkung der verschiedenen Aptamere wurden die Blutgerinnungszeiten auf eine Standard-Kurve normiert, die durch aufeinanderfolgende Verdünnungen einer  $\alpha$ -Thrombinlösung in einem Bereich von 10 NIH U/mL (100 %) bis 0,625 NIH U/mL (6,25 %)

bestimmt wurde. Um die blutgerinnungshemmenden Wirkung der verschiedenen Aptamere relativ zu der von **HD1** zu erhalten, wurden die Blutgerinnungszeiten zusätzlich auf die Standard-Kurve von **HD1** normiert (0  $\mu\text{M}$  (0 %) bis 2  $\mu\text{M}$  (200 %)).

### RNA-Transkription

dsDNA-Template für die *in vitro* Transkription wurden mit PCR hergestellt. Dazu wurde das Templat 5'-GATAGCGCCCGAACTAAGCGCCCGGAAAAAGGCTTAGTTGACGAGGATGGAGGTTATCGAATTTTCGGCGGATGCCTCCCG-3' und die Primer-Sequenzen 5'-glmS.mini 5'-TAATACGACTCACTATAGATAGCGCCCGAACTAAG-3' und 3'-glmS.mini 5'-CGGGAGGCATCCGCGAAAATTC-3' verwendet. Für die Fluoreszeinkmarkierung der RNA wurde die dsDNA in Gegenwart von 10 mM GMPS (Guanosin-5'-monophosphothioat) (*emp biotech*) über Nacht bei 37°C transkribiert. Nach der GMPS-Transkription wurde die Reaktion mit DNase I für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach Ethanol-Präzipitation wurde die RNA in 100  $\mu\text{L}$  Wasser gelöst und zweimal über G25 Microspin Columns (*GE Healthcare*) gefiltert. Die Fluoreszeinkmarkierung wurde durchgeführt indem die GMPS-RNA mit einem 200-fachen Überschuss 5-(Iodoacetamido)-fluoreszein (*Sigma*) in 50 mM Tris pH = 8,0; 50 mM EDTA und 2 M Harnstoff für 2 Stunden bei 40°C inkubiert wurde. Die markierte RNA wurde über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (10 %) gereinigt, durch UV-Shadowing detektiert und durch Ausschneiden, Zerstoßen und Extrahieren der identifizierten Gelbereiche isoliert.

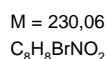
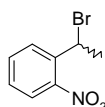
### Fluoreszenzpolarisationsmessung

Die Fluoreszenzpolarisationsbestimmungen wurden durchgeführt indem das fluoreszeinkmarkierte *glmS*-Ribozym (100 nM) in Reaktionspuffer (50 mM Tris pH = 7,9; 200 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,001 % Tween-20) für 30 Minuten bei 25°C alleine oder in Gegenwart verschiedener Effektormoleküle (GlcN6P, GlcN wurden von *Sigma-Aldrich* gekauft) inkubiert wurde. UV-Bestrahlung wurde mit einer kommerziell erhältlichen UV-Handlampe (366 nm) durchgeführt. Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 25  $\mu\text{L}$  und aller Reaktionen wurden in schwarzen 96-well-Platten (*Corning*) unter Lichtausschluss durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Proben mit einem Tecan Ultra Fluoreszenz-Reader (*Tecan*, Crailsheim) ausgelesen. Alle Experimente wurden doppelt bestimmt.

## 3.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

### 3.2.1 Synthese von NPE-Amin

#### 1-Brom-1-(2-nitrophenyl)ethan (**114**)

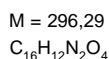
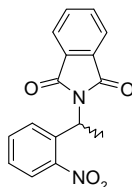


Verbindung **114** wurde nach einer Literaturvorschrift synthetisiert:<sup>[193]</sup> *o*-Ethylnitrobenzol (30 g, 198 mmol, 26,8 mL, 1 eq.), N-Bromsuccinimid (53 g, 298 mmol, 1,5 eq.) und Dibenzoylperoxid (750 mg, 3 mmol, kat.) wurden in Tetrachlorkohlenstoff (300 mL) gelöst. Die Mischung wurde 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt (Ölbadtemperatur 90°C). Die abgekühlte Reaktionsmischung wurde filtriert, und aus dem Filtrat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 19:1). Nach entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Trocknen im Hochvakuum erhielt man das gewünschte Produkt **114** als orange-gelbes Öl (39,4 g, 171 mmol, 86 %).

R<sub>f</sub> (Cyclohexan / Aceton 19:1) = 0,43

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,07 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 5,80 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,9 Hz, 1H, CHBrCH<sub>3</sub>); 7,42 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,8 Hz, 1H, arom. H); 7,63 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,8 Hz, 1H, arom. H); 7,82 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,2 Hz, 1H, arom. H); 7,88 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,0 Hz, 1H, arom. H) ppm.

#### *N*-(2-Nitrophenyl)ethylphthalimid (**249**)



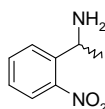
Verbindung **249** wurde nach einer abgewandelten Literaturvorschrift synthetisiert:<sup>[193]</sup> 1-Brom-1-(2-nitrophenyl)ethan (**114**) (89,8 g, 390 mmol, 1 eq.) und Kaliumphthalimid (72,3 g, 390 mmol, 1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (390 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde unter Rückfluss auf 155°C erhitzt (Ölbadtemperatur). Nach abkühlen auf

Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen (400 mL) und nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\varnothing = 8$  cm,  $h = 14$  cm, Dichlormethan). Man erhielt einen hellbraunen Feststoff (78,2 g, 294 mmol, 67 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1) = 0,72

$^1\text{H NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1,84$  (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 5,81 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz); 7,53-7,89 (m, 8H, arom. H) ppm.

### 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin (75)



M = 166,18  
C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Verbindung **75** wurde nach einer abgewandelten Literaturvorschrift synthetisiert.<sup>[193]</sup> *N*-(2-Nitrophenyl)ethylphthalimid (**249**) (78,2 g, 264 mmol, 1 eq.) wurde in Ethanol (500 mL) suspendiert. Die Mischung wurde unter Rückfluss erhitzt bis der Feststoff vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Mischung auf 80°C abgekühlt und Hydrazinhydratlösung hinzugefügt (50 % in Wasser) (25,7 mL, 264 mmol, 1 eq.). Die Mischung wurde eine Stunde bei 60°C gerührt. Dabei fiel ein dicker Niederschlag aus. Die Masse im Kolben wurde zerstoßen und eine weitere Portion Hydrazinhydratlösung (50 % in Wasser) (25,7 mL, 264 mmol, 1 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 60°C stehen gelassen. Anschließend wurde die Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Ethanol verdünnt und über einen Büchnertrichter filtriert. Der Rückstand wurde mehrmals (3x) mit kaltem Ethanol gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 97:3 mit 0,5 % Triethylamin im Laufmittel). Man erhielt die Verbindung **75** in Form eines intensiv gelben, viskosen Öls (40,6 g, 244 mmol, 92 %).

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 95:5 mit 0,5 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylethylamin) = 0,40

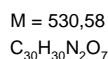
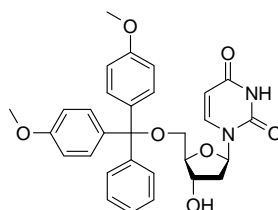
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1,30$  (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,02 (br, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 4,31 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ); 7,41-7,91 (m, 4H, arom. H) ppm.



### 3.2.2 Synthese des NPE-geschützten Desoxycytidinderivats

Die Synthese des photoaktivierbaren Desoxycytidinderivats wurde analog einer Synthese von Silverman et al.<sup>[42,194]</sup> durchgeführt.

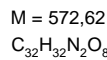
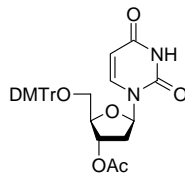
#### 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (72)



Verbindung **72** wurde entsprechend einer Literaturvorschrift synthetisiert:<sup>[195]</sup> 2'-Desoxyuridin (5 g, 22 mmol, 1 eq.) wurde in Pyridin (160 mL) gelöst und ein Teil des Pyridins (ca. 60 mL) wurde am Rotationsverdampfer wieder entfernt (azeotrope Destillation von Wasser). Unter Argonatmosphäre wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (8,91 g, 26,5 mmol, 1,2 eq.) hinzugefügt und die Mischung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde mit Dünnschichtchromatographie verfolgt (Dichlormethan / Methanol 95:5). Nachdem das Ausgangsmaterial vollständig reagiert hatte, wurde Ethanol (25 mL) hinzugefügt und die Lösung noch 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Pyridin unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (300 mL) aufgenommen und die organische Phase nacheinander zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x 300 mL) und dann mit gesättigter Kochsalzlösung (300 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und die erhaltene Lösung unter kräftigem Rühren in n-Hexan (500 mL) getropft. Es fiel ein weißer Niederschlag aus, der über eine Glasfilterfritte (P2) abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet wird. Da eine NMR-Spektroskopische Untersuchung ergab, dass das Produkt nicht ganz sauber ist, wurde es ein weiteres Mal auf die gleiche Weise gefällt. Man erhielt das gewünschte Produkt **72** in Form eines blaßgelben Feststoffes (10,4 g, 19,6 mmol, 89 %).

R<sub>f</sub> (Dichlormethan / Methanol 95:5) = 0,23

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 2,15-2,20 (m, 2H, 2 x H-2'); 3,15-3,25 (m, 2H, 2 x H-5'); 3,73 (s, 6H, 2 x OMe); 3,84-3,88 (m, 1H, H-3'); 4,26-4,31 (m, 1H, H-4'); 5,32 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,8 Hz, 1H, 3'-OH); 5,37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,0 Hz, 1H, H-6); 6,12-6,15 (m, 1H, H-1'); 6,87-6,90 (m, 4H, arom. H); 7,22-7,38 (m, 9H, arom. H); 7,63 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,2 Hz, 1H, H-5); 11,32 (s, 1H, NH) ppm.

**3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (73)**

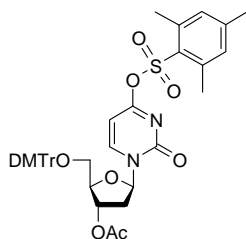
5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyuridin (**72**) (10,3 g, 19,3 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (244 mg, 2,0 mmol, 0,1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin (60 mL) gelöst. Essigsäureanhydrid (2,72 mL, 29,0 mmol, 1,5 eq.) wurde hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Mit DC (Dichlormethan / Methanol 98:2 mit 1 % Triethylamin) konnte kein Ausgangsmaterial mehr nachgewiesen werden. Methanol (2 mL) wurde hinzugefügt und anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit wässriger Zitronensäurelösung (5 %), Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **73** wird in Form eines hellgelben Schaumes erhalten (11,6 g, vollständige Umsetzung).

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 98:2 mit 1 % Triethylamin) = 0,24

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 2,04 (s, 3H, OAc); 2,29-2,47 (m, 2H, 2 x *H*-2'); 3,20-3,37 (m, 2H, 2 x *H*-5'); 3,73 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>); 4,05-4,09 (m, 1H, CH); 5,23-5,27 (m, 1H, CH); 5,45 (d,  $^3J_{HH}$  = 8,0 Hz, 1H, arom. *H*); 6,12-6,17 (m, 1H, *H*-1'); 6,88-7,39 (m, 13H, arom. *H*); 7,63 (d,  $^3J_{HH}$  = 8,0 Hz, 1H, arom. *H*); 11,38 (s, 1H, NH) ppm.

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 21,17; 36,85; 55,47; 63,89; 74,35; 83,33; 84,76; 86,42; 102,31; 113,68; 127,23; 128,09; 128,33; 130,14; 135,57; 135,75; 140,74; 145,01; 150,74; 158,58; 163,37; 170,37 ppm.

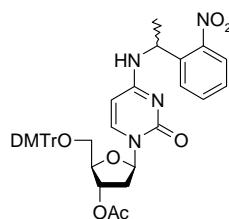
**HR-MS** (EI): *m/z* berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M]<sup>+</sup> 572,2158; gefunden 572,2156.

**3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-4-O-mesitylsulfonyl-2'-desoxyuridin (74)**

M = 754,86  
C<sub>41</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S

Nukleosid **73** (1,0 g, 1,75 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (21,3 mg, 0,18 mmol, 0,1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) gelöst. Triethylamin (1,22 mL, 8,75 mmol, 5 eq.) wurde hinzugefügt, gefolgt von 2-Mesitylsulfonylchlorid (498 mg, 2,28 mmol, 1,3 eq.). Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei färbte sich die Lösung dunkelrot. Ein DC (Dichlormethan / Methanol 98:2 mit 1 % Triethylamin) zeigte, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 99:1 → 98:2, jeweils mit 1 % Triethylamin im Laufmittel). Das Produkt **74** wurde als blaßgelber Schaum erhalten (750 mg, 0,99 mmol, 56 %) und sofort für die nächste Reaktion eingesetzt.

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 98:2 mit 1 % Triethylamin) = 0,56

**3'-O-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-4-N-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]-2'-desoxycytidin (76)**

M = 720,79  
C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>

Nukleosid **74** (750 mg, 0,99 mmol, 1 eq.) wird unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (4,5 mL) gelöst. Eine Lösung von NPE-Amin **75** (415 mg, 2,5 mmol, 2,5 eq.) in wasserfreiem DMF (4,5 mL) wurde mit einer Spritze hinzugefügt und der Kolben und die Spritze nochmal mit DMF (3 mL)

nachgespült. Die Reaktionslösung wurde für 45 Minuten auf 90°C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Anschließend wurde das DMF im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit 5 %iger Zitronensäurelösung, Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat mit 1 % Triethylamin). Man erhielt das Produkt **76** in Form eines blaßgelben Schaumes (453 mg, 0,63 mmol, 62 %).

$R_f$  (Ethylacetat mit 1 % Triethylamin) = 0,17

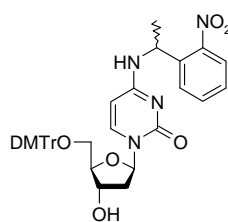
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,49 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,6 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>); 2,02 (s, 3H, OAc); 2,13-2,34 (m, 2H, 2 x H-2'); 3,19-3,32 (m, 2H, 2 x H-5'); 3,75 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>); 4,03-4,06 (m, 1H, CH); 5,17-5,23 (m, 1H, CH); 5,49-5,53 (m, 1H, CH), 5,69 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 7,7 Hz, 1H, arom. H); 6,06-6,13 (m, 1H, H-1'); 6,87-7,38 (13H, arom. H); 7,47-7,76 (m, 4H, arom. H); 7,93 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 7,9 Hz, 1H, arom. H); 8,39-8,42 (m, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 21,17; 22,22; 22,25; 29,42; 45,43; 45,53; 55,49; 63,80; 74,51; 74,56; 83,19; 83,24; 85,16; 85,44; 86,39; 95,00; 113,68; 124,62; 127,23; 127,86; 127,92; 128,07; 128,32; 128,54; 130,13; 134,20; 135,59; 135,61; 135,71; 140,05; 140,33; 145,00; 145,04; 148,55; 154,79; 158,58; 162,75; 162,79; 170,37 ppm.

**MS** (FAB):  $m/z$  berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 721,3; gefunden 721,2.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> (%) C 66,66; H 5,59; N 7,77; gefunden C 66,65; H 6,11; N 7,11.

### 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-4-N-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]-2'-desoxycytidin (**77**)



M = 678,75  
C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>

Verbindung **76** (427 mg, 592  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde in einer Lösung von 33 % Methylamin in Ethanol (5 mL) gelöst. Die Lösung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC (Dichlormethan / Methanol 96:4 mit 1 % Triethylamin) zeigte, daß die Ausgangsverbindung komplett umgesetzt wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 96:4 mit 1 % Triethylamin). Man erhält einen blaßgelben Schaum (402 mg, vollständige Umsetzung).

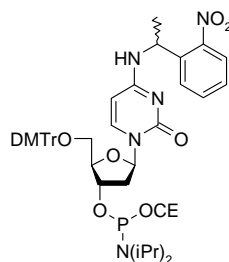
$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 96:4 mit 1 % Triethylamin) = 0,16

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,49 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,8 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>); 1,92-2,20 (m, 2H, 2 x H-2'); 3,16-3,21 (m, 2H, 2 x H-5'); 3,75 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>); 3,83-3,87 (m, 1H, CH); 4,18-4,27 (m, 1H, CH); 5,25-5,28 (m, 1H, CH/OH); 5,48-5,53 (m, 1H, CH/OH); 5,64-5,67 (m, 1H, CH/OH); 6,04-6,11 (m, 1H, H-1'); 6,87-7,39 (13H, arom, H); 7,46-7,76 (4H, arom, H); 7,91-7,95 (m, 1H, arom, H); 8,34-8,36 (m, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11,51; 21,86; 22,46; 25,45; 45,09; 45,70; 55,06; 63,36; 69,84; 70,03; 84,63; 84,80; 85,19; 85,76; 94,21; 113,21; 124,16; 126,75; 127,43; 127,68; 127,87; 128,07; 129,74; 133,73; 135,30; 135,43; 139,76; 140,06; 144,73; 148,13; 154,45; 158,12; 162,35; 169,48 ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 679,2768; gefunden 679,2756.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-4-N-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]-2'-desoxycytidin-3'-(cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit) (78)**



M = 878,97  
C<sub>47</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P

Verbindung **77** (129 mg, 190  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (4 mL) gelöst. *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (146  $\mu\text{L}$ , 855  $\mu\text{mol}$ , 4,5 eq.) wurde hinzugegeben und die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit einer Spritze Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (85  $\mu\text{L}$ , 380  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) hinzugegeben. Die Mischung wurde 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt bis mittels DC (Cyclohexan / Aceton 1:1 mit 1 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin) kein Startmaterial mehr nachgewiesen werden konnte. Die Lösung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 2:1 mit 1 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin). Man erhält das Produkt **78** als farblosen Schaum (115 mg, 130  $\mu\text{mol}$ , 68 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 1:1 mit 1 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin) = 0,38

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0,95-1,13 (m, 12H, *i*Pr-CH<sub>3</sub>); 1,48 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,8 Hz, 3H, NPE-CH<sub>3</sub>); 2,06-2,37 (m, 2H, 2 x H-2'); 2,61-2,77 (m, 2H, Cyanoethyl-CH<sub>2</sub>); 3,19-3,26 (m, 2H, 2 x H-5');

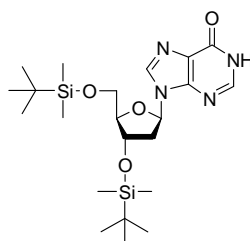
3,44-3,71 (m, 4H, 2 x *iPr-CH* und Cyanoethyl-*CH*<sub>2</sub>); 3,75 (s, 6H, 2 x OMe); 3,93-4,03 (m, 1H, *H-4'*); 4,42-4,51 (m, 1H, *H-3'*); 5,47-5,52 (m, 1H, NPE-*CH*); 5,65-5,70 (m, 1H, *H5* oder *H6*); 6,02-6,13 (m, 1H, *H-1'*); 6,86-6,92 (m, 4H, DMTr arom. *H*); 7,22-7,39 (m, 9H, DMTr arom. *H*); 7,47-7,53 (m, 1H, NPE arom. *H*); 7,59-7,75 (m, 3H, NPE arom. *H* und *H5* oder *H6*); 7,91-7,94 (m, 1H, NPE arom. *H*); 8,36-8,40 (m, 1H, *NH*) ppm.

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 147,24; 147,27; 147,62 ppm.

### 3.2.3 Synthese des NPE-geschützten Desoxyadenosinderivats

Die Synthese des photoaktivierbaren Desoxyadenosinderivats wurde analog einer Synthese von Silverman et al.<sup>[42,194]</sup> durchgeführt.

#### 3',5'-*O,O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyinosin (**80**)



M = 480,76  
C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>

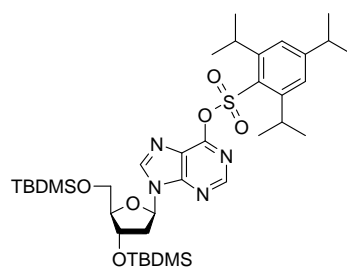
Verbindung **80** wurde nach einer Literaturvorschrift hergestellt:<sup>[196]</sup> 2'-Desoxyinosin (5 g, 19,8 mmol, 1 eq.), Imidazol (9,43 g, 138 mmol, 7 eq.) und *tert*Butyldimethylsilylchlorid (13,1 g, 79,3 mmol, 4 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (12 mL) gelöst. Die entstandene Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Ethanol (15 mL) hinzugefügt, und die Mischung weitere 15 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan gelöst und nacheinander mit Salzsäure (1 M), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurden die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt **80** als farblosen Feststoff (9,53 g, vollständige Umsetzung). Es wurde unaufgereinigt weiterverwendet.

**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan / Methanol 9:1) = 0,68

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,01; 0,03; 0,11 (12 H, 4 SiCH<sub>3</sub>); 0,85; 0,89 (18H, 2 SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,30-2,36 (m, 1H, *H-2'*); 2,75-2,82 (m, 1H, *H-2'*); 3,64-3,68 (m, 1H, *H-5'*); 3,74-3,78 (m, 1H, *H-5'*);

3,83-3,87 (m, 1H, *H*-3' oder *H*-4'); 4,57-4,60 (m, 1H, *H*-3' oder *H*-4'); 6,27-6,32 (m, 1H, *H*-1'); 8,04 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 12,36 (s, 1H, *NH*) ppm.

**3',5'-*O,O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-6-*O*-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-2'-desoxyinosin (81)**

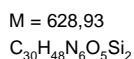
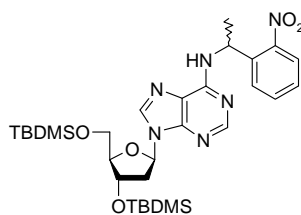


M = 747,17  
C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>SSi

Verbindung **81** wurde nach einer Literaturvorschrift hergestellt:<sup>[196]</sup> Verbindung **80** (9,45 g, 19,7 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (241 mg, 1,97 mmol, 0,1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in trockenem Dichlormethan (135 mL) gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0°C abgekühlt und *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (16,9 mL, 98,5 mmol, 5 eq.) wurde hinzugefügt, gefolgt von 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (10,7 g, 35,5 mmol, 1,8 eq.). Die Reaktionsmischung wurde 10 Minuten bei 0°C gerührt, dann wurde das Eisbad entfernt und die Lösung noch weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC (Cyclohexan / Ethylacetat 8:2) zeigte, daß die Reaktion vollständig abgelaufen war. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 93:7 → 9:1). Man erhält das 6-*O*-sulfonylierte Isomer **81** als blaßgelben Schaum (7,45 g, 9,97 mmol, 48 %) neben dem 1-*N*-sulfonylierten Isomer (6,35 g, 8,50 mmol, 40 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 9:1) = 0,31; 1-*N*-sulfonyliertes Isomer  $R_f$  = 0,15

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,06-0,12 (m, 12H, 4 x SiCH<sub>3</sub>); 0,88-0,92 (m, 18H, 2 x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,42-2,50 (m, 1H); 2,59-2,67 (m, 1H); 2,87-2,98 (m, 1H); 3,74-3,89 (m, 2H, 2 x *H*-5'); 4,01-4,05 (m, 1H); 4,19-4,40 (m, 2H, *iPr-CH*); 4,59-4,63 (m, 1H); 6,47-6,51 (m, 1H, *H*-1'); 7,21 (s, 2H); 7,22 (s, 1H); 8,38 (s, 1H); 8,56 (s, 1H) ppm.

**3',5'-O,O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-6-*N*-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxyadenosin (82)**

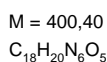
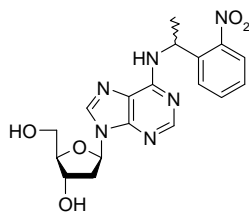
Verbindung **81** (7,35 g, 9,84 mmol, 1 eq.), 1-(2-nitrophenyl)ethylamin (**75**) (3,27 g, 19,7 mmol, 2 eq.) und *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (3,37 mL, 19,7 mmol, 2 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (60 mL) gelöst. Die Lösung wurde für 24 h auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 8:2). Man erhielt das Produkt **82** in Form eines hellgelben Schaums (4,78 g, 7,41 mmol, 74 %).

**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan / Ethylacetat 8:2) = 0,06

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 0,03-0,10 (m, 12H, 4 x SiCH<sub>3</sub>); 0,80-0,88 (m, 18H, 2 x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,63-1,65 (m, 3H, NPE-CH<sub>3</sub>); 2,21-2,30 (m, 1H, *H*-2'); 2,83-2,90 (m, 1H, *H*-2'); 3,60-3,65 (m, 1H, *H*-5'); 3,76-3,83 (m, 2H, *H*-4' + *H*-5'); 4,57-4,62 (m, 1H, *H*-3'); 5,71-5,78 (m, 1H, NPE-CH); 6,25-6,32 (m, 1H, *H*-1'); 7,39-7,43 (m, 1H, NPE arom. *H*); 7,64 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, 1H, NPE arom. *H*); 7,84 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,8 Hz, 2H, NPE arom. *H*); 8,01 (s, 1H); 8,33 (s, 1H); 8,59-8,65 (m, 1H, *NH*) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = -5,54; -4,96; -4,77; 17,72; 17,96; 21,35; 22,89; 25,69; 25,74; 26,35; 29,63; 44,66; 62,34; 62,51; 71,83; 72,02; 83,27; 83,39; 86,90; 87,02; 119,57; 123,56; 127,76; 127,94; 133,48; 139,50; 139,65; 140,45; 148,59; 148,85; 152,10; 153,27 ppm.

**HR-MS** (MALDI): *m/z* berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O<sub>5</sub>N<sub>6</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 629,32975; gefunden 629,33003.

**6-*N*-(1-(2-Nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxyadenosin (83)**

Nukleosidderivat **82** (4,68 g, 7,26 mmol, 1 eq.) wurde in THF (120 mL) gelöst. Es wurde eine Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1 M in THF) (14,5 mL, 14,5 mmol, 2 eq.) hinzugefügt. Die



Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC (Dichlormethan / Methanol 95:5) zeigte, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 97:3 → 95:5 → 93:7). Man erhielt einen blaßgelben Schaum (2,91g, vollständige Umsetzung).

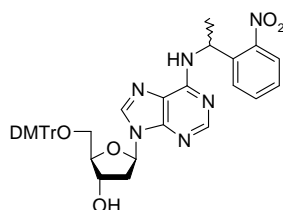
$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 95:5) = 0,05

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,79 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, 3H, NPE- $\text{CH}_3$ ); 2,27-2,32 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,81-2,88 (m, 1H,  $H-2'$ ); 3,62-3,68 (m, 1H,  $H-5'$ ); 3,73-3,78 (m, 1H,  $H-5'$ ); 4,04-4,06 (m, 1H,  $H-4'$ ); 4,42-4,44 (m, 1H,  $3'-\text{OH}$ ); 4,58-4,61 (m, 1H,  $H-3'$ ); 5,38-5,44 (m, 1H,  $5'-\text{OH}$ ); 5,89-5,97 (m, 1H, NPE- $\text{CH}$ ); 6,37-6,41 (m, 1H,  $H-1'$ ); 7,41-7,46 (m, 1H, NPE arom.  $H$ ); 7,61-7,65 (m, 2H, NPE arom.  $H + \text{NH}$ ); 7,87-7,93 (m, 2H, NPE arom.  $H$ ); 8,06 (s, 1H); 8,16-8,21 (m, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  = 20,58; 22,00; 41,21; 46,40; 54,97; 63,70; 73,19; 87,26; 90,14; 124,68; 128,62; 134,11; 141,13; 150,40; 152,72; 172,53 ppm.

**HR-MS** (MALDI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  401,15679; gefunden 401,15727.

#### 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-*N*-(1-(2-Nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxyadenosin (**84**)



$M = 702,77$   
 $\text{C}_{39}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_7$

Verbindung **83** (2,81 g, 7,02 mmol, 1 eq.) wurde mit Pyridin (200 mL) koevaporiert und in Pyridin (250 mL) gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0°C abgekühlt und unter Argonatmosphäre wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (2,85 g, 8,42 mmol, 1,2 eq.) hinzugefügt. Das Eisbad wurde entfernt und die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC (Dichlormethan / Methanol 99:1 mit 0,5 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin) zeigte, dass das Ausgangsmaterial vollständig aufgebraucht war. Methanol (60 mL) wurde hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase nacheinander mit wässriger Zitronensäurelösung (5 %), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan /

Methanol 99:1 98:2 97:3). Zum Packen der Säule wurde dem Laufmittel 0,5 % Triethylamin hinzugefügt. Man erhielt das Produkt **84** in Form eines blaßgelben Schaums (4,47 g, 6,37 mmol, 75 %).

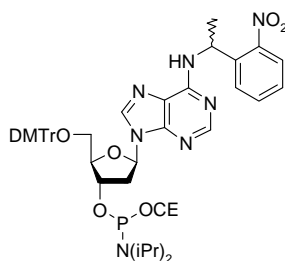
$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 99:1 mit 0,5 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin) = 0,13

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,78 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, 3H, NPE- $\text{CH}_3$ ); 2,39-2,45 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,88-3,00 (m, 1H,  $H-2'$ ); 3,29-3,35 (m, 2H, 2 x  $H-5'$ ); 3,76, 3,77 (2s, 6H, 2 x OMe); 4,10-4,14 (m, 1H,  $H-4'$ ); 4,51-4,53 (m, 1H,  $3'-\text{OH}$ ); 4,65-4,71 (m, 1H,  $H-3'$ ); 5,87-5,97 (m, 1H, NPE- $\text{CH}$ ); 6,39-6,43 (m, 1H,  $H-1'$ ); 6,78-6,83 (m, 4H, DMTr arom.  $H$ ); 7,16-7,25 (m, 3H, DMTr arom.  $H$ ); 7,28-7,31 (m, 4H, DMTr arom.  $H$ ); 7,40-7,45 (m, 3H, DMTr arom.  $H$  + NPE arom.  $H$ ); 7,47-7,50 (m, 1H,  $\text{NH}$ ); 7,58-7,63 (m, 1H, NPE arom.  $H$ ); 7,86-7,93 (m, 2H, NPE arom.  $H$ ); 8,00-8,02 (m, 1H); 8,08-8,15 (m, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  = 40,22; 40,44; 54,96; 55,49; 65,05; 72,62; 85,10; 86,91; 87,39; 113,82; 124,64; 127,45; 128,50; 128,69; 128,95; 130,84; 130,97; 134,13; 136,73; 136,86; 136,99; 140,17; 146,13; 150,39; 153,20; 159,56 ppm.

**HR-MS** (MALDI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{N}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  703.28747; gefunden 703.28746.

**5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-*N*-(1-(2-Nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxyadenosin-3'-(cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit) (**85**)**



$M = 903,0$   
 $\text{C}_{48}\text{H}_{55}\text{N}_8\text{O}_8\text{P}$

Verbindung **84** (150 mg, 213  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan gelöst (6 mL). *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (182  $\mu\text{L}$ , 1,07 mmol, 5 eq.) wurde hinzugefügt und die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit einer Spritze Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (95  $\mu\text{L}$ , 426  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) hinzugegeben. Die Mischung wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt bis mittels DC (Cyclohexan / Aceton 1:1 mit 1 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin) kein Ausgangsmaterial mehr nachgewiesen werden konnte. Die Lösung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 2:1 mit). Zum Packen der Säule wurde dem

Laufmittel 0,5 % Triethylamin zugesetzt. Man erhielt das Produkt **85** als farblosen Schaum (155 mg, 172  $\mu\text{mol}$ , 80 %).

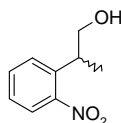
$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 2:1 mit 0,5 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin) = 0,38

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 1,01-1,13 (m, 12H, 2 x *iPr-CH*<sub>3</sub>); 1,64 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, 3H, NPE-*CH*<sub>3</sub>); 2,39-2,48 (m, 1H, *H-2'*); 2,66 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,1$  Hz, 1H, Cyanoethyl-*CH*<sub>2</sub>); 2,75 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,1$  Hz, 1H, Cyanoethyl-*CH*<sub>2</sub>); 2,96-3,07 (m, 1H, *H-2'*); 3,14-3,26 (m, 2H, 2 x *H-5'*); 3,48-3,59 (m, 2H, 2 x *iPr-CH*); 3,62-3,75 (m, 8H, 2 x OMe + Cyanoethyl-*CH*<sub>2</sub>); 4,05-4,13 (m, 1H, *H-4'*); 4,70-4,82 (m, 1H, *H-3'*); 5,72-5,79 (m, 1H, NPE-*CH*); 6,25-6,38 (m, 1H, *H-1'*); 6,75-6,81 (m, 4H, DMTr arom. *H*); 7,15-7,21 (m, 7H, DMTr arom. *H*); 7,27-7,33 (m, 2H; DMTr arom. *H*); 7,38-7,44 (m, 1H, NPE arom. *H*); 7,60-7,65 (m, 1H, NPE arom. *H*); 7,83-7,87 (m, 2H, NPE arom. *H*); 7,91-7,96 (m, 1H); 8,29-8,33 (m, 1H); 8,57-8,66 (m, 1H, *NH*) ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 147,03; 147,61 ppm.

### 3.2.4 Synthese von NPP-Alkohol

#### 2-(2-Nitrophenyl)propanol (**116**)



$M = 181,19$   
 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$

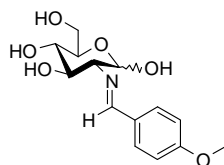
2-(2-Nitrophenyl)propanol **116** wurde nach einer Literaturvorschrift<sup>[197]</sup> hergestellt: 2-Ethylnitrobenzol (81 mL, 604 mmol, 2,5 eq.) und Paraformaldehyd (7,4 g, 246 mmol, 1 eq.) wurden zusammen mit Triton B (Benzyltrimethylammoniumhydroxid, 40 % in Methanol; 7,2 mL, 16,4 mmol, 0,067 eq.) in DMSO (80 mL) gelöst und für 5 Stunden bei 90°C refluxiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung destilliert. Man erhielt das gewünschte Produkt in Form eines gelben Öls (1 mbar, 115°C; 34,9 g, 192 mmol, 78 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 19:1) = 0,41

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2,07 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,8$  Hz, 3H, *CH*<sub>3</sub>); 5,80 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 6,8$  Hz, 1H, *CH*); 7,43 (m, 1H, arom. *H*); 7,63 (m, 1H, arom. *H*); 7,82 (dd,  $^3J_{\text{HH1}} = 8,2$  Hz,  $^3J_{\text{HH2}} = 1,3$  Hz, 1H, arom. *H*); 7,88 (dd,  $^3J_{\text{HH1}} = 8,0$  Hz,  $^3J_{\text{HH2}} = 1,3$  Hz, 1H, arom. *H*) ppm.

### 3.2.5 Synthese der NPP-geschützten Glucosamin-6-phosphat-Derivate

#### 2-*N*-(4-Methoxybenzyliden)-*D*-glucosamin (**108**)

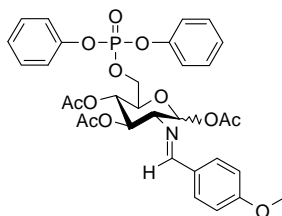


M = 297,31  
C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>

Verbindung **108** wurde nach einer Literaturvorschrift<sup>[162]</sup> synthetisiert: D-(+)-Glucosaminhydrochlorid (10,0 g, 46,4 mmol, 1 eq.) wurde in wässriger Natronlauge (1 M; 47,0 mL) gelöst. Anisaldehyd (5,72 mL, 47,0 mmol, 1 eq.) wurde hinzugegeben und die Mischung wurde geschüttelt, bis ein weißer Niederschlag ausfiel. Anschließend wurde die Mischung für eine Stunde in einen Gefrierschrank (-20°C) gestellt. Der Kolbeninhalt ist dabei zu einem dicken, weißen Schlamm erstarrt. Die Mischung wurde mit Wasser verdünnt, der Niederschlag abgesaugt und nacheinander mit eiskaltem Wasser und eiskaltem Diethylether / Ethanol (1:1) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man das Produkt als weißen, kristallinen Feststoff (11,7 g, 39,3 mmol, 85 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 2,77-2,81 (m, 1H); 3,11-3,17 (m, 1H); 3,21-3,26 (m, 1H); 3,39-3,51 (m, 2H); 3,70-3,75 (m, 1H); 3,80 (s, 3H, OMe); 4,53 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,8 Hz, 1H); 4,69 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,3 Hz, 1H); 4,79 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,7 Hz, 1H); 4,90 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,4 Hz, 1H); 6,51 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, 1H, *H*-1'); 6,99 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H, arom. *H*); 7,68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 2H, arom. *H*); 8,11 (s, 1H, MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CHN) ppm.

#### Glucosamin-6-phosphat-Derivat (**109**)



M = 655,60  
C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>12</sub>P

Die Synthese von Verbindung **109** wurde nach einer Literaturvorschrift<sup>[161]</sup> hergestellt: 2-*N*-(4-Methoxybenzyliden)-*D*-glucosamin (**108**) (6,70 g, 22,5 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin gelöst (150 mL). Die Lösung wurde mit Hilfe eines Kryostaten auf -20°C abgekühlt und Phosphorsäurediphenylesterchlorid (5,83 mL, 28,2 mmol, 1,25 eq.) wurde mit einer

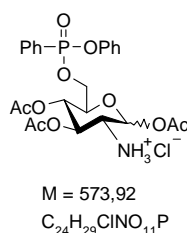
Meßpipette vorsichtig hinzutropft. Dabei beschlug der Reaktionskolben von innen. Die Mischung wurde 15 Stunden bei  $-5^{\circ}\text{C}$  gerührt. Die Lösung wurde währenddessen klar und gelblich. Es wurde Essigsäureanhydrid (13,1 mL, 140 mmol, 6,2 eq.) hinzugefügt und die Mischung wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in zwei Hälften geteilt in eiskaltes Wasser (jeweils 1 L) gegossen. Dabei fiel ein weißlicher Niederschlag aus. Die Mischung wurde über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abgesaugt und nacheinander mit eiskaltem Wasser (100 mL) und eiskaltem Ethanol (25 mL) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt das Produkt als weißen Feststoff (6,17 g, 9,41 mmol, 41 %).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1,82$  (s, 3H, OAc); 1,96-1,98 (m, 6H, 2 x OAc); 3,79 (s, 3H, OMe); 4,31-4,39 (m, 4H); 4,99-5,04 (m, 1H); 5,44-5,49 (m, 1H); 6,11-6,13 (m, 1H,  $H-1'$ ); 6,98-7,01 (m, 2H, arom.  $H$ ); 7,21-7,29 (m, 6H, arom.  $H$ ); 7,40-7,45 (m, 4H, arom.  $H$ ); 7,65-7,67 (m, 2H, arom.  $H$ ); 8,28 (s, 1H,  $NH$ ) ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = -10,7$  ppm.

**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{NO}_{12}\text{P}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  656,2; gefunden 656,2.

### Glucosamin-6-phosphat-Derivat 110

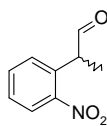


Die Synthese wurde entsprechend einer Literaturvorschrift<sup>[161]</sup> durchgeführt: Verbindung **109** (3,08 g, 4,70 mmol, 1 eq.) wurde in Aceton (50 mL) gelöst und die Lösung wurde unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. In der Siedehitze wurde Salzsäure (4 M; 1,5 mL, 1,3 eq.) hinzugegeben, die Mischung wurde noch 1 Minute refluxiert und dann auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Dabei fiel ein weißer Niederschlag aus. Die Mischung wurde auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, der Niederschlag wurde abgesaugt und mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum erhielt man das Produkt als weißen Feststoff (2,13 g, 3,71 mmol, 84 %).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1,97$  (s, 3H, OAc); 2,03 (s, 3H, OAc); 2,15 (s, 3H, OAc); 3,53-3,58 (m, 1H); 4,13-4,18 (m, 1H); 4,26-4,32 (m, 1H); 4,34-4,39 (m, 1H); 4,95-5,00 (m, 1H); 5,35-5,40 (m, 1H); 5,94-5,97 (m, 1H,  $H-1'$ ); 7,19-7,28 (m, 6H, arom.  $H$ ); 7,39-7,44 (m, 4H, arom.  $H$ ); 8,74 (bs, 1H,  $NH$ ) ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = -10,7$  ppm.

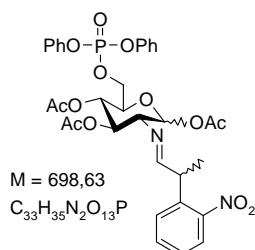
**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NNaO}_{11}\text{P}$   $[\text{M}-\text{HCl}+\text{Na}]^+$  560,1; gefunden 560,2.

**2-(2-Nitrophenyl)-propanal (123)**

M = 179,18  
C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>

Die Oxidation wurde nach einer abgewandelten Literaturvorschrift<sup>[198]</sup> durchgeführt. Oxalylchlorid (2,31 g, 18,2 mmol, 1,1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in Dichlormethan gelöst und die Lösung wurde auf -70°C abgekühlt. Eine Lösung von DMSO (2,82 mL, 39,7 mmol, 2,4 eq.) in Dichlormethan (5 mL) wurde langsam (innerhalb von 5 Minuten) hinzugegeben. Dabei fand eine Gasentwicklung statt. Nach 10 Minuten wurde eine Lösung von 2-(2-Nitrophenyl)-propanol (**116**) (3 g, 16,6 mmol, 1 eq.) in Dichlormethan (10 mL) über einen Zeitraum von 5 Minuten hinzugegeben. Die Lösung wurde 15 Minuten gerührt, dann wurde Triethylamin (11,5 mL, 82,8 mmol, 5 eq.) hinzugefügt. Die Lösung wurde noch 5 Minuten bei -70°C gerührt, dann eine Stunde bei Raumtemperatur. Es fiel ein dicker, gelboranger Niederschlag aus. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser (50 mL) gewaschen, die wässrige Phase mit Dichlormethan (50 mL) reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit gesättigter Kochsalzlösung, verdünnter Schwefelsäure (1 %), Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das Rohprodukt als gelbe, viskose Flüssigkeit (2,29 g, 12,8 mmol, 77 %). Das Produkt ist laut NMR-Spektrum noch mit der Ausgangsverbindung **116** verunreinigt. Es wird ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,53 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,27 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, 1H, CH); 7,30-7,33 (m, 1H, arom. H); 7,45-7,49 (m, 1H, arom. H); 7,61-7,66 (m, 1H, arom. H); 7,98-8,01 (m, 1H, arom. H); 9,77 (s, 1H, CHO) ppm.

**Glucosamin-6-phosphat-Derivat 124**

Glucosamin-6-phosphat-Derivat **110** (675 mg, 1,18 mmol, 1 eq.) und NPP-Aldehyd **123** (211 mg, 1,18 mmol, 1 eq.) wurden in Dichlormethan (50 mL) gelöst. *N,N*-Diisopropylethylamin (201 µL, 1,18 mmol, 1 eq.) und trockenes Magnesiumsulfat (226 mg, 1,88 mmol, 1,6 eq.) wurden hinzugefügt.

Die Mischung wurde 24 Stunden refluxiert. Anschließend wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel aus dem Filtrat am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 6:4 → 55:45 mit jeweils 1 % Triethylamin) und man erhielt das Produkt in Form einer zähen orangen Paste (490 mg, 701  $\mu\text{mol}$ , 59 %).

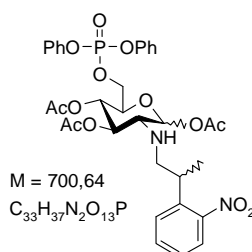
$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1 mit 1 % Triethylamin) = 0,34

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1,37$  (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,84-2,01 (9H, 3 x OAc); 3,21-3,30 (m, 1H); 4,05-4,20 (m, 1H); 4,25-4,37 (m, 3H); 4,89-4,94 (m, 1H); 5,31-5,42 (m, 1H); 5,96-6,01 (m, 1H); 7,18-7,28 (m, 6H, arom.  $H$ ); 7,38-7,43 (m, 5H, arom.  $H$  und  $\text{CHN}$ ); 7,49-7,53 (m, 1H, NPP-arom. $H$ ); 7,68-7,72 (m, 1H, NPP-arom. $H$ ); 7,83-7,88 (m, 1H, NPP-arom. $H$ ); 7,90-7,93 (m, 1H, NPP-arom. $H$ ) ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = -10,7$  ppm.

**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{NaO}_{13}\text{P}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  721,2; gefunden 721,2.

### Glucosamin-6-phosphat-Derivat 118



Glucosamin-6-phosphat-Derivat **124** (100 mg, 143  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde in einer Mischung aus Acetonitril (3 mL) und DMSO (1,5 mL) gelöst. Natriumcyanoborhydrid (54,0 mg, 858  $\mu\text{mol}$ , 6 eq.) wurde hinzugefügt und die Mischung wurde mit Essigsäure auf  $\text{pH} = 6$  gebracht. Die Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigt, dass das Ausgangsmaterial vollständig umgesetzt wurde. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknen im Hochvakuum erhielt man das Produkt als oranges Öl (93 mg, 133  $\mu\text{mol}$ , 93 %).

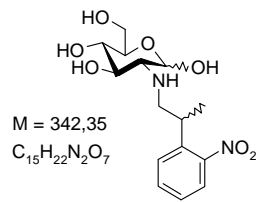
$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1 mit 1 % Triethylamin) = 0,33

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1,16$ -1,19 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,87-2,03 (9H, 3 x OAc); 2,56-2,88 (m, 3H); 2,99-3,08 (m, 1H); 4,00-4,06 (m, 1H); 4,18-4,33 (m, 3H); 4,78-4,84 (m, 1H); 5,07-5,14 (m, 1H); 5,65-5,69 (m, 1H,  $\text{H-1}'$ ); 7,13-7,27 (m, 6H, arom. $H$ ); 7,38-7,45 (m, 5H, arom. $H$ ); 7,49-7,53 (m, 1H, arom.  $H$ ); 7,61-7,66 (m, 1H, arom.  $H$ ); 7,75-7,78 (m, 1H, arom.  $H$ ) ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = -10,7$  ppm.

**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{NaO}_{13}\text{P}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  723,2; gefunden 723,2.

## Glucosamin-Derivat 127



Glucosaminhydrochlorid (1 g, 4,64 mmol, 1 eq.) wurde in Natronlauge (1M; 4,64 mL, 4,64 mmol, 1 eq.) gelöst und mit NPP-Aldehyd **123** (831 mg, 4,64 mmol, 1 eq.) versetzt. Die Mischung wurde über einen Zeitraum von 3,5 Stunden immer wieder kräftig geschüttelt. Dabei färbte sich die Reaktionsmischung mit der Zeit dunkelrot und es konnten zwei Phasen unterschieden werden. Dann wurde die Reaktionsmischung mit Methanol verdünnt. Dadurch bildete sich eine homogene Lösung. Die Lösung wurde mit Essigsäure (200 µL) versetzt und es wurde Natriumcyanoborhydrid (292 mg, 4,64 mmol, 1 eq.) hinzugegeben. Die Mischung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Ethylacetat und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung verteilt und nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wäßrige Phase noch weitere 4 mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Chloroform / Methanol 85:15 mit 1 % Triethylamin) erhielt man das Produkt als blaßgelben Schaum (488 mg, 1,43 mmol, 30 %).

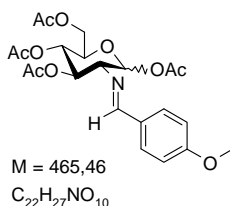
**R<sub>f</sub>** (Chloroform / Methanol 8:2) = 0,33

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Da die Verbindung als Gemisch der beiden anomeren Formen vorliegt, ist die Aufspaltung der 1H-Signale sehr komplex und das Integral muss teilweise als Dezimalbruch angegeben werden. δ = 1,16-1,20 (m, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,01-2,23 (m, 1H); 2,72-3,62 (m, 9H); 4,18-4,26 (m, 0,45H, H-1'); 4,95-4,97 (m, 0,55H, H-1'); 7,37-7,42 (m, 1H, arom. H); 7,51-7,57 (m, 1H, arom. H); 7,59-7,64 (m, 1H, arom. H); 7,70-7,73 (m, 1H, arom. H) ppm.

**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 343,2; gefunden 343,2.



## Glucosamin-Derivat 128

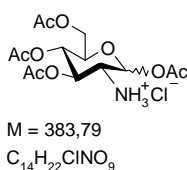


Die Synthese erfolgte entsprechend einer Literaturvorschrift<sup>[162]</sup>: Verbindung **108** (5 g, 16,8 mmol, 1 eq.) und Essigsäureanhydrid (12,6 mL, 135 mmol, 8 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin (50 mL) suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 1,4 L Eiswasser geschüttet, dabei fiel sofort ein weißer Niederschlag aus. Die Mischung wurde gerührt, bis das Eis gerade geschmolzen war. Dann wurde der Niederschlag abgesaugt, nacheinander mit eiskaltem Wasser und wenig eiskaltem Ethanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt das Produkt als weißen, kristallinen Feststoff (6,97 g, 15,0 mmol, 89 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,82 (s, 3H, OAc); 1,98-1,99 (6H, 2 x OAc); 2,02 (s, 3H, OAc); 3,42-3,46 (m, 1H); 3,80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,99-4,03 (m, 1H); 4,20-4,28 (m, 2H); 4,94-4,99 (m, 1H); 5,42-5,47 (m, 1H); 6,05-6,08 (m, 1H); 6,98-7,00 (m, 2H, arom. H); 7,64-7,67 (m, 2H, arom. H); 8,28 (s, 1H, CHN) ppm.

MS (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup> 466,2; gefunden 466,2.

## Glucosamin-Derivat 129

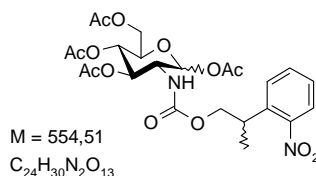


Die Synthese wurde nach Literaturangaben<sup>[162]</sup> durchgeführt: Verbindung **128** (6,97 g, 15,0 mmol, 1 eq.) wurde in Aceton (60 mL) gelöst und zum Refluxieren erhitzt. In der Siedehitze wurde Salzsäure (5 M; 4,75 mL, 19,0 mmol, 1,27 eq.) hinzugefügt. Der Kolbeninhalt erstarrte sofort. Es wurde noch 1 Minute weiter erhitzt, dann auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Der Kolbeninhalt wurde mit Aceton verdünnt und abgesaugt. Der Filtrerrückstand wurde in der Glasfilterfritte mehrfach mit eiskaltem Aceton aufgeschlämmt und wieder abgesaugt. Der Filtrerrückstand wurde anschließend im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt das Produkt als weißen Feststoff (5,09 g, 13,3 mmol, 88 %).

Laut NMR-Spektrum enthält das Produkt noch eine geringe Menge Anisaldehyd. Es wird unaufgereinigt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,97 (s, 3H, OAc); 2,00 (s, 3H, OAc); 2,03 (s, 3H, OAc); 2,17 (s, 3H, OAc); 3,55-3,60 (m, 1H); 3,98-4,01 (m, 1H); 4,03-4,07 (m, 1H); 4,17-4,21 (m, 1H); 4,91-4,96 (m, 1H); 5,33-5,38 (m, 1H); 5,90 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, 1H, H-1'); 8,78 (bs, NH) ppm.

### Glucosaminderivat 135



*N,N*-Dimethylaminopyridin (16 mg, 130 μmol, 0,1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in einer Mischung aus wasserfreiem Dichlormethan (5 mL) und wasserfreiem Pyridin (5 mL) gelöst. Dieser Mischung wurde Phosgen-Lösung (20 % in Toluol; 1,026 mL, 1,95 mmol, 1,5 eq.). Dabei entstand weißer Nebel und ein gelber Niederschlag. Glucosamin-Derivat **129** (500 mg, 1,3 mmol, 1 eq.) wurde in wasserfreiem Dichlormethan (8 mL), das mit Triethylamin (180 μL, 1,3 mmol, 1 eq.) versetzt wurde, gelöst. Über einen Zeitraum von 15 Minuten wurde diese Lösung langsam der Phosgenlösung hinzugefügt. Dann wurde die Reaktionsmischung weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von NPP-Alkohol **116** (707 mg, 3,9 mmol, 3 eq.) in wasserfreiem Dichlormethan (4 mL) zugegeben, gefolgt von Triethylamin (721 μL, 5,2 mmol, 4 eq.). Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte, dass die Ausgangsverbindung **129** fast vollständig umgesetzt wurde. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit Citronensäurelösung (10 % in Wasser) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 7:3 → 6:4 → 1:1). Man erhält das Produkt in Form eines blaßgelben, festen Schaums (571 mg, 1,03 mmol, 79 %).

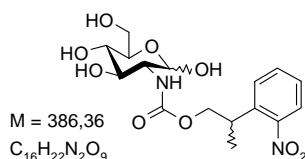
**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1) = 0,36

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,6 Hz, 3H, NPP-Me); 1,90-2,05 (m, 12H, 4 x OAc); 3,32-3,44 (m, 1H, NPP-CH); 3,56-3,68 (m, 1H); 3,85-4,01 (m, 2H); 4,13-4,21 (m, 3H); 4,87 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,9 Hz, 1H); 5,13 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,4 Hz, 1H); 5,65 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, 1H); 7,24-7,31 (m, 1H); 7,45-7,51 (m, 1H, arom. H); 7,65-7,70 (m, 2H, arom. H); 7,80-7,85 (m, 1H, arom. H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 17,86; 20,25; 20,39; 20,48; 33,36; 54,06; 61,43; 67,50; 68,09; 71,50; 72,11; 72,41; 91,80; 123,74; 127,75; 128,40; 132,89; 136,73; 150,04; 155,68; 168,76; 169,23; 169,46; 170,00 ppm.

**HR-MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>13</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 577,1645; gefunden 577,1637.

## Glucosamin-Derivat 136



Verbindung **135** (1,86 g, 3,35 mmol, 1 eq.) wurde in einer Mischung aus THF (50 mL) und Methanol (50 mL) gelöst. Nachdem die Mischung im Eisbad auf 0°C abgekühlt worden war, wurde Natronlauge (2 M; 33,5 mL, 67,1 mmol, 20 eq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde 10 Minuten bei 0°C gerührt und dann mit Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung verdünnt und viermal mit einer Mischung aus Dichlormethan / Isopropanol 9:1 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 88:12) und man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (975 mg, 2,52 mmol, 75 %).

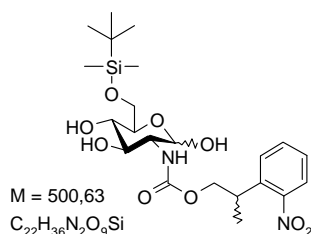
R<sub>f</sub> (Dichlormethan / Methanol 88:12) = 0,29

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,28 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 2,98-3,70 (m, 7H); 4,05-4,17 (m, 2H); 4,33-4,93 (m, 4H); 6,35-6,92 (m, 2H); 7,45-7,51 (m, 1H, arom. H); 7,65-7,73 (m, 2H, arom. H); 7,81-7,85 (m, 1H, arom. H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 18,07; 18,36; 33,31; 33,51; 48,62; 56,29; 58,67; 61,17; 67,14; 67,46; 70,22; 70,99; 72,05; 74,14; 76,77; 90,63; 95,45; 123,72; 127,73; 128,69; 132,95; 136,91; 150,04; 155,96 ppm.

HR-MS (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 409,1223; gefunden 409,1221.

## Glucosamin-Derivat 138



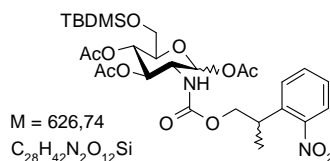
Die selektive Silylierung der primären OH-Gruppe wurde entsprechend abgewandelter Literaturangaben<sup>[169,170]</sup> durchgeführt: Eine Lösung von Verbindung **136** (975 mg, 2,52 mol, 1 eq.), 4-(Dimethylamino)-pyridin (15,4 mg, 126 μmol, 0,05 eq.) und Triethylamin (524 μL, 3,78 mmol, 1,5 eq.) in wasserfreiem DMF (10 mL) wurde unter Argonatmosphäre auf -15°C abgekühlt. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (458 mg, 2,77 mmol, 1,1 eq.) wurde hinzugefügt und die Lösung wurde bei

0°C gerührt. Nach 3,5 Stunden zeigte ein DC, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Das DMF wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde in einer Mischung von Dichlormethan / Isopropanol 9:1 aufgenommen. Die organische Lösung wurde mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, die wässrige Phase anschließend zweimal mit Dichlormethan / Isopropanol 9:1 reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 92:8) und man erhält das Produkt als viskose Flüssigkeit, die laut NMR-Spektrum immer noch etwas DMF enthält. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 88:12) = 0,86

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,08 (s, 6H, Me(TBDMS)); 0,89 (s, 9H, *t*-Bu(TBDMS)); 1,32-1,36 (m, 3H, NPP-Me); 3,29-5,22 (m, 10H); 7,34-7,39 (m, 1H, arom. *H*); 7,44-7,48 (m, 1H, arom. *H*); 7,55-7,59 (m, 1H, arom. *H*); 7,71-7,75 (m, 1H, arom. *H*) ppm.

### Glucosamin-Derivat 139



Verbindung **138** (angenommene 2,52 mmol aus der vorigen Vorschrift, 1 eq.), und 4-(Dimethylamino)-pyridin (15,4 mg, 126  $\mu\text{mol}$ , 0,05 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin (15 mL) gelöst und mit Essigsäureanhydrid (1,42 mL, 15,1 mmol, 6 eq.) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte, dass das Ausgangsmaterial vollständig reagiert hatte. Das Pyridin wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan / Ethylacetat 6:4) erhielt man das gewünschte Produkt als blaßgelben Schaum (1,26 g, 2,01 mmol, 79 % über zwei Stufen).

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1) = 0,71

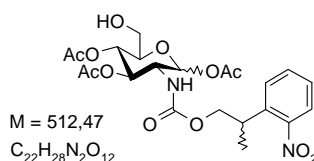
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,00-0,08 (m, 6H, Me(TBDMS)); 0,85-0,88 (m, 9H, *t*-Bu(TBDMS)); 1,30-1,33 (m, 3H, NPP-Me); 1,95-2,18 (m, 9H, 3x Ac); 3,63-3,83 (m, 4H); 3,99-4,33 (m, 3H); 4,54-4,73 (m, 1H); 5,04-5,22 (m, 2H); 5,62-6,19 (m, 1H); 7,34-7,74 (m, 4H, arom. *H*) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -5,30; 17,00; 17,14; 18,38; 20,82; 20,89; 21,07; 25,93; 33,21; 52,79; 52,95; 62,06; 68,37; 69,30; 69,47; 71,06; 71,13; 72,51; 75,47; 90,83; 124,07; 124,25; 127,58; 127,63; 127,90; 127,96; 132,69; 132,78; 136,94; 137,24; 151,01; 155,42; 168,95; 169,18; 171,39$  ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_{12}\text{Si}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  649,2404; gefunden 649,2400.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{Si}$  (%) C 53,7; H 6,75; N 4,5; gefunden C 53,75; H 6,9; N 4,4.

## Glucosamin-Derivat 140



Verbindung **139** (1,18 g, 1,88 mmol, 1 eq.) wurde in einer Mischung von THF (5 mL), Essigsäure (15 mL) und Wasser (5 mL) gelöst. Die Lösung wurde 90 Minuten bei 65°C gerührt. Ein DC zeigte, dass die Reaktion vollständig verlaufen war. Das THF wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde mit Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden jeweils zweimal mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 2:8) und man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (923 mg, 1,80 mmol, 95 %).

$R_f$  (Ethylacetat) = 0,67

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,31-1,33$  (m, 3H, NPP-Me); 1,97-2,21 (m, 9H, 3x Ac); 3,53-3,81 (m, 4H); 3,98-4,34 (m, 3H); 4,72-4,78 (m, 1H); 5,01-5,12 (m, 1H); 5,22-5,27 (m, 1H); 5,99-6,19 (m, 1H); 7,34-7,74 (m, 4H, arom. H) ppm.

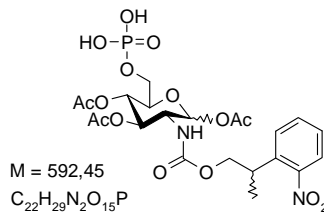
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14,33; 16,99; 17,10; 20,71; 20,76; 20,84; 20,97; 21,06; 21,18; 33,15; 52,82; 52,98; 60,53; 61,01; 61,09; 68,23; 68,27; 68,49; 69,37; 69,54; 70,27; 70,37; 72,00; 75,00; 90,81; 92,45; 124,04; 124,26; 127,59; 127,63; 127,88; 127,98; 132,74; 132,79; 136,88; 137,19; 155,31; 155,40; 169,08; 170,21; 170,26; 171,26; 171,30$  ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_{12}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  535,1540; gefunden 535,1530.

## Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB)

Triethylammoniumbicarbonatpuffer wurde hergestellt indem zu einer Lösung von Triethylamin (1M in Wasser; 1L) so lange Trockeneis gegeben wurde, bis der pH-Wert 7,4 betrug.

### Glucosamin-6-phosphat-Derivat 142



Die Phosphorylierung wurde entsprechend einer abgewandelten Literaturvorschrift<sup>[199]</sup> durchgeführt: Verbindung **140** (793 mg, 1,55 mmol, 1 eq.) und Protonenschwamm (*N,N,N,N'*-Tetramethyl-1,8-naphthalindiamin; 1,99 g, 9,3 mmol, 6 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Acetonitril (40 mL) gelöst. Die Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und währenddessen im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Dann wurde Phosphorylchlorid (568 µL, 6,2 mmol, 4 eq.) hinzugegeben und die Mischung wurde bei 0°C gerührt. Nach 3 Stunden war kein Ausgangsmaterial mehr auf dem DC zu sehen. Die Reaktionsmischung wurde in eiskalten TEAB-Puffer (400 mL, 0,2 M) geschüttelt und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die wässrige Phase wurde viermal mit Ethylacetat gewaschen und die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von ca. 10 mL eingeeengt und in zwei Portionen per MPLC gereinigt (Säule: Merck Lobar LiChroprep RP-18 310-25, Gradient: 0-100 % Acetonitril gegen 0,1 M TEAB-Puffer über 30 Minuten, 20 mL/min). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Das Produkt wurde in Form eines hellbraunen, glasartigen Feststoffes erhalten (929 mg, 1,17 mmol, 75 %).

**R<sub>f</sub>** (RP-18, Acetonitril / TEAB 0,1 M; 3:7) = 0,30

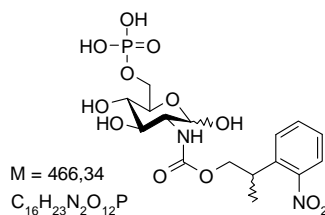
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,21-1,27 (m, 3H, NPP-Me); 1,78-2,14 (m, 9H, 3x Ac); 3,33-4,31 (m, 7H); 4,59-5,14 (m, 2H); 5,61-5,91 (m, 1H); 7,45-7,84 (m, 4H, arom. H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 9,68; 17,94; 20,40; 20,80; 33,31; 33,44; 45,19; 52,21; 54,08; 62,53; 63,03; 67,59; 68,75; 70,25; 70,45; 70,78; 73,35; 89,69; 123,70; 127,79; 128,55; 132,88; 136,74; 149,95; 156,04; 169,15; 169,75 ppm.

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,11 ppm.

**HR-MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>15</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> 615,1203; gefunden 615,1183.

### Glucosamin-6-phosphat-Derivat 137



Verbindung **142** (877 mg, 1,10 mmol, 1 eq.) wurde in einer Mischung aus THF, Methanol und Wasser (80 mL; THF/Methanol/Wasser 1:1:2) gelöst. Die Lösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und Natronlauge (2 M; 11,0 mL, 22 mmol, 20 eq.) wurde hinzugefügt. Die Mischung wurde 10 Minuten bei 0°C gerührt und anschließend durch Zugabe von Essigsäure neutralisiert. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in TEAB-Puffer (0,1 M; 5 mL) gelöst. Diese Lösung wurde in einer Portion mit MPLC gereinigt (Säule: Merck Lobar LiChroprep RP-18 310-25, Gradient: 0-20 % Acetonitril gegen 0,1 M TEAB-Puffer über 30 Minuten, 20 mL/min). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt als blaßgelben, glasartigen Feststoff (559 mg, 986 µmol, 85 %). Laut NMR enthält das Produkt ca. 1,3 Äquivalente Triethylammonium als Gegenion.

$R_f$  (RP-18, Acetonitril / TEAB 0,1 M; 3:7) = 0,61

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 1,33-1,37 (m, 3H, NPP-Me); 3,34-3,66 (m, 4H); 3,81-3,86 (m, 1H); 3,97-4,02 (m, 1H); 4,06-4,31 (m, 4H); 5,02-5,07 (m, 1H); 7,40-7,49 (m, 1H, arom. H); 7,61-7,65 (m, 2H, arom. H); 7,73-7,77 (m, 1H, arom. H) ppm.

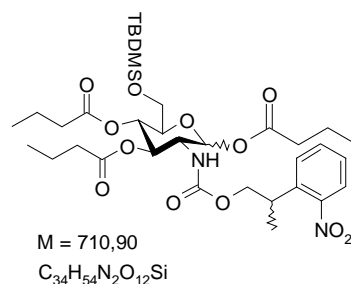
$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 9,25; 18,15; 18,50; 35,06; 47,29; 57,67; 65,36; 69,47; 69,76; 71,64; 71,92; 72,38; 75,43; 77,02; 92,94; 97,34; 124,91; 128,63; 129,59; 133,81; 138,41; 151,99; 158,55; 159,25 ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 3,58 ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  465,0910; gefunden 465,0907.

Die Synthese der lipophilen Variante des photoaktivierbaren Glucosamin-6-phosphat-Derivats wurde durch eine Arbeit von Carsten Schultz et. al. <sup>[171,200]</sup> inspiriert.

### Glucosamin-Derivat 145



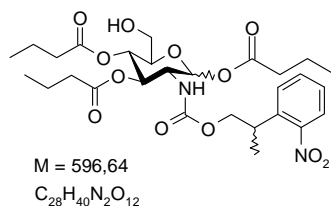
Verbindung **138** (2,03 g, 4,35 mmol, 1 eq.) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (27 mg, 218 µmol, 0,05 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin (30 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Buttersäureanhydrid (4,23 mL, 26,1 mmol, 6 eq.) gegeben und die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Pyridin wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol ko-evaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit

gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde viermal mit Dichlormethan reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan / Ethylacetat 8:2) erhielt man das gewünschte Produkt (3,02 g, 4,24 mmol, 97 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Da die Verbindung als Gemisch der beiden anomeren Formen vorliegt, ist die Aufspaltung der 1H-Signale sehr komplex und das Integral muss teilweise als Dezimalbruch angegeben werden.  $\delta$  = 0,00-0,02 (m, 6H, Si-CH<sub>3</sub>); 0,85-0,86 (m, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,88-1,01 (m, 9H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,29-1,32 (m, 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 1,47-1,75 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,15-2,46 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,62-3,70 (m, 3H); 3,76-3,82 (m, 1H); 3,97-4,27 (m, 3H); 4,70-4,77 (m, 1H); 5,09-5,25 (m, 2H); 6,06-6,07 (m, 0,55H, H-1'); 6,19-6,20 (m, 0,45H, H-1'); 7,32-7,43 (m, 2H, arom. H); 7,52-7,57 (m, 1H, arom. H); 7,65-7,74 (m, 1H, arom. H) ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>12</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 733,3344; gefunden 733,3402.

### Glucosamin-Derivat 146



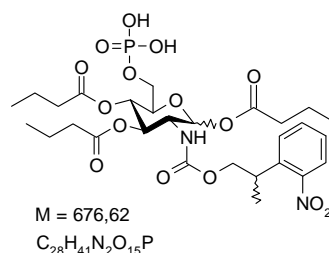
Verbindung **145** (3,02 g, 4,24 mmol, 1 eq.) wurde in einer Mischung aus Essigsäure (30 mL), THF (10 mL) und Wasser (10 mL) gelöst und für 2 Stunden auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde das THF am Rotationsverdampfer entfernt, die restliche Lösung mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Dichlormethan reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan / Ethylacetat 4:6) erhielt man das gewünschte Produkt (2,04 g, 3,42 mmol, 80 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Da die Verbindung als Gemisch der beiden anomeren Formen vorliegt, ist die Aufspaltung der 1H-Signale sehr komplex und das Integral muss teilweise als Dezimalbruch angegeben werden.  $\delta$  = 0,81-1,01 (m, 9H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,30-1,32 (m, 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 1,48-1,75 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,17-2,46 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,50-3,80 (m, 4H); 3,95-4,29 (m, 3H); 4,71-4,79 (m, 1H); 5,05-5,14 (m, 1H); 5,24-5,32 (m, 1H); 6,06-6,08 (m, 0,55H, H-1'); 6,20-6,22 (m, 0,45H, H-1'); 7,33-7,44 (m, 2H, arom. H); 7,52-7,58 (m, 1H, arom. H); 7,65-7,74 (m, 1H, arom. H) ppm.

**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>12</sub> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 614,3; gefunden 614,3.



## Glucosamin-6-phosphat-Derivat 147

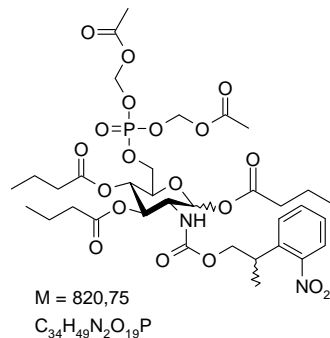


Verbindung **146** (2,04 g, 3,43 mmol, 1 eq.) und Protonenschwamm (*N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-naphthalindiamin; 4,40 g, 20,6 mmol, 6 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Acetonitril (80 mL) gelöst. Die Lösung wurde 30 Minuten gerührt und während dieser Zeit im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Dann wurde Phosphorylchlorid (1,28 mL, 13,7 mmol, 4 eq.) hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde 3 Stunden bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in eiskalten TEAB-Puffer (1L, 0,2 M) gegossen und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die wässrige Phase wurde viermal mit Ethylacetat gewaschen und die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt und in sieben Portionen per MPLC gereinigt (Säule: Merck Lobar LiChroprep RP-18 310-25, Gradient: 30 % für 10 min dann innerhalb von 10 min auf 50 % dann 50 % für 8 min Acetonitril gegen 0,05 M TEAB-Puffer, 20 mL/min). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Das Produkt wurde in Form einer gelblichen, wachsartigen Masse erhalten (736 mg, ca. 946 µmol, 27 %). Das NMR-Spektrum zeigt, dass ca. 1,3 Äquivalente Triethylammonium als Gegenion enthalten sind.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Da die Verbindung als Gemisch der beiden anomeren Formen und jeweils einem Diastereomergemisch vorliegt, ist die Aufspaltung der 1H-Signale sehr komplex und das Integral muss teilweise als Dezimalbruch angegeben werden. δ = 0,77-0,92 (m, 9H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,21-1,25 (m, 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 1,41-1,60 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,08-2,48 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,32-3,41 (m, 1 oder 2H); 3,58-3,65 (m, 1 oder 2H); 3,88-3,96 (m, 1 oder 2H); 4,09-4,23 (m, 1 oder 2H); 4,76-4,93 (m, 1H); 5,09-5,16 (m, 1H); 5,62-5,65 (m, 0,25H, H-1'); 5,94-5,97 (m, 0,75H, H-1'); 7,44-7,51 (m, 2H, arom. H und NH); 7,64-7,67 (m, 2H, arom. H); 7,78-7,83 (m, 1H, arom. H) ppm.

**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub>P [M-H]<sup>-</sup> 675,2; gefunden 675,2.

### Glucosamin-6-phosphat-Derivat 144



Verbindung **147** (254 mg, 375  $\mu$ mol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Acetonitril (10 mL) gelöst. Es wurde *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin (1,60 mL, 9,38 mmol, 25 eq.) hinzugefügt, gefolgt von Acetoxymethylbromid (641  $\mu$ L, 6,54 mmol, 17,4 eq.). Die Reaktionsmischung wird zwei Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile wurden im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen, die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 6:4  $\rightarrow$  1:1) und man erhielt das gewünschte Produkt in Form einer gelblichen, wachsartigen Masse (137 mg, 167  $\mu$ mol, 44 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 1:1) = 0,32

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Da die Verbindung als Gemisch der beiden anomeren Formen und jeweils einem Diastereomergemisch vorliegt, ist die Aufspaltung der <sup>1</sup>H-Signale sehr komplex und das Integral muss teilweise als Dezimalbruch angegeben werden.  $\delta$  = 0,78-0,92 (m, 9H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,21-1,25 (m, 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 1,40-1,61 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,11 (s, 6H, 2 x OAc); 2,13-2,47 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); ~3,33 (unter dem Wassersignal; 1H, NPP-CH); 3,91-4,22 (m, 6H, NPP-CH<sub>2</sub> und *H*-2' und *H*-5' und 2 x *H*-6'); 4,90-5,18 (m, 2H, *H*-3' und *H*-4'); 5,50-5,57 (m, 4H, 2 x O-CH<sub>2</sub>-O); 5,66-5,69 (m, 0,2H, *H*-1'); 5,97-5,99 (m, 0,8H, *H*-1'); 7,45-7,53 (m, arom. *H* und NH); 7,63-7,68 (m, 2H, arom. *H*); 7,79-7,82 (m, 1H, arom. *H*) ppm.

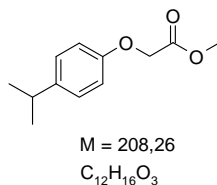
**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 13,17, 13,26 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 17,43, 17,58, 17,74 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 17,95 (NPP-CH<sub>3</sub>); 20,32 (2 x OCOCH<sub>3</sub>); 33,24, 33,41 (NPP-CH); 35,09, 35,25 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 52,11 (*C*-2'); 65,63-65,73 (*C*-6'); 67,50 (*C*-4'); 67,72 (NPP-CH<sub>2</sub>); 69,44, 69,58 (*C*-5'); 69,86, 70,02 (*C*-3'); 82,37, 82,45 (2 x O-CH<sub>2</sub>-O); 89,55 (*C*-1'); 123,72, 127,73, 128,49, 132,81 (arom. C); 136,61, 149,94 (quartäre arom. C); 155,97 (Carbamat); 168,95 (2 x OCOCH<sub>3</sub>); 171,50, 171,94 (3 x OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = -4,08 ppm.

**HR-MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>19</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> 843,2559; gefunden 843,2570.

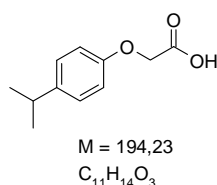
### 3.2.6 Synthese der *i*PrPac-Gruppe

#### 2-(4-Isopropylphenoxy)essigsäuremethylester (250)



Die Synthese wurde entsprechend einer Literaturvorschrift<sup>[179]</sup> durchgeführt: Natriumhydrid (60 % in Paraffin, rieselfähig; 5,88 g, 147 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem THF (120 mL) suspendiert. Über einen Tropftrichter wurde langsam eine Lösung von p-Isopropylphenol (20 g, 147 mmol, 1 eq.) in wasserfreiem THF (160 mL) hinzugegeben. Die Mischung wurde 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wurde die Lösung klar. Anschließend wurde die Lösung im Eisbad gekühlt und es wurde tropfenweise 2-Bromessigsäuremethylester (22,5 g, 147 mmol, 1 eq.) hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser (150 mL) aufgenommen und dreimal mit Diethylether (3 x 250 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum destilliert. Man erhielt das gewünschte Produkt in Form einer klaren Flüssigkeit (1,5 mbar, 103°C; 28,8 g, 94 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,9 Hz, 6H, *i*Pr); 2,85 (sep, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,9 Hz, 1H, CH); 3,79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,83 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,6 Hz, 2H, arom. H); 7,14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,5 Hz, 2H, arom. H) ppm.

#### 2-(4-Isopropylphenoxy)essigsäure (251)

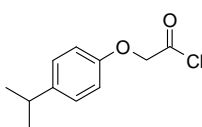


Die Synthese wurde entsprechend einer Literaturvorschrift<sup>[179]</sup> durchgeführt: Zu einer Lösung von Verbindung **250** (28,8 g, 138 mmol, 1 eq.) in Dioxan (300 mL) wurde eine Lösung von Lithiumhydroxid (6,19 g, 166 mmol, 1,2 eq.) in Wasser (200 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dabei änderte sich die Farbe der Lösung von grün nach gelb. Das Dioxan wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der wässrige Rückstand wurde mit

halbkonzentrierter Salzsäure auf pH = 1 gebracht und anschließend dreimal mit Ethylacetat (3 x 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt in Form eines weißen voluminösen Feststoffes (26,0 g, 134 mmol, 97 %).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,16 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,9 Hz, 6H, *iPr*); 2,82 (sep,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,9 Hz, 1H, *CH*); 4,62 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 6,81 (m, 2H, arom. *H*); 7,14 (m, 2H, arom. *H*) ppm.

## 2-(4-Isopropylphenoxy)essigsäurechlorid (184)



M = 212,68  
C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>2</sub>

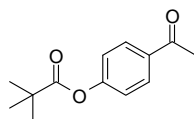
Die Synthese wurde entsprechend einer Literaturvorschrift<sup>[201]</sup> durchgeführt: Verbindung **251** (20 g, 105 mmol, 1 eq.) wurde unter Rückflusskühlung für 8 Stunden in Thionylchlorid (163 g, 1,37 mol, 13 eq.) auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid bei Normaldruck abdestilliert und das Produkt anschließend durch Vakuumdestillation isoliert (1,2 mbar, 91°C). Man erhält das Produkt als blaßgelbe Flüssigkeit (20,1 g, 94,5 mmol, 90 %).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,22 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,9 Hz, 6H, *iPr*); 2,87 (sep,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,9 Hz, 1H, *CH*); 4,92 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 6,83 (m, 2H, arom. *H*); 7,17 (m, 2H, arom. *H*) ppm.

## 3.2.7 Synthese der pHP-Gruppe (p-Hydroxyphenacyl-Gruppe)

Die Synthese der pHP-Gruppe wurde entsprechend meiner Diplomarbeit<sup>[174]</sup> durchgeführt.

### 1-(4-Pivaloyloxyphenyl)-ethanon (165)



M = 220,27  
C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>

p-Hydroxyacetophenon (8,85 g, 65,0 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in Ethylacetat (125 ml) gelöst. Pivaloylchlorid (7,84 g, 65,0 mmol, 1eq) wurde hinzugegeben, gefolgt von Pyridin

(10,3 g, 130 mmol, 2 eq.). Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es fiel ein weißer Niederschlag aus ( $\rightarrow$  Pyridiniumchlorid). Die Reaktionslösung wurde nacheinander mit verdünnter Salzsäure (10 %, 100 mL), gesättigter Natriumcarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zurück blieb eine gelbe, ölige Flüssigkeit. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan) erhielt man das gewünschte Produkt in Form eines hellgelben, kristallinen Feststoffes. (10,8 g, 49,0 mmol, 75 %).

$R_f$  (Dichlormethan) = 0,53

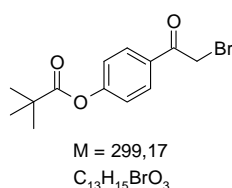
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,37 (s, 9H, Piv); 2,60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7,16 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8,8 Hz, 2H, arom. H); 7,99 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8,8 Hz; 2H, arom. H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 26,6; 27,1; 39,2; 121,7; 129,9; 134,6; 155,0; 176,5; 196,8 ppm.

**HR-MS** (EI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$  220,1099; gefunden 220,1100.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$  (%) C 70,89; H 7,32; N 0,0; gefunden C 70,81; H 7,28; N 0,0.

### 1-(4-Pivaloyloxyphenyl)-2-brom-ethanon (166)



Die Bromierung wurde nach einer abgewandelten Literaturvorschrift<sup>[23,202]</sup> durchgeführt: Kupfer(II)bromid (10,1 g, 45,4 mmol, 2 eq.) wurde in Ethylacetat (50 ml) suspendiert. Eine Lösung von Verbindung **165** (5,0 g, 22,7 mmol, 1 eq.) in Chloroform (50 ml) wurde hinzugegeben. Die Mischung wurde unter starkem Rühren 15 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung über einen Büchnertrichter filtriert und das Lösungsmittel aus dem Filtrat im Vakuum entfernt. Zurück blieb ein braunes Öl, das langsam auskristallisiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan / Chloroform = 1 : 2) erhielt man das gewünschte Produkt in Form eines hellgelben Feststoffes (5,03 g, 16,8 mmol, 74 %).

$R_f$  (Chloroform) = 0,37

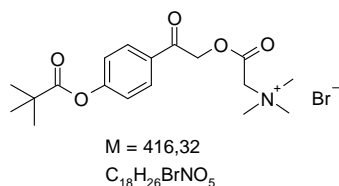
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,37 (s, 9H, Piv); 4,42 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7,20 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8,9 Hz, 2H, arom. H); 8,02 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8,9 Hz, 2H, arom. H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 27,1; 30,6; 39,3; 122,1; 130,6; 131,4; 155,6; 176,4; 190,2 ppm.

**HR-MS** (EI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrO}_3$   $[\text{M}]^+$  298,0205; gefunden 298,0213.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrO}_3$  (%) C 52,19; H 5,05; N 0,0; gefunden C 52,17; H 5,05; N 0,0.

### Trimethyl-((2-(4-Pivaloyloxyphenyl)-2-oxoethoxy)carbonylmethyl)ammonium bromid (168)

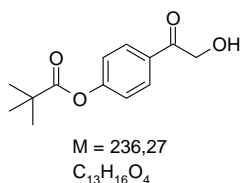


Verbindung **168** wurde entsprechend einer abgewandelten Literaturvorschrift<sup>[175]</sup> synthetisiert: Betain (1,91 g, 16,3 mmol, 1 eq.) wurde in heißem Ethanol (40 ml) gelöst, die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und zu einer Suspension von Verbindung **166** (4,88 g, 16,3 mmol, 1 eq.) in wasserfreiem Ethanol (50 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 40 °C gerührt (Trockenrohr) und anschließend 1 Stunde refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform (50 ml) aufgenommen. Nach einiger Zeit fiel ein weißer, flockiger Niederschlag aus. Nach 1 Stunde wurde der Niederschlag über einen Büchnertrichter abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Da es sich um ein Zwischenprodukt handelte, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet (6,10 g, 14,7 mmol, 89 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,37 (s, 9H, Piv); 3,36 (s, 9H, N-CH<sub>3</sub>); 4,75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 5,80 (s, 2H, CH<sub>3</sub>); 7,37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,3 Hz, 2H, arom. H); 8,11 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,3 Hz, 2H, arom. H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 27,1; 53,7; 63,1; 68,5; 79,7; 122,9; 130,2; 131,4; 155,7; 164,8; 176,4; 191,3 ppm.

### 1-(4-Pivaloyloxyphenyl)-2-hydroxy-ethanon (169)



Verbindung **169** wurde entsprechend einer abgewandelten Literaturvorschrift<sup>[175]</sup> synthetisiert: Verbindung **168** (5,98 g, 14,4 mmol, 1 eq.) wurde in VE-Wasser (100 ml) suspendiert. Eine Lösung von Kaliumcarbonat (1,99 g, 14,4 mmol, 1 eq.) in der benötigten Menge Wasser wurde hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wurde milchig trüb. Die Mischung wurde 3 Stunden gerührt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in Form eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten (2,51 g, 10,6 mmol, 74 %).

$R_f$  (Chloroform / Ethylacetat 9:1) = 0,32

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,37 (s, 9H, Piv); 3,48 (s, 1H, OH); 4,85 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7,20 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8,8 Hz, 2H, arom. H); 7,94 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 8,8 Hz, 2H, arom. H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 27,1; 39,3; 65,4; 122,2; 129,3; 130,8; 155,8; 176,4; 197,3 ppm.

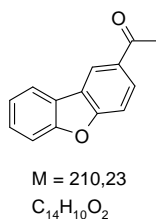
**HR-MS** (EI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$   $[\text{M}]^+$  236,1049; gefunden 236,1059.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$  (%) C 66,09; H 6,83; N 0,0; gefunden C 65,95; H 6,72; N 0,0.

### 3.2.8 Synthese der NDBF-Gruppe (Nitrodibenzofuranyl-Gruppe)

Die Synthese der NDBF-Gruppe wurde im Zuge eines Gemeinschaftsprojektes von Timo Mack<sup>[145]</sup> durchgeführt. Die Synthesevorschrift wird der Vollständigkeit halber hier aufgeführt.

#### 2-Acetyldibenzofuran (171)



Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[176]</sup> Aluminiumtrichlorid (9,5 g, 71,3 mmol, 1,2 eq.) wurde unter Argonatmosphäre fein gepulvert in Schwefelkohlenstoff (20 mL) suspendiert. Anschließend wurde zügig Acetylchlorid (4,6 mL 5,1 g, 65,4 mmol, 1,1 eq.) hinzugefügt und die Mischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde Dibenzofuran (10,0 g, 59,5 mmol, 1 eq.), gelöst in Schwefelkohlenstoff (20 mL), langsam in 5 mL-Portionen zugegeben. Die Suspension erwärmte sich, lokal siedete das Lösungsmittel. Nach beendeter Zugabe wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 2 Stunden bei 55 °C Ölbadtemperatur unter Intensivkühlung erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Reaktionsmischung wurde mit Eiswasser (200 mL) gequench, die rote organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde noch dreimal mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit Natronlauge (0,5 M) und Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1) lieferte das Produkt als weißen Feststoff (9,3 g, 44,4 mmol, 74 %). Das NMR-Spektrum zeigt etwa 10% Verunreinigung mit 3-Acetyldibenzofuran.

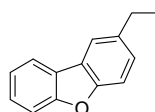
$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 9:1) = 0,31

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,72 (s, 1H, CH<sub>3</sub>); 7,39 (m, 1H, H-7); 7,50 (m, 1H, H-8); 7,60 (m, 2H, H-3 und H-6); 8,00 (m, 1H, H-9); 8,11 (dd, J<sub>HH1</sub> = 8,6 Hz, J<sub>HH2</sub> = 1,8 Hz, 1H, H-3); 8,59 (dd, J<sub>HH1</sub> = 1,8 Hz, J<sub>HH2</sub> = 0,5 Hz, 1H, H-1) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 26,9; 111,7; 112,1; 121,1; 121,7; 123,5; 123,9; 124,7; 128,1; 128,1; 132,6; 157,0; 155,0; 197,4 ppm.

**HR-MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup> 210,0681; gefunden 210,0685.

## 2-Ethyldibenzofuran (172)



M = 196,25  
C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O

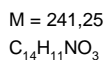
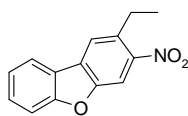
Die Herstellung des Zinkamalgams erfolgte nach Literatur<sup>[203]</sup>. Dazu wurde Zinkpulver (45,0 g, 687 mmol, 10 eq.) und Quecksilber(II)chlorid (4 g, 14,7 mmol) mit einer Mischung aus konzentrierter Salzsäure (2,5 mL) und Wasser (60 mL) geschüttelt. Anschließend wurde die saure Lösung vom Amalgam abdekantiert und der Rückstand mit Wasser gewaschen. Die Synthese von Verbindung **172** wurde nach Literaturvorschrift durchgeführt<sup>[176]</sup>. Zu dem amalgamierten Zink wurde vorsichtig Wasser (35 mL) und konzentrierte Salzsäure (75 mL) gegeben, gefolgt von 2-Acetyldibenzofuran (**171**) (14,4 g, 68,7 mmol, 1 eq.). Die Reaktionsmischung wurde unter Rückflusskühlung bei 120°C Ölbadtemperatur für 40 Stunden erhitzt. Nach 16, 24 und 36 Stunden wurden jeweils 50 mL konzentrierte Salzsäure hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und dreimal mit Diethylether (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde durch Destillation im Vakuum isoliert (0,4 mbar, 91°C) in Form einer klaren, farblosen Flüssigkeit (8,6 g, 43,8 mmol, 64 %). Das NMR-Spektrum zeigt etwa 10 % Verunreinigung mit 3-Ethyldibenzofuran.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,36 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,84 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,32 (m, 2H, H-7, H-8); 7,45 (m, 2H, H-4, H-6); 7,56 (m, 1H, H-9); 7,78 (d, J<sub>HH</sub> = 0,9 Hz, 1H, H-1); 7,94 (d, J<sub>HH</sub> = 7,8 Hz, 1H, H-3) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 16,4; 29,0; 111,4; 111,8; 119,5; 120,7; 122,5; 122,6; 122,7; 127,0; 127,3; 138,9; 154,7; 156,56 ppm.

**HR-MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O [M]<sup>+</sup> 196,0888; gefunden 196,0886.



**2-Ethyl-3-nitrodibenzofuran (173)**

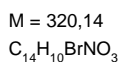
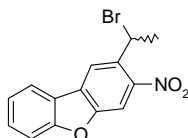
Die Synthese erfolgte nach einer Literaturvorschrift<sup>[204]</sup>: Zu einer Lösung von 2-Ethyl-dibenzofuran (**172**) (42,3 g, 216 mmol, 1 eq.) in Eisessig (210 mL) wurde mit einem Tropftrichter zügig rauchende Salpetersäure (27,1 mL, 648 mmol, 3 eq.) hinzugegossen. Die Reaktionslösung erwärmte sich dabei. Anschließend wurde unter Rückflusskühlung 1 Stunde auf 100°C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wurde die rote Reaktionslösung in kaltes Wasser gegossen und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan mit 0 bis 2 % Ethylacetat) und man erhält das Produkt als gelben Feststoff (33,7 g, 139 mmol, 64 %), der in Methanol umkristallisiert werden kann (gelbe Nadeln). Das NMR-Spektrum zeigt etwa 10 % Verunreinigung mit 3-Ethyl-2-nitrodibenzofuran.

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 97:3) = 0,4

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1,39 (t,  $^3J_{HH} = 7,5$  Hz, 3H,  $CH_3$ ); 3,10 (q,  $^3J_{HH} = 7,5$  Hz, 2H,  $CH_2$ ); 7,42 (m, 1H,  $H-8$ ); 7,59 (m, 2H,  $H-7$ ,  $H-5$ ); 7,90 (s, 1H,  $H-1$ ); 8,00 (m, 1H,  $H-9$ ); 8,15 (s, 1H,  $H-4$ ) ppm.

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 15,6; 26,8; 108,8; 112,3; 121,7; 122,4; 122,7; 123,7; 128,9; 129,3; 134,2; 147,8; 153,5; 158,4 ppm.

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $C_{14}H_{11}NO_3$   $[M]^+$  241,0739; gefunden 241,0744.

**1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan (174)**

Die Synthese erfolgte nach Literaturvorschrift<sup>[24]</sup>: 2-Ethyl-3-nitrodibenzofuran (**173**) (33,7 g, 140 mmol, 1 eq.), N-Bromsuccinimid (37,4 g, 209 mmol, 1,5 eq.) und Dibenzoylperoxid (665 mg, 2,7 mmol, 0,02 eq.) wurden in Tetrachlorkohlenstoff (1300 mL) suspendiert und für 22 Stunden unter Rückflusskühlung auf 100°C erhitzt. Dabei wurde die Suspension klarer und es bildete sich ein weißer

Niederschlag. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC verfolgt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das kristalline Succinimid abfiltriert. Das Filtrat wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Dichlormethan 1:2) und man erhielt das Produkt als gelben Feststoff (38,1 g, 119 mmol, 85 %).

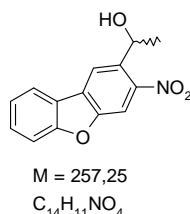
$R_f$  (Cyclohexan / Dichlormethan 2:1) = 0,48

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2,21 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,00 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 6,8$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ ); 7,45 (m, 1H,  $H-8$ ); 7,56-7,66 (m, 2H,  $H-7$ ,  $H-5$ ); 8,07 (m, 1H,  $H-9$ ); 8,08 (s, 1H,  $H-1$ ); 8,43 (s, 1H,  $H-4$ ) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 27,9; 42,8; 108,6; 112,4; 121,6; 121,9; 122,4; 124,1; 129,2; 129,8; 133,2; 146,2; 154,2; 158,5 ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3$   $[\text{M}]^+$  320,9824; gefunden 320,9830 ( $^{81}\text{Br}$  Isotopenpeak).

### 1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethanol (175)



Verbindung **174** (1,6 g, 5 mmol, 1 eq.) wurde in THF (30 mL) gelöst und eine Lösung von Silbernitrat (850 mg, 5 mmol, 1 eq.) in Wasser (30 mL) wurde hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 3,5 Stunden unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurde mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Dichlormethan 2:1). Man erhält einen gelben Feststoff (750 mg, 2,9 mmol, 58 %).

$R_f$  (Dichlormethan / Ethylacetat 2:1) = 0,6

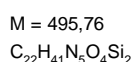
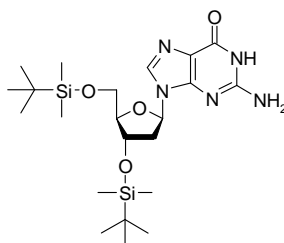
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,67 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 5,58 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 6,3$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ ); 7,42 (dd,  $J_{\text{HH1}} = 7,0$  Hz,  $J_{\text{HH2}} = 1,3$  Hz, 1H,  $H-8$ ); 7,55-7,64 (m, 2H,  $H-7$ ,  $H-5$ ); 8,03 (dd,  $J_{\text{HH1}} = 7,7$  Hz,  $J_{\text{HH2}} = 0,7$  Hz, 1H,  $H-9$ ); 8,14 (s, 1H,  $H-1$ ); 8,40 (s, 1H,  $H-4$ ) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 24,9; 66,0; 108,5; 112,4; 119,3; 121,9; 122,7; 123,9; 129,4; 129,6; 136,6; 146,4; 154,0; 158,5 ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$   $[\text{M}]^+$  257,0688; gefunden 257,0688.

### 3.2.9 Synthese des pHP-geschützten Desoxyguanosinderivats

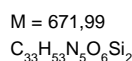
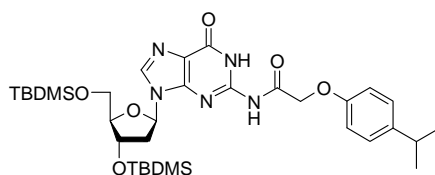
#### 3',5'-*O,O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin (**183**)



Verbindung **183** wurde nach Literaturvorschrift<sup>[205,206]</sup> synthetisiert: 2'-Desoxyguanosin (20 g, 70 mmol, 1 eq.), Imidazol (33,4 g, 471 mmol, 7 eq.) und *tert*Butyldimethylsilylchlorid (46,2 g, 280 mmol, 4 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (50 mL) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt, gründlich mit eiskaltem Ethanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt das Produkt als weißen, feinpulvrigen Feststoff (31,7 g, 63,9 mmol, 91 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,04 (m, 6H, TMDMS-CH<sub>3</sub>); 0,10 (s, 6H, TMDMS-CH<sub>3</sub>); 0,87 (s, 9H, TBDMS-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,89 (s, 9H, TBDMS-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,21-2,26 (m, 1H, *H*-2'); 2,60-2,67 (m, 1H, *H*-2'); 3,62-3,72 (m, 2H, 2 x *H*-5'); 3,79-3,82 (m, 1H, *H*-3' oder *H*-4'); 4,47-4,50 (m, 1H, *H*-3' oder *H*-4'); 6,08-6,12 (m, 1H, *H*-1'); 6,46 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,88 (s, 1H, arom. *H*); 10,60 (s, 1H, NH) ppm.

#### 3',5'-*O,O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-2'-desoxyguanosin (**185**)



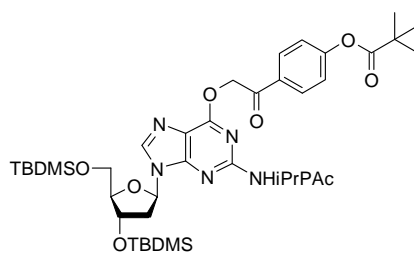
Die Synthese wurde nach Literaturangaben<sup>[48,178,206]</sup> synthetisiert: Verbindung **183** (10 g, 20,2 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin (130 mL) gelöst und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. 2-(4-Isopropylphenoxy)essigsäurechlorid (**184**) (6,45 g, 4,9 mL, 30,2 mmol, 1,5 eq.) wurde langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei 0°C und dann 1 Stunde bei

Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde wieder auf 0°C abgekühlt und es wurde Methanol (400 mL) hinzugefügt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Methanol koevaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 3:1 → 2:1). Man erhält das Produkt als gelben Feststoff (5,6 g, 8,33 mmol, 72 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 3:1) = 0,38

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0,04 (m, 6H, TMDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,11(s, 6H, TMDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,86 (s, 9H, TBDMS- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 0,89 (s, 9H, TBDMS- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,17 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,9$  Hz, 6H, iPr- $\text{CH}_3$ ); 2,29-2,35 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,70-2,77 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,83 (sep,  $^3J_{\text{HH}} = 6,9$  Hz, 1H, iPr- $\text{CH}_3$ ); 3,63-3,74 (m, 2H, 2 x  $H-5'$ ); 3,84-3,87 (m, 1H,  $H-3'$  oder  $H-4'$ ); 4,51-4,53 (m, 1H,  $H-3'$  oder  $H-4'$ ); 4,81 (s, 2H, iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 6,12-6,23 (m, 1H,  $H-1'$ ); 6,87-6,89 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 7,15-7,18 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 8,22 (s, 1H, arom.  $H$ ); 11,81 (s, 2H, 2 x NH) ppm.

### 3',5'-*O,O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2-*N*-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(2-(4-pivaloyloxyphenyl)-2-oxoeth-1-yl)-2'-desoxyguanosin (**186**)



M = 890,25  
 $\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_9\text{Si}_2$

Nukleosid **185** (4,0 g, 5,93 mmol, 1 eq.), Alkohol **169** (2,11 g, 8,90 mmol, 1,5 eq.) und Triphenylphosphin (2,33 g, 8,90 mmol, 1,5 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem THF (60 mL) gelöst. Diethylazodicarboxylat (40 % in Toluol; 4,07 mL, 8,90 mmol, 1,5 eq.) wurde mit einer Spritze hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte, dass die Ausgangsstoffe noch nicht vollständig reagiert hatten. Daher wurde erneut Diethylazodicarboxylat (2,67 mL, 5,7 mmol) und Triphenylphosphin (1,5 g, 5,7 mmol) hinzugegeben und die Lösung wurde weitere 20 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Dichlormethan am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 3:1 → 2:1). Man erhielt das Produkt als gelben Feststoff (2,97 g, laut NMR ist das Produkt noch mit Hydrazicarboethylester verunreinigt, so dass effektiv ca. 2,08 mmol gewünschtes Produkt

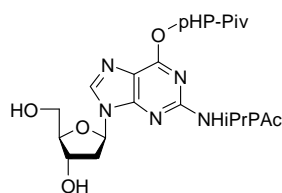
enthalten sind, entspricht ca. 23 %). Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für die nächste Synthese verwendet.

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1) = 0,38

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0,00 (m, 6H, TBDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,09 (m, 6H, TBDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,84 (s, 9H, TBDMS- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 0,88 (s, 9H, TBDMS- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,15 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,0$  Hz, 6H, iPrPac- $\text{CH}_3$ ); 1,33 (s, 9H, Pivaloyl-  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2,27-2,36 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,80 (sep.,  $^3J_{\text{HH}} = 6,8$  Hz, iPrPac- $\text{CH}$ ); 2,91-3,00 (m, 1H,  $H-2'$ ); 3,63-3,69 (m, 1H,  $H-5'$ ); 3,75-3,81 (m, 1H,  $H-5'$ ); 3,84-3,87 (m, 1H,  $H-3'$  oder  $H-4'$ ); 4,59-4,64 (m, 1H,  $H-3'$  oder  $H-4'$ ); 4,83 (s, 2H, iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 6,05 (s, 2H, pHP- $\text{CH}_2$ ); 6,32-6,36 (m, 1H,  $H-1'$ ); 6,71-6,74 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 7,06-7,09 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 7,27-7,30 (m, 2H, pHP-arom.  $H$ ); 8,06-8,08 (m, 2H, pHP-arom.  $H$ ); 8,46 (s, 1H, arom.  $H$ ); 10,52 (s, 1H,  $\text{NH}$ ) ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{46}\text{H}_{68}\text{N}_5\text{O}_9\text{Si}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  890,4550; gefunden 890,4555.

### 2-*N*-(4-Isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(2-(4-pivaloyloxyphenyl)-2-oxoeth-1-yl)-2'-desoxyguanosin (188)



$M = 661,72$   
 $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_9$

Nukleosid **186** (494 mg, 555  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde in THF (15 mL) gelöst und mit Essigsäure (400  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Anschließend wurde Tetrabutylammoniumfluoridlösung (1M in THF; 1,67 mL, 1,67 mmol, 3 eq.) hinzugefügt und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Isopropanol 92:8  $\rightarrow$  9:1). Man erhält das Produkt als blaßgelben Feststoff (188 mg, 284  $\mu\text{mol}$ , ca. 50 %).

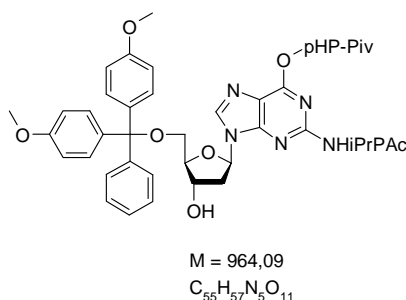
$R_f$  (Dichlormethan / Isopropanol 9:1) = 0,35

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,15 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,0$  Hz, 6H, iPrPac- $\text{CH}_3$ ); 1,33 (s, 9H, Pivaloyl- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2,29-2,35 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,70-2,84 (m, 2H,  $H-2'$  und iPrPac- $\text{CH}$ ); 3,50-3,63 (m, 2H, 2 x  $H-5'$ ); 3,86-3,89 (m, 1H,  $H-4'$ ); 4,41-4,45 (m, 1H,  $H-3'$ ); 4,87 (s, 2H, iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 4,91-4,93 (m, 1H, 5'- $\text{OH}$ ); 5,33-5,34 (m, 1H, 3'- $\text{OH}$ ); 6,05 (s, 2H, pHP- $\text{CH}_2$ ); 6,35-6,38 (m, 1H,  $H-1'$ ); 6,72-6,74 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 7,07-7,09 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 7,26-7,29 (m, 2H, pHP-arom.  $H$ ); 8,05-8,07 (m, 2H, pHP-arom.  $H$ ); 8,52 (s, 1H, arom.  $H$ ); 10,53 (s, 1H,  $\text{NH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 13,5; 19,4; 24,1; 26,7; 32,6; 38,7; 51,8; 61,6; 67,3; 68,6; 70,7; 83,4; 88,0; 114,2; 117,2; 122,3; 127,0; 129,6; 131,6; 140,7; 141,5; 151,4; 152,9; 154,9; 155,9; 159,4; 167,7; 176,0; 192,0$  ppm.

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{NaO}_9$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  684,2640; gefunden 684,2673.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-O-(2-(4-pivaloyloxyphenyl)-2-oxoeth-1-yl)-2'-desoxyguanosin (190)**



Nukleosid **188** (690 mg, 1,04 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin (30 mL) gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt und 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (420 mg, 1,25 mmol, 1,2 eq.) wurde hinzugefügt. Die Lösung wurde 1 Stunde bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Da ein DC zeigte, dass das Ausgangsmaterial noch nicht vollständig umgesetzt wurde, wurde erneut 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (70 mg, 0,2 eq.) hinzugefügt und weitere 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde Ethanol (5 mL) zur Reaktionslösung gegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit Citronensäurelösung (5 % in Wasser) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 97:3, die Säule wurde mit 0,5 % Triethylamin im Laufmittel gepackt) und man erhielt das gewünschte Produkt als blaßgelben Schaum (662 mg, 686  $\mu\text{mol}$ , 66 %).

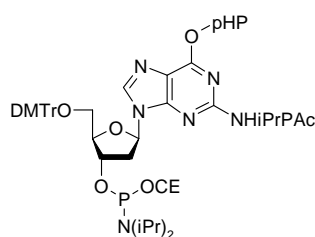
$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 95:5) = 0,42

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1,15$  (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,9$  Hz, 6H, iPrPac- $\text{CH}_3$ ); 1,33 (s, 9H, Pivaloyl- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2,32-2,40 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,76-2,92 (m, 2H,  $H-2'$  und iPrPac- $\text{CH}$ ); 3,07-3,12 (m, 1H,  $H-5'$ ); 3,28-3,32 (m, 1H,  $H-5'$ ); 3,70 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ); 3,95-4,00 (m, 1H,  $H-4'$ ); 4,45-4,49 (m, 1H,  $H-3'$ ); 4,82 (s, 2H, iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 5,32-5,34 (m, 1H, 3'-OH); 6,06 (s, 2H, pHP- $\text{CH}_2$ ); 6,37-6,42 (m, 1H,  $H-1'$ ); 6,70-6,79 (6H, 2 x iPrPac-arom.  $H$  und 4 x DMTr-arom.  $H$ ); 7,08-7,31 (13H, 2 x iPrPac-arom.  $H$  und 2 x pHP-arom.  $H$  und 9 x DMTr-arom.  $H$ ); 8,06-8,09 (m, 2H, pHP-arom.  $H$ ); 8,40 (s, 1H, arom.  $H$ ); 10,48 (s, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (62,5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 24,1; 26,7; 32,6; 38,7; 55,0; 64,4; 67,4; 68,6; 70,6; 83,6; 85,4; 86,3; 113,0; 117,6; 122,3; 123,9; 126,6; 127,1; 129,6; 129,8; 131,6; 135,4; 135,8; 140,8; 141,8; 144,9; 149,7; 151,4; 152,8; 155,0; 156,0; 158,0; 159,5; 167,4; 176,0; 192,0 ppm.

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{55}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{NaO}_{11}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  986,3947; gefunden 986,3942.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-O-(2-(4-pivaloyloxy-phenyl)-2-oxoethyl-1-yl)-2'-desoxyguanosin-3'-(cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit) (179)**



M = 1164,32  
 $\text{C}_{64}\text{H}_{74}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{P}$

Nukleosid **190** (120 mg, 124  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) gelöst und mit *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (106  $\mu\text{L}$ , 622  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) versetzt. Die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit einer Spritze Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (56  $\mu\text{L}$ , 249  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde 3 Stunden gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte, dass das Ausgangsmaterial noch nicht vollständig umgesetzt wurde, daher wurde eine weitere Portion Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (20  $\mu\text{L}$ ) und *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (106  $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 2:1, Säule mit 0,5 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin gepackt) und man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (120 mg, 103  $\mu\text{mol}$ , 83 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 1:1) = 0,65

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0,98-1,16 (m, 18H, 3 x *iPr-CH*<sub>3</sub>); 1,33 (s, 9H, Pivaloyl- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2,46-2,53 (m, 1H, *H-2'*); 2,56-2,73 (m, 2H, Cyanoethyl- $\text{CH}_2$ ); 2,76-2,83 (m, 1H, *iPr-CH*); 3,02-3,09 (m, 1H, *H-2'*); 3,17-3,23 (m, 1H, *H-5'*); 3,29-3,35 (m, 1H, *H-5'*); 3,46-3,56 (m, 2H, 2 x *iPr-CH*); 3,57-3,74 (m, 2H, Cyanoethyl- $\text{CH}_2$ ); 3,69-3,70 (m, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ); 4,03-4,12 (m, 1H, *H-4'*); 4,65-4,72 (m, 1H, *H-3'*); 4,82 (s, 2H, *iPrPac-CH*<sub>2</sub>); 6,06 (s, 2H, *pHP-CH*<sub>2</sub>); 6,38-6,42 (m, 1H, *H-1'*); 6,69-6,80 (6H, 2 x *iPrPac-arom. H* und 4 x *DMTr-arom. H*); 7,06-7,32 (13H, 2 x *iPrPac-arom.*

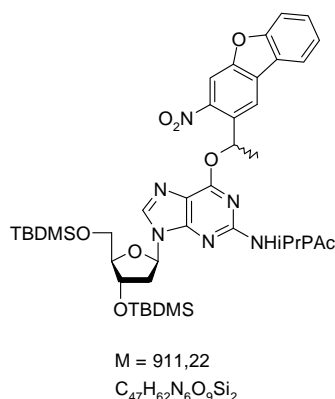
*H* und 2 x pHP-arom. *H* und 9 x DMTr-arom. *H*); 8,06-8,09 (m, 2H, pHP-arom. *H*); 8,41-8,42 (m, 1H, arom. *H*); 10,44-10,46 (m, 1H, *NH*) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (62,5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 19,7; 24,0; 24,2; 26,7; 32,6; 42,5; 42,8; 55,0; 58,1; 63,7; 67,4; 68,6; 83,7; 68,6; 83,7; 85,6; 113,0; 114,2; 117,5; 118,7; 118,9; 122,3; 126,6; 126,9; 127,6; 129,6; 131,6; 135,3; 135,6; 140,7; 141,8; 144,7; 151,3; 152,8; 155,0; 156,0; 158,0; 159,5; 167,4; 176,0; 192,0 ppm.

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 147,31; 147,97 ppm.

### 3.2.10 Synthese des NDBF-geschützten Desoxyguanosinderivats

#### 3',5'-*O,O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-2-*N*-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)-ethyl)-2'-desoxyguanosin (**187**)



Nukleosid **185** (1,74 g, 2,59 mmol, 1 eq.), Alkohol **175** (1,0 g, 3,89 mmol, 1,5 eq.) und Triphenylphosphin (1,02 g, 3,89 mmol, 1,5 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem THF (20 mL) gelöst. Diethylazodicarboxylat (40 % in Toluol; 1,78 mL, 3,89 mmol, 1,5 eq.) wurde mit einer Spritze hinzugefügt und die Lösung wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle zeigte, dass das Ausgangsmaterial noch nicht vollständig umgesetzt wurde, daher wurden erneut Diethylazodicarboxylat (1,2 mL, 2,6 mmol) und Triphenylphosphin (0,68 g, 2,6 mmol) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das THF wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit MPLC aufgearbeitet (Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm in befüllbarer 160 x 40 mm Kunststoffkartusche; Cyclohexan / Aceton 5:1). Man erhielt das Produkt als blaßgelben Feststoff (950 mg, 1,04 mmol, 40 %). Da die produktthaltige Lösung während der Aufarbeitung durch unglückliche Umstände vom Abzugsuntergrund mit Zellstofftüchern



aufgenommen und aus selbigen mit Dichlormethan extrahiert werden musste, kann die Ausbeute vermutlich noch verbessert werden.

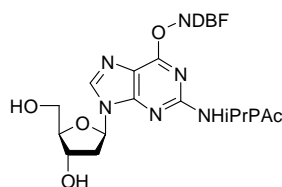
$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 5:1) = 0,29

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = (-0,16)-0,08 (m, 12 H, TMDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,66-0,86 (m, 18 H, TMDMS-C( $\text{CH}_3$ ) $_3$ ); 1,13-1,15 (m, 6H, iPr- $\text{CH}_3$ ); 1,92-1,94 (m, 3H, DBF- $\text{CH}_3$ ); 2,21-2,28 (m, 1H,  $H$ -2'); 2,75-2,83 (m, 1H, iPr- $\text{CH}$ ); 2,87-2,97 (m, 1H,  $H$ -2'); 3,56-3,62 (m, 1H,  $H$ -5'); 3,68-3,74 (m, 1H,  $H$ -5'); 3,77-3,81 (m, 1H,  $H$ -4'); 4,56-4,60 (m, 1H,  $H$ -3'); 4,81-4,83 (m, 2H, iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 6,25-6,29 (m, 1H,  $H$ -1'); 6,80-6,90 (m, 3H, DBF- $\text{CH}$  und 2 x iPrPac-arom.  $H$ ); 7,09-7,13 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 7,41-7,45 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 7,59-7,63 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 7,72-7,76 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 8,26-8,29 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 8,38-8,40 (m, 2H, DBF-arom.  $H$ ); 8,61-8,63 (m, 1H, dG-arom.  $H$ ); 10,04-10,15 (m, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (62,5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = -5,7; -5,6; -5,0; -4,9; 17,7; 17,8; 17,8; 22,0; 24,0; 25,5; 25,6; 26,3; 32,6; 62,7; 67,3; 70,7; 71,9; 83,6; 87,4; 108,3; 112,1; 114,3; 117,8; 119,9; 121,9; 122,6; 124,0; 127,0; 128,3; 129,8; 132,4; 141,0; 141,7; 142,0; 147,1; 151,1; 151,2; 152,7; 152,8; 153,3; 155,9; 157,6; 159,1; 166,9 ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_9\text{Si}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  911,4190; gefunden 911,4190.

### 2-*N*-(4-Isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)-ethyl)-2'-desoxyguanosin (189)



$M = 682,70$   
 $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_9$

Nukleosid **187** (940 mg, 1,03 mmol, 1 eq.) wurde in THF (50 mL) gelöst. Essigsäure (700  $\mu\text{L}$ , 12,4 mmol) wurde zur Reaktionslösung gegeben, gefolgt von Tetrabutylammoniumfluoridlösung (1M in THF; 3,08 mL, 3,1 mmol, 3 eq.). Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. (Dichlormethan / Methanol 95:5). Man erhält das Produkt als blaßgelben Feststoff (442 mg, 647  $\mu\text{mol}$ , 63 %).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,14-1,16 (m, 6H, iPr- $\text{CH}_3$ ); 1,92-1,95 (m, 3H, DBF- $\text{CH}_3$ ); 2,21-2,29 (m, 1H,  $H$ -2'); 2,62-2,73 (m, 1H,  $H$ -2'); 2,77-2,84 (m, 1H, iPr- $\text{CH}$ ); 3,44-3,59 (m, 2H, 2 x  $H$ -5'); 3,82-3,86 (m, 1H,  $H$ -4'); 4,37-4,42 (m, 1H,  $H$ -3'); 4,85-4,91 (m, 3H, 5'-OH und iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 5,28-5,32 (m, 1H, 3'-OH); 6,29-6,32 (m, 1H,  $H$ -1'); 6,84-6,87 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 6,88-6,92 (m,

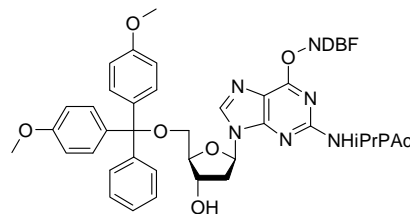
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,14-1,17 (m, 6H, iPr- $\text{CH}_3$ ); 1,93-1,96 (m, 3H, DBF- $\text{CH}_3$ ); 2,28-2,34 (m, 1H,  $H$ -2'); 2,78-2,90 (m, 2H,  $H$ -2' und iPr- $\text{CH}$ ); 3,05-3,12 (m, 1H,  $H$ -5'); 3,22-3,31 (m, 1H,  $H$ -5'); 3,67-3,69 (m, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ); 3,94-3,98 (m, 1H,  $H$ -4'); 4,43-4,52 (m, 1H,  $H$ -3'); 4,81-4,83 (m, 2H, iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 5,29-5,33 (m, 1H, 3'-OH); 6,32-6,37 (m, 1H,  $H$ -1'); 6,67-7,27 (18H, 13 x DMTr-arom.  $H$  und 4 x iPrPac-arom.  $H$  und DBF- $\text{CH}$ ); 7,38-7,46 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ );

7,11-7,14 (m, 2H, iPrPac-arom.  $H$ ); 7,44-7,47 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 7,61-7,65 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 7,75-7,78 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 8,30-8,32 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 8,41 (s, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 8,47 (s, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 8,64 (s, 1H, dG-arom.  $H$ ); 10,16-10,19 (m, 1H,  $\text{NH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (62,5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 13,5; 14,1; 19,4; 20,8; 21,0; 21,9; 24,0; 25,2; 32,6; 51,8; 61,6; 67,3; 70,7; 83,4; 87,9; 108,4; 112,1; 114,4; 117,5; 120,0; 121,9; 122,6; 124,0; 127,1; 128,3; 129,8; 132,4; 140,9; 141,5; 147,0; 151,2; 152,8; 153,4; 155,9; 157,5; 159,1; 167,3; 172,0 ppm.

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  683,2461; gefunden 683,2461.

### 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-N-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-O-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)-ethyl)-2'-desoxyguanosin (191)



$M = 985,07$   
 $\text{C}_{56}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_{11}$

Nukleosid **189** (421 mg, 610  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Pyridin (20 mL) gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt und es wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (248 mg, 732  $\mu\text{mol}$ , 1,2 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 1 Stunde bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit Citronensäurelösung (5 % in Wasser) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 95:5, die Säule wurde mit 0,5 % Triethylamin im Laufmittel gepackt). Da die säulenchromatographische Aufreinigung nicht das gewünschte Ergebnis brachte, wurde das Rohprodukt anschließend mittels MPLC aufgereinigt (Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm in befüllbarer 160 x 40 mm Kunststoffkartusche; Dichlormethan / Methanol 99:1  $\rightarrow$  97:3  $\rightarrow$  95:5). Man erhielt das gewünschte Produkt als blaßgelben Schaum (430 mg, 437  $\mu\text{mol}$ , 71 %).

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 95:5) = 0,30

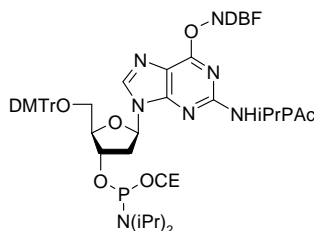
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,14-1,17 (m, 6H, iPr- $\text{CH}_3$ ); 1,93-1,96 (m, 3H, DBF- $\text{CH}_3$ ); 2,28-2,34 (m, 1H,  $H$ -2'); 2,78-2,90 (m, 2H,  $H$ -2' und iPr- $\text{CH}$ ); 3,05-3,12 (m, 1H,  $H$ -5'); 3,22-3,31 (m, 1H,  $H$ -5'); 3,67-3,69 (m, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ); 3,94-3,98 (m, 1H,  $H$ -4'); 4,43-4,52 (m, 1H,  $H$ -3'); 4,81-4,83 (m, 2H, iPrPac- $\text{CH}_2$ ); 5,29-5,33 (m, 1H, 3'-OH); 6,32-6,37 (m, 1H,  $H$ -1'); 6,67-7,27 (18H, 13 x DMTr-arom.  $H$  und 4 x iPrPac-arom.  $H$  und DBF- $\text{CH}$ ); 7,38-7,46 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ );

7,59-7,64 (m, 1H, DBF-arom. *H*); 7,74-7,77 (m, 1H, DBF-arom. *H*); 8,20-8,31 (m, 1H, DBF-arom. *H*); 8,36-8,38 (m, 1H, DBF-arom. *H*); 8,41-8,44 (m, 1H, DBF-arom. *H*); 8,61-8,67 (m, 1H, dG-arom. *H*); 10,07-10,12 (m, 1H, *NH*) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (62,5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 22,0; 24,1; 32,6; 54,9; 64,3; 67,3; 70,7; 83,6; 85,3; 86,3; 108,3; 112,0; 112,9; 114,3; 117,8; 119,9; 121,9; 122,6; 124,0; 126,4; 127,1; 127,5; 127,6; 128,3; 129,4; 129,6; 129,8; 132,4; 135,3; 135,4; 135,6; 135,8; 140,9; 141,6; 141,9; 144,7; 144,9; 146,9; 151,1; 151,2; 152,7 ppm.

HR-MS (ESI): *m/z* berechnet für  $\text{C}_{56}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{NaO}_{11}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1007,3586; gefunden 1007,3585.

**5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-*N*-(4-isopropylphenoxyacetyl)-6-*O*-(1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)-ethyl)-2'-desoxyguanosin-3'-(cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit) (177)**



$M = 1185,29$   
 $\text{C}_{65}\text{H}_{69}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{P}$

Nukleosid **191** (120 mg, 120  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) gelöst und mit *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (103  $\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) versetzt. Die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit einer Spritze Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (54  $\mu\text{L}$ , 240  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde 2 Stunden gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte, dass das Ausgangsmaterial noch nicht vollständig umgesetzt wurde, daher wurde eine weitere Portion Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (20  $\mu\text{L}$ ) und *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin (106  $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 2:1, Säule mit 0,5 % *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin gepackt) und man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (112 mg, 94,5  $\mu\text{mol}$ , 78 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 1:1) = 0,62

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0,95-1,18 (m, 18H, *iPr-CH*<sub>3</sub>); 1,92-1,96 (m, 3H, DBF-*CH*<sub>3</sub>); 2,38-2,48 (m, 1H, *H-2'*); 2,56-2,72 (m, 2H, Cyanoethyl-*CH*<sub>2</sub>); 2,78-2,85 (m, 1H, *iPr-CH*); 2,94-3,05 (m, 1H, *H-2'*); 3,12-3,20 (m, 1H, *H-5'*); 3,24-3,34 (m, 1H, *H-5'*); 3,45-3,56 (m, 2H, 2 x *iPr-CH*);

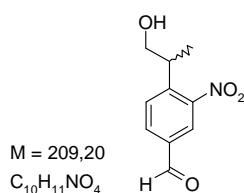
3,56-3,70 (m, 2H, Cyanoethyl- $CH_2$ ); 3,64-3,70 (m, 6H, 2 x  $OCH_3$ ); 4,06-4,10 (m, 1H,  $H-4'$ ); 4,63-4,72 (m, 1H,  $H-3'$ ); 4,79-4,83 (m, 2H,  $iPrPac-CH_2$ ); 6,32-6,38 (m, 1H,  $H-1'$ ); 6,67-7,27 (18H, 13 x DMTr-arom.  $H$  und 4 x  $iPrPac$ -arom.  $H$  und DBF- $CH$ ); 7,41-7,49 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 7,62-7,66 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 7,77-7,80 (m, 1H, DBF-arom.  $H$ ); 8,22-8,46 (m, 3H, DBF-arom.  $H$ ); 8,62-8,68 (m, 1H, dG-arom.  $H$ ); 10,02-10,09 (m, 1H,  $NH$ ) ppm.

$^{13}C$  NMR (62,5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 19,7; 22,0; 24,1; 24,2; 32,6; 42,5; 42,7; 54,9; 58,1; 58,4; 63,7; 67,3; 70,7; 73,2; 83,8; 85,5; 108,3; 112,1; 112,9; 114,3; 117,7; 117,9; 118,7; 118,9; 119,8; 120,0; 121,8; 122,6; 124,0; 126,4; 127,1; 127,6; 129,5; 132,3; 135,4; 135,7; 140,9; 141,6; 141,9; 144,6; 144,7; 147,0; 151,1; 152,6; 153,4; 155,8; 157,6; 157,9; 159,1; 166,9 ppm.

$^{31}P$  NMR (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 147,3; 148,0 ppm.

### 3.2.11 Synthese der NPP-NH<sub>2</sub>-Gruppe

#### 2-(4-Fomyl-2-nitrophenyl)propan-1-ol (216)



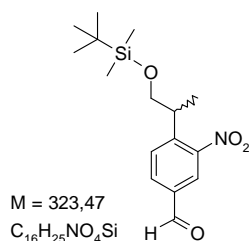
Die Hydroxymethylierung wurde entsprechend einer abgewandelten Literaturvorschrift<sup>[207]</sup> durchgeführt: 4-Ethyl-3-nitrobenzaldehyd (4,96 g, 27,9 mmol, 1 eq.) und Paraformaldehyd (1,26 g, 41,9 mmol, 1,5 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMSO (40 mL) suspendiert. *tert*Butanol (7 mL) wurde hinzugefügt, gefolgt von Kalium-*tert*butanolat (313 mg, 2,79 mmol, 0,1 eq.). Die Lösung färbte sich sofort dunkelblau. Die Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und färbte sich mit der Zeit dunkelrot. Anschließend wurde die Lösung unter Rückfluskkühlung für 3 Stunden auf 85°C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Nach abkühlen auf Raumtemperatur zeigte ein DC, dass kaum noch Ausgangsmaterial vorhanden war. Die Reaktionsmischung wurde mit Salzsäure (0,5 M) verdünnt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 7:3 → 6:4 → 1:1) und man erhielt das Produkt als gelbe, viskose Flüssigkeit (4,95 g, 23,7 mmol, 84 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 4:6) = 0,64

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,25 (d,  $^3J_{HH} = 7,0$  Hz, 3H,  $CH_3$ ); 3,24-3,35 (m, 1H,  $CH$ ); 3,53-3,58 (m, 2H,  $CH_2$ ); 4,81 (d,  $^3J_{HH} = 5,3$  Hz,  $OH$ ); 7,84 (d,  $^3J_{HH} = 8,3$  Hz, 1H, arom.  $H$ ); 8,14 (dd,  $^3J_{HH} = 8,1$  Hz,  $J_{HH2} = 1,8$  Hz, 1H, arom.  $H$ ); 8,31 (d,  $J_{HH} = 1,7$  Hz, 1H, arom.  $H$ ); 10,04 (s, 1H,  $CHO$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 17,2 ( $\text{CH}_3$ ); 36,7 ( $\text{CH}$ ); 65,6 ( $\text{CH}_2$ ); 124,4, 129,7, 132,0, 134,9, 144,5, 150,8 (arom. C); 191,3 ( $\text{CHO}$ ) ppm.

#### 4-(2-(*tert*butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl)-3-nitrobenzaldehyd (217)



Verbindung **216** (4,95 g, 23,7 mmol, 1 eq.) und 4-(Dimethylamino)pyridin (145 mg, 1,19 mmol, 0,05 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin (4,93 mL, 35,6 mmol, 1,5 eq.) wurde die Lösung im Eisbad auf 0°C abgekühlt und *tert*Butyldimethylsilylchlorid (4,30 g, 26,1 mmol, 1,1 eq.) wurde hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei 0°C gerührt. Ein DC zeigte, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Nach Zugabe von Ethanol (40 mL) wurde die Lösung noch 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel weitestgehend am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Wasser und Dichlormethan verteilt. Die organische Phase wurde nacheinander mit Salzsäure (1 M), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält das Produkt als hellgelbe, viskose Flüssigkeit (6,06 g, 18,7 mmol, 79 %). Das Rohprodukt ist so sauber, dass es ohne weitere Reinigung weiterverwendet wird.

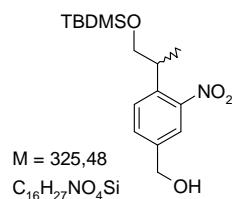
$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 6:4) = 0,93

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = -0,11, -0,1 (6H, 2 x  $\text{SiCH}_3$ ); 0,73 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,27 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3,32-3,43 (m, 1H,  $\text{CH}$ ); 3,66-3,79 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7,88 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz, 1H, arom. H); 8,15 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz,  $J_{\text{HH}2} = 1,7$  Hz, 1H, arom. H); 8,31 (d,  $J_{\text{HH}} = 1,7$  Hz, 1H, arom. H); 10,05 (s, 1H,  $\text{CHO}$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = -5,77, -5,69 ( $\text{SiCH}_3$ ); 16,58; 17,69; 25,53; 36,48; 67,25; 124,35, 129,71, 131,94, 134,97, 143,97, 150,94 (arom. C); 191,27 ( $\text{CHO}$ ) ppm.

MS (ESI):  $m/z$  berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>Si [M] 323,2; gefunden 323,1.

Elementaranalyse (C, H, N): berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>Si (%) C 49,41; H 7,79; N 4,33; gefunden C 59,26; H 7,81; N 4,45.

**[4-(2-(*tert*butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl)-3-nitrophenyl]-methanol (219)**

Verbindung **217** (4,17 g, 12,9 mmol, 1 eq.) wurde in Ethanol (abs.; 20 mL) gelöst und Natriumborhydrid (139 mg, 3,30 mmol, 0,25 x 1,02 eq.) wurde hinzugefügt. Die Lösung wurde sofort gelb und dann mit der Zeit wieder blasser. Die Lösung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte, dass das Ausgangsmaterial vollständig verbraucht war. Die Lösung wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt, um evtl. überschüssiges Natriumborhydrid zu zerstören. Anschließend wurde die Lösung in einer Mischung aus Wasser und Dichlormethan verteilt und nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase ein weiteres Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält das Produkt in Form einer gelben, zähen Flüssigkeit (4,1 g, 12,6 mmol, 98 %). Es wird ohne Aufreinigung weiterverwendet.

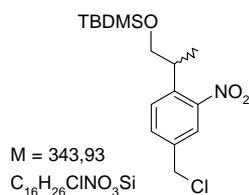
**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan / Ethylacetat 6:4) = 0,50

**<sup>1</sup>H NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = -0,10, -0,08 (6H, 2 x SiCH<sub>3</sub>); 0,76 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,22-3,31 (m, 1H, CH); 3,64-3,70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,54 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 5,41 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,7 Hz, 1H, OH); 7,56-7,57 (m, 2H, arom. H); 7,69-7,70 (m, 1H, arom. H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (62,5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = -5,62, -5,59 (SiCH<sub>3</sub>); 17,05; 17,81; 25,66 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,80; 61,53; 67,56; 120,78, 128,31, 130,21, 135,77, 142,35, 150,36 (arom. C) ppm.

**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 326,2; gefunden 326,0.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>Si (%) C 59,04; H 8,36; N 4,30; gefunden C 59,11; H 8,23; N 4,31.

**1-[2-(*tert*Butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-4-(chlormethyl)-2-nitro-benzol (221)**


Verbindung **219** (1,67 g, 5,13 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (20 mL) gelöst. Es wurde nacheinander 4-(Dimethylamino)pyridin (62,3 mg, 513  $\mu$ mol, 0,1 eq.), *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin (1,01 mL, 10,3 mmol, 2 eq.) und Mesitylsulfonylchlorid (1,12 g, 5,13 mmol, 1 eq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Laut DC war kaum noch Ausgangsmaterial vorhanden. Die Lösung wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 95:5) und man erhielt das Produkt als hellgelbes, viskoses Öl, das bei -20°C langsam auskristallisiert (1,53 g, 4,45 mmol, 87 %).

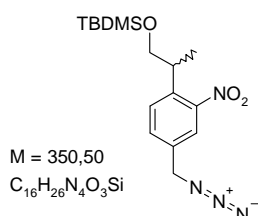
**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan / Ethylacetat 8:2) = 0,80

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = -0,11, -0,09 (6H, 2 x SiCH<sub>3</sub>); 0,74 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,25-3,32 (m, 1H, CH); 3,61-3,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl); 7,64 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,1 Hz, 1H, arom. H); 7,72 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,3 Hz, J<sub>HH2</sub> = 2,0 Hz, 1H, arom. H); 7,88 (d, J<sub>HH</sub> = 1,9 Hz, 1H, arom. H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = -5,69, -5,62 (SiCH<sub>3</sub>); 16,78; 17,76; 25,61 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,91; 44,29; 67,46; 123,46, 129,07, 132,78, 137,22, 137,72, 150,43 (arom. C) ppm.

**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>ClNO<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 344,1; gefunden 344,1.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>ClNO<sub>3</sub>Si (%) C 55,88; H 7,62; N 4,07; gefunden C 55,70; H 7,47; N 3,94.

**4-(Azidomethyl)-1-[2-(*tert*butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-2-nitro-benzol (222)**


Verbindung **221** (1,53 g, 4,45 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Natriumazid (578 mg, 8,90 mmol, 2 eq.) wurde die Lösung 30 Minuten lang unter Rückflusskühlung auf 100°C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Nach Abkühlen auf

Raumtemperatur zeigte ein DC, dass die Ausgangsverbindung vollständig umgesetzt worden war. Das DMF wurde weitestgehend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Wasser und Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält das Produkt als gelbes Öl (1,51 g, 4,31 mmol, 96,8 %).

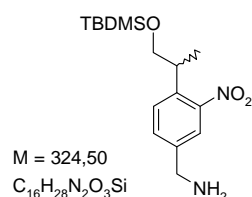
$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 8:2) = 0,60

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = -0,12, -0,10 (6H, 2 x  $\text{SiCH}_3$ ); 0,74 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,24 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3,24-3,35 (m, 1H,  $\text{CH}$ ); 3,61-3,73 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 4,54 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ); 7,65-7,66 (m, 2H, arom.  $H$ ); 7,81-7,82 (m, 1H, arom.  $H$ ) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = -5,75, -5,68 ( $\text{SiCH}_3$ ); 16,74; 17,71; 25,56 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ); 35,84; 52,07; 67,45; 122,95, 129,00, 132,21, 135,33, 137,41, 150,54 (arom.  $C$ ) ppm.

**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  351,2; gefunden 351,1.

#### 4-(Aminomethyl)-1-[2-(*tert*butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-2-nitro-benzol (218)



Verbindung **222** (1,51 g, 4,31 mmol, 1 eq.) wurde in einer Mischung aus wasserfreiem THF (10 mL) und wasserfreiem Acetonitril (10 mL) gelöst. Triphenylphosphin (1,13 g, 4,31 mmol, 1 eq.) wurde hinzugegeben und die Lösung wurde gerührt, bis das Triphenylphosphin vollständig gelöst war. Dabei trat eine leichte Gasentwicklung auf. Die Mischung wurde anschließend 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt (70°C Ölbadtemperatur). Ein DC (Cyclohexan / Ethylacetat 9:1) zeigte, dass die Ausgangsverbindung vollständig aufgebraucht war. Der Reaktionsmischung wurde Wasser (10 mL) hinzugefügt und die Mischung wurde weitere 4 Stunden refluxiert (75°C Badtemperatur). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur konnte auf dem DC (Dichlormethan / Methanol 9:1) mit Ninhydrin-Färbung die Entstehung eines Amins nachgewiesen werden. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer und anschließend im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 9:1). Man erhielt das Produkt in Form eines gelben, viskosen Öls (1,27 g, 3,91 mmol, 90,8 %).

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 9:1)  $\approx$  0,5 (Produkt schmiert auf dem DC)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = -0,09, -0,08 (6H, 2 x  $\text{SiCH}_3$ ); 0,77 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,23 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,98 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 3,18-3,29 (m, 1H,  $\text{CH}$ ); 3,62-3,71 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,75 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 7,51-7,60 (m, 2H, arom.  $H$ ); 7,73-7,75 (m, 1H, arom.  $H$ ) ppm.

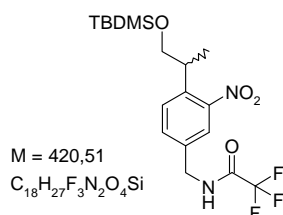


$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = -5,65, -5,62$  (SiCH $_3$ ); 17,07; 17,77; 25,62 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ); 35,75; 44,36; 67,51; 121,44, 128,12, 131,01, 135,14, 144,07, 150,36 (arom. C) ppm.

MS (ESI):  $m/z$  berechnet für C $_{16}$ H $_{29}$ N $_2$ O $_3$ Si [M+H] $^+$  325,2; gefunden 325,0.

Elementaranalyse (C, H, N): berechnet für C $_{16}$ H $_{28}$ N $_2$ O $_3$ Si (%) C 59,22; H 8,70; N 8,63; gefunden C 58,93; H 8,69; N 8,35.

### 1-[2-(*tert*Butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-2-nitro-4-(trifluoroacetamidomethyl)-benzol (224)



Verbindung **218** (1,20 g, 3,70 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) gelöst und *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin (2,53 mL, 14,8 mmol, 3 eq.) wurde hinzugefügt. Anschließend wurde vorsichtig mit einer Spritze Trifluoressigsäureanhydrid (1,03 mL, 7,40 mmol, 1,5 eq.) zugegeben. Wegen des hohen Dampfdrucks des Anhydrids empfiehlt es sich, die Kanüle der Spritze so zu verbiegen, dass die Spritze nach unten gehalten werden kann und der Inhalt nicht ausläuft. Während der Zugabe des Trifluoressigsäureanhydrids bildete sich ein weißer Nebel im Kolben. Die Mischung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte, dass das Amin vollständig umgesetzt worden war. Die Reaktionsmischung wurde im Hochvakuum vorsichtig von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt als bräunlich-gelbes, viskoses Öl (1,58g, vollständige Umsetzung).

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 95:5) = 0,94

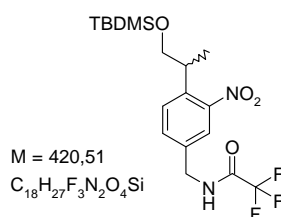
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = -0,11, -0,10$  (6H, 2 x SiCH $_3$ ); 0,74 (s, 9H, SiC(CH $_3$ ) $_3$ ); 1,23 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, 3H, CH $_3$ ); 3,24-3,31 (m, 1H, CH); 3,60-3,71 (m, 2H, CH $_2$ ); 4,42-4,46 (m, 2H, CH $_2$ NCOCF $_3$ ); 7,54-7,64 (m, 2H, arom. H); 7,71-7,72 (m, 1H, arom. H); 10,02-10,07 (m, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = -5,74, -5,66$  (SiCH $_3$ ); 16,83; 17,72; 25,57 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ); 35,80; 41,55; 67,46; 122,26; 128,84; 131,47; 136,71; 137,04; 150,37; 156,17; 156,66 ppm.

MS (ESI):  $m/z$  berechnet für C $_{18}$ H $_{26}$ F $_3$ N $_2$ O $_4$ Si [M-H] $^-$  419,2; gefunden 419,2

Elementaranalyse (C, H, N): berechnet für C $_{18}$ H $_{27}$ F $_3$ N $_2$ O $_4$ Si (%) C 51,41; H 6,47; N 6,66; gefunden C 51,66; H 6,53; N 6,53.

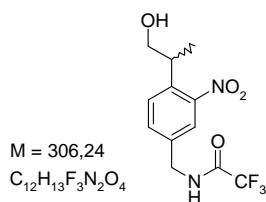
### 1-[2-(*tert*Butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-2-nitro-4-(trifluoracetamidomethyl)-benzol (224) – Variante 2



Bei dieser Synthesevorschrift handelt es sich um eine Alternative zu den vorangegangenen 3 Stufen. Hier wird das Chlorid **221** direkt mit Trifluoracetamid zum gewünschten Produkt umgesetzt. Da dieser Weg drei Synthesestufen durch eine ersetzt, ist er schneller und wirkt auf den ersten Blick auch eleganter. Jedoch ist die Gesamtausbeute über die zuletzt beschriebenen drei Stufen deutlich besser als die Ausbeute dieser Reaktion (87,9 % gegenüber 58 %).

Die Reaktion wurde entsprechend einer abgewandelten Literaturvorschrift<sup>[208]</sup> durchgeführt: Trifluoracetamid (1,80 g, 16,0 mmol, 1,5 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (35 mL) gelöst. Vorsichtig wurde Natriumhydrid (60 % in Paraffin, rieselfähig; 597 mg, 14,9 mmol, 0,93 eq.) hinzugegeben und die Mischung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde eine Lösung von Verbindung **221** (3,67 g, 10,6 mmol, 1 eq.) in DMF (5 mL) hinzugegeben und die Lösung wurde unter Rückfluskkühlung auf 80°C erhitzt. Nach 3,5 Stunden zeigte ein DC, dass immer noch Ausgangsmaterial vorhanden war. Also wurde eine Lösung von Trifluoracetamid (1,80 g, 16,0 mmol, 1,5 eq.) und Natriumhydrid (597 mg, 14,9 mmol, 0,93 eq.) in DMF (10 mL) hinzugegeben und die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem ein weiteres DC immer noch eine unvollständige Reaktion zeigte wurde eine weitere Portion Trifluoracetamid/Natriumhydrid-Lösung hinzugegeben. Nach weiteren 6 Stunden Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase noch ein weiteres Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 9:1). Man erhielt das gewünschte Produkt in Form eines bräunlich-gelben, viskosen Öls (2,61 g, 6,21 mmol, 58 %).

**Analytik:** s.o.

**2-[-2-Nitro-4-(trifluoracetamidomethyl)-phenyl]-propan-1-ol (207)**

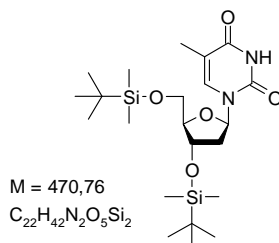
Verbindung **224** (1,51 g, 3,59 mmol) wurde in einer Mischung aus Wasser (5 mL), THF (5 mL) und Essigsäure (15 mL) gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte vollständige Umsetzung. Das THF wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase nacheinander mit Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden jeweils zweimal mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 6:4) und man erhielt das Produkt als bräunlich-gelbes, viskoses Öl (1,04 g, 3,40 mmol, 94 %).

**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan / Ethylacetat 6:4) = 0,30

**<sup>1</sup>H NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,13-3,26 (m, 1H, CH); 3,48-3,53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,43-4,47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NCOCF<sub>3</sub>); 4,73-4,78 (m, 1H, OH); 7,52-7,62 (m, 2H, arom. H); 7,69-7,72 (m, 1H, arom. H); 10,02-10,09 (m, 1H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (62,5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 17,6; 36,1; 41,6; 65,8; 122,3; 128,8; 131,5; 136,8; 137,3; 150,3; 156,2; 156,8 ppm.

**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M-H]<sup>-</sup> 305,1; gefunden 305,0.

**3.2.12 Synthese des dT-NPP-NH<sub>2</sub>****3',5'-O,O-Di(*tert*butyldimethylsilyl)- 2'-desoxythymidin (226)**

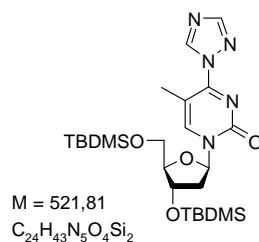
Die Silylierung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt: Thymidin (10,0 g, 41,3 mmol, 1 eq.), Imidazol (19,8 g, 291,3 mmol, 7 eq.) und *tert*Butyldimethylsilylchlorid (24,9 g, 165 mmol, 4 eq.)

wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem DMF (25 mL) gelöst. Die Lösung wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanol (100 ml) gequenchet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der verbleibende, gelartige, gelbe Rückstand wurde in einer Mischung aus Wasser und Ethylacetat verteilt. Die organische Phase wurde nacheinander mit Salzsäure (1 M), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das gewünschte Produkt in Form eines weißen Feststoffes (19,4 g, quantitative Umsetzung).

$R_f$  (Dichlormethan / Ethanol 9:1) = 0,83

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,08 (s, 6H, TBDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,11 (s, 6H, TBDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,89 (s, 9H, TBDMS- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 0,93 (s, 9H, TBDMS- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,91 (s, 3H, 5-Me); 1,97-2,02 (m, 1H,  $H-2'$ ); 2,22-2,27 (m, 1H,  $H-2'$ ); 3,74-3,78 (m, 1H,  $H-5'$ ); 3,85-3,88 (m, 1H,  $H-5'$ ); 3,92-3,94 (m, 1H,  $H-4'$  oder  $H-3'$ ); 4,39-4,42 (m, 1H,  $H-3'$  oder  $H-4'$ ); 6,30-6,34 (m, 1H,  $H-1'$ ); 7,46 (s, 1H, arom.  $H$ ); 8,33 (s, 1H,  $\text{NH}$ ) ppm.

#### 4-(1,2,4-Triazol-1-yl)-3',5'-*O,O*-di(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxythymidin (**228**)



1,2,4-Triazol (11,8 g, 170 mmol, 20 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in Acetonitril (250 ml) suspendiert. Die Mischung wurde im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Phosphorylchlorid (6,70 g, 43,7 mmol, 4 ml, 5 eq.) wurde langsam hinzu gegeben. Anschließend wurde Triethylamin (17,2 g, 170 mmol, 23,7 ml, 20 eq.) unter starkem Rühren langsam hinzugefügt. Die Mischung wurde 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von 3',5'-*O,O*-Di(*tert*butyldimethylsilyl)-thymidin (**226**) (4,0 g, 8,5 mmol, 1 eq.) in Acetonitril (60 ml) über einen Tropftrichter innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand wurde in einer Mischung aus gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Dichlormethan verteilt. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gewünschte Produkt wurde in Form eines blassgelben Feststoffes erhalten (4,78 g, vollständige Umsetzung). Das Produkt wurde unaufgereinigt weiterverwendet.

$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 1:1) = 0,50

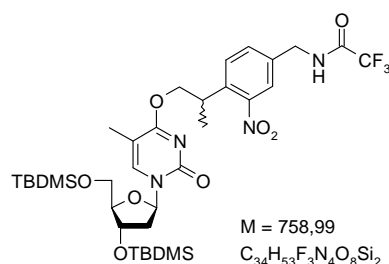
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,05-0,07 (m, 6H, TBDMS-CH<sub>3</sub>); 0,09-0,10 (m, 6H, TBDMS-CH<sub>3</sub>); 0,88 (s, 9H, TBDMS-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,89 (s, 9H, TBDMS-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,02-2,09 (m, 1H, H-2'); 2,42 (m, 3H, 5-Me); 2,59-2,65 (m, 1H, H-2'); 3,76-3,80 (m, 1H, H-5'); 3,92-3,96 (m, 1H, H-5'); 4,03-4,05 (m, 1H, H-3' oder H-4'); 4,36-4,39 (m, 1H, H-3' oder H-4'); 6,26 (m, 1H, H-1'); 8,08 (s, 1H, Triazol-arom. H); 8,23 (m, 1H, arom. H); 9,26 (s, 1H, Triazol-arom. H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = -5,4; -5,3; -4,9; -4,5; 8,7; 17,3; 18,0; 18,4; 25,8; 26,0; 42,7; 45,9; 62,6; 71,7; 87,8; 88,8; 105,3; 145,1; 146,7; 153,4; 154,0; 158,1 ppm.

**MS** (FAB): *m/z* berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 522,3; gefunden 522,3.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub> (%) C 55,24; H 8,31; N 13,42; gefunden C 53,82; H 8,66; N 12,86.

### Thymidin-Derivat 229



Thymidin-Derivat **228** (1,72 mg, 3,30 mmol, 1,1 eq.), Alkohol **207** (919 mg, 3,00 mmol, 1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Acetonitril (20 mL) gelöst. DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; 493 μL, 3,30 mmol, 1,1 eq.) wurde hinzugefügt und die Mischung wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Isopropanol 98:2). Man erhielt das Produkt als hellgelben Schaum (2,05 g, 2,70 mmol, 90 %).

**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan / Isopropanol 96:4) = 0,40

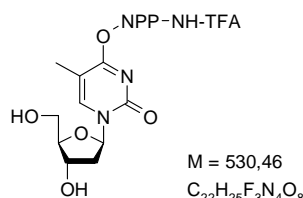
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,05-0,08 (m, 12 H, TBDMS-CH<sub>3</sub>); 0,85-0,88 (m, 18H, TBDMS-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,9 Hz; 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 1,70 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 2,01-2,24 (m, 2H, 2 x H-2'); 3,57-3,87 (m, 4H); 4,30-4,48 (m, 5H); 6,08-6,13 (m, 1H, H-1'); 7,57-7,76 (m, 4H, NPP-arom. H und H-6); 10,01 (bs, 1H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = -5,6; -5,0; -4,9; 11,4; 17,4; 17,6; 17,9; 25,6; 25,6; 32,5; 40,4; 41,6; 61,9; 62,5; 70,3; 71,9; 85,4; 85,5; 87,2; 102,8; 102,8; 113,9; 117,8; 122,4; 128,9; 128,9; 131,8; 135,8; 135,8; 137,5; 140,3; 150,0; 150,0; 154,3; 155,7; 156,2; 156,7; 169,2 ppm.

**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 759,3; gefunden 759,6.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $C_{34}H_{53}F_3N_4O_8Si_2$  (%) C 53,81; H 7,04; N 7,38; gefunden C 53,60; H 6,89; N 7,34.

### Thymidin-Derivat 230



Verbindung **229** (1,93 g, 2,54 mmol) wurde in einer Mischung aus Wasser (5 mL), THF (5 mL) und Essigsäure (15 mL) gelöst und die Mischung wurde für 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit einer Mischung aus Dichlormethan / Isopropanol 9:1 verdünnt und nacheinander mit gesättigter Kochsalzlösung und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden jeweils noch zweimal mit Dichlormethan / Isopropanol 9:1 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 95:5 → 90:10). Man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (795 mg, 1,50 mmol, 59 %). Außerdem konnte noch eine Fraktion isoliert werden, die laut NMR-Spektrum der einfach desilylierten Thymidin-Spezies entsprach => evtl. sollte eine längere Reaktionszeit gewählt werden.

**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan / Methanol 85:15) = 0,50

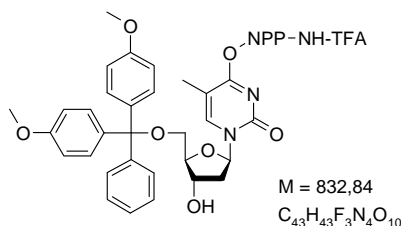
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1,34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz; 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 1,71 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>); 1,92-2,02 (m, 1H, H-2'); 2,13-2,22 (m, 1H, H-2'); 3,51-3,65 (m, 3H); 3,78-3,81 (m, 1H); 4,17-4,24 (m, 1H); 4,32-4,48 (m, 4H); 5,01-5,05 (m, 1H, OH); 5,20-5,22 (m, 1H, OH); 6,08-6,13 (m, 1H, H-1'); 7,57-7,61 (m, 1H); 7,73-7,76 (m, 2H); 7,96-7,98 (m, 1H); 10,01-10,06 (m, 1H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 11,4; 17,4; 32,6; 40,5; 41,6; 54,8; 60,9; 69,9; 70,2; 85,4; 87,5; 102,6; 114,0; 117,8; 122,4; 128,9; 131,8; 135,8; 137,5; 141,0; 150,0; 154,4; 156,3; 156,7; 169,2 ppm.

**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 531,2; gefunden 531,4.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (%) C 49,81; H 4,75; N 10,56; gefunden C 48,17; H 4,88; N 9,46.

## Thymidin-Derivat 231



Verbindung **230** (751 mg, 1,42 mmol, 1 eq.) wurde in Pyridin gelöst (60 mL) und die Hälfte des Pyridins wurde wieder am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde die Lösung unter Argonatmosphäre im Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (576 mg, 1,70 mmol, 1,2 eq.) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Ethanol (5 mL) hinzugegeben und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit Citronensäurelösung (5 % in Wasser) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, die wässrigen Phasen noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 95:5, Säule mit 0,5 % Triethylamin gepackt). Man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (1,10 g, 1,32 mmol, 93 %).

$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 95:5) = 0,26

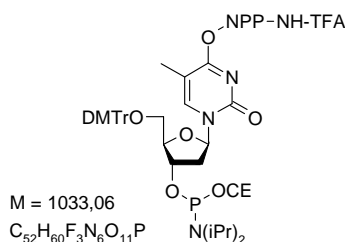
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,33-1,39 (m, 6H, NPP- $\text{CH}_3$  und 5- $\text{CH}_3$ ); 2,08-2,17 (m, 1H,  $H$ -2'); 2,22-2,31 (m, 1H,  $H$ -2'); 3,18-3,25 (m, 2H); 3,55-3,67 (m, 1H); 3,73 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ); 3,91-3,95 (m, 1H); 4,27-4,48 (m, 5H); 5,31-5,33 (m, 1H, 3'-OH); 6,12-6,18 (m, 1H,  $H$ -1'); 6,86-6,91 (m, 4H, DMTr-arom.  $H$ ); 7,19-7,39 (m, 9H, DMTr-arom.  $H$ ); 7,57-7,61 (m, 1H); 7,73-7,78 (m, 3H); 10,01-10,06 (m, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11,0; 17,4; 32,5; 40,6; 41,6; 54,8; 55,0; 70,1; 85,4; 85,7; 85,8; 102,9; 113,2; 122,4; 126,7; 127,6; 127,8; 128,9; 129,7; 131,8; 135,2; 135,4; 135,8; 137,5; 144,6; 150,0; 154,3; 158,1; 169,2 ppm.

**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{F}_3\text{NaN}_4\text{O}_{10}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  855,3; gefunden 855,5.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_{10}$  (%) C 62,01; H 5,20; N 6,73; gefunden C 59,70; H 5,24; N 6,37.

## Thymidin-Derivat 208



Verbindung **231** (200 mg, 240  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (7 mL) gelöst. *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin (206  $\mu\text{L}$ , 1,2 mmol, 5 eq.) wurde hinzugefügt und die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit einer Spritze Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (107  $\mu\text{L}$ , 480  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 2:1; Säule mit 0,5 % *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin gepackt) und man erhielt das Produkt in Form eines blaßgelben Schaums (226 mg, 219  $\mu\text{mol}$ , 91 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 1:1 mit 1 % Triethylamin) = 0,63

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0,97-1,14 (m, 12H, *iPr-CH*<sub>3</sub>); 1,33-1,42 (m, 6H, NPP-*CH*<sub>3</sub> und 5-*CH*<sub>3</sub>); 2,24-2,45 (m, 2H, 2 x *H-2'*); 2,61-2,77 (m, 2H, Cyanoethyl-*CH*<sub>2</sub>); 3,23-3,29 (m, 2H); 3,45-3,70 (m, 5H); 3,72-3,73 (m, 6H, 2 x OMe); 4,03-4,10 (m, 1H); 4,34-4,56 (m, 5H); 6,12-6,19 (m, 1H, *H-1'*); 6,85-6,89 (m, 4H, DMTr-arom. *H*); 7,22-7,38 (m, 9H, DMTr-arom. *H*); 7,57-7,60 (m, 1H); 7,73-7,80 (m, 3H); 10,01-10,04 (m, 1H, *NH*) ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 147,4; 147,8 ppm.

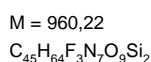
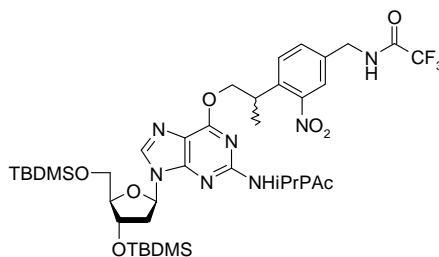
**MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>60</sub>H<sub>80</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>P [M+HNEt(*iPr*)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 1163,3; gefunden 1163,2.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>60</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>P (%) C 60,46; H 5,85; N 8,14; gefunden C 60,24; H 5,96; N 7,90.



### 3.2.13 Synthese des dG-NPP-NH<sub>2</sub>

#### Guanosinderivat 232



Nukleosid **185** (2,47 g, 3,68 mmol, 1 eq.), Alkohol **207** (1,69 g, 5,52 mmol, 1,5 eq.) und Triphenylphosphin (1,46 g, 5,52 mmol, 1,5 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in wasserfreiem THF (30 mL) gelöst. Diethylazodicarboxylat (40 % in Toluol; 2,53 mL, 5,52 mmol, 1,5 eq.) wurde mit einer Spritze hinzugefügt. Die Lösung wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem ein DC zeigte, dass die Reaktion unvollständig abgelaufen war, wurde jeweils ein weiteres Äquivalent Diethylazodicarboxylat-Lsg. (1,69 mL, 3,68 mmol) und Triphenylphosphin (0,97 g, 3,68 mmol) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden jeweils noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1). Da das Produkt noch Verunreinigungen enthielt wurde es einer weiteren Aufreinigung durch MPLC unterzogen (Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm in befüllbarer 160 x 40 mm Kunststoffkartusche; Cyclohexan / Ethylacetat 3:1). Man erhielt das Produkt als hellgelben Schaum (2,02 g, 2,10 mmol, 57 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1) = 0,63

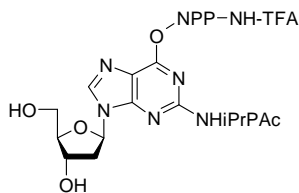
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = -0,02-0,08 (m, 12H, 4 x TBDMS-CH<sub>3</sub>); 0,82 (s, 9H, TBDMS-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,86 (s, 9H, TBDMS-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,14-1,18 (m, 6H, iPr-CH<sub>3</sub>); 1,36-1,39 (m, 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 2,26-2,32 (m, 1H, H-2'); 2,78-2,85 (m, 1H, iPr-CH); 2,88-2,95 (m, 1H, H-2'); 3,63-3,67 (m, 1H, H-5'); 3,72-3,78 (m, 2H, NPP-CH und H-5'); 3,82-3,86 (m, 1H, H-4'); 4,45-4,48 (m, 2H, TFA-CH<sub>2</sub>); 4,57-4,61 (m, 1H, H-3'); 4,68-4,79 (m, 2H, NPP-CH<sub>2</sub>); 4,94 (s, 2H, iPrPac-CH<sub>2</sub>); 6,29-6,33 (m, 1H, H-1'); 6,82-6,86 (m, 2H, iPrPac-arom. H); 7,11-7,15 (m, 2H, iPrPac-arom. H); 7,58-7,61 (m, 1H, NPP-arom. H); 7,77-7,80 (m, 2H, NPP-arom. H); 8,36 (s, 1H, H-8); 10,04-10,07 (m, 1H, TFA-NH); 10,57 (s, 1H, iPrPac-NH) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (62,5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = -5,56, -5,54, -5,00, -4,84 (TBDMS-SiCH<sub>3</sub>); 17,66; 17,93; 17,99; 24,07 (iPr-CH<sub>3</sub>); 25,64, 25,72 (TBDMS-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 32,60 (iPr-CH); 33,02 (NPP-CH); 38,52

(C-2'); 41,61 (TFA-CH<sub>2</sub>); 62,81 (C-5'); 67,31 (iPrPac-CH<sub>2</sub>); 70,29 (NPP-CH<sub>2</sub>); 72,11 (C-3'); 83,44 (C-1'); 87,40 (C-4'); 114,27; 117,48; 122,80; 127,05; 129,02; 131,96; 135,80; 137,62; 140,82; 141,41; 149,90; 151,48; 152,58; 156,04; 156,55; 159,88; 167,29 ppm.

**HR-MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>45</sub>H<sub>65</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 960,4329; gefunden 960,4324.

### Guanosinderivat 233



M = 731,69  
C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>

Nukleosid **232** (2,01 g, 2,09 mmol, 1 eq.) wurde in THF (50 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit Essigsäure (1,43 mL, 25,2 mmol, 12 eq.) versetzt, gefolgt von Tetrabutylammoniumfluoridlösung (1M in THF; 6,35 mL, 6,31 mmol, 3 eq.). Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Ein DC zeigte, dass die Ausgangsverbindung vollständig aufgebraucht war. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 95:5 → 90:10). Man erhält das Produkt als blaßgelben Schaum (1,09 g, 1,49 mmol, 71 %).

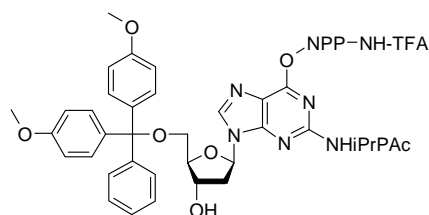
**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan / Methanol 9:1) = 0,30

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, 6H, iPr-CH<sub>3</sub>); 1,37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, 3H, NPP-CH<sub>3</sub>); 2,25-2,32 (m, 1H, H-2'); 2,65-2,73 (m, 1H, H-2'); 2,78-2,87 (m, 1H, iPr-CH); 3,47-3,62 (m, 2H, 2 x H-5'); 3,72-3,80 (m, 1H, NPP-CH); 3,84-3,87 (m, 1H, H-4'); 4,39-4,43 (m, 1H, H-3'); 4,45-4,48 (m, 2H, TFA-CH<sub>2</sub>); 4,68-4,79 (m, 2H, NPP-CH<sub>2</sub>); 4,89-4,92 (m, 1H, 5'-OH); 4,98 (s, 2H, iPrPac-CH<sub>2</sub>); 5,31-5,33 (m, 1H, 3'-OH); 6,31-6,35 (m, 1H, H-1'); 6,84-6,87 (m, 2H, iPrPac-arom. H); 7,13-7,17 (m, 2H, iPrPac-arom. H); 7,58-7,61 (m, 1H, NPP-arom. H); 7,77-7,81 (m, 2H, NPP-arom. H); 8,42 (s, 1H, H-8); 10,04-10,08 (m, 1H, TFA-NH); 10,58 (s, 1H, iPrPac-NH) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (62,5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 17,98 (NPP-CH<sub>3</sub>); 24,09 (iPr-CH<sub>3</sub>); 32,59 (iPr-CH); 33,01 (NPP-CH); 39,45 (C-2'); 41,61 (TFA-CH<sub>2</sub>); 61,58 (C-5'); 67,39 (iPrPac-CH<sub>2</sub>); 70,31 (NPP-CH<sub>2</sub>); 70,62 (C-3'); 83,30 (C-1'); 87,90 (C-4'); 114,3; 117,2; 122,8; 127,1; 129,0; 131,9; 135,8; 137,6; 140,8; 141,2; 149,9; 151,5; 152,6; 152,7; 156,0; 156,3; 156,8; 159,81; 159,83; 167,6 ppm.

**HR-MS** (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 732,2599; gefunden 732,2614.

## Guanosinderivat 234



M = 1034,07  
 $C_{54}H_{54}F_3N_7O_{11}$

Nukleosid **233** (1,05 g, 1,43 mmol, 1 eq.) wurde in Pyridin (50 mL) gelöst und das Pyridin anschließend am Rotationsverdampfer wieder entfernt. Der Rückstand wurde in wasserfreiem Pyridin (20 mL) aufgenommen und unter Argonatmosphäre im Eisbad auf 0°C abgekühlt. 4,4'-Dimethoxytrytylchlorid (583 mg, 1,72 mmol, 1,2 eq.) wurde hinzugefügt und die Lösung wurde 1 Stunde bei 0°C gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Pyridin wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wurde nacheinander mit Citronensäurelösung (5 % in Wasser) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden jeweils noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Methanol 98:2; zum Packen der Säule wurde dem Laufmittel 0,5 % Triethylamin zugesetzt). Man erhält das Produkt als blass gelben Schaum (1,15 g, 1,11 mmol, 78 %).

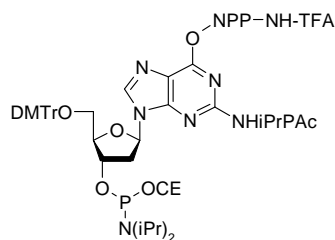
$R_f$  (Dichlormethan / Methanol 95:5) = 0,30

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,16 (d,  $^3J_{HH}$  = 6,9 Hz, 6H, iPr- $CH_3$ ); 1,38 (d,  $^3J_{HH}$  = 6,9 Hz, 3H, NPP- $CH_3$ ); 2,32-2,38 (m, 1H, H-2'); 2,77-2,89 (m, 2H, iPr- $CH$  und H-2'); 3,07-3,12 (m, 1H, H-5'); 3,25-3,30 (m, 1H, H-5'); 3,68-3,70 (m, 6H, 2 x OMe); 3,72-3,81 (m, 1H, NPP- $CH$ ); 3,96-4,00 (m, 1H, H-4'); 4,46-4,50 (m, 3H, TFA- $CH_2$  und H-3'); 4,67-4,79 (m, 2H, NPP- $CH_2$ ); 4,93-4,96 (m, 2H, iPrPac- $CH_2$ ); 5,32-5,34 (m, 1H, 3'-OH); 6,36-6,40 (m, 1H, H-1'); 6,70-6,86 (m, 6H, DMTr oder iPrPac arom. H); 7,13-7,30 (m, 11H, DMTr oder iPrPac arom. H); 7,59-7,62 (m, 1H, NPP-arom. H); 7,79-7,82 (m, 2H, NPP-arom. H); 8,32 (s, 1H, H-8); 10,04-10,08 (m, 1H, TFA-NH); 10,53-10,55 (m, 1H, iPrPac-NH) ppm.

$^{13}C$  NMR (62,5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 18,0 (NPP- $CH_3$ ); 24,1 (iPr- $CH_3$ ); 32,6 (iPr-H); 33,0 (NPP- $CH$ ); 38,5 (C-2'); 41,6 (TFA- $CH_2$ ); 54,9 (OMe); 64,4 (C-5'); 67,4 (iPrPac- $CH_2$ ); 70,3 (NPP- $CH_2$ ); 70,6 (C-3'); 83,5 (C-1'); 85,3 (DMTr); 86,3 (C-4'); 112,9, 113,0, 114,3 (DMTr); 117,5; 118,2; 122,8; 126,5; 127,1; 127,6; 129,0; 129,6; 129,7; 132,0; 135,5; 135,6; 135,8; 137,6; 140,8; 141,4; 144,9; 149,9; 151,4; 151,5; 152,5; 156,0; 156,3; 156,8; 157,9; 159,9; 167,3 ppm.

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $C_{54}H_{55}F_3N_7O_{11}$   $[M+H]^+$  1034,3906; gefunden 1034,3908.

## Guanosinderivat 209



M = 1234,29  
 $C_{63}H_{71}F_3N_9O_{12}P$

Nukleosid **234** (100 mg, 96,7  $\mu$ mol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL) gelöst. *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin (82,8  $\mu$ L, 484  $\mu$ mol, 5 eq.) wurde hinzugefügt und die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit einer Spritze Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (43,1  $\mu$ L, 193  $\mu$ mol, 2 eq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Aceton 2:1; Säule mit 0,5 % *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin gepackt) und man erhielt das Produkt in Form eines blaßgelben Schaums (99 mg, 80,2  $\mu$ mol, 83 %).

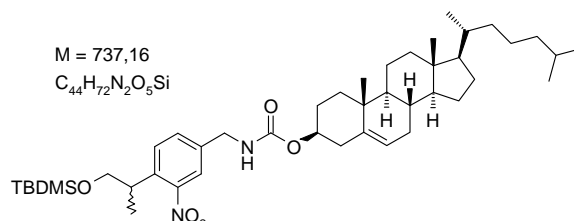
$R_f$  (Cyclohexan / Aceton 1:1, 0,5 % *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin) = 0,50

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0,97-1,17 (m, 18 H, 3 x *iPr*-CH( $CH_3$ ) $_2$ ); 1,37-1,39 (m, 3H, NPP- $CH_3$ ); 2,43-2,56 (m, 1H, H-2'); 2,56-2,73 (m, 2H, Cyanoethyl- $CH_2$ ); 2,77-2,87 (m, *iPrPac*-*iPr*-CH); 2,98-3,06 (m, 1H, H-2'); 3,14-3,24 (m, 2H, 2 x H-5'); 3,45-3,55 (m, 2H, N(*iPrCH*) $_2$ ); 3,57-3,78 (m, 2H, Cyanoethyl- $CH_2$ ); 3,65-3,78 (m, 1H, NPP-CH); 3,68-3,69 (m, 6H, 2 x OMe); 4,03-4,12 (m, 1H, H-4'); 4,44-4,47 (m, 2H, TFA- $CH_2$ ); 4,66-4,78 (m, 3H, NPP- $CH_2$  und H-3'); 4,91-4,94 (m, 2H, *iPrPac*- $CH_2$ ); 6,35-6,39 (m, 1H, H-1'); 6,70-6,77 (m, 4H, DMTr-arom. H) 6,80-6,84 (m, 2H, *iPrPac*-arom. H); 7,12-7,18 (m, 9H, 4 x DMTr-arom. H und 2 x *iPrPac*-arom. H); 7,26-7,30 (m, 2H, DMTr-arom. H); 7,57-7,61 (m, 1H, NPP-arom. H); 7,77-7,81 (m, 2H, NPP-arom. H); 8,30-8,32 (m, 1H, H-8); 10,03-10,07 (m, 1H, TFA-NH); 10,48-10,50 (m, 1H, *iPrPac*-NH) ppm.

$^{31}P$  NMR (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 147,3; 148,0 ppm.

### 3.2.14 Synthese des dT-NPP-Chol

#### NPP-Derivat 243



Verbindung **218** (2,05 g, 6,32 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (155 mg, 947  $\mu$ mol, 0,15 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in einer Mischung aus wasserfreiem Pyridin (40 mL) und wasserfreiem Dichlormethan (40 mL) gelöst und mit *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin (2,2 mL, 12,6 mmol, 2 eq.) versetzt. Anschließend wurde Cholesterylchloroformiat (2,84 g, 6,32 mmol, 1 eq.) hinzugegeben und die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, mit Citronensäurelösung (5 % in Wasser) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 9:1). Man erhielt das Produkt als farblosen Schaum (4,26 g, 5,78 mmol, 91 %).

$R_f$  (Cyclohexan / Ethylacetat 9:1) = 0,33

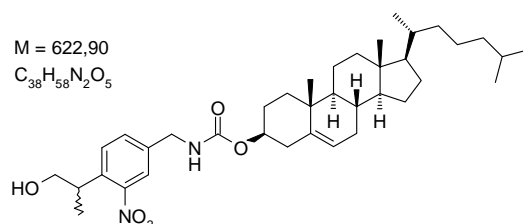
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = -0,10-(-0,09) (m, 6H, TBDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,65 (s, 3H, Chol); 0,75 (s, 9H, TBDMS- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 0,83-2,32 (m, 43H); 3,22-3,29 (m, 1H); 3,61-3,70 (m, 2H, NPP- $\text{CH}_2$ ); 4,18-4,21 (m, 2H, N- $\text{CH}_2$ ); 4,28-4,36 (m, 1H); 5,31-5,34 (m, 1H, Chol- $\text{C}=\text{CH}$ ); 7,50-7,73 (m, 4H, 3 x NPP-arom. *H* und *NH*) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = -5,43; -5,41; 12,0; 17,5; 18,4; 18,9; 19,5; 21,2; 22,7; 23,0; 24,0; 24,4; 26,0; 28,2; 28,3; 28,4; 32,0; 32,1; 35,9; 36,2; 36,3; 36,7; 37,1; 38,6; 39,7; 39,9; 42,5; 44,0; 50,2; 56,3; 56,9; 67,9; 75,1; 122,6; 122,8; 129,3; 131,1; 137,8; 138,4; 139,8; 150,8; 156,3 ppm.

**MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  754,6; gefunden 754,2.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$  (%) C 71,69; H 9,85; N 3,80; gefunden C 71,77; H 9,80; N 3,77.

## NPP-Derivat 244



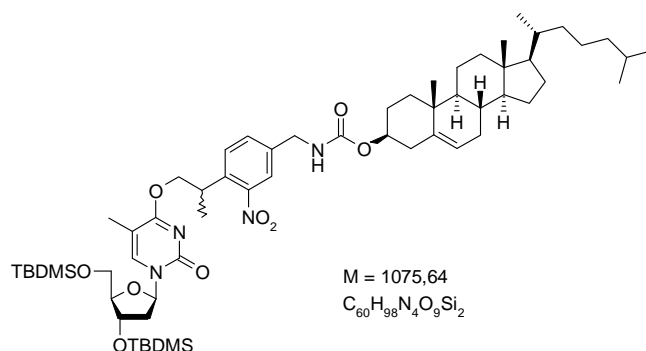
Verbindung **243** (4,25 g, 5,77 mmol) wurde in einer Mischung aus Wasser (10 mL), THF (60 mL) und Essigsäure (70 mL) gelöst und 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 7:3) und man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (3,37g, 5,41 mmol, 83,7 %).

R<sub>f</sub> (Dichlormethan / Isopropanol 96:4) = 0,29

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,64-2,34 (m, 46H); 3,12-3,23 (m, 1H); 3,46-3,51 (m, 2H, NPP-CH<sub>2</sub>); 4,19-4,22 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 4,27-4,39 (m, 1H); 4,72-4,76 (m, 1H, OH); 5,31-5,35 (m, 1H, C=CH); 7,48-7,62 (m, 3H, NPP-arom. H); 7,71-7,76 (m, 1H, NH) ppm.

MS (ESI): *m/z* berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>62</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 649,5; gefunden 640,6.

## Thymidin-Derivat 245



Thymidin-Derivat **228** (1,26 g, 2,41 mmol, 1 eq.) und Alkohol **244** (1,5 g, 2,41 mmol, 1 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in einer Mischung aus wasserfreiem Acetonitril (20 mL) und wasserfreiem Dichlormethan (20 mL) gelöst. Anschließend wurde DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; 400 µL, 2,65 mmol, 1,1 eq.) hinzugegeben und die Lösung wurde 18 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss (Aluminiumfolie) stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt

(Dichlormethan / Isopropanol 39:1). Man erhielt das Produkt als blaßgelben Schaum (2,44 g, 2,27 mmol, 94 %).

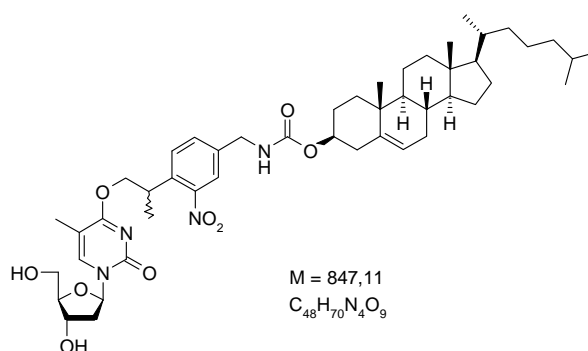
$R_f$  (Dichlormethan / Isopropanol 95:5) = 0,38

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,05-0,10 (m, 6H, TBDMS- $\text{CH}_3$ ); 0,67-2,48 (m, ); 3,73-3,95 (m, 4H); 4,33-4,41 (m, 3H); 4,48-4,58 (m, 3H); 5,01-5,08 (m, 1H); 5,36-5,40 (m, 1H); 6,28-6,33 (m, 1H, H-1'); 7,46-7,49 (m, 1H); 7,66-7,67 (m, 1H); 7,70-7,23 (m, 1H) ppm.

**HR-MS** (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{60}\text{H}_{99}\text{N}_4\text{O}_9\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1075,6945; gefunden 1075,6944.

**Elementaranalyse** (C, H, N): berechnet für  $\text{C}_{60}\text{H}_{98}\text{N}_4\text{O}_9\text{Si}$  (%) C 67,00; H 9,18; N 5,21; gefunden C 67,23; H 9,26; N 5,11.

### Thymidin-Derivat 246



Verbindung **245** (135 mg, 126  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde in THF (3,5 mL) THF gelöst und mit Essigsäure (86,5  $\mu\text{L}$ , 1,51 mmol, 12 eq.) versetzt. Anschließend wurde Tetrabutylammoniumfluorid-Lsg. (1M in THF; 98,5  $\mu\text{L}$ , 377 mmol, 3 eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan / Isopropanol 9:1). Man erhielt das Produkt als blaßgelben, glasartigen Feststoff (60,4 mg, 71,3  $\mu\text{mol}$ , 56 %).

$R_f$  (Dichlormethan / Isopropanol 95:5) = 0,28

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 0,65-2,34 (m, ); 3,00-3,06 (m, 1H); 3,52-3,61 (m, 3H); 3,75-3,81 (m, 1H); 4,18-4,57 (m, 6H); 5,02-5,05 (5'-OH); 5,20-5,22 (m, 3'-OH); 5,32-5,35 (m, 1H, Chol-C=CH); 6,08-6,12 (m, 1H, H-5'); 7,53-7,56 (m, 1H); 7,67-7,75 (m, 3H); 7,97 (s, 1H) ppm.

**HR-MS** (MALDI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  847,5216; gefunden 847,5230.





# Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl-
ACE	<i>Bis</i> -(2-Acetoxyethoxy)methyl-
ACN	Acetonitril
AMA	Mischung aus Ammoniaklösung (32 % in H <sub>2</sub> O) und Methylaminlösung (40 % in H <sub>2</sub> O) im Verhältnis 1:1
ar	aromatisch
ATP	Adenosintriphosphat
Bhc	6-Brom-7-hydroxy-4-methylcumarin
Bt	Butyryl-
Bz	Benzoyl-
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CD	Zirkulardichroismus
CE	Cyanoethyl
cpd	Composite pulse decoupling
CPG	Controlled pore glass
CPP	Zell-penetrierendes Peptid (cell penetrating peptide)
DABSYL	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonyl-
DBPO	Dibenzoylperoxid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazobicarboxylat
DEAE	Diethylaminoethyl-
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl- <i>N</i> -ethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMNPE	(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	L-Dioleoylphosphatidylethanolamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykol- <i>bis</i> -( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EI	Electron impact
Eq.	Äquivalente
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl-
<i>et al.</i>	Und andere ( <i>et alii</i> )
ETT	5-Ethylthio-1 <i>H</i> -tetrazol
FAB	Fast atom bombardment
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	Green fluorescent protein
GlcN	Glukosamin
GlcN6P	Glukosamin-6-phosphat
GM	Goeppert-Mayer
GMPS	Guanosin-5'-monophosphothioat
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High density lipoprotein
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
hNDBF	2-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)propyl-
HPLC	High pressure/performance liquid chromatographie
iPr	Isopropyl-
iPrPac	Isopropylphenoxyacetyl-
kat.	Katalytische Menge
Konz.	Konzentriert
LCAA	Long-Chain aminoalkyl-
LDL	Low density lipoprotein
LED	Leuchtdiode
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
Me	Methyl-
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(2-Mesitylsulfonyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol
MT	Molekularer Transporter
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NDBF	1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl-
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear magnetic resonance
NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl-

---

NPEOM	(1-(2-Nitrophenyl)ethoxy)methyl-
NPOM	6-Nitropiperonyloxymethyl-
NPP	2-(2-Nitrophenyl)propyl-
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pHP	<i>p</i> -Hydroxyphenacyl-
Piv	Pivaloyl-
ppm	Parts per million
PS	Polystyrol
PSG	Photolabile Schutzgruppe
py	Pyridin
RFP	Red fluorescent protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RP	Reverse Phase
RT	Raumtemperatur
SIL	Cyclododecyloxy- <i>bis</i> -(trimethylsilyloxy)silyl-
siRNA	Small interfering RNA
SMCC	Succinimidyl-4-( <i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
SMPB	Succinimidyl-4-( <i>p</i> -maleimidophenyl)butyrat
TAT	Transactivator of transcription
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	<i>Tris</i> -(carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of flight
TOM	(Triisopropylsilyl)oxymethyl-
TPS	Triisopropylbenzolsulfonyl-
UTR	Nicht translatierte Region (untranslated region)
UV	Ultraviolett



## Literaturverzeichnis

- [1] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2002**, *1*, 441–458.
- [2] J. Engels, E. J. Schlaeger, *Journal of Medicinal Chemistry* **1977**, *20*, 907–911.
- [3] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [4] Günter Mayer, Alexander Heckel, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [5] S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Annual Review of Physiology* **1993**, *55*, 755–784.
- [6] M. Goeldner (Ed.) *Dynamic studies in biology. Phototriggers, photoswitches and caged biomolecules*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [7] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- [8] E. M. Callaway, R. Yuste, *Current Opinion in Neurobiology* **2002**, *12*, 587–592.
- [9] K.-P. Yip, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2005**, *289*, R620–626.
- [10] F. DelPrincipe, M. Egger, G. C. R. Ellis-Davies, E. Niggli, *Cell Calcium* **1999**, *25*, 85–91.
- [11] F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 8777–8778.
- [12] Y. Hirayama, M. Iwamura, T. Furuta, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 905–908.
- [13] O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, N. Jayaraman, *Glycobiology* **2005**, *15*, 861–873.
- [14] J. Juodaityte, N. Sewald, *Journal of Biotechnology* **2004**, *112*, 127–138.
- [15] D. M. Rothman, M. D. Shults, B. Imperiali, *Trends in Cell Biology* **2005**, *15*, 502–510.
- [16] V. N. Rajasekharan Pillai, *Synthesis* **1980**, *1980*, 1–26.
- [17] J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Letters* **1962**, *3*, 697–699.
- [18] M. Gaplovsky, Y. V. Il'ichev, Y. Kamdzhilov, S. V. Kombarova, M. Mac, M. A. Schworer, J. Wirz, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2005**, *4*, 33–42.
- [19] A. Hasan, K.-P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247–4264.
- [20] Stefan Walbert, Wolfgang Pfeleiderer, Ulrich E. Steiner, *Helvetica Chimica Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [21] R. S. Givens, C.-H. Park, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6259–6262.
- [22] R. S. Givens, A. Jung, C.-H. Park, J. Weber, W. Bartlett, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 8369–8370.
- [23] P. G. Conrad, R. S. Givens, J. F. W. Weber, K. Kandler, *Organic Letters* **2000**, *2*, 1545–1547.
- [24] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat Meth* **2006**, *3*, 35–40.
- [25] T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [26] J. A. Delaire, K. Nakatani, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1817–1846.
- [27] G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1741–1754.
- [28] Y. Dorsett, T. Tuschl, *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 318–329.
- [29] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281–297.
- [30] M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 451–463.
- [31] Stanley T. Crooke, *Current Molecular Medicine* **2004**, *4*, 465–487.
- [32] Y. S. Cho-Chung, Y. G. Park, Y. N. Lee, *Current Opinion In Molecular Therapeutics*, **1999**, *1*, 386–392.
- [33] M. Famulok, S. Verma, *Trends in Biotechnology* **2002**, *20*, 462–466.
- [34] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 20895–20900.

- [35] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat Genet* **2001**, *28*, 317–325.
- [36] Samit Shah, Subhashree Rangarajan, Simon H. Friedman, *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 1352–1356.
- [37] S. G. Chaulk, Am MacMillan, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 3173–3178.
- [38] Stefan Pitsch, Patrick A. Weiss, Xiaolin Wu, Damian Ackermann, Thomas Honegger, *Helvetica Chimica Acta* **1999**, *82*, 1753–1761.
- [39] Lenz Kröck, Alexander Heckel, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 471–473.
- [40] V. Mikat, A. Heckel, *RNA* **2007**, *13*, 2341–2347.
- [41] Philipp Wenter, Boris Fürtig, Alexandre Hainard, Harald Schwalbe, Stefan Pitsch, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 2600–2603.
- [42] Claudia Höbartner, Scott K. Silverman, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 7305–7309.
- [43] X. Tang, J. L. Richards, A. E. Peritz, I. J. Dmochowski, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 5303–5306.
- [44] H. Lusic, A. Deiters, *Synthesis* **2006**, *2006*, 2147–2150.
- [45] H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, *Molecular BioSystems* **2008**, *4*, 508–511.
- [46] Douglas D. Young, Hrvoje Lusic, Mark O. Lively, Jeffrey A. Yoder, Alexander Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2937–2940.
- [47] S. L. Beaucage (Ed.) *Current protocols in nucleic acid chemistry*, Wiley, New York, **2001**.
- [48] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 3821–3827.
- [49] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 3526–3527.
- [50] K. L. Agarwal, A. Yamazaki, P. J. Cashion, H. G. Khorana, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1972**, *11*, 451–459.
- [51] J. C. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 397–416.
- [52] G. M. Blackburn, *Nucleic acids in chemistry and biology*, RSC Publ., Cambridge, **2006**.
- [53] W. H. A. Kuipers, E. Kuyl-Yeheskiely, J. H. v. Boom, C. A. A. v. Boeckel, *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*, 3493–3500.
- [54] B. Mullah, A. Andrus, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 5751–5754.
- [55] a) H. G. Khorana, W. E. Razzell, P. T. Gilham, G. M. Tener, E. H. Pol, *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79*, 1002–1003. b) P. T. Gilham, H. G. Khorana, *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80*, 6212–6222.
- [56] R. Lohrmann, H. G. Khorana, *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 829–833.
- [57] K. L. Agarwal, H. Buchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. Rajbhandari, J. H. van de Sande et al., *Nature* **1970**, *227*, 27–34.
- [58] C. B. Reese, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8893–8920.
- [59] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, P. S. Miller, *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*, 3360–3365.
- [60] C. B. Reese, R. C. Titmas, L. Yau, *Tetrahedron Letters* **1978**, *19*, 2727–2730.
- [61] S. S. Jones, B. Rayner, C. B. Reese, A. Ubasawa, M. Ubasawa, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3075–3085.
- [62] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98*, 3655–3661.
- [63] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [64] a) Hartmut Seliger, Kailash Chand Gupta, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1985**, *24*, 685–687. b) Y. Hayakawa, R. Kawai, A. Hirata, J.-i. Sugimoto, M. Kataoka, A. Sakakura, M. Hirose, R. Noyori, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 8165–8176.
- [65] R. H. Hall, A. Todd, R. F. Webb, *Journal of the chemical society* **1957**, 3291–3296.
- [66] B. C. Froehler, P. G. Ng, M. D. Matteucci, *Nucl. Acids Res.* **1986**, *14*, 5399–5407.

- [67] P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 4051–4054.
- [68] R. T. Pon, N. Usman, K. K. Ogilvie, *Biotechniques* **1988**, 6, 768–775.
- [69] C. McCollum, A. Andrus, *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, 4069–4072.
- [70] K. C. Gupta, P. Sharma, P. Kumar, S. Sathyanarayana, *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19, 3019–3026.
- [71] A. Guzaev, H. Salo, A. Azhaye, H. Lönnberg, *Tetrahedron* **1995**, 51, 9375–9384.
- [72] R. T. Pon, S. Yu, *Nucl. Acids Res.* **1997**, 25, 3629–3635.
- [73] K. K. Ogilvie, K. L. Sadana, E. A. Thompson, M. A. Quilliam, J. B. Westmore, *Tetrahedron Letters* **1974**, 15, 2861–2863.
- [74] S. A. Scaringe, F. E. Wincott, M. H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 11820–11821.
- [75] C. Mülhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, Elsevier Spektrum Akad. Verl., München, **2006**.
- [76] a) J. C. Sanford, T. M. Klein, E. D. Wolf, N. Allen, *Particulate Science and Technology: An International Journal* **1987**, 5, 27–37. b) T. M. Klein, E. D. Wolf, R. Wu, J. C. Sanford, *Nature* **1987**, 327, 70–73.
- [77] P. Sundaram, W. Xiao, J. L. Brandsma, *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 1375–1377.
- [78] G.-N. Ye, H. Daniell, J. C. Sanford, *Plant Molecular Biology* **1990**, 15, 809–819.
- [79] V. A. Klenchin, S. I. Sukharev, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, Chizmadzhev YuA, *Biophysical Journal* **1991**, 60, 804–811.
- [80] S. I. Sukharev, V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, Chizmadzhev YuA, *Biophysical Journal* **1992**, 63, 1320–1327.
- [81] V. Budker, G. Zhang, S. Knechtle, J. A. Wolff, *Gene Therapy* **1996**, 3, 593–598.
- [82] K. Gao, L. Huang, *Molecular Pharmaceutics* **2009**, 6, 651–658.
- [83] Magdolna G. Sebestyén, Vladimir G. Budker, Tatiana Budker, Vladimir M. Subbotin, Guofeng Zhang, Sean D. Monahan, David L. Lewis, So C. Wong, James E. Hagstrom, Jon A. Wolff, *The Journal of Gene Medicine* **2006**, 8, 852–873.
- [84] D. L. Lewis, J. A. Wolff, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, 59, 115–123.
- [85] T. Suda, K. Suda, D. Liu, *Mol Ther* **2008**, 16, 1098–1104.
- [86] V. P. Torchilin, *Annual Review of Biomedical Engineering* **2006**, 8, 343–375.
- [87] M. Magnani, L. Rossi, A. Fraternali, M. Bianchi, A. Antonelli, R. Crinelli, L. Chiarantini, *Gene Therapy* **2002**, 9, 749–751.
- [88] H.-M. Byun, D. Suh, H. Yoon, J. M. Kim, H.-G. Choi, W.-K. Kim, J. J. Ko, Y.-K. Oh, *Gene Ther* **0000//print**, 11, 492–496.
- [89] L. H. Li, M. L. Hensen, Y. L. Zhao, S. W. Hui, *Biophysical Journal* **1996**, 71, 479–486.
- [90] L. Rossi, S. Serafini, L. Cappellacci, E. Balestra, G. Brandi, G. F. Schiavano, P. Franchetti, M. Grifantini, C.-F. Perno, M. Magnani, *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, 47, 819–827.
- [91] R. Juliano, M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, *Nucl. Acids Res.* **2008**, 36, 4158–4171.
- [92] E. Perret, A. Lakkaraju, S. Deborde, R. Schreiner, E. Rodriguez-Boulan, *Current Opinion in Cell Biology* **2005**, 17, 423–434.
- [93] F. L. Graham, A. J. van der Eb, *Virology* **1973**, 52, 456–467.
- [94] C. Plank, U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J. S. RÄ©my, F. Krötzer, M. Anton, J. Lausier, J. Rosenecker, *Biological Chemistry* **2003**, 384, 737–747.
- [95] M. A. Lopata, D. W. Cleveland, B. Sollner-Webb, *Nucl. Acids Res.* **1984**, 12, 5707–5717.
- [96] a) M. Grzelinski, B. Urban-Klein, T. Martens, K. Lamszus, U. Bakowsky, S. Höbel, F. Czubayko, A. Aigner, *Human Gene Therapy* **2006**, 17, 751–766. b) R. M. Schifferers, A. Ansari, J. Xu, Q. Zhou, Q. Tang, G. Storm, G. Molema, P. Y. Lu, P. V. Scaria, M. C. Woodle, *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, e149-.
- [97] J. DeRouchey, C. Schmidt, G. F. Walker, C. Koch, C. Plank, E. Wagner, J. O. Rädler, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 724–732.

- [98] a) T. Tsutsumi, F. Hirayama, K. Uekama, H. Arima, *Journal of Controlled Release* **2007**, *119*, 349–359. b) J. Zhou, J. Wu, N. Hafdi, J.-P. Behr, P. Erbacher, L. Peng, *Chemical Communications* **2006**, 2362–2364.
- [99] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 7297–7301.
- [100] R. Rennert, I. Neundorf, A. G. Beck-Sickinger, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 485–498.
- [101] a) E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 16010–16017. b) D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 10444–10450.
- [102] a) J. S. Wadia, R. V. Stan, S. F. Dowdy, *Nat Med* **2004**, *10*, 310–315. b) C. Foerg, U. Ziegler, J. Fernandez-Carneado, E. Giralt, R. Rennert, A. G. Beck-Sickinger, H. P. Merkle, *Biochemistry* **2005**, *44*, 72–81.
- [103] C. Walther, K. Meyer, R. Rennert, I. Neundorf, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2346–2356.
- [104] B. R. Meade, S. F. Dowdy, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 134–140.
- [105] S. A. Moschos, S. W. Jones, M. M. Perry, A. E. Williams, J. S. Erjefalt, J. J. Turner, P. J. Barnes, B. S. Sproat, M. J. Gait, M. A. Lindsay, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 1450–1459.
- [106] Y.-L. Chiu, A. Ali, C.-y. Chu, H. Cao, T. M. Rana, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 1165–1175.
- [107] W. Li, F. Szoka, *Pharmaceutical Research* **2007**, *24*, 438–449.
- [108] G. Tresset, *PMC Biophysics* **2009**, *2*, 3.
- [109] I. Koltover, T. Salditt, R. S. O. dler, C. R. Safinya, *Science* **1998**, *281*, 78–81.
- [110] Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616–5623.
- [111] O. Zelphati, F. C. Szoka, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 11493–11498.
- [112] J. Zabner, A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger, M. J. Welsh, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 18997–19007.
- [113] E. Wagner, M. Zenke, M. Cotten, H. Beug, M. L. Birnstiel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 3410–3414.
- [114] J. O. McNamara, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger, P. H. Giangrande, *Nat Biotech* **2006**, *24*, 1005–1015.
- [115] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth et al., *Nature* **2004**, *432*, 173–178.
- [116] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo et al., *Nat Biotech* **2007**, *25*, 1149–1157.
- [117] Alexander Heckel, Maximilian C. R. Buff, Marie-Sophie L. Raddatz, Jens Müller, Bernd Pöttsch, Günter Mayer, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 6748–6750.
- [118] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, A. G. Beck-Sickinger, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [119] T. E. Adams, J. A. Huntington, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**, *26*, 1738–1745.
- [120] Klaus Rehse, *Pharmazie in unserer Zeit* **1975**, *4*, 1–9.
- [121] Johannes Dodt, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34*, 867–880.
- [122] a) B. Pöttsch, J. Müller, J. Rox, *Transfus Med Hemother* **2006**, *33*, 200–204. b) J. Hirsh, M. O'Donnell, J. I. Weitz, *Blood* **2005**, *105*, 453–463.
- [123] S. C. B. Gopinath, *Thrombosis Research* **2008**, *122*, 838–847.
- [124] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566.
- [125] L. C. Griffin, J. J. Toole, L. L. K. Leung, *Gene* **1993**, *137*, 25–31.
- [126] A. Schwienhorst, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2006**, *63*, 2773–2791.



- [127] C. P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, G. A. Pitoc, T. L. Ortel, D. Monroe, B. A. Sullenger, *Nature* **2002**, *419*, 90–94.
- [128] C. P. Rusconi, J. D. Roberts, G. A. Pitoc, S. M. Nimjee, R. R. White, G. Quick, E. Scardino, W. P. Fay, B. A. Sullenger, *Nat Biotech* **2004**, *22*, 1423–1428.
- [129] C. K. Dyke, S. R. Steinhubl, N. S. Kleiman, R. O. Cannon, L. G. Aberle, M. Lin, S. K. Myles, C. Melloni, R. A. Harrington, J. H. Alexander et al., *Circulation* **2006**, *114*, 2490–2497.
- [130] K. Padmanabhan, A. Tulinsky, *Acta Crystallographica Section D* **1996**, *52*, 272–282.
- [131] Q. Wu, M. Tsiang, J. E. Sadler, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 24408–24412.
- [132] K. Y. Wang, S. McCurdy, R. G. Shea, S. Swaminathan, P. H. Bolton, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1899–1904.
- [133] P. Schultze, R. F. Macaya, J. Feigon, *Journal of Molecular Biology* **1994**, *235*, 1532–1547.
- [134] A. Heckel, G. Mayer, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 822–823.
- [135] Günter Mayer, Lenz Kröck, Vera Mikat, Marianne Engeser, Alexander Heckel, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1966–1970.
- [136] R. O. Schoenleber, B. Giese, *Synlett* **2003**, *2003*, 501–504.
- [137] M. C. R. Buff, F. Schafer, B. Wulffen, J. Muller, B. Potzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38(6)*, 2111–2118.
- [138] Jens Müller, Bernhard Wulffen, Bernd Pöttsch, Günter Mayer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2223–2226.
- [139] Günter Mayer, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 2672–2689.
- [140] P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 21858–21869.
- [141] T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, *287*, 820–825.
- [142] N. Hamaguchi, A. Ellington, M. Stanton, *Analytical Biochemistry* **2001**, *294*, 126–131.
- [143] a) I. Smirnov, R. H. Shafer, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1462–1468. b) S. Uehara, N. Shimada, Y. Takeda, Y. Koyama, Y. Takei, H. Ando, S. Satoh, A. Uno, K. Sakurai, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2008**, *81*, 1485–1491.
- [144] Y. Kim, J. A. Phillips, H. Liu, H. Kang, W. Tan, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 6489–6494.
- [145] T. Mack, *Dissertation*, Goethe-Universität, Frankfurt, **2010**.
- [146] A. Rentmeister, G. Mayer, N. Kuhn, M. Famulok, *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, 3713–3722.
- [147] B. Suess, J. E. Weigand, *RNA Biology* **2008**, *5*, 24–29.
- [148] a) M. Koizumi, G. A. Soukup, J. N. Q. Kerr, R. R. Breaker, *Nat Struct Mol Biol* **1999**, *6*, 1062–1071. b) D. D. Young, A. Deiters, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 2658–2661.
- [149] H.-W. Lee, S. G. Robinson, S. Bandyopadhyay, R. H. Mitchell, D. Sen, *Journal of Molecular Biology* **2007**, *371*, 1163–1173.
- [150] K. H. Link, L. Guo, T. D. Ames, L. Yen, R. C. Mulligan, R. R. Breaker, *Biological Chemistry* **2007**, *388*, 779–786.
- [151] Markus Wieland, Jörg S. Hartig, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2604–2607.
- [152] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281–286.
- [153] Jinsoo Lim, Beth C. Grove, Adam Roth, Ronald R. Breaker, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 6689–6693.
- [154] T. J. McCarthy, M. A. Plog, S. A. Floy, J. A. Jansen, J. K. Soukup, G. A. Soukup, *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 1221–1226.
- [155] a) J. A. Jansen, T. J. McCarthy, G. A. Soukup, J. K. Soukup, *Nat Struct Mol Biol* **2006**, *13*, 517–523. b) K. H. Link, L. Guo, R. R. Breaker, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 4968–4975.
- [156] D. J. Klein, A. R. Ferre-D'Amare, *Science* **2006**, *313*, 1752–1756.
- [157] J. C. Cochrane, S. V. Lipchock, S. A. Strobel, *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 97–105.
- [158] K. J. Hampel, M. M. Tinsley, *Biochemistry* **2006**, *45*, 7861–7871.

- [159] J. A. Collins, I. Irnov, S. Baker, W. C. Winkler, *Genes & Development* **2007**, *21*, 3356–3368.
- [160] D. D'Addona, C. G. Bochet, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 5227–5229.
- [161] F. Maley, H. A. Lardy, *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78*, 1393–1397.
- [162] Max Bergmann, Leonidas Zervas, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1931**, *64*, 975–980.
- [163] M. Kanai, M. Yasumoto, Y. Kuriyama, K. Inomiya, Y. Katsuhara, K. Higashiyama, A. Ishii, *Chemistry Letters* **2004**, *33*, 1424–1425.
- [164] G. de Nanteuil, A. Benoist, G. Rémond, J.-J. Descombes, V. Barou, T. J. Verbeuren, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1435–1438.
- [165] C. C. Tam, K. L. Mattocks, M. Tishler, *Synthesis-Stuttgart* **1982**, 188–190.
- [166] W. S. Mungall, G. L. Greene, P. S. Miller, R. L. Letsinger, *Nucl. Acids Res.* **1974**, *1*, 615–627.
- [167] H. K. Chenault, R. F. Mandes, K. R. Hornberger, *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 331–336.
- [168] M.-Z. Liu, Y. C. Lee, *Carbohydrate Research* **2001**, *330*, 413–419.
- [169] Willy Kinzy, Richard R. Schmidt, *Liebigs Annalen der Chemie* **1987**, *1987*, 407–415.
- [170] S. K. Chaudhary, O. Hernandez, *Tetrahedron Letters* **1979**, *20*, 99–102.
- [171] Carlo Dinkel, Mark Moody, Alexis Traynor-Kaplan, Carsten Schultz, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 3004–3008.
- [172] M. Pofahl, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, **2009**.
- [173] R. S. Givens, D. Heger, B. Hellrung, Y. Kamdzhilov, M. Mac, P. G. Conrad, E. Cope, J. I. Lee, J. F. Mata-Segreda, R. L. Schowen et al., *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 3307–3309.
- [174] M. C. R. Buff, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, **2005**.
- [175] H. Wittmann, E. Ziegler, *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **1988**, *119*, 103–111.
- [176] W. Borsche, B. Schacke, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1923**, *56*, 2498–2508.
- [177] Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 3839–3845.
- [178] L. C. J. Gillet, O. D. Scharer, *Organic Letters* **2002**, *4*, 4205–4208.
- [179] R. Sarges, R. F. Hank, J. F. Blake, J. Bordner, D. L. Bussolotti, D. M. Hargrove, J. L. Treadway, E. M. Gibbs, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 4783–4803.
- [180] Robert Damoiseaux, Antje Keppler, Kai Johnsson, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 285–287.
- [181] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1–28.
- [182] C. Özcoban, *Diplomarbeit*, Goethe-Universität, Frankfurt am Main, **2010**.
- [183] H. Lusic, R. Uprety, A. Deiters, *Organic Letters* **2010**, *12*, 916–919.
- [184] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Elsevier Acad. Press, Amsterdam, **2008**.
- [185] V. S. Goldmacher, P. D. Senter, J. M. Lambert, W. A. Blattler, *Bioconjugate Chemistry* **1992**, *3*, 104–107.
- [186] Tang, I. J. Dmochowski, *Organic Letters* **2005**, *7*, 279–282.
- [187] J. S. Soughayer, Y. Wang, H. Li, S.-H. Cheung, F. M. Rossi, E. J. Stanbridge, C. E. Sims, N. L. Allbritton, *Biochemistry* **2004**, *43*, 8528–8540.
- [188] P. J. Kociński, *Protecting groups*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [189] M. Meyer, C. Dohmen, A. Philipp, D. Kiener, G. Maiwald, C. Scheu, M. Ogris, E. Wagner, *Molecular Pharmaceutics* **2009**, *6*, 752–762.
- [190] M. Antopolsky, E. Azhayeveva, U. Tengvall, S. Auriola, I. Jääskeläinen, S. Rönkkö, P. Honkakoski, A. Urtti, H. Lönnberg, A. Azhayevev, *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 598–606.
- [191] P. B. Dervan, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9*, 2215–2235.
- [192] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 7512–7515.

- [193] C. P. Salerno, D. Magde, A. P. Patron, *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 3971–3981.
- [194] Claudia Höbartner, Scott K. Silverman, *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 7471–7475.
- [195] D. M. Noll, A. M. Noronha, P. S. Miller, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 3405–3411.
- [196] A. S. Kiselyov, T. Steinbrecher, R. G. Harvey, *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 6129–6134.
- [197] Y. Tsuji, S. Kotachi, K. T. Huh, Y. Watanabe, *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 580–584.
- [198] W. Adam, S. G. Bosio, N. J. Turro, B. T. Wolff, *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 1704–1715.
- [199] A. Collier, G. Wagner, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 4526–4532.
- [200] S. Roemer, C. Stadler, M. T. Rudolf, B. Jastorff, C. Schultz, *Journal of the chemical society, Perkin Transactions 1* **1996**, 1683–1694.
- [201] L. C. J. Gillet, O. D. Scharer, *Organic Letters* **2002**, *4*, 4205–4208.
- [202] W. D. Langley, *Organic Synthesis*, 127.
- [203] L.-F. Tietze, T. Eicher, *Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium. 142 Syntheseschemata*, Thieme; Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [204] S. Natori, *Pharmaceutical bulletin* **1957**, *5*, 539–547.
- [205] Pierre Potier, Adib Abdennaji, Jean-Paul Behr, *Chemistry - A European Journal* **2000**, *6*, 4188–4194.
- [206] Lenz Kröck, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, **2004**.
- [207] Sigrid Bühler, Irene Lagoja, Heiner Giegrich, Klaus-Peter Stengele, Wolfgang Pfleiderer, *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 620–659.
- [208] P. A. Harland, P. Hodge, W. Maughan, E. Wildsmith, *Synthesis-Stuttgart* **1984**, 941–943.



---

## Wissenschaftliche Publikationen

Erstveröffentlichungen: Alexander Heckel, Maximilian C. R. Buff, Marie-Sophie L. Raddatz, Jens Müller, Bernd Pötzsch, Günter Mayer, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 6748–6750.

Maximilian C. R. Buff, Florian Schäfer, Bernard Wulffen, Jens Müller, Bernd Pötzsch, Alexander Heckel, Günter Mayer, *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38(6)*, 2111-2118.

Review: Maximilian Buff, Timo Mack, Alexander Heckel, Light-activatable nucleic acids "caged" at the nucleobases, *Chimia* **2009**, *63(5)*, 261-264.