

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

**Synthese und Untersuchungen eines  $\alpha$ -konfigurierten, oxidativen  
DNA-Schadens ( $\alpha$ -cFaPydG)**

**sowie**

**Entwicklung einer PNA-Templat dirigierten Ligationsstrategie**

**Florian Büsch**  
aus  
**Gießen an der Lahn**

**2007**



## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.



München, den 25.07.2007

---

Florian Büsch

Dissertation eingereicht am 25.07.2007

**Erstgutachter:** Prof. Dr. T. Carell

**Zweitgutachter:** PD Dr. J. Schatz

**Tag der mündlichen Prüfung:** 02.10.2007



Gewidmet meiner lieben Frau Isabel, unseren Söhnen Johann Elias & David Julius  
sowie meinen Eltern.

## Danksagung

*Herrn Prof. Dr. Thomas Carell* danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die intellektuelle und uneingeschränkte materielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

*Herrn PD Jürgen Spatz* danke ich für die Übernahme des Koreferats.

*Frau Gärtner* danke ich für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen Belangen.

Den Mitarbeitern *Herrn Dr. Werner Spahl* und *Frau Brigitte Tschuck* des Departments Chemie der LMU München danke ich für die Anfertigung der Massenspektren. Des Weiteren danke ich *Herrn Dr. David Stephenson* und *Frau Claudia Dubler* des Departments Chemie der LMU München für die Aufnahme der Kernresonanzspektren.

*Herrn Dr. Peter Mayer* vom Department Chemie der LMU München danke ich für die Durchführung der Kristallstrukturbestimmungen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre sowohl im Labor als auch in der Freizeit. *Dr. Sascha Breeger*, meinem langjährigen Boxennachbarn und Mitbewohner, danke ich für die vielen schönen Jahre, sowohl in Marburg als auch in München. *Dr. Johannes Gierlich* danke ich für seine hilfreichen Tipps bei allen Computerbetreffenden Fragen.

Für die Durchführung des Umlaufs danke ich *Claudia Gräf*. Für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich vor allem *Dr. Sascha Breeger*, *Heiko Müller* und *Corinna Kaul*.

Meinen Eltern und meiner ganzen Familie danke ich dafür, daß sie mir das interessante Studium ermöglicht haben und mir während dieser Zeit Rückhalt gaben.

Meiner lieben Frau *Isabel* danke ich, daß sie mich während dieser Zeit begleitet und Höhen und Tiefen mit mir geteilt hat. Ganz besonders danke ich unseren beiden Söhnen *Johann Elias* und *David Julius*. Allein mit Ihrer Anwesenheit und Lebensfreude ließen sie mich so manche schwere Situation zum Ende der Doktorarbeit bewältigen.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DNA - Träger der genetischen Information</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>DNA-Schädigung</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Oxidative Schäden .....	3
1.2.2	Schädigung des Guanosins durch direkte Oxidation.....	4
1.2.3	Schädigung des Guanosins durch Hydroxylradikale .....	5
1.2.4	Weitere oxidative DNA-Schäden .....	7
<b>1.3</b>	<b>Mutagenität</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>Reparatur</b> .....	<b>9</b>
1.4.1	Glykosylasen.....	10
<b>1.5</b>	<b>Formamidopyrimidinschaden des Guanosins (FaPydG)</b> .....	<b>12</b>
1.5.1	Analoge des Formamidopyrimidin-Schadens des Guanosins.....	13
<b>1.6</b>	<b>Reparatur von FaPydG und dessen Analoga</b> .....	<b>14</b>
<b>1.7</b>	<b>Replikation von FaPydG und dessen Analoga</b> .....	<b>15</b>
<b>1.8</b>	<b>Von der DNA zum fertigen Protein</b> .....	<b>17</b>
<b>1.9</b>	<b>Chemische Synthese von Proteinen</b> .....	<b>18</b>
1.9.1	Peptidfestphasensynthese (SPPS) .....	19
1.9.2	Native Chemische Ligation (NCL) .....	21
1.9.3	Staudinger-Ligation .....	22
1.9.4	Konzept einer templat-dirigierten Protein Synthese (TDPS) .....	24
<b>2</b>	<b>Zielsetzung Projekt <math>\alpha</math>-<math>\alpha</math>FaPydG</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse <math>\alpha</math>-<math>\alpha</math>FaPydG</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b><math>\alpha</math>-<math>\alpha</math>FaPydG: Synthese, Replikation und Reparatur</b> .....	<b>30</b>
3.1.1	Synthese des $\alpha$ - $\alpha$ FaPydG-Schadensanalogons als Phosphoramidatbaustein.....	30
3.1.1.1	Retrosynthese .....	30
3.1.1.2	Darstellung des Nitropyrimidinonderivats <b>60</b> .....	31
3.1.1.3	Darstellung des (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-Cyclopentenols <b>65</b> .....	32
3.1.1.4	Darstellung des carbozyklischen Analogons der $\beta$ -D-2'-Desoxyribose <sup>[150]</sup> .....	33

3.1.1.5	Darstellung des carbozyklischen Analogons $\alpha$ -D-2'-Desoxyribosylamins <b>70</b> ...	34
3.1.1.6	Kupplung mit dem Nitropyrimidinon-Derivat <b>60</b> und Bestimmung der absoluten Konfiguration.....	36
3.1.1.7	Darstellung des Formamids <b>77</b> durch Reduktion und Formylierung .....	38
3.1.1.8	Darstellung einer Modellverbindung zur Bestimmung der Rotationsbarrieren des <i>cis/trans</i> -Formamid <b>78</b> .....	39
3.1.1.8.1	Theorie .....	40
3.1.1.8.2	Experiment.....	40
3.1.1.9	Desilylierung, Dimethoxytrityl-Schützung und Phosphoramidit-Synthese zur Darstellung des $\alpha$ - <i>c</i> FaPydG-Analogons <b>58</b> .....	42
3.1.2	DNA-Synthese und enzymatischer Totalverdau.....	44
3.1.2.1	Einbau des $\alpha$ - <i>c</i> FaPydG-Bausteins in DNA.....	44
3.1.2.2	Enzymatischer Totalverdau $\alpha$ - <i>c</i> FaPydG enthaltender Stränge .....	45
3.1.3	Oxidation von $\alpha$ - <i>c</i> FaPydG zu 8-OxodG innerhalb der DNA .....	47
3.1.3.1	ESI-FTICR-Messungen.....	47
3.1.3.2	Enzymatischer Totalverdau $\alpha$ - $\epsilon$ -OxodG enthaltender Stränge.....	48
3.1.3.3	Ursachen, Lösungen und Interpretation .....	49
3.1.4	Einflüsse des $\alpha$ - <i>c</i> FaPydG Schadens.....	51
3.1.4.1	Thermodynamische Stabilität der Basenpaarung mit $\alpha$ - <i>c</i> FaPydG.....	51
3.1.4.1.1	Theorie .....	51
3.1.4.1.2	Ergebnisse der Schmelzpunktstudien.....	53
3.1.4.2	Replikation - fehlerfreie Replikation, Mutation oder Abbruch .....	55
3.1.4.2.1	Theorie .....	55
3.1.4.2.2	$\alpha$ - <i>c</i> FaPydG Replikation mit <i>S. cerevisiae</i> Pol $\eta$ , BstDinB und BstPol I .....	58
3.1.4.3	Fpg-Kokristallisation .....	62
3.1.4.4	<i>In vivo</i> Replikation .....	63
<b>4</b>	<b>Zielsetzung PNA-Templat dirigiertes Ligationsverfahren.....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse PNA-Templat dirigiertes Ligationsverfahren.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Aminosäurederivate für ein PNA-Templat dirigiertes Ligationsverfahren.....</b>	<b>67</b>
5.1.1	Pd(0)-spaltbarer <i>Linker</i> .....	67
5.1.1.1	Retrosynthese eines Pd(0)-spaltbaren <i>Linkers</i> .....	68
5.1.1.2	Synthese eines Pd(0)-spaltbaren <i>Linkers</i> .....	70
5.1.1.2.1	Darstellung der <i>tert</i> -Butylester und Allylethersynthese.....	70

5.1.1.2.2	Michaelis-Arbuzov-Reaktionen zur Synthese der Phosphonate <b>91</b> und <b>92</b> , Ozonolysen und HWE-Reaktionen.....	72
5.1.2	Fluorid-spaltbarer Silyl- <i>Linker</i> .....	75
5.1.2.1	Retrosynthese I eines Fluorid-spaltbaren Silyl- <i>Linkers</i> .....	75
5.1.2.2	Synthese I eines Fluorid-spaltbaren Silyl- <i>Linkers</i> .....	76
5.1.2.2.1	Darstellung der Serin-Derivate und des Glykolsäurephenacylesters zur Kupplung mit dem Silyl- <i>Linker</i> .....	76
5.1.2.2.2	Syntheseversuche der Disilyletherverbindungen <b>108</b> und <b>109</b> .....	77
5.1.2.3	Retrosynthese II eines Fluorid-spaltbaren Silyl- <i>Linkers</i> .....	80
5.1.2.4	Synthese II eines Fluorid-spaltbaren Silyl- <i>Linkers</i> .....	82
5.1.2.4.1	Synthese der Di-propyl-(3-cyanopropyl)-Silylether <b>116</b> und <b>117</b> und heterogene Reduktion mit Wasserstoff und PtO <sub>2</sub> .....	82
5.1.2.4.2	Synthese der Zielverbindung <b>120</b> und Syntheseversuche von Zielverbindung <b>122</b> .....	83
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>86</b>
<b>6.1</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>86</b>
<b>6.2</b>	<b>Synthese des carbozyklischen <math>\alpha</math>-<i>c</i>FaPydG-Phosphoramiditbausteins <b>58</b></b> .....	<b>91</b>
6.2.1	Synthese des Pyrimidinonderivats <sup>[46, 62]</sup> <b>60</b> .....	91
6.2.2	Darstellung des carbozyklischen Desoxyribosylamins <b>70</b> .....	93
6.2.3	Kupplung des Carbozyklus <b>60</b> mit dem Pyrimidinonderivat <b>70</b> .....	102
6.2.4	Umfunktionalisierungen des carbozyklischen Nukleotids <b>75</b> .....	103
6.2.5	Synthese der Referenzverbindung <b>78</b> zur Bestimmung der Rotationsbarrieren....	108
<b>6.3</b>	<b>Synthese von Aminosäurederivaten</b> .....	<b>109</b>
6.3.1	Synthesestudien zum Pd(0)-spaltbaren <i>Linker</i> .....	109
6.3.1.1	Darstellung der allyl-geschützten Aminosäurederivate - Edukte der Ozonolyse- Reaktionen.....	109
6.3.1.2	Darstellung der Phosphonate <b>91</b> und <b>92</b> .....	116
6.3.1.3	Darstellung der Aminosäurealdehyde durch Ozonolysen mit reduktiver Aufarbeitung .....	117
6.3.2	Modellverbindungen der HWE-Reaktion.....	121
6.3.3	Darstellung des Wittigreagenzes <b>105</b> .....	123
6.3.4	Synthesestudien zur Darstellung von Di- <i>tert</i> -Butyl-disilylethern.....	124
6.3.5	Synthese der Zielverbindung <b>120</b> .....	128
6.3.6	Syntheseversuche zur Darstellung der Zielverbindung <b>122</b> .....	131

<b>6.4</b>	<b>Herstellung und Reinigung von Oligonukleotiden.....</b>	<b>135</b>
6.4.1	Oligonukleotide mit $\alpha$ -cFaPydG.....	135
6.4.2	Abspaltung, Entschützung und Reinigung der DNA-Stränge .....	136
<b>6.5</b>	<b>Elongationsstudien mit DNA-Polymerasen.....</b>	<b>144</b>
6.5.1	Pol $\eta$ aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	144
6.5.2	DinB aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	145
6.5.3	Pol I aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	146
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>147</b>
7.1	Röntgenkristallstruktur von 88.....	147
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>157</b>

## I Zusammenfassung

Nach oxidativem Streß findet man in Zellen häufig zwei DNA-Schäden: 8-OxodG und das 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPydG). Beide leiten sich von der ungeschädigten DNA-Base Guanin ab. Der FaPydG-Schaden kann sowohl in der  $\beta$ - als auch in der  $\alpha$ -Konfiguration vorliegen. Um biologische Fragestellungen bzgl. der Basenpaarung und der Kodierungseigenschaften beider Formen zu klären, war es notwendig, das  $\alpha$ -Anomers des carbozyklischen FaPydG-DNA-Schadens zu synthetisieren. Die Darstellung des  $\beta$ - $\alpha$ FaPydG-Schadens erfolgte bereits 2005 in der Arbeitsgruppe *Carell*. In einer sechzehnstufigen Synthese konnte der  $\alpha$ -Schaden in Form seines Phosphoramiditbausteins dargestellt werden. Über automatisierte DNA-Synthese konnten Oligonukleotide am festen Trägermaterial synthetisiert und nach Abspaltung und HPLC-Reinigung in verschiedenen Experimenten genutzt werden.

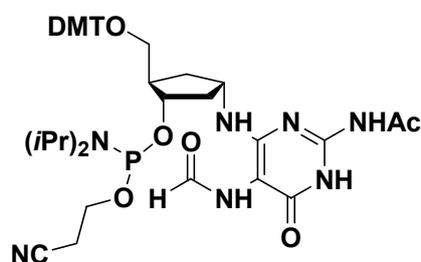


Abbildung I:  $\alpha$ -FaPydG-Schaden als Phosphoramiditbaustein.

Einige der hergestellten DNA-Oligonukleotide enthielten reproduzierbar den eingesetzten FaPydG-Schaden, andere zeigten eine Oxidation zum  $\alpha$ - $\delta$ -OxodG. Diese Reaktion ist von dem natürlichen Schaden nicht bekannt, literaturbekannt ist lediglich eine Dehydratisierung unter harschen Bedingungen zum Guanosin. Die gemachten Beobachtungen lassen sich über eine zyklisierte Zwischenform erklären, welche durch die Oxidationslösung während der DNA-Synthese oxidiert wird. Liegt das Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - $\alpha$ FaPydG und  $\alpha$ - $\delta$ -Hydro,hydroxydG, abhängig von der Sequenz, auf Seiten der geschlossenen Form, so ist eine Oxidation aus dieser Zwischenverbindung direkt zum 8-OxodG denkbar.

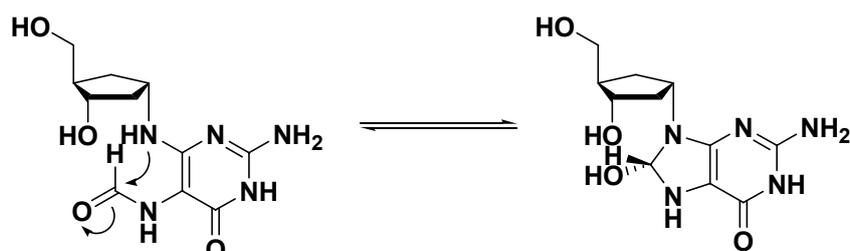


Abbildung II: Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - $\alpha$ FaPydG und  $\alpha$ - $\delta$ -Hydro,hydroxydG.

Diese Vermutung wird belegt durch die Tatsache, daß zeitgleich synthetisierte und völlig identisch behandelte DNA-Stränge anderer Sequenz keine Oxidationsprodukte zeigten. Festgestellt werden konnte dies durch hochaufgelöste ESI-FTICR-Messungen. Mit dieser Analysemethode sind geringste Abweichungen zuverlässig nachweisbar, wohingegen die häufig genutzten MALDI-TOF-Messungen diese Abweichungen nicht immer zeigten.

Thermodynamische Studien konnten belegen, daß das  $\alpha$ -cFaPydG kein bevorzugtes DNA-Basenpaar ausbildet. Alle möglichen Basenpaare zeigten starke Destabilisierung im Vergleich zum ungeschädigten Basenpaar.

Elongationsversuche *in vitro* mit *S. cerevisiae* Polymerase  $\eta$ , *G. stearothermophilus* DNA-Polymerase I und DinB aus *G. stearothermophilus* ergaben, daß der  $\alpha$ -Schaden ein vollständiger Block für alle genannten Polymerasen ist. Erst bei drastischen Reaktionsbedingungen konnte eine Verlängerung des Primers mit *Bst*Pol I detektiert werden. Das Ergebnis zeigte einen bevorzugten Einbau von dCTP gegenüber dem DNA-Schaden, gefolgt vom Einbau von dATP.

Zukünftig sind Versuche zur Vermeidung der unerwünschten Oxidation von  $\alpha$ -cFaPydG notwendig, um die Cokristallisation des  $\alpha$ -cFaPydG-Oligomers mit dem Fpg-Protein aus *Lactococcus lactis* und *Bst*Pol I weiter voran treiben zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Versuche zur Darstellung von tetrafunktionellen Aminosäurederivaten unternommen, die in einem neuen Verfahren für eine PNA-Templat dirigierte Ligation eingesetzt werden sollten. Eine Ligation findet zwischen zwei Aminosäuren statt, so daß für einen Ligationsversuch mit diesem neuen Verfahren immer ein zusammengehöriges Paar von Aminosäureverbindungen notwendig ist.

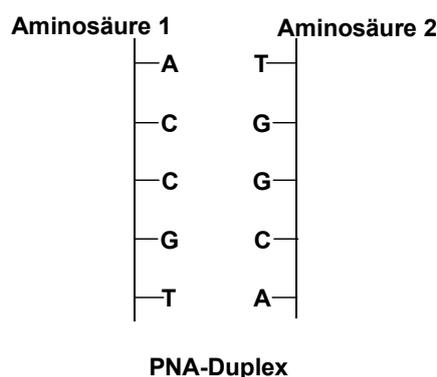


Abbildung III: Prinzip der PNA-Templat dirigierte Ligation.

Dieses Paar benötigt eine Verbindungsstelle zur PNA (siehe Abbildung III) über die Seitenkette der Aminosäure und jeweils einen *N*- und einen *C*-Terminus der Aminosäure selbst für die eigentliche Ligrationsreaktion. Dieser darf während der Festphasensynthese nicht reagieren. Nach erfolgter Ligation soll das Templat wieder selektiv abgespalten werden. Somit erge-

ben sich folgende Anforderungen an das Aminosäurepaar: Die Aminosäuren müssen funktionelle Seitenketten besitzen, die nach Abspaltung des PNA-Templats wieder natürlich vorliegen. Zur selektiven Abspaltung des Templats ist eine Verbindung orthogonal zu säure- und basenlabilen Schutzgruppen notwendig, da diese bereits auf den verbleibenden drei Termini der Verbindung zur Festphasensynthese benötigt werden.

Denkbare orthogonal spaltbare "Brücken" sind allylische Verbindungen, die Pd(0)-spaltbar sind, aber auch siliziumbasierte Verbindungen, die mit Fluorid-Ionen spaltbar sind, sind prinzipiell geeignet.

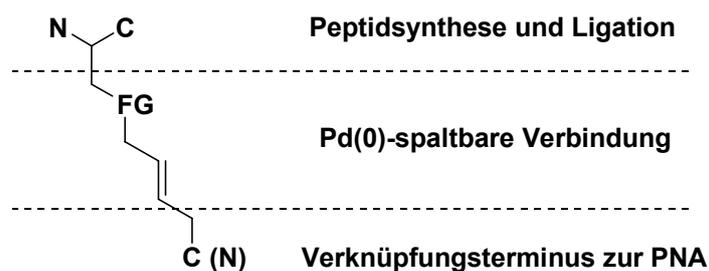


Abbildung IV: Prinzipieller Aufbau eines Aminosäurederivats für ein templat dirigiertes Ligationsverfahren.

Auf dem Bereich des Pd(0)-spaltbaren *Linkers* ist ein retrosynthetischer Schnitt an eben dieser Funktionalität als geeignet anzusehen. Denkbar ist hier z. B. eine *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion. Die benötigten Aldehyde und Phosphorylide für diesen Schlüsselschritt konnten in guten Ausbeuten hergestellt werden. Allerdings konnte lediglich eines der zwei benötigten Aminosäurederivate hergestellt werden. Die Synthese des anderen Produktes gelang unter diversen Reaktionsbedingungen nicht. Ebenso blieben Versuche erfolglos ähnliche Pd(0)-spaltbare *Linker*-Moleküle über klassische *Wittig*- oder Metathese-Reaktionen mit den *Grubbs*-Katalysatoren der 1. und 2. Generation herzustellen.

Die erfolgreichsten Versuche, synthetisch ein Zielmolekülpaar für einen ersten Ligationsversuch zugänglich zu machen, verliefen auf dem Gebiet der Darstellung eines fluoridspaltbaren Silyl-*Linkers*. Hierbei bleiben alle genannten Anforderungen die gleichen lediglich anstelle der Allylverbindungen sind Silylether notwendig. Je weniger Silylether in einer solchen Verbindung vorhanden sind, desto säurestabiler ist sie. Ein zweiter Einfluß auf die Säurestabilität kann über die Größe der Alkylsubstituenten genommen werden (*tert*-Butyl > isopropyl > Ethyl). Zunächst wurden Substitutionsversuche mit den Verbindungen Di-*tert*-Butylchlorsilan, Di-*tert*-Butyldichlorsilan und Di-*tert*-Butylsilylbis(trifluormethansulfonat) unternommen, um über einen Di-*tert*-butyldisilylether eine Verbindung zwischen PNA und Aminosäure herzustellen. Die Substitutionen lieferten allerdings lediglich monosubstituierte Silanole, unabhängig davon, welche Reaktionsbedingungen und Substitutionsreihenfolgen gewählt wurden. Erfolgreicher konnten diesbezüglich die Experimente mit dem kommerziell erhältlichen (3-

Cyanopropyl)-diisopropyl-chlorsilan durchgeführt werden. Hierbei gelang die Darstellung eines der Zielmoleküle - Molekül **120**.

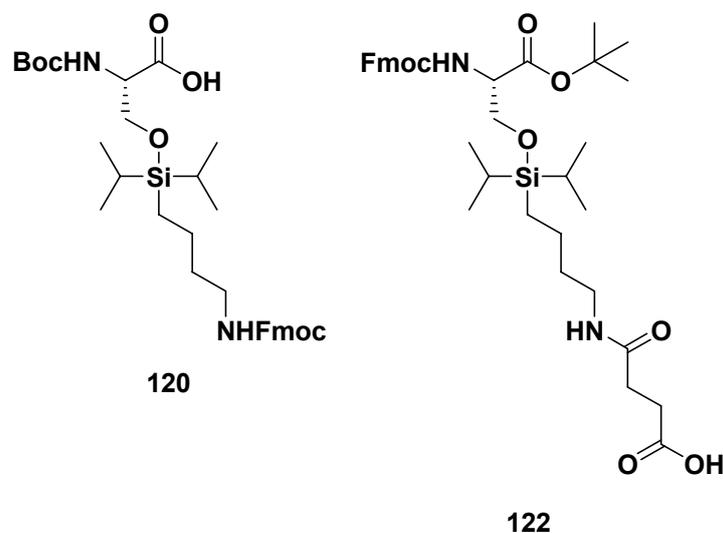


Abbildung V: Fluorid-spaltbare Silizium-Verbindung als Verbindung zwischen PNA und Aminosäure.

Die Darstellung des zweiten benötigten Bausteins **122** gelang bis zur vorletzten Stufe in sehr guten Ausbeuten. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Darstellung der zweiten Zielverbindung war aus Gründen der thematischen Neuausrichtung der Arbeitsgruppe *Carell* innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich.

## I Summary

Following oxidative stress often two kinds of DNA-lesions can be found: 8-OxodG and the 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPydG). Both derive from the DNA-Nucleobase guanine. The FaPydG-lesion can exist both in the  $\beta$ -configuration and the  $\alpha$ -configuration. To clarify biological questions concerning the basepairing and the encoding features of both forms it was necessary to synthesise of the  $\alpha$ -anomer of the carbocyclic FaPydG-DNA-lesion. The synthesis of the  $\beta$ - $\alpha$ -FaPydG-lesion was already finished in 2005 in the *Carell* group. In a sixteen-step synthesis the  $\alpha$ -lesion could be prepared in the form of its phosphoramidite component. Oligonucleotides could be prepared on solid support using automated DNA-synthesis.

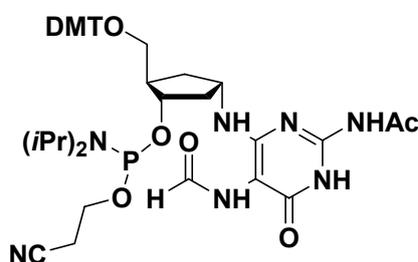


Figure I:  $\alpha$ - $\alpha$ -FaPydG-lesion as phosphoramidite component.

Some of the synthesised DNA-Nucleotides contained the inserted FaPydG-lesion. Others showed an oxidation to  $\alpha$ - $\beta$ -OxodG. This reaction is not known for natural lesion. Just a dehydration to guanosine under harsh conditions is described. The observations can be explained by formulation of a cyclic intermediate, which is possibly oxidized by the oxidation dilution during the DNA-synthesis. If the sequence-dependent equilibrium between  $\alpha$ - $\alpha$ -FaPydG and  $\alpha$ - $\beta$ -Hydro,hydroxydG is at the side of the closed form, an oxidation from this intermediate directly to 8-OxodG is imaginable.

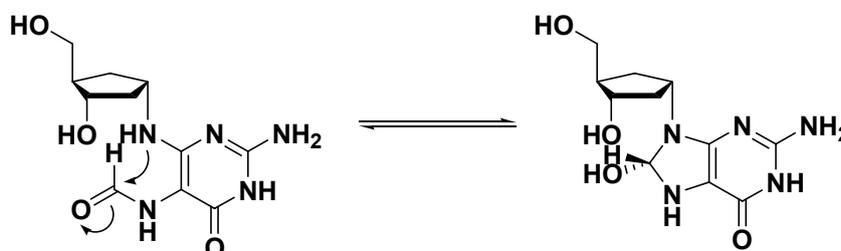


Figure II: Equilibrium between  $\alpha$ - $\alpha$ -FaPydG and  $\alpha$ - $\beta$ -Hydro,hydroxydG

This assumption is proven by the fact that at the same time synthesised and completely identically treated DNA-strands of different sequence didn't show oxidation products. This

## Summary

could be ascertained by high resolution ESI-FTICR-measurement. With this analytical method even smallest variations are detectable in a reliable way, whereas the often used MALDI-TOF-measurements not always show these variations.

Thermodynamic studies showed that  $\alpha$ -cFaPydG doesn't form a preferred DNA-basepair. All possible basepairs showed a strong destabilisation in comparison to the undamaged, correct basepair. *In vitro* elongation experiments with *S. cerevisiae* polymerase Pol  $\eta$ , *G. stearothermophilus* DNA-polymerase I and DinB from *G. stearothermophilus* showed that the  $\alpha$ -lesion is a definitive block for all mentioned polymerases. Only by applying rigorous reaction conditions an elongation of the primer with *Bst*Pol I could be detected. This elongation showed a favored incorporation of dCTP, followed by an incorporation of dATP.

In the time to come experiments to avoid the unwanted oxidation of  $\alpha$ -cFaPydG will be essential to promote the cocrystallisation of the  $\alpha$ -cFaPydG-oligomere with the Fpg-protein from *Lactococcus lactis* and the *Bst*Pol I.

In the second part of the thesis attempts were taken to prepare tetrafunctional amino acid derivatives, which were planned to be used in a PNA-template directed ligation reaction. Ligation takes place between two amino acids, so that for a ligation attempt with this method there is always needed a matching pair of amino acids.

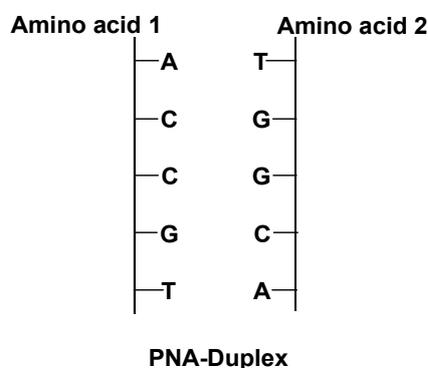


Figure III: Principle of PNA-template directed ligation.

This pair requires a connection of the amino acid to the PNA over the side chain of the amino acid. The *N*- and *C*-terminus of the amino acid had to be unprotected for the ultimate ligation reaction. These termini must not react during the solid support PNA-synthesis. After ligation the template should be separated selectively. Thus, the following requirements for the pair of amino acids result: The amino acids have to possess functional side chains, which exist naturally after cleavage of the PNA-template. For the selective cleavage of the template a connection orthogonal to acid and base unstable protecting groups is necessary, because these are already needed for the solid support synthesis on the residual three termini of the compound.

Imaginable orthogonal cleavable links are allylic compounds, which are cleavable with Pd(0), but also silicon based compounds, which are cleavable with fluoridions, would be appropriate.

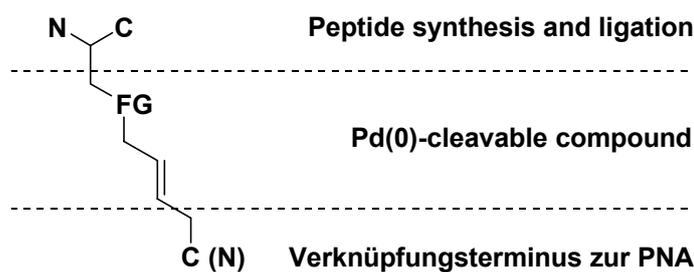


Figure IV: Basic structure of an amino acid derivative for a template-directed ligation method.

In the area of the Pd(0)-cleavable link a retrosynthetic cut at this functionality should be adequate. Here, e.g. a *Horner-Wadsworth-Emmons*-reaction is imaginable. The aldehydes and phosphorylides needed for this key step could be prepared with good yields, however only one of the two amino acid derivatives was obtained. The synthesis of the other compound didn't succeed under diverse reaction conditions. Also efforts to prepare analogue Pd(0)-cleavable link molecules through classic *Wittig* or metathese reactions with *Grubbs* catalysts of the first and second generation were unsuccessful.

The most successful efforts to make a target molecule synthetically accessible for a first ligation attempt involved the preparing of a fluorid-cleavable silyl link. Here all requirements stay the same, just instead of allylic compounds silyl ethers are needed. The acid stability of the silyl protecting group depends on the size of the alkyl groups (*tert*-butyl>isopropyl>ethyl). Firstly, substitution experiments with the compounds Di-*tert*-butylchlorosilane, Di-*tert*-butyl-dichlorosilane and Di-*tert*-butylsilylbis(trifluoromethanesulfonate) were undertaken to establish a connection between PNA and the amino acid through a Di-*tert*-butyldisilylether. However, the substitutions produced just monosubstituted silanoles, irrespective of the choice of reaction conditions and substitution order. The experiments with the commercially available (3-Cyanopropyl)-diisopropyl-chlorosilane were more successful. Here the synthesis of one of the target molecules- molecule **120** - could be achieved.

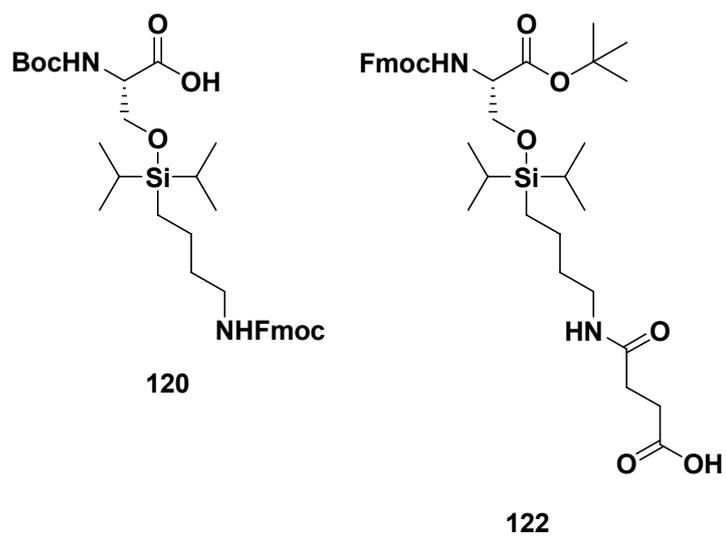


Figure V: Fluorid-cleavable silicon compound as a link between PNA and amino acid.

The preparation of the needed second compound **122** succeeded until the last step. An optimisation of reaction conditions for the synthesis of the second target compound was not possible within the thesis.

# 1 Einleitung

## 1.1 DNA - Träger der genetischen Information

Alle Lebensformen der Erde sind durch ihren genetischen Bauplan - die Sequenz der Desoxyribonukleinsäure - festgelegt. Die Sequenz der DNA, das heißt die Abfolge der einzelnen Basen, kodiert den Aufbau eines jeden Proteins, diese wiederum ermöglichen erst alle Abläufe und Steuerungen eines Organismus.<sup>[1, 2]</sup> Wichtige Funktionen wie die Regulation von Stoffwechselwegen, die Zellatmung, oder die makroskopischen Prozessen, wie der Bewegung werden von Proteinen gesteuert. Alle Eigenschaften einer Lebensform sind auf die Reihenfolge der DNA Basen Adenin **1**, Thymin **2**, Guanin **3** und Cytosin **4** zurückzuführen.

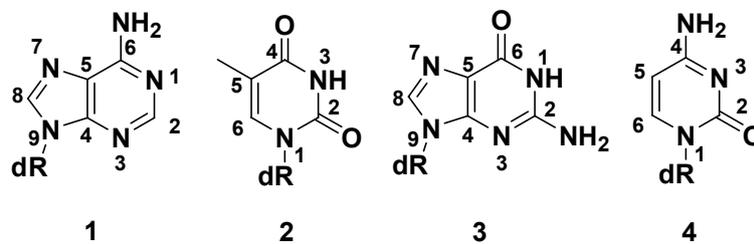


Abbildung 1.1: Die vier DNA Basen mit Nummerierung der Atome. dR = 2'-Desoxyribofuranose.

Erst 70 Jahre nach der ersten Isolierung durch *F. Miescher*<sup>[3]</sup> wurde die Funktion der DNA 1944 von *Avery, McLeod* und *McCarty* nachgewiesen.<sup>[4]</sup> Von da an ging die Aufklärung der genauen Funktion der DNA mit großen Schritten voran: 1950 veröffentlichte *Chargaff* das Prinzip der Basenkomplementarität, das besagt, daß sich ein Adenin mit einem Thymin und ein Guanin mit einem Cytosin über charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen zu einem stabilen Basenpaar zusammenfindet, man spricht auch von komplementären Basenpaaren.<sup>[5, 6]</sup> Diese Erkenntnis zeigt allerdings auch, daß die genetische Information nicht einfach, sondern doppelt in einem DNA-Molekül gespeichert ist. Das polymere DNA-Molekül besteht aus Monomeren, die man Nukleotide nennt. Unter einem Nukleosid versteht man eine Nukleobase, die über eine glykosidische Bindung an eine 2'-Desoxyribose gebunden ist (Abbildung 1.1). Diese Nukleoside werden dann über eine Phosphodiesterbindung zu einem DNA-Strang verknüpft. Die Struktur eines solchen DNA-Strangs, die sogenannte Doppelhelix, wurde 1953 durch *Watson* und *Crick* mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.<sup>[7]</sup> Hierbei waren die Erkenntnisse von *Chargaff* von entscheidender Bedeutung. Dieser Zeitpunkt wird als Beginn der Molekularbiologie aufgefaßt.

## 1.2 DNA-Schädigung

Das Speichermolekül der genetischen Information ist permanent in allen Zellen Schädigung ausgesetzt. Immer wieder auftretende Replikationsfehler der DNA Polymerasen - verursacht durch eine unterschiedlich hohe Replikationsgenauigkeit - können zum Verlust der ursprünglichen Erbinformation führen. Der Verlust der Information wird aber besonders durch endogene (von innen kommende) und exogene (durch äußere Ursachen entstehende) Einflüsse beschleunigt. Pro Zelle und Tag treten so  $10^4$  bis  $10^6$  Schäden auf.<sup>[8]</sup> Die Zelle muß zur Bewahrung ihres Erbguts bestrebt sein, auftretende Fehler schnellstmöglich zu erkennen und diese zu beheben. Zu den exogenen Einflüssen zählen neben ionisierender Strahlung auch mutagene Chemikalien und UV-Strahlung. Endogene Einflüsse können Abbau- oder auch Zwischenprodukte von Chemikalien des Stoffwechsels selbst sein. Hierbei sind allen voran die "*reactive oxygen species*" (ROS) zu nennen. In Schema 1.1 ist eine Übersicht von endogenen und exogenen Einflüssen und deren Auswirkungen auf die DNA dargestellt.<sup>[8, 9]</sup>

### schädigende Einflüsse

Alkylierende Reagenzien

Reaktive Sauerstoffspezies  
(ROS)

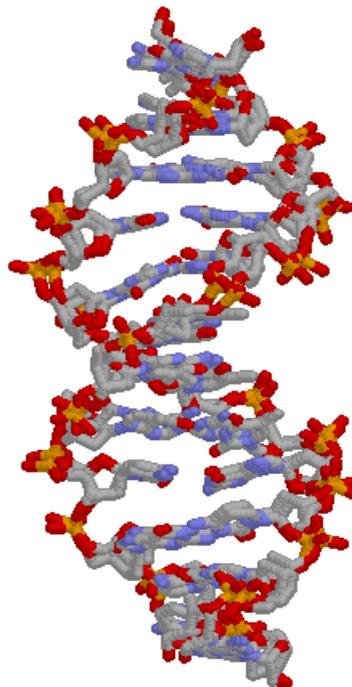
Direkte Oxidation

Ionisierende Strahlung

UV-Strahlung

Röntgenstrahlung

Spontaner Abbau



### gebildete Schäden

O<sub>6</sub>-meG, Adduktschäden

Abasische Stellen

Oxidative DNA-Schäden

Schäden am Rückgrat

Einzelstrangbrüche

Dimerschäden

Doppelstrangbrüche

Abasische Stellen

Desaminierte Basen

Schema 1.1: Exogene und endogene Einflüsse und deren mögliche Auswirkungen auf die DNA.

Um schadhafte Stellen in der DNA schnell und effizient ausfindig zu machen und diese anschließend zu beheben, haben sich im Laufe der Evolution viele verschiedene Erkennungs- und Reparaturwege entwickelt. Nach erfolgreicher Erkennung, anschließend erfolgter Reparatur oder auch Neusynthese des DNA-Strangs sollte eine korrekte Replikation wieder möglich sein. Viele der möglichen DNA Schäden sind heute chemisch gut erforscht. Abhängig von der verursachenden Spezies werden DNA-Schäden in unterschiedliche Klassen eingeteilt.

DNA-Schäden können an verschiedenen Stellen des Makromoleküls auftreten, abhängig davon welcher schädigende Einfluß vorliegt, sind das Phosphodiesterückgrat, die Zuckereinheit oder die DNA-Base betroffen. Die Folgen reichen von Einzel- und/oder Doppelstrangbrüchen über so genannte "*bulky adducts*" und UV-Schäden bis hin zu oxidativen Schäden.

### 1.2.1 Oxidative Schäden

Alle DNA-Basen sind prinzipiell oxidierbar, allerdings unterscheiden sich ihre Redoxpotentiale erheblich.<sup>[10]</sup> Während die Redoxpotentiale von Cytosin und Thymin mit 1.6 V und 1.7 V niedrig liegen, sind die Potentiale von Adenin und Guanin mit 1.42 V und 1.29 V so, daß eine effiziente Schädigung erfolgt.<sup>[11, 12]</sup> Besonders von Guanin sind zahlreiche Oxidationsprodukte isoliert worden. Das Redoxpotential von 1.29 V wird in einem DNA-Doppelstrang auf 0.82-1.16 V durch  $\pi$ -Wechselwirkungen des Guanins mit den anderen DNA-Basen abgesenkt.<sup>[13-16]</sup>

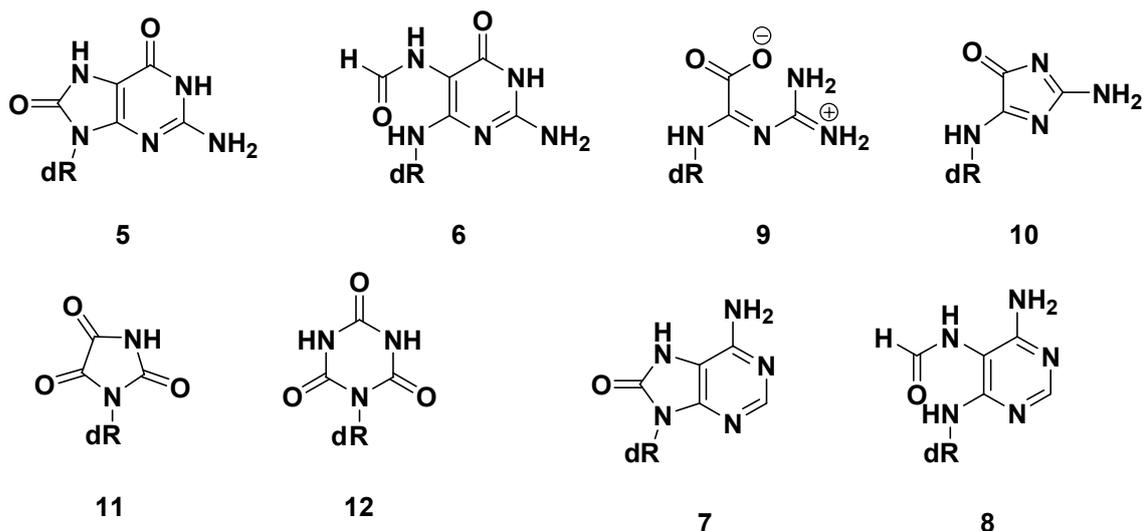


Abbildung 1.2: Die am häufigsten auftretenden oxidativen DNA-Schäden mit dR = 2'-Desoxyribofuranose.

Eine Übersicht über die purinbasierten DNA-Oxidationsschäden ist in Abbildung 1.2 gezeigt. Hierbei sind die häufigsten das 7,8-Dihydro-8-oxoguanosin (8-OxodG **5**) und das Formamidopyrimidin des Guanins (FaPydG **6**).<sup>[13, 17-20]</sup> Analog zum Guanin treten diese Schädigungen auch bei Adenin in Form von 8-OxadA **7** und FaPydA **8** auf. Weitere Oxidationsprodukte, die aus einer Kaskade vom 8-OxodG entstehen können, sind das Oxazolone **9**, das Imidazolone **10**, aber auch die Parabansäure **11** und die Cyanursäure **12**. Alle genannten oxidativen Schäden sind - neben weiteren - Endprodukte der Oxidationskaskade des Guanins. Alle genannten Produkte, abgesehen von FaPydG **6** und FaPydA **8**, können sich unter oxidativen Bedingungen mittels Decarboxylierung, Hydrolyse und/oder Eliminierung von Harnstoff aus 8-OxodG **5** bilden.<sup>[21-23]</sup>

## 1.2.2 Schädigung des Guanosins durch direkte Oxidation

Die Guaninbase in der DNA-Doppelhelix kann prinzipiell auf verschiedenen Wegen oxidiert werden. Die hier genauer dargestellten Wege sind die direkte Oxidation mittels Abgabe eines einzelnen Elektrons und die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

Bei der Einelektronenoxidation des Guanins entsteht nach Abgabe eines Elektrons ein Radikalkation **13**, das unter protischen Bedingungen im Gleichgewicht mit dem neutralen Radikal **14** steht, welches wiederum unter basischen Bedingungen in das Guaninradikalanion **15** übergehen kann.

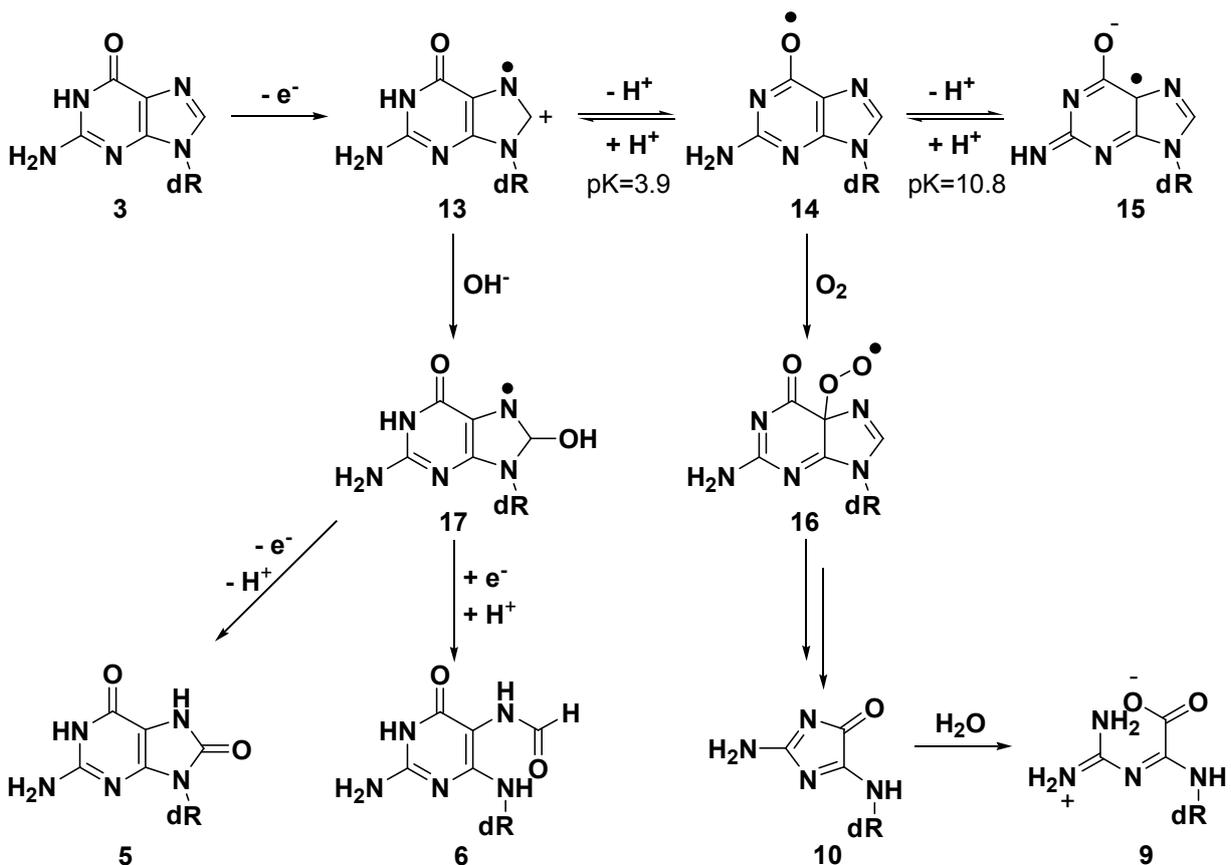


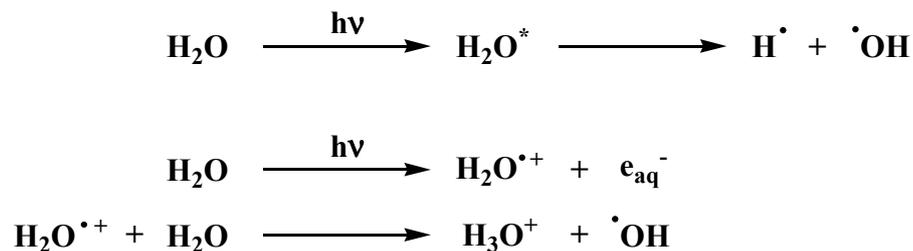
Abbildung 1.3: Einelektronenoxidation des Guanins.

Aus den einzelnen Radikalintermediaten **13** und **14** können sich die oxidativen Schäden Imidazol **10**, Oxazol **9** FaPydG **6** und 8-OxidG **5** bilden, wie dies in Abbildung 1.3 dargestellt ist. Hierzu reagiert das Intermediat **14** über das Peroxoradikal **16**, das sich unter Sauerstoffeinfluß bilden kann, zu Imidazol **10** und anschließend unter Hydrolyse zu Oxazol **9**. Unter basischen Bedingungen reagiert das Radikalkation **13** mit einem Hydroxidion zu einem instabilen Intermediat **17**. Dieses C8-Hydroxylradikal kann nun in einer erneuten Oxidation 8-OxidG **5** bilden oder unter reduktiven Bedingungen zu FaPydG **6** weiterreagieren. Streng betrachtet sind FaPydG **6** und FaPydA **8** keine oxidativen DNA-Schäden sondern Hydrolyse-

produkte des Guanins. Dennoch werden sie aufgrund ihres Ursprungs zu dieser Klasse gezählt.

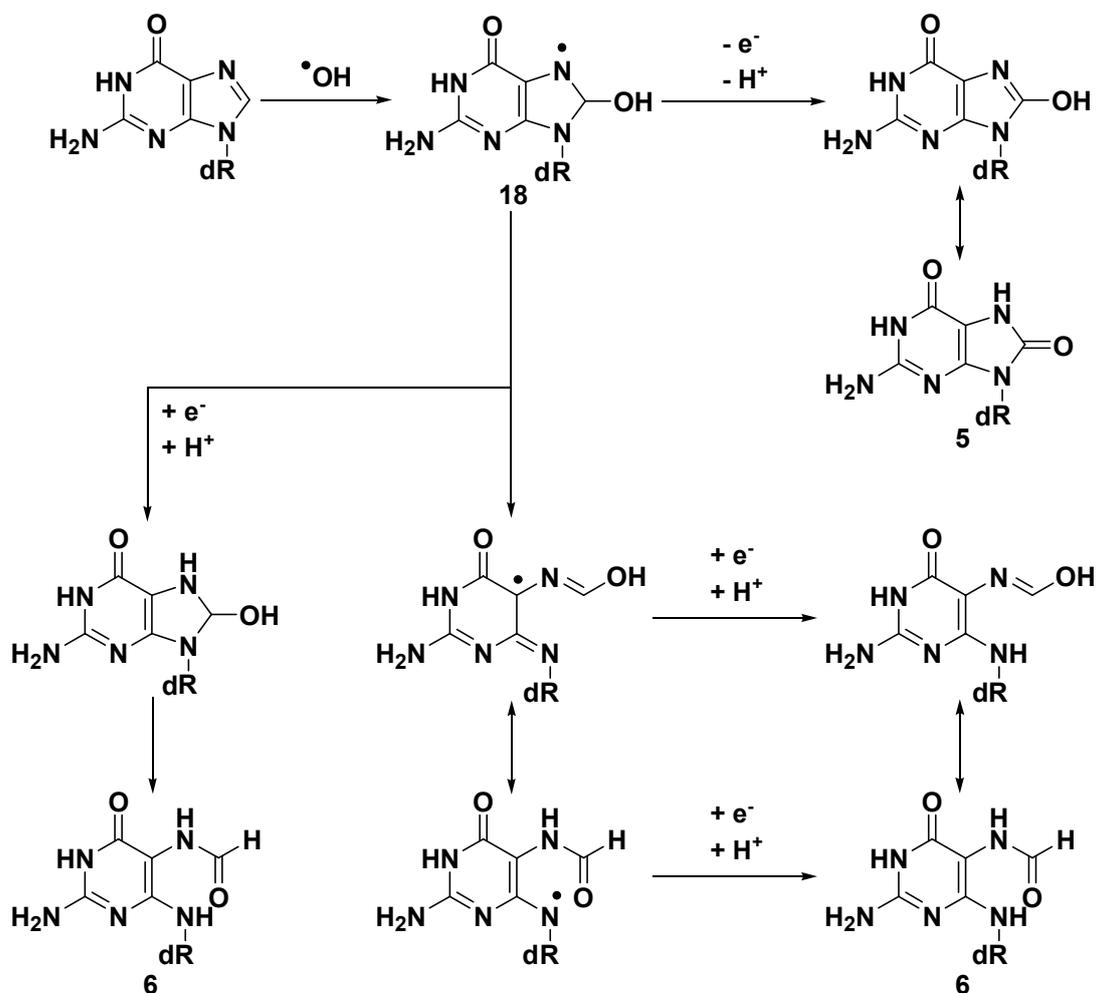
### 1.2.3 Schädigung des Guanosins durch Hydroxylradikale

Eine weitere Möglichkeit, das Guanin zu schädigen, ist die Reaktion der Nucleobase mit Hydroxylradikalen.<sup>[13, 19, 20, 24, 25]</sup> Diese entstehen endogen in besonders großen Mengen, z. B. bei einem Herzinfarkt<sup>[26]</sup> und beim Schlaganfall.<sup>[27]</sup> Als Nebenprodukt der Zellatmung und somit auch endogenen Ursprungs entsteht Wasserstoffperoxid, das durch die sogenannte *Fenton*-Reaktion in Anwesenheit von Fe(II) ein Hydroxidion und ein Hydroxylradikal bildet.<sup>[28, 29]</sup> Hierbei wird Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert. Diese Hydroxylradikale zählen zu den "reactive oxygen species" (ROS) und können auch exogen entstehen. Hierbei liefern  $\gamma$ -Strahler wie z. B.  $^{60}\text{Co}$  über zwei Reaktionen mit hohen Quantenausbeuten Hydroxylradikale.<sup>[19]</sup> Experimente mit anschließender Quantifizierung zeigten, daß ein einziges Photon im Schnitt zur Bildung von ca. 36 000 Hydroxylradikalen führt.



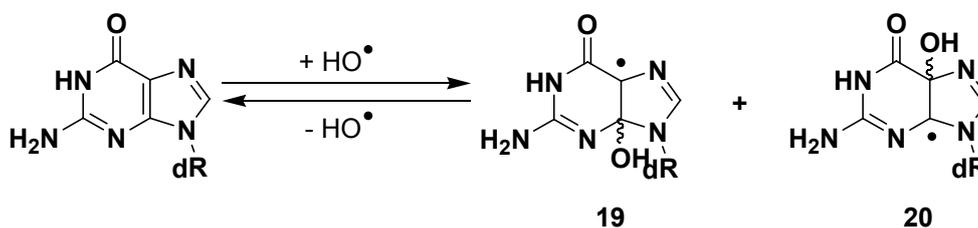
Schema 1.2: Bildung von Hydroxylradikalen.

Gelangen reaktive Sauerstoffspezies in die Zelle, kommt es, besonders an den Guaninen der DNA zur Bildung der genannten oxidativen Schäden. Mechanistisch läuft die Bildung wie in Schema 1.3 beschrieben ab. Dazu ist zunächst die Bildung des C8-Hydroxylradikals **18** notwendig. Dieses ist redoxambivalent: Entweder bildet sich unter Oxidation und Protonenabgabe 8-OxodG **5** oder unter Reduktion, Protonenaufnahme und Hydrolyse des Imidazolrings auf zwei Wegen FaPydG **6**.<sup>[19]</sup>



Schema 1.3: Reaktion Guanosin mit Hydroxylradikalen und Folgereaktionen mit  $\text{dR} = 2'$ -Desoxyribofuranose.

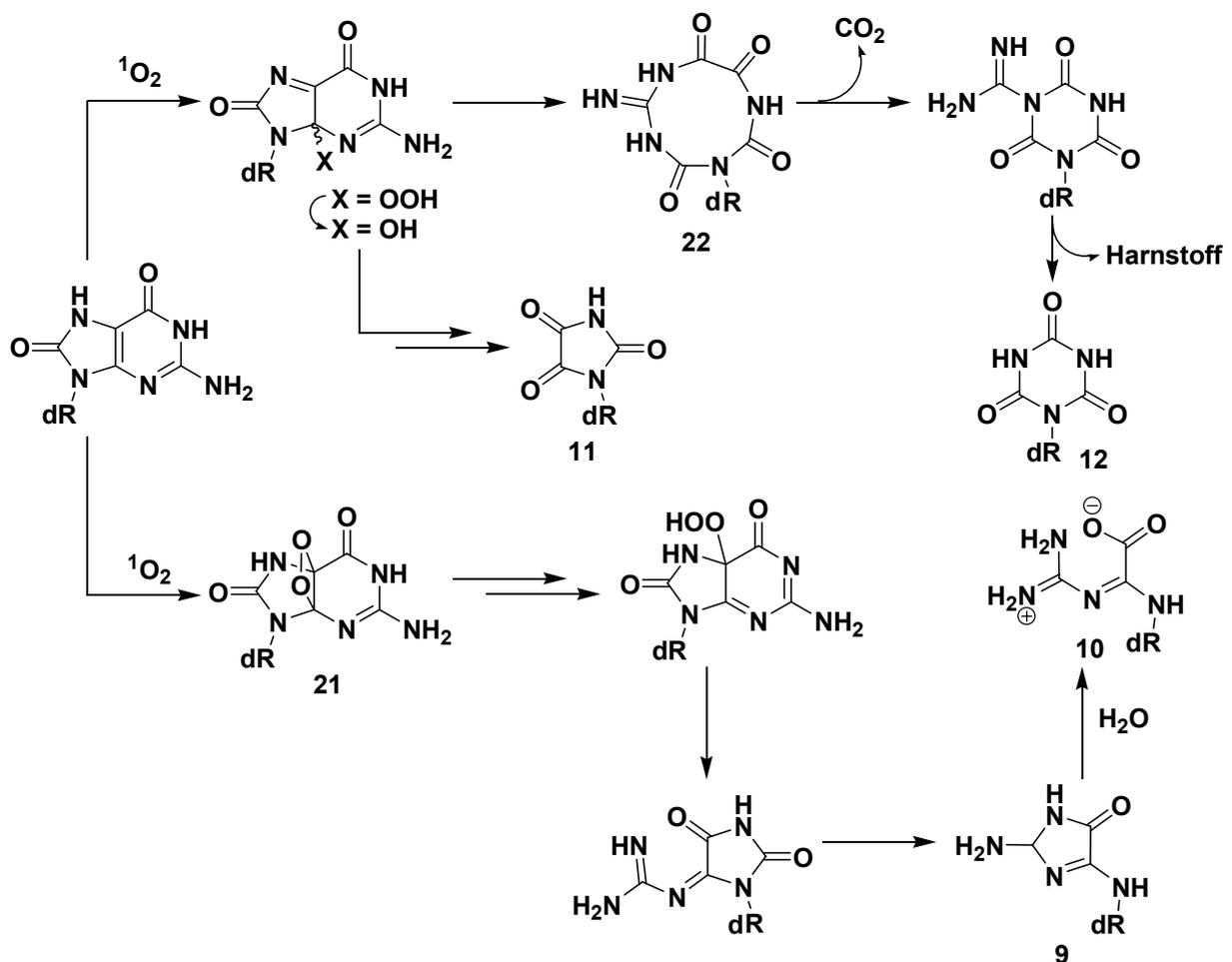
Die ebenfalls gebildeten C4- und C5-Hydroxylradikale (19 und 20) des Guanosins eliminieren vermutlich Wasser und reagieren nach Elektronen- und Protonenaufnahme wieder zu Guanin (Schema 1.4).<sup>[19]</sup>



Schema 1.4: C4- und C5-Hydroxylradikalprodukte des Guanosins und Folgereaktionen.

### 1.2.4 Weitere oxidative DNA-Schäden

Das schon mehrmals diskutierte 8-OxodG besitzt mit einem Redoxpotential von 0.58 V ein noch niedrigeres Potential als das des Guanosins.<sup>[30]</sup> Es ist somit wesentlich oxidationsempfindlicher und reagiert in verschiedenen weiteren Redoxreaktionen. Das Dioxetan **21** wird gebildet, wenn Singulett-Sauerstoff mit 8-OxodG reagiert. Abhängig von der Regiochemie bei der Öffnung des Rings an C4 bilden sich die Sekundäroxidationsprodukte Imidazol **10** und Oxazol **9**, während eine Ringöffnung an C5 zu Parabansäure **11** führt.<sup>[18, 31]</sup> Die Öffnung an C5 kann aber auch über ein makrozyklisches Intermediat **22** mit anschließender Eliminierung von CO<sub>2</sub> und Harnstoff zur Cyanursäure **12** reagieren (Schema 1.5).<sup>[13, 18, 22, 23, 32]</sup>



Schema 1.5: Oxidationsprodukte durch erneute Oxidation von 8-OxodG.

### 1.3 Mutagenität

Die Replikation von DNA wird von Polymerasen durchgeführt. Ihre Aufgabe ist es, die Information der DNA so exakt wie möglich an die folgende Generation weiter zu geben. Wie bereits dargestellt, reagiert das DNA-Makromolekül ständig mit reaktiven Spezies, werden diese Veränderungen nicht vollständig erkannt und repariert, kann es zu drastischen Folgen kommen. Durch die veränderte Basenpaarung während der Replikation kann es zu einem fehlerhaften Einbau eines einzelnen Nukleotids kommen (Punktmutation). Dies ist z.B. bei der Replikation von 8-OxodG mit *Bst*Pol I der Fall.<sup>[33]</sup> Ebenso ist auch eine sogenannte Leserasterverschiebung (*frameshift*) möglich, bei der der Einbau von zu vielen oder zu wenigen Nukleotiden die Folge ist. Dies konnte bei Elongationsversuchen mit AP-Stellen, CPD und AAF-dG-Schäden beobachtet werden.<sup>[34-36]</sup> Sogenannte Insertionen bzw. Deletionen bewirken den Verlust der Information aller nachfolgend replizierten Codons. Manche DNA-Schäden können sogar die Replikation vollständig stoppen und damit die Zellteilung unterbinden. Beispiele hierfür sind das CPD und AAF-dG mit *Bst*Pol I.<sup>[35, 37]</sup> Befinden sich die Mutationen in einem nicht kodierenden Bereich der DNA, so spricht man von sogenannten stummen Mutationen, die ohne folgenschwere Konsequenzen bleiben. Mutationen in kodierenden Bereichen hingegen können zu fehlerhaften Proteinen, die eventuell nicht mehr ihre Funktion erfüllen können, bis hin zur Apoptose bzw. Nekrose der Zelle führen.<sup>[8]</sup> Mutationen sind die Ursache für die Entstehung von Krebs, Erbkrankheiten und Alterung, aber sind zugleich auch die Chance auf Evolution.<sup>[38, 39]</sup>

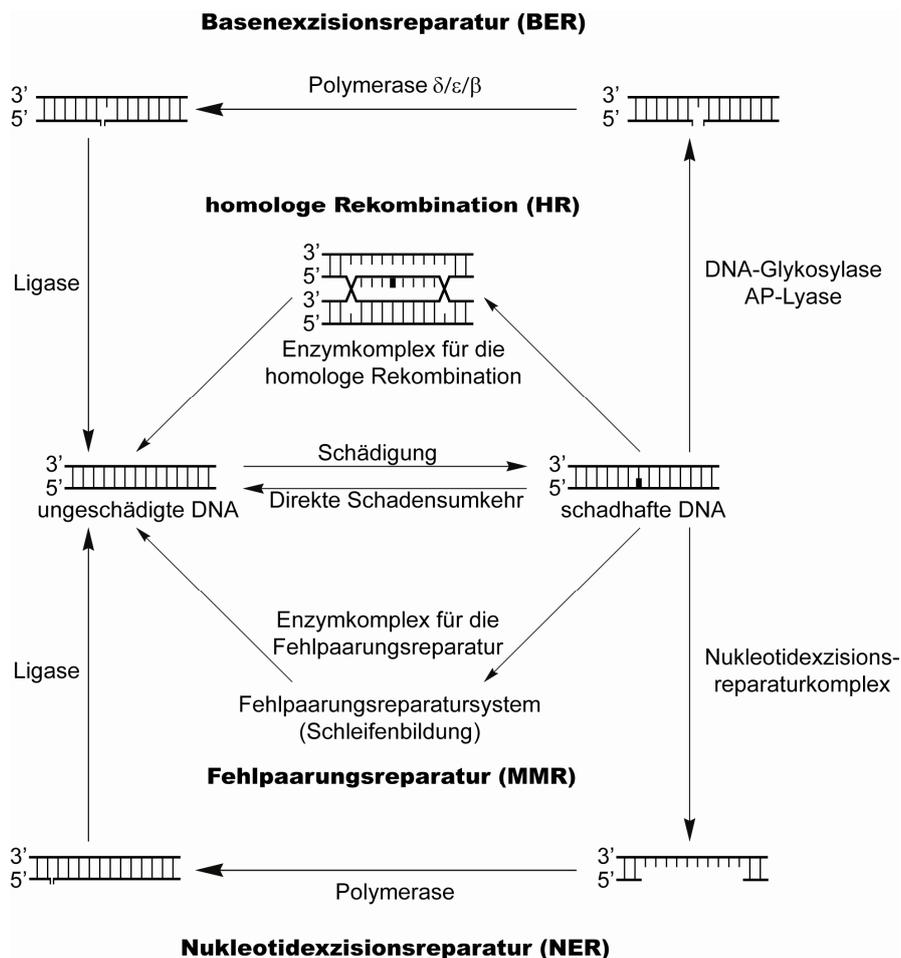
Die Polymerasen sollten eine gewisse Toleranz gegenüber DNA-Schäden aufweisen. Tatsächlich haben sich im Laufe der Evolution in den einzelnen Organismen verschiedene Polymerasen entwickelt und auf Schäden spezialisiert. Aufgrund ihres Aufbaus werden diese Polymerasen in verschiedene Familien eingeteilt:

- Familie A: Einige prokaryotische replikative und lückenfüllende Polymerasen, z. B. DNA-Polymerase I aus *E. coli* und *G. stearothermophilus*, replikative T7 DNA-Polymerase sowie eukaryotische mitochondriale Pol  $\gamma$ .
- Familie B: Einige eukaryotische replikative Polymerasen, z. B. DNA-Polymerase  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , sowie Pol II aus *E. coli*.
- Familie C: Z. B.  $\alpha$ -katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase III.
- Familie D: Einige Polymerasen aus Archaeen.
- Familie X: Einige eukaryotische Reparaturpolymerasen, z. B. Pol  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\delta 1$  und  $\delta 2$ .
- Familie Y: Reparaturpolymerasen mit geringer Replikationsgenauigkeit, z. B. DinB (Pol IV) aus *E. coli*, die eukaryotischen Polymerasen  $\eta$ ,  $\iota$  und  $\kappa$ , sowie Dph und Dpo4 aus Archaeen.

## 1.4 Reparatur

Für eine Zelle muß es allerdings darum gehen, im Besitz einer effektiven Erkennung und Reparaturmöglichkeit der auftretenden Schäden zu sein. Die Evolution hat zahlreiche Reparatursysteme entwickelt, die abhängig vom Reparaturweg in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden:

- Direkte Schadensumkehr
- Basenexzisionsreparatur (BER)
  - \* *short-patch*
  - \* *long-patch*
- Nukleotidexzisionsreparatur (NER)
- Fehlpaarungsreparatur (MMR)
- Reparatur von Doppelstrangbrüchen
  - \* Homologe Rekombination (HR)
  - \* Nichthomologes *end joining* (NHEJ)

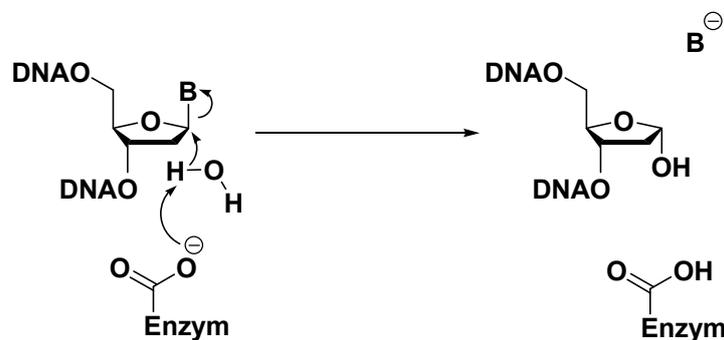


Schema 1.6: Mögliche Reparaturwege für geschädigte DNA.

An dieser Stelle soll nur auf die Basenexzisionsreparatur (BER) und Nukleotidexzisionsreparatur (NER) eingegangen werden, da sie die wichtigsten Reparaturmechanismen im Kontext dieser Arbeit sind.

### 1.4.1 Glykosylasen

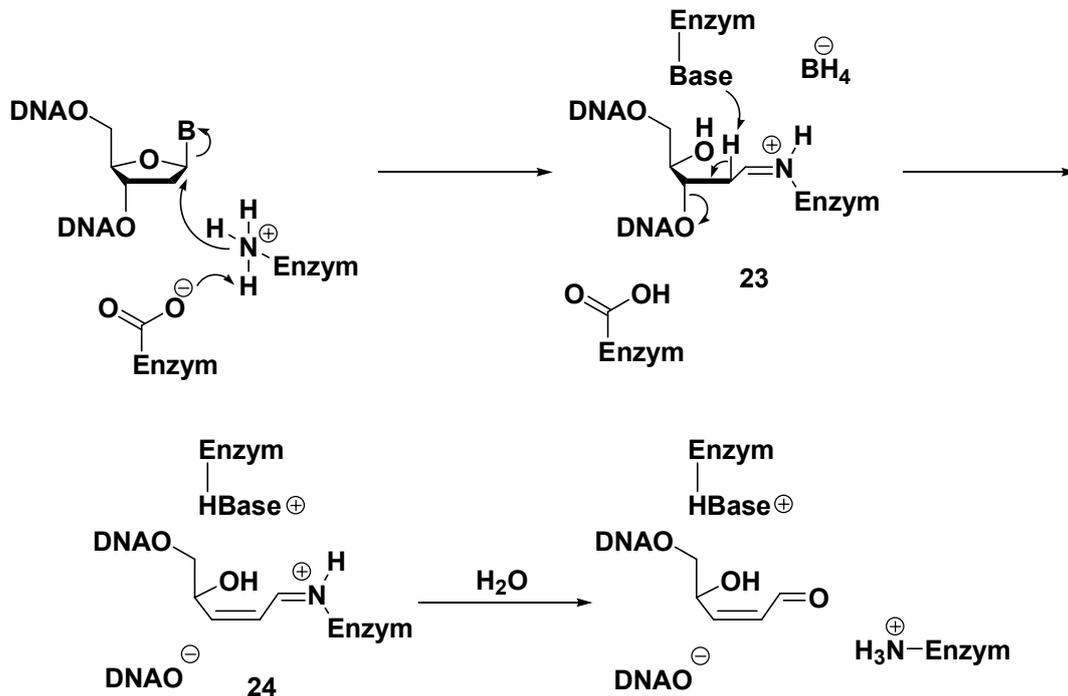
Der erste Schritt bei der Basenexzisionsreparatur ist die Hydrolyse der glykosidischen Bindung.<sup>[40-42]</sup> Der Bruch der Bindung zwischen der C1'-Position des Zuckers und der DNA-Base kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen und unterscheidet sich je nachdem, ob es sich um eine mono- oder bifunktionelle DNA-Glykosylase handelt. Im Falle der monofunktionellen Glykosylasen koordiniert das Enzym ein Wassermolekül im aktiven Zentrum über eine Carboxylatgruppe, so daß die glykosidische Bindung hydrolysiert und die schadhafte Base verdrängt werden kann (Schema 1.7). Der Phosphordiester der verbleibenden AP-Stelle wird durch eine AP-Endonuklease gespalten. Das korrekte Triphosphat wird von einer Polymerase eingebaut und der 3'-Phosphordiester der AP-Stelle hydrolysiert. Die Ligase stellt den Phosphordiester wieder her.<sup>[9]</sup>



Schema 1.7: Reaktionsmechanismus monofunktioneller DNA-Glykosylasen.

Hierbei unterscheidet man *long-patch* und *short-patch-repair*, wobei die Anzahl der ergänzten Nukleotide maßgebend ist. Ein Nukleotid beim *short-patch* und zwei bis sechs Nukleotide beim *long-patch*. Bei den bifunktionellen DNA-Glykosylasen/AP-Lyasen, übernimmt ein und dasselbe Enzym beide Aufgaben: Basenhydrolyse und Phosphodiestererspaltung. In diesem Mechanismus (Schema 1.8) ist allerdings das angreifende Nukleophil die *N*-terminale Aminosäure Lysin oder Prolin. Diese bilden intermediär unter Hydrolyse des Schadens und gleichzeitiger Ausbildung einer kovalenten Bindung eine Schiff'sche Base **23** mit dem DNA-Strang. Nachdem eine  $\beta$ -Eliminierung (Hydrolyse des 3'-Phosphodiesters der DNA) und eine weitere Hydrolyse des Enamins **24** erfolgt ist, steht das Enzym wieder für einen weiteren Reparaturschritt bereit.<sup>[40-43]</sup> Einige DNA-Glykosylasen z. B. das Fpg-Protein oder sein menschliches

Homologe des hOgg1 sind in der Lage auch eine  $\delta$ -Eliminierung durchzuführen. Hierbei wird auch der Phosphordiester an der 5'-Position hydrolysiert.



Schema 1.8: Reaktionsmechanismus bifunktionaler DNA-Glykosylasen.

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beinhaltet das Herausschneiden von mehreren Nukleotiden durch einen Enzymkomplex. Die bekannteste NER Maschine ist der in Prokaryonten vorkommende sogenannte *uvrABC*-Komplex. Hierbei werden insgesamt zwölf Nukleotide um den erkannten Schaden herausgeschnitten und die entstandene Lücke mit einer Polymerase wieder aufgefüllt. Das offene Phosphodiesterückgrat wird mit einer Ligase geschlossen.<sup>[9]</sup>

## 1.5 Formamidopyrimidinschaden des Guanosins (FaPydG)

Chemisch war das FaPydG lange Zeit nicht zugänglich. Die ersten Ansätze, das FaPydG chemisch darzustellen, gehen zurück auf das Jahr 1985. In diesen Versuchen wurde ein intakter DNA-Strang in sauerstofffreier wässriger Lösung  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt.<sup>[44]</sup> Hierbei konnte allerdings nur das Pyranosyl-FaPydG **25** in sehr geringen Ausbeuten dargestellt werden. Außerdem handelt es sich um ein  $\alpha/\beta$ -Gemisch, das sich aus dem gewünschten Furanosyl-FaPydG **26** unter Ringöffnung und anschließendem Ringschluß zum Pyranosezucker bildet (Abbildung 1.4).

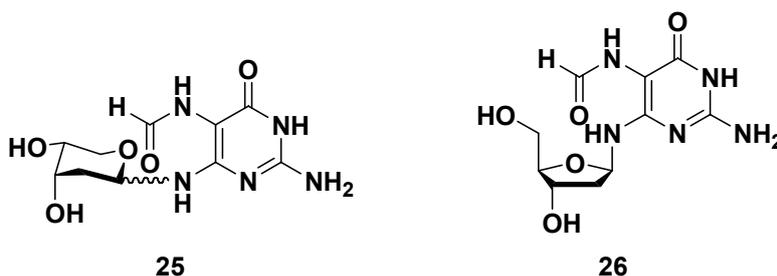
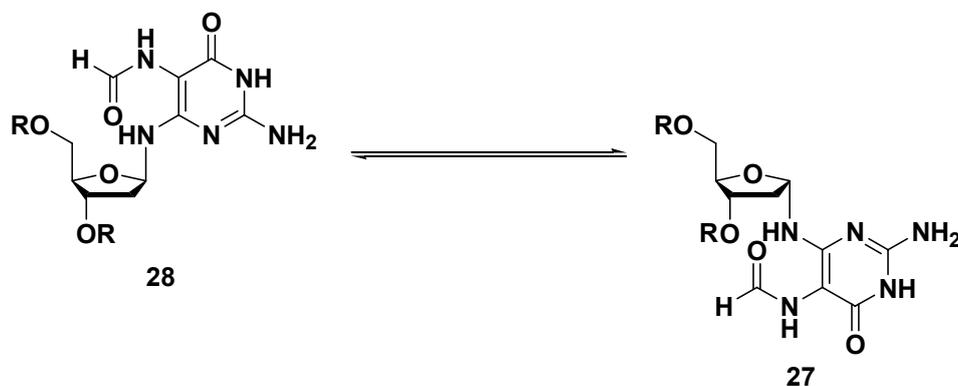


Abbildung 1.4: Pyranosyl-FaPydG und Furanosyl-FaPydG.

Die Arbeitsgruppen von *Greenberg*<sup>[45]</sup> und *Carell*<sup>[46, 47]</sup> publizierten nahezu zeitgleich Synthesen des FaPydG mit unterschiedlichen Ansätzen. Während in der Arbeitsgruppe *Carell* das silylgeschützte Derivat des reinen  $\beta$ -FaPydG-Schadens dargestellt werden konnte, wurde in den USA, in der Arbeitsgruppe *Greenberg*, das  $\alpha/\beta$ -Gemisch in Form von Dinukleotiden in DNA eingebaut.<sup>[45, 48, 49]</sup> Die Wahl eines Dinukleotids verhindert hierbei die ungewünschte Konstitutionsumwandlung vom Furanose- zum Pyranosezucker.

Ausführliche Untersuchungen zur Anomerisierung von  $\beta$ -FaPydG ergaben, daß sich innerhalb von 6.5 h ein Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -FaPydG (**27** und **28**) von 71:29 zu Gunsten des  $\alpha$ -Produktes eingestellt (Schema 1.9) hat.<sup>[46, 47]</sup>



Schema 1.9: Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -FaPydG.

Wie die Verteilung in einem DNA-Strang vorliegt, ist bis heute nicht geklärt, vermutlich ist die vorherrschende Form in der DNA allerdings das  $\beta$ -Anomer. Hinweise für diese These liefert eine enzymatische Studie,<sup>[50]</sup> abschließend ist diese Frage allerdings nicht geklärt.

Man unterscheidet zusätzlich bei DNA-Basen die *syn*- und *anti*-Konformation der *N*-glykosidischen Bindung. In der *anti*-Konformation sind die Heteroatome vom Furanosering weg gedreht, wohingegen sie sich in der *syn*-Konformation oberhalb der Furanoseringebene befinden. Purine können in *syn*-Konformation vorliegen, wenn gleich diese sterisch ungünstig ist. Pyrimidine liegen immer in der *anti*-Konformation vor.

### 1.5.1 Analoga des Formamidopyrimidin-Schadens des Guanosins

Aus den bereits angesprochenen Schwierigkeiten, den FaPydG-Schaden an einer bestimmten Position in einer definierten und eindeutigen Konfiguration in einem DNA-Strang zu inkorporieren, sind in der Vergangenheit verschiedene Analoga hergestellt worden.<sup>[51-59]</sup> Bereits in den 60er Jahren wurde durch Hydrolyse von N7-methyliertem 2'-Desoxyguanosin unter Ringöffnung C5N-methyliertes FaPydG (m-FaPydG **29**) erhalten.<sup>[60]</sup> Untersuchungen mit diesem Analogon ergaben, daß der Schaden nicht mutagen, aber replikationshemmend ist.<sup>[52, 53, 55,</sup>

56, 58]

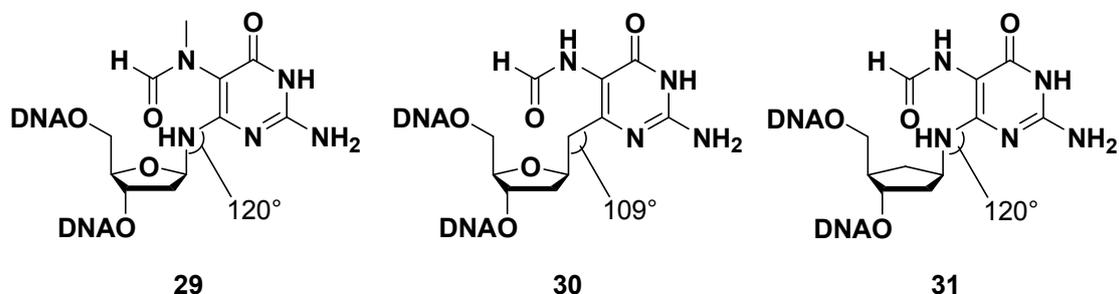


Abbildung 1.5: Bekannte Analoga des FaPydG-Schadens.

Das zweite Analogon dieses Schadens wurde 2002 veröffentlicht, hierbei wurde das sekundäre Amin an der C1'-Position durch eine Methylenereinheit substituiert.<sup>[57]</sup> Dieses Analogon **30** verhindert eine Anomerisierung zwar vollständig, da es sich hierbei nun nicht mehr um ein *N,O*-Halbacetal handelt, allerdings ändern sich die Bindungswinkel in diesem Molekül nicht unerheblich. Ein nun  $sp^3$ -hybridisierter Kohlenstoff anstelle eines sekundärenamins ändert den Bindungswinkel zwischen Base und Zuckereinheit von ursprünglich 120° auf dann 109°. Vermutlich sind diese Änderungen im Vergleich zum natürlichen DNA-Schaden von entscheidender Bedeutung, da der veränderte Winkel der Base die Wasserstoffbrückenbindungen zu den gegenüberliegenden DNA-Basen beeinflusst. Zudem wird das Amin an der C1'-

Position durch hochkonservierte Aminosäurereste der Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase erkannt. Das sekundäre Amin besitzt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung dieses DNA-Schadens durch Reparaturenzyme.<sup>[61]</sup>

Zahlreiche Arbeiten wurden mit dem Analogon **31** durchgeführt: Hierbei wird das sekundäre Amin nicht ersetzt und auch die restliche Base bleibt unverändert.<sup>[62]</sup> Lediglich die formale Substitution des Sauerstoffatoms in der 2'-Desoxyribose durch eine Methylengruppe führt zu einer Stabilisierung der DNA-Doppelhelixstruktur.<sup>[63]</sup> Dies konnte auch in computergestützten Kraftfeldberechnungen bestätigt werden. Auch in anderen Studien wurden carbozyklische Analoga anstelle der natürlichen verwendet und deren Ähnlichkeit mit den natürlichen Vertretern belegt. Strukturuntersuchungen sowohl in Lösung als auch im Kristall zeigten ebenso wie *Primer extension* Studien identische Ergebnisse zwischen den verwendeten natürlichen und carbozyklischen Nukleotiden.<sup>[64-68]</sup>

## 1.6 Reparatur von FaPydG und dessen Analoga

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse, die Reparatur des Formamidopyrimidin-Schadens des Guanosins betreffend sind miteinander schwer vergleichbar, da insgesamt fünf verschiedene Wege der Erzeugung des FaPydG-Schadens benutzt wurden. Hierzu zählen Ergebnisse von *Boiteux et al.*, die 1998 durch Schädigung von DNA mit Hydroxylradikalen FaPydG erzeugten.<sup>[69]</sup> *Ide et al.* nutzten 2000 den selektiven Einbau von m-FaPydG,<sup>[56]</sup> während die unselektive Erzeugung von m-FaPydG von *Boiteux et al.*<sup>[70]</sup> und der selektive Einbau eines  $\alpha/\beta$ -Gemisches von FaPydG von *Greenberg et al.* stammen.<sup>[49]</sup> Einen wesentlichen Fortschritt stellt der Einbau der  $\beta$ -FaPydG Analoga von *Greenberg et al.*<sup>[71]</sup> und *Carell et al.*<sup>[61]</sup> dar, da es sich in diesen Fällen um einen zweifelsfreien Einbau eines nicht mehr anomerisierbaren Produktes handelt.

Aus der Literatur ist bekannt, daß *m*-FaPydG von den prokaryontischen Enzymen MutM (Fpg), Nth (Endo IV), Nei (Endo VIII)<sup>[43]</sup> und den humanen Reparaturenzymen hOgg1<sup>[9, 72]</sup> und möglicherweise Neil<sup>[43, 73]</sup> erkannt wird. Ergebnisse mit FaPydG haben gezeigt, daß Fpg aber nicht Nei diesen Schaden erkennt. Dies stellt einen Unterschied zu den Ergebnissen mit *m*-FaPydG dar, welches von beiden Reparaturenzymen erkannt und repariert wird.<sup>[43]</sup> Aus Fpg-Kristallstrukturen<sup>[74]</sup> und Strukturen von Fpg in einem Komplex mit abasischen Stellen,<sup>[75-77]</sup> 8-OxodG **5** und Dihydrouracil<sup>[78]</sup> konnte allgemein die Erkennung und Reparatur von geschädigten Nukleotiden abgeleitet werden. Im Jahre 2004 konnte erstmalig die Erkennung und Reparatur des FaPydG-Schadens vom Fpg-Protein aus *Lactococcus lactis* in atomarer Auflösung verfolgt werden.<sup>[61]</sup>

In einer Kooperation von *Coste*, *Castaing* und *Carell* konnten Kokristallstrukturen mit dem *LFpg*-Protein und einem  $\beta$ -*c*FaPydG-DNA-Duplex in einer Auflösung von 1.8 Å erhalten werden (Abbildung 1.6). Dabei wurde sichtbar, daß der DNA-Schaden aus dem DNA-Doppelstrang herausgedreht wird und somit in die aktive Tasche des Enzyms hineinreicht.

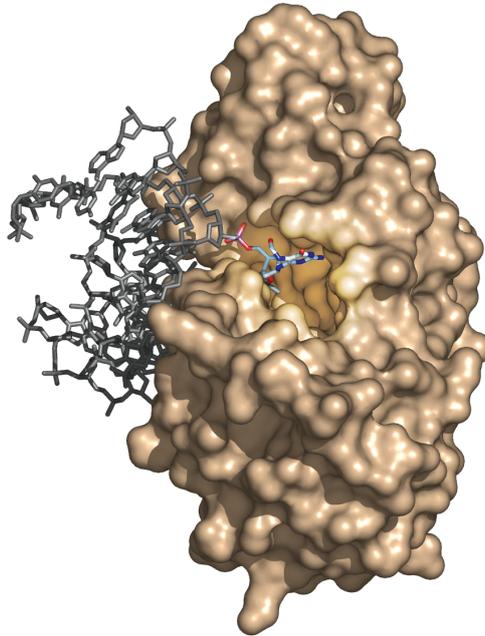


Abbildung 1.6: Kokristallstruktur von  $\beta$ -*c*FaPydG in der aktiven Tasche des Fpg-Reparaturenzyms.<sup>[79]</sup>

Das  $\beta$ -*c*FaPydG befindet sich in der *anti*-Konformation. Das C1'-Atom des Schadens wird im aktiven Zentrum für einen nukleophilen Angriff des Prolins zugänglich.<sup>[61]</sup> Die Verwendung des carbozyklischen Analogons verhindert die üblicherweise folgende Hydrolyse der schadhafte Base und das Enzym stoppt an dieser Stelle.

## 1.7 Replikation von FaPydG und dessen Analoga

Auch über das Verhalten des FaPydG-Schadens innerhalb des Replikationsprozesses herrscht bis heute keine klare Erkenntnis, dieses wird daher immer noch kontrovers diskutiert. Das *m*-FaPydG-Analogon ist nicht mutagen,<sup>[52, 53, 55, 56, 58]</sup> hemmt aber die Replikation, das  $\alpha/\beta$ -FaPydG-Gemisch zeigt eine erhöhte Inkorporation von dATP,<sup>[80]</sup> und letzte Veröffentlichungen mit einem  $\beta$ -*c*FaPydG-Analogon postulieren eine fehlerfreie Replikation mit der *low fidelity* Pol  $\eta$ <sup>[63]</sup> und der *high fidelity* *Bst*Pol I.<sup>[81]</sup> In Abbildung 1.6 ist das Fluoreszenzsignal der Kapillarelektrophorese dargestellt, welches mit steigender Triphosphatkonzentration dCTP bei

Elongationsstudien eines Fluoreszenz markierten *Primers* der Sequenz 5'-FlAATGACCAGG mit Pol  $\eta$  erhalten wird.

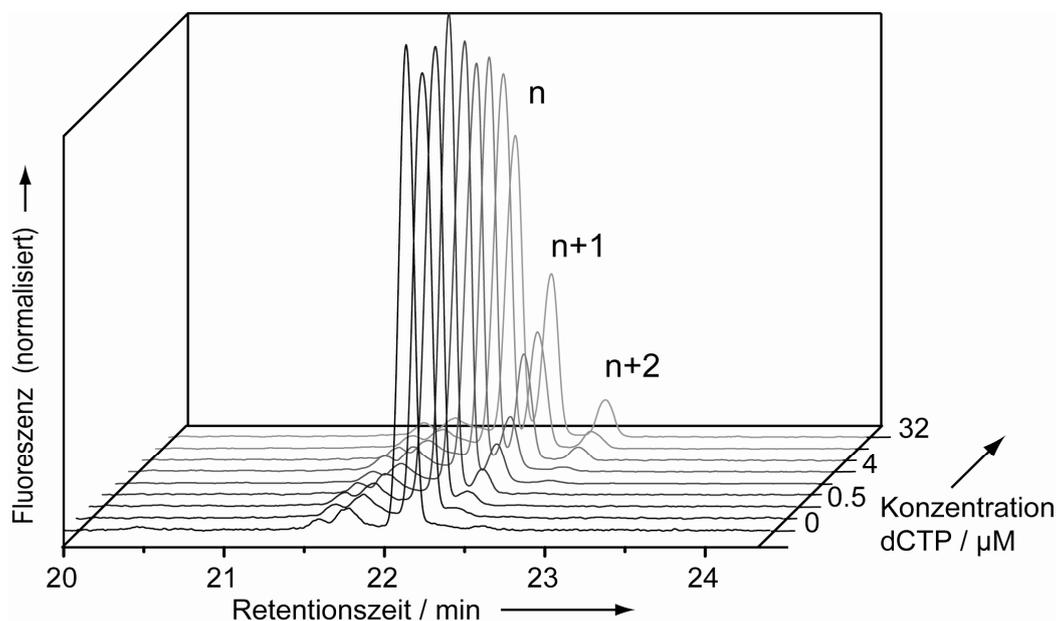


Abbildung 1.7: Fehlerfreie Replikation von  $\beta$ -cFaPydG mit Pol  $\eta$ . Alle Reaktionszeiten betragen drei Minuten. Die anderen Reaktionsbedingungen sind der Achsenbeschriftung zu entnehmen.<sup>[62]</sup>

Es ist gut erkennbar, daß die Verlängerung des *Primers* innerhalb einer Reaktionszeit von 3 Minuten mit steigender dCTP-Konzentration stattfindet. Aus dem Verhältniss der Signale zueinander kann mittels Integration die Geschwindigkeit des Einbaus und die Einbaueffizienz des betrachteten Triphosphats bestimmt werden.

Mit diesem Analogon konnten außerdem Kokristallstrukturen mit der *Bst*DNA Polymerase I erhalten werden. Diese wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von *Beese* erstellt. *In vitro primer extension* Studien haben gezeigt, daß sowohl die *high fidelity* Polymerase I<sup>[81]</sup> als auch die *low fidelity* Polymerase  $\eta$ <sup>[63]</sup> den  $\beta$ -cFaPydG-Schaden fehlerfrei replizieren. In Kokristallstrukturen konnten alle Reaktionsschritte des fehlerfreien Einbaus von dCTP verfolgt werden, da hierbei die Elongation im Kristall durchgeführt wurde. Es konnten Strukturdaten aus der Protein-DNA-Kokristallisation (5'-CAT XCG AGT CAG GCT-3' mit X =  $\beta$ -cFaPydG) an der Präinsertionsstelle, der Insertionsstelle und der Postinsertionsstelle beim Einbau von dCTP erhalten werden.  $\beta$ -cFaPydG verhält sich also im großen und ganzen wie ein unmodifiziertes dG.<sup>[81]</sup>

## 1.8 Von der DNA zum fertigen Protein

Die ersten Vermutungen, wie die Information der DNA aus dem Zellkern in ein Protein im Cytosol umgewandelt werden könnte, stammen von *Jacob* und *Monod* aus dem Jahre 1961.<sup>[82]</sup> Sie waren es auch, die die Existenz eines Botenmoleküls vorhersagten und dies auch im selben Jahr beweisen konnten.<sup>[83]</sup> Seitdem hat man sehr detaillierte Erkenntnisse gewonnen, wie dieser Prozeß der Transkription abläuft. Von RNA-Polymerasen wird im Zellkern die Information der DNA in ein anderes Makromolekül übertragen. Dies speichert die Information der DNA und wird *mRNA* (*messenger*RNA) genannt. Sie ist sequenzbezogen deckungsgleich mit der DNA, wobei neben dem unterschiedlichen Zucker - anstelle der 2'-Desoxyribose in der DNA liegt in der RNA Ribose **32** als Zuckereinheit vor - auch die Nukleobase Thymin **2** durch die RNA-Base Uracil **33** ersetzt ist (Abbildung 1.8).<sup>[84]</sup>

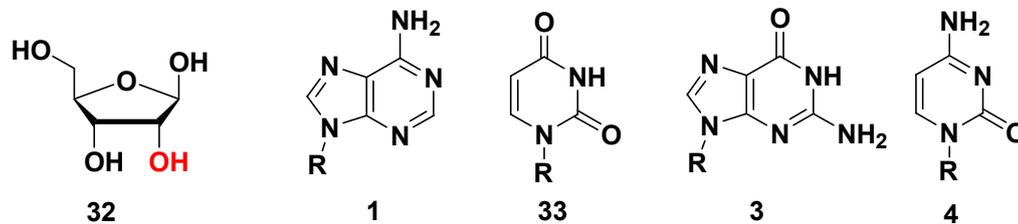
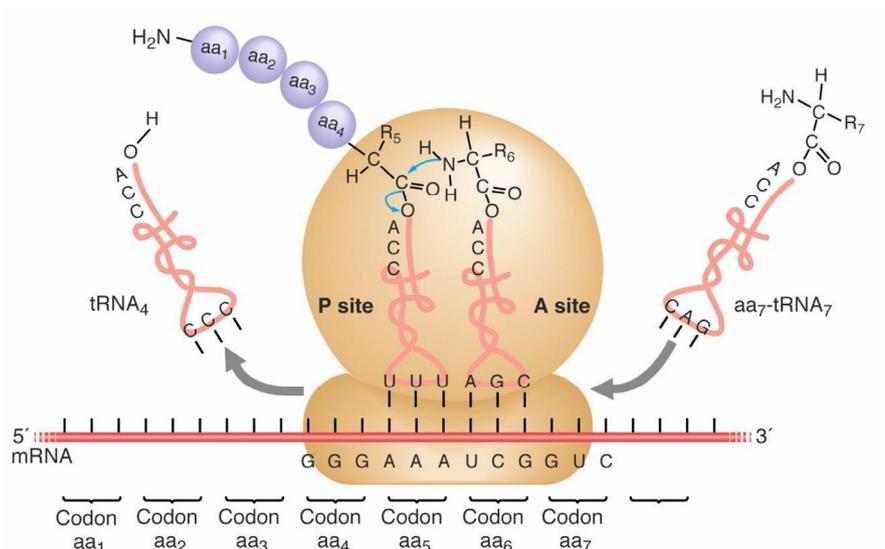


Abbildung 1.8: Ribose und die vier RNA-Basen mit R = Ribose.

Die *mRNA* dient als Informationsüberträger von der DNA hin zum fertigen Protein. Im Cytoplasma findet erst die eigentliche Proteinbiosynthese statt. Im ersten Schritt wird die *mRNA* an einem Ribosom gebunden. Ribosomen sind Komplexe aus Proteinen und Ribonukleinsäuren (RNA), an denen die Translation, die Übersetzung der *mRNA* in ein Protein stattfindet. Hier kommt es nun zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der *mRNA*, die nun als Matrize dient, und der sogenannten transfer-RNA (tRNA).<sup>[2]</sup> Diese RNA-Moleküle tragen am 3'-Ende eine bestimmte Aminosäure, deren Carboxylgruppe mit der 3'- bzw. 2'-Hydroxylgruppe der Ribose der tRNA verestert ist.

Die Matrizerkennungsregion der tRNA heißt Anticodon und besteht immer aus drei Basen, ebenso wie die komplementäre Region auf der *mRNA*, die Codon genannt wird. Mit den vier Basen ergeben sich 64 Codons, die für 20 Aminosäuren codieren. Da mehrere Codons einer Aminosäure entsprechen, bezeichnet man den genetischen Code auch als degeneriert. Kommt es zwischen Codon und Anticodon zu einer "Erkennung", so wird die am 3'-Ende befindliche Aminosäure mittels nukleophilem Angriff des N-Terminus der letzten Aminosäure auf den wachsenden Polypeptidstrang übertragen. Diesen gesamten Vorgang nennt man Translation (Schema 1.10).<sup>[1]</sup>



Schema 1.10: Translation am Ribosom.<sup>[85]</sup>

Peptide und Proteine spielen eine zentrale Rolle in einer Vielzahl biologischer und physiologischer Prozesse in lebenden Organismen: Sie sind involviert als Hormone und Neurotransmitter in der interzellularen Kommunikation, agieren als Antikörper des Immunsystems, um den Organismus gegen äußere Eindringlinge zu schützen, und sind am Transport verschiedenster Substanzen durch biologische Membranen beteiligt.

Um die Funktionsweise der Proteine (Kontrolle von Mechanismen, Struktureigenschaften und deren Funktion) besser untersuchen und verstehen zu können, ist es wichtig, diese biologisch oder synthetisch in großer Reinheit und Menge zugänglich zu machen. In den folgenden Kapiteln werden ausschließlich synthetische Darstellungsmethoden erläutert, obgleich mit der Isolation nativer Proteine und den Techniken der Rekombination/Expression aus Mikroorganismen vielseitig eingesetzte Techniken der Biochemie nicht näher betrachtet werden. Alle Methoden haben ihre Vor- und Nachteile, aber nur die chemischen Verfahren erlauben den Einbau unnatürlicher Aminosäuren und die Produktion von ausreichenden Mengen an sauberen Proteinen.

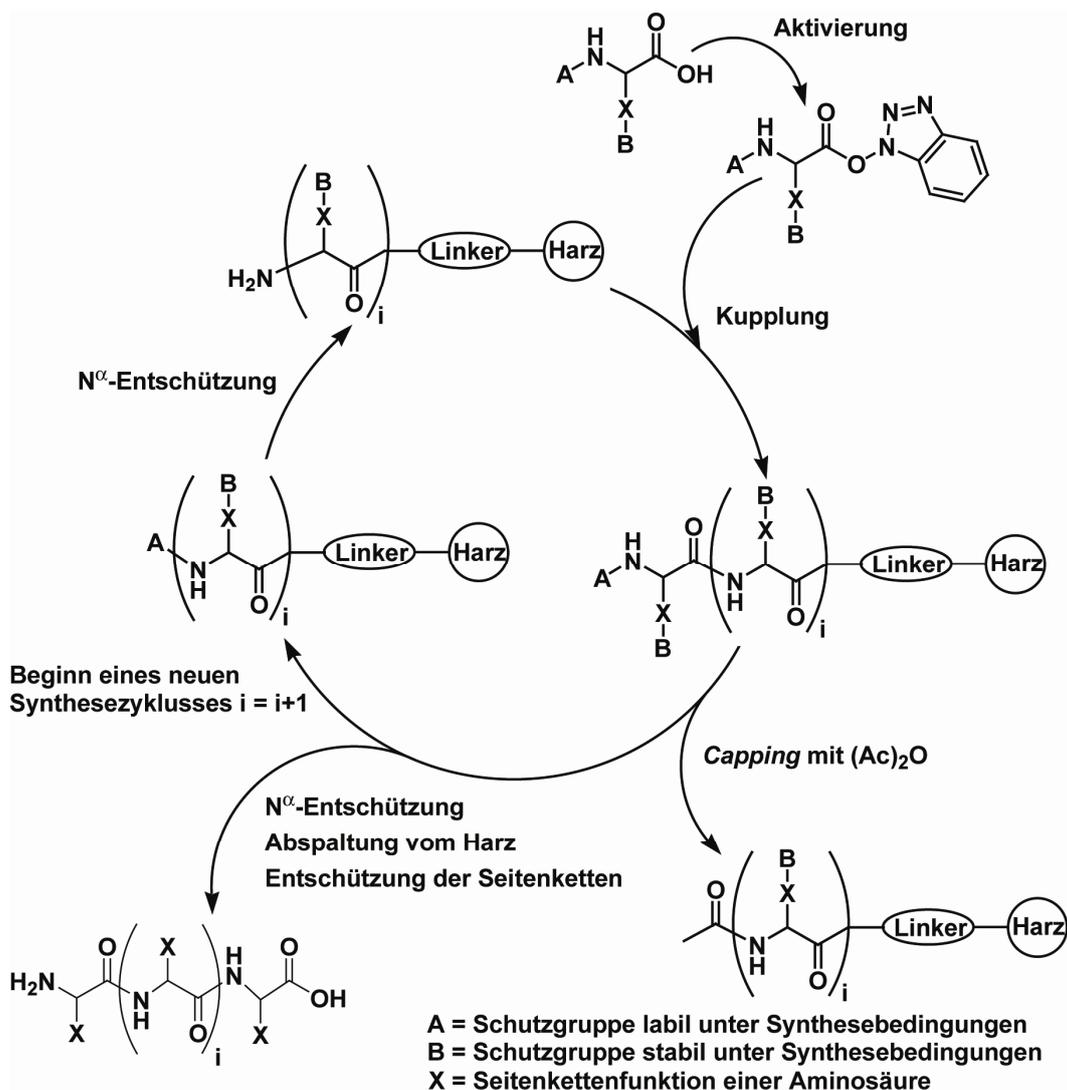
## 1.9 Chemische Synthese von Proteinen

Seit der ersten Synthese eines Dipeptids von *Emil Fischer* im Jahre 1901 gab es auf dem Gebiet der Proteinsynthese enorme Fortschritte und neue Entwicklungen.<sup>[86]</sup> 1955 wurde *Vincent du Vigneaud* der Nobelpreis für Chemie für die Synthese des Oktapeptidhormons Oxytocin zuerkannt.<sup>[87]</sup> Es ist heutzutage möglich, Peptide mit über 200 Aminosäuren in Routineverfahren herzustellen.

### 1.9.1 Peptidfestphasensynthese (SPPS)

Die Entwicklung der Peptidsynthese an der festen Phase (*solid phase peptide synthesis*, kurz: SPPS) nahm ihren Beginn im Jahr 1963 und ist mit dem Chemiker **Bruce Merrifield** verbunden. Er war es, der im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren in Lösung, die Synthese an einem festen Trägermaterial durchführte.<sup>[88]</sup>

Diese Innovation hatte den entscheidenden Vorteil, daß die gebildeten Zwischenprodukte nicht isoliert und gereinigt werden müssen, sondern die unerwünschten Nebenprodukte durch Filtration und Waschen des Trägermaterials abgetrennt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Automatisierung der einzelnen Reaktionsschritte, da es sich um einen repetitiven Prozeß handelt: Entschützung der  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäure, Kupplung der nächsten, *N*-terminal geschützten und carboxsäureaktivierten Aminosäure (Schema 1.11). Hierfür erhielt **B. Merrifield** 1984 den Nobelpreis für Chemie.



Schema 1.11: Peptidsynthese nach **Merrifield**.

Auf dem Gebiet des Trägermaterials und der Schutzgruppen wurden in der Vergangenheit verschiedene Kombinationen entwickelt, mit denen sich unerwünschte Nebenreaktionen z. B. mit den Seitenketten der Aminosäuren während der Synthese und des Abspaltungsvorgangs vom festen Trägermaterial vermeiden lassen. Die bekanntesten Strategien sind die Fmoc/*tert*-Butyl(Bu)<sup>[89]</sup>- und die Boc/Benzyl(Bzl)<sup>[90]</sup>-Strategie. Abbildung 1.9 zeigt die Schutzgruppen, die bei einer Fmoc/*tert*-Butyl-Technik verwendet werden.

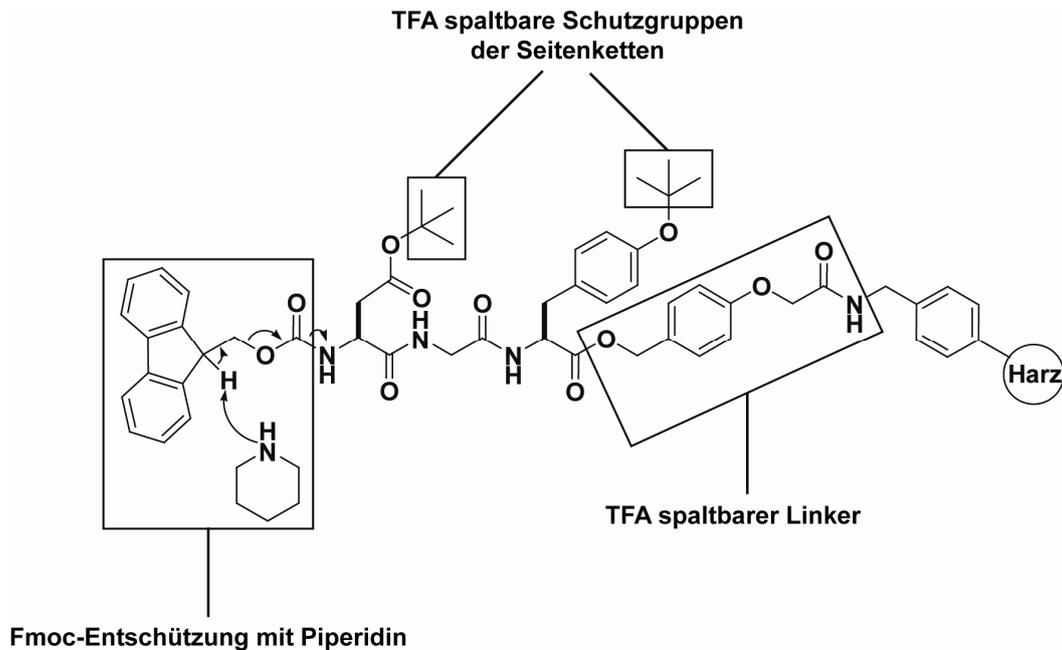
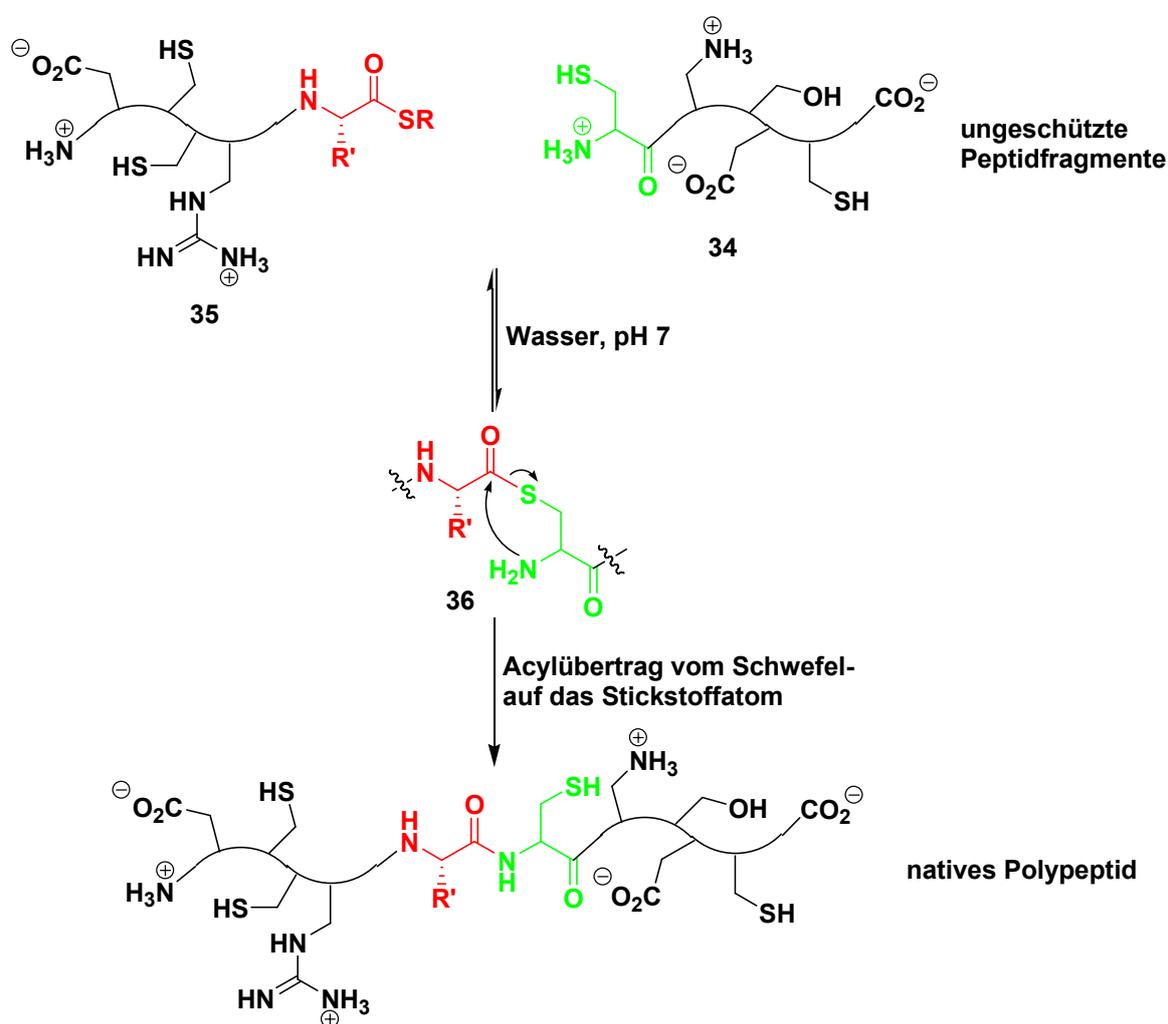


Abbildung 1.9: Fmoc-Synthesestrategie zur Festphasensynthese von Peptiden.

Mittels SPPS können Peptide und kleine Proteine von bis zu 50 Aminosäuren synthetisiert werden. Es sind nur einige wenige Beispiele in der Literatur beschrieben, in der längere Aminosäuresequenzen hergestellt wurden unter anderem die Ribonuklease A (124 AS),<sup>[91]</sup> das HIV-1 TaT (86 AS)<sup>[92, 93]</sup> und das *green fluorescent protein (GFP)* mit 238 Aminosäuren.<sup>[94]</sup> Allerdings handelt es sich hierbei um die Kopplung von Peptidfragmenten an einem festen Trägermaterial. Diese Beispiele zeigen den limitierenden Faktor der Methode auf, da mit zunehmender Synthesedauer die Menge an Nebenprodukten drastisch ansteigt. Unvollständige Entschützungs- und Kupplungsreaktionen sind systemimmanent, da sie nie mit 100 sondern "nur" mit  $\leq 99\%$  Ausbeute ablaufen. Die durchschnittliche Länge eines Proteins liegt allerdings bei etwa 250 Aminosäuren und besteht aus zwei Domänen von ca. 15 kDa.<sup>[95-97]</sup> Um Proteine herstellen zu können, die solche lange Sequenzen beinhalten, wurden neue Methoden entwickelt. Eine der wichtigsten und brauchbarsten Methoden ist die native chemische Ligations (NCL), die die Kupplung von ungeschützten Peptidfragmenten in wässriger Lösung erlaubt.

## 1.9.2 Native Chemische Ligation (NCL)

Derzeit ist die am weitesten verbreitete Methode zur Synthese von Proteinen auf chemischen Weg die *native chemical ligation* (NCL).<sup>[98]</sup> Diese Weiterentwicklung der chemischen Ligation<sup>[99-103]</sup> hat den Vorteil, daß keine "Überreste" aus der Ligationsreaktion im Protein an der Verknüpfungsstelle zurückbleiben. Diese Proteinligationsmethode beruht auf einer Beobachtung, die bereits im Jahr 1953 von *Wieland* gemacht wurde, als bei der Reaktion von Valinithiophenylester mit Cystein in wässrigem Puffer das Dipeptid ValCysOH als Produkt entstand.<sup>[104]</sup> Diese Chemie wurde 1994 von *Kent et al.* dazu genutzt, Peptidfragmente zu ligieren.<sup>[105-107]</sup>



Schema 1.12: Mechanismus der nativen chemischen Ligation (NCL).

Hierbei reagiert das Thiolat des Cysteins des *N*-terminalen Peptidfragments **34** unter Transthioesterifizierung mit dem *C*-terminalen Thioester des zweiten Fragments **35**. Die Peptidbindung wird durch eine Acylverschiebung vom Schwefel zum Stickstoff gebildet: Der freie

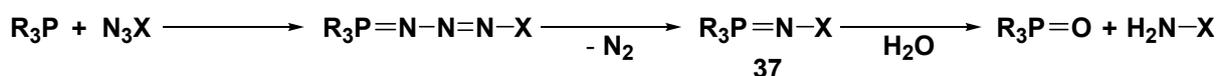
*N*-Terminus des Cysteins spaltet den Thioester **36**, und unter Bildung der Amidbindung wird die Thiolfunktion der Seitenkette des Cysteins wieder frei.

Bei dieser Ligationsmethode reagieren in der Sequenz eingeschlossene Cysteine nicht, da sie nicht eine Amidbindungsbildung eingehen können. Zum anderen reagieren solche zwischenzeitlich gebildeten Thioester im Gleichgewicht mit zugegebenen Thiolen wieder zu aktivierten Thioestern **35**, die dann wieder der gewünschten Reaktion mit endständigen Cysteinen zur Verfügung stehen.<sup>[108]</sup> Diese Ligationsmethode von Polypeptiden ist begrenzt auf Proteinsequenzen, die an der gewünschten Ligationsstelle ein Cystein *N*-terminal haben. Die andere Aminosäure der Ligationsposition ist nicht festgelegt. Es reagieren alle Aminosäuren, allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.<sup>[109]</sup> Der gesamte Ligationsvorgang wird bei neutralem pH und unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Es bestehen zahlreiche Beispiele für synthetisierte Proteine mit dieser Ligationsmethode.<sup>[110-115]</sup> Die ligierten Proteine sind bis zu 200 Aminosäuren groß. Für weitergehende Informationen zu dieser Ligationsmethode sind dem interessierten Leser zahlreiche Veröffentlichungen empfohlen.<sup>[98, 105-107, 116]</sup>

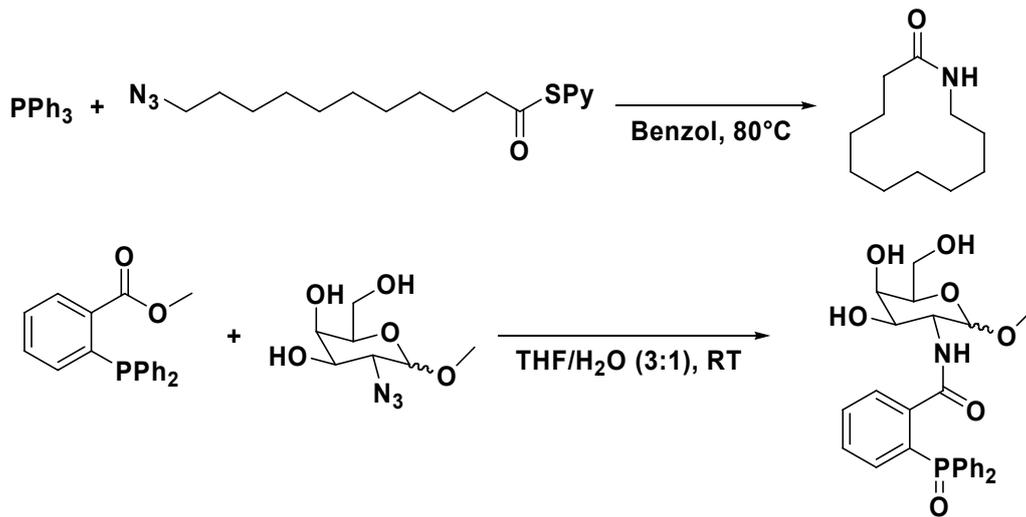
### 1.9.3 Staudinger-Ligation

Die Staudinger-Ligation ist sowohl eine einfache Alternative zur nativen chemischen Ligation, als auch eine Erweiterung, da sie die Limitierung auf einen Cysteinrest an der Ligationsstelle umgeht. Diese Ligationsmethode macht sich eine bereits 1919 von *Staudinger* und *Meyer* publizierte Reaktion zunutze, in der ein tertiäres Phosphan mit einem Azid reagiert.<sup>[117]</sup> Die Reaktion verläuft über ein stabiles Intermediat, ein Iminophosphoran **37**, welches dann bei Hydrolyse ein Phosphanoxid und ein Amin bildet (Schema 1.13).



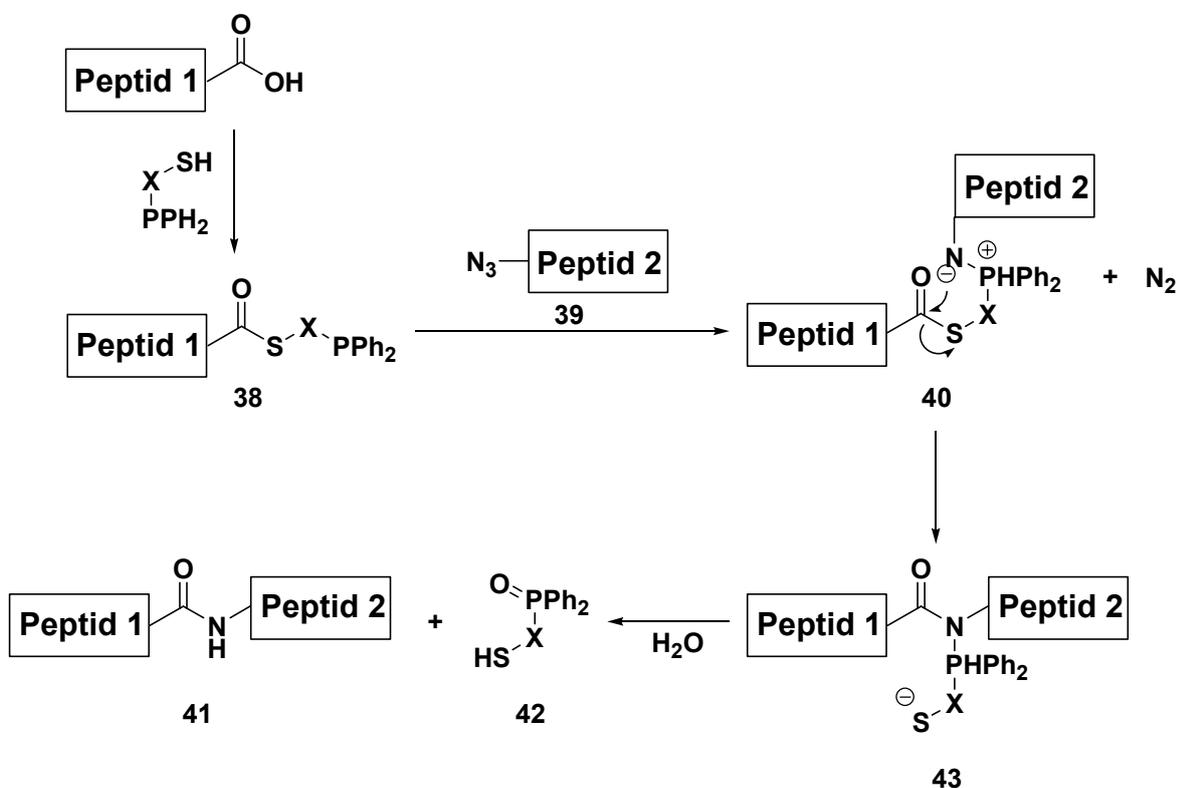
Schema 1.13: Staudinger-Reaktion.

Um in einem Ligationsschritt nutzbar zu sein, erfordert es aber die Bildung eines Amids und nicht die Bildung einesamins. Eine dazu notwendige Acylierung des Intermediats **37** ist inter-<sup>[118]</sup> und intramolekular<sup>[119]</sup> möglich (Schema 1.14). Nach abschließender Hydrolyse ist eine neue Peptidbindung geknüpft.<sup>[119-124]</sup>



Schema 1.14: Beispiele für die Staudinger-Ligation.

Es gibt eine verbesserte Variante der Staudinger-Ligation, die ein ligiertes Polypeptid ohne Rückstände als Produkt hervorbringt, diese Methode wird "rückstandslose" Staudinger-Ligation genannt. Der entscheidende Unterschied ist hierbei, daß das Phosphan den zu übertragenden Acylierungsrest in Form eines Thioesters gebunden hat. Durch Reaktion des Phosphans **38** mit dem Azid **39** bildet sich das Iminophosphoran **40**. Nach dem Acyltransfer vom Schwefel zum Stickstoff bildet sich ein Amidophosphoniumthiolat, welches mit Wasser zum Peptid **41** und Phosphinoxid **42** hydrolysiert (Schema 1.15).<sup>[125]</sup>



Schema 1.15: Reaktionsmechanismus der "rückstandslosen" Staudinger-Ligation.

Der entscheidende Aspekt für die rückstandslose Ligation liegt in der nichtzyklischen Form des Amidophosphoniumthiolats **43**, das nur dadurch nach Hydrolyse als Nebenprodukt abtrennbar ist.<sup>[126, 127]</sup> Bei dieser Form der Staudinger-Ligation verbleiben wie auch bei der NCL keine proteinfremden Rückstände im Ligationsprodukt. Es steht aber im Gegensatz zur NCL ein größeres Spektrum an möglichen Ligationsstellen in einer Proteinsequenz zur Verfügung. Allerdings reagieren verschiedene Aminosäuren an der Ligationsstelle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Ausbeuten. Ein entweder *N*-<sup>[127]</sup> oder *C*-terminal<sup>[128]</sup> zur Ligationsstelle befindliches Glycin führt zu guten Ausbeuten von >90 %, wohingegen bei Abwesenheit eines Glycin an der Ligationsstelle die Ausbeuten drastisch sinken.

Während Versuche mit dem Thioester aus dem Phosphinthiol **44** und mit einem Glycinazid-Derivat eine  $\leq 35$  %-ige Ausbeute des Dipeptids lieferte,<sup>[126]</sup> waren es mit dem Thioester des Phosphinthiol **45** und demselben Glycinazid-Derivat über 90 %.<sup>[127]</sup> Die *o*-Phenylgruppe des Phosphinthiol **44** ist durch eine einfache Methylengruppe im Phosphinthiol **45** substituiert (Abbildung 1.10). Dadurch verläuft der Acylshift über einen sechsgliedrigen Übergangszustand, bei dem der Abstand zwischen dem nukleophilen Stickstoffatom des Iminophosphorans und dem Kohlenstoffatom des elektrophilen Thioesters verkürzt ist und damit höhere Ausbeuten als mit einem Azid resultieren.<sup>[128-130]</sup>

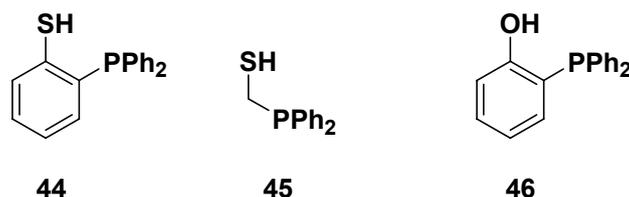


Abbildung 1.10: In der Staudinger-Ligation eingesetzte Phosphinothiole **44** und **45** und Phosphinophenol **46**.

Das Phosphinphenol **46** wurde zur Ligation von zwei Dipeptiden genutzt. Gly-Phe und Ala-Phe wurden hierbei mit Ausbeuten von 32 und 36 % ligiert.<sup>[131]</sup> Die Ligation wurde nicht mit ungeschützten Aminosäuren im wässrigen Medium durchgeführt. Zudem ist eine direkte Konvertierung eines Thioesterfragments aus einer anderen Ligationemethode in einen Ester mit Phosphinophenol **46** nicht möglich. Diese Strategie ist dennoch ein erster Schritt in eine "sequenzunabhängige" Staudinger-Ligation.

#### 1.9.4 Konzept einer templat-dirigierten Protein Synthese (TDPS)

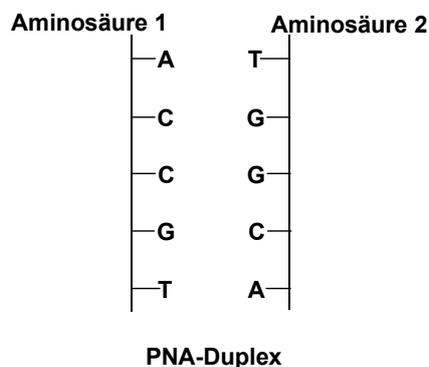
Die vorgestellten Ligationen offenbaren, daß es verschiedene, vielseitig einsetzbare Methoden gibt, Polypeptide miteinander zu verknüpfen. Es gibt allerdings bislang keine Ligation, die "sequenzunabhängig" mit guten Ausbeuten abläuft. Am weitesten erfüllt die Staudin-

ger-Ligation diese Ansprüche. In der Arbeitsgruppe *Carell* wurde Anfang 2003 ein Konzept zur templat-dirigierten Protein Synthese (TDPS) entworfen, mit dem es möglich sein sollte, zu guten Ligationsausbeuten und einer größeren Unabhängigkeit von der Proteinsequenz zu kommen.

Wie in Kapitel 1.8 vorgestellt, erfolgt die natürliche Proteinbiosynthese auf Grundlage der *mRNA*. Im Protein wird die neue Aminosäure am Ende der tRNA in unmittelbare Umgebung zum entstehenden Protein gebracht. Dadurch erfolgt die Übertragung der Aminosäure quasi unimolekular und intramolekular. Die Reaktionen sind nicht zuletzt wegen dieses Sachverhalts hochgradig selektiv und nahezu quantitativ.

Es ist eine Vielzahl von Reaktionen in der Literatur beschrieben, die sich diese Tatsache zu Nutze gemacht haben. Hierbei dienen meist DNA und RNA zur Präorganisation der Reaktanden. Die Breite der so erfolgten selektiven Reaktionen reicht von  $S_N2$ -Reaktionen,<sup>[132]</sup> über reduktive Aminierungen,<sup>[133]</sup> *Wittig*-Reaktionen,<sup>[133]</sup> und 1,3-Cycloadditionen nach *Huisgen*<sup>[134]</sup> bis hin zu *Heck*-Kupplungen,<sup>[133]</sup> um nur eine Auswahl zu nennen. Auch Peptidbindungen zwischen PNA-<sup>[135]</sup> und modifizierten DNA-Oligomeren<sup>[136-138]</sup> und Peptiden<sup>[139, 140]</sup> sowie zwischen Aminosäuren,<sup>[141]</sup> wurden so geknüpft. Allerdings handelt es sich im letzten Fall um die Synthese eines Tripeptids und nicht um eine neue Ligationsmethode. Einschlägige Literatur zu templatdirigierten Reaktionen in Form eines Artikels<sup>[142]</sup> und eines Buches<sup>[143]</sup> sei für ein weitergehendes Verständnis empfohlen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollen in unserem Konzept die zwei zu ligierenden Aminosäuren in unmittelbare räumliche Nähe zueinander gebracht werden. So müßte deren Reaktion selektiv und mit einer vielfach höheren Ausbeute erfolgen, als dies in Lösung der Fall ist. Dabei ist allerdings zu beachten, daß das Templat nicht nur aus einem sondern aus zwei komplementären PNA-Strängen besteht (Schema 1.16). Die Wahl eines PNA- und nicht eines DNA-Templats erfolgte aus drei Gründen: Erstens ist PNA wesentlich resistenter gegenüber chemischen Einflüssen, zweitens ist die Chemie an der festen Phase von Peptiden und PNA ohne weitere Modifikationen kompatibel und drittens liegt die Stabilität eines PNA-Doppelstrangs deutlich oberhalb der eines DNA-Duplexes.



Schema 1.16: Erster Ansatz des Konzepts der TDPS.

Als nächstes ist die Wahl eines *Linkers* zwischen PNA und Aminosäure essentiell, da das synthetisierte Peptid "rückstandslos" aus der Ligationmethode hervorgehen soll. Das bedeutet, daß das *Linker*-Molekül reversibel mit den Aminosäuren verbunden sein muß. Die beiden Termini der Aminosäure selbst kommen nicht in Frage: Über den einen Terminus werden die nächsten Aminosäuren gebunden und der andere soll im eigentlichen Ligationsschritt zur Verfügung stehen. Damit eignen sich prinzipiell nur Aminosäuren, die eine funktionelle Seitenkette besitzen: Serin **47**, Threonin **48**, Tyrosin **49**, Cystein **50**, Aspartat **51**, Glutamat **52** und Lysin **53** (Abbildung 1.11).

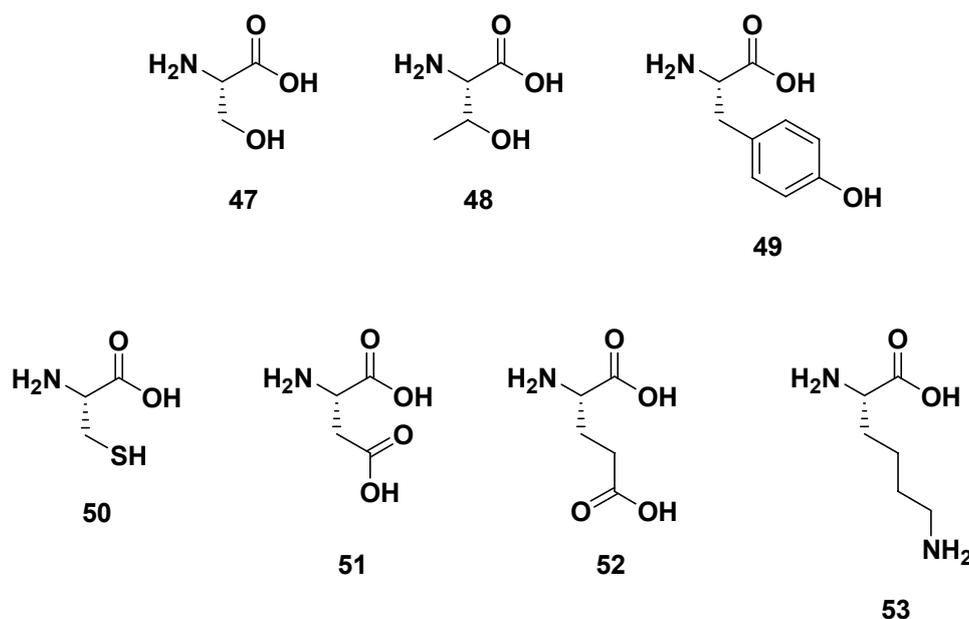


Abbildung 1.11: Prinzipiell für die TDPS geeignete Aminosäuren.

Die aufgeführten Aminosäuren erscheinen auf den ersten Blick als Einschränkung dieser Ligationmethode, allerdings ist dieser Nachteil gleichzeitig als Erweiterung des bestehenden Repertoires der NCL und der "rückstandslosen" Staudinger-Ligation (siehe Kapitel 1.9.2 und 1.9.3) zu verstehen.

Um eine Ligation mittels TDPS durchführen zu können, sind zwei Verbindungen notwendig: Verbindung **54** ermöglicht die Peptidfestphasensynthese mit dem Beginn der Synthese bei der Aminosäuresequenz, Molekül **55** wird in der umgekehrten Richtung eingesetzt, beginnend mit der PNA-Sequenz. Die Fmoc-Schutzgruppen und eine ungeschützte Carboxylgruppe sind essentiell für die Peptidfestphasensynthese. Die verbleibende Carbonsäure, respektive das verbleibende Amin müssen säurelabil geschützt sein, um für den Ligationsschritt nach der Abspaltung vom Trägermaterial zur Verfügung zu stehen. Die eigentliche "Brücke" muß während beider Prozesse unversehrt bleiben. Aus diesen Bedingungen folgt, daß ein *Linker*-Molekül bestehend aus drei Termini und darüber hinaus aus einer orthogonal spaltbaren "Brücke" zwischen dem zusätzlichem Terminus und Aminosäure, eingesetzt werden muß (Abbildung 1.12).

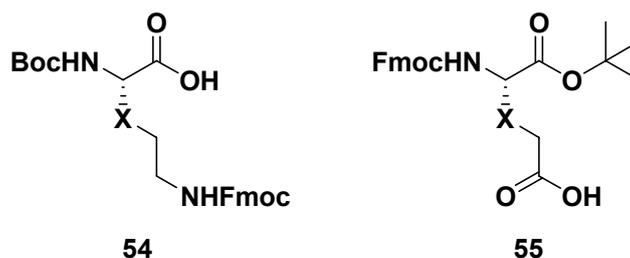


Abbildung 1.12: Zielmoleküle zur Ligationsmethode der TDPS.

Die Aufgabe des orthogonal spaltbaren *Linkers* können lichtspaltbare Schutzgruppen übernehmen. Sie sind unter den basischen Synthese- und den sauren Abspaltbedingungen stabil und durch ihre lichtinduzierte Spaltung dazu orthogonal.<sup>[144, 145]</sup> Diesen Ansprüchen werden auch noch mindestens zwei weitere Klassen von Schutzgruppen gerecht: Palladium labile Allyl- und fluoridspaltbare Silyl-*Linker*. Erste synthetische Anstrengungen ein *Linker*-Molekül zu synthetisieren, das lichtinduziert spaltbar ist,<sup>[146]</sup> wurden in der Arbeitsgruppe *Carell* in den Jahren 2003/04 durchgeführt.<sup>[147]</sup> Allerdings war es synthetisch nicht möglich, eine der Zielverbindungen **56** und **57** aus Abbildung 1.13 herzustellen.

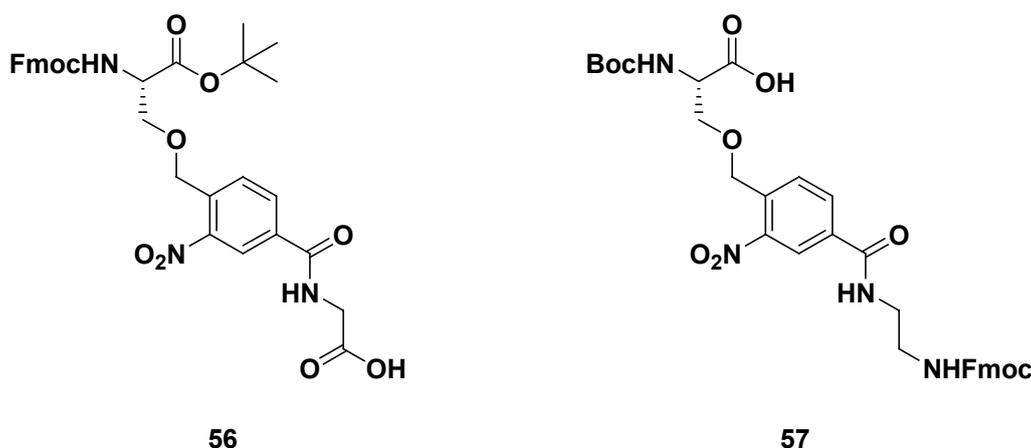


Abbildung 1.13: Photolabile Zielverbindungen zur Templat-dirigierten Peptidligation.

Das Konzept der Arbeitsgruppe *Carell* besitzt neben der größeren Vielfalt an geeigneten Aminosäuren an der Ligationsstelle noch den Vorteil der Erweiterung von einer Ligation in Lösung zu einer Ligationkaskade an mehreren Stellen gleichzeitig (Abbildung 1.14). Diesen Vorteil beinhaltet das neue Konzept, weil die Synthese eines Aminosäure-PNA-Hybrids erweiterbar ist auf ein PNA-Aminosäure-PNA-Hybrid. Diese Änderung erfordert lediglich eine PNA-Synthese am Beginn und am Ende eines solchen Hybrids, was allerdings durch die identische Chemie zur Peptidfestphasensynthese kein Problem darstellt. Lediglich die maximal erreichbare Sequenzlänge eines Peptids an der festen Phase (Kapitel 1.9.1) ist der limitierende Faktor.

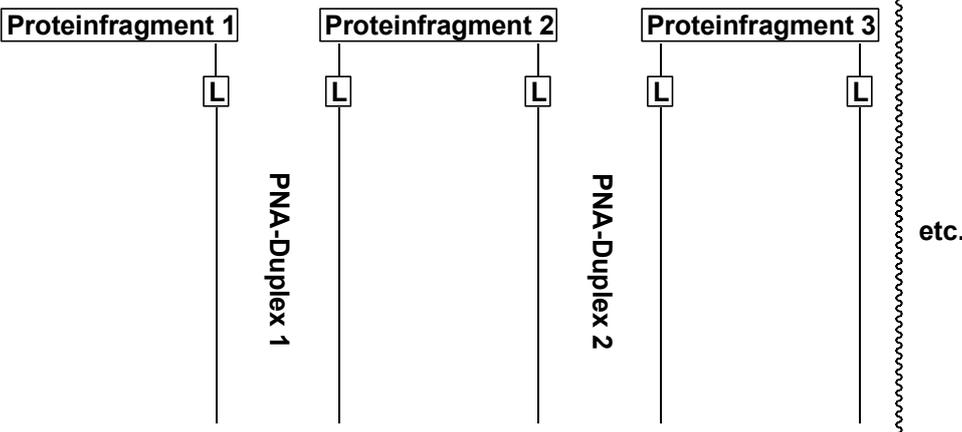


Abbildung 1.14: Erweitertes Konzept zur TDPS.

## 2 Zielsetzung Projekt $\alpha$ -cFaPydG

Das 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPydG) liegt unter physiologischen Bedingungen sowohl in der  $\beta$ - als auch in der  $\alpha$ -Konfiguration vor. Aus diesem Grund konnten in der Vergangenheit nur ein  $\alpha/\beta$ -Gemisch dieses Schadens eingebaut werden. Um den Einfluß der jeweiligen Konfiguration des Schadens auf biologische Prozesse untersuchen zu können, wurden in der Vergangenheit in der Arbeitsgruppe *Carell et al.* das bioisostere, stabile carbozyklische  $\beta$ -Analog des FaPydG-Schadens in Oligonukleotide eingebaut.

Ziel dieses Forschungsprojektes war es, das carbozyklische Analogon des FaPydG-Schadens in  $\alpha$ -Konfiguration als Phosphoramidit herzustellen und dieses Monomer in einer automatisierten DNA-Oligonukleotidsynthese in DNA-Stränge einzubauen. Die carbozyklische Grundstruktur ist literaturbekannt und im Vergleich zu den jeweiligen natürlichen Oligonukleotiden konnten in Experimenten nur äußerst geringe Abweichungen hinsichtlich der Struktur festgestellt werden.<sup>[64, 67, 68]</sup>

Nach erfolgreicher Synthese und Reinigung mittels HPLC sollten die hergestellten DNA-Sequenzen unter anderem zur Untersuchung der Paarungseigenschaften des  $\alpha$ -cFaPydG-Schadens mit den vier möglichen DNA-Basen genutzt werden. Mit den Ergebnissen solcher konzentrationsabhängiger Schmelzpunkt-Studien sollten erste Rückschlüsse auf die Mutagenität des DNA-Schadens gezogen werden.

*In vitro-Assays* mit verschiedenen DNA-Polymerasen sollten dann letztlich ein vollständigeres Bild ergeben, wie die Natur den betrachteten DNA-Schaden prozessiert.

Wir planten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *L. Beese* (Dept. of Biochemistry, Duke University, Durham, USA) Proteinkokristallstrukturen der *Bst*DNA-Polymerase I mit  $\alpha$ -cFaPydG enthaltenden DNA-Doppelsträngen zu erhalten und mittels dieser, einen Blick mit atomarer Auflösung in den Replikationsprozeß einer *high fidelity* Polymerase zu erhalten.

In unserer Arbeitsgruppe sollte mit der biochemischen Abteilung das Fpg-Reparaturenzym aus *lactococcus lactis* und einem  $\alpha$ -cFaPydG enthaltenden DNA-Duplex kokristallisiert werden, um einen atomar aufgelösten Blick in die Reparatur eines  $\alpha$ -anomerisierten DNA-Schaden zu erhalten.

## 3 Ergebnisse $\alpha$ -cFaPydG

### 3.1 $\alpha$ -cFaPydG: Synthese, Replikation und Reparatur

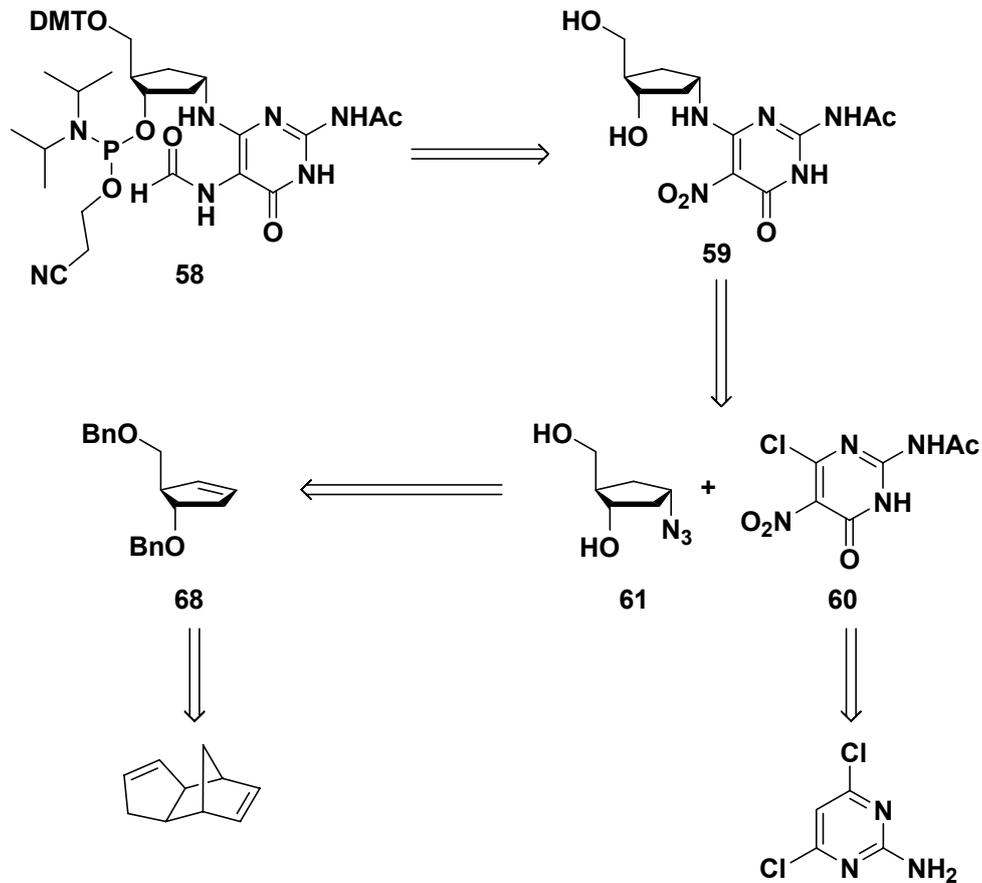
#### 3.1.1 Synthese des $\alpha$ -cFaPydG-Schadensanalogons als Phosphoramiditbaustein

Wie aus der Einleitung und aus der Zielsetzung hervorgeht, ist es essentiell zur vollständigen Klärung der biologischen Fragen ein bioisosteres, carbozyklisches Analogon des  $\alpha$ -konfigurierten FaPydG-Schadens als Phosphoramidit **58** synthetisch zugänglich zu machen. Dieses ist notwendig, da der natürliche Schaden als  $\alpha$ - und als  $\beta$ -Anomer existiert. Das  $\alpha$ -Produkt ist das thermodynamisch stabilere der beiden Formen und liegt in Lösung bevorzugt vor.<sup>[46, 47]</sup> Welche der beiden Konfigurationen in der DNA bevorzugt vorliegt, ist nicht geklärt. Allerdings kann vermutet werden, daß es sich um das  $\beta$ -Anomer handeln dürfte, da das  $\alpha$ -Anomer in einer DNA-Doppelhelix, die rein aus  $\beta$ -Nukleosiden aufgebaut ist, thermodynamisch ungünstiger sein dürfte. Darüberhinaus ist es aber auch denkbar, daß gerade der kleine Anteil an  $\alpha$ -FaPydG eine erhebliche biologische Relevanz besitzen könnte. In diesem Zusammenhang sei auf die Existenz des Reparaturenzyms Endo IV verwiesen, welches speziell für die Erkennung von  $\alpha$ -Nukleotiden in DNA-Doppelsträngen zuständig ist.<sup>[50, 148]</sup> Ein weiterer Aspekt, der für eine biologische Relevanz eines  $\alpha$ -FaPydG-Schadens spricht, ist die Ausbildung von stabilen Basenpaaren des  $\alpha$ -Adenins mit Thymin. Dies ist über "inverse" *Watson-Crick*-Basenpaarung möglich.<sup>[148]</sup> Mit der  $\alpha$ -anomeren Form des FaPydG-Schadenanalogons in DNA-Strängen soll in Schmelzpunktexperimenten, Polymerase-Studien und Protein-Kokristallstrukturen der Einfluß dieses Anomers auf biologische Prozesse untersucht werden.

##### 3.1.1.1 Retrosynthese

Retrosynthetisch erschienen die folgenden Schnitte sinnvoll: Das Phosphoramidit **58** ist synthetisch auf das Nitropyrimidinonderivat **59** zurückführbar. Dieser Vorläufer des  $\alpha$ -Formamidopyrimidinschadens des Guanins sollte seinerseits darstellbar sein aus dem Heterozyklus **60** und dem  $\alpha$ -D-2'-Desoxyribosylazidanalogon **61**. Die Pyrimidinonverbindung **60** ist literaturbekannt aus dem 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin darstellbar. Das Azid **61** ist syn-

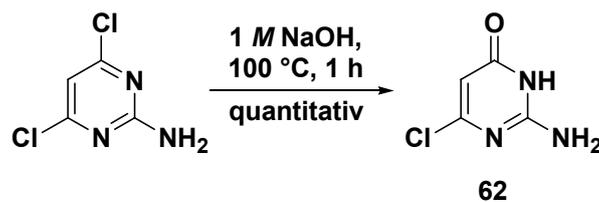
thetisch größtenteils über eine Synthese von *Meier et al.* aus Cyclopentadien mittels asymmetrischer Hydroborierung (Schema 3.1) zugänglich. <sup>[149, 150]</sup>



Schema 3.1: Retrosynthese des  $\alpha$ -*c*FaPydG Phosphoramidits 58.

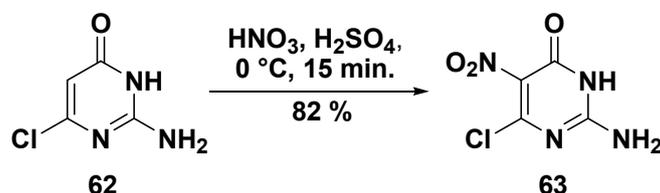
### 3.1.1.2 Darstellung des Nitropyrimidinonderivats 60

Die Zielverbindung 58 besteht in der Basenregion aus einem Heterozyklus, der sich ableitet vom käuflich erwerblichen 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin. Mittels Hydrolyse eines Chloridsubstituenten mit wässriger Natronlauge bei 100 °C wurde nach einer Stunde quantitativ Verbindung 62 dargestellt. <sup>[46, 151, 152]</sup>



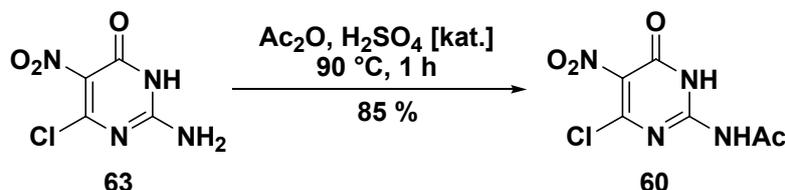
Schema 3.2: Hydrolyse von 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin zu 62.

Die Nitrierung von Molekül **62** wurde mit rauchender Salpetersäure und konzentrierter Schwefelsäure bei 0 °C in 15 Minuten durchgeführt. Das *Quenchen* der Reaktion erfolgte durch tropfenweise Zugabe der Mischung auf Eis unter ständigem Entfernen des Tauwassers. Diese Vorgehensweise ist notwendig, da sich sonst das Produkt im Wasser löst und dann nicht mehr isolierbar ist.<sup>[46, 153, 154]</sup>



Schema 3.3: Nitrierung zum Nitropyrimidinon **63**.

Das Nitropyrimidinon **63** wird im letzten Schritt am Amin acetyliert. Diese Schutzgruppe ist nukleophil, basisch spaltbar und unter den DNA-Synthesebedingungen stabil. Die Acetylierung erfolgte säurekatalysiert mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und Essigsäureanhydrid. Die so mit einer Acetylgruppe geschützte Verbindung **60** besitzt den weiteren Vorteil, das die Löslichkeit des Heterozyklus deutlich erhöht ist.<sup>[62, 155]</sup>



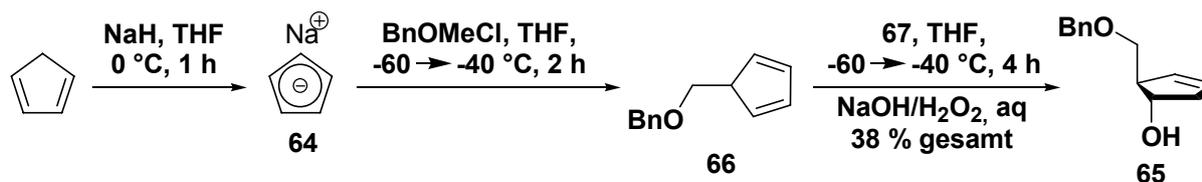
Schema 3.4: Acetylierung der Verbindung **63** zum Heterozyklusbaustein **60**.

### 3.1.1.3 Darstellung des (3*S*,4*R*)-Cyclopentenols **65**

Wie bereits 1988 von *Biggadike et al.* veröffentlicht wurde, ist aus Natriumcyclopentadien **64** in zwei Reaktionen ohne zwischenzeitliche Aufarbeitung ein Cyclopentenolderivat **65** darstellbar, das mit den zwei Chiralitätszentren an der 3'- und der 4'-Position schon wichtige strukturelle Informationen des Zielmoleküls enthält.<sup>[149]</sup> Die absolute Konfiguration mit 3*S* und 4*R* ist identisch mit den Konfigurationen der 2'-Desoxyribose eines natürlichen Nukleosids.

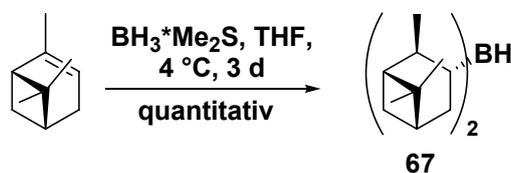
Zur Darstellung des benötigten Natriumcyclopentadien **64** wurde zunächst das Dimer des Cyclopentadiens mittels Thermolyse gespalten und das Monomer unter Schutzgas destillativ abgetrennt. Nach gewissenhaftem Entgasen der Flüssigkeit wurde diese mit NaH unter striktem Ausschluß von Sauerstoff und Feuchtigkeit in absolutem THF zum Natriumsalz des Cy-

clopentenols umgesetzt. Diese Lösung ist bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schutzgas stabil und wenige Tage lagerbar. Das Natriumcyclopentadien wurde bei  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Benzylchloromethylether in THF in einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion zum Benzylether **66** umgesetzt. Die sich anschließende asymmetrische Hydroborierung mit (-)-Diisopinocampheylboran **67** mit basischer, oxidativer Aufarbeitung lieferte das Cyclopentenol **65** mit einer Gesamtausbeute von 38 %.<sup>[150]</sup> Zur Reinigung des Produktes war eine Hochvakuumdestillation zum Abtrennen des gebildeten Camphols mit anschließender Säulenchromatographie an Kieselgel geeignet. Die Rohproduktmasse ist nach der Hochvakuumdestillation halbiert und erleichtert somit erheblich die weitere Reinigung.



Schema 3.5: Synthese des (3*S*,4*R*)-Cyclopentenols **65**.

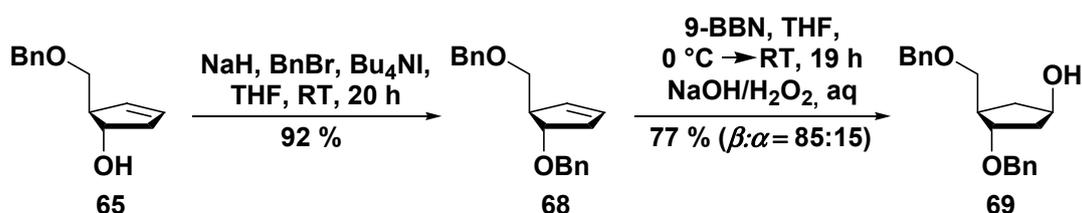
Das (-)-(IPC)<sub>2</sub>BH für die zuletzt genannte Reaktion wurde nach einer Vorschrift aus dem Jahr 1998 aus dem Boran-Dimethylsulfid- und/oder auch aus dem Boran-THF-Komplex und (1*R*)-(+)- $\alpha$ -Pinen hergestellt (Schema 3.6).<sup>[156]</sup>



Schema 3.6: Herstellung von (-)-Diisopinocampheylboran **67**.

### 3.1.1.4 Darstellung des carbozyklischen Analogons der $\beta$ -D-2'-Desoxyribose<sup>[150]</sup>

Der weitere Syntheseweg zum  $\alpha$ -Anomer des FaPydG-Schadens erfolgte nach veröffentlichten Reaktionen von *Meier et al.* aus dem Jahr 2003.<sup>[150]</sup> Dabei wurde zunächst das Cyclopentenol **65** mit Natriumhydrid und Benzylbromid unter Zugabe eines Phasentransferkatalysators in THF an der 3'-Position verethert.



Schema 3.7: Benzylierung und Hydroborierung mit 9-BBN von 65 zu 69.

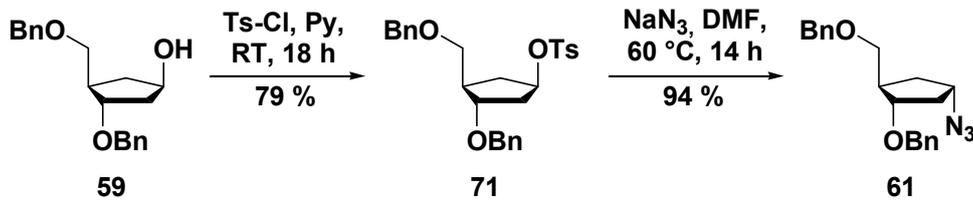
Die Reaktion zu Verbindung **68** ist notwendig, um eine saubere Reaktionsführung in der sich anschließenden Hydroborierung zu gewährleisten. Diese erfolgt mit 9-BBN aus sterischen Gründen vorwiegend zu dem an dieser Stelle gewünschten  $\beta$ -Produkt **69** (Schema 3.7).<sup>[150]</sup> Das Nebenprodukt, das  $\alpha$ -Anomer (15 %), kann bereits an dieser Stelle säulenchromatographisch abgetrennt werden.

### 3.1.1.5 Darstellung des carbozyklischen Analogons $\alpha$ -D-2'-Desoxyribosylamins **70**

In ersten Versuchen wurde der carbozyklische  $\beta$ -Alkohol **69** in einer abgewandelten *Mitsunobu*-Inversion in das  $\alpha$ -Azid überführt.<sup>[62]</sup> In einer *Mitsunobu*-Reaktion liegt selbst bei theoretischer Ausbeute von 100 % der Anteil an Produkt bei nur einem Drittel der Masse des Rohproduktes. Eine säulenchromatographische Reinigung einer solchen Reaktion beinhaltet also vor allem ein Abtrennen des Produktes von zwei Dritteln Nebenprodukt. Dies ist in zweierlei Hinsicht unbefriedigend: Erstens ist eine Trennung des Produktes von unverbrauchtem Diphenylphosphorylazid (DPPA) nur nach mehrmaliger chromatographischer Reinigung vollständig zu erreichen und zweitens erhöht sich unnötigerweise der Verbrauch an Kieselgel. Aus diesem Grund ist die Reaktionsvorschrift ungeeignet, um die gewünschte Verbindung in größeren Mengen herzustellen. Dies ist aber notwendig, um genügend Ausgangsmaterial für die verbleibenden acht Stufen der geplanten Synthese zur Verfügung zu haben.

Daher wurde ein zweistufiger Prozeß bevorzugt: Zunächst überführte man die Alkoholfunktion an C1' in eine Abgangsgruppe. Mit Tosylchlorid in Pyridin reagierte der  $\beta$ -Alkohol **69** zum gewünschten Tosylat **71**. Die anschließende Filtration über Kieselgel liefert das Produkt in einer Ausbeute von 79 %.

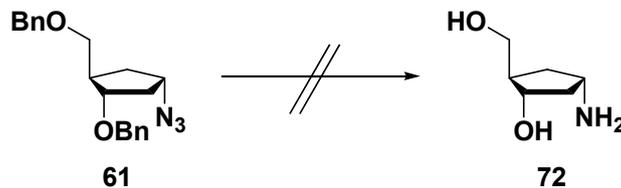
Die folgende Substitution des Tosylats mit Natriumazid in DMF zum gewünschten  $\alpha$ -Azid **61** verlief mit quantitativem Umsatz und erlaubte die Reinigung damit ebenfalls eine einfache "Säulenfiltration" (Schema 3.8).



Schema 3.8: Herstellung von  $\alpha$ -D-2'-Desoxyribosylazid **61**.

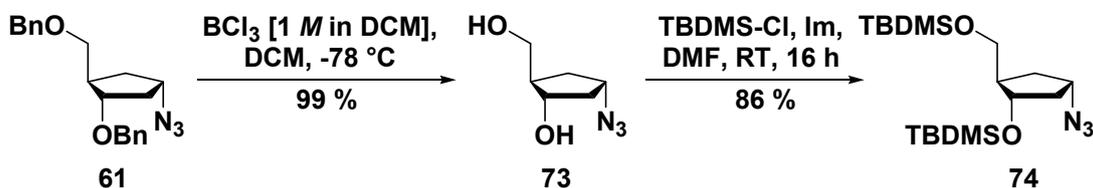
Die Reaktion erfolgt unter Inversion der Konfiguration, was durch NOESY-NMR Experimente von *M. Ober* ausführlich untersucht wurde.<sup>[62]</sup> Aus diesem Grund wurde hier die betreffende Analytik nicht wiederholt, sondern eine Verbindung zu einem späteren Zeitpunkt auf deren relative Konfiguration mittels NMR-Messungen hin überprüft.

Es wurden diverse Versuche unternommen, das Azid **61** in einer einstufigen Reduktion sowohl vollständig zu entschützen, als auch gleichzeitig zum Amin **72** umzusetzen. Unter zahlreichen Reaktionsbedingungen konnte stets nur eine Vielzahl von Produkten erhalten werden.



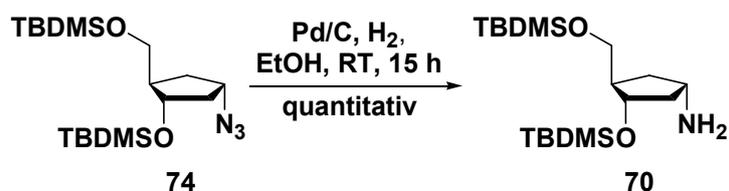
Schema 3.9: Versuche einer einstufigen Reduktion des Desoxyribosylazids **61** zum vollständig entschützten Desoxyribosylamin **72**.

Letztlich wurden zunächst die Benzylether mit der Lewisäure Bortrichlorid in DCM bei  $-78^\circ\text{C}$  gespalten. Das *Quenchen* der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Methanol und dauerte 16 Stunden. Wird diese Dauer unterschritten, ist mit erheblichen Verlusten bei der Darstellung des Azids **73** zu rechnen (Schema 3.10). Die folgende Schützung der 3' und 5'-Position des carbozyklischen Analogons wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.<sup>[157]</sup> Die Reaktion ergab in 86 %-iger Ausbeute das TBDMS-geschützte Azid **74**.



Schema 3.10: Etherspaltung mit  $\text{BCl}_3$ -Lösung und Schützung der Hydroxylgruppen der Verbindung **73** zu **74**.

Die Reduktion mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre zum carbozyklischen Analogon des  $\alpha$ -D-2'-Desoxyribosylamin **70** ist im Schema 3.11 dargestellt.

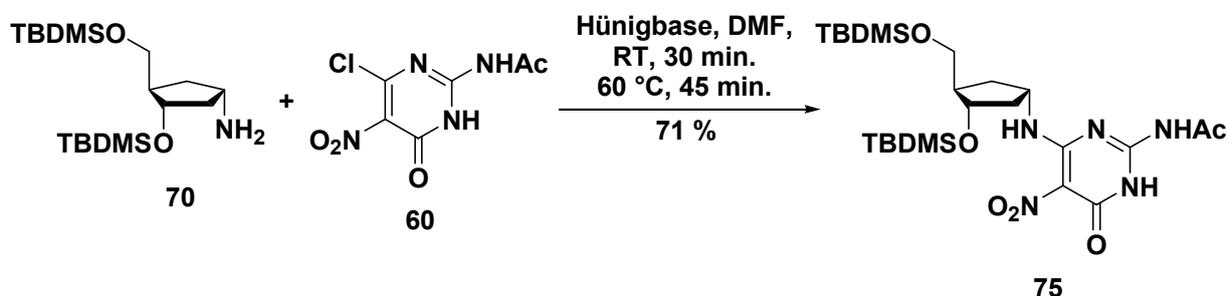


Schema 3.11: Reduktion zum  $\alpha$ -D-2'-Desoxyribosylamin **70**.

Bei der Durchführung dieser Reaktion war es empfehlenswert, alle Solventien sorgfältig zu entgasen und die Reaktion ständig heftig zu durchmischen. Bei heterogenen Katalysen ist es essentiell, eine gute Durchmischung von organischer Phase und Gasphase zu erzielen, denn nur so erfolgt die gewünschte Reaktion in vernünftigen Reaktionszeiten.

### 3.1.1.6 Kupplung mit dem Nitropyrimidinon-Derivat **60** und Bestimmung der absoluten Konfiguration

Das  $\alpha$ -Cyclopentylamin **70** wurde mit dem Nitropyrimidinon **60** unter Verwendung einer sterisch gehinderten Stickstoffbase gekuppelt. Diese Bedingungen wurden analog zu den Reaktionsbedingungen gewählt, die für die Synthese des  $\beta$ -*c*FaPydG-Bausteins an dieser Stelle erfolgreich waren. Die Reaktion ergab mit 71 % Ausbeute die Verbindung **75** (Schema 3.12).



Schema 3.12: Kupplung des Carbozyklus mit dem Nucleobasenvorläufer **60** zur Verbindung **75**.

Die korrekte Konfiguration der Verbindung **75** wurde durch NOESY-NMR-Messungen bestätigt. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, erwartet man verschiedene Kreuzsignale in einem NOESY-Experiment, aus denen sich die relative Anordnung der Protonen zueinander ableiten lässt.

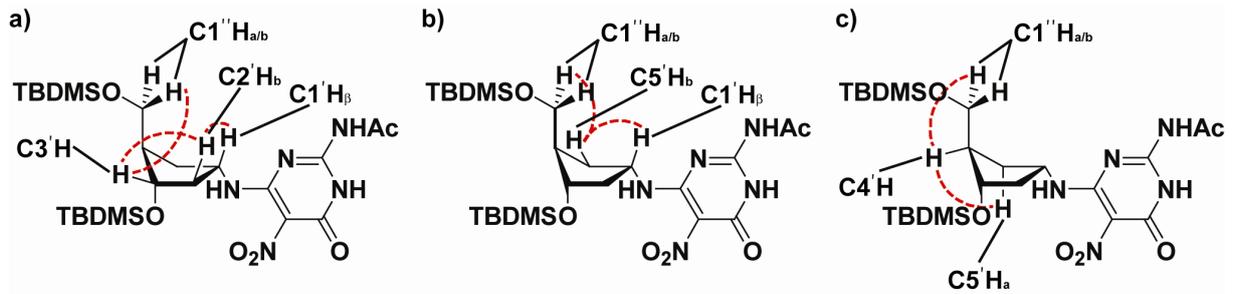
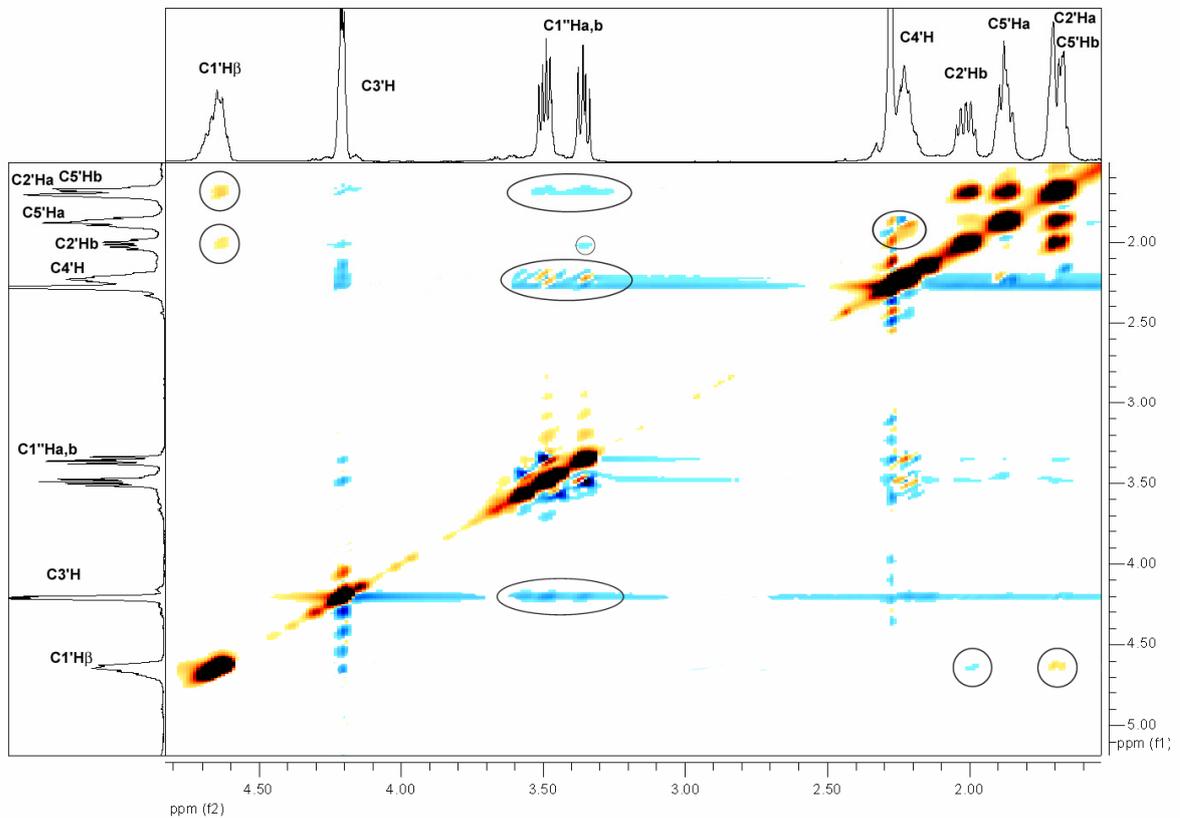


Abbildung 3.1: Erwartete NOE-Kreuzsignale der Verbindung 75.

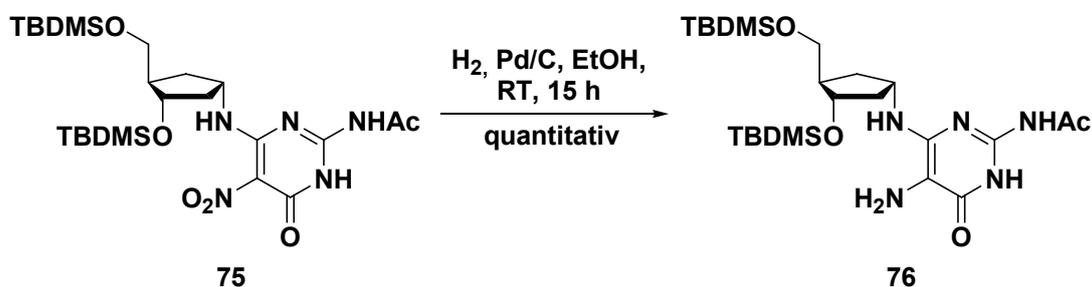
Die Protonen der C1''H<sub>a/b</sub>-Position besitzen bei Vorliegen der  $\alpha$ -Konfiguration insgesamt drei starke Kopplungen durch den Raum mit den Protonen C5'H<sub>b</sub>, C4'H und C3'H sowie eine schwache Kopplung zu C2'H<sub>b</sub> (Abbildung 3.1 a bis c). Ausgehend von dieser Zuordnung zeigt Abbildung 3.1 a, daß Kreuzsignale zwischen den Protonen an C3'H und C2'H<sub>b</sub> sowie C2'H<sub>b</sub> und C1'H<sub>β</sub> nur dann zustande kommen können, wenn diese *cis* zueinander angeordnet sind.

Abbildung 3.2: NOESY-Spektrum der Verbindung 75 in CDCl<sub>3</sub> bei 400 MHz.

Das Kreuzsignal zwischen C5'H<sub>b</sub> und C1'H<sub>β</sub> (Abbildung 3.1 b) ist ebenso ein Beweis für die  $\alpha$ -Konfiguration. Man beobachtet auch vom C4'-Proton eine Raumkopplung zum C5'H<sub>a</sub> (Abbildung 3.1 c), welches wiederum aufgrund der *trans*-Anordnung zum C1'H<sub>β</sub> keinen NOE zeigen kann. Alle Kopplungen konnten zugeordnet werden und bestätigen somit, daß die Substitution des Heterozyklus am Carbozyklus in  $\alpha$ -Konfiguration erfolgte.

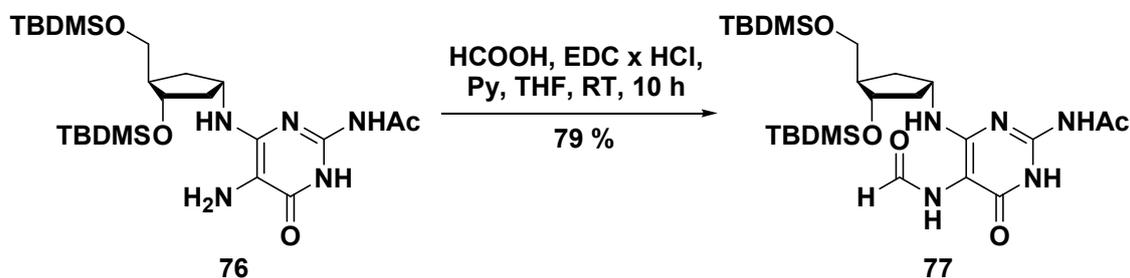
### 3.1.1.7 Darstellung des Formamids **77** durch Reduktion und Formylierung

Um letztlich die Base des FaPydG-Schadenanalogons zu erhalten, ist es notwendig, die Nitrogruppe des Pyrimidinonrings zunächst zum Amin zu reduzieren, welches dann formyliert wird. Dann ist die Base - abgesehen von der Acetylschutzgruppe - identisch mit der des natürlichen DNA-Schadens. Im Falle des  $\beta$ -cFaPydG war das gebildete Amin extrem oxidationsempfindlich und konnte nicht isoliert werden.<sup>[62]</sup> Bei der Synthese des  $\alpha$ -cFaPydG war das Amin **76** nach Reduktion mit Wasserstoff unter heterogener Katalyse mit Palladium auf Aktivkohle stabil und konnte vollständig charakterisiert werden (Schema 3.13). Diese Isolation wurde allerdings nur zu analytischen Zwecken durchgeführt.



Schema 3.13: Reduktion der Nitrogruppe zum stabilen Amin **76**.

Aus zeitökonomischen Gründen wurde das Amin **76** sonst ohne weitere Aufarbeitung in der Formylierungsreaktion eingesetzt. Die Umsetzung desamins zum Formamid **77** verlief mit EDC-aktivierter Ameisensäure und Pyridin als Base in THF innerhalb von zehn Stunden mit 79 %-iger Ausbeute. Hierbei zeigten sich erneut Unterschiede in der Reaktivität zum  $\beta$ -Analog. Diese Verbindung besaß ein erheblich reaktionsträgeres Amin, denn die Reaktion lieferte erst nach zwei Tagen in DMF akzeptable Ausbeuten.<sup>[62]</sup>



Schema 3.14: Formylierung desamins **76** zu **77**.

### 3.1.1.8 Darstellung einer Modellverbindung zur Bestimmung der Rotationsbarrieren des *cis/trans*-Formamid 78

Das Formamidopyrimidin liegt in Form eines *cis*- und *trans*-Formamid-Gemisches vor (Abbildung 3.3).

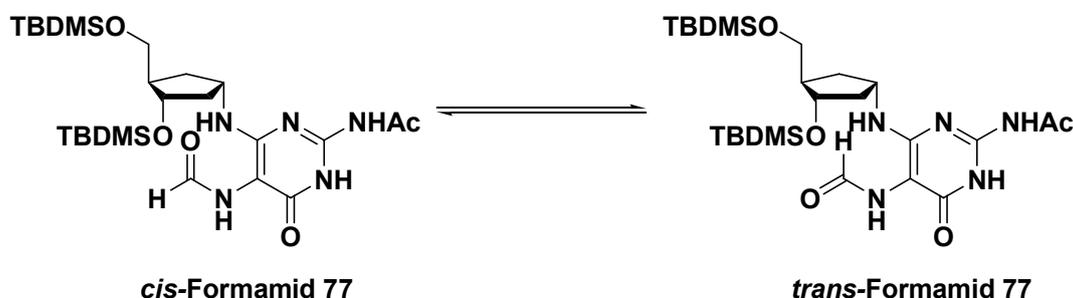
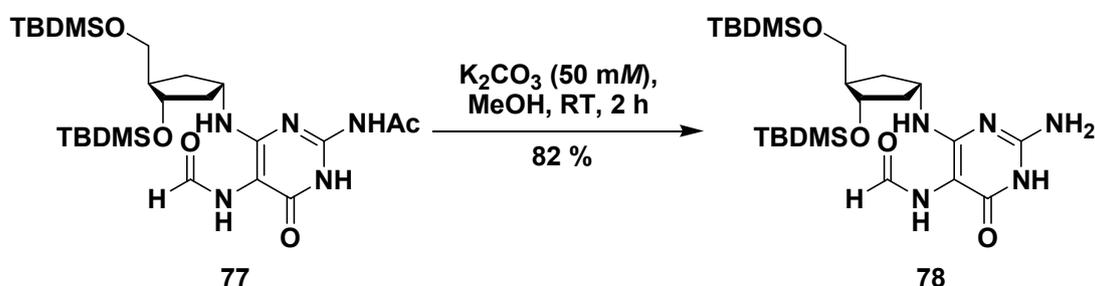


Abbildung 3.3: Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Formamid.

Die Rotation um die Amidbindung ist aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters gehemmt. Die notwendige Energie diese Rotationsbarriere zu überwinden, hat Einfluß auf die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung. Die Rotationsbarriere kann mittels Signalformanalyse durch NMR-Messungen bei verschiedenen Temperaturen ermittelt werden.<sup>[17, 158]</sup>

Diese sind für den FaPydG-Schaden auf  $17.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $72.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ )<sup>[46]</sup> und für das carbozyklische Analogon des FaPydG-Schadens in  $\beta$ -Konfiguration in DMSO- $d_6$  zu  $17.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $73.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) bestimmt worden.<sup>[62]</sup> Ab einer Höhe von  $23 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $96 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) läuft eine Isomerisierung bei Raumtemperatur so langsam ab, daß die beiden Rotamere getrennt isolierbar wären.<sup>[158]</sup> Ob sich die  $\alpha$ -Verbindung ähnlich verhält oder die Grenze von  $23 \text{ kcal mol}^{-1}$  überschreitet, galt es am TBDMS-geschützten  $\alpha$ -*c*FaPydG **78** zu untersuchen.

Verbindung **78** wurde mit  $50 \text{ mM}$  Kaliumcarbonat-Lösung in absolutem Methanol selektiv deacetyliert. Diese Reaktion verlief innerhalb von zwei Stunden bei Raumtemperatur in  $82 \%$ -iger Ausbeute.



Schema 3.15: Deacetylierung zum TBDMS-geschützten  $\alpha$ -*c*FaPydG **78**.

### 3.1.1.8.1 Theorie

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Hinreaktion  $k_1$  und der Rückreaktion  $k_{-1}$  eines Gleichgewichts von *cis*- und *trans*-Formamid berechnen sich aus den jeweiligen freien Aktivierungsenthalpien  $\Delta G^\ddagger$  nach der *Eyring*-Gleichung. Wenn der Energieunterschied zwischen *cis*- und *trans*-Formamid nahezu null ist, sind die Geschwindigkeiten  $k_1$  und  $k_{-1}$  nahezu gleich und es gilt:

$$k_1 \approx k_{-1} \approx k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (3.1)$$

mit  $k_B$  = Boltzmannkonstante,  $h$  = Plancksches Wirkungsquantum,  $T$  = Temperatur und  $R$  = universelle Gaskonstante. Zusätzlich gilt am Koaleszenzpunkt folgender Zusammenhang:<sup>[159]</sup>

$$k_c = \frac{\pi \Delta \nu}{\sqrt{2}} \quad (3.2)$$

mit  $k_c$  = Geschwindigkeitskonstante am Koaleszenzpunkt,  $\Delta \nu$  = NMR-Linienabstand der betrachteten Signale (in Hz) bei hinreichend niedriger Temperatur. Hierbei bedeutet hinreichend niedrig diejenige Temperatur, bei der auf der NMR-Zeitskala kein Austausch zwischen den betrachteten Signalen besteht. Aus den beiden oben genannten Gleichungen ergibt sich durch Auflösen nach  $\Delta G^\ddagger$  folgender Zusammenhang mit  $T_c$  = Koaleszenztemperatur.

$$\Delta G^\ddagger = -RT_c \ln \left( \frac{h \pi \Delta \nu}{k_B T_c \sqrt{2}} \right) \quad (3.3)$$

Dieser Zusammenhang ermöglicht unter Verwendung der Konstanten, der Koaleszenztemperatur und des Linienabstandes aus den temperaturabhängigen NMR-Messungen die Bestimmung der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$ .

### 3.1.1.8.2 Experiment

In Abbildung 3.4 sind die relevanten Bereiche der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren bei 400 MHz von Verbindung **78** in 5 K-Schritten von 300 K bis 380 K in DMSO- $d_6$  dargestellt. Zwischen 5.7 und 6.1 ppm sind deutlich zwei Dubletts zu erkennen, die von dem Proton des sekundären Amins an der C1'-Position stammen. Das weiter im Tieffeld befindliche Dublett entspricht dem Proton der *trans*-Verbindung von **78**, das hochfeldverschobene Signal stammt vom selben Proton, allerdings von der *cis*-Verbindung von **78**.

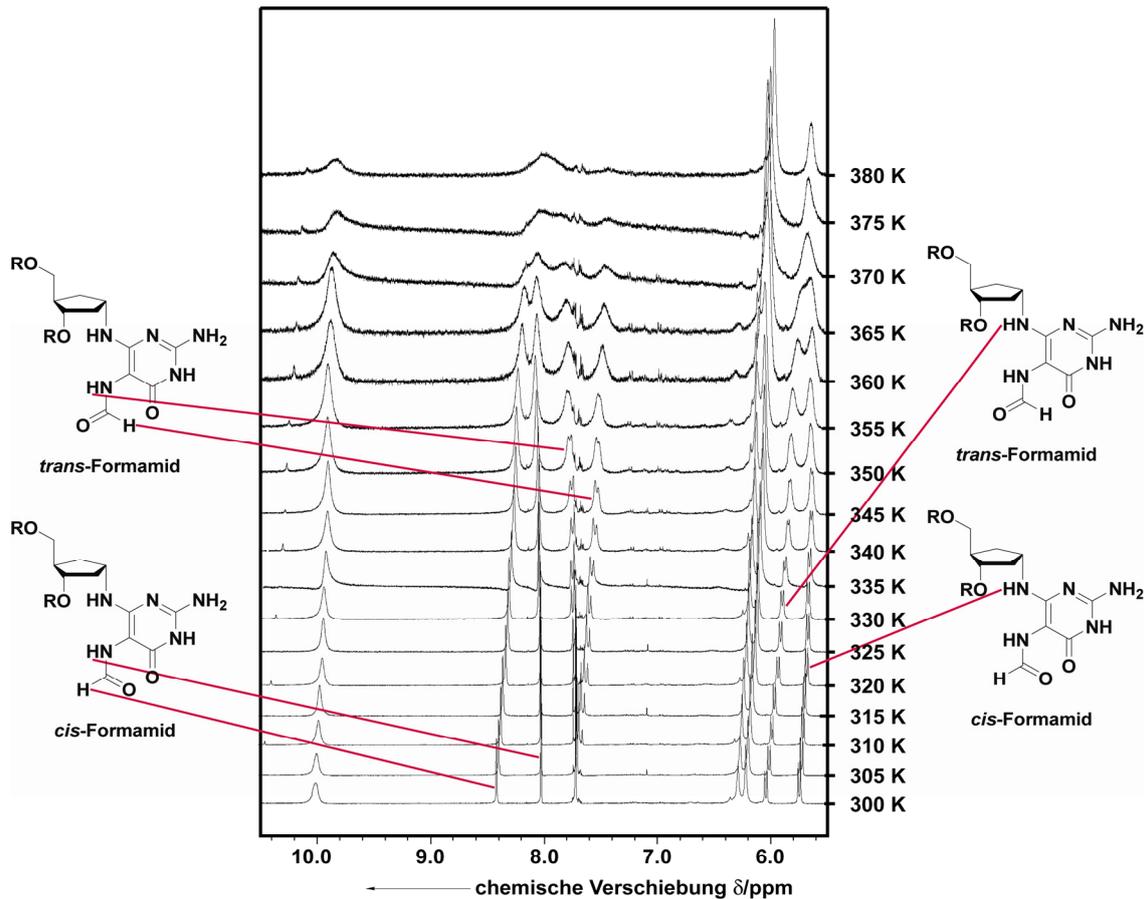


Abbildung 3.4: Wasserfalldiagramm der temperaturabhängigen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des TBDMS-geschützten, deacetylierten  $\alpha$ -*c*FaPydG 78.

Das C1'N-Proton bildet mit dem Formamid und den beiden aromatischen Kohlenstoffatomen C4 und C5 quasi einen offenen Siebenring in der *cis*-Verbindung, so daß die Carbonylgruppe des Formamids aus der Ebene des Aromaten ausweichen muß. Dies geschieht durch die Rotation um die C5NH-Bindung (Abbildung 3.5), wodurch sich die magnetische Umgebung des Formamidprotons ändert, welches sich dann oberhalb der Carbonylgruppe befindet und damit in der *cis*-Konfiguration einer Hochfeldverschiebung und in der *trans*-Verbindung einer Tieffeldverschiebung unterliegt.<sup>[160]</sup> Damit ist dargelegt, warum die chemische Verschiebung des Aminprotons an C1' des Carbozyklus direkt von der Konfiguration des Formamids abhängt.

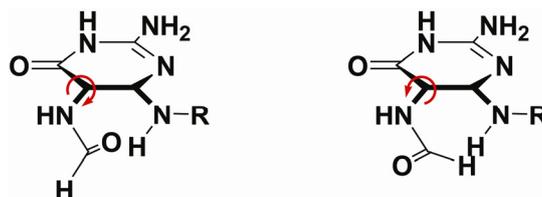


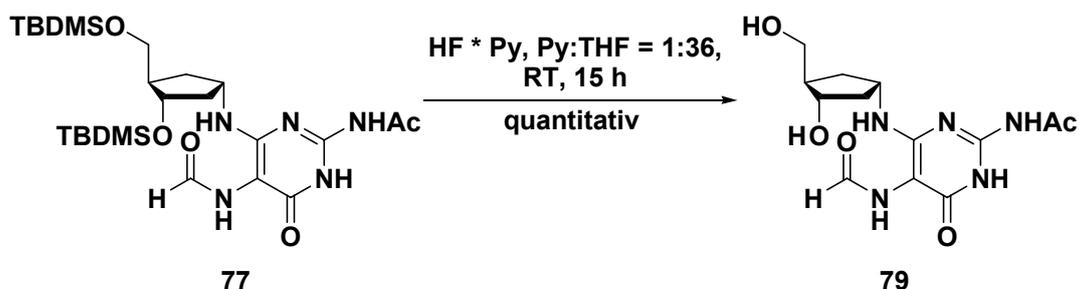
Abbildung 3.5: Anisotropieeffekt des *cis*- bzw. des *trans*-Formamids der Verbindung 78.

Die Rotation um die Amidbindung des Formamids findet bei erhöhter Temperatur so schnell statt, daß die NMR-Spektroskopie zu langsam ist, um weiterhin einen Unterschied zwischen der *cis*- und der *trans*-Konfiguration darstellen zu können. Diese Temperatur wird Koaleszenztemperatur genannt und kann mit der Signalanalyse aus den temperaturabhängigen  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen abgelesen werden. Mit der chemischen Verschiebungsdifferenz der betrachteten Signale bei hinreichend niedrigen Temperaturen und der dazugehörigen Koaleszenztemperatur ist es möglich, die Rotationsbarriere des Formamids zu berechnen. Die Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\nu$  vom *cis/trans*-Formamid liegt beim  $\alpha$ -cFaPydG-Derivat **78** bei 122.1 Hz und die Koaleszenztemperatur bei etwa 370 K. Damit ergibt sich eine Rotationsbarriere in DMSO von 17.7 kcal mol<sup>-1</sup> (74.2 kJ mol<sup>-1</sup>). Die Rotationsbarriere liegt also geringfügig oberhalb des Wertes, der für den natürlichen FaPydG-Schaden mit 17.4 kcal mol<sup>-1</sup> (72.9 kJ mol<sup>-1</sup>) festgestellt wurde.<sup>[46]</sup>

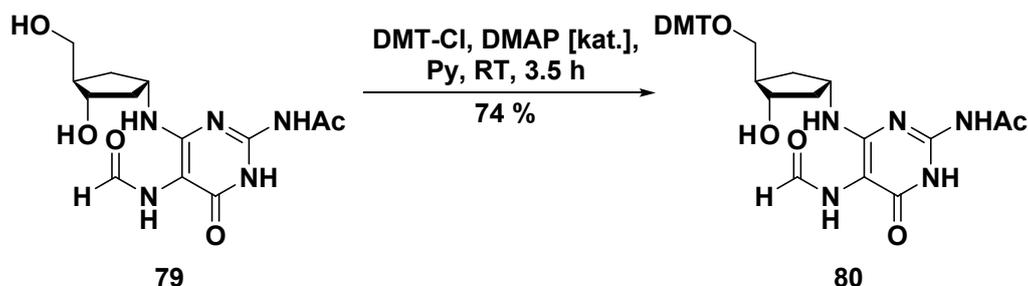
Bei der direkten Betrachtung der Formamidprotonen ist es ebenso möglich, die Rotationsbarriere zu bestimmen. Die Signalformanalyse ist aber in diesem Fall aufgrund von Signalüberlagerungen schwieriger. Zudem fallen die Signale des *trans*-Formamid-NH und CHO bei Raumtemperatur zusammen und trennen sich erst bei erhöhter Temperatur auf. Eine Koaleszenz ist in diesen Fällen erst bei 380 K zu sehen, was bei einer Differenz der chemischen Verschiebung von 163.9 Hz zu einer Rotationsbarriere von 75.2 kJ mol<sup>-1</sup> (18.0 kcal mol<sup>-1</sup>) führt. Diese liegt mit einer Abweichung von 0.3 kcal mol<sup>-1</sup> vom zunächst berechneten Wert im Bereich der Fehlertoleranz.

### 3.1.1.9 Desilylierung, Dimethoxytrityl-Schätzung und Phosphoramidit-Synthese zur Darstellung des $\alpha$ -cFaPydG-Analogons **58**

Die letzten drei Stufen auf dem Weg zum gewünschten Phosphoramiditbaustein für die DNA-Synthese am festen Trägermaterial umfassen zunächst eine Desilylierungsreaktion an der 3'- und der 5'-Position zu den korrespondierenden freien Alkoholfunktionen. Verbindung **77** mußte im Gegensatz zu seinem  $\beta$ -Analogon in einem Pyridin/Tetrahydrofuran-Gemisch gelöst und anschließend mit dem HF/Pyridin-Komplex versetzt werden. Das Produkt **79** konnte in quantitativer Ausbeute nach 15 Stunden Reaktionszeit erhalten werden und fiel aus der Reaktionsmischung in Form eines leicht orangefarbenen Pulvers aus.

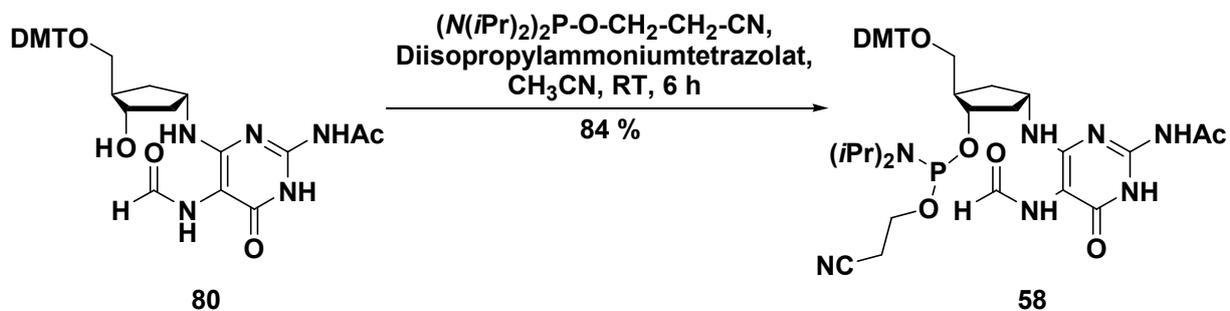
Schema 3.16: Desilylierung von Verbindung **79**.

Die folgende Dimethoxytritylschützung der 5'-Hydroxyfunktion wurde unter Standardbedingungen in Pyridin mit Dimethoxytritylchlorid durchgeführt, wobei DMAP in katalytischen Mengen zugegen war. Innerhalb von nur dreieinhalb Stunden lieferte die Reaktion in 74 %-iger Ausbeute das DMT-geschützte Derivat **80**. Hierbei ist es zwar möglich, die Reaktion bei Raumtemperatur durchzuführen, allerdings mußte die Zugabe des Dimethoxytritylchlorids in kleinen Portionen erfolgen (2 x 0.5 eq, anschließend 0.3 eq).



Schema 3.17: Dimethoxytritylschützung der 5'-Hydroxyfunktion.

Die abschließende Reaktion zum Phosphoramidit konnte nicht erfolgreich mit CED-Cl durchgeführt werden (O6-Phosphorylierung), weshalb auf das weniger reaktive 3-(Bis(diisopropylamino)phosphanoxy)propannitril ausgewichen werden mußte. Dieses Reagenz lieferte in Acetonitril mit katalytischen Mengen an Diisopropylammoniumtetrazolat innerhalb von sechs Stunden bei Raumtemperatur das Zielmolekül **58**.

Schema 3.18: Phosphoramiditsynthese zum Monomerbaustein des  $\alpha$ -*Fa*PydG-Schadensanalogon **58**.

### 3.1.2 DNA-Synthese und enzymatischer Totalverdau

#### 3.1.2.1 Einbau des $\alpha$ -cFaPydG-Bausteins in DNA

Das FaPydG-Schadensanalogon **58** wurde mit Hilfe eines *PerSeptive Biosystems Expedite 8900* und eines *Äkta Oligopilot 10 (Amersham Biosciences)* in verschiedene Oligonukleotide eingebaut. An dieser Stelle soll auf die besonderen Bedingungen hingewiesen werden, die zur Synthese der Oligonukleotide benötigt wurden. Aus den Studien zum  $\beta$ -cFaPydG war bekannt, daß der FaPydG-Baustein verlängerte Kupplungszeiten und eine verändertes *Capping* benötigt, da es unter den Standardbedingungen umacetyliert wird und das Formamid verliert. Das  $\alpha$ -cFaPydG-Phosphoramidit wurde mit einer Kupplungszeit von 20 Minuten und mit geänderten *Capping*-Bedingungen ähnlich zu denen des  $\beta$ -cFaPydG in Oligonukleotide verschiedener Sequenz und Länge an definierten Positionen eingebaut. Das dabei verwendete Pivaloylsäureanhydrid als *Capping*-Reagenz reagierte derart ineffizient, daß ein Wechsel auf das etwas reaktivere iso-Butyrylanhydrid notwendig wurde. Dieses stellte sich im *Capping*-Prozeß als besser geeignet heraus, die nicht mit dem Sondermonomer gekuppelten DNA-Sequenzen für den nächsten Reaktionsschritt zu blockieren. Alle Standardbasen, die nach dem  $\alpha$ -cFaPydG eingebaut wurden, wurden ebenfalls mit erhöhten Kupplungszeiten und dem veränderten *Capping*-Protokoll gekuppelt. Die synthetisierten Stränge wurden vom festen Trägermaterial mit einer 3:1-Mischung aus konzentrierter, wässriger Ammoniaklösung und Ethanol bei 15 °C für 18 Stunden (bei 1000 rpm) abgespalten. Mit dieser Methode (detaillierte Bedingungen in Kapitel 6) wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Sequenzen hergestellt.

DNA-Sequenz	Nr.	Verwendung
5'-GCG ATX TAG CG-3'	DNA 1	thermodynamische Studien
5'-TGC AGT XAC AGC-3'	DNA 2	thermodynamische Studien
5'-TAC XCC TGG TCA TT-3'	DNA 3	Replikation <i>in vitro</i>
5'-CTC TTT XTT TCT CG-3'	DNA 4	Kristallisation <i>LFpg</i>
5'-CAT XCG AGT CAG G-3'	DNA 5	Kristallisation <i>BstPol I</i>
5'-CAC CAT XTT GAA TTC TAA-3'	DNA 6	Replikation <i>in vivo</i>

Tabelle 3.1: DNA-Sequenzen und deren Verwendung.

### 3.1.2.2 Enzymatischer Totalverdau $\alpha$ -cFaPydG enthaltender Stränge

Nach der Synthese erfolgte die Molekulargewichtsbestimmung des Reaktionsproduktes vor und nach HPLC-Reinigung mittels MALDI-TOF oder ESI-FTICR-Messungen. Wenn bei diesen Messungen das gesuchte Molekulargewicht gefunden werden kann, bedarf es noch eines weiteren, direkten Beweises, daß das Sondermonomer - im vorliegenden Fall das  $\alpha$ -cFaPydG - unverändert nach der Synthese vorliegt. Es schloß sich ein enzymatischer Totalverdau an. Dabei wurde der zu untersuchende Strang (DNA 4) mit den Enzymen *Penicillium citrum* Nuklease P1, *calf spleen*-Phosphodiesterase II, der *snake venom*-Phosphatase und der *calf intestinal*-Phosphatase verdaut.

Die Reaktionsmischungen wurden mittels HPLC-MS/MS untersucht und charakterisiert. Das Auffinden des gewünschten Molekulargewichts und der dazugehörigen Chromatogramm war als weiterer Beleg des unveränderten Sondermonomers notwendig. In Abbildung 3.6 ist das Chromatogramm des enzymatischen Totalverdaus dargestellt, welches einen zusätzlichen breiten Peak bei 10.1 Minuten zeigt.

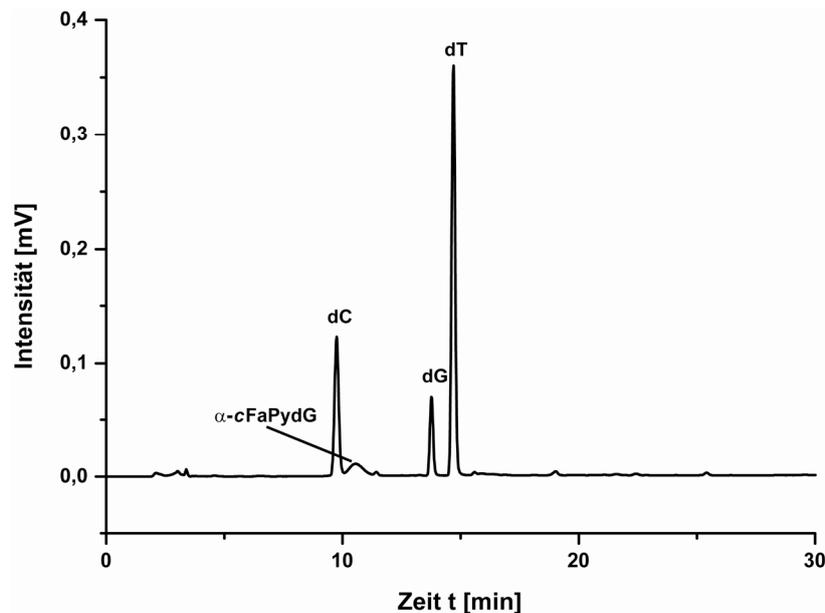


Abbildung 3.6: Chromatogramm des enzymatischer Totalverdau von DNA 4.

Das Molekulargewicht von 328.4298 und 342.1793 g/mol, die bei dieser Retentionszeit detektiert wurden, können nicht einer der vier Standardnukleobasen zugeordnet werden. Die Massen dieser Peaks gehören jeweils zu den Addukten des  $\alpha$ -cFaPydG-Schadens mit 328.4298 g/mol (M+Formiat) und 342.1793 g/mol (M+Acetat). Beim anschließenden MS<sup>2</sup>-Experiment dieser Signale zeigen beide das Molekulargewicht des Monomers von 282.1925 g/mol ( $\alpha$ -cFaPydG-Anion). Dieser Monomerpeak konnte in einer weiteren Fragmentierung zu den Signalen 239.1878 g/mol (M-C=O) und 254.1421 g/mol (M-C=O und -

NH<sub>2</sub>) zerlegt werden. Damit konnte ein eindeutiger Beweis für den nach Synthese, Abspaltung und Reinigung unverändert gebliebenen  $\alpha$ -*c*FaPydG-DNA-Schaden erhalten werden.

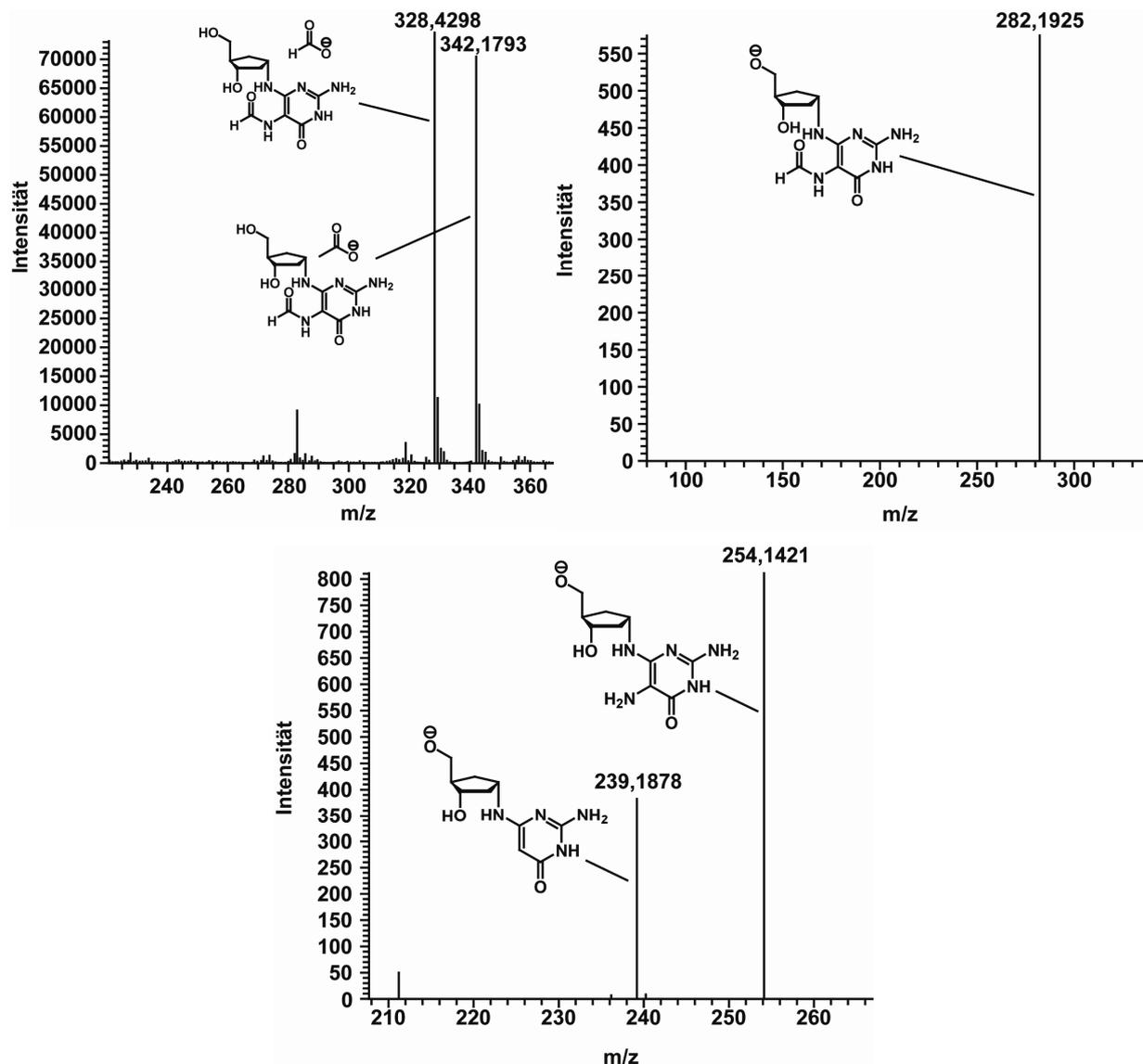


Abbildung 3.7: Das dazugehörigen MS/MS -Experiment des Peaks der höchsten Intensität bei der Retentionszeit  $t = 10.1$  Minuten im negativ Modus ESI-FTICR.

Die Abweichung der gemessenen Masse zur berechneten exakten Masse eines Sondermonomeranions im MS<sup>n</sup>-Experiment ist mit jeder weiteren MS-Messung zunehmend und bewegt sich mit 0.025 % sehr klein und innerhalb der Toleranz. Eine eindeutige Zuordnung gelang in den oben aufgeführten Sequenzen DNA 1, DNA 2, DNA 3 und DNA 4. In den verbleibenden Sequenzen DNA 5 zur *Bst*Pol I Proteinkokristallisation und in der *in vivo* Replikationssequenz DNA 6 wurden allerdings Massenabweichungen in den ESI-FT-ICR-Messungen festgestellt.

### 3.1.3 Oxidation von $\alpha$ -cFaPydG zu 8-OxodG innerhalb der DNA

#### 3.1.3.1 ESI-FTICR-Messungen

Es ist bei den Sequenzen DNA 5 und DNA 6 offensichtlich während der Synthese oder der Abspaltung zu einer unerwarteten chemischen Modifikation des  $\alpha$ -cFaPydGs gekommen. Das erwartete und gemessene Molekulargewicht im FT-ICR ist exemplarisch für den DNA-Strang DNA 5 in Abbildung 3.8 dargestellt. Diese entspricht dem Gesamt-molekulargewicht des ungeladenen DNA-Strangs von 4013.73 g/mol. Das gefundene Molekulargewicht wich hier, ebenso wie auch im Fall DNA 6, jeweils vom gesuchten Molekulargewicht um  $\Delta m/z = 0.68$  ab (3-fach geladenes Anion). Dies bedeutet für die Gesamtmassen der beiden vermessenen DNA-Stränge eine Abweichung von 2.04 g/mol, was auf die Bildung von  $\alpha$ - $\epsilon$ -OxodG hindeutet. Dies bedeutet, daß  $\alpha$ -cFaPydG an einer Stelle während der Synthese oder der Schutzgruppenabspaltung/Entschützung zu 8-OxodG oxidiert worden ist.

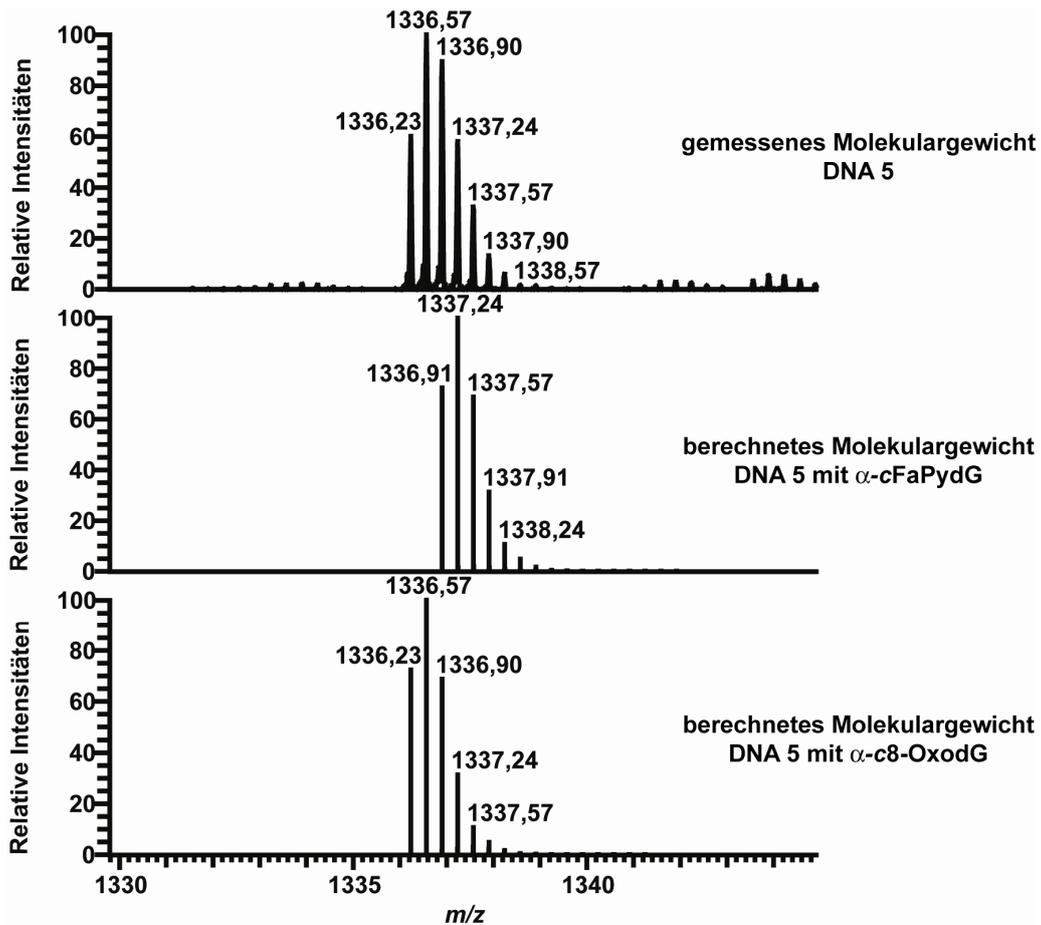


Abbildung 3.8: ESI-FTICR des DNA-Strangs DNA 5 mit der dazugehörigen Simulation der Masse des Strangs  $\alpha$ -cFaPydG und  $\alpha$ - $\epsilon$ -OxodG enthaltend.

### 3.1.3.2 Enzymatischer Totalverdau $\alpha$ -c8-OxodG enthaltender Stränge

Der DNA-Strang DNA 5 wurde ebenfalls einem enzymatischen Totalverdau unterzogen und lieferte das dargestellte Chromatogramm (Abbildung 3.9). Das dazugehörige Molekulargewicht von 280,1049 g/mol entspricht exakt dem berechneten Molekulargewicht von  $\alpha$ -c8-OxodG (Abbildung 3.10).

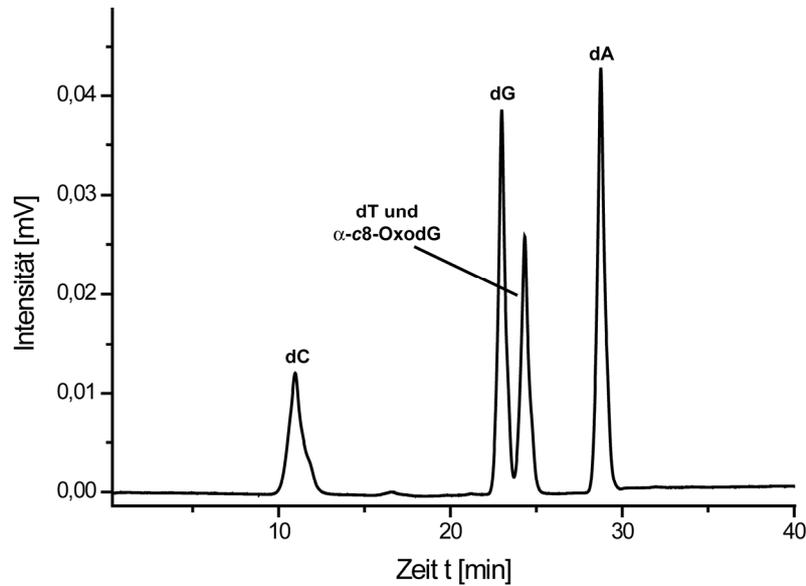


Abbildung 3.9: Chromatogramm des enzymatischen Totalverdaus von DNA 5.

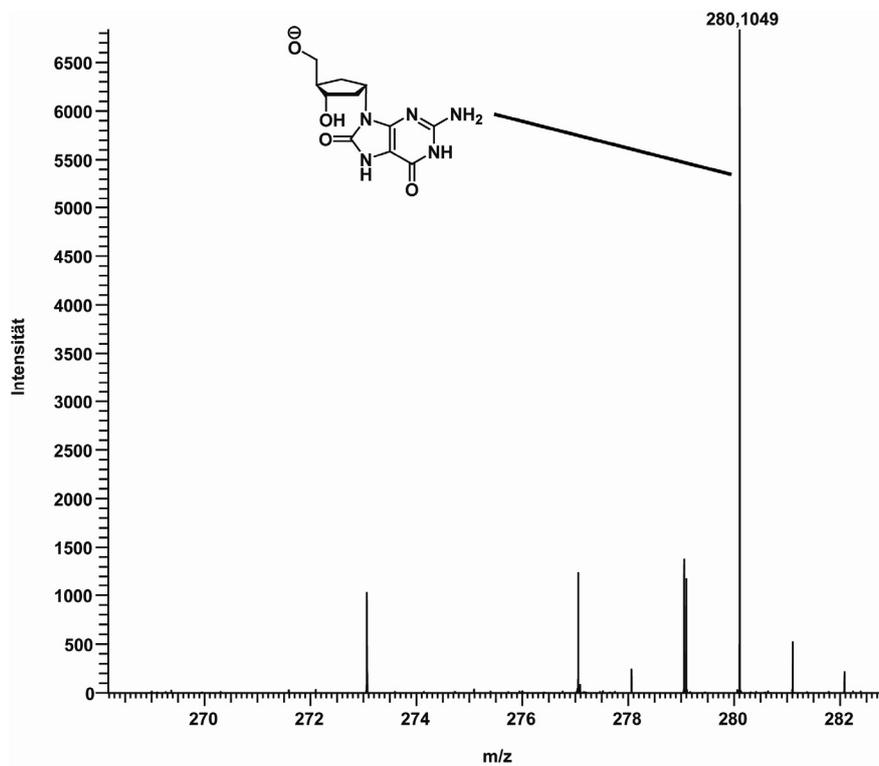


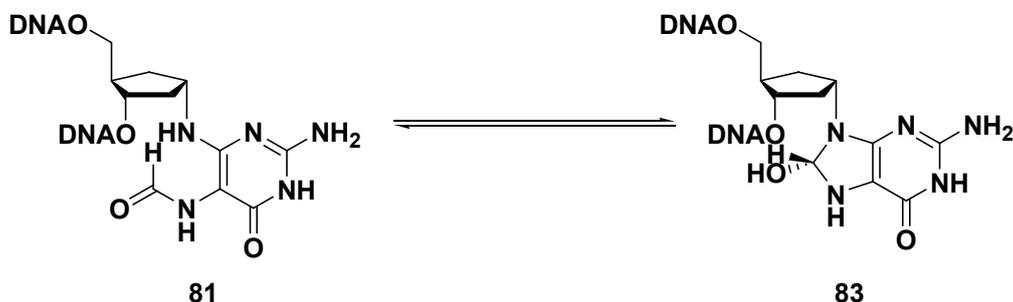
Abbildung 3.10: MS des größten Peaks bei  $t = 24.6$  Minuten mit der Masse von  $\alpha$ -c8-OxodG im negativ Modus ESI-FTICR.

Zwei chemische Erklärungen sind für diese Beobachtung denkbar: Da das richtige Monomer vor der DNA-Synthese vorlag, kann man eine chemische Reaktion vor der Festphasensynthese ausschließen. Auch die korrekten, HPLC-gereinigten DNA-Sequenzen - reproduzierbar am gleichen Tag mit der gleichen Charge Phosphoramidit synthetisiert - zeigen, daß das Sonderbasenmonomer unverändert zu Synthesebeginn vorlag. Folglich kann ein fehlerhaftes Edukt als Sonderbaustein vor/während der DNA-Synthese ausgeschlossen werden.

### 3.1.3.3 Ursachen, Lösungen und Interpretation

Die Umsetzung von  $\alpha$ -*c*FaPydG **81** zu  $\alpha$ -*c*8-OxodG **82** ist auch durch die Abspaltbedingungen des DNA-Strangs vom festen Trägermaterial denkbar. Hierbei wird eine Mischung konzentrierter Ammoniaklösung in Wasser und Ethanol (3:1) bei 17 °C verwendet, die für 20 Stunden einwirkt. Diese Bedingungen wurden allerdings ebenfalls gleichermaßen für alle Sequenzen genutzt, so daß eine generelle Problematik für den DNA-Schaden auszuschließen ist. Eine basische Umwandlung von FaPydG zu 8-OxodG ist chemisch nur unter drastischen Bedingungen über Dehydratisierung zur intakten Base dG mit anschließender Oxidation bekannt.<sup>[161-163]</sup> Allerdings ist unter den gegebenen Bedingungen eine Oxidation von dG zu 8-OxodG mittels Luftsauerstoff nicht literaturbekannt. Somit ist dieser Ansatz als mögliche Erklärung auszuschließen. Zudem wäre sonst eine Oxidation jedes weiteren Guanins auch denkbar, dies wurde aber unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet.

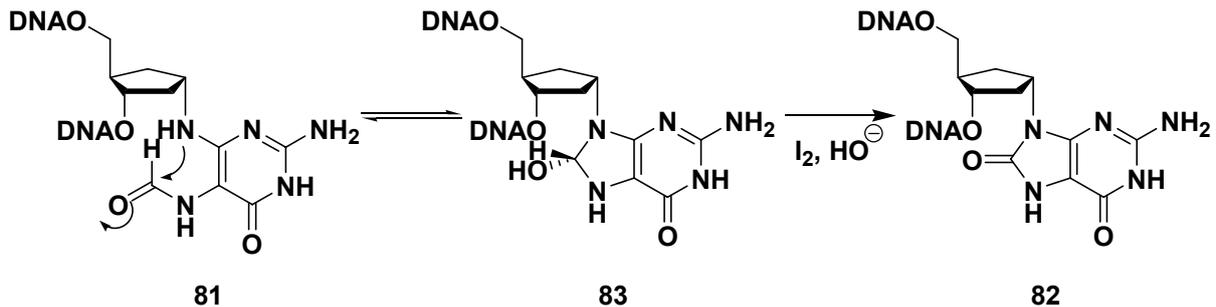
Ein anderer Ansatz geht davon aus, daß das  $\alpha$ -*c*FaPydG vermutlich in einem Gleichgewicht zwischen offenem Pyrimidinring und einer geschlossenen Form als  $\alpha$ -*c*8-Hydro,hydroxydG **83** vorliegt (Schema 3.19).



Schema 3.19: Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ -*c*FaPydG und  $\alpha$ -*c*8-Hydro,hydroxydG.

Abhängig von der Sequenz kann dieses Gleichgewicht auf Seiten der geschlossenen Form schon während der DNA-Synthese liegen. Nach jedem gekuppelten Phosphoramidit schließt sich ein Oxidationsschritt mit alkalischer Jodlösung an, bei dem es denkbar ist, daß ein solches, vermutlich instabiles Intermediat **83** direkt zum  $\alpha$ -*c*8-OxodG **82** oxidiert werden kann.

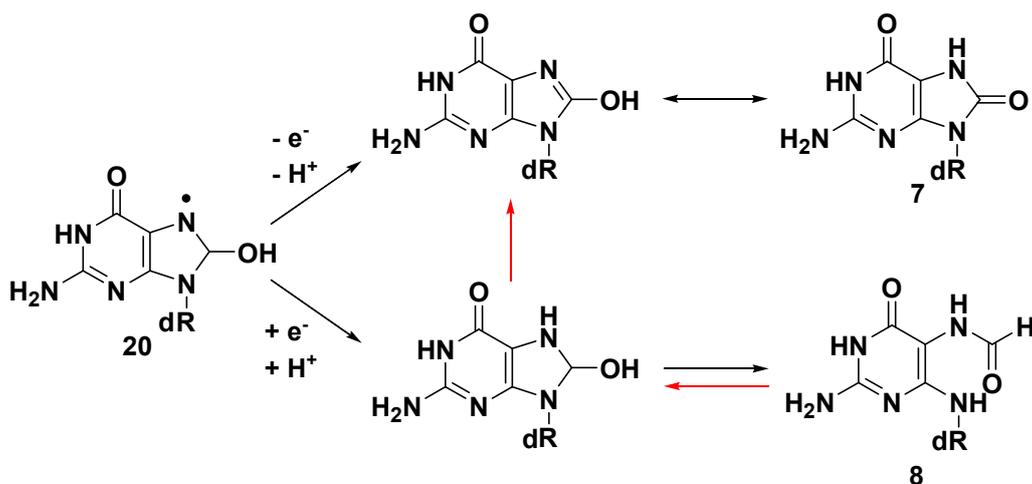
Der literaturbekannte Weg verläuft über die Bildung von Guanin, beginnend mit einer Zyklisierung und anschließender Eliminierung von Wasser. Das so gebildete dG kann dann unter oxidativen Bedingungen zu 8-OxodG weiterreagieren. Das Oxidationspotential von alkalischer Iodlösung kann vermutlich ausreichen, diese Reaktion zu ermöglichen - die Anwesenheit von Luftsauerstoff allein ist hier nicht ausreichend (Schema 3.20). In guaninreichen DNA-Sequenzen ist lediglich beobachtet worden, daß das am weitesten zum 5'-Ende befindliche dG das oxidationsempfindlichste Guanin in der Sequenz ist.<sup>[164]</sup> Dieser Sonderfall liegt in den genannten Sequenzen ebenfalls nicht vor.



Schema 3.20: Vermutlicher Reaktionsweg der Oxidation von  $\alpha$ -*c*FaPydG 81 zu  $\alpha$ -*c*8-OxodG 82.

Sollte die gemachte Annahme korrekt sein, so wäre eine denkbare Lösung die Verwendung von *tert*-Butylhydroperoxidlösung als alternativem Oxidationsmittel nach erfolgtem Einbau des  $\alpha$ -*c*FaPydG-Schadens während der DNA-Festphasensynthese.

Die erhaltenen Ergebnisse sind eventuell ein erster Hinweis auf einen neuen biologischen Weg der direkten Umwandlung von FaPydG in 8-OxodG nach erfolgter Schädigung an C8 durch ein Hydroxyradikal (Schema 3.21).



Schema 3.21: Denkbare direkte Umwandlung von FaPydG in 8-OxodG R = 2'-Desoxyribofuranose.

Bislang ist eine solche Möglichkeit nicht bekannt, lediglich die direkte Bildung der jeweiligen DNA-Schäden - wie in der Einleitung ausgeführt - ist belegt. Weitergehende Untersu-

chungen und Studien zur Bildung von  $\alpha$ - $\epsilon$ -Hydro,hydroxydG sollten sich an dieser Stelle anschließen.

Sollte der oben aufgeführte Weg tatsächlich eine bislang nicht bekannte Umwandlung von  $\alpha$ -FaPydG in  $\alpha$ -8-OxodG sein, so ergeben sich aus diesen Erkenntnissen weitere interessante Fragestellungen. Bislang gibt es keine Untersuchungen darüber, ob es  $\alpha$ -8-OxodG gibt, oder nicht. 8-OxodG kann nicht anomerisieren, da kein *N,O*-Halbacetal vorliegt, wie dies im Falle von FaPydG der Fall ist. Die Existenz eines  $\alpha$ -8-OxodG-Schadens wäre somit sehr interessant auch für dieses Projekt, da dies für zwei Dinge ein direkter Beweis wäre: Es gibt in DNA einen Anteil an  $\alpha$ -FaPydG und dieser läßt sich über die zyklische Übergangsstruktur  $\alpha$ -Hydro,hydroxydG direkt zu  $\alpha$ -8-OxodG oxidieren.

Aus den Untersuchungen mit dem  $\beta$ -cFaPydG konnten keine Hinweise darauf gewonnen werden, daß auch dieses Anomer in der Lage ist, zu zyklisieren um direkt  $\beta$ - $\epsilon$ -OxodG zu liefern, welches zudem auch wie schon erwähnt nicht mehr zum  $\alpha$ -8-OxodG anomerisieren kann.

### 3.1.4 Einflüsse des $\alpha$ -cFaPydG Schadens

#### 3.1.4.1 Thermodynamische Stabilität der Basenpaarung mit $\alpha$ -cFaPydG

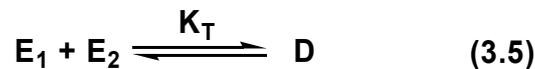
##### 3.1.4.1.1 Theorie

Mit Hilfe der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie läßt sich das thermische Denaturieren einer DNA-Doppelhelixstruktur verfolgen. Bei diesem Vorgang, der auch als Schmelzen bezeichnet wird, entfernen sich die beiden DNA-Stränge voneinander mittels thermischer Energie und dissoziieren. Während dieses Vorgangs erhöht sich die UV-Absorption  $A(T)$  gegenüber  $A^0$  der Absorption des Systems bei hinreichend niedriger Temperatur. Die Hyperchromizität  $y$  eines Systems ist die prozentuale Veränderung der Absorption  $A$  gegenüber einem Grundzustand des Systems  $A^0$ .

$$y = \frac{A(T)}{A^0} - 1 \quad (3.4)$$

Bei der Betrachtung der UV-Absorption während des Experiments sieht man einen sigmoidalen Verlauf in Abhängigkeit von der Temperatur. Diesen Verlauf kennt man auch bei einem klassischen Phasenübergang. Hierbei spricht man von *kooperativem Schmelzen*, was bedeutet, daß eine thermische Störung des DNA-Duplex sich begünstigend auf das "Aufschmel-

zen" des Doppelstrangs auswirkt. Die Vielzahl der zwischenzeitlich eingenommenen Zustände wird vereinfacht in der folgenden Betrachtung angenommen und auf lediglich zwei Zustände reduziert: Vollständig assoziiert und vollständig dissoziiert.<sup>[165, 166]</sup>



Der Schmelzpunkt eines Duplex wird mit  $T_m$  bezeichnet und ist definiert als der Punkt, an dem 50 % des Doppelstrangs D in die beiden Einzelstränge  $E_1$  und  $E_2$  dissoziiert ist. Wenn die Einzelstrangkonzentrationen identisch sind, dann berechnet sich die Gleichgewichtskonstante K aus dem oben genannten Gleichgewicht wie folgt:

$$K_T = \frac{\alpha}{(1 - \alpha)^2 (C_T/2)} \quad (3.6)$$

$C_T$  bezeichnet die Konzentration beider Einzelstränge bei vollständiger Denaturierung.  $\alpha$  gibt den Anteil an DNA wieder, die in Form eines Duplex vorliegt und ist damit definitionsgemäß 1/2 bei der Schmelztemperatur  $T_m$ . Damit reduziert sich die Gleichgewichtskonstante K zu folgender Formel:

$$K_{T_m} = \frac{4}{C_T} \quad (3.7)$$

Unter Berücksichtigung des allgemeinen Gasgesetzes und der oben aufgeführten Vereinfachung ergibt sich durch Umformung ein Zusammenhang zwischen Schmelzpunkttemperatur und Konzentration in Form einer Geradengleichung.

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{\Delta S^0 - R \ln 4}{\Delta H^0} \quad (3.8)$$

Durch *van't Hoff*-Auftragung der reziproken Schmelztemperatur  $1/T_m$  gegen den Logarithmus der Konzentration  $\ln C_T$  kann eine Gerade erstellt werden. Wenn man dies für mehrere Experimente bei verschiedenen DNA-Konzentrationen tut, so erhält man eine Gerade, mit deren Steigung und Achsenabschnitt sich thermodynamische Parameter wie Enthalpie, freie Enthalpie und Entropie bestimmen lassen (Steigung m und y-Achsenabschnitt b).

$$\Delta H^0 = \frac{R}{m} \quad \Delta S^0 = R \left( \frac{b}{m} + \ln 4 \right) \quad \Delta H^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

Die genannten Beziehungen gelten nicht für selbst-komplementäre Systeme, sogenannte DNA-Haarnadeln, sondern nur für zwei komplementäre DNA-Stränge.

### 3.1.4.1.2 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien

Die Stabilität eines DNA-Duplex kann durch DNA-Schäden gestört werden. Die damit oft einhergehende Änderung der Wasserstoffbrückeneigenschaften kann zu Fehlpaarungen und damit zu Mutationen führen.<sup>[57, 167, 168]</sup> Wie schon in Kapitel 1.2 beschrieben, können sich solche Mutationen unterschiedlich auswirken, allerdings sind in Fällen der Basenfehlpaarung immer verringerte Schmelzpunkte zu beobachten.

In jüngster Vergangenheit wurden im Arbeitskreis *Carell* von *M. Ober* und *H. Müller* Schmelzpunktstudien durchgeführt, bei denen DNA-Stränge vermessen wurden, die 8-OxodG,  $\beta$ -*c*FaPydG,  $\alpha$ dG und ungeschädigtes dG an definierter Stelle in zwei unterschiedlichen Sequenzen enthielten. Ein grundlegendes Ergebnis dieser Studien ist, daß der Carbozyklus an Stelle der natürlichen Desoxyriboseeinheit keinen nennenswerten Einfluß auf die Stabilität eines DNA-Duplex besitzt - es konnte eine geringfügig erhöhte Dissoziationsenthalpie  $-\Delta H^0$  festgestellt werden, während dieser Wert durch die ebenfalls erhöhte Schmelzentropie  $-\Delta S^0$  ausgeglichen wurde ( $dG \equiv \alpha dG$ ).

Die Frage, welchen Einfluß ein  $\alpha$ -*c*FaPydG-Schaden auf die thermodynamische Stabilität im Vergleich zum bereits ausführlich vermessenen  $\beta$ -Anomer hat, wurde mit den Sequenzen DNA 1 und DNA 2 untersucht (5'-GCGATXTAGCG-3' und 5'-TGCAGTXACAGC-3'). An der definierten Stelle **X** enthielten diese DNA-Stränge  $\alpha$ -*c*FaPydG. Diese Sequenzen sind zur besseren Vergleichbarkeit identisch zu denjenigen gewählt, die schon in der zuvor erwähnten Studie verwendet wurden.

Die synthetisierten und aufgereinigten DNA-Stränge wurden mit den komplementären Sequenzen hybridisiert. Dabei wurden die Sequenzen der Gegenstränge so gewählt, daß sich gegenüber dem  $\alpha$ -*c*FaPydG die Nukleotide dA, dC, dT bzw. dG befanden. UV-Schmelzpunkte in einem Konzentrationsbereich von  $0.3 \leq C_T/2 \leq 27 \mu\text{mol}$  wurden gemessen und die thermodynamischen Parameter  $\Delta G_{298K}^0$ ,  $\Delta H^0$  und  $\Delta S^0$  durch lineare Regression unter Anwendung der oben aufgeführten Gleichungen bestimmt (Abbildung 3.11). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

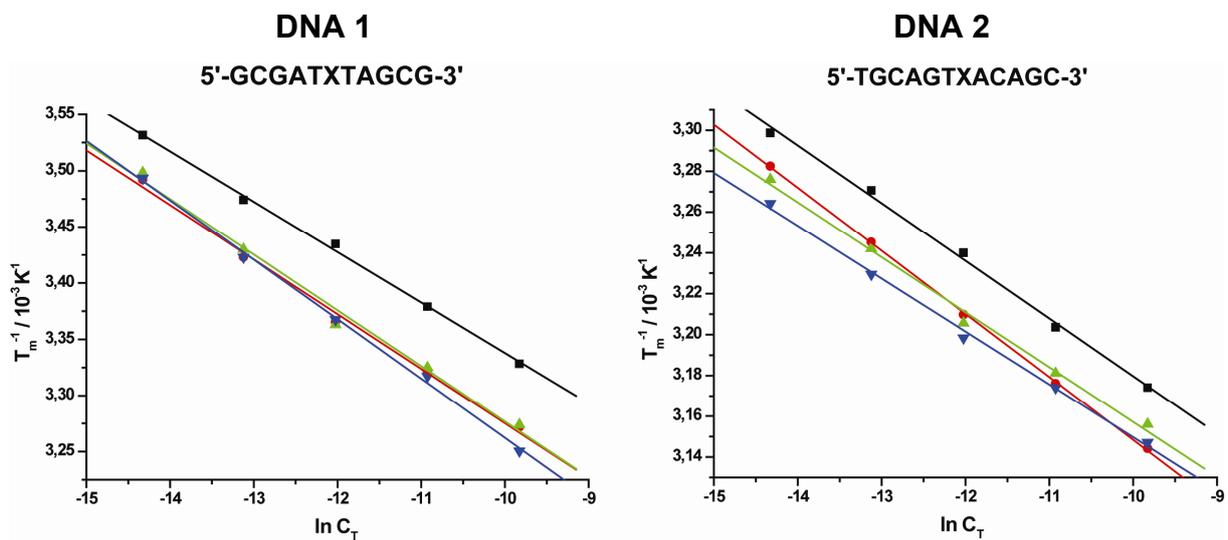


Abbildung 3.11: *van 't Hoff*-Diagramme von Doppelsträngen mit den Sequenzen 5'-GCGATXTAGCG-3' und 5'-TGCAGTXACAGC-3' und allen kanonischen Basen gegenüber von X =  $\alpha$ -cFaPydG mit ■ = im Gegenstrang A, ● = im Gegenstrang C, ▲ = im Gegenstrang G und ▼ = im Gegenstrang T.

Es ist ersichtlich, daß es im Fall von  $\alpha$ -cFaPydG keine ausgeprägte, bevorzugte Basenpaarung gibt. Alle möglichen Basenpaare sind bezüglich ihrer freien Dissoziationsenthalpien  $\Delta G^0$  in etwa gleichwertig und befinden sich energetisch sogar unterhalb eines dG:dA-*mismatches*. Im Vergleich zu den *mismatches* beim  $\beta$ -cFaPydG befinden sich im Fall des  $\alpha$ -Anomers alle Basenkombinationen im Bereich der dort ermittelten Werte für eine Fehlpaarung. Die Störung der doppelhelikalen Struktur durch den DNA-Schaden ist im  $\alpha$ -Schadensfall erwartungsgemäß höher. Mit dieser schadhaften Nukleobase ist jegliche Paarung unmöglich. Die Stabilität eines Nukleotidpaars mit dC, das im  $\beta$ -cFaPydG Fall zu erkennen ist, liegt bezüglich der freien Dissoziationsenthalpie im Bereich eines dG:dT-*mismatches* und ist um 2-4 kcal/mol gegenüber einem ungeschädigten dG:dC-Basenpaar verringert. Die zweitstärkste Wechselwirkung konnte im Fall  $\beta$ -cFaPydG mit dT gemessen werden, dessen Dissoziationsenthalpie weitere 2 kcal/mol bezüglich einem dG:dT-Paar erniedrigt war (Tabelle 3.2, nächste Seite).

Auch die Kombination der thermodynamischen Daten beider vermessener DNA-Schäden kann lediglich teilweise die Beobachtungen erklären, daß unter Verwendung eines  $\alpha/\beta$ -FaPydG-Gemisches eine Stabilisierung des FaPydG:dC-Basenpaares bevorzugt erfolgt, gefolgt von einem FaPydG:dA-*mismatch*.<sup>[45, 48, 57, 80]</sup>

Basenpaar <sup>a,c</sup> X, Y	5` GCGATXTAGCG 3` CGCTAYATCGC			5` TGCAGTXACGC 3` ACGTCAYTGCG		
	$\Delta G_{298}^0$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^{0b}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^{0b}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{298}^0$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^{0b}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^{0b}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$\alpha$ -cFaPydG: dA	-7,0	-44 ± 1.1	-125 ± 7.8	-10,4	-70 ± 1.3	-201 ± 8.0
$\alpha$ -cFaPydG: dC	-7,7	-41 ± 1.7	-111 ± 4.7	-10,7	-64 ± 1.9	-180 ± 6.5
$\alpha$ -cFaPydG: dG	-7,7	-40 ± 2.0	-109 ± 3.2	-11,1	-74 ± 1.0	-211 ± 7.2
$\alpha$ -cFaPydG: dT	-7,8	-38 ± 1.6	-100 ± 6.1	-11,4	-77 ± 1.1	-219 ± 3.7
$\beta$ -cFaPydG: dA	-7.0	-42 ± 2.0	-118 ± 7.0	-10.4	-64 ± 1.6	-181 ± 5.0
$\beta$ -cFaPydG: dC	-10.2	-51 ± 1.0	-137 ± 3.2	-13.4	-80 ± 1.8	-222 ± 5.7
$\beta$ -cFaPydG: dG	-6.9	-43 ± 2.0	-121 ± 6.8	-9.9	-61 ± 1.1	-173 ± 3.7
$\beta$ -cFaPydG: dT	-8.3	-47 ± 1.0	-129 ± 3.4	-10.8	-68 ± 1.1	-193 ± 3.7
dG: dA	-9.8	-46 ± 1.1	-122 ± 3.8	-11.5	-68 ± 1.3	-189 ± 4.1
dG: dC	-14.2	-74 ± 1.5	-199 ± 4.7	-16.0	-85 ± 2.3	-231 ± 6.9
dG: dG	-9.9	-51 ± 0.7	-137 ± 2.2	-11.5	-68 ± 1.5	-190 ± 4.9
dG: dT	-10.3	-54 ± 1.8	-146 ± 5.7	-12.4	-73 ± 0.9	-204 ± 2.7
$\alpha$ dG: dA	-9.8	-49 ± 2.2	-130 ± 7.0	-11.5	-70 ± 1.3	-196 ± 12.6
$\alpha$ dG: dC	-13.5	-70 ± 2.6	-191 ± 8.1	-15.6	-87 ± 1.7	-238 ± 11.5
$\alpha$ dG: dG	-11.7	-62 ± 2.5	-170 ± 8.7	-13.0	-86 ± 1.7	-245 ± 10.8
$\alpha$ dG: dT	-10.5	-57 ± 2.6	-157 ± 9.6	-12.9	-82 ± 2.4	-232 ± 14.6

Tabelle 3.2: Thermodynamische Daten und Vergleich zu  $\beta$ -cFaPydG, carbozyklische und natürliche Nukleotide.  
<sup>a</sup> Bedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4,  $c_{\text{dup}} = 0.3\text{-}27\mu\text{M}$ . <sup>b</sup> Der Fehler wurde berechnet mittels Standardfehlerfortpflanzung bei der linearen Regression. <sup>c</sup> Daten teilweise aus der Literatur übernommen.<sup>[63]</sup>

### 3.1.4.2 Replikation - fehlerfreie Replikation, Mutation oder Abbruch

#### 3.1.4.2.1 Theorie

Um die Replikationsgenauigkeit von DNA-Polymerasen zu messen, gibt es zwei Methoden unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady state*).<sup>[169, 170]</sup> Beide Methoden, der *kinetic assay* und der *competition assay*, liefern theoretisch dieselben Ergebnisse, allerdings ist der *kinetic assay* technisch erheblich einfacher durchzuführen. Hierbei wird der Einbau jedes Nukleotids separat gemessen und die dazugehörigen kinetischen Parameter werden bestimmt. Der Vergleich dieser kinetischen Werte läßt dann auf die Replikationsgenauigkeit der betrachteten

DNA-Polymerase schließen. Beim *competition assay* wird der Einbau von zwei dNTPs in einen DNA-Strang direkt miteinander verglichen. Die für die Polymerasestudien im Arbeitskreis *Carrell* verwendete Methode ist der *kinetic assay* und aus diesem Grund soll auch in den folgenden Betrachtungen ausschließlich diese Methode näher erläutert werden.

Die Verlängerung des *Primers* wird durch denaturierende Gelelektrophorese analysiert und anschließend mit einer geeigneten Detektionsmethode quantitativ nachgewiesen. Üblicherweise nutzt man die radioaktive  $^{32}\text{P}$ -Markierung. Die Vorteile dieser Methode sind: strukturelle Veränderungen werden vermieden, die Markierungsmethoden sind etabliert und die Empfindlichkeit ist sehr hoch. Prinzipiell sind aber auch fluoreszenzmarkierte Substrate geeignet, deren Nachweisempfindlichkeiten nur unwesentlich geringer sind, als die der radioaktiven  $^{32}\text{P}$ -Methode. Als Trennverfahren von *Primer* der Länge  $n$  ( $n$  = Anzahl der Nukleotide) und verlängertem *Primer* ( $n+1$ ) eignet sich auch die Kapillargelelektrophorese.

Als Warmstart (*running start*)- und als Kaltstart (*standing start*)-methode bezeichnet man zwei Wege der Kinetikbestimmung, die sich in den *Primer*-Templat-Konstrukten unterscheiden.



Abbildung 3.12: Aufbau der Elongationsversuche von Warmstart- und Kaltstartmethode.

In der Warmstartmethode liegt zu Beginn der Polymerisation ein Hybrid aus einem *Primer*- und einem Templatstrang, vor der das zu untersuchende Nukleotid X enthält. Der *Primer*-Strang wird so gewählt, daß dessen 3'-Ende wenige Basen vor dem Sondernukleotid X endet. Die Nukleotide vor X, die keine komplementären Basen im *Primer*-Strang haben, sollten identisch sein. Die eigentliche Verlängerungsreaktion wird gestartet, indem das komplementäre Triphosphat (im Beispiel dATP) in hohen Konzentrationen zugegeben wird und das Triphosphat, das gegenüber von X eingebaut werden soll, in variablen Konzentrationen.

Die Polymerase verlängert bis zur Position  $n-1$ , dort kann sie entweder stoppen oder ein weiteres Nukleotid einbauen. Die Wahrscheinlichkeit der Dissoziation der Polymerase vom Templat wird mit  $p_{\text{dis}}$  und die Wahrscheinlichkeit des Einbaus eines Nukleotid mit  $p_{\text{pol}}$  mit Dissoziationsgeschwindigkeit  $k_{\text{dis}}$  bzw. Inkorporationsgeschwindigkeit  $v_{\text{pol}}$  definiert:

$$p_{\text{dis}} = \frac{k_{\text{dis}}}{v_{\text{pol}} + k_{\text{dis}}} \quad (3.9)$$

$$p_{\text{pol}} = \frac{v_{\text{pol}}}{v_{\text{pol}} + k_{\text{dis}}} \quad (3.10)$$

$k_{\text{dis}}$  wird als konstant angesehen, wohingegen  $v_{\text{pol}}$  abhängig von der Nukleotidkonzentration ist. Die Dissoziation liefert *Primer* mit der Länge  $n-1$ , während nach der Elongation durch die Polymerase ein Strang mit der Länge  $n$  entsteht. Die Intensitäten dieser Signale  $I_n$  und  $I_{n-1}$  können mit den Wahrscheinlichkeiten gleichgesetzt werden:

$$\frac{I_n}{I_{n-1}} = \frac{p_{\text{pol}}}{p_{\text{dis}}} \quad (3.11)$$

Die maximale Geschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  für hohe Triphosphatkonzentrationen ergibt sich aus den genannten Zusammenhängen:

$$V_{\text{max}} = k_{\text{dis}} p_{\text{max}} \quad (3.12) \quad \text{mit } p_{\text{max}} = \left( \frac{I_n}{I_{n-1}} \right)_{\text{max}}$$

Daraus ergibt sich eine umformulierte *Michaelis-Menten*-Beziehung:

$$\frac{I_n}{I_{n-1}} = \frac{p_{\text{max}} [\text{dNTP}]}{K_m + [\text{dNTP}]} \quad (3.13)$$

Durch graphische Darstellung von  $I_n/I_{n-1}$  gegen die Nukleotidkonzentration kann man unter Verwendung der Gleichung 3.13 die Parameter  $K_m$  und  $p_{\text{max}}$  bestimmen.<sup>[170]</sup>

Die Steigung des Graphen in einer Michaelis-Menten-Auftragung bei geringen Triphosphatkonzentrationen gibt das Verhältnis von  $V_{\text{max}}/K_m$  wieder. Diese Steigung ist zudem der Proportionalitätsfaktor der Inkorporationsgeschwindigkeiten. Nach *Fersht* ist die Inkorporationsspezifität  $f_{\text{ins}}$  definiert als:<sup>[171]</sup>

$$f_{\text{ins}} = \frac{\left( \frac{p_{\text{max}}}{K_m} \right)_f}{\left( \frac{p_{\text{max}}}{K_m} \right)_r} \quad (3.14)$$

Hierbei stehen die Indizes  $f$  und  $r$  für die Geschwindigkeit des Einbaus "falscher" und "richtiger" Nukleotide.<sup>[171]</sup>

Bei der Kaltstartmethode ist die Intensität des *Primers*  $I_{n-1}$  nicht zu ermitteln, da der *Primer* bereits die Ausgangslänge  $n-1$  besitzt. Das Intensitätssignal  $I_n$  ist jedoch proportional zur aktiven Polymerase, so daß bei der Kaltstartmethode anstelle des Signals  $I_{n-1}$  des *Primers*  $n-1$  das Gesamtsignal mit der Intensität  $I_0$  über alle Peaks benutzt wird. Damit ergeben sich folgende Gleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeit der Kaltstartmethode:

$$v'_{\text{pol}} = \frac{[\text{Pr}]_0}{t} \frac{I_n}{I_0}$$

$$V'_{\text{max}} = \frac{[\text{Pr}]_0}{t} \frac{I_{n, \text{max}}}{I_0}$$

$[\text{Pr}]_0$  ist die Ausgangskonzentration des *Primers*. Die oben aufgeführten Gleichungen besitzen nur Gültigkeit für den Fall, daß  $I_n \ll I_0$  ist, da man sonst außerhalb der *steady state* Bedingungen befinden würde. Allgemein werden Systeme benutzt, bei denen nicht mehr als 20 % des eingesetzten *Primers* zum verlängerten Produkt  $n$  umgesetzt worden ist. Die *Michaelis-Menten*-Gleichung für die Kaltstartmethode sieht wie folgt aus:

$$\frac{[\text{Pr}]_0}{t} \frac{I_n}{I_0} = \frac{V'_{\text{max}} [\text{dNTP}]}{K_m + [\text{dNTP}]} \quad (3.17)$$

Wie zu erkennen ist, liefert die o.g. Gleichung für die Kaltstartmethode die gleiche Aussage wie die entsprechende Gleichung der Warmstartmethode. Ein weiterer Zusammenhang besteht noch zwischen der Enzymkonzentration und  $V'_{\text{max}}$ : diese sind proportional zueinander. Die Proportionalitätskonstante, auch katalytische Konstante  $k'_{\text{cat}}$  genannt, berechnet sich nach:

$$k'_{\text{cat}} = \frac{V'_{\text{max}}}{[\text{E}]} \quad (3.18)$$

Die Kaltstartmethode eignet sich zur Untersuchung von DNA-Schäden. Hierbei ist besonders die Inkorporationsspezifität von entscheidender Bedeutung, sie gibt Auskunft über die Mutagenität eines untersuchten Schadens.<sup>[169, 170, 172-177]</sup>

### 3.1.4.2.2 $\alpha$ -cFaPydG Replikation mit *S. cerevisiae* Pol $\eta$ , *BstDinB* und *BstPol I*

*Low fidelity*- oder *error prone*-Polymerasen der Klasse Y lesen in erhöhtem Maße über DNA-Schäden hinweg und verbessern somit die Toleranz einer Zelle gegenüber fehlerhaften Nukleotiden. Die Replikation verläuft bei einem solchen Vorgang oft fehlerfrei ab, es wird das Nukleotid eingebaut, das komplementär zum ursprünglichen und nun geschädigten Nukleotid ist. Es findet also keine Mutation statt. Die Replikationsrate ist hoch, allerdings geht dies zu Lasten der Genauigkeit. Dieser Sachverhalt gilt sowohl für die Polymerase  $\eta$  aus *Saccharomyces cerevisiae* als auch für *BstDinB*.

Bei der *high fidelity* Polymerase I aus *Geobacillus stearothermophilus* ist die Replikationsrate geringer, allerdings ist die Replikationsgenauigkeit dafür sehr hoch. Dennoch kommt es z. B. beim Replikationsprozeß über den 8-OxodG Schaden bei unterschiedlichen Polymerasen so-

wohl zum Einbau von dATP als auch zum nicht mutagenen Einbau von dCTP. Studien der Arbeitsgruppe *Carell* in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Beese* konnten im Falle der *Bst*Pol I zeigen, daß 8-OxodG mutagen und  $\beta$ -*c*FaPydG fehlerfrei repliziert werden.<sup>[33]</sup> Von diesem Vorgang konnten Kristallstrukturen in atomarer Auflösung erhalten werden. Es galt zu klären, wie diese Polymerase mit dem  $\alpha$ -*c*FaPydG verfährt. Daten der Arbeitsgruppe *Greenberg* zeigen, daß ein  $\alpha/\beta$ -FaPydG-Gemisch bei der Replikation mit *Bst*Pol I bevorzugt dCTP (nicht mutagen) inkorporiert, allerdings erkannte die Gruppe in ihren Experimenten auch eine erhöhte Insertionseffizienz von dATP (mutagen) gegenüber dem verwendeten DNA-Schaden.<sup>[80]</sup> Da die zuvor schon erwähnten Daten von *Carell et al.* einen solchen mutagenen Einbau von dATP während der Replikation von  $\beta$ -*c*FaPydG ausschließen können, war es notwendig, die  $\alpha$ -Form dieses Schadens in einen DNA-Strang einzubauen und die Replikationsstudien damit durchzuführen.

Der Replikationsprozeß des  $\alpha$ -*c*FaPydGs mit Polymerase  $\eta$  aus *S. cerevisiae*, *Bst*DinB und *Bst*Pol I zeigte unter den beim  $\beta$ -*c*FaPydG verwendeten Bedingungen keine Elongation des *Primers*. Der Schaden in seinem  $\alpha$ -Anomer ist ein Replikationsblock für alle drei untersuchten Polymerasen. Selbst nach der Verlängerung der Reaktionszeit auf zwei Stunden und Erhöhung der Enzymkonzentrationen auf bis zu 100 nM bei Pol  $\eta$ , 10 nM bei DinB und auf bis zu 100 nM bei Pol I konnten keine Elongation der *Primer* in der Kapillargelelektrophorese detektiert werden.

Da aber Kokristallisation der weiteren Elongationsschritte im Kristall nur möglich ist, wenn das Triphosphat bekannt ist, daß gegenüber  $\alpha$ -*c*FaPydG eingebaut wird, war es notwendig *Primer Extension*-Studien unter drastischen Bedingungen mit der *Bst*Pol I durchzuführen. Die Kokristallisation sollte anschließend in der Arbeitsgruppe *Beese et al.* durchgeführt werden, allerdings wurde dieses Vorhaben verhindert durch die in Kapitel 3.1.3 schon erwähnte fehlerhafte Masse des notwendigen DNA-Strangs.

Elongationsstudien mit einem  $\alpha$ -*c*FaPydG enthaltenden Templat zeigten, daß selbst bei einer Erhöhung der Enzymkonzentration auf 5, 10 bzw. 100 nM und eine Verlängerung der Reaktionszeit auf zwei Stunden keine Verlängerung des *Primers* auftrat. Um dennoch eine qualitative Aussage über die Mutagenität des  $\alpha$ -*c*FaPydG-Schadens zu erhalten, wurden Elongationsstudien unter drastischen Bedingungen durchgeführt. Die Wahl von 6.5  $\mu$ M *Bst*Pol I und 2 mM Triphosphat bei einer Reaktionszeit von eineinhalb Stunden brachte letztlich den gewünschten Erfolg (Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14). In den genannten Abbildungen ist zu erkennen, daß  $\alpha$ -*c*FaPydG ein gewisses mutagenes Potential besitzt. Das bevorzugt eingebaute Triphosphat gegenüber  $\alpha$ -*c*FaPydG ist dCTP gefolgt von einem Einbau von dATP. Die Triphosphate dGTP und dTTP werden nicht eingebaut. Ein Einbau von dATP ist hingegen beim  $\beta$ -*c*FaPydG nicht zu beobachten.

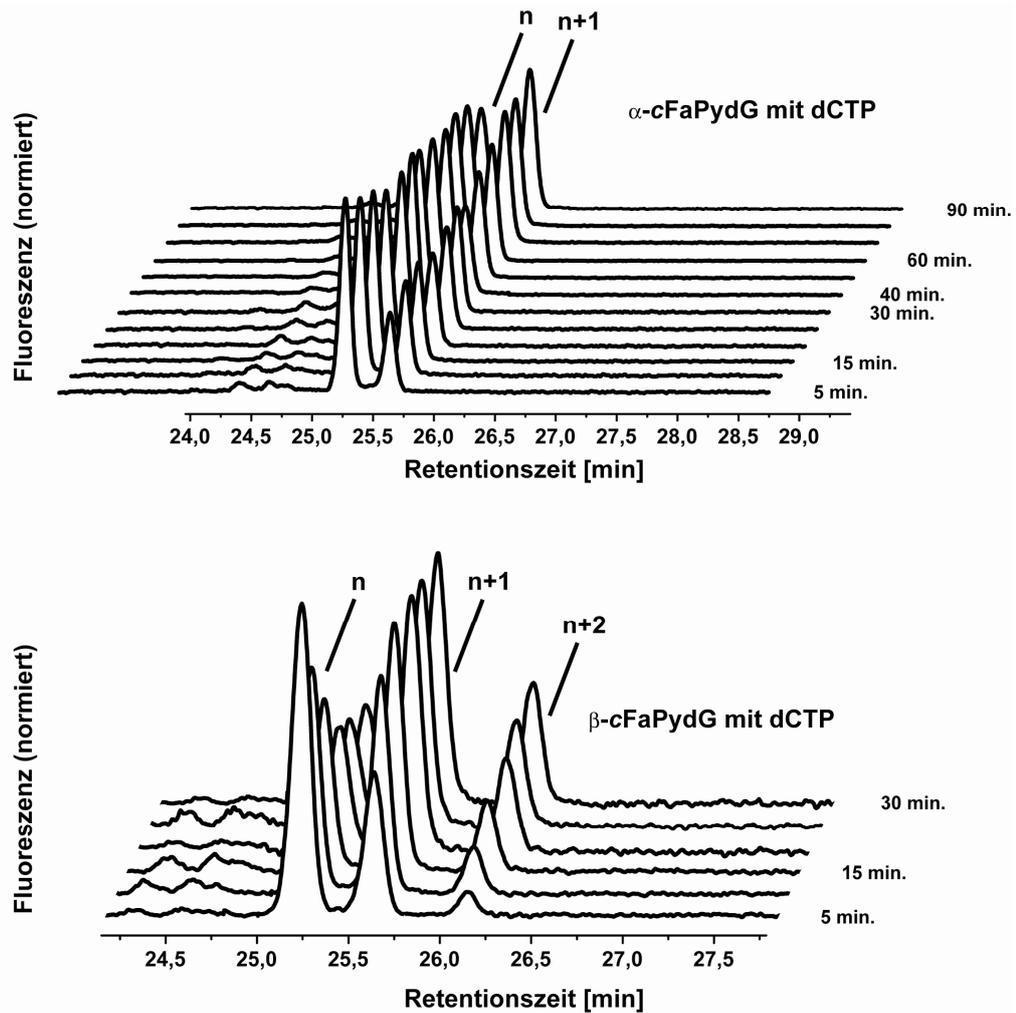


Abbildung 3.13: Replikation *in vitro* mit *Bst*Pol I - Vergleich von  $\beta$ -cFaPydG und  $\alpha$ -cFaPydG mit dCTP.

Die Bedingungen für die Elongation des *Primers* mit dem  $\beta$ -cFaPydG Templat sind mit  $0.2 \mu\text{M}$  *Primer*,  $0.4 \mu\text{M}$  Templat,  $3 \text{ nM}$  Pol I aus *Geobacillus stearothermophilus* und  $0.2 \text{ mM}$  der entsprechenden dNTPs bei Raumtemperatur sehr milde, verglichen mit denen, die bei dem  $\alpha$ -cFaPydG benötigt wurden. Man erkennt deutlich den bevorzugten Einbau von dCTP gegenüber dem  $\beta$ -Anomer des Schadens (Abbildung 3.13), wohingegen unter diesen Bedingungen nahezu kein Einbau von dATP zu beobachten war (Abbildung 3.14). Die erhaltenen Ergebnisse spiegeln die Daten aus der Kooperation von *Carell* und *Beese et al.* wieder.<sup>[62]</sup> Die Enzymkonzentration ist damit mehr als 2000-fach höher. In diesen Konzentrationsbereichen ist das Errechnen von Einbaueffizienzen und Einbaugeschwindigkeiten nicht angebracht, da es sich hierbei nicht mehr um eine katalytische Reaktion handelt. Unter diesen drastischen Bedingungen konnte ein bevorzugter Einbau von dCTP gegenüber  $\alpha$ -cFaPydG festgestellt werden, allerdings war der Einbau von dATP deutlich erhöht beim  $\alpha$ -Konformer im Vergleich zum  $\beta$ -cFaPydG.

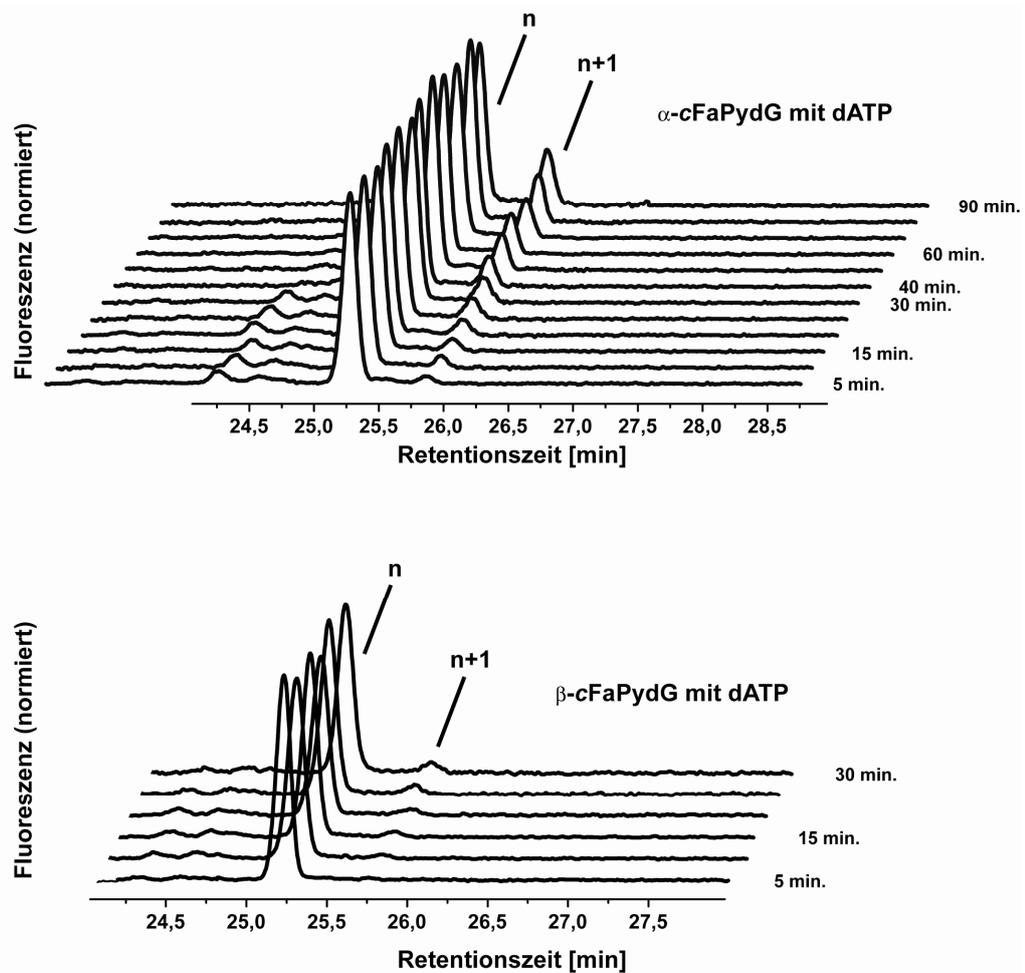


Abbildung 3.14: Replikation *in vitro* mit *Bst*Pol I - Vergleich von  $\beta$ -cFaPydG und  $\alpha$ -cFaPydG mit dATP.

Die DNA 5-Sequenz sollte zur Proteinkokristallisation benutzt werden. Dieselbe Sequenz wurde bereits mit dem  $\beta$ -cFaPydG in Kooperation mit *L. Beese* mit *Bst*Pol I kokristallisiert. Hochaufgelöste Bilder des Replikationsprozesses in der Präinsertionsstelle, der Insertionsstelle und der Postinsertionsstelle konnten auf diesem Weg erhalten werden. Durch Elongation des *Primers* im Kristall konnte festgestellt werden, daß das  $\beta$ -FaPydG nicht mutagen im Replikationsprozeß mit *Bst*Pol I ist.

Durch Röntgenstrukturanalyse sollte geklärt werden, wie das  $\alpha$ -Anomer des FaPydG-Schadens in der Polymerase repliziert wird und ob diese Form für die von *Greenberg* festgestellte Mutagenität verantwortlich ist. Die dazu notwendige Sequenz konnte nicht erfolgreich synthetisiert werden (Kapitel 3.1.3).

### 3.1.4.3 Fpg-Kokristallisation

Die bakteriellen Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylasen Fpg und MutM erkennen die DNA-Schäden 8-OxodG und FaPydG.<sup>[51, 54, 178-181]</sup> In Affinitätsmessungen konnte bereits in der Arbeitsgruppe *Carell et al.* festgestellt werden, daß das  $\alpha$ -cFaPydG hybridisiert mit einer homologen DNA-Sequenz im Doppelstrang von dem Fpg-Protein aus *Lactococcus lactis* gebunden wird. Es gibt also einen Hinweis darauf, daß der Formamidopyrimidinschaden des Guanosins auch in seiner  $\alpha$ -Form ein Substrat für das Fpg-Protein ist. Das Fpg gehört zur Gruppe der DNA-Glykosylasen/AP-Lyasen: zunächst wird die Base hydrolysiert, die somit entstehende AP-Stelle wird erkannt und dann nachfolgend mittels Eliminierung der DNA-Strang gebrochen.<sup>[70, 182, 183]</sup> Katalytisch aktiv ist hierbei das *N*-terminale Prolin (Pro<sup>1</sup>) des Enzyms; es greift den erkannten Schaden nukleophil unter Hydrolyse der Base an. Diese abasische Stelle führt durch Eliminierung am 3'-Ende zum DNA-Strangbruch. Diese Reaktionen sind mit einem carbozyklischen Substrat nicht möglich.<sup>[70, 182, 183]</sup> Im Fall des  $\beta$ -cFaPydG konnte gezeigt werden, daß der DNA-Schaden extrahelikal aus dem Doppelstrang herausgedreht und somit der Hydrolyse zugänglich gemacht wird. Gleichzeitig stabilisiert das Enzym die verbleibende Base gegenüber des Schadens innerhalb der Doppelsehelix (Abbildung 3.15).<sup>[79]</sup>

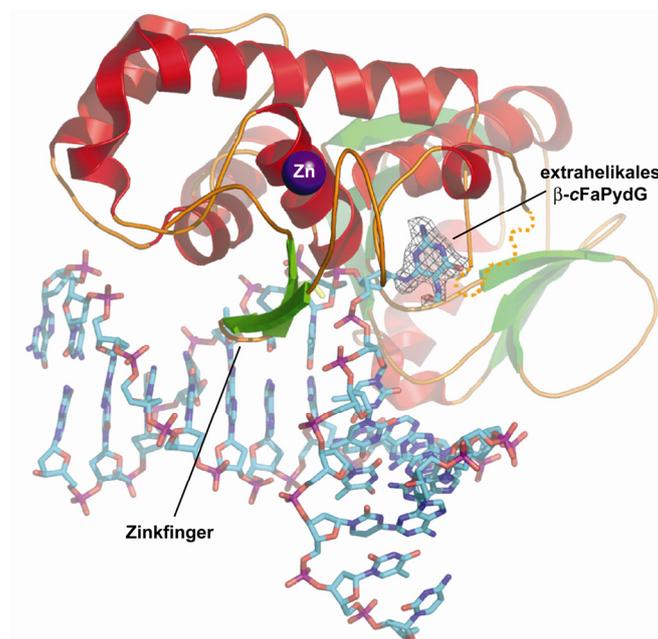


Abbildung 3.15:  $\beta$ -cFaPydG wird von *LFpg* extrahelikal aus dem Doppelstrang herausgedreht.<sup>[79]</sup>

Die  $\alpha$ -cFaPydG enthaltende Sequenz DNA 4 dient der Kokristallisation eines DNA-Doppelstrangs mit dem Fpg-Reparaturprotein. Erste Kristallisationsversuche erbrachten bisher keine Kristallbildung. Die Bedingungen der Kristallisation müssen weiter sondiert werden.

### 3.1.4.4 *In vivo* Replikation

Die zuletzt synthetisierte Sequenz DNA 6, die ebenfalls  $\alpha$ - $\epsilon$ -OxodG enthält, war für Experimente zur Replikation *in vivo* gedacht. Diese Experimente sollten einen direkten Einblick in die Vergleichbarkeit von *Primer Extension* Studien *in vitro* mit dem Geschehen *in vivo* geben. Die Sequenz mußte die folgenden Anforderungen erfüllen: Es ist zur Insertion in ein Plasmid notwendig, daß eine Erkennungssequenz vorhanden ist, an den die DNA-Sequenz in das Plasmid eingefügt werden soll (schwarz gekennzeichnet in Abbildung 3.16). Diese ist im vorliegenden Fall festgelegt, da das verwendete TOPO-Kit<sup>®</sup> zur Insertion exakt die abgebildete Sequenz benötigt. Die rot gekennzeichnete Region ist die Schadensregion, hier befindet sich, eingeschlossen zwischen jeweils zwei Basen, der DNA-Schaden, gefolgt von einer Restriktionssequenz (blau). Diese ist wichtig, da nur so die Plasmide in den Klonen geschnitten werden, in denen sich das gewünschte Plasmid befindet. Zyklisierungen des Plasmid ohne *Insert* werden so nicht detektiert. Abschließend folgt ein Stop-Codon (grün), das zudem die Möglichkeit bietet, die hergestellten Proteine zu analysieren. Sollte der DNA-Schaden eine fehlerhafte Aminosäure in dem erzeugten Protein bei der Translation verursachen, so ist eine Sequenzierung mit diesem Basentriplett möglich.

**5'- CAC CAT XTT GAA TTC TAA -3'**

Abbildung 3.16: Sequenz des DNA-Strangs für die *in vivo* Replikation.

Wird die oben genannte Sequenz in ein Plasmid eines *E. coli* Stamms CSR603 insertiert, erfolgt die Replikation *in vivo* mit dem gezielt eingebauten und an definierter Stelle befindlichen DNA-Schaden. Der genannte Stamm ist BER kompetent und inkompetent bezüglich der Nukleotidexzision (NER). Der Schaden kommt als Substrat für Reparaturenzyme wegen des Carbozyklus nicht in Frage, sofern die Schadensreparatur über die Hydrolyse der glykosidischen Bindung erfolgt.

Die ausgearbeiteten Experimente haben den weiteren Vorteil, daß enorm kleine Mengen an synthetisierter DNA notwendig sind (100 pmol/ $\mu$ L). Nach erfolgter Hybridisierung mit einem Gegenstrang wird der Doppelstrang mit dem TOPO-Kit<sup>®</sup> in das Plasmid des CSR603 *E. coli* Stamms transformiert (chemische Transformation). Nach dem Wachsen der Zellen werden diese auf Kanamycinplatten ausgestrichen und die vorhanden Klone gepickt und einer Sequenzierung unterzogen (Abbildung 3.17).

3 - Ergebnisse  $\alpha$ -cFaPydG

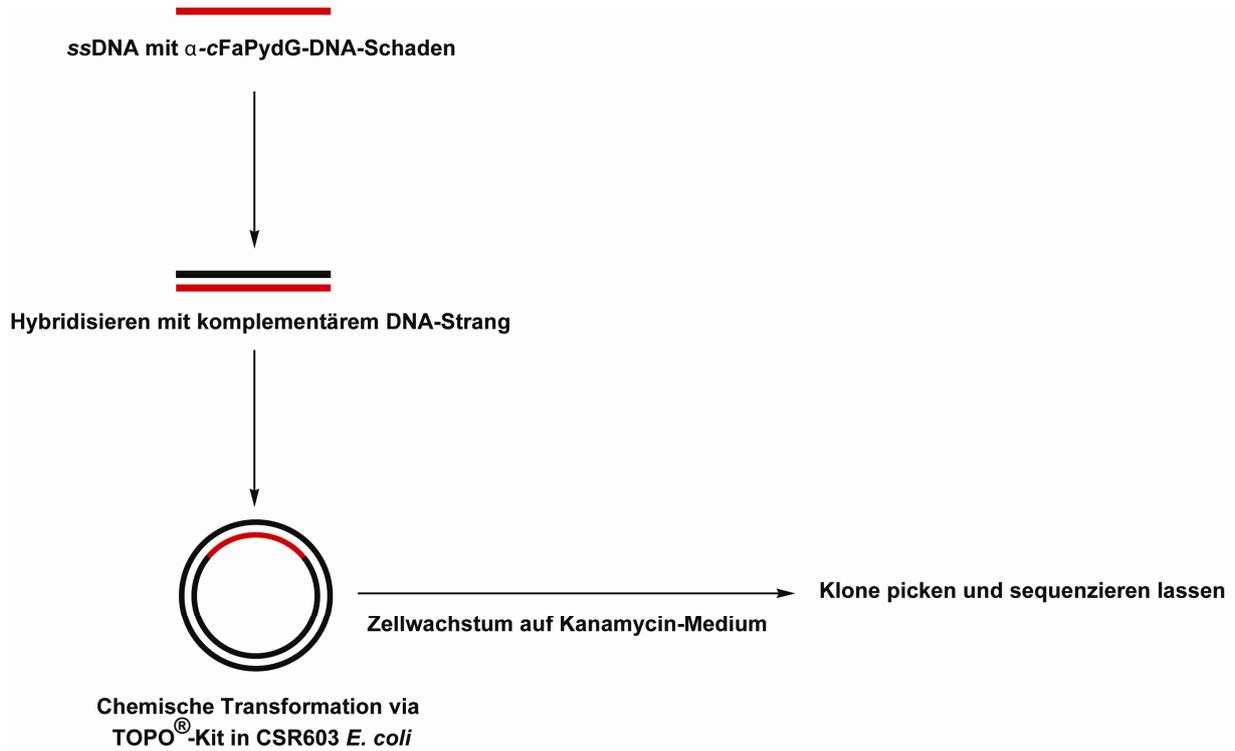


Abbildung 3.17: *In vivo* Replikation in dem NER inkompetenten und BER kompetenten *E. coli* Stamm CSR603.

**Zusammenfassung und Ausblick  $\alpha$ -*c*FaPydG: Synthese, Replikation und Reparatur**

Es konnte synthetisch das  $\alpha$ -Anomer des carbozyklischen FaPydG-DNA-Schadens in Form seines Phosphoramiditbausteins dargestellt werden. Dieser konnte über automatisierte DNA-Synthese am festen Trägermaterial in Oligonukleotide inkorporiert werden.

Es wurde eine sequenzabhängige Oxidation des  $\alpha$ -*c*FaPydG-Schadens zu  $\alpha$ - $\epsilon$ -OxodG beobachtet. Vermutet wird eine Oxidation während der DNA-Synthese, bei der es, abhängig von der Sequenz, zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen offenem  $\alpha$ -*c*FaPydG und der  $\alpha$ - $\epsilon$ -Hydro,hydroxydG-Form zu Gunsten der zyklisierten Form kommt. Aus dieser Form heraus ist eine direkte Oxidation zum detektierten 8-OxodG mit der verwendeten alkalischen Jodlösung denkbar.

Thermodynamische Studien konnten zeigen, daß das  $\alpha$ -*c*FaPydG kein bevorzugtes DNA-Basenpaar ausbildet. Alle möglichen Basenpaare zeigten eine starke Destabilisierung verglichen mit dem ungeschädigten korrekten Basenpaar.

Elongationsversuche *in vitro* mit der *Bst*Pol I, DinB und Pol  $\eta$  zeigten, daß der  $\alpha$ -Schaden ein vollständiger Block für alle genannten Polymerasen ist. Erst bei der Wahl von drastischen Reaktionsbedingungen konnte eine Verlängerung des *Primers* detektiert werden.

Diese Verlängerungen zeigten einen bevorzugten Einbau von dCTP gegenüber dem DNA-Schaden, gefolgt vom Einbau von dATP.

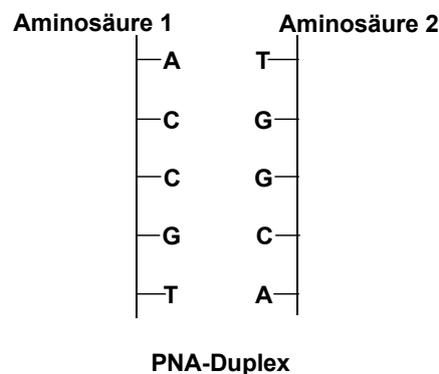
Ausgehend sind die Kokristallisation des  $\alpha$ -*c*FaPydG-Oligomers mit *LF*p<sub>g</sub>.

Nach Vermeidung der unerwünschten Oxidation während der DNA-Synthese sollen *Bst*Pol I mit dem Oligomer DNA 5 kokristallisiert und die *in vivo* Replikations Experimente mit DNA 6 zur Vergleichbarkeit mit den *in vitro* erhaltenen Daten durchgeführt werden.

## 4 Zielsetzung PNA-Templat dirigiertes Ligationsverfahren

Im zweiten Teil der Arbeit sollten tetrafunktionelle Aminosäurederivate synthetisch zugänglich gemacht werden, die in einem neuen Verfahren zur Proteinsynthese einsetzbar sind. Dieses Verfahren nennt sich Ligation, da zwischen zwei benachbarten Aminosäuren eine Peptidbindung gebildet wird und so zwei Fragmente in diesem Schritt zu einem Polypeptid legiert werden. Die Vorteile des Verfahrens gegenüber den bestehenden Methoden sollten darin liegen, daß die Ligationsreaktion durch die Verwendung eines Templats selektiv und zudem quasi intramolekular ablaufen sollte, da sich die beiden zu legierenden Termini in räumlich unmittelbarer Umgebung zueinander befinden sollten. Diese Organisation ist in einer Reaktionsmischung über komplementäre Basenpaarung möglich. Chemisch kann man hierbei aus praktischen Gründen auf das DNA-Analogon PNA (*peptide nucleic acid*) zurückgreifen. Die Bedingungen während der Synthese und Abspaltung sind bei PNA und Peptidsynthese am festen Trägermaterial identisch.

Um das vorgestellte Konzept zu verwirklichen sind zwei benachbarte Aminosäuren notwendig, die beide eine funktionelle Seitenkette haben. Über diese findet die Verknüpfung zum PNA-Templat statt. Das Prinzip ist in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1: Prinzip der PNA-Templat dirigierte Ligation.**

Die erwähnte Verknüpfung der Aminosäure zur PNA muß selektiv spaltbar sein und unter den verwendeten Bedingungen der Synthese und der Abspaltung stabil bleiben. Hierbei sind Allyl- und Silyl-Ether und Ester mit Einschränkungen denkbar. Diese besitzen prinzipiell eine hinreichend große Stabilität gegenüber Säuren und Basen und sind zudem orthogonal spaltbar.

Es war Ziel dieses Projektes ein Paar Aminosäurederivate zu synthetisieren, die in einer Ligationsreaktion geeignet einsetzbar sind.

## 5 Ergebnisse PNA-Templat dirigiertes Ligationsverfahren

### 5.1 Aminosäurederivate für ein PNA-Templat dirigiertes Ligationsverfahren

#### 5.1.1 Pd(0)-spaltbarer Linker

Wie schon in der Einleitung (Kapitel 1.9.4) beschrieben, ist das Konzept der PNA-Templat dirigierten Ligation (TDPS) eine Erweiterung bestehender Ligationstechniken. Mit der Wahl eines photolabilen *Linkers* als Verbindung zwischen PNA und Peptid konnten innerhalb der Diplomarbeit und auch zu Beginn dieser Arbeit keine synthetischen Erfolge erhalten werden. Aus diesem Grund wurde über Alternativen nachgedacht, die die Orthogonalität der anderen funktionellen Gruppen nicht beeinträchtigt. Als Möglichkeit wurde eine Pd(0)-spaltbare *Linker*-Funktion zwischen PNA und Aminosäure angesehen und die Herstellung der sich damit ergebenden Zielmoleküle in Angriff genommen. Es sei an dieser Stelle betont, daß die Synthese der Zielverbindungen eine komplexe Aufgabe ist, da diese vier orthogonale Funktionalitäten beinhalten müssen: Neben drei Termini (zwei Termini der Aminosäure und einem zusätzlichen Terminus zur Verbindung von Aminosäure und PNA) ist die eigentliche *Linker*-Funktion die Vierte innerhalb eines solchen Zielmoleküls (Abbildung 5.1).

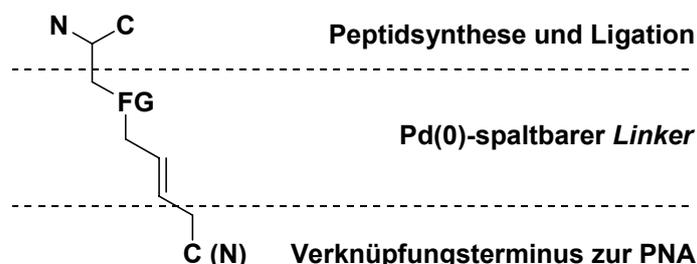
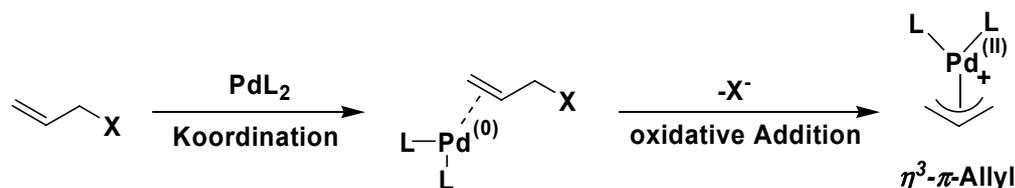


Abbildung 5.1: Aufbau der Zielmoleküle mit vier unterschiedlichen Orthogonalitäten.

Diese Position erlaubt in einem Pd(0)-katalysierten Schritt die Spaltung unter Erhalt der ursprünglichen Seitenkette der Aminosäure und damit ein gleichzeitiges Abtrennen des dritten Terminus - der Verbindung zum PNA-Templat. Dieser Zyklus verläuft nach der *Tsuji-Trost*-Allylierung und beginnt mit der Erzeugung einer aktiven Pd(0)-Spezies *in situ*. In Schema 5.1 ist die Spaltung einer Allylverbindung dargestellt: Der erste Schritt der Spaltung ist die Koordination der Pd(0)-Spezies an die Doppelbindung der Allylkomponente unter Ausbildung eines  $\eta^2$ - $\pi$ -Komplexes. Eine oxidative Addition, bei der die Abgangsgruppe abgespalten wird, ergibt einen  $\eta^3$ - $\pi$ -Allyl-Komplex (Schema 5.1). Im betrachteten Fall ist die Abgangs-

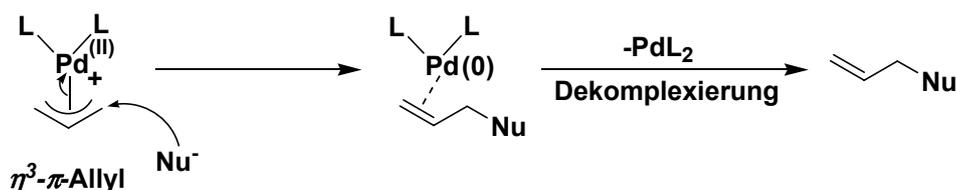
gruppe X die Seitenkette der Aminosäure. Dieser Schritt wird auch als "Ionisierung" bezeichnet:



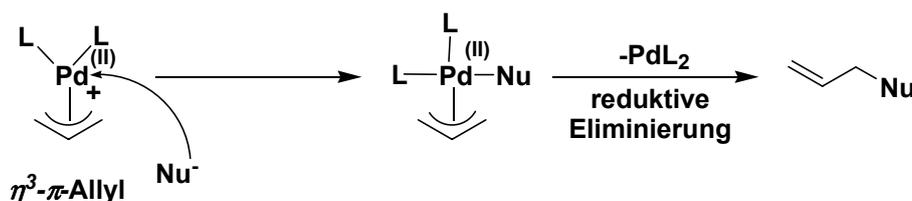
Schema 5.1: Mechanismus der Pd(0)-Spaltung von Allylverbindungen, Teil 1 [L = Ligand].

Je nach Stärke des Nucleophils, verläuft die Reaktion nun über zwei unterschiedliche Wege. Schwache Nucleophile, deren konjugierte Säure einen  $pK_s$  unter 25 besitzen, reagieren direkt mit dem Allylteil, wohingegen harte Nucleophile zuerst an das Metallzentrum addieren und nach einer reduktiven Eliminierung zum allylierten Nebenprodukt führen (Schema 5.2). Im vorliegenden Fall enthält diese Allylspezies den zusätzlichen Terminus zur Anbindung des PNA-Templats.

#### weiche Nucleophile:



#### harte Nucleophile:



Schema 5.2: Mechanismus der Pd(0)-Spaltung von Allylverbindungen, Teil 2 [L = Ligand].

### 5.1.1.1 Retrosynthese eines Pd(0)-spaltbaren Linkers

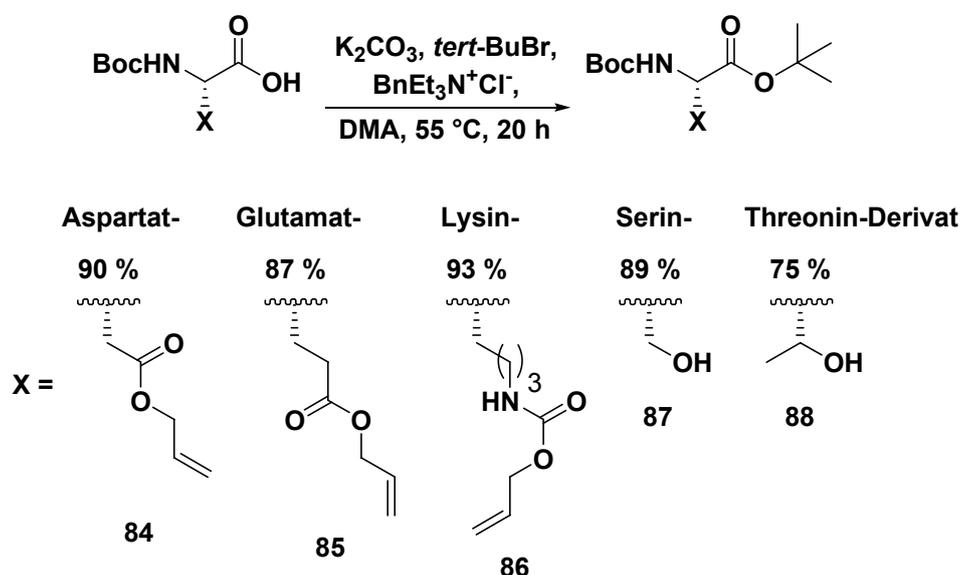
Zur Darstellung der Zielverbindungen im Schema 5.3 sind die Boc-geschützten Aminosäureverbindungen von Serin, Threonin, Aspartat, Glutamat und Lysin käufliche Ausgangsverbindungen. Schlüsselschritte der Synthesen sind reduktiv aufgearbeitete Ozonolysen mit sich anschließenden *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktionen (*HWE*). Die Zwischenverbindungen



### 5.1.1.2 Synthese eines Pd(0)-spaltbaren *Linkers*

#### 5.1.1.2.1 Darstellung der *tert*-Butylester und Allylethersynthese

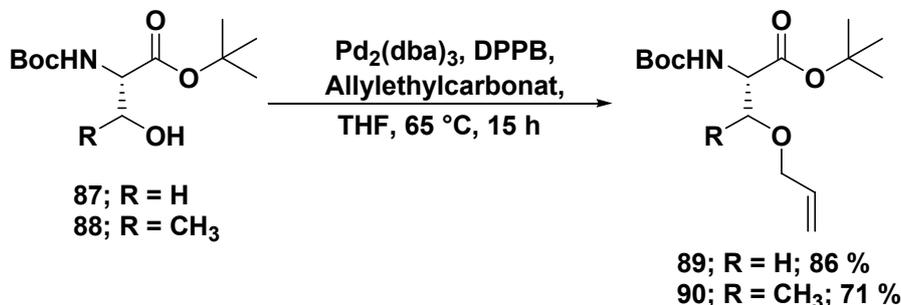
Die Synthesestrategie beginnt mit der geeigneten Wahl der Schutzgruppen für die Amino- bzw. der Carboxylfunktion der Aminosäuren. Ausgangsmaterialien waren die Boc-geschützten Aminosäuren. Die Carbonsäure der Aminosäuren sollte mit einem ebenfalls säurelabilen *tert*-Butylester geschützt werden. Versuche, mit aktivierenden Reagenzien die Säuregruppe mit *tert*-Butanol zum gewünschten Ester umzusetzen, gelangen weder mit BOP<sup>[184]</sup>, PyBOP<sup>[185]</sup> noch mit EEDQ<sup>[186]</sup>. Bei allen Versuchen - wobei Äquivalente, Reaktionszeit und Temperatur variiert wurden - konnten lediglich Produktgemische erhalten werden. Das gewünschte Produkt wurde stets nur in sehr geringen Mengen gebildet. Letztlich erfolgreich war eine Vorschrift von *Chevallet et al.* mit *tert*-Butylbromid, Kaliumcarbonat und Benzyltriethylammoniumchlorid in *N,N*-Dimethylacetamid, die gewünschten *tert*-Butylester **84** bis **88** konnten in guten Ausbeuten hergestellt werden. (Schema 5.4). Sowohl bei Boc-geschützten Aminosäuren mit offener Seitenkettenfunktion, als auch im Fall der schon allyl-geschützten Boc-Aminosäurederivate gelang diese Reaktion.



Schema 5.4: Veresterung der Carbonsäurefunktion zu den *tert*-Butylestern **84**, **85**, **86**, **87** bzw. **88**.

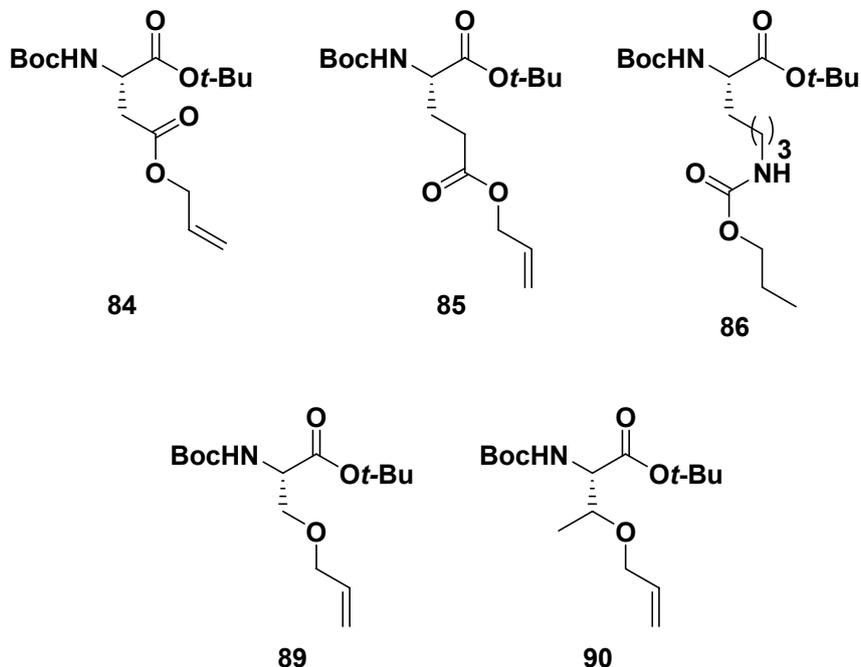
Anschließend war es notwendig, die Verbindungen **84** bis **88** an den jeweiligen funktionellen Gruppen der Seitenketten mit einer allylischen Schutzgruppe zu versehen. Die klassische Methode zur Allyl-Schätzung mit Allylbromid und Natriumhydrid<sup>[187, 188]</sup> führte allerdings zu mehreren Produkten. Auch eine vorgezogene *tert*-Butylestersynthese mit einer sich anschließenden Allyl-Schätzung brachte keinen Erfolg.

Letztlich erfolgreich wurde eine Pd(0)-katalysierte Allylierung nach *Lakhmire et al.* durchgeführt, bei der Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium, 1,4-Bis(diphenylphosphino)butan und Allylethylcarbonat in THF zum Einsatz kommen.<sup>[189]</sup> Diese Reaktionsführung lieferte die vollständig geschützten Aminosäuren **89** und **90** in guten Ausbeuten (Schema 5.5).



Schema 5.5: Allylethersynthese zum Serin- und Threonin-Derivat **89** bzw. **90**.

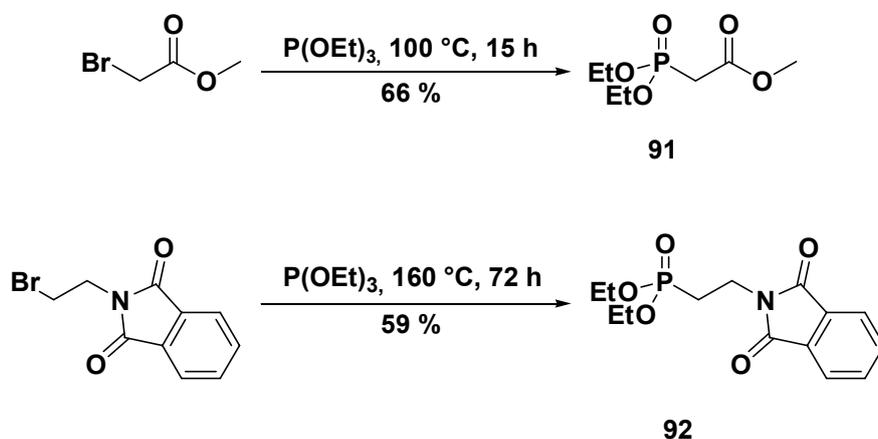
An dieser Stelle sei kurz zusammengefaßt, daß mit den beiden vorangestellten erfolgreichen Reaktionen fünf der potentiell sieben, für eine Ligation benötigten Aminosäuren als vollständig geschützte Verbindungen synthetisch zugänglich gemacht werden konnte: Es handelt sich hierbei um die Boc-geschützten Aminosäuren **84**, **85**, **86**, **89** und **90**, deren Seitenketten jeweils allyl- und deren C-Termini jeweils als *tert*-Butylester geschützt sind (Schema 5.6).



Schema 5.6: Edukte für die Ozonolyse mit anschließender *Horner-Wadsworth-Emmons* (HWE)-Reaktion.

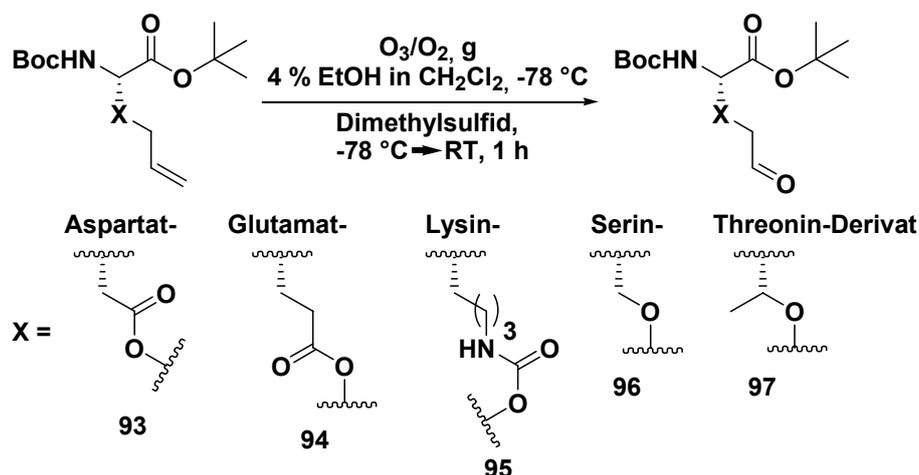
### 5.1.1.2.2 Michaelis-Arbuzov-Reaktionen zur Synthese der Phosphonate **91** und **92**, Ozonolysen und HWE-Reaktionen

Der Schlüsselschritt der weiteren Synthesestrategie war eine Ozonolyse mit reduktiver Aufarbeitung und einer sich daran anschließenden *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion (*HWE*). Die dazu benötigten Phosphonate wurden mittels der *Michaelis-Arbuzov*-Reaktion hergestellt. Die Phosphonate **91** und **92** dienten also, wie aus der Retrosynthese hervorgeht, der Einführung des zusätzlichen Terminus zur Anbindung an das PNA-Templat und gleichzeitig der Bildung des Pd(0)-spaltbaren *Linkers*. Die Synthese erfolgte nach leicht modifizierten Vorschriften.<sup>[190-192]</sup> Es konnten aus den käuflich erhältlichen Edukten Bromessigsäuremethylester bzw. 2-Bromethyl-phthalimid mit Triethylphosphit die gewünschten Phosphonate **91** bzw. **92** in Ausbeuten von 66 % bzw. 59 % erhalten werden (Schema 5.7).



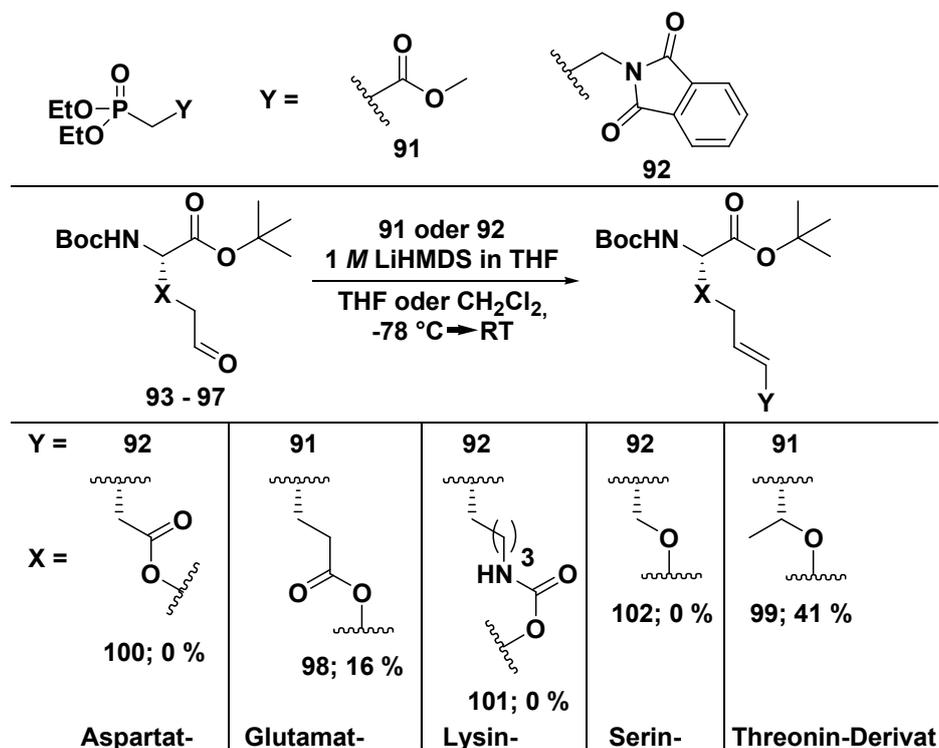
Schema 5.7: *Michaelis-Arbuzov*-Reaktionen zur Synthese der Phosphonate **91** und **92**.

Die entsprechenden Aldehyde als Reaktionspartner **93-97** wurden mittels Ozonolyse und anschließender Aufarbeitung mit Dimethylsulfid hergestellt. Bei der Synthese ähnlicher Verbindungen wurden in einer Ethanol/Dichlormethanmischung bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  der entsprechenden Alkene eine Ozon/Sauerstoff-Mischung eingeleitet, bis eine Blaufärbung der Reaktionslösung erfolgte. Die reduktive Aufarbeitung mit Dimethylsulfid bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  lieferte die Aldehyde **93**, **94**, **95**, **96** und **97** in Ausbeuten, die nicht bestimmt wurden (Schema 5.8). Die Reinigung an Kieselgel erwies sich ebenso wie die Lagerung sowohl bei Raumtemperatur als auch bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  als ungünstig, da Zersetzung der teilweise extrem instabilen Verbindungen eintrat. Es konnte dennoch in allen Fällen eine massenspektrometrische Charakterisierung erfolgen, die immer das gesuchte Molekulargewicht des Aldehyds zeigte. Lediglich beim Aspartat- und dem Glutamat-Derivat konnte zusätzlich erfolgreich eine NMR-Analyse durchgeführt werden. In der Folge wurden die synthetisierten Aldehyde immer direkt ohne weitere Reinigung oder Charakterisierung in die *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion (*HWE*) eingesetzt.



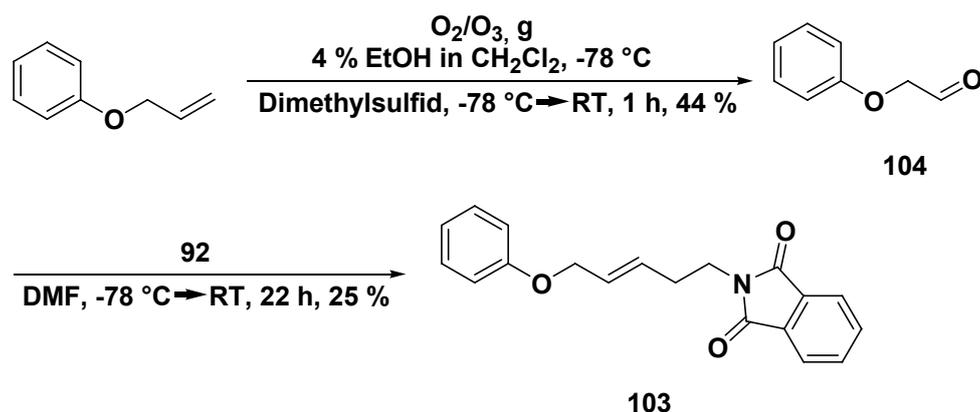
Schema 5.8: Ozonolysen aller Aminosäure-Verbindungen mit reduktiver Aufarbeitung.

Die *HWE*-Reaktion wurde in zwei Teilschritten vorgenommen: 1. Bildung der Phosphorylide und 2. Kondensation dieser Verbindungen mit den entsprechenden Aldehyden (Schema 5.9). Ähnliche Reaktionen von Aminosäuren und Phosphoryliden, bei denen Lithiumhexamethyldisilazid (LiHMDS) als Base eingesetzt wurde, verliefen ohne Racemisierung am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom.<sup>[193-195]</sup> Aus diesem Grund fiel auch die Wahl der Base in diesen Fällen auf das sterisch sehr anspruchsvolle LiHMDS. Die bei 0 °C hergestellten Phosphorylide aus den Phosponaten **91** und **92** wurden bei -78 °C zu den betreffenden Aldehyden **93**, **94**, **95**, **96** und **97** gegeben und die Reaktionsmischung nach drei Stunden bei -78 °C durch Entfernen der Kühlung auf Raumtemperatur gebracht.



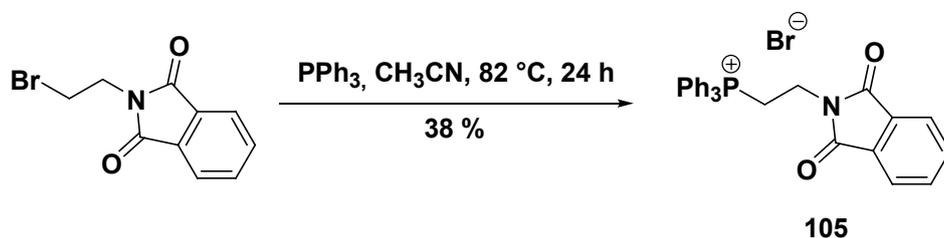
Schema 5.9: *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktionen der Aldehyde **93**, **94**, **95**, **96** und **97**.

Auf diesem Weg war es lediglich möglich, in moderaten Ausbeuten, die entsprechenden Methylester-Derivate **98** und **99** herzustellen. Durch Variation sämtlicher Reaktionsparameter wie der Reaktionszeit, der Reaktionstemperatur, der Äquivalentverteilung von Edukt und Reaktanden, aber auch der Reihenfolge der Zugabe der Reaktionspartner konnte keine Darstellung der Phthalimid-Derivate **100**, **101** und **102** erfolgen. Um diese Verbindungen dennoch darstellbar zu machen, wurde zunächst ein Modellsystem untersucht. Die in Schema 5.10 dargestellte Reaktion verlief in 25 %-iger Ausbeute in DMF zum gewünschten Produkt **103**. Der zwischenzeitlich gebildete Aldehyd **104** konnte ebenfalls isoliert und charakterisiert werden.



Schema 5.10: Allylphenylether als Modellsystem für die HWE-Reaktion mit dem Phthalimidphosphonat **92**.

Diese Modellreaktion zeigt, daß nicht das betreffende Phosphorylid sondern andere Reaktionsparameter oder Reaktanden die Reaktion verhindert. Folglich wurden die analogen Bedingungen auch auf die betreffenden Aminosäureverbindungen übertragen, allerdings ohne Erfolg. Eine denkbare Alternative zur beschriebenen *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion ist die entsprechende *Wittig*-Reaktion. Diese Reaktion wurde auch durchgeführt und dazu zunächst das analoge *Wittig*-reagenz **105** synthetisiert (Schema 5.11).



Schema 5.11: Darstellung des Wittig-Reagenzes **105**.

Die sich anschließende *Wittig*-Reaktion lieferte allerdings auch unter diversen Reaktionsbedingungen und mit einer großen Varianz an Lösungsmitteln und Reaktionstemperaturen nicht den gewünschten Erfolg.

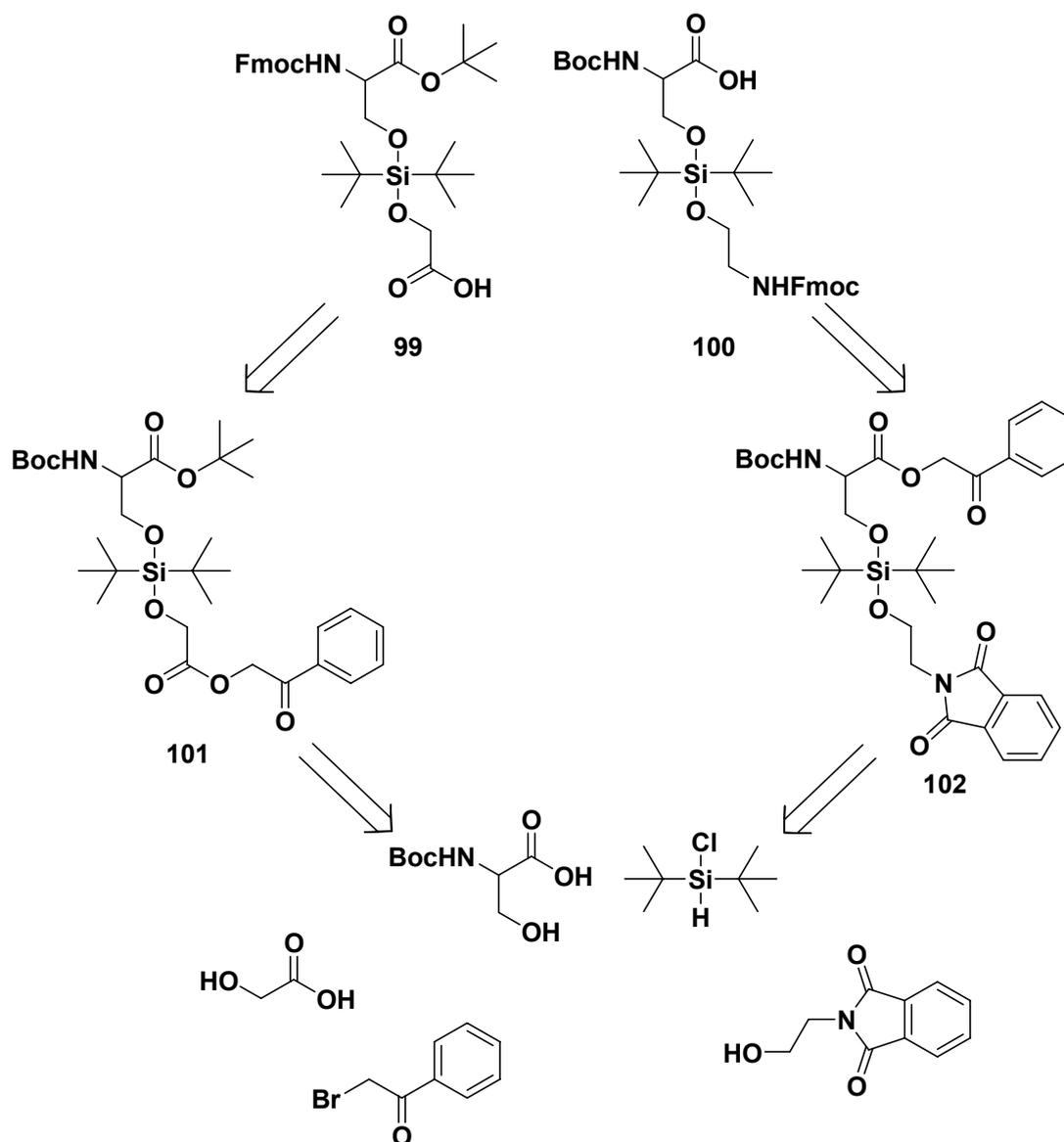
Zahlreiche Versuche mittels Olefinmetathesereaktionen unter Verwendung der *Grubbs*-Katalysatoren der 1. und 2. Generation führten ebenfalls nicht zu den gewünschten Zielverbindungen. Da der Schlüsselschritt nur für eines der beiden notwendigen Synthesziele erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde an dieser Stelle die Synthese eines Pd(0)-spaltbaren *Linker*-Moleküls aufgegeben und ein anderer Ansatz zur Synthese eines Silyl-*Linkers* verfolgt.

### 5.1.2 Fluorid-spaltbarer Silyl-*Linker*

Der letzte Ansatz, zwei Bausteine für eine Templat-organisierte Peptidligation herzustellen, ging von einer weiteren orthogonalen Verbindung zwischen Peptid und PNA-Strang aus. Zu den bestehenden säure- und basenlabilen Schutzgruppen der Aminosäuren orthogonal sind auch verschiedene Silylether. Sofern diese Brücken aus möglichst drei Alkylresten am Silizium und nur einem Silylether zur Seitenkette der Aminosäure bestehen, ist eine große Stabilität gegenüber Säuren und Basen und gleichzeitig eine gute Spaltbarkeit durch Fluoridionen gegeben. Nimmt die Zahl der Alkylsubstituenten ab und die Zahl der Silylether zu, so steigt die Säurelabilität. Das Festphasen-Syntheseprodukt wird sauer vom Trägermaterial abgespalten, dabei darf aber unter keinen Umständen bereits die PNA vom Peptid getrennt werden. Ein zweiter Faktor, der die Säurestabilität von Silyl-*Linkern* beeinflusst ist die Größe der Alkylreste: *tert*-Butyl > *iso*-Pr > Ethyl.

#### 5.1.2.1 Retrosynthese I eines Fluorid-spaltbaren Silyl-*Linkers*

Die Zielmoleküle **106** und **107** aus Schema 5.12 leiten sich retrosynthetisch von den Verbindungen **108** und **109** ab. Die hierzu durchzuführenden Reaktionen dienen letztlich der korrekten Anordnung der notwendigen Schutzgruppen für die Festphasensynthese. Diese Zwischenprodukte sollten aus den kommerziellen Verbindungen Di-*tert*-butylchlorsilan, Boc-Serin, 2-Hydroxyethyl-phthalimid, Bromacetophenon und Glycolsäure (Hydroxyessigsäure) zugänglich sein.

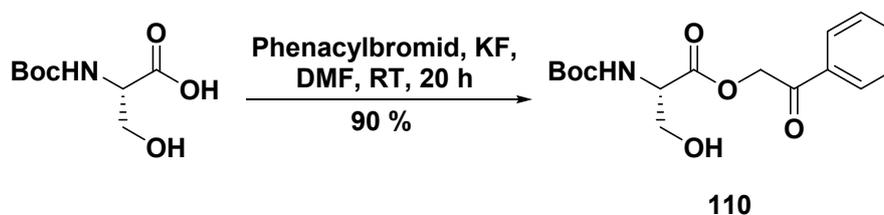


Schema 5.12: Retrosynthese I ausgehend von Di-*tert*-butylchlorsilan.

### 5.1.2.2 Synthese I eines Fluorid-spaltbaren Silyl-Linkers

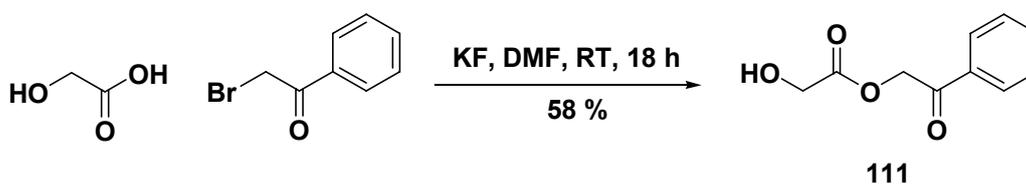
#### 5.1.2.2.1 Darstellung der Serin-Derivate und des Glykolsäurephenacylesters zur Kupplung mit dem Silyl-Linker

Um die Aminosäuren mit den Di-*tert*-butylchlorsilan zu derivatisieren, mußten diese ausgehend vom Edukt Boc-Serin C-terminal geschützt werden. Der erste Schritt ist eine Phenacylesterschutzung, die analog einer Vorschrift von *Clark et al.* aus dem Jahre 1977 mit Phenacylbromid und Kaliumfluorid in DMF erfolgte und in sehr guten Ausbeuten den Ester **110** lieferte (Schema 5.13).<sup>[196]</sup>



Schema 5.13: Synthese des Boc-Serin(OH)-Phenacylesters 110.

Die Synthese des Boc-Serin-*tert*-Butylesters **87** wurde bereits in Unterkapitel 5.1.1.2.1 beschrieben. Die Synthese des Alkohols **111** zur Kupplung an das Di-*tert*-Butylchlorsilan wurde analog der bei Verbindung **110** genutzten Vorschrift hergestellt und lieferte aus Bromacetophenon, Kaliumfluorid und Hydroxyessigsäure in DMF das Produkt **111**.<sup>[196]</sup>

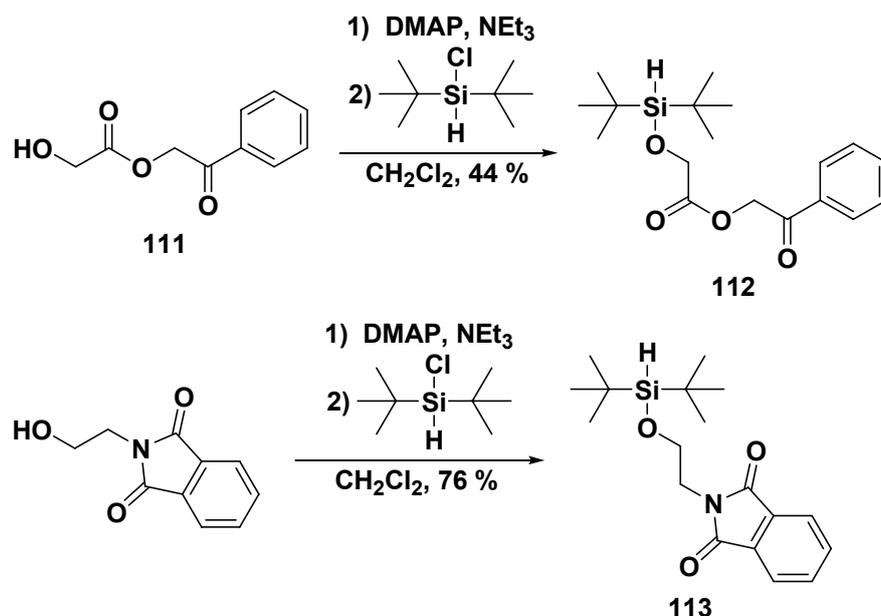


Schema 5.14: Darstellung des Hydroxyessigsäurephenacyl ester 111 als Edukt der Substitutionsreaktion.

### 5.1.2.2.2 Syntheserversuche der Disilyl etherverbindungen 108 und 109

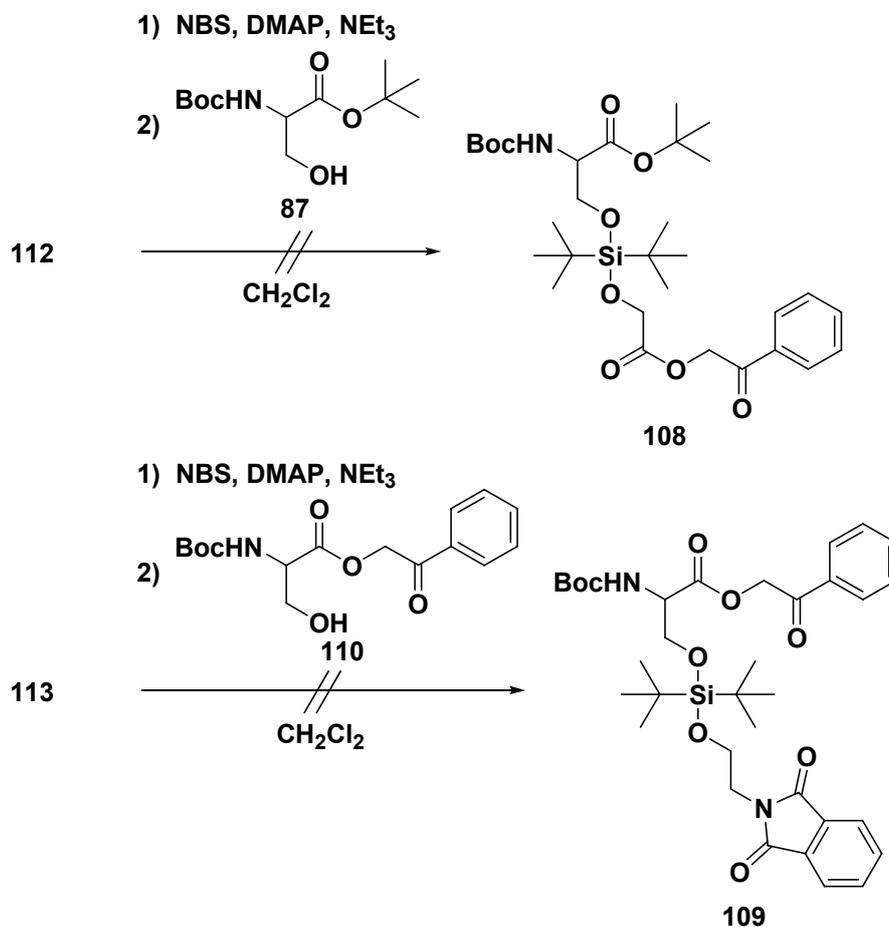
Die dargestellten Verbindungen **87**, **110** und **111** sowie das käuflich erwerbliche 2-Hydroxyethyl-phthalimid sollten nun in einer zweistufigen Reaktion mit dem Di-*tert*-butylchlorsilan umgesetzt werden. Hierbei diene eine Vorschrift von *Petit et al.*<sup>[197]</sup> und *Dibiasi et al.*<sup>[198]</sup> als Richtlinie. Im ersten Teil der Reaktion wird der erste Silyl ether unter Substitution des Chlorids gebildet. Diese Verbindung wurde zur Kontrolle isoliert und charakterisiert. Die sich anschließende zweite Substitution wird erst durch Umsetzung des Silans mit NBS ermöglicht, wodurch das gebildete Bromsilan im zweiten Teil dieser Reaktion den Disilyl ether bilden kann.

Aus dem Hydroxyessigsäurephenacyl ester **111** wurde mit DMAP und Triethylamin in Dichlormethan in einer  $S_N2$ -Reaktion das Zwischenprodukt **112** synthetisiert. Ebenso gelang die Herstellung der Verbindung **113** durch Substitution mit 2-Hydroxyethyl-phthalimid unter den identischen Bedingungen in guten Ausbeuten von 76 %.

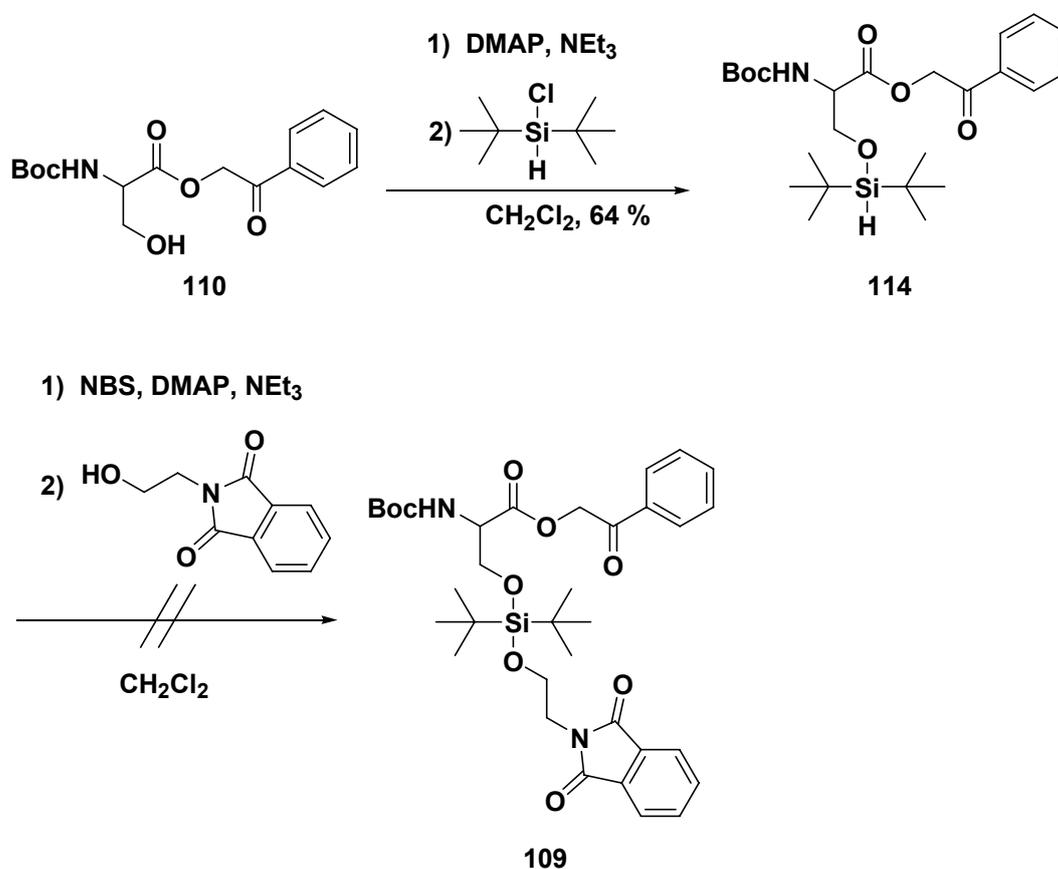


Schema 5.15: Darstellung der monosubstituierten Silane 112 und 113.

Die sich anschließende Reaktion dieser Verbindungen mit NBS, DMAP, Triethylamin und Boc-Serin-*tert*-Butylester **87** sowie dem Boc-Serin-Phenacylester **110** lieferte allerdings nicht die erwarteten Produkte **108** und **109**.

Schema 5.16: Versuch der Darstellung der Di-*tert*-butyldisilylether 108 und 109.

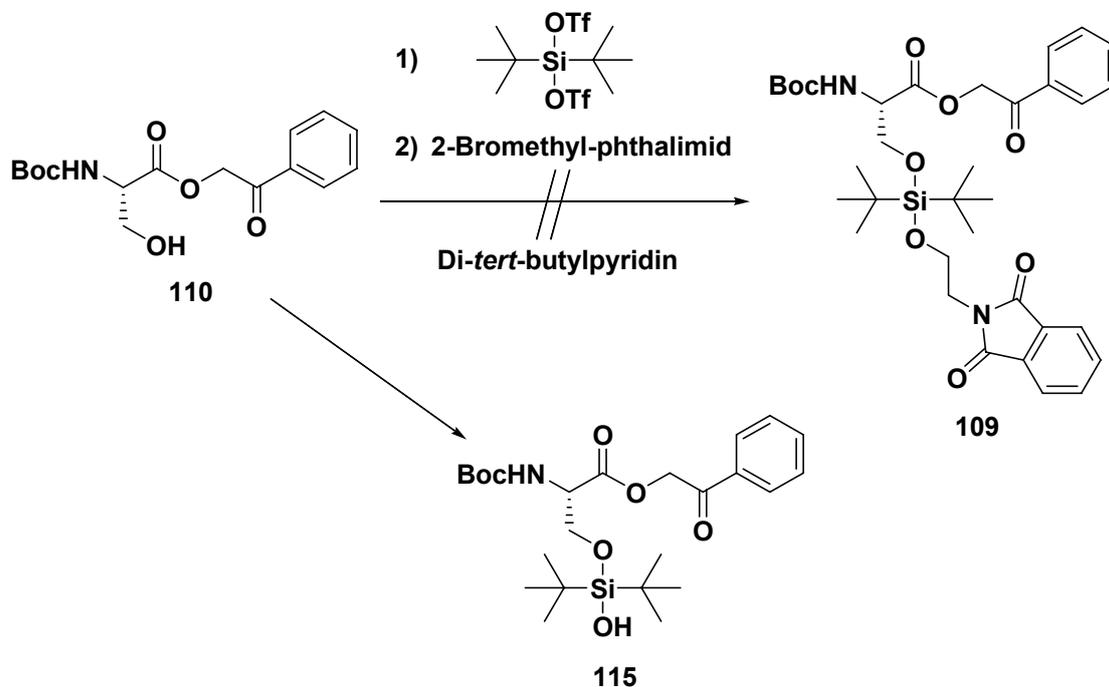
Da beide Zwischenverbindungen der zuletzt genannten Reaktionen isoliert und charakterisiert werden konnten, läßt sich das Problem dieser Reaktion auf zwei mögliche Gründe eingrenzen: Zum Einen wäre es denkbar, daß die Reaktion des Silans mit NBS nicht abläuft und damit eine zweite Substitution prinzipiell nicht möglich war. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, daß zwar die Bromierung gelang, aber aus sterischen Gründen die zweite Substitution mit den jeweiligen Aminosäure-Derivaten nicht erfolgte. Um das Problem weiter einzugrenzen, wurde die Reihenfolge der Reaktanden in den Reaktionen umgedreht: Die erste Substitution erfolgte mit dem sterisch anspruchsvolleren Serinderivat **110** zur Verbindung **114** und anschließend die zweite Substitution mit dem 2-Hydroxyethyl-phthalimid. Auch diese geänderte Reihenfolge brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die Darstellbarkeit der Verbindung **109** ist damit auch auf diesem Weg nicht realisierbar.



Schema 5.17: Versuch der Darstellung des Di-*tert*-butyldisilyl ethers **109** mit geänderter Reihenfolge.

Ob die Reaktion mit NBS abläuft ist nicht feststellbar, da dieses Zwischenprodukt äußerst instabil ist. Abgesehen von diesem Grund verbleibt letztlich als Ursache eine zu große sterischen Hinderung. Möglich ist auch, daß das Bromsilan eine zu geringe Reaktivität besitzt. Ein weiterer Versuch dieses Problem einzugrenzen, stellt die Verwendung der käuflich zugänglichen Verbindung Di-*tert*-butylsilylbis(trifluoromethansulfonat) dar. Sollte auch in diesem Fall keine Reaktion mit dem zweiten Alkohol erfolgen, so ist die sterische Hinderung der Zwischenverbindungen offensichtlich zu groß für einen Angriff des Nucleophils am Siliziumatom.

Die Serinverbindung **110** wurde unter Schutzgas mit Di-*tert*-butylsilylbis(trifluormethansulfonat) in einer nukleophilen Substitution umgesetzt und in einer sich direkt anschließenden Reaktion 2-Hydroxyethyl-Phthalimid zugegeben, um den Di-*tert*-Butyldisilylether **109** zu bilden (Schema 5.18).



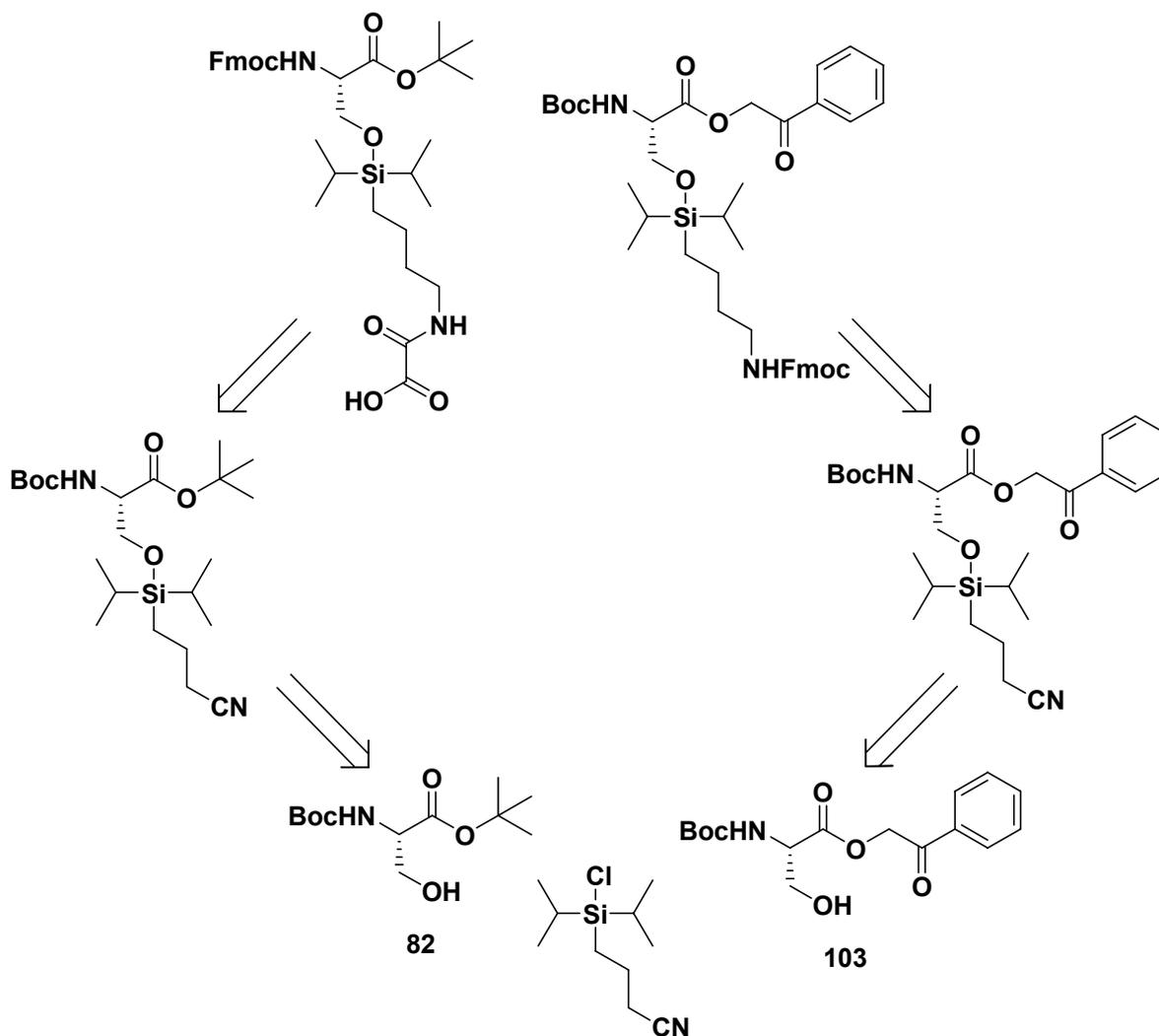
Schema 5.18: Versuche der Di-*tert*-butyldisilylethersynthese mit Di-*tert*-butylsilylbis(trifluormethansulfonat).

Diese Reaktion gelang unter verschiedenen Reaktionsbedingungen nicht. Lediglich die mit der eingesetzten Aminosäure monosubstituierten Siliziumspezies konnten in Form des Silanols **115** nach der wässrigen Aufarbeitung der Reaktion isoliert werden. Diese abschließende Reaktion zeigt deutlich, daß das zweite Triflat als Abgangsgruppe reaktiv genug ist mit Wasser in der Aufarbeitung zu reagieren. Mit dem eingesetzten Alkohol findet hingegen keine Reaktion statt, obwohl es sich um einen primären Alkohol handelt. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, daß die sterische Zugänglichkeit der monosubstituierten Silanverbindung zu stark eingeschränkt ist, daß selbst eine so gute Abgangsgruppe wie ein Triflat nicht ausreicht in einer  $S_N2$ -Reaktion gegen eine primären Alkohol ausgetauscht zu werden.

### 5.1.2.3 Retrosynthese II eines Fluorid-spaltbaren Silyl-Linkers

Der letzte Ansatz die zwei Zielverbindungen für einen Fluorid-spaltbaren Silyl-*Linker* synthetisch zugänglich zu machen, sollte zwei Dinge berücksichtigen: Aus den Erkenntnissen aus der Synthese zur Retrosynthese I folgt, daß die Alkylreste am Siliziumatom nicht sterisch zu anspruchsvoll sein dürfen. Wenn man anstatt zwei *tert*-Butyl-Resten am Siliziumatom zwei

*iso*-Propyl-Reste vorsieht, erhält man im Falle eines Disilylethers, wie schon zuvor erwähnt, eine ausgeprägte Säurelabilität der Verbindung, die allerdings ungeeignet für die Abspaltbedingungen nach der PNA-Synthese vom festen Trägermaterial ist. Somit kam als Kompromiss zwischen sterischer Zugänglichkeit auf der einen Seite und Säurestabilität des Produktes auf der anderen Seite nur eine trialkyl-substituierte Siliziumspezies in Frage. Diese wiederum benötigte aber eine Möglichkeit der Funktionalisierung am dritten Alkylrest, um einen zusätzlichen Terminus für die Verbindung zur PNA herstellen zu können.



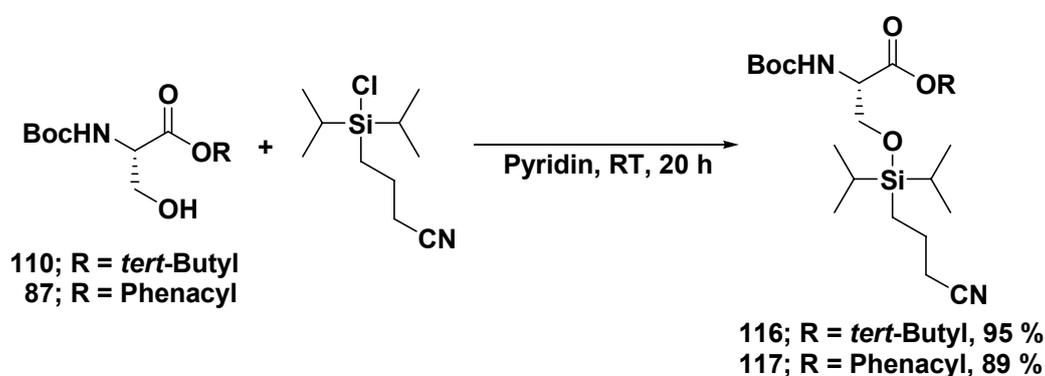
Schema 5.19: Retrosynthese II ausgehend vom (3-Cyanopropyl)-diisopropyl-chlorsilan.

Das käuflich erwerbliche (3-Cyanopropyl)-di*iso*-propyl-chlorsilan erfüllt die genannten Anforderungen: Es handelt sich um eine Trialkylspezies, mit zwei -Propyl-Resten und einer Abgangsgruppe. Der dritte Substituent trägt eine funktionelle Gruppe. Diese Verbindung und die schon bereits erwähnten Serinderivate **110** und **87** sind letztlich die Verbindungen, auf die sich die Darstellung der Zielmoleküle retrosynthetisch zurückführen läßt (Schema 5.19).

### 5.1.2.4 Synthese II eines Fluorid-spaltbaren Silyl-Linkers

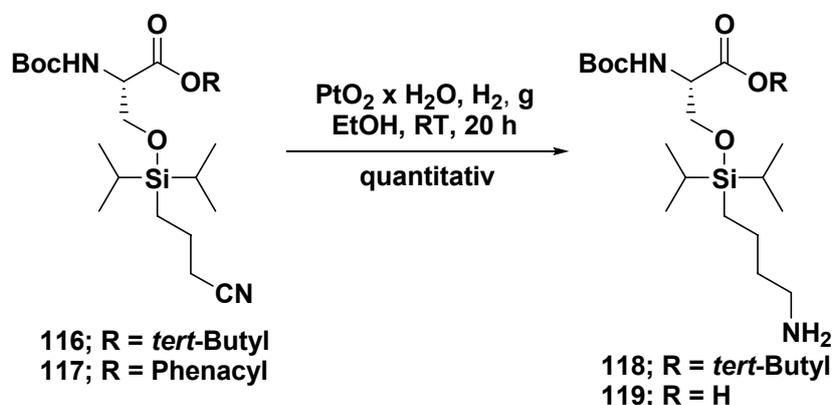
#### 5.1.2.4.1 Synthese der Di-propyl-(3-cyanopropyl)-Silylether 116 und 117 und heterogene Reduktion mit Wasserstoff und $PtO_2$

Mit Hilfe des (3-Cyanopropyl)-dipropyl-chlorsilans wurde in einer nukleophilen Substitution mit Boc-Serin-phenacylester **87** und Boc-Serin-*tert*-butylester **110** in sehr guten Ausbeuten die gewünschten Silylethern **116** und **117** hergestellt. In beiden Reaktionen wurden die Edukte vollständig innerhalb von 20 Stunden in Pyridin zu den in Schema 5.20 dargestellten Produkten umgesetzt.



Schema 5.20: Darstellung der Di-propyl-(3-cyanopropyl)-Silylether 116 und 117.

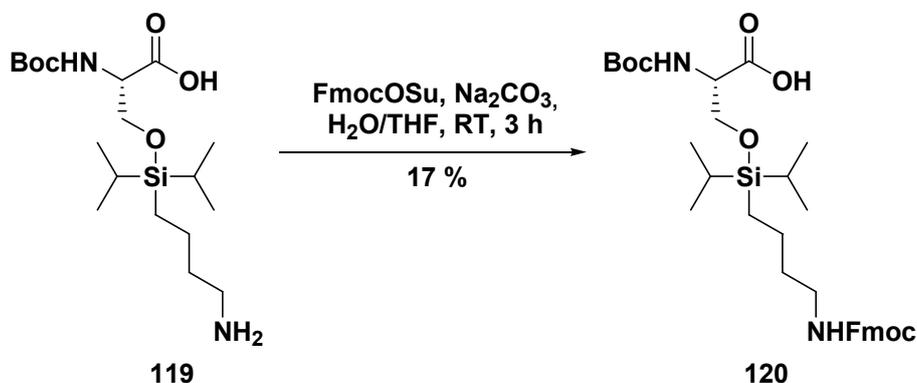
In der folgenden Reaktionen wurden die Nitrilfunktionen der Serinderivate **116** und **117** unter hydrierenden Bedingungen mit Platindioxid in Ethanol zu den Aminen **118** und **119** umgesetzt. Bei dieser Reaktion ist es essentiell, daß die Reaktionsmischung vehement gerührt wird, damit ein guter Austausch der im Solvens gelösten Gase stattfinden kann. Im Falle der Verbindung **117** erfolgt hier gleichzeitig die Spaltung des Phenacylester. Quantitative Ausbeuten konnten in beiden Reaktionen erzielt werden (Schema 5.21).



Schema 5.21: Hydrierung der Nitrile 116 und 117 in einer  $H_2$ -Atmosphäre mittels  $PtO_2$ -Katalyse.

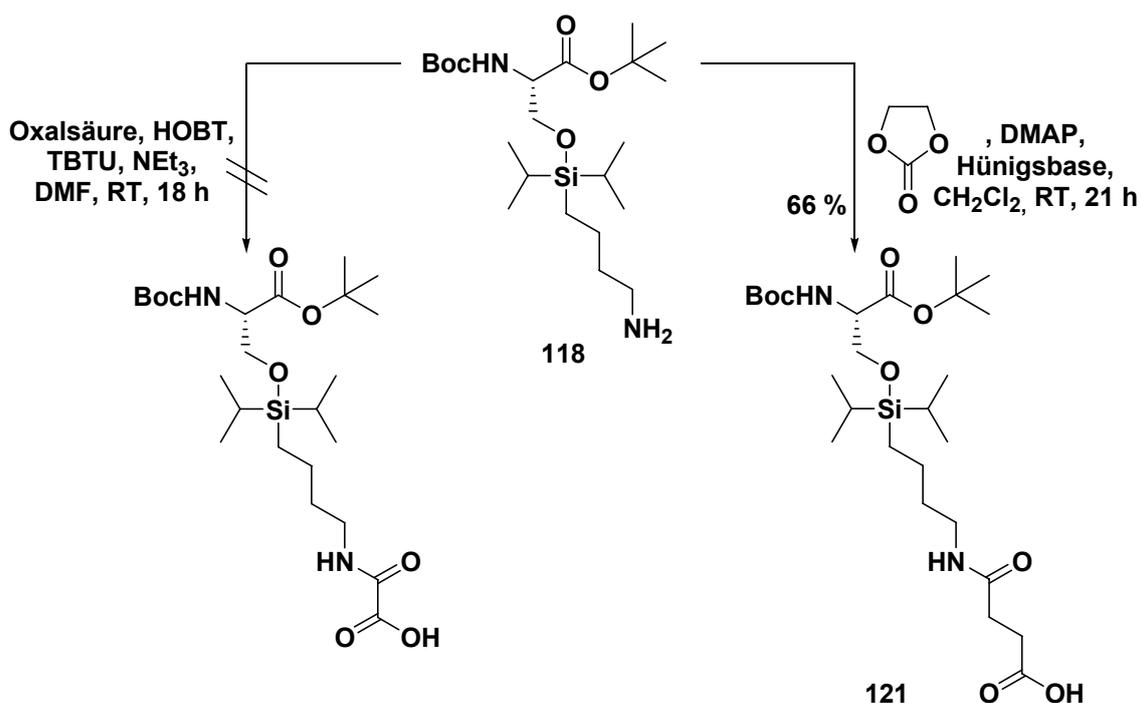
### 5.1.2.4.2 Synthese der Zielverbindung 120 und Synthesversuche von Zielverbindung 122

Eine der Zielverbindungen, Verbindung **120** konnte in mäßiger Ausbeute (17 %) durch Umsetzung des Amins **119** in einer THF/H<sub>2</sub>O-Mischung mit FmocOSu und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dargestellt werden.



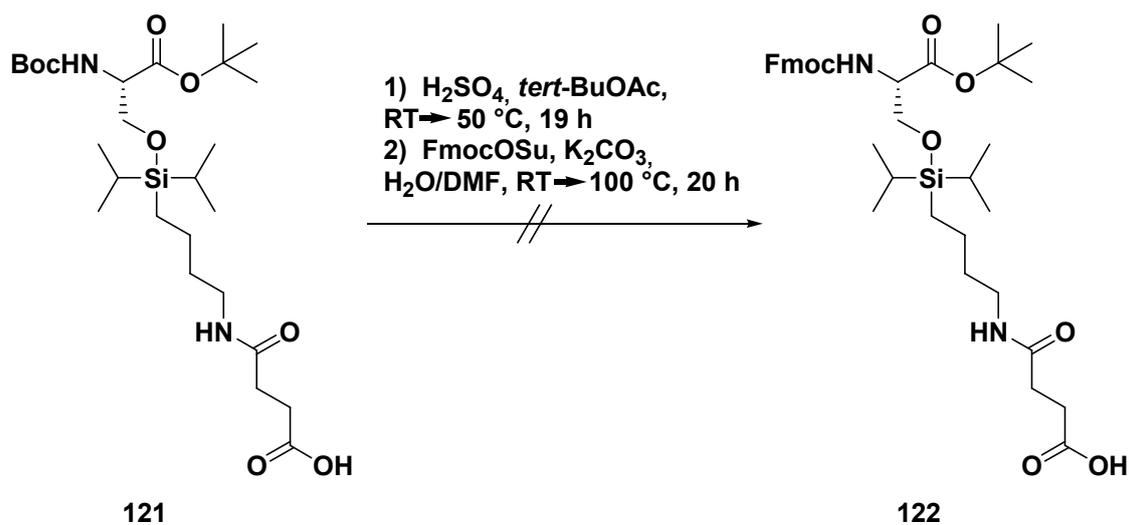
Schema 5.22: Fmoc-Schätzung in einem THF/Wasser-Gemisch.

Erste Versuche eine Amidbindung mit dem Amins **118** und HOBT/TBTU-aktivierter Oxalsäure zu synthetisieren konnte hingegen nicht erfolgreich gestaltet werden. Aus diesem Grund wurde eine Reaktionsvariante mit Bernsteinsäureanhydrid durchgeführt, bei der wenige Nebenreaktionen ablaufen. Diese lieferte mit DMAP und Hünigsbase in Dichlormethan das Produkt **121** in guten Ausbeuten (Schema 5.23).



Schema 5.23: Synthese eines zusätzlichen C-Terminus zur Darstellung der Verbindung 121.

Der nächste Schritt war die selektive Entschützung des *N*-Terminus des Serins unter katalytischem Einsatz von konzentrierter Schwefelsäure in Essigsäure-*tert*-butylester. Diese Reaktion verlief quantitativ unter Erhalt der freien Aminogruppe des Serins. Da diese Verbindung als Ammoniumion vorliegend nicht säulenchromatographisch an Kieselgel zu reinigen ist, wurde es vorgezogen nach Entfernen der Solventien im Hochvakuum bei 50 °C eine direkt anschließende Fmoc-Schützung des *N*-Terminus vorzunehmen. Die Reaktion in einem THF/Wasser-Gemisch unter Verwendung von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und FmocOSu führte allerdings in diesem Fall nicht zur Zielverbindung **122** (Schema 5.24).



Schema 5.24: Versuche zur Darstellung der zweiten Zielverbindung **122**.

Es wurde versucht über Temperaturerhöhung (schrittweise bis 100 °C) und durch Zugabe von DMF zu der Reaktionsmischung (bessere Löslichkeit von FmocOSu) eine Umsetzung des Eduktes zu erzwingen, allerdings lieferte dies auch nicht den gewünschten Erfolg.

Das Projekt einer chemischen Templat-dirigierten Peptidligation wurde an dieser Stelle eingestellt, da sich die Synthese der Zielverbindungen als viel zu kompliziert erwies.

### Zusammenfassung und Ausblick für ein PNA-Templat dirigiertes Ligationsverfahren

Es konnten auf dem Bereich des Pd(0)-spaltbaren *Linkers* die für den Schlüsselschritt der Retrosynthese eine *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion benötigten Aldehyde und die notwendigen Phosphorylide hergestellt werden. Diese Reaktion gelang im Fall des Methylester-Derivates in akzeptablen Ausbeuten. Die jeweils anderen Produkte mit dem Phthalimid-Derivat gelangen nicht. Variationen der Reaktionsbedingungen führten nicht zum gewünschten Erfolg. In der dazugehörigen Modellreaktion konnte aber wiederum das Produkt dargestellt werden. Versuche, ähnliche Palladium(0)-spaltbare *Linker*-Moleküle über Metathesereaktionen mit den *Grubbs*-Katalysatoren der 1. und 2. Generation herzustellen, lieferten ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg.

Die erfolgreichsten Versuche, synthetisch ein Zielmolekülpaar für einen ersten Ligationsversuch zugänglich zu machen, gelangen über die Einführungen eines fluoridspaltbaren Silyl-*Linkers*. Substitutionsversuche mit den Verbindungen Di-*tert*-butylchlorsilan, Di-*tert*-butyl-dichlorsilan und Di-*tert*-butylsilylbis(trifluormethansulfonat) lieferten jedoch lediglich nur die Monosubstitutionsprodukte unabhängig davon, welche Reaktionsbedingungen und Substitutionsreihenfolgen gewählt wurden.

Erfolgreicher konnten diesbezüglich die Experimente mit dem käuflich erwerblichen (3-Cyanopropyl)-dipropyl-chlorsilan durchgeführt werden. Hierbei gelang die Darstellung einer Zielverbindung (**120**). Auf dem zweiten Teil der Syntheseroute gelang die Darstellung des vorletzten Produktes in sehr guten Ausbeuten. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Darstellung der zweiten Zielverbindung **122** waren aus Personalgründen und aus Gründen der thematischen Neuausrichtung der Arbeitsgruppe *Carell* innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich. Die dazu notwendigen Experimente sind allerdings mit einem geringen zeitlichen Aufwand verbunden. Daraufhin sollten dann erste Versuche folgen, eine chemische Ligation der beiden Aminosäuren mittels einer PNA-Templat präorganisierten Reaktion durchzuführen.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Material und Methoden

Für Dünnschichtchromatographien (DC) wurden Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck* (*Kieselgel-60 F<sub>254</sub>*-Dünnschicht, 5 cm x 10 cm) verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht (254 bzw. 366 nm) und mit Hilfe von Tauchbädern. Dazu wurde Kaliumpermanganat-Tauchreagenz (0.5 % in 1 *M* NaOH, aq), Anisaldehyd-Tauchreagenz (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL Schwefelsäure), Ninhydrin-Tauchreagenz (300 mg Ninhydrin in 100 mL *n*-Butanol) oder ein Cer(IV)-Tauchreagenz verwendet und anschließend auf 150-250 °C erhitzt.

Die Bestimmung der Zusammensetzung von Oligonukleotiden wurde durch enzymatischen Totalverdau mittels HPLC-MS/MS durchgeführt. Zur betreffenden Oligonukleotidlösung (100  $\mu$ L, 20  $\mu$ M) wurden 10  $\mu$ L Puffer (300 *mM* Ammoniumacetat, 100 *mM* CaCl<sub>2</sub> und 1 *mM* ZnSO<sub>4</sub>, pH=5.7) zugefügt. Diese Lösung wurde mit 22 *units* Nuklease P1 aus *Penicillium citrum* und 0.05 *units calf spleen*-Phosphodiesterase versetzt. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert. Nach 3 h wurden 12  $\mu$ L eines zweiten Puffers (500 *mM* Tris/HCl, 1 *mM* EDTA, pH=8.0), 10 *units* alkaline *calf intestinal*-Phosphatase sowie 9 *units snake venom*-Phosphatase zugegeben und weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Reaktionsende wurde HCl (6  $\mu$ L, 0.1 M) zugefügt. Die Lösung wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß umpipettiert.

Enzymreaktionen wurden mit einem Thermomixer und in 1.5 mL-Reaktionsgefäßen der Firma *Eppendorf* durchgeführt. Die verwendeten Enzymlösungen wurden generell bei 0 °C aliquotiert, mit Flüssigstickstoff gekühlt und bei -80 °C aufbewahrt. Die Enzymlösungen wurden nach dem Auftauen bis zur eigentlichen Reaktion auf 0 °C gehalten. Es wurde jeweils ein Aliquot für ein Experiment verwendet; dieses wurde danach verworfen.

Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden (260 nm) wurden aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der vier Nukleoside (dA 15.2 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, dC 7.1 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, dG 12.0 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, dT 8.4 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) berechnet. Als Extinktionskoeffizient für  $\alpha$ -cFaPydG wurde der Koeffizient bei 260 nm und pH = 6.5 (9.5 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) zu Grunde gelegt.<sup>[62]</sup>

HPL-Chromatographie wurde auf einer *Merck-Hitachi*-Anlage (*L-7400 UV-Detektor*, *L-7480 Fluoreszenzdetektor*) durchgeführt. Für analytische Umkehrphasen-Trennungen wurden

*CC Nucleosil 100-5 C18-* oder *CC Nucleosil 100-3 C18*-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Präparative Oligonukleotidtrennungen wurden mit *VP250/21 Nucleosil 100-7 C18*-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Gradienten sind in Unterabschnitt 6.4.2 aufgeführt.

HPLC-MS/MS-Experimente von verdauten Oligonukleotiden oder Nukleosidgemischen und -standards wurden an einem *Thermo Finnigan LTQ-FT* durchgeführt: Für die mobile Phase wurden zwei Elutionspuffer (Puffer A: 2 mM  $\text{NEt}_3/\text{AcOH}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Puffer B: 2 mM  $\text{NEt}_3/\text{AcOH}$  in 80 % Acetonitril) mit folgendem Gradient verwendet: 0 min: 0 % B, 12 min: 3 % B, 30 min: 20 % B; Flussrate: 0.2 mL/Minuten Um auch Substanzen von geringer UV-Absorption nachzuweisen, wurde die Wellenlänge des UV-Detektors auf 210 nm eingestellt. Das Massenspektrometer wurde mit einer Elektronenspray-Spannung von 4 kV im negativen und positiven Modus betrieben.

Infrarot-Spektroskopie (IR) wurde, soweit nicht anders beschrieben, mit KBr-Presslingen (ca. 1 mg Substanz auf 300 mg KBr) oder als Film zwischen NaCl-Platten mit einem Bruker IFS 88, Bruker IFS 25 und einem *Spectrum BX* Spektrometer der Firma *Perkin Elmer* mit einer ATR-Einheit des Typs *Dura Sampler Diamond ATR (Attenuated Total Reflection)* von *Smiths Detection* durchgeführt. Die Lage der Banden wird in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben; die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen vs (sehr stark), s (stark), m (mittel), oder w (schwach) beschrieben.

Zur Kapillargelelektrophorese von Oligonukleotiden wurde ein *P/ACE MDQ DNA System* mit *UV Detector Module* sowie *LIF Detector Module* mit *488 nm Laser Module* der Firma *Beckman Coulter* verwendet. Die dabei benutzte Glaskapillare mit Polyacrylamid-Innenbeschichtung von *Beckman Coulter* hatte einen Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  und eine Gesamtlänge von 30 cm. Die Länge vom Einlass bis zum Detektor betrug 21 cm. Es wurde ein lyophilisiertes 6 %-iges lineares Polyacrylamidgel eingesetzt, welches mit einem denaturierenden Gelpuffer (0.1 M Tris/Borat, 1 mM EDTA, 7 M Harnstoff) gemäß Herstellervorschrift rehydratisiert wurde. Derselbe Puffer wurde als Elektrodenpuffer verwendet. Das Gel wurde durch Zentrifugation (5000 rpm) entgast und die Kapillare anschließend mit dem Gel bei 30 psi über einen Zeitraum von 15 Minuten beladen. Vor der Analyse wurden die gemessenen DNA-Proben mit ZipTip® 0.6  $\mu\text{L}$  C18-Pipettenspitzen von Millipore entsalzt und mit zweifach destilliertem Wasser (40  $\mu\text{L}$ ) verdünnt. Die Probeninjektion erfolgte mit einer Injektionsspannung von 10 kV für 8 s. Die Trennung wurde mit einem beidseitigen Druck von 20 psi bei 9 kV und 25 °C über einen Zeitraum von 45 Minuten durchgeführt. Oligonukleotide wurden bei 254 nm durch Absorption detektiert. Fluoresceinmarkierte Oligonukleotide wurden durch LIF-Detektion (Anregungswellenlänge: 488 nm, Emission: 526 nm) nachgewiesen.

$^1\text{H}$ -Kernresonanzspektren ( $^1\text{H}$ -NMR) wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf den Geräten *Bruker AMX 200*, *Varian Mercury 200VX*, *Bruker ARX 300*, *Varian VXR 400S*, *Varian Inova 400*, *Bruker DRX 500* sowie *Bruker ARX 600* aufgenommen. Die jeweiligen Messfrequenzen (in MHz) sowie das Lösungsmittel wurden in Klammern angegeben. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das entsprechende Lösungsmittelsignal ( $\text{CHCl}_3$  [ $\delta = 7.26$ ] in  $\text{CDCl}_3$ , DMSO [ $\delta = 2.50$ ] in  $\text{DMSO-d}_6$  sowie HDO [ $\delta = 4.65$ ] in  $\text{D}_2\text{O}$ ) als interne Referenz dient. Die Kopplungskonstante  $J$  ist in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett), sowie ggf. deren Kombinationen beschrieben. Das Symbol br wurde breiten Signalen vorangestellt. Für die Signalzuordnungen wurden in der Regel COSY-Spektren zur Hilfe genommen. Die Konfiguration des entsprechenden Moleküls wurde bei Notwendigkeit mit NOESY-Messungen untersucht.

$^{13}\text{C}$ -Kernresonanzspektren ( $^{13}\text{C}$ -NMR) wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Bruker AC 200*, *Bruker ARX 300*, *Varian VXR 400S*, *Varian Inova 400*, *Bruker DRX 500* sowie *Bruker AMX 600* aufgenommen. Die Messfrequenzen (in MHz) sowie das Lösungsmittel wurden jeweils in Klammern angegeben. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das entsprechende Lösungsmittelsignal ( $\text{CHCl}_3$ , [ $\delta = 77.00$ ] in  $\text{CDCl}_3$  bzw. DMSO [ $\delta = 39.50$ ] in  $\text{DMSO-d}_6$ ) als interne Referenz dient. Die Peakzuordnungen wurden per Inkrementrechnung, oder bei Notwendigkeit mit Hilfe von APT-, HSQC-, HMQC-, HMBC oder nichtentkoppelten  $^{13}\text{C}$ -Spektren durchgeführt.

$^{31}\text{P}$ -Kernresonanzspektren ( $^{31}\text{P}$ -NMR) wurden bei Raumtemperatur auf einem *Varian Mercury 200 VX* aufgenommen. Die Messfrequenzen (in MHz) sowie das Lösungsmittel wurden jeweils in Klammern angegeben. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in ppm relativ zu 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  angegeben, die als externer Standard dient.

Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Acros*, *Sigma* oder *Merck* bezogen und, wenn nicht anders vermerkt, in den kommerziell erhältlichen Qualitäten *puriss.*, *p. a.* oder *purum* verwendet. EtOH wurde über Na und MeOH über Mg getrocknet und destilliert bzw.  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , THF, DMSO und Toluol trocken von den Firmen Fluka, Aldrich oder Acros bezogen. Die Reaktionen wurden alle in ausgeheizten Apparaturen unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Das Einengen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde am Membranpumpenvakuum eines Rotationsverdampfers *Laborota 4001-efficient* der Firma *Heidolph* und der zugehörigen Pumpe *CVC2000<sup>III</sup>* der Firma *Vacuubrand* durchgeführt. Um Reaktionsprodukte im Hochvakuum ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$  mbar) zu trocknen und kleinere Mengen wässriger

oder alkoholischer Lösungen zu entfernen, wurde eine Drehschieber-Vakuumpumpe *RZ2* der Firma *Vacuubrand* mit Ölpumpenvakuum eingesetzt.

Massenspektren (MS, HRMS): EI-Massenspektren wurden auf einem *MAT 95* Spektrometer der Firma *Varian* aufgenommen. Für FAB-Massenspektren in Niedrig- und Hochauflösung wurde ein *Finnigan MAT95*-Massenspektrometer eingesetzt. Messungen von ESI-FTICR-Massenspektren in Niedrig- und Hochauflösung wurden mit einem *Thermo Finnigan LTQ-FT* durchgeführt. Die Polarität der gemessenen Ionen und die Methode werden zusammen angegeben. Zur Bestimmung der Masse von Oligonukleotiden wurde teilweise MALDI-TOF-Massenspektrometrie mit einem *Bruker Autoflex II*-Spektrometer unter Verwendung einer 3-Hydroxypicolinsäurematrix durchgeführt. ESI-FTICR-Spektren von DNA-Strängen (2  $\mu\text{L}$  Probe, ca. 30  $\mu\text{M}$ ) wurden direkt injiziert oder zuvor chromatographisch getrennt ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 8:2$  bei 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Die Temperatur der Kapillare betrug 300 °C und die Sprayspannung lag bei 4-5 kV (negativer Modus).

Für die Oligonukleotidsynthese wurden ein *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *PerSeptive Biosystems* und ein *Äkta Oligopilot 10* der Firma *Amersham Biosciences* verwendet. Ultramild<sup>®</sup>-Phosphoramidite für die DNA-Synthese wurden von *Glen Research* bezogen, kompatible 1  $\mu\text{M}$ -Kartuschen mit CPG-Trägermaterial von *PE Biosystems*. Als Lösungsmittel für die Phosphoramidite und den Aktivator wurde Acetonitril der Firma *Riedel de Haën* mit einem Wassergehalt von 0.1 ppm verwendet. Die verwendeten Syntheseprotokolle werden in Abschnitt 6.4 und 6.4.1 erläutert. Nach Abspaltung vom Träger, Entschützung unter basischen Bedingungen und Reinigung mittels HPLC wurden die Massen der Oligonukleotide durch ESI-FTICR-Massenspektrometrie gemessen und mit dem theoretischen Wert verglichen.

Röntgenkristallstrukturanalysen von kleinen Molekülen wurden an der LMU München mit einem *IPDS/CCD*-Gerät durchgeführt.

Säulenchromatographien wurden nach der Flash-Methode mit *Kieselgel 60* (230-400 mesh) der Firma *Merck* durchgeführt. Die Elution erfolgte unter Anwendung eines  $\text{N}_2$ -Überdrucks von 0.2–0.5 bar bei Raumtemperatur. Der Kieselgel-Überschuss relativ zu den Rohprodukten und die Laufmittelzusammensetzung werden in Klammern angegeben.

Schmelzkurven von Oligonukleotidkomplexen wurden mit einem *Cary 100 Bio Spektral-photometer* erstellt. Der Temperaturgradient betrug 0.5 °C/Minuten. In der Regel wurden fünf aufeinanderfolgende Messungen im Temperaturbereich von 85 °C–0 °C und 0 °C–85 °C bei

260 nm sowie 320 nm durchgeführt. Während der Messung wurde der Probenraum mit Stickstoff gespült. Für die Messungen wurden, falls nicht anders beschrieben, Küvetten mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Schichtdicke der Firma *Helma* eingesetzt. In der Regel wurden die Schmelzkurven mit DNA-Konzentrationen von  $3 \mu\text{M}$  in wässrigen Lösungen mit NaCl ( $150 \text{ mM}$ ) und Tris/HCl,  $\text{pH} = 7.4$  ( $10 \text{ mM}$ ) bestimmt. Die Proben in den Küvetten wurden mit Dimethylpolysiloxan überschichtet. Zur Auswertung wurden mit Hilfe von *Microcal Origin*<sup>®</sup> die fünf temperaturabhängigen Absorptionskurven bei 260 nm gemittelt. Von der erhaltenen Kurve wurde die gemittelte temperaturabhängige Hintergrundmessung bei 320 nm abgezogen. Messungen mit hohen DNA-Konzentrationen wurden in Küvetten mit reduzierten Schichtdicken von 2 mm (Duplexkonzentration  $9 \text{ mM}$ ) und 1 mm ( $27 \text{ mM}$ ) durchgeführt. Schmelzpunkte ( $T_m$ ) von Oligonukleotiden ergeben sich aus dem Nulldurchgang der geglätteten zweiten Ableitung der Schmelzkurve eines Oligonukleotiddoppelstrangs.

Schmelzpunkte von chemischen Verbindungen wurden in offenen Glaskapillaren mit Apparaturen der Firma *Büchi* vom Typ *Smp 20* und *B-540* gemessen und sind nicht korrigiert.

Die thermodynamischen Parameter des Dissoziationsverhaltens von Oligonukleotidkomplexen wurden mit Hilfe einer modifizierten *van't Hoff*-Gleichung bestimmt. Dazu wurden die inversen Schmelzpunkte, die bei fünf verschiedenen Duplexkonzentrationen gemessen wurden ( $0.3 \mu\text{mol}$ ,  $1 \mu\text{mol}$ ,  $3 \mu\text{mol}$ ,  $9 \mu\text{mol}$  und  $27 \mu\text{mol}$ ), gegen den natürlichen Logarithmus der jeweiligen Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression erhält man eine Gerade, aus deren Gleichung sich die Parameter  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  und  $\Delta G$  ableiten lassen.

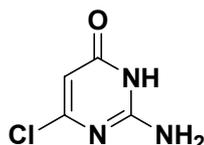
UV-Spektren zur Quantifizierung von Oligonukleotiden wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio Spektralphotometer* aufgenommen. Die Lösungen wurden bei  $80^\circ\text{C}$  im Konzentrationsbereich  $0.5 > \text{OD}_{260} < 1.0$  gemessen. Vom Messwert bei 260 nm wurde der Nullwert bei 320 nm abgezogen und die DNA-Konzentration mit Hilfe des errechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt.

Drehwerte wurden an einem *241 Polarimeter* der Firma *Perkin-Elmer* in einer Küvette mit der Länge von 5 cm und einem Volumen von 1.5 mL durchgeführt. Die Drehwerte wurden in Chloroform in Konzentrationen von 70-80 mg/mL bestimmt. Weitere Parameter der Messungen waren die folgenden: Die Temperatur im Probenraum betrug  $28^\circ\text{C}$  und die definierte Wellenlänge war  $\lambda = 589 \text{ nm}$ .

## 6.2 Synthese des carbozyklischen $\alpha$ -cFaPydG-Phosphoramiditbausteins 58

### 6.2.1 Synthese des Pyrimidinonderivats<sup>[46, 62]</sup> 60

#### 2-Amino-6-chlor-3*H*-pyrimidin-4-on<sup>[199]</sup> (62)

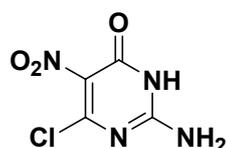


2-Amino-4,6-dichloropyrimidin (8.0 g, 48.9 mmol) wurde mit 1 *M* wässriger Natriumhydroxidlösung (100 mL) versetzt und 30 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Dabei ging das Edukt vollständig in Lösung. Das Produkt **62** wurde mit Essigsäure (40 mL) gefällt und durch Filtration des Niederschlags in Form eines gelblichen Pulvers erhalten (6.67 g, 46.0 mmol, 94 %).

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 5.59 (s, 1H, CH), 7.02 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 11.13 (br s, 1H, NH) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 97.67 (C5), 153.79 (C2), 157.84, 160.52 ppm.

#### 2-Amino-6-chlor-5-nitro-3*H*-pyrimidin-4-on<sup>[152]</sup> (63)

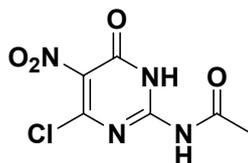


Verbindung **62** (6.5 g, 44.8 mmol) wurde bei 0 °C mit konz. Schwefelsäure (13 mL) und anschließend mit rauchender Salpetersäure (13 mL) bei 0 °C versetzt. Diese Suspension wurde 5 Minuten bei 0 °C gerührt und dann die gelbe Reaktionsmischung auf Eis getropft. Hierbei wurde kontinuierlich das entstehende Tauwasser mittels Vakuum durch eine Nutsche entfernt. Der erhaltene, schwach gelbe Niederschlag wurde mehrere Tage im HV getrocknet. Verbindung **63** wurde in Form eines schwach gelben Pulvers erhalten (7.1 g, 37.2 mmol, 83 %).

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 7.14$  (br s, 1H, NH), 8.54 (br s, 1H, NH), 12.15 (br s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 126.57$  (C5), 153.12, 154.09, 154.96 ppm.

**2-Acetylamino-6-chlor-5-nitro-3*H*-pyrimidin-4-on<sup>[155]</sup> (60)**



Nitropyrimidin **63** (5.0 g, 26.2 mmol) wurde in Essigsäureanhydrid (35 mL) gelöst. Nach der Zugabe von vier Tropfen konzentrierter Schwefelsäure wurde die Reaktionsmischung für 30 Minuten auf 90 °C erhitzt. Die Reaktionslösung kühlte über Nacht ab, und der dabei gebildete Niederschlag wurde abgetrennt. Nach dem Einengen des Filtrats auf die Hälfte des Volumens konnte erneut Feststoff gewonnen werden. Verbindung **60** wurde auf diese Weise in Form eines gelblichen Pulvers (4.1 g, 17.6 mmol, 84 %) erhalten.

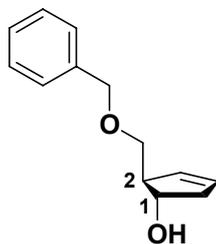
$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 2.21$  (s, 3H, Ac), 12.46 (s, 1H, NH) 12.77 (br s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 23.90$  ( $\text{CH}_3$ ), 131.89, 150.70, 151.62, 153.00, 174.42 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm;

MS (ESI):  $m/z = 231.0$   $[\text{M-H}^+]$ .

## 6.2.2 Darstellung des carbozyklischen Desoxyribosylamins 70

(1*S*,2*R*)-2-Benzylloxymethyl-3-cyclopenteno<sup>[149, 150]</sup> (**65**)



Für die Reaktion war es zunächst notwendig zwei Reagenzien frisch herzustellen: Das Hydroborierungsreagenz (-)-Dipinocampheylboran **67** und das Natriumcyclopentadien **64**.

Dazu wurde Boran-Dimethylsulfidkomplex (20 mL, 0.2 mol, 1 eq) in THF (30 mL) gelöst und (+)- $\alpha$ -Pinen (63.4 mL, 0.4 mol, 2.0 eq) bei 0 °C unter Rühren innerhalb von 40 Minuten hinzugegeben. Nach ca. 4 h bei 0 °C fiel (-)-Dipinocampheylboran **67** im Verlauf der Reaktion als weißer Niederschlag aus. Anschließend wurden THF (50 mL) sowie (+)- $\alpha$ -Pinen (9.6 mL, 60 mmol, 0.3 eq) hinzugegeben und die Suspension bei 4 °C unter Stickstoff zwei Tage aufbewahrt. Diese Lösung wurde ohne weitere Aufarbeitung für die folgende Umsetzung verwendet.

Herstellung von Natriumcyclopentadien **64**: NaH (4.8 g, 0.2 mol, 1.0 eq) wurde in trockenem THF (100 mL) suspendiert. Bei 0 °C wurde frisch destilliertes Cyclopentadien (20 mL, 0.22 mol, 2.2 eq) tropfenweise über einen Zeitraum von 45 Minuten zugegeben (Wasserstoffentwicklung!). Nachdem die Reaktionsmischung bei 0 °C für eine Stunde gerührt worden war, wurde diese unter Schutzgasatmosphäre für zwei Tage bei -80 °C gelagert.

Herstellung von Verbindung **65**: Über eine Spritze wurde die Natrium-cyclopentadienyl-Lösung unter Luftausschluss zu einer Lösung von Benzylchlormethylether (28 mL, 0.2 mol, 1.0 eq) in THF (100 mL) bei -60 °C getropft. Die Reaktion wurde bei -40 °C zwei Stunden gerührt, wobei allmählich eine Braunfärbung auftrat. Anschließend wurde diese Mischung wieder auf -60 °C mit Hilfe eines Trockeneis/Aceton-Kältebades abgekühlt und eine auf -60 °C vorgekühlte Suspension von (-)-Dipinocampheylboran **67** (57.4 g, 0.2 mol, 1.0 eq) in THF (200 mL) über einen Tropftrichter hinzugefügt. Die Lösung wurde 1 h bei -60 °C gerührt und danach sofort für fünf Stunden in ein Eisbad gestellt. Die Reaktionsmischung wurde so weitere 16 Stunden gerührt während dessen langsam Raumtemperatur erreicht wurde.

Der 1L-Dreihalskolben wurde mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und die Reaktionsmischung mit Diethylether (100 mL) versetzt. Bei der sich anschließenden Zugabe von 3 M wässriger NaOH-Lösung (70 mL) wurde darauf geachtet, daß die Reaktionstemperatur unter 10 °C blieb. Die Temperatur der Reaktionsmischung überstieg nicht 15 °C bei der tropfenweisen

Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (30 %, 70 mL). Die Reaktion wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt.

Nach Phasentrennung im Scheidetrichter wurde die wässrige Phase mit Et<sub>2</sub>O extrahiert (4 x 100 mL). Die organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (2 x 100 mL), über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Vom Rohprodukt (120 g) wurde mittels Hochvakuumdestillation bei 5 x 10<sup>-3</sup> mbar und 100 °C Ölbadtemperatur das Nebenprodukt Camphol abgetrennt und das verbleibende Öl durch zweimalige Säulenchromatographie (je 1800 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 3:1) gereinigt. Man erhielt **65** (15.5 g, 75.6 mmol, 38 %) in Form eines farblosen Öls.

R<sub>f</sub> = 0.34 (Hex:EtOAc = 2:1);

Drehwert: [α]<sub>D</sub><sup>28</sup> = 86 mLg<sup>-1</sup>dm<sup>-1</sup>;

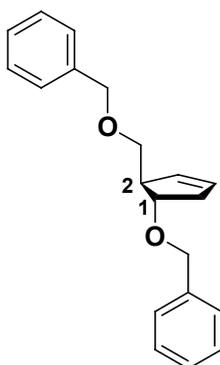
FTIR (ATR): ν = 3400 br s, 3060 m, 2906 s, 2854 s, 1737 w, 1606 w, 1496 m, 1454 s, 1361 m, 1311 m, 1267 m, 1207 m, 1159 m, 1100 s, 1075 s, 1028 m, 979 m, 951 m, 850 w, 735 s, 698 s, 613 w cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.39 (tdd, <sup>2</sup>J = 17.0 Hz, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, 1H, C5H<sub>cis</sub> (bezüglich OH-Gruppe an C1)), 2.69 (dddd, <sup>2</sup>J = 17.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J = 4.2 Hz, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, 1H, C5H<sub>trans</sub> (bezüglich OH-Gruppe an C1)), 2.80 (br s, 1H, OH), 2.86 (qddd, <sup>2</sup>J = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J = 3.8 Hz, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 1H, C2H), 3.31 (dd, <sup>2</sup>J = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H, OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.52 (dd, <sup>2</sup>J = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H, OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.2-4.3 (m, 1H, C1H), 4.53 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5.58 (qd, <sup>2</sup>J = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J = 2.1 Hz, <sup>4</sup>J = 2.1 Hz, 1H, C3H), 5.7-5.8 (m, 1H, C4H), 7.3-7.4 (m, 5H, CH<sub>arom.</sub> vom Phenyl) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 41.0 (C5), 55.1 (C2), 71.9 (OCH<sub>2</sub>), 73.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (C1), 127.5 (C<sub>ortho</sub> von Ph), 128.3 (C<sub>para</sub> von Ph), 128.3 (C<sub>meta</sub> von Ph), 129.3 (C3), 129.9 (C4), 138.1 (C<sub>ipso</sub> von Ph) ppm;

MS (EI<sup>+</sup>): m/z = 204 [M]<sup>+</sup>;

HRMS (EI<sup>+</sup>): m/z berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = [M]<sup>+</sup>: 204.1150, gefunden 204.1142.

**(1*S*,2*R*)-1-Benzyl-2-benzyloxymethyl-3-cyclopenten<sup>[150]</sup> (68)**

Natriumhydrid (1.78 g, 74 mmol, 1.4 eq) wurde in absolutem THF (120 mL) suspendiert und bei 0 °C der Alkohol **65** (10.8 g, 52.9 mmol, 1 eq) in trockenem THF (30 mL) portionsweise vorsichtig zugegeben. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde die Reaktionsmischung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und Tetrapentylammoniumiodid (TPAI) (225 mg, 0.5 mmol, 0.01 eq) und Benzylbromid (8.8 mL, 74 mmol, 1.4 eq) zugegeben. Die Mischung wurde 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von wenigen Millilitern Methanol *gequencht*. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan (500 mL) versetzt und die organische Phase mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Hex:EtOAc = 100:3 → 100:4) gereinigt. Man erhielt **68** in Form eines farblosen Öls (13.4 g, 45.5 mmol, 86 %), das am HV vollständig getrocknet wurde.

R<sub>f</sub> = 0.25 (Hex:EtOAc = 20:1);

Drehwert:  $[\alpha]_D^{28} = 82 \text{ mLg}^{-1}\text{dm}^{-1}$ ;

FTIR (ATR):  $\nu = 3087 \text{ w}, 3061 \text{ m}, 3031 \text{ m}, 2855 \text{ s}, 2787 \text{ w}, 1951 \text{ w}, 1874 \text{ w}, 1809 \text{ w}, 1737 \text{ w}, 1606 \text{ w}, 1496 \text{ m}, 1454 \text{ m}, 1359 \text{ m}, 1359 \text{ m}, 1308 \text{ w}, 1271 \text{ w}, 1205 \text{ w}, 1175 \text{ w}, 1098 \text{ s}, 1071 \text{ s}, 1028 \text{ m}, 907 \text{ w}, 788 \text{ w}, 734 \text{ s}, 697 \text{ s}, 605 \text{ m cm}^{-1}$ ;

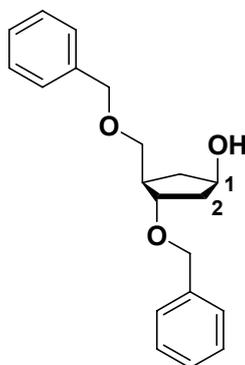
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 2.4\text{-}2.5 \text{ (m, 1H, C5H}_{\text{cis}}), 2.69 \text{ (qdd, } ^2J = 17.3 \text{ Hz, } ^3J = 7.0 \text{ Hz, } ^3J = 2.3 \text{ Hz, } ^4J = 2.2 \text{ Hz, 1H, C5H}_{\text{trans}}), 3.0\text{-}3.1 \text{ (m, 1H, C2H)}, 3.34 \text{ (dd, } ^2J = 9.3 \text{ Hz, } ^3J = 7.3 \text{ Hz, 1H, OCH}_a\text{H}_b), 3.46 \text{ (dd, } ^2J = 9.3 \text{ Hz, } ^3J = 5.7 \text{ Hz, 1H, OCH}_a\text{H}_b), 4.10 \text{ (td, } ^2J = 6.8 \text{ Hz, } ^3J = 3.2 \text{ Hz, 1H, C1H)}, 4.53 \text{ (d, } ^3J = 2.3 \text{ Hz, 2H, PhCH}_2), 4.55 \text{ (s, 2H, PhCH}_2), 5.71 \text{ (qdd, } ^2J = 40.8 \text{ Hz, } ^3J = 6.1 \text{ Hz, } ^4J = 2.2 \text{ Hz, 1H, C3H)}, 7.31 \text{ (m, 10H, CH}_{\text{arom.}} \text{ 2 x vom Phenyl) ppm}$ ;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 39.1 \text{ (C5)}, 52.9 \text{ (C2)}, 70.8 \text{ (OCH}_2), 71.7 \text{ (PhCH}_2\text{O)}, 73.1 \text{ (PhCH}_2\text{O)}, 81.4 \text{ (C1)}, 127.4, 127.5, 127.5, 127.7, 128.3, 128.3, 129.8, 130.0, 138.5, 138.8 \text{ (10 x CH von Ph) ppm}$ ;

MS (EI<sup>+</sup>):  $m/z = 294$  [M]<sup>+</sup>;

HRMS (EI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für [C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = [M]<sup>+</sup>: 294.1620, gefunden 294.1588.

**(1*R*,3*S*,4*R*)-3-Benzoyloxy-4-benzyloxymethyl-cyclopentanol**<sup>[150]</sup> (**69**)



Zu einer Lösung von **68** (12.7 g, 43.1 mmol) in trockenem THF (110 mL) wurde unter Rühren bei 0 °C tropfenweise eine Lösung von 9-BBN (Dimer, 10.5 g, 86.3 mmol, 2 eq) in THF (140 mL) über einen Tropftrichter zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und nacheinander langsam absolutes Ethanol (14 mL), 3 M NaOH-Lsg. (40 mL) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (33 %, 40 mL) hinzugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser (500 mL) wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc (5 x 250 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (1900 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 3:1) gereinigt. Dabei konnte das  $\beta$ -Produkt **69** (10.3 g, 33 mmol, 77 %) in Form eines farblosen Öls gewonnen werden.

$R_f = 0.37$  (Hex:EtOAc = 1:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3401$  brs, 3088 w, 3063 w, 3030 w, 2929 s, 2859 s, 1953 w, 1737 w, 1605 w, 1496 m, 1454 m, 1360 m, 1303 w, 1206 m, 1166 w, 1096 s, 1028 m, 909 w, 736 s, 698 s, 609 w cm<sup>-1</sup>;

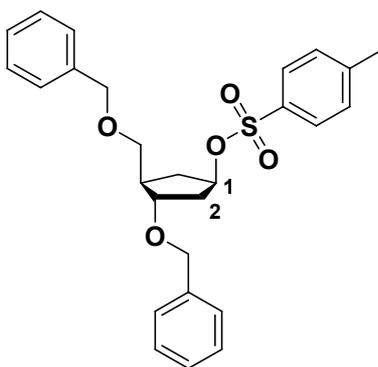
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.5$ -1.6 (m, 1H, C5H<sub>endo</sub>), 1.8-1.9 (m, 1H, C2H<sub>exo</sub>), 2.08 (dddd, <sup>2</sup> $J = 13.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.7$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.3$  Hz, <sup>4</sup> $J = 1.9$  Hz, 1H, C2H<sub>endo</sub>), 2.2-2.4 (m, 3H, OH, C4H, C5H<sub>exo</sub>), 3.53 (dq, <sup>2</sup> $J = 9.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.1$  Hz, 1H, OC1'H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.09 (dt, <sup>3</sup> $J = 6.7$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.0$  Hz, 1H, C3H), 4.3-4.4 (m, 1H, C1H), 4.4-4.6 (m, 4H, C1'OCH<sub>2</sub>Ph, C3OCH<sub>2</sub>Ph), 7.3-7.4 (m, 10H, CH<sub>arom.</sub> 2 x vom Phenyl) ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 37.3 (C5), 42.6 (C2), 44.5 (C4), 71.4 ( $\text{OC1'H}_2$ ), 72.2 (C3), 72.3, 73.3 (2 x  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 81.9 (C1), 127.6, 127.7, 128.3, 128.4, 128.9, 128.9 (10 x CH von Ph), 137.8, 138.6 (2 x  $\text{C}_{\text{ipso}}$  von Ph) ppm;

MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  = 312  $[\text{M}]^+$ ;

HRMS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3]^+ = [\text{M}]^+$ : 312.1725, gefunden 312.1720.

**(1*R*,3*S*,4*R*)-3-Benzoyloxy-4-benzoyloxymethylcyclopentan-1-tosylat (71)**



(1*R*,3*S*,4*R*)-3-Benzoyloxy-4-benzoyloxymethylcyclopentan-1-ol **69** (7 g, 22.4 mmol) wurde in absolutem Pyridin (30 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (6.4 g, 33.6 mmol) wurde in kleinen Portionen über einen Zeitraum von 30 Minuten zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktion 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Essigsäureethylester (300 mL) und  $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL) verdünnt und die organische Phase im Scheidetrichter abgetrennt und dreimal mit gesättigter, wässriger  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (200 mL) und gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (500 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 5:1) gereinigt. Verbindung **71** wurde in Form eines farblosen Öls (8.2 g, 17.6 mmol, 79 %) erhalten.

$R_f$  = 0.26 (Hex:EtOAc = 5:1);

FTIR (ATR):  $\nu$  = 3436 br, 3063 s, 3031 m, 2927 m, 2862 m, 1598 m, 1454 m, 1360 s, 1189 s, 1175 vs, 1096 s, 988 m, 894 s, 668  $\text{m cm}^{-1}$ ;

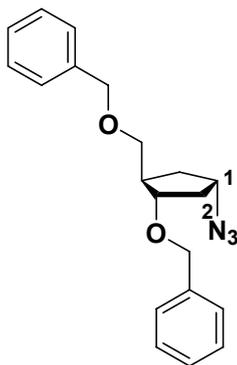
$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.6-1.7 (m, 1H,  $\text{C5H}_b$ ), 2.0-2.1 (m, 2H,  $\text{C2H}_a\text{H}_b$ ), 2.2-2.3 (m, 2H,  $\text{C4H}$  und  $\text{C5H}_a$ ), 2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  vom Tosylat), 3.44 (td,  $^3J=6.3$  Hz, 2H,  $\text{C1'H}_a\text{H}_b$ ), 3.9-4.0 (m, 1H, C1H), 4.45 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$  vom Phenyl), 4.50 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$  vom Phenyl), 5.0-5.1 (m, 1H, C3H), 7.3-7.4 (m, 12H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ . 2 x vom Phenyl+ 2 x  $\text{CH}_{\text{meta}}$  vom Tosylat), 7.7-7.8 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{ortho}}$  vom Tosylat) ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 21.5$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom Tosylat), 34.0 (C5), 38.8 (C2), 44.0 (C4), 71.2 (C vom Benzyl), 71.6 (C1'), 73.0 (C vom Benzyl), 80.1 (C1), 82.1 (C3), 127.4 (4 x C), 127.5 (4 x C), 127.7 (4 x C), 128.3 (2 x C), 129.7, 138.2 (2 x C), 144.5 ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 467$  [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{S}]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 467.1887; gefunden 467.1891.

**(1*S*,3*S*,4*R*)-3-Benzoyloxy-4-benzyloxymethylcyclopentan-1-azid (61)**



Verbindung **71** (8.0 g, 17.1 mmol) wurde mit trockenem DMF (30 mL) und Natriumazid (12.2 g, 18.8 mmol) versetzt und bei 60 °C für 14 h gerührt. Nach Zugabe von Essigsäureethylester (300 mL) und H<sub>2</sub>O (100 mL) wurde die organische Phase abgetrennt und zweimal mit gesättigter Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (100 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen und anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Die Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der zurückbleibende Feststoff an Kieselgel (100 mL Kieselgel, Hex:EtOAc:CHCl<sub>3</sub> = 10:1:0.5) säulenchromatographisch gereinigt. Auf diesem Weg wurde Verbindung **61** in Form eines Öls (5.4 g, 16 mmol, 94 %) erhalten.

$R_f = 0.54$  (Hex:EtOAc = 5:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3064$  w, 3030 w, 2931 m, 2858 m, 2097 vs, 1730 w, 1491 w, 1454 m, 1360 m, 1263 m, 1206 w, 1097 s, 1028 m, 736 s, 697 m cm<sup>-1</sup>;

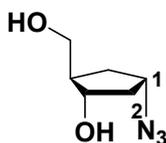
$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.8$ -1.9 (m, 2H, C2H<sub>b</sub> und C5H<sub>b</sub>), 1.99 (dddd,  $^4J = 13.4$  Hz,  $^3J = 8.7$  Hz,  $^3J = 4.7$  Hz,  $^2J = 1.3$  Hz, 1H, C5H<sub>a</sub>), 2.24 (td,  $^4J = 13.8$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H, C2H<sub>a</sub>), 2.4-2.5 (m, 1H, C4H), 3.44 (d,  $^3J = 5.5$  Hz, 2H, C1'H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.86 (td,  $^3J = 7.0$  Hz,  $^3J = 5.1$  Hz, 1H, C3H), 3.9-4.0 (m, 1H, C1H), 4.49 (s, 2H, OCH<sub>2</sub> vom Phenyl), 4.52 (s, 2H, OCH<sub>2</sub> vom Phenyl), 7.2-7.4 (m, 10H, CH<sub>arom.</sub> 2 x vom Phenyl) ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 33.9$  (C5), 38.0 (C2), 44.7 (C4), 60.2 (C1), 71.2 (C1'), 71.4 (OCH<sub>2</sub> vom Benzyl), 73.1 (OCH<sub>2</sub> vom Benzyl), 80.6 (C3), 127.4, 127.5 (3 x C), 127.7 (2 x C), 128.3 (2 x C), 129.7 (2 x C), 138.2 (2 x C) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 338$  [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für [C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>: 338.1863; gefunden 337.1865.

**(1*S*,3*S*,4*R*)-3-Hydroxy-4-hydroxymethylcyclopentan-1-azid (73)**



**61** (5.2 g, 15.4 mmol) wurde in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Bortrichlorid-Lösung (1 M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 200 mL) wurde über einen Zeitraum von 45 Minuten über einen Tropftrichter mit Druckausgleich in die Reaktionsmischung bei -78 °C eingebracht. Man rührte die Reaktion bei -78 °C für weitere 3 h und ließ dann über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Am nächsten Tag wurde mit absolutem Methanol (80 mL) bei -78 °C *gequencht* und unter ständigem Rühren über Nacht das Reaktionsgefäß auf Raumtemperatur gebracht. Alle Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel (10 cm Füllhöhe mit 350 mL Kieselgel, Chloroform:Methanol = 10:1) säulenfiltriert. Verbindung **73** wurde in Form eines hellgelben Öls (2.4 g, 15.3 mmol, 99 %) erhalten.

R<sub>f</sub> = 0.27 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1);

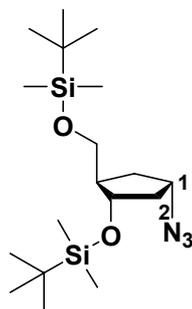
FTIR (ATR):  $\nu = 3351$  vs, 2935 s, 2499 w, 2103 vs, 1651 w, 1442 m, 1338 m, 1261 s, 1165 m, 1076 s, 1048 s, 941 m, 878 w, 687 m, 559 m cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.58$  (ddd, <sup>4</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, C5H<sub>b</sub>), 1.77 (dddd, <sup>4</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J = 4.5 Hz, <sup>2</sup>J = 1.6 Hz, 1H, C2H<sub>b</sub>), 1.9-2.0 (m, 1H, C5H<sub>a</sub>), 2.2-2.4 (m, 4H, C2H<sub>a</sub>, C4H und 2 x OH), 3.56 (dd, <sup>4</sup>J = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 1H, C1'H<sub>b</sub>), 3.79 (ddd, <sup>4</sup>J = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, <sup>2</sup>J = 3.0 Hz, 1H, C1'H<sub>a</sub>), 3.9-4.0 (m, 1H, C1H), 4.07 (dd, <sup>4</sup>J = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 1H, C3H) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 33.3$  (C5), 40.7 (C2), 48.4 (C4), 60.2 (C1), 65.0 (C1'), 75.8 (C3) ppm;

MS (ESI):  $m/z = 192$  [M+Cl]<sup>-</sup>;

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Cl]<sup>-</sup> = [M+Cl]<sup>-</sup>: 192.0545; gefunden 192.0544.

**(1*S*,3*S*,4*R*)-3-*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy-4-*tert*-butyl-dimethyl-silyloxymethylcyclopentan-1-azid (74)**

Verbindung **73** (2.4 g, 15.3 mmol) wurde mit Imidazol (2.61 g, 38.3 mmol) bei Raumtemperatur in trockenem DMF (20 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde portionsweise TBDMSCl (5.77 g, 38.3 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung über 16 h bei RT gerührt. Es wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) verdünnt und je einmal mit gesättigter NH<sub>4</sub>Cl- (150 mL) und mit gesättigter NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (300 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 20:1) gereinigt. Produkt **74** (5.1 g, 13.2 mmol) wurde in Form eines farblosen Öls erhalten.

R<sub>f</sub> = 0.59 (EtOAc:Hex = 20:1);

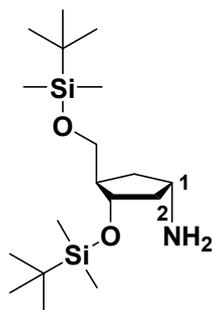
FTIR (ATR):  $\nu$  = 2956 s, 2930 s, 2896 m, 2858 s, 2098 s, 1472 m, 1464 m, 1389 w, 1361 w, 1257 s, 1108 s, 1006 m, 939 w, 874 m, 836 vs, 813 m, 776 s, 669 w cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.03 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.05 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.88 (s, 18H, 2 x *tert*-Butyl vom TBDMS), 1.6-1.7 (m, 1H, C2H<sub>b</sub>), 1.7-1.9 (m, 2H, C5H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.10 (tdt, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 1H, C4H), 2.23 (td, <sup>4</sup>J = 13.7 Hz, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, C2H<sub>a</sub>), 3.5-3.6 (m, 2H, C1'H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.8-3.9 (m, 1H, C1H), 4.04 (q, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 1H, C3H) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = -5.5 (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), -5.4 (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), -4.8 (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), -4.6 (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), 18.0 (C<sub>quartär</sub> *tert*-Butyl vom TBDMS), 18.3 (C<sub>quartär</sub> *tert*-Butyl vom TBDMS), 25.8 (3 x C<sub>tert-Butyl</sub> vom TBDMS), 25.9 (3 x C<sub>tert-Butyl</sub> vom TBDMS), 32.7 (C5), 41.2 (C2), 49.1 (C4), 59.5 (C1), 62.6 (C1'), 73.1 (C3) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 386 [M+H]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = [M+H]<sup>+</sup>: 386.2654; gefunden 385.2650.

**(1*S*,3*S*,4*R*)-3-*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy-4-*tert*-butyl-dimethyl-silyloxymethylcyclopentan-1-amin (70)**

Verbindung **74** (2.94 g, 7.6 mmol) und Pd/C (300 mg) wurden in absolutem Ethanol (20 mL) suspendiert. Im Reaktionsgefäß wurde die Atmosphäre durch zweimaliges Anlegen von Vakuum gefolgt von Spülen mit H<sub>2</sub>-Gas ausgetauscht. Die Reaktionsmischung wurde unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre für 15 h bei Raumtemperatur heftig gerührt. Die Suspension wurde über einen PTFE-Filter (Whatman Puradisc®) abfiltriert und so von den Pd/C befreit. Das Ethanol wurde im Vakuum entfernt, wobei das Produkt in Form eines farblosen Öls zurückblieb. Das Amin **70** (2.73 g, 6.0 mmol, quant.) wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in die nächste Reaktion eingesetzt.

R<sub>f</sub> = 0.31 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 2956$  s, 2930 s, 2887 m, 2858 s, 1472 m, 1464 m, 1389 w, 1361 w, 1257 s, 1103 s, 1006 m, 939 w, 874 m, 836 vs, 813 m, 775 s, 668 w cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.02$  (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.86 (s, 9H, *tert*-Butyl vom TBDMS), 0.87 (s, 9H, *tert*-Butyl vom TBDMS), 1.44 (td, <sup>3</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 1H, C2H<sub>b</sub>), 1.61 (ddd, <sup>3</sup>J = 13.5 Hz, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 1H, C5H<sub>b</sub>), 1.7-1.8 (m, 3H, C5H<sub>a</sub> und NH<sub>2</sub>), 2.03 (td, <sup>4</sup>J = 12.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 1H, C2H<sub>a</sub>), 2.1-2.2 (m, 1H, C4H), 3.29 (ddd, <sup>4</sup>J = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J = 4.9 Hz, 1H, C1H), 3.47 (ddd, <sup>4</sup>J = 28.0 Hz, <sup>3</sup>J = 10.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 2H, C1'H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.04 (dd, <sup>4</sup>J = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, 1H, C3H) ppm;

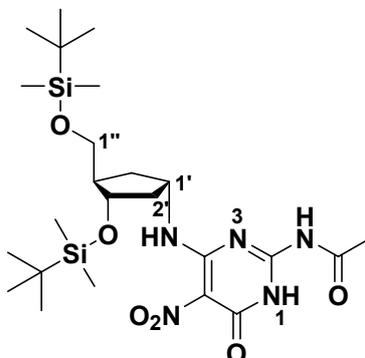
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = -5.5$  (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), -5.4 (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), -4.8 (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), -4.6 (C<sub>Methyl</sub> vom TBDMS), 18.0 (C<sub>quartär tert-Butyl</sub> vom TBDMS), 18.3 (C<sub>quartär tert-Butyl</sub> vom TBDMS), 25.8 (6 x C<sub>tert-Butyl</sub> vom TBDMS), 25.9 (3 x C), 37.7 (C5), 45.1 (C2), 49.6 (C4), 51.2 (C1), 64.0 (C1'), 74.9 (C3) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 360$  [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>: 359.2749; gefunden 359.2733.

### 6.2.3 Kupplung des Carbozyklus **60** mit dem Pyrimidinonderivat **70**

*N*-{4-3-*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy-4-*tert*-butyl-dimethyl-silyloxymethyl-cyclopentyl-amino-5-nitro-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl}-acetamid (**75**)



Amin **70** (2.73 g, 7.6 mmol) wurde in trockenem DMF (50 mL) aufgenommen, mit Diisopropylethylamin (1.5 mL, 8.4 mmol) und Verbindung **60** versetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung 30 Minuten und anschließend 45 Minuten bei 60 °C gerührt. Dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte den vollständigen Umsatz des Edukts. Daraufhin wurde die Reaktion mit Essigsäureethylester (300 mL) versetzt und die organische Phase dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Letzte Lösungsmittelreste wurden abschließend über Nacht im Hochvakuum abkondensiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (500 mL Kieselgel, Chloroform:Methanol = 20:1) wurde Verbindung **75** in Form eines gelben Pulvers (3.0 g, 5.4 mmol, 71 %) erhalten.

R<sub>f</sub> = 0.38 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1);

Smp.: (Zersetzung) 220-225 °C;

FTIR (ATR):  $\nu$  = 3436 m, 3214 m, 2955 s, 2931 s, 2887 m, 2858 s, 1669 vs, 1623 vs, 1589 vs, 1537 s, 1472 m, 1427 m, 1373 m, 1330 m, 1232 s, 1151 w, 1108 m, 1034 w, 1005 w, 939 vw, 837 s, 776 m, 699 w cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom TBDMS), 0.87 (s, 18H, 2 x *tert*-Butyl vom TBDMS), 1.7-1.8 (m, 2H, C2'H<sub>b</sub> und C5'H<sub>b</sub>), 1.8-1.9 (m, 1H, C5'H<sub>a</sub>), 2.00 (ddd, <sup>3</sup>J = 13.7 Hz, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 1H, C2'H<sub>a</sub>), 2.2-2.3 (m, 1H, C4'H), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom Acetyl), 3.38 (dd, *J* = 10.1 Hz, 6.1 Hz, 1H, C1''H<sub>b</sub>), 3.51 (dd, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 1H, C1''H<sub>a</sub>), 4.18 (td, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz, 1H, C3'H), 4.5-4.6 (m, 1H, C1'H), 10.00 (d, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, NH am C1'), 10.36 (br, 1H, NH), 11.43 (br, 1H, NH) ppm;

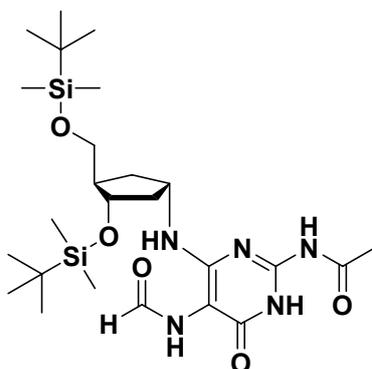
$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -5.5$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom TBDMS),  $-5.4$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom TBDMS),  $-4.6$  ( $2 \times \text{C}_{\text{Methyl}}$  vom TBDMS),  $18.2$  ( $2 \times \text{C}_{\text{quartär}}$  *tert*-Butyl vom TBDMS),  $18.3$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom Acetyl),  $25.9$  ( $6 \times \text{C}_{\text{tert-Butyl}}$  vom TBDMS),  $35.0$  ( $\text{C}5'$ ),  $41.7$  ( $\text{C}2'$ ),  $49.9$  ( $\text{C}4'$ ),  $52.4$  ( $\text{C}1'$ ),  $64.0$  ( $\text{C}1''$ ),  $75.6$  ( $\text{C}3'$ ),  $112.9$ ,  $149.8$ ,  $155.2$ ,  $157.4$ ,  $172.6$  ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 556$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}_2]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 556.2987; gefunden 556.2993.

#### 6.2.4 Umfunktionalisierungen des carbocyclischen Nukleotids 75

*N*-{4-3-*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy-4-*tert*-butyl-dimethyl-silyloxymethyl-cyclopentyl-amino-5-formylamino-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl}-acetamid (77)



Verbindung **75** (1.9 g, 3.4 mmol) und Pd/C (250 mg) wurden mit absolutem Ethanol (30 mL) und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) versetzt. Die Atmosphäre des Reaktionsgefäßes wurde durch zweimaliges Anlegen von Vakuum gefolgt von Spülen mit  $\text{H}_2$ -Gas ausgetauscht. Die Reaktionsmischung wurde unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre für 15 h bei Raumtemperatur heftig gerührt. Die Suspension wurde zur Abtrennung von Pd/C über einen PTFE-Filter (Whatman Puradisc<sup>®</sup>) filtriert. Das Ethanol wurde im Vakuum entfernt bis das Amin als farbloses Öl zurückblieb. Das Amin **76** wurde direkt weiter zum gewünschten Formamid umgesetzt: Der Rückstand wurde in absolutem THF (50 mL) und trockenem Pyridin (30 mL) aufgenommen und mit EDC  $\times$  HCl (1.7 g, 8.8 mmol) versetzt. Nachdem der größte Teil des Feststoffs in Lösung gegangen war, wurde Ameisensäure (162  $\mu\text{L}$ , 4.3 mmol) hinzugegeben und die Reaktion für 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der zurückbleibende Feststoff mit Essigsäureethylester (200 mL) versetzt und zweimal mit Wasser (100 mL), gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ - (100 mL) und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung (100 mL)

gewaschen. Nach erfolgtem Trocknen der organischen Phase über  $\text{MgSO}_4$  wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und Verbindung **77** mittels säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (350 mL Kieselgel, Chloroform:Methanol = 20:1) und anschließendem Umkristallisieren aus Heptan mit einer Ausbeute von 79 % in Form eines schwach gelben Pulvers (1.5 g, 2.7 mmol) erhalten.

$R_f = 0.22$  ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 10:1$ );

Smp.: 115-119 °C;

FTIR (ATR):  $\nu = 3436$  s, 2956 m, 2950 m, 2858 m, 1652 s, 1472 w, 1254 m, 1088 w, 837 m, 777  $\text{m cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 0.02$  (s, 3H, vom TBDMS), 0.03 (s, 3H, vom TBDMS), 0.03 (s, 3H, vom TBDMS), 0.03 (s, 3H, vom TBDMS), 0.85 (s, 9H, *tert*-Butyl vom TBDMS), 0.86 (s, 9H, *tert*-Butyl vom TBDMS), 1.53 (ddd,  $^4J = 25.8$  Hz,  $^3J = 12.9$  Hz,  $^3J = 6.5$  Hz, 1H,  $\text{C2}'\text{H}_b$ ), 1.6-1.8 (m, 1H,  $\text{C5}'\text{H}_b$ ), 2.2-2.0 (m, 3H,  $\text{C4}'\text{H}$  und  $\text{C2}'\text{H}_a$ ,  $\text{C5}'\text{H}_a$ ), 2.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  vom Acetyl), 3.5-3.6 (m, 2H,  $\text{C1}''\text{H}_a\text{H}_b$ ), 3.9-4.0 (m, 1H,  $\text{C3}'\text{H}$ ), 4.37 (qd,  $^4J = 14.3$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz,  $^3J = 6.9$  Hz, 1H,  $\text{C1}'\text{H}$ ), 6.18 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 0.39H,  $\text{NH}_{\text{trans-Formamid}}$  an  $\text{C1}'$ ), 6.55 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 0.61H,  $\text{NH}_{\text{cis-Formamid}}$  an  $\text{C1}'$ ), 7.80 (d,  $^3J = 11.5$  Hz, 0.38H,  $\text{NH}_{\text{trans-Formamid}}$ ), 8.04 (d,  $^3J = 11.3$  Hz, 0.40H,  $\text{CHO}_{\text{trans-Formamid}}$ ), 8.04 (d,  $^3J = 1.6$  Hz, 0.64H,  $\text{NH}_{\text{cis-Formamid}}$ ), 8.73 (d,  $^3J = 1.6$  Hz, 0.61H,  $\text{CHO}_{\text{cis-Formamid}}$ ), 11.27 (br, 2H, 2 x NH) ppm;

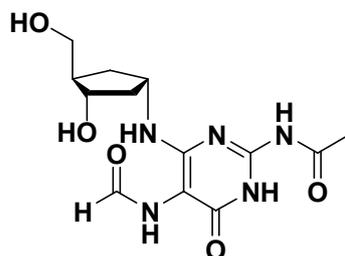
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = -5.0$  (2 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom TBDMS), -4.4 ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom TBDMS), -4.2 ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom TBDMS), 18.2 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  vom TBDMS), 18.4 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  vom TBDMS), 24.3 ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom Acetyl), 26.2 (6 x  $\text{C}_{\text{tert-Butyl}}$  vom TBDMS), 34.6 ( $\text{C5}'$ ), 42.2 ( $\text{C2}'$ ), 49.1 ( $\text{C4}'$ ), 49.4 ( $\text{C1}'$ ), 63.8 ( $\text{C1}''$ ), 74.4 ( $\text{C3}'$ ), 148.8, 148.9, 157.4, 157.5, 158.5, 161.3, 166.8, 174.0, 174.1 ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 554$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

MS (ESI):  $m/z = 552$  [ $\text{M}-\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 554.3189; gefunden 554.3184.

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2]^+ = [\text{M}-\text{H}^+]^+$ : 552.3043; gefunden 552.3041.

***N***-{4-3-Hydroxy-4-hydroxymethyl-cyclopentylamino-5-formylamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl}-acetamid (**79**)

Verbindung **77** (250 mg, 0.45 mmol) wurde mit trockenem THF (4.5 mL), absolutem Pyridin (125  $\mu$ L) und HF x Pyridin-Komplex (ca. 70 % HF-Anteil, 125  $\mu$ L) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es fiel ein orangefarbener Feststoff aus, der durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Der Überstand wurde verworfen und Reste des HF x Pyridin-Komplexes im Präzipitat durch Zugabe von Methoxytrimethylsilan (0.6 mL) zerstört. Das so gewonnene Produkt wurde zweimal mit trockenem THF gewaschen und zwei Tage sorgfältig im Hochvakuum getrocknet. Verbindung **79** lag in Form eines gelben Pulvers (145 mg, 0.9 mmol, quantitativ) vor.

$R_f = 0.67$  (C18-TLC, MeOH:H<sub>2</sub>O = 1:1);

Smp.: 152-155 °C;

FTIR (ATR):  $\nu = 3420$  s, 2929 w, 1645 vs, 1587 s, 1505 m, 1440 w, 1422 m, 1375 w, 1241 s, 1152 w, 1044 m, 1013 w, 879 w, 710 w, 563 w cm<sup>-1</sup>;

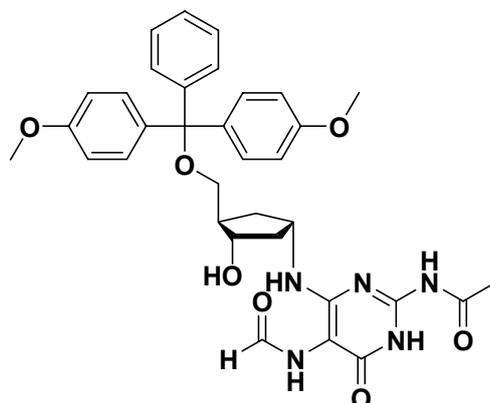
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 1.50$  (ddd, <sup>3</sup>*J* = 26.6 Hz, <sup>3</sup>*J* = 13.1 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 1H, C2'H<sub>b</sub>), 1.6-1.7 (m, 2H, C5'H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 1.9-2.0 (m, 1H, C4'H), 2.07 (td, <sup>3</sup>*J* = 12.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.5 Hz, 1H, C2'H<sub>a</sub>), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom Acetyl), 3.2-3.4 (m, 2H, C1''H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.7-3.8 (m, 1H, C3'H), 4.33 (sept., <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1H, C1'H), 4.49 (br, 1H, OH), 4.76 (dd, <sup>4</sup>*J* = 11.5 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.2 Hz, 1H, OH), 6.27 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 0.33H, NH<sub>trans-Formamid</sub> an C1'), 6.57 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, 0.61H, NH<sub>cis-Formamid</sub> an C1'), 7.81 (d, <sup>3</sup>*J* = 11.5 Hz, 0.37H, NH<sub>trans-Formamid</sub>), 8.06 (d, <sup>3</sup>*J* = 1.5 Hz, 0.65H, NH<sub>cis-Formamid</sub>), 8.12 (d, <sup>3</sup>*J* = 11.5 Hz, 0.37H, CHO<sub>trans-Formamid</sub>), 8.75 (d, <sup>3</sup>*J* = 1.4 Hz, 0.61H, CHO<sub>cis-Formamid</sub>), 11.31 (br, 1H, NH), 11.34 (br, 1H, NH) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 24.2$  (C<sub>Methyl</sub> vom Acetyl), 35.0 (C5'), 48.8 (C2'), 49.6 (C4'), 62.9 (C1'), 67.4 (C1''), 92.8 (C3'), 113.6, 150.1, 157.2, 161.1, 173.9, 202.7 ppm;

MS (ESI):  $m/z = 324$  [M-H]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup> = [M-H]<sup>+</sup>: 324.1308; gefunden 324.1315.

***N*-{4-3-Hydroxy-4-dimethoxytrityloxymethyl-cyclopentylamino-5-formylamino-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl}-acetamid (80)**



Zu einer Lösung von Verbindung **79** (352 mg, 1.08 mmol) in absolutem Pyridin (15 mL) wurde bei Raumtemperatur alle 30 Minuten in drei Portionen (2 x 0.5 eq + 1 x 0.3 eq) Dimethoxytritylchlorid (477 mg, 1.41 mmol) gegeben. Nach 3.5 h war die Umsetzung vollständig (DC-Kontrolle). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol (3 mL) beendet. Das Solvens wurde *in vacuo* entfernt und das verbleibende Rohprodukt an Kieselgel via *Flash*-Chromatographie (Chloroform:Methanol:Pyridin = 20:2:1) gereinigt. Die DMT-geschützte carbozyklische Verbindung **80** fiel in Form eines farblosen Pulvers (500 mg, 7.97 mmol, 74 %) an.

$R_f = 0.16$  (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1);

Smp.: 145-148 °C;

FTIR (ATR):  $\nu = 3436$  s, 2920 s, 1732 m, 1650 m, 1445 w, 1384 m, 1249 m, 1156 w, 1070 m, 612 w cm<sup>-1</sup>;

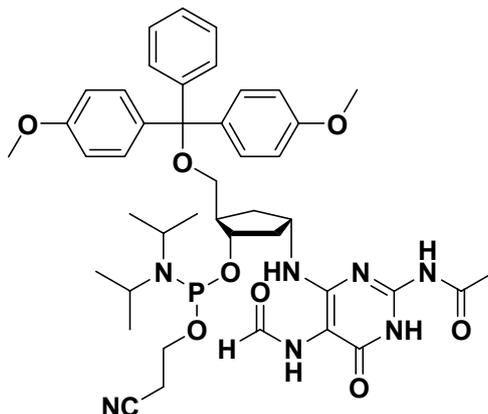
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.5-1.6$  (m, 2H, C2'H<sub>b</sub>), 1.83 (ddd,  $J = 13.0$  Hz, 8.9 Hz, 4.1 Hz, 1H, C5'H<sub>b</sub>), 2.0-2.1 (m, 2H, C4'H und C5'H<sub>a</sub>), 2.2-2.4 (m, 1H, C2'H<sub>a</sub>), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub> vom Acetyl), 2.9-3.0 (m, 2H, C1''H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.70 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub> vom DMT), 3.9-4.0 (m, 1H, C3'H), 4.3-4.5 (m, 1H, C1'H), 6.05 (d,  $J = 8.2$  Hz, 0.62H, NH<sub>*cis*-Formamid</sub> an C1'), 6.14 (d,  $^3J = 8.2$  Hz, 0.33H, NH<sub>*trans*-Formamid</sub> an C1'), 6.7-6.8 (m, 4H, 4 x CH<sub>arom.</sub> vom DMT), 7.2-7.3 (m, 9H, 9 x CH<sub>arom.</sub> vom DMT), 7.98 (d,  $^3J = 11.5$  Hz, 0.39H, NH<sub>*trans*-Formamid</sub>), 8.06 (d,  $^3J = 1.4$  Hz, 0.61H, NH<sub>*cis*-Formamid</sub>), 8.12 (d,  $^3J = 11.5$  Hz, 0.39H, CHO<sub>*trans*-Formamid</sub>), 8.75 (d,  $^3J = 1.4$  Hz, 0.61H, CHO<sub>*cis*-Formamid</sub>), 11.31 (br, 1H, NH), 11.34 (br, 1H, NH) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 23.5$  (C<sub>Methyl</sub> vom Acetyl), 35.3 (C2'), 41.4 (C5'), 46.2 (C3'), 49.8 (C1'), 54.6 (2 x OC<sub>Methyl</sub> vom DMT), 64.9 (C1''), 74.6 (C4'), 85.2 (C<sub>quartär</sub> vom DMT), 94.1 (C<sub>quartär</sub>), 112.2 (4 x C), 123.2, 126.1 (2 x C), 127.2 (2 x C), 127.5 (2 x C), 129.4 (4 x C), 135.4, 135.6, 144.6, 149.2, 155.2, 157.1, 157.8 (2 x C), 159.8, 172.6 ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 628$  [M+H]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für [C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup> = [M+H]<sup>+</sup>: 628.2771; gefunden 628.2776.

***N***-{4-3-Hydroxy-4-dimethoxytrityloxymethyl-cyclopentylamino-5-formylamino-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidin-2-yl}-acetamidphosphoramidit (**58**)



**80** (420 mg, 0.67 mmol), Dipropylammoniumtetrazolid (20 mg, 0.12 mmol) und 2-Cyanoethyl-tetrapropylphosphordiamidit (636  $\mu$ L, 2.0 mmol) wurden in Acetonitril (15 mL) suspendiert und bis zum vollständigen Umsatz noch sechs Stunden unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Das Acetonitril wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch säulenchromatographische Reinigung an deaktiviertem Kieselgel (50 mL Kieselgel [Deaktiviert mit 1 % Pyridin in Dichloromethan und Trocknung im Vakuum und anschließend im Trockenschrank], CHCl<sub>3</sub>:MeOH:Pyridin = 20:1:1) isoliert. Das Phosphoramidit **58** (468 mg, 0.57 mmol, 84 %) wurde in Form eines farblosen Films erhalten.

$R_f = 0.27$  (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3423$  s, 3242 s, 2962 m, 1655 s, 1584 s, 1510 s, 1444 m, 1415 m, 1365 w, 1250 s, 977 w, 728 w cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.9$ -1.3 (m, 12H, 4 x CH<sub>3</sub> vom -propyl), 1.3-1.5 (m, 2H, C2'H<sub>b</sub> und C5'H<sub>b</sub>), 1.6-1.8 (m, 1H, C5'H<sub>a</sub>), 1.8-2.0 (m, 2H, C2'H<sub>a</sub>, C4'H), 2.0-2.2 (m, 3H, CH<sub>3</sub> vom Acetyl), 2.3-2.4 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 2.5-2.6 (m, 2H, C1''H<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.6-2.7 (m, 2H, 2 x CH vom propyl), 3.0-3.2 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.5-3.7 (m, 3H, OCH<sub>3</sub> vom DMT), 3.7-3.8 (m, 4H, OCH<sub>3</sub> vom DMT und C3'H), 4.1-4.4 (m, 2H, C1'), 6.33 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 1H, NH<sub>cis/trans</sub>-Formamid an C1'), 6.7-6.8 (m, 3H, 3 x CH<sub>arom.</sub> vom DMT), 7.2-7.3 (m, 1H, CH<sub>arom.</sub> vom DMT), 7.2-7.4 (m, 6H, 6 x CH<sub>arom.</sub> vom DMT), 7.4-7.5 (m, 2H, 2 x CH<sub>arom.</sub> vom DMT), 7.6-7.7

## 6 - Experimenteller Teil

(m, 1H, CH<sub>arom.</sub> vom DMT), 7.7-7.8 (m, 1H, CHO<sub>cis/trans-Formamid</sub>), 8.22 (s, 1H, NH<sub>cis/trans-Formamid</sub>), 8.6-8.7 (m, 1H, NH), 10.5 (br, 1H, NH) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 20.6, 20.8, 24.6 (2 x C), 24.7 (2 x C), 24.8 (2 x C), 24.9 (2 x C), 34.7, 35.0, 41.0, 41.1, 43.2 (2 x C), 43.3 (2 x C), 45.5, 45.8, 50.3, 50.4, 50.7, 55.4, 57.3, 57.4, 57.9, 58.0, 64.1, 64.3, 75.5, 75.6, 86.0 (2 x C), 113.2, 113.4, 118.0, 118.2, 123.9, 126.9, 128.4 (2 x C), 128.5, 130.3, 130.4 (2 x C), 131.1, 136.2, 136.6, 145.5, 150.0, 154.7, 154.8, 168.6 (2 x C), 159.9, 171.8, 172.1 ppm;

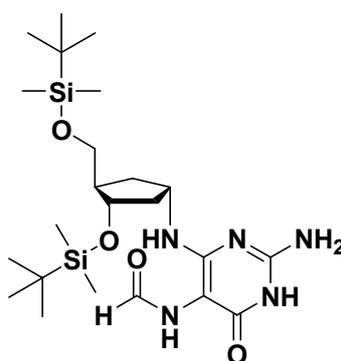
<sup>31</sup>P-NMR (81 Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 147.5, 148.4 ppm;

MS (ESI):  $m/z$  = 828 [M-H<sup>+</sup>];

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für [C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>P]<sup>-</sup> = [M-H<sup>+</sup>]: 828.3693; gefunden 828.3696.

### 6.2.5 Synthese der Referenzverbindung 78 zur Bestimmung der Rotationsbarrieren

*N*-{2-Amino-4-[3-(*tert*-butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-4-hydroxy-cyclopentylamino]-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidin-5-yl}-formamid (78)



Verbindung **77** (50 mg, 90  $\mu$ mol) wurden mit 0.05 M methanolischer Kaliumcarbonat-Lösung (5 mL) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit Methanol verdünnter Ameisensäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im HV entfernt und das so erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (50 mL Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>:MeOH 10:1) gereinigt. Man erhielt **78** (29 mg, 57  $\mu$ mol, 63 %) als farbloses Pulver.

R<sub>f</sub> = 0.10 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1);

Smp.: 179–182 °C (Zersetzung);

FTIR (KBr):  $\nu$  = 3421.3 s, 2955.9 s, 2928.1 s, 2855.6 m, 1648.0 s, 1593.2 s, 1487.5 m, 1419.1 w, 1361.8 m, 1254.9 m, 1165.4 w, 1079.9 m, 1005.2 w, 836.2 s, 775.6 m cm<sup>-1</sup>;

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 0.0-0.1$  (m, 12H, 4 x  $\text{CH}_3$  vom TBDMS), 0.8-0.9 (m, 18H, 2 x *tert*-Butyl vom TBDMS), 1.49 (tdd,  $^4J = 24.9$  Hz,  $^3J = 12.5$  Hz,  $^3J = 6.3$  Hz,  $^3J = 6.3$  Hz, 1H,  $\text{C5'H}_b$ ), 1.6-1.7 (m, 2H,  $\text{C2'H}_b$  und  $\text{C4'H}$ ), 1.9-2.2 (m, 2H,  $\text{C2'H}_a$  und  $\text{C5'H}_a$ ), 3.4-3.5 (m, 2H,  $\text{C1''H}_a\text{H}_b$ ), 3.9-4.0 (m, 1H,  $\text{C3'H}$ ), 4.3-4.4 (m, 1H,  $\text{C1'H}$ ), 5.73 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 0.54H,  $\text{NH}_{\text{cis-Formamid}}$  an  $\text{C1'}$ ), 6.02 (d,  $^3J = 8.2$  Hz, 0.44H,  $\text{NH}_{\text{trans-Formamid}}$  an  $\text{C1'}$ ), 6.24 (d,  $^3J = 28.3$  Hz, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.70 (s, 1H,  $\text{CHO}_{\text{cis-Formamid}}$  und  $\text{NH}_{\text{cis-Formamid}}$ ), 8.01 (d,  $^3J = 1.5$  Hz, 0.59H,  $\text{NH}_{\text{cis-Formamid}}$ ), 8.40 (d,  $^3J = 1.1$  Hz, 0.57H,  $\text{CHO}_{\text{cis-Formamid}}$ ), 10.01 (br, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = -5.4, -5.4, -4.6, -4.6, 14.1$  (2 x C), 18.1 (2 x C), 18.2, 18.4, 19.1, 22.7, 26.1, 35.3, 35.5, 41.7, 41.9, 49.5, 49.5, 51.4, 64.0, 64.2, 76.1, 76.8, 77.2, 88.2, 153.5, 154.0, 160.9, 162.0, 168.3 ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 512$   $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ , 550  $[\text{M}+\text{K}^+]^+$ ;

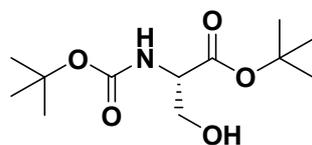
HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}_2]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 512.3083, gefunden 512.3079,  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}_2\text{K}]^+ = [\text{M}+\text{K}^+]^+$ : 550.2642, gefunden 550.2641.

## 6.3 Synthese von Aminosäurederivaten

### 6.3.1 Synthesestudien zum Pd(0)-spaltbaren Linker

#### 6.3.1.1 Darstellung der allyl-geschützten Aminosäurederivate - Edukte der Ozonolyse-Reaktionen

##### *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-serin-*tert*-butylester (87)



Unter Stickstoff wurden Boc-Ser-OH (2.1 g, 10 mmol) und Benzyltriethylammoniumchlorid (2.3 g, 10 mmol) in *N,N*-Dimethylacetamid (75 mL) gelöst. Nach Zugabe von Kaliumcarbonat (35.9 g, 260 mmol) und *tert*-Butylbromid (55.7 mL, 480 mmol) wurde die Reaktionsmischung für 20 h bei 55 °C gerührt. Der erkaltete Ansatz wurde in Eiswasser (1000 mL) eingetragen (Gasentwicklung) und die Mischung anschließend mit Ethylacetat (2 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 200 mL) und gesättigte Natriumchlorid-Lösung (150 mL) gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchroma-

tographisch gereinigt (750 mL Kieselgel, Hex:EtOAc 1:1). Es wurde das gewünschte Produkt **87** (2.3 g, 8.98 mmol, 89 %) in Form eines weißen kristallinen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.40$  (Hex:EtOAc = 2:1);

Smp.: 79-81 °C;

FTIR (ATR):  $\nu = 3271.4$  m, 2974.6 m, 1739.2 m, 1682.3 s, 1392.9 m, 1364.1 m, 1236.0 m, 1149.5 s, 1078.7 m, 1047.5 m, 930.0 w, 790.3 w  $\text{cm}^{-1}$ ;

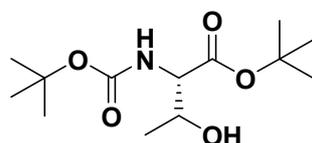
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.45$  (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.48 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.64 (s, 1H, OH), 3.9-4.0 (m, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 4.2-4.3 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 5.41 (s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 28.0$  (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.3 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 56.4 ( $\text{C}_\alpha$ ), 64.1 ( $\text{C}_\beta$ ), 80.1 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  vom *tert*-Butyl), 82.7 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  vom *tert*-Butyl), 155.9 (C=O vom Boc), 169.7 (C=O vom *tert*-Butylester) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 284$  [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_5\text{Na}]^+ = [\text{M}+\text{Na}^+]^+$ : 284.1468, gefunden 284.1474.

### *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-threonin-*tert*-butylester (**88**)



Boc-Thr-OH (2.19 g, 10 mmol) und Benzyltriethylammoniumchlorid (2.3 g, 10 mmol) wurden unter Schutzgasatmosphäre in *N,N*-Dimethylacetamid (75 mL) gelöst. Nach Zugabe von Kaliumcarbonat (35.9 g, 260 mmol) und *tert*-Butylbromid (55.7 mL, 480 mmol) ließ man die Reaktion auf 55 °C für 20 h bis zum vollständigen Umsatz des Eduktes reagieren. Der erkaltete Ansatz wurde in Eiswasser (1000 mL) gegossen und die Mischung anschließend mit Ethylacetat (2 x 200 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 x 200 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (1 x 150 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (750 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 1:1). Auf diesem Weg wurde das Produkt **88** in Form eines farblosen kristallinen Feststoffs erhalten (2.1 g, 7.45 mmol, 75 %). Für die Röntgenstrukturanalyse wurde eine Probe aus wenig heißem Heptan umkristallisiert.

$R_f = 0.36$  (Hex:EtOAc = 3:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3414.9$  w, 2978.7 m, 1698.5 m, 1504.6 m, 1366.3 m, 1249.4 m, 1149.2 s, 1060.0 w, 847.1 w  $\text{cm}^{-1}$ ;

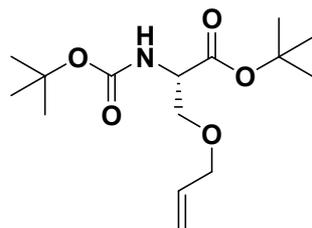
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.23$  (d, 3H,  $^3J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.48 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.87 (s, 1H, OH), 4.11 (d,  $^3J = 7.1$  Hz, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 4.2-4.3 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 5.24 (s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 19.9$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.0 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.3 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 59.2 ( $\text{C}_\omega$ ), 68.5 ( $\text{C}_\beta$ ), 79.9 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  vom *tert*-Butyl), 82.4 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  vom *tert*-Butyl), 155.4 (C=O vom Boc), 170.5 (C=O vom *tert*-Butylester) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 298$  [ $\text{M} + \text{Na}^+$ ]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_5\text{Na}]^+ = [\text{M} + \text{Na}^+]^+$ : 298.1625, gefunden 298.1629.

### *N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -*O*-allyl-L-serin-*tert*-butylester (**89**)



Unter Stickstoff wurden Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium (175 mg, 191  $\mu\text{mol}$ ) und 1,4-Bis(diphenylphosphino)butan (326 mg, 765  $\mu\text{mol}$ ) in trockenem THF (20 mL) suspendiert. Boc-Ser(OH)-*O-tert*-butylester **87** (2.0 g, 7.65 mmol) wurde unter Stickstoff in trockenem THF (25 mL) gelöst, Allylethylcarbonat (2.0 mL, 15.3 mmol) zugefügt und die Mischung zur Suspension mit dem Pd-Katalysator gegeben. Die violette Suspension wurde für 15 h bei 65 °C gerührt. Nach Erkalten wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt (500 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 20:1  $\rightarrow$  5:1). *N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -*O*-allyl-L-Serin-*tert*-butylester **89** (2.0 g, 6.59 mmol, 86 %) wurde in Form eines gelben Öls erhalten.

$R_f = 0.29$  (Hex:EtOAc = 10:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 2979$  w, 1714 s, 1496 m, 1366 m, 1248 m, 1150 s, 1060 m, 924 w, 848 w  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.43$  (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 3.62 (dd,  $^3J = 9.4$  Hz,  $^2J = 3.1$  Hz, 1H,  $\beta\text{-CHH}$ ), 3.80 (dd,  $^3J = 9.4$  Hz,  $^2J = 3.2$  Hz,

## 6 - Experimenteller Teil

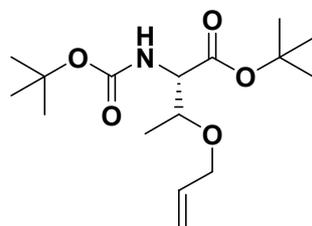
1H,  $\beta$ -CHH'), 3.92 (ddt,  $^4J = 13.0$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz,  $^2J = 1.5$  Hz, 1H, OCHH'-CH=CH<sub>2</sub>), 3.99 (ddt,  $^4J = 13.0$  Hz,  $^3J = 5.5$  Hz,  $^2J = 1.3$  Hz, 1H, OCHH'-CH=CH<sub>2</sub>), 4.28 (dt,  $^3J = 8.7$  Hz,  $^2J = 3.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 5.16 (dq,  $^3J = 10.4$  Hz,  $^2J = 1.7$  Hz, 1H, =CHH'), 5.23 (dq,  $^3J = 17.2$  Hz,  $^2J = 1.7$  Hz, 1H, =CHH'), 5.34 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H, NH), 5.8-5.9 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 28.0$  (3 x C<sub>Methyl</sub>), 28.3 (3 x C<sub>Methyl</sub>), 54.5 (C $\alpha$ ), 70.4 (C<sub>quartär</sub>), 72.2 (C<sub>quartär</sub>), 79.6 (C $\beta$ ), 81.9, 117.1, 134.2, 155.5, 169.7 ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 324$  [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für [C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>Na]<sup>+</sup> = [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>: 324.1781, gefunden 324.1787.

### *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -*O*-allyl-L-threonin-*tert*-butylester (12)



Unter Schutzgas wurden Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium (250 mg, 273  $\mu$ mol) und 1,4-Bis(diphenylphosphino)butan (465 mg, 1.1 mmol) in trockenem THF (30 mL) suspendiert. **88** (3.0 g, 10.9 mmol) wurde unter Stickstoff in trockenem THF (25 mL) gelöst, Allyl-ethylcarbonat (2.9 mL, 21.8 mmol) zugefügt und die Mischung zur Suspension mit dem Pd-Katalysator gegeben. Die violette Suspension wurde für 15 h bei 65 °C gerührt. Nach dem Erkalten wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgetrennt (700 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 20:1  $\rightarrow$  5:1). Verbindung **90** wurde so (2.45 g, 7.8 mmol, 71 %) in Form eines gelben Öls erhalten.

R<sub>f</sub> = 0.31 (Hex:EtOAc = 10:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 2978.4$  m, 1717.1 s, 1499.9 m, 1367.6 m, 1317.3 w, 1150.0 s, 1070.4 m, 922.2 w, 848.2 w cm<sup>-1</sup>;

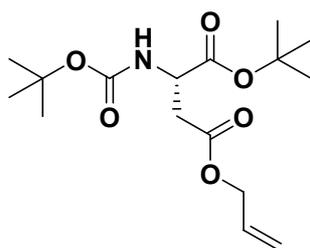
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.19$  (d, 3H,  $J = 6.3$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.46 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 3.85 (ddt,  $^4J = 12.6$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz,  $^2J = 1.5$  Hz, 1H, OCHH'-CH=CH<sub>2</sub>), 4.0-4.1 (m, 2H,  $\beta$ -CH und OCHH'-CH=CH<sub>2</sub>), 4.15 (dd,  $^3J = 9.7$  Hz,  $^2J = 2.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 5.13 (dq,  $^3J = 10.4$  Hz,  $^2J = 1.7$  Hz, 1H, =CHH'), 5.2-5.3 (m, 2H, =CHH'), 5.8-5.9 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>) ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 16.3$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.1 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.3 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 58.7 ( $\text{C}_\alpha$ ), 70.0, 75.0, 79.5, 81.7, 116.8, 134.6, 156.2 (C=O vom Boc), 170.1 (C=O vom *tert*-Butylester) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 316$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{NO}_5]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 316.2118, gefunden 316.2122.

### *N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\delta$ -*O*-allyl-L-asparaginsäure-*tert*-butylester (**84**)



Es wurden Boc-Asp(OAll)-OH (1.6 g, 6.0 mmol) und Benzyltriethylammoniumchlorid (1.4 g, 6.0 mmol) in *N,N*-Dimethylacetamid (45 mL) unter Stickstoff gelöst. Danach wurde Kaliumcarbonat (21.6 g, 156 mmol) und *tert*-Butylbromid (33.4 mL, 288 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h bei 55 °C gerührt. Der erkaltete Ansatz wurde in Eiswasser (600 mL) eingetragen (Gasentwicklung) und die Mischung anschließend mit Essigsäureethylester (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 200 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (150 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (700 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 5:1). Man erhielt das Produkt **84** (1.78 g, 5.40 mmol, 90 %) in Form eines orangen Öls.

$R_f = 0.37$  (Hex:EtOAc = 5:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3624.7$  m, 2977.4 m, 2512.0 m, 2159.9 s, 2027.0 s, 1713.2 m, 1494.4 m, 1366.3 m, 1148.8 s, 1023.1 m, 847.7  $\text{m cm}^{-1}$ ;

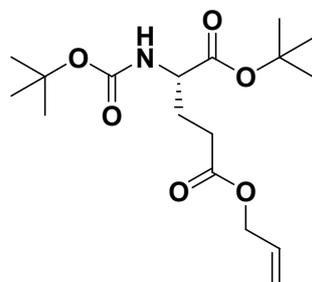
$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.43$  (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 2.79 (dd,  $^3J = 16.8$  Hz,  $^2J = 4.9$  Hz, 1H,  $\beta\text{-CHH}'$ ), 2.96 (dd,  $^3J = 16.8$  Hz,  $^2J = 4.5$  Hz, 1H,  $\beta\text{-CHH}$ ), 4.4-4.5 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 4.58 (dq,  $^3J = 5.7$  Hz,  $^2J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.23 (dq,  $^3J = 10.4$  Hz,  $^2J = 1.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}'$ ), 5.31 (dq,  $^3J = 17.2$  Hz,  $^2J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}$ ), 5.44 (d, 1H,  $^3J = 8.2$  Hz, NH), 5.8-5.9 (m, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ) ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 27.8$  (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.2 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 36.9 ( $\text{C}_\beta$ ), 50.4 ( $\text{C}_\alpha$ ), 65.4, 79.7, 82.2, 118.4, 131.7, 155.3, 169.8 (C=O vom Boc), 170.5 (C=O vom *tert*-Butylester) ppm;

MS (ESI):  $m/z = 328$   $[M-H]^+$ ;

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $[C_{16}H_{26}NO_6]^- = [M-H]^+$ : 328.1766, gefunden 328.1765.

### *N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\delta$ -*O*-allyl-L-glutaminsäure-*tert*-butylester (**85**)



Unter Stickstoff wurden Boc-Glu(OAll)-OH (2.9 g, 10 mmol) und Benzyltriethylammoniumchlorid (2.3 g, 10 mmol) in *N,N*-Dimethylacetamid (75 mL) gelöst. Es wurde Kaliumcarbonat (35.9 g, 260 mmol) und *tert*-Butylbromid (55.7 mL, 480 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h bei 55 °C gerührt. Nach dem Erkalten wurde die Mischung in Eiswasser (1000 mL) eingetragen (Gasentwicklung) und anschließend mit Ethylacetat (2 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 200 mL) und gesättigte Natriumchlorid-Lösung (150 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (1000 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 5:1). Das gewünschte Produkt **85** (3.0 g, 8.7 mmol, 87 %) wurde in Form eines weißen kristallinen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.31$  (Hex:EtOAc = 5:1);

Smp.: 39-41 °C;

FTIR (ATR):  $\nu = 3624$  m, 2929 m, 2512 m, 2159 s, 2028 s, 1713 m, 1503 m, 1366 m, 1148 s, 1048 m, 646  $m\text{ cm}^{-1}$ ;

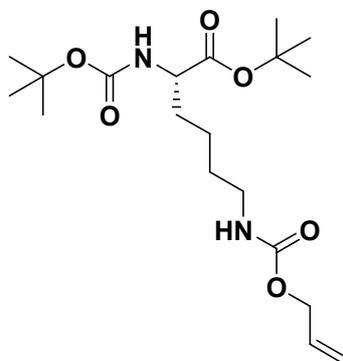
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.43$  (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.9-2.0 (m, 1H,  $\beta\text{-CHH}'$ ), 2.1-2.2 (m, 1H,  $\beta\text{-CHH}'$ ), 2.4-2.5 (m, 2H,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.2-4.3 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 4.5-4.6 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.07 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H, NH), 5.23 (dq,  $^3J = 10.4$  Hz,  $^2J = 1.3$  Hz, 1H,  $=\text{CHH}'$ ), 5.31 (dq,  $^3J = 17.2$  Hz,  $^2J = 1.5$  Hz, 1H,  $=\text{CHH}'$ ), 5.9-6.0 (m, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 28.0$  (3 x  $C_\beta$ ), 28.3 ( $C_\gamma$ ), 28.9 (3 x  $C_{\text{Methyl}}$ ), 30.3 (3 x  $C_{\text{Methyl}}$ ), 53.4 ( $C_\omega$ ), 65.3, 79.8, 82.2, 118.3, 132.1, 155.4, 171.3 (C=O vom Boc), 172.5 (C=O vom *tert*-Butylester) ppm;

MS (ESI $^+$ ):  $m/z = 366$   $[M+\text{Na}]^+$ ;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[C_{17}H_{29}NO_6Na]^+ = [M+Na]^+$ : 366.1887, gefunden 366.1891.

***N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\epsilon$ -*N*-allyloxycarbonyl-L-lysin-*tert*-butylester (101)**



In *N,N*-Dimethylacetamid (45 mL) wurden Boc-Lys( $\epsilon$ -*N*-Alloc)-OH x DCHA (3.1 g, 6.0 mmol) und Benzyltriethylammoniumchlorid (1.4 g, 6.0 mmol) unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Es wurden Kaliumcarbonat (21.6 g, 156 mmol) und *tert*-Butylbromid (33.4 mL, 288 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h bei 55 °C gerührt. Der erkaltete Ansatz wurde in Eiswasser (600 mL) eingetragen (Gasentwicklung), wobei sich ein weißes Präzipitat bildete. Dieses löste sich sukzessive bei der folgenden Extraktion mit Ethylacetat (4 x 150 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 150 mL) und gesättigte Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (1000 mL Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 20:1). Man erhielt Verbindung **101** (2.2 g, 5.6 mmol, 93 %) in Form eines farblosen Öls.

$R_f = 0.33$  (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 20:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3340.5$  m, 2929.8 m, 2510.3 m, 2159.0 s, 2027.1 s, 1694.4 s, 1519.7 m, 1366.3 m, 1246.2 m, 1150.8 s, 1021.1 m, 926.0 m, 847.4 m cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.3$ -1.4 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.46 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.6-1.7 (m, 2H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 1.6-1.7 (m, 1H,  $\beta$ -CHH'), 1.7-1.8 (m, 1H,  $\beta$ -CHH'), 3.1-3.2 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 4.1-4.2 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 4.55 (d, <sup>3</sup> $J = 4.9$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4.78 (s, 1H, NH), 5.05 (d, <sup>3</sup> $J = 5.5$  Hz, 1H, NH), 5.20 (d, <sup>3</sup> $J = 10.4$  Hz, 1H, =CHH'), 5.29 (d, <sup>3</sup> $J = 16.4$  Hz, 1H, =CHH'), 5.9-6.0 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>) ppm;

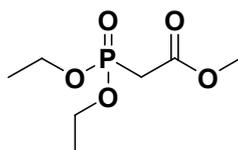
<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 22.3$  (C $_{\gamma}$ ), 28.0 (3 x C<sub>Methyl</sub>), 28.3 (3 x C<sub>Methyl</sub>), 32.7 (3 x C), 40.7, 53.7 (C $_{\omega}$ ), 65.4, 79.7 (C<sub>quartär</sub>), 81.8 (C<sub>quartär</sub>), 117.6, 133.0, 155.5, 156.3, 171.9 ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 409$  [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für [C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na]<sup>+</sup> = [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>: 409.2309, gefunden 409.2315.

### 6.3.1.2 Darstellung der Phosphonate 91 und 92

#### Diethyl-formylmethylester-methylphosphonat (91)



Bromessigsäuremethylester (10 mL, 110 mmol) und Triethylphosphit (19 mL, 110 mmol) wurden gemischt und bei 100 °C für 15 h gerührt. Das Produkt ist nach dem Entfernen von Resten flüchtiger Substanzen im Hochvakuum bei 80 °C über Nacht ohne weitere Reinigung sauber genug für weitere Umsetzungen. Das gewünschte Phosphonat **91** (15.5 g, 73.8 mmol) konnte auf diesem Weg mit einer Ausbeute von 66 % in Form eines farblosen Öls erhalten werden.

$R_f = 0.17$  (Hex:EtOAc = 1:1);

FTIR (KBr):  $\nu = 2987.3$  m, 1743.6 s, 1438.0 m, 1394.9 m, 1277.3 s, 1164.1 m, 1121.2 m, 1025.1 s, 971.6 s, 896.4 m, 841.3 w, 783.0 w, 616.1 w, 488.7 w cm<sup>-1</sup>;

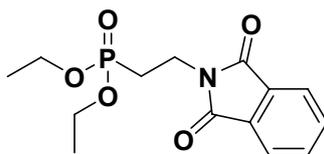
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.33$  (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2.93 (d, <sup>3</sup>J = 19.2 Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.1-4.2 (m, 4H, 2 x CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O) ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 16.2$  (C<sub>Methyl</sub>), 16.3 (C<sub>Methyl</sub>), 33.5 (P-CH<sub>2</sub>-C=O), 52.5 (C<sub>Methyl</sub> vom Methylester), 62.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 62.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 166.3 (C=O) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 443$  [2M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für [C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>Na]<sup>+</sup> = [2M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>: 443.1206, gefunden 443.1203.

## Diethyl-2-(1,3-dioxindolin-2-yl)-ethylphosphonat (92)



*N*-(2-Bromomethyl)-phthalimid (5.0 g, 19.7 mmol) und Triethylphosphit (18.0 mL, 104 mmol) wurden gemischt und bei 160 °C über Nacht unter Rühren refluxiert. Es wurde der Rückflusskühler entfernt und die Reaktionsmischung bei 120 °C für weitere 20 h gerührt. Durch eine sich anschließende Destillation im Hochvakuum (100 °C,  $5 \times 10^{-2}$  mbar) wurden Eduktrückstände abgetrennt. **92** (3.6 g, 11.7 mmol, 59 %) wurde in Form eines farblosen Öls erhalten.

$R_f = 0.15$  (Hex:EtOAc = 1:1);

FTIR (KBr):  $\nu = 2984.7$  w, 1774.3 m, 1716.1 s, 1443.0 m, 1398.7 m, 1363.2 m, 1267.9 m, 1164.5 w, 1027.8 s, 970.0 m, 862.1 w, 794.3 w, 720.3 m, 530.8 w, 488.4 w  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.29$  (t,  $^2J = 7.1$  Hz, 6H, 2 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.2-2.3 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.9-4.0 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.1-4.2 (m, 4H, 2 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.7-7.8 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.8-7.9 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) ppm;

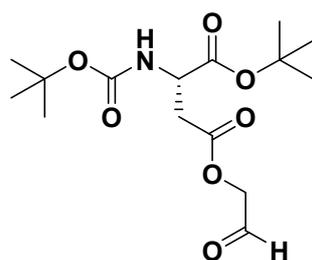
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 16.3$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 16.4 ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 24.1, 32.2, 61.8 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 61.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 132.1 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.0 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.2 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 167.8 (2 x  $\text{C=O}$ ) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 312$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{P}]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 312.0995, gefunden 312.0995.

### 6.3.1.3 Darstellung der Aminosäurealdehyde durch Ozonolysen mit reduktiver Aufarbeitung

#### *N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\gamma$ -*O*-formylmethyl-L-asparaginsäure-*tert*-butylester (96)



*N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -*O*-allyl-L-serin-*tert*-butylester **89** (1.4 g, 4.3 mmol) wurde unter Stickstoff in absolutem Dichlormethan (50 mL) gelöst und mit absolutem Ethanol (2 mL) versetzt. Anschließend wurde bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Rühren eine Sauerstoff-Ozon-Mischung durch die Lösung geleitet, bis eine hellblaue Farbe verblieb. Die Reaktionsmischung wurde weitere 30 Minuten bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und durch Zugabe von Dimethylsulfid (5 mL) *gequencht*. Nach dem Entfernen des Kältebades wurde die farblose Lösung für eine weitere Stunde bei RT gerührt. Nach dem Einengen der Reaktionsmischung im Hochvakuum wurde das Rohprodukt an Kieselgel gereinigt (50 mL Kieselgel, "Säulenfiltration", Hex:EtOAc = 10:1  $\rightarrow$  1:1). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnte der Aldehyd **96** in für die Analyse ausreichenden Mengen erhalten werden.

$R_f = 0.54$  (Hex:EtOAc = 1:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 2978.3\text{ w}, 1715.6\text{ m}, 1503.4\text{ w}, 1367.1\text{ m}, 1249.0\text{ m}, 1150.0\text{ s}, 1048.7\text{ m}, 846.9\text{ w cm}^{-1}$ ;

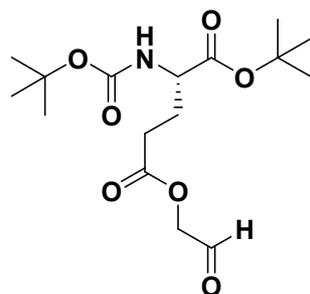
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.44$  (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 2.94 (dd,  $^3J = 16.7\text{ Hz}, ^2J = 4.9\text{ Hz}$ , 1H,  $\beta\text{-CHH}'$ ), 3.06 (dd, 1H,  $^3J = 16.8\text{ Hz}, ^2J = 4.5\text{ Hz}$ , 1H,  $\beta\text{-CHH}'$ ), 4.4-4.5 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 4.64 (d,  $^3J = 17.4\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{OCHH}'\text{CHO}$ ), 4.72 (d,  $^3J = 17.4\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{OCHH}'\text{CHO}$ ), 5.48 (d,  $^3J = 7.8\text{ Hz}$ , 1H, NH), 9.59 (s, 1H, CHO) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 27.8$  (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.3 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 36.7 ( $\text{C}_\beta$ ), 50.5 ( $\text{C}_\alpha$ ), 68.8 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 80.0 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 82.6 ( $\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 155.4 (C=O), 169.7 (C=O), 170.3 (C=O), 195.2 (CHO) ppm;

MS (ESI):  $m/z = 330$  [ $\text{M-H}^+$ ];

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_7]^+ = [\text{M-H}^+]$ : 330.1558, gefunden 330.1556.

### *N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\delta$ -*O*-formylmethyl-L-glutaminsäure-*tert*-butylester (**94**)



*N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\delta$ -*O*-allyl-L-glutaminsäure-*tert*-butylester **85** (680 mg, 2.0 mmol) wurde unter Stickstoff in absolutem Dichlormethan (50 mL) gelöst und mit trockenem Etha-

nol (2 mL) versetzt. Anschließend wurde bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Rühren ein Sauerstoff-Ozon-Gemisch durch die Lösung geleitet, bis die Lösung eine hellblaue Farbe zeigte. Nach Zugabe von Dimethylsulfid (5 mL) wurde das Kältebad entfernt und die wieder farblose Lösung für 1.5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel filtriert (50 mL Kieselgel, "Säulenfiltration", EtOAc), das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt und der so erhaltene Aldehyd **94** (691 mg, 2.0 mmol, quantitativ) über Nacht im Hochvakuum vom restlichen Lösungsmittel befreit.

$R_f = 0.44$  (Hex:EtOAc = 1:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 2978.4\text{ w}, 1715.1\text{ m}, 1503.9\text{ w}, 1367.7\text{ m}, 1248.0\text{ m}, 1150.9\text{ s}, 1047.1\text{ m}, 846.2\text{ w cm}^{-1}$ ;

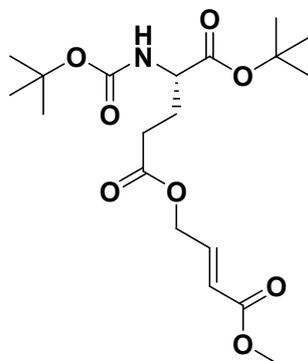
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.43$  (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.46 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.9-2.0 (m, 1H,  $\beta\text{-CHH}'$ ), 2.2-2.3 (m, 1H,  $\beta\text{-CHH}$ ), 2.5-2.6 (m, 2H,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.2-4.3 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 4.66 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CHO}$ ), 5.10 (d,  $^3J = 6.9\text{ Hz}$ , 1H, NH), 9.60 (s, 1H, CHO) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 28.0$  (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$  und  $\text{C}_\gamma$ ), 28.3 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 29.8 ( $\text{C}_\beta$ ), 53.2 ( $\text{C}_\alpha$ ), 68.7 ( $\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 82.2 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 82.3 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 155.4 (C=O vom Boc), 171.2 (C=O), 172.2 (C=O), 195.8 (CHO) ppm;

MS (ESI):  $m/z = 344$  [ $\text{M-H}^+$ ];

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_7]^-$  [ $\text{M-H}^+$ ]: 344.1715, gefunden 345.1714.

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- $\delta$ -*O*-but-2-en-säuremethylester-L-glutaminsäure-*tert*-butylester (98)**



**91** (454 mg, 2.5 mmol) wurde unter Stickstoff in trockenem THF (25 mL) gelöst und bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  langsam in eine 1 *M* Lösung von Lithiumhexamethyldisilazid in THF (2.2 mL, 2.2 mmol)

gegeben. Die gelbe Reaktionsmischung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gebracht und der Aldehyd **94** (690 mg, 2.0 mmol) in absolutem THF (15 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach dem Quenchen der Reaktion durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (50 mL) wurde die wässrige Phase mit Diethylether (3\*100 mL) extrahiert. Die etherischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (200 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 5:1  $\rightarrow$  3:1) und Verbindung **98** (127 mg, 316  $\mu\text{mol}$ ) mit einer moderaten Ausbeute von 16 % in Form eines farblosen Öls neben dem Edukt erhalten.

$R_f$  0.39 (Hex:EtOAc = 4:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 2978.8\text{ w}, 1712.2\text{ s}, 1507.5\text{ w}, 1438.1\text{ w}, 1366.0\text{ m}, 1251.0\text{ m}, 1148.7\text{ s}, 1947.3\text{ w}, 846.2\text{ w cm}^{-1}$ ;

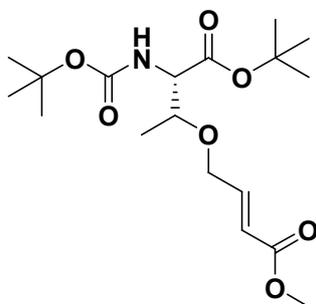
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.39$  (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.43 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.8-1.9 (m, 1H,  $\beta\text{-CHH}'$ ), 2.1-2.2 (m, 1H,  $\beta\text{-CHH}$ ), 2.4-2.5 (m, 2H,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 3.71 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.1-4.2 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 4.7-4.8 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{-CH=}$ ), 5.00 (d,  $^3J = 7.8\text{ Hz}$ , 1H, NH), 5.99 (dt,  $^3J = 15.8\text{ Hz}$ ,  $^2J = 1.9\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{OCH}_2\text{-CH=CH-CO}_2\text{CH}_3$ ), 6.90 (dt,  $^3J = 15.8\text{ Hz}$ ,  $^2J = 4.6\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{OCH}_2\text{-CH=CH-CO}_2\text{CH}_3$ ) ppm;

$^{13}\text{C NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 27.9$  (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.0 ( $\text{C}_\beta$ ), 28.2 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 30.0 ( $\text{C}_\gamma$ ), 51.6 ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 53.2 ( $\text{C}_\alpha$ ), 62.6 ( $\text{OCH}_2$ ), 79.7 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 82.2 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 121.9, 141.2, 155.3 (C=O vom Boc), 166.1 (C=O), 171.2 (C=O), 172.0 (C=O) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 402$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

HR-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{NO}_8]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 402.2122, gefunden 402.2126.

### *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- $\delta$ -*O*-but-2-en-säuremethylester-L-threonin-*tert*-butylester (**99**)



**90** (1.5 g, 4.6 mmol) wurde unter Stickstoff in absolutem Dichlormethan (50 mL) gelöst und mit trockenem Ethanol (2 mL) versetzt. Anschließend wurde die Lösung auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und unter Rühren ein Sauerstoff-Ozon-Gemisch eingeleitet, bis eine blaue Verfärbung

auftrat. Nach Zugabe von Dimethylsulfid (5 mL) wurde die farblose Reaktionsmischung auf  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und für 30 Minuten gerührt. **91** (1.0 g, 4.8 mmol) wurde unter Stickstoff in absolutem Dichlormethan (15 mL) gelöst und bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  langsam mit einer 1 M Lösung von Lithiumhexamethyldisilazid in THF (11.6 mL, 11.6 mmol) versetzt. Nach 30 Minuten Rühren wurde die gelbe Lösung bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  zur Lösung des Ozonolyseproduktes **97** gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Durch die Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (50 mL) wurde die Reaktion beendet und 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde anschließend mit Diethylether (3 x 150 mL) extrahiert und die etherische Phase mit Wasser (2 x 200 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (150 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (600 mL Kieselgel, Toluol:EtOAc = 10:1). Verbindung **99** (712 mg, 1.91 mmol, 41 %) konnte auf diesem Weg in Form eines farblosen Öls erhalten werden.

$R_f = 0.27$  (Toluol: EtOAc = 10:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 2978.5\text{ w}, 1716.2\text{ s}, 1501.8\text{ m}, 1367.6\text{ m}, 1302.0\text{ m}, 1151.0\text{ s}, 1071.9\text{ m}, 967.3\text{ w}, 847.1\text{ w}, 756.4\text{ w cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.19$  (d,  $^3J = 6.3\text{ Hz}$ , 3H,  $\beta\text{-CH}_3$ ), 1.44 (s, 18H, *tert*-Butyl vom Ester und *tert*-Butyl vom Boc), 3.71 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.0-4.1 (m, 2H,  $\beta\text{-CH}$  und  $\text{OCHH}'\text{-CH=}$ ), 4.1-4.2 (m, 2H,  $\alpha\text{-CH}$  und  $\text{OCHH}'\text{-CH=}$ ), 5.16 (d,  $^3J = 9.6\text{ Hz}$ , 1H, NH), 6.0-6.1 (m, 1H,  $\text{OCH}_2\text{-CH=CH-CO}_2\text{CH}_3$ ), 6.8-6.9 (m, 1H,  $\text{OCH}_2\text{-CH=CH-CO}_2\text{CH}_3$ ) ppm;

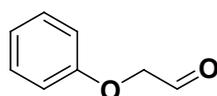
$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 16.3$  ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.0 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 28.3 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 51.5 ( $\text{C}_{\text{Methyl}}$ ), 58.4 ( $\text{C}_\alpha$ ), 67.5, 75.9, 79.6, 81.9, 120.7, 144.1, 156.0 (C=O vom Boc), 166.6 (C=O vom Methylester), 169.8 (C=O vom *tert*-Butylester) ppm;

MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z = 373$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ;

HR-MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_7]^+ = [\text{M}]^+$ : 373.2101, gefunden 373.2081.

### 6.3.2 Modellverbindungen der HWE-Reaktion

#### Phenoxyacetaldehyd (104)



Allylphenylether (490  $\mu\text{L}$ , 3.73 mmol) wurde in Dichlormethan (30 mL) und absolutem Ethanol (2 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  abgekühlt und so lange ein Sauerstoff/Ozon-Gemisch mittels eines Ozongenerators eingeleitet, bis sich die Lösung leicht blau färbte (30 Minuten). Es wurde mit Dimethylsulfid (4 mL) *gequencht* und für weitere 45 Minuten gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Phenoxyacetaldehyd wurde ohne weitere Aufarbeitung in die anschließende Reaktion eingesetzt.

$R_f = 0.49$  (Hex:EtOAc = 2:1);

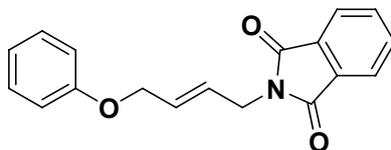
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.55$  (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.7-6.8 (m, 2H, 2 x  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7.0-7.1 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7.3-7.4 (m, 2H, 2 x  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 9.84 (s, 1H, CHO) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 72.9$  ( $\text{OCH}_2$ ), 114.8 (2 x  $\text{C}_{\text{ortho}}$ ), 122.2 ( $\text{C}_{\text{para}}$ ), 130.0 (2 x  $\text{C}_{\text{meta}}$ ), 199.7 (CHO) ppm;

MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z = 136$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ;

HR-MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2]^+ = [\text{M}]^+$ : 136.0524, gefunden 136.0526.

### 2-(4-Phenoxy-but-2-enyl)-isoindol-1,3-dion (103)



1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol [HFI] (456  $\mu\text{L}$ , 4.4 mmol) wurde in absolutem DMF (10 mL) auf  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt, mit einer *n*-BuLi-Lösung in Hexan (1.6 M, 2.75 mL, 4.4 mmol) versetzt und für 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde das Phthalimidphosphonat **92** (1.39 g, 4.5 mmol) in die Lösung gegeben und die Reaktionsmischung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  für eine Stunde gerührt. Der Aldehyd **104** wurde in DMF (15 mL) gelöst und auf  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu dieser Lösung wurde die zuvor hergestellte Ylid-Lösung in DMF ebenfalls auf  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 22 h gerührt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (50 mL) beendet und anschließend für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3 x 150 mL) extrahiert und die vereinigten etherischen Phasen mit  $d_4\text{H}_2\text{O}$  (2 x 150 mL) und mit ges. Natriumchlorid-Lösung (200 mL) gewaschen. Anschließend wurde die Lösung über trockenem Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (600 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 4:1) gereinigt und so das Produkt **103** in Form eines gelben Öles (181 mg, 933  $\mu\text{mol}$ , 25% Gesamtausbeute) erhalten.

$R_f = 0.60$  (Hex:EtOAc = 2:1);

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.8\text{-}3.9$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 4.0-4.1 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 6.9-7.0 (m, 5H, 5 x Phenyl- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.1-7.2 (m, 2H, 2 x Phenyl- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.6-7.7 (m, 2H, 2 x Phtalimid- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.78 (d,  $^2J = 1.5$  Hz, 2H, 2 x Phtalimid- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) ppm;

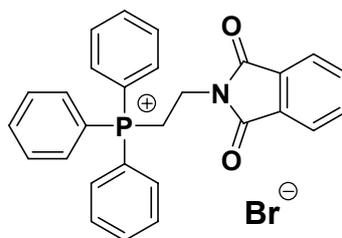
$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 61.1$  ( $\text{NCH}_2$ ), 115.4 ( $\text{OCH}_2$ ), 115.5, 121.3, 122.3, 128.4, 128.5, 128.7, 131.0, 133.1, 157.5, 166.8 (2 x C=O) ppm;

MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z = 293$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ;

HR-MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3]^+$  [ $\text{M}$ ] $^+$ : 293.1052, gefunden 293.1058.

### 6.3.3 Darstellung des Wittigreagenzes **105**

#### 2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-ethyl-triphenyl-phosphoniumbromid (**105**)



Es wurden 2-Bromethylphthalimid (5.26 g, 20.7 mmol) und Triphenylphosphin (10.85 g, 41.4 mmol) in Acetonitril (40 mL) gelöst und 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Feststoff anschließend in einer Fritte mit Toluol gewaschen. Das Produkt wurde im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt **105** in Form eines weißen Feststoffs (4.1 g, 7.9 mmol, 38 %).

$R_f = 0.71$  (Hex:EtOAc = 4:1);

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.2\text{-}4.3$  (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.6-4.7 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 7.2-7.3 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.5-7.6 (m, 11H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.8-7.9 (m, 6H, 3 x  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) ppm;

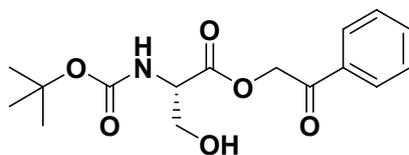
$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 117.5$ , 118.6, 123.7 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.9 (3 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 130.9 (6 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 131.8 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.0 (6 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 135.3 (3 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 135.4 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 167.9 (2 x C=O) ppm;

MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z = 463$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ;

HR-MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  ber.  $[\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{P}]^+ = [\text{M}]^+$ : 463.1461, gefunden 463.1469.

### 6.3.4 Synthesestudien zur Darstellung von Di-*tert*-Butyl-disilylethern

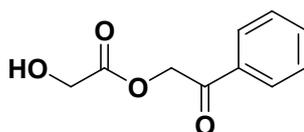
#### *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-serin-phenacylester (110)



In trockenem DMF (5 mL) wurden Kaliumfluorid (639 mg, 11.0 mmol) und Phenacylbromid (995 mg, 5.0 mmol) suspendiert. Hierzu wurde *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-serin (1.0 g, 5.0 mmol) gegeben und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O (30 mL) versetzt und mit Diethylether (60 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde erneut mit Diethylether (3 x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (250 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 3:2 → 1:1) wurde Verbindung **110** in Form eines weißen, kristallinen Feststoffs erhalten (1.5 g, 4.5 mmol, 90 %).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmten mit denen in der Literatur berichteten überein.<sup>[200]</sup>

#### Hydroxyessigsäure-2-oxo-2-phenyl-ethylester (111)



Bromacetophenon (1.99 g, 10 mmol) und Kaliumfluorid (1.28 g, 22 mmol) wurden in 10 mL DMF gelöst und nach 10 min mit Glycolsäure (0.76 g, 10 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 18 h bei RT gerührt. Danach wurde mit vollentsalztem Wasser (3 x 50 mL) und die wässrige Phase nachfolgend mit Diethylether (3 x 75 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit *dd*H<sub>2</sub>O (5 x 150 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Phase wurde nochmals dreimal mit Diethylether (150 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt **111** (1.1 g, 5.8 mmol, 58 %) in Form farbloser Schuppen.

$R_f = 0.15$  (Hex:EtOAc = 2:1);

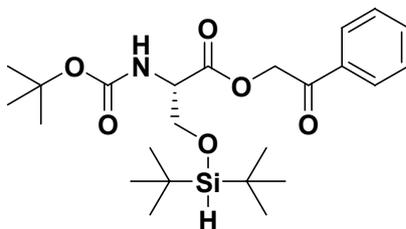
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.64$  (br, 1H, OH), 4.32 (s, 1H,  $\text{HOCH}_2\text{COOR}$ ), 5.38 (s, 2H,  $\text{COOCH}_2\text{COR}$ ), 7.4-7.5 (m, 2H, meta- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.54 (d,  $^3J = 3.6$  Hz, 1H, para- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.83 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 2H, ortho- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 61.0$  ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 66.9 ( $\text{OCH}_2\text{C=O}$ ), 128.1 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 129.4 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.3 (para- $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.5 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 173.2 (C=O vom Ester), 191.9 (C=O vom Keton) ppm;

MS (EI<sup>+</sup>):  $m/z = 194$  [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>;

HR-MS (EI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4]^+ = [\text{M}]^+$ : 194.0579, gefunden 194.0587.

### 2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-di-*tert*-butyl-silanyloxy-propionsäure-2-oxo-2-phenylethylester (114)



4-DMAP (12 mg, 0.1 mmol), Triethylamin (0.11 g, 1.1 mmol), Di-*tert*-butylchlorsilan und das Serinderivat **110** (260 mg, 800  $\mu\text{mol}$ ) wurden in Dichlormethan (2.5 mL) gelöst und die Reaktionsmischung unter Stickstoffatmosphäre 5 h bei RT gerührt. Anschließend wurden das Lösungsmittel und das verbliebene Di-*tert*-butylchlorsilan 14 h bei 50 °C im Hochvakuum abdestilliert. Verbindung **114** wurde in Form eines farblosen Öls erhalten (238 mg, 512  $\mu\text{mol}$ , 64 %).

$R_f = 0.39$  (Hex:EtOAc = 4:1);

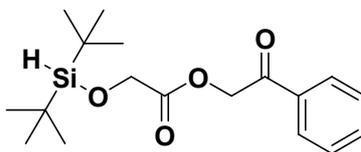
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.96$  (d,  $^3J = 11.6$  Hz, 18H, 2 x *tert*-Butyl), 1.39 (s, 9H, *tert*-Butyl), 3.93 (s, 1H, SiH), 4.10 (br, 1H, NH), 4.2-4.3 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 4.5-4.6 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  vom Phenylester), 5.3-5.4 (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), 7.4-7.5 (m, 2H, meta- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.5-7.6 (m, 1H, para- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.88 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 2H, ortho- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.6$  (2 x Si- $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 27.5 (6 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom Si(*tert*-Butyl)<sub>2</sub>), 28.7 (3 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom Boc), 65.5 ( $\text{C}_\alpha$ ), 67.0 ( $\text{C}_\beta$ ), 67.4 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 128.8 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 129.3 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.3 (para- $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.5, 155.5 (C=O vom Boc), 170.4 (C=O vom Phenylester), 191.5 (C=O vom Keton) ppm;

MS (EI):  $m/z = 464$   $[M-H]^+$ ;

HR-MS (EI):  $m/z$  berechnet für  $[C_{24}H_{38}NO_6Si]^- = [M-H]^+$ : 464.2474, gefunden 464.2491.

### Di-*tert*-butyl-silanyloxy-essigsäure-phenacylester (112)



Hydroxyessigsäurephenacylester **111** (144 mg, 1.0 mmol), Triethylamin (11 mg, 1.1 mmol) und DMAP (12 mg, 0.1 mmol) wurden in Dichlormethan (10 mL) gelöst. Anschließend wurde Di-*tert*-butylchlorsilan (222  $\mu$ L, 1.1 mmol) in Dichlormethan (2 mL) langsam bei 0 °C zur Reaktionsmischung zugegeben. Nach einer Stunde wurde das Volumen der Reaktionsmischung *in vacuo* auf ca. 4 mL eingengt und für vier Stunden unter Schutzgasatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (100 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 10:1). Die Verbindung **112** (148 mg, 440  $\mu$ mol, 44%) wurde in Form eines farblosen Öls erhalten.

$R_f = 0.56$  (Hex:EtOAc = 4:1);

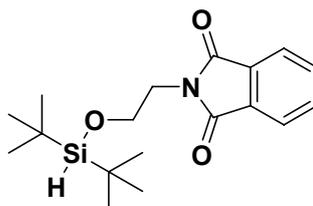
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.03$  (s, 18H, 2 x *t*-Butyl), 4.04 (s, 1H, SiH), 4.55 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  vom Phenacylester), 5.39 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.4-7.5 (m, 2H, meta- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.6-7.7 (m, 1H, para- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.90 (d, 2H,  $^3J = 12.0$  Hz, ortho- $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.6$  (2 x Si- $\text{C}_{\text{quartär}}$ ), 27.3 (6 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom Si(*tert*-Butyl) $_2$ ), 64.9 (SiO $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ ), 66.2 (O $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ ), 128.0 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 129.1 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.1 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.4 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 170.9 (C=O), 191.9 (C=O) ppm;

MS (EI):  $m/z = 335$   $[M-H]^+$ ;

HR-MS (EI):  $m/z$  berechnet für  $[C_{18}H_{27}O_4Si]^- = [M-H]^+$ : 335.1684, gefunden 335.1688;

Elementaranalyse: berechnet 64.3 % C, 8.4 % H, gefunden: 63.61 % C, 8.52 % H.

2-(2-Di-*tert*-butyl-silanyloxy-ethyl)-isoindol-1,3-dion (113)

2-Hydroxyethyl-phtalimid (190 mg, 1.0 mmol) wurde in Dichlormethan (5 mL) gelöst und zu dieser Lösung Triethylamin (150  $\mu$ L, 1.1 mmol) und 4-DMAP (12 mg, 0.10 mmol) gegeben. Nachdem die Reaktionsmischung vollständig klar wurde diese langsam mit Di-*tert*-butylchlorosilan (220  $\mu$ L, 1.10 mmol) versetzt. Die Mischung wurde für 18 h unter Stickstoffatmosphäre bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo* wurde das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (100 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 10:1) und die gewünschte Verbindung **113** in Form eines farblosen Öls erhalten (253 mg, 760  $\mu$ mol, 76 %).

$R_f = 0.60$  (Hex:EtOAc = 4:1);

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.86$  (s, 18H, 2 x *t*-Butyl), 3.8-3.9 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.88 (s, 1H, SiH), 3.9-4.0 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.6-7.7 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.7-7.8 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.6$  (2 x  $\text{Si-C}_{\text{quartär}}$ ), 27.3 (6 x  $\text{C}_{\text{Methyl}}$  vom Si(*tert*-Butyl) $_2$ ), 40.2 ( $\text{NCH}_2$ ), 63.8 ( $\text{OCH}_2$ ), 123.4 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 132.4 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 134.1 (2 x  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 168.5 (2 x C=O) ppm;

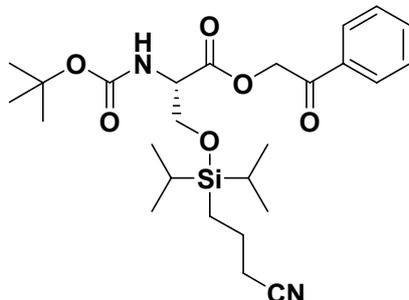
MS (EI $^+$ ):  $m/z = 333$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ;

HR-MS (EI):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_3\text{Si}]^- = [\text{M}-\text{H}^+]$ : 332.1687, gefunden 332.1670.

Elementaranalyse: berechnet: 4.5 % N, 64.9 % C, 8.1 % H. gefunden 4.03 % N, 63.56 % C, 8.21 % H.

### 6.3.5 Synthese der Zielverbindung 120

#### *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -*O*-(3-cyanopropyl)-diisopropyl-silanyl-L-serin-phenacylester (117)



Unter Stickstoffatmosphäre und bei 0 °C wurde (3-Cyanopropyl)-diisopropyl-chlorosilan (818  $\mu$ L, 3.6 mmol) vorgelegt und in trockenem Pyridin (2 mL) gelöst. Hierzu wurde das Phenacylester-geschützte Boc-L-Serin **110** (1.1 g, 3.3 mmol, 1.0 eq.) in trockenem Pyridin (3 mL) tropfenweise bei 0 °C hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktion für 20 Stunden bei RT gerührt, wobei nach einiger Zeit das Ausfallen eines weißen Feststoffs (Pyridiniumsalze) beobachtet wurde. Dann wurde mit H<sub>2</sub>O (50 mL) versetzt und mit CHCl<sub>3</sub> (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (2 x 80 mL), mit gesättigter, wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 80 mL), mit H<sub>2</sub>O (2 x 80 mL) und mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen. Daraufhin erfolgte Trocknung über MgSO<sub>4</sub> und die Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo*. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohprodukts (400 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 5:1 → 3:1) erhielt man Verbindung **117** in Form eines farblosen Öls (1.49 g, 2.95 mmol, 89 %).

$R_f = 0.22$  (Hex:EtOAc = 5:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3451.5$  w, 2941.7 s, 2892.9 m, 2866.3 s, 2247.0 w, 1757.1 m, 1705.2 s, 1598.8 w, 1500.4 m, 1463.5 m, 1424.3 m, 1367.9 m, 1161.2 s, 1114.0 m, 1070.7 m, 730.5 s, 688.4  $\text{cm}^{-1}$ ;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.7-0.8$  (m, 2H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 0.9-1.0 (m, 14H, 2 x *tert*-Butyl am Silizium), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.7-1.8 (m, 2H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.34 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz, 2H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 4.00 (dd, <sup>3</sup>*J* = 9.9 Hz, <sup>2</sup>*J* = 3.1 Hz, 1H, CHH'OSi), 4.18 (dd, <sup>3</sup>*J* = 9.9 Hz, <sup>2</sup>*J* = 3.2 Hz, 1H, CHH'OSi), 4.5-4.6 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 5.38 (s, 3H, NH, COOCH<sub>2</sub>CO), 7.4-7.5 (m, 2H, 2 x CH<sub>arom.</sub>), 7.5-7.6 (m, 1H, CH<sub>arom.</sub>), 7.8-8.0 (m, 2H, 2 x CH<sub>arom.</sub>) ppm;

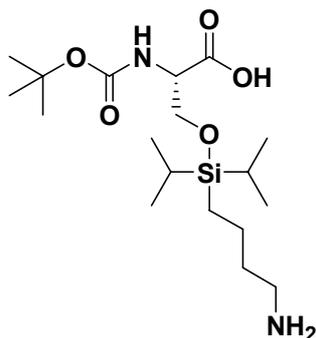
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 10.2$  (CH<sub>2</sub> am Silizium), 12.5 (2 x CH vom isopropyl), 17.6 (4 x CH<sub>3</sub> vom isopropyl), 20.3 (CH<sub>2</sub>), 21.0 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (3 x C<sub>Methyl</sub> vom Boc), 55.8 (C $\alpha$ ),

64.1 ( $C_\beta$ ), 66.7 ( $\text{CH}_2$  vom Phenacylester), 80.2 ( $C_{\text{quart}}$ ), 120.0 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ), 128.0 (2 x  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 129.1 (2 x  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 134.2 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 155.5 ( $\text{C}=\text{O}$  vom Boc), 170.4 ( $\text{C}=\text{O}$  vom Ester), 191.3 ( $\text{C}=\text{O}$  vom Keton) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 522$  [ $\text{M}+\text{NH}_4^+$ ]<sup>+</sup>;

HR-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}]^+ = [\text{M}+\text{NH}_4^+]^+$ : 522.2994, gefunden 522.2990.

### *N-tert-Butyloxycarbonyl-β-O-(4-aminobutyl)-diisopropyl-silanyl-L-serin (119)*



Die Cyanoverbindung **117** (500 mg, 99  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter  $\text{N}_2$  in absolutem Ethanol (20 mL) gelöst und mit  $\text{CHCl}_3$  (500  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Zu dieser Lösung wurde  $\text{PtO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ -Katalysator (100 mg) gegeben und 20 h bei RT unter  $\text{H}_2$  gerührt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.0 g) und weiteres Rühren für 2 h bei RT. Die Suspension wurde dann über *Celite* abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Verbindung **119** wurde ohne weitere Aufarbeitung und Reinigung in Form eines farblosen Öls (387 mg, 991  $\mu\text{mol}$ , quant.) erhalten.

FTIR (ATR):  $\nu = 3354.6$  m, 2926.2 s, 2864.3 s, 1694.9 m, 1585.2 s, 1463.1 m, 1389.0 m, 1365.8 m, 1167.4 m, 1110.3 m, 1062.7 m, 882.7 w, 686.6 w  $\text{cm}^{-1}$ ;

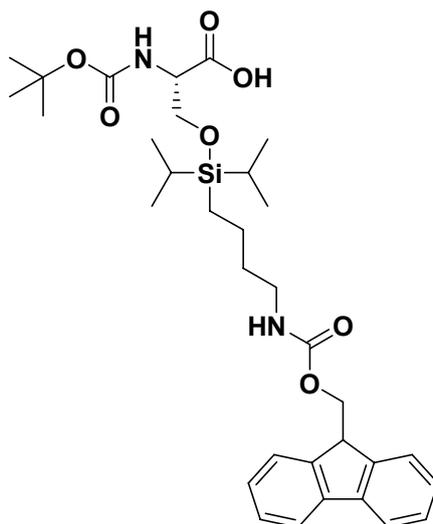
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.6\text{-}0.7$  (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.0-1.1 (m, 14H,  $\text{Si}[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]_2$ ), 1.4-1.5 (m, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.5-1.6 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.7-1.8 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.9-3.0 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.93 (dd,  $^3J = 9.4$  Hz,  $^2J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{CHH}'\text{OSi}$ ), 4.06 (d,  $^3J = 4.1$  Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 4.13 (d,  $^3J = 9.5$  Hz, 1H,  $\text{CHH}'\text{OSi}$ ), 5.54 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H, NH), 8.15 (br, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ppm;

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 10.3$  ( $\text{CH}_2$  am Silizium), 12.6 (2 x CH vom isopropyl), 17.6 (4 x  $\text{CH}_3$  vom isopropyl), 20.1 ( $\text{CH}_2$ ), 28.7 (3 x  $\text{CH}_3$  vom Boc), 30.7 ( $\text{CH}_2$ ), 39.3 ( $\text{CH}_2$ ), 57.3 ( $C_\omega$ ), 64.8 ( $C_\beta$ ), 68.4 ( $C_{\text{quart}}$ ), 155.9 ( $\text{C}=\text{O}$  vom Boc), 176.7 ( $\text{C}=\text{O}$  von der Carbonsäure) ppm;

MS (ESI):  $m/z = 389$   $[M-H]^+$ ;

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $[C_{18}H_{37}N_2O_5Si]^- = [M-H]^+$ : 389.2477, gefunden 389.2473.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -O-(9-fluorenylmethoxycarbonylaminoethyl)-diisopropylsilanyl-L-serin (120)**



Die Aminoverbindung **119** (250 mg, 640  $\mu$ mol) wurde in einem Gemisch aus 10 %-iger, wässriger  $Na_2CO_3$ -Lösung in THF (2:1, 3 mL) gelöst und tropfenweise mit FmocOSu (259 mg, 768  $\mu$ mol) in THF (1.5 mL) versetzt. Nach 2.5-stündigen Rühren bei RT wurde das THF *in vacuo* entfernt und die Reaktionsmischung mit  $CHCl_3$  (50 mL) verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.05 M Zitronensäure (60 mL), wonach die wässrige Phase mit  $CHCl_3$  (2 x 50 mL) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung des Rohprodukts (200 mL Kieselgel,  $CHCl_3$ :MeOH = 50:1  $\rightarrow$  25:1  $\rightarrow$  10:1) lieferte Verbindung **120** in Form eines Öls (65.0 mg, 106  $\mu$ mol, 17 %).

$R_f = 0.34$  ( $CHCl_3$ :MeOH = 10:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3344$  m, 2926 s, 2864 s, 1694 s, 1506 m, 1450 m, 1366 m, 1248 m, 1162 s, 1113 m, 1060 m, 882 w, 758 w, 739  $m\ cm^{-1}$ ;

$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 0.6-0.7$  (m, 2H,  $SiCH_2CH_2CH_2CH_2NH$ ), 0.9-1.0 (m, 14H,  $Si(CH_2CH_2)_2$ ), 1.3-1.4 (m, 2H,  $SiCH_2CH_2CH_2CH_2NH$ ), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.5-1.6 (m, 2H,  $SiCH_2CH_2CH_2CH_2NH$ ), 3.1-3.2 (m, 2H,  $SiCH_2CH_2CH_2CH_2NH$ ), 3.91 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H,  $CHH'OSi$ ), 4.15 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $CHH'OSi$ ), 4.2-4.3 (m, 1H, Fluorenyl-

CHCH<sub>2</sub>O), 4.36 (d, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 1H, α-CH), 4.4-4.5 (m, 2H, Fluorenyl-HCH<sub>2</sub>O), 5.09 (s, 1H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 5.45 (d, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.30 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, 2 x CH<sub>arom.</sub>), 7.39 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, 2 x CH<sub>arom.</sub>), 7.58 (d, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 2H, 2 x CH<sub>arom.</sub>), 7.75 (d, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, 2 x CH<sub>arom.</sub>) ppm;

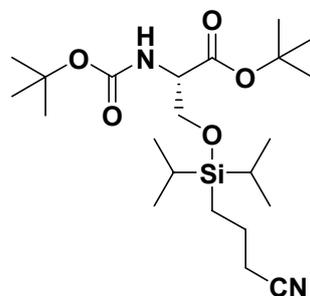
<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.9 (CH<sub>2</sub> am Silizium), 12.7 (2 x CH vom isopropyl), 17.8 (4 x CH<sub>3</sub> vom isopropyl), 20.6 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (3 x C<sub>Methyl</sub> vom Boc), 34.1 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 47.4 (CH), 55.6 (C<sub>α</sub>), 64.2 (C<sub>β</sub>), 67.1 (CH<sub>2</sub>), 68.4 (C<sub>quart.</sub>), 120.2 (2 x CH), 125.3 (2 x CH), 127.3 (2 x CH), 127.9 (2 x CH), 141.5 (2C), 144.1, 144.2, 155.8 (C=O), 157.4 (C=O), 173.2 (C=O von der Carbonsäure) ppm;

MS (ESI): *m/z* = 611 [M-H<sup>+</sup>];

HR-MS (ESI): *m/z* berechnet für [C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Si]<sup>+</sup> = [M-H<sup>+</sup>]: 611.3158, gefunden 611.3164.

### 6.3.6 Syntheseversuche zur Darstellung der Zielverbindung 122

*N-tert*-Butyloxycarbonyl-β-*O*-(3-cyanopropyl)-diisopropyl-silanyl-L-serin-*tert*-butylester (116)



Unter Stickstoffatmosphäre und bei 0 °C wurde (3-Cyanopropyl)-diisopropyl-chlorosilan (700 μL, 3.12 mmol) vorgelegt und in trockenem Pyridin (2 mL) gelöst. Hierzu wurde das *tert*-Butylester-geschützte Boc-L-Serin **87** (800 mg, 3.06 mmol) in trockenem Pyridin (3 mL) tropfenweise und bei 0 °C zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei nach einiger Zeit das Ausfallen eines weißen Feststoffes (Pyridiniumsalze) beobachtet werden konnte. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O (50 mL) versetzt und mit CHCl<sub>3</sub> (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (2 x 80 mL), mit gesättigter, wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 80 mL), mit H<sub>2</sub>O (2 x 80 mL) und mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen. Daraufhin wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel

*in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts (400 mL Kieselgel, Hex:EtOAc = 5:1) erhielt man Verbindung **116** als weißen Feststoff (1.29 g, 2.91 mmol, 95 %).

$R_f = 0.43$  (Hex:EtOAc = 5:1);

Smp.: 77.3-77.9 °C;

FTIR (ATR):  $\nu = 3447.6$  w, 2941.1 m, 2868.0 m, 2248.7 w, 1713.4 s, 1496.1 m, 1367.0 m, 1350.8 m, 1251.2 m, 1153.2 s, 1112.8 m, 1060.9 m, 916.0 w, 882.3 w, 731.1  $\text{cm}^{-1}$ ;

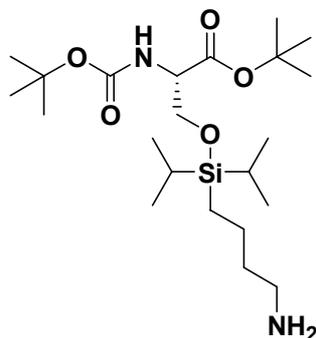
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.7$ -0.8 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 0.9-1.0 (m, 14H,  $\text{Si}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ), 1.42 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.6-1.8 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.33 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.86 (dd,  $^3J = 9.7$  Hz,  $^2J = 2.6$  Hz, 1H,  $\text{CHH}'\text{OSi}$ ), 4.03 (dd,  $^3J = 9.7$  Hz,  $^2J = 2.5$  Hz, 1H,  $\text{CHH}'\text{OSi}$ ), 4.19 (dd,  $^3J = 5.4$  Hz,  $^3J = 2.9$  Hz 1H,  $\alpha$ -CH), 5.30 (d,  $^3J = 7.8$  Hz 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 10.2$  ( $\text{CH}_2$  am Silizium), 12.4 (CH vom isopropyl), 12.6 (CH vom isopropyl), 17.6 (2 x  $\text{CH}_3$  vom isopropyl), 17.7 (2 x  $\text{CH}_3$  vom isopropyl), 20.3 ( $\text{CH}_2$ ), 21.1 ( $\text{CH}_2$ ), 28.2 (3 x  $\text{CH}_3$ ), 28.5 (3 x  $\text{CH}_3$ ), 56.3 ( $\text{C}_\alpha$ ), 64.4 ( $\text{C}_\beta$ ), 79.9 ( $\text{C}_{\text{quart.}}$ ), 82.2 ( $\text{C}_{\text{quart.}}$ ), 119.8 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ), 155.5 (C=O vom Boc), 169.8 (C=O vom Ester) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 443$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

HR-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 443.2936, gefunden 443.2933.

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -*O*-(4-aminobutyl)-diisopropyl-silanyl-L-serin-*tert*-butylester (118)**



Die Nitrilverbindung **116** (500 mg, 1.13 mmol) wurde in einer Stickstoffatmosphäre in absolutem Ethanol (20 mL) gelöst und mit  $\text{CHCl}_3$  (500  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Zu dieser Lösung wurde  $\text{PtO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ -Katalysator (100 mg) gegeben und 20 h bei RT unter  $\text{H}_2$  gerührt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.1 g). Es wurde nochmal für 2 Stunden bei RT gerührt. Die

Suspension wurde dann über *Celite* abfiltriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Verbindung **118** wurde ohne weitere Aufreinigung in Form eines leicht braunen Öls (505 mg, 1.13 mmol, quantitativ) erhalten.

FTIR (ATR):  $\nu = 3443.9$  m, 2933.2 s, 2866.1 s, 1715.6 s, 1498.8 m, 1392.4 m, 1367.0 m, 1251.3 m, 1153.3 s, 1113.7 m, 1060.1 m, 882.7 w, 845.4 w, 731.4w  $\text{cm}^{-1}$ ;

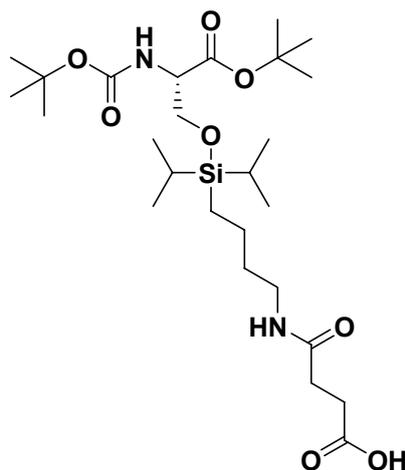
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.5\text{-}0.7$  (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 0.9-1.0 (m, 14H,  $\text{Si}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ), 1.41 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Ester), 1.44 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.5-1.6 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.7-1.9 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.9-3.1 (m, 2H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.86 (d,  $^3J = 3.9$  Hz, 1H,  $\text{CHH}'\text{OSi}$ ), 4.01 (dd,  $^3J = 9.7$  Hz,  $^2J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{CHH}'\text{OSi}$ ), 4.1-4.2 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 5.32 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 10.2$  ( $\text{CH}_2$  am Silizium), 12.5 (2 x CH vom isopropyl), 17.7 (4 x  $\text{CH}_3$  vom isopropyl), 20.8 ( $\text{CH}_2$ ), 28.2 (3 x  $\text{CH}_3$ ), 28.6 (3 x  $\text{CH}_3$ ), 30.6 ( $\text{CH}_2$ ), 39.8 ( $\text{CH}_2$ ), 56.3 ( $\text{C}_\alpha$ ), 64.4 ( $\text{C}_\beta$ ), 79.8 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ ), 82.1 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ ), 155.6 (C=O vom Boc), 170.0 (C=O vom Ester) ppm;

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 447$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]<sup>+</sup>;

HR-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}]^+ = [\text{M}+\text{H}^+]^+$ : 447.3249, gefunden 447.3233.

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -*O*-(bernsteinsäure-*N'*-butylamid-1-yl)-diisopropyl-silanyl-L-serin-*tert*-butylester (121)**



Das Amin **118** (514 mg, 1.15 mmol), 4-DMAP (70.2 mg, 575  $\mu\text{mol}$ ) und Bernsteinsäureanhydrid (150 mg, 1.5 mmol) wurden bei 35-40 °C im Hochvakuum für zwei Stunden getrocknet. Daraufhin erfolgte die Zugabe von trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) und *i*Pr<sub>2</sub>EtN (400  $\mu\text{L}$ ,

2.3 mmol) und es wurde für 21 Stunden bei RT gerührt. Nach Verdünnung der Reaktionsmischung mit Dichlormethan (250 mL) wurde mit 0.01 *M* Zitronensäure-Lösung (2 x 100 mL), einmal mit H<sub>2</sub>O (100 mL) und mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (2 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung des Rohprodukts (200 mL an Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 50:1 → 25:1 → 15:1 → 10:1) lieferte Verbindung **121** als gelben Film (415 mg, 759 μmol, 66 %).

$R_f = 0.19$  (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1);

FTIR (ATR):  $\nu = 3323.9$  w, 2932.1 m, 2866.7 m, 1715.6 s, 1651.3 m, 1499.2 m, 1457.0 m, 1367.0 m, 1250.5 m, 1152.1 s, 1114.5 m, 1060.6 m, 882.9 w, 844.3 w, 734.0 w cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.5-0.6$  (m, 2H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.92 (s, 14H, Si(CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.37 (s, 11H, *tert*-Butyl vom Ester und SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.39 (s, 9H, *tert*-Butyl vom Boc), 1.4-1.5 (m, 2H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.4-2.5 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 2.5-2.6 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 3.1-3.2 (m, 2H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.79 (dd, <sup>3</sup>*J* = 9.5 Hz, <sup>2</sup>*J* = 2.4 Hz, 1H, CHH'OSi), 3.98 (d, <sup>3</sup>*J* = 9.6 Hz, 1H, CHH'OSi), 4.1-4.2 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 5.37 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 6.55 (s, 1H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH) ppm;

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 10.1$  (CH<sub>2</sub> am Silizium), 12.4 (2 x CH vom isopropyl), 17.7 (4 x CH<sub>3</sub> vom isopropyl), 20.8 (CH<sub>2</sub>), 28.2 (3 x CH<sub>3</sub>), 28.5 (3 x CH<sub>3</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (CH<sub>2</sub>), 33.3 (CH<sub>2</sub>), 39.4 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (C $\omega$ ), 64.3 (C $\beta$ ), 80.0 (C<sub>quart.</sub>), 82.3 (C<sub>quart.</sub>), 155.7 (C=O), 170.3 (C=O), 172.8 (C=O), 175.9 (C=O) ppm;

MS (ESI):  $m/z = 546$  [M-H<sup>+</sup>];

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für [C<sub>26</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Si]<sup>-</sup> = [M-H<sup>+</sup>]<sup>-</sup>: 545.3264, gefunden 545.3266.

## 6.4 Herstellung und Reinigung von Oligonukleotiden

Für die Festphasensynthese wurde CPG-Granulat in 1  $\mu$ mol-Kartuschen verwendet oder die entsprechend benötigten Mengen an Trägermaterial in Form des *bulk*-Produktes in eine wiederauffüllbare Kartusche eingefüllt und verschlossen. Kommerziell erhältliche Phosphoramidite wurden nach Standardprotokollen des Herstellers verwendet und mit folgenden Bedingungen in der DNA-Synthese eingesetzt:

Kupplungslösung: 5-Benzylmercaptotetrazol (BTT, 0.25 M) in wasserfreiem Acetonitril

Deblocklösung: Dichloressigsäure (DCA, 2.5 % in Toluol)

Capping A-Lösung: Essigsäureanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ , 1 M) und 2,6-Lutidin (11 %) in Acetonitril

Capping B-Lösung: *N*-Methylimidazol (NMI, 16 Vol.-%) in Acetonitril

Oxidationslösung: Iod (150 mM) in 2,6-Lutidin/Acetonitril/Wasser-Mischung (1:11:5)

Die Konzentration der Standardnukleotide betrug 0.1 M in Acetonitril. Die Kupplungszeiten bei diesen Basen waren drei Minuten. Alle Stränge wurden mit der DMT-*off*-Methode hergestellt, das bedeutet, daß die 5'-DMT-Gruppe des letzten Nukleotids vor Beendigung der Synthese noch am Trägermaterial abgespalten wird.

### 6.4.1 Oligonukleotide mit $\alpha$ -cFaPydG

Um Transamidierung der Formylgruppe des FaPydG-Schadens zu vermeiden, konnte das standardmäßig genutzte Essigsäureanhydrid sowie auch das Phenoxyessigsäureanhydrid nicht genutzt werden. Es wurde alternativ eine mildere *Capping*-Prozedur gewählt, bei der sich die genutzte Lösung folgendermaßen zusammensetzte:

Alternative *Capping*-Lösung: 2,6-Lutidin/isoButyrylanhydrid/THF = 1:1:8

Die Kupplungszeiten der Standardnukleotide wurden unverändert gelassen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die Kupplung des  $\alpha$ -cFaPydG-Schadens wurde zweimal mit je 8 Äquivalenten für jeweils 15 Minuten durchgeführt. Bei in 5'-Richtung anschließenden Phosphoramiditen nach diesem Sondermonomer erfolgte die Kupplung ebenfalls zweimal mit je 10 Äquivalenten für drei Minuten, dadurch konnten Strangabbrüche an dieser kritischen Stelle der Synthese weitgehend vermieden werden.

### 6.4.2 Abspaltung, Entschützung und Reinigung der DNA-Stränge

Das Trägermaterial wurde vor der Abspaltung im Hochvakuum getrocknet, dann die synthetisierten Oligonukleotide unter basischen Bedingungen vom CPG-Trägermaterial entfernt und gleichzeitig die verbliebenen Schutzgruppen der DNA-Basen gespalten. In einem *Eppendorf Thermomixer* ließ man folgende Entschützungslösung bei 15 °C für 18 Stunden bei 1000 rpm auf das DNA-Material einwirken:

Entschützungslösung: Ethanol/gesättigte, wässrige Ammoniak-Lösung (1:3)

Die Lösung wurde im Vakuum eingeeengt, abzentrifugiert, über einen 0.2  $\mu\text{m}$  Nylon-Membranfilter der Firma *Whatman* filtriert und mit *dd*Wasser auf ca. 900  $\mu\text{L}$  Volumen verdünnt.

Die Reinigung erfolgte anschließend mittels RP-HPLC mit einem Protokoll, dessen Ablauf sich für alle synthetisierten DNA-Sequenzen als geeignet erwies:

Säule: *VP 250/10 Nucleosil 100/7* von *Macherey & Nagel*

Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat in *dd*H<sub>2</sub>O

Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in 80 % Acetonitril und 20 % *dd*H<sub>2</sub>O

Fluß: 5 mL/min

Gradient: 0 min: 0 % B, 5 min: 10 % B, 50 min: 22 % B, 55 min: 100 % B, 60 min: 100 % B, 65 min: 0 % B 70 min: 0 % B.

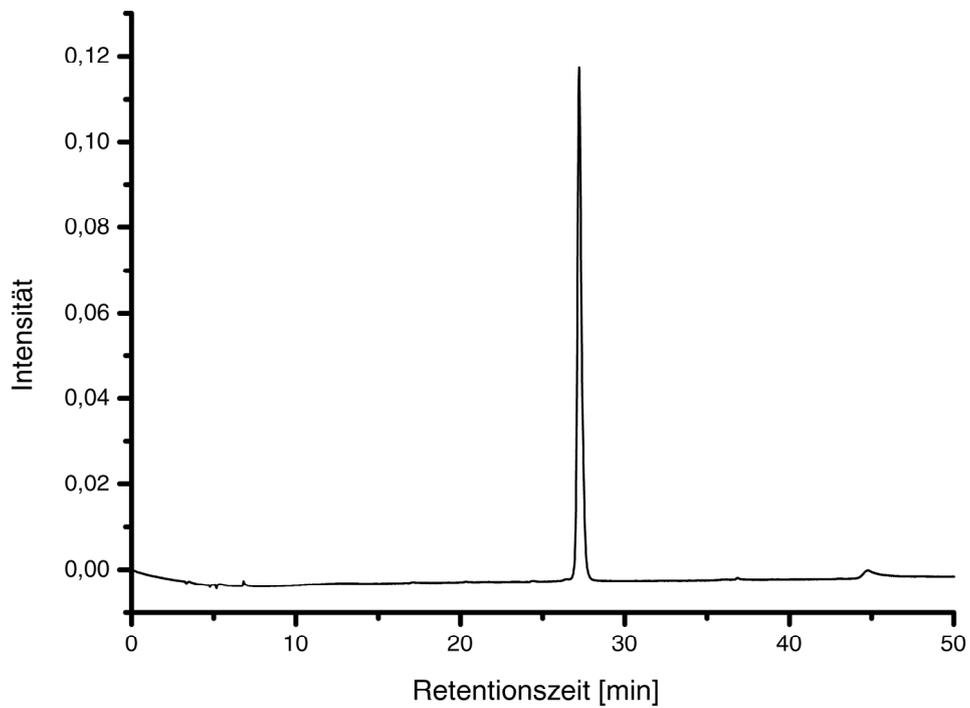
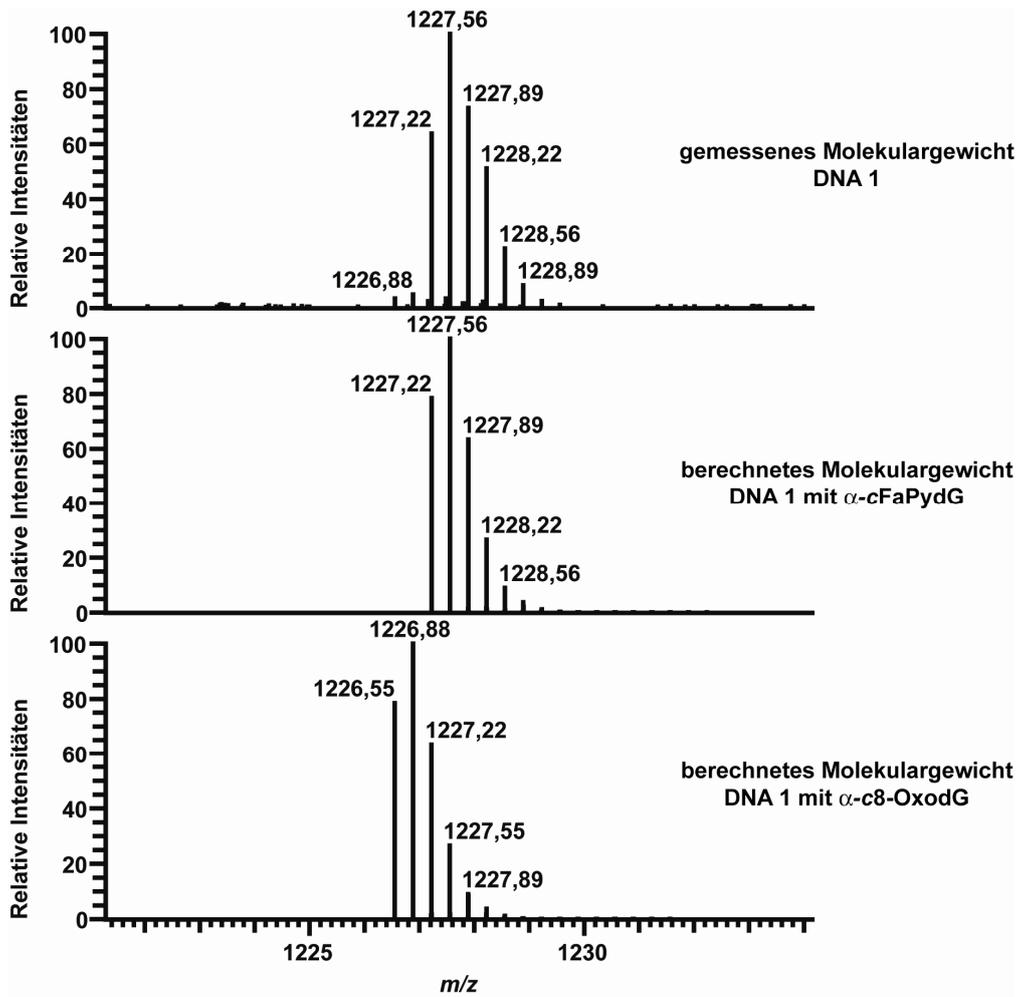
Nach der chromatographischen Reinigung wurden die gesammelten Fraktionen einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen und anschließend die Reinheit der Fraktionen mittels analytischer HPLC überprüft (Säulen: *CC Nucleosil 100-5 C18* oder *CC Nucleosil 100-5 C18* der Firma *Macherey & Nagel*, Puffersystem wie bei der präparativen HPLC angegeben, Gradient: 0 min: 0 % B, 45 min: 30 % B, 48 min: 100 % B, 52 min: 100 % B, 55 min: 0 % B, 60 min: 0 % B, Fluß: 0.5 mL/min).

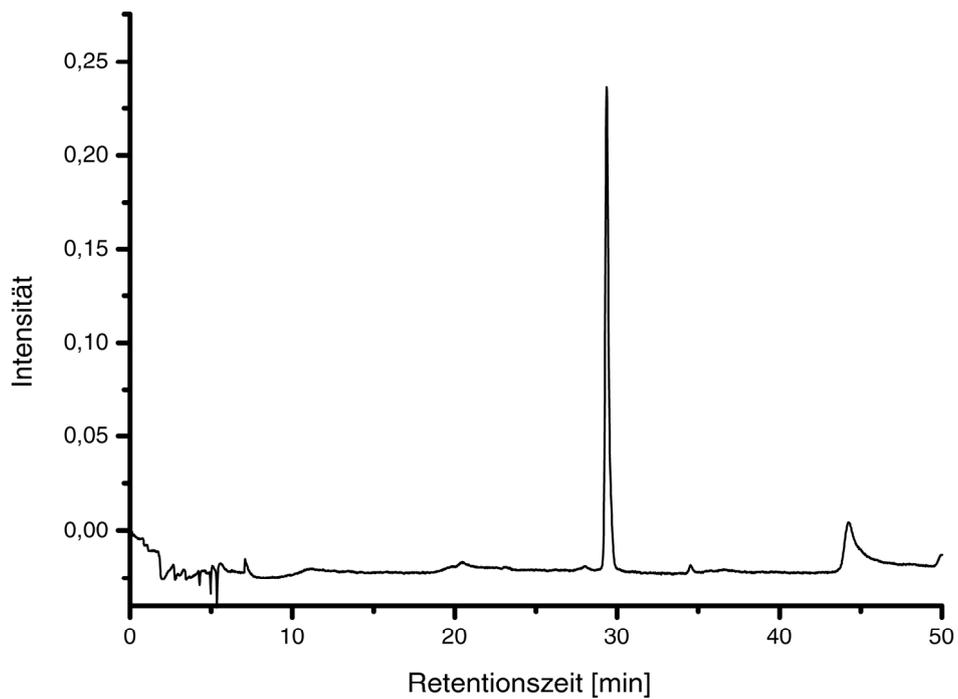
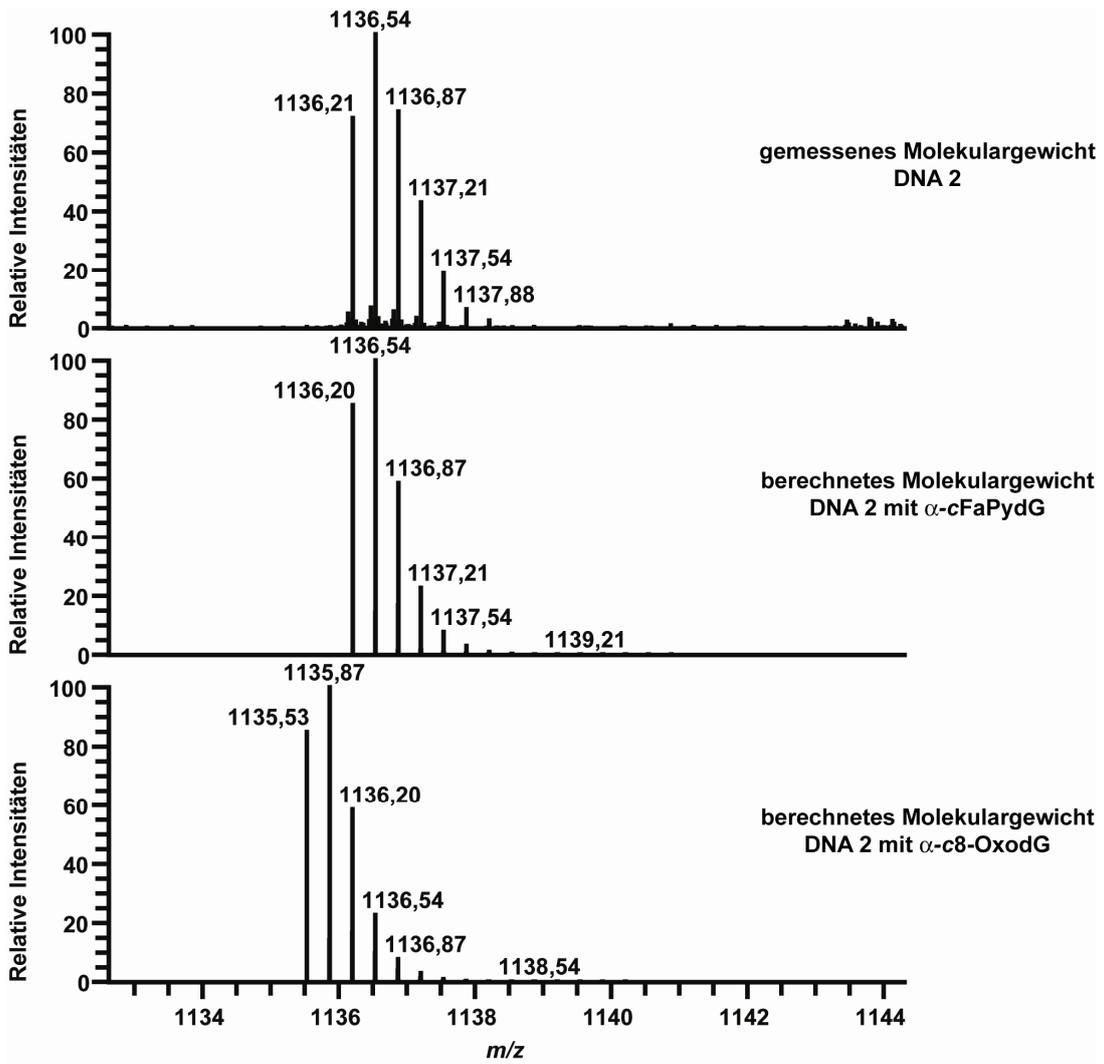
Nummer	DNA-Sequenz	berechnetes Molekulargewicht	gefundenes Molekulargewicht
DNA 1	5'-GCG ATX TAG CG-3'	3411.67	3411.67
DNA 2	5'-TGC AGT XAC AGC-3'	3684.72	3684.72
DNA 3	5'-TAC XCC TGG TCA TT-3'	4243.80	4243.80
DNA 4	5'-CTC TTT XTT TCT CG-3'	4200.77	4200.77
DNA 5	5'-CAT XCG AGT CAG G-3'	4013.77	4011.77
DNA 6	5'-CAC CAT XTT GAA TTC TAA-3'	5471.04	5469.04

Tabelle 6.1: Hergestellte DNA-Sequenzen mit berechneten und gefundenen Massen bezogen auf X =  $\alpha$ -*c*FaPydG.

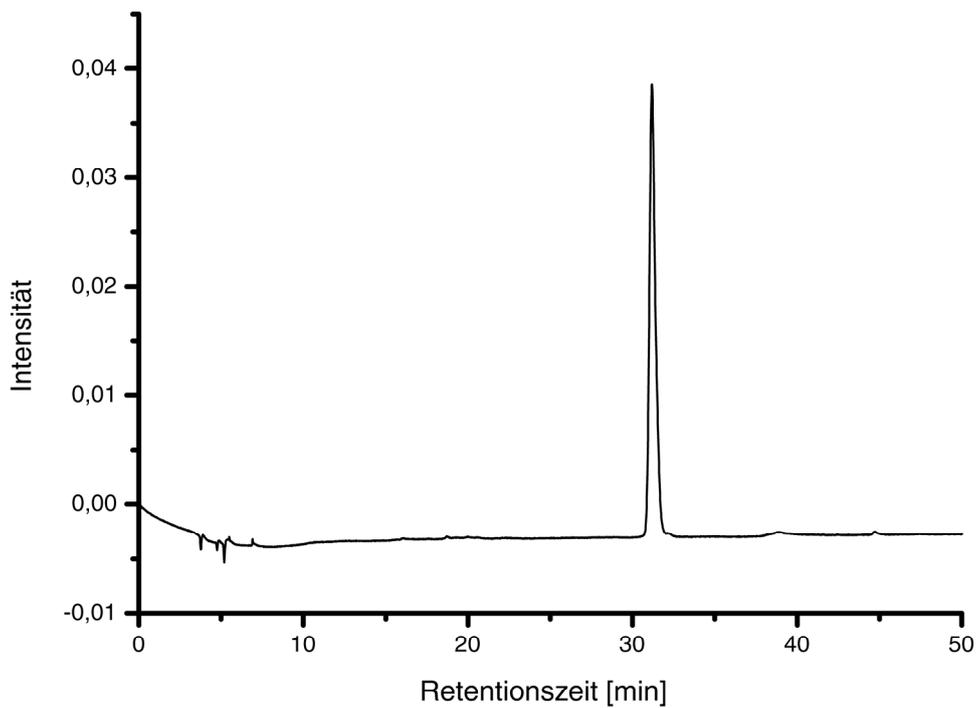
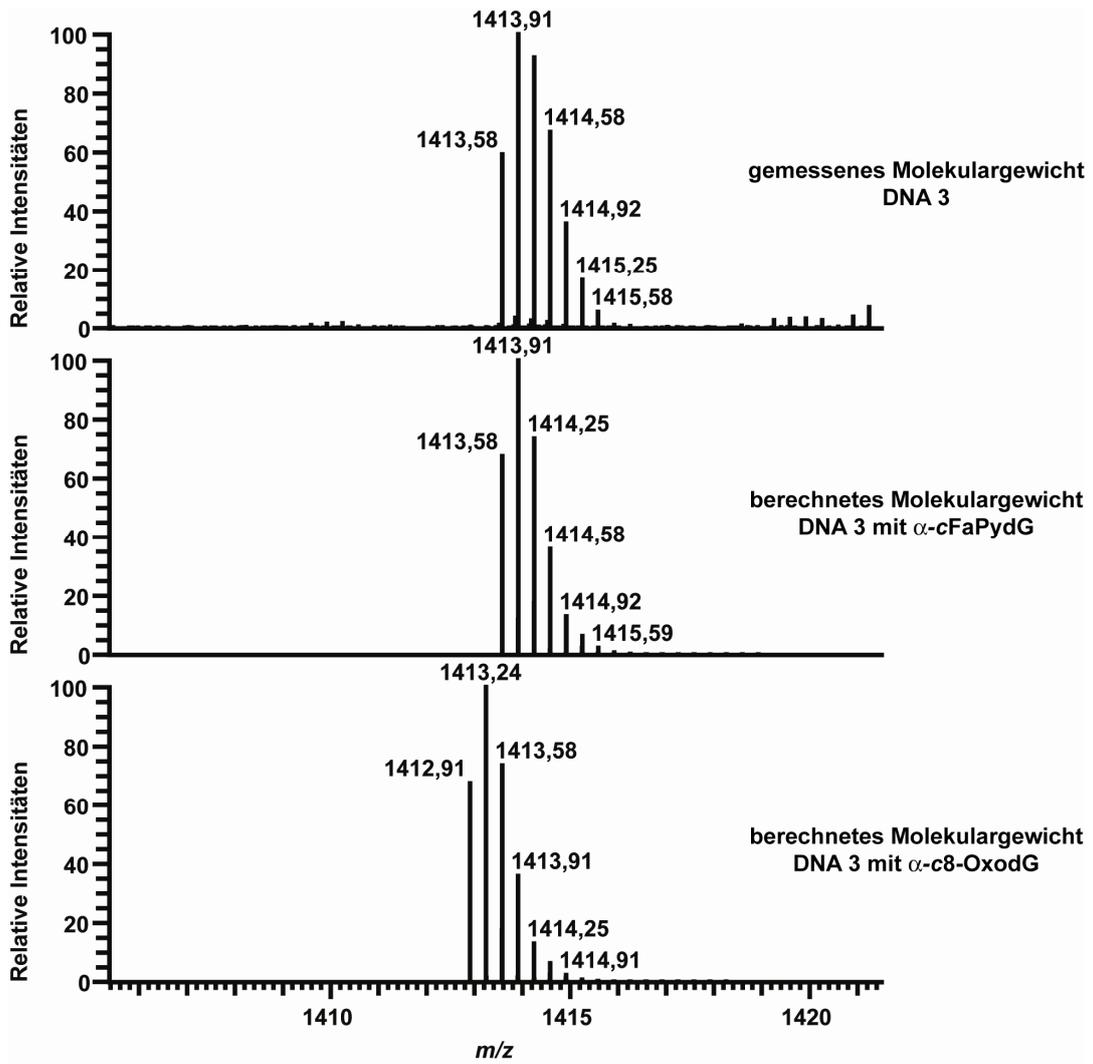
Die erhaltenen Fraktionen wurden in den Vakuumzentrifuge lyophilisiert, in *ddH*<sub>2</sub>O (1 mL) aufgenommen und die DNA über *Sep-Pac*-Säulen entsalzt. Dazu wurden die Kartuschen mit Acetonitril (5 mL) aktiviert und mit *ddH*<sub>2</sub>O (10 mL) equilibriert. Die DNA-Probe wurde aufgetragen und anschließend mit bidestilliertem Wasser (10 mL) gewaschen. Die Elution erfolgte mit ca. 5 mL eines Acetonitril/*ddH*<sub>2</sub>O-Gemisches (1:1). Für alle weiteren Verwendungen wurde diese DNA-Probe erneut lyophilisiert und in *ddH*<sub>2</sub>O gelöst.

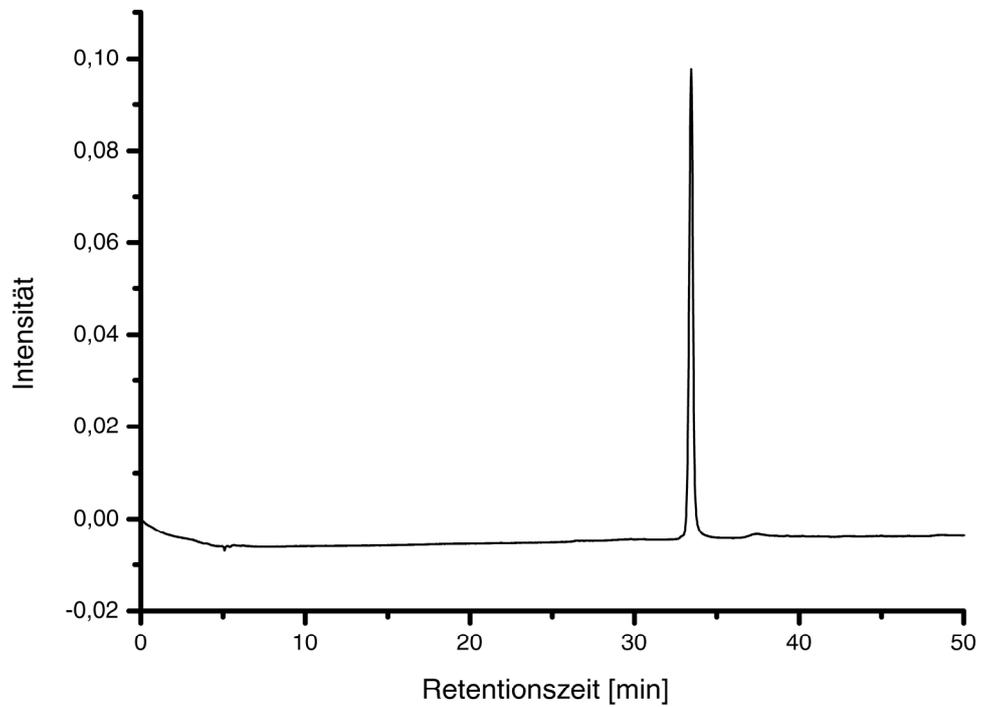
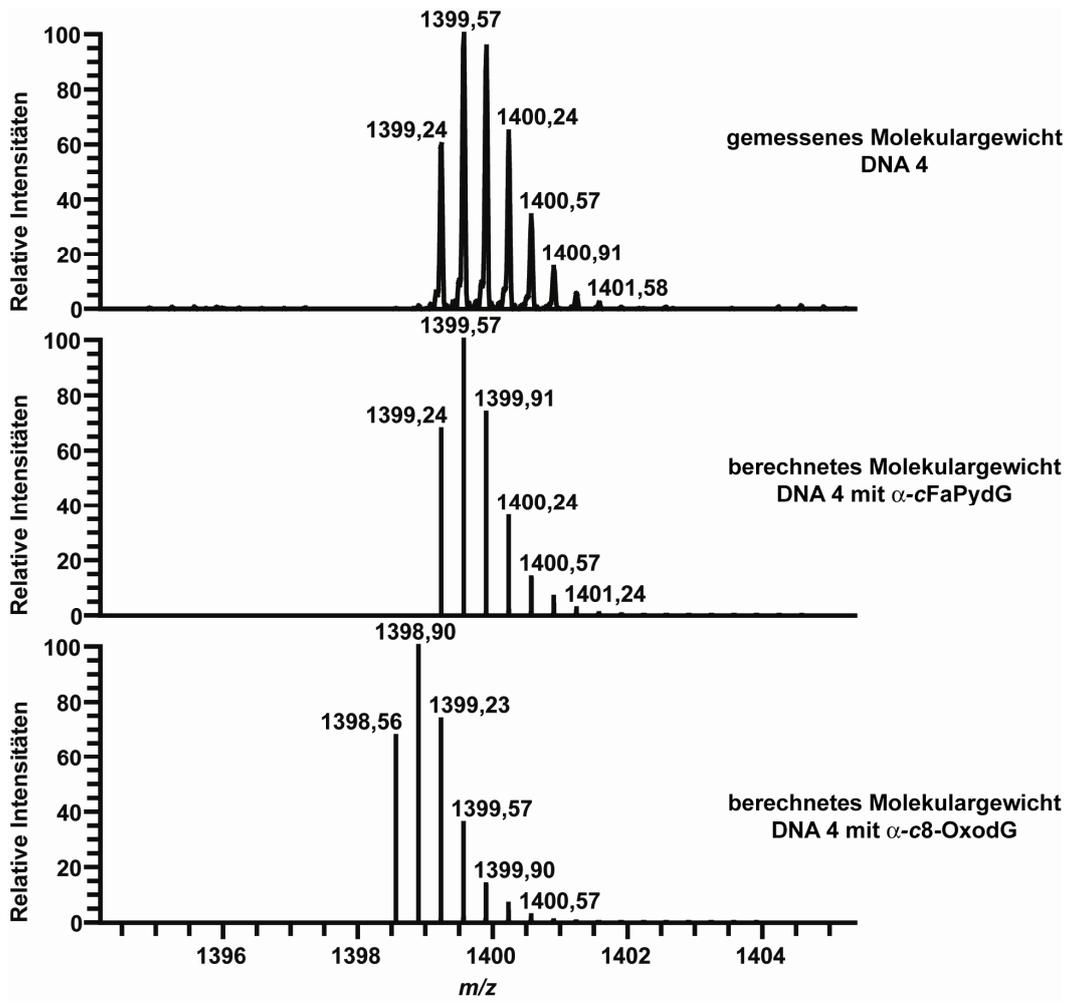
Die diskutierten Abweichungen von hergestellten DNA-Strängen und den berechneten Massen mit dem Nachweis von  $\alpha$ - $\epsilon$ -OxidG bedingen, daß an dieser Stelle auf den folgenden Seiten von jeder DNA-Sequenz die gemessene und die jeweils berechneten ESI-FTICR-Messungen sowie das dazugehörige analytische HPLC-Chromatogramm abgebildet werden.



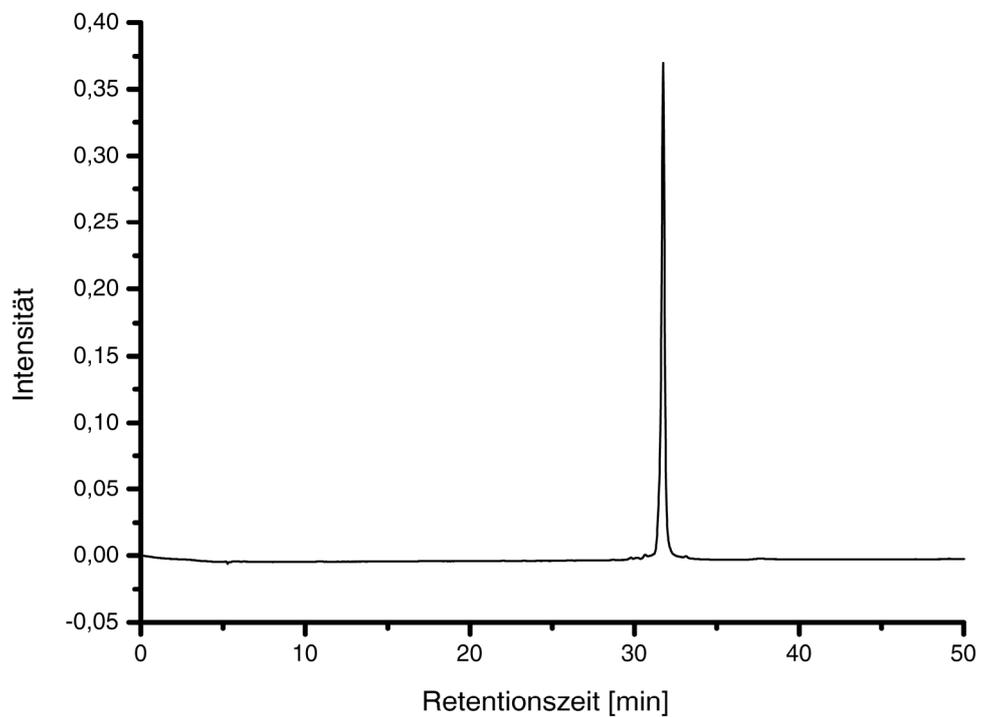
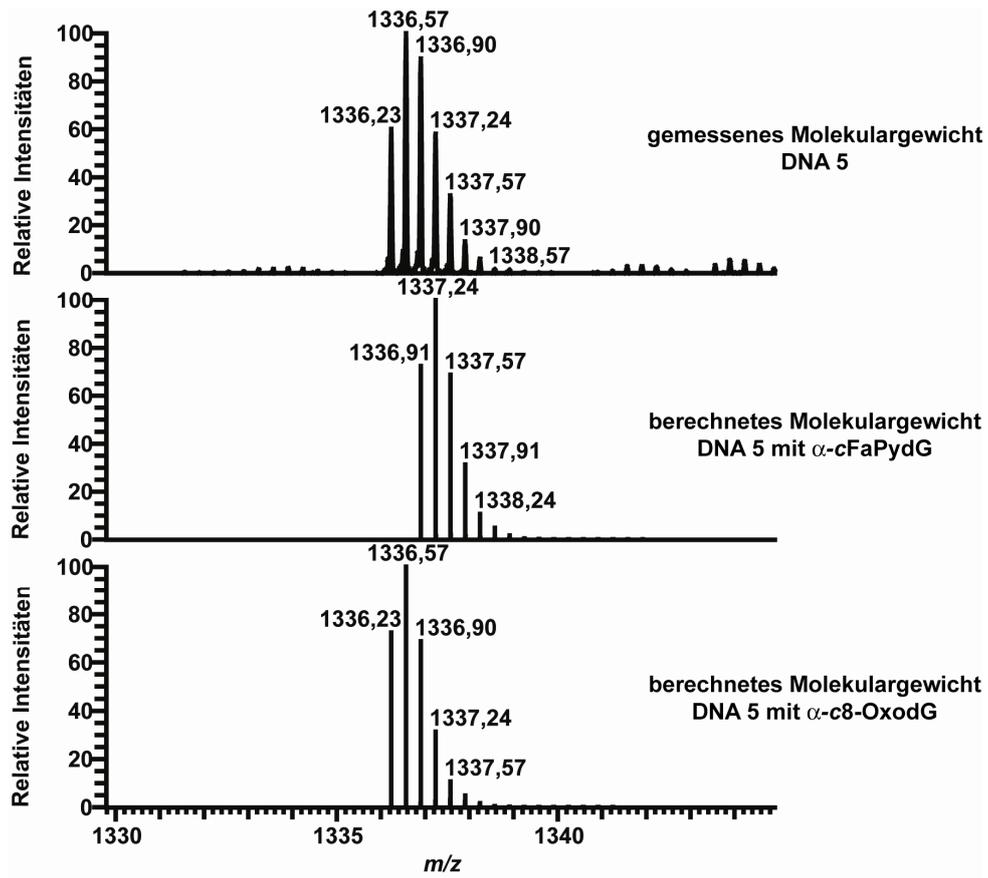


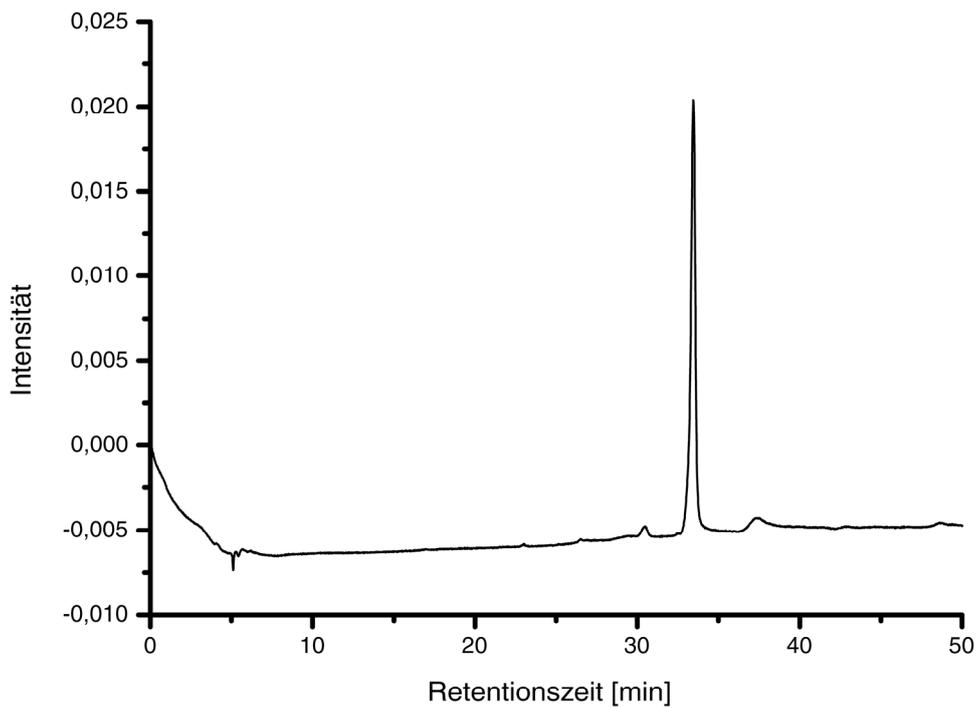
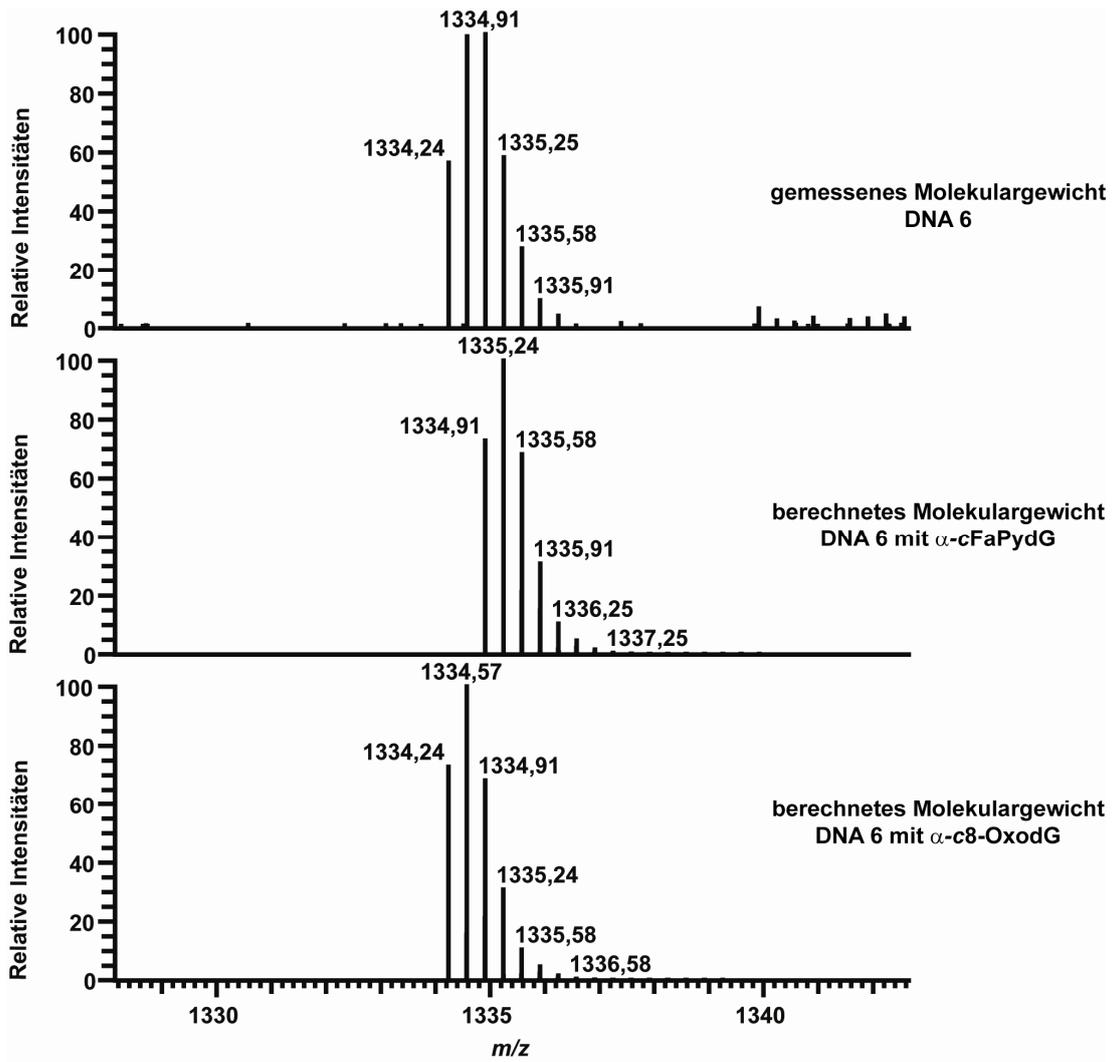
6 - Experimenteller Teil





6 - Experimenteller Teil





## 6.5 Elongationsstudien mit DNA-Polymerasen

### 6.5.1 Pol $\eta$ aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Studien der *Primer*-Verlängerung dienten der Messung der Kinetik und Selektivität des Einbaus eines Triphosphats gegenüber dem DNA-Schaden. Es sollten in Anlehnung an etablierte Methoden zunächst folgende Puffersysteme hergestellt und dann die Bedingungen gefunden werden, bei denen die jeweiligen Polymerasen ca. 20 % des eingesetzten Primers elongiert hatten:

DNA-Templat/*Primer*-Hybrid-Lösung: Das DNA-Templat mit der definierten Schädigung  $\alpha$ -cFaPydG (5'-TACXCTGGTCATT-3', X =  $\alpha$ -cFaPydG) wurde mit einem fluoreszenzmarkierten *Primer* (5'-GGACCAGTAAFI-3', FI = Fluorescein) hybridisiert. Das *Primer*/Templat-Konstrukt wurde so gewählt, daß das Ende des *Primers* bei der schadhafte DNA-Base lag. Zur Verbesserung der Auswertbarkeit dieser Experimente wurde die Sequenz an einer Position, gegenüber der von *M. Ober* gewählten Abfolge, verändert. Die Position n+1 nach dem Schaden war in der o. g. Sequenz ein C, damit es bei dem vermuteten Einbau eines dCTP gegenüber von  $\alpha$ -cFaPydG nicht zu einem gleichzeitigen Doppeleinbau dieses Triphosphats kommen konnte. In der ursprünglichen Sequenz befand sich ein G an der n+1-Position, was einen Doppeleinbau zur Folge hatte.

Vorratslösungen Pol  $\eta$ : In verschiedenen Konzentrationen wurden Lösungen aus Pol  $\eta$  (10 nM, 100 nM und 1000 nM), KCl (50 mM),  $\beta$ -Mercaptoethanol (10 mM), Glycerin (10 Vol.-%) in  $K_3PO_4$ /HCl-Puffer (20 mM, pH = 7.5) hergestellt, aliquotiert und eingefroren. Reaktionspuffer Pol  $\eta$ : Eine wässrige Lösung von KCl (100 mM),  $MgCl_2$  (5 mM), DTT (10 mM), Glycerin (2.5 Vol.-%) und Tris/HCl (40 mM, pH = 7.4). Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert und direkt vor dem Experiment mit 2.5 Vol.-% einer BSA-Lösung (10 mg/mL) versetzt.

dNTP-Lösungen: Um herauszufinden, bei welcher Triphosphatkonzentration ein 20-%iger Umsatz des *Primers* erfolgte, wurde eine Konzentrationsreihe mit 16 verschiedenen Stufen (0.61  $\mu$ M, 1.2  $\mu$ M, 2.4  $\mu$ M, 4.9  $\mu$ M, 9.8  $\mu$ M, ..., 20 mM) der vier Triphosphate (dATP, dCTP, dTTP und dGTP) angesetzt.

Bei den Elongationsversuchen bei 25 °C wurden pro Experiment einer Versuchsreihe 21  $\mu$ L Reaktionspuffer, 3  $\mu$ L DNA-Templat/*Primer*-Hybrid-Lösung und 3  $\mu$ L Enzymlösung zusammengegeben und inkubiert. Die eigentliche Elongationsreaktion wurde durch Zugabe von 3  $\mu$ L der jeweiligen dNTP-Lösung gestartet. Nach drei Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 30  $\mu$ L einer 100 mM EDTA-Lösung (mit NaOH auf pH = 7.4 eingestellt) gestoppt. Zudem wurden die Polymerasen durch anschließendes Erhitzen der Reaktionsmischung auf

95 °C für 15 Minuten denaturiert. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 5000 rpm wurde der Überstand abpipettiert und die DNA mit *ZipTip*<sup>®</sup> 0.6 µL C18-Pipettenspitzen der Firma *Millipore* extrahiert. Dieser Ablauf war bei allen drei verschiedenen Polymerasen identisch und wurde mit allen angegebenen Konzentrationen der Polymerasen und allen angegebenen Triphosphatkonzentrationen der vier dNTPs gleichermaßen wiederholt.

Auch der Ablauf der Probenweiterverarbeitung war in den Fällen der zwei weiteren Polymerasen identisch. Die eluierten Proben (jeweils ca. 10 µL) wurden mit *ddH*<sub>2</sub>O (40 µL) verdünnt und mittels Kapillargelelektrophorese analysiert. Der fluoreszenzmarkierte *Primer* besaß eine Retentionszeit von ca. 24 Minuten, so daß drei Proben mit einem Abstand von acht Minuten injiziert werden konnten und durch eine abschließende Trennung bei 9 kV für 30 Minuten versetzt drei Signalgruppen bei 8, 16 und 24 Minuten ergaben (*LIF*-Detektion).

Bei der Durchführung der Versuchsreihen konnte festgestellt werden, daß bei allen Bedingungen keine Elongation detektierbar war. Die immer zeitgleich durchgeführten Positivkontrollen unter identischen Bedingungen belegten die Aktivität der Polymerase. Selbst eine Verlängerung der Reaktionszeit auf zwei Stunden bewirkte nicht die Verlängerung des *Primers*. Für Pol  $\eta$  war der eingesetzte  $\alpha$ -Schaden zumindest bis zu den eingesetzten Konzentrationen ein vollständiger Block. Somit war eine Aufstellung der *Michalis-Menten*-Gleichung und damit die Bestimmung der Konstanten  $K_m$ ,  $V_{max}$  und  $k_{cat}$  nicht möglich.

### 6.5.2 DinB aus *Geobacillus stearothermophilus*

Auch im Fall der zweiten *low fidelity* Polymerase, DinB aus *G. stearothermophilus* konnte keine Elongation des Primers festgestellt werden. Die hier durchgeführten Experimente waren in den Konzentrationsbereichen identisch mit denen, die auch bereits bei Pol  $\eta$  gewählt wurden, lediglich die Polymerasekonzentrationen waren aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit geringer. Auch hier war bei den Positivkontrollen eine Verlängerung des *Primers* auf n+1 detektierbar.

In diesen Versuchreihen wurden folgende Veränderungen am bestehenden Puffersystem vorgenommen:

Vorratslösungen *Bst*DinB: In verschiedenen Konzentrationen wurden Lösungen aus DinB (10 nM, 30 nM, 50 nM, und 100 nM), KCl (50 mM),  $\beta$ -Mercaptoethanol (10 mM), Glycerin (20 Vol.-%) in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/HCl-Puffer (20 mM, pH = 7.4) hergestellt, aliquotiert und eingefroren. Reaktionspuffer *Bst*DinB: Der Reaktionspuffer war eine wässrige Lösung aus MgCl<sub>2</sub> (5 mM), DTT (10 mM), BSA (250 µg/mL) Glycerin (2.5 Vol.-%) und Tris/HCl-Puffer (40 mM, pH = 8.0).

### 6.5.3 Pol I aus *Geobacillus stearothermophilus*

Im Fall der *Bst*Pol I konnte ebenfalls keine Verlängerung in der Kapillargelelektrophorese detektiert werden. Da hier aber wie bereits in Kapitel 3.1.4.2 erwähnt eine Proteinkokristallisation in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Beese et al.* angestrebt wurde, sollten hier unter allen Umständen qualitative Äußerungen gemacht werden können, welches das bevorzugt eingebaute Triphosphat gegenüber dem  $\alpha$ -*c*FaPydG ist und wie gut die anderen verbleibenden drei Triphosphate sich in Relation dazu verhalten. Es wurden deshalb die ohnehin schon sehr hohen Enzymkonzentrationen von 100 nM weiter erhöht. Es konnten auch bei dieser Polymerase bei Konzentrationen von 1 nmol/L Enzym Kontrollen mit ungeschädigten *Primer*/Templat-Hybriden durchgeführt werden, die zur Elongation des *Primers* führten, was eine Aktivität der Polymerase belegt. Es wurden die folgenden Puffersysteme genutzt:

Vorratslösungen *Bst*Pol I: In verschiedenen Konzentrationen wurden Lösungen aus *Bst*Pol I (10 nM, 100 nM, 1000 nM und 65  $\mu$ M), KCl (50 mM), DTT (1 mM), Glycerin (50 Vol.-%), EDTA (0.1 mM), Triton X-100 (0.1 %) und Tris/HCl (10 mM, pH = 7.5) hergestellt, aliquotiert und eingefroren.

Reaktionspuffer *Bst*Pol I: Eine wässrige Lösung von KCl (10 mM), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mM), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), Triton X-100 (0.1 %) in Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH = 8.8) wurde hergestellt. Dieser Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

## 7 Anhang

### 7.1 Röntgenkristallstruktur von 88

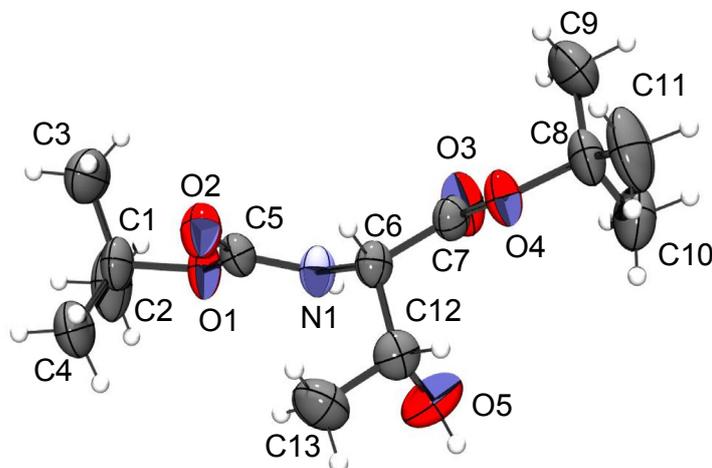


Abbildung 7.1: Struktur und Atomnummerierung 88.

Kristalldaten	
Molekülformel	$C_{13}H_{25}NO_5$
Molekulargewicht	275.34
Kristallsystem	Orthorhombisch
Raumgruppe	$P2_12_1$ (Nr. 19)
a, b, c (Å)	10.5769 (16), 11.4392(18), 13.7453(13)
$\alpha, \beta, \gamma$	90.00, 90.00, 90.00
V (Å <sup>3</sup> )	1663.5(4)
Z	4
$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	1.099
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.083
F(000)	600
Kristallgröße (mm)	33 x 40 x 46
Kristallfarbe & -habitus	Farblose Platte
Datensammlung	
Messtemperatur (K)	295(2)
Strahlung, $\lambda$ (Å)	Mo-K $\alpha$ 0.71073
$\theta_{\min}, \theta_{\max}$ (°)	2.32, 26.29
Datensatz	$-13 \leq h \leq 13, -14 \leq k \leq 14, -17 \leq l \leq 17$
Gemessene Reflexe	3681
Unabhängige Reflexe	1802
$R_{\text{int}}$	0.0104
Beobachtete Reflexe [ $I > 2\sigma(I)$ ]	1459

Verfeinerung	
$N_{\text{Reflexe}}, N_{\text{Parameter}}$	1802, 181
$R_1, wR_2, S$	0.0345, 0.0814, 1.068
$w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0.0358 \cdot P)^2 + 0.2758 P]$ mit	
$P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$	
Flack x	0(10)
$\Delta\rho_{\text{min}}, \Delta\rho_{\text{max}}, [e/\text{\AA}^3]$	0.152, -0.098

Tabelle 7.1: Kristalldaten und Messdetails.

Atombez.	x	y	z	$U_{\text{eq}}$
O1	0.56370(14)	0.18937(17)	0.01293(10)	0.0597(5)
O2	0.41529(15)	0.24140(16)	0.12351(12)	0.0611(5)
O3	0.78853(15)	0.19067(19)	0.28967(11)	0.0700(6)
O4	0.65996(14)	0.18695(15)	0.41988(10)	0.0540(4)
O5	0.62722(19)	-0.05470(17)	0.27446(17)	0.0773(6)
N1	0.59538(17)	0.14983(18)	0.16671(12)	0.0478(5)
C1	0.4893(2)	0.2261(2)	-0.07342(16)	0.0584(7)
C2	0.5783(3)	0.2008(4)	-0.15589(18)	0.0943(12)
C3	0.4587(4)	0.3546(3)	-0.0677(2)	0.0889(10)
C4	0.3725(3)	0.1524(3)	-0.0803(2)	0.0757(8)
C5	0.5162(2)	0.1977(2)	0.10257(14)	0.0455(5)
C6	0.5685(2)	0.1425(2)	0.26974(14)	0.0432(5)
C7	0.6870(2)	0.1769(2)	0.32590(15)	0.0460(5)
C8	0.7605(2)	0.2121(3)	0.49232(18)	0.0617(7)
C9	0.8157(4)	0.3318(3)	0.4730(3)	0.0972(12)
C10	0.8585(3)	0.1173(3)	0.4895(2)	0.0830(9)

Tabelle 7.2: Atomkoordinaten und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren für Nichtwasserstoffatome ( $\text{\AA}^2$ ). Für

$$U_{\text{eq}} \text{ gilt: } U_{\text{eq}} = \frac{1}{3} \sum_i \sum_j U_{ij} a_i^* a_j^* a_i a_j.$$

Atombez.	x	y	z	$U_{\text{iso}}$
H2A	0.5392	0.2224	-0.2163	0.113
H2B	0.5979	0.1189	-0.1568	0.113
H2C	0.6547	0.2449	-0.1473	0.113
H3A	0.3979	0.3676	-0.0170	0.107
H3B	0.4243	0.3802	-0.1288	0.107
H3C	0.5343	0.3978	-0.0537	0.107
H4A	0.3951	0.0713	-0.0751	0.091
H4B	0.3318	0.1659	-0.1417	0.091
H4C	0.3157	0.1726	-0.0284	0.091
H5	0.6176	-0.1181	0.3013	0.093
H6	0.5010	0.1981	0.2854	0.052
H9A	0.7495	0.3893	0.4749	0.117
H9B	0.8550	0.3326	0.4101	0.117

H9C	0.8776	0.3497	0.5219	0.117
H10A	0.9169	0.1279	0.5422	0.100
H10B	0.9033	0.1208	0.4288	0.100
H10C	0.8181	0.0425	0.4956	0.100
H11A	0.6275	0.2702	0.5890	0.120
H11B	0.7471	0.2184	0.6407	0.120
H11C	0.6469	0.1345	0.5940	0.120
H12	0.5141	0.0184	0.3701	0.063
H13A	0.3394	0.0400	0.2660	0.091
H13B	0.3798	-0.0916	0.2733	0.091
H13C	0.4167	-0.0179	0.1814	0.091

Tabelle 7.3: Wasserstoffatomkoordinaten und isotrope Temperaturfaktoren ( $\text{\AA}^2$ ).  $U_{iso} = \frac{1}{3} \sum_i \sum_j U_{ij} a_i^* a_j^* a_i a_j$ .

Die Temperaturfaktoren haben die Form  $e^{-T}$  mit  $T = 8\pi^2 U (\sin \theta / \lambda)^2$  für isotrope Atome.

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
O1	0.0520(8)	0.0939(13)	0.0332(7)	0.0054(8)	-0.0044(7)	0.0148(10)
O2	0.0597(9)	0.0751(12)	0.0484(9)	-0.0073(9)	-0.0047(8)	0.0208(9)
O3	0.0520(9)	0.1120(16)	0.0460(9)	0.0062(10)	0.0031(8)	-0.0158(11)
O4	0.0494(8)	0.0789(12)	0.0337(7)	-0.0041(8)	-0.0035(6)	0.0004(9)
O5	0.0782(13)	0.0600(12)	0.0938(15)	0.0203(11)	0.0308(12)	0.0165(10)
N1	0.0447(9)	0.0650(12)	0.0337(9)	0.0012(9)	0.0010(8)	0.0084(10)
C1	0.0622(14)	0.0761(18)	0.0368(12)	0.0066(12)	-0.0117(11)	0.0070(14)
C2	0.0842(19)	0.160(3)	0.0386(13)	0.0113(18)	-0.0004(13)	0.022(3)
C3	0.122(3)	0.078(2)	0.0669(18)	0.0176(17)	-0.0261(19)	-0.005(2)
C4	0.0834(19)	0.086(2)	0.0575(16)	-0.0014(16)	-0.0221(15)	-0.0006(17)
C5	0.0467(11)	0.0511(13)	0.0387(11)	-0.0028(10)	-0.0052(9)	-0.0015(11)
C6	0.0450(11)	0.0536(13)	0.0311(10)	-0.0002(10)	0.0030(9)	0.0045(10)
C7	0.0505(12)	0.0513(14)	0.0361(11)	0.0045(10)	-0.0004(9)	-0.0012(11)
C8	0.0585(14)	0.082(2)	0.0442(13)	-0.0068(15)	-0.0153(11)	0.0028(14)
C9	0.107(3)	0.087(2)	0.097(2)	-0.018(2)	-0.042(2)	-0.009(2)
C10	0.0782(19)	0.103(2)	0.0674(18)	0.0076(18)	-0.0160(16)	0.0185(18)
C11	0.084(2)	0.172(4)	0.0429(14)	-0.021(2)	-0.0086(14)	0.011(2)
C12	0.0522(12)	0.0578(15)	0.0466(12)	0.0003(11)	0.0112(11)	0.0002(12)
C13	0.0747(18)	0.0721(19)	0.081(2)	-0.0076(16)	0.0006(17)	-0.0210(16)

Tabelle 7.4: Anisotrope Temperaturfaktoren ( $\text{\AA}^2$ ). Die Temperaturfaktoren haben die Form  $e^{-T}$  mit  $T = 8\pi^2 U (\sin \theta / \lambda)^2$  für isotrope Atome und  $T = 2\pi^2 \sum_{ij} (h_i h_j U_{ij} a_i^* a_j^*)$  für anisotrope Atome.

Bindung	Länge	Bindung	Länge
O1-C5	1.334(2)	C1-C4	1.500(4)
O1-C1	1.485(3)	C1-C2	1.502(4)
O2-C5	1.213(3)	C1-C3	1.507(4)
O3-C7	1.194(3)	C6-C12	1.523(3)
O4-C7	1.328(3)	C6-C7	1.524(3)

O4-C8	1.485(3)	C8-C10	1.502(4)
O5-C12	1.415(3)	C8-C9	1.512(5)
N1-C5	1.334(3)	C8-C11	1.515(4)
N1-C6	1.447(3)	C12-C13	1.508(3)

Tabelle 7.5: Bindungslängen (Å).

Bindungen	Winkel	Bindungen	Winkel
C5-O1-C1	121.23(17)	C12-C6-C7	110.07(19)
C7-O4-C8	120.98(18)	O3-C7-O4	126.0(2)
C5-N1-C6	123.19(18)	O3-C7-C6	124.24(19)
O1-C1-C4	109.1(2)	O4-C7-C6	109.75(18)
O1-C1-C2	102.52(19)	O4-C8-C10	109.7(2)
C4-C1-C2	111.1(2)	O4-C8-C9	109.6(2)
O1-C1-C3	110.4(2)	C10-C8-C9	112.5(3)
C4-C1-C3	112.0(3)	O4-C8-C11	102.6(2)
C2-C1-C3	111.2(3)	C10-C8-C11	110.3(3)
O2-C5-N1	124.4(2)	C9-C8-C11	111.7(3)
O2-C5-O1	125.45(19)	O5-C12-C13	111.8(2)
N1-C5-O1	110.16(18)	O5-C12-C6	105.58(17)
N1-C6-C12	111.93(19)	C13-C12-C6	112.5(2)
N1-C6-C7	108.62(17)		

Tabelle 7.6: Bindungswinkel (°).

Bindungen	Winkel	Bindungen	Winkel
C5-O1-C1-C4	-61.8(3)	N1-C6-C7-O3	-9.7(3)
C5-O1-C1-C2	-179.7(3)	C12-C6-C7-O3	113.1(3)
C5-O1-C1-C3	61.7(3)	N1-C6-C7-O4	171.21(19)
C6-N1-C5-O2	1.2(4)	C12-C6-C7-O4	-65.9(2)
C6-N1-C5-O1	-178.2(2)	C7-O4-C8-C10	-59.4(3)
C1-O1-C5-O2	-5.0(4)	C7-O4-C8-C9	64.5(3)
C1-O1-C5-N1	174.4(2)	C7-O4-C8-C11	-176.7(3)
C5-N1-C6-C12	102.2(2)	N1-C6-C12-O5	59.6(3)
C5-N1-C6-C7	-136.0(2)	C7-C6-C12-O5	-61.3(2)
C8-O4-C7-O3	-3.1(4)	N1-C6-C12-C13	-62.6(2)
C8-O4-C7-C6	176.0(2)	C7-C6-C12-C13	176.5(2)

Tabelle 7.7: Torsionswinkel (°).

## 8 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\nu$	Differenz der chem. Verschiebung ohne Austausch
$\Delta G^\ddagger$	freie Aktivierungsenthalpie
$\delta$	NMR: chemische Verschiebung
$\Delta G_{298\text{ K}}^0$	freie Reaktionsenthalpie bei 298 K
$\Delta H^0$	Reaktionsenthalpie
$\Delta S^0$	Reaktionsentropie
$\nu$	IR: Wellenzahl
$t$	Relaxationszeit
Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
A	Adenin, DNA: 2'-Desoxyadenosin
Ac	Acetyl, Acetat
All	Allyl
Amu	<i>atomic mass units</i> , atomare Masseneinheiten
AP	apurinische/apyrimidinische Stelle
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
BDDC	Bis[[4-(2,2dimethyl-1,3-dioxolyl)]methyl]-carbodiimid
BER	Basenexzisionsreparatur
Bn	Benzyl-
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
BOP	1-Hydroxybenzotriazolyl-oxytris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat
BOPCl	<i>N,N</i> -Bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphorodiamidchlorid
br	NMR, IR: breites Signal
Bzl	Benzoyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
C	Cytosin, DNA: 2'-Desoxycytidin
CD	<i>circular dichroism</i> , Zirkulardichroismus
$\alpha$ -OxodG	carbozyklisches 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanin
$\alpha$ dG	carbozyklisches 2'-Desoxyguanosin
$\alpha$ FaPydA	FaPyA des carba-2'-Desoxyadenosins
$\alpha$ FaPydG	FaPyG des carba-2'-Desoxyguanosins

COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPD	<i>cis-syn</i> -Cyclobutyl-T-T-Pyrimidindimer-Photoschaden
CPG	<i>controlled pore glass</i> , Glasgranulat mit def. Porengröße
d	NMR: Dublett
dA	2'-Desoxyadenosin
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DCA	Dichloressigsäure
DC	Dünnschichtchromatogramm, Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytidin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	Dicyclohexylamin
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
ddC	2',3'-Didesoxycytidin
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	Zweifach destilliertes Wasser
dest.	destilliert
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO-d <sub>6</sub>	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DMTCl	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DPPB	1,4-Bis(diphenylphosphino)butan
DQF-COSY	<i>Double-Quantum Filtered</i> COSY
dT	2'-Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
[E]	Enzymkonzentration
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EEDQ	2-Ethoxy-1-(ethoxycarbonyl)-1,2-dihydrochinolin
EI	<i>Electron Impact Ionisation</i>
EPL	<i>Expressed Protein Ligation</i>
Eq	Äquivalente
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i> , Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FaPyA	<i>N</i> -(4,6-Diamino-5-pyrimidinyl)formamid
FaPydA	FaPyA-Schaden des 2'-Desoxyadenosins
FaPydG	FaPyG-Schaden des 2'-Desoxyguanosins
FaPy	Formamidopyrimidin
FaPyG	<i>N</i> -(2,4-Diamino-6-oxo-1,6-dihydro-5-pyrimidinyl)formamid
$f_{ins}$	Inkorporationsspezifität
Fl	Fluorescein (in DNA-Strängen)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase, auch: MutM
FTIR	<i>Fourier-Transform IR</i>
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
G	Guanin, DNA: 2'-Desoyguanosin
<i>h</i>	Plancksches Wirkungsquantum
H	NMR: Proton
h	Stunde(n)
HFI	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HMBC	Heteronuclear Multi-Bond Connectivity
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hOgg1	humane 8-oxoG-DNA-Glykosylase
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> Hochdruckchromatographie
HPLC-MS/MS MS	eines mit HPLC und MS isolierten Ions
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> , Hochauflösende MS
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HV	„Hochvakuum“, $10^2$ – $10^3$ mbar
HWE	<i>Horner-Wadsworth-Emmons</i>
Hz	Hertz
I	Intensität

## 8 - Abkürzungsverzeichnis

$I_0$	Gesamtsignalintensität
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl
IR	Infrarot, Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	NMR: Kopplungskonstante
$k_B$	Boltzmannkonstante
$k_c$	Geschwindigkeitskonstante am Koaleszenzpunkt
$k_{cat}$	katalytische Konstante: $k_{cat} = V_{max} \times [E]^{-1}$
$k_{dis}$	Dissoziationsgeschwindigkeit
$K_m$	Michaeliskonstante, Indikator f. Enzymaffinität an Substrat
konz.	konzentriert
L	Liter
LIF	<i>Laser Induced Fluorescence</i> , Laserinduzierte Fluoreszenz
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
<i>Ll</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
Lsg.	Lösung
<i>M</i>	Molar, mol/L
<i>m</i>	MS: Molekülion
m	IR: mittel ( <i>middle</i> ), MS: Molekülmasse, NMR: Multiplett
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight</i>
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeOTMS	Methoxy(trimethyl)silan
mFaPydG	<i>N</i> -(2,4-Diamino-6-oxo-1,6-dihydro-5-pyrimidinyl)- <i>N</i> -methylformamid des 2'-Desoxyguanosins
<i>m</i> RNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCL	<i>Native Chemical Ligation</i>
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OSu	Succinimidylcarbonat
8-OxodG	7,8-Dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanin
o. g.	oben genannt
p. a.	<i>pro analysi</i> , zur Analyse

Pac	Phenoxyacetyl
$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium
$p_{\text{dis}}$	Dissoziationswahrscheinlichkeit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Ph	Phenyl
$\text{pK}_a$	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante für eine Protolyse
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
Pol	Polymerase
ppm	<i>parts per million</i>
$p_{\text{pol}}$	Inkorporationswahrscheinlichkeit
$\text{Pr}_0$	Ausgangskonzentration des <i>Primers</i>
Pr	Propyl
PTFE	Polytetrafluorethylen
PyBOP	Benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
q	NMR: Quartett
quant.	quantitativ
quint	NMR: Quintett
R	universelle Gaskonstante
$R_f$	<i>ratio of fronts</i> , Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	<i>reverse phase high pressure liquid chromatography</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	IR: stark ( <i>strong</i> )
s	Sekunde(n), NMR: Singulett
Ser	Serin
Smp.	Schmelzpunkt
s. o.	siehe oben
SPCL	<i>Solid-phase Chemical Ligation</i>
t	NMR: Triplett
T	Temperatur
T	Thymin, DNA: 2'-Desoxythymidin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMSC	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid

## 8 - Abkürzungsverzeichnis

TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
T <sub>c</sub>	Koaleszenztemperatur
TDPS	Templat-dirigierte Protein Synthese
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i> , Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TOF	<i>Time of Flight</i> , Flugzeit
Tol	Toluol
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transport ribonucleic acid</i>
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
V <sub>pol</sub>	Inkorporationsgeschwindigkeit
w	IR: schwach ( <i>weak</i> )
z	MS: Ladungszahl
Zers.	Zersetzung, Zersetzungsbereich

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, 1st ed., VCH, New York, Basel, **1992**.
- [2] L. Stryer, *Biochemie*, 4th ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [3] M. McCarty, *The Transforming Principle - Discovering that Genes are made of DNA*, W. W. Norton & Company, Inc., New York, **1985**.
- [4] M. McCarty, O. T. Avery, *J. Exp. Med.* **1946**, *83*, 97-104. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types 3. An Improved Method for the Isolation of the Transforming Substance and Its Application to Pneumococcus Type-Ii, Type-Iii, and Type-Vi.
- [5] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, *6*, 201-209. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation.
- [6] E. Chargaff, *Fed. Proc.* **1951**, *10*, 654-659. Structure and Function of Nucleic Acids as Cell constituents.
- [7] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
- [8] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., **1995**.
- [9] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974. Chemistry and biology of DNA repair.
- [10] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631-636. Long distance charge transport in DNA: The hopping mechanism.
- [11] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.
- [12] C. E. Crespo-Hernandez, D. M. Close, L. Gorb, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 5386-5395. Determination of Redox Potentials for the Watson-Crick Base Pairs, DNA Nucleosides, and Relevant Nucleoside Analogues.
- [13] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission.
- [14] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6406-6407. Photoinduced DNA Cleavage Via Electron-Transfer - Demonstra-

tion That Guanine Residues Located 5' to Guanine Are the Most Electron-Donating Sites.

- [15] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553. Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes .1. Nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies.
- [16] Y. Yoshioka, Y. Kitagawa, Y. Takano, K. Yamaguchi, T. Nakamura, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8712-8719. Experimental and theoretical studies on the selectivity of GGG triplets toward one-electron oxidation in B-form DNA.
- [17] S. Raoul, M. Bardet, J. Cadet, *Chem. Res. Tox.* **1995**, *8*, 924-933. Gamma-Irradiation of 2'-Deoxyadenosine in Oxygen-Free Aqueous Solutions: Identification and Conformational Features of Formamidopyrimidine Nucleoside Derivatives.
- [18] S. Raoul, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1892-1898. Photosensitized reaction of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Identification of 1-(2-Deoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)cyanuric acid as the major singlet oxygen oxidation product.
- [19] A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 1033-1077. Reactions of Oxyl Radicals with DNA.
- [20] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520. Purine Bases, Nucleosides, and Nucleotides: Aqueous Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and  $e^-$  and OH Adducts.
- [21] C. J. Burrows, J. G. Muller, O. Korniyushyna, W. C. Luo, V. Duarte, M. D. Leopold, S. S. David, *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 713-717. Structure and potential mutagenicity of new hydantoin products from guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidation by transition metals.
- [22] O. Korniyushyna, A. M. Berges, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15304-15314. In vitro nucleotide misinsertion opposite the oxidized guanosine lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin and DNA synthesis past the lesions using Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment).
- [23] O. Korniyushyna, C. J. Burrows, *Biochemistry* **2003**, *42*, 13008-13018. Effect of the oxidized guanosine lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydan-

- toin on proofreading by *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) in different sequence contexts.
- [24] T. Douki, R. Martini, J. L. Ravanat, R. J. Turesky, J. Cadet, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 2385-2391. Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution.
- [25] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J. L. Ravanat, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, *531*, 5-23. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features.
- [26] T. Kuzuya, S. Hoshida, Y. J. Kim, M. Nishida, H. Fuji, A. Kitabatake, M. Tada, T. Kamada, *Circ. Res.* **1990**, *66*, 1160-1165. Detection of Oxygen-Derived Free-Radical Generation in the Canine Postischemic Heart During Late Phase of Reperfusion.
- [27] H. A. Kontos, *Stroke* **2001**, *32*, 2712-2716. Oxygen radicals in cerebral ischemia - The 2001 Willis Lecture.
- [28] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, *65*, 899-905.
- [29] M. A. Sharpe, S. J. Robb, J. B. Clark, *J. Neurosci.* **2003**, *87*, 386-394. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations.
- [30] H. Yanagawa, Y. Ogawa, M. Ueno, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13320-13326. Redox ribonucleosides. Isolation and characterization of 5-hydroxyuridine, 8-hydroxyguanosine, and 8-hydroxyadenosine from *Torula* yeast RNA.
- [31] W. Adam, C. R. SahaMoller, A. Schonberger, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9233-9238. Photooxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by thermally generated triplet-excited ketones from 3-(hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and comparison with type I and type II photosensitizers.
- [32] V. Duarte, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 496-502. Insertion of dGMP and dAMP during in vitro DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine.
- [33] 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.

- [34] H. Ling, F. Boudsocq, R. Woodgate, W. Yang, *Mol. Cell* **2004**, *13*, 751-762. Snapshots of replication through an abasic lesion; structural basis for base substitutions and frameshifts.
- [35] S. Dutta, Y. Li, D. Johnson, L. Dzantiev, C. C. Richardson, L. J. Romano, T. Ellenberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 16186-16191. Crystal structures of 2-Acetylaminofluorene and 2-Aminofluorene in complex with T7 DNA polymerase reveal mechanisms of mutagenesis.
- [36] H. Ling, F. Boudsocq, B. S. Plosky, R. Woodgate, W. Yang, *Nature* **2003**, *424*, 1083-1087. Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution.
- [37] Y. Li, S. Dutta, S. Doublé, H. M. Bdour, J. S. Taylor, T. Ellenberger, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 784-790. Nucleotide insertion opposite a cis-syn thymine dimer by a replicative DNA polymerase from bacteriophage T7.
- [38] E. C. Friedberg, *Nature* **2003**, *421*, 436-440. DNA damage and repair.
- [39] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709-715. Instability and decay of the primary structure of DNA.
- [40] J. C. Fromme, A. Banerjee, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 43-49. DNA glycosylase recognition and catalysis.
- [41] H. E. Krokan, R. Standal, G. Slupphaug, *Biochem. J.* **1997**, *325*, 1-16. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA.
- [42] G. P. Holmquist, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1998**, *400*, 59-68. Endogenous lesions, S-phase-independent spontaneous mutations, and evolutionary strategies for base excision repair.
- [43] D. O. Zharkov, G. Shoham, A. P. Grollman, *DNA Repair* **2003**, *2*, 832-869. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases.
- [44] M. Berger, J. Cadet, *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **1985**, *40*, 1519-1531. Isolation and Characterization of the Radiation-Induced Degradation Products of 2'-Deoxyguanosine in Oxygen-Free Aqueous Solutions.
- [45] K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8636-8637. Synthesis of oligonucleotides containing Fapy·dG (N<sup>6</sup>-(2-Deoxy- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine).
- [46] L. T. Burgdorf, Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg **2001**.
- [47] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 293-301. Synthesis, stability, and conformation of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion.

- [48] K. Haraguchi, M. O. Delany, C. J. Wiederholt, A. Sambandam, Z. Hantosi, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3263-3269. Synthesis and characterization of oligodeoxynucleotides containing formamidopyrimidine lesions and nonhydrolyzable analogues.
- [49] Y. L. Jiang, C. J. Wiederholt, J. N. Patro, K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **2004**, *70*, 141-149. Synthesis of Oligonucleotides Containing Fa-pydG (N6-(2-Deoxy- $\alpha,\beta$ -D-erythropentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) using a 5'-Dimethoxytrityl Dinucleotide Phosphoramidite.
- [50] J. N. Patro, K. Haraguchi, M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13397-13403. Probing the Configurations of Formamidopyrimidine Lesions FaPydA and FaPydG in DNA Using Endonuclease IV.
- [51] C. J. Chetsanga, T. Lindahl, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 3673-3683. Release of 7-Methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*.
- [52] C. Lagravère, B. Malfoy, M. Leng, J. Laval, *Nature* **1984**, *310*, 798-800. Ring-opened alkylated guanine is not repaired in Z-DNA.
- [53] T. R. O'Connor, S. Boiteux, J. Laval, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 5879-5894. Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis.
- [54] J. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M. H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman, S. Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 4690-4694. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity.
- [55] B. Tudek, S. Boiteux, J. Laval, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3079-3084. Biological properties of imidazole ring-opened N7-Methylguanine in M13mp18 phage DNA.
- [56] K. Asagoshi, T. Yamada, H. Terato, Y. Ohyama, Y. Monden, T. Arai, S. Nishimura, H. Aburatani, T. Lindahl, H. Ide, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4956-4964. Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine.

- [57] M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1460-1465. Synthesis of oligonucleotides and thermal stability of duplexes containing the beta-C-nucleoside analogue of Fapy center dot dG.
- [58] K. Asagoshi, H. Terato, Y. Ohya, H. Ide, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14589-14597. Effects of a guanine-derived formamidopyrimidine lesion on DNA replication - Translesion DNA synthesis, nucleotide insertion, and extension kinetics.
- [59] B. Tudek, *J. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *36*, 12-19. Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance.
- [60] R. K. Robins, L. B. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 252-253. Ring cleavage of purine nucleosides to yield possible biogenetic precursors of pteridines and riboflavin.
- [61] F. Coste, M. Ober, T. Carell, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44074-44083. Structural basis for the recognition of the FaPydG lesion (2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by the Fpg DNA glycosylase.
- [62] M. Ober, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität **2005**.
- [63] M. Ober, H. Muller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143-18149. Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion.
- [64] S. Portmann, K.-H. Altmann, N. Reynes, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2396-2403. Crystal Structures of Oligodeoxyribonucleotides Containing 6'- $\alpha$ -Methyl and 6'- $\alpha$ -Hydroxy Carbocyclic Thymidines.
- [65] C. Thibaudeau, A. Kumar, S. Bekiroglu, A. Matsuda, V. E. Marquez, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5447-5462. NMR conformation of (-)- $\beta$ -D-aristeromycin and its 2'-deoxy and 3'-deoxy counterparts in aqueous solution.
- [66] F. Johnson, G. Dorman, R. A. Rieger, R. Marumoto, C. R. Iden, R. Bonala, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 193-202. Synthesis of enzymatically noncleavable carbocyclic nucleosides for DNA-N-glycosylase studies.
- [67] A. Denisov, E. Zamaratski, T. Maltseva, A. Sandstrom, S. Bekiroglu, K.-H. Altmann, M. Egli, J. Chattopadhyaya, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1998**, *16*, 547-568. The solution conformation of a carbocyclic analog of the Dickerson-Drew do-

- decamer: Comparison with its own X-ray structure and that of the NMR structure of the native counterpart.
- [68] S. Smirnov, F. Johnson, R. Marumoto, C. de los Santos, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, *17*, 981-991. Structure of an 11-mer DNA duplex containing the carbocyclic nucleotide analog: 2'-deoxyaristeromycin.
- [69] B. Karahalil, P.-M. Girard, S. Boiteux, M. Dizdaroglu, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1228-1233. Substrate specificity of the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals.
- [70] P. A. van der Kemp, D. Thomas, R. Barbey, R. de Oliveira, S. Boiteux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 5197-5202. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine.
- [71] C. J. Wiederholt, M. O. Delaney, M. A. Pope, S. S. David, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9755-9760. Repair of DNA containing Fapy center dot dG and its  $\beta$ -C-nucleoside analogue by formamidopyrimidine DNA glycosylase and MutY.
- [72] O. D. Schärer, J. Jiricny, *Bioessays* **2001**, *23*. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases.
- [73] M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, *FASEB J.* **2003**, *17*, 1195-1214. Oxidative DNA damage: Mechanisms, Mutation, and Disease.
- [74] M. Sugahara, T. Mikawa, T. Kumasaka, M. Yamamoto, R. Kato, K. Fukuyama, Y. Inoue, S. Kuramitsu, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3857-3869. Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8.
- [75] J. C. Fromme, G. L. Verdine, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 544 - 552. Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM.
- [76] L. Serre, K. P. de Jesus, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2854-2865. Crystal structure of the *Lactococcus lactis* formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA.

- [77] D. O. Zharkov, R. A. Rieger, C. R. Iden, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5335-5341. NH<sub>2</sub>-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein.
- [78] J. C. Fromme, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51543-51548. DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM.
- [79] F. Coste, M. Ober, T. Carell, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44074-44083. Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase.
- [80] C. J. Wiederholt, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7278-7279. Fapy-dG instructs Klenow exo(-) to misincorporate deoxyadenosine.
- [81] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *eingereicht*. Structural basis for the mutagenic potential of the oxidative DNA lesion FaPydG during high-fidelity DNA replication.
- [82] F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 318-325. Genetic Regulatory Mechanisms in Synthesis of Proteins.
- [83] S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson, *Nature* **1961**, *190*, 576-581. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis.
- [84] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry*, Wiley, New York, **1999**.
- [85] [[http://www.mun.ca/biology/scarr/4241F2\\_ribosome.jpg](http://www.mun.ca/biology/scarr/4241F2_ribosome.jpg)], **2007**.
- [86] E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868-2877. A derivative from glykocolls.
- [87] V. Du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3115-3121. The Synthesis of Oxytocin.
- [88] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2152. Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide.
- [89] A. Guy, A. Lobgeois, M. Lemaire, *J. Fluorine Chem.* **1986**, *32*, 361-366. Fluoral Hemiacetal, a New Reagent for Aromatic Trifluoro Alkylation.
- [90] J. M. Stewart, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Vol. 289, **1997**, pp. 29-44.

- [91] B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1922-1933. Synthesis of Ribonuclease A.
- [92] A. D. Frankel, S. Biancalana, D. Hudson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 7397-7401. Activity of Synthetic Peptides from the Tat Protein of Human Immunodeficiency Virus Type-1.
- [93] R. Chun, C. G. Glabe, H. Fan, *J. Virol.* **1990**, *64*, 3074-3077. Chemical Synthesis of Biologically-Active Tat Trans-Activating Protein of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1.
- [94] Y. Nishiuchi, T. Inui, H. Nishio, J. Bodi, T. Kimura, F. I. Tsuji, S. Sakakibara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13549-13554. Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence.
- [95] A. L. Berman, E. Kolker, E. N. Trifonov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 4044-4047. Underlying Order in Protein-Sequence Organization.
- [96] M. Gerstein, *Folding & Design* **1998**, *3*, 497-512. How representative are the known structures of the proteins in a complete genome? A comprehensive structural census.
- [97] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242. The Protein Data Bank.
- [98] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91-118. Chemical synthesis of proteins.
- [99] M. Schnolzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221-225. Constructing Proteins by Dovetailing Unprotected Synthetic Peptides - Backbone-Engineered Hiv Protease.
- [100] C. F. Liu, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4149-4153. Chemical Ligation Approach to Form a Peptide-Bond between Unprotected Peptide Segments - Concept and Model Study.
- [101] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33. Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins.
- [102] D. R. Englebretsen, B. G. Garnham, D. A. Bergman, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8871-8874. A Novel Thioether Linker - Chemical Synthesis of a Hiv-1 Protease Analog by Thioether Ligation.

- [103] C. F. Liu, C. Rao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 307-312. Orthogonal ligation of unprotected peptide segments through pseudoproline formation for the synthesis of HIV-1 protease.
- [104] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-149. Über Peptidsynthesen. 8. Bildung Von S-Haltigen Peptiden Durch Intramolekulare Wanderung Von Aminoacylresten.
- [105] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation.
- [106] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960. Synthesis of native proteins by chemical ligation.
- [107] S. Kent, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 574-593. Total chemical synthesis of enzymes.
- [108] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325-4329. Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives.
- [109] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10068-10073. Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology.
- [110] T. M. Hackeng, C. M. Mounier, C. Bon, P. E. Dawson, J. H. Griffin, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 7845-7850. Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A(2).
- [111] J. A. Camarero, G. J. Cotton, A. Adeva, T. W. Muir, *J. Peptide Res.* **1998**, *51*, 303-316. Chemical ligation of unprotected peptides directly from a solid support.
- [112] L. E. Canne, P. Botti, R. J. Simon, Y. J. Chen, E. A. Dennis, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8720-8727. Chemical protein synthesis by solid phase ligation of unprotected peptide segments.
- [113] T. M. Hackeng, J. A. Fernandez, P. E. Dawson, S. B. H. Kent, J. H. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 14074-14078. Chemical synthesis and spontaneous folding of a multidomain protein: Anticoagulant microprotein S.
- [114] A. Brik, E. Keinan, P. E. Dawson, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3829-3835. Protein synthesis by solid-phase chemical ligation using a safety catch linker.

- [115] Z. Wu, A. Prah, R. Powell, B. Ericksen, J. Lubkowski, W. Lu, *J. Peptide Res.* **2003**, *62*, 53-62. From pro defensins to defensins: synthesis and characterization of human neutrophil pro  $\alpha$ -defensin-1 and its mature domain.
- [116] J. Wilken, S. B. H. Kent, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *9*, 412-426. Chemical protein synthesis.
- [117] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406. Recent Advances in the Staudinger Reaction.
- [118] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction.
- [119] I. Bosch, P. Romea, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4671-4674. Alternative Procedures for the Macrolactamization of Omega-Azido Acids.
- [120] J. Garcia, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4841-4844. New Synthetic Tricks - Triphenylphosphine-Mediated Amide Formation from Carboxylic-Acids and Azides.
- [121] J. Garcia, J. Vilarrasa, X. Bordas, A. Banaszek, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 639-640. New Synthetic Tricks - One-Pot Preparation of N-Substituted Phthalimides from Azides and Phthalic-Anhydride.
- [122] I. Bosch, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Chem. Commun.* **1995**, 91-92. Epimerization-Free Peptide Formation from Carboxylic-Acid Anhydrides and Azido Derivatives.
- [123] M. Mizuno, I. Muramoto, K. Kobayashi, H. Yaginuma, T. Inazu, *Synthesis* **1999**, 162-165. A simple method for the synthesis of *N*- $\beta$ -glycosylated-asparagine and -glutamine derivatives.
- [124] M. D. Velasco, P. Molina, P. M. Fresneda, M. A. Sanz, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4079-4084. Isolation, reactivity and intramolecular trapping of phosphazide intermediates in the Staudinger reaction of tertiary phosphines with azides.
- [125] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820-8828. Reaction mechanism and kinetics of the traceless Staudinger ligation.
- [126] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941. Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide.
- [127] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9-12. High-yielding Staudinger ligation of a phosphinothioester and azide to form a peptide.

- [128] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993-4996. Staudinger ligation of  $\alpha$ -azido acids retains stereochemistry.
- [129] B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268-5269. Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods.
- [130] M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790-11791. Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation.
- [131] R. Merckx, D. T. S. Rijkers, J. Kemmink, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515-4518. Chemoselective coupling of peptide fragments using the Staudinger ligation.
- [132] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961-6963. The generality of DNA-templated synthesis as a basis for evolving non-natural small molecules.
- [133] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1796-1800. Expanding the reaction scope of DNA-templated synthesis.
- [134] Z. J. Gartner, R. Grubina, C. T. Calderone, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1370-1375. Two enabling architectures for DNA-templated organic synthesis.
- [135] C. Bohler, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578-581. Template Switching between Pna and Rna Oligonucleotides.
- [136] J. T. Goodwin, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197-9198. Template-Directed Synthesis - Use of a Reversible-Reaction.
- [137] Y. Gat, D. G. Lynn, *Biopolymers* **1998**, *48*, 19-28. Reading DNA differently.
- [138] J. C. Leitzel, D. G. Lynn, *Chem. Rec.* **2001**, *1*, 53-62. Template-directed ligation: From DNA towards different versatile templates.
- [139] R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 49-56. Template-directed ligation of peptides to oligonucleotides.
- [140] S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9970-9981. Single-Nucleotide-Specific PNA-Peptide Ligation on Synthetic and PCR DNA Templates.
- [141] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10304-10306. Multistep small-molecule synthesis programmed by DNA templates.

- [142] X. Y. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848-4870. DNA-Templated organic synthesis: Nature's strategy for controlling chemical reactivity applied to synthetic molecules.
- [143] Y. Gat, D. G. Lynn, *Templated Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [144] C. H. Park, R. S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2453-2463. New Photoactivated Protecting Groups. 6. *p*-Hydroxyphenacyl: A Phototrigger for Chemical and Biochemical Probes.
- [145] R. S. Givens, J. F. W. Weber, P. G. Conrad, G. Orosz, S. L. Donahue, S. A. Thayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2687-2697. New Phototriggers 9: *p*-Hydroxyphenacyl as a C-Terminal Photoremovable Protecting Group for Oligopeptides.
- [146] R. S. Givens, L. W. Kueper, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 55-66. Photochemistry of phosphate esters.
- [147] F. Büsch, *Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg* **2003**. Synthese eines Photolinkers zur templat-gesteuerten Peptidsynthese.
- [148] J. M. Aramini, S. H. Cleaver, R. T. Pon, R. P. Cunningham, M. W. Germann, *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 77-91. Solution structure of a DNA duplex containing an alpha-anomeric adenosine: Insights into substrate recognition by endonuclease IV.
- [149] K. Biggadike, A. D. Borthwick, D. Evans, A. M. Exall, B. E. Kirk, S. M. Roberts, L. Stephenson, P. Youds, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1988**, *3*, 549-554. Use of diethylaminosulphur trifluoride (DAST) in the preparation of synthons of carbocyclic nucleosides.
- [150] O. R. Ludek, C. Meier, *Synthesis* **2003**, 2101-2109. New convergent synthesis of carbocyclic nucleoside analogues.
- [151] L. T. Burgdorf, *Diplomarbeit, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich*, **1998**.
- [152] W. Pfeleiderer, H. Walter, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1964**, *677*, 113-126. Untersuchung in der Pyrimidinreihe, XIV: Umsetzung mit 4-Chlor-5-Nitro-Pyrimidinen.
- [153] W. Pfeleiderer, H. Zondler, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 3008-3021. Synthese und Eigenschaften blockierter 7,8-Dihydropterine.

- [154] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *19*, 3281-3289. Excess electron transfer in flavin-capped DNA-hairpins.
- [155] J. C. Temple, B. H. Smith, J. A. Montgomery, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3141-3142. Preparation of 2,5-Diamino-4,6-dichlorpyrimidin.
- [156] C. F. Lane, J. J. Daniels, *Org. Syn.* **1998**, *Vol. 6*, 719. (-)-Isopinocampheol.
- [157] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, 2nd ed., Wiley, New York, **1991**.
- [158] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 237-253. Nachweis gehinderter Rotationen und Inversionen durch NMR-Spektroskopie.
- [159] J. A. Pople, W. G. Schneider, H. J. Bernstein, *High-resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw-Hill, New York, NY, USA, **1959**.
- [160] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 5th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, **1995**.
- [161] C. W. Noell, R. K. Robins, *J. Med. Chem.* **1962**, *5*, 558-588. Potential Purine Antagonists. XXXI. The Preparation of Certain 9-Alkyl-2-amino-6-purinethiols and Related Derivatives as Antitumor Agents.
- [162] B. I. K. (DE), *Vol. DE4136114*, **1993**.
- [163] B. I. K. (DE), *Vol. DE19600713*, **1997**.
- [164] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, A. Tsuchida, M. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6406-6407. Photoinduced DNA Cleavage via Electron Transfer: Demonstration That Guanine Residues Located 5' to Guanine Are the Most Electron-Donating Sites.
- [165] D. Poland, H. A. Scheraga, *Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers*, Adenine Press, New York, **1970**.
- [166] L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601-1620. Calculating Thermodynamic Data for Transitions of Any Molecularity from Equilibrium Melting Curves.
- [167] F. Barone, A. Bonincontro, F. Mazzei, A. Minoprio, F. Pedone, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 61-67. Effect of thymine dimer introduction in a 21 base pair oligonucleotide.
- [168] G. E. Plum, F. Johnson, A. P. Grollman, K. Breslauer, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16148-16160. Influence of the oxidatively damaged adduct 8-

oxodeoxyguanosine on the conformation, energetics, and thermodynamic stability of a DNA duplex.

- [169] M. F. Goodman, S. Creighton, L. B. Bloom, J. Petruska, *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **1993**, *28*, 83-126. Biochemical Basis of DNA Replication Fidelity.
- [170] S. Creighton, L. B. Bloom, M. F. Goodman, *Method Enzymol.* **1995**, *262*, 232-257. Gel fidelity assay measuring nucleotide misinsertion, exonucleolytic proofreading, and lesion bypass efficiencies.
- [171] A. R. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman, New York, **1985**.
- [172] J. A. Campbell, W. K. Lee, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4602-4616. Chiroselective Syntheses of Precursors of Cyclopentane and Cyclopentene Carbocyclic Nucleosides by [3+3]-Coupling and Transannular Alkylation.
- [173] S. Creighton, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4759-4774. Gel Kinetic Analysis of DNA Polymerase Fidelity in the Presence of Proofreading Using Bacteriophage T4 DNA Polymerase.
- [174] M. T. Washington, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36835-36838. Fidelity and processivity of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase  $\eta$ .
- [175] R. E. Johnson, M. T. Washington, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7447-7450. Fidelity of human DNA polymerase  $\eta$ .
- [176] R. Kusumoto, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6090-6099. Translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$  across thymine glycol lesions.
- [177] H. S. Hwang, J. S. Taylor, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14612-14623. Role of base stacking and sequence context in the inhibition of yeast DNA polymerase  $\eta$  by pyrene nucleotide.
- [178] S. Boiteux, T. R. O'Connor, J. Laval, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3177-3183. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein.
- [179] M. L. Michaels, L. Pham, C. Cruz, J. H. Miller, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 3629-3632. MutM, a protein that prevents G:C $\rightarrow$ T:A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase.

- [180] H. Czczot, B. Tudek, B. Lambert, J. Laval, S. Boiteux, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 412-416. Escherichia coli Fpg protein and UvrABC endonuclease repair DNA damage induced by methylene blue plus visible light in vivo and in vitro.
- [181] J. P. Radicella, C. Dherin, C. Desmaze, M. S. Fox, S. Boiteux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 8010-8015. Cloning and characterization of hOgg1, a human homolog of the ogg1 gene of Saccharomyces cerevisiae.
- [182] V. Bailly, W. G. Verly, T. R. O'Connor, J. Laval, *Biochem. J* **1989**, *262*, 581-589. Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase.
- [183] T. R. O'Connor, J. Laval, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 5222-5226. Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites.
- [184] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-1222. Reactifs de couplage peptidique I (1)-1'-Hexafluorophosphate de benzotriazolyl *N*-Oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.).
- [185] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208. Py-BOP(R): A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product.
- [186] B. Zacharie, T. P. Connolly, C. L. Penney, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7072-7074. A Simple One-Step Conversion of Carboxylic Acids to Esters Using EEDQ.
- [187] M. P. Glenn, L. K. Pattenden, R. C. Reid, D. P. Tyssen, J. D. A. Tyndall, C. J. Birch, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 371-381. Beta-Strand Mimicking Macrocyclic Amino Acids: Templates for Protease Inhibitors with Antiviral Activity.
- [188] T. R. Kane, C. Q. Ly, D. E. Kelly, J. M. Dener, *J. Comb. Chem* **2004**, *6*, 564-572. Solid-Phase Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Derivatives Employing Support-Bound Tyrosine Esters in the Pictet-Spengler Reaction.
- [189] R. Lakhmiri, P. Lhoste, D. Sinou, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4669-4672. Allyl ethyl carbonate/palladium (0), a new system for the one step conversion of alcohols into allyl ethers under neutral conditions.
- [190] H. O. House, V. K. Jones, G. A. Frank, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3327-3333. The Chemistry of Carbanions. VI. Stereochemistry of the Wittig Reaction with Stabilized Ylids.

- [191] H. Gali, K. R. Prabhu, S. R. Karra, K. V. Katti, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 676-680. Facile Ring-Opening Reactions of Phthalimides as a New Strategy to Synthesize Amide-Functionalized Phosphonates, Primary Phosphines, and Bisphosphines.
- [192] S. Gobec, K. Strancar, U. Urleb, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 167-170. A general synthesis of ethyl 4-aminophenyl and ethyl 4-[amino(hydroxyimino)methyl]phenyl phosphonates.
- [193] D. Wernic, J. DiMaio, J. Adams, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4224-4228. Enantio-specific synthesis of L- $\alpha$ -aminosuberic acid. Synthetic applications in preparation of atrial natriuretic factor analogs.
- [194] V. Constantinou-Kokotou, V. Magrioti, T. Markidis, G. Kokotos, *J. Peptide Res.* **2001**, *58*, 325-331. Synthesis of enantiopure non-natural alpha-amino acids using *tert*-butyl (2*S*)-2-[Bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoate as key-intermediate: the first synthesis of (*S*)-2-Amino-oleic acid.
- [195] N. Kubasch, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2710-2726. Synthesis of muramyl peptides containing meso-diaminopimelic acid.
- [196] J. H. Clark, J. M. Miller, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 599-602. Hydrogen bonding in organic synthesis V: potassium fluoride in carboxylic acids as an alternative to crown ether with acid salts in the preparation of phenacyl esters.
- [197] E. M. Boon, J. K. Barton, P. I. Pradeepkumar, J. Isaksson, C. Petit, J. Chattopadhyaya, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3402-3405. An electrochemical probe of DNA stacking in an antisense oligonucleotide containing a C3'-endo-locked sugar.
- [198] C. M. DiBlasi, D. E. Macks, D. S. Tan, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1777-1780. An Acid-Stable *tert*-Butyldiarylsilyl (TBDAS) Linker for Solid-Phase Organic Synthesis.
- [199] H. S. Forrest, R. Hull, H. J. Rodda, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1951**, 3-6. Synthesis of 8-Substituted Pteridine Derivatives.
- [200] G. Lonergan, C. Psachoulia, V. Marmaras, J. Hondrelis, C. Sanida, J. Matsoukas, *Anal. Biochem.* **1989**, *176*, 368-372. Isolation and identification of free amino acids as crystalline *N*-*t*-butyloxycarbonyl, *O*-phenacyl derivatives.

## Curriculum vitae Florian Büsch



### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Florian Büsch  
Adresse: Schifferstadter Str. 22, 67165 Waldsee  
Geburtsdatum/-ort: 24. Juni 1977 in Gießen a. d. Lahn  
Mobil: 0049-(0)176-20114498  
Email: florian.buesch@web.de  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder  
Konfession: evangelisch-lutherisch  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULAUSSBILDUNG UND MILITÄRDIENST

08/83 - 06/85 Geschwister Scholl Grundschule, Mühlheim am Main  
08/85 - 06/88 Grundschule am Koggenweg, Lübeck  
08/88 - 05/97 Ernestinenschule - Gymnasium zu Lübeck  
**31.05.1997** **Abitur**  
07/97 -04/98 Militärdienst in der Stabskompanie des Panzerbataillons 183 in Boostedt

### HOCHSCHULSTUDIUM

10/98 - 03/03 Studium der Chemie an der Philipps-Universität in Marburg a. d. Lahn  
03/03 - 09/03 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Thomas Carell an der Philipps-Universität  
Marburg (Thema: Synthese eines Photolinkers zur templat-gesteuerten Peptidsynthese)  
**02.09.03** **Hochschulabschluss: Diplom Chemiker**

### TÄTIGKEITEN UND PRAKTIKA IN DER INDUSTRIE

04/98 - 09/98 Arbeits- und Sprachaufenthalt in Bergen, Norwegen  
04/01 - 07/03 Arbeitsverhältnisse (insg. 20 Monate) als studentische Hilfskraft (Organisation und Betreuung des chemischen Praktikums für Medizinstudenten in Marburg)  
04/02 - 10/02 Freiberufliche Tätigkeit für MIB - Munich Innovative Biomaterials GmbH, Planegg-Martinsried (Synthese von Polyaminen)  
2001 - 03 Mehrmonatige Tätigkeit bei Taros Chemicals, damals Marburg (Auftrags-synthesen für diverse chemische Unternehmen)

Darüber hinaus erfolgten Tätigkeiten und Praktika in der nicht-chemischen Industrie bei Schütt&Grundeis, ESKA Implants, Nordischer Maschinenbau Rud. Baader GmbH und Co. KG, CeWe Color AG & Co. OHG, alle in Lübeck.

#### PROMOTION

09/03 - 07/07 Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von **Prof. Dr. Thomas Carell**

02.10.2007 Verteidigung am Department für Chemie und Biochemie (Themen: Synthese und Untersuchungen eines  $\alpha$ -konfigurierten oxidativen DNA-Schadens ( $\alpha$ - $\alpha$ FaPydG) sowie Entwicklung einer PNA-Templat dirigierten Ligationstechnik

#### BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

**08/07 Laborleiter BASF, Ludwigshafen, Polymerforschung B1**

#### KENNTNISSE UND FÄHIGKEITEN

##### Sprachen:

Deutsch: Muttersprache

Englisch: fließend

Norwegisch: fließend

Französisch: Grundkenntnisse

##### Computerkenntnisse:

MS Office, Origin, Adobe Photoshop und Illustrator, ChemDraw Ultra, Win NMR, MestReC, etc.

Erwerb der eingeschränkten Sachkunde nach § 5 der Chemikalienverbotsverordnung

#### HOBBIES

Violoncello, Tennis, Tischtennis



München, den 25. Juli 2007

Florian Büsch