

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Replikation und Amplifizierung des Metall-Salen-Basenpaars

Corinna Denise Kaul
aus
Neuburg an der Donau

2011

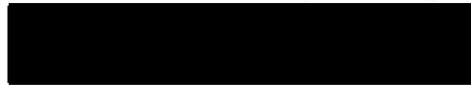
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26.06.2011

A solid black rectangular box used to redact the signature of the author.

(Corinna Kaul)

Dissertation eingereicht am 27.06.2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff

Mündliche Prüfung am 14.07.2011

Für Stefan

*Fantasie ist für mich das Lebenselixier, das uns Kraft und Ansporn gibt,
ausgetretene Pfade zu verlassen und Neues zu erkunden.*

Ralf Isau

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Thomas Carell danke ich für die spannende Aufgabenstellung, die finanzielle Unterstützung sowie seinen ungebremsten Ideenfluss und Enthusiasmus. Durch die Aufnahme in seinen hervorragend ausgestatteten Arbeitskreis wurde das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Prof. Konstantin Karaghiosoff danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders danke ich auch Frau Slava Gärtner für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen Belangen, wie das Auffinden verschollener Stipendienzusagen.

Den Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionstipendium von 2007 bis 2009 sowie die Finanzierung von Konferenzreisen und Fachliteratur.

Den Mitarbeitern der analytischen Serviceabteilungen der LMU München danke ich für ihre große Hilfe. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Werner Spahl für Hilfe bei der Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen. Auch Frau Sonja Kosak sei in diesem Zusammenhang gedankt, unter anderem auch für die gelegentlichen Zuckerschübe. Dr. David Stephenson und Claudia Dubler danke ich für die Aufnahme der Kernresonanzspektren.

Frau Sabine Voß danke ich für Unterstützung in der Vorstufensynthese sowie Ihre Fähigkeit jede Chemikalie in kürzester Zeit aufzutreiben. Frau Kerstin Kurz danke ich für das gelegentliche Aufreinigen der Bst Pol I. Dr. Daniel Globisch und Veronika Reiter danke ich für die Unterstützung und Analytik der enzymatischen Totalverdau. Dr. Andreas Glas, Tim Gehrke und Korbinian Heil danke ich für die Unterstützung an der HPLC, vor allem, wenn die Software mal wieder nicht so wollte, wie ich. Tim und Korbinian danke ich außerdem für Korrekturen der Arbeit.

Den Physikern in der Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann Gaub danke ich für die Zusammenarbeit zur Untersuchungen der mechanischen Stabilität von modifizierter DNA.

Meinem Vorgänger Dr. Guido Clever danke ich für die Entwicklung des tollen Salenbasenpaars sowie die gründliche Einweisung in fast alle Arbeitskreisgeräte. Ich danke auch meinen Laborkollegen für die vergangenen Jahre, insbesondere auch den Ehemaligen Dr. Glenn Burley und Dr. Dave Hammond, von denen ich viel gelernt habe. Den „neuen, jungen Wilden“ wünsche ich viel Glück und dass ihr lange vor Ines' Gute-Laune-Song (ich sag nur „Jede Zelle...“) verschont bleibt.

Ein „Danke“ geht auch an meine Praktikanten/Diplomanden, die mich in der Synthese unterstützt haben, insbesondere an Mirko Wagner für das gewissenhafte Aufreinigen des dSTP während seiner Diplomarbeit.

Dr. Sabine Schneider sei gedankt für die diversen Synchrotrontrips, Einführung in das Kristallisieren, Korrekturlesen der Arbeit und Überprüfung der Kristallstrukturen. Viel Glück und Erfolg mit deinem eigenen Arbeitskreis an der TU.

Ein ganz großes und herzliches Dankeschön geht an Dr. Markus Müller. Neben der Einführung in die Biochemie, der Unterstützung bei Problemen mit Laptop und Laptöpfchen, dem Rechnen der Kristallstrukturen, der Diskussionen über den enzymatischen Einbau, Vorschlägen für weitere Experimente und dem Korrekturlesen der Arbeit, sei ihm auch für diverse Gespräche ums Fahrrad, dem Urlaubs-Blumengießdienst, dem Diebstahlhilfedienst und Ausflüge in die Berge gedankt.

Tim Gehrke danke ich auch noch für diverse Diskussionen um den Carbozyklus, ums Kristallisieren sowie grundsätzliche Ansichten zur Doktorarbeit und wünsche ihm noch einen guten und erfolgreichen Abschluss.

Emine Kaya sei gedankt für die Aufnahme der „Hobby-Biochemiker“ in ihr Labor, Unterstützung bei biochemischen Arbeitsabläufen, Korrekturlesen, aber auch außeruniversitäre Unternehmungen und Gespräche. Für den nahenden Wechsel wünsche ich ihr viel Optimismus und eine krisenfreie Zeit.

Für Aktivitäten außerhalb des Dunstkreises der Chemie, ob im Schnee, beim Unihockey oder in den Bergen möchte ich mich auch noch bei folgenden Leuten bedanken: Dr. Thomas Reißner, Dr. Eva Bürckstümmer (die jetzt wieder nach München zurückgekehrt ist), Dr. Stephanie Schorr und Dr. Christian Trindler.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Mutter, die stets für mich da ist. Vielen Dank für deine uneingeschränkte Unterstützung und dein Vertrauen in mich. Zuletzt danke ich Stefan Sedlmaier für sein Verständnis, seine Geduld und seine Unterstützung während der vergangenen gemeinsamen neun Jahre, was die Entstehung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert oder auf Konferenzen präsentiert worden:

Veröffentlichungen in rezensierten Zeitschriften

C. Kaul, M. Müller, M. Wagner, S. Schneider, T. Carell, *Nature Chemistry* **2011**, 3, 794-800. *The principle of reversible bond formation allows replication and amplification of a crosslinking salen complex as an orthogonal base pair.*

B. M. Gaub, C. Kaul, J. L. Zimmermann, T. Carell, H. E. Gaub, *Nanotechnology* **2009**, 20, 434002/1-434002/8. *Switching the mechanics of dsDNA by Cu salicylic aldehyde complexation.*

Konferenzbeiträge

Aug. 2010 Vortrag und Posterpräsentation, 3rd EuCheMS Conference, Nürnberg, Deutschland.

Sept. 2008 Posterpräsentation, 2nd EuCheMS Conference, Turin, Italien.

März 2007 Posterpräsentation, 3rd Symposium on Complex Materials, Volkswagen Stiftung, Kerkrade, Niederlande.

3.2.1.5	Versuche zur Fehlpaarung der dS-Base mit den natürlichen DNA-Basen.....	47
3.2.1.6	Vollverlängerung unter kompetitiven Bedingungen.....	52
3.2.2	Polymerasekettenreaktion.....	56
3.2.2.1	Synthese der Templatstränge für die PCR.....	58
3.2.2.2	Test verschiedener Polymerasen und <i>annealing</i> -Temperaturen..	61
3.2.2.3	Einfluss der Additive Ethylendiamin und CuSO ₄ auf die PCR eines mit Salenbasenpaaren modifizierten Templats.....	62
3.2.2.4	Enzymatischer Verdau des PCR-Produkts mit Salenbasenpaaren.....	64
3.3	Co-Kristallstrukturen der <i>high-fidelity</i> Polymerase Bst Pol I mit Salicylaldehyd-modifizierter DNA.....	69
3.3.1	Synthese der modifizierten DNA-Stränge.....	70
3.3.2	Expression und Aufreinigung von Bst Pol I.....	71
3.3.3	Kristallisation der modifizierten DNA-Stränge im Komplex mit Bst Pol I.....	72
3.3.4	Kristallstrukturen.....	73
3.3.4.1	Salicylaldehydbase in der Prä-insertionsstelle der Polymerase.....	75
3.3.4.2	Nichtpaarende Salicylaldehyd-Basen.....	75
3.3.4.3	Struktur des Salenbasenpaar in einem DNA-Polymerase-Komplex.....	76
3.3.4.4	Weitere Kristallisationsansätze.....	78
3.4	AFM-Experimente zur mechanischen Stabilität von DNA mit Metall-Salicylaldehydbasenpaar.....	79
3.4.1	Thermodynamische Studien.....	80
3.4.2	Durchführung der AFM-Versuche.....	82
3.5	Entwicklung eines schwefelhaltigen Metall-Basenpaars.....	86
3.5.1	Synthese eines geschützten carbazyklischen Amin-Phosphoramidits zum Einbau in DNA.....	88
3.5.1.1	Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit tert-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe.....	89

3.5.1.2	Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit Acetyl-Schutzgruppe.....	92
3.5.1.3	Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit Phenylacteyl-Schutzgruppe.....	95
3.5.1.4	Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit Alloc-Schutzgruppe.....	98
3.5.2	Umsetzung der modifizierten DNA-Stränge mit CS ₂	101
4.	Fazit und Ausblick.....	104
5.	Experimenteller Teil	107
5.1	Chemische Synthese	107
5.1.1	Material und Methoden	107
5.1.2	Durchführung der Synthese	109
5.1.2.1	Synthese des Chloro-Zuckers.....	109
5.1.2.2	Synthese des Salicylaldehydnukleosidtriphosphats.....	111
5.1.2.3	Synthese eines geschützten carbazyklischen Aminnukleosid-phosphoramidits	122
5.1.3	Oligonukleotidsynthese	138
5.1.3.1	Sequenzen der DNA-Stränge:	141
5.1.3.2	Bestimmung der Oligonukleotid-Konzentration.....	144
5.1.4	Schmelzkurven von Oligonukleotiden	144
5.2	Biochemische Experimente.....	146
5.2.1	Material und Methoden	146
5.2.1.1	Geräteliste	146
5.2.1.2	Puffer, Lösungen und Medien.....	148
5.2.1.3	Enzyme, Primer und Marker	150
5.2.2	Primer-Verlängerungsreaktionen	151
5.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	152
5.2.4	Enzymatischer Totalverdau	153
5.2.5	Kristallisationsexperimente	155
5.2.5.1	Transformation, Expression und Aufreinigung der DNA Polymerase Bst Pol I	155
5.2.5.2	Kristallisationsansätze	156

5.2.5.3	Kristallstrukturdaten	157
6.	Abkürzungsverzeichnis	159
7.	Literaturverzeichnis	163
	Lebenslauf.....	177

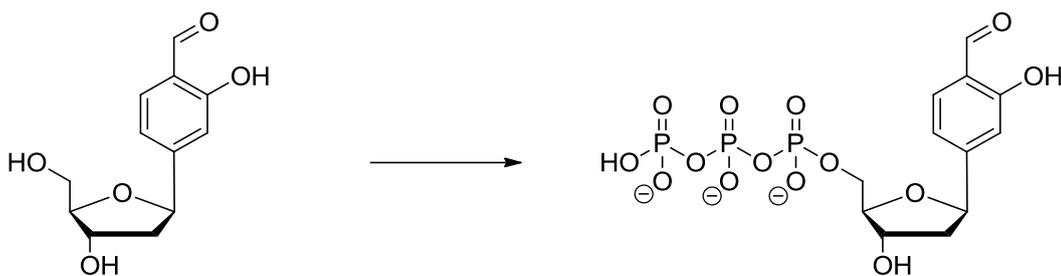
Zusammenfassung

Seit vielen Jahren gibt es Bestrebungen den genetischen Code durch die Synthese nicht-natürlicher Basenpaare zu erweitern. Dabei müssen diese Basenpaare orthogonal sein, d.h. sie dürfen nicht mit den natürlichen Basen interagieren. Der Einbau und die Verlängerung in DNA müssen enzymatisch, also mittels Polymerasen möglich sein. Bisher vorgestellte Basenpaare wurden mit alternativen Wasserstoffbrückenmustern oder als hydrophobe Basenpaare synthetisiert.

Zudem wurde das Konzept der Metall-Basenpaare entwickelt, das den Ersatz der natürlichen Basen durch einen Komplex zwischen nukleosidähnlichen Liganden und einem Metallion vorsieht. Der Einbau der Metallbasenpaare in DNA ermöglicht es, Systeme mit interessanten elektronischen und magnetischen Eigenschaften hervorzubringen.

Im Zuge dieser Arbeit sollte eine Verknüpfung der Konzepte zur Erweiterung des genetischen Codes und der Metallbasen unter Verwendung des bekannten Metall-Salenbasenpaars erfolgen. Dieses Basenpaar wird zusätzlich zu den koordinativen Bindungen noch durch einen kovalenten *crosslink* vermittelt. Zur Assemblierung werden zwei gegenüberliegende Salicylaldehydnucleoside mittels Ethylendiamin verbrückt, bei anschließender Zugabe von Cu(II) wird dieses im Chelatkomplex eingebaut.

Um dieses Metall-Salenbasenpaar enzymatisch in DNA einzubauen, wurde neben einem modifizierten Templatstrang auch ein entsprechender Triphosphatbaustein dSTP benötigt. Die Synthese des Salicylaldehydtriphosphats erfolgte ausgehend vom freien Nucleosid (Schema 0.1).



Schema 0.1: Synthese des Salicylaldehydnucleosidtriphosphats dSTP.

Anschließend wurde das Triphosphat in Primerverlängerungsreaktionen eingesetzt, insbesondere unter Verwendung der *high-fidelity* Polymerase Bst Pol I. Es wurden Selektivitätsuntersuchungen durchgeführt, die den Einfluss der Additive Ethylendiamin und Cu(II) zeigten. Dabei wurde die dS-Base im Templat und als Triphosphat gegenüber den natürlichen Basen eingesetzt. Bei fast allen Basen konnte der Fehleinbau gegenüber einem dS durch Zugabe der Additive verringert werden (Abbildung 0.1 A-C). Das Basenpaar dS:dS konnte enzymatisch in DNA eingebaut und unter Additivzugabe verlängert werden (Abbildung 0.1 D+E), der Nachweis des korrekten Produktstrangs wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie erbracht (Abbildung 0.1 F).

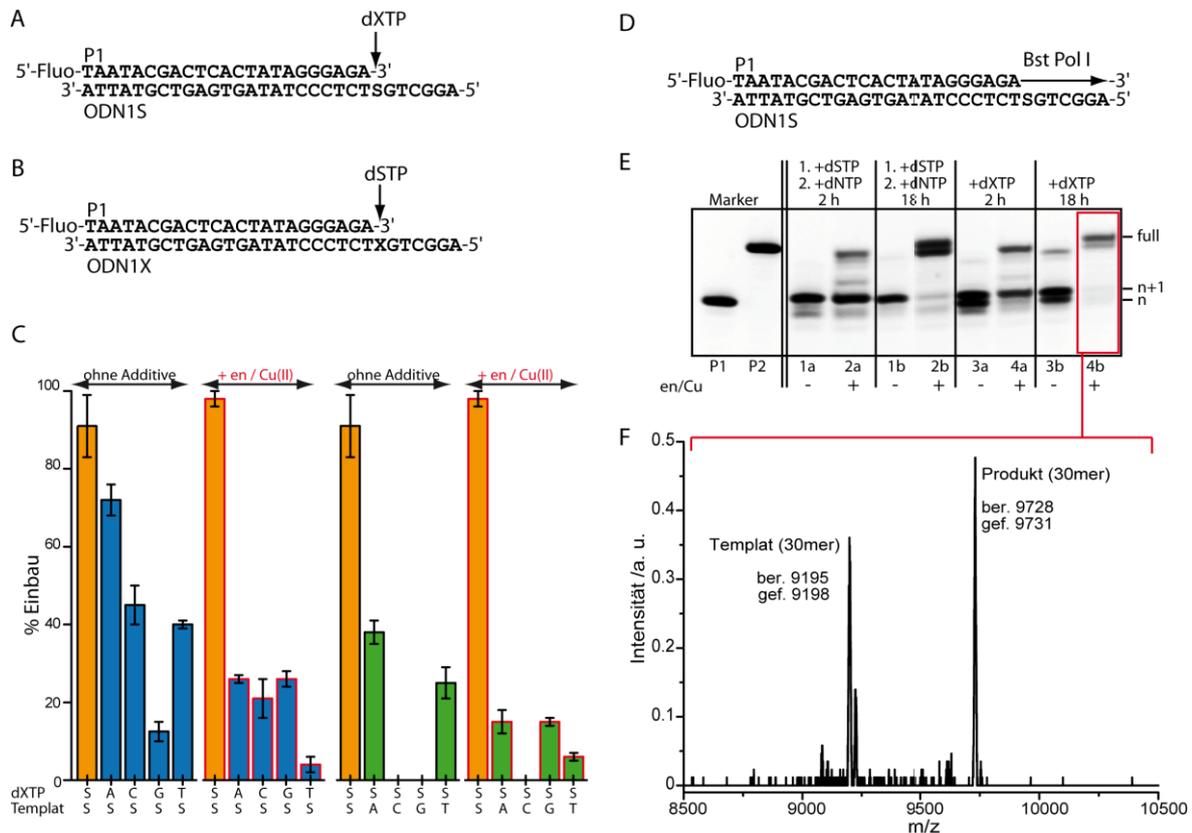


Abbildung 0.1: Primerverlängerungsreaktionen des dS-Cu-dS-Basenpaars mit der Polymerase Bst Pol I.

Das Basenpaar wurde auch in der Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Die benötigten langen modifizierten Templatstränge wurden durch eine Kombination aus chemischer und biochemischer Synthese hergestellt. Für die PCR wurde die Polymerase KOD XL mit stark verlängerten Zykluszeiten eingesetzt, da während

der Replikation der Bruch der kovalenten Ethylendiaminbrücke nötig war. Dennoch konnte das dreifach modifizierte Templat repliziert und amplifiziert werden (Abbildung 0.2 A+B). Das korrekte PCR-Produkt wurde mittels enzymatischem Totalverdau und anschließender LC-ESI-MS nachgewiesen (Abbildung 0.2 C+D).

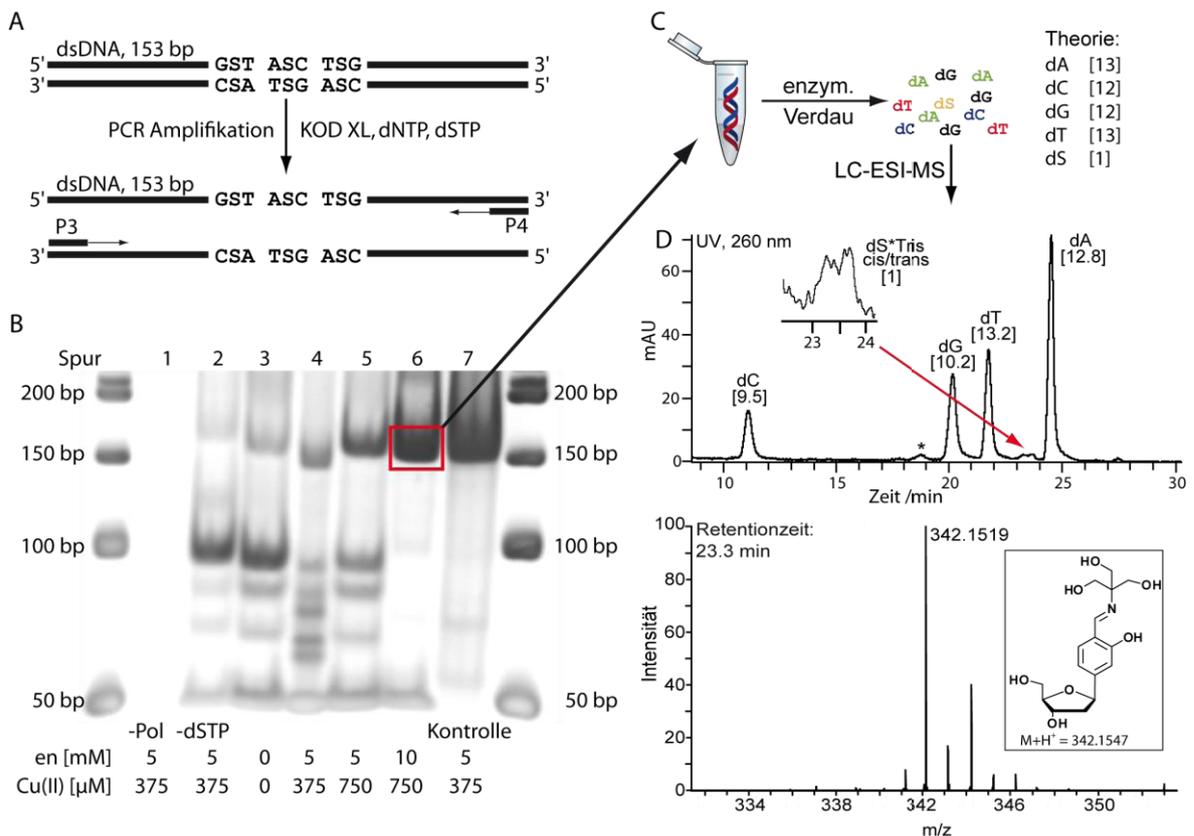


Abbildung 0.2: Replikation und Amplifizierung des Metall-Salenbasenpaars in der Polymerasekettenreaktion sowie Analytik des PCR-Produkts.

Es erfolgte die Aufklärung drei verschiedener Kristallstrukturen eines Komplexes aus der Polymerase Bst Pol I und mit dS-Basen modifizierter DNA. Dazu wurden verschiedene DNA-Stränge synthetisiert und mit der überexprimierten und aufgereinigten Polymerase zum Kristallisieren gebracht. Die Datensammlung erfolgte am Synchrotron. Struktur 1 zeigt eine dS-Base in der Präinsertionsstelle der Polymerase. Strukturen 2 und 3 zeigen die Modifikationen im doppelsträngigen Bereich der DNA. Während sich in Struktur 2 die beiden freien Salicylaldehyde im Doppelstrang ohne Wechselwirkung gegenüber stehen, ist in Struktur 3 das vollständige Kupfer-Salenbasenpaar ausgebildet. Das Ethyl-

diamin verbrückt die beiden Stränge der Doppelhelix, das Cu(II) sitzt zwischen den beiden Basen in einer quadratisch-planaren Umgebung (Abbildung 0.3).

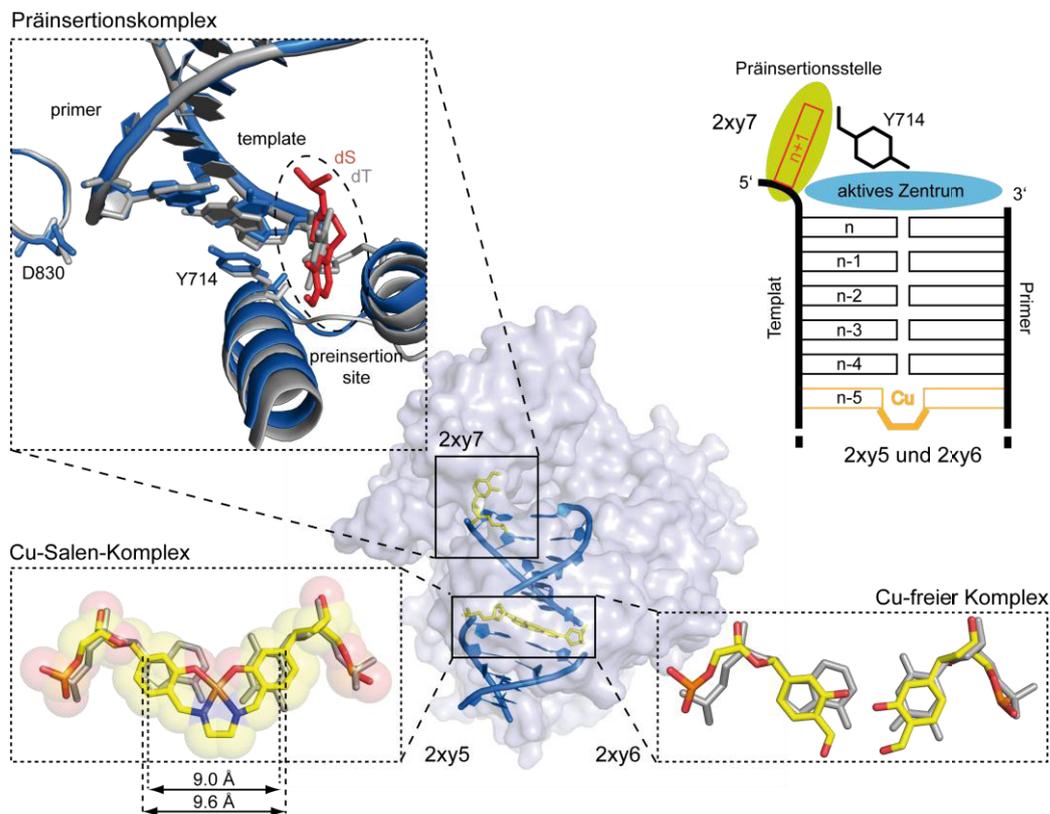


Abbildung 0.3: Kristallstrukturen der Polymerase Bst Pol I mit Salicylaldehyd-modifizierter DNA.

In einer Kooperation wurde die mechanische Stabilität der mit dem Salicylaldehyd-Basenpaar modifizierten DNA untersucht. In Zugexperimenten im AFM zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den freien Salicylaldehyden und dem entsprechenden Kupferkomplex. Die Kraft, die zur mechanischen Trennung des Doppelstrangs benötigt wurde, stieg nach Zugabe von Cu(II) von 50 auf 80 pN (Abbildung 0.4).

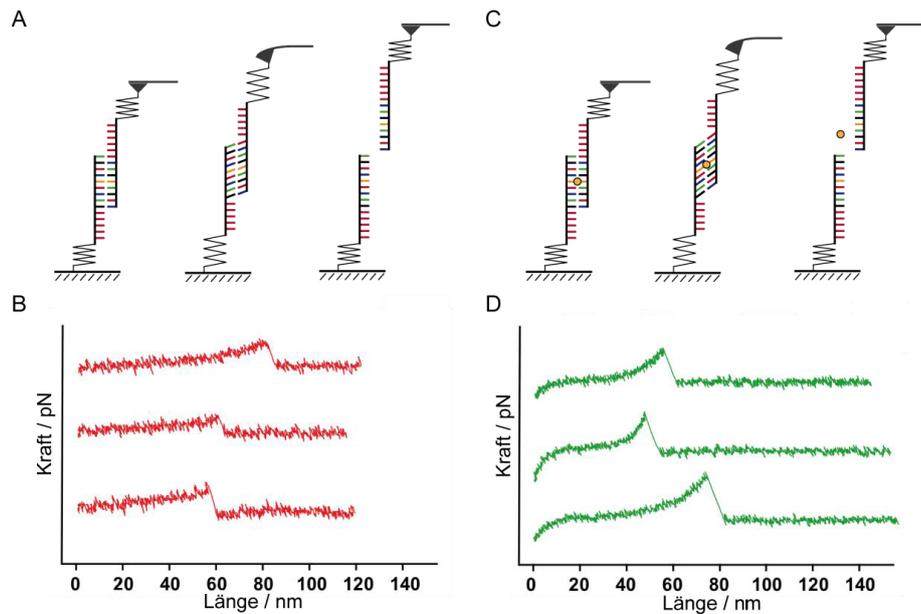
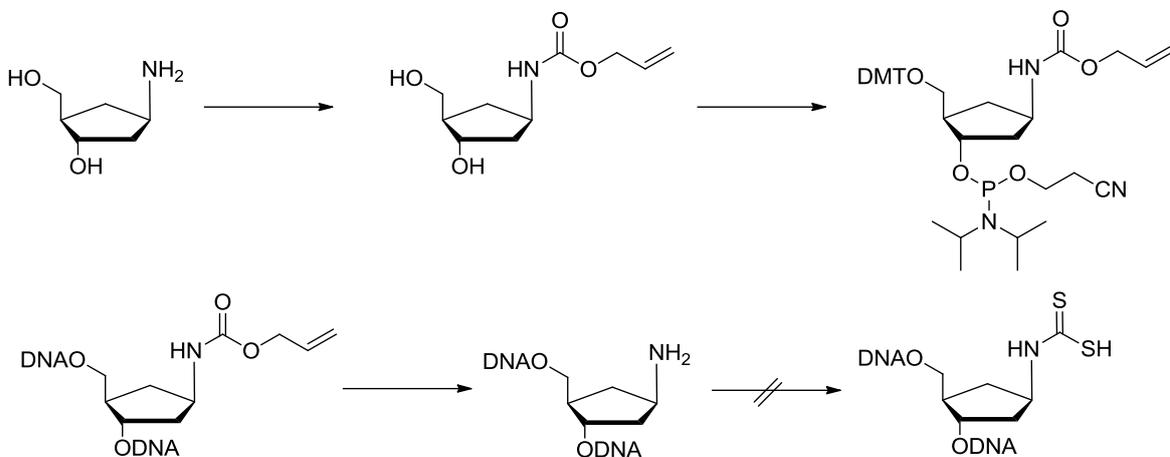


Abbildung 0.4: AFM-Experimente zur Untersuchung der mechanischen Stabilität von Metallbasenpaaren.

Zur Entwicklung weiterer Metall-Basenpaar wurde die Möglichkeit zur Synthese eines schwefelhaltigen Ligand-Nukleosids untersucht. Damit wäre die Koordination weicher Metallionen, wie Palladium(II) möglich. Für die postsynthetische Modifikation der DNA war der Einbau eines mit einem Amin funktionalisierten Nukleosids in DNA nötig. Als Vorstufe wurde das mit einer Alloc-Gruppe geschützte Amin in DNA eingebaut und an der festen Phase entschützt. Die Umsetzung der Aminogruppe mit CS_2 zur Ausbildung einer Dithiocarbamatfunktionalität konnte allerdings nicht erreicht werden (Schema 0.2).



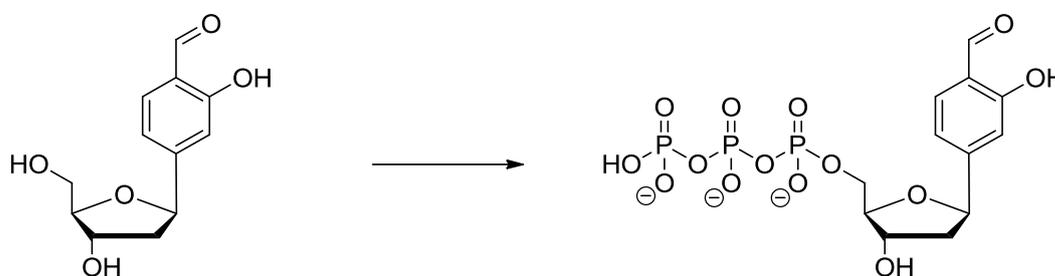
Schema 0.2: Einbau eines Aminfunktionalisierten Nukleosid-Analogs in DNA. Die Umsetzung zum Dithiocarbamat war nicht erfolgreich.

Summary

For more than 20 years many research groups around the world have endeavoured to expand the genetic code by the incorporation of non-natural base pairs into DNA. The criteria for the utilization of non-natural base pairs are challenging: base pairs need to be orthogonal and are not allowed to interact with the natural bases. The incorporation and extension in DNA should work enzymatically by polymerases. In this thesis, a unique base pair regime is introduced, which utilize does not rely on alternative hydrogen bonding patterns or hydrophobic interactions. Instead, the concept of metal base pairs was used, where natural bases were replaced by a complex between nucleoside analogue ligands and a metal ion. The incorporation of metal base pairs in DNA enabled the development of systems with interesting electronic and magnetic properties.

Within this work the two concepts of metal coordination and enzymatic incorporation of non-natural bases were combined via the utilization of the well-characterized metal salen base pair. This base pair is in addition to the coordinative forces mediated by a covalent crosslink. To assemble the salen two opposite salicylic aldehyde nucleosides were bridged by the addition of ethylene diamine followed by chelate complexation in the presence of Cu(II).

To introduce the metal salen base pair enzymatically into DNA the synthesis of a modified template as well as of a correspondent triphosphate was necessary. The synthesis of the salicylic aldehyde triphosphate dS_{TP} was based on the free nucleoside (Scheme 0.1).



Scheme 0.1: Synthesis of the salicylic aldehyde nucleoside triphosphate dS_{TP}.

Afterwards the triphosphate was used in primer extension reactions especially with the high-fidelity polymerase *Bst Pol I*. In selectivity experiments the influence of the additives ethylene diamine and Cu(II) on mismatch pairing was shown. For these experiments the dS base was used in the template or as triphosphate next to the natural bases. At almost all bases the misincorporation next to dS was reduced by the additives (Figure 0.1 A-C). The base pair dS:dS was enzymatically incorporated in DNA and extended under addition of the additives. (Figure 0.1 D+E). The verification of the correct product strand was provided by MALDI mass spectrometry (Figure 0.1 F).

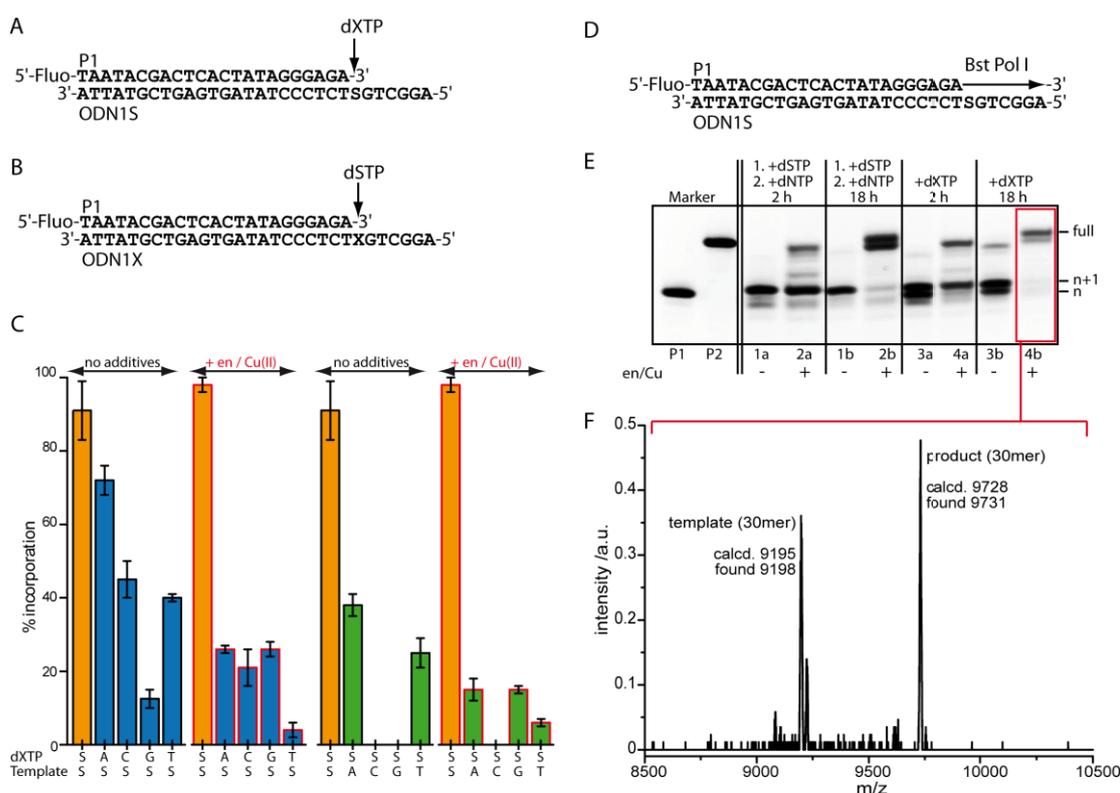


Figure 0.1: Primer extension reactions of the dS-Cu-dS base pair with the polymerase *Bst Pol I*.

The base pair was also used in the polymerase chain reaction (PCR). The required long and modified template strands were synthesized by a combination of chemical and biochemical methods. For PCR the thermophilic polymerase *KOD XL* was used with elongated cycle times due to the fact that during replication the break of the covalent ethylene diamine bridge was necessary. The threefold modified template was replicated and amplified successfully (Figure 0.2 A+B). The

correct PCR product was proven by enzymatic digest and subsequent LC-ESI-MS (Figure 0.2 C+D).

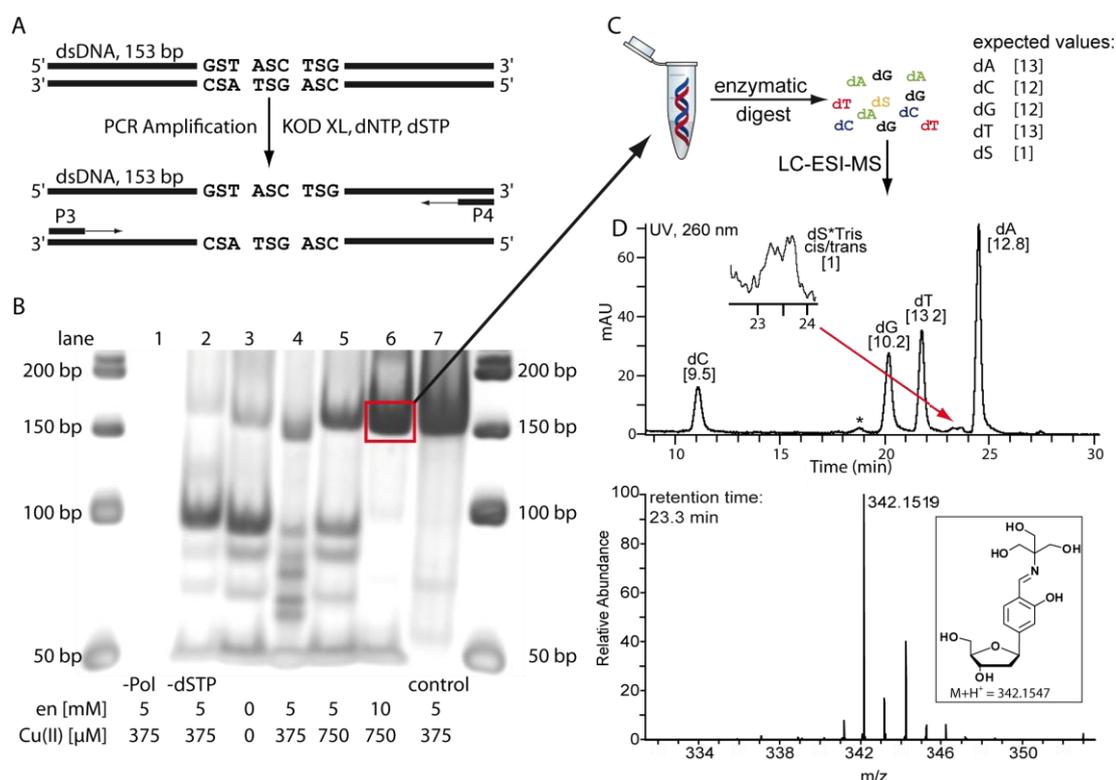


Figure 0.2: Replication and amplification of the metal-salen base pair in the PCR as well as analytic of the PCR product.

Three different crystal structures of polymerase Bst Pol I in complex with dS-modified DNA have been solved. Several different DNA strands have been synthesized and crystallized with the overexpressed and purified polymerase. Data collection was obtained at the synchrotron facility. Structure 1 showed a dS base in the preinsertion site of the polymerase. Structures 2 and 3 confirmed the modification in the double stranded region of the DNA. Whereas in structure 2 the two free salicylic aldehydes face each other without any attractive interaction, in structure 3 the complete copper salen base pair was formed. The ethylene diamine bridges the two strands of the double helix, the Cu(II) sits in between the two bases in a square-planar environment (Figure 0.3).

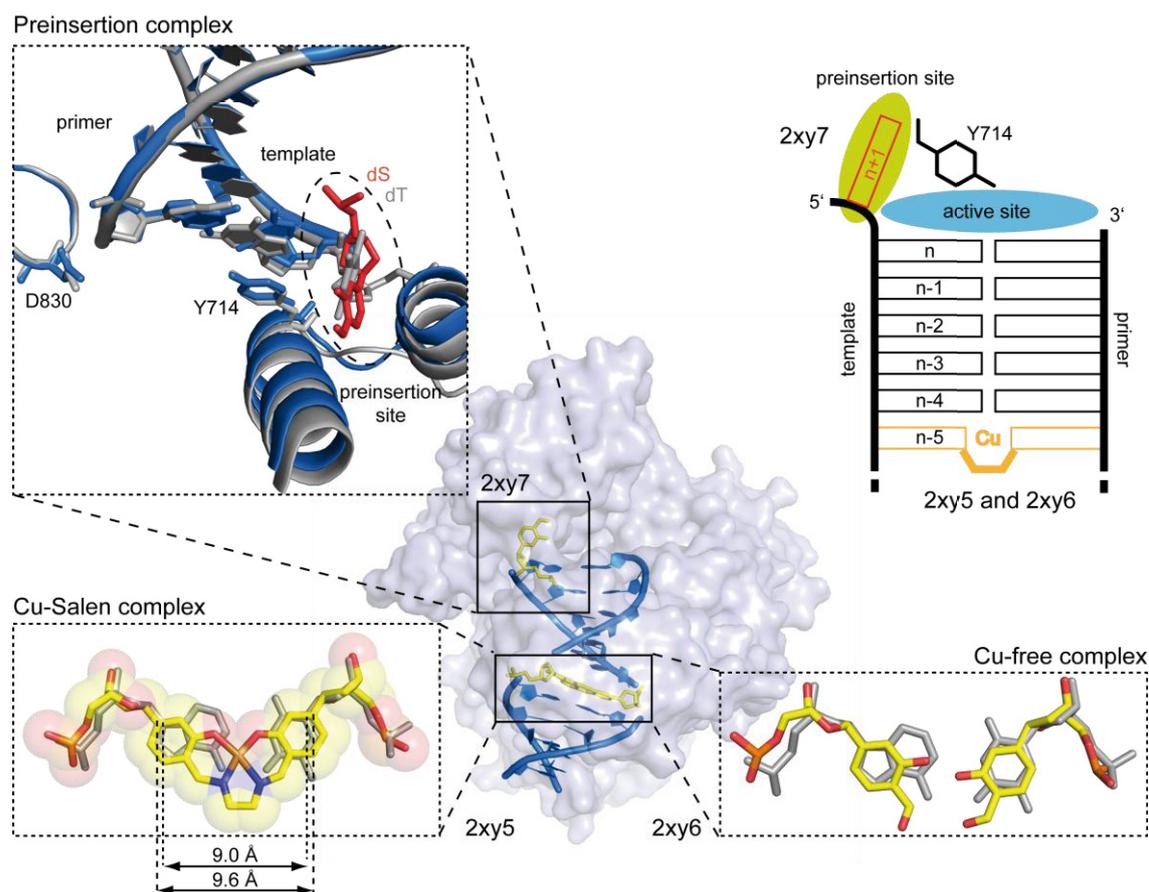


Figure 0.3: Crystal structures of the polymerase *Bst* Pol I with salicylic aldehyde modified DNA.

In collaboration with the group of Prof. Gaub the mechanic stability of the dS:dS modified DNA was investigated. In rupture force experiments in the AFM a clear difference between the free salicylic aldehydes and the according copper-complex arised. The force which was necessary for the mechanic dissociation of the double strand increased after the addition of Cu(II) from 50 to 80 pN (Figure 0.4).

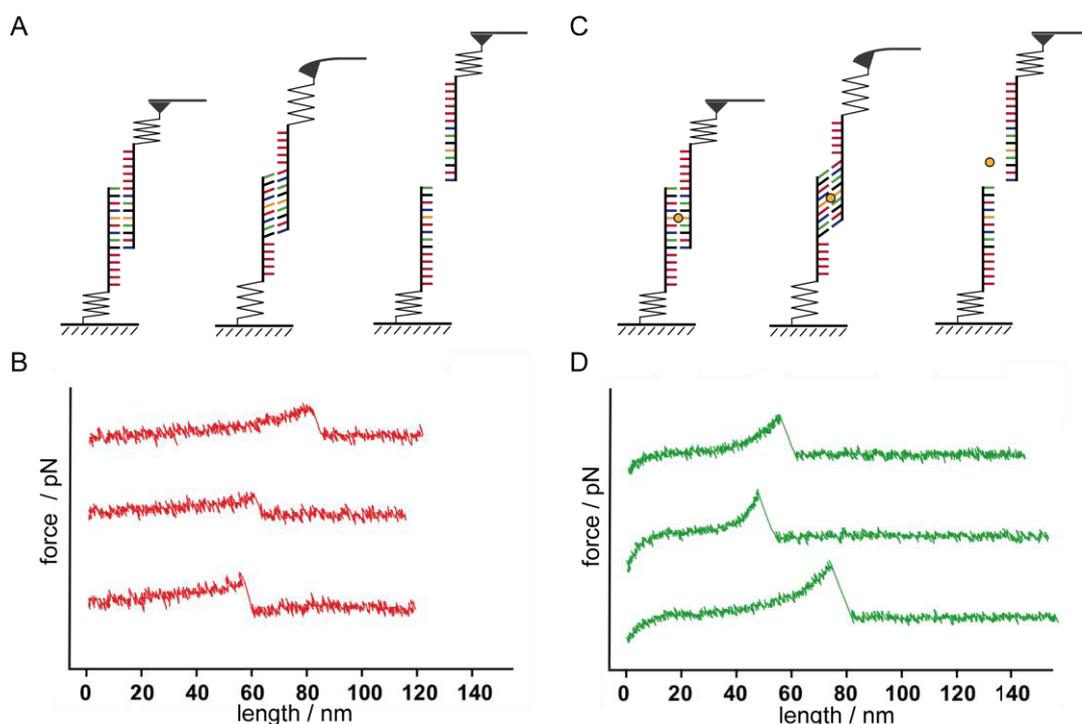
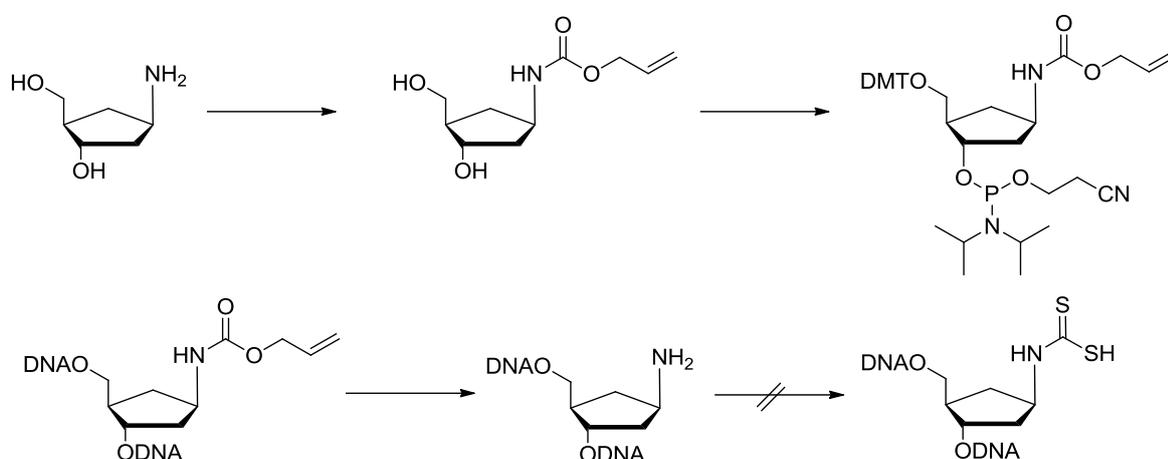


Figure 0.4: AFM experiments for the investigation of the mechanic stability of metal base pairs.

To develop new metal base pairs the synthesis of a sulphur containing ligand nucleoside was examined. Such a base pair would enable the coordination of soft metal ions like palladium(II). For post-synthetic modification of DNA the incorporation of an amine functionalised nucleoside in DNA was necessary. An Alloc protected amine was introduced into DNA as precursor and deprotected on the solid phase. The formation of the dithiocarbamate functionality by a reaction of the amino group with the CS_2 was nevertheless not achieved.



Scheme 0.2: Incorporation of an amine functionalized nucleoside analogue in DNA. The formation of the dithiocarbamate was not successful.

1. Einleitung

1.1 Nicht-natürliche Basenpaare in DNA

Die dreidimensionale Struktur der DNA-Doppelhelix wurde bereits 1953 von Watson und Crick aufgeklärt.^[1, 2] Das Zucker-Phosphatrückgrat windet sich dabei entlang einer zylindrischen Helix, die Nukleobasen sitzen im Zentrum. Die Ausbildung der Watson-Crick-Basenpaare dA:dT (**1, 2**) und dC:dG (**3, 4**) erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 1.1).^[1]

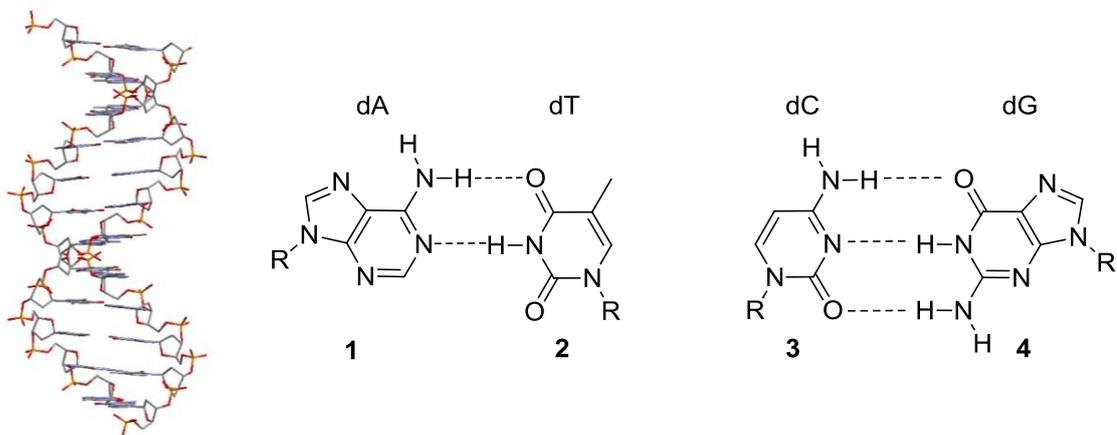


Abbildung 1.1: DNA-Doppelhelix in der B-Form^[3] sowie die Watson-Crick-Basenpaare dA:dT und dC:dG (R = Desoxyribosylrest).

Die primäre Funktion der DNA ist die Speicherung der genetischen Information, deren Grundlage die spezifische Paarung von dA mit dT und dC mit dG ist.^[4-7] Nach dem Umschreiben der DNA in mRNA (*messenger* RNA) während der Transkription, findet die Übertragung der genetischen Information in Proteine statt (Translation).^[8] Dabei werden die Basen in Dreiergruppen (Tripletcodons) abgelesen und in eine Aminosäure übersetzt. Durch die vier verschiedenen Basen und die Möglichkeit diese auf den drei Plätzen der Tripletcodons zu verteilen, ergeben sich 4^3 Codons. Diese 64 Codons werden in einem universellen Code in die 20 proteinogenen Aminosäuren übersetzt.^[8, 9] Würde man nun zusätzliche Basenbausteine in DNA einführen, so ergeben sich bei einem neuen Basenpaar dX:dY insgesamt 6^3 (= 216) und bei einem selbstpaarenden Paar dX:dX insgesamt 5^3 (= 125) Codons. Werden diese Codons transkribiert und in

unnatürliche Aminosäuren translatiert, wird die direkte Funktionalisierung von Proteinen ermöglicht (Abbildung 1.2).^[5]

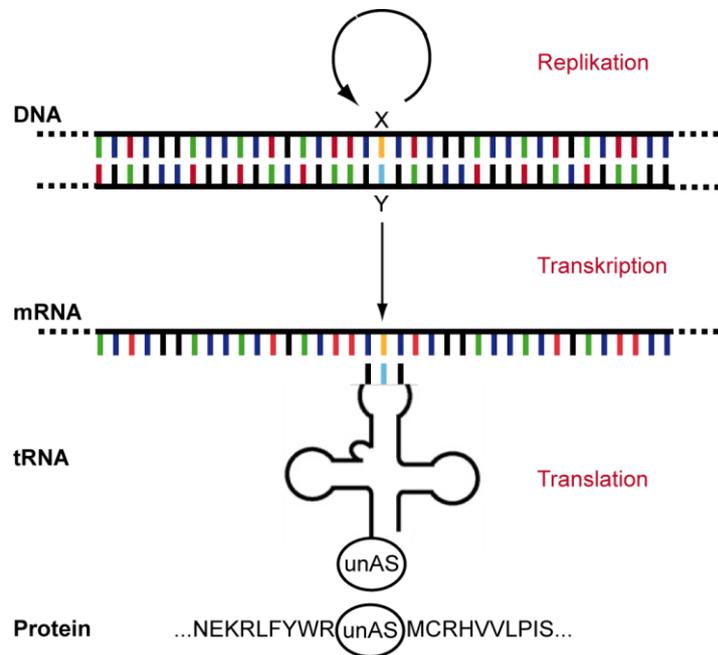


Abbildung 1.2: Die Erweiterung des genetischen Alphabets mittels einem nicht-natürlichen Basenpaar. Die Replikation, Transkription und Translation des Basenpaars dX:dY ermöglicht den spezifischen Einbau der unnatürlichen Aminosäure unAS in ein Protein.

Schon seit einigen Jahren gibt es Bestrebungen zur Erweiterung des genetischen Codes, indem man das Alphabet der DNA zusätzlich zu den kanonischen, natürlichen Bausteinen ausbaut. Für diesen Schritt müssen einige Kriterien erfüllt werden. Es gilt ein neues, künstliches Basenpaar zu kreieren, das dem Duplex Stabilität verleiht und mittels einer Polymerase replizierbar ist.^[4-7] Letzteres beinhaltet, dass ein Triphosphatbaustein von der Polymerase erkannt und akzeptiert, sowie effizient und selektiv gegenüber seinem Partner im Templat eingebaut wird. Zudem sollte kein natürliches Triphosphat gegenüber dem unnatürlichen Nukleotid eingebaut werden können. Da die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen lange als der Grund für die hohe Spezifität der Basenpaarbildung angesehen wurden, waren neue Wasserstoffbrückenmuster der erste Ansatz zur Erweiterung des genetischen Alphabets (Kap. 1.1.1).^[4-7] Erst später erkannte man, dass auch hydrophobe Basenpaare eingesetzt werden können (Kap. 1.1.2).^[10]

1.1.1 Alternative Wasserstoffbrückenbindungen

1989 beschrieben *Switzer et al.* den enzymatischen Einbau von *disoC:disoG* (**5, 6**, Abbildung 1.3) in DNA sowie die Transkription mittels T7 RNA-Polymerase in einen RNA-Strang.^[11-14] Das alternative Wasserstoffbrückenmuster führt zu einer Selektivität beim Einbau in DNA. Allerdings zeigte sich, dass *disoC* unter leicht alkalischen Bedingungen zu dU hydrolysiert.^[11] Zudem tritt oftmals Fehleinbau von dT gegenüber *disoG*-Paaren auf, da *disoG* (**6**) einer Keto-Enol-Tautomerie unterliegt. Während die Keto-Form komplementär zum *disoC* ist, zeigt das Enoltautomer *disoG'* (**7**) eine Komplementarität zum dT (Abbildung 1.3).^[14]

Auch das 5-Methylisocytidin **5a** (Abbildung 1.3) wurde eingesetzt, ebenfalls in Kombination mit *disoG*.^[15, 16] Dieses Basenpaar wurde auch in der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet, allerdings waren die Ergebnisse nur unbefriedigend, wiederum wegen der *disoG:dT-mismatch*-Bildung, die zu einem signifikanten Verlust des nicht-natürlichen Basenpaares während der PCR führt. Daher wurde dT gegen ein 2-Thiothymidin (**8**) ersetzt, die dadurch entstehende sterische Hinderung destabilisiert den *disoG:dT-mismatch*. Die $d^{2\text{-Thio}}\text{T:dA}$ -Paarung hingegen bleibt unbeeinträchtigt, da dA keine Wasserstoffbrücke zur C=S-Einheit ausbilden kann (Abbildung 1.3).^[16]

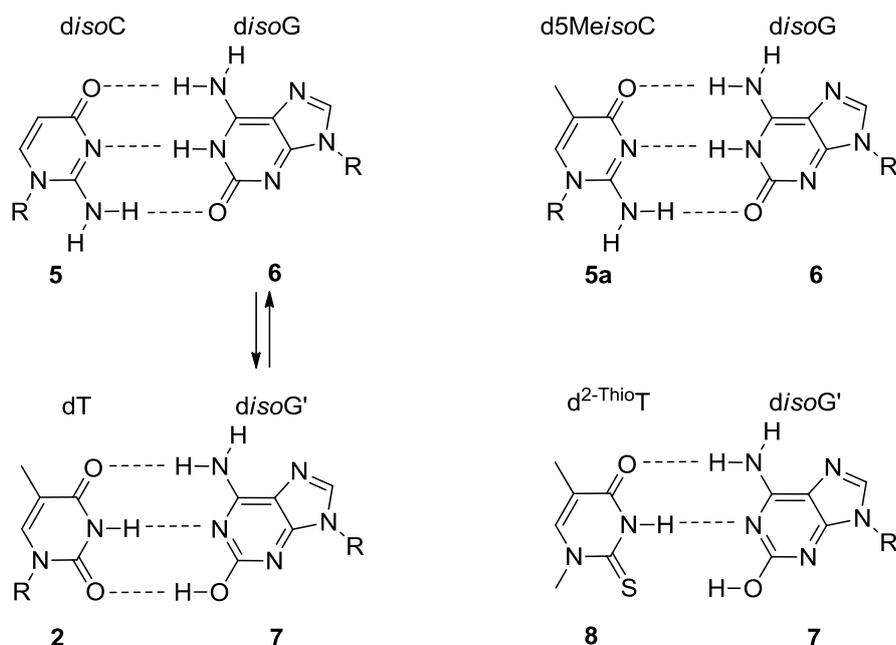


Abbildung 1.3: Übersicht über die nicht-natürlichen Basenpaare *disoC:disoG*, die Enolform *disoG'*, das d5MeisoC sowie das $d^{2\text{-Thio}}\text{T}$ (R = Desoxyribosylrest).

Ein weiteres Basenpaar mit alternativen H-Brücken, das ebenfalls in der Gruppe um *Benner* entwickelt wurde, ist das $d\kappa:dX$ (**9**, **10**, Abbildung 1.4).^[11] Obwohl anfangs vielversprechend, insbesondere auch wegen der kommerziellen Verfügbarkeit von dX , zeigte sich in späteren Versuchen, dass ein selektiver Einbau des $d\kappa TP$ gegenüber einem dX -Templat durch Polymerasen nicht möglich ist.^[17]

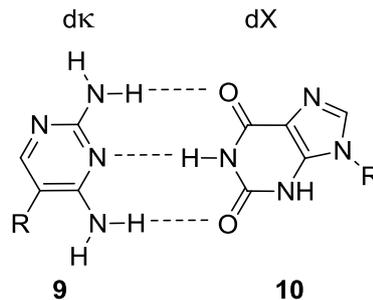


Abbildung 1.4: 3- β -D-Ribofuranosyl-(2,6-diaminopyridin) $d\kappa$ (**9**) paart über drei Wasserstoffbrücken mit dem Xanthosin dX (**10**); R = Desoxyribofuranosyl.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgte *Rappaport*, der natürliche Basen modifizierte und funktionelle Einheiten, die ursprünglich an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, durch Schwefel oder Wasserstoff ersetzte. Das so geschaffene $dT^h:dG^s$ -Paar (3- β -D-Ribofuranosyl-5-methyl-2-pyrimidinon **11**, 6-Thioguanosin **12**, Abbildung 1.5) ist durch zwei H-Brücken verbunden. Der Einbau mittels Polymerase ist möglich, allerdings findet ein hoher Fehleinbau von $dCTP$ gegenüber dG^s im Templat statt.^[18, 19]

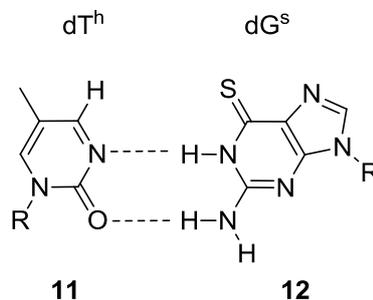


Abbildung 1.5: Zwei Wasserstoffbrücken stabilisieren das nicht-natürliche Basenpaar aus 3- β -D-Ribofuranosyl-5-methyl-2-pyrimidinon dT^h (**11**) und 6-Thioguanosin dG^s (**12**).

Auch die Gruppe um *Hirao* beschäftigte sich mit Basenpaaren durch alternative H-Brücken. So entwickelte sie die Basenpaare dy:dx (**13**, **14**, Abbildung 1.6 links)^[20] sowie dy:ds (**13**, **15**, Abbildung 1.6 rechts).^[21] Mittels Schmelzpunktanalysen zeigte sich, dass dy:ds zu einer besseren Duplex-Stabilität führt als dy:dx, vermutlich aufgrund verbesserter *stacking*-Eigenschaften der ds-Base.^[20] In Einzelnukleotidverlängerungen zeigte sich, dass ein enzymatischer Einbau der nicht-natürlichen Basen möglich ist, Experimente zu Vollverlängerungen wurden nicht durchgeführt.^[22]

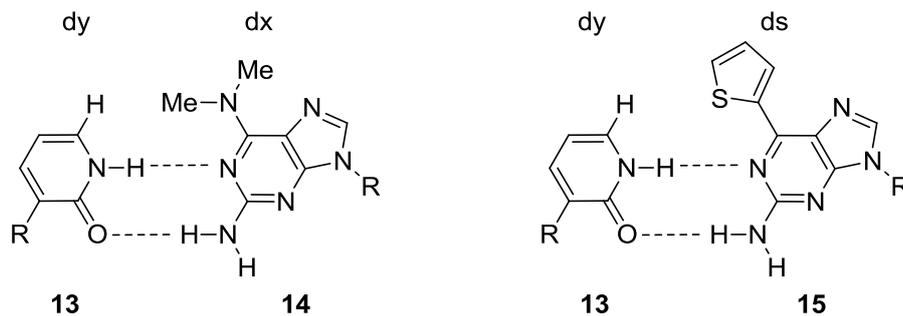


Abbildung 1.6: Die Basenpaare dy:dx (3- β -D-Ribofuranosyl-pyridin-2-on **13** und 3- β -D-Ribofuranosyl-2-amino-6-(*N,N*-dimethylamino)purin **14**) sowie dy:ds (**13** und 3- β -D-Ribofuranosyl-2-amino-6-(2-thienyl)purin **15**) aus der Gruppe um *Hirao*.

Kool et al. setzten stark vergrößerte DNA-Basen ein, abgeleitet von den natürlichen Basen mittels Benzannelierung. Gepaart wurde dabei jeweils eine natürliche Base mit der komplementären xBase. In dieser sog. xDNA (Abbildung 1.7), deren Basenpaare mittels der Polymerasen KF und Dpo4 in DNA gebildet und von Dpo4 auch verlängert werden können, sind die C1'-Abstände um etwa 2.4 Å größer als die der Standardbasenpaare. Zum enzymatischen Einbau wurde jeweils eine xBase im Templat mit den natürlichen Basen gepaart.^[23] Es wurden keine Triphosphate der xBasen eingesetzt. Aufgrund der geringeren Effizienz beim Einbau der natürlichen Triphosphate gegenüber den xBasen wird deutlich, dass die Größe des Basenpaars den enzymatischen Einbau beeinflusst.^[23]

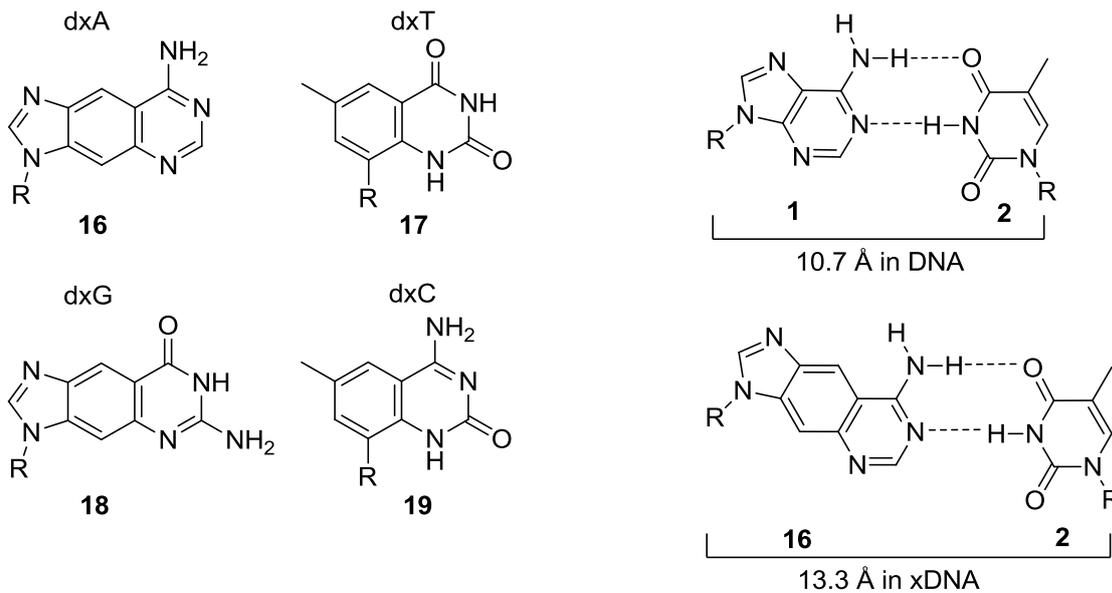


Abbildung 1.7: Die vergrößerten Basen der xDNA, dxA **16**, dxT **17**, dxG **18** und dxC **19**. Zum Größenvergleich wurden die Abstände der C1-Atome von einem natürlichen dA:dT-Basenpaar und einem vergrößerten dxA:dT-Paar verglichen.^[23]

Aktuell steht besonders das dP:dZ-Basenpaar **20**, **21**, Abbildung 1.8) von *Yang et al.* im Vordergrund.^[24] Drei Wasserstoffbrücken bilden das Basenpaar aus, das nicht nur in einfachen Primerverlängerungsreaktionen eingesetzt werden kann, sondern auch für die PCR geeignet ist.^[25]

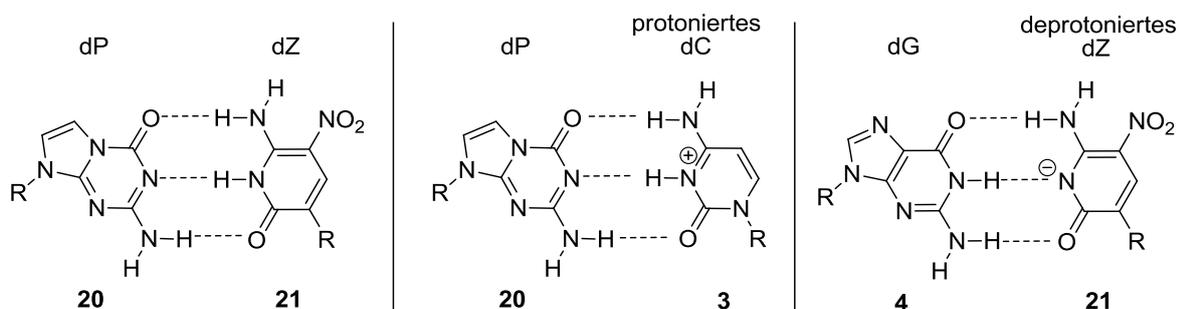


Abbildung 1.8: Das dP:dZ-Basenpaar aus 2-Amino-8-(1'- β -D-2'-deoxyribofuranosyl)-imidazo[1,2-a]-1,3,5-triazin-4(8H)-on (**20**) und 6-Amino-5-nitro-3-(1'- β -D-2'-deoxyribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (**21**), sowie die pH-abhängigen Fehlpaarungen dP:(dC+H⁺) und dG:(dZ-H⁺).

Es sind sowohl Polymerasen der A-Familie (*Bst*, *Taq*, u.a. alle exo^-) als auch der B-Familie (*Vent*, *DeepVent* u.a., exo^- und exo^+) in der Lage das Basenpaar zu bilden. Der Einbau von dZTP gegenüber dPTP schien leichter zu sein, als der Einbau von dPTP gegenüber dZTP. Zudem zeigten sich in pH-abhängigen PCR-Ansätzen, dass ein Austausch des dZ:dP-Paars gegen ein dG:dC-Paar möglich

ist. Dies geschieht durch die Protonierung von dC bei niedrigen pH-Werten, das dann einen *mismatch* mit dP bilden kann, bzw. durch eine Deprotonierung von dZ bei hohen pH-Werten, das nun in der Lage ist einen *mismatch* mit dG zu bilden (Abbildung 1.8). Nach mehreren PCR-Zyklen ist so der komplette Austausch des dZ:dP durch ein dG:dC-Basenpaar erfolgt. Die besten Ergebnisse zur Erhaltung des dZ:dP-Basenpaars erzielte man bei einem pH-Wert von 7.8 bis 8.0. Allerdings riskierte man damit einen Austausch von dC:dG zu dZ:dP.^[25]

Dennoch scheint das dZ:dP-Basenpaar vielversprechend und wurde bereits eingesetzt, um z.B. das Signal-Rauschverhältnis bei *molecular beacons* zu verringern. Durch die eingebauten Modifikationen werden Duplexbildungen mit anderweitig vorhandener DNA oder eine Hybridisierung zwischen *loop*- und *stem*-Sequenz vermieden.^[26] Weiterhin fand sich bereits ein Einsatzgebiet in der *nested* PCR (verschachtelte PCR). Diese ist sehr gut geeignet, wenn im Vergleich zur Gesamt-DNA-Menge nur geringe Mengen an zu amplifizierender DNA vorliegen. Es werden dann zwei PCR hintereinander ausgeführt, mit äußeren und inneren Primern. Enthielten die äußeren Primer dP, ergaben sich bessere Ergebnisse für die geschachtelte PCR, da keine Primer-Dimere gebildet werden konnten und die Primer nicht unspezifisch an genomische DNA banden.^[27]

1.1.2 Hydrophobe Wechselwirkungen als ausreichende Voraussetzung zur Bildung spezifischer Basenpaare

Erst im Jahr 1997 beobachtete *Kool*, dass H-Brücken zwischen den Basen keine absolute Voraussetzung zur Replizierbarkeit einer Base sind.^[28] Strukturelle Ähnlichkeit zu den Standardbasen und die Möglichkeit zur Ausbildung von *Van-der-Waals*-Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen sind ausreichend.^[4] Zudem wird Tautomerisierung, wie beispielsweise beim *disoG* vermieden. So synthetisierten *Moran et al.* das Difluortoluolnukleosid dF (**22**, Abbildung 1.9) als nichtpolares, strukturähnliches Analog zu dT. Diese modifizierte Base kann keine Wasserstoffbrücken zu dA ausbilden, dennoch wurde gegenüber dF im Templat mit relativ hoher Selektivität und Effizienz ein dATP eingebaut.^[28] Auch das dFTP wurde von der Polymerase als Substrat akzeptiert und mit dA gepaart.^[10]

Zur Erweiterung des Konzepts wurden zusätzlich nicht-polare dA-Analoga synthetisiert, um H-Brücken vollständig auszuschließend. Sowohl das dZ (**23**, Abbildung 1.9), als auch das dQ (**24**, Abbildung 1.9) wurden enzymatisch eingebaut und dienten als Templat für dFTP.^[29] Allerdings zeigte sich, dass eine Vollverlängerung des Strangs effizienter ist, wenn ein dATP gegenüber dem dF bzw. ein dTTP gegenüber dem dZ eingebaut wurde.^[30] Dies ist ein bedeutender Nachteil des Systems.

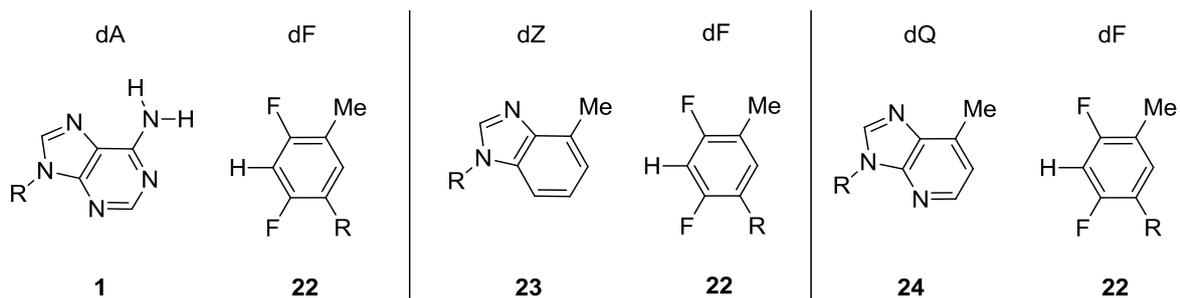


Abbildung 1.9: Das dF (2,4-Difluortoluolnucleosid, **22**) und seine möglichen komplementären Basenpartner dA (**1**), dZ (4-Methylbenzimidazoldeoxynucleosid, **23**) und dQ (9-Methyl-1H-imidazol[(4,5)-b]pyridinnucleosid, **24**).

Um zu zeigen, dass zur Replizierbarkeit ein Basenpaar mit dem gleichen sterischen Anspruch wie ein kanonisches Basenpaar ausreichend ist, entwickelten *Kool* und Mitarbeiter einen spezifischen Partner zur abasischen Stelle Φ (**25**), das Pyrennucleotid dP (**26**, Abbildung 1.10).^[31-33] Der Einbau des entsprechenden Triphosphats dPTP gegenüber einer abasischen Stelle war effizient und selektiv und ermöglichte deren Sequenzierung. Allerdings konnte über das Basenpaar dP:d Φ hinaus keine Weiterverlängerung beobachtet werden, zudem war der Einbau von d Φ TP gegenüber einem dP im Templat nur mit schlechter Effizienz möglich.^[34]

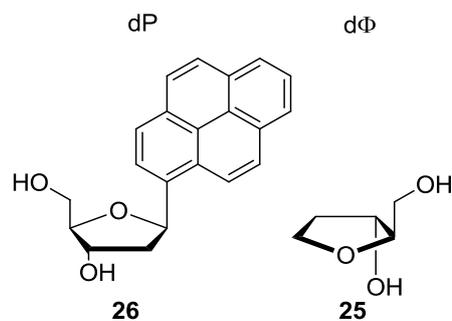


Abbildung 1.10: Das Pyrennucleosid (**26**) ist ein spezifischer Partner für die abasische Stelle d Φ (**25**).

Auch die Gruppe um *Romesberg* beschäftigte sich ausgiebig mit hydrophoben Basenpaaren zur Erweiterung des genetischen Codes. Es wurden mehrere, ähnliche Nukleoside synthetisiert, eine Auswahl ist in Abbildung 1.11 gezeigt.^[35-37]

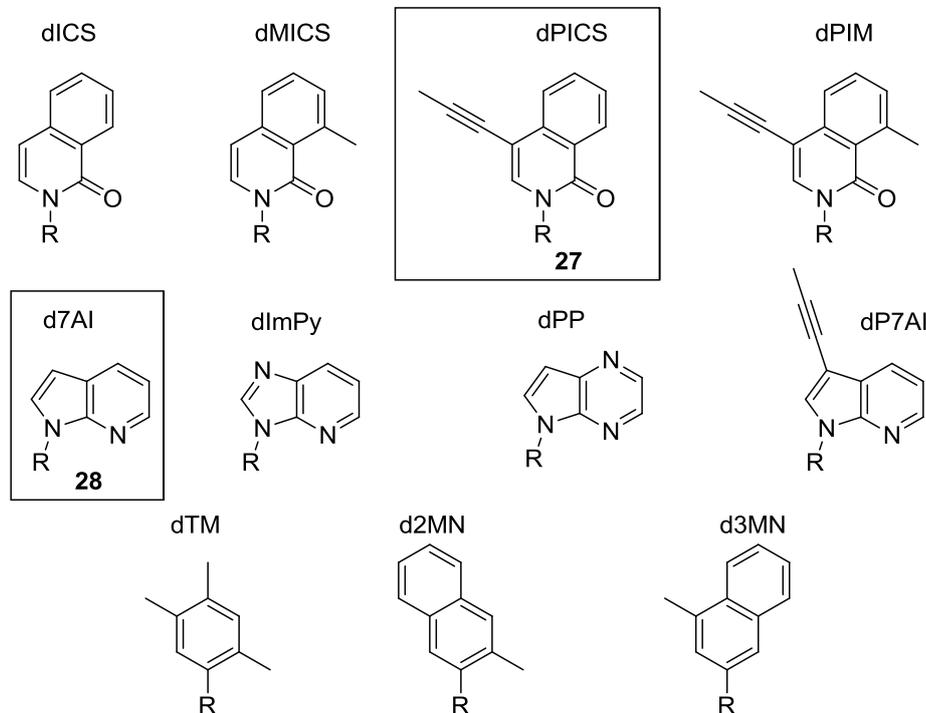


Abbildung 1.11: Auswahl der von *Romesberg et al.* synthetisierten hydrophoben Nukleoside.

Erstmals kamen auch selbstpaarende Moleküle zum Einsatz, wie das dPICS:dPICS (**27**, Abbildung 1.12)^[38-40] oder das d7AI:d7AI (**28**, Abbildung 1.12).^[41-43]

Das dPICS:dPICS-Basenpaar weist zwar eine ähnliche Stabilität wie ein kanonisches dC:dG-Baar auf und kann gut vom Klenow-Fragment (KF) in DNA eingebaut werden,^[38, 41] allerdings ist eine anschließende Verlängerung des Strangs nicht möglich.^[35]

Das d7AI-Selbstpaar hingegen kann von KF einigermaßen effizient synthetisiert werden und eine Verlängerung des Strangs ist möglich, wenn auch mit schlechter Effizienz. Interessanterweise aber ist die Polymerase β (Pol β) zwar nicht in der Lage das Basenpaar zu bilden, aber kann nach dessen Einbau durch KF eine weitere Verlängerung des Strangs durchführen.^[43] In diesem binären Polymerase-Kontext zeigt das d7AI:d7AI-Paar eine hohe Effizienz und Genauigkeit, dennoch könnte die Notwendigkeit zweier Polymerase unerwünscht sein.^[43]

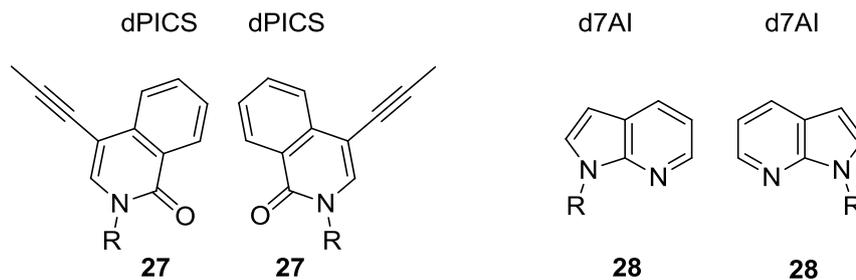


Abbildung 1.12: Selbstpaarende, hydrophobe, nicht-natürliche Basenpaare ausgehend vom Propinylhydroxyisochinolinnukleosid **27** und 7-Azaindolnukleosid **28**.

Hirao et al. griffen die von *Kool* vorgestellte dQ-Base (**24**, Abbildung), die als dA-Analog entwickelt wurde, auf und synthetisierten ein Pyrrol-2-carbaldehydnukleosid dPa (**29**, Abbildung) als potentiellen Partner zur optimalen Selektivität und Verlängerung.^[44, 45] Obwohl der Duplex durch das Basenpaar dQ:dPa destabilisiert wird, wird das Basenpaar durch eine Polymerase effizient synthetisiert und verlängert. Der *mismatch* dA:dPa, der durch den fehlerhaften Einbau von dATP auftritt, wurde nicht effizient verlängert.^[45] Dies macht das dQ:dPa derzeit zu einem der vielversprechendsten „dritten“ Basenpaare.^[4]

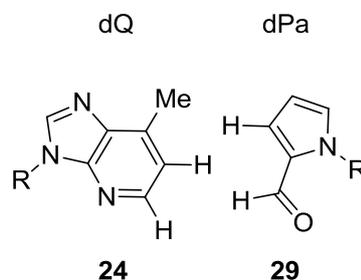


Abbildung 1.13: Hydrophobes Basenpaar aus dQ (9-Methyl-1*H*-imidazol[(4,5)-*b*]pyridinnukleosid, **24**) und dPa (Pyrrol-2-carbaldehydnukleosid, **29**).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass *Hirao et al.* dieses Basenpaar weiterentwickeln. Sie stellten 2006 das dDs:dPa-Basenpaar (**30**, **29**, Abbildung 1.14) vor.^[46] Neben den entsprechenden DNA-Triphosphat- und Phosphoramiditbausteinen synthetisierte die Gruppe auch die RNA-Triphosphate PaTP und DsTP, sowie markierte Varianten, wie Biotin-PaTP (**31**, Abbildung 1.14).

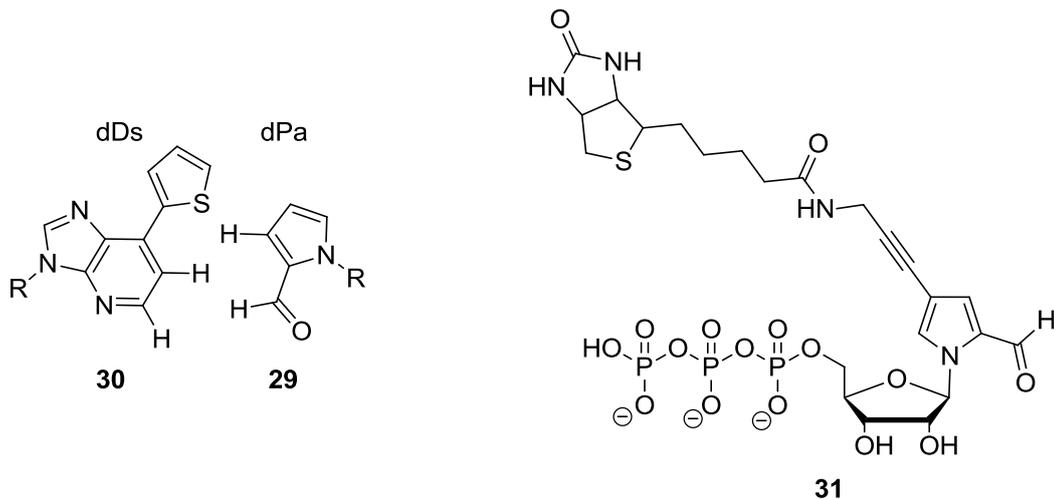


Abbildung 1.14: Das Basenpaar aus 7-(2-Thienyl)-imidazol[4,5-*b*]pyridinnukleosid dDs (**30**) und Pyrrol-2-carbaldehyd dPa (**29**) kann selektiv und effizient als drittes Basenpaar in der PCR eingesetzt werden und mit Hilfe der entsprechenden RNA-Triphosphate, z.B. dem markierten Biotin-Pa-triphosphat (**31**) transkribiert werden.

So gelang es der Gruppe, das Basenpaar mittels PCR effizient und selektiv zu replizieren und zu amplifizieren. Darüber hinaus ist es möglich mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase eine Transkription in RNA durchzuführen. Wird das biotinylierte RNA-Triphosphat von Pa (**31**) eingesetzt, ist sogar eine ortsspezifische Markierung der RNA möglich. Dennoch sind auch bei diesem Basenpaar besondere Maßnahmen nötig. So muss, um eine Selbstpaarung von Ds zu verhindern, das entsprechende γ -Amidotriphosphat dDsTP_N eingesetzt werden, dessen Einbaueffizienz allerdings niedriger ist, als die des unmodifizierten Substrats. Um den Fehleinbau von dATP gegenüber einem dPa zu verringern, wird auch hier das γ -Amidotriphosphat dATP_N verwendet.^[46]

Ersetzt man den dPa-Baustein durch ein dPn (**32**, Abbildung 1.15), so kann man auf den Einsatz von dATP_N zu verzichten und das natürliche dATP zu verwenden.^[47] Dies ist vermutlich dadurch möglich, dass nun anstelle des Aldehyd-Wasserstoffs ein Sauerstoff der Nitrogruppe sitzt, der keine Wasserstoffbrücke zum dA ausbilden kann (Abbildung 1.15).^[47] An weiteren Verbesserungen des Systems wird gearbeitet,^[48] mittlerweile existiert auch ein fluoreszierendes Analog zum dDs, die dDss-Base (**33**, Abbildung 1.15), die ebenfalls repliziert und transkribiert werden kann.^[49]

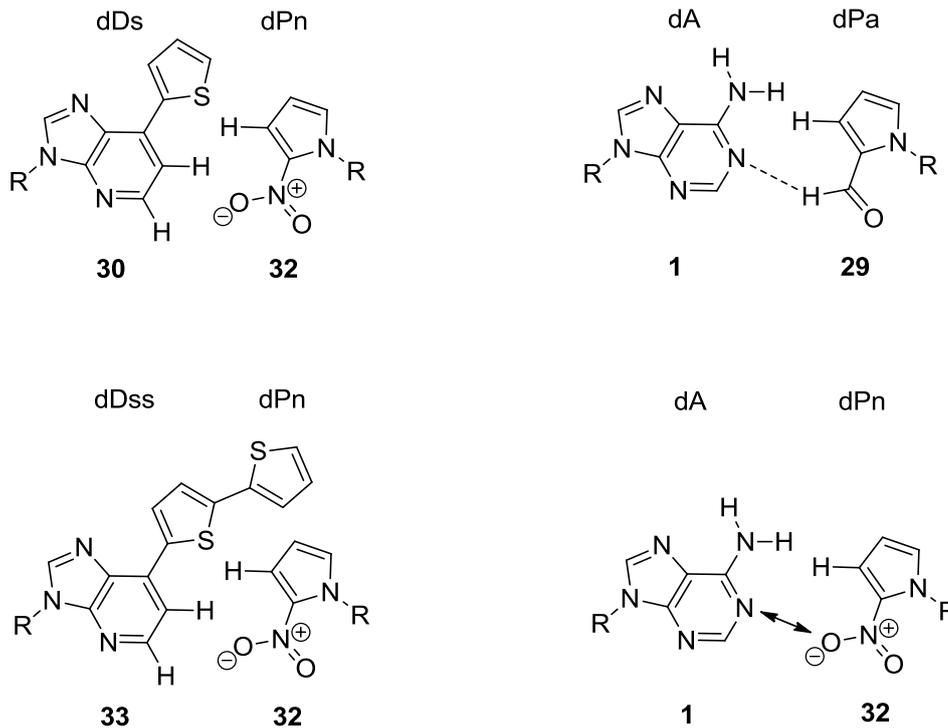


Abbildung 1.15: Das verbesserte hydrophobe Basenpaar dDs:dPn (2-Nitropyrrolnuklosid **32**). Die rechten Abbildungen zeigen, wie die Selektivität bei dPn durch das Wegfallen der Wasserstoffbrücke zu dA verbessert werden kann. **33** zeigt die fluoreszierende Base dDss (7-(2,2'-Bithien-5-yl)-imidazo[4,5-*b*]pyridin).

1.2 Metall-Basenpaare

Die Strukturvielfalt der DNA kann aber auch anderweitig durch den Einbau modifizierter Basen erhöht werden, die ganz neue Funktionalitäten in die DNA einführen, z.B. durch Metall-Basenpaare.^[50-52] Obwohl es sich dabei teilweise um künstlich modifizierte Nucleobasen handelt, wurden diese bisher nicht in die Gruppe der nicht-natürlichen Basenpaare zu Erweiterung des genetischen Codes eingeordnet. Der Einbau in DNA erfolgte ausschließlich über DNA-Festphasensynthese.^[50-52]

Bei den Metall-Basenpaaren wirken die Nucleoside als Liganden, die Metallionen koordinieren. Baut man diese sog. Ligandoside in einen DNA-Doppelstrang ein, so bildet sich ein Metallion-Komplex im Zentrum der Doppelhelix. Die in natürlichen Basenpaaren vorhandenen H-Brücken zur Ausbildung der Doppelstränge werden bei Metall-Basenpaaren durch koordinative Bindungen ersetzt, man spricht auch von Metallion-vermittelten Basenpaaren (Abbildung 1.16).^[50-52]

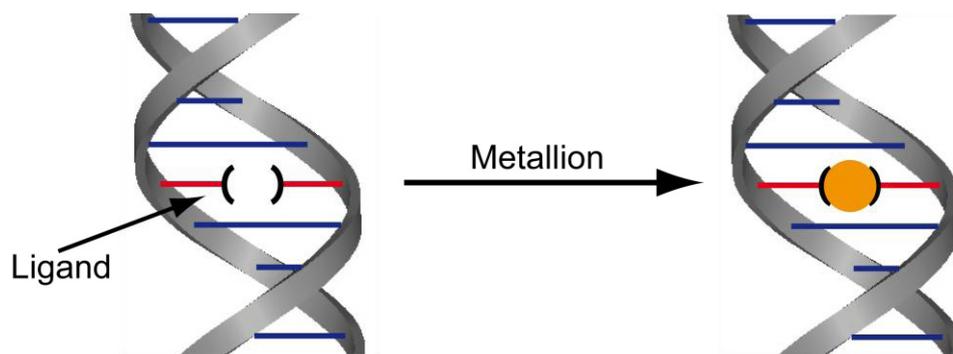


Abbildung 1.16: Konzept eines Metall-Basenpaars in DNA.

Wichtig für die Entwicklung der Ligandoside ist die Kompatibilität mit der DNA-Synthesechemie. Zudem sollte das komplexierende Basenpaar eine höhere Affinität zu den Metallionen besitzen als die natürlichen *Watson-Crick*-Basenpaare und eine ähnliche Größe wie diese aufweisen, um die Bildung eines stabilen Doppelstrangs zu ermöglichen. Inspiriert von der planaren Struktur der Basenpaare wurden vor allem quadratisch-planare Komplexe untersucht. Es gibt bereits einige bekannte Systeme, die dieses Konzept aufgreifen. *Katz* fand als erster die unspezifische Bindung von Quecksilber(II)-Ionen an DNA und postulierte einen entsprechenden Metall-Basen-Komplex.^[53] 1996 bestätigte dies *Marzilli* durch Bildung des T-Hg²⁺-T-Komplexes in DNA-Haarnadeln.^[54] *Tanaka* und *Shionoya* gelang die Synthese des ersten freien Metall-Basenpaars unter Verwendung modifizierter Nucleoside, also artifizierlicher Basen.^[55] Die erste erfolgreiche Bildung eines Metall-Basenpaares innerhalb der DNA wurde von *Schultz et al.* durchgeführt. Sie komplexieren Silber- und Kupferionen mit modifizierten Pyridinen (Abbildung 1.17).^[56-60] Dabei verwendet die Gruppe um *Schultz* das Pyridin-2,6-dicarboxylatnucleosid (**34**, X = O) als dreizähligen Liganden und ein einfaches Pyridin-Nucleosid (**35**), die sich in einem DNA-Doppelstrang gegenüberstehen. Die Zugabe von Cu²⁺-Ionen führt zur Ausbildung des Metall-Basenpaares sowie zu einer Stabilisierung des DNA-Duplex.^[57]

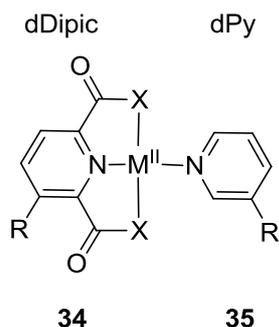


Abbildung 1.17: Das erste in DNA eingebaute Metall-Basenpaar aus dDipic (**34**, X = O, M = Cu) und dPy (**35**). Alternativ wurde auch X = NH, NCH₃ verwendet (R = Desoxyribosyl).

Es wurden weitere modifizierte Pyridine von der Gruppe entwickelt, unter anderem auch ein System zur Komplexierung von Silberionen, das auf weiche Schwefelatome als Koordinationsstellen zurückgreift (dSPy, **36**, Abbildung 1.18).^[59]

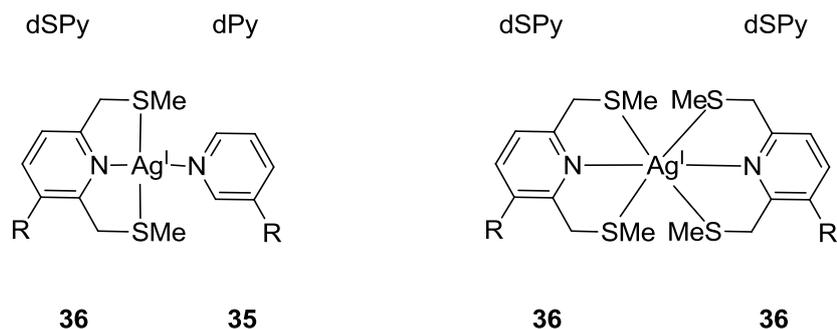


Abbildung 1.18: Die schwefelhaltige Nucleobase dSPy (**36**) kann gemeinsam mit einem Pyridin-nucleosid (dPy, **35**) oder als Selbstpaar Silber(I) komplexieren.

Auch Bipyridine eignen sich als Liganden, wie *Tor et al.* zeigten (Abbildung 1.19).^[61] Modifizierte und substituierte Bipyridine wurden noch mehrfach zur Komplexierung von Metallionen in DNA verwendet (z.B. dPurP:dPurP, Abbildung 1.19).^[62-66]

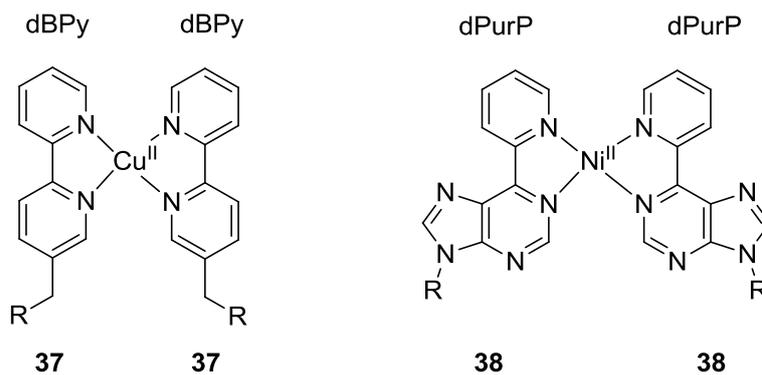


Abbildung 1.19: Bipyridine (dBPY, **37**) als Liganden für Cu(II)^[61] und eine Modifikation dPurP (**38**) zur Komplexierung von Ni(II).^[65]

Shionoya und Mitarbeiter entwickelten einen Liganden auf Hydroxypyridon-Basis (**39**, Abbildung 1.20), der zur Komplexierung von Cu²⁺-Ionen in DNA geeignet ist.^[67] Zudem zeigten sie, dass einfache Pyridin-Nukleoside (**35**, Abbildung 1.20) als Liganden für Silberionen in DNA eingesetzt werden können.^[68] Anschließend entwickelten sie mehrere Schwefelanaloga zu dem Hydroxypyridonbasenpaar (**40**, **41**, Abbildung 1.20), mit dem Ziel weiche Metallionen, wie Palladium zu komplexieren. Allerdings gelang es nicht, diese Moleküle in DNA einzubauen, so dass nur die freien Komplexe publiziert wurden.^[69]

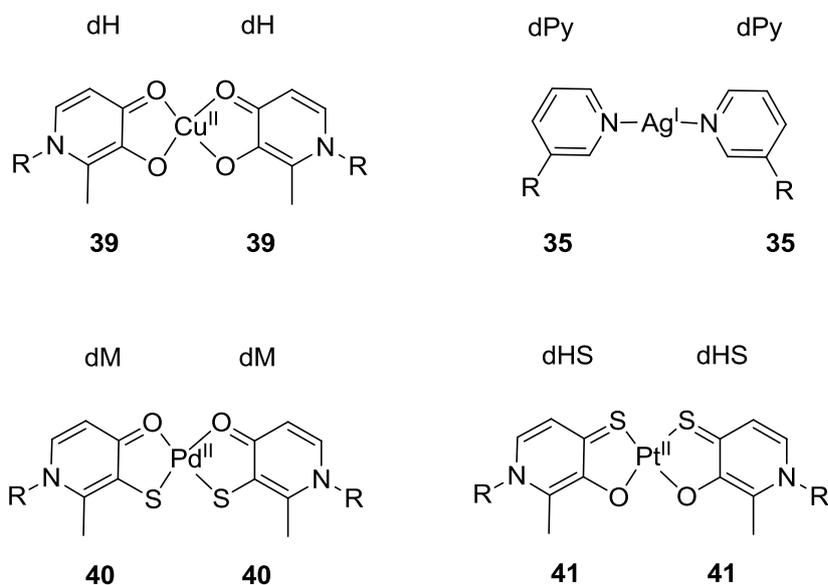


Abbildung 1.20: Die Metallbasenpaare aus der Gruppe um Shionoya: Das Hydroxypyridon-nukleosid komplexiert als Selbstpaar Cu(II) (**39**, dH, oben links), Pyridinnukleoside dienen als Liganden für Silber(I) (**35**, dPy, oben rechts) und die Schwefelanaloga des dH, das Mercaptopyridon (**40**, dM, unten links) bzw. das Hydroxypyridinethion (**41**, dHS, unten rechts) sind zur Komplexierung weicher Metallionen, wie Palladium(II) und Platin(II) geeignet.

Das erste entdeckte Metallbasenpaar T-Hg(II)-T (**2**, Abbildung 1.21) wurde in den späteren Jahren oftmals wieder aufgegriffen,^[70-72] z. B. von *Ono*, der damit unter anderem einen hochselektiven Quecksilber(II)-Sensor auf Oligonukleotid-Basis entwickelte.^[71] Es sind auch noch weitere Kombinationen von *mismatches* aus natürlichen Basenpaaren in der Lage Metallionen zu koordinieren.^[73, 74] So kann z.B. ein C-C-*mismatch* Ag(I) komplexieren (**3**, Abbildung 1.21).^[73]

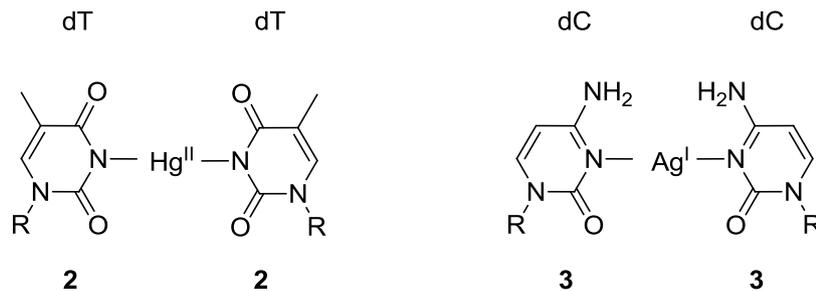


Abbildung 1.21: Das dT-Hg(II)-dT-Basenpaar und das dC-Ag(I)-dC-Basenpaar.

Clever et al. entwickelten das Salen-Basenpaar (**42**),^[75, 76] das auf dem *N,N'*-Bis-(salicyliden)ethylendiamin-Liganden^[77] beruht. Dabei handelt es sich um das erste Metall-Basenpaar, bei dem die Liganden über eine kovalente Brücke miteinander verbunden sind und somit zu einem *interstrand-cross-link* der Einzelstränge führen (Abbildung 1.22).

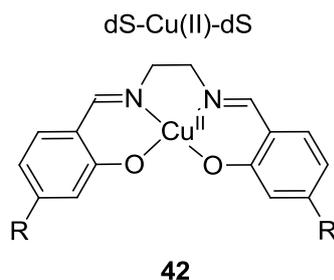
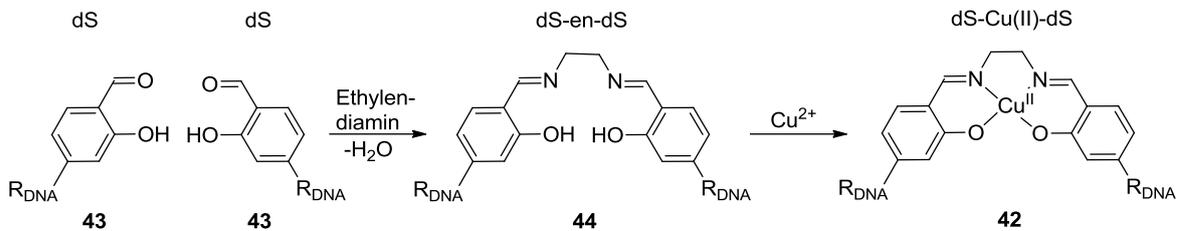


Abbildung 1.22: Das Kupfer-Salen-Basenpaar (**42**) von *Clever et al.*, bei dem die komplementären DNA-Stränge kovalent über eine Ethylendiamin-Brücke verknüpft sind.

Um diesen Liganden in die DNA einzuführen, wird das geschützte Salicylaldehyd-Nukleosid zum Phosphoramidit umgesetzt und dieses über Standard-Phosphoramidit-Festphasensynthese in DNA eingebaut. Die Schutzgruppen am Salicylaldehyd werden nach erfolgreicher Synthese abgespalten und die

komplementären Oligonukleotide hybridisiert. Danach wird der Duplex mit Ethylendiamin versetzt, wobei es zu einem Gleichgewicht zwischen dem Aldehyd und der Imin-Form des Liganden kommt. Anschließend fügt man eine Metallsalzlösung zu, so dass der Metall-Salen-Basenpaar-Komplex (**42**) gebildet wird (Abbildung 1.22).^[75]



Schema 1.1: Assemblierung des Kupfer-Salenbasenpaars (**42**) in DNA.

Dieses Salen-Basenpaar eignet sich zur Komplexierung zahlreicher Metallionen, wie Cu²⁺, Mn³⁺, Fe³⁺, Ni²⁺, VO⁺ und Zn²⁺. Im Fall des Cu²⁺-Salen-Basenpaares (**42**) findet man – im Vergleich zu einem modifizierten DNA-Strang, der freie Salicylaldehyde trägt – eine Erhöhung des Schmelzpunktes der DNA um 42.5 °C. Im Vergleich zu einem DNA-Strang mit AT-Basenpaar liegt eine Stabilisierung um mehr als 30 °C vor.^[75] Im Vergleich dazu stabilisiert das von *Schultz et al.* vorgestellte Basenpaar dDipic:dPy (**34**, **35**, Abbildung 1.17) nur um 2 °C.^[60] Es handelt sich bei dem Salen-Basenpaar also um ein hochgradig duplexstabilisierendes Metall-Basenpaar. Die Stabilität des Basenpaars ist groß genug, um die Aufhebung eines *Watson-Crick*-Basenpaares zu bewirken. Wurden zwei Salicylaldehyde in sonst komplementären DNA-Strängen nicht gegenüber von einander eingebaut, sondern um eine oder zwei Basen verschoben, so wurde dennoch nach Zugabe von Ethylendiamin und Metall-Salz die Ausbildung des Metall-Basenpaares beobachtet. Die Bildung des Komplexes kontrollierte die endgültige Doppelstrang-Geometrie. Die DNA wird, falls notwendig, verbogen und auch der Bruch eines AT-Basenpaares wurde beobachtet.^[76]

Polonius und *Müller* stellten zuletzt erstmals ein Basenpaar vor, das durch eine Kombination aus koordinativen Bindungen und einer Wasserstoffbrücke gebildet wurde. Zum Einsatz kommen dabei Thymidin (**2**), sowie 1-Deaza-2-desoxyadenosin (**45**, Abbildung 1.23).^[78]

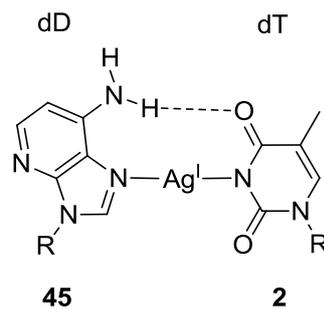


Abbildung 1.23: Künstliches Basenpaar zwischen dD (**45**) und dT (**2**), das durch die Kombination aus Wasserstoffbrücke und Metallkomplexierung gebildet wird.

1.2.1 Stapeln von Metallionen in DNA

Wenn man nun bei der Synthese der DNA-Stränge nicht nur eine Modifikation, sondern gleich mehrere einbaut, gelingt es, mehrere Metall-Basenpaare übereinander zu bringen: man kann Metallionen in der DNA stapeln.^[50, 51]

Dieses Stapeln gelang erstmals *Shionoya et al.*^[79] Sie verwendeten ihr Hydroxypyridon-Basenpaar (aus **39**, Abbildung 1.20) und stellten Stränge mit einer bis fünf Modifikationen her (bei einer Gesamtstranglänge von drei bis sieben Basen). Die Stränge formen ohne Zugabe von Cu^{2+} keine Duplexe. Erst nach Zugabe der Cu^{2+} -Ionen wird ein Doppelstrang ausgebildet (Abbildung 1.24 A). Außerdem zeigte die Gruppe, dass ein 4mer aus Hydroxypyridonbasen dH (**39**), bei Zugabe von Eisen(III) eine Tripelhelix mit vier gestapelten Metallionen bilden kann (Abbildung 1.24 B)

Auch *Schultz et al.* gelang es, vier Metallionen (Cu^{2+}) in einem DNA-Strang zu stapeln, wobei das Basenpaar dDipic:dPy (**34**, **35**, Abbildung 1.17) zum Einsatz kommt. Der Nachweis der Metallionstapel erfolgt nur indirekt über die Stabilität des jeweiligen Duplexes.^[60] *Ono et al.* stapelten bis zu drei T-Hg(II)-T-Basenpaare (**6**) übereinander.^[70]

Um noch längere Stapel aus Metall-Basenpaaren in DNA zu erhalten, setzten *Clever et al.* das Salen-Basenpaar **42** ein.^[75, 80] Aufgrund seiner extrem großen Stabilität war es möglich, vielkernige Metall-Komplexe in einem DNA-Doppelstrang zu verwirklichen. Dazu werden Stränge mit zwei bis zehn aufeinander folgenden Liganden synthetisiert und anschließend mit den entsprechenden Gegensträngen

hybridisiert. Nach Zugabe von Ethylendiamin und der Metall-Salze kann die Bildung der Metall-Basenpaare beobachtet werden. Um dem jeweiligen System die Bildung der Komplexe zu erleichtern, wurden an jedem Ende des Duplex fünf *Watson-Crick*-Basenpaare (dC:dG) zur Präorganisation des Doppelstrangs eingesetzt. Es gelang die Ausbildung eines Strangs mit zehn Mangan-Salenbasenpaaren, die direkt übereinander gestapelt sind. Damit wurde eine vollständige Helixwindung gestapelter Metallionen (Abbildung 1.24 C) erreicht.^[80] *Polonius* und *Müller* schließlich stapelten 20 Silberionen zwischen ihren dD:dT-Basenpaaren (Abbildung 1.24 D).^[78]

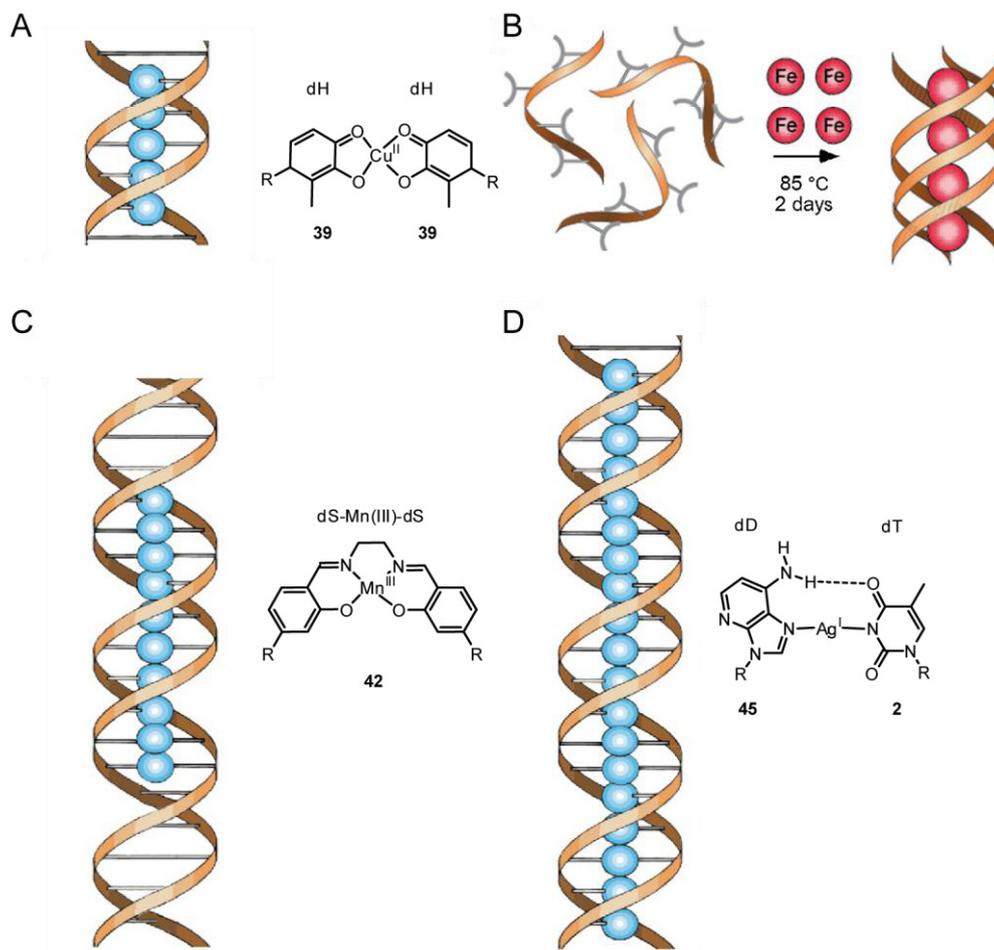


Abbildung 1.24:^[51] Graphische Darstellung verschiedenen Metallionstapel. A) Fünf dH-Cu(II)-dH-Basenpaare; B) Tripelhelixbildung durch Zugabe von Eisen(III) zu einem 4mer aus dH; C) vollständige Helixwindung aus Mangan(III) durch Salenkomplexe; D) zwanzig Silber(I)ionen werden durch Koordination von dD:dT-Basen gestapelt.

Im Hinblick auf eine noch größere Kontrolle erschien es sinnvoll, neben der Anzahl auch die Art des Metallions zu verändern, also verschiedene Metallionen gezielt in

den gleichen DNA-Strang einzubauen, abhängig von der Sequenz. Dafür ist die Auswahl von zwei oder mehr Metall-Basenpaar-Systemen, die spezifisch genug für ein Metallion sind, enorm wichtig.^[81, 82] *Carell* und Mitarbeiter wählten dazu das Salenbasenpaar **42** zur Komplexierung von Cu(II) sowie die dT-dT-Fehlpaarung (**2**) zur Komplexierung von Hg(II). Abhängig von der DNA-Sequenz wurden verschiedene Längen und Abfolgen gemischter Metallionenstapel in DNA realisiert. Es gelang erfolgreich das Stapeln von fünf Cu(II)- und fünf Hg(II)-Ionen in einem DNA-Strang (Abbildung 1.25 A).^[81, 82] Der Gruppe von *Shionoya* gelang es mit Hilfe der Hydroxypyridonbase **39** sowie dem Pyridinnukleosid **35** insgesamt fünf Metallionen (vier Cu(II) und ein Hg(II)) zu stapeln (Abbildung 1.25 B).^[81, 82]

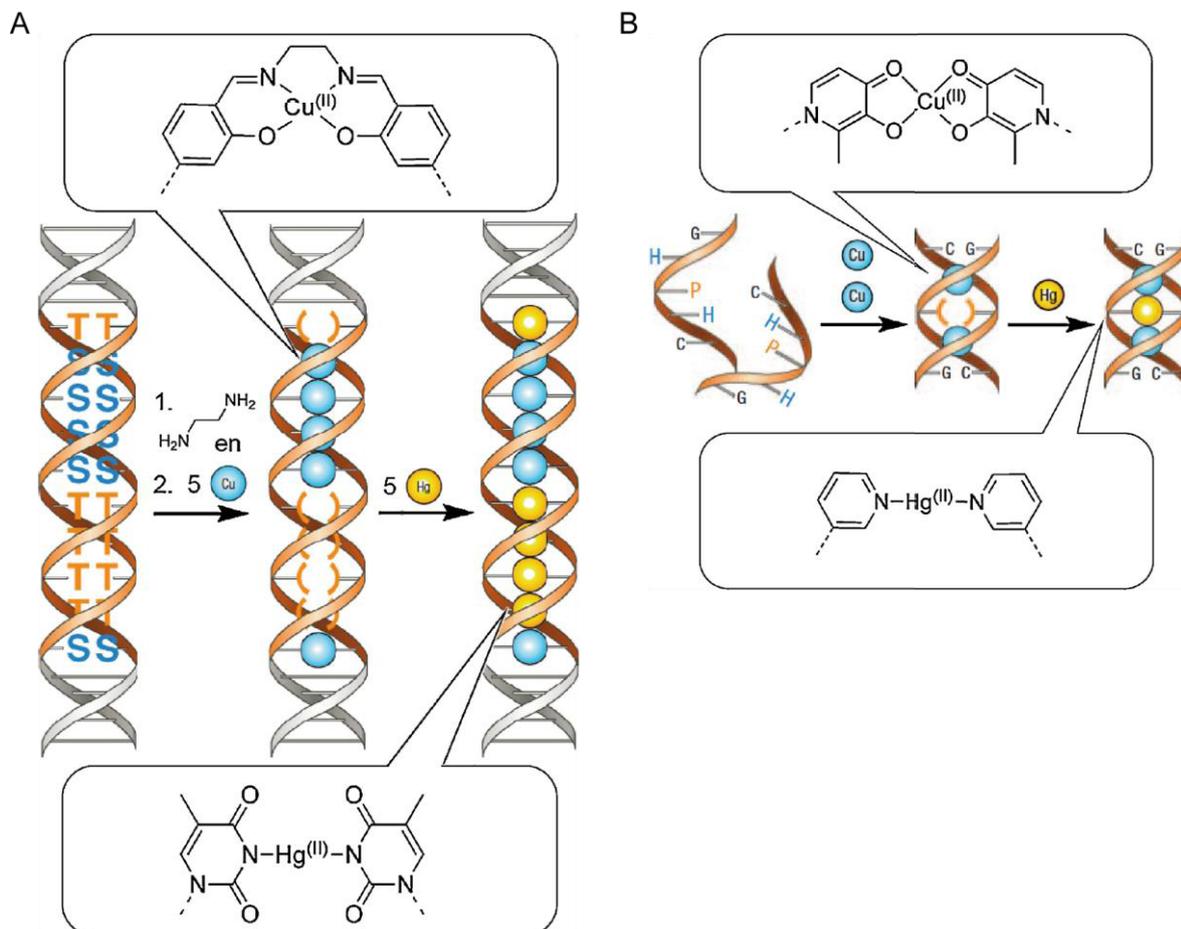


Abbildung 1.25.^[51] Graphische Darstellung gemischter Metallstapel A) aus dS-Cu(II)-dS und dT-Hg(II)-dT-Basen, sowie B) aus dH-Cu(II)-dH- und dPy-Hg(II)-dPy-Basen.

1.2.2 Strukturen Metall-vermittelter Basenpaare

Um genauen Einblick in die strukturellen Auswirkungen durch den Einbau eines Metallbasenpaars auf die DNA zu bekommen, sind Strukturlösungen unerlässlich. Bisher gibt es allerdings nur zwei Publikationen zu Strukturlösungen mit Metallbasenpaaren in DNA.

Bereits 2001 gelang es *Atwell et al.* einen Duplex mit zwei dDipic:dPy-Basenpaaren (**34**, **35**, Abbildung 1.17) zu kristallisieren und eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen.^[56] Dabei zeigte sich, dass das Kupferion wie postuliert im Innern der Doppelhelix sitzt und durch die modifizierten Basen koordiniert wird (Abbildung 1.26). Das Cu(II) sorgt damit für die Wechselwirkung zwischen den beiden Basen. Allerdings liegt die DNA in der Z-Form und nicht in der üblichen B-Form vor.^[56]

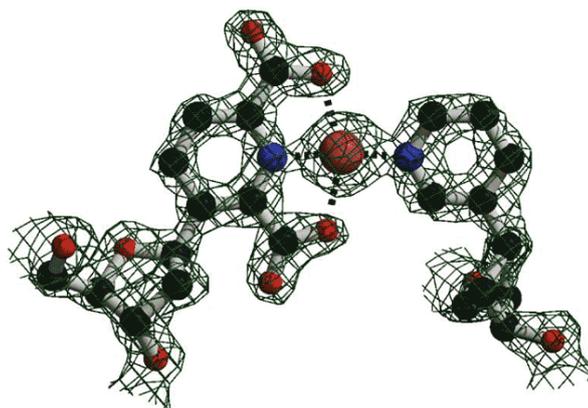


Abbildung 1.26:^[56] Kristallstruktur des Metall-Basenpaars dDipic-Cu(II)-dPy.

Kürzlich zeigten *Johannsen et al.* die Struktur einer DNA-Doppelhelix mit drei aufeinanderfolgenden Metallbasenpaaren.^[83] Mit Hilfe von NMR-Untersuchungen wurde die Struktur eines 17mer Duplex, der mit drei Im-Ag(I)-Im-Basen modifiziert war, gelöst (Abbildung 1.27).^[83]

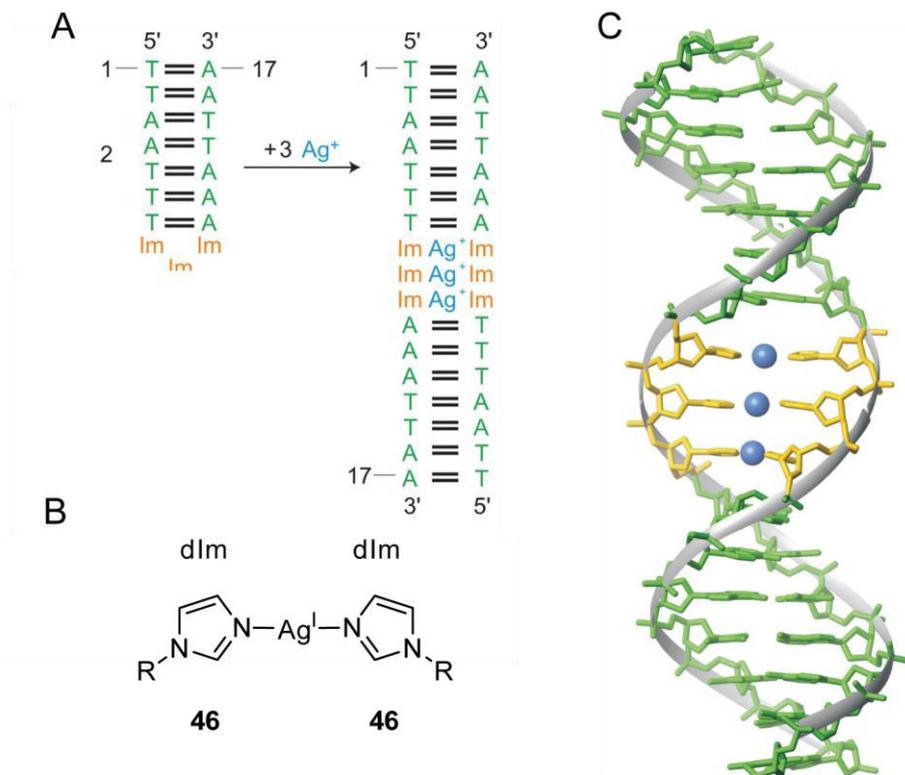


Abbildung 1.27:^[83] A) Schematische Darstellung der Duplexbildung nach Zugabe von $Ag(I)$ zu einem *hairpin*; B) Struktur des $dIm-Ag(I)-dIm$ -Basenpaars ($dIm = 46$); C) NMR-Struktur eines Duplex mit drei Metallbasenpaaren.

Es zeigte sich eine geringe Entwindung der Doppelhelix an der modifizierten Stelle, weitere größere konformationelle Verformungen traten nicht auf. Direkte Ag-Ag-Wechselwirkungen konnten aufgrund der Dynamik des Systems nicht eindeutig beobachtet werden.^[83]

1.2.3 Verwendung von Metallbasenpaaren in biochemischen Untersuchungen

Da Untersuchungen auf dem Gebiet der nicht-natürlichen Basenpaare (vgl. Kap. 1.1) zeigten, dass Polymerasen in der Lage sind mit modifizierten Substraten zu arbeiten, stellte sich die Frage, ob auch Metallbasenpaare enzymatisch in DNA eingebaut werden können. Dies würde lange, mit Metallionen modifizierte Stränge zugänglich machen, da man nicht mehr durch die chemische Festphasensynthese der DNA beschränkt ist. Besonders im Hinblick auf die Nanotechnologie scheint das reizvoll zu sein. Zudem kann mit einem orthogonalen Metall-Basenpaar neben

der Erweiterung des genetischen Codes auch eine Funktionalisierung der DNA ermöglicht werden.

Im Jahr 2010 veröffentlichten *Urata et al.* ihre Ergebnisse zum enzymatischen Einbau des T-Hg(II)-T-Basenpaars in DNA.^[84] Es gelang eine Primerverlängerungsreaktion, bei der die Polymerase ein Thymidintriphosphat (dTTP) gegenüber einer dT-Base im Templatstrang einbaut, um ein dT-Hg(II)-dT-Basenpaar zu bilden. Da es sich aber nicht um ein orthogonales Metallbasenpaar handelt, sondern die Basenpaarbildung in Konkurrenz zu dem stark bevorzugten kanonischen Paar dA:dT steht, muss auf dATP verzichtet werden.^[84] Der enzymatische Einbau des T-Hg-T ist also keine Erweiterung des genetischen Codes. Grundsätzlich ist die Bildung des *mismatches* dT:dT auch ohne Hg(II) möglich, wenn kein dATP zur Verfügung steht. Allerdings kann anschließend keine weitere Verlängerung des Strangs mehr stattfinden. Dies wird erst durch die Zugabe des Metallions ermöglicht, wobei diese Vollverlängerung selektiv für Hg(II) ist, bei Zugabe anderer Metallionen, wie z.B. Mn(II), Fe(II/III) oder Cu(II) wird der Primer nicht weiter verlängert.^[84]

Diese Ergebnisse nutzten *Park et al.* um die DNA als logischen Operator einzusetzen.^[85] Logische Operatoren werden in der technischen Informatik verwendet und werten Eingangssignale an einer Schaltung logisch aus. Das von *Park et al.* verwendete System ist dabei denkbar einfach und nutzt das dT-Hg(II)-dT- sowie das dC-Ag(I)-dC-Basenpaar.^[85] Allerdings werden die Basenpaare nicht enzymatisch eingebaut, es finden lediglich Verlängerungen von Primer/Templat-Duplexen statt, die auf das Metallbasenpaar enden. Ein Beispiel für den „UND“-Operator ist in Abbildung 1.28 gezeigt.^[85]

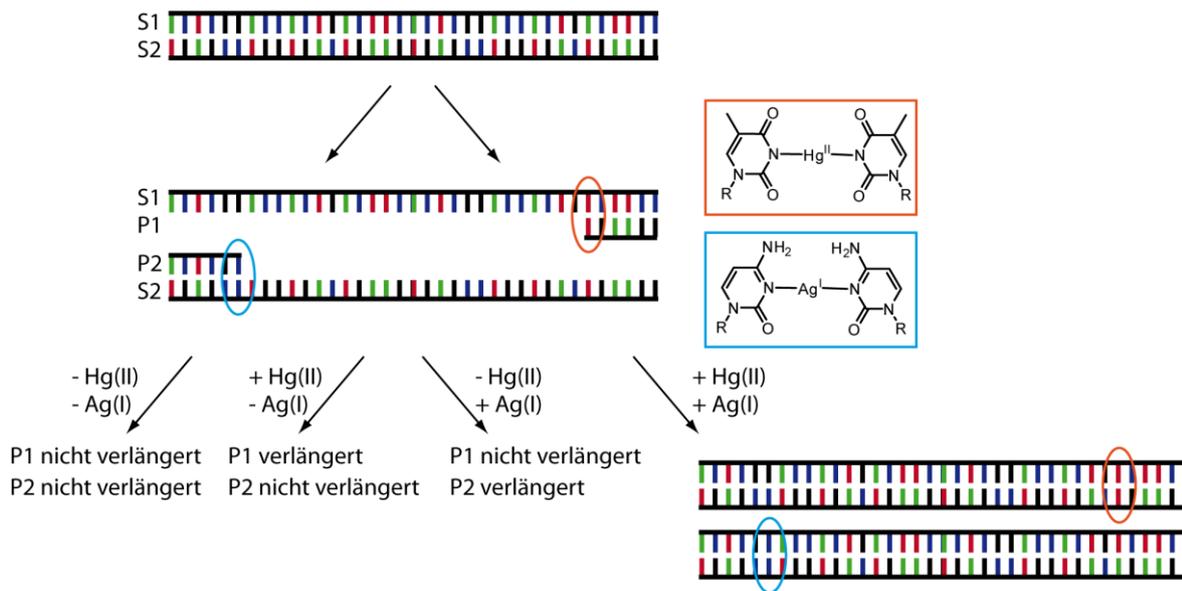


Abbildung 1.28: Ein logischer „UND“-Operator mit DNA. Die durch Primer-*annealing* entstandenen *mismatches* können nur verlängert werden, wenn die entsprechenden Metallionen zugegeben werden und damit die Paarung der Basen durch koordinative Bindungen ermöglicht wird.

Ein DNA-Doppelstrang wird denaturiert und die Einzelstränge werden mit Primern hybridisiert, wobei Primer 1 einen dT:dT-*mismatch* und Primer 2 einen dC:dC-*mismatch* bildet. Diese Fehlpaarungen verhindern, dass eine Verlängerung des Primers bei der PCR stattfinden kann, analog zu den Ergebnissen von *Urata et al.*^[84, 85] Gibt man allerdings Hg(II) zu, so kann Primer 1 verlängert werden. Wird Ag(I) zugesetzt, so ist die Verlängerung von Primer 2 möglich. Erst bei Zugabe beider Metallionen können beide Primer verlängert und amplifiziert werden. Nur dann kann die PCR vollständig ablaufen. Dies entspricht dem „UND“-Operator, nur wenn Hg(II) und Ag(I) vorliegen, liefert die Reaktion ein Ergebnis.^[85]

Auch wenn diese ersten Ergebnisse versuchen, das Konzept der nicht-natürlichen Basenpaare zur Erweiterung des genetischen Codes und das Konzept der Metallbasenpaare zu verknüpfen, so wurde ein vollständig orthogonales, replizierbares, nicht-natürliches Metallbasenpaar bisher noch nicht verwirklicht.

2. Aufgabenstellung

Mittels DNA-Festphasensynthese können einfach und meist sehr effektiv viele Modifikationen in DNA eingebaut werden. Allerdings ist auf diesem chemischen Weg nur die Herstellung sehr kurzer DNA-Stränge möglich. Die biochemischen Methoden, insbesondere die Polymerasekettenreaktion (PCR), hingegen, bieten die Möglichkeit zur Synthese sehr langer Stränge in großen Mengen. Während bereits einige nicht-natürliche Basenpaare in der PCR eingesetzt werden können, wurden orthogonale, artifizielle Metallbasenpaare bisher nicht in biochemischen Untersuchungen verwendet. Dies erscheint aber sehr nützlich, um in Zukunft mit Metall-Basenpaaren modifizierte Stränge in ausreichender Menge und Länge erzeugen zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob das Salenbasenpaar **42** für einen Einsatz in der Polymerasekettenreaktion geeignet ist. Da als Vorstufe das Salicylaldehydnukleosid zur Verfügung steht, war zuerst die Synthese eines geeigneten Bausteins, des Salicylaldehydtriphosphats (dSTP) nötig. Im Anschluss galt es zu testen, ob sich dSTP als Substrat für Polymerasen eignet. Dies ist Grundvoraussetzung für den enzymatischen Einbau in DNA-Stränge. Dabei musste untersucht werden, ob dieser Einbau selektiv gegenüber einer weiteren Salicylaldehydbase geschieht und wie Fehlpaarungen zu den übrigen Nukleosiden vermieden werden können. Zudem ist es auch wichtig zu klären, ob die Salicylaldehydbase im Templatstrang zu Fehleinbau der natürlichen Triphosphate führt. Neben der chemischen Synthese des Triphosphatbausteins und der Templatstränge, sind hier also auch biochemische Methoden wie Primerverlängerungsreaktionen sowie im späteren Verlauf die Polymerasekettenreaktion anzuwenden.

Als weiterer Punkt ist anzusprechen, dass bisher nur wenige Strukturen von Metallbasenpaaren bekannt sind. Lediglich eine Röntgenstrukturanalyse und eine NMR-Struktur von DNA-Strängen, die mit einem metallvermitteltem Basenpaar modifiziert wurden, sind bisher publiziert.^[56, 83]

Um einen genauen Einblick in den exakten strukturellen Aufbau des Metallsalenbasenpaars sowie seinem eventuellen Einfluss auf umgebende Basen

und die Duplexstruktur zu erhalten, ist eine Röntgenstrukturanalyse des modifizierten Duplex nötig. Die Kristallisation sollte als Komplex mit einer Polymerase durchgeführt werden, um dem Duplex das Enzym als Matrix zu bieten. Außerdem kann so der Einblick in die verschiedenen Schritte des enzymatischen Einbaus des Metallbasenpaars geschaffen werden. Dazu müssen verschiedene Bedingungen und Sequenzkontexte untersucht werden.

Da das Kupfer-Salenbasenpaar in DNA zu außergewöhnlicher thermischer Stabilität führte,^[75] war auch eine Untersuchung der mechanischen Eigenschaften interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Gaub* an der LMU die mechanische Stabilität eines modifizierten Duplex untersucht werden. Neben der Synthese speziell modifizierter DNA-Stränge, sollten auch die thermodynamischen Daten der verwendeten Stränge ermittelt werden. Anschließend sollten von den Kooperationspartnern die mechanischen Untersuchungen am Rasterkraftmikroskop (AFM) durchgeführt werden.

Im Hinblick auf die Erweiterung des Metallbasenpaar-Konzepts ist der Einbau bisher nicht eingesetzter Metallionen in DNA wünschenswert. Die Variabilität des Systems soll so erhöht werden, ohne die Selektivität auf einzelne Metallionen zu verlieren.

Daher sollte ein Palladiumion-Basenpaares in DNA entwickelt werden, wobei die Komplexierung des Palladiumions ausschließlich durch weiche Schwefelatome im Liganden erfolgen sollte. Dies ist z.B. in Dithiocarbamaten der Fall. Da in der Gruppe bereits ein guter Zugang zu dem carbazyklischen Amin **47** (Abbildung 2.1) bestand, sollte dieses hergestellt und eine Möglichkeit zur Funktionalisierung als Dithiocarbamat entwickelt werden. Auch eine Strategie zum Einbau des neuen Ligandosiden in Oligonukleotide mittels Phosphoramiditverfahren war zu erarbeiten.

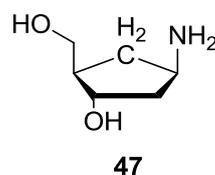
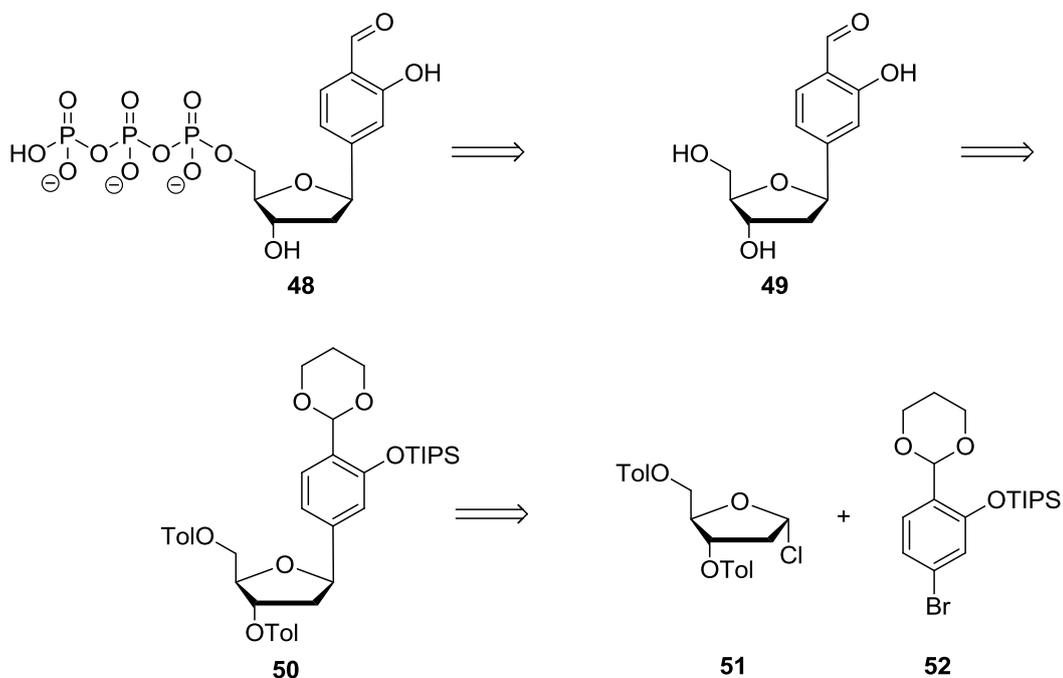


Abbildung 2.1: Carbazyklisches Amin **47** als Nukleosidanalogue.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese eines Salicylaldehydnukleosidtriphosphats

Das im Mittelpunkt der Arbeit stehende Metall-Salen-Basenpaar wurde in der Arbeitsgruppe *Carell* von *G. Clever* entwickelt.^[75] Um den Einbau des Precursors Salicylaldehydnukleosid in DNA-Stränge mittels enzymatischer Reaktionen zu ermöglichen, war die Entwicklung eines Triphosphatbausteins nötig. In Schema 3.1 ist eine Übersicht über Retrosynthese zum benötigten Salicylaldehyd-5'-triphosphat (dSTP) **48** gegeben.

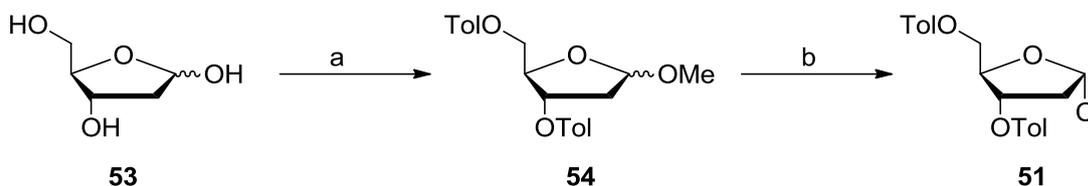


Schema 3.1: Retrosynthetische Analyse des Salicylaldehydnukleosidtriphosphats **48** (dSTP).

Das Nukleosid **49** wurde nach *Clever et al.* mittels C-Glykosylierung aus einem geschützten Bromsalicylaldehyd **52** und einem Glykosyldonor **51** dargestellt.^[75] Abweichend von den bisher veröffentlichten Methoden,^[86, 87] war es möglich die Synthese des Glykosyldonors **51** in Zusammenarbeit mit *C. Zöschinger* so zu variieren, dass keine HCl-Gaseinleitung mehr nötig war. Der finale Schritt zum Chlorozucker konnte mittels *in situ* erzeugtem HCl durchgeführt werden (vgl. Kap. 3.1.1).

3.1.1 Vereinfachte Synthese des toluoyl-geschützten 2'-Desoxyribosylchlorids

Das toluoyl-geschützte 2'-Desoxyribosylchlorid **51** wurde in zwei Stufen in Anlehnung an *Hoffer und Grollmann et al.*^[86, 87] dargestellt (Schema 3.2).

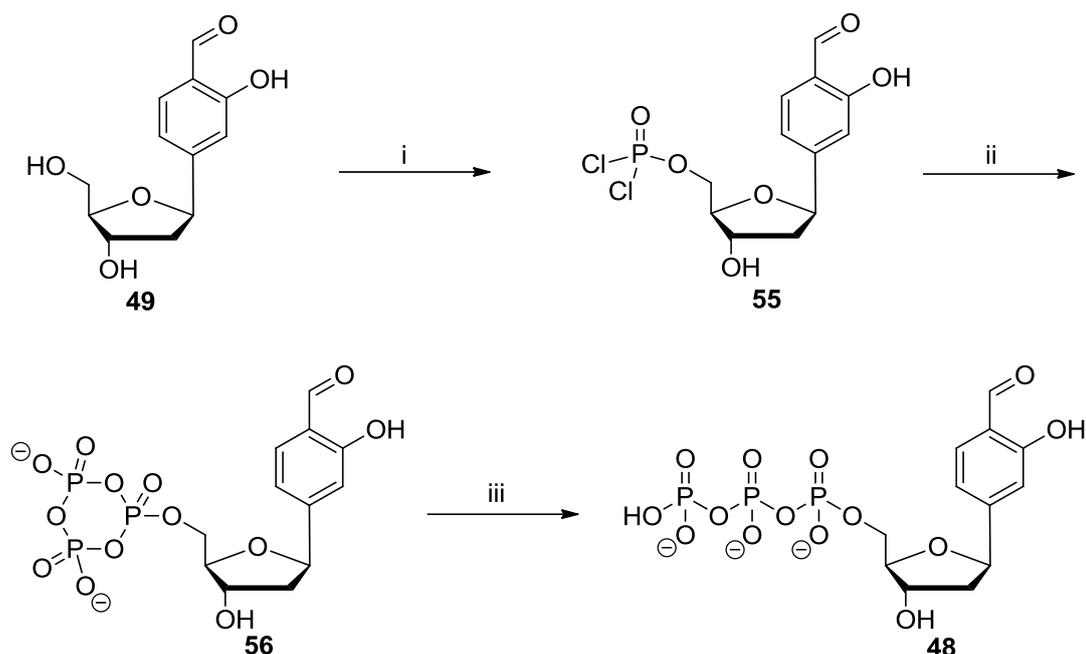


Schema 3.2: Synthese des Glykosyldonors **51**. a) i) AcCl, MeOH, 30 min, RT; ii) TolCl, Pyridin, 2 h, 45 °C b) HOAc (conc.), AcCl, H₂O, 15 min, 0 °C.

Nach Umsetzung von **53** in Methanol bildete sich säurekatalysiert das Methylacetal, das umgehend durch die Schützung der Hydroxylgruppen mit Toluoylsäurechlorid in **54** überführt wird. Nach Aufreinigung wurde **54** in Eisessig gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Acetylchlorid und einem Tropfen Wasser versetzt. Innerhalb weniger Minuten war die Bildung des geschützten Desoxyribosylchlorids **51** durch einen kräftigen farblosen Niederschlag zu erkennen. In einigen Fällen war die Zugabe eines weiteren Tropfen Wassers oder einer geringen Menge flüssigen Stickstoffs notwendig, um die Reaktion zu starten. Aufgrund des anomeren Effekts entsteht bei dieser Reaktion ausschließlich das α -Anomer. Um eine Zersetzung zu vermeiden, wurde das Produkt gründlich mit Diethylether zur Entfernung aller Säurereste gewaschen und bei -20 °C gelagert.

3.1.2 Triphosphatsynthese nach *Ludwig und Ruth*^[88, 89]

Die Umsetzung des Salicylaldehydnucleosids zum Triphosphat erfolgte über die Methode von *Ludwig*^[88] und *Ruth*.^[89] Dabei wird im ersten Schritt nach *Yoshikawa* durch regioselektive Phosphorylierung mit POCl₃ an der 5'-OH-Einheit des Zuckers ein aktiviertes Monophosphat erzeugt.^[90] Durch den folgenden nukleophilen Angriff eines Pyrophosphats auf das Nucleosid-5'-dichlorophosphat, erhält man ein Trimetaphosphat. Anschließend werden die Phosphatbindungen teilweise hydrolysiert und man erhält das gewünschte Triphosphat (Schema 3.3).



Schema 3.3: Darstellung des Salicylaldehydnucleosidtriphosphats **48**. i) POCl_3 , $\text{PO}(\text{OMe})_3$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; ii) $(\text{HNBu}_3)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, NBu_3 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min iii) $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$, $0\text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h, dann RT für 1 h.

Um eine absolute Wasserfreiheit während der Reaktion zu garantieren, mussten Edukte und Reagenzien vor Beginn der Reaktion getrocknet werden. Feststoffe wurde dazu über Nacht am Hochvakuum getrocknet, Lösemittel über Molsieb (3 \AA) gerührt.

Als Lösungsmittel wurde Phosphorsäuretrimethylester eingesetzt.^[90] Darin sind sowohl die ionischen als auch die organischen Reagenzien des Reaktionsgemisches gut löslich, so dass sich eine homogene Lösung bilden kann. Zudem geht man davon aus, dass POCl_3 und $\text{PO}(\text{OMe})_3$, vergleichbar wie POCl_3 und DMF, zunächst ein aktiviertes Intermediat bilden, welches dann mit dem Nucleosid reagiert.^[91]

Zu einer Lösung von Salicylaldehyd-Nucleosid **49** und Protonenschwamm in $\text{PO}(\text{OMe})_3$ wurden bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ langsam 1.2 eq POCl_3 zugegeben. Man rührte für 3 h bei $0\text{ }^\circ\text{C}$, der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen fand eine regioselektive Phosphorylierung der 5'-OH-Gruppe statt, die sekundäre 3'-OH-Gruppe sowie der phenolische Alkohol mussten wegen der geringeren Reaktivität nicht geschützt werden.

Im Anschluss wurde eine Lösung von 5 eq Tributylammoniumpyrophosphat^[2] und 10 eq NBU₃ in DMF bei 0 °C zugegeben und man rührte für 15 min zur Bildung des Trimetaphosphats **56**. Die Hydrolyse durch Zugabe von Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (1 M) führte zum gewünschten Salicylaldehydnucleosidtriphosphat (dSTP) **48**.

Im Anschluss erfolgte eine aufwendige Reinigung *via* rp-HPLC des Produkts. Diese wurde von *M. Wagner* im Rahmen seiner Diplomarbeit^[92] durchgeführt. Es waren drei aufeinanderfolgende Trennungen nötig, Laufmittel war jeweils ein Gradient der Puffer A (0.1 M NHEt₃OAc in H₂O) und B (0.1 M NHEt₃OAc in Acetonitril : H₂O = 4 : 1).

Zuerst wurde über eine semipräparative Trennsäule (VP 250-10 Nucleodur 100-7 C18, Fluss 5 mL/min, *Macherey & Nagel*) mit einem Gradient von 0–30 % B in 50 min getrennt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden am Lyophilisator eingeeignet und durch MALDI-Massenspektrometrie charakterisiert, so dass die das Triphosphat (dSTP) enthaltenden Fraktionen identifiziert und vereinigt werden konnten. Die Retentionszeit des dSTP betrug 26.5–32.0 min. Aufgrund des breiten Elutionspeaks war das Triphosphat noch verunreinigt (Abbildung 3.1 A).

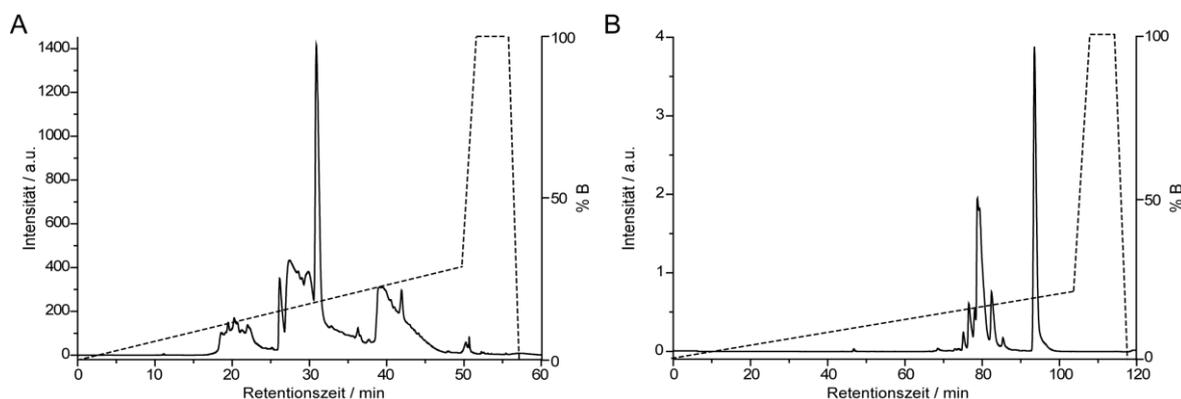


Abbildung 3.1: HPLC-Chromatogramme der A) ersten Aufreinigung auf einer semipräparativen Säule sowie B) der zweiten Reinigung auf einer präparativen Säule. Durchgezogene Linie: Chromatogramm; gestrichelte Linie: Puffergradient B.

Zur weiteren Reinigung des Produkts wurde eine präparative Trennsäule (VP 250-21 Nucleosil 100-7 C18, Fluss 10 mL/min, *Macherey & Nagel*) verwendet, und ein Gradient 0–20 % B in 110 min, der zu einer brauchbaren Auftrennung führte. Das Chromatogramm (Abbildung 3.1 B) zeigt, dass das Triphosphat nach etwa 80 min

eluierte, allerdings von einem zweiten Peak noch überlagert wurde. Erneut wurden die Produktfraktionen vereinigt.

Der abschließende Reinigungsschritt war erneut eine Trennung über die präparative Säule mit dem bewährten Laufmittelgradienten von 0–20 % B in 110 min. Das Produkt eluierte bei etwa 72 min, die Abweichung von der vorherigen Retentionszeit ist mit schwankenden Salzgehalten zu erklären (Abbildung 3.2 A).

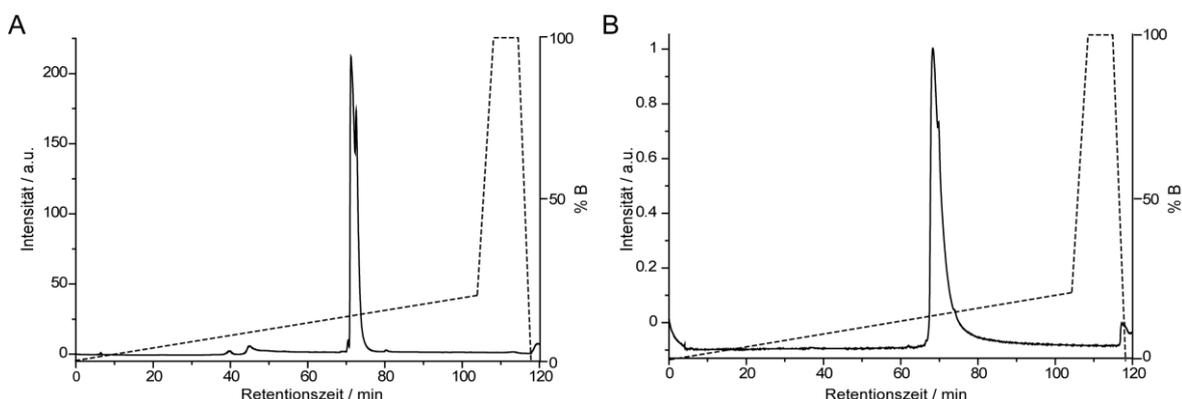


Abbildung 3.2: HPLC-Chromatogramme der A) dritten Aufreinigung auf einer semipräparativen Säule sowie B) der abschließenden analytischen HPLC zur Überprüfung der Reinheit. Durchgezogene Linie: Chromatogramm; gestrichelte Linie: Puffergradient B.

Die Fraktion mit Salicylaldehydnucleosidtriphosphat wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie identifiziert. Die Konzentrations- und Ausbeutebestimmung erfolgte am Nanodrop Spektrophotometer. Man erhielt 2 % Salicylaldehyd-5'-triphosphat (**48**). Der Nachweis der Reinheit erfolgte über analytische rp-HPLC (Abbildung 3.2 B) und das ESI-Massenspektrum zeigte eine gute Übereinstimmung der berechneten mit der gefundenen Molekülmasse ($[M-H]^+$: ber.: 476.9753; gef. 476.9754).

Die unwahrscheinliche Phosphorylierung am 3'-OH oder der phenolischen Hydroxy-Gruppe wurde mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie ausgeschlossen. Das ^{31}P -Spektrum zeigt drei Signale, nämlich zwei Dubletts bei -10.7 (1 P, $^2J_{\text{P-P}} = 20$ Hz, P_γ) und -11.3 ppm (1 P, $^2J_{\text{P-P}} = 20$ Hz, P_α), und ein Triplett bei -23.4 ppm (1 P, $^2J_{\text{P-P}} = 20$ Hz, P_β). Die gemessenen Verschiebungen sind typisch für Triphosphate und lassen sich den drei Phosphoratomen zuordnen.^[93] Im Proton-gekoppelten ^{31}P -Spektrum tritt eine zusätzliche Triplett-Aufspaltung des Dubletts bei -11.3 ppm

mit $J_{P-H} = 6$ Hz auf. Hierbei handelt es sich um die ${}^3J_{P-H}$ -Kopplung zwischen P_α und den beiden H-Atomen am C5'. Diese besitzen eine chemische Verschiebung von $\delta = 4.0$ ppm und konnten durch COSY- und HSQC-NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich konnte die Korrelation zwischen den H-Atomen am C5' und P_α ($\delta = -11.3$ ppm) auch im ${}^{31}P/{}^1H$ -HMBC-Experiment nachgewiesen werden, so dass die Phosphorylierung in 5'-Position bewiesen war.

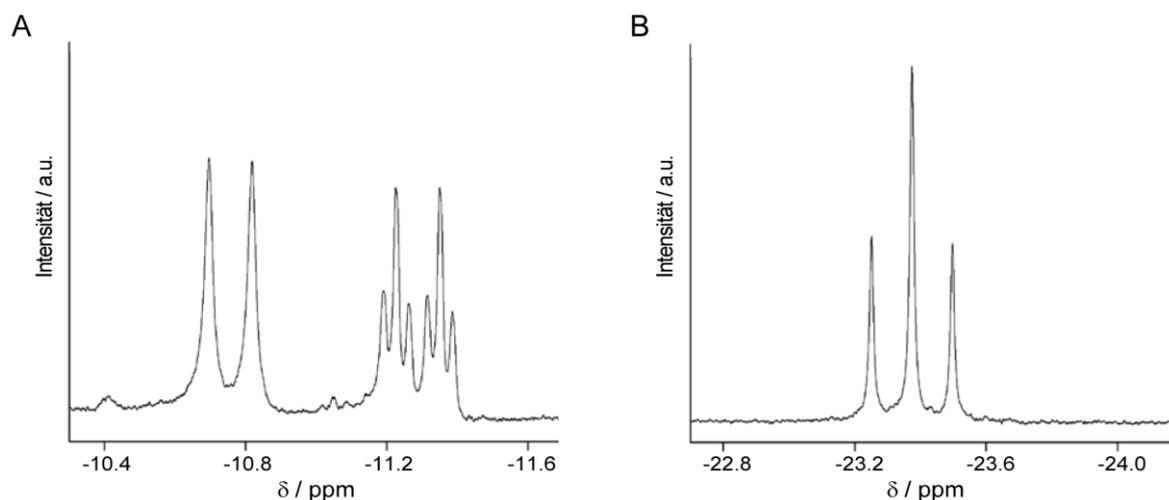
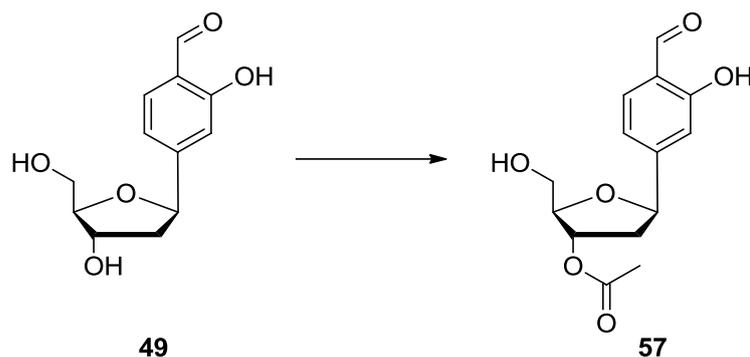


Abbildung 3.3: Zwei Ausschnitte aus dem proton-gekoppelten ${}^{31}P$ -Spektrum des Salicylaldehydnukleosidtriphosphats. A) Signale für P_γ und P_α ; B) Signal für P_β .

3.1.3 Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein

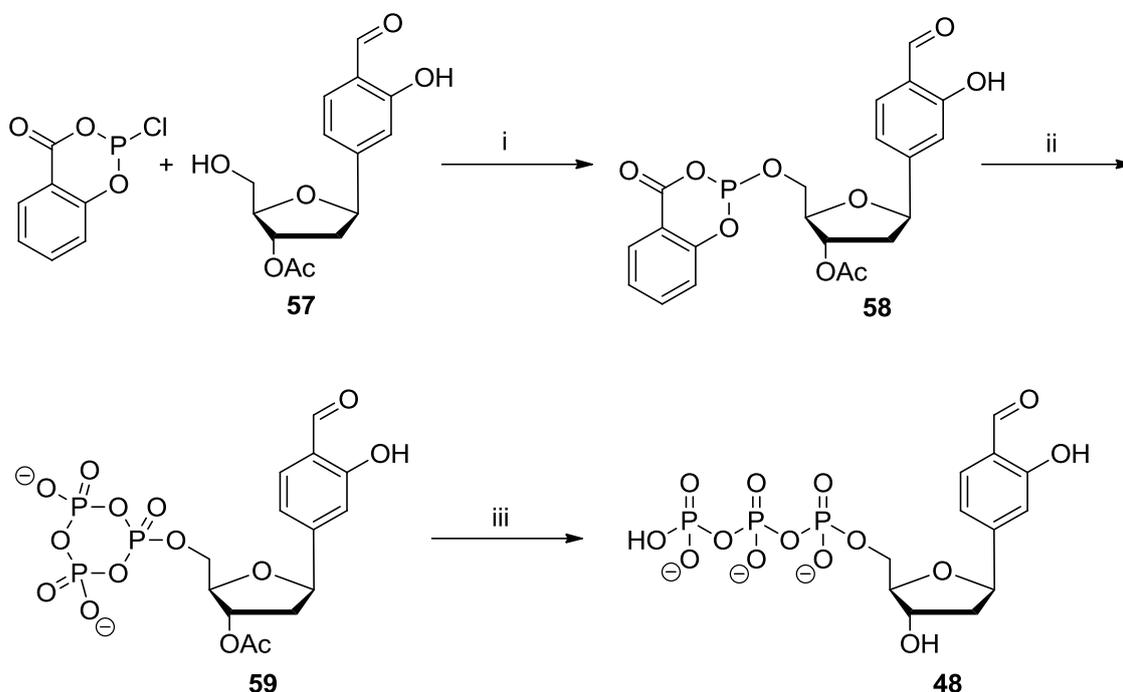
Da die Syntheseroute nach Ludwig und Ruth (vgl. Kap. 3.1.2) nur sehr geringe Ausbeuten ergibt, wurde alternativ die Darstellung des Triphosphats nach Ludwig und Eckstein versucht.^[94] Diese Synthese wurde von M. Wagner im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.^[92]

Dazu war zuerst die Schützung der 3'-OH-Gruppe nötig, die enzymatisch mit Hilfe der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* und Vinylacetat (1.2 eq) als Substrat erfolgte. Als Nebenprodukte wurden das 5'-acetylierte sowie das bis-acetylierte Molekül gefunden, diese konnten jedoch gut abgetrennt werden. Man erhielt 63% des 3'-geschützten Produkts **57** (Schema 3.4).^[95]



Schema 3.4: Darstellung des 3'-acetylgeschützten Salicylaldehyd-Nukleosids **57**; Lipase, Vinylacetat, THF, 35 °C, 3.5 h.

Die anschließende Triphosphatsynthese wurde erneut als Eintopfreaktion in vier Stufen durchgeführt.^[94] Durch die Reaktion des geschützten Nukleosids **57** mit 2-Chlor-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on erzeugte man das aktivierte Phosphit **58**, das mit dem Tributylammoniumpyrophosphat zu einem zyklischen Intermediat **59** reagierte. Nach Oxidation und Hydrolyse erhielt man das gewünschte Salicylaldehyd-5'-triphosphat **48** (Schema 3.5).



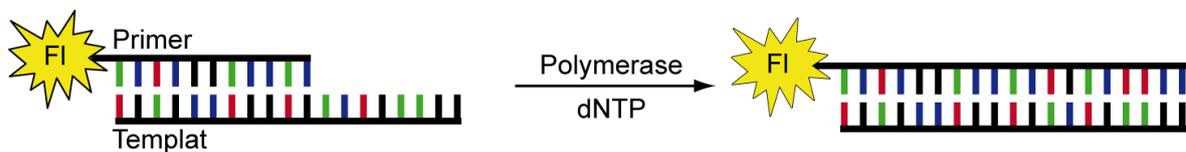
Schema 3.5: Darstellung des Salicylaldehydnukleosidtriphosphats **48**. i) Dioxan / Pyridin, RT, 10 min; ii) $(\text{HNBu}_3)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, NBu_3 , RT, 10 min; iii) 1) 1 % I_2 in Pyridin : $\text{H}_2\text{O} = 98 : 2$, ii) H_2O , NH_3 (conc.).^[95]

Neben dem Ausschluss von Trockenheit, war diesmal auch eine Schutzgasatmosphäre wichtig. Das geschützte Nukleosid **57** wurde in 3 : 1 Dioxan : H₂O gelöst und bei RT unter Rühren mit 1 eq einer 1 M Lösung von 2-Chlor-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on versetzt. Nach 10 min wurde eine 0.5 M Lösung von Tributylammoniumpyrophosphat^[2] und Tributylamin zugegeben und für weitere 10 min gerührt. Die Oxidation des Phosphits **59** wurde durch Zugabe einer 1 %igen Iodlösung durchgeführt. Überschüssiges Iod wurde nach 15 min mit einer NaHSO₃-Lösung (5 %) abgepuffert, das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt. Die partielle Hydrolyse des Trimetaphosphats zum Triphosphat sollte nach Wasserzugabe erfolgen, die Abspaltung der Acetylschutzgruppe durch Ammoniak (conc). Trotz sorgfältiger Reaktionsdurchführung konnte jedoch kein Produkt erhalten werden.

3.2 Enzymatischer Einbau des dSTP in DNA

3.2.1 Primerverlängerungsstudien

Um das dSTP enzymatisch in Oligonukleotide einzubauen, wurden zuerst Primerverlängerungsstudien durchgeführt. Dabei wird ein DNA-Einzelstrang (Templat) mit einem kürzeren DNA-Strang (Primer) hybridisiert, so dass ein Doppelstrang mit einem 5'-Überhang vorliegt. Anschließend wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase der Primerstrang in Richtung 5'→3' durch den Einbau der entsprechenden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) komplementär zum Templat verlängert (Schema 3.6).^[96]



Schema 3.6: Prinzip der Primerverlängerung bei Verwendung eines Fluorescein-markierten Primers.

Ersetzt man nun eine natürliche Base durch eine Modifikation, so ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, wie die Polymerase reagieren kann:

- Stopp der Polymerase: Es findet keine Verlängerung statt.
- Fehleinbau: Die Polymerase baut ein natürliches dNTP gegenüber der Modifikation ein (Mutation, *mismatch*).
- Einbau einer Modifikation: Polymerase akzeptiert ein artifizielles, nicht-natürliches Triphosphat als Substrat.

Voraussetzung für die enzymatischen Untersuchungen war allerdings die Synthese eines modifizierten Templatstrangs (vgl. 3.2.1.1).

3.2.1.1 Synthese eines modifizierten Templatstrangs

Die Synthese modifizierter DNA-Stränge wurde mittels automatisierter DNA-Festphasensynthese durchgeführt, die auf der von *Caruthers*^[97, 98] entwickelten Phosphoramiditchemie beruht. Die Oligonukleotide wurden auf einem Expedite

8900 Synthesizer (PerSeptive Biosystems) oder einem Äkta Oligopilot 10 (GE Healthcare) unter Standardsynthesebedingungen hergestellt. Die Synthese der DNA-Stränge erfolgt in 3'→5'-Richtung, wobei die erste Base üblicherweise bereits am Trägermaterial sitzt. Nach Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe an dieser Base kann das folgende Nucleosidphosphoramidit gekuppelt werden. Als Aktivator wurde Benzylthiotetrazol (BTT) eingesetzt (Abbildung 3.4).

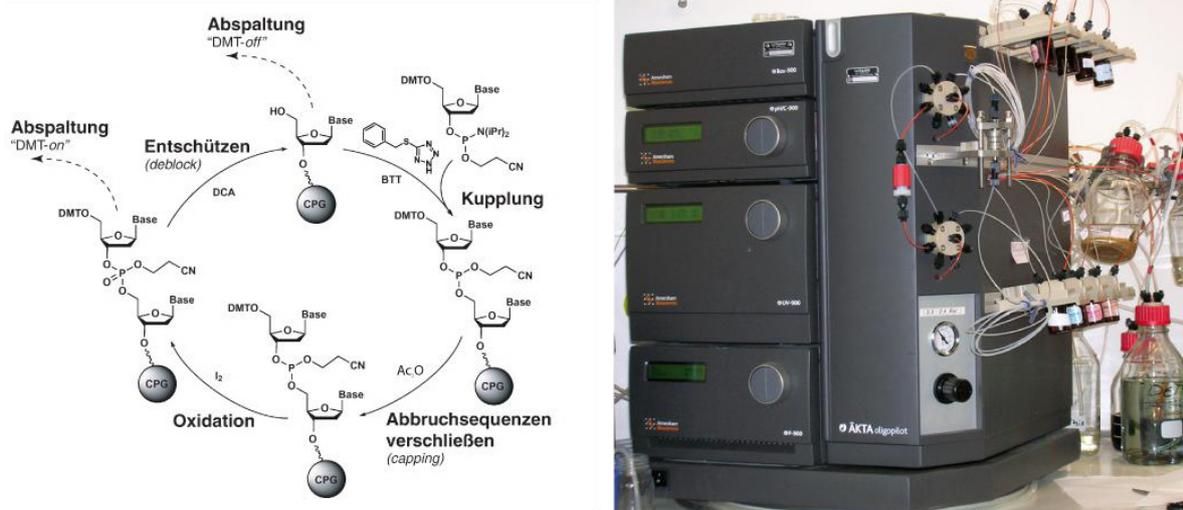


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des DNA-Festphasensynthesezyklus, Abbildung des Äkta Oligopilot.

Als Modifikation wurde das Salicylaldehydnucleosidphosphoramidit **60** (Abbildung 3.5) eingesetzt,^[75] das nach Literaturvorschrift unter Verwendung der vereinfachten Zuckersynthese (vgl. Kap. 3.1.1) synthetisiert wurde. Wie *G. Clever* zeigte, waren für den Einbau des Salicylaldehydnucleosids im Gegensatz zu vielen anderen Modifikationen keine verlängerten Kupplungszeiten oder erhöhte Äquivalente im Vergleich zu Standardbedingungen nötig. Dennoch wurden zur Verbesserung der Ausbeute verlängerte Kupplungszeiten verwendet.

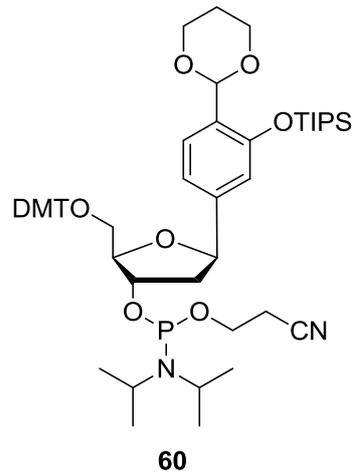


Abbildung 3.5: Phosphoramidit des Salicylaldehydnukleosids **60**.

In Anlehnung an *Yu et al.*^[35] wurde folgende Sequenz ODN1S als Templat für die Primerverlängerungsstudien gewählt:

5'-GGA TCG **STC** TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3'

Eine Übersicht über alle verwendeten DNA-Stränge ist in den Tabellen 5.1 und 5.2 zu finden.

Die Synthesekontrolle erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 500 nm. Hier wurde das durch saure Hydrolyse der DMT-Schutzgruppe entfernte 4,4'-Dimethoxytritylkation detektiert, das als indirekter Indikator für die Kupplungseffizienz gilt (Abbildung 3.6).

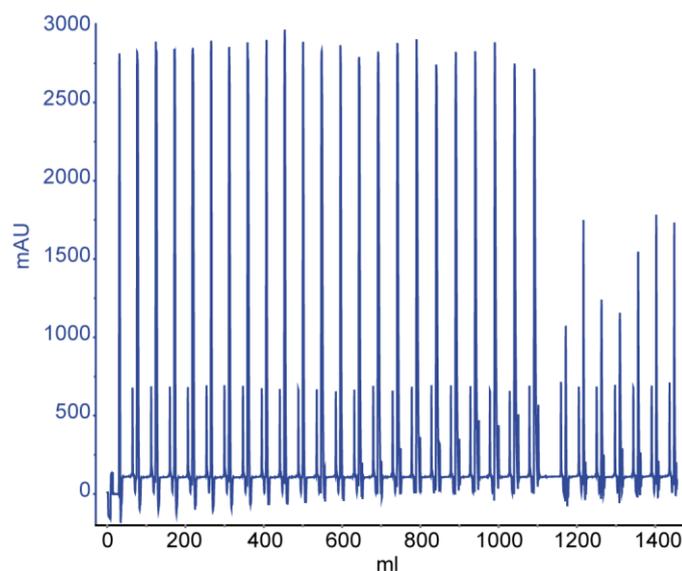


Abbildung 3.6: DMT-Signale bei der Synthese von ODN1S. Die Synthese erfolgte in 3'→5'-Richtung.

Zur Hydrolyse der Acetal-Schutzgruppe wurde die synthetisierte DNA noch am Trägermaterial mit wässriger 3 %iger Dichloressigsäure für 30 min behandelt. Zur Abspaltung vom Trägermaterial und vollständigen Entschützung wurde mit $\text{NH}_3 : \text{H}_2\text{O} = 3 : 1$ für 12 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA über rp-HPLC aufgereinigt (Puffer A: 0.1 M $\text{NH}_4\text{Et}_3\text{OAc}$ in H_2O und Puffer B: 0.1 M $\text{NH}_4\text{Et}_3\text{OAc}$ in Acetonitril : $\text{H}_2\text{O} = 4 : 1$, Abbildung 3.7). Da der Salicylaldehyd eine zusätzliche Absorption bei 330 nm hat, kann die Zuordnung der einzelnen Peaks durch Verwendung eines PDA-Detektors erleichtert werden.

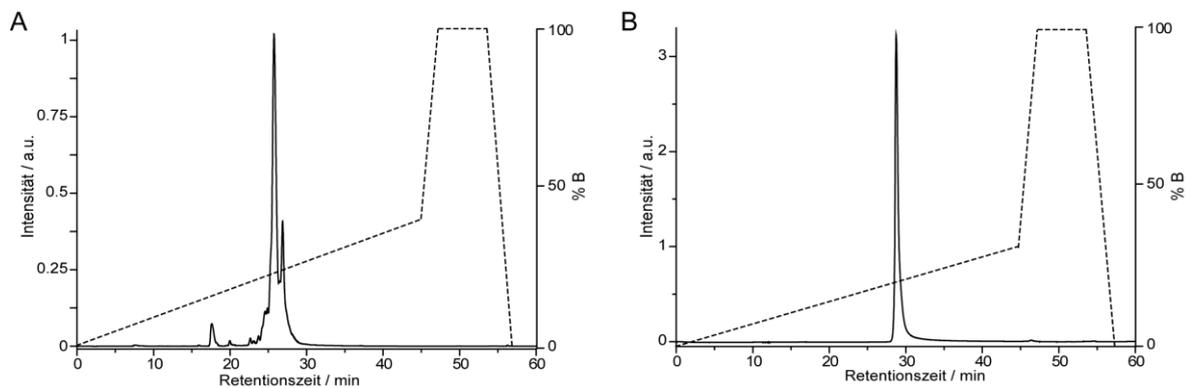


Abbildung 3.7: A) HPLC-Chromatogramm der präparativen Aufreinigung von ODN1S. B) Nachweis der Reinheit mittels analytischer HPLC. Durchgezogene Linie: Chromatogramm, gestrichelte Linie: Puffergradient B.

Die mittels ESI-Massenspektrometrie gefundene Molekülmasse stimmte sehr gut mit der berechneten Molekülmasse überein ($[\text{M}-6\text{H}]^{6-}$ ber.: $1531.4183 \text{ g mol}^{-1}$, gef.: $1531.4280 \text{ g mol}^{-1}$). Die gereinigte DNA wurden mittels *Sep-Pak*[®]-Säule entsalzt, die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektroskopisch bei 260 nm.

3.2.1.2 Erste Primerverlängerungsreaktionen mit Klenow(*exo*⁻)-Fragment

Erste Versuche zum Einbau des synthetisierten dSTP wurde von *M. Wagner* im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.^[92] Dazu verwendete er das Klenow-Fragment (KF) der DNA-Polymerase I (A-Familie) aus *E. coli*.^[99] Ursprünglich besitzt KF allerdings neben der Polymeraseaktivität auch noch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*-Aktivität). Dies ist bei Einbauversuchen nicht-natürlicher Nukleotide eher hinderlich, da möglicherweise der Einbau der nicht-natürlichen Base als Fehlpaarung erkannt und korrigiert würde. Daher wurde auf

das sog. Klenow(exo⁻)-Fragment (KF(exo⁻)), das keine *proofreading*-Aktivität mehr besitzt, zurückgegriffen.

Die verwendeten Templat- und Primersequenzen sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 aufgeführt. Sie wurden in Anlehnung an *Yu et al.* gewählt, die eine ähnliche Sequenz bereits erfolgreich in Primerverlängerungsexperimenten mit nicht-natürlichen Basen eingesetzt hatten.^[35] Neben ODN1S wurden noch unmodifizierte Templatstränge ODN1A/C/G/T (30mere, *Metabion*) verwendet, die sich in ihren Sequenzen nur an der n+1-Position unterscheiden, also in der Base, die direkt auf den doppelsträngigen Bereich mit dem Primer folgt. Diese wurden für Kontrollreaktionen verwendet. Als Primer wurde ODNP1 (23mer) eingesetzt, der am 5'-Ende mit einem Fluorescein markiert war. ODNP2 (24mer) diente als zusätzlicher Größenmarker bei der Gel-Elektrophorese.

Einzelnukleotidverlängerung

Nach der Hybridisierung von ODN1S und ODNP1 wurden die Doppelstränge mit KF(exo⁻) (*NEB*) bei 37 °C für 5 min inkubiert und die Verlängerungsreaktion durch Zugabe von dSTP gestartet. Die Reaktionszeit betrug 60 min. Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE, Abbildung 3.8).

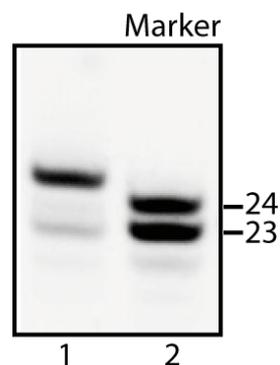


Abbildung 3.8: Einzelnukleotidverlängerung von ODN1S mit dSTP (Spur 1), Markerbande mit P1 (n) und P2 (n+1) in Spur 2. Bedingungen: 1.5 μM Templat (ODN1S), 1 μM Primer (ODNP1), 200 μM dSTP, 5 U KF(exo⁻), 1 h 37 °C.

Rechts ist der Marker mit den Kontrollbanden für ODNP1 (n) und ODNP2 (n+1) zu sehen. In der linken Bande ist deutlich sichtbar, dass eine Verlängerung des Primers mit dSTP stattfand. Allerdings liegt diese Bande höher als die 24mer

Markerbande. Dieses ungewöhnliche Laufverhalten wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie weiter untersucht.

Dazu wurde ein Ansatz unter ansonsten gleichen Bedingungen 1.5 h mit dSTP inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Roti[®]-Phenol beendet und die DNA mittels Chloroform-Extraktion gereinigt. Anschließend wurde die Molekülmasse des verlängerten Primers durch MALDI-Massenspektrometrie (negativer Modus) bestimmt. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der experimentell ermittelten Molekülmasse (7914 g/mol) mit der berechneten Molekülmasse des um ein Salicylaldehyd-Nukleotid verlängerten Primers (7920 g/mol, Abbildung 3.9). Obwohl das Laufverhalten bei der Gelelektrophorese auf einen n+2-Einbau hinzuweisen scheint, wurde nur eine dS-Base eingebaut.

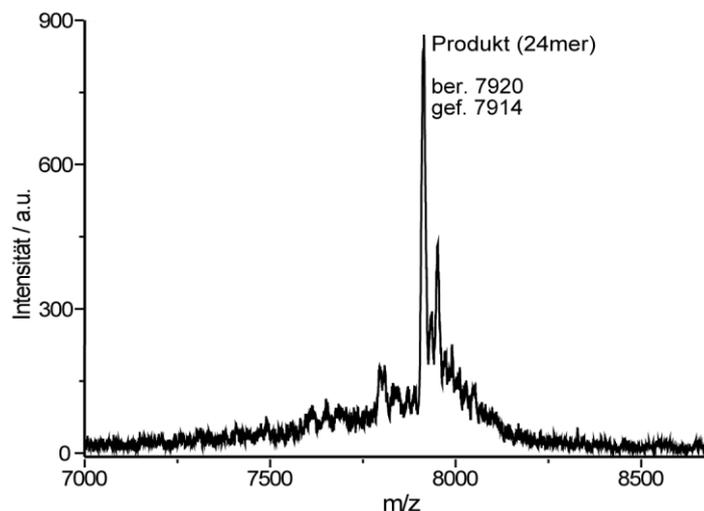


Abbildung 3.9: MALDI-Massenspektrum der Einzelnukleotidverlängerung (entsprechend Spur 1 aus Abbildung 3.8).

Vollverlängerung

Da der Einbau des dSTP gegenüber einer dS-Base im Templat stattfinden kann, sollte nun untersucht werden, ob eine vollständige Verlängerung des Primers möglich ist oder ob die Polymerase nach dem Einbau der Modifikation blockiert wird. Dazu wurde analog zu oben beschriebenen Versuchen zuerst eine Einzelnukleotidverlängerung durchgeführt, indem der Duplex ODN1S:ODNP1 für 60 min mit dSTP und KF(exo⁻) bei 37 °C verlängert wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Mischung aller vier natürlichen Nukleosidtriphosphate (Abbildung

3.10, Spur 1) und erneute Inkubation bei 37 °C für 60 min. Als Kontrollreaktion wurde eine Verlängerung von ODNP1, hybridisiert mit ODN1C, durchgeführt (Spur 2).

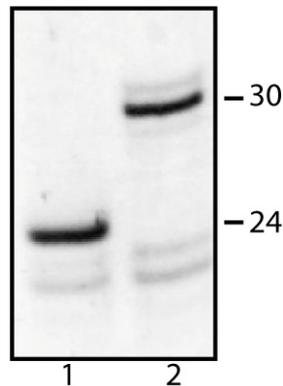


Abbildung 3.10: Vollverlängerung gegenüber ODN1S (Spur 1), bzw. ODN1C (Spur 2). Bedingungen: 1.5 μM Templät (ODN1S/C), 1 μM Primer (ODNP1), 200 μM dSTP/dGTP, 5 U KF(exo⁻), 1 h 37 °C; anschließend 200 μM dNTP-Mix

Während bei der Kontrollreaktion eine vollständige Verlängerung des Primers stattfand, wurde der Primer im Fall des modifizierten Strangs nach Einbau des dSTPs nicht weiter verlängert. Die Polymerase scheint nach Bildung der dS:dS-Paarung blockiert zu sein.

3.2.1.3 Test verschiedener Polymerasen zur Primerverlängerung

Da KF(exo⁻) nicht in der Lage war, die dS:dS-Paarung zu verlängern, wurden verschiedene andere Polymerasen auf die Fähigkeit der Vollverlängerung hin untersucht.

Zuerst wurden Einzelnukleotidverlängerungen durchgeführt, um zu sehen, ob das nicht-natürlich dSTP überhaupt von der jeweiligen Polymerase als Substrat erkannt wird. Eingesetzt wurden jeweils 5 U Polymerase. Der Puffer sowie die Reaktionstemperatur wurden Polymerase-spezifisch gewählt. Eine Übersicht der durchgeführten Ansätze sowie der Ergebnisse nach 60 min Verlängerungszeit ist in Tabelle 3.1 gegeben.

Tabelle 3.1: Übersicht der Polymerasescreenings auf Einzelnukleotidverlängerung

Polymerase	Puffer	Temperatur in °C	Ergebnis
KF(exo ⁻)	NEB 2	37	n+1 möglich
Pol η ^[100]	Pol η -Puffer	37	kein Einbau
KOD	KOD-Puffer	50	kein Einbau
Pwo	Thermpol	50	kein Einbau
Taq	Thermopol	50	n+1 möglich
Vent(exo ⁻)	Thermopol	50	n+1 möglich
Therminator	Thermopol	50	unspezifische Verlängerung
Bst Pol I (LF)	Thermopol	50	n+1 möglich

Reaktionsansätze mit Pol η, Pwo und KOD zeigten keine n+1-Produkte. Bei Einsatz der Therminator-Polymerase wurden unspezifische Verlängerungen über die Templatlänge hinaus sichtbar. Die Taq- und die Vent(exo⁻)-Polymerasen zeigten eine Verlängerung des Primers, allerdings war diese unvollständig, eine zweite Bande, die unverlängerten Primer zeigte war deutlich sichtbar. Im Gegensatz dazu war bei Verwendung der Bst Pol I nur eine Bande für den n+1-verlängerten Primer sichtbar. Daher wurde mit dieser Polymerase ein Test auf Vollverlängerung durchgeführt. Wie oben beschrieben (vgl. 3.2.1.2), wurde zuerst eine Einzelverlängerung über 60 min durchgeführt, anschließend erfolgte die Zugabe aller dNTP zur vollständigen Verlängerung. Nach weitem 2 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Auftragspuffer beendet und das Ergebnis mittel PAGE analysiert (Abbildung 3.11).

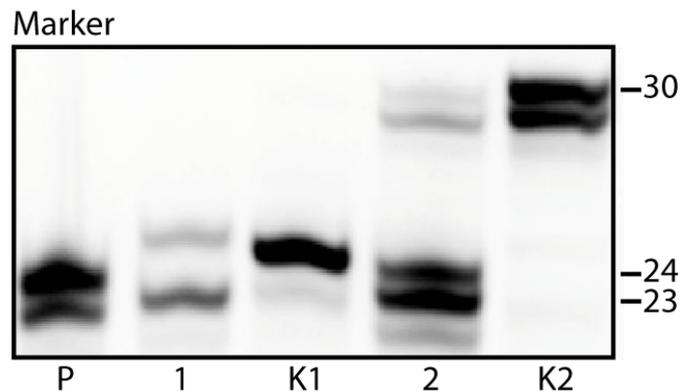


Abbildung 3.11: Erster Versuch zur Vollverlängerung mittels Bst Pol I. K: Kontrollreaktionen mit ODN1C. Bedingungen: 1.5 μM Templat (ODN1S), 1 μM Primer (ODNP1), 200 μM dSTP, 5 U Bst Pol I, 1 h 50 °C (Spur 1); anschließend Zugabe von 200 μM dNTP-Mix (N = A, C, G und T, 2 h 50 °C (Spur 2).

Dabei zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen grundsätzlich ein Überlesen der Paarung dS:dS möglich ist (Spur 2), allerdings nur in sehr geringem Umfang. Dennoch wurde diese Reaktion als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen gewählt, um die optimalen Bedingungen für Primerverlängerungen zu finden.

3.2.1.4 Primerverlängerungen mit Bst Pol I unter Zugabe verschiedener Additive

Auf Grund der zuvor erhaltenen Ergebnisse wurden die folgenden Untersuchungen mit dem großen Fragment (*large fragment*, LF) der Polymerase I aus *Geobacillus stearothermophilus* durchgeführt.

Die Struktur des großen Fragments der Bst Pol I entspricht der Struktur des Klenow-Fragments aus *E. coli* Polymerase I.^[101] Neben den Subdomänen Daumen, Handfläche und Finger verfügt sie über eine weitere Domäne, die strukturell der 3'→5'-Exonukleasedomäne des Klenow-Fragments entspricht. Im Gegensatz zum Klenow-Fragment besitzt das große Fragment der Bst Pol I jedoch keinerlei Exonukleaseaktivität. Im Vergleich mit dem Klenow-Fragment sind in der 3'→5'-Exonukleasedomäne Aminosäuren mutiert oder deletiert, die für die Koordination des katalytisch notwendigen Metallkations verantwortlich sind. Somit besitzt die Bst Pol I keine *proofreading*-Aktivität mehr.^[101]

Das Temperaturoptimum dieser Polymerase liegt bei 60 bis 65 °C. Da die Schmelztemperatur des gewählten Templat/Primer-Duplex mit etwa 55 °C deutlich

unter dieser Temperatur liegt, wurde die Reaktionstemperatur auf 50 °C reduziert. Hier hat die Bst Pol I noch eine Aktivität von 45 %.^[102]

Da bisher nur das dSTP als alternatives Triphosphat zum Einbau angeboten wurde, stellt sich die Frage, ob die Zugabe von Ethylendiamin und Metallionen einen Einfluss auf Einbau der Modifikation und anschließender Verlängerung hat. Ohne Additive war es nur möglich ein nicht-paarendes dS:dS zu bilden. Zwischen den gegenüberliegenden Basen findet aber keine Wechselwirkung statt. Diese Wechselwirkung tritt erst nach Zugabe eines Metallions (z. B. Cu^{2+} oder Mn^{2+}) in Form von koordinativen Bindungen oder durch Reaktion mit Ethylendiamin als kovalente Brücke zwischen den Basen ein. Das vollständige Metall-Salenbasenpaar liegt erst nach Imin- und Komplexbildung in der DNA vor. Daher sollte nun der Einfluss der Additive auf die Verlängerung des Primers untersucht werden. Zuerst wurde eine Einzelnukleotidverlängerung durchgeführt. Nach 120 min bei 50 °C wurde jeweils die Hälfte der Reaktionsansätze entnommen und mit Auftragspuffer versetzt (Abbildung 3.12 A). Zur zweiten Hälfte wurde eine Mischung der vier natürlichen dNTP gegeben. Nach weiteren 90 min wurden auch diese Ansätze durch Zugabe von Auftragspuffer gequencht (Abbildung 3.12 B). Um zu überprüfen, ob die veränderten Reaktionsbedingungen die Aktivität der Polymerase beeinflussen, wurden analoge Kontrollreaktionen mit natürlichen Templaten (ODN1G) durchgeführt. Dies ist notwendig, da bekannt ist, dass Cu-Ionen für Proteine toxisch sein können. Dies ist bedingt durch die Bindung des Cu(II) an die Thiolgruppen der Aminosäurereste. In Zellen können des Weiteren die Lipide der Zellmembran oxidiert werden, was zur Bildung freier Radikale führt, die DNA und Zellmembran schädigen.^[103]

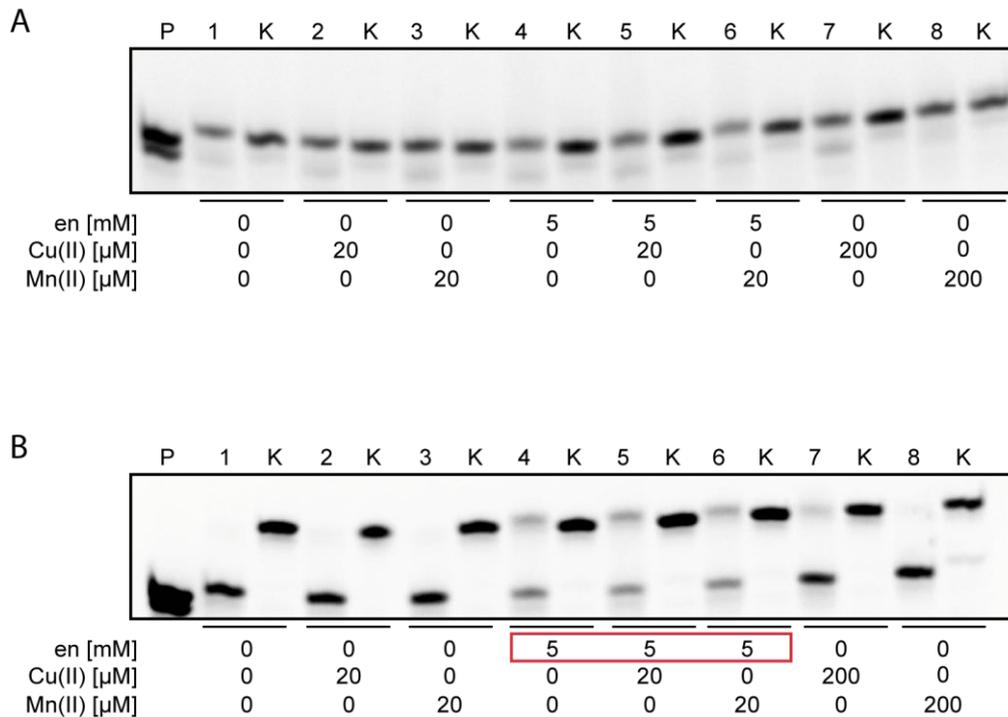


Abbildung 3.12: A) Einzelnukleotidverlängerung und B) Vollverlängerungsreaktionen unter Zugabe verschiedenen Additive. K: Kontrollreaktion mit unmodifiziertem Templat ODN1C zum Test, ob die Polymerase unter den jeweiligen Additiven noch in der Lage ist, Verlängerungen durchzuführen. Bedingungen: 1.5 μ M Templat (ODN1S), 1 μ M Primer (ODNP1), 200 μ M dSTP, 5 U Bst Pol I, 2 h, 50 °C (Gel A); anschließend Zugabe von 200 μ M dNTP-Mix (N = A, C, G und T, 1.5 h, 50 °C; die Konzentrationen der jeweiligen Additive sind direkt in der Abbildung angegeben.

Der Einbau des dSTP scheint durch die Additive nicht beeinflusst zu werden. Auch die Kontrollreaktionen werden durch diese nicht gestört.

Bei Betrachtung der Spuren 4 bis 6 der Abbildung 3.12 B wird deutlich, dass eine Zugabe von Ethylendiamin eine Vollverlängerung begünstigt. Es sind schwache Banden für das Produkt der gewünschten Länge zu erkennen. Im Vergleich zu den Kontrollreaktionen ist der Anteil an verlängertem Primer aber immer noch sehr gering. Daher wurde geprüft, ob eine Abhängigkeit der Reaktionseffizienz von der Ethylendiamin-Konzentration vorliegt. Zudem wurde der Reaktionsverlauf nach 2 h sowie nach 18 h überprüft (Abbildung 3.13).

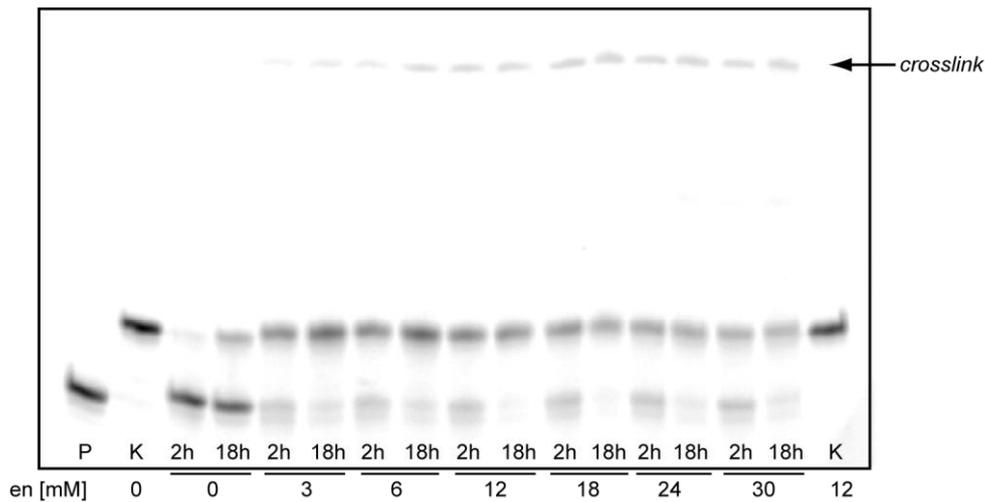


Abbildung 3.13: Primerverlängerung (Vollprodukt) unter Zugabe steigender Ethylendiamin-Konzentration (0 bis 30 mM) und bei 2 h oder 18 h. K: Kontrolle mit natürlicher DNA. Bedingungen: 1.5 μM Templat (ODN1S), 1 μM Primer (ODNP1), 200 μM dSTP, 0-30 mM Ethylendiamin, 5 U Bst Pol I, 2 h, 50 °C; anschließend Zugabe von 200 μM dNTP-Mix (N = A, C, G und T, 2 h oder 18 h bei 50 °C).

Es zeigte sich, dass mit steigender Ethylendiamin-Konzentration die Bande des n+1-Produkts schwächer wird und mehr vollständige Verlängerung stattfindet. Zudem ist der Zeitfaktor entscheidend. Reaktionen, die über Nacht abliefen, zeigten deutlich mehr Vollängenprodukt. Neben diesen Ergebnissen konnte man noch einen weiteren Effekt beobachten. Mit steigender Ethylendiamin-Konzentration tauchte eine zusätzliche Bande im oberen Bereich des Gels auf, in dem üblicherweise längere Stränge zu sehen sind. Nach einigen Testreaktionen stellte sich heraus, dass diese Bande nur dann auftauchte, wenn

1. eine dS-Base im Templat vorlag,
2. dSTP zum Einbau angeboten wurde,
3. Polymerase vorhanden war **und**
4. Ethylendiamin zugegeben wurde.

Dies spricht dafür, dass es sich bei der vorliegenden Bande um einen DNA-Doppelstrang handelte, der durch das Ethylendiamin kovalent verlinkt war. Offenbar war diese kovalente Interstrang-Verbrückung stabil gegen die denaturierenden Bedingungen (Harnstoff) des Gels. Dieses Problem der *crosslinks* auf dem Gel konnte durch Zugabe von 1 μL EDTA und Erhitzen der entsprechenden Proben für 10 min auf 90 °C direkt vor dem Auftragen auf das Gel gelöst werden. Ein entsprechendes Gel ist in Kap. 3.2.1.6 gezeigt.

3.2.1.5 Versuche zur Fehlpaarung der dS-Base mit den natürlichen DNA-Basen

Wie oben gezeigt, war die vollständige Verlängerung des Primers nach dem Einbau des dSTP möglich. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu wissen, ob gegenüber den natürlichen Basen auch die richtigen Partner eingebaut wurden oder es Fehleinbau von dSTP gab. Zudem muss berücksichtigt werden, dass im Falle einer direkten Vollverlängerung ohne vorausgehende Einzelnukleotidverlängerung das dSTP mit den anderen dNTP um den Einbau gegenüber dem dS-Templat konkurriert. Daher wurden Untersuchungen zu möglichen Fehlpaarungen der dS-Base mit den natürlichen Basen angestellt. Es müssen die folgenden Kombinationen in Einzelnukleotidverlängerungen untersucht werden:

ODN1S/dATP	ODN1A/dSTP
ODN1S/dCTP	ODN1C/dSTP
ODN1S/dGTP	ODN1G/dSTP
ODN1S/dTTP	ODN1T/dSTP

Gleichzeitig wurde der Einfluss von Ethylendiamin und CuSO_4 auf den möglichen Fehleinbau betrachtet, indem die Primerverlängerungsreaktionen unter verschiedenen Additivkonzentrationen untersucht wurden.

Zuerst wurde die Verlängerung des Primers gegenüber dem modifizierten Templat ODN1S unter Zugabe jeweils eines natürlichen Desoxynukleotidtriphosphats untersucht. Die Analyse der einzelnen Reaktionen erfolgte mittels PAGE (Abbildung 3.14).

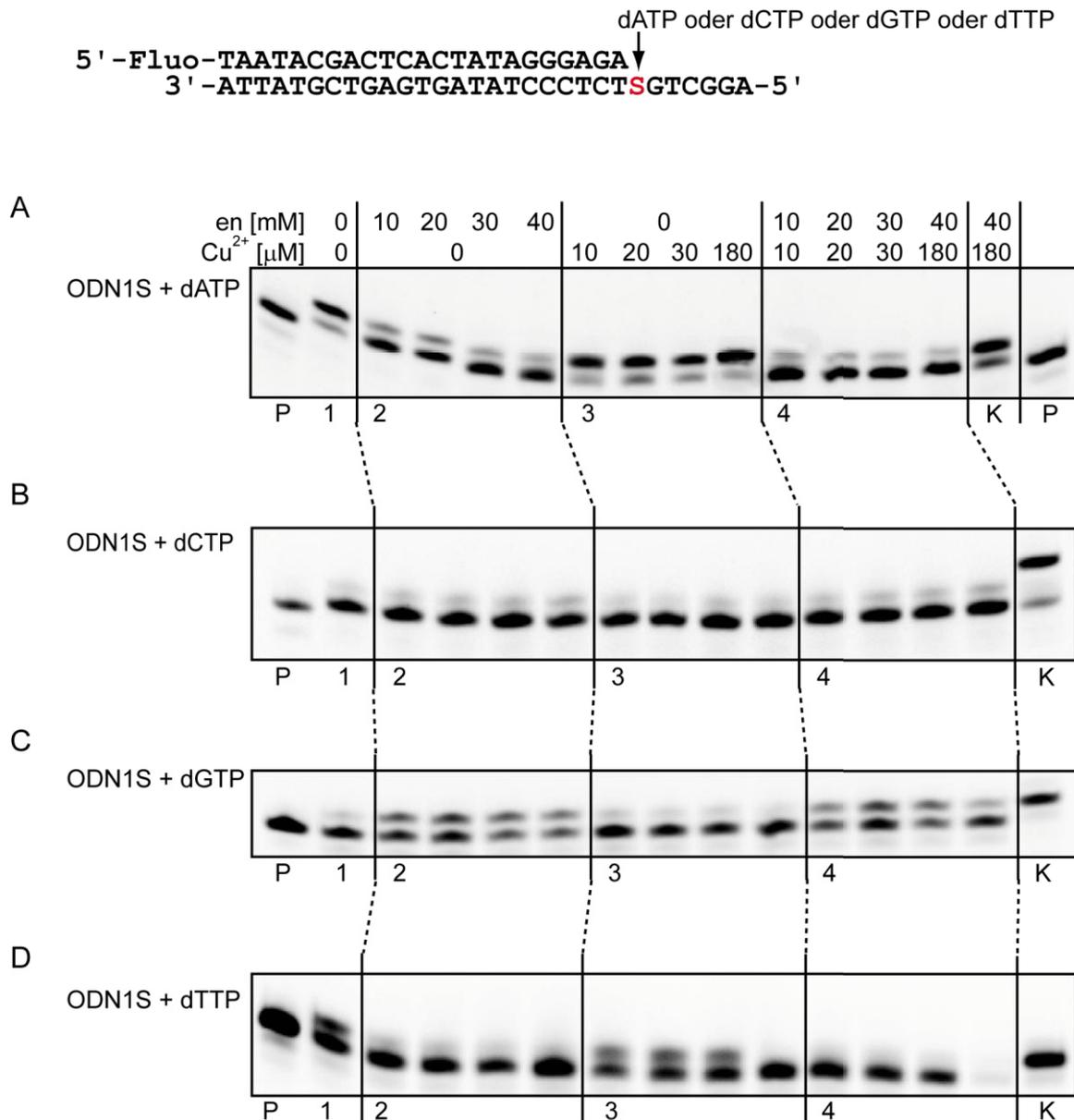


Abbildung 3.14: Einzelnukleotidverlängerungsversuche mit ODN1S und A) dATP, B) dCTP, C) dGTP und D) dTTP. P: Primer, K: Kontrolle mit unmodifizierter DNA, Spur 1: Fehleinbau ohne Zugabe von Additiven, Spur 2: Einbau unter zunehmender Ethylendiamin-Konzentration (0-40 mM), Spur 3: Einbau unter zunehmender Cu(II)-Konzentration (10-180 μM), Spur 4: Einbau unter zunehmender Ethylendiamin- (0-40 mM) und Cu(II)-Konzentration (10-180 μM). Bedingungen: 1.5 μM Templat (ODN1S), 1 μM Primer (ODNP1), 10 μM dNTP (N = A, C, G oder T), 0-40 mM Ethylendiamin, 10-180 μM CuSO₄, 5 U Bst Pol I, 2 h, 50 °C.

Wie man gut erkennen kann, war ein Fehleinbau von dA gegenüber der dS-Base im Templat möglich (Abbildung 3.14 A, Spur 1). Die Zugabe von Ethylendiamin allerdings reduzierte diesen *mismatch* (Spur 2), wohingegen Cu²⁺ keinen Einfluss zu haben schien (Spur 3). Bei der Kombination der beiden Additive erhielt man den gleichen Effekt wie bei Ethylendiamin, nämlich einen reduzierten Fehleinbau. Der Einbau von dCTP war bereits ohne Additive sehr gering, weder Ethylendiamin

noch CuSO_4 schienen dies zu beeinflussen (Abbildung 3.14 B). Völlig anders stellte sich die Situation im Fall des dGTP dar (Abbildung 3.14 C). Während ohne Additive kaum Fehleinbau des dGTP gegenüber der dS-Base im Templat stattfand (Spur 1), führte die Anwesenheit von Ethylendiamin zu verstärktem Fehleinbau der Polymerase (Spur 2). Da in diesem Fall CuSO_4 jedoch den gegenteiligen Effekt, nämlich eine Reduzierung des Einbaus bewirkte (Spur 3), konnte durch die Kombination der beiden Additive ein Kompromiss erreicht werden (Spur 4). dTTP wurde ebenfalls fehlerhaft gegenüber der dS-Base eingebaut (Abbildung 3.14 D, Spur 1), allerdings führten bereits geringe Konzentrationen von Ethylendiamin zu einer vollständigen Blockade des Falscheinbaus (Spur 2). Dieser Effekt wurde durch hohe Cu^{2+} -Konzentrationen verstärkt, so dass in diesem Fall eine Verlängerung vollkommen verhindert werden konnte (Spur 3 und 4).

Nun wurde der mögliche Fehleinbau von dSTP gegenüber den natürlichen Templaten ODN1A/C/G/T untersucht. Die Analyse der einzelnen Reaktionen erfolgte mittels PAGE (Abbildung 3.15).

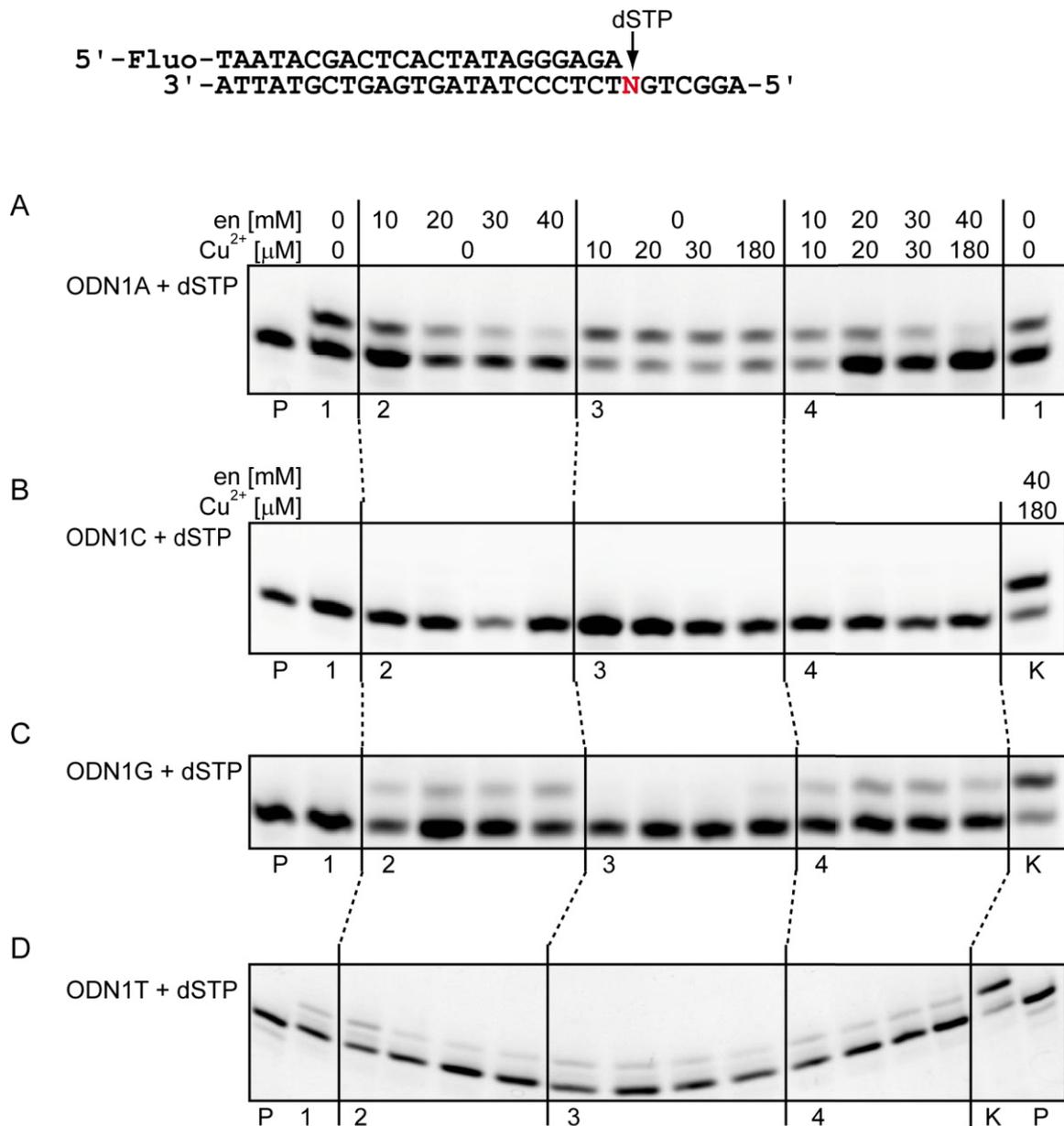


Abbildung 3.15: Einzelnukleotidverlängerungsversuche mit dSTP und A) ODN1A, B) ODN1C, C) ODN1G und D) ODN1G. P: Primer, K: Kontrolle mit unmodifizierter DNA, Spur 1: Fehleinbau ohne Zugabe von Additiven, Spur 2: Einbau unter zunehmender Ethylendiamin-Konzentration (0-40 mM), Spur 3: Einbau unter zunehmender Cu(II)-Konzentration (10-180 μM), Spur 4: Einbau unter zunehmender Ethylendiamin- (0-40 mM) und Cu(II)-Konzentration (10-180 μM). Bedingungen: 1.5 μM Templat (ODN1N), 1 μM Primer (ODNP1), 200 μM dSTP, 0-40 mM Ethylendiamin, 10-180 μM CuSO₄, 5 U Bst Pol I, 2 h, 50 °C.

Vergleichbar mit der umgekehrten Templat/Triphosphat-Kombination, konnte das dSTP gegenüber einer dA-Base im Templat eingebaut werden (Abbildung 3.15 A, Spur 1). Allerdings erfolgte auch hier eine Reduzierung des Falscheinbaus durch die Zugabe von Ethylendiamin. dSTP wurde in keinem Fall von der Polymerase gegenüber einer dC-Base im Templat eingebaut (Abbildung 3.15 B). Im Fall von ODN1G zeigte sich, dass auch hier der Falscheinbau von dS durch Ethylendiamin

erst begünstigt wurde, aber mit Hilfe von Cu^{2+} der Effekt gemildert werden konnte (Abbildung 3.15 C). Gegenüber einer dT-Base wurde nur in geringem Maße dSTP eingebaut, durch die Additive konnte die fehlerhafte Verlängerung weiter reduziert werden (Abbildung 3.15 D).

Um einen direkten Vergleich der Daten ohne und mit Additive zu erhalten wurden jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführte Reaktionen für jede Kombination mittels PAGE analysiert. Mithilfe des *AIDA image analyzers*^[104] wurden die Gele graphisch durch Integration der Banden ausgewertet. Dies ermöglichte eine quantitative Bestimmung der Verlängerungsprodukte. Als 100% wurde die summierte Intensität aller in einer Spur vorhandenen Banden festgelegt. Die erhaltenen Werte wurden mittels eines Balkendiagramms gegenübergestellt (Abbildung 3.16).

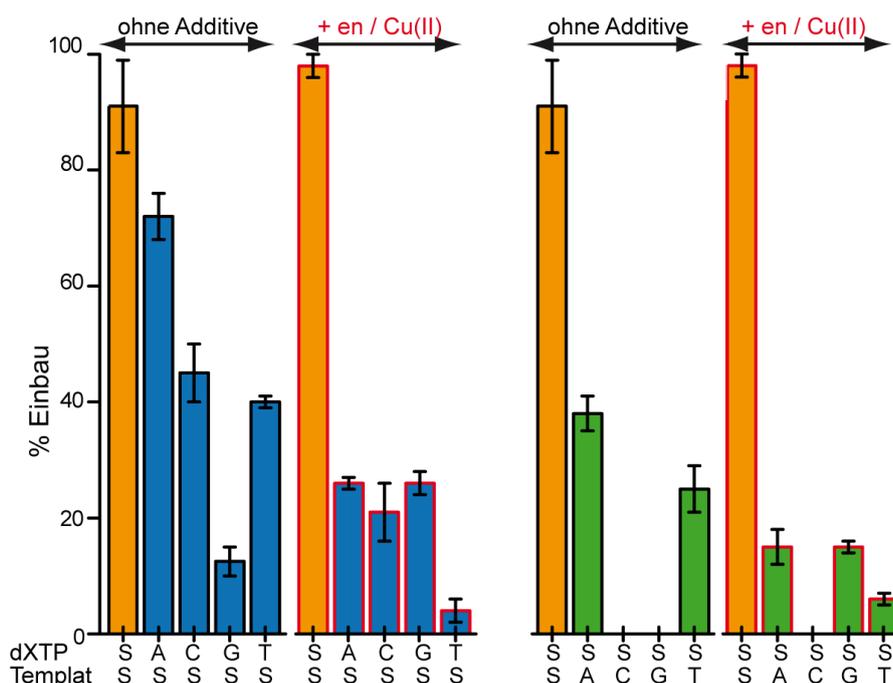


Abbildung 3.16: Prozentualer Einbau von dSTP gegenüber ODN1S (gelb). Prozentualer Einbau der verschiedenen dNTP gegenüber eines modifizierten Templatstrangs ODN1S (blau) und prozentualer Einbau von dSTP gegenüber natürlicher Templatstränge ODN1N (grün) bei Einzelnukleotidverlängerungen. Die rot umrandeten Balken zeigen die Ergebnisse nach Zugabe von Ethylendiamin (40 mM) und CuSO_4 (180 μM). Bedingungen: 1.5 μM Templat, 1 μM Primer, 200 μM dSTP oder 10 μM dNTP (N = A, C, G, T), 5 U Bst Pol I, 2 h, 50 °C.

Es wird deutlich, dass die Zugabe von Ethylendiamin und CuSO_4 in fast Kombinationen fehlerhafte Basenpaarungen reduzierte. Lediglich im Fall der

Kombination dG:dS wurde eine Fehlpaarung durch die Additive begünstigt. Dennoch blieb in allen Fällen der *mismatch*-Einbau bei Zugabe von Ethylendiamin und Cu(II) unter 30 %. Zu beachten ist, dass diese Ergebnisse unter nicht-kompetitiven Bedingungen erzielt wurden, die Polymerase also nur die Wahl zwischen „kein Einbau“ und „Falscheinbau“ hatte.

3.2.1.6 Vollverlängerung unter kompetitiven Bedingungen

Die bisher durchgeführten Vollverlängerungen wurden immer als Folgereaktion auf Einzelnukleotidverlängerungen durchgeführt. Für den Einbau gegenüber dem dS im Templatstrang wurde also nur das dSTP angeboten und erst nach dessen Einbau erfolgte die Zugabe der übrigen Triphosphate zur vollständigen Verlängerung des Primers. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen und Reaktionsbedingungen sollte es möglich sein, alle fünf benötigten Triphosphate gleichzeitig zu Reaktionsbeginn anzubieten. Damit steht das dSTP für den Einbau gegenüber der dS-Base in Konkurrenz zu den natürlichen dNTP. Um einen direkten Vergleich der beiden Reaktionswege zu erhalten (Abbildung 3.17), wurden die sequentielle Vollverlängerung und die direkte Vollverlängerung parallel durchgeführt.

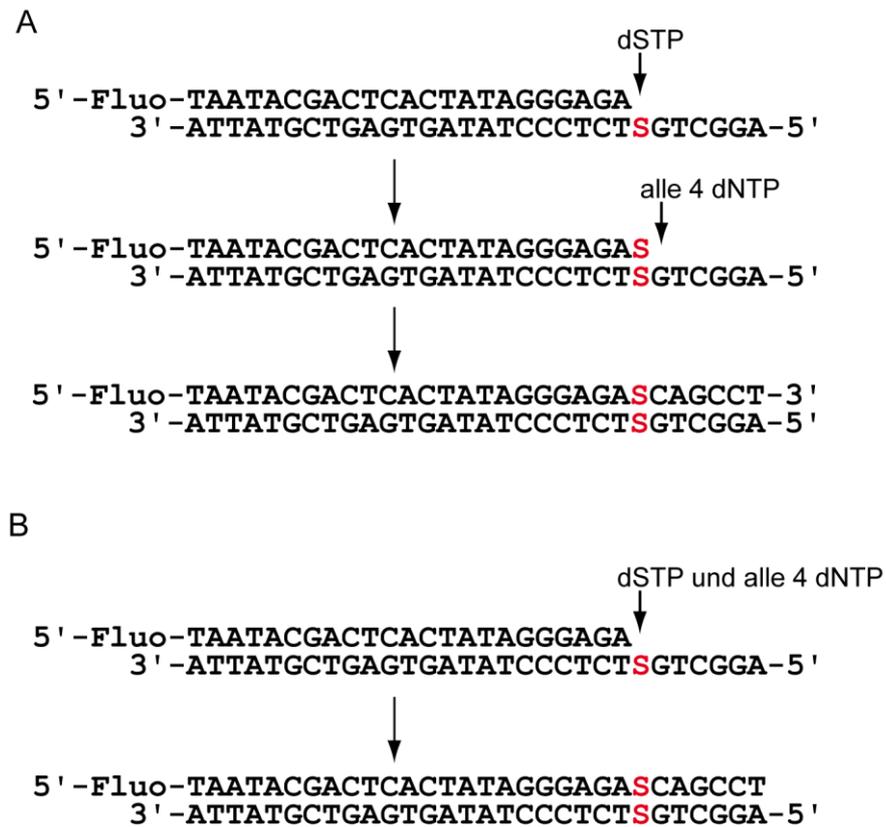


Abbildung 3.17: Vergleich des Ablaufs der A) sequentiellen Vollverlängerung, bei der zuerst eine Einzelnukleotidverlängerung durchgeführt wird, und im Anschluss daran die Zugabe aller anderen Triphosphate die Vollverlängerung ermöglicht mit der B) direkten Vollverlängerung, bei der gleichzeitig alle fünf Triphosphate zugegeben werden.

In Anlehnung an die durchgeführten *mismatch*-Experimente wurden die Primerverlängerungsreaktionen mit einem 20-fachen Überschuss an dSTP im Vergleich zu den natürlichen dNTP durchgeführt. Zudem wurden zum Vergleich auch Reaktionen ohne die Additive Ethylendiamin und Kupfersulfat analysiert. Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben mit EDTA versetzt und für 10 min auf 90 °C erhitzt, um mögliche *interstrand-crosslinks* aufzubrechen. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Abbildung 3.18 gezeigt.

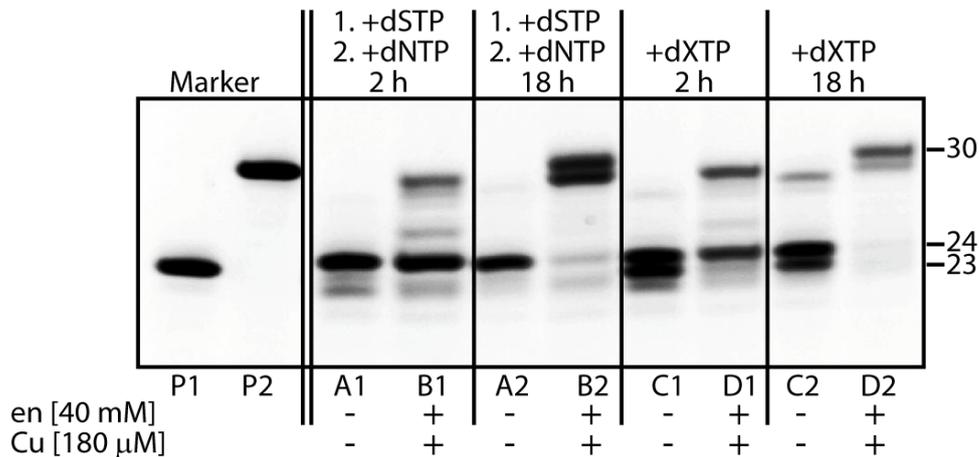


Abbildung 3.18: Vergleich der vollständigen Primerverlängerungen nach sequentieller (Spuren A und B) sowie nach direkter (Spuren C und D) Vollverlängerung. Bedingungen: 1.5 µM Templat (ODN1N), 1 µM Primer (ODNP1), 200 µM dSTP, 10 µM dNTP, 40 mM Ethylendiamin, 180 µM CuSO₄, 5 U Bst Pol I, 50-60 °C, 2 h bzw. 18 h.

Die Gelspuren A und B zeigen die Ergebnisse der Reaktionen einer sequentiellen Vollverlängerung. Dazu wurde zuerst nur dSTP zur Reaktion gegeben und nach 2 h Reaktion bei 50 °C wurden die übrigen Triphosphate zugegeben. Die Analyse der folgenden Reaktion bei 60 °C erfolgte nach 2 h (Spuren A1 und B1) bzw. nach 18 h (Spuren A2 und B2). Die Erhöhung der Reaktionstemperatur erfolgte, um das Temperaturoptimum der Bst Pol I zu erreichen. Da sich wegen der Bildung des Salenbasenpaars der Schmelzpunkt des Duplex stark erhöhte, war ein Denaturieren des Templat-Primer-Doppelstrangs nicht zu befürchten.

Wie man deutlich sieht, zeigte sich in Ansätzen ohne Additive auch nach 18 h (Spur A2) kaum ein vollständig verlängertes Produkt. Bei Zugabe von Ethylendiamin und Cu(II) hingegen wurde ein hoher Anteil an Vollprodukt erhalten.

Das Ergebnis ist mit der direkten Vollverlängerung zu vergleichen, bei der sofort alle fünf zur Verfügung stehenden Triphosphate eingesetzt wurden (Spuren C und D). Auch hier war ohne Additive nur eine Verlängerung um ein Nukleotid zu beobachten, (Spuren C1 und C2), wohingegen bei Zusatz von Ethylendiamin und Kupfersulfat das Volllängenprodukt erhalten wurde (Spuren D1 und D2).

Um sicher zu stellen, dass keine Mutation stattgefunden hat, wurde der komplette Ansatz von Spur D2 parallel zur Gelelektrophorese für Aufnahme eines Massenspektrums präpariert. Dazu wurde das Reaktionsgemisch an Stelle von Auftragspuffer mit Roti[®]-Phenol versetzt und nach Vortexen und Zentrifugation wurde die wässrige Phase entnommen und mehrfach mit Chloroform extrahiert. Im Anschluss wurde die wässrige Phase getrocknet und der Rückstand in 10 µL H₂O

aufgenommen und über ZipTip (C18, *Millipore*) sowie MF-Membranfilter (*Millipore*) entsalzt. Die Aufnahme des MALDI-Massenspektrums erfolgte in einer HPA-Matrix. Man erhielt ein Massenspektrum mit zwei Hauptsignalen (Abbildung 3.19).

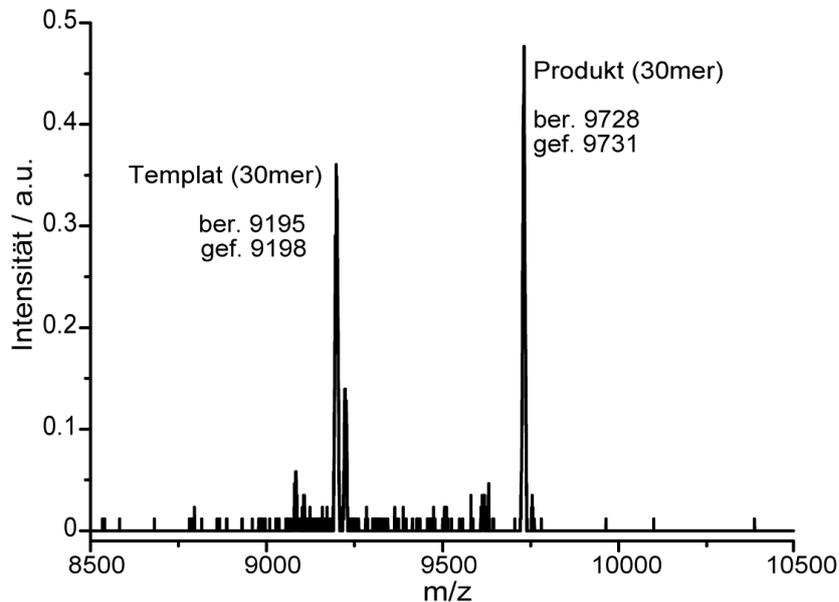


Abbildung 3.19: MALDI-Massenspektrum der direkten Vollverlängerung (entsprechend Spur D2 aus Abbildung 3.18).

Wie deutlich zu erkennen ist, finden sich nur zwei Signale im Spektrum, die dem Templatstrang und dem korrekt verlängerten Primerstrang (Produkt) zuzuordnen sind. Wegen der Markierung mit Fluorescein ist der Produktstrang deutlich schwerer als das Templat. Das Signal für den Produktstrang hat die Molekülmasse für den korrekten Einbau eines Salicylaldehyds. Wäre fälschlicherweise eine natürliche Base anstelle des dS eingebaut worden, müsste es Signale für deutlich schwerere Produkte geben. Zudem lässt das Massenspektrum darauf schließen, dass die zwei Banden in Abbildung 3.18, Spur D2, die sehr knapp nebeneinander liegen, vermutlich auf Produktstrang und einen Produktstrang, der noch an einer dS-Base ein Imin mit Ethylendiamin ausbildet, zurückzuführen sind. Dieses Imin würde bei der MALDI-Messung hydrolysieren und kein zusätzliches Signal geben.

Mittels direkter Zugabe aller fünf Triphosphate ist also eine korrekte Primerverlängerungsreaktion möglich.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Da die Primerverlängerungsreaktionen gute Ergebnisse zeigten, sollte nun der Einbau des Salenbasenpaars mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)^[105, 106] verwirklicht werden. Mit dieser Methode gelingt die Amplifizierung von DNA-Strängen im Bereich von 50 bp bis 150 kbp. Der Einsatz modifizierter Nukleotide in der PCR hat sich in relativ kurzer Zeit entwickelt. Diese können beispielsweise eingesetzt werden, wenn eine hohe Modifikationsdichte der DNA gewünscht ist^[107, 108] oder sehr lange, modifizierte DNA-Stränge für Anwendungen in der Nanotechnologie benötigt werden.^[95, 109, 110] Im Folgenden ist der Ablauf einer PCR beschrieben (Abbildung 3.20).

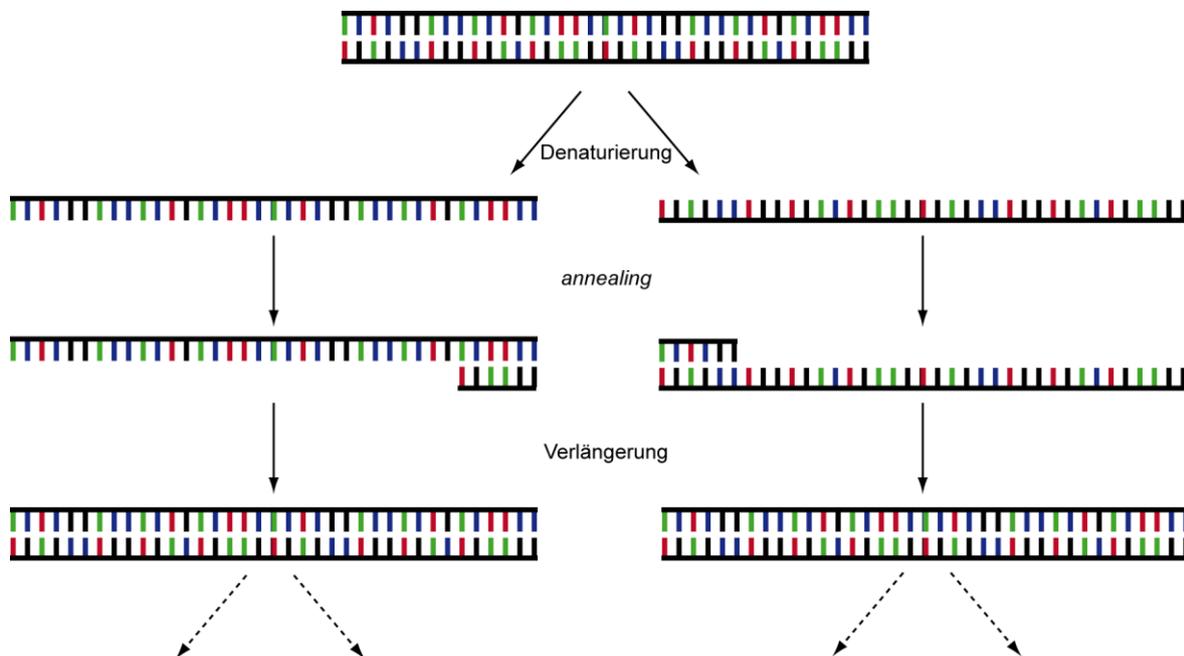


Abbildung 3.20: Schema einer Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Strängen.

Eine Lösung mit einem doppelsträngigen Templat, zwei Primeroligonukleotiden, den Triphosphaten (in unserem Fall fünf) und einer Polymerase wird mehrmals einer dreistufigen Temperaturfolge unterworfen.

Zuerst erfolgt die Strangtrennung, bei der das ursprüngliche Doppelstrangtemplat denaturiert wird, indem man die Lösung kurzzeitig auf 90-99 °C erhitzt. Im Anschluss wird die Lösung sehr schnell auf 40-65 °C zur Hybridisierung der Primer abgekühlt (*annealing*). Zur Bestimmung der benötigten Hybridisierungstemperatur sind die Schmelztemperaturen der Primer von großer Bedeutung. In

diesem Schritt findet bereits Primerverlängerung statt, wodurch sich die Schmelztemperatur erhöht. Dadurch kann im nächsten Schritt die Temperatur erhöht werden, so dass die Polymerase optimal arbeiten kann. Üblicherweise liegt diese Temperatur um etwa 72 °C. Hier findet nun die vollständige Verlängerung des Primers statt, wobei dieser Schritt bei Standardreaktionen mit natürlichen Templaten je nach Länge des Produktes und der Prozessivität der Polymerase etwa 30 s bis 2 min dauert. Danach erfolgt erneut die Denaturierung bei 95 °C und ein neuer Zyklus wird begonnen. Da mit jedem Zyklus neue Bindungsstellen für Primer generiert werden, erhöht sich die Menge des Produktes theoretisch exponentiell.

Üblicherweise geschieht der Denaturierungsschritt während des Zyklus in etwa 15 s, aber aufgrund der Stabilität des Salenbasenpaars, erschien es sinnvoll diesen Schritt zu verlängern. Wie sich auch während der Primerverlängerungen zeigte, benötigte die Vollverlängerung mehr Zeit als üblich für diese Art Experiment. Daher wurde auch die Zeit für den Verlängerungsschritt stark verlängert, so dass sich im Vergleich zu den allgemein verwendeten Zykluszeiten starke Abweichungen ergaben (Abbildung 3.21).

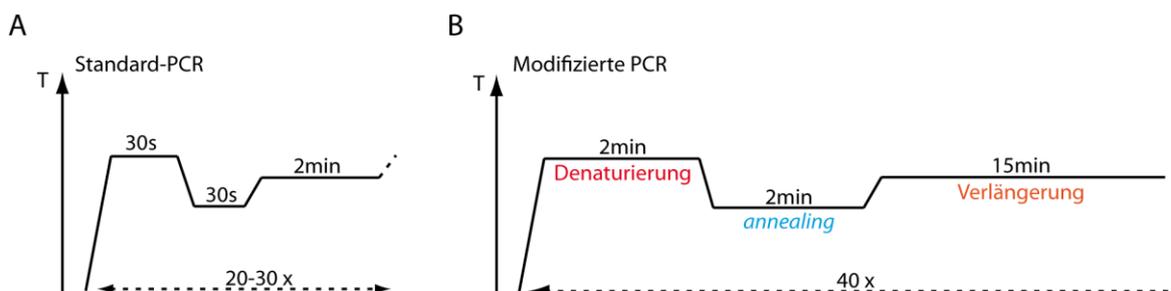


Abbildung 3.21: Vergleich eines Standard-PCR-Zyklus (A) mit dem modifizierten Zyklus (B) zur Amplifikation des Salenbasenpaars mittels PCR.

Grundsätzlich waren bei dem Übergang von den Primerverlängerungsexperimenten einige zusätzliche Punkte zu beachten.

Die Primer sollten mindestens 17 Nukleotide lang sein, um eine Schmelztemperatur im Bereich von 55-80 °C zu haben, wobei beide Primer den gleichen Schmelzpunkt haben sollten. Zudem ist es wichtig, dass die Primer keine Haarnadelstrukturen oder Duplexe mit sich selbst oder dem zweiten Primer bilden

können. Ferner müssen die 3'-Enden der Primer einen stabilen Duplex mit dem Templat bilden können. Da die Templatstränge bereits mit mehreren dS-Basen modifiziert sein müssen, werden auch besondere Ansprüche an die Synthese dieser Stränge gestellt (vgl. Kap 3.2.2.1).

Die wichtigste Anforderung an die Polymerase für die PCR war, dass ihr Temperaturoptimum um 72 °C liegt und sie eine sehr gute Temperaturstabilität bei 95 °C besitzt. Daher konnte für die PCR nicht mehr die bisher eingesetzte Bst. Pol I verwendet werden, die bei Temperaturen über 70 °C inaktiviert wird, sondern eine andere, thermostabilere Polymerase musste zum Einsatz kommen.

3.2.2.1 *Synthese der Templatstränge für die PCR*

Die Modifikation der DNA-Stränge stellte zusätzliche Ansprüche an die Reaktionsplanung. Als Templat sollte in Anlehnung an die Arbeit von Hirao *et al.*^[46] ein 153 bp langer Strang eingesetzt werden. Dieser wurde wie in der oben genannten Publikation beschrieben in einer Kombination aus chemischer und biochemischer Synthese verwirklicht. Zuerst wurden zwei Oligonukleotide mittels Festphasensynthese hergestellt, die ein Dimer durch einen 25 bp-langen Bereich am 3'-Ende ausbilden können. Dieser enthält die drei dS:dS-Basenpaare. Anschließend erfolgt eine Art Primerverlängerung mit Klenow(exo⁻) zum vollständig ausgebildeten Duplex (Abbildung 3.22).

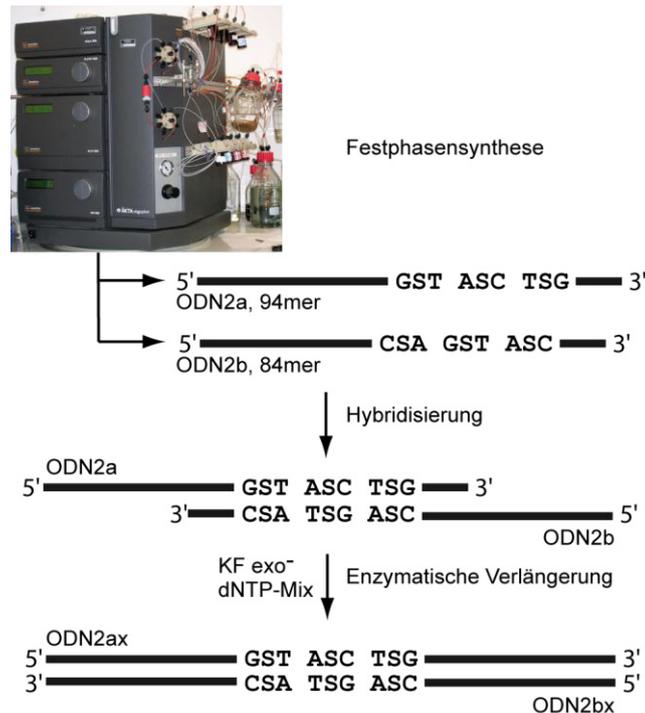


Abbildung 3.22: Synthese der Templatstrangs für PCR mittels Kombination aus chemischer Festphasensynthese und Primerverlängerungsreaktion.

Mit Hilfe der Firma *Ella Biotech*, Martinsried, gelang der Einbau des Salicylaldehyd-Phosphoramidits **60** (Abbildung 3.5) in ein 94mer bzw. ein 84mer über Festphasensynthese. Dabei wurden jeweils drei dS-Basen eingebaut. Die Synthese erfolgte *DMT-on*, was nach der Abspaltung vom Trägermaterial einen ersten Aufreinigungsschritt an der HPLC erleichterte (Abbildung 3.23 A). Erst im Anschluss wurde die Säurebehandlung zur Abspaltung der DMT-Schutzgruppe und damit auch die Hydrolyse des Acetals am Salicylaldehyd durchgeführt. Dafür wurde die DNA auf eine *Sep-Pak*[®]-Säule aufgetragen und durch Waschen mit 10 mL einer Lösung aus 3 % Dichloressigsäure in H₂O entschützt. Man spülte mit 6 mL Triethylammoniumacetat-Puffer (0.1 M) und 10 mL H₂O nach und eluierte die DNA mit 5 mL Acetonitril : H₂O = 1 : 1. Anschließend wurden die entschützten Stränge erneut über rp-HPLC aufgereinigt (Abbildung 3.23 B) und im Anschluss über *Sep-Pak*[®]-Säulen entsalzt. Zur Übersichtlichkeit sind nur die Chromatogramme für ODN2a gezeigt.

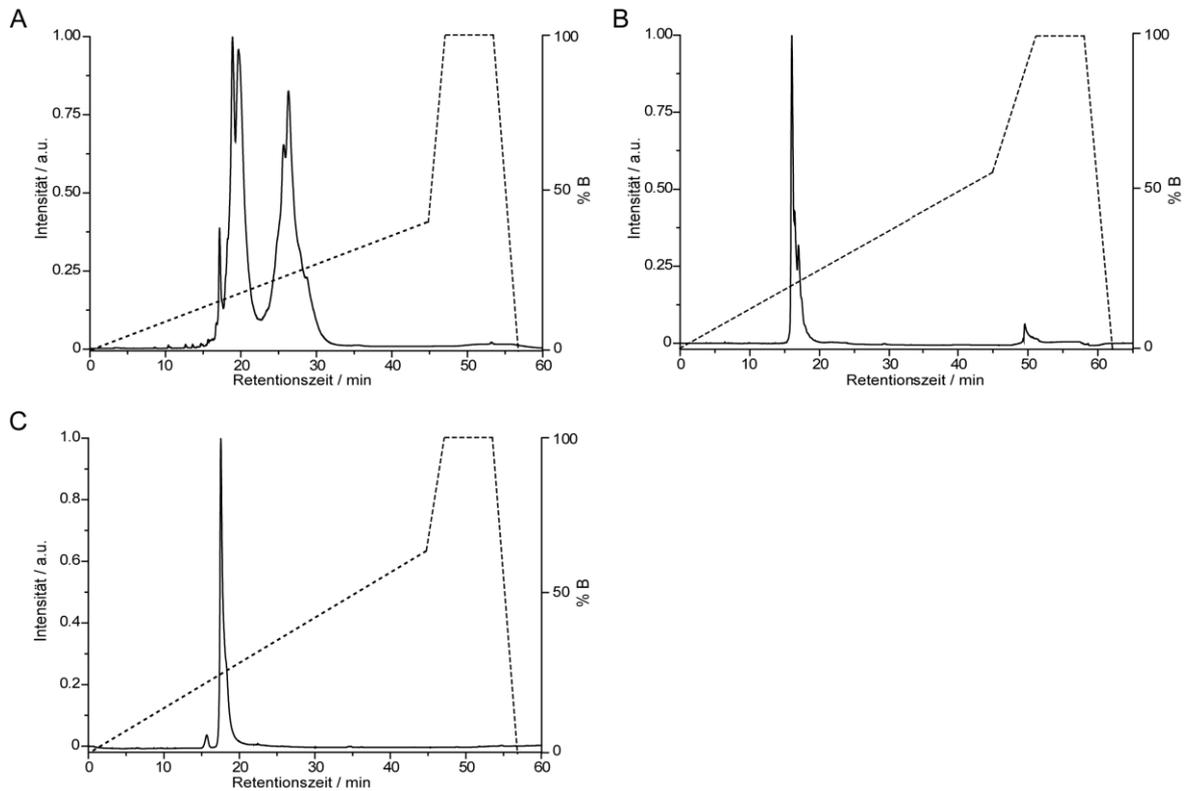


Abbildung 3.23: HPLC-Chromatogramm der präparativen Aufreinigung von ODN2a. A) Aufreinigung des Stranges DMT-on; B) Reinigung des Stranges nach Entfernung der Acetalschutzgruppe am Salicylaldehyd und der DMT-Schutzgruppe am 5'-Ende; C) Nachweis der Reinheit mittels analytischer HPLC. Durchgezogene Linie: Chromatogramm, gestrichelte Linie: Puffergradient B.

Auf Grund der Länge und der entsprechend hohen Masse war eine Analyse der Stränge mittels MALDI- oder ESI-Massenspektrometrie nicht möglich. Allerdings konnten die so erhaltenen Stränge mittels Gelelektrophorese mit unmodifizierten, gekauften Strängen verglichen werden. Die korrekte Länge der Stränge wurde so bestätigt (Abbildung 3.24). Zudem war die gelbe Farbe der DNA-Lösung nach der Abspaltung vom Trägermaterial mit Ammoniak ein deutliches Anzeichen für das Vorliegen von Iminen, gebildet aus NH_3 und dem vorhandenen Salicylaldehyd.

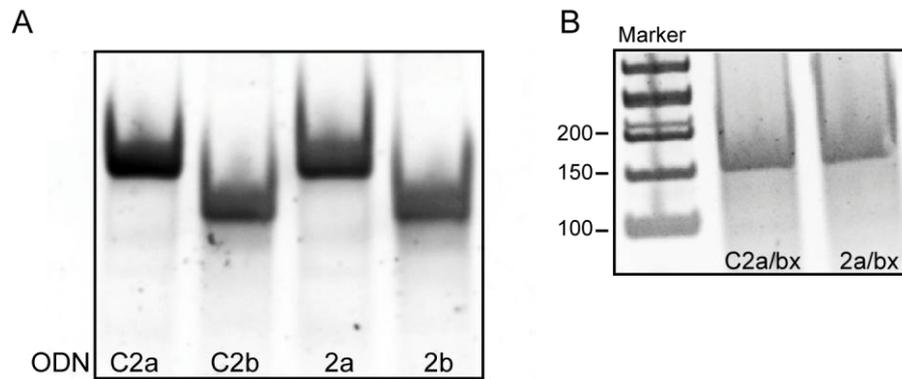


Abbildung 3.24: Gelelektrophorese A) der synthetisierten Stränge ODN2a und ODN2b (als Marker dienen die kommerziell erworbenen Stränge ODNC2a und ODNC2b) sowie B) der verlängerten Stränge ODN2a/bx und ODNC2a/bx.

Anschließend wurden die DNA-Stränge hybridisiert ($1 \mu\text{M}$) und durch Zugabe von $1 \text{ U KF}(\text{exo}^-)$ und $200 \mu\text{M}$ dNTP-Mix bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h verlängert. Die Verlängerung wurde mittels PAGE kontrolliert (Abbildung 3.24). Das so erhaltene 153 bp Templat wurde für den Einsatz in der PCR verdünnt.

3.2.2.2 Test verschiedener Polymerasen und annealing-Temperaturen

Verschiedene thermostabile Polymerasen wurden in einer PCR eingesetzt, um zu testen, welche geeignet ist, die PCR mit einem modifizierten DNA-Strang durchzuführen. Dafür wurden das verlängerte Templat ODN2a/bx, sowie zur Kontrolle das unmodifizierte Analogon in einer PCR mit verlängerten Zeiten (vgl. Kap. 3.2.2) eingesetzt.

Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten Polymerasen in einem PCR-Test.

Polymerase	Puffer	Ergebnis
Vent(exo^-)	Thermopol	kein Produkt
DeepVent(exo^-)	Thermopol	kein Produkt
Taq	Thermopol	kein Produkt
KOD XL	KOD XL-Puffer	schwache Produktbande
Phusion Hot Start	Phusion-Puffer	kein Produkt

Nur bei Verwendung der KOD XL (*Novagen*) konnte überhaupt eine Produktbande detektiert werden, so dass diese Polymerase, die unter anderem speziell für die

Verwendung modifizierter Triphosphate entwickelt wurde, in den weiteren Versuchen eingesetzt wurde.

Eine Variation der Hybridisierungstemperatur zwischen 42 °C, 52 °C und 62 °C zeigte keine Unterschiede im Ergebnis. Für die folgenden Untersuchungen wurde daher 42 °C als *annealing*-Temperatur gewählt.

3.2.2.3 Einfluss der Additive Ethylendiamin und CuSO_4 auf die PCR eines mit Salenbasenpaaren modifizierten Templats

Die PCR wurde nun mit KOD XL durchgeführt. Zur Kontrolle wurden verschiedene Reaktionsansätze untersucht. Um zu zeigen, dass eine Produktbande nicht vom eingesetzten Templatstrang resultiert, wurde ein Ansatz ohne Polymerase pipettiert. Ein weiterer Ansatz wurde ohne Zugabe von dSTP angesetzt. Eine Kontrolle mit unmodifiziertem Templatstrang (ODNC2a/bx) wurde ebenfalls untersucht. Die *annealing*-Temperatur betrug 42 °C. Die Zykluszeiten betragen 2 min (Denaturierung), 2 min (*annealing*) und 16 min (Verlängerung). Es wurden 40 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurden die einzelnen Reaktionen mittels PAGE analysiert. Die Detektion der DNA wurde durch Anfärben in einem SYBR Green I-Tauchbad ermöglicht (Abbildung 3.25).

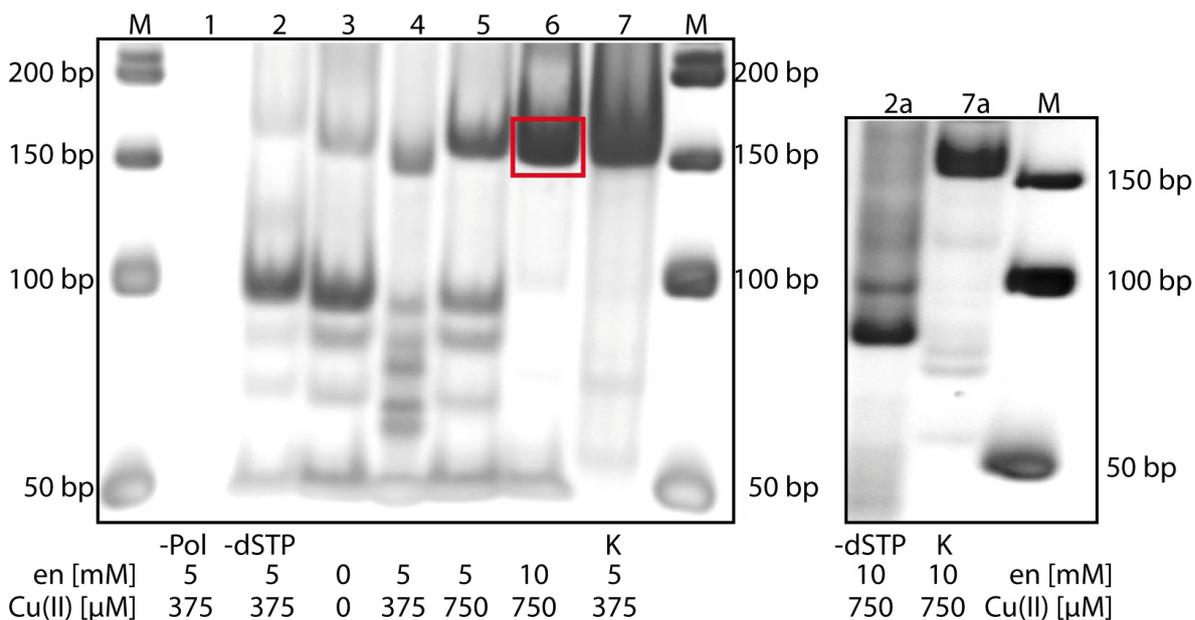


Abbildung 3.25: PCR-Experiment mit Templat ODN2a/bx; M: Marker (*GeneRuler™ Low Range DNA-Leiter*, Fermentas), Spur 1: keine Polymerase, Kontrolle der Amplifikation; Spur 2: ohne dSTP, Spur 3: kein Ethylendiamin, kein Cu^{2+} ; Spuren 4-6: ansteigende Cu^{2+} - und Ethylendiamin-Konzentrationen; Spur 7: Kontrolle mit unmodifizierter DNA (dG:dC statt dS:dS im Templat); Spuren 2a und 7a: Wiederholung von 2 bzw. 7 unter optimalen Additiv-Konzentrationen. Bedingungen: 0.1 mM pro dXTP (X = A, C, G, T, und S), 5–10 mM Ethylendiamin und 375–750 μM CuSO_4 , 1 μM pro Primer ODNP4 und ODNP5, 1 nM dsDNA (153mer, ODN2a/bx bzw. ODNC2a/bx) und 1 U KOD XL, verlängerter PCR-Zyklus siehe Abbildung 3.21.

Bei der Kontrollreaktion in Spur 1 sind keine Banden sichtbar, was beweist, dass eine Amplifikation stattfinden muss, damit die Nachweisgrenze überschritten wird. Fehlt das dSTP (Spur 2), so findet sich kaum korrekt verlängertes Produkt, lediglich ein kürzeres Amplikon bei etwa 100 bp ist sichtbar. Das gleiche Ergebnis erzielt man, wenn keine Additive der Reaktion zugesetzt werden (Spur 3). Nur eine sehr schwache Bande ist bei 150 bp sichtbar. Bei Zugabe von Ethylendiamin und CuSO_4 wird eine Produktbande deutlich sichtbar (Spur 4), die noch verstärkt wird, wenn man die Konzentration an Cu(II) erhöht (Spur 5). Bei zusätzlicher Erhöhung der Ethylendiamin-Konzentration scheinen die optimalen Reaktionsbedingungen erreicht zu sein (Spur 6). Es ist im Wesentlichen nur noch die Produktbande bei etwa 150 bp zu sehen. Sie entspricht dem Ergebnis der Kontrollreaktion in Spur 7. Die Reaktionen ohne dSTP und mit unmodifizierter DNA wurden zur Kontrolle erneut mit den optimierten Bedingungen durchgeführt (Spuren 2a und 7a), zeigten aber keine Unterschiede zu den vorher durchgeführten Ansätzen. Um zu zeigen, dass die PCR korrekt abläuft, sollte das

Amplikon genauer untersucht werden, um zu zeigen, dass auch dS vorhanden ist (vgl. Kap. 3.2.2.4).

3.2.2.4 Enzymatischer Verdau des PCR-Produkts mit Salenbasenpaaren

Würden während der PCR *mismatch*-Einbauten von natürlichen Nucleosiden gegenüber der Salicylaldehyde stattfinden, so wären diese Stränge nicht mehr modifiziert. Diese neu entstanden Stränge wären natürlich ein viel besseres Templat für die PCR und würden daher effizienter vermehrt. Daher ist zu überprüfen, ob das Salicylaldehydnucleosid auch nach 40 Zyklen noch in den Strängen vorhanden ist, was bei theoretisch 2^{40} Kopien ein Beweis für die korrekte Amplifizierung des dS:dS-Basenpaars in der PCR ist. Daher wurde das PCR-Produkt mittels LC-MS untersucht (Abbildung 3.26).

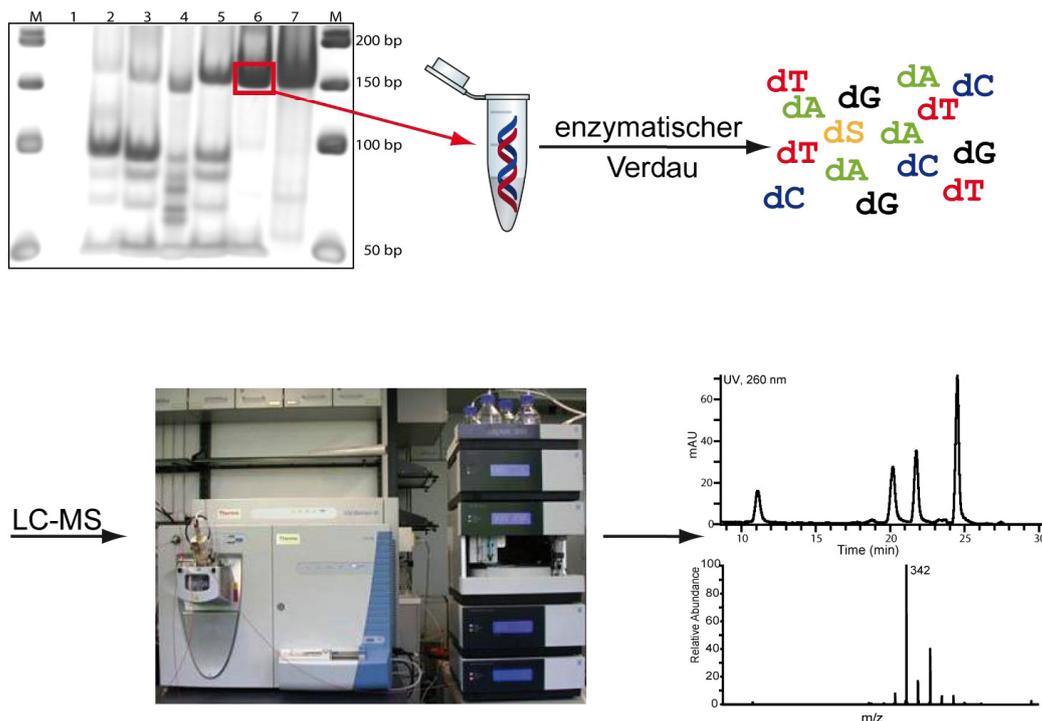


Abbildung 3.26: Enzymatischer Verdau des PCR-Produkts und anschließende LC-MS zur Charakterisierung.

Das entsprechende Amplikon aus der PCR wurde aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die DNA durch Waschen mit Wasser aus dem Gel extrahiert. Die Lösung wurde entsalzt und anschließend die DNA enzymatisch totalverdaut.

Dazu wurde die DNA mit Verdau-Puffer A und Nuklease für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Verdau-Puffer B, *Antarctic Phosphatase* und *Snake Venom Phosphodiesterase I* zugegeben und die Lösung wurde weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der totalverdauten DNA erfolgte über FT-ICR-HPLC-MS. Das Eluat wurde bei 260 nm überwacht und die Massen mit einer *Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL* bestimmt (Abbildung 3.27 A). Zur Kontrolle wurde Salicylaldehydnukleosid dS analysiert (Abbildung 3.27 B).

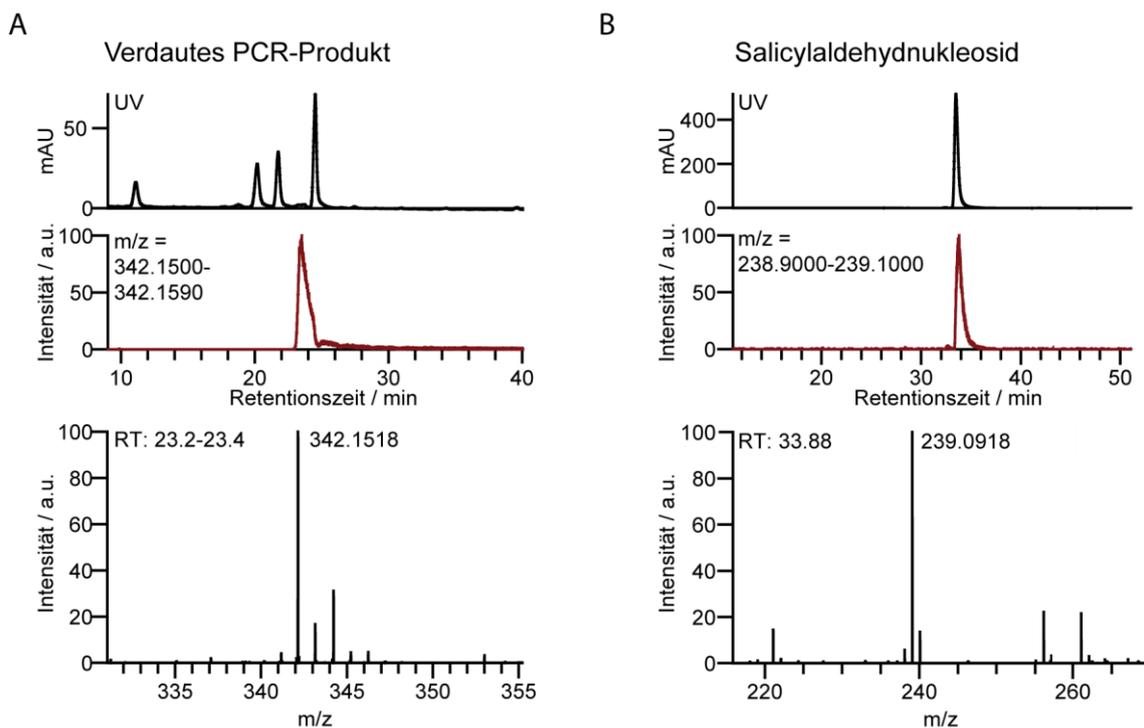
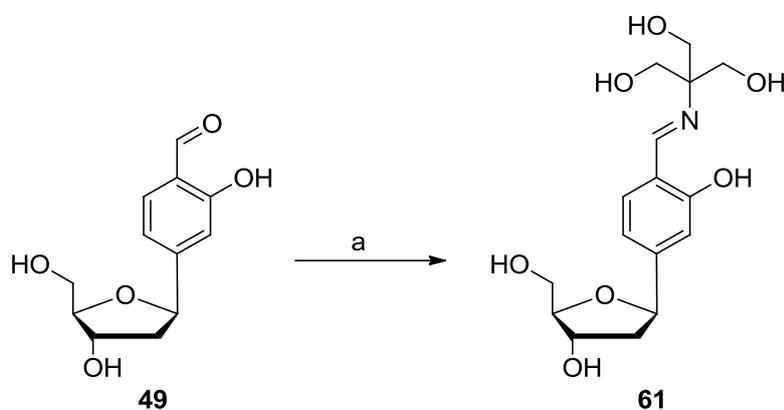


Abbildung 3.27: LC-MS-Analyse des verdauten PCR Produkts (A) im Vergleich mit dS (B). Oben: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm; Mitte: Ionenspektrum bei entsprechendem Massefilter; unten: ESI-MS-Spektrum bei entsprechender Retentionszeit.

Das erhaltene UV-Chromatogramm (Abbildung 3.27 A) zeigte vier starke Signale, die den natürlichen Nucleosiden dA, dC, dG und dT zugeordnet werden konnten (vgl. Kap. 5.2.4). Außerdem war ein weiteres Signal bei einer Retentionszeit von 23-24 min sichtbar, dessen Absorptionsspektrum ebenfalls einem Nucleosid entsprach. Allerdings war die gefundene Masse von $m/z = 342.1518 \text{ g mol}^{-1}$ (Abbildung 3.27 A unten) höher als die des erwarteten dS ($m/z = 239.0918 \text{ g mol}^{-1}$, Abbildung 3.27 B unten) und auch die Retentionszeit von etwa 23 min (Mitte) stimmte nicht mit der des dS (34 min) überein.

Wurde allerdings ein unter Verdaubedingungen behandeltes dS analysiert (Abbildung 3.28 A), so zeigte sich ein zusätzliches Signal, bei der im DNA-Verdau gefundenen Retentionszeit (23 min, Abbildung 3.28 A oben) mit einer Masse von $342.1559 \text{ g mol}^{-1}$, die auch im Verdau des PCR-Produkts gefunden wurde (Abbildung 3.27 A unten). Bei genauerem Betrachten der Verdaubedingungen fiel das Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ins Auge, das als Amin mit dem Aldehyd des dS ein Imin bilden kann. Das so vorliegende Tris-Addukt hat die korrekte Molekülmasse. Zur Sicherheit wurde das Imin nachsynthetisiert und mittels LC-MS analysiert.



Schema 3.7: Synthese des Tris-Imin des Salicylaldehydnucleosids **61**. a) Tris, MeOH, RT, 2 h.

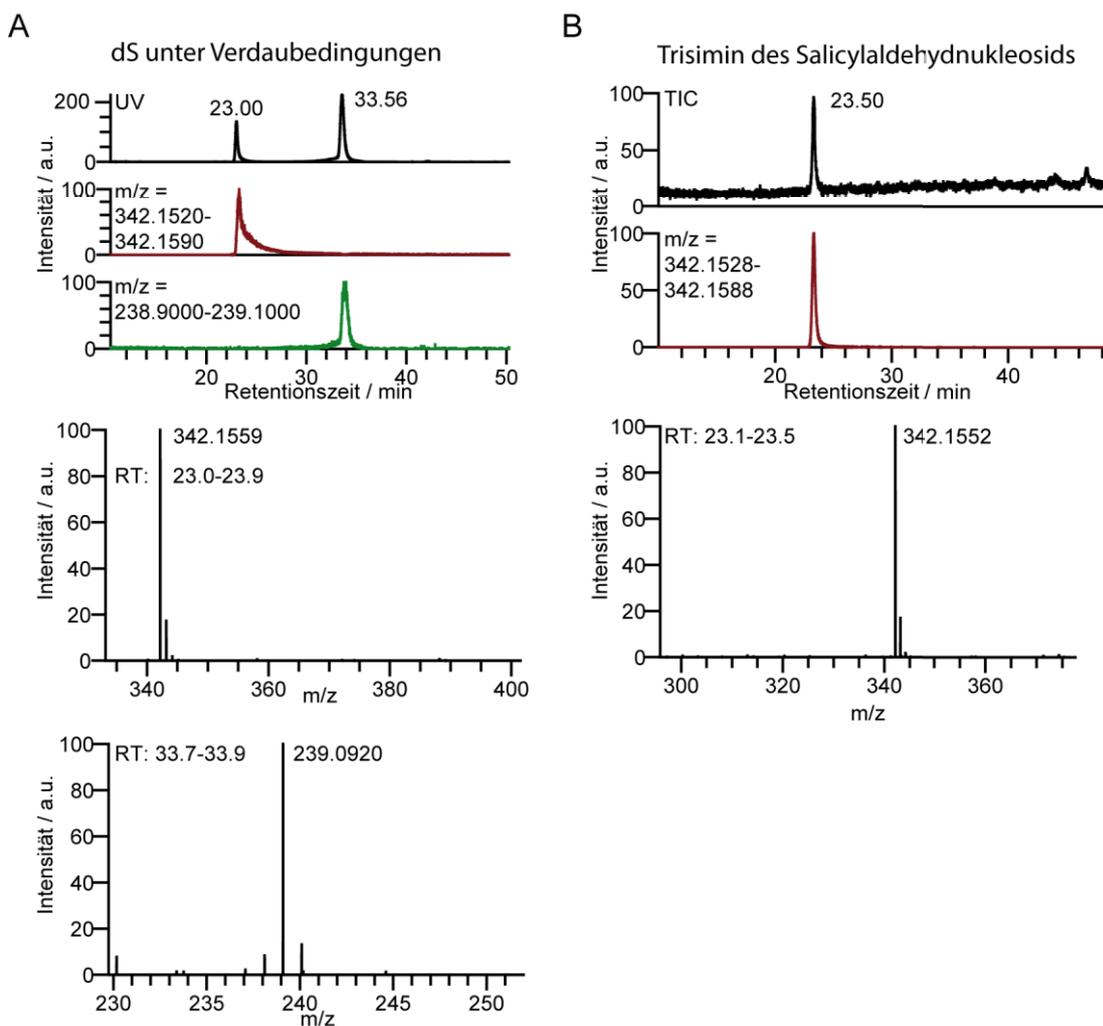


Abbildung 3.28: LC-MS-Analyse des dS unter Verdaubedingungen (A) und des Trisaddukt **61** (B). Oben: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm (A) bzw. totaler Ionenstrom (B); Mitte: Ionenstrom bei entsprechendem Massefilter; unten: ESI-MS-Spektrum bei entsprechender Retentionszeit.

Es zeigte sich, dass es sich bei dem zusätzlichen Signal im Verdau des PCR-Produkts (Abbildung 3.27) um das Tris-Imin des Salicylaldehyds **60** handelte, das durch die Iminbildung des Nucleosid mit der Pufferkomponente Tris entstanden war. Zum Vergleich wurde das Tris-Addukt synthetisiert und der HPLC-MS unterzogen. Die Retentionszeit und die Masse stimmten überein.

Zur Auswertung der LC-MS des PCR-Produkts wurden die Flächen unter dem HPLC-Chromatogramm integriert, wobei die exakten Retentionszeiten (Integrationsgrenzen) mit Hilfe eines Massenfilters auf dem totalen Ionenstrom (*total ion current*, TIC) bestimmt wurden. Die Integrale der UV-Signale der einzelnen Nucleoside (in eckigen Klammern) wurden mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten bei 260 nm korrigiert.^[111] Die Normierung erfolgte auf die

dS-Basen. Zum Vergleich sind die theoretisch berechneten Werte angegeben (Abbildung 3.29).

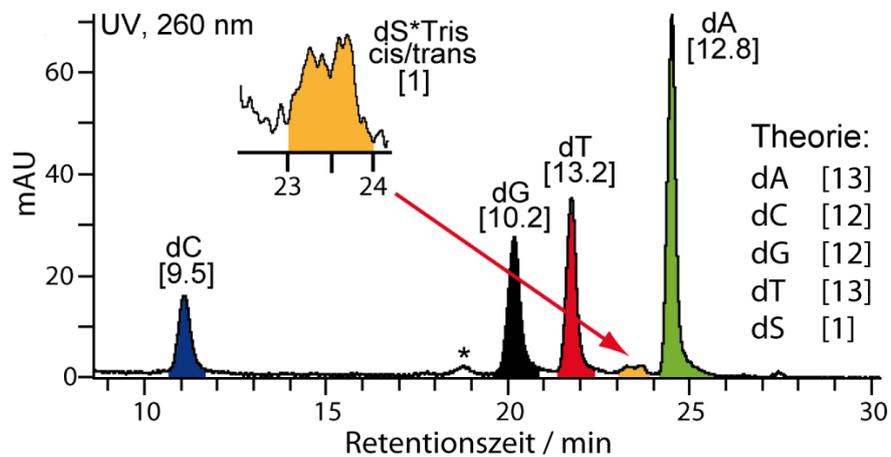


Abbildung 3.29: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm des verdauten PCR mit Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Nucleosiden.

Die theoretischen und experimentell ermittelten Werte stimmen gut überein. Für das dS wurden zwei Signale erhalten, allerdings wurde im Massenspektrum für beide der gleiche Wert gefunden. Die zwei Signale sind vermutlich auf die *cis/trans*-Isomere des Imins zurückzuführen. Die PCR hat demnach die modifizierten Templatstränge korrekt amplifiziert.

3.3 Co-Kristallstrukturen der *high-fidelity* Polymerase Bst Pol I mit Salicylaldehyd-modifizierter DNA

Vor allem um die exakte Geometrie des Salen-Basenpaars in der DNA nachzuweisen, war es ein Hauptanliegen, Kristallstrukturen modifizierter DNA-Stränge zu erhalten.

Prinzipiell sind bis heute nur wenige Strukturen mit Metall-Basenpaaren bekannt. 2001 gelang es *Atwell et al.* eine Struktur des dDipic-Cu(II)-dPy-Basenpaar (**34**, **35**, Abbildung 1.17) modifizierten Oligonukleotids zu lösen und zu zeigen, dass das Metallion, wie angenommen, mittig zwischen den modifizierten Basen sitzt und den Duplex über koordinative Bindungen verknüpft.^[56] Zwei weitere NMR-Strukturen von Metallbasen in DNA^[83] sowie in RNA,^[72] wurden von *Johanssen et al.* veröffentlicht.

Um den enzymatischen Einbau des dSTP gegenüber dem Salen zu verfolgen, muss das Basenpaar im Komplex mit einer Polymerase kristallisiert werden. Ferner kristallisieren reine DNA-Kristalle manchmal nur schwer, sind oftmals zu klein zur Datenmessung oder streuen nur mit schlechter Auflösung,^[3] so dass die Co-Kristallisation der DNA mit einer Polymerase diese Probleme umgehen kann.

Hier wird nun die erste Co-Kristallstruktur eines mit Metallbasenpaar modifizierten Oligonukleotids in Komplex mit einer Polymerase gezeigt.

Interessant ist es, das Metallbasenpaar und seine Vorläufer in verschiedenen Situationen zu kristallisieren:

- A. Salicylaldehydbase des Templats in der Präinsertionsstelle (Prä-IS)
- B. dSTP paart mit Salicylaldehydbase im aktiven Zentrum (IS)
- C. Basenpaar in der Postinsertionstelle (n-1)
- D. Basenpaar im Doppelstrang

Die einzelnen Positionen sind in Abbildung 3.30 veranschaulicht. Eine genauere Erklärung des Mechanismus zum Einbau eines Basenpaars mit der Polymerase Bst Pol I ist in Kap. 3.3.4 gegeben.

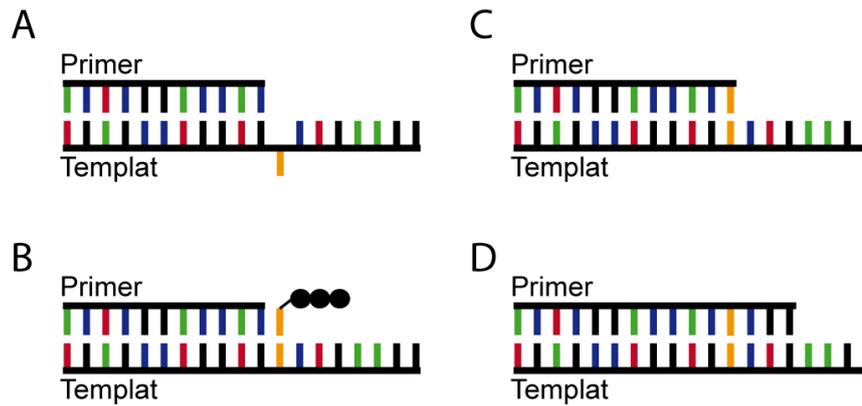


Abbildung 3.30: Schematische Übersicht über die verschiedenen Zustände während des enzymatischen Einbaus eines Basenpaares.

3.3.1 Synthese der modifizierten DNA-Stränge

Neben den modifizierten Templatsträngen für Kristallisationsexperimente, deren Synthese analog zu Kap. 3.2.1.1 durchgeführt wurde, war auch die Verwendung spezieller Primerstränge mit 3'-Modifikationen für einige Ansätze nötig.

Um eine Kristallisation von einer Polymerase mit der Salicylaldehyd-Base und dem angelagerten dSTP im aktiven Zentrum zu erhalten (vgl. Abbildung 3.30 B), war es nötig einen Primer mit einem Didesoxy-Ende zu verwenden, um Polynukleotidsynthese im Kristall zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde die reverse DNA-Festphasensynthese (5'→3') durchgeführt, um am 3'-Ende des zu synthetisierenden Primers ein Didesoxy-Nukleotid zu positionieren. Es wurde ein 10mer-Primer (ODNK1b) mit der Sequenz 5'-GCC TGA CTC G_{dd} -3' synthetisiert, welcher komplementär zum modifizierten DNA-Templat ODNK1a ist. Das Hybridisierungsprodukt aus beiden Strängen wurde in Kristallisationsversuchen mit Bst Pol I eingesetzt (vgl. Kap. 3.3.4.1)

Um das gebildete Salenbasenpaar im aktiven Zentrum der Polymerase zu zeigen (vgl. Abbildung 3.30 C), war es notwendig einen DNA-Primer-Strang mit einer S-Base am 3'-Ende zu synthetisieren, die wurde über Standardfestphasensynthese unter Verwendung eines *universal supports* erreicht (ODNK1c). Im Gegensatz zum üblichen Verfahren wurde also Trägermaterial ohne erste Base eingesetzt.

Die verschiedenen Sequenzen, die zur Kristallisation des Salen-Basenpaar in unterschiedlichen Situationen nötig waren, sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Übersicht über die zur Kristallisation verwendeten DNA-Stränge

Name	Sequenz 5'→3'	Länge	M _{ber.} / gmol ⁻¹	M _{gef.} / gmol ⁻¹
K1a	CAT SCG AGT CAG GCT	15mer	4562	4562
K1b	GCC TGA CTC G_{dd}	10mer	2987	2987
K1c	GCC TGA CTC GS	11mer	3303	3304
K2a	ATG CGA CCS TCC CT	14mer	4169	4170
K2b	AGG GAS GGT C	10mer	3102	3101
K3a	AGG GSS GGT C	10mer	3090	3090
K3b	ATG CGA CCS SCC CT	14mer	4165	4167
K4a	GGG STS GGT C	10mer	3081	3081
K4b	AGT CGA CCS ASC CC	14mer	4174	4174
K4c	AGT CGA CCS TSC CC	14mer	4165	4166

3.3.2 Expression und Aufreinigung von Bst Pol I

Für die Untersuchungen wurde das große Fragment (*large fragment*, LF) der DNA Polymerase I des thermostabilen Stamms *Geobacillus stearothermophilus* (Wildtyp) verwendet. Die entsprechenden Sequenzen wurden in den Expressionsvektor pDEST007^[112] kloniert und der Vektor in *E. coli* transformiert. Um einen ternären Komplex aus Protein, DNA und ankommenden dSTP zu kristallisieren, wurde bei der Bst Pol I Asp-329 zu Alanin mutiert (D329 Mutante), um Kristallkontakte zu reduzieren und so die geschlossene Konformation der Polymerase zu stabilisieren.^[113] Die Plasmide für Wildtyp und Mutante wurde freundlicherweise von *M. Müller* zur Verfügung gestellt.

Bst Pol I wurde in *E. coli* überproduziert. Nach erfolgter Zellyse wurde das Protein mittels einer Strep-Tactin-Säule aufgereinigt (Abbildung 3.31 A). Die gesammelten, Protein-enthaltenden Fraktionen wurden auf Heparin-Puffer A umgepuffert, der Strep-Tag wurde mittels AcTEV-Protease abgespalten und anschließend wurde die anhaftende DNA mittels einer HiTrap Heparinsäule entfernt (Abbildung 3.31 B). Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt, auf 8-10 mg/mL aufkonzentriert, in den Kristallisationspuffer umgepuffert und entweder sofort verwendet oder bei -80 °C gelagert.

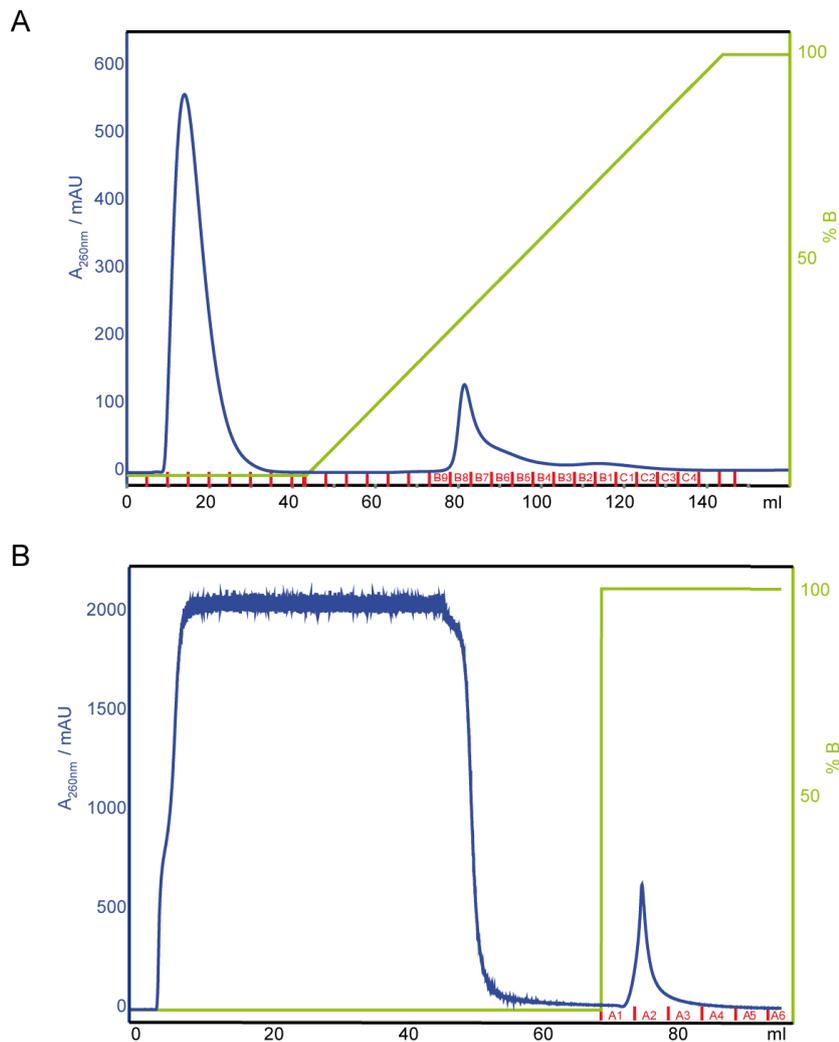


Abbildung 3.31: Aufreinigung der Bst Pol I; A) Chromatogramm der Strep-Tag-Reinigung. Die zur weiteren Aufreinigung geeigneten Fraktionen waren B7 bis B4 von der Schulter des zweiten Peaks. B) Chromatogramm der Heparin-Affinitätssäule. Das Protein war in den Fraktionen A1 und A2. Blau: Absorption bei 280 nm, grün: Puffergradient.

3.3.3 Kristallisation der modifizierten DNA-Stränge im Komplex mit Bst Pol I

Die Kristallisationsbedingungen wurden in Anlehnung an bereits veröffentlichte Kristallisationsansätze mit Bst. Pol I gewählt.^[113, 114] Kristallisation erfolgte mittels der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen (*hanging drop vapour diffusion*), bei der eine DNA/Protein-Mischung als Tropfen auf einem Deckglas über einer Reservoirlösung sitzt (Abbildung 3.32 A). Die Keimbildungszone wird durch Equilibrierung des Tropfens gegen das größere Reservoir mit höherer Konzentra-

tion des Fällungsmittels erreicht. Nach 10 bis 60 Tagen bei 18 °C erhielt man messbare Kristalle (Abbildung 3.32 B).

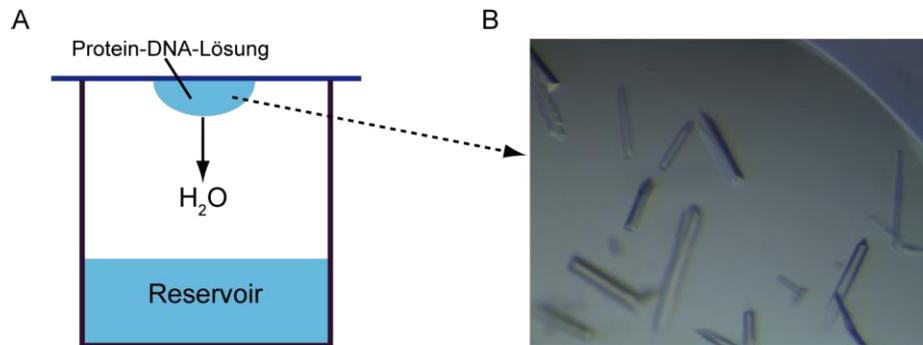


Abbildung 3.32: A) Schematische Darstellung der *hanging drop vapour diffusion*-Methode. B) Kristalle eines Bst Pol I/DNA-Komplexes.

Um den Polymerase-DNA-Komplex zu erhalten, wurde das Protein (10 mg/mL) mit der DNA/dSTP-Lösung im Verhältnis 1 : 1 und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Kristalle wuchsen mittels *hanging drop vapour diffusion* in 42-44 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5-3.5 % 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) und 0.1 M MES-Puffer in 10 bis 60 Tagen. Die Kristallstrukturlösung erfolgte über molekularen Ersatz (*molecular replacement*). Die Raumgruppe war bei allen folgenden Strukturen $P2_12_12_1$. Die Details zur Datensammlung^[115] und Strukturlösung sowie Verfeinerung^[116] sind in Kap. 5.2.5.3 zu finden.

3.3.4 Kristallstrukturen

Durch bereits veröffentlichte Strukturen der Bst Pol I in Komplex mit DNA ist bekannt, dass die DNA während der Replikation durch fünf wichtige Bindungszentren der Polymerase geführt wird.^[113]

Vor dem Einbau liegt das ungepaarte Templatnukleotid zunächst in der Präinsertionsstelle (PräIS) und das Enzym nimmt die offene Konformation ein. Die Nukleobase wird von einer Enzymkavität aufgenommen, die durch die beiden Helices O und O1 gebildet wird. Ist ein passendes dNTP anwesend, schließt sich das Enzym und die Templatbase wird an die Insertionsstelle (IS) gebunden. Diese Insertionsstelle ist nur dann vollständig ausgebildet, wenn in der geschlossenen Enzymkonformation der Daumen in Richtung der Finger bewegt wird und so eine

Watson-Crick-Basenpaarung beider Nukleotide sichergestellt wird. Im katalytischen Zentrum nahe der Insertionsstelle kann die Triphosphatgruppe des dNTPs durch zwei Mg-Ionen koordiniert werden, wodurch ein nukleophiler Angriff möglich wird. Nach dem Einbau der Base und Abspaltung von Pyrophosphat öffnet sich das Enzym wieder, und das neu entstandene Basenpaar wird an die Postinsertionsstelle (PostIS) geführt. Sie bindet das 3'-Ende des Primers und das gegenüberliegende Templatnukleosid. Nach einem weiteren Verlängerungsschritt wird das vorher gebildete Basenpaar in den DNA-Duplexbindungsereich transportiert. Er bindet ein vier Basenpaare langes Segment der DNA mit den Positionen $n-2$ bis $n-5$. Die treibende Kraft der Primerverlängerung ist die Spaltung des Triphosphats. Abbildung 3.33 fasst den Replikationsvorgang von Bst Pol I zusammen.^[113, 117]

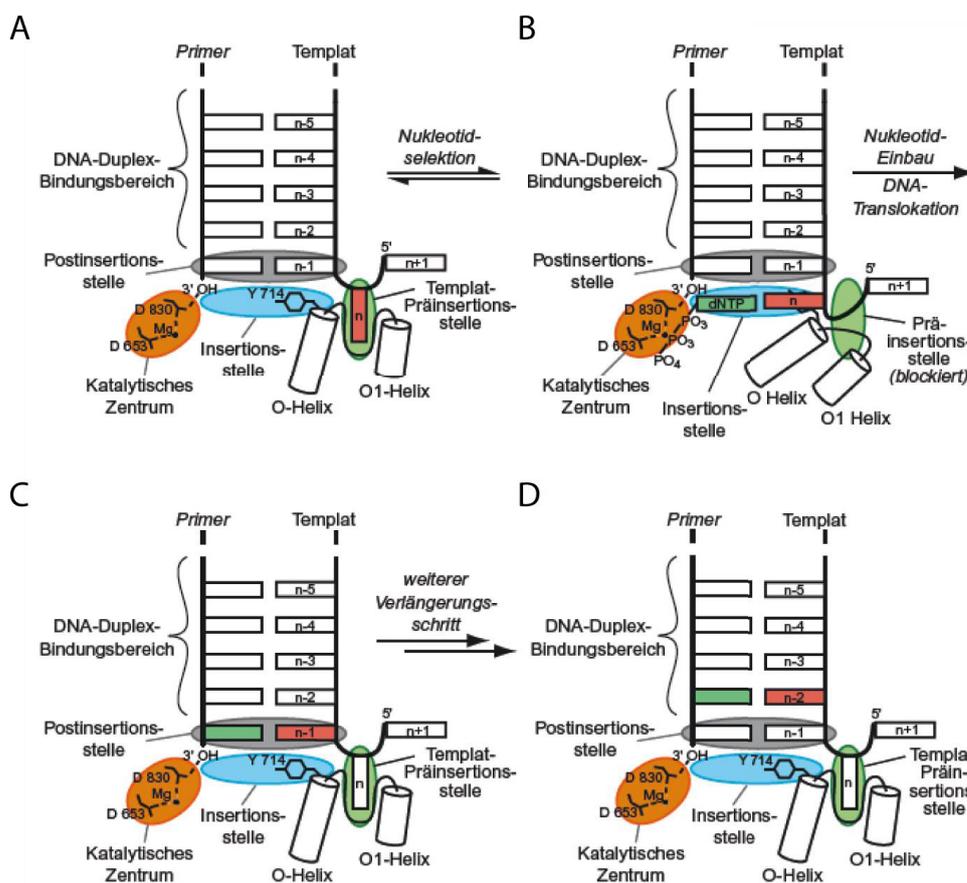


Abbildung 3.33:^[117] Replikation eines DNA-Strangs durch Polymerase I. A) Abzulesende Base (rot) ist zunächst an der PräIS (Position n). Die Polymerase liegt in der offenen Konformation vor. B) Das Enzym nimmt die geschlossene Konformation an, dadurch wird das aktive Zentrum definiert und ein Nukleosidtriphosphat (grün) selektiert. C) Durch Konformationsänderung zurück in die offene Konformation wird der Schaden an die Postinsertionsstelle ($n-1$) transportiert. D) Ein weiterer Zyklus bringt das Basenpaar an die $n-2$ -Position.

3.3.4.1 Salicylaldehydbase in der Prä-insertionsstelle der Polymerase

Zu Beginn wurden die Stränge ODNK1a und ODNK1b hybridisiert, so dass man eine Duplexregion aus 9 Basen erhielt, mit einem 5'-Einzelstrangtemplatüberhang (4 Basen) und einem Einzelnukleotid-Überhang am 3'-Ende des Templats. Ziel war ursprünglich, einen ternären Komplex mit Polymerase, DNA und ankommendem Triphosphat zu erhalten, weshalb neben 10 mM Ethylendiamin und 3 mM CuSO₄ zusätzlich 2-10 mM dSTP zugegeben wurden. Es wurde die Proteinmutante verwendet.

Es zeigte sich allerdings, dass nicht der gewünschte ternäre Komplex kristallisierte, sondern aus den Kristallen von Bst Pol I mit dem DNA-Duplex ODNK1a/b wurde eine Struktur der Salicylaldehyd-Base des Templatstrangs in der Prä-Insertionsstelle (PräIS) der Polymerase erhalten. Die Auflösung lag im Bereich von 46.04–3.05 Å. Tyrosin 714 schließt die Insertionsstelle (IS) nach dem letzten ausgebildeten Basenpaar und dS wird in der PräIS stabilisiert. Eine Überlagerung der erhaltenen Struktur mit einer kanonischen dT-Templatbase^[113] zeigt, dass die strukturellen Änderungen durch den modifizierten DNA-Strang vernachlässigbar sind (Abbildung 3.34).

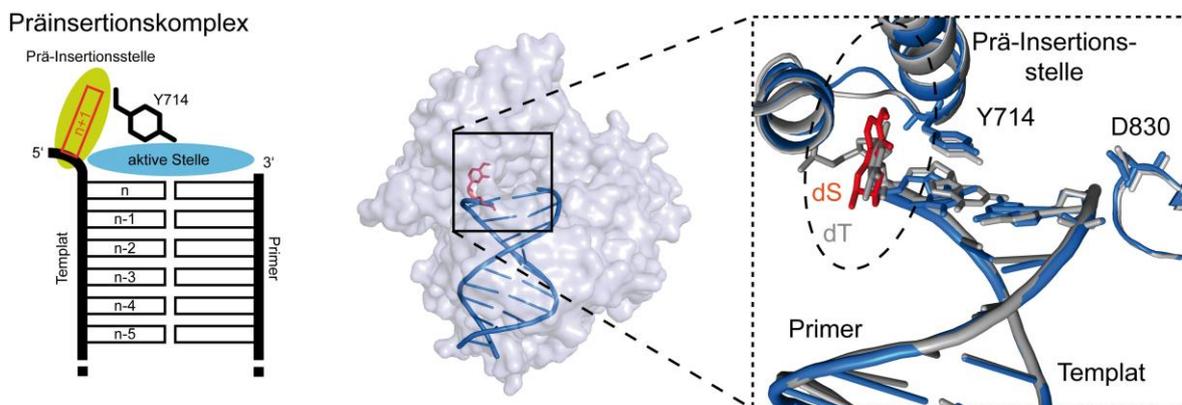


Abbildung 3.34: Kristallstruktur von Bst Pol I mit einem modifizierten DNA-Strang. Die Salicylaldehydbase sitzt in der PräIS der Polymerase. Rechts: Überlagerung der erhaltenen Struktur mit einer natürlichen DNA, bei der eine dT-Base in der PräIS^[113] sitzt.

3.3.4.2 Nichtpaarende Salicylaldehyd-Basen

Nach dem Hybridisieren der Stränge ODNK2a und ODNK2b erhielt man eine doppelsträngige Region aus 10 Basen und einen 5'-Einzelstrangtemplatüberhang

aus 4 Basen. Es ist kein 3'-Überhang vorhanden. Zum Einsatz kam das Wildtyp-Protein. Die Auflösung lag zwischen 50.0 und 2.3 Å.

Es waren weder Ethylendiamin noch Manganionen im Kristall vorhanden, obwohl diese (10 mM Ethylendiamin und 3 mM MnSO_4) zusätzlich in die Lösung zur Hybridisierung gegeben wurden. Die Strukturlösung erfolgte also für ein nicht-paarendes Salicylaldehyd-Basenpaar. Die vorliegende Struktur bestätigte jedoch, dass zwischen den beiden Salicylaldehyde keine produktiven Wechselwirkungen stattfinden und für eine effektive Basenpaarung die Ausbildung des vollständigen Salen-Metall-Komplexes nötig ist. Im Gegensatz zu den nicht-natürlichen Basenpaaren, die auf hydrophoben Wechselwirkungen und π -stacking beruhen,^[4, 118] findet hier keine Überlappung der aromatischen Ringe der modifizierten Basen statt.

Salicylaldehyd-Basenpaar

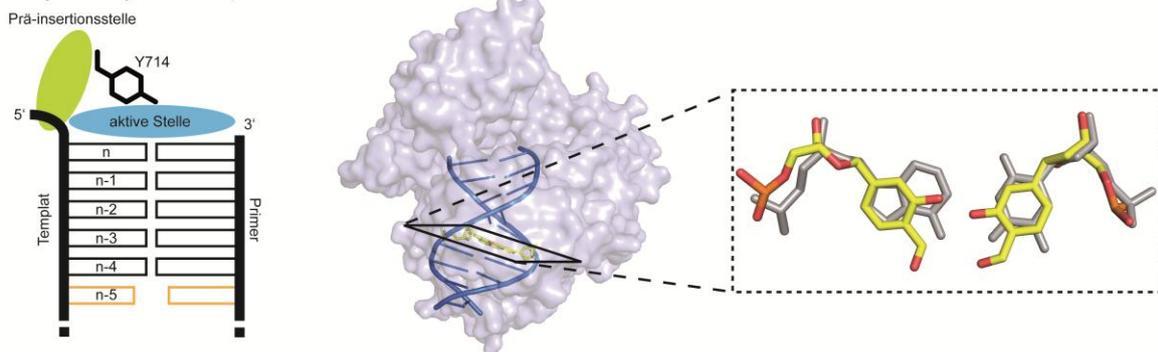


Abbildung 3.35: Kristallstruktur von Bst Pol I mit einem modifizierten DNA-Strang. Im doppelsträngigen Bereich sitzen zwei Salicylaldehyd-Basen ohne Wechselwirkung gegenüber. Rechts: Überlagerung der erhaltenen Struktur mit einem dA:dT-Basenpaar.^[113]

3.3.4.3 Struktur des Salenbasenpaar in einem DNA-Polymerase-Komplex

Wird der oben eingesetzte Doppelstrang ODNK2a/b in Gegenwart von 10 mM Ethylendiamin und 3 mM CuSO_4 mit dem Wildtyp-Protein inkubiert, erhielt man Protein-DNA-Kristalle mit einer Auflösung von 93.47–2.22 Å.

Das vollständig ausgebildete Salenbasenpaar war gut aufgelöst und zeigte, dass die beiden Basenpaare durch das eine kovalente Brücke miteinander verbunden waren (*crosslink*). Zudem war das Cu(II) -Ion deutlich sichtbar (Abbildung 3.36). Der Nachweis, dass tatsächlich Cu^{2+} in der Struktur vorlag, erfolgte durch anormale Röntgenbeugung an der Absorptionskante von Cu(II) bei 1.3785 Å

(Abbildung 3.37). Die Abstände der C1'-Atome innerhalb des Salenbasenpaares liegen mit 11.4 Å sehr nahe am Abstand der entsprechenden Atome in einem dA:dT-Basenpaar (10.4 Å, Abbildung 3.36).

Kupfer-Salen-Basenpaar

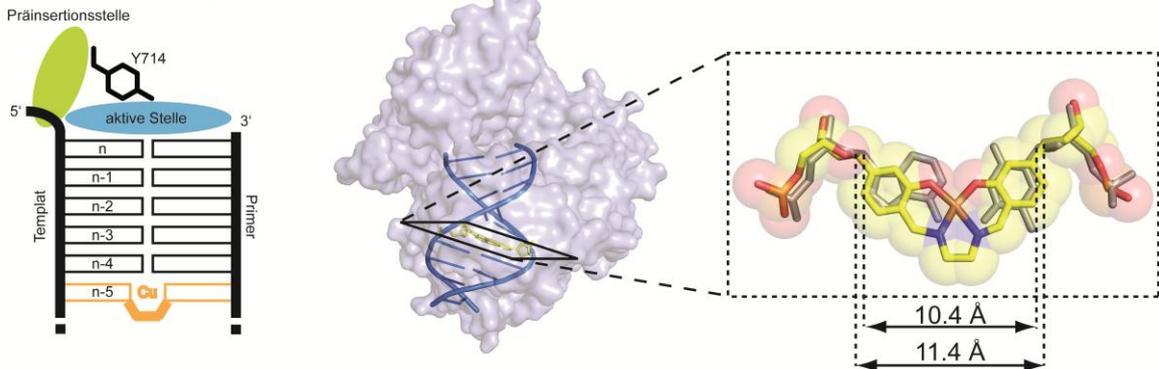


Abbildung 3.36: Kristallstruktur von Bst Pol I mit einem modifizierten DNA-Strang. Im doppelsträngigen Bereich sitzt ein vollständig ausgebildetes Kupfer-Salenbasenpaar, dessen attraktive Wechselwirkungen auf einer Kombination von kovalenten (Etylendiamin-Brücke) und koordinativen Bindungen (Komplexierung von Cu-Ion) beruht. Rechts: Überlagerung der erhaltenen Struktur mit einer dA:dT-Basenpaar mit Angabe der zugehörigen C1'-Abstände.^[113]

Bei Drehung der Struktur kann man ferner erkennen, dass das Salenbasenpaar sehr flach ist, wobei die Konformation des DNA-Strangs durch das Salenbasenpaar nicht gestört wurde (Abbildung 3.37). Zudem wurden neben den Salenatomen, die als vierzähliger Chelatligand eine quadratisch-planare Koordinationsumgebung für das Cu(II) schaffen, keine axialen Liganden gefunden. Dies entspricht den Literaturdaten, in denen Cu(II)-Salenkomplexe ebenfalls eine quadratisch-planare Geometrie zeigen.^[119-123]

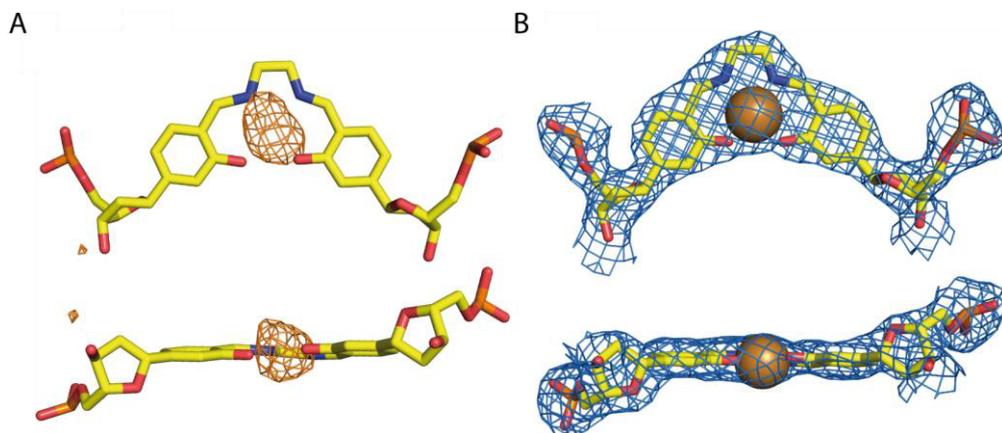


Abbildung 3.37: A) Anormale Differenzelektronendichtekarte des Kupfers bei 3σ konturiert; B) $2F_o-DF_c$ Elektronendichtekarte des Salenbasenpaares konturiert bei 1σ .

3.3.4.4 Weitere Kristallisationsansätze

Neben den erhaltenen Strukturen wurden einige weitere Kristallisationsansätze durchgeführt, die bisher nicht erfolgreich zu Strukturen geführt haben. Die Versuche sind der Vollständigkeit wegen übersichtlich in Tabelle 3.4 angegeben.

Tabelle 3.4: Übersicht über zusätzlich durchgeführte Kristallisationsansätze

Stränge	Sequenz	Additive	Ziel	Ergebnis
ODNK1a/b	TCGGACTGAGC ST AC GCCTGACTCG _{dd}	dSTP, en, Cu(II)	dSTP ggü. dS in IS	keine Kristalle
ODNK1a/b	TCGGACTGAGC ST AC GCCTGACTCG _{dd}	dSTP	dSTP ggü. dS in IS	dS in Prä-IS
ODNK1a/c	TCGGACTGAGC ST AC GCCTGACTCG S	dSTP, en, Cu(II)	dS-dS in Post-IS	Basenpaar außerhalb der aktiven Tasche oder DNA nicht geordnet
ODNK3a/b	TCCC SS CCAGCGTA AGGG SS CTGG	en, Cu(II)	2 Cu(II)-Salenbasenpaare direkt nebeneinander	DNA nicht aufgelöst
ODNK4a/b	CCC SAS CCAGCTGA GGG STS GGTC	en, Cu(II)	2 Cu(II)-Salenbasenpaare getrennt durch dA:dT- Basenpaar	DNA nicht aufgelöst
ODNK4a/c	CCC STS CCAGCTGA GGG STS GGTC	en, Cu(II), Hg(II)	2 Cu(II)-Salenbasenpaare getrennt durch dT-Hg-dT- Basenpaar	Probleme durch Niederschlag von Hg(0), keine Kristalle

Ebenso konnten bisher keine Strukturen mit Mangan-Ionen anstelle von Cu(II) erhalten werden. Kristalle unter Zugabe von MnSO₄ in die Reaktionslösung hatten das Metallion in keinem Fall in der Struktur eingebaut. Es wurden nur freie Salicylaldehyde gefunden (siehe Kap.3.3.4.2).

3.4 AFM-Experimente zur mechanischen Stabilität von DNA mit Metall-Salicylaldehydbasenpaar

Will man molekulare Strukturen mit DNA designen, ist vor allem auch die Stabilität der DNA wichtig. Dabei ist nicht nur die Stabilität gegen thermische Einflüsse von Bedeutung, sondern auch die Widerstandsfähigkeit gegenüber externen Kräften spielt eine wichtige Rolle. Die thermische Stabilität einer mit Salicylaldehyden modifizierten DNA und auch eines ausgebildeten Salenbasenpaars zeigte bereits *G. Clever*. Er stellte fest, dass in einem bestimmten Sequenzkontext der Schmelzpunkt des DNA-Strangs durch Ausbildung des Salenbasenpaars um 40 °C steigt.^[75] Ohne die kovalente Verbrückung war immerhin noch eine Erhöhung von 15 °C allein durch die koordinativen Bindungen zum Kupferion festzustellen.^[3]

In Zusammenarbeit mit den Physikern der Arbeitsgruppe von *Prof. H. Gaub* wurde die mechanische Stabilität der modifizierten DNA mit Hilfe der Einzelmolekülkraftspektroskopie unter Verwendung eines AFM (Rasterkraftmikroskop)^[124] untersucht.^[125]

Zum Einsatz im AFM war die Synthese speziell modifizierter Stränge notwendig. Die DNA-Stränge wurden so synthetisiert, dass sich ein 20 bp langer doppelsträngiger Bereich ausbilden kann, in dessen Mitte ein Salicylaldehydbasenpaar sitzt. Zudem wurden am 5'-Ende zehn dT-Basen als Abstandshalter eingebaut. Nach Kupplung der letzten dT-Base erfolgte der Einbau einer Thiolgruppe, die über einen C6-Linker an das Phosphatrückgrat der DNA gebunden wurde. Diese Modifizierung erfolgte ebenfalls am DNA-Synthesizer an der festen Phase. Nach den Entschützungen und der Abspaltung vom Trägermaterial (vgl. Kap. 3.2.1.1) wurden die DNA-Stränge über rp-HPLC aufgereinigt und anschließend entsalzt. Man erhielt die Stränge ODNP1a und ODNP1b (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Sequenzen der für AFM-Messungen verwendeten DNA-Stränge sowie Vergleich der theoretischen und gemessenen Massen

Name	Sequenz 5'→3'	Länge	M _{ber.} / g mol ⁻¹	M _{gef.} / g mol ⁻¹
P1a	HS-C ₆ - TTT TTT TTT TCG TTG GTG CSG ATA TCT CGG	30mer	9517	9523
P1b	HS-C ₆ - TTT TTT TTT TCC GAG ATA TCS GCA CCA ACG	30mer	9433	9440

Untersucht wurden zwei Systeme, die oben genannten Stränge ohne Additive, in denen sich also zwei Salicylaldehyde ohne Wechselwirkung gegenüberstehen, sowie das System bei Anwesenheit von Cu(II). Dabei spielen die koordinativen Wechselwirkungen zwischen den beiden Nucleobasen und dem Metallion eine große Rolle. Es wurden keine Versuche unter Zugabe von Ethylendiamin durchgeführt, da dieses nicht mit dem Messpuffer am AFM kompatibel war.

3.4.1 Thermodynamische Studien

Zur Bestimmung von ΔG^0 wurden Schmelzkurven von ODNP1a/b bei verschiedenen DNA-Konzentrationen durchgeführt. Für jede Konzentration wurden zwei komplette Aufheiz- sowie Abkühlkurven bei einer Absorption von 260 nm aufgenommen, die entsprechenden Kurven wurden gemittelt und der Untergrund durch Subtraktion der Absorption bei 400 nm berücksichtigt. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 3.38 gezeigt.

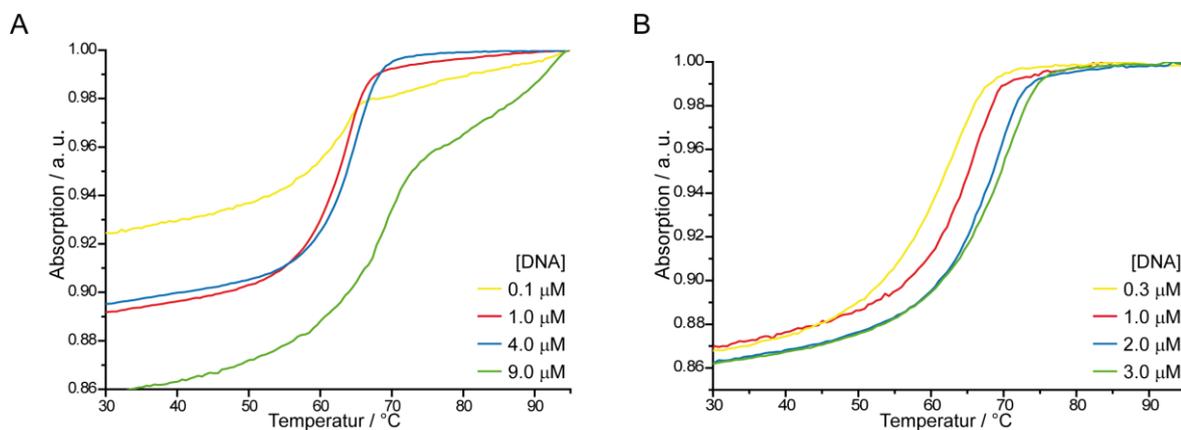


Abbildung 3.38: Schmelzkurven bei verschiedenen Konzentrationen von ODNP1a/b A) ohne Cu(II) und B) mit Zugabe von 1.4 äq Cu(II).

Die gezeigten Schmelzkurven sind normiert. Die Schmelzpunkte der DNA wurden durch die zweite Ableitung der Absorptionskurven bestimmt, da sich die Nulldurchgänge der zweiten Ableitung genauer ablesen lassen, als die Wendepunkte der Schmelzkurven. Die erhaltenen Werte sind mit den entsprechenden Konzentrationen in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Übersicht über die ermittelten Schmelzpunkte von ODNP1a/b

ohne Cu(II)		mit Cu(II)	
[DNA] / μM	T_m / $^{\circ}\text{C}$	[DNA] / μM	T_m / $^{\circ}\text{C}$
0.1	62.6	0.3	65.8
1.0	63.4	1.0	68.9
4.0	64.9	2.0	70.3
9.0	69.2	3.0	70.7

Aus diesen Werten kann man nun ΔG^0 bestimmen, da für jedes System im Gleichgewicht gilt:

$$-RT \ln K_T = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Da am Schmelzpunkt der DNA genau 50 % des Duplex in seine Einzelstränge dissoziiert sind, kann die Gleichgewichtskonstante K_T vereinfacht mit Hilfe der eingesetzten DNA-Konzentration C_T ausgedrückt werden. Damit wird die Umformung der obigen Gleichung 3.1 zu unten stehendem Ausdruck ermöglicht:^[117]

$$\underbrace{\frac{1}{T_m}}_y = \frac{R}{\Delta H^{\circ}} \underbrace{\ln C_T}_x + \frac{\Delta S^{\circ} - R \ln 4}{\Delta H^{\circ}} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Da dieser Ausdruck (*Van't Hoff-Gleichung*) einer Geradengleichung entspricht, können durch Auftragung der inversen Schmelztemperatur $1/T_m$ gegen $\ln C_T$ die thermodynamischen Parameter bestimmt werden.

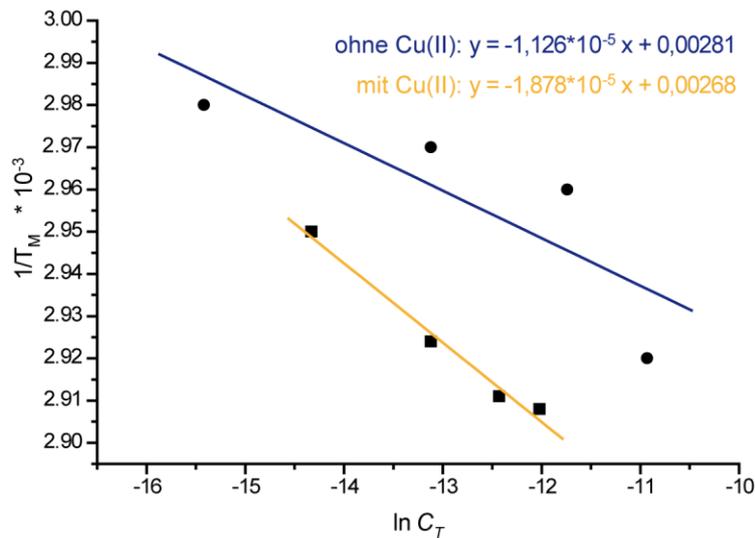


Abbildung 3.39: Van't Hoff-Diagramm für die Schmelzkurvenenergieergebnisse ohne Cu(II) (●, linearer Fit: blau) und mit Cu(II) (■, linearer Fit: gelb).

Durch Ablesen der Steigung und des Achsenabschnitts der jeweiligen Ausgleichsgerade, lassen sich für die beiden Systeme die thermodynamischen Parameter bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Thermodynamische Daten zu den Strängen ODNP1a/b ohne und mit Zugabe von Cu(II)

	ohne Cu(II)	mit Cu(II)
$\Delta H^0 / \text{kcal mol}^{-1}$	-176	-105
$\Delta S^0 / \text{kcal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	-0.526	-0.280
$\Delta G^0 / \text{kcal mol}^{-1}$	-22.4	-19.4

Die erhaltenen Parameter können nun mit den theoretisch Werten^[126, 127] verglichen werden. Dabei erhält man berechnete ΔG^0 -Werte von $-22.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ für einen *mismatch* bzw. $-19.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ für einen unmodifizierten vergleichbaren DNA-Strang. Daher kann man davon ausgehen, dass ein dS:dS-Paar ohne Cu(II) wie ein *mismatch* keine attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Basen ausbildet.

3.4.2 Durchführung der AFM-Versuche

Die Untersuchungen am AFM wurden in der Gruppe von Prof. H. Gaub an der Physik-Fakultät der LMU durchgeführt.

Zuerst erfolgte die Anbindung der einzelnen DNA-Stränge an Glasplatte (*slide*, ODNP1b) und Blattfeder (*cantilever*, ODNP1a). Die *slides* (Nexterion) waren prä-aminosilanisiert, die Blattfeder wurde durch Inkubation mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan nach dem Protokoll von Morfill *et al.*^[128] silanisiert. Die Aminogruppen wurden durch Inkubation in Boratpuffer (pH = 8.5, 1 h) deprotoniert und anschließend wurden durch Reaktion mit dem NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) der bifunktionale NHS-PEG-MAL-*Spacer* (PEG: Polyethylenglykol; MAL: Maleimid) kovalent angebunden.^[128] Die mit einem 5'-Thiol modifizierte DNA wurde mit TCEP-*beads* behandelt, um gebildete Disulfid-Brücken zu reduzieren und anschließend für 1 h mit *slide* bzw. *cantilever* inkubiert, um am 5'-Ende eine Thioetherbindung zwischen der Maleimid-Gruppe und dem Sulfid auszubilden. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.40 gezeigt.

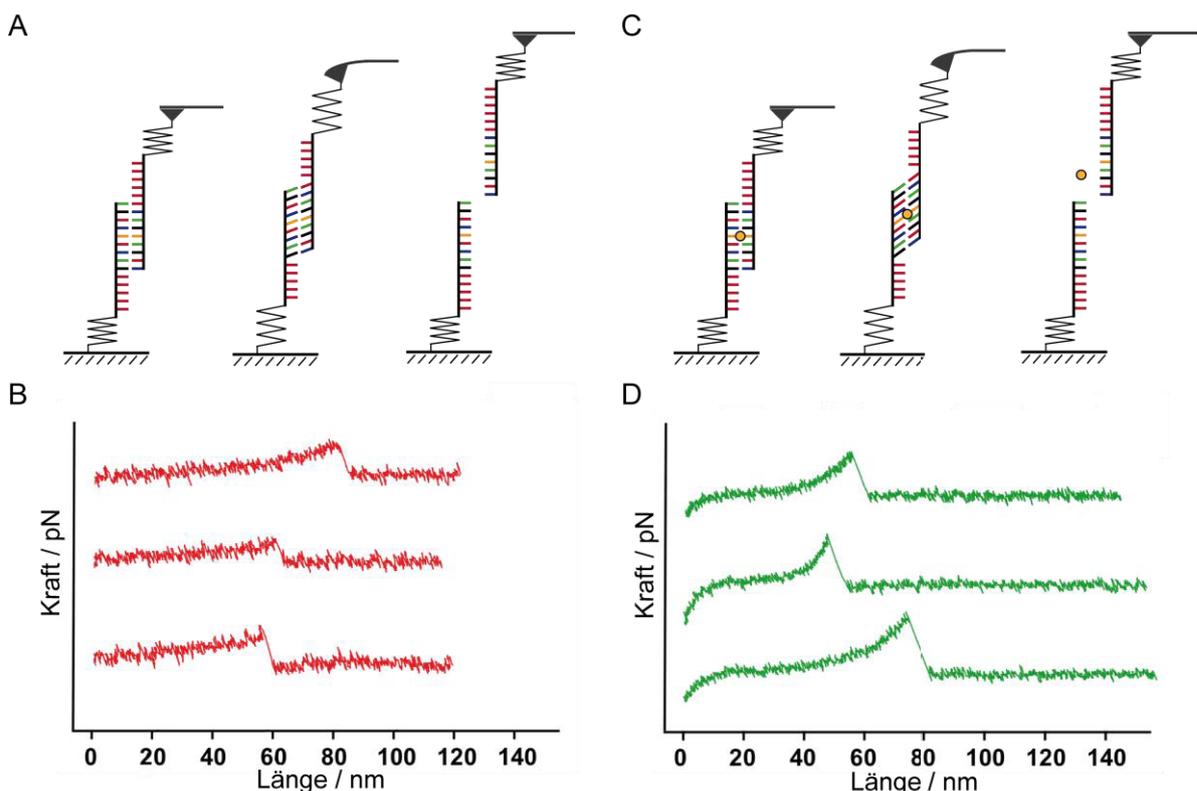


Abbildung 3.40: Schematische Darstellung des Experiments (*shearing*-Geometrie) und Beispiele für gemessene Abrisskurven. A) Experimenteller Aufbau und C) typische Kraftkurven ohne Zugabe von Cu(II); B) und D) unter Zugabe von 35 µM Cu(II).

Der *cantilever* wurde zum *slide* bewegt, so dass die anheftenden DNA-Stränge sich nahe kommen und zum Doppelstrang hybridisieren können. Anschließend wird der *cantilever* langsam von der Oberfläche wegbewegt. Wenn nach der

Ausdehnung des PEG-Spacers die anliegenden Kräfte die Bindungskräfte des Doppelstrangs übersteigen, denaturieren die Stränge zu den Einzelsträngen, man spricht vom Abreißen. In der *shearing*-Geometrie erfolgt das Anlegen der Kraft parallel zum Phosphatrückgrat der DNA. Üblicherweise liegen diese sogenannten Abrisskräfte für ein 20mer Oligonukleotid im Bereich von 50 pN.^[128-130] Es wurden mehrere Abrisskurven hintereinander aufgenommen, jeweils mit einer Zuggeschwindigkeit (Ladungsrate) von 1200 pN s⁻¹.

Die Ergebnisse der aufgenommenen Kraftkurven wurden in einem Histogramm zusammengestellt (Abbildung 3.41).

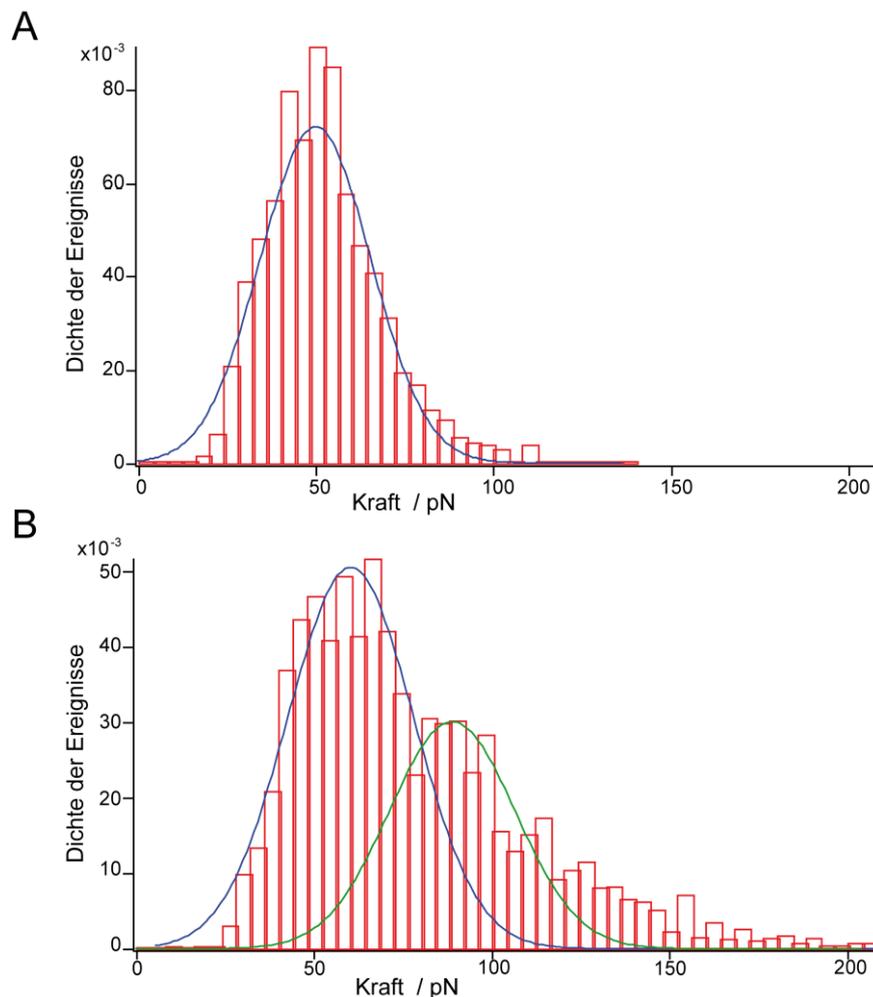


Abbildung 3.41: Histogramm der Abrisskräfte. A) Histogramm der Daten ohne Cu(II); Aufnahme von 5000 Kurven mit einer Rückstellgeschwindigkeit von 1200 nm s⁻¹. Fitting mit einer Gausskurve (blau). B) Histogramm der Daten mit Cu(II); Aufnahme von 7000 Kurven (Rückstellgeschwindigkeit 1200 nms⁻¹). Fitting mit zwei Gausskurven (blau und grün).

Abbildung 3.41 A zeigt die wahrscheinlichste Abrisskraft von in der Tat etwa 50 pN für das 20mer ohne Cu(II). Dies entspricht dem Wert für ein 20mer Oligonukleotid. In Abbildung 3.41 B hingegen liegt zwar auch ein Maximum bei etwa 50 pN, allerdings kann man neben diese Gaußkurve (blau) noch eine zweite Kurve (grün) legen, deren Maximum bei 80 pN liegt. Da die Konzentration an Cu(II)-Ionen in der Messlösung so eingestellt wurde, dass etwa 50 % der dS:Cu:dS-Komplexe ausgebildet sind, kann man davon ausgehen, dass die grüne Kurve die DNA-Stränge repräsentiert, die zusätzlich zu den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den kanonischen Basen noch koordinative Wechselwirkungen durch den Kupferkomplex aufweisen. Dies bedeutet, dass die Bildung des Kupferkomplexes bei einer Ladungsrate von 1200 pN s^{-1} einen Anstieg der Abrisskraft von 50 pN auf 80 pN bewirkt.

3.5 Entwicklung eines schwefelhaltigen Metall-Basenpaars

Im Hinblick auf den Einbau weiterer Arten von Metallionen in DNA ist es interessant, Liganden mit weichen Koordinationsstellen zu entwickeln, um weiche Metallionen, wie zum Beispiel Palladium(II), in der DNA komplexieren zu können. Dies ist besonders reizvoll, da mit ^{105}Pd ein diamagnetischer Kern mit einem Spin von $5/2$ vorliegt und so die Möglichkeit besteht, NMR-Experimente daran durchzuführen. Hierdurch könnte die Aufklärung der unmittelbaren Metallionumgebung gelingen.

In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, schwefelhaltige Ligandoside zu synthetisieren, und in DNA einzubauen, um Palladiumion koordinieren zu können.

Ein in der Literatur bereits bekannter Baustein mit Schwefel ist die 2,6-Bis(ethylthiomethyl)pyridin-nukleobase **36** (Abbildung 3.42) von *Zimmermann et al.*,^[59] mit dem allerdings Ag(I) komplexiert wurde. Bei dem Versuch, Pd^{2+} -Ionen einzubauen, fand man keine metallion-abhängige Bildung des Basenpaars. Auch die Gruppe von *Shionoya* arbeitete auf diesem Gebiet. Sie synthetisierte das schwefelhaltigen Ligandosid **41** (Abbildung 3.42), das ein enger Verwandter des Hydroxypyridinonnukleosids **39** ist.^[69] Allerdings zeigte sich, dass dieses Molekül für die chemische DNA-Synthese ungeeignet war, da der Schwefel während des Oxidationsschritts in der Festphasensynthese zum Sulfoxid oxidierte.^[131]

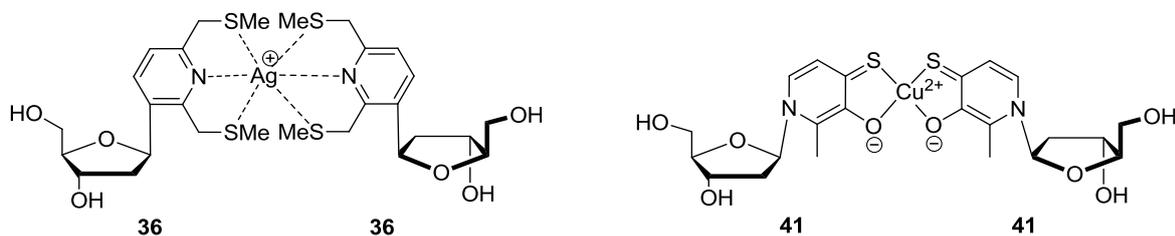


Abbildung 3.42: Das dSPy:Ag:dSPy-Basenpaar (**36**) von *Zimmermann et al.*, sowie das Dihydroxypyridinethionbasenpaar (**41**) zur Komplexierung von Cu(II) von *Takezawa et al.*

Zudem besitzen diese beiden alternativen Basen neben der weichen Koordinationsstelle am Schwefel auch noch einen Sauerstoff bzw. Stickstoff zur Koordination. Um eine ausschließliche Koordination durch Schwefelatome zu

ermöglichen, sollten in der vorliegenden Arbeit Dithiocarbamate eingesetzt werden. Dithiocarbamate sind die Halb-Amide der Thiocarbonsäure.^[132] Bereits 1850 beschrieb *Debus* die Synthese der Dithiocarbaminsäure.^[133] Die zugehörigen Dithiocarbamate ($R_2CNS_2^-$) sind eine vielfältige Gruppe monoanionischer 1,1-Dithio-Liganden. Die Synthese der Dithiocarbamate gelingt in der einfachsten Form aus primären und sekundären Aminen und Schwefelkohlenstoff. Besonders interessant für diese Arbeit sind die Palladium-bis(dithiocarbamat)-Komplexe. Es kann dabei sowohl Palladium(II) als auch Palladium(IV) stabilisiert werden, wobei der erstere Fall weit häufiger vorkommt. Die ersten Bis(dithiocarbamat)-Komplexe des Palladiums $Pd(S_2NCR_2)_2$ wurden bereits von *Delépine* beschrieben.^[134] Bis heute ist eine große Anzahl dieser Pd-Komplexe vorgestellt worden. Alle Komplexe dieser Art sind luftstabil und diamagnetisch.^[135]

Bereits früher wurden erste Untersuchungen zu der Verwendung von Dithiocarbamaten in DNA vorgenommen.^[136] Die Basen dA, dG und dC besitzen jeweils eine NH_2 -Funktion. Allerdings handelt es sich dabei genau genommen um Amidin-Teilstrukturen mit sp^2 -hybridisierten Stickstoffatomen, bei denen zwei Stickstoffe an ein Kohlenstoffatom gebunden sind und eine C-N-Doppelbindung ausbilden. Um nun zu überprüfen, ob auch die Basen dA, dG und dC mit CS_2 Dithiocarbamate bilden oder ein Oligonukleotid an anderer Stelle durch den Schwefelkohlenstoff beeinflusst wird, wurde ein einfacher DNA-Strang, der alle vier natürlichen Basen enthielt, ausgewählt und zusammen mit Cyclopentylamin **62** (Abbildung 3.43) in MeCN : H_2O im Verhältnis 1 : 1 gelöst und mit CS_2 versetzt. Es wurde das Dithiocarbamatderivat des Cyclopentylamins mittels ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen. Die DNA zeigte keine Umsetzungen mit CS_2 .^[136]



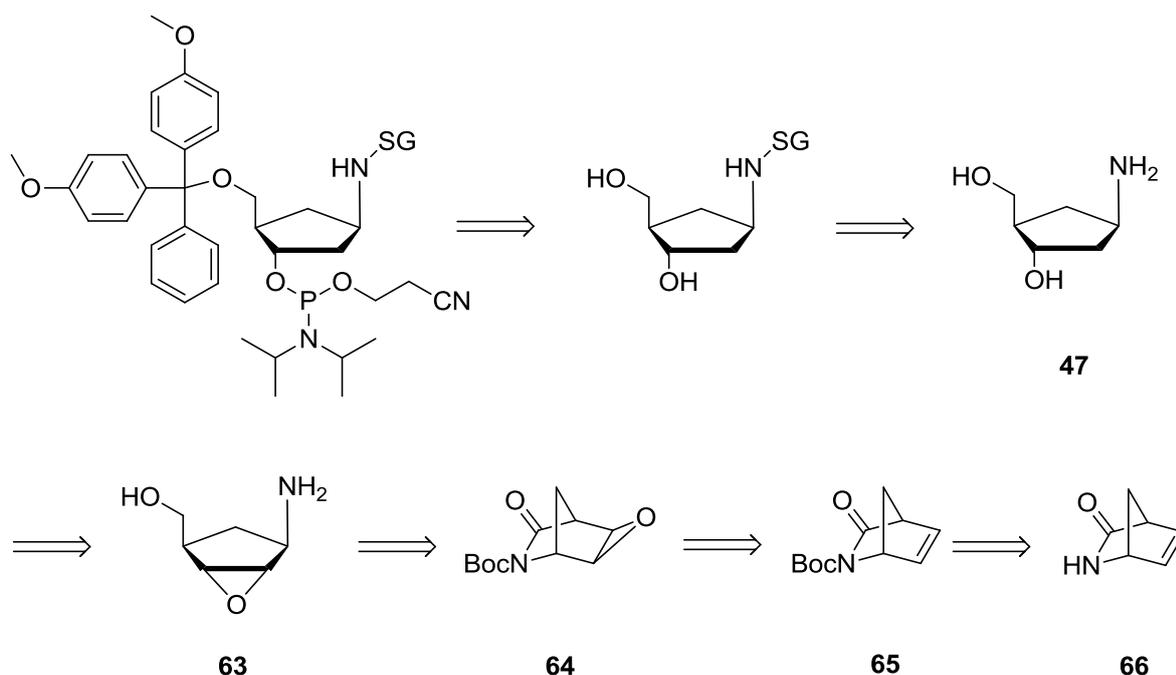
Abbildung 3.43: Vergleich des carbazyklischen Amins **47** mit Cyclopentylamin **62**.

Im nächsten Schritt erfolgte dann die Synthese einer Nucleobase, mit einer Amin-Gruppe, die in ein Oligonucleotid eingebaut wurde. Anschließend erfolgten Versuche, die Base in ein Dithiocarbamat zu überführen.

Da in der Arbeitsgruppe bereits ein guter Zugang zu (1*S*,2*R*,4*R*)-4-Amino-2-(hydroxymethyl)cyclopentanol **47** (Abbildung 3.43), einem Vorläufer für carbazyklische Nucleoside.^[117] besteht, sollte dieses in DNA eingebaut werden.

3.5.1 Synthese eines geschützten carbazyklischen Amin-Phosphoramidits zum Einbau in DNA

In Schema 3.8 ist eine Übersicht über Retrosynthese zum benötigten geschützten Phosphoramiditbaustein gegeben.



Schema 3.8: Retrosynthetische Analyse des carbazyklischen Amin-Phosphoramidits mit Schutzgruppe.

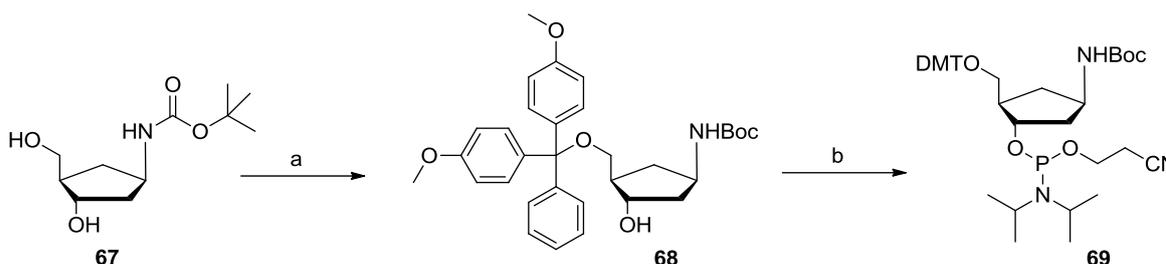
Die Synthese bis zum carbazyklischem Amin **47** wurde nach bekannten Literaturvorschriften durchgeführt (vgl. Kap. 5.1.2.3).^[117, 137] Anschließend war es nötig, die Amin-Funktion zu schützen, damit während der chemischen DNA-Synthese keine unerwünschten Reaktionen daran stattfinden. Die Schutzgruppe muss

verschiedene Anforderungen, wie Stabilität gegen saure und oxidative Bedingungen erfüllen. Zudem wäre es von Vorteil, wenn die anschließend nötige Entschützung entweder im Zuge der Standardentschützung der DNA mit NH_3/EtOH erfolgen kann oder ein zusätzlicher Schritt den DNA-Strang nicht schädigt. Die Bedingungen wurden von mehreren Schutzgruppen erfüllt, die Synthesen sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.5.1.1 Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe

Da während der Synthese der Amin-Vorstufe die NH_2 -Funktion mittels einer *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe (Boc) geschützt ist, sollte diese als erste Schutzgruppe getestet werden. Obwohl die Gruppe säurelabil ist, könnte die Stabilität ausreichen, um während der DNA-Synthese nicht zu hydrolysieren.

Die Synthese erfolgte ausgehend von **67**, das die direkte Vorstufe des freien carbazyklischenamins **47** ist und dessen Synthese literaturbekannt und in hohen Ausbeuten möglich ist.^[117] Anschließend erfolgte die Schützung der 5'-OH-Gruppe mit DMT sowie in einem zweiten Schritt die Synthese des 3'-Phosphoramidits nach Standardmethoden (vgl. 3.2.1.1). Man erhielt das gewünschte Molekül **69** in hohen Ausbeuten.



Schema 3.9: Darstellung des Boc-geschützten, carbazyklischen Aminnukleosids **69**. a) DMTCl, Pyridin, 3 Å, RT, 2 h, 98 %; b) CEDCI, $\text{NEt}(\text{iPr})_2$, THF, RT, 1 h, 98 %.

Der Einbau in DNA erfolgte unter Verwendung verlängerter Kupplungszeiten, um hohe Ausbeuten zu erreichen. Grundsätzlich erfolgte die DNA-Synthese nach dem in Kap. 3.2.1.1 beschriebenen Prinzip, es wurden die Stränge ODNBoc1a und 1b (vgl. Tabelle 5.1) synthetisiert. Die DMT-Werte zeigten einen erfolgreichen Einbau der Modifizierung an (Abbildung 3.44 A), der korrekte Einbau der Modifikation

wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie (Abbildung 3.44 B) bestätigt. Eine Aufreinigung der Stränge erfolgte über rp-HPLC (Abbildung 3.44 C und D).

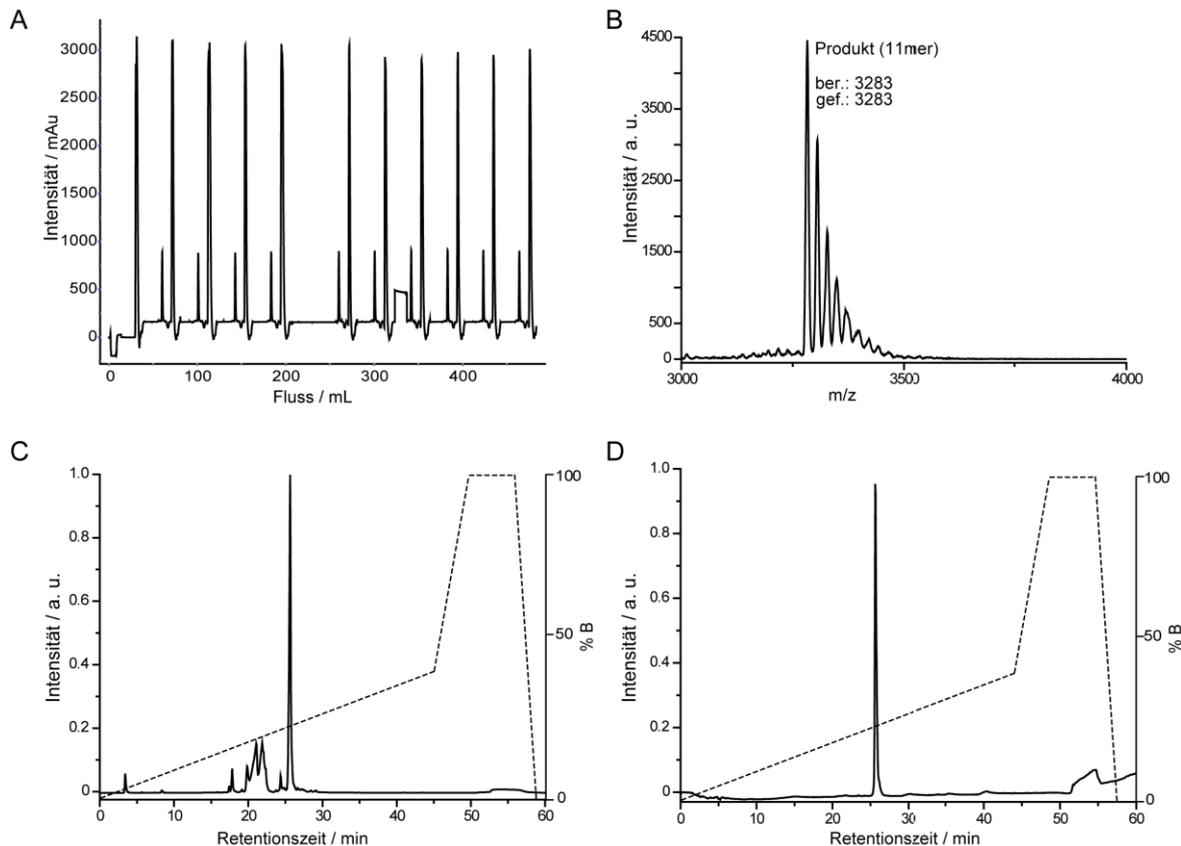


Abbildung 3.44: Analytische Daten zur DNA-Synthese von ODNBoc1b. A) DMT-Signale der DNA-Synthese. Die Synthese erfolgte in 3'→5'-Richtung. B) MALDI-Spektrum des Rohstrangs mit dem Produktsignal sowie den Alkalimetalladdukten. C) HPLC-Chromatogramm der präparativen Aufreinigung von ODNBoc1b. D) Nachweis der Reinheit mittels analytischer HPLC. Durchgezogene Linie: Chromatogramm, gestrichelte Linie: Puffergradient B.

Der Einbau des geschützten Amins war erfolgreich, die Boc-Gruppe war stabil gegenüber den schwach sauren Bedingungen der DNA-Synthese. Um nun das freie Amin für eine Reaktion zur Verfügung zu haben, musste noch die Hydrolyse der Boc-Gruppe erfolgen. Nach der Literatur erfolgt die Entschützung des freien Moleküls bei 100 °C für 18 h in H₂O.^[117] Allerdings zeigte sich in einem Test, dass der DNA-Strang bei diesen Bedingungen fragmentierte. Daher wurde auf die saure Hydrolyse zurückgegriffen, wobei eine Entschützung noch am Harz oder in Lösung möglich ist. Die durchgeführten Reaktionen und Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8: Übersicht zu den durchgeführten Reaktion zur Hydrolyse der Boc-Gruppe in der DNA

Strang	Reagenz	Lösemittel	Zeit	Temperatur	Ergebnis
am Harz	10 %DCA	DCM	30 min	RT	keine Entschützung
am Harz	1 %TFA	DCM	15 h	17 °C	keine Entschützung
am Harz	3 %TFA	DCM	15 h	17 °C	keine Entschützung
in Lösung	10 %DCA	DCM/H ₂ O	30 min	RT	keine Entschützung
in Lösung	1 %TFA	DCM/H ₂ O	15 h	17 °C	keine Entschützung
in Lösung	1 %TFA	DCM/H ₂ O	24 h	17 °C	keine Entschützung
in Lösung	1 %TFA	DCM/H ₂ O	15 h	25 °C	keine Entschützung
in Lösung	3 %TFA	DCM/H ₂ O	15 h	17 °C	Produkt erkennbar
in Lösung	3 %TFA	DCM/H ₂ O	24 h	17 °C	Produkt deutlich sichtbar,
in Lösung	3 %TFA	DCM/H ₂ O	15 h	25 °C	Produkt deutlich sichtbar, weitere Peaks
in Lösung	1 %TFA	H ₂ O	15 h	17 °C	Produkt erkennbar
in Lösung	1 %TFA	H ₂ O	24 h	17 °C	Produkt deutlich sichtbar, weitere Peaks
in Lösung	1 %TFA	H ₂ O	15 h	25 °C	Produkt erkennbar, weitere Peaks
in Lösung	3 %TFA	H ₂ O	15 h	17 °C	Produkt erkennbar, weitere Peaks
in Lösung	3 %TFA	H ₂ O	24 h	17 °C	Produkt erkennbar, weitere Peaks
in Lösung	3 %TFA	H ₂ O	15 h	25 °C	Produkt erkennbar, weitere Peaks
in Lösung	3-5 %TFA	DCM	15 h	17 °C, 25 °C	DNA hydrolysiert
in Lösung	5 %FA	H ₂ O	15 h, 24 h	17 °C, 25 °C	minimale Entschützung

Bei den am Harz durchgeführten Reaktionen wurde anschließend über Nacht die DNA vom Träger abgespalten. Die in Lösung durchgeführten Reaktionen wurden mit HPLC-Puffer A neutralisiert und über Membran entsalzt. Die Analyse der Reaktionen erfolgte über MALDI-Massenspektrometrie.

Am Harz fand grundsätzlich keine Entschützung statt, hier wurde in den Massenspektren nur Signale für geschützte DNA gefunden. Ameisensäure (FA) war nicht in der Lage die Boc-Gruppe vom Amin abzuspalten. Der Einsatz von TFA in hohen Konzentrationen oder reinem DCM führte zur Zersetzung der DNA, man sah im MALDI-Massenspektrum nur noch Signale für Fragmente. Diese Fragmente traten teilweise auch bei den Entschützungen mit niedrigkonzentrierter TFA auf. Am vielversprechendsten schien die Umsetzung mit 1 % TFA in H₂O über 24 h zu sein (Tabelle 3.8, blau hervorgehoben: MALDI vgl. Abbildung 3.45 A). Jedoch zeigte eine HPLC-Analyse (Abbildung 3.45 B), dass immer noch ein hoher Anteil an geschützter DNA vorlag und zudem die Trennung von den

entstandenen Nebenprodukten schwierig war. Daher erschien eine Optimierung der Reaktion nicht sinnvoll und es wurden weitere Schutzgruppen getestet.

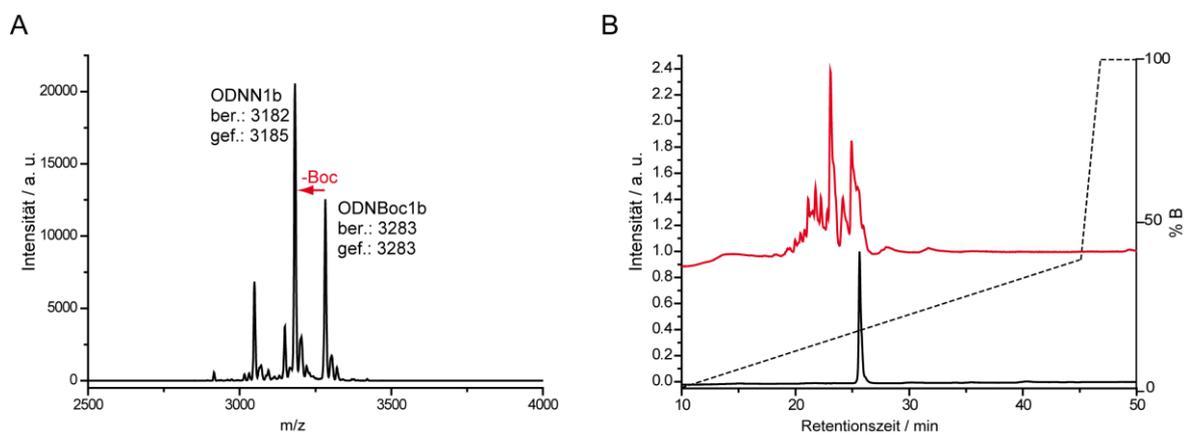
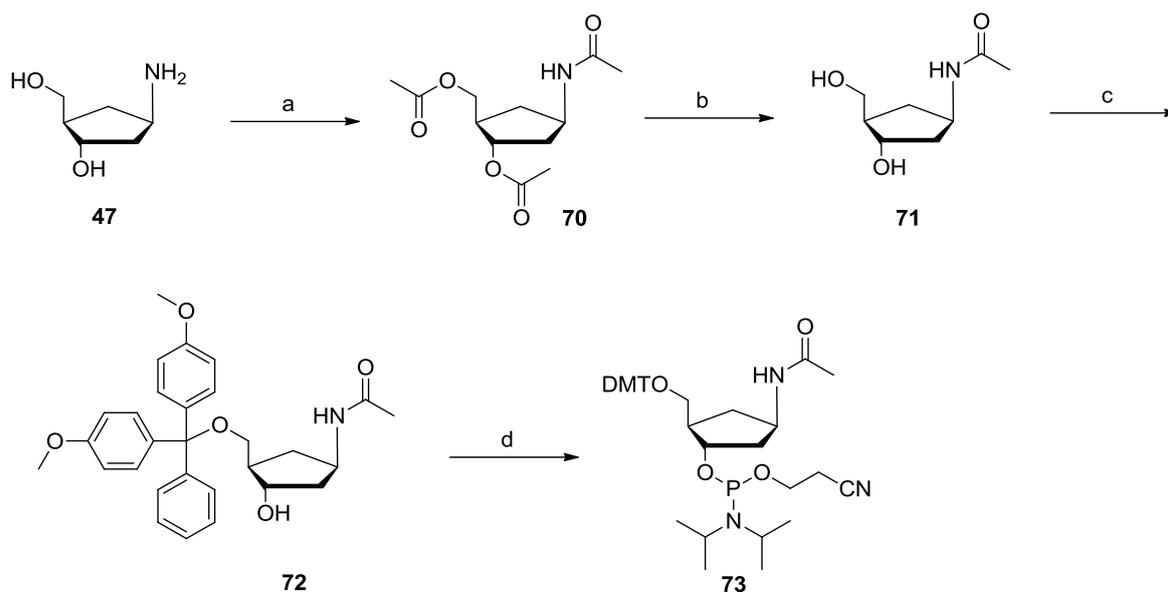


Abbildung 3.45: Analytische Daten zur Entschützung von ODNBoc1b zu ODNN1b A) MALDI-Spektrum mit dem Eduktsignal (ODNBoc1b) sowie dem Produktsignal (ODNN1b). B) Analytisches HPLC-Chromatogramm des Eduktstrangs (schwarz, ODNBoc1b) sowie nach der Entschützungsreaktion (rot); durchgezogene Linie: Chromatogramm, gestrichelte Linie: Puffergradient B.

3.5.1.2 Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit Acetyl-Schutzgruppe

Als alternative zur Boc-Gruppe wurde nun die Acetylschutzgruppe am Amin eingeführt. Dazu wurde zuerst eine vollständige Acetylierung des Moleküls **47** durch Umsetzung mit Ac_2O und im Anschluss eine selektive Entschützung an den OH-Gruppen mit $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ durchgeführt. Danach erfolgte die Synthese des Phosphoramidits **73** über die DMT-Verbindung **72** (Schema 3.10).



Schema 3.10: Darstellung des acetylgeschützten, carbazyklischen Aminnucleosidphosphoramidits **73**. a) Ac_2O , Pyridin, 3 Å, RT, 3 h, 52 %; b) K_2CO_3 , MeOH, RT, 1 h, 77 %; c) DMTCl, Pyridin, 3 Å, RT, 3 h, 85 %; CEDCl, $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$, THF, RT, 1 h, 88 %.

Der Einbau in DNA mittels Festphasensynthese wurde unter Anwendung verlängerter Kupplungszeiten erreicht. Dabei wurden verschiedene Stränge ODNac synthetisiert (vgl. Tabelle 5.1). Die DMT-Werte zeigten einen erfolgreichen Einbau der Modifizierung an (Abbildung 3.46 A), der korrekte Einbau der Modifikation wurde auch mittels MALDI-Massenspektrometrie bewiesen (Abbildung 3.46 B). Eine Aufreinigung der Stränge erfolgte über rp-HPLC (Abbildung 3.46 C und D).

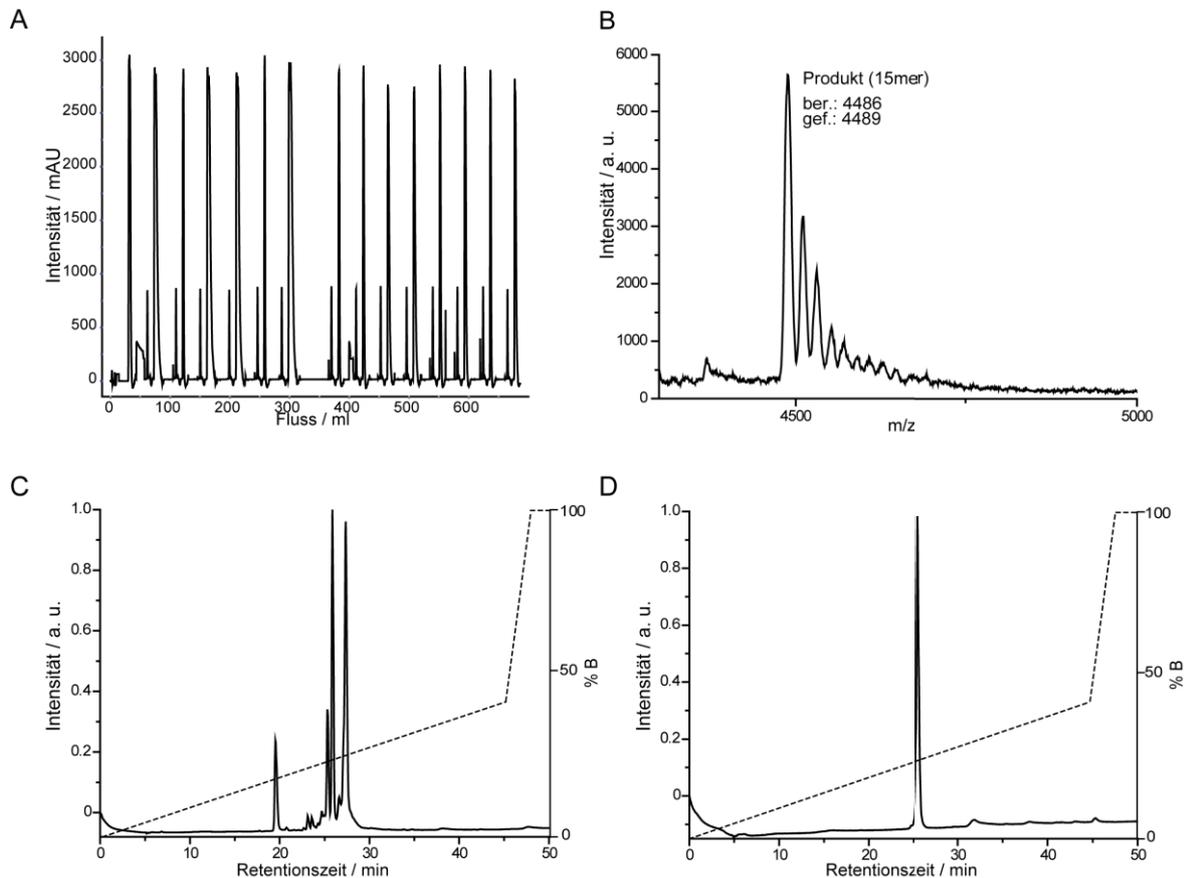


Abbildung 3.46: Analytische Daten zur DNA-Synthese von ODNac2a. A) DMT-Signale der DNA-Synthese. Die Synthese erfolgte in 3'→5'-Richtung. B) MALDI-Spektrum des Rohstrangs mit dem Produktsignal sowie den Alkalimetalladdukten. C) HPLC-Chromatogramm der präparativen Aufreinigung von ODNac2a. D) Nachweis der Reinheit mittels analytischer HPLC. Durchgezogene Linie: Chromatogramm, gestrichelte Linie: Puffergradient B.

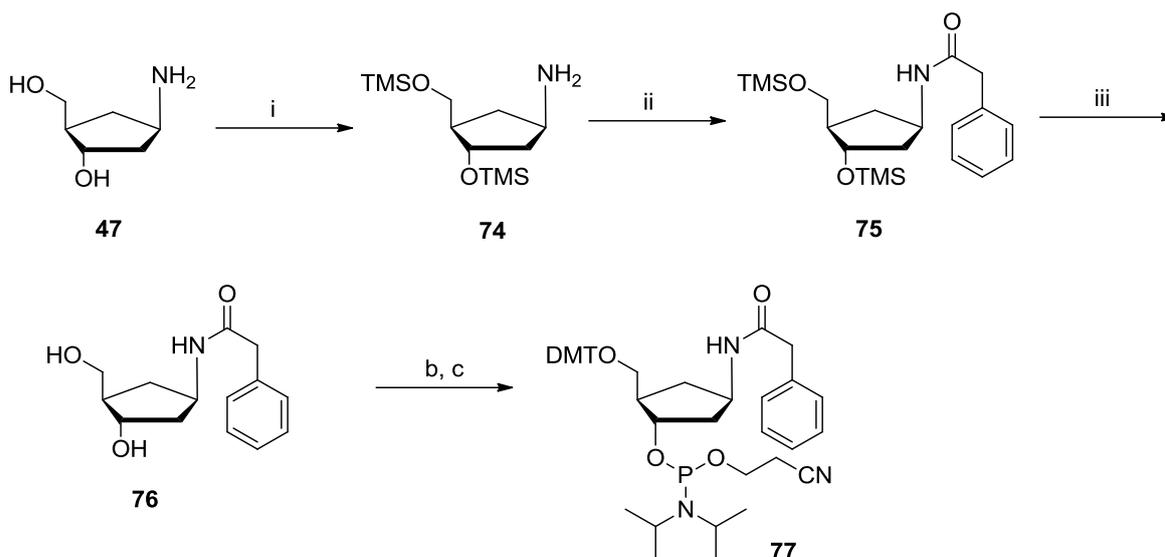
Die Abspaltung der Acetylgruppe wurde analog zu Kap. 3.5.1.1 getestet. Die Ergebnisse waren ähnlich, sodass auf eine genauere Auflistung verzichtet wird. Bei Verwendung der Acetylschutzgruppe konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis mit quantitativer Entschützung und Vermeidung der DNA-Hydrolyse erzielt werden.

Der Versuch eine labilere Einheit, wie z.B. die Trifluoracetyl-Schutzgruppe, zu verwenden, scheiterte an der Synthese. Beim Versuch der analog zum Acetyl durchgeführten ersten Umsetzung mit $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ wurde kein Produkt gebildet, es fand eine Zersetzung des zyklischen Amins **47** statt.

3.5.1.3 Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit Phenylacteyl-Schutzgruppe

Die Schützung der NH_2 -Funktion als Phenylacetamid ist ebenfalls weit verbreitet und die Gruppe kann enzymatisch wieder abgespalten werden. Diese Entschützung wurde bereits erfolgreich an Peptiden^[138] und auch an Oligonukleotiden^[139] durchgeführt.

Die Bildung des Phenylacetamides erfolgte in Anlehnung an *Benseler* und *McLaughlin*.^[140] Am carbazyklische Amin **47** wurden zuerst die OH-Gruppen mit Trimethylsilylgruppen geschützt. Anschließend wurde unter Einsatz von HOBt als Aktivierungsreagenz eine Amidbildung mit Phenylacetylchlorid durchgeführt und zuletzt wurden die TMS-Gruppen basisch abgespalten. Die Ausbeute über dieser Eintopfreaktion betrug 86 %. Routinemäßig erfolgten die DMT-Schützung sowie die Phosphoramiditdarstellung.



Schema 3.11: Darstellung des phenylacetylgeschützten, carbazyklischen Aminnukleosids-phosphoramidits **77**. a) i) TMSCl, Pyridin, RT, 1 h, ii) Phenylacetylchlorid, HOBt, MeCN, Pyridin, 0 °C, 1 h, auf RT kommen lassen, 12 h, iii) NH_4OH , H_2O , 0 °C, 15 min, 86 %; c) DMTCl, Pyridin, 3 Å, RT, 3 h, 72 %; CEDCl, $\text{NEt}(\text{iPr})_2$, THF, RT, 1 h, 93 %.

Die Entschützung an der DNA sollte enzymatisch unter Einsatz der Penicillin G-Acylase verlaufen.^[139] Dafür wurde zuerst eine Testreaktion am carbazyklischen Nukleosid **76** durchgeführt. Dieses wurde in H_2O (pH = 7) mit der Penicillin G-Acylase (*ASA Spezialenzyme*, Wolfenbüttel) versetzt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Das anschließend aufgenommene Massenspektrum zeigte eine

Entschützung der NH₂-Funktion an (HRMS (ESI) m/z ber. für C₆H₁₄NO₂ [M+H]⁺: 132.1025; gef.: 130.1019).

Da die Entschützung erfolgversprechend schien, wurden verschiedene, modifizierte DNA-Stränge (ODNPhAc) synthetisiert (vgl. Tabelle 5.1). Exemplarisch sind für eine Sequenz die analytischen Daten in Abbildung 3.47 gezeigt.

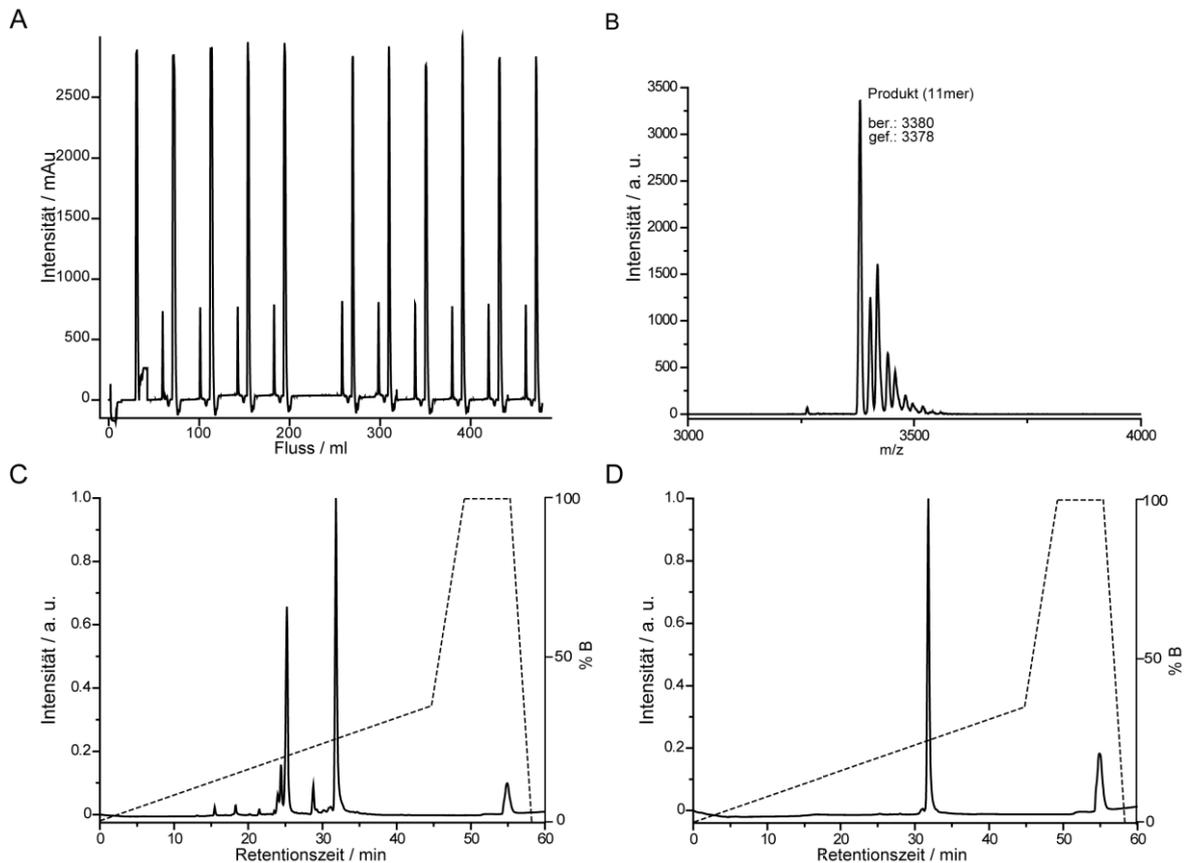


Abbildung 3.47: Analytische Daten zur DNA-Synthese von ODNPhAc1a. A) DMT-Signale der DNA-Synthese. Die Synthese erfolgte in 3'→5'-Richtung. B) MALDI-Spektrum des Rohstrangs mit dem Produktsignal sowie den Alkalimetalladdukten. C) HPLC-Chromatogramm der präparativen Aufreinigung von ODNPhAc1a. B) Nachweis der Reinheit mittels analytischer HPLC. Durchgezogene Linie: Chromatogramm, gestrichelte Linie: Puffergradient B.

Anschließend erfolgte die enzymatische Entschützung der Phenylacetylgruppe. Dabei wurden sowohl die Entschützung am Trägermaterial als auch in Lösung durchgeführt. Es erfolgte eine Zugabe von 5-20 µL Penicillin G Acylase (1 U/µL). Die Reaktionen wurden in Kaliumphosphat-Puffer (200 mM) mit einem pH-Wert von 7.7 oder 8.0 angesetzt. Teilweise erfolgte die Zugabe von EDTA (30 mM) oder Ethylendiamin (100 mM). Die Reaktionstemperaturen variierten zwischen 25 °C,

37 °C, 54 °C und 65 °C, die Reaktionszeiten zwischen 1 h und 16 h. Es wurden jeweils sehr ähnliche MALDI-Spektren erhalten (Abbildung 3.48).

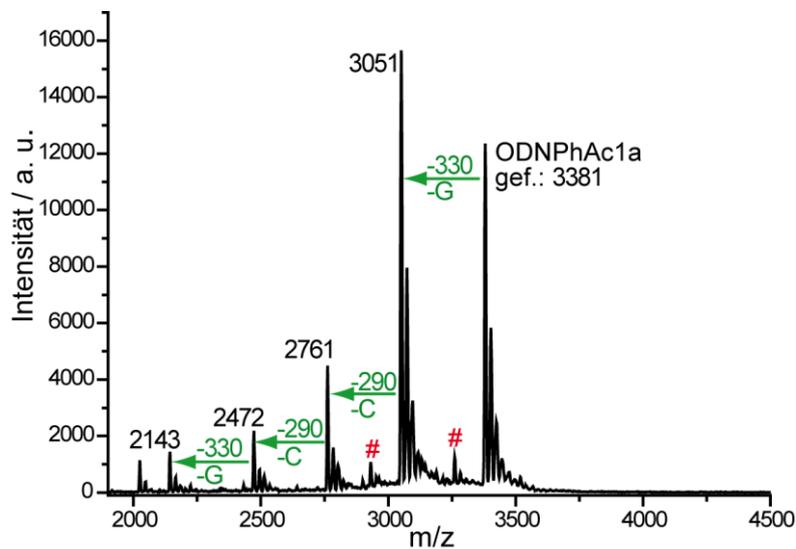


Abbildung 3.48: MALDI-Spektrum von ODNPhAc1a nach der Behandlung mit Penicillin G-Acylase; #: entschützte DNA.

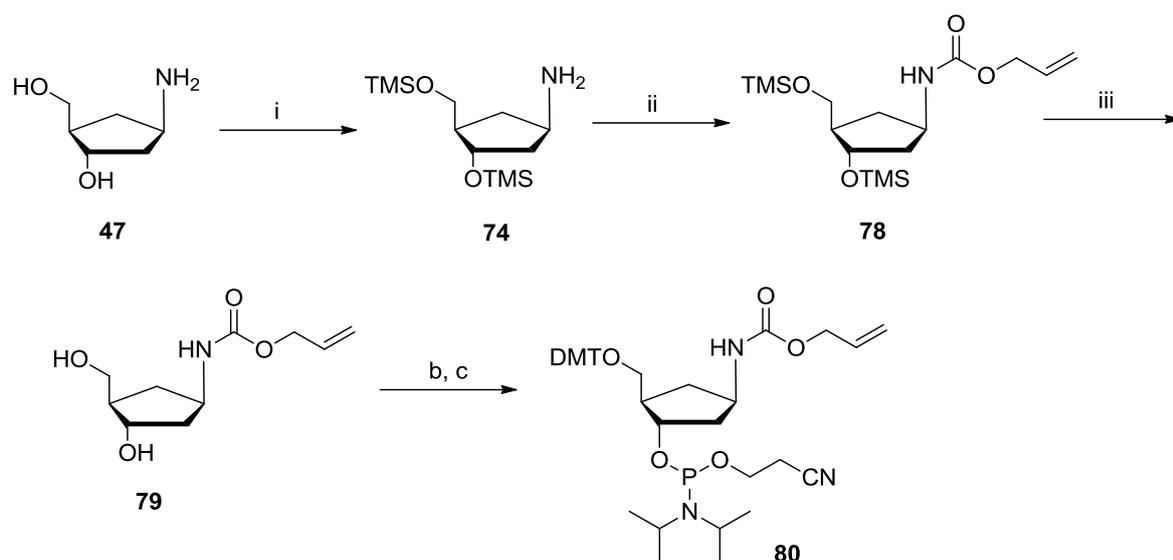
Im MALDI-Spektrum zeigte sich, dass die DNA zwar teilweise entschützt wurde (#), allerdings mit einer Zersetzung des DNA-Strangs einherging. Man kann mit Hilfe der Sequenz exakt den Abbau der DNA in Richtung 3'→5' verfolgen. Offenbar war die Penicillin G-Acylase verunreinigt mit einem Enzym, das eine Exonuklease-Aktivität hat. Diese Verunreinigung wurde bei allen Enzymchargen festgestellt.

Der Versuch die DNA-Stränge durch Modifizierung am 3'-Ende zu schützen, indem Trägermaterial mit Dabsyl-, Dabcyll- sowie Biotin-Resten (vgl. Tabelle 5.1) eingesetzt wurde, misslang. Auch diese Gruppen schützen die DNA-Stränge nicht vor einer Hydrolyse durch die verunreinigte Enzymlösung.

Da zudem die Entschützung der DNA nur in sehr geringen Ausbeuten stattfand, war auch die Phenylacetylschutzgruppe für eine effektive DNA-Modifizierung ungeeignet.

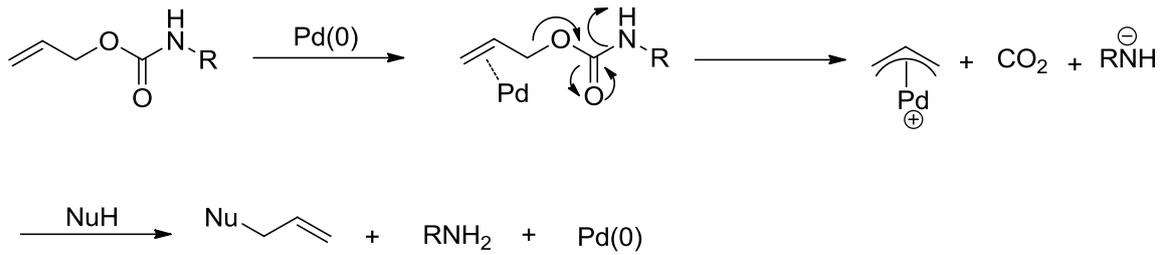
3.5.1.4 Einbau des carbazyklischen Amin-Nukleosids mit Alloc-Schutzgruppe

Als weitere Alternative zur Schützung der Amin-Funktion wurde die Allyloxycarbonyl-Gruppe eingesetzt, die ebenfalls bereits in DNA verwendet wurde.^[141-143] Dazu wurden analog zu Kap. 3.5.1.3 die OH-Gruppen intermediärer mit TMS-Gruppen geschützt. Das Allylcarbammat wurde in hohen Ausbeuten von 86 % gewonnen. Auch die Synthese der DMT-Stufe sowie des Phosphoramidits gelangen mit 62 % bzw. 99 % Ausbeute (Schema 3.12).



Schema 3.12: Darstellung des Alloc-geschützten, carbazyklischen Aminnucleosidsphosphoramidits **80**. a) i) TMSCl, Pyridin, RT, 1 h, ii) Allylchloroformiat, HOBt, MeCN, Pyridin, 0 °C, 1 h, auf RT kommen lassen, 12 h, iii) NH₄OH, H₂O, 0 °C, 15 min, 86 %; c) DMTCl, Pyridin, 3 Å, RT, 3 h, 62 %; CEDCl, NEt(*i*Pr)₂, THF, RT, 1 h, 99 %.

Erneut erfolgte der Einbau des Nucleosids in verschiedene DNA-Stränge. Die Abspaltung der Alloc-Gruppe erfolgte nach der Literatur noch am Trägermaterial.^[142, 144] Hierzu wurde eine Lösung aus 25 mg Palladium(0)-bis-(dibenzylidenaceton), 17 mg 1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan und 11 µL Pyrrolidin in 10 mL MeCN hergestellt und mittels einer Spritze langsam über das Harz in der Kartusche gespült.



Schema 3.13: Mechanismus der Palladiumkatalysierten Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe.

Um an der DNA anhaftendes Palladium zu entfernen, wurde anschließend mit einer Lösung aus 225 mg Natriumdiethyldithiocarbamat in 10 mL H₂O nachgespült. Die DNA wurde nach einem Standardprotokoll entschützt und mittel rp-HPLC aufgereinigt. In Abbildung 3.49 sind die analytischen Daten beispielhaft für Strang ODNA_{Alloc3a} bzw. ODNN_{3a} angegeben.

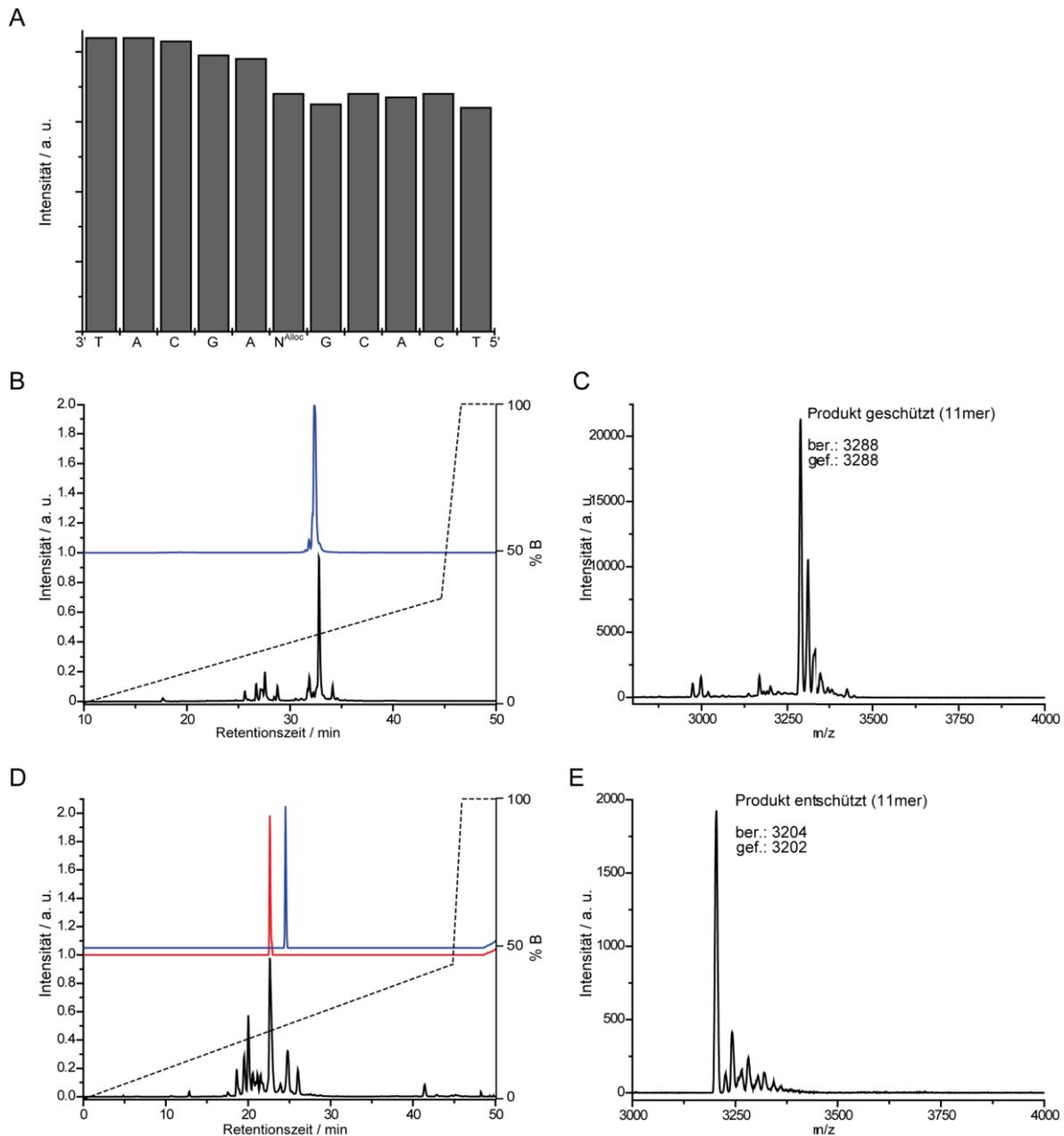
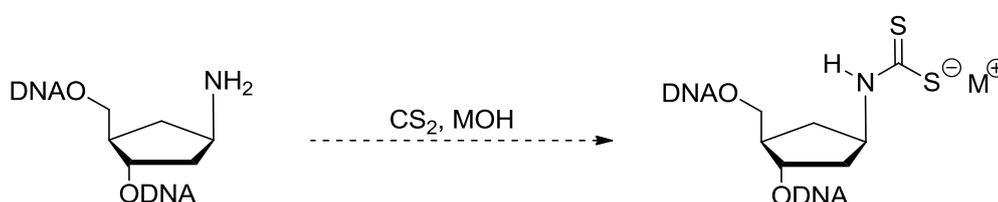


Abbildung 3.49: Analytische Daten zur DNA-Synthese von ODNAloc3a. A) DMT-Signale der DNA-Synthese. Die Synthese erfolgte in 3'→5'-Richtung. B) HPLC-Chromatogramm der präparativen Aufreinigung von ODNAloc3a ohne Entschützung mit Pd. Nachweis der Reinheit mittels analytischer HPLC (blaue Linie). B) MALDI-Spektrum von ODNAloc3a mit dem Produktsignal sowie den Alkalimetalladdukten. C) HPLC-Chromatogramm der präparativen Aufreinigung von ODNN3a nach Entschützung mit Pd(0). Nachweis der Reinheit mittels analytischer HPLC (rot: ODNN3a, blau: ODNAloc3a). B) MALDI-Spektrum von ODNN3a mit dem Produktsignal sowie den Alkalimetalladdukten. Gestrichelte Linie: Puffergradient B.

Die Synthese, Entschützung und Aufreinigung der Stränge war sehr gut möglich, die Alloc-Schutzgruppe war zum Einbau des carbazyklischen Amins in DNA hervorragend geeignet, so dass die synthetisierten DNA-Stränge zur Umsetzung mit CS₂ eingesetzt werden konnten (vgl. Kap. 3.5.2).

3.5.2 Umsetzung der modifizierten DNA-Stränge mit CS₂

Die Synthese einer Dithiocarbamatfunktionalität erfolgt üblicherweise aus primären oder sekundären Aminen und Schwefelkohlenstoff unter basischen Bedingungen.^[135] Als Lösungsmittel werden vor allem H₂O, EtOH und MeOH verwendet, wobei aufgrund der Löslichkeit von DNA nur H₂O, eventuell in Kombination mit MeCN in Frage kommt. Die Reaktionen finden bei Raumtemperatur statt, seltener unter Kühlung.^[135] Dieses Prinzip sollte auch bei der Umsetzung an DNA angewandt werden (Schema 3.14).



Schema 3.14: Darstellung eines Dithiocarbamats in DNA.

Es wurden zwei DNA-Sequenzen eingesetzt, ODNN3a, bei der die Amin-Base mitten im Strang sitzt, sowie ODNN4a, der die Aminfunktion nahe des 3'-Ende trägt (Sequenzen siehe Tabelle 5.1).

Es wurden verschiedene Puffersysteme, Basen, Temperaturen und Reaktionszeiten getestet, eine Übersicht gibt Tabelle 3.9.

Tabelle 3.9: Übersicht zu den getesteten Reaktionsbedingungen für die Umsetzung des Amins zum Dithiocarbamat

Sequenz	n(DNA)	CS ₂ oder Thiocarbonyl-imidazol	Puffer bzw. Base	T / °C	t / min
ODNN3a	550 pmol	11 nmol	12.1 nmol KOH (0.01 M)	25	18
ODNN3a	550 pmol	27.5 nmol	30.2 nmol KOH (0.01 M)	25	18
ODNN3a	550 pmol	110 nmol	121 nmol KOH (0.01 M)	25	18
ODNN3a	550 pmol	11 nmol	1.5 nmol KCl/NaOH (pH = 12)	25	18
ODNN3a	550 pmol	27.5 nmol	5 nmol KCl/NaOH (pH = 12)	25	18
ODNN3a	550 pmol	110 nmol	15 nmol KCl/NaOH (pH = 12)	25	18
ODNN3a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	23	18
ODNN3a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	23	18
ODNN3a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	23	18
ODNN3a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	23	18
ODNN3a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	23	18
ODNN3a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	23	18
ODNN4a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	23	18

ODNN4a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	23	18
ODNN4a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	23	18
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	23	18
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	23	18
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	23	18
ODNN3a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	30	18
ODNN3a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	30	18
ODNN3a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	30	18
ODNN3a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	30	18
ODNN3a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	30	18
ODNN3a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	30	18
ODNN4a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	30	18
ODNN4a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	30	18
ODNN4a	1 nmol	1 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	30	18
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	30	18
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	30	18
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	30	18
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8)	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0)	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2)	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8) + 800 µmol Harnstoff	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0) + 800 µmol Harnstoff	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2) + 800 µmol Harnstoff	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8) + 800 µmol Harnstoff	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Carbonat-Puffer (pH = 11.0) + 800 µmol Harnstoff	25	20
ODNN4a	1 nmol	10 nmol	1 mmol Phosphat-Puffer (pH = 11.2) + 800 µmol Harnstoff	25	20
ODNN4a	1 nmol	30 nmol jede Stunde	1 mmol Borat-Puffer (pH = 10.8) + 800 µmol Harnstoff	25	8

Nach den Reaktionen wurden die Ansätze in flüssigen Stickstoff eingefroren und am Hochvakuum vollständig eingengt, um das hochgiftige überschüssige CS₂ aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels MALDI-Massenspektrometrie sowie HPLC-Chromatographie.

Die analytischen Daten der einzelnen Reaktionen unterschieden sich kaum, beispielhaft sind hier die Daten für den blau gekennzeichneten Ansatz aus Tabelle 3.9 gezeigt (Abbildung 3.50).

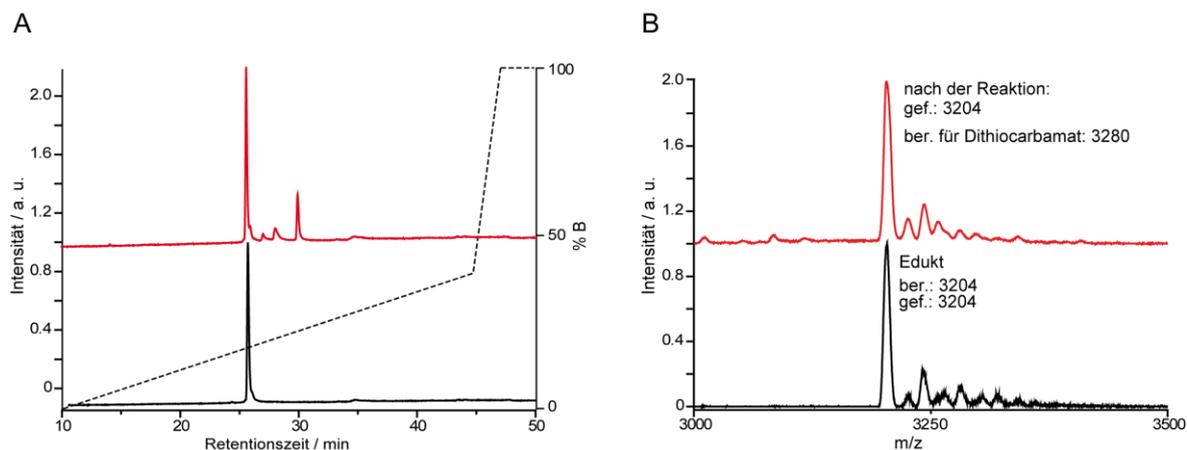


Abbildung 3.50: Analytische Daten zur Umsetzung von ODNN4a mit CS_2 . A) HPLC-Chromatogramm vor (schwarz) und nach der Reaktion (rot); gestrichelte Linie: Puffergradient B; B) MALDI-Spektrum vor (schwarz) und nach der Reaktion (rot).

Obwohl die HPLC-Analyse ein zusätzliches Signal bei etwa 30 min zeigt, war in der Massenanalyse nur die Molekülmasse des Eduktstrangs zu finden. Auch bei einer präparativen Auftrennung der Reaktion mittels HPLC und Analyse des neuen Signals wurde kein Produktsignal im MALDI-Massenspektrum gefunden.

Unter den getesteten Bedingungen fand keine Bildung der Dithiocarbamatfunktionalität am Aminnukleosid in der DNA statt. *C. Zöschinger*, der sich ebenfalls mit Umsetzungsreaktionen an denselben DNA-Strängen beschäftigte, beobachtete erst bei sehr großen pH-Werten (> 14) mehrfache CS_2 -Addukte im Massenspektrum.^[145] Dies bedeutet, dass die Mehrfachaddukte auf unspezifische Dithiocarbamatbildung auch an natürlichen DNA-Basen zurückzuführen sind. Eine selektive Reaktion mit dem carbazyklischen Amin war nicht möglich. Die Synthese des schwefelhaltigen Metall-Basenpaars konnte über diesen Weg nicht erreicht werden, daher müssen alternative Routen gefunden werden.

4. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, das Kupfer-Salenbasenpaar enzymatisch in DNA einzubauen und mittels PCR zu amplifizieren. Dazu wurde das entsprechende Salicylaldehydtriphosphat (dSTP) synthetisiert und gereinigt. Zuerst wurden mit der Polymerase Bst Pol I Primerverlängerungsreaktionen durchgeführt, wobei sich zeigte, dass die Anwesenheit von Ethylendiamin, das die Interstrangbrücke zwischen den gegenüberliegenden dS-Basen ausbildet, für eine effektive Verlängerung des dS:dS-Basenpaares nötig ist. Zudem wurden *mismatch*-Experimente zwischen dS und den natürlichen Basen durchgeführt und der Einfluss der Additive Ethylendiamin und Cu(II) auf die Selektivitäten untersucht. Vollverlängerungsexperimente, die mittels MALDI-Massenspektrometrie ausgewertet wurden, zeigten den korrekten Einbau des dSTP mit anschließender Verlängerung des Primers. Das Kupfer-Salenbasenpaar wurde dann in der PCR mit der Polymerase KOD XL eingesetzt. Die Auswertung mittels enzymatischen Totalverdau und LC-MS bewies, dass unter Zugabe von Ethylendiamin und Kupfersulfat erstmals erfolgreich die selektive und effiziente Replikation und Amplifizierung eines Metallbasenpaares gelang.

Um die Erweiterung des genetischen Codes durch das dS-Cu(II)-dS-Basenpaar weiterzuführen, wäre der nächste Schritt die Transkription in mRNA. Das benötigte RNA-Triphosphat STP wurde von *Pfaffeneder* in der Masterarbeit erfolgreich synthetisiert.^[146] Erste Versuche zur *in vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase bleiben bisher ohne Ergebnisse. Dies könnte daran liegen, dass die Polymerase wegen zu geringer Länge des Templates zu schnell dissoziiert, daher müssen längere Template getestet werden. Zudem stehen noch weitere Transkriptionspolymerasen zur Auswahl, die eingesetzt werden können.^[146]

Erfolgreich konnten drei Kristallstrukturen von Bst Pol I im Komplex mit modifizierter DNA erhalten werden. Struktur 1 zeigt die Salicylaldehydbase des Templatstrangs in der Präinsertionsstelle der Polymerase. In Struktur 2 befinden sich zwei nicht-paarende Salicylaldehydbasen gegenüberliegend im doppelsträngigen Bereich der DNA. Diese Struktur beweist, dass zwischen den Basen keine attraktiven Wechselwirkungen durch *interstrand stacking* auftreten. Die

Modifikation führt zu keinen konformationellen Änderungen der DNA. Die dritte Struktur zeigt ein vollständig ausgebildetes Kupfersalenbasenpaar. Die Ethylendiaminbrücke ist deutlich sichtbar und das Kupfer(II)ion sitzt mitten im Duplex. Anwesenheit und Position des Metallions wurden durch anormale Röntgenbeugung nachgewiesen.

Interessant wären noch die Strukturen mit dem Salenbasenpaar in der Postinsertionsstelle sowie ein ternärer Komplex zwischen Polymerase, DNA und ankommendem dSTP. Kristalle mit dem Salen in der PostIS waren in der aktiven Tasche nicht aufgelöst, das Basenpaar an der entscheidenden Stelle war ungeordnet. Ternäre Komplexe sind prinzipiell schwer zu kristallisieren, bisher konnten davon keine Kristalle erhalten werden. Für beide Strukturen werden weitere Kristallisationsansätze benötigt. Besonders interessant wären zudem Salenkomplexe mit Mangan(III). Da Mn(III) im Gegensatz zu Cu(II) eine sechsfache Koordination bevorzugt, wäre es interessant zu sehen, ob die zusätzlich benötigten axialen Liganden Wassermoleküle oder Atome der umgebenden kanonischen Basen sind. Allerdings befand sich bisher niemals Mn(III) in den darauf abzielenden Ansätzen.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Gaub wurden die mechanischen Eigenschaften des Kupfer-Salicylaldehyd-Basenpaars untersucht. Diese Vorstufe des Salenbasenpaars wird nur durch koordinative Bindungen vermittelt. Durch Anbindung der DNA an *slide* und *cantilever* eines AFM in der *shearing*-Geometrie konnte die Stabilität der modifizierten DNA ohne und mit Cu(II) gegen externe, mechanische Kräfte untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die wahrscheinlichste Abrisskraft durch die Komplexbildung von 50 auf 80 pN stieg. Untersuchungen am vollständig ausgebildeten Salenkomplex konnten aufgrund der Unverträglichkeit des AFM-Messpuffers mit Ethylendiamin (Niederschlagsbildung) leider nicht durchgeführt werden.

Zur Entwicklung eines neuen schwefelhaltigen Ligandosids wurde die Taktik der postsynthetischen Modifikation der DNA gewählt. Es gelang der Einbau verschiedener geschützter carbazyklischer Amine in DNA. Die Alloc-Schutzgruppe konnte erfolgreich und effektiv mit Pd(0) abgespalten werden. Dennoch gelang es nicht, das Amin in der DNA mit CS₂ zum Dithiocarbamat umzusetzen. Dieses

Thema wird von *C. Zöschinger* weitergeführt, der nun versucht die Nucleoside schon vor der DNA-Synthese mit Schwefel zu modifizieren und durch veränderte Bedingungen der Festphasensynthese die Oxidation des Schwefels zu unterbinden. Zudem erfolgen Untersuchungen zur Komplexbildung von Goldionen.

5. Experimenteller Teil

5.1 Chemische Synthese

5.1.1 Material und Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden Aluminium-Fertigplatten *Kieselgel 60 F₂₅₄* der Größe 5 x 10 cm der Firma *Merck* verwendet. Die Substanzen wurden unter UV-Licht (254 bzw. 366 nm) oder, bei Aminen, durch Anfärben mit Ninhydrin-Tauchreagenz (300 mg Ninhydrin in 100 mL *n*-Butanol und 3.00 mL Eisessig, Platte auf 100 °C erwärmen) sichtbar gemacht. Zum Nachweis auf Aldehyde wurde eine saure 2,4-Dinitrophenolhydrazinlösung in Ethanol verwendet.

HPL-Chromatographie (HPLC): Für analytische Umkehrphasen-Trennungen wurde eine *Waters* (2695 Separation Module, 996 Photodiode Array Detector, 2475 Multi λ Fluorescence Detector) mit *CC Nucleosil 100-3 C18*-Säule der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Präparative Oligonukleotidtrennungen wurden auf einer *Merck-Hitachi*-Anlage *LaChrome* (L-7420 UV-Vis-Detektor, L-7480 Fluoreszenzdetektor, L-7150 Pumpe, L-7000 Interfacemodul, L-7612 Lösungsmittelentgaser) an *CC205/4 Nucleosil 100-5 C18*-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* oder einer *Waters* (Alliance 2695 mit Photo Diode Array 2996 oder 996 und Fluoreszenz-Detektor 2475; Präparative HPLC 1525EF mit 2484 UV-Detektor) an *VP250/10 Nucleodur 100-5C18*-Säulen durchgeführt. Als Eluent wurde 0.1 M NH_4OAc in H_2O : MeCN verwendet.

Infrarot-Spektroskopie (IR): Zur Aufnahme stand ein Spectrum BX FT-IR-Spektrometer (*Perkin Elmer*) mit einer Diamant-ATR (*Attenuated Total Reflection*) Einheit zur Verfügung. Die Lage der Banden wird in cm^{-1} angegeben; die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *s* (stark), *m* (mittel) oder *w* (schwach) vermerkt.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): Kernresonanzspektren wurden, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufgenommen. 200 MHz-Kernresonanz-

spektren wurden an einem *Varian Oxford 200* aufgenommen, Kernresonanzspektren höherer Feldstärke wurden von der NMR-Abteilung des Departments Chemie der LMU München aufgenommen. Hierbei wurden folgende Geräte verwendet: *Bruker AC 300*, *Varian XL 400*, sowie *Bruker AMX 600*. In Klammern sind jeweils die Messfrequenz sowie das Lösungsmittel vermerkt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das entsprechende Lösungsmittelsignal als interner Standard dient. Bei ^{31}P -Spektren ist die chemische Verschiebung δ in ppm relativ zu 85 % H_3PO_4 angegeben, welche als externer Standard dient. Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), m (Multipllett), sowie deren Kombinationen, gekennzeichnet. Breiten Signalen wurde das Symbol br vorangestellt. Die Kopplungskonstante J ist in Hz angegeben. Die Signalzuordnungen erfolgten teilweise mit COSY-, DEPT-, HMBC- und HSQC-Spektren.

Lösungsmittel und Chemikalien: Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Acros* und *Fluka* mit einem Wassergehalt < 50 ppm bezogen. Ether wurde über Na/Benzophenon getrocknet und destilliert. Lösungsmittel, die in den betreffenden Abschnitten nicht als trocken gekennzeichnet wurden, und Chemikalien wurden von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Acros*, *Sigma* oder *Merck* in den kommerziell erhältlichen Qualitäten *puriss.*, *p.a.* oder *purum* bezogen. Lösungsmittel zum Ausschütteln und zur säulenchromatographischen Aufreinigung waren von technischer Qualität und wurden vor Gebrauch über Destillation gereinigt. Zum Einengen von Lösungsmittel wurde ein Rotationsverdampfer *Laborota 4000* der Firma *Heidolph* verwendet. Reaktionsprodukte wurden mindestens acht Stunden am Hochvakuum (10^{-2} – 10^{-3} mbar) getrocknet. Kleinere Mengen wässriger oder alkoholischer Lösungen wurden auch mit einer SpeedVac Plus SC110A (*Savant*) am Ölpumpenvakuum eingeengt. Wässrige Proben wurden in Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (*Christ ALPHA 2-4*).

Massenspektrometrie: Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI) wurden von der Abteilung Massenspektrometrie am Department für Chemie aufgenommen. Hierfür wurde ein *Varian MAT CH 7A* (70 eV) verwendet. Messungen von ESI-Massenspektren (ESI-ICR) kleiner Moleküle und der Oligonukleotide in Hochauflösung wurden an einem *Thermo Finnigan LTQ-FT*

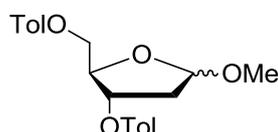
durchgeführt. Die Messungen der MALDI-ToF-Spektren wurden an einem *Bruker Autoflex II* (Beschleunigungsspannung 20 kV) durchgeführt. Als Matrix für Oligonukleotide wurde Hydroxypicolinsäure (HPA, 25 mg 3-Hydroxypicolinsäure, 5 mg Ammoniumcitrat und 5 μ L 15-Krone-5 in 0.5 mL H₂O) verwendet, für kleine Moleküle wurde auch mit 6-Aza-2-thiothymin (ATT, 14 mg auf 100 μ L H₂O : MeCN) als Matrix gemessen. Die Masse der detektierten Ionen wird in Abhängigkeit zur Ionenladung in der Form m/z angegeben.

Säulenchromatographie: Für Säulenchromatographie nach der *Flash*-Methode wurde *Kieselgel 60* von *Merck* (Korngröße 0.040–0.063 mm) verwendet. Die Kieselgelmengen richten sich nach den von *Still et al.* ausgearbeiteten Parametern.^[147] Die Elution erfolgte unter N₂-Überdruck bei Raumtemperatur.

5.1.2 Durchführung der Synthese

5.1.2.1 Synthese des Chloro-Zuckers

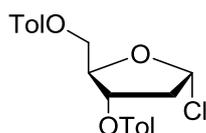
3,5-Di-*p*-toluoyl-methyl-2-desoxy-ribofuranosid **54**^[86, 87]



2-Desoxyribose (15.0 g, 112 mmol, 1 eq) wurde in 300 mL trockenem MeOH gelöst und mit 0.5 mL Acetylchlorid versetzt. Nach 30 min Rühren bei RT fügte man 5.0 g Ag₂CO₃ zu, um überschüssiges HCl abzufuffern. Das Ag₂CO₃ wurde abfiltriert, das Filtrat *in vacuo* eingengt und 2x mit je 4 mL Pyridin coevaporiert. Das erhaltene rot-schwarze Öl wurde in 90 mL Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend fügte man 29.6 mL Toluoylchlorid (224 mmol, 2 eq) zu und erwärmte für 2 h auf 45 °C. Die Lösung wurde dann mit 500 mL H₂O verdünnt und das Produkt mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mit H₂O, HCl (2 M) und ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 5 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **54** als farbloses Öl (18.5 g, 48 mmol, 43 %).

$R_f = 0.4$ (*i*Hex : EtOAc = 5 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.2\text{--}2.5$ (m, 2 H), 2.37 (s, 6 H), 3.41 (s, 3 H), 4.50–4.62 (m, 3 H), 5.18 (dd, 1 H), 5.38–5.45 (m, 1 H), 7.17–7.28 (m, 4 H), 7.88–7.98 (m, 4 H) ppm; **HRMS** (ESI^+ , $[\text{M}+\text{NH}_4^+]^+$): ber. für $[\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6]^+$: 402.1917, gef. 402.1903.

α -3,5-Di-*p*-toluoyl-methyl-2-desoxy-ribofuranosylchlorid **51**

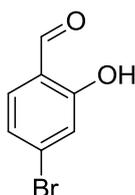


10.0 g des Ribofuranosids **54** (26 mmol, 1 eq) wurden in 30 mL Eisessig gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man fügte 1.4 mL H_2O sowie 5.4 mL Acetylchlorid zu und rührte für 15 min bei 0 °C. Es entstand ein starker, farbloser Niederschlag, bei Bedarf erfolgte das Animpfen der Lösung durch Zugabe einer kleinen Menge flüssigen Stickstoffs. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit trockenem Et_2O säurefrei gewaschen. Das Produkt wurde im Hochvakuum getrocknet, man erhielt 7.40 g des farblosen Feststoffs **51** (19.0 mmol, 73 %).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.41$ (s, 1 H), 2.70–2.95 (m, 2 H), 4.63 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz), 4.82–4.90 (m, 1 H), 5.52–5.59 (m, 1 H), 6.45 (d, 1 H, $J = 10$ Hz), 7.21–7.28 (m, 4 H), 7.87–8.01 (m, 4 H) ppm; **HRMS** (ESI^- , $[\text{M}+\text{OH}]^-$): ber. für $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{ClNO}_6]^-$: 405.1105, gef. 405.1128.

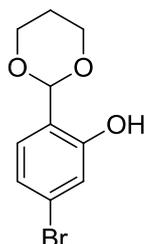
5.1.2.2 Synthese des Salicylaldehydnukleosidtriphosphats

Die Synthese des Salicylaldehydnukleosids richtet sich nach *Clever*.^[3, 75]

4-Brom-2-hydroxybenzaldehyd^[75] **81**

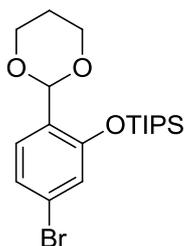
3-Bromphenol (10.0 g, 58 μ mol, 1 eq), trockenes MgCl_2 (8.3 g, 87 mmol, 1.5 eq) und Triethylamin (31.0 mL, 220 mmol, 4 eq) wurden in 250 mL trockenem Acetonitril gelöst und 30 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von Paraformaldehyd (11.7 g, 390 mmol, 6.7 eq) wurde die Mischung 7 h bei 90 °C refluxiert und anschließend weitere 12 h bei RT gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit 2 M Salzsäure auf pH = 1-2 angesäuert und zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 9 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **81** als gelbes Öl (8.5 g, 42 mmol, 72 %).

R_f = 0.4 (*i*Hex : EtOAc = 9 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.17 (dd, 1 H, J = 8.0, 1.7 Hz), 7.19 (d, 1 H, J = 1.7 Hz), 7.41 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 9.85 (s, 1 H), 11.11 (s, 1 OH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 119.9, 121.5, 123.9, 132.4, 134.9, 162.4, 196.2 ppm; **MS** (EI, pos., 70 eV): m/z = 200 $[\text{M}]^+$, 172 $[\text{M}-\text{CHO}]^+$.

5-Brom-2-([1,3]dioxan-2-yl)phenol^[75] **82**

4-Brom-2-hydroxybenzaldehyd (**81**, 4.04 g, 20 mmol, 1 eq), Triethylorthoformiat (3.7 mL, 22 mmol, 1.1 eq) und 1,3-Propandiol (6.1 g, 80 mmol, 4 eq) wurden mit einer katalytischen Menge von Tetra-*n*-butylammoniumtribromid (0.98 g, 2 mmol, 0.1 eq) vereinigt und 3 d bei RT gerührt. Anschließend wurde gesättigte NaHCO₃-Lsg. zugegeben, bis pH = 7 erreicht war. Die Lösung wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit verdünnter NaHCO₃-Lsg. gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 9 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **82** als gelbliches Öl (4.38 g, 17 mmol, 85 %).

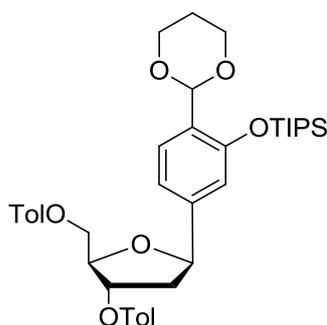
$R_f = 0.15$ (*i*Hex : EtOAc = 9 : 1); **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.50$ (d, 1 H, $J = 13.5$ Hz), 2.20-2.28 (m, 1 H), 3.98 (dt, 2 H, $J = 12.2, 2.4$ Hz), 4.28 (dd, 2 H, $J = 12.0, 5.0$ Hz), 5.58 (s, 1 H), 6.97 (dd, 1 H, $J = 8.3, 1.9$ Hz), 7.01 (d, 1 H, $J = 8.3$ Hz), 7.04 (d, 1 H, $J = 1.9$ Hz), 7.98 (s, 1 OH) ppm; **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 25.8, 67.7, 102.7, 120.6, 121.4, 123.0, 123.9, 129.2, 156.3$ ppm; **HRMS** (ESI⁺, [M+H]⁺): ber. für [C₁₀H₁₁BrO₃]⁺: 257.9892, gef. 257.9885.

(5-Brom-2-([1,3]dioxan-2-yl)phenoxy)triisopropylsilan^[75] **52**

Zu einer Lösung von 5-Brom-2-[1,3]dioxan-2-ylphenol (**82**, 8.76 g, 34 mmol, 1 eq) in trockenem Dichlormethan (200 mL) wurde $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$ (14.5 mL, 85 mmol, 2.5 eq) gegeben. Anschließend wurde bei 0 °C Triisopropylsilyltriflat (15.4 mL, 57 mmol, 1.7 eq) langsam zugetropft, die Lösung wurde dann 24 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch nach Wasserzugabe dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden erst mit H_2O , dann mit gesättigter NaCl -Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 30 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **52** als farbloses Öl (9.27 g, 22 mmol, 65 %).

$R_f = 0.6$ (*i*Hex : EtOAc = 9 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.13$ (d, 18 H, $J = 7.5$ Hz), 1.27–1.35 (m, 3 H), 1.41 (d, 1 H, $J = 13.4$ Hz), 2.17–2.25 (m, 1 H), 3.93 (dt, 2 H, $J = 11.7, 2.4$ Hz), 4.22 (dd, 2 H, $J = 10.6, 5.0$ Hz), 5.79 (s, 1 H), 6.93 (d, 1 H, $J = 1.9$ Hz), 7.09 (dd, 1 H, $J = 8.3, 1.9$ Hz), 7.45 (d, 1 H, $J = 8.3$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.2, 18.2, 26.0, 67.8, 97.2, 121.7, 122.8, 124.3, 128.4, 128.9, 154.0$ ppm; **HRMS** (ESI⁺, $[\text{M}+\text{H}^+]^+$): ber. für $[\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{BrO}_3\text{Si}]^+$: 415.1304, gef. 415.1305.

β -3',5'-Bistoluoyl-2'-desoxy-1'-[4-([1,3]dioxan-2-yl)-3-triisopropylsilyloxyphenyl]-ribose^[75] **50**

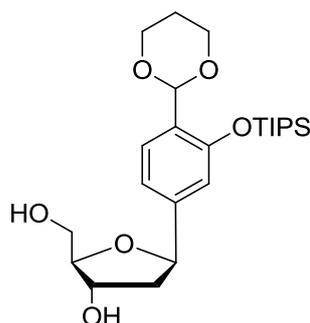


Zu einer Lösung von **52** (7.10 g, 17.1 mmol, 3 eq) in frisch destilliertem Diethylether (40 mL) wurde bei -78 °C *tert*Butyllithium (1.6 M in Hexan, 23 mL, 36.8 mmol, 6.5 eq) langsam zugetropft. Nach 3 h Rühren bei -78 °C wurde die

Lösung durch eine Kanüle in einen zweiten, auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlten Kolben überführt, in dem der Kupfer(I)bromid-Dimethylsulfid-Komplex (1.80 g, 8.8 mmol, 1.5 eq) in trockenem Diethylether (10 mL) suspendiert worden war. Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig auf ungefähr $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ angewärmt, bis sich eine klare gelbe Lösung gebildet hatte. Diese wurde sofort durch eine Kanüle in eine auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlte Lösung von α -3',5'-Bistoluoyl-2'-desoxy-1'-ribosylchlorid (**51**, 2.20 g, 5.7 mmol, 1.0 eq) in trockenem Dichlormethan (20 mL) überführt. Nachdem sich das Reaktionsgemisch über Nacht auf RT erwärmt hatte, wurden gesättigte Ammoniumchloridlösung (20 mL), 2 M Ammoniaklösung (1 mL) und Diethylether (100 mL) zugegeben. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde die wässrige Phase, zweimal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden zweimal mit H_2O , dann mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, *i*Hex : EtOAc = 9 : 1) aufgereinigt: und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt das gewünschte β -Anomer **50** als farbloses Öl (1.21 g, 1.8 mmol, 32 %).

$R_f = 0.3$ (*i*Hex : EtOAc = 4 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.04$ (dd, 18 H, $J = 7.5, 1.8$ Hz), 1.18–1.26 (m, 3 H), 1.39 (d, 1 H, $J = 13.5$ Hz), 2.09 (ddd, 1 H, $J = 13.9, 11.1, 5.9$ Hz), 2.15–2.24 (m, 1 H), 2.37 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 2.49 (dd, 1 H, $J = 13.9, 5.0$ Hz), 3.92 (dt, 2 H, $J = 12.2, 2.2$ Hz), 4.20 (dd, 2 H, $J = 11.4, 4.8$ Hz), 4.50–4.55 (m, 3 H), 5.18 (dd, 1 H, $J = 11.0, 4.9$ Hz), 5.54 (d, 1 H, $J = 5.8$ Hz), 5.84 (s, 1 H), 6.88 (d, 1 H, $J = 1.2$ Hz), 6.92 (dd, 1 H, $J = 8.0, 1.2$ Hz), 7.18 (d, 2 H, $J = 7.9$ Hz), 7.25 (d, 2 H, $J = 7.9$ Hz), 7.53 (d, 1 H, $J = 7.9$ Hz), 7.88 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz), 7.95 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.2, 18.2, 21.9, 22.1, 26.1, 42.0, 65.2, 67.8, 77.3, 80.5, 83.0, 97.5, 115.4, 118.4, 127.2, 127.5, 128.4, 129.4, 129.6, 129.6, 129.9, 130.0, 142.9, 144.0, 144.3, 153.5, 166.3, 166.6$ ppm; **HRMS** (ESI⁺, $[\text{M}+\text{H}]^+$): ber. für $[\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Si}]^+$: 689.3510, gef. 689.3524.

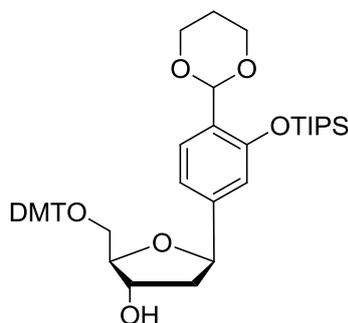
β -2'-Desoxy-1'-[4-([1,3]dioxan-2-yl)-3-triisopropylsilyloxyphenyl]ribose^[75] **83**



Zu einer Lösung des geschützten Salicylaldehyd-Nukleosids (**50**, 540 mg, 0.78 mmol, 1 eq) in trockenem Methanol (10 mL) wurde K_2CO_3 (240 mg, 1.70 mmol, 2.2 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt, bis sich der Feststoff vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde mit Chloroform (35 mL) und Wasser (35 mL) verdünnt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 35 mL Chloroform extrahiert, die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes (Kieselgel; $CHCl_3$: MeOH = 20 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **83** als farbloses Öl (299 mg, 0.66 mmol, 85 %).

R_f = 0.4 ($CHCl_3$: MeOH = 9 : 1); **1H -NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.10 (d, 18 H, J = 7.5 Hz), 1.25–1.32 (m, 3 H), 1.39 (d, 1 H, J = 13.5 Hz), 1.85–1.91 (m, 1 H), 2.15–2.24 (m, 2 H), 3.65–3.70 (m, 1 H), 3.76 (d, 1 H, J = 11.5 Hz), 3.92 (dt, 2 H, J = 12.2, 2.4 Hz), 3.98 (dt, 1 H, J = 4.6, 2.8 Hz), 4.20 (ddd, 2 H, J = 11.8, 5.0, 1.2 Hz), 4.34–4.36 (m, 1 H), 5.09 (dd, 1 H, J = 10.1, 5.7 Hz), 5.84 (s, 1 H), 6.78 (d, 1 H, J = 1.6 Hz), 6.88 (dd, 1 H, J = 8.0, 1.6 Hz), 7.53 (d, 1 H, J = 8.0 Hz) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 13.2, 18.3, 26.1, 44.4, 63.8, 67.8, 73.9, 79.8, 87.4, 97.5, 115.8, 118.4, 127.6, 128.3, 143.6, 153.4 ppm; **HRMS** (ESI⁺, $[M+H]^+$): ber. für $[C_{24}H_{41}O_6Si]^+$: 453.2672, gef. 453.2677.

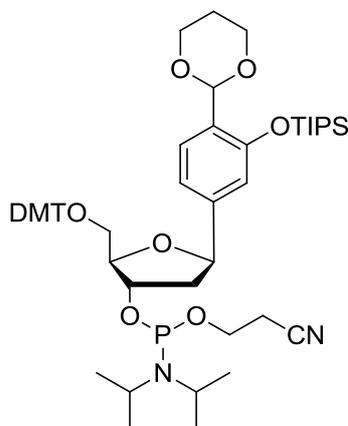
β -2'-Desoxy-1'-[4-([1,3]dioxan-2-yl)-3-triisopropylsilyloxyphenyl]-5'-O-dimethoxytritylribose^[75] **84**



595 mg (1.3 mmol) **83** wurden zweimal mit 10 mL trockenem Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde das Edukt in 20 mL trockenem Pyridin gelöst und 2 h über Molsieb (4 Å) gerührt. Man gab 483 mg (1.4 mmol, 1.1 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu und rührte 2 h bei RT. Die Reaktion wurde durch 1 h Rühren mit 5 mL MeOH bei RT für 1 h abgepuffert. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 4 : 1 + 1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man **84** als farblosen Schaum (683 g, 0.9 mmol, 70 %).

R_f = 0.4 (*i*Hex : EtOAc = 1 : 1); **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.08 (dd, 18 H, J = 7.5, 2.8 Hz), 1.22–1.30 (m, 3 H), 1.40 (d, 1 H, J = 13.5 Hz), 1.80 (d, 1 H, J = 2.0 Hz), 1.86 (m, 1 H), 2.14–2.25 (m, 2 H), 3.16 (dd, 1 H, J = 9.5, 6.9 Hz), 3.38 (dd, 1 H, J = 2.6, 4.6 Hz), 3.79 (s, 6 H), 3.92 (dt, 2 H, J = 12.4, 2.4 Hz), 4.00 (m, 1 H), 4.20 (d, 2 H, J = 11.4 Hz), 4.35 (d, 1 H, J = 3.1 Hz), 5.08 (dd, 1 H, J = 9.9, 5.6 Hz), 5.84 (s, 1 H), 6.78 (d, 1 H, J = 1.2 Hz), 6.88 (d, 1 H, J = 8.8 Hz), 7.21 (t, 1 H, J = 7.2 Hz), 7.26 (t, 2 H, J = 7.2 Hz), 7.34 (d, 4 H, J = 8.8 Hz), 7.43 (d, 2 H, J = 7.2 Hz), 7.52 (d, 1 H, J = 8.0 Hz) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.2, 18.2, 26.2, 43.7, 55.3, 64.5, 67.7, 75.0, 79.6, 86.3, 86.4, 97.5, 113.3, 115.8, 118.3, 126.9, 127.4, 128.0, 128.3, 130.2, 136.2, 143.9, 144.9, 153.1, 158.6 ppm; **HRMS** (ESI⁺, [M+H]⁺): ber. für [C₂₄H₄₁O₆Si]⁺: 453.2672, gef. 453.2677.

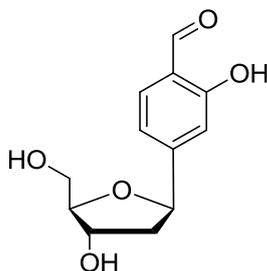
β -2'-Desoxy-1'-[4-([1,3]dioxan-2-yl)-3-triisopropylsilyloxyphenyl]-5'-O-dimethoxytrityl3'-O-(2'-cyanoethyl)phosphoramidit-ribose^[75] **60**



300 mg (0.39 mmol) **84** wurden zweimal mit 5 mL trockenem THF coevaporiert. Man löste das Edukt in 8 mL trockenem THF und gab 272 μ L (1.6 mmol, 4 eq) NEt(*i*Pr)₂ sowie 151 μ L (0.67 mmol, 1.7 eq) (*i*Pr₂N)(OCH₂CH₂CN)PCl (CEDCI) zu. Man rührte etwa 1 h bei RT (farbloser Niederschlag). Anschließend entfernte man das Lösemittel *in vacuo* und löste den Rückstand in entgastem EtOAc. Zur Reinigung filtrierte man das Rohprodukt unter Schutzgas über Kieselgel (desaktiviert, *i*Hex : EtOAc = 3 : 1 + 1 % Pyridin) und trocknete das Produkt im Hochvakuum. Man erhielt **60** (325 mg, 0.33 mmol, 85 %) als farblosen Schaum.

R_f = 0.1 (Doppelspot, *i*Hex : EtOAc = 9 : 1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.07 (d, 18 H, J = 7.4 Hz), 1.08–1.30 (m, 17 H), 1.40 (d, 1 H, J = 13.4 Hz), 1.80 (ddd, 1 H, J = 5.9, 11.0, 12.8 Hz), 2.14–2.33 (m, 2 H), 2.47 (dd, 1 H, J = 6.5, 2.3 Hz), 2.61 (t, 1 H, J = 6.3 Hz), 3.13–3.31 (m, 2 H), 3.52–3.65 (m, 2 H), 3.68–3.75 (m, 1 H), 3.79 (s, 6 H), 3.92 (dt, 2 H, J = 12.4, 2.2 Hz), 4.21 (dd, 1 H, J = 11.6, 5.7 Hz), 4.45 (dd, 1 H, J = 10.8, 6.0 Hz), 5.01–5.08 (m, 1 H), 5.84 (s, 1 H), 6.73 (dd, 1 H, J = 4.3, 1.2 Hz), 6.78–6.83 (m, 4 H), 6.96–7.03 (m, 1 H), 7.17–7.21 (m, 1 H), 7.24–7.35 (m, 6 H), 7.40–7.47 (m, 2 H), 7.50–7.56 (m, 1 H) ppm; ³¹P-NMR (80 MHz, CDCl₃): δ = 149.0, 149.5 ppm; HRMS (ESI⁺, [M+H]⁺): ber. für [C₅₄H₇₆N₂O₉PSi]⁺: 955.5058, gef. 955.5053.

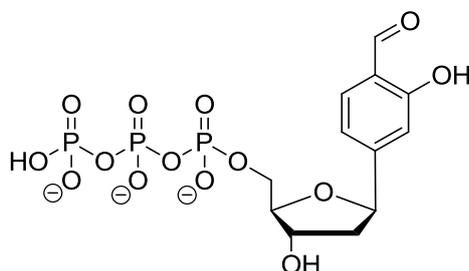
Salicylaldehyd-Nukleosid; (4-(β -2'-Desoxyriboseyl)-2-hydroxybenzaldehyd)^[75] **49**



Das toluoyl-entschützte Salicylaldehyd-Nukleosid (**83**, 79 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq) wurde in trockenem THF (2 mL) gelöst und nach Zugabe von Tetrabutylammoniumfluorid (1.0 M in THF, 0.30 mL, 0.30 mmol, 1.7 eq) 3 h bei RT gerührt. Dann wurden konzentrierte Salzsäure (0.2 mL) und 1 Tropfen Wasser zugegeben und es wurde weitere 2 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 10 mL Wasser wurde das Gemisch dreimal mit Diethylether (je 20 mL) extrahiert; die vereinigten organischen Extrakte wurden anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes (Kieselgel; CHCl₃ : MeOH = 9 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **49** als farblosen, kristallinen Feststoff (23 mg, 0.10 mmol, 59 %).

R_f = 0.3 (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1); **¹H-NMR** (200 MHz, CD₃OD): δ = 1.88 (ddd, 1 H, J = 13.1, 10.4, 5.8 Hz), 2.24 (ddd, 1 H, J = 13.1, 5.6, 1.7 Hz), 3.66 (dd, 2 H, J = 5.1, 1.4 Hz), 3.96 (dt, 1 H, J = 5.1, 2.4 Hz), 4.30 (td, 1 H, J = 5.8, 2.0 Hz), 5.12 (dd, 1 H, J = 10.4, 5.8 Hz), 6.99–7.08 (m, 2 H), 7.64 (d, 1 H, J = 7.9 Hz), 9.97 (s, 1 H) ppm; **¹³C-NMR** (75 MHz, CD₃OD): δ = 44.81, 64.01, 74.28, 80.85, 89.50, 115.13, 118.50, 121.87, 134.11, 153.82, 162.79, 196.86 ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M-H⁺]⁻): ber. für [C₁₂H₁₃O₅]⁻: 237.0763, gef. 237.0768.

Salicylaldehydnukleosid-5'-triphosphat (dSTP); (β -2'-Desoxy-1'-(3-hydroxy-4-formylphenyl)ribose-5'-triphosphat) **48**

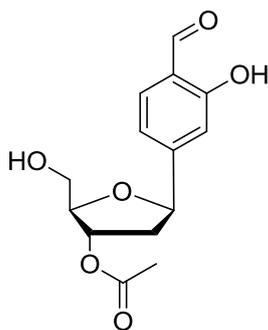


Das Salicylaldehyd-Nukleosid (**48**, 30 mg, 0.126 mmol, 1.0 eq) und der Protonenschwamm (41 mg, 0.189 mmol, 1.5 eq) wurden zusammen über Nacht am Hochvakuum getrocknet und dann in Phosphorsäuretrimethylester (2 mL) gelöst. Das PO(OMe)₃ war zuvor über Nacht über Molsieb 3 Å gerührt worden. Anschließend wurde bei 0 °C POCl₃ (14 μ L, 0.151 mmol, 1.2 eq) langsam zutropft und 3 h bei 0 °C gerührt. Dann wurde eine Lösung von Tributylammoniumpyrophosphat (299 mg, 0.630 mmol, 5 eq) und Tributylamin (300 μ L, 1.26 mmol, 10 eq) in DMF (1.30 mL) bei 0 °C zugegeben, welche zuvor über Nacht über Molsieb 3 Å gerührt worden war. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei 0 °C gerührt, danach wurde Triethylammoniumbicarbonat-Lösung (1 M, 8 mL) zugegeben und erst 1 h bei 0 °C, dann bei RT gerührt. Abschließend wurde das Lösungsmittel am Lyophilisator entfernt. Die weitere Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte via rp-HPLC mit einem Gradienten der Puffer A (0.1 M NH₄Et₃OAc in H₂O) und B (0.1 M NH₄Et₃OAc in Acetonitril : H₂O = 80 : 20). Es wurde eine semipräparative (VP 250-10 Nucleodur 100-7 C18, Fluss 5 mL/min) oder eine präparative Trennsäule (VP 250-21 Nucleosil 100-7 C18, Fluss 10 mL/min, *Macherey-Nagel*) verwendet. Die Isolierung des Triphosphates **48** gelang nach drei Trennungen. Das lyophilisierte Rohprodukt wurde in 2 mL Wasser gelöst und in zwei Aliquote (I und II) aufgeteilt. Beide Aliquote wurden zunächst auf der semipräparativen Trennsäule mit einem Gradienten von 0–30 % B in 50 min (I) bzw. 60 min (II) aufgetrennt gewählt. Die Retentionszeiten der das dSTP (**48**) enthaltenden Fraktionen betragen 26.5–32.0 min (I) und 31.0–36.5 min (I). Diese Fraktionen wurden jeweils vereinigt, eingengt und auf der präparativen Trennsäule mit einem Gradienten von 0–20 % B in 110 min weiter aufgetrennt.

48 eluierte zwischen 79 und 81 min (I und II). Die Fraktionen mit besonders hohem dSTP-Anteil aus beiden Trennungen wurden vereinigt, eingengt und zusammen ein weiteres Mal auf der präparativen Trennsäule getrennt. Das gewünschte Produkt **48** eluierte bei gleichem Laufmittelgradienten zwischen 71.0 und 74.4 min, die Fraktionen mit einer Retentionszeit zwischen 71.0 und 72.2 min enthielten das dSTP ohne weitere Verunreinigungen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels an der Lyophylle erhielt man das Salicylaldehydnukleosid-5'-triphosphat (**48**) als gelbes Öl (1.2 mg, 0.025 mmol, 2 %).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.96 (ddd, 1 H, J = 13.8, 10.6, 5.8 Hz), 2.17 (dd, 1 H, J = 13.8, 1.7 Hz), 3.98 (ddd, 2 H, J = 5.8, 4.6, 2.8 Hz), 4.06–4.10 (m, 1 H), 4.42 (td, 1 H, J = 5.6, 1.9 Hz), 5.06 (dd, 1 H, J = 10.6, 5.8 Hz), 6.96 (d, 1 H, J = 6.96, 1.5 Hz), 7.00 (dd, 1 H, J = 8.0, 1.5 Hz), 7.60 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 9.80 (s, 1 H) ppm; **³¹P-NMR** (160 MHz, D₂O, proton-gekoppelt): δ = -10.7 (d, 1 P, $^2J_{P-P}$ = 20 Hz, P_γ), -11.3 (td, 1 P, $^2J_{P-P}$ = 20 Hz, $^3J_{P-H}$ = 6 Hz, P_α), -23.4 (t, 1 P, $^2J_{P-P}$ = 20 Hz, P_β) ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M-H⁺]⁻): ber. für [C₁₂H₁₆O₁₄P₃]⁻: 476.9753, gef. 476.9754.

4-(β-3'-Acetyl-2'-desoxyriboseyl)-2-hydroxybenzaldehyd **57**

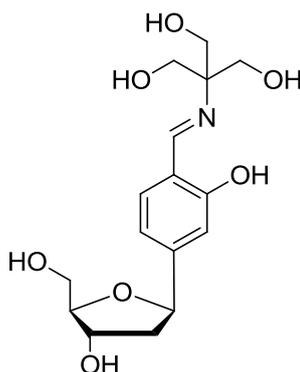


Das Salicylaldehyd-Nukleosid (**49**, 71 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) und Vinylacetat (31 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq) wurden in THF (6 mL) gelöst. Nach Zugabe von Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (15156 U/g, immobilisiert auf Keramikpartikeln, 85 mg) wurde die Suspension 3.5 h bei 35 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Lösung *in vacuo* eingengt. Nach säulenchromatographischer

Aufreinigung des Rohproduktes (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 2 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **57** als gelbliches Öl (52 mg, 0.19 mmol, 63 %).

$R_f = 0.3$ (*i*Hex : EtOAc = 1 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.04$ (ddd, 1 H, $J = 13.9, 10.9, 6.5$ Hz), 2.40 (ddd, 1 H, $J = 13.8, 5.3, 1.1$ Hz), 2.13 (s, 1 H), 3.86 (t, 2 H, $J = 3.7$ Hz), 4.12 (dt, 1 H, $J = 4.2, 2.4$ Hz), 5.11 (dd, 1 H, $J = 10.9, 5.3$ Hz), 5.24 (d, 1 H, $J = 7.9$), 6.98–7.05 (m, 2 H), 7.55 (d, 1 H, $J = 7.9$), 9.88 (s, 1 H), 11.06 (s, 1 H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): $\delta = 21.1, 41.1, 63.2, 76.5, 79.6, 85.9, 114.6, 117.2, 120.1, 134.0, 150.8, 161.8, 170.9, 196.0$ ppm; **HRMS** (ESI $^-$, $[\text{M}-\text{H}^+]^-$): ber. für $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_6]^-$: 279.0874, gef. 279.0872.

β -2'-Deoxy-1'-(3-hydroxy-4-((tris(hydroxymethyl)methyl)iminomethyl)phenyl)-ribose **61**



Das Nukleosid (**49**) (14 mg, 0.05 mmol) wurde in 5 mL Methanol (trocken) gelöst und mit Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (6.0 mg, 0.05 mmol) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Die Farbe der Lösung änderte sich von einem schwachen zu einem tiefem Gelb. Nach Entfernen des Lösemittels *in vacuo* erhielt man 17 mg **61** (0.05 mmol, quant.) als gelbes Öl.

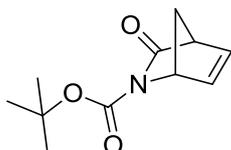
IR (FT-IR) $\nu = 3302s, 2924m, 2876m, 1627s, 1524m, 1481w, 1468w, 1453w, 1431w, 1368w, 1348w, 1312w, 1160w, 1087w, 1042s, 919w, 875w, 799w, 746w, 620w$ cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) $\delta = 1.88$ (ddd, 1 H, $J = 5.91, 10.44, 13.11$ Hz, H2'b), 2.17 (dd, 1 H, $J = 6.41, 12.23$ Hz, H2'a), 3.62–3.66 (m, 2 H, C5'), 3.80 (s, 6 H, $\text{CH}_{2\text{tris}}$), 3.92 (td, 1 H, $J = 2.46, 5.24, 5.22$ Hz, H4'), 4.27 (d, 1 H, $J =$

5.93 Hz, H_{3'}), 5.02 (dd, 1 H, $J = 5.48, 10.37$ Hz, H_{1'}), 6.70 (d, 1 H, $J = 8.13$ Hz, H_{ar}), 6.78 (s, 1 H, H_{ar}), 7.27 (d, 1 H, $J = 8.13$ Hz, H_{ar}), 8.52 (s, 1 H, H_{CN}) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CD₃OD) $\delta = 169.32$ (C_{ar}OH), 164.54 (CN), 149.51 (C_{ar,q}), 133.03 (C_{ar}), 116.32 (C_{ar}), 116.27, 113.60 (C_{ar}), 87.83 (C_{4'}), 79.72 (C_{1'}), 72.86 (C_{3'}), 66.11 (C_{Tris,q}), 63.42 (CH₂), 61.50 (CH₂), 60.88 (CH₂), 56.49 (CH₂), 43.15 (C_{2'}) ppm; **HRMS** (ESI⁺, [M+K⁺]⁺): ber. für [C₁₆H₂₄NO₇]⁺: 342.1553, gef. 342.1546.

5.1.2.3 Synthese eines geschützten carbazyklischen Aminnukleosidphosphoramidits

Die Synthese bis zum freien carbazyklischen Amin erfolgte nach Ober.^[117]

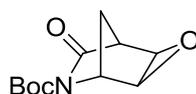
tert-Butyl-(1*R*,4*S*)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxylat^[137] **65**



Der Azabicyklus **66** (4.0 g, 36.6 mmol), Boc₂O (15.0 g, 73.4 mmol, 2 eq) und DMAP (4.46 g, 36.6 mmol, 1 eq) wurden in trockenem THF gelöst und bei RT 3 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, das tieforange Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 4 : 1) gereinigt und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 7.52 g **65** als farblosen Feststoff (36.0 mmol, 98 %).

$R_f = 0.3$ (*i*Hex : EtOAc = 4 : 1); **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.49$ (s, 9 H), 2.13 (d, 1 H, $J = 8.5$ Hz), 2.33 (d, 1 H, $J = 8.5$ Hz), 3.34–3.40 (m, 1 H), 4.99–4.98 (m, 1 H), 6.62–6.69 (m, 1 H), 6.85–6.92 (m, 1 H) ppm; **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 27.8, 54.2, 54.9, 62.4, 82.4, 138.2, 139.9, 150.2, 176.2$ ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M-H⁺]⁻): ber. für [C₁₁H₁₆NO₃]⁻: 210.1130, gef. 210.1128.

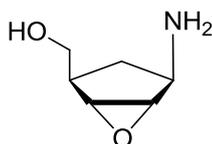
tert-Butyl-(1*S*,2*R*,4*S*,5*R*)-7-oxo-3-oxa-6-azatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octan-6-carboxylat^[137] **64**



Der Boc-geschützte Azabicyklus **65** (7.74 g, 36.6 mmol) wurde in 300 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man gab *m*Chlorperbenzoesäure (27.0 g, 91.5 mmol, 2.5 eq) zu und rührte 3 d bei RT. Das Reaktionsgemisch wurde mit Na₂CO₃, NaHCO₃ sowie H₂O gewaschen, um die überschüssige *m*CPBA zu entfernen, und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 4 : 1) gereinigt und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 7.85 g **64** (34.9 mmol, 95 %) als farblosen Feststoff.

$R_f = 0.4$ (*i*Hex : EtOAc = 4 : 1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.48$ (s, 9 H), 1.62 (d, 1 H, $J = 10.5$ Hz), 1.79 (d, 1 H, $J = 10.5$ Hz), 3.03–3.04 (m, 1 H), 3.59 (dd, 1 H, $J = 3.0, 1.2$ Hz), 3.75 (dd, 1 H, $J = 3.0, 1.2$ Hz), 4.59–4.61 (m, 1 H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 27.1, 28.0, 48.3, 50.0, 53.1, 58.9, 83.3, 149.7, 173.5$ ppm; HRMS (ESI⁺, [M+K⁺]⁺): ber. für [C₁₁H₁₅KNO₄]⁺: 264.0638, gef. 264.0633.

tert-Butyl-*N*-[(1*S*,2*R*,4*R*,5*S*)-4-(hydroxymethyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl]-carbammat^[137] **63**

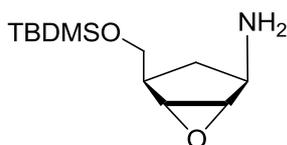


64 (7.85 g, 34.9 mmol) wurde in 250 mL MeOH gelöst, auf 0 °C gekühlt und unter Rühren vorsichtig und portionsweise mit NaBH₄ (6.61 g, 174.3 mmol, 5 eq) versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde mit HOAc conc. neutralisiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in NH₄Cl aufgeschlämmt

und mit CHCl_3 extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man 6.69 g **63** (29.2 mmol, 84 %) als farblosen Feststoff.

$R_f = 0.1$ (*i*Hex : EtOAc = 3 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.43\text{--}1.62$ (m, 1 H), 1.45 (s, 9 H), 1.75–1.91 (br s, 1 H), 2.05–2.20 (m, 1 H), 2.41 (ddd, 1 H, $J = 2.3, 3.6, 9.2$ Hz), 3.42 (s, 2 H), 3.68 (dd, 1 H, $J = 3.6, 10.1$ Hz), 3.92 (dd, 1 H, $J = 2.3, 10.1$ Hz), 4.18–4.36 (m, 1 H), 5.84 (d, 1 H, $J = 6.3$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.3, 32.5, 40.3, 49.7, 59.2, 59.8, 62.7, 79.2$ ppm; **HRMS** (ESI⁺, $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$): ber. für $[\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NaNO}_4]^+$: 252.1212, gef. 252.1221.

tert-Butyl-*N*-[(1*S*,2*R*,4*R*,5*R*)-4-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]-6-oxa-bicyclo-[3.1.0]hex-2-yl]carbamat^[137] **85**

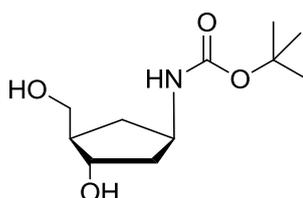


Der Alkohol **63** (6.69 g, 29.2 mmol) wurde mit Imidazol (4.37 g, 64.2 mmol, 2.2 eq) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (9.76 g, 64.2 mmol, 2.2 eq) in DMF (120 mL) gelöst und 3 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von EtOAc (80 mL) wurde 2x mit ges. wässriger NaHCO_3 -Lsg. sowie einmal mit ges. wässriger NaCl -Lsg. gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo*, wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Kieselgel; *i*Hex : EtOAc = 9 : 1) gereinigt. Man erhielt 9.2 g **85** (26.9 mmol, 92 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.3$ (*i*Hex : EtOAc = 9 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.15$ (s, 6 H), 0.90 (s, 9 H), 1.34 (d, 1 H, $J = 14.0$ Hz), 1.41 (s, 9 H), 2.06–2.91 (m, 1 H), 2.32–2.39 (m, 1 H), 3.44 (d, 1 H, $J = 2.0$ Hz), 3.39 (d, 2 H, $J = 2.0$ Hz), 3.62 (dd, 1 H, $J = 2.8, 10.9$ Hz), 3.91 (dd, 1 H, $J = 2.8, 10.9$ Hz), 4.21–4.29 (m, 1 H), 5.74 (br d, 1 H, $J = 9.4$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.3, -5.2, 18.2, 26.1, 28.3, 32.9,$

40.4, 49.8, 59.4, 59.7, 63.8, 79.3 ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M+HCO₂]⁻): ber. für [C₁₈H₃₄NO₆Si]⁻: 388.2155, gef. 388.2159.

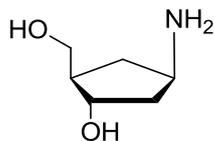
tert-Butyl-*N*-[(1*R*,3*S*,4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]carbamat^[137] **67**



Das Epoxid **63** (6.98 g, 20.3 mmol) wurde in wasserfreiem Toluol (140 mL) gelöst und auf sieben Kolben verteilt (< 1 g pro Kolben). Man gab bei 0 °C jeweils 1.95 mL Red-Al[®] (65% Lsg. in Toluol, gesamt: 70.8 mmol, 2.5 eq) hinzu. Es wurde 3 h bei RT gerührt, wobei ein grobkristalliner Niederschlag ausfiel. Anschließend wurde jeweils mit ges. wässriger NH₄Cl-Lsg. (20 mL) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionsgemische wurde vereinigt, mit EtOAc verdünnt und mit ges. wässriger NaCl-Lsg. solange gewaschen, bis die organische Phase klar war. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc rückextrahiert und das Extrakt mit ges. wässriger NaCl-Lsg. gewaschen. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; CHCl₃ : MeOH = 9 : 1) erhielt man 1.77 g **67** (7.66 mmol, 38 %) als farblosen Feststoff.

R_f = 0.2 (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1); **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.02–1.21 (m, 1 H), 1.44 (s, 9 H), 1.80–2.11 (m, 4 H), 2.20 (br s, 1 H), 2.24–2.38 (m, 1 H), 3.57–3.67 (m, 1 H), 3.69–3.85 (m, 1 H), 4.00–4.25 (m, 2 H), 4.58 (br, 1 H) ppm; **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ = 28.3, 34.9, 40.8, 49.3, 49.9, 64.7, 73.2, 80.9, 155.9 ppm; **HRMS** (ESI⁺, [M+H]⁺): ber. für [C₁₁H₂₂NO₄]⁺: 232.1549, gef. 232.1552.

(1*S*,2*R*,4*R*)-4-Amino-2-(hydroxymethyl)cyclopentanol^[137] **47**

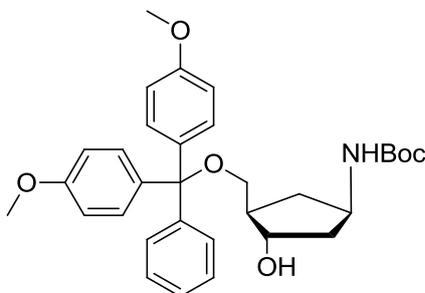


Man suspendierte **67** (1.27 g, 5.5 mmol) in sorgfältig entgastem Wasser (bidestilliert, 20 mL) und entgaste das Gemisch nochmals. Es wurde unter Rückfluss und Sauerstoffausschluss über Nacht gekocht und das Wasser anschließend *in vacuo* entfernt. Man erhielt 0.786 g **47** (5.5 mmol, quant.) in Form eines leicht bräunlichen Feststoffs.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.93 (dt, 1 H, J = 7.4, 12.7 Hz), 1.44 (dt, 1 H, J = 7.4, 12.7 Hz), 1.61 (ddd, 1 H, J = 4.7, 6.9, 12.8 Hz), 1.73–1.82 (m, 1 H), 1.97 (dt, 1 H, J = 7.5, 12.7 Hz), 3.27–3.35 (m, 2 H), 3.39 (dd, 1 H, J = 5.5, 10.4 Hz), 3.88 (dt, 1 H, J = 4.7, 6.5 Hz), 4.36 (br, 2 H) ppm; **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 38.3, 45.1, 49.9, 50.3, 63.4, 72. ppm; **MS** (EI, pos., 70 eV): m/z = 130 [M]⁺.

Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe

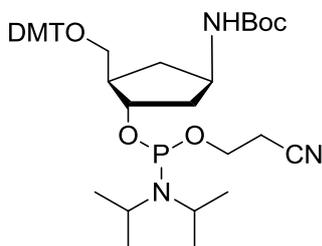
tert-Butyl-[(1*R*,3*R*,4*S*)-3-[[dimethoxytrityl]oxy]methyl]-4-hydroxycyclopentyl]-carbamat **68**



1.00 g (4.33 mmol) des carbazyklischen Boc-Carbamats **67** wurden zweimal mit 10 mL trockenem Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde das Edukt **67** in 30 mL trockenem Pyridin gelöst und 2 h über Molsieb (4 Å) gerührt. Man gab 1.61 g (4.76 mmol, 1.1 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu und rührte 2 h bei RT. Die Reaktion wurde durch Rühren mit 20 mL MeOH bei RT für 1 h gequenchet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie (Kieselgel; DCM : MeOH = 50 : 1 + 1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man **68** als farblosen Schaum (2.27 g, 4.20 mmol, 98 %).

$R_f = 0.1$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1); **IR** (FT-IR) $\nu = 3394_{br\ s}, 2968_w, 1704_s, 1607_m, 1583_w, 1507_s, 1456_w, 1445_m, 1415_w, 1391_w, 1363_m, 1296_m, 1244_s, 1221_m, 1172_s, 1114_w, 1067_m, 1031_s, 901_w, 827_s, 790_m, 754_m, 727_m, 701_m\text{ cm}^{-1}$; **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.96\text{--}1.09$ (m, 1 H), 1.43 (s, 9 H), 1.72–1.83 (m, 1 H), 1.96–2.07 (m, 1 H), 2.07–2.15 (m, 1 H), 2.18–2.31 (m, 1 H), 3.03 (t, 1 H, $J = 5.3$ Hz), 3.28–3.38 (m, 1 H), 3.73–3.79 (m, 1 H), 3.83 (s, 6 H), 4.01–4.20 (m, 1 H), 4.48 (br s, 1 H), 6.81–6.89 (d, 4 H, $J = 8.9$ Hz), 7.20–7.36 (m, 7 H), 7.38–7.45 (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz), 8.63 (br d, 1 H, $J = 5.4$ Hz) ppm; **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 25.6, 28.4, 41.5, 47.0, 55.2, 66.2, 68.0, 75.6, 86.4, 113.2, 123.7, 126.9, 127.9, 128.1, 130.0, 130.0, 135.9, 136.1, 144.8, 149.9, 158.5$ ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M+HCO₂]⁻): ber. für [C₃₃H₄₀NO₈]⁻: 578.2754, gef. 578.2755.

(1*R*,3*R*,4*S*)-1-*tert*-Butyloxycarbonylamino-3-[[dimethoxytrityl]oxy]methyl-4-O-(*N,N*-diisopropyl)-(2'-cyanoethyl)phosphoramidit **69**

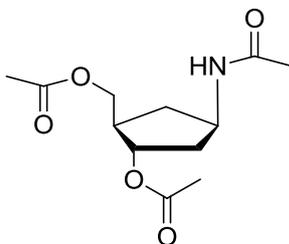


570 mg (1.1 mmol) **68** wurden zweimal mit 5 mL trockenem THF coevaporiert. Man löste **68** in 20 mL trockenem THF und gab 730 μ L (4.3 mmol, 4 eq) $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$ sowie 404 μ L (1.8 mmol, 1.7 eq) $(i\text{Pr}_2\text{N})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{PCI}$ (CEDCI) zu. Man rührte etwa 1 h bei RT (farbloser Niederschlag). Anschließend entfernte man das Lösemittel *in vacuo* und löste den Rückstand in entgastem EtOAc. Zur Reinigung filtrierte man das Rohprodukt unter Schutzgas über Kieselgel (desaktiviert, DCM : MeOH = 50 : 1 + 1 % Pyridin) und trocknete das Produkt im Hochvakuum. Man erhielt **69** (591 mg, 1.1 mmol, 98 %) als farblosen Schaum.

R_f = 0.8 (DCM : MeOH = 50 : 1); $^{31}\text{P-NMR}$ (80 MHz, CDCl_3): δ = 148.5, 149.4 ppm; **HRMS** (ESI⁺, $[\text{M}+\text{H}^+]^+$): ber. für $[\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}]^+$: 734.3934, gef. 734.3940.

Acetyl-Schutzgruppe

(1*S*,2*R*,4*R*)-4-acetamido-2-(acetoxymethyl)cyclopentyl-acetat **70**

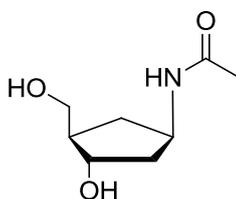


Das freie Amin **47** (2.25 g, 17.2 mmol) wurde in 40 mL trockenem Pyridin mit Molsieb (3 Å) gelöst und 4 h gerührt. Anschließend gab man Ac_2O (6.1 mL,

59.6 mmol, 3.3 eq) zu und rührte 2 d. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1) erhielt man 2.27 g **70** (8.82 mmol, 51 %) als braunes Öl.

$R_f = 0.5$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1); **IR** (FT-IR) $\nu = 3292w, 2954w, 2232w, 1703s, 1653m, 1542m, 1437w, 1365m, 1232s, 1166w, 1039m, 910m, 837w, 703s$ cm⁻¹; **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 1.11\text{--}1.27$ (m, 1 H), 1.74–1.84 (m, 1 H), 1.97 (s, 3 H), 2.04 (s, 3 H), 2.06 (s, 3 H), 2.06–2.14 (m, 1 H), 2.28–2.43 (m, 2 H), 4.10 (d, 2 H, $J = 5.1$ Hz), 4.36–4.51 (m, 1 H), 4.94–5.03 (m, 1 H), 5.73–5.82 (br d, 1 H) ppm; **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃) $\delta = 20.9, 21.1, 23.2, 34.6, 38.9, 43.4, 48.4, 65.1, 75.5, 170.0, 170.1, 171.0$ ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M+HCO₂]⁻): ber. für [C₁₃H₂₀NO₇]⁻: 302.1240, gef. 302.1243.

N-[(1*R*,3*S*,4*R*)-3-Hydroxy-4-(hydroxymethyl)-cyclopentyl]-acetamid **71**

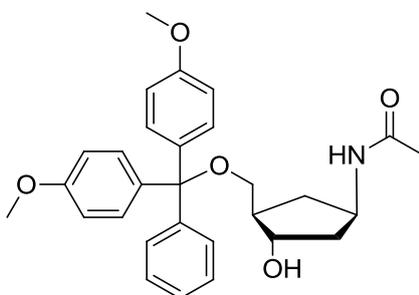


Zu einer Lösung des geschützten carbazyklischen Nucleosids (**70**, 2.27 g, 8.8 mmol) in trockenem Methanol (50 mL) wurde K₂CO₃ (1.74 g, 17.6 mmol, 2 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt, bis sich der Feststoff vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde mit CHCl₃ (100 mL) und H₂O (100 mL) verdünnt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 100 mL Chloroform gewaschen und anschließend das Wasser *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes (Kieselgel; CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1) und Trocknen im Hochvakuum erhielt man **71** als farbloses Öl (921 mg, 5.3 mmol, 60 %).

$R_f = 0.3$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1); **IR** (FT-IR) $\nu = 3384br m, 2948w, 2835w, 1703s, 1653m, 1558w, 1419m, 1366m, 1231m, 1093w, 1024s$ cm⁻¹; **¹H-NMR** (300 MHz,

CDCl₃) δ = 1.01 (ddd, 1 H, J = 6.4, 10.7, 17.7 Hz), 1.45 (ddd, 1 H, J = 6.6, 8.6, 13.0 Hz), 1.66 (dd, 1 H, J = 4.1, 7.8 Hz), 1.70 (s, 3 H), 1.72–1.79 (m, 1 H), 1.93–2.02 (m, 1 H), 3.25 (dd, 1 H, J = 6.4, 10.5 Hz), 3.35 (dd, 1 H, J = 6.0, 10.5 Hz), 3.80 (dd, 1 H, J = 4.2, 10.7 Hz), 4.10 (dd, 1 H, J = 8.2, 10.7 Hz), 4.46 (br s, 2 H), 7.69 (br d, 1 H, J = 7.6 Hz) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ = 23.1, 34.7, 41.6, 47.9, 49.7, 63.5, 72.3, 168.8 ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M+Cl]⁻): ber. für [C₈H₁₅NO₃Cl]⁻: 208.0740, gef. 208.0747.

N-[(1*R*,3*R*,4*S*)-3-[[*(*Dimethoxytrityl*)*oxy]methyl]-4-hydroxycyclopentyl]-acetamid **72**

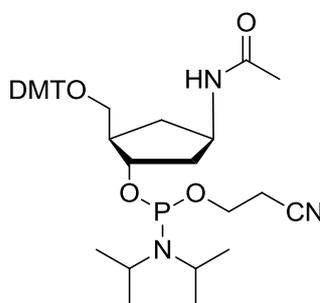


920 mg (5.3 mmol) des carbazyklischen Acetyl-Amids **71** wurden zweimal mit 10 mL trockenem Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde das Edukt in 25 mL trockenem Pyridin gelöst und 2 h über Molsieb (4 Å) gerührt. Man gab 1.98 g (5.8 mmol, 1.1 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu und rührte 2 h bei RT. Die Reaktion wurde durch Rühren mit 15 mL MeOH bei RT für 1 h gequenchet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie (Kieselgel; CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 + 1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man **72** als farblosen Schaum (1.61 g, 3.4 mmol, 64 %)

R_f = 0.1 (CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1); **IR** (FT-IR) ν = 3333br w, 2940w, 2832w, 1606w, 1558w, 1506m, 1463w, 1445w, 1412w, 1299w, 1246m, 1175m, 1115w, 1072m, 1024s, 964w, 901w, 825m, 790w, 753m, 726m, 701m, 667w cm⁻¹; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.00–1.12 (m, 1 H), 1.38–1.51 (m, 1 H), 1.63–1.68 (m, 1 H), 1.70 (s, 3 H), 1.84–1.96 (m, 1 H), 2.06–2.19 (m, 1 H), 2.75–2.86 (m, 1 H), 3.00 (d, 1 H, J = 5.6 Hz), 3.70 (s, 6 H), 3.73–3.81 (m, 1 H), 4.04–4.18 (m,

1 H), 6.85 (d, 4 H, $J = 8.4$ Hz), 7.19 (dd, 7 H, $J = 5.0, 7.2$ Hz), 7.2 (t, 2 H, $J = 7.6$ Hz), 8.54 (br d, 1 H, $J = 1.0$ Hz), ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 23.1, 35.5, 41.7, 47.6, 47.6, 55.4, 65.4, 72.4, 85.4, 113.6, 124.3, 128.1, 128.2, 130.1, 136.4, 136.5, 145.7, 158.4, 168.9$ ppm; **HRMS** (ESI^- , $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$): ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{NO}_7\text{Cl}]^-$: 520.2335, gef. 520.2359.

(1*R*,3*R*,4*S*)-1-Acetylamino-3-[[[(dimethoxytrityl)oxy]methyl]-4-*O*-(*N,N*-diisopropyl)-(2'-cyanoethyl)phosphoramidit **73**

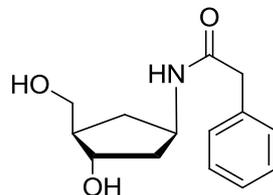


100 mg (0.21 mmol) **72** wurden zweimal mit 5 mL trockenem THF coevaporiert. Man löste **72** in 50 mL trockenem THF und gab 144 μL (1.7 mmol, 4 eq) $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$ sowie 80 μL (0.7 mmol, 1.7 eq) $(i\text{Pr}_2\text{N})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{PCI}$ (CEDCI) zu. Man rührte 1 h bei RT (farbloser Niederschlag). Anschließend entfernte man das Lösemittel *in vacuo* und löste den Rückstand in entgastem Laufmittel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 30 : 1 + 1\%$ Pyridin). Zur Reinigung filtrierte man das Rohprodukt unter Schutzgas über Kieselgel (desaktiviert, $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 30 : 1 + 1\%$ Pyridin) und trocknete das Produkt im Hochvakuum. Man erhielt **73** (141 mg, 0.21 mmol, 99 %) als farblosen Schaum.

$R_f = 0.6$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 30 : 1$); $^{31}\text{P-NMR}$ (80 MHz, CDCl_3): $\delta = 148.9, 148.7$ ppm; **HRMS** (ESI^+ , $[\text{M}+\text{H}^+]^+$): ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}]^+$: 676.3515, gef. 676.3531.

Phenylacetyl-Schutzgruppe

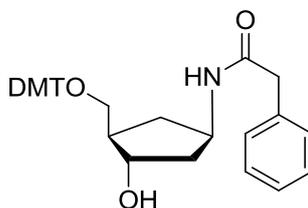
N-((1*R*,3*S*,4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-2-phenylacetamide **76**



Das freie Amin **47** (0.722 g, 5.5 mmol) wurde in 25 mL trockenem Pyridin gelöst. Man versetzte mit Trimethylsilylchlorid (2.99 g, 27.5 mmol, 5 eq) und rührte 1 h bei RT (DC-Kontrolle). Anschließend suspendierte man *N*-Hydroxybenzotriazol (1.19 g, 8.8 mmol, 1.6 eq) in 3 mL MeCN, kühlte auf 0 °C und gab Phenylacetylchlorid (1.09 mL, 8.26 mmol, 1.5 eq) zu. Die Suspension klarte auf. Die Amin-Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit der HOBt/PhAcCl-Lösung versetzt. Man rührte 12 h und ließ das Gemisch dabei auf RT kommen. Nach erneutem Kühlen auf 0 °C gab man 4 mL H₂O zu, rührte für 5 min, versetzte anschließend mit 8 mL NH₄OH und ließ für 15 min bei 0 °C rühren. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Auftrennung (Kieselgel; CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1) erhielt man 1.18 g **76** (4.7 mmol, 86 %) als farblosen Feststoff.

R_f = 0.6 (CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1); **IR** (FT-IR) ν = 3292br m, 2934w, 2487br w, 2221w, 2096w, 1635m, 1558m, 1496w, 1454m, 1361w, 1238w, 1165w, 1118m, 1046m, 1023s, 979s, 824m, 745s, 726s, 696s cm⁻¹; **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD) δ = 1.20 (dt, 1 H, J = 8.8, 13.0 Hz), 1.67–1.78 (m, 1 H), 1.85–2.01 (m, 2 H), 2.18–2.30 (m, 1 H), 3.44 (s, 2 H), 3.54 (ddd, 2 H, J = 6.0, 10.8, 27.7 Hz), 4.01 (dd, 1 H, J = 4.8, 11.7 Hz), 4.19–4.39 (m, 1 H), 7.16–7.31 (m, 4 H), 7.41–7.53 (m, 1 H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CD₃OD) δ = 33.8, 40.6, 42.4, 48.2, 49.0, 63.2, 72.7, 126.4, 128.1, 128.5, 135.7, 172.1 ppm; **HRMS** (ESI⁺, [M+H]⁺): ber. für [C₁₄H₂₀NO₃]⁺: 250.1443, gef. 250.1440.

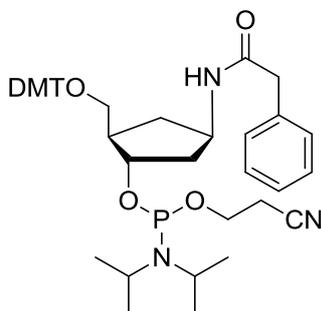
N-[(1*R*,3*R*,4*S*)-3-[[[(Dimethoxytrityl)oxy]methyl]-4-hydroxycyclopentyl]-phenylacetamid **86**



545 mg (2.2 mmol) des Amids **76** wurden zweimal mit 5 mL trockenem Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde das Edukt in 10 mL trockenem Pyridin gelöst und 2 h über Molsieb (4 Å) gerührt. Man gab 815 mg (2.4 mmol, 1.1 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu und rührte 2 h bei RT. Die Reaktion wurde durch Rühren mit 5 mL MeOH bei RT für 1 h gequencht. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie (Kieselgel; CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 + 1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man **86** als farblosen Schaum (866 mg, 1.6 mmol, 72 %)

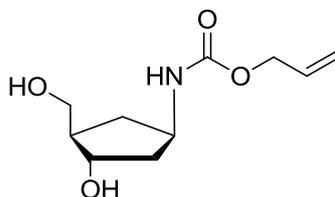
$R_f = 0.2$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1); **IR** (FT-IR) $\nu = 3296br w, 3060w, 3024w, 2950w, 2928w, 2835w, 1646m, 1606m, 1583w, 1542m, 1507s, 1463m, 1441m, 1415w, 1341w, 1295m, 1245s, 1174s, 1158m, 1115m, 1098w, 1073w, 1023s, 965w, 948w, 932w, 898m, 827s, 797m, 789m, 752s, 726m, 728s, 667m cm^{-1}$; **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) $\delta = 0.93$ (dd, 1 H, $J = 9.9, 21.1$ Hz), 1.62–1.74 (m, 1 H), 1.98 (d, 1 H, $J = 5.9$ Hz), 2.04–2.13 (m, 1 H), 2.21 (d, 1 H, $J = 13.0$ Hz), 2.96–3.03 (m, 1 H), 3.27 (dd, 1 H, $J = 5.0, 9.1$ Hz), 3.43 (s, 2 H), 3.78 (s, 6 H), 4.00 (d, 1 H, $J = 7.1$ Hz), 4.38 (d, 1 H, $J = 7.1$ Hz), 5.45 (br s, 1 H), 6.77–6.86 (m, 3 H), 7.19–7.23 (m, 2 H), 7.24–7.32 (m, 11 H), 7.67 (t, 2 H, $J = 7.6$ Hz), 8.60 (br d, 1 H, $J = 4.2$ Hz) ppm; **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) $\delta = 34.8, 41.2, 43.7, 47.1, 48.1, 55.2, 65.9, 75.4, 86.4, 113.2, 123.7, 126.9, 127.2, 127.9, 128.1, 128.9, 129.2, 130.0, 130.0, 134.9, 135.8, 136.0, 136.0, 144.8, 149.8, 158.5, 170.6$ ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M+HCO₂]⁻): ber. für [C₃₆H₃₈NO₇]⁻: 596.2648, gef. 596.2654.

(1*R*,3*R*,4*S*)-1-Phenylacetylamino-3-[[[(dimethoxytrityl)oxy]methyl]-4-*O*-(*N,N*-diisopropyl)-(2'-cyanoethyl)phosphoramidit **77**



105 mg (0.19 mmol) **86** wurden zweimal mit 5 mL trockenem THF coevaporiert. Man löste **86** in 10 mL trockenem THF und gab 130 μ L (0.76 mmol, 4 eq) $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$ sowie 73 μ L (0.32 mmol, 1.7 eq) $(i\text{Pr}_2\text{N})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{PCl}$ (CEDCI) zu. Man rührte etwa 1 h bei RT (farbloser Niederschlag). Anschließend entfernte man das Lösungsmittel *in vacuo* und löste den Rückstand in entgastem Laufmittel (CH_2Cl_2 : MeOH = 30 : 1 + 1 % Pyridin). Zur Reinigung filtrierte man das Rohprodukt unter Schutzgas über Kieselgel (desaktiviert, CH_2Cl_2 : MeOH = 30 : 1 + 1 % Pyridin) und trocknete das Produkt im Hochvakuum. Man erhielt **77** (133 mg, 0.18 mmol, 93 %) als farblosen Schaum.

R_f = 0.9 (CH_2Cl_2 : MeOH = 30 : 1); $^{31}\text{P-NMR}$ (80 MHz, CDCl_3): δ = 148.5, 148.8 ppm; **HRMS** (ESI $^-$, $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$): ber. für $[\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}]^-$: 796.3727, gef. 796.3722.

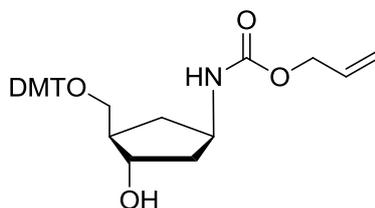
Alloc-SchutzgruppeAllyl-[(1*R*,3*S*,4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]-carbammat **79**

Das freie Amin **47** (0.56 g, 4.3 mmol) wurde in 25 mL trockenem Pyridin gelöst. Man versetzte mit Trimethylsilylchlorid (2.3 g, 21 mmol, 5 eq) und rührte 1 h bei RT (DC-Kontrolle). Anschließend suspendierte man *N*-Hydroxybenzotriazol (0.92 g, 6.8 mmol, 1.6 eq) in 4 mL MeCN, kühlte auf 0 °C und gab Allylchloroformiat (AllocCl, 0.68 mL, 6.4 mmol, 1.5 eq) zu. Die Suspension klarte auf.

Die Amin-Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit der HOBt/AllocCl-Lösung versetzt. Man rührte 12 h und ließ das Gemisch dabei auf RT kommen. Nach erneutem Kühlen auf 0 °C gab man 4 mL H₂O zu, rührte für 5 min, versetzte anschließend mit 8 mL NH₄OH und ließ für 15 min bei 0 °C rühren. Nach dem Entfernen des Lösemittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Auftrennung (Kieselgel; CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1) erhielt man 0.79 g **79** (3.7 mmol, 86 %) als farblosen Feststoff.

$R_f = 0.5$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 4 : 1); **IR** (FT-IR) $\nu = 3302br\ m, 2936br\ w, 1692s, 1647m, 1533s, 1448m, 1341m, 1258s, 1157m, 1091m, 1035s, 1019s, 993s, 927m, 778m, 740s\ cm^{-1}$; **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD) $\delta = 1.19$ (dt, 1 H, $J = 8.8, 13.0$ Hz), 1.65–1.72 (m, 1 H), 1.83–2.00 (m, 1 H), 2.01 (s, 1 H), 2.16–2.92 (m, 1 H), 3.54 (ddd, 2 H, $J = 6.2, 10.8, 28.7$ Hz), 3.96–4.04 (m, 1 H), 4.04–4.15 (m, 1 H), 4.49 (s, 2 H), 5.16 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz), 5.26 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz), 5.81–5.98 (m, 1 H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CD₃OD) $\delta = 34.1, 40.8, 49.0, 49.6, 63.4, 64.7, 72.7, 115.9, 133.1, 156.7$ ppm; **HRMS** (EI⁻, pos. 70 eV, [M]⁺): ber. für [C₁₀H₁₇NO₄]⁺: 215.1158, gef. 215.1154.

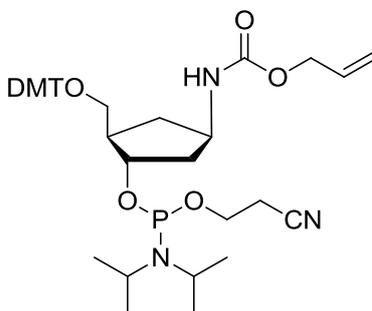
N-[(1*R*,3*R*,4*S*)-3-[[*(*Dimethoxytrityl*)*oxy]methyl]-4-hydroxycyclopentyl]-allyl-carbamat **87**



473 mg (2.2 mmol) des Amids **79** wurden zweimal mit 8 mL trockenem Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde das Edukt in 15 mL trockenem Pyridin gelöst und 2 h über Molsieb (4 Å) gerührt. Man gab 820 mg (2.4 mmol, 1.1 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zu und rührte 2 h bei RT. Die Reaktion wurde durch Rühren mit 10 mL MeOH bei RT für 1 h gequencht. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie (Kieselgel; CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1 + 1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man **87** als farblosen Schaum (705 mg, 1.4 mmol, 62 %)

R_f = 0.4 (CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1); **IR** (FT-IR) ν = 3402br w, 2913w, 2836w, 1696m, 1646w, 1607m, 1583w, 1507s, 1462m, 1441m, 1412w, 1295m, 1246s, 1173s, 1157m, 1113w, 1031s, 910m, 826s, 797w, 789m, 772w, 753m, 727s, 701s, 670m cm⁻¹; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.98–1.13 (m, 1 H), 1.71–1.85 (m, 1 H), 1.94–2.06 (m, 1 H), 2.07–2.17 (m, 1 H), 2.19–2.34 (m, 1 H), 3.27–3.34 (m, 1 H), 3.57–3.70 (m, 1 H), 3.79 (s, 6 H), 4.03–4.11 (m, 1 H), 4.13–4.25 (m, 1 H), 4.25 (s, 2 H), 4.71 (s, 1 H), 5.11–5.38 (m, 2 H), 5.77–6.01 (m, 1 H), 6.82 (d, 4 H, J = 8.9 Hz), 7.13–7.46 (m, 1 H), 7.78 (s, 1 H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ = 35.0, 41.4, 49.4, 55.2, 55.2, 65.4, 65.9, 75.4, 86.4, 113.1, 117.6, 126.6, 127.0, 127.8, 130.0, 132.9, 135.8, 144.8, 158.5 ppm; **HRMS** (ESI⁻, [M+HCO₂]⁻): ber. für [C₃₂H₃₆NO₈]⁻: 562.2442, gef. 562.2458.

(1*R*,3*R*,4*S*)-1-Allyloxycarbonylamino-3-[(dimethoxytrityl)oxy]methyl}-4-O-(*N,N*-diisopropyl)-(2'-cyanoethyl)phosphoramidit **80**



621 mg (1.2 mmol) **87** wurden zweimal mit 5 mL trockenem THF coevaporiert. Man löste das Edukt in 20 mL trockenem THF und gab 820 μ L (4.8 mmol, 4 eq) $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$ sowie 455 μ L (2.0 mmol, 1.7 eq) $(i\text{Pr}_2\text{N})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{PCl}$ (CEDCI) zu. Man rührte etwa 1 h bei RT (farbloser Niederschlag). Anschließend entfernte man das Lösemittel *in vacuo* und löste den Rückstand in entgastem Laufmittel (CH_2Cl_2 : MeOH = 50 : 1 + 1 % Pyridin). Zur Reinigung filtrierte man das Rohprodukt unter Schutzgas über Kieselgel (desaktiviert, CH_2Cl_2 : MeOH = 50 : 1 + 1 % Pyridin) und trocknete das Produkt im Hochvakuum. Man erhielt **80** (855 mg, 1.2 mmol, 99 %) als farblosen Schaum.

R_f = 0.8 (CH_2Cl_2 : MeOH = 50 : 1); $^{31}\text{P-NMR}$ (80 MHz, CDCl_3): δ = 149.0, 150.4 ppm; **HRMS** (ESI $^-$, $[\text{M}-\text{H}^+]^-$): ber. für $[\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}]^-$: 718.3621, gef. 718.3597.

5.1.3 Oligonukleotidsynthese

Die Oligonukleotidsynthese wurde an einem Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesis System (*PerSeptive Biosystems*) bzw. einem Äkta Oligopilot 10 (*GE Healthcare*) durchgeführt. Phosphoramidite (Bz-dA, Bz-dC, *i*Bu-dG, dT) und das CPG-Trägermaterial für die DNA-Synthese wurden von *Glen Research/Eurogentech* bezogen. Als Lösungsmittel für die Phosphoramidite und den Aktivator wurde Acetonitril mit einem Wassergehalt von < 10 ppm verwendet. Nach Abspaltung vom Träger, Entschützung unter basischen Bedingungen und Reinigung mittels HPLC wurden die Massen der Oligonukleotide durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessen und mit dem berechneten Wert verglichen (siehe auch Tabelle 5.1).

Die Synthese von DNA-Oligonukleotiden mit Salicylaldehydnukleosid und carbazyklischem Amin-Nukleosid wurde nach Standardprotokollen des Herstellers für die Festphasensynthese von DNA durchgeführt. Die verwendeten Kupplungszeiten wurden im Fall des carbazyklischen Amins auf 10 min verlängert.

Für das Ansetzen der Phosphoramidit-Lösungen, der Aktivator- und der *Capping*-Lösungen wurde trockenes MeCN (< 10 ppm H₂O) verwendet, und die Lösungen wurden zusätzlich durch Zugabe von Molsieb (3 Å) vor Feuchtigkeit geschützt. Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Phosphoramidite:	0.1 M in MeCN, 3 Å Molsieb
Aktivator:	0.25 M Benzylthiotetrazol (BTT) in MeCN, 3 Å Molsieb
Detritylierung:	3 % Dichloressigsäure (v/v) in Toluol
Oxidation:	25 mM Iod in 65:30:6 (v/v) MeCN:H ₂ O:Lutidin
<i>Capping A</i> :	20 % Acetanhydrid in Acetonitril (50 %) und Lutidin (30 %)
<i>Capping B</i> :	20 % <i>N</i> -Methylimidazol in Acetonitril

Sonderfälle:

1. Für die Kristallisation war die Verwendung eines DNA-Strangs mit einem Didesoxyguanosin (ddG) am 3'-Ende notwendig. Dies lässt sich chemisch nur über reverse DNA-Festphasensynthese herstellen, so dass ein reverser Träger, sowie reverse Phosphoramidite, die die DMT-Schutzgruppe an der 3'-

Position und die Phosphor(III)-Einheit an der 5'-Position des Zuckers tragen, verwendet werden mussten. So kann die Synthese revers zum Standardverfahren in 5'→3' Richtung erfolgen und der Abschluss des DNA-Strangs mit einem ddG-Baustein ohne DMT-Schutzgruppe erfolgen. Der Ablauf der Synthese und die verwendeten Reagenzien sind identisch.

2. Zur Kristallisation wurde zudem ein Strang verwendet, der eine Salicylaldehydmodifikation am 3'-Ende trägt. Zur Herstellung dieses Stranges wurde die Standard-Synthese unter Einsatz eines universellen Trägermaterials durchgeführt. Diesem Träger fehlt die üblicherweise bereits angekuppelte erste Base der Sequenz, sodass als erste Base direkt die Modifikation eingebaut werden kann. Reaktionszeiten und Reagenzien blieben ansonsten unverändert.

Vor der Trägerabspaltung mussten bei DNA-Oligonukleotiden mit Salicylaldehydnukleosid und carbazyklischem Amin-Nukleosid die zusätzlichen Schutzgruppen auf den modifizierten Nukleosiden entfernt werden.

Das CPG-Material der mit Salicylaldehyd modifizierten Stränge wurde nach der DNA-Synthese getrocknet und anschließend zur Abspaltung der Acetalschutzgruppe am Salicylaldehyd für etwa 60 bis 90 min mit 2 % Dichloressigsäure und 1 % Wasser in Dichlormethan behandelt und mit reinem Dichlormethan gewaschen.

Das CPG-Material der mit dem Alloc-Amin modifizierten Stränge wurde nach der DNA-Synthese mit 10 mL einer Palladium(0)-Lösung (24.9 mg Pd(0)-bis(benzylidenaceton), 17.3 mg 1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan, 10.9 µL Pyrrolidin in 10 mL MeCN) zur Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe behandelt. Um überschüssiges Palladium von der DNA zu entfernen, wurde mit einer Lösung von 225 mg Natriumdiethyldithiocarbamat in 10 mL H₂O gewaschen.

Die Abspaltung vom Trägermaterial und Entschützung der Oligonukleotide fand unter basischen Bedingungen unter Verwendung eines *Eppendorf Thermoschüttlers* statt. Es wurde folgendes Protokoll verwendet: Ethanol / ges. wässrige NH₃-Lösung 1:3, 37 °C, 12 h, 850 rpm.

Die DNA-Lösungen wurde vom Harz getrennt, *in vacuo* eingengt (*SpeedVac Plus SC110A, Savant*), über einen 0.2 μm Nylon-Membranfilter (*Pall Acrodisc[®]*) filtriert und mit zweifach destilliertem Wasser auf ca. 800 μL aufgefüllt. Bei salicylaldehyd-modifizierten Strängen wurde 10 min vor dem Einspritzen in die HPLC-Anlage mit 10 % Essigsäure (konz.) bei 35 °C inkubiert, um die mit Ammoniak gebildeten Imine des Salicylaldehyds zu hydrolysieren.

Für die Synthese von langen DNA-Strängen (> 35 Nukleotide) wurde der letzte DMT-Entschützungs-schritt in der Synthesesequenz ausgelassen. Der DNA-Strang wurde in 5'-DMT-geschützter Form vom Träger abgespalten (*DMT-on-Variante*). Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass der unpolare Charakter der DMT-Gruppe die Elution des Vollängenprodukts auf der HPLC verzögert, so dass dieses leichter von den Abbruchsequenzen abgetrennt werden kann. Die Entschützung in konzentrierter Ammoniaklösung wurde wie bei der vorher beschriebenen *DMT-off-Variante* durchgeführt. Im Anschluss an die HPLC-Reinigung wurde die DNA auf einer Sep-Pak-Kartusche DMT-entschützt und entsalzt. Die Sep-Pak-Kartusche wurde mit Acetonitril (10 mL) aktiviert, mit bidest. H₂O (10 mL) equilibriert und die DNA-Lösung langsam auf die Kartusche gegeben. Anschließend wurde mit bidest. Wasser (10 mL) nachgewaschen. Über einen Zeitraum von etwa 90 s wurde eine wässrige Trifluoressigsäurelösung (1.5 %) durch die Säule gespült, die anschließend sofort mit HPLC-Puffer A (6 mL, s.u.) neutralisiert wurde. Der Puffer wurde mit bidest. H₂O ausgewaschen und die DNA mit Acetonitril/H₂O 1 : 1 (5 mL) eluiert. Das weitere Vorgehen ist identisch zur *DMT-off-Variante*.

Anschließend wurden die Oligonukleotide unter Verwendung des folgenden HPLC-Protokolls gereinigt:

Säule:	CC205/4 Nucleosil 100-5 C18 von <i>Macherey & Nagel</i> bzw. VP250/10 Nucleodur 100-5 C18 von <i>Macherey & Nagel</i>
HPLC-Puffer A:	0.1 M Triethylammoniumacetat in <i>ddH₂O</i>
HPLC-Puffer B:	0.1 M Triethylammoniumacetat in 80 % Acetonitril
Fluss:	5 mL/min
Gradient:	0 min: 0 % B, 40 min: 30 % B, 45 min: 100 % B, 55 min: 100 % B, 60 min: 0 % B.

Die einzelnen Fraktionen wurden *in vacuo* eingeeengt, mittels ESI (FT-ICR) oder MALDI auf Reinheit analysiert und alle sauberen Fraktionen vereinigt. Anschließend wurde *in vacuo* eingeeengt und unter Verwendung von *Sep-Pak*[®]-Säulen (C₁₈-modifizierte Kieselgelkartuschen) vollständig entsalzt. Die Kartuschen wurden hierzu zunächst mit Acetonitril (10 mL) aktiviert und mit ddH₂O (10 mL) equilibriert. Die wässrige DNA-Lösung wurde langsam aufgetragen und Salze mit 10 mL Wasser langsam ausgewaschen. Die DNA wurde mit 2 x 4 mL 50 % Acetonitril eluiert, und die Lösungen *in vacuo* eingeeengt.

Zur Identifizierung der Oligonukleotide wurden ESI-Messungen (FT-ICR) durchgeführt und die Massen mit den theoretischen Werten verglichen.

5.1.3.1 Sequenzen der DNA-Stränge:

Eine Übersicht über die synthetisierten Einzelstränge ist in Tabelle 5.1 gegeben. Sind die Massen ohne Nachkommastellen angegeben, so wurden sie mittels MALDI bestimmt. Bei der Angabe höher geladener Ionen mit vier Nachkommastellen erfolgte die Massenanalytik mit ESI-MS. In der letzten Spalte ist der jeweilige Einsatzbereichs der DNA angegeben (B: biochemische Untersuchungen, K: Kristallisation, P: AFM-Untersuchungen, N: Einbau des geschützten Amins in DNA).

Tabelle 5.1: Übersicht über die synthetisierten DNA-Stränge

ODN	Sequenz 5' → 3'	Länge	<i>m/z</i> / <i>gmol</i> ⁻¹	
1S	GGA TCG STC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA	30mer	[M-6H] ⁶⁻ ber.:1531,4280 gef.:1531,4183	B
2a	GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC CAT GGG CTC CAA GAA GCC GGT CCC CAT CAT GST CSA TSG CAA CCG C	94mer	ber.: 28922	B
2b	TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CCG GGT TAT TAC ATG CGC TGG CAC TTG CCC GTA CGG CGG TTG CSA TSG ASC ATG ATG GGG	84mer	ber.: 25928	B
2ax	GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC CAT GGG CTC CAA GAA GCC GGT CCC CAT CAT GST CSA TSG CAA CCG CCG TAC GGG CAA GTG CCA GCG CAT GTA ATA ACC CGG GTC ATA GCT GTT TCC TGT GTG AAA	153mer	ber.: 47202	B

2bx	TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CCG GGT TAT TAC ATG CGC TGG CAC TTG CCC GTA CGG CGG TTG CSA TSG ASC ATG ATG GGG ACC GGC TTC TTG GAG CCC ATG GTA TAT CTC CTT CTT AAA GTT AAC CCT ATA GAG AGT CGT TAT AAT TTC	153mer	ber.: 47121	B
K1a	CAT SCG AGT CAG GCT	15mer	ber.: 4562 gef.: 4562	K
K1b	GCC TGA CTC G_{dd}	10mer	ber.: 2987 gef.: 2987	K
K1c	GCC TGA CTC GS	11mer	ber.: 3303 gef.: 3304	K
K2a	ATG CGA CCS TCC CT	14mer	ber.: 4169 gef.: 4170	K
K2b	AGG GAS GGT C	10mer	ber.: 3102 gef.: 3101	K
K3a	AGG GSS GGT C	10mer	ber.: 3090 gef.: 3090	K
K3b	ATG CGA CCS SCC CT	14mer	ber.: 4165 gef.: 4167	K
K4a	GGG STS GGT C	10mer	ber.: 3081 gef.: 3081	K
K4b	AGT CGA CCS ASC CC	14mer	ber.: 4174 gef.: 4174	K
K4c	AGT CGA CCS TSC CC	14mer	ber.: 4165 gef.: 4166	K
P1a	HS-C ₆ - TTT TTT TTT TCG TTG GTG CSG ATA TCT CGG	30mer	ber.: 9517 gef.: 9523	P
P1b	HS-C ₆ - TTT TTT TTT TCC GAG ATA TCS GCA CCA ACG	30mer	ber.: 9433 gef.: 9440	P
Boc1a	GCG CGN^{Boc} GGC CG	11mer	ber.: 3363 gef.: 3362	N
Boc1b	CGG CCN^{Boc} CGC GC	11mer	ber.: 3283 gef.: 3283	N
Ac1a	GCG CGN^{Ac} GGC CG	11mer	ber.: 3304 gef.: 3302	N
Ac1b	CGG CCN^{Ac} CGC GC	11mer	ber.: 3224 gef.: 3222	N
Ac2a	CAC ATT AN^{Ac}T GTT GTA	15mer	ber.: 4486 gef.: 4489	N
Ac2b	TAC ATT AN^{Ac}T AAT GTG	15mer	ber.: 4504 gef.: 4504	N
PhAc1a	GCG CGN^{PhAc} GGC CG	11mer	ber.: 3380 gef.: 3378	N
PhAc1b	CGG CCN^{PhAc} CGC GC	11mer	ber.: 3300 gef.: 3301	N
PhAc2a	CAC ATT AN^{PhAc}T GTT GTA	15mer	ber.: 4562 gef.: 4555	N
PhAc2b	TAC ATT AN^{PhAc}T AAT GTG	15mer	ber.: 4586 gef.: 4582,	N
Dabsyl PhAc1a	GCG CGN^{PhAc} GGC CG - Dabsyl	11mer	ber.: 3914 gef.: 3913	N
Dabcyl PhAc1b	CGG CCN^{PhAc} CGC GC - Dabcyl	11mer	ber.: 3798 gef.: 3800	N
Biotin PhAc2a	CAC ATT AN^{PhAc}T GTT GTA - Biotin	15mer	ber.: 5067 gef.: 5068	N
Biotin PhAc2b	TAC ATT AN^{PhAc}T AAT GTG - Biotin	15mer	ber.: 5091 gef.: 5088,	N
Alloc1a	GCG CGN^{Alloc} GGC CG	11mer	ber.: 3346 gef.: 3350	N

Alloc1b	CGG CCN ^{Alloc} CGC GC	11mer	ber.: 3266 gef.: 3266	N
Alloc2a	CAC ATT AN ^{Alloc} T GTT GTA	15mer	ber.: 4528 gef.: 4524	N
Alloc2b	TAC ATT AN ^{Alloc} T AAT GTG	15mer	ber.: 4546 gef.: 4546	N
Alloc3a	TCA CGN ^{Alloc} AGC AT	11mer	ber.: 3288 gef.: 3288	N
Alloc3b	ATG CTN ^{Alloc} CGT GA	11mer	ber.: 3319 gef.: 3320	N
Alloc4a	TCA CGA GCA N ^{Alloc} T	11mer	ber.: 3288 gef.: 3286	N
Alloc4b	AN ^{Alloc} T GCT CGT GA	11mer	ber.: 3271 gef.: 3272	N
N1a	GCG CGN GGC CG	11mer	ber.: 3262 gef.: 3261	N
N1b	CGG CCN CGC GC	11mer	ber.: 3182 gef.: 3185	N
N2a	CAC ATT ANT GTT GTA	15mer	ber.: 4444 gef.: 4443	N
N2b	TAC ATT ANT AAT GTG	15mer	ber.: 4462 gef.: 4463	N
N3a	TCA CGN AGC AT	11mer	ber.: 3204 gef.: 3202	N
N3b	ATG CTN CGT GA	11mer	ber.: 3235 gef.: 3233	N
N4a	TCA CGA GCA NT	11mer	ber.: 3204 gef.: 3204	N
N4b	ANT GCT CGT GA	11mer	ber.: 3235 gef.: 3235	N

Eine Übersicht über die gekauften Einzelstränge ist in Tabelle 5.2 gegeben

Tabelle 5.2: Sequenzen der gekauften DNA-Stränge

ODN	Sequenz 5' → 3'	Länge	
P1	Fluo-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA	23mer	B
P2	Fluo-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG	24mer	B
P3	Fluo-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG CGA TCC	30mer	B
1A	GGA TCG ATC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA	30mer	B
1C	GGA TCG CTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA	30mer	B
1G	GGA TCG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA	30mer	B
1T	GGA TCG TTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA	30mer	B
C2a	GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC CAT GGG CTC CAA GAA GCC GGT CCC CAT CAT GGT CGA TGG CAA CCG C	94mer	B
C2b	TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CCG GGT TAT TAC ATG CGC TGG CAC TTG CCC GTA CGG CGG TTG CCA TCG ACC ATG ATG GGG	84mer	B

5.1.3.2 Bestimmung der Oligonukleotid-Konzentration

Zur Quantifizierung von Oligonukleotiden wurde ein *Varian Cary 100 Bio* Spektralphotometer eingesetzt. Die Lösungen wurden bei 80 °C gemessen. Vom Messwert bei 260 nm wurde der Nullwert bei 400 nm abgezogen und die DNA-Konzentration mit Hilfe des aus der Basensequenz errechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt. Die sonst übliche Untergrundmessung bei 320 nm konnte wegen der Absorption des Salicylaldehyds in diesem Bereich nicht verwendet werden.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte auch mittels eines *Nanodrop ND-1000* von *Peqlab*. Dann wurde für doppelsträngige DNA pauschal ein Extinktionskoeffizient von $0.02 \mu\text{Lng}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angenommen, d.h. eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μL . Für einzelsträngige DNA gilt ein Extinktionskoeffizient von $0.025 \mu\text{Lng}^{-1}\text{cm}^{-1}$, eine OD von 1 entspricht also in diesem Fall einer DNA-Konzentration von 40 ng/ μL .

5.1.4 Schmelzkurven von Oligonukleotiden

Schmelzkurven wurden mit einem *Cary 100 Bio* Spektralphotometer mit *Cary Temperature Controller*, *Sample Transport Accesory* und *Multi Cell Block* der Firma *Varian* bestimmt. Der Temperaturgradient betrug 1 °C / min. Es wurden zwei aufeinander folgende Messungen im Temperaturbereich 80 °C → 0 °C und 0 °C → 80 °C bei 260 nm sowie 400 nm aufgenommen. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gefüllt. Für die Messungen wurden Küvetten mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Schichtdicke der Firma *Hellme* verwendet. Die Schmelzkurven wurden mit DNA-Konzentrationen von 3 μM in wässrigen Lösungen mit NaCl (150 mM) und CHES (10 mM) ermittelt. Die Proben in den Küvetten wurden mit Dimethylpolysiloxan überschichtet. Zur Auswertung wurden mit Hilfe von *Microcal Origin*^[148] die temperaturabhängigen Absorptionskurven bei 260 nm gemittelt. Von der erhaltenen Kurve wurde die gemittelte temperaturabhängige Hintergrundmessung bei 400 nm abgezogen. Der sonst übliche Wert bei 320 nm zur Hintergrundbestimmung konnte wegen der Absorption des Salicylaldehyds in diesem Bereich nicht verwendet werden. Die

Schmelzpunkte (T_m) ergeben sich aus dem Maximum der ersten Ableitung bzw. der Nullstelle der zweiten Ableitung der Schmelzkurve eines Oligonukleotid-Doppelstrangs.

5.2 Biochemische Experimente

5.2.1 Material und Methoden

5.2.1.1 Geräteliste

Tabelle 5.3: Verwendete Geräte und deren Bezugsquellen

Gerätebezeichnung	Hersteller
Äkta Chromatographie System P-900/UPC-900/Frac-950	GE Healthcare, München
Autoklav Vakulab S3000	Systec, Gießen
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Carey UV-Spektrometer Bio100	Varian, Darmstadt
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zellaufschlusspresse <i>French pressure</i>	Thermo, Dreieich
Bildauswertung LAS 3000	Raytest, Straubenhardt
Gelkammer Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Gelkammer Protean II xi Cell	Biorad, München
Inkubator 1S	Noctua, Wiesloch
Kristallisationsplatten Easy Xtal Tool	Qiagen, Hilden
Lyophylle Alpha 2-4 LD plus	Christ, Osterode
MALDI-TOF Autoflex II-Spektrometer	Bruker Daltonics, Bremen
UV-Spektrometer Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
PCR-Maschine Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschine Realplex ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
Sorvall-Zentrifuge, Evolution RC	Kendro, Dreieich
Speedvac Cryostat CT 04-50 SR	Christ, Osterode
Speedvac Plus	Thermo, Dreieich
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage Waters Millipore-System	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

Primerverlängerungs- und Polymerasekettenreaktionen sowie Hybridisierungen: Diese Reaktionen wurden auf einem *Mastercycler personal* Thermocycler oder auf einem *Mastercycler S ep realplex4* Gerät der Firma *Eppendorf* in 0.2 mL oder 0.5 mL-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der *Mastercycler realplex* erlaubte das gleichzeitige Auslesen von bis zu 96 PCR-

Reaktionen über Fluoreszenzmessung der SYBR-Green-Emission sowie das Anlegen eines horizontalen Temperaturgradienten über die Proben.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE): Native und denaturierende PAGE wurde für kleine Gele (8 cm Länge, 0.75 mm Dicke) in einer *Mini-Protean 3-Kammer (Bio-Rad)*, für große Gele (20 cm Länge, 1.0 mm Dicke) in einer *Protean II xi-Kammer (Bio-Rad)* durchgeführt. Gele wurden mit einem konstanten Strom der Stärke 12 mA pro Gel (kleine Gele) bzw. 35 mA pro Gel (große Gele, Wasserkühlung auf 40 °C) gefahren. Die Gelelektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Proben wurden im Verhältnis 1:1 gemischt mit 2x Probenpuffer auf das Gel aufgetragen.

Zur Detektion von nicht fluoreszenzmarkierter DNA wurden die Gele 15-30 min in 1x SYBR-Green-Färbelösung geschwenkt, bevor sie am Geldokumentationsgerät betrachtet wurden.

Ein 22.5%iges denaturierendes PA-Gel wurde in einer Protean II xi-Zelle (*Biorad*) gegossen und direkt nach einer Polymerisationszeit von 1 h verwendet.

Zusammensetzung:

- 36 mL Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat
- 5 mL 10x TBE-Puffer
- 200 µL APS-Lösung (10 mg/mL)
- 20 µL TEMED

Ein natives 5%iges PA-Gel (für PCR-Produkte) konnte nach dem Gießen mit feuchtem Papier umwickelt mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden, ohne an Auflösung einzubüßen.

Zusammensetzung:

- 2 mL Rotiphorese Gel 30 (37.5:1)
- 1 mL 10x TBE-Puffer
- 7 mL H₂O
- 800 µL APS-Lösung (10 mg/mL)
- 4 µL TEMED

Gel-Dokumentation: Die Bildgebung der Gele wurde an einem *LAS-3000 Imager* (*Raytest*) durchgeführt. Für Fluorescein und SYBR Green wurde ein Filter mit 515 nm verwendet. Als Lichtquelle diente LED-Auflicht der Wellenlänge 460 nm.

Bradford-Assay: Das Prinzip des Bradford-Assays beruht darauf, dass der verwendete Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G 250 an anionische Gruppen von Proteinen bindet, wodurch es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm kommt. Die Bradford-Lösung (*Biorad*) wurde nach Herstellerangaben aus Bradford-Konzentrat hergestellt. Für die Bestimmung des Referenz-Wertes, wurden 950 μL der Bradford-Lösung mit 50 μL des jeweiligen Puffers versetzt. Die Probenvorbereitung zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie folgt (Gesamtvolumen 1000 μL):

950 μL	Bradford-Lsg.
x μL	Protein-Lsg.
50-x μL	Puffer.

5.2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Puffer, Lösungen und Medien mit bidestilliertem Wasser (ddH_2O , mittels Millipore-Anlage) angesetzt. pH-Werte wurden durch Zugabe von verdünnter HCl- oder verdünnter NaOH-Lösung eingestellt.

Tabelle 5.4: Häufig verwendete Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x TBE-Puffer	0.89 M Tris (108 g), 0.89 M Borsäure (55 g), 32 mM EDTA (9.3 g) mit H_2O auf 1 L auffüllen
2x TBE-Auftragspuffer PAGE	für 3 mL 10x TBE, 12 % (v/v) Ficoll 400 (3.6 g), 7 M Harnstoff (12.61 g), einige Körnchen Bromphenolblau (Lauffront), mit H_2O auf 30 mL auffüllen.
5x TBE-Auftragspuffer PAGE, harnstofffrei	für 5 mL 10x TBE, 5 mL Glycerin, einige Körnchen Bromphenolblau (Lauffront)
PAG-Gelverdünner	8.3 M Harnstofflösung (500 g/L)

Lysispuffer	100 mM Tris (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol; 1 Tablette Roche Complete (EDTA-frei) auf 50 mL
Strep-tag-Puffer A	100 mM Tris (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0.1% Tween-20, 0.1% NP-40 substitute
Strep-tag-Puffer B	0.5 mg/ml D-Desthiobiotin in Strep-tag-Puffer A
Heparin-Puffer A	50 mM Tris (pH = 7.5), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50 mM NaCl
Heparin-Puffer B	50 mM Tris (pH = 7.5), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 M NaCl
Kristallisationspuffer für Bst Pol I	50 mM Tris (pH = 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 25 mM NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH = 8.5), 1 mM EDTA
Verdau-Puffer A	300 mM NH_4OH , 100 mM CaCl_2 , 1 mM ZnSO_4 , pH = 5.7
Verdau-Puffer B	500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0
Verdau-HPLC-Puffer A	2 mM NH_4OAc
Verdau-HPLC-Puffer B	2 mM NH_4OAc in $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 80 : 20$
1x Thermopol-Puffer	10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris-HCl (pH = 8.8), 2 mM MgSO_4 , 0.1 % TritonX-100
1x KOD XL-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 8 mM MgCl_2 , 7.5 mM DTT, 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA
NEB 2	10 mM Tris-HCl (pH = 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol

Tabelle 5.5: Sonstige Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Rotiphorese	25% (m/v) Acrylamid, 1.32% (m/v) Methylenbisacrylamid, 50%
Sequenziergelkonzentrat	(m/v) Urea
Rotiphorese Gel 30	30% (m/v) Acrylamid, 0.8% (m/v) Methylenbisacrylamid
SYBR-Green II für Gelfärbung	1x SYBRGreen II in 1xTBE-Puffer
für qPCR	100x SYBR Green II in bidest. H_2O
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml in DMF
Carbenicillin	100 mg/ml in ddH_2O
LB-Medium	20 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 20 g NaCl; pH = 7
SOC-Medium	0.5 % (m/v) Pepton, 0.5 % (m/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl; pH = 7.2 nach Autoklavierung: 5.0 mM MgCl_2 , 5.0 mM MgSO_4
Medium-Agar:	Medium mit 1.5 % (m/v) Agar

5.2.1.3 Enzyme, Primer und Marker

Tabelle 5.6: Verwendete Enzyme

Enzym aus Organismus	Bezugsquelle	Verwendung
AcTEV Protease aus <i>Tobacco etch virus</i>	Invitrogen	Bst Pol I Aufreinigung
Antarctic Phosphatase aus <i>antarctic bacterium TAB5</i>	NEB	Totalverdau
Bst Pol I <i>Large Fragment</i> aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NEB, selbst präpariert	Primerverlängerung, Kristallisation
Deep Vent(exo ⁻) aus <i>Pyrococcus species GB-D</i>	NEB	PCR
Klenow(exo ⁻) aus <i>Escherichia coli</i>	NEB	Primerverlängerung, Puffer NEB2
KOD aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Merck	Primerverlängerung
KOD XL aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Merck	PCR
Nuclease S1 aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Roche, Aldrich	Totalverdau
Phusion Hot Start, gentechnisch manipuliert	Finnzymes	PCR
Polymerase η aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	zur Verfügung gestellt von S. Schorr	Primerverlängerung
Pwo aus <i>Pyrococcus woesei</i>	Roche	Primerverlängerung
Snake Venom Phosphodiesterase I aus <i>Crotus adamanteus venom</i>	USB	Totalverdau
Taq aus <i>Thermus aquaticus YT-1</i>	NEB	Primerverlängerung, PCR
Therminator aus <i>Thermococcus species</i>	NEB	Primerverlängerung
Vent(exo ⁻) aus <i>Thermococcus litoralis</i>	NEB	Primerverlängerung, PCR

Für Bst Pol I gelten folgende temperaturabhängige Aktivitäten:^[102]

10-15%	bei 37°C
30-45%	bei 50°C
100%	bei 60-65°C
20%	bei 70°C.

Alle in PCR-Reaktionen oder in Primerverlängerungsreaktionen verwendeten Primer oder unmodifizierten Template wurden von *Metabion*, Martinsried, bezogen und sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Als Marker/Leitern wurden der PCR-Marker von *NEB*, die 50 bp DNA-Leiter (*NEB*), die *low range* DNA-Leiter (*Fermentas*), sowie die *ultra low range* DNA-Leiter (*Fermentas*) verwendet.

5.2.2 Primerverlängerungsreaktionen

Ein Fluorescein-markierter Primer P1 (*Metabion*) wurde mit einem unmarkierten Templat-Strang ODN1 im Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH = 8.8, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl_2 , 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100) hybridisiert (Erhitzen auf 95 °C für 4 min, gefolgt von Abkühlen auf 4 °C in 45 min). Das Verhältnis Primer zu Templat betrug 1 : 1.5. Die Endkonzentration des Primers während der Reaktion betrug 1 μM .

Nach Zugabe von 5 U einer DNA Polymerase sowie gegebenenfalls Ethylendiamin und Kupfersulfat wurde die Reaktionslösung für 10 min bei einer der Polymerase angepassten Reaktionstemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Nukleotidtriphosphat(en) gestartet und nach 1, 2, 4 oder 20 h durch Zugabe von TBE-Auftragespuffer gestoppt. Die Reaktionslösungen wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgelöst und mittels eines *LAS-3000 image reader* (*Raytest*) sichtbar gemacht.

Bei Einzelnukleotidverlängerungen wurde nur ein Triphosphat zugegeben. Bei sequentiellen Vollverlängerungen wurde zuerst ein Triphosphat zugegeben, nach entsprechender Reaktionszeit erfolgte die Zugabe weiterer Triphosphate. Bei direkten Vollverlängerungsreaktionen wurden alle benötigten Triphosphate gleichzeitig zugefügt.

Die Primerverlängerungsreaktionen wurden auf einem 22.5% TBE-Urea-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es zeigte sich, dass der Ethylendiamin-*crosslink* in der DNA stabil gegenüber den denaturierenden Bedingungen des Gels war, so dass die Reaktionsansätze vor der gelelektrophoretischen Trennung für 10 min auf 90 °C erhitzt wurden, um die Einzelstränge zu erhalten.

Massenspektrometrie der Primerverlängerungsansätze

Stränge für die Massenanalytik wurde zum Reaktionsabbruch statt mit Auftragspuffer im Verhältnis 1:1 mit Phenol (Rotiphenol) versetzt und anschließend eine Phenol-/Chloroformextraktion durchgeführt.

Dazu wurden die Reaktionsansätze mit jeweils 20 µL Phenol versetzt und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde die wässrige Lösung in ein frisches 200 µL-Reaktionsgefäß überführt und mit 2x 20 µL CHCl₃ gewaschen. Die wässrige Phase wurde aufkonzentriert (*Speedvac*) und mittels ZipTip (C18, *Millipore*) sowie MF-Membranfilter (*Millipore*) entsalzt. 0.5 µL der Probe wurden mit HPA-Matrix auf einem MALDI-Target auskristallisiert. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte an einem *Bruker Autoflex II* (MALDI-ToF).

5.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zum Einsatz in der Polymerasekettenreaktion wurden besonders lange Templatstränge benötigt, die durch eine Kombination chemischer und biochemischer Synthese hergestellt wurden. Die Stränge ODN2a (94mer) und ODN2b (84mer) wurden von Ella Biotech (Martinsried) mit dem in dieser Arbeit synthetisierten Phosphoramiditbaustein des Salicylaldehydnukleosid **60** chemisch synthetisiert. Nach Abspaltung vom Träger wurden die so erhaltenen DMT-*on*-Stränge auf der HPLC aufgereinigt und nach Entschützung ein zweites Mal chromatographisch getrennt. Nach der Entsalzung mittels Sep-Pak wurden die Konzentrationen am Nanodrop bestimmt. Die Stränge enthalten jeweils drei S-Modifikationen und sind im modifizierten Bereich komplementär, tragen also klebrige Enden (*sticky ends*). Die Einzelstränge wurden im Reaktionspuffer NEB2 hybridisiert (95 °C für 4 min, gefolgt von Abkühlen auf 4 °C in 45 min). Das Verhältnis ODN2a zu ODN2b betrug 1 : 1. Die Endkonzentration der Stränge während der Reaktion betrug jeweils 1 µM. Nach Zugabe von 2 U Klenow(exo⁻) in NEB2 inkubierte man bei RT für 10 min und startete die Primerverlängerungsreaktion bei 30 °C durch Zugabe eines dNTP-Mix (A, C, G, T, je 2 mM). Nach 2 h wurde die Reaktion durch einen Hitzeschock (90 °C für 5 min) gestoppt. Das so erhaltene doppelsträngige 153mer (ODN2a/bx) wurde verdünnt (1:1000) und als PCR-Templat verwendet.

Die PCR wurde durchgeführt in 20 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 8 mM MgCl₂, 7.5 mM DTT, 50 µg/ml BSA, 5–10 mM Ethylendiamine (en) und 375–750 µM CuSO₄. Zugefügt wurden 1 µM pro Primer ODNP4 und ODNP5, 1 nM doppelsträngige DNA (153mer, ODN2a/bx), 0.1 mM pro dNTP (N = A, C, G, T und S), und 1 U KOD XL DNA Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* (Novagen). Der PCR-Zyklus wurde folgendermaßen programmiert:

95 °C für 2 min;
42 °C für 2 min;
72 °C für 15 min,
40 Zyklen.

Die Analyse der PCR-Reaktionen erfolgte auf 6 %-igen nativen Polyacrylamidgelen. Die Anfärbung der Gele zur Sichtbarmachung der DNA-Banden unter UV-Licht erfolgte durch Anfärben des Gels mit SYBR GreenII.

5.2.4 Enzymatischer Totalverdau

Zum enzymatischen Totalverdau des PCR-Produkts wurden die entsprechenden Banden zuerst aus dem Gel ausgeschnitten und über Nacht mit Wasser ausgewaschen. Nachdem die DNA-Lösung eingeeengt wurde, wurde mit Hilfe einer Sep-Pak-Kartusche (vgl. Kap. 5.1.3) entsalzt und erneut aufkonzentriert.

Für den Verdau wurde die DNA (0.5 nmol in 100 µL H₂O) mit 10 µL Verdau-Puffer A (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄, pH = 5.7) und 80 U Nuclease S1 (aus *Aspergillus oryzae*) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 12 µL Puffer B (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0), 10 U Antarctic Phosphatase und 0.2 U Snake Venom Phosphodiesterase I (*Crotalus adamanteus venom*) wurde die Lösung weitere 3 h bei 37 °C inkubiert, um den Verdau zu vervollständigen. Die Probe wurde im Anschluss zentrifugiert (13400 rpm, 15 min). Die Analyse der totalverdauten DNA erfolgte über FT-ICR-HPLC-MS-MS auf einer 3 HDO Säule (150 x 2.0 mm, *Interchim Interchrom Uptisphere*). Dabei wurden folgende Puffer mit dem angegebenen Gradienten eingesetzt:

Puffer A: 2 mM NH₄HCOO in H₂O, pH = 5.5
 Puffer B: 2 mM NH₄HCOO in H₂O/MeCN 20/80
 Gradient: 0 → 12 min; 0 % → 3 % B;
 12 → 60 min; 3 % → 60 % B;
 60 → 62 min; 60 % → 100 % B;
 62 → 90 min; 100 % B;
 90 → 95 min; 100 % B → 0 % B;
 95 → 130 min; 0 % B
 Fluss: 0.15 mL/min.

Das Eluat wurde bei 260 nm überwacht und die Massen mit einer *Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL* bestimmt.

Zur Auswertung der LC-MS wurde das Programm *Qualbrowser*^[149] eingesetzt. Die Flächen unter dem HPLC-Chromatogramm wurden integriert, wobei die exakten Retentionszeiten (Integrationsgrenzen) mit Hilfe eines Massenfilters auf dem totalen Ionenstrom (*total ion current*, TIC) bestimmt wurden. Die Integrale der UV-Signale der einzelnen Nukleoside wurden mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten bei 260 nm korrigiert. Der Extinktionskoeffizient des dS-Trisaddukts wurde experimentell über UV-Spektroskopie bestimmt. Zudem erfolgte ein Vergleich der erhaltenen Retentionszeit mit einer chemisch synthetisierten Probe. Eine Übersicht über die Extinktionskoeffizienten ist in Tabelle 5.7 gegeben.

Tabelle 5.7: Massen, Retentionszeiten und Extinktionskoeffizienten der Desoxynukleoside

Desoxy-nukleosid	berechnete Masse [M+H ⁺] ⁺ / g mol ⁻¹	gefundene Masse [M+H ⁺] ⁺ / g mol ⁻¹	Retentionszeit / min	Extinktionskoeffizient ε ₂₆₀ / mM ⁻¹ cm ⁻¹
dA	252.1097	252.1072	24.3–25.2	15.4 ^[111]
dC	228.0984	228.0963	10.8–11.9	7.3 ^[111]
dG	268.1046	268.1020	19.8–20.9	11.7 ^[111]
dT	243.0981	243.0956	21.3–22.2	8.8 ^[111]
dS*Tris	342.1553	342.1552	23.2–24.0	9.8
dS	239.0919	239.0920	32.9–34.1	10.2 ^[75]

5.2.5 Kristallisationsexperimente

5.2.5.1 Transformation, Expression und Aufreinigung der DNA Polymerase Bst Pol I

Die Polymerase-Untereinheit der DNA Polymerase I von *Geobacillus stearothermophilus* (DSM Nr. 22) wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pENTR-TEV-D-TOPO (*Invitrogen*) kloniert, um eine N-terminale TEV-Protease-Erkennungsstelle einzubauen. Das Fragment wurde dann in das Expressionsplasmid pDEST007^[112] überführt, was zu einem N-terminalen Strep-Tag II führte.^[150]

Für den Versuch einen ternären Komplex aus Protein, DNA und ankommenden dSTP zu kristallisieren, wurde Asp-329 zu Alanin mutiert, um Kristallkontakte zu reduzieren und so die geschlossene Konformation der Polymerase zu stabilisieren.^[151] Die Mutation wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese (QuikChange II, *Stratagene*) direkt auf dem Expressionsvektor pDEST007 eingeführt, der die kodierende Sequenz für Bst Pol I trägt.^[150] Expression und Aufreinigung fanden analog zum Wildtyp-Enzym, wie unten beschrieben, statt.

Pro Transformation wurde ein Aliquot chemisch-kompetenter BL21-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 50 ng DNA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend einem Hitzeschock von 42 °C für 30 s ausgesetzt und erneut auf Eis gestellt. Danach wurden 250 µL SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 350 rpm im Eppendorf-Thermomixer 1 h inkubiert. 50 µL bzw. 250 µL wurden jeweils auf einer LB-Agar-Platte mit Carbenicillin (100 µg/mL) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Platten im Anschluss bei 4 °C gelagert.

Von einer Agarplatte wurde ein Klon entnommen und damit eine 50 mL LB-Flüssigkultur mit Carbenicillin (100 µg/mL Endkonzentration) angeimpft. Diese Übernachtskultur wurde bis zum nächsten Morgen bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. 4 x 1 L LB-Medium mit Carbenicillin (100 µg/mL Endkonzentration) wurden mit 50 mL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer $OD_{600} = 1.0$ mit Anhydrotetracyclin (100 µL Lösung pro 1 L Kultur). Die Zellen wurden weitere 3 h inkubiert und anschließend durch Zentrifugation im

SLA-3000 Rotor (8 min, 8000 rpm) sedimentiert, in 100 mL Lysispuffer resuspendiert, mit einem Proteaseinhibitor (Complete EDTA-frei, Roche) versetzt und mittels *French Press* aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0.1% NP-40 substitute und 0.1% Tween-20 als Detergenzien wurde das Lysat für 10 min auf 50 °C erhitzt, um die *E.coli*-Proteine zu denaturieren. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (30 min bei 18000 rpm) und der klare Überstand auf eine Streptactin-Säule (IBA) geladen. Mit Strep-tag-Puffer A wurde das Lysat auf die Säule gespült. Die Elution von der Säule erfolgte mittels Desthiobiotin (0.5 mg/mL in Strep-tag-Puffer B). Die vereinigten Fraktionen wurden über einen 30 kDa *cut-off* Membran-zentrifugenfilter (*Amicon*) aufkonzentriert und umgepuffert (50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA und 1 mM DTT). Die Konzentration der Proteinlösung wurde mittels *Bradford* bestimmt.

Zur Abspaltung des Strep-Tags inkubierte man über Nacht bei 0 °C mit 10 U/mg AcTEV Protease (*Invitrogen*) und erhitze anschließend nochmals für 1 h auf 30 °C. Die Proteinmischung wurde auf eine HiTrap Heparin Säule (*GE Healthcare*) geladen. Das Protein wurde mit Hilfe eines linearen Gradienten (0 % B auf 100 % B in 20 min) desselben Puffers mit hoher Salzkonzentration (1 M NaCl) eluiert. Die protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Membran-zentrifugenfiltern aufkonzentriert und auf Kristallisationspuffer umgepuffert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung erfolgte nach *Bradford*. Das Enzym wurde auf eine Konzentration von 9-10 mg/mL eingestellt und zur Kristallisation weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

5.2.5.2 Kristallisationsansätze

Die Co-Kristallisation erfolgte nach der *hanging drop vapour diffusion* Methode (Dampfdiffusion im hängenden Tropfen). Hierzu wurde zunächst der Templatstrang mit dem entsprechenden Primerstrang in 10 mM CHES, pH = 9, und 50 mM NaCl hybridisiert. Anschließend wurde das Protein Bst Pol I (10 mg/mL) mit der dsDNA in einem 1:1-Verhältnis gemischt und 1 h bei 0 °C inkubiert. Im Fall des vollständig ausgebildeten Salenbasenpaars wurden noch 6 mM CuSO₄ sowie 20 mM Ethylendiamin zugegeben.

Die Reservoirs der Kristallisationsplatten wurden mit jeweils 500 μL 0.1 M MES (pH = 5.8), 2-5% MPD, 43-52% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefüllt. Eine 1:1-Mischung von Protein/DNA-Komplex zu Reservoir-Lösung wurde als hängender Tropfen über der jeweiligen Reservoir-Lösung platziert und die Platten bei 18 °C inkubiert. Durch Diffusion erhielt man nach 10-60 d messbare Kristalle. Die Kristalle wurden in Mutterlösung mit 20% (v/v) Sucrose eingefroren und bis zur Datenmessung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und transportiert.

5.2.5.3 Kristallstrukturdaten

Die Daten wurden an den Synchrotron-Messstationen PXI und PXIII (*Swiss Light Source* (SLS), Villigen, Schweiz) aufgenommen. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme XDS^[152] und SCALA.^[153, 154] Die Strukturlösung erfolgte über *molecular replacement* mit PHASER^[155] unter Zuhilfenahme der Daten von 1U45^[113] aus der Proteindatenbank (PDB). Um Voreingenommenheit durch das verwendete Modell zu reduzieren, wurden die Temperaturfaktoren für die Hauptkette auf 20, und für die Seitenkette, sowie DNA-Atome auf 40 zurückgesetzt. Nach „simulated annealing“ mit PHENIX^[156], wurde das Modell der Struktur manuell mittels COOT^[157] gebaut. Die Modelle wurden mit REFMAC5^[158] verfeinert.

Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 5.8 angegeben. Die Anwesenheit und Position des Cu(II) im Kristall wurde mittels anormaler Beugung an der K-Kante von Kupfer bei 1.3785 Å nachgewiesen.

Tabelle 5.8: Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik. Die Nummern in Klammern beziehen sich auf die hochaufgelöste Schale.

	Prä-insertion	Freie Aldehyde	Salen
PDB-Nummer ^[159]	2xy7	2xy6	2xy5
DNA-Stränge	K1a und K1b	K2a und K2b	K2a und K2b
Experimentelle Daten			
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelle			
a, b, c (Å)	86.04, 94.02, 106.71	88.24, 93.13, 105.5	88.17, 93.47, 105.59
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Wellenlänge (Å)	1.000	1.3785	1.3785

Auflösung (Å)		46.4–3.05	50.0–2.3	93.47–2.22
R_{merge}		0.148 (0.528)	0.074 (0.402)	0.084 (0.43)
Mittel / / σ		9.5 (3.0)	15.2 (3.6)	14.9 (3.5)
Anzahl beobachteter Reflexe		58021 (8436)	150632 (21732)	211153 (29884)
Anzahl unabhängiger Reflexe		16829 (2398)	39334 (5661)	43840 (6273)
Vollständigkeit des Datensatzes (%)		99.0 (99.1)	99.9 (100)	99.9 (99.5)
Redundanz		3.4 (3.5)	3.8 (3.8)	4.8 (4.8)
Verfeinerung				
Auflösung (Å)		43.02–3.05	45.28–2.3	67.68–2.22
Anzahl an Reflexen		15959	37312	41587
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$		23.62 / 28.37	21.31 / 25.42	19.31 / 23.46
Anzahl an Atomen		4961	5168	5227
Protein		4497	4577	4584
DNA		423	403	409
Wasser		8	158	183
<i>B</i> -Faktoren				
Protein		35.66	26.73	25.33
DNA		48.24	50.94	43.11
Wasser		17.1	27.61	25.75
Standardabweichung				
Bindungslängen (Å)		0.0087	0.0127	0.0131
Bindungswinkel (°)		1.121	1.371	1.469

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Adenosin
A	Absorption
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
AFM	Rasterkraftmikroskop, engl. <i>atomic/scanning force microscope</i>
ber.	berechnet
Boc	Butoxycarbonyl
<i>br</i>	breites Signal (NMR/IR)
BTT	Benzylthiotetrazol
bp	Basenpaar(e)
C	Cytidin; Cytosin
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CEDCI	Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
conc.	konzentriert
COSY	<i>correlated spectroscopy</i> (NMR)
CPG	Glasgranulat mit def. Porengröße, engl. <i>controlled pore glass</i>
Δ	Differenz
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Tage; Dublett (NMR)
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytosin
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DCA	Dichloressigsäure
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> (NMR)
dest.	destilliert
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl
DMTCI	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> ,
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
D ₂ O	deuteriertes Wasser
dS	2'-Desoxysalicylaldehydnukleosid
dSTP	2'-Desoxysalicylaldehydtriphosphat
dT	2'-Desoxythymidin
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
DTC	Dithiocarbamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EI	Elektronenstoßionisation (MS)
en	Ethylendiamin
eq.	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisation (MS)
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere, lat. <i>et alii</i>
EtOAc	Essigsäureethylester
FC	<i>flash</i> -Säulenchromatographie
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz
G	Guanin, Guanosin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HMBC	engl. <i>heteronuclear multi-bond connectivity</i> (NMR)
HMQC	engl. <i>heteronuclear multiple quantum correlation</i> (NMR)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high pressure/performance liquid chromatography</i>
HR-MS	hochaufgelöstes Massenspektrum, engl. <i>high resolution mass spectrometry</i> ,
HSQC	engl. <i>heteronuclear single-quantum correlation</i>
HV	Hochvakuum (10 ⁻³ - 10 ⁻² mbar)
Hz	Hertz
I	Intensität
<i>i</i> Hex	<i>iso</i> -Hexan

<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR)
kat.	katalytisch
λ	Wellenlänge
L	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar, mol/L
M	Molekülion (MS)
m	Multipllett (NMR); mittel (IR)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
max.	maximal
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
<i>n</i> Bu	<i>neo</i> -Butyl
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetresonanz
NOESY	engl. <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
ODN	Oligodeoxynukleotid
p. a.	zur Analyse, lat. <i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PG	<i>protecting group</i> , Schutzgruppe
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
<i>q</i>	Quartett (NMR)
quant.	quantitativ
R	organischer Rest
Red-Al [®]	Natrium-bis(2-methoxyethoxy)aluminiumhydrid
rel.	relativ
<i>R_f</i>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
<i>rp</i>	Umkehrphase, reverse Phase

<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n); Singulett (NMR); stark (IR)
SG	Schutzgruppe
t	Triplet (NMR)
T	Temperatur
T	Thymin; Thymidin
T _m	Schmelzpunkt eines Oligonukleotids
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TEMED	TEMED Tetramethylethylendiamin, auch TMEDA
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilyl
TMS	Trimethylsilyl, Trimethylsilan
ToF	<i>Time of Flight</i> , Flugzeit
Tol	Toluol
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tris	Tris-HCl Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
U	Aktivitätseinheit eines Enzyms, engl. <i>unit</i>
UV	ultraviolett
ν	Wellenzahl (IR)
Vis	<i>visible</i> , sichtbar
Vol.	Volumen
z	Ladungszahl (MS)

7. Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.*
- [2] Das Tributylammoniumpyrophosphat wurde freundlicherweise von Dr. Milan Vrabel zur Verfügung gestellt.
- [3] G. H. Clever, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2006**. *Synthesis and Characterization of a Metal-Salen Base Pair for the Assembly of Programmed Metal Arrays inside the DNA Double Helix.*
- [4] A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 727-733. *Beyond A, C, G and T: augmenting nature's alphabet.*
- [5] I. Hirao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 622-627. *Unnatural base pair systems for DNA/RNA-based biotechnology.*
- [6] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 936-943. *Replacing the Nucleobases in DNA with Designer Molecules.*
- [7] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 990-1009. *Mimicking the structure and function of DNA: insights into DNA stability and replication.*
- [8] R. D. Knight, S. J. Freeland, L. F. Landweber, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 241-247. *Selection, history and chemistry: the three faces of the genetic code.*
- [9] F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. J. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, 192, 1227-1232. *General Nature of the Genetic Code for Proteins.*
- [10] S. Moran, R. X. F. Ren, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 10506-10511. *A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson–Crick pairing ability is replicated with high sequence selectivity.*
- [11] J. A. Piccirilli, S. A. Benner, T. Krauch, S. E. Moroney, *Nature* **1990**, 343, 33-37. *Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet.*
- [12] C. Roberts, R. Bandaru, C. Switzer, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3601-3604. *Synthesis of oligonucleotides bearing the non-standard bases iso-C and iso-G. Comparison of iso-C-iso-G, C-G and U-A base-pair stabilities in RNA/DNA duplexes.*

- [13] C. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8322-8323. *Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA.*
- [14] C. Y. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10489-10496. *Enzymic recognition of the base pair between isocytidine and isoguanosine.*
- [15] S. C. Johnson, C. B. Sherrill, D. J. Marshall, M. J. Moser, J. R. Prudent, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1937-1941. *A third base pair for the polymerase chain reaction: inserting isoC and isoG.*
- [16] A. M. Sismour, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5640-5646. *The use of thymidine analogs to improve the replication of an extra DNA base pair: a synthetic biological system.*
- [17] J. Horlacher, M. Hottiger, V. N. Podust, U. Hübscher, S. A. Benner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 6329-6333. *Recognition by viral and cellular DNA polymerases of nucleosides bearing bases with nonstandard hydrogen bonding patterns.*
- [18] H. P. Rappaport, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7253-7267. *The 6-thioguanine/5-methyl-2-pyrimidinone base pair.*
- [19] H. P. Rappaport, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3047-3057. *Replication of the base pair 6-thioguanine/5-methyl-2-pyrimidinone with the large Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I.*
- [20] T. Fujiwara, M. Kimoto, H. Sugiyama, I. Hirao, S. Yokoyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2221-2223. *Synthesis of 6-(2-thienyl)purine nucleoside derivatives that form unnatural base pairs with pyridin-2-one nucleosides.*
- [21] I. Hirao, Y. Harada, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13298-13305. *A Two-Unnatural-Base-Pair System toward the Expansion of the Genetic Code.*
- [22] I. Hirao, T. Mitsui, T. Fujiwara, M. Kimoto, T. To, T. Okuni, A. Sato, Y. Harada, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Suppl.* **2001**, *1*, 17-18. *Efforts toward creating unnatural base pairs for an expanded genetic code.*
- [23] H. Lu, A. T. Krueger, J. Gao, H. Liu, E. T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2704-2710. *Toward a designed genetic system with biochemical function: polymerase synthesis of single and multiple size-expanded DNA base pairs.*

- [24] Z. Yang, D. Hutter, P. Sheng, A. M. Sismour, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6095-6101. *Artificially expanded genetic information system: a new base pair with an alternative hydrogen bonding pattern.*
- [25] Z. Yang, A. M. Sismour, P. Sheng, N. L. Puskar, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4238-4249. *Enzymatic incorporation of a third nucleobase pair.*
- [26] P. Sheng, Z. Yang, Y. Kim, Y. Wu, W. Tan, S. A. Benner, *Chem. Commun.* **2008**, 5128-5130. *Design of a novel molecular beacon: modification of the stem with artificially genetic alphabet.*
- [27] Z. Yang, F. Chen, S. G. Chamberlin, S. A. Benner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 177-180. *Expanded genetic alphabets in the polymerase chain reaction.*
- [28] S. Moran, R. X. F. Ren, S. I. V. Rumney, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2056-2057. *Difluorotoluene, a Nonpolar Isostere for Thymine, Codes Specifically and Efficiently for Adenine in DNA Replication.*
- [29] J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2323-2324. *Minor Groove Interactions between Polymerase and DNA: More Essential to Replication than Watson-Crick Hydrogen Bonds?*
- [30] J. C. Morales, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 950-954. *Efficient replication between non-hydrogen-bonded nucleoside shape analogs.*
- [31] T. J. Matray, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6191-6192. *Selective and Stable DNA Base Pairing without Hydrogen Bonds.*
- [32] R. X. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. Rumney, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678. *Naphthalene, Phenanthrene, and Pyrene as DNA Base Analogues: Synthesis, Structure, and Fluorescence in DNA.*
- [33] S. Smirnov, T. J. Matray, E. T. Kool, C. de los Santos, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5561-5569. *Integrity of duplex structures without hydrogen bonding: DNA with pyrene paired at abasic sites.*
- [34] T. J. Matray, E. T. Kool, *Nature* **1999**, *399*, 704-708. *A specific partner for abasic damage in DNA.*
- [35] C. Yu, A. A. Henry, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3841-3844. *Polymerase recognition of unnatural base pairs.*

- [36] A. A. Henry, A. G. Olsen, S. Matsuda, C. Yu, B. H. Geierstanger, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6923-6931. *Efforts To Expand the Genetic Alphabet: Identification of a Replicable Unnatural DNA Self-Pair.*
- [37] S. Matsuda, J. D. Fillo, A. A. Henry, P. Rai, S. J. Wilkens, T. J. Dwyer, B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, P. G. Schultz, G. Spraggon, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10466-10473. *Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: Structure and Replication of Unnatural Base Pairs.*
- [38] D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585-11586. *Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: DNA Polymerase Recognition of a Highly Stable, Self-Pairing Hydrophobic Base.*
- [39] A. M. Leconte, L. Chen, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12470-12471. *Polymerase Evolution: Efforts toward Expansion of the Genetic Code.*
- [40] Y. Wu, M. Fa, E. L. Tae, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14626-14630. *Enzymatic Phosphorylation of Unnatural Nucleosides.*
- [41] A. K. Ogawa, Y. Wu, D. L. McMinn, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3274-3287. *Efforts toward the Expansion of the Genetic Alphabet: Information Storage and Replication with Unnatural Hydrophobic Base Pairs.*
- [42] Y. Wu, A. K. Ogawa, M. Berger, D. L. McMinn, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7621-7632. *Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: Optimization of Interbase Hydrophobic Interactions.*
- [43] E. L. Tae, Y. Wu, G. Xia, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7439-7440. *Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: Replication of DNA with Three Base Pairs.*
- [44] T. Mitsui, M. Kimoto, Y. Harada, A. Sato, A. Kitamura, T. To, I. Hirao, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2002**, *2*, 219-220. *Enzymatic incorporation of an unnatural base pair between 4-propynyl-pyrrol-2-carbaldehyde and 9-methyl-imidazo[(4,5)-b]pyridine into nucleic acids.*

- [45] T. Mitsui, A. Kitamura, M. Kimoto, T. To, A. Sato, I. Hirao, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5298-5307. *An Unnatural Hydrophobic Base Pair with Shape Complementarity between Pyrrole-2-carbaldehyde and 9-Methylimidazo[(4,5)-b]pyridine.*
- [46] I. Hirao, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, R. Kawai, A. Sato, Y. Harada, S. Yokoyama, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 729-735. *An unnatural hydrophobic base pair system: site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA.*
- [47] I. Hirao, T. Mitsui, M. Kimoto, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15549-15555. *An Efficient Unnatural Base Pair for PCR Amplification.*
- [48] M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e14/11-e14/19. *An unnatural base pair system for efficient PCR amplification and functionalization of DNA molecules.*
- [49] M. Kimoto, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4988-4989. *A Unique Fluorescent Base Analogue for the Expansion of the Genetic Alphabet.*
- [50] G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226-6236. *DNA-metal base pairs.*
- [51] G. H. Clever, M. Shionoya, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2391-2402. *Metal-base pairing in DNA.* Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (2690701025054).
- [52] J. Müller, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, *2008*, 3749-3763. *Metal-Ion-Mediated Base Pairs in Nucleic Acids.*
- [53] S. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2238-2245. *The Reversible Reaction of Sodium Thymonucleate and Mercuric Chloride.*
- [54] Z. Kuklenyik, L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 5654-5662. *Mercury(II) Site-Selective Binding to a DNA Hairpin. Relationship of Sequence-Dependent Intra- and Interstrand Cross-Linking to the Hairpin-Duplex Conformational Transition.*
- [55] K. Tanaka, M. Shionoya, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5002-5003. *Synthesis of a Novel Nucleoside for Alternative DNA Base Pairing through Metal Complexation.*
- [56] Abdruck mit Genehmigung von S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364-12367. *Structure of a*

- Copper-Mediated Base Pair in DNA*. Copyright 2001 American Chemical Society.
- [57] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714-10715. *A Novel Copper-Mediated DNA Base Pair*.
- [58] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4174-4175. *A Simple Glycol Nucleic Acid*.
- [59] N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13684-13685. *A Novel Silver(I)-Mediated DNA Base Pair*.
- [60] N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 13-25. *A second-generation copper(II)-mediated metallo-DNA-base pair*.
- [61] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375-3376. *2,2'-Bipyridine Ligandoxide: A Novel Building Block for Modifying DNA with Intra-Duplex Metal Complexes*.
- [62] C. Brotschi, C. J. Leumann, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1195-1197. *Transition Metal Ligands as Novel DNA-Base Substitutes*.
- [63] D.-L. Popescu, T. J. Parolin, C. Achim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6354-6355. *Metal Incorporation in Modified PNA Duplexes*.
- [64] C. Switzer, D. Shin, *Chem. Commun.* **2005**, 1342-1344. *A pyrimidine-like nickel(II) DNA base pair*.
- [65] C. Switzer, S. Sinha, P. H. Kim, B. D. Heuberger, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1529-1532. *A Purine-like Nickel(II) Base Pair for DNA*.
- [66] L. Zapata, K. Bathany, J.-M. Schmitter, S. Moreau, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 1022-1028. *Metal-Assisted Hybridization of Oligonucleotides, Evaluation of Circular 2'-O-Me RNA as Ligands for the TAR RNA Target*.
- [67] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12494-12498. *Efficient Incorporation of a Copper Hydroxypyridone Base Pair in DNA*.
- [68] K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8802-8803. *Formation of Silver(I)-Mediated DNA Duplex and Triplex through an Alternative Base Pair of Pyridine Nucleobases*.
- [69] Y. Takezawa, K. Tanaka, M. Yori, S. Tashiro, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6092-6098. *Soft Metal-Mediated Base Pairing with Novel Synthetic Nucleosides Possessing an O,S-Donor Ligand*.

- [70] Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, T. Machinami, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2172-2173. *Mercury(II)-Mediated Formation of Thymine-HgII-Thymine Base Pairs in DNA Duplexes.*
- [71] A. Ono, H. Togashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4300-4302. *Highly Selective Oligonucleotide-Based Sensor for Mercury(II) in Aqueous Solutions.*
- [72] S. Johannsen, S. Paulus, N. Düpre, J. Müller, R. K. O. Sigel, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1141-1151. *Using in vitro transcription to construct scaffolds for one-dimensional arrays of mercuric ions.*
- [73] A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, Y. Tanaka, *Chem. Commun.* **2008**, 4825-4827. *Specific interactions between silver(I) ions and cytosine-cytosine pairs in DNA duplexes.*
- [74] H. Urata, E. Yamaguchi, Y. Nakamura, S.-i. Wada, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 941-943. *Pyrimidine-pyrimidine base pairs stabilized by silver(I) ions.*
- [75] G. H. Clever, K. Polborn, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7204-7208. *A highly DNA-duplex-stabilizing metal-salen base pair.*
- [76] G. H. Clever, Y. Soeltl, H. Burks, W. Spahl, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8708-8718. *Metal-salen-base-pair complexes inside DNA: complexation overrides sequence information.*
- [77] T. P. Yoon, E. N. Jacobsen, *Science* **2003**, *299*, 1691-1693. *Privileged chiral catalysts.*
- [78] F.-A. Polonius, J. Müller, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 5602-5604. *An Artificial Base Pair, Mediated by Hydrogen Bonding and Metal-Ion Binding.*
- [79] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, *299*, 1212-1213. *A Discrete Self-Assembled Metal Array in Artificial DNA.*
- [80] G. H. Clever, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 250-253. *Controlled stacking of 10 transition-metal ions inside a DNA duplex.*
- [81] J. Müller, *Nature* **2006**, *444*, 698-698. *Metals line up for DNA.*
- [82] K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 190-194. *Programmable self-assembly of metal ions inside artificial DNA duplexes.*

- [83] S. Johannsen, N. Megger, D. Boehme, R. K. O. Sigel, J. Mueller, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 229-234. *Solution structure of a DNA double helix with consecutive metal-mediated base pairs.* Abdruck mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publisher Ltd., Copyright 2010 (2690700169679).
- [84] H. Urata, E. Yamaguchi, T. Funai, Y. Matsumura, S.-i. Wada, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6516-6519. *Incorporation of Thymine Nucleotides by DNA Polymerases through T-Hg(II)-T Base Pairing.*
- [85] K. S. Park, C. Jung, H. G. Park, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 9757-9760. *"Illusionary" Polymerase Activity Triggered by Metal Ions: Use for Molecular Logic-Gate Operations.*
- [86] M. Hoffer, *Chemische Berichte* **1960**, *93*, 2777-2781. *α -Thymidin.*
- [87] M. Takeshita, C. N. Chang, F. Johnson, S. Will, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10171-10179. *Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. Model substrates for DNA polymerases and apurinic/aprimidinic endonucleases.*
- [88] J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131-133. *A new route to nucleoside 5'-triphosphates.*
- [89] J. L. Ruth, Y.-C. Cheng, *Mol. Pharmacol.* **1981**, *20*, 415-422. *Nucleoside Analogues with Clinical Potential in Antivirus Chemotherapy.*
- [90] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065-5068. *A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides.*
- [91] F. Cramer, M. Winter, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 989-996. *Imidoester, VI. Katalytische Wirkung von Dimethylformamid bei Reaktionen von Phosphorsäureester-chloriden.*
- [92] M. Wagner, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2008**. *Die Synthese des Salicylaldehydnucleosid-Triphosphats und seine enzymatische Inkorporation in Oligonukleotide.*
- [93] K. Burgess, D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047-2060. *Syntheses of Nucleoside Triphosphates.*
- [94] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635. *Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one.*

- [95] M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. E. Gramlich, T. Carell, *Small* **2007**, 3, 1049-1055. *Formation of Bimetallic Ag–Au Nanowires by Metallization of Artificial DNA Duplexes.*
- [96] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, 94, 441-446. *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.*
- [97] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281-285. *Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses.*
- [98] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223-2311. *Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach.*
- [99] H. Klenow, I. Henningsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1970**, 65, 168-175. *Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli B by Limited Proteolysis.*
- [100] Pol η wurde freundlicherweise von Dr. Stephanie Schorr zur Verfügung gestellt.
- [101] J. R. Kiefer, C. Mao, C. J. Hansen, S. L. Basehore, H. H. Hogrefe, J. C. Braman, L. S. Beese, *Structure* **1997**, 5, 95-108. *Crystal structure of a thermostable Bacillus DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution.*
- [102] <http://www.neb.com/nebecomm/products/faqproductM0275.asp#0192> aufgerufen am 0222.0203.2011.
- [103] M. M. O. Peña, J. Lee, D. J. Thiele, *J. Nutr.* **1999**, 129, 1251-1260. *A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution.*
- [104] AIDA advanced image data analyzer V4.08.036, raytest GmbH, **2005**.
- [105] J. M. Bartlett, D. Stirling, in *PCR Protocols*, Vol. 226, **2003**, pp. 3-6.
- [106] K. B. Mullis, F. A. Faloon, in *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 155 (Ed.: W. Ray), Academic Press, **1987**, pp. 335-350.
- [107] S. Brakmann, S. Löbermann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 1427-1429. *High-Density Labeling of DNA: Preparation and Characterization of the Target Material for Single-Molecule Sequencing.*
- [108] M. Kuwahara, J.-i. Nagashima, M. Hasegawa, T. Tamura, R. Kitagata, K. Hanawa, S.-i. Hososhima, T. Kasamatsu, H. Ozaki, H. Sawai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5383-5394. *Systematic characterization of 2'-deoxynucleoside- 5'-triphosphate analogs as substrates for DNA*

- polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA.*
- [109] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1398-1399. *Directed DNA Metallization.*
- [110] M. Fischler, A. Sologubenko, J. Mayer, G. Clever, G. Burley, J. Gierlich, T. Carell, U. Simon, *Chem. Commun.* **2008**, 169-171. *Chain-like assembly of gold nanoparticles on artificial DNA templates via "click chemistry".*
- [111] A. Andrus, R. G. Kuimelis, *Base Composition Analysis of Nucleosides Using HPLC*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [112] J. C. Pieck, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2007**. *Reparatur und Replikation des Sporen Photoproduktes sowie ortsspezifische Generierung eines CPD bzw. Sporen Photoproduktes in DNA.*
- [113] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, 431, 217-221. *Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase.*
- [114] G. W. Hsu, X. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 3764-3770. *Structure of a High Fidelity DNA Polymerase Bound to a Benzo[a]pyrene Adduct That Blocks Replication.*
- [115] Ich danke Dr. Sabine Schneider für die Messung der Kristalle.
- [116] Die Rechnungen zu den Kristallstrukturen wurden freundlicherweise von Dr. Markus Müller durchgeführt.
- [117] M. Ober, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2005**. *Synthese eines carbozyklischen Analogons des Formamidopyrimidin-dG DNA-Schadens: Untersuchungen zur Replikation und Reparatur.*
- [118] F. E. Romesberg, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, 89-90. *Efforts to expand the genetic code.*
- [119] K. Masayuki, M. Yayoi, T. Tadashi, *Anal. Sci. X* **2008**, 24, x283-x284. *Synthesis and Crystal Structure of a Mononuclear Copper(II) Complex of N,N'-Bis-2,3,4-trihydroxybenzylidene-1,2-phenyldiamine.*
- [120] CCDC 602317 enthält die kristallographischen Daten für die Struktur des freien Kupfer-Salenkomplex aus den Salicylaldehydnucleosiden. Diese Daten können kostenlos vom The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhalten werden.

- [121] L. Dyers Jr, S. Y. Que, D. VanDerveer, X. R. Bu, *Inorg. Chim. Acta* **2006**, 359, 197-203. *Synthesis and structures of new salen complexes with bulky groups.*
- [122] D. Hall, T. N. Waters, *J. Chem. Soc.* **1960**, 2644-2648. *The colour isomerism and structure of some copper co-ordination compounds. Part IV. The structure of NN[prime or minute]-disalicylidene-ethylenediaminecopper.*
- [123] L. C. Nathan, J. E. Koehne, J. M. Gilmore, K. A. Hannibal, W. E. Dewhirst, T. D. Mai, *Polyhedron* **2003**, 22, 887-894. *The X-ray structures of a series of copper(II) complexes with tetradentate Schiff base ligands derived from salicylaldehyde and polymethylenediamines of varying chain length.*
- [124] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930. *Atomic Force Microscope.*
- [125] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **2000**, 78, 1997-2007. *Mechanical Stability of Single DNA Molecules.*
- [126] J. SantaLucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 1460-1465. *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics.*
- [127] <http://arep.med.harvard.edu/cgi-bin/adnan/tm.pl> aufgerufen am 19.02.2009.
- [128] J. Morfill, F. Kühner, K. Blank, R. A. Lugmaier, J. Sedlmair, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **2007**, 93, 2400-2409. *B-S Transition in Short Oligonucleotides.*
- [129] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, 6, 346-349. *Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules.*
- [130] F. C. Simmel, B. Yurke, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 80, 883-885. *A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states.*
- [131] Persönliche Mitteilung der Arbeitsgruppe von Prof. M. Shionoya.
- [132] G. D. Thorn, R. A. Ludwig, *The Dithiocarbamates and Related Compounds*, Elsevier, Amsterdam, **1962**.
- [133] H. Debus, *Ann. Chem. (Liebigs)* **1850**, 73, 26-34. *Über die Verbindungen der Sulfocarbaminsäure.*
- [134] M. Delepine, *Compt. Rend.* **1907**, 144, 1125-1127. *Metallic Salt of Dithiocarbamic Acids; Preparation of Isothiocyanates in the Aliphatic Series.*
- [135] K. D. Karlin, (Hrsg.), G. Hogarth, *Progress in Inorganic Chemistry: Chapter 2: Transition Metal Dithiocarbamates: 1978-2003, Vol. 53*, **2005**.

- [136] C. Kaul, Masterarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2006**. *Die Assemblierung gemischter Metallionenstapel in DNA und die Entwicklung eines Schwefel-haltigen Ligandosids.*
- [137] B. M. Domínguez, P. M. Cullis, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5783-5786. *2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one epoxide: A versatile intermediate for the synthesis of cyclopentyl carbocyclic 2-deoxy-, 3-deoxy- & arabinonucleoside analogues.*
- [138] D. Sebastian, A. Heuser, S. Schulze, H. Waldmann, *Synthesis* **1997**, 1098-1108. *Selective Enzymatic Removal of Protecting Groups from Phosphopeptides: Chemoenzymatic Synthesis of a Characteristic Phosphopeptide Fragment of the Raf-1 Kinase.*
- [139] H. Waldmann, A. Reidel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1997**, *36*, 647-649. *The Phenylacetyl Group—The First Amino Protecting Group That Can Be Removed Enzymatically from Oligonucleotides in Solution and on a Solid Support.*
- [140] F. Benseler, L. W. McLaughlin, *Synthesis* **1986**, 45-46. *An Improved Procedure for the Protection of 2'-Deoxyguanosine.*
- [141] Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajino, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2400-2402. *Allyloxycarbonyl group: a versatile blocking group for nucleotide synthesis.*
- [142] Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1691-1696. *The allylic protection method in solid-phase oligonucleotide synthesis. An efficient preparation of solid-anchored DNA oligomers.*
- [143] P. D. Jeffrey, S. W. McCombie, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 587-590. *Homogeneous, palladium(0)-catalyzed exchange deprotection of allylic esters, carbonates and carbamates.*
- [144] A. Dorenbeck, Dissertation, (Bochum), **2000**. *DNA-Nanostrukturen durch Self-assembly von Trisoligonucleotidylen.*
- [145] Persönliche Mitteilung von Christian Zöschinger.
- [146] T. M. Pfaffeneder, Masterarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2010**. *Synthesis of Salicylaldehyde Ribonucleotide-5'-Triphosphate and Initial Studies towards Its Enzymatic Incorporation into RNA.*

- [147] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925. *Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution.*
- [148] Origin® 6.0 SR, Microcal Software, Inc. One Roundhouse Plaza, Northampton, MA, 01060 USA, **2000**.
- [149] Qual Browser 2.0 in Xcalibur, Thermo Electron Corporation, **1998-2007**.
- [150] Klonierung und Mutation wurden freundlicherweise von Dr. Markus Müller durchgeführt.
- [151] S. J. Johnson, J. S. Taylor, L. S. Beese, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3895-3900. *Processive DNA synthesis observed in a polymerase crystal suggests a mechanism for the prevention of frameshift mutations.*
- [152] W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795-800. *Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants.*
- [153] CCP4, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760-763. *The CCP4 suite: programs for protein crystallography.*
- [154] P. Evans, *Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography* **1997**, *33*, 22-24.
- [155] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, L. C. Storoni, R. J. Read, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 458-464. *Likelihood-enhanced fast translation functions.*
- [156] P. D. Adams, R. W. Grosse-Kunstleve, L.-W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter, T. C. Terwilliger, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 1948-1954. *PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination.*
- [157] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126-2132. *Coot: model-building tools for molecular graphics.*
- [158] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240-255. *Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method.*
- [159] *Proteindatenbank über die EBI Macromolecular Structure Database* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe>).

Corinna Denise Kaul

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 18. Januar 1982
Geburtsort: Neuburg an der Donau

Schul- und Hochschulausbildung

seit Dez. 2006 Promotion
an der Ludwig-Maximilians-Universität München
unter der Leitung von Prof. Thomas Carell

Okt. 2004
– Nov. 2007 Masterstudium in Chemie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Okt. 2001
– Okt. 2004 Bachelorstudium in Chemie und Biochemie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Sept. 1992
– Juni 2001 Descartes-Gymnasium Neuburg an der Donau;
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Sept. 1988 –
Juli 1992 Grundschule der Volksschule Ehekirchen

Auszeichnungen und Stipendien

Juni 2009 *Young Researcher* beim
59. Treffen der Nobelpreisträger in Lindau

Juli 2007
– Juni 2009 Doktorandenstipendium
des Fonds der Chemischen Industrie

Dezember 2007 Klaus-Römer-Preis für die Masterarbeit

Dezember 2006 Buchpreis der Fakultät Chemie und Pharmazie
für herausragenden Erfolg im Masterstudiengang

München, 26.06.2011