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

Synthese und Einbau des Sporenphotoproduktes in DNA

Eva Bürckstümmer
aus
Regensburg

2008

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinnen 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 25.03.2008

(Bürckstümmer Eva)

Dissertation eingereicht am 3.04.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Zipse

Tag der mündlichen Prüfung am 9.05.2008

Was wir wissen, ist ein Tropfen -
Was wir nicht wissen, ein Ozean.
Isaac Newton

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Carell danke ich für die interessante und abwechslungsreiche Themenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Unterstützung. Durch das von ihm gebotene, hervorragende Arbeitsumfeld wurde das Gelingen dieser Arbeit erst möglich.

Prof. Dr. Hendrik Zipse danke ich für die Übernahme des Koreferats. Gleichzeitig sei hier allen Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Mitwirken an der mündlichen Prüfung gedankt.

Ich danke Frau *Slava Gärtner*, Frau *Sabine Voß* und Frau *Claudia Gräf* für ihre schnelle und unbürokratische Hilfe in allen organisatorischen und chemischen Belangen. Frau Sabine *Voß* sei hierbei besonders für die ausdauernde Synthese vieler Stufen und die zügige und unproblematische Durchführung des Umlaufs zu dieser Dissertation gedankt.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren.

Für das Überexprimieren und Reinigen der SP-Lyase danke ich *Dr. Claudia Chiocchini* und *Melanie Maul.* Darüber hinaus danke ich besonders *Dr. Carsten Pieck* für seine gute Zusammenarbeit und stete Bereitschaft zur Beantwortung von biochemischen Fragestellungen und *Andreas Glas* und *Ralf Strasser* für die Einführung in FP-Messungen. Für das Modelling danke ich zudem *Christian Trindler.*

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre sowohl im Labor als auch in der Freizeit. Bei *Dr. Sascha Breeger, Dr. Simone Arnold, Dr. Johannes Gierlich*, *Dr. Martin von Meltzer* und *Frau Voß* bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis. *Johannes Gierlich* danke ich insbesondere für seine hilfreichen Tipps bei nahezu allen Computer-betreffenden Fragen und das Einrichten meines DSL-Anschlusses. Desweiteren möchte ich mich bei meinem „Mädchenlabor“, bzw. „Labor Alpenblick“ bedanken für den vielen Spaß den wir hatten. Hier möchte ich mich vor allem bei meiner Boxkollegin *Sabine Voß* für die vielen, hilfreichen Gespräche, die Unterstützung und Freundschaft bedanken. Weiterhin danke ich allen sportlichen Arbeitskreismitgliedern für die vielen gemeinsamen Stunden und das Ablenken von der

Arbeit. Hier seien *Martin von Meltzer*, *Aaron Alt, Antonio Manetto* und *Simone Arnold* für die Lauftreffs, bzw. Sportkurse genannt, *Steffi Schorr* fürs Klettern und Segeln am Isselmeer und natürlich *Christian Trindler* für viele gemeinsame Stunden in den Bergen.

Für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich herzlich *Andreas Glas, Corinna Kaul, Thomas Reißner* und *Christian Trindler.*

Der abschließende und größte Dank gebührt meiner Familie für die immerwährende, selbstlose Unterstützung sowohl während des Studiums in Frankfurt a. M. als auch während meiner Promotion in München. *Walter Rickel* und *Christian Trindler* danke ich, dass sie mich in dieser Zeit begleitet haben und so manche Höhen und Tiefen mit mir geteilt haben. Ohne diesen beständigen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Teile dieser Arbeit wurden auf Konferenzen präsentiert:

1. E. Bürckstümmer, M. G. Friedel, J. C. Pieck, T. Carell, *Response to DNA damage: Insight from Chemical, biochemical, structural biology and cellular studies. Royal Society of Chemistry,* University of Sussex, Great Britain, 19.-21. Sep. **2005**. Synthesis and repair of the Spore Photoproduct.

2. J. C. Pieck, E. Bürckstümmer, U. Hennecke, M. G. Friedel, T. Carell; *Gordon Research Conference 2006: DNA Damage, Mutation and Cancer,* Ventura, USA, 5.-10. März **2006**. Direct repair of the Spore Photoproduct and the (6-4) Photolesion.

3. E. Bürckstümmer, J. C. Pieck, T. Carell, *XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids,* Universität Bern, Schweiz, 03.-07. Sep. **2006**. Synthesis of the Spore Photoproduct and its incorporation into DNA.

4. J. C. Pieck, E. Bürckstümmer, T. Carell; *9th Biennial Meeting of the German Society for Research on DNA repair,* Hamburg, Deutschland, 12.-15. Sep. **2006**. Repair, mutagenic properties and generation of the Spore Photoproduct.

5. J. C. Pieck, E. Bürckstümmer, T. Carell; *Münchner Industrietag 2006,* München, Deutschland, 5. Okt. **2006**. Repair, mutagenic properties and generation of the Spore Photoproduct.

6. E. Bürckstümmer, J. C. Pieck, T. Carell, *2nd European Conference on Chemistry for Life Science,* University of Wroclaw, Polen, 04.-08. Sep. **2007**. The Spore Photoproduct: Synthesis and biological studies.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG 9
SUMMARY 11
1. EINLEITUNG 13
1.1 UV-Licht induzierte DNA-Schäden und deren Reparatur 15
1.1.1 Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) 16
1.1.1.1 Allgemeines über CPD 16
1.1.1.2 Reparatur des CPDs 19
1.1.2 (6-4)-Photoprodukt (6-4PP) 21
1.1.2.1 Allgemeines über das 6-4PP 21
1.1.2.2 Reparatur des (6-4)-Photoproduktes 22
1.1.3 Dewar-Photoprodukt 24
1.1.4 Sporenphotoprodukt (SP) 25
1.1.4.1 Sporenmorphologie und Aufbau 26
1.1.4.2 DNA-Verpackung in Sporen 29
1.1.4.3 DNA-Schädigung in Sporen 33
1.1.4.4 Strukturaufklärung des Sporenphotoproduktes 34
1.1.4.5 DNA-Reparatur in Sporen 41
2. SYNTHESE UND UNTERSUCHUNG DES SPORENPHOTOPRODUKTES 45
2.1 Aufgabenstellung 45
2.2 Synthese des Sporenphotoproduktes 18a/b zum Einbau in DNA 46
2.2.1 Retrosynthese 46
2.2.2 Synthese der Dihydrothymidineinheit 22 47
2.2.3 Synthese des Allylbromids 23 49
2.2.4 Kupplung zum Dimer und Synthese der Phosphoramidite 18a/b 50
2.2.5 Aufklärung der Konfiguration am C5 52
2.3 Synthese des Sporenphotoproduktes 19a/b zum Einbau in DNA 60
2.3.1 Retrosynthese 60
2.3.2 Synthese der Dihydrothymidineinheit 34 60
2.3.3 Synthese des Allylbromids 33 61
2.3.4 Kupplung zum Dimer und Synthese der Phosphoramidite 19a/b 62
2.3.5 Aufklärung der Konfiguration am C5 64
2.4 DNA-Festphasensynthese 70
2.5 Versuche zur Synthese des Sporenphotoproduktes 20a/b mit einem Phosphat-Rückgrat 73

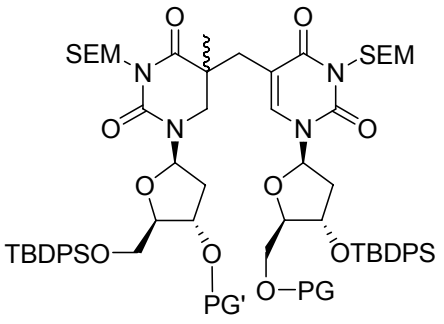
2.5.1 Aufbau des Rückgrates über Belichtung 73
2.5.1.1 Syntheseplanung 73
2.5.1.2 Synthese der Dimeren 45a/b/c/d 74
2.5.2 Aufbau des Rückgrates über Synthese 76
2.5.2.1 Retrosynthese 76
2.5.2.2 Synthese der Dimeren 50a/b 77
2.5.3 Aufbau des Rückgrates enzymatisch 78
3. BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN 79
3.1 Schmelzpunktstudien 79
3.2 Modelling des SPs in die DNA 81
3.3 Bindungsstudien 83
3.4 Abgleich mit der Natur 85
4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 87
5. EXPERIMENTELLER TEIL 89
5.1 Material und Methoden 89
5.2 Synthese des SP 18a/b 92
5.3 Synthese des SP 19a/b 106
5.4 Festphasensynthese 121
5.4.1 Synthese 121
5.4.2 Entschützung und Aufreinigung 122
5.5 Synthese des SP mit Phosphatrückgrat 45a/b/c/d 123
5.6 Synthese des SP mit Phosphatrückgrat 50a/b 129
5.7 Synthese von Dimethoxytrityltriflat 38 130
5.8 Synthese von 7a/b 131
5.9 Schmelzpunkt-Messungen 132
5.10 FP-Messung 132
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 134
7. LITERATURVERZEICHNIS 138

Zusammenfassung

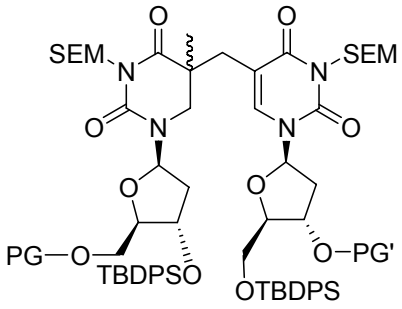
Durch Bestrahlung von Organismen mit UV-Licht werden verschiedene Photoschäden in der zellulären DNA erzeugt. Diese sind für die Alterung und Mutagenese verantwortlich. Für den Fortbestand und das Leben eines jeden Organismus ist die Erhaltung der genetischen Information jedoch dringend erforderlich. Aus diesem Grund hat jeder Organismus unterschiedliche Reparaturmechanismen zur Beseitigung von Schäden.

Bei Sporen konnte eine 5-50mal höhere UV-Resistenz als bei entsprechenden wachsenden Zellen beobachtet werden. Es bildet sich hier ein einzigartiger Photoschaden, der Sporenphotoschaden. Die Reparatur dieses Schadens durch die Sporenphotoprodukt-Lyase ist dabei ungewöhnlich und sehr effizient. Der genaue Reparaturmechanismus ist jedoch aufgrund fehlender, definierter Substrate nicht bekannt.

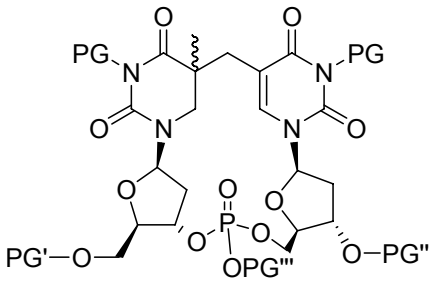
Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals beide Diastereomere der teilweise entschützten Sporenphotoprodukt-Analoga **30a/b** und **43a/b** in ausreichend großen Mengen synthetisiert werden (Abbildung I).



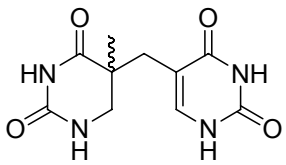
30a/b, bzw. **18a/b**



43a/b, bzw. **19b**



45a/b, bzw. **50a/b**



7a/b

Abb. I: Struktur der wichtigsten, im Rahmen der Arbeit hergestellten Diastereomere zur Untersuchung des Sporenphotoproduktes. **30a/b**, **43a/b**: PG=PG'=H, **18a/b**, **19b**: PG=DMT, PG'=CED, **45a/b**: PG=H, PG'=DMT,PG''=H, PG'''= O^-, **50a/b**: PG=SEM, PG'=PG''=TBDPS, PG'''=O-CH_2-CCl_3.

Nach der Trennung der Diastereomeren mittels *np*-HPLC, gelang an diesem Punkt die Bestimmung der Stereochemie am C5 der Dihydrothymidineinheit mittels 2D-NMR-Spektroskopie (NOESY). Anschließend konnte erstmals die Synthese der jeweiligen Phosphoramiditbausteine **18a/b** und **19b** zum Einbau in DNA durch automatisierte DNA-Festphasensynthese durchgeführt werden.

Mit diesen Bausteinen war es möglich, DNA-Stränge beliebiger Sequenz mit genau definiertem Schaden zu synthetisieren. In einem letzten Schritt mussten optimierte Entschützungsprotokolle für die DNA entwickelt werden, da die Standardentschützungs-bedingungen nicht erfolgreich waren. Die DNA konnte für Reparaturassays zur Untersuchung der Sporenphotoprodukt-Lyase eingesetzt werden.

Des Weiteren wurde aus den getrennten Isomeren **30a/b** durch saure Hydrolyse zwei Standards synthetisiert (**7a/b**). Diese können für einen Vergleich mit den in der Natur entstehenden Sporenphotoprodukten verwendet werden. Dafür müsste für den natürlichen Schaden im Trockenfilm oder in der Spore belichtete DNA sauer hydrolysiert werden. Durch einen HPLC-Assay mit einer chiralen Säule könnte durch Koinjektion gezeigt werden, welches Enantiomer in der Natur vorliegt.

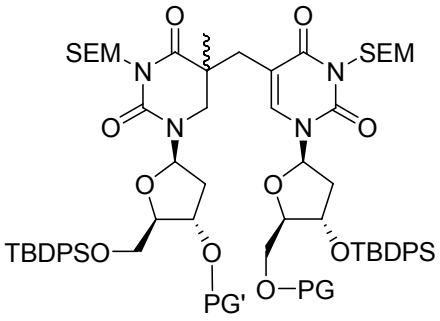
Ein weiterer Erfolg im Laufe dieser Arbeit war die Synthese des Sporenphotoproduktes mit geschlossenem Phosphatrückgrat. Dies gelang über zwei unterschiedliche Wege. Zum einen wurde das geschützte Phosphat über zwei Stufen in die Sporenphotoprodukt-Analoga **30a/b** inkorporiert. Aufgrund der schlechten Ausbeute von **50a/b** wurde die weitere Synthese zum Phosphoramidit nicht getestet. Ein anderer Weg war die Belichtung von Dithymidinmonophosphat im Trockenfilm zu **45a/b**. Hierbei war die Aufreinigung der limitierende Schritt der Synthese.

Summary

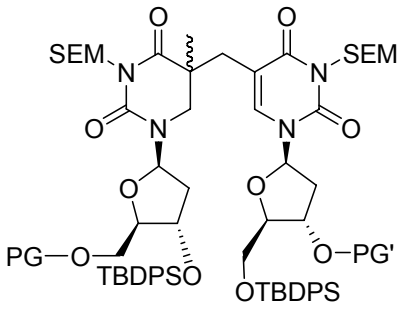
Many DNA photolesions are created upon UV irradiation of organisms. These lesions are correlated with aging and mutagenesis. However, the conservation of the genetic information is urgently required for the existence and life of every organism. Therefore every organism uses different repair mechanisms to remove lesions.

Spores have a UV resistance 5-50 times higher than the corresponding growing cells. A unique photolesion, the spore photoproduct, is formed here. Also the repair of the lesion by the spore photoproduct is unusual and very efficient. However, the exact repair mechanism of the enzyme is unclear because defined substrates are not available.

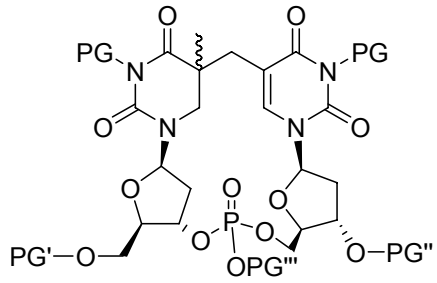
The first goal in the context of the thesis was the synthesis of the two diastereomers of the partly deprotected spore photoproduct analogues **30a/b** and **43a/b** in good yields (figure I).



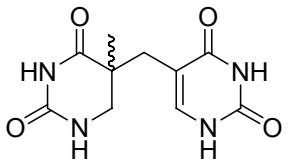
30a/b and **18a/b**



43a/b and **19b**



45a/b and **50a/b**



7a/b

Fig. I: Structures of the key compounds to investigate the spore photoproduct and the spore photoproduct lyase. **30a/b**, **43a/b**: PG=PG'=H, **18a/b**, **19b**: PG=DMT, PG'=CED, **45a/b**: PG=H, PG'=DMT, PG''=H, PG'''= O^-, **50a/b**: PG=SEM, PG'=PG''=TBDPS, PG'''=O-CH_2-CCl_3.

After the separation of the diastereomers of **30a/b** and **43a/b** via *np*-HPLC the stereo-chemistry at C5 of the dihydrothymidine was determined via 2D-NMR-spectroscopy

(NOESY). Consequently the synthesis of the phosphoramidite building blocks **18a/b** and **19b** necessary for the incorporation into DNA via automatic DNA-solid phase synthesis was successful.

With these nucleotides it was possible for the first time to synthesise DNA strands with exactly defined substrates and user-defined sequences. At this point the deprotection of the DNA with standard conditions failed. However, with some optimisations the deprotection of the DNA was successful. The DNA was now ready for repair experiments to investigate the spore photoproduct lyase.

To examine, which photoproduct is formed exactly in nature, standards **7a/b** were synthesised by acid hydrolysis of the separated isomers **30a/b**. Afterwards DNA, which was irradiated in the dry film, or irradiated spore DNA could now be treated with acid. The determination is possible by comparison of the naturally formed lesion with the standards via HPLC-assays.

The synthesis of the spore photoproduct with a closed phosphate backbone was also performed via two distinct routes. One way was the incorporation of the protected phosphate via two steps into the spore photoproduct analogues **30a/b**. However, the synthesis of **50a/b** and the following synthesis to the phosphoramidite need further optimisation. The other way of synthesising a spore photoproduct with a closed phosphate backbone was the UV irradiation of the Dithymidine-monophosphate **49a/b** to **45a/b** in a dry film. With this method mainly the spore photoproduct is formed. The key step of the synthesis was the purification and separation of the products. The synthesis of **45a/b** and the following synthesis to the phosphoramidite need further optimisation, too.

.

1. Einleitung

Die DNA ist die Grundlage für das Leben und den Fortbestand eines jeden Organismus. Im Jahre 1869 extrahierte *Miescher* erstmals eine Substanz aus Eiter, welche er „Nuklein" nannte.[1, 2] Zwanzig Jahre später wurde der Ausdruck „Nukleinsäure" durch *Altmann* eingeführt. Er entwickelte eine Methode, um aus Hefe und tierischem Gewebe Nukleinsäuren, welche früher als Nuklein bekannt waren, zu isolieren. Die Existenz der zwei Hauptformen der Nukleinsäuren, die Ribonukleinsäure (RNA) und die Desoxyribonukleinsäure (DNA), wurden früh von *Miescher* und *Kossel* entdeckt. Es konnte aber erst später der genaue Aufbau der Komponenten (heterozyklische Base, Zucker und Phosphatrückgrat) bestimmt werden.[2, 3] *Levene* und *Jacobs* führten im Jahre 1909 den Ausdruck „Nukleoside" ein, um die Zuckerderivate von Purinen und Pyrimidinen zu beschreiben. Die Nukleoside können aus RNA und DNA durch enzymatische oder chemische Hydrolyse erhalten werden. Während der 50iger und 60iger Jahre gab es weitere Entwicklungen in der Chemie der Nukleoside und Nukleotide auf der die konventionelle, synthetische Methodik beruht.

Die Nukleobasen sind sowohl in der DNA als auch RNA identisch. Das bei der DNA auftretende Thymin ist in der RNA allerdings durch ein Uracil ersetzt (Abbildung 1-1).[4]

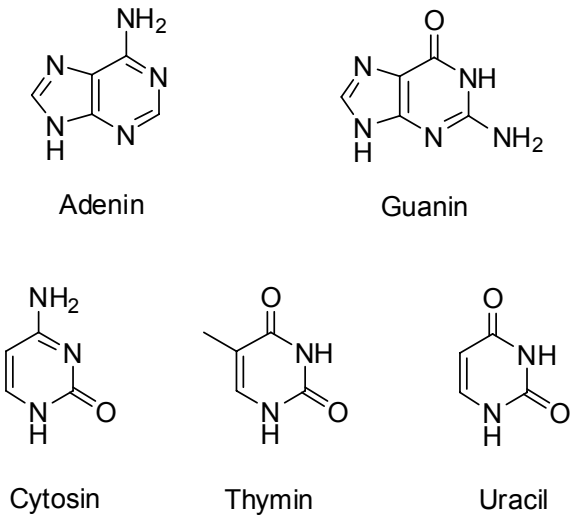
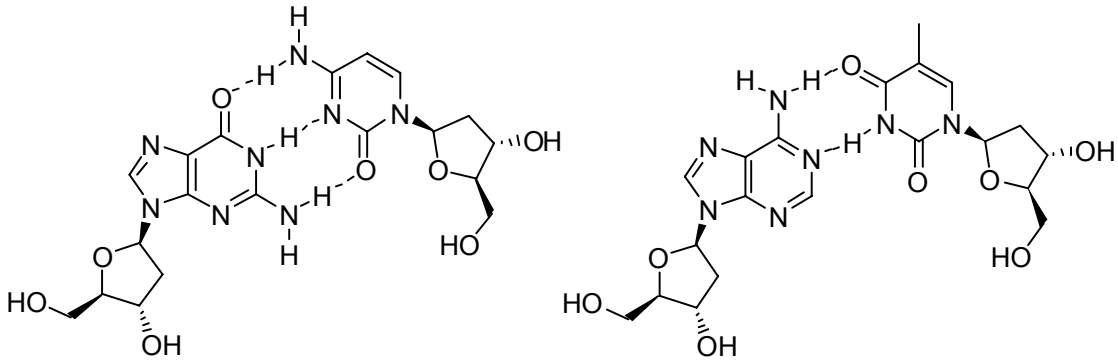


Abb. 1-1: Nukleobasen der DNA und RNA.

Die Nukleobasen sind im DNA-Einzelstrang über ein Zucker-Phosphat-Rückgrat miteinander verbunden. Die sich gegenüberliegenden Nukleobasen bilden in der DNA Doppelhelix nach dem Prinzip der Basenkomplementarität Wasserstoffbrücken-Bindungen aus.[5] Die sich bildenden spezifischen Paare nennt man Watson-Crick-Basenpaare (Abbildung 1-2).[6] In der Wasserstoffbrücken-Bindung fungiert der Amin-

Wasserstoff als Donor und das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs oder des Stickstoffs als Akzeptor.



Guanosin:Cytidin
G:C

Adenosin:Thymidin
A:T

Abb. 1-2: Watson-Crick-Basenpaare.

Die beiden wichtigsten Doppelhelixtypen bei Nukleinsäuren sind die A- und die B-Form. Wesentliche Unterschiede sind hier die deutlich stärkere Neigung der Nukleobasen relativ zur Helixachse und die Größen der Furchen bei der A-DNA. Welche Form auftritt, ist in der Regel von der Art der Nukleoside, von der Sequenz des Doppelstranges, dem Hydratisierungsgrad und der Salzkonzentration abhängig. Für die DNA ist die B-Form am häufigsten. Die RNA bildet eine A- Form Helix aus.[4]

DNA und RNA sind fragile Makromoleküle. Sie lassen sich deshalb leicht durch endogene oder exogene Prozesse schädigen. Hierzu zählen Veränderungen z. B. durch Chemikalien, Radikale, $\gamma-$ und UV-Strahlung. Bleiben diese Modifikationen unerkannt, kann es zu Mutationen und so zu einer Veränderung oder dem Verlust der genetischen Information kommen.[7-9] In vielen Fällen führt dies zu Krebs, Erberkrankungen und Alterung, oder sogar zur Apoptose.[10] Schätzungen zu Folge kommt es in einer menschlichen Zelle zu $10^4 – 10^6$ Schädigungen pro Tag.[11] Spezielle Reparatursysteme und deren zugehörigen Reparaturenzyme können jedoch die DNA-Schäden effektiv beseitigen und so die genetische Information bewahren (Abbildung 1-3).[12-16]

Nachfolgend wird speziell auf die UV-Schäden eingegangen.

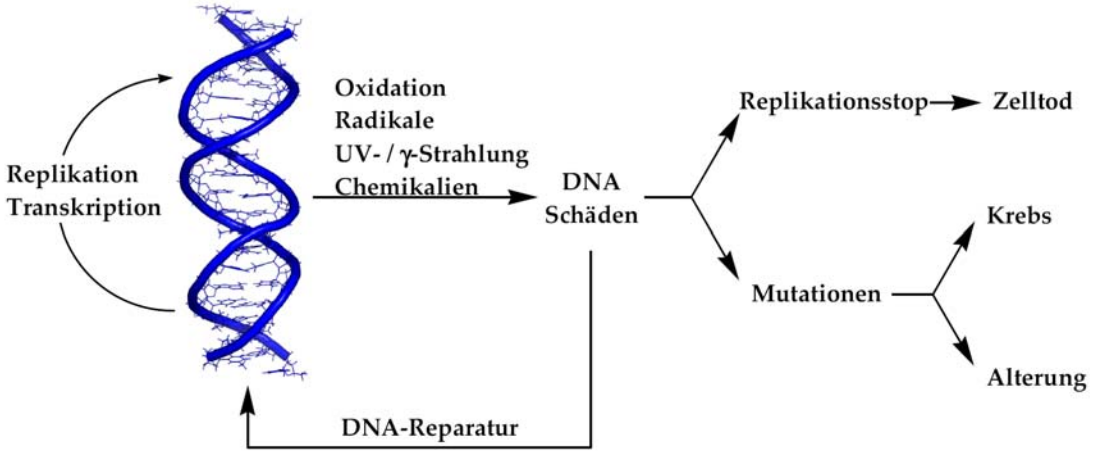


Abb. 1-3: DNA-Schäden und deren Folgen.

1.1 UV-Licht induzierte DNA-Schäden und deren Reparatur

Eine wichtige Klasse von DNA-Schäden bilden die UV-Photoschäden. Die Bestrahlung eines lebenden Organismus mit UVB (280-320 nm)- und UVC (240-280 nm)-Strahlung hat mutagene, karzinogene und tödliche Effekte.[11, 17] Es gibt einen direkten Zusammenhang zwischen der Strahlung und der Entstehung von Hautkrebs.[18-21] Beim Hautkrebs gibt es die weit verbreiteten, meist gutartigen Basallkarzinome (Basaliom) und Plattenephitelzellkarzinome, sowie das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs).[22, 23] Die Zahl der diagnostizierten malignen Melanome ist in den letzten Jahren drastisch angestiegen. Dies lässt sich auch mit einer erhöhten UV-Strahlendosis auf der Erde in Zusammenhang bringen, welche im Abbau der schützenden Ozonschicht begründet liegt.[24-27] Um die Entstehung von Hautkrebs besser verstehen und somit heilen zu können, ist es wichtig molekulare Prozesse, die zu UV-Photoschäden, bzw. deren Reparatur führen, zu untersuchen.[28-30]

Die Bildung der Photoschäden erfolgt durch die UV-Absorption der DNA-Basen im UVB- und im UVC-Bereich.[31] Die photochemische Anregung verläuft hierbei über einen vertikalen Übergang vom Grundzustand der Basen in einen angeregten Singulettzustand nach dem Franck-Condon-Prinzip (Abbildung 1-4). Das Molekül kann aus dem angeregten Zustand durch einen strahlungslosen Übergang (*internal conversion*) oder durch Fluoreszenz, also Emission eines Photons, in den Grundzustand zurückkehren. Eine weitere Möglichkeit ist das Spin-verbotene *intersystem crossing* (ISC), bei dem das Molekül in einen Triplettzustand überführt wird. Der Triplettzustand besitzt hierbei eine längere Lebensdauer, da auch der Übergang aus dem angeregten Triplettniveau in den Singulettgrundzustand Spin-verboten ist. Die sich anschließende Photoreaktionen der Basen verläuft entweder aus dem angeregten Singulett- oder Triplettzustand.[32]

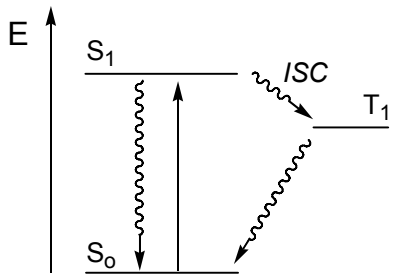


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der photochemischen Anregung nach dem Franck-Condon-Prinzip.

Die UV-Photoschäden werden dabei meist zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen gebildet.[33] Die in der Abbildung 1-5 gezeigten Photoschäden können, mit Ausnahme des Sporenphotoproduktes, auch zwischen zwei Cytidinen bzw. als gemischte Photoschäden aus Cytidin und Thymidin entstehen.

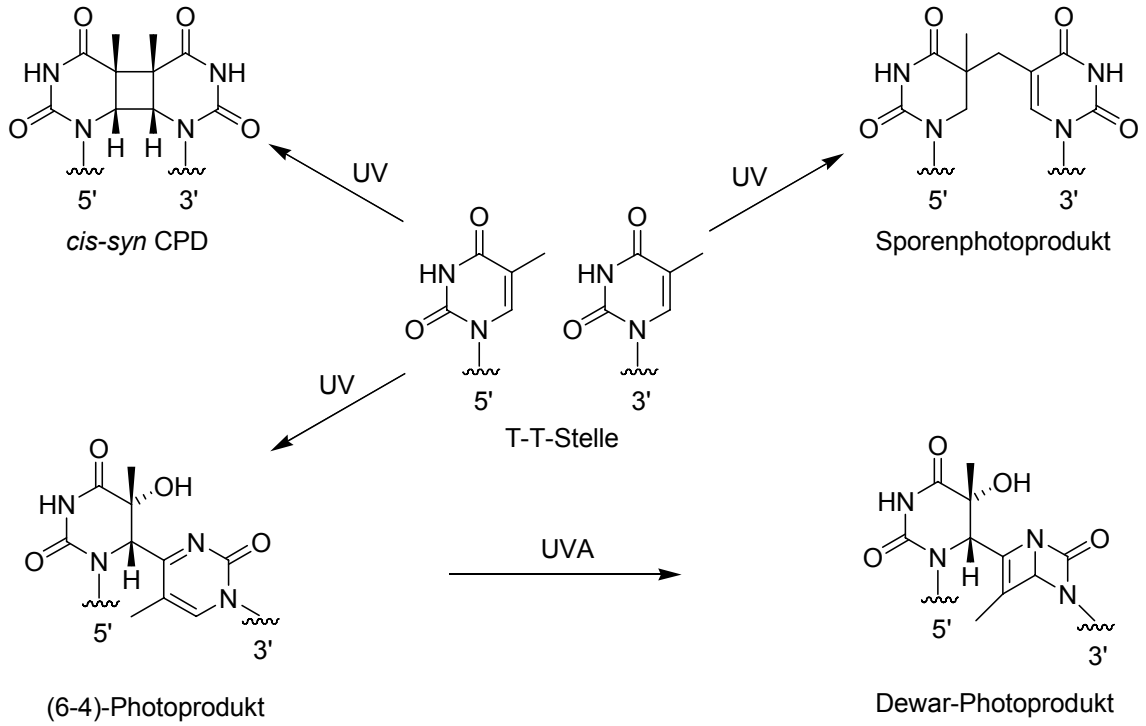


Abb. 1-5: Entstehung der häufigsten Photodimere zwischen zwei benachbarten Thymidinen.[33]

1.1.1 Cyclobutanpyrimidindimer (CPD)

1.1.1.1 Allgemeines über CPD

Der am häufigsten auftretende und am besten charakterisierte Photoschaden ist das *cis-syn* Cyclobutanpyrimidindimer. Der CPD Schaden wird durch eine [2+2]-Cycloaddition zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen entweder aus dem angeregtem Singulett- oder dem Triplettzustand gebildet (Abbildung 1-6).[33] Durch die in der DNA-Doppelhelix

vorgegebene Konformation der Basen entsteht hauptsächlich eines der möglichen Cyclobutanstereoisomere, das sogenannte *cis-syn*-Isomer.

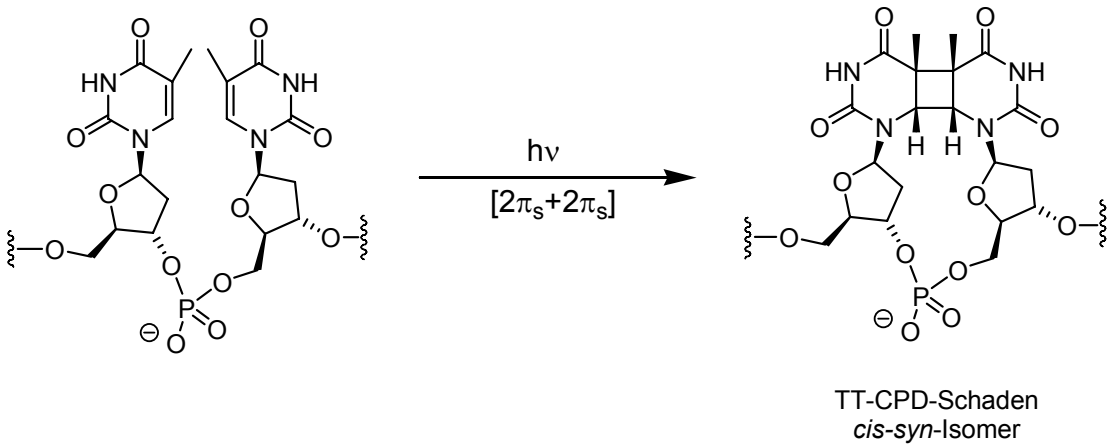


Abb. 1-6: Bildung des TT-CPD-Schadens.

Da Thymin bei den Basen die niedrigste Triplettenergie aufweist, stellt es theoretisch den besten Akzeptor beim Energietransfer innerhalb der DNA dar.[34] Dies wurde durch experimentelle Untersuchungen bewiesen. Es werden tatsächlich häufiger Thymidin-dimere als Cytidindimere gebildet. Es konnte eine Bildungstendenz mit der Reihenfolge: TT › TC › CT › CC beobachtet werden (Abbildung 1-7).[35, 36] Das TT-Dimer entsteht dabei etwa dreimal häufiger als das TC-Dimer.[37, 38] Obwohl CPD-Dimere durch die kovalente Verknüpfung zweier Basen sterisch anspruchsvolle Schäden sind, verursachen sie kaum eine Verzerrung der DNA. Wie UV-Denaturierungsexperimente zeigen konnten, beträgt die Destabilisierung der DNA Doppelhelix durch den CPD-Schaden sogar nur 6 kJ/mol.[39] Die Kristallstruktur eines DNA-Doppelstrang mit einem enthaltenen CPD-Schaden zeigt zudem einen Knick von etwa 30° in der Doppelhelix.[40] Die Basenpaarungen zu den beteiligten Pyrimidinbasen werden dadurch zwar geschwächt, bleiben aber erhalten.

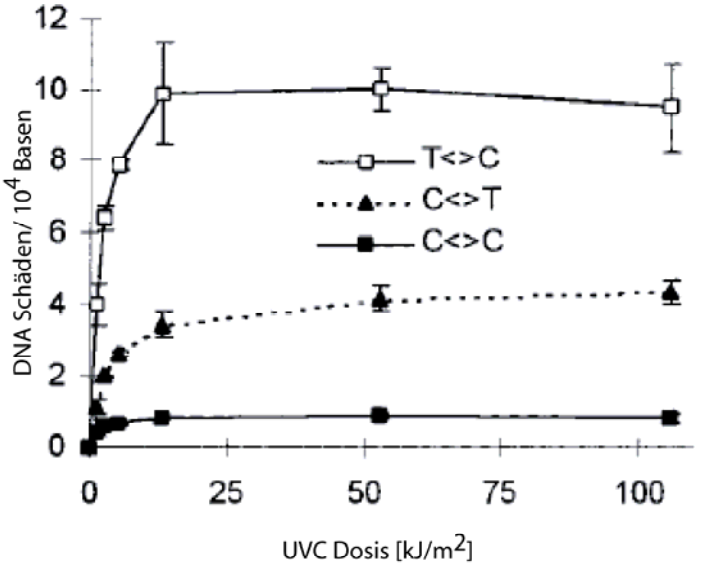


Abb. 1-7: Bildung von TC, CT, CC Cyclobutanpyrimidindimere in isolierter DNA durch UVC Bestrahlung.[36]

In zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Experimenten wurde die Mutagenität der einzelnen Schäden untersucht.[41-44] Es zeigte sich, dass die häufigste Mutation die C→T Transition bei der Replikation von Photodimeren ist, also der Austausch einer Pyrimidinbase durch eine Pyrimidinbase.[41] Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Dihydrocytosine in den CPD-Schäden unter physiologischen Bedingungen zu einer schnellen Desaminierung mit einer Halbwertszeit von wenigen Stunden neigen (Abbildung 1-8).[43]

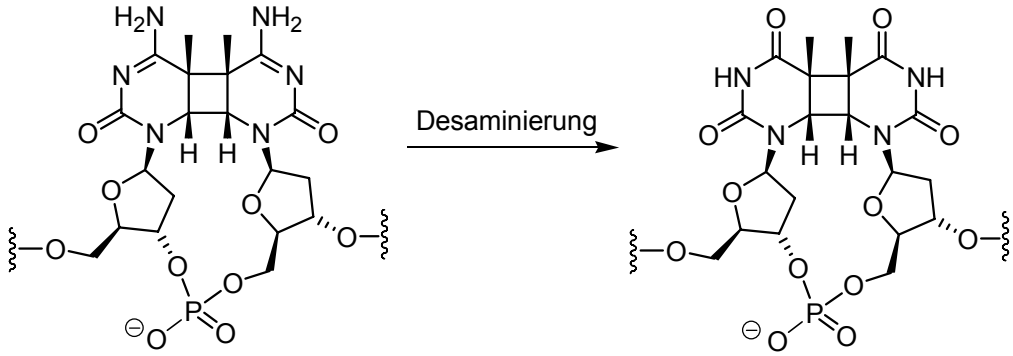


Abb. 1-8: Desaminierung des CC-CPD zum UU-CPD.

Die Hydrolyse führt zu Uracil-haltigen Dimeren, welche eine Inkorporation von Adenosin als Gegenbase während der Replikation verursachen. Eine anschließende Reparatur des Schadens führt zum Einbau von Thymidin, womit sich die beobachtete Transition erklären lässt. Der TT-CPD-Schaden erzeugt ebenfalls Mutationen. Hier werden vor allem am 3'-Thymidin T→C Transition und T→A Transversionen beobachtet.[45]

1.1.1.2 Reparatur des CPDs

Die meisten Organismen besitzen ein Netzwerk aus Reparaturmechanismen um die beschriebenen toxischen Effekte der Schäden zu vermeiden.[17] Die für die Schäden an Nukleotiden wichtigsten Reparaturmechanismen sind die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und direkte Reparaturproteine, welche spezifisch Schäden direkt zu den Ausgangsnukleotiden zurückverwandeln.[15, 16]

CPD wird hauptsächlich durch NER und durch die CPD-Photolyase repariert.[17] Bei NER wird der Schaden in der DNA zunächst erkannt und anschließend zusammen mit 15-30 benachbarten Basen ausgeschnitten. Die Lücke im entstandenen Einzelstrang wird durch Polymerasen wieder aufgefüllt und durch eine Ligase geschlossen. Je nach Organismus werden hierfür unterschiedliche Proteine verwendet, das Prinzip jedoch bleibt identisch.[46]

Eine weniger komplexe, mehrstufige Reparatur als NER ist die direkte Reparatur des CPDs durch Photoreaktivierung.[17] Dieser Prozess wird durch eine Photolyase, die CPD-Photolyase, katalysiert. Die Photoreaktivierung ist ein lichtabhängiger Prozess. Er benötigt UVA (320-400 nm)- und Blaulicht zur Monomerisierung des Dimers. Photolyasen sind zwar in der Natur weit verbreitet (z.B. in Fischen, Reptilien, Bäuteltiere), beim Menschen wurden sie jedoch noch nicht gefunden.[17, 47] Alle Photolyasen sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht je nach Organismus von 53-66 kDa. Die CPD-Photolyase ist in zwei Klassen aufgeteilt. Es gibt hierbei die Klasse I Photolyasen, welche in mikrobiellen Organismen gefunden wurden, und die Klasse II Photolyasen, welche in höheren Organismen gefunden wurden.[48-50] Alle Photolyasen besitzen zudem eine stöchiometrische Menge an nicht-kovalent gebundenen Flavinadenindinukleotid (FAD) als redoxaktiven Cofaktor (Abbildung 1-9). Die enzymatische Aktivität der Photolyasen ist abhängig vom angeregten Zustand des Cofaktors im reduzierten Zustand ($FADH^-$). $FADH^-$ hat dabei eine schwache Absorption unter eine Wellenlänge von 400 nm.

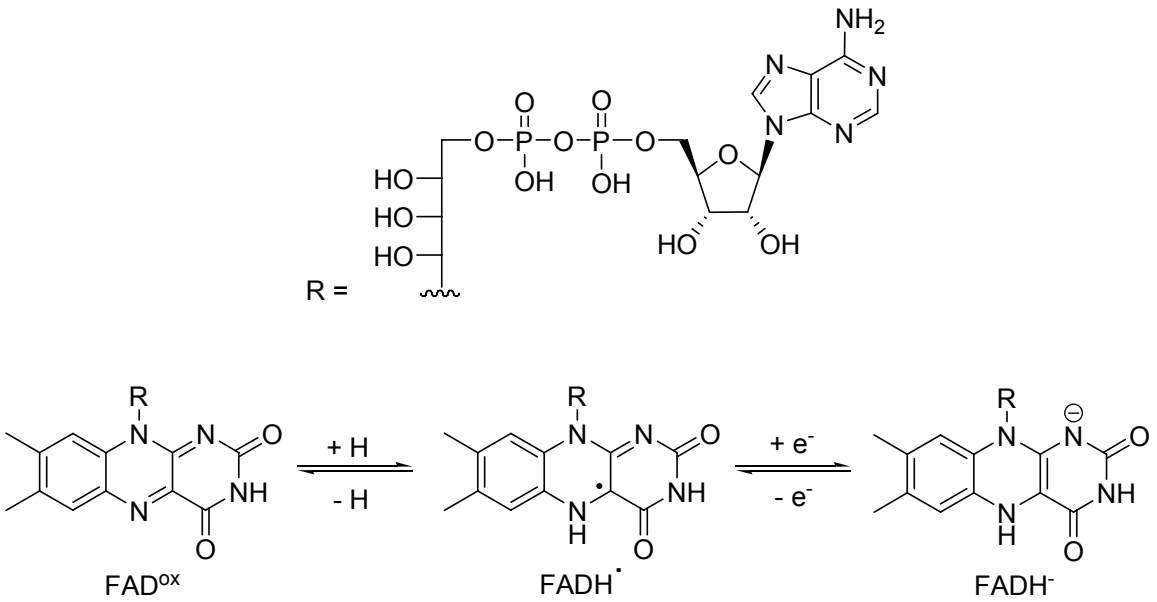


Abb. 1-9: Die Redoxzustände vom 7,8-Dimethylisoalloxazin-Teil des FADs.[17]

Photolyasen können zudem noch einen weiteren lichtabhängigen Cofaktor wie z.B. das 5,10-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder das 8-Hydroxy-5-Desazariboflavin (8-HDF) besitzen. Bei der CPD-Photolyase liegt der zweite Cofaktor je nach Organismus als MTHF oder 8-HDF vor. Im Jahre 2004 wurde durch die Arbeitskreise *Carell* und *Essen* eine Kokristallstruktur der Klasse I *Anacystis nidulans* CPD-Photolyase zusammen mit einem Formacetal-verbrückten CPD-DNA Doppelstrang erfolgreich gelöst (Abbildung 1-10).[51]

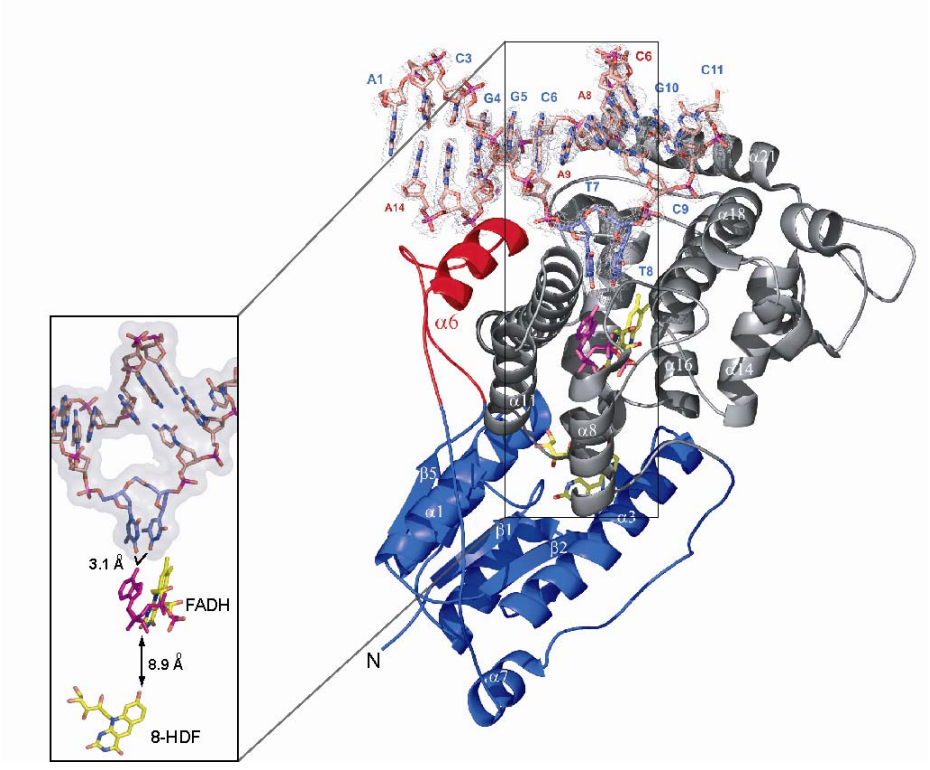


Abb. 1-10: Kristallstruktur der *A. nidulans* CPD-Photolyase mit gebundener DNA.[51]

Der Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase ist weitgehend aufgeklärt worden. Hier erfolgt die Reparatur durch Übertragung eines Elektrons von einem reduzierten, deprotonierten und angeregten Flavin auf den CPD-Schaden. Das dabei gebildete Radikalanion zerfällt in einer Cycloreversion in die zwei ursprünglichen Basen. An dieser Stelle wird auf weitere Übersichtsartikel verwiesen.[17, 52, 53]

Im letzt genannten Reparaturmechanismus BER wird die geschädigte Base durch eine DNA Glykosylase erkannt und ausgeschnitten. Die resultierende abasische Stelle wird durch eine AP Endonuklease aus dem Strang entfernt, eine Polymerase füllt die Lücke auf und eine Ligase schließt diese.[54] Dieser Reparaturpfad wird hauptsächlich zur Beseitigung von oxidativen Schäden und desaminierten Basen eingeschlagen. Jedoch besitzen einige Bakterien und Eukaryonten DNA Glykosylasen, die spezifisch den CPD-Schaden erkennen und so eine Reparatur dieses Schadens durch BER ermöglichen.[55]

1.1.2 (6-4)-Photoprodukt (6-4PP)

1.1.2.1 Allgemeines über das 6-4PP

Das mutagene und cytotoxische 6-4PP wird am zweit häufigsten durch UV-Bestrahlung gebildet.[56] Es entsteht, wie das CPD, durch eine [2+2]-Cycloaddition.[32, 33] In diesem Fall allerdings reagiert in einer Paternó-Büchi Reaktion die C5-C6-Doppelbindung des 5'-Nukleosides mit der C4-Carbonylgruppe des 3'-Nukleosides zu einem Oxetan. Dieses ist chemisch instabil und zerfällt durch Ringöffnung zum 6-4PP (Abbildung 1-11). Handelt es sich beim 3'-Nukleosids um ein Cytidin, so erfolgt die Reaktion formal aus dem Imin-Tautomer des Cytosin. Das entstehende Intermediat ist ein Azetidin, welches ebenfalls oberhalb von –80 °C instabil ist und unter Ringöffnung das 6-4PP bildet.[19] Das entstandene 6-4PP zeigt ein zweites Absorptionsmaximum bei 325 nm, wodurch die Detektion dieses Photodimerschadens erheblich erleichtert wird. Mittels HPLC-MS/MS-Experimente konnte eine Bildungstendenz mit der Reihenfolge TC › TT › CC › CT beobachtet werden.[35, 36, 57] Die Stereochemie des Schadens wird durch die DNA-Doppelhelix bestimmt.

Aus NMR-Untersuchungen wurde eine Verbiegung des Doppelstranges von 44° an der Stelle des Schadens abgeschätzt. Dies würde eine viel stärkere Störung der DNA-Doppelhelix als im Fall des CPD-Schadens bedeuten.[58-60] Andere experimentelle und theoretische Untersuchungen konnten dies jedoch nicht bestätigen.[61, 62] Durch UV-Denaturierungsexperimente konnte zudem eine Destabilisierung eines DNA-Doppelstranges von 24 kJ/mol durch den (6-4)-Schaden gemessen werden.[61, 63, 64] Es konnte zudem gezeigt werden, dass der aus dem 3'-Nukleosid entstehende Pyrimidinonring

bevorzugt Guanin anstatt Adenin paart. Dies führt zu einer T→C Transition. Im Gegensatz zum CPD Schaden konnte bisher keine Kristallstruktur eines 6-4PP geschädigten DNA-Stranges im Komplex mit einer (6-4)-Photolyase erhalten werden. Dadurch ist eine eindeutige Klärung der Struktur schwierig.

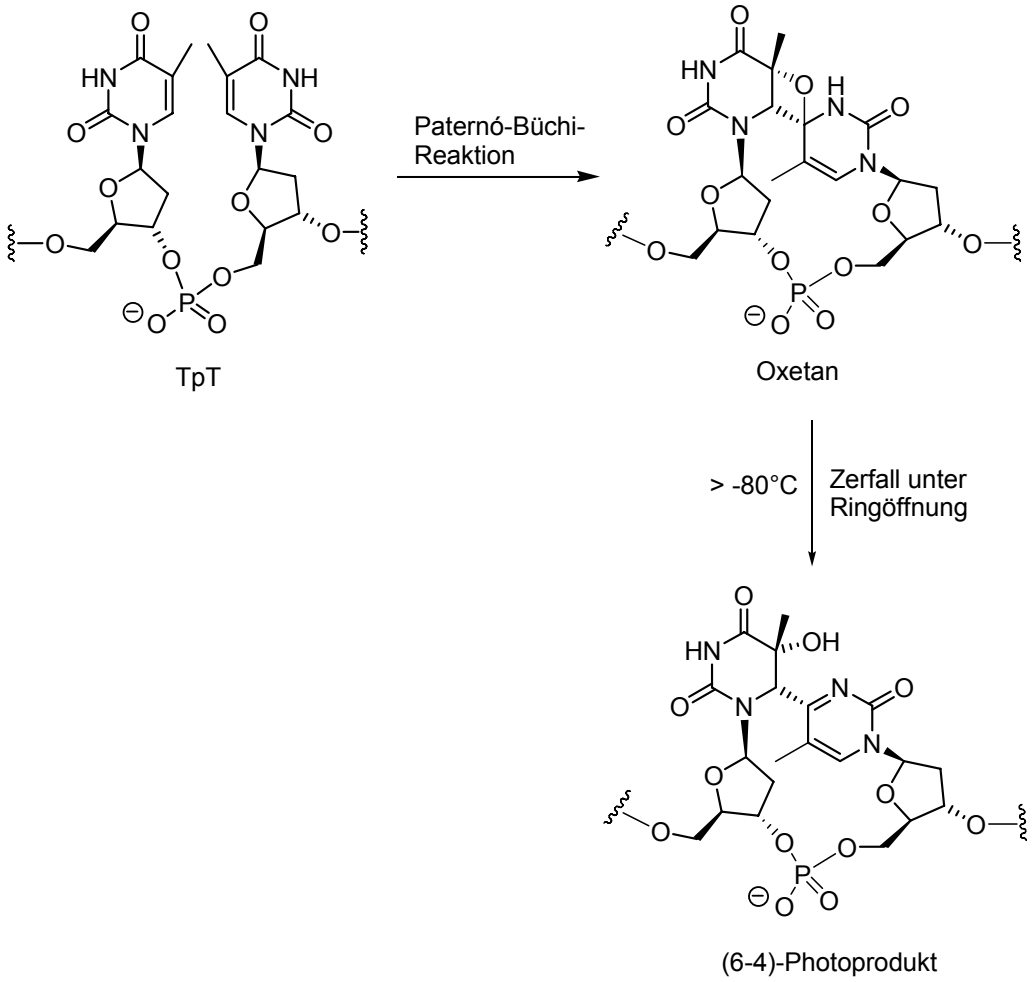


Abb. 1-11: Bildung des TT 6-4PPs über das Oxetanintermediat.

1.1.2.2 Reparatur des (6-4)-Photoproduktes

Der (6-4)-Schaden kann sowohl durch NER als auch durch Photoreaktivierung repariert werden. Eine (6-4)-Photolyase wurde dabei erstmalig 1993 durch *Todo et al.* aus *Drosophila melanogaster* identifiziert.[65] Im Gegensatz zu den CPD-Photolyasen sind diese Enzyme relativ selten und konnten bisher nur in höheren Organismen wie *Xenopus laevis*, *Crotalus atrox*, *Arabidopsis thaliana*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Anopheles gambiae* und *Dunaliella salina* nachgewiesen werden.[66-70] Wie genau der Reparaturmechanismus dabei verläuft ist noch unbekannt. Es wurde jedoch eine Ähnlichkeit zur CPD-Photoreaktivierung vermutet, da Sequenzhomologien der (6-4)- zur CPD-Photolyase vorhanden sind. Die (6-4)-Photolyase benötigt zudem auch einen

Flavincofaktor (Abbildung 1-12).[17] Die Photolyase repariert verschiedene 6-4PP, wie z.B. das TT- und das TC-Dimer, trotz der unterschiedlichen Funktionalität am C(4) der 3'-Base. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass der Transfer der Amino- bzw. Hydroxylgruppe des 6-4PP in einer intramolekularen Reaktion verläuft. *Kim et al.* postulierte deswegen, dass der erste Schritt bei der Reparatur des 6-4PPs eine Rückbildung des Oxetanintermediates ist.[71] Anschließend erfolgt wie bei der CPD-Photolyase ein Elektronentransfer, durch den das Intermediat in die beiden Pyrimidine gespalten wird. Allerdings ist die Energiedifferenz des ersten Schrittes für eine enzymatische Reaktion sehr hoch.[72] Die Bildung des Oxetans könnte jedoch durch eine vorherige Protonierung des N^3 unter Bildung eines Acyliminiumions erleichtert werden (Abbildung 1-12).[73] *Todo et al.* konnte 2001 zwei konservierte Histidinreste im aktiven Zentrum der (6-4)-Photolyase finden, die solch eine Protonierung ermöglichen.[74] Bisher unveröffentlichte Arbeiten im Arbeitskreis *Carell* lassen jedoch auf einen anderen möglichen Reparaturmechanismus schließen.

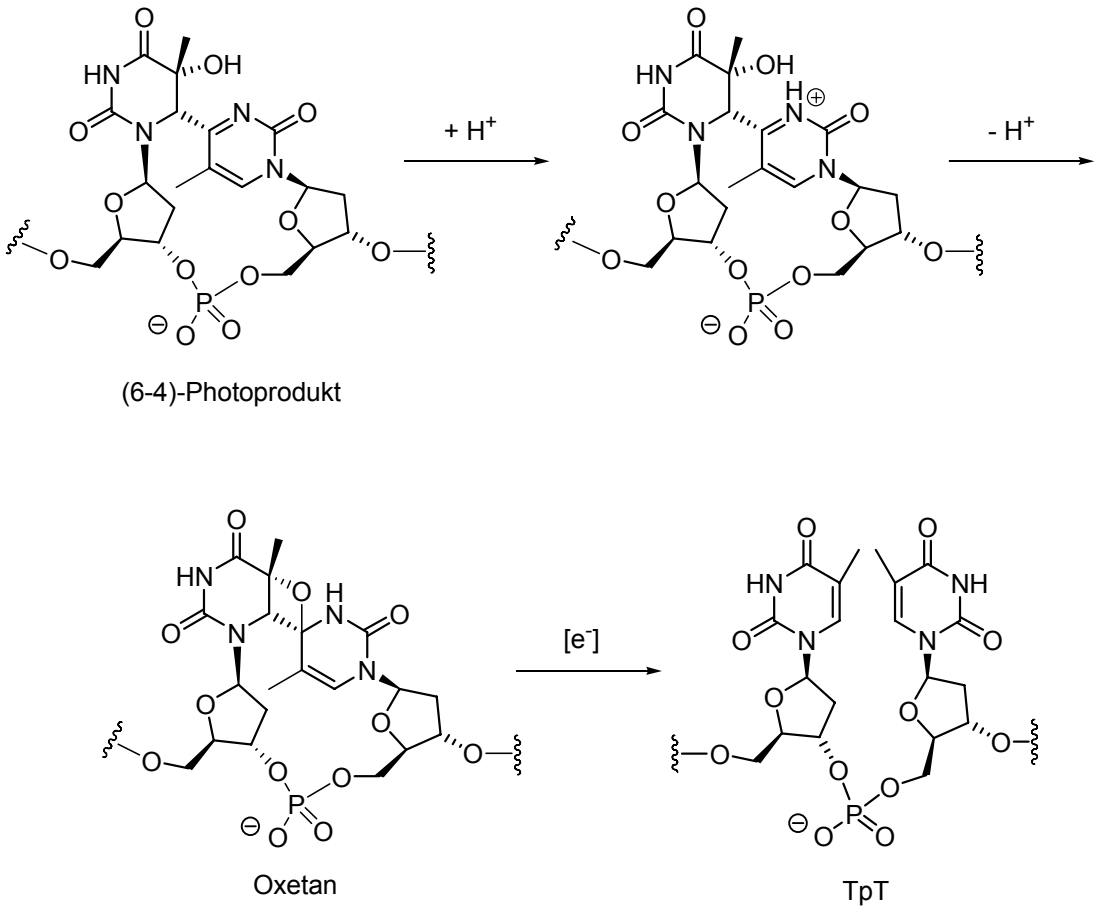


Abb. 1-12: Postulierter Reparaturmechanismus des 6-4PPs durch die Photolyase.[71, 74]

Die (6-4)-Photolyase bindet sowohl an mit 6-4PP, CPD und Dewar-Isomer geschädigte DNA-Stränge. Die Reparaturaktivität gegenüber dem Dewar-Isomer, bzw. dem CPD ist

jedoch sehr gering. Die Quantenausbeute der Reparatur des 6-4PP durch die (6-4)-Photolyase (Φ = 0.11) ist im Vergleich zum CPD mit der CPD-Photolyase (Φ = 0.42 für eine *E. coli* Photolyase) jedoch auch gering.[69]

1.1.3 Dewar-Photoprodukt

Die Dewar-Photoprodukte werden durch Einwirkung weiterer UV-Strahlung photochemisch bei einer Wellenlänge von 312 nm reversibel aus den 6-4PP gebildet (Abbildung 1-13).[32, 33, 75] HPLC-MS/MS Studien zufolge konnte dieser Schaden nach Belichtung mit UVB- und UVC-Strahlung nur an CC-Stellen gefunden werden.[35, 36, 57] Die Umkehrung dieser Reaktion ist durch Belichtung mit UVC-Strahlung möglich, verläuft allerdings sehr viel langsamer.[76]

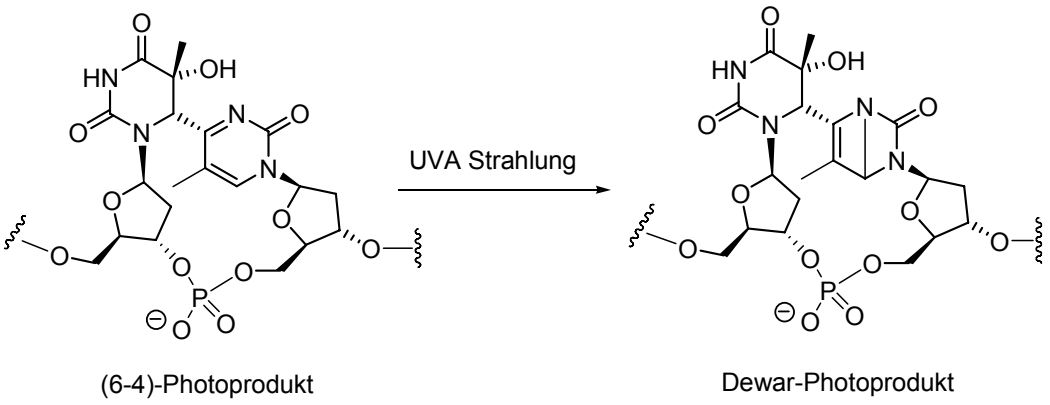


Abb. 1-13: Bildung des TT Dewar-Photoproduktes.

Cadet et al. konnte 2005 zeigen, dass bei Bestrahlung von Hamsterzellen mit simuliertem Sonnenlicht (UVB : UVA = 5 : 95) mehr Dewar-Schäden als 6-4PP gebildet werden.[75] Der Dewar-Schaden führt ebenso wie das 6-4PP zu einer Destabilisierung der Doppelhelix um 24 kJ/mol.[63, 64] Auch ist hier die Fehlpaarung des 3'-Pyrimidinonrings zu Guanin gegenüber Adenin energetisch bevorzugt. NMR-Studien lassen allerdings auf eine andere Verbiegung der DNA-Doppelhelix schließen.[60] Die strukturellen Veränderungen scheinen im Gegensatz zum 6-4PP sowohl die 3'-Seite als auch die 5'-Seite gleichmäßig zu stören. Über die mutagenen Eigenschaften des Dewar-Photoproduktes ist nur wenig bekannt.[60] DNA-Reparaturenzyme und Polymerasen scheinen den Schaden als abasische Stelle zu erkennen und Adenosin als komplementäre Base einzubauen.[77-80] Überraschenderweise kann auch die (6-4)-Photolyase das Dewar-Isomer reparieren, obwohl dies mit dem postulierten Reparaturmechanismus (Vierringbildung) nicht so leicht möglich wäre. Die Reparatur erfolgt jedoch sehr langsam.[17]

1.1.4 Sporenphotoprodukt (SP)

Das bereits in 1.1 erwähnte SP ist ein Photodimerschaden, der bis jetzt *in vivo* nur in Sporen gefunden wurde. Das SP entsteht, wie auch das CPD und 6-4PP, zwischen zwei benachbarten Thymidinen (Abbildung 1-14). Es wurde 1965 erstmals von *Donnellan et al.* entdeckt.[81]

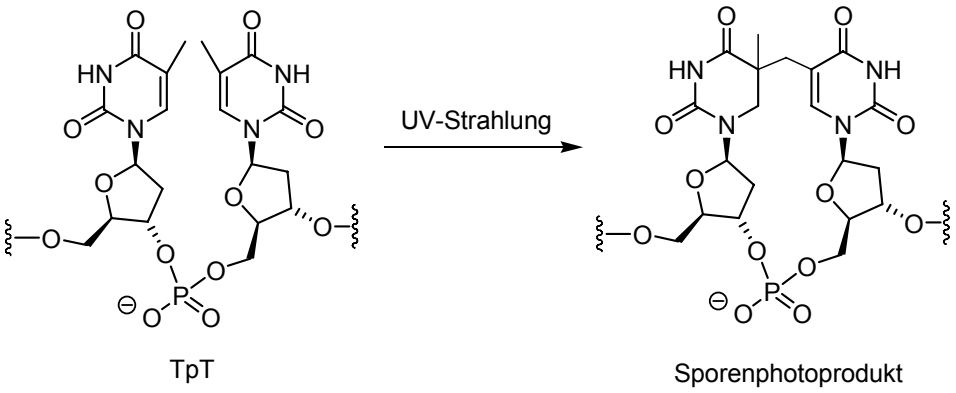


Abb. 1-14: Bildung des SP.

Die Dimerbildung kann hierbei aus zwei benachbarten Thymidinen in einem DNA-Strang (intramolekular) oder in gegenüberliegenden Thymidinen im DNA-Doppelstrang (intermolekular, *cross-link*) gebildet werden. Weit aus häufiger entsteht der intramolekulare Photoschaden.[82, 83] Bis jetzt wurden keine mechanistischen Studien zur Bildung des SP durchgeführt. *T. Begley* postulierte jedoch 1999 einen möglichen Mechanismus (Abbildung 1-15).[84] Hierbei würde zunächst durch UV-Bestrahlung ein Thymidin **1** angeregt werden. Anschließend entstehen durch eine *Norrish* Typ II Wasserstoffabstraktion von der Methylgruppe des Thymidins **1** durch das benachbarte angeregte Thymidin **2** die Radikalintermediate **3** und **4**. Das SP würde nach der Tautomerisierung von **3** zu **5** mit der sich anschließenden Kupplung der Radikalintermediate gebildet werden. Das protonierte Thymidinradikal **3** wurde zuvor schon durch Pulsradiolyseexperimente und bei der Öffnung des CPD-Radikalanions synthetisiert. In beiden Fällen war das an C-6 protonierte Tautomer **5** stabiler als das am Sauerstoff protonierte Tautomer **3**.

Gegen den postulierten Mechanismus spricht allerdings der fehlgeschlagene Versuch, die Bildung des SP mit Hilfe des thiophenylsubstituierten Thymidins **6** nachzustellen.[85] Die Idee war, durch Belichtung von **6**, über ein 5-(2'-Desoxyuridinyl)-methylradikal, das SP zu bilden, was aber fehlschlug (Abbildung 1-16). Bisher gibt es noch keine Studien zur qualitativen und quantitativen Bildung des SP bei unterschiedlichen Wellenlängen.

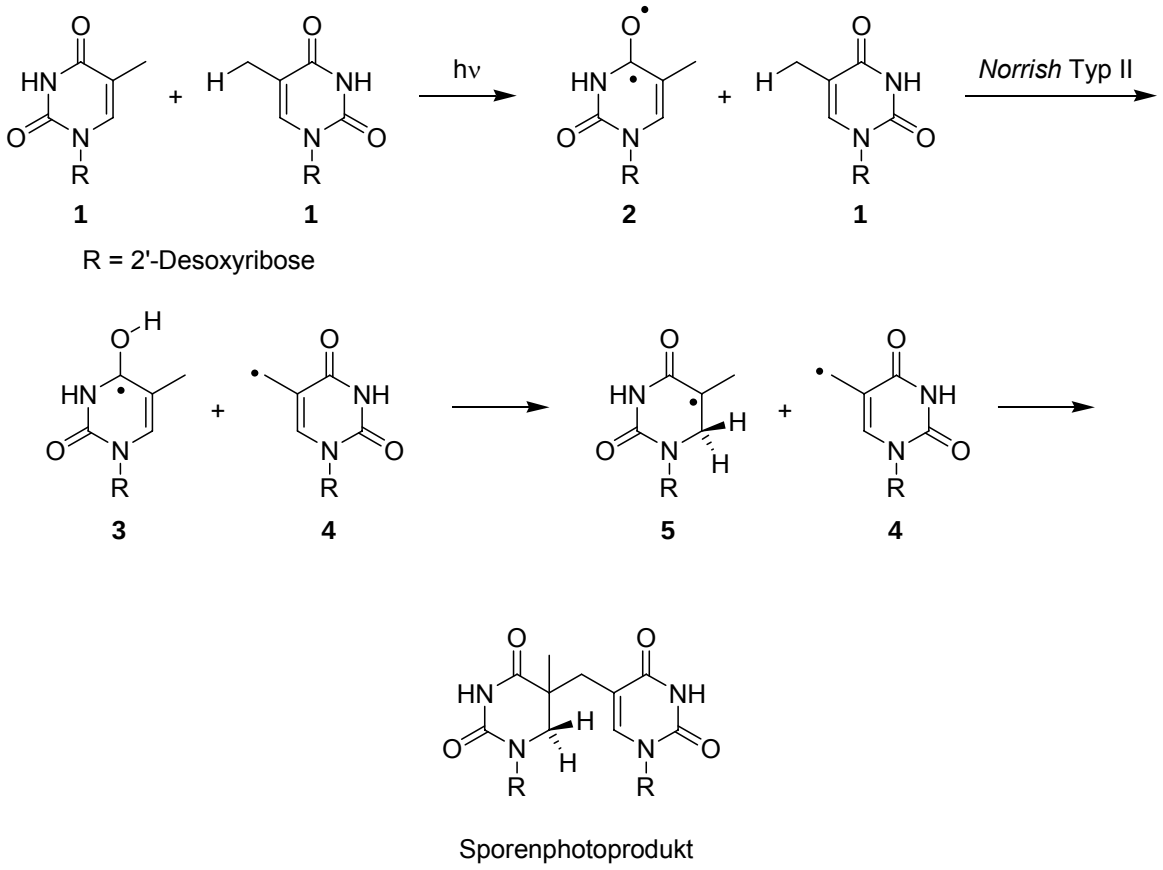


Abb. 1-15: Von *Begley* postulierter Bildungsmechanismus für das SP.[84]

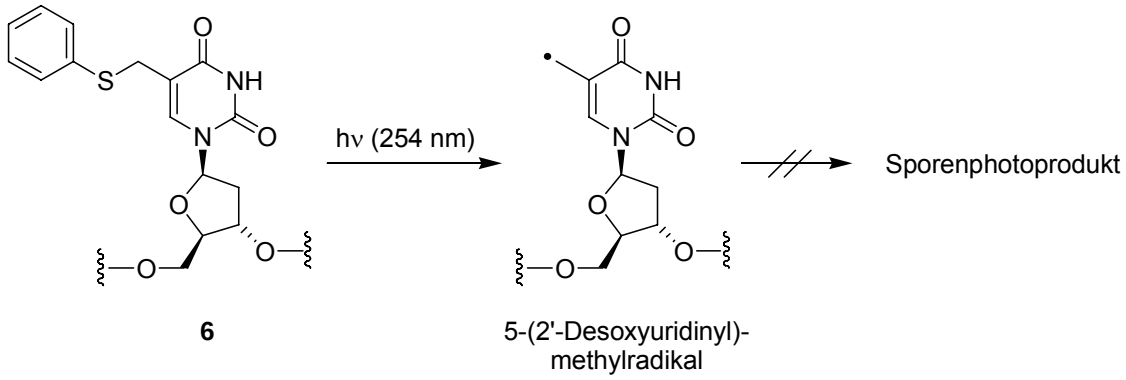


Abb. 1-16: Belichtung des Modells **6** zur Simulierung der Bildung des SP über ein 5-(2'-Desoxyuridinyl)methylradikal.[85]

1.1.4.1 Sporenmorphologie und Aufbau

Ende des 19. Jahrhunderts entdeckten *Koch*[86]*, Cohn*[87] und *Tyndall*[88] unabhängig von einander, dass einige Bakterienarten Teile ihres Lebens als ruhende, zelluläre Strukturen verbringen können. Diese nennt man heute Endosporen, oder kurz Sporen. Sporenbildende Organismen sind weit verbreitet und kommen in vielen Bakterienspezies

vor. Am besten sind die Bodenbakterien vom Typ *Clostridium* und *Bacillus* und hier vor allem *Bacillus subtilis* untersucht.[89] Seitdem stellen Sporen die widerstandsfähigsten Lebensformen auf Erden dar. Der Altersrekord wird zurzeit von der *Bacillus* Spezies 2-9-3 gehalten. Diese wurde von *Powers et al.* 2000 aus einem 250 Millionen Jahre altem Salzkristall aus der *Permian Salado* Formation in New Mexico isoliert und zum keimen gebracht.[90] Bei Bakterien wird die Sporenbildung durch eine drastische Verschlechterung der Lebensbedingungen ausgelöst. Dies kann zum einem der Mangel an Nährstoffen wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff sein, zum anderen Zytotoxine, wie z.B. zu hohe Konzentrationen an Schwermetallen. Die lange Lebensdauer lässt sich auf eine große Resistenz gegenüber widrigen Umständen, wie feuchte oder trockene Hitze, UV- und γ-Strahlung, extreme Trockenheit und oxidierende Reagenzien, zurückführen.[91] Die Spore unterscheidet sich deutlich von der normalen Zelle. Dabei besitzt sie einige einzigartige molekulare und zelluläre Strukturen (Abbildung 1-17).[89, 91] Trotz ihres metabolisch inaktiven Zustandes kann sie geringste positive Veränderungen in der Umgebung wahrnehmen und sofort wieder keimen.

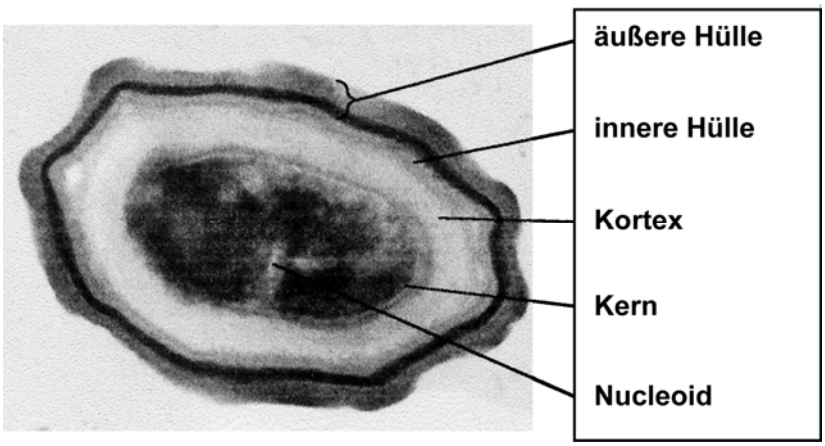


Abb. 1-17: Querschnitt durch eine *Bacillus subtilis* Spore.[91]

Durch die Sporenbildung können sich Bakterien damit ungünstigen, lokalen Bedingungen vorübergehend entziehen. Zusätzlich zu der temporären Flucht, können Sporen über Wind, Wasser und lebende Wirtsorganismen in für die Keimung und das anschließende vegetative Wachstum vorteilhaftere Umgebungen transportiert werden. Deshalb lassen sich Sporen in allen Teilen der Erde über und unter der Erdoberfläche finden.[91] Auf diese Weise sorgen Sporen erfolgreich für die Erhaltung und weiträumige Verbreitung der genetischen Information eines Bakteriums.[92]

Die Sporulierung ist gewöhnlich der letzte Ausweg, wenn alle anderen Wege zum Wachstum, Konkurrieren und Überleben ausgeschöpft sind.[93] Die Entscheidung des Bakteriums zur Sporenbildung ist extrem kritisch, da diese nicht unterbrochen werden

kann. Falls dem Bakterium die vollständige Sporulierung nicht gelingt, ist die genetische Information für immer verloren. Das Bakterium muß ihre Entscheidung zur Sporenbildung davon abhängig machen, ob noch genügend Resourcen vorhanden sind, da der Prozess viel Energie kostet. Während der Sporenbildung durchläuft das Bakterium mehrere Stationen, welche mittels Licht- und Elektronenmikroskopie beobachtbar sind. Der gesamte Prozess dauert unter Laborbedingungen bei 37 °C 6 – 8 h (Abbildung 1-18). Die einzelnen Phasen werden durch eine sequentielle Abfolge von zeit- und ortsabhängigen Transkriptionsfaktoren (σ-Faktoren) auf der Ebene der Genexpression streng kontrolliert.[89]

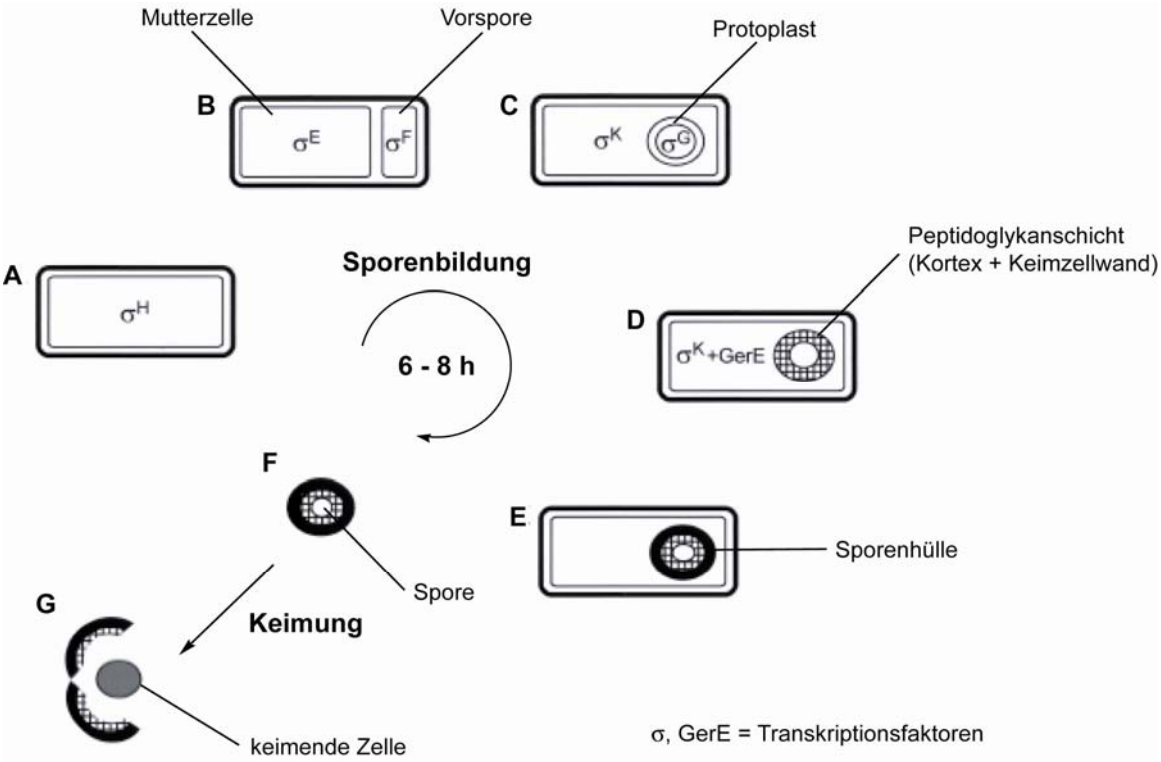


Abb. 1-18: Zyklus der Sporenbildung und Keimung einer Spore.[94]

Die Sporenbildung kann in mehrere Phasen eingeteilt werden. In der Phase A bereitet sich die Zelle auf die Sporulierung durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors σ^H vor. Im zweiten Schritt (Phase B) teilt sich die Bakterienzelle in zwei unterschiedlich große Zellkompartimente auf, die größere Mutterzelle und die kleinere Vorspore. Diese besitzen jeweils ein vollständiges Chromosom. Die Genexpression, aktiviert durch die Transkriptionsfaktoren σ^E und σ^F, wird in beiden Untereinheiten getrennt voneinander kontrolliert. So wird die Spore von innen durch die Proteinbiosynthese der Vorspore und von außen durch die Proteinbiosynthese der Mutterzelle aufgebaut. In Phase C wird durch einen endocytoseartigen Prozess nach ca. 3 h die Vorspore in einen Protoplasten umgewandelt, welcher von zwei Membranen umgeben ist und frei im Cytosol der Mutterzelle vorliegt. Zwischen den beiden Membranen wird von außen der Kortex, eine

Peptidoglykanschicht, und von innen die Keimzellwand aufgebaut (Phase D). Dabei tritt die Dehydratisierung des Sporenkerns ein, bei der die Vorspore ihre Stoffwechselaktivität verliert.[89, 94] Zum selben Zeitpunkt werden die α/β-Typ SASPs (*small acid-soluble proteins*) gebildet. Zusammen mit der Dehydratisierung des Sporenkerns und den, an die Vorsporen-DNA gebundenen, α/β-Typ SASPs kommt es zu der charakteristischen Erhöhung der UV-Resistenz der Spore.[95] Im nächsten Schritt (Phase E) werden die zwei Schichten der Sporenhülle durch in der Mutterzelle synthetisierte Proteine aufgebaut. Diese Proteinhülle kann im Elektronenmikroskop in eine dunklere äußere Schicht und eine hellere, lamellenartige Schicht unterteilt werden. In der letzten Phase der Sporenbildung lysiert die umgebende Mutterzelle und setzt die metabolisch inaktive Spore frei (Phase F).[89, 94]

Bei geringsten Änderungen am Nährstoffgehalt setzt bei der Spore wieder der Keimungsprozess zum Bakterium ein. Dabei bewirkt der Abbau der Kortex eine schnelle Rehydratisierung des Sporenkerns. Dies führt zum Anschwellen des Sporenkernes und anschließendem Aufbrechen der Sporenhülle (Stadium G). Die Zelle nimmt wieder ihre Stoffwechselaktivität auf und verliert ihre Resistenzeigenschaften. Die Keimzellwand übernimmt dabei zunächst die Funktion der Zellwand. Während der Sporenkeimung werden die SASPs zu Aminosäuren abgebaut, welche in die anschließende Proteinbiosynthese einfließen.[96, 97]

1.1.4.2 DNA-Verpackung in Sporen

Für die lange Lebensdauer von Sporen ist der Erhalt der genetischen Information extrem wichtig. Die DNA muß deshalb effektiv vor Schäden durch äußere Einflüsse geschützt werden. Dies gelingt durch eine einzigartige Verpackung der DNA im Sporenkern.

Bei wachsenden Zellen liegt das Nukleoid als diffuse, globuläre Masse vor. Bei der Ausbildung der Spore verändert sich dieses und es bildet sich eine starke, kompakte toroidale Form der DNA (siehe Abbildung 1-19).[98, 99] Zudem ist die Plasmid-DNA im Vergleich zu der entsprechenden vegetativen Zelle stärker negativ superspiralisiert.[95, 100] Diese außergewöhnlichen Struktureigenschaften des Nukleoids sind auf eine vollständige, sequenzunabhängige Sättigung der DNA mit α/β-Typ SASPs zurückzuführen.[100-103] Diese nur 60 - 75 Aminosäuren langen Proteine sind bisher nur in den Sporen nachgewiesen worden und ergeben 8 - 20% des Totalproteingehaltes der Spore.[98, 104, 105] Bei den SASPs gibt es neben den mehrheitlichen α/β-Typ (80%) auch noch andere Typen. Bei *Escherichia coli* wurde beobachtet, dass eine hohe Konzentration an SASPs das Zellwachstum hemmt.[106] Vermutlich ist die Bindung an DNA so stark, dass die Transkription eingeschränkt oder verhindert wird. Die α/β-Typ SASPs sind das Produkt

einer Multigenfamilie von 4 - 7 Genen, die über das gesamte Genom von *Bacillus*-Arten verteilt sind. Ihre Aminosäuresequenz ist hochgradig konserviert.[107]

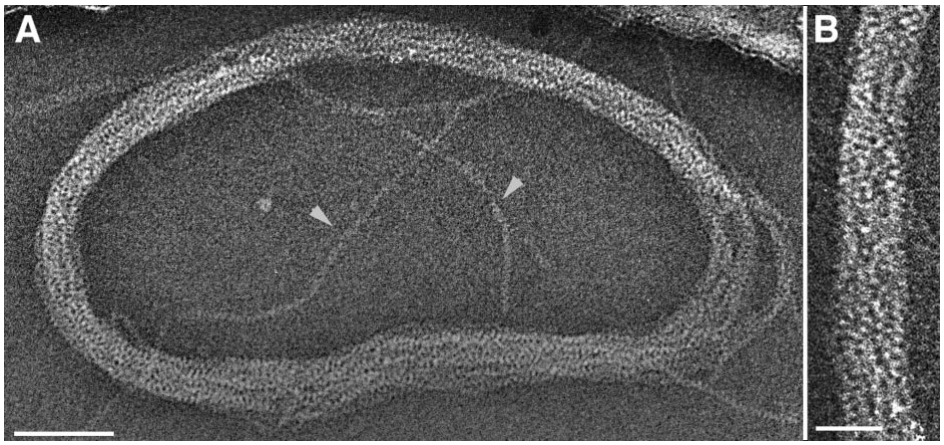


Abb. 1-19: Transmissions-Elektronenmikroskopie-Aufnahme eines A) typischen toroidalen Aggregates von DNA-SspC-Filamenten. Die Pfeilspitzen zeigen auf einzelne Filamente außerhalb des Rings. B) Vergrößerung eines Ausschnitts aus A, die die dichte Packung der Filamente verdeutlicht. Maßstab: 50 nm (A), 10 nm (B).[99]

Die Sättigung der DNA mit α/β-Typ SASPs spielt eine entscheidende Rolle bei dem Schutz der DNA gegenüber Hitze, Trockenheit, Oxidationsmitteln und UV-Strahlung.[101-104] Dies konnte mit Hilfe von *knockout*-Mutanten, die keine SASP herstellen können, festgestellt werden.[99, 108-112] Aufgrund mangelnder Strukturdaten über den gebildeten DNA-SASP-Komplex bleiben noch viele Aspekte des Schutzmechanismus dieser DNA-bindenden Proteine unverstanden. SASPs dienen den Sporen nicht nur als Schutzmechanismus, sondern auch als Aminosäuredepot für die Keimung, bei der durch Proteasen die SASPs abgebaut werden.[107] In diesen Proteinen sind außer Tryptophan und Cystein alle natürlichen Aminosäuren enthalten.

Die Struktur der DNA-SASP-Komplexe wurde bisher vorwiegend *in vitro,*[100, 102, 103, 113-115] in der Vorspore[104] und in der frühen Keimung[98] untersucht. Dabei ließen Circulardichroismus- und FT-Infrarotspektroskopie-Studien vermuten, dass eine Konformationsänderung der DNA von der B-Form in eine A-ähnliche Form erfolgt. Diese Änderung konnte bei der Bindung von SspC, ein charakteristisches α/β-SASP-Protein, an DNA beobachtet werden. Daraus wurde deshalb geschlossen, dass diese konformationelle Modifikation die Photochemie der DNA grundlegend verändert und somit für den Schutz der DNA durch α/β-Typ SASPs verantwortlich ist.[116, 117] Durch die Konformationsänderung von B- zu A-DNA konnte auch die starke Änderung der Superhelicität, welche sowohl in Sporen[95] als auch bei der *in vitro*-Wechselwirkung[102] beobachtet wurde, erklärt werden. Allerdings zeigten Elektronenmikroskopie-Studien an DNA-SspC-Filamenten, dass sich die Länge der DNA-Moleküle und die Ganghöhe bei der SspC-Bindung nicht signifikant

ändert. Demnach sollte die DNA-Konformation im DNA-SspC-Komplex entgegen der vorherigen Annahme eher der B-Form ähneln.[100]

Im Jahre 2004 konnte *Wolf et al.* mittels Kryoelektronen-Mikroskopie die Struktur eines helikalen DNA-SspC-Komplexes aufklären.[99] Das Protein umhüllt dabei die DNA vollständig und bildet definierte, hervorstehende Domänen. Die Ganghöhe des Komplexes von 3.17 nm unterscheidet sich kaum von der in B-DNA (3.40 nm) (Abbildung 1-20).

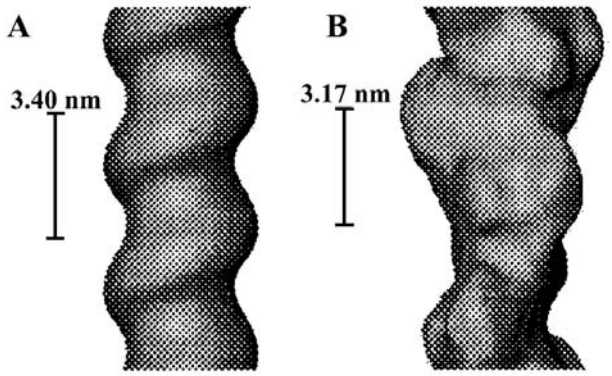


Abb. 1-20: Dreidimensionale Oberflächendarstellung: A) B-DNA, B) DNA-SspC-DNA-Komplex.[99]

Die herausstehenden SspC-Einheiten ermöglichen eine Verzahnung der benachbarten DNA-SspC-Filamente zu einer dicht gepackten Anordnung an Nukleoproteinhelices (Abbildung 1-21). Basierend auf der Strukturanalyse vermuten die Autoren, dass die quaternäre Organisation der DNA-SspC-Filamente entscheidend für den Schutz und die erhöhte Superhelicität der DNA ist. Der Wassergehalt ist innerhalb der Packung der nahezu perfekt miteinander verzahnten Filamente stark reduziert. Daraus resultiert eine geringere Bildung von reaktiven, oxidierenden Radikalen und eine veränderte Photochemie der DNA. Innerhalb der dreidimensionalen, toroiden Struktur liegen sowohl antiparallele als auch parallele Kontakte zwischen den benachbarten DNA-SspC-Filamenten vor, da das Bakterienchromosom in einer geschlossenen Ringform vorliegt. Die Strukturanalyse hat gezeigt, dass die parallelen Wechselwirkungen schwächer sind als die antiparallelen. Die parallelen, benachbarten Filamente zeigen eine geringere Komplementarität als die dichteren, antiparallelen. Diese stabilisieren die dreidimensionale Anordnung der Filamente und kompensieren die schwächeren, parallelen Kontakte.

In dem Bakterium *Deinococus radiodurans* wurde ebenfalls diese ungewöhnliche, ringförmige DNA-Struktur gefunden. Das Bakterium besitzt eine hohe Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung (15000 Gy im Gegensatz zu 10 Gy für normale Organismen) und einigen anderen DNA-schädigenden Einflüssen wie z. B. Trockenheit.

Die hohe Resistenz wird auf die toroidale Struktur der DNA zurückgeführt.[118] Es wird vermutet, dass in dieser rigiden Struktur die DNA-Brüche, welche durch ionisierende Strahlung hervorgerufen werden, templat-unabhängig, aber fehlerfrei schnell wieder verknüpft werden können. Die Diffusion der DNA-Enden wird somit wie im toroidalen DNA-SspC-Komplex durch die dicht gepackte und lateral angeordnete Toroidstruktur eingeschränkt und die Enden werden vor dem Abbau geschützt.

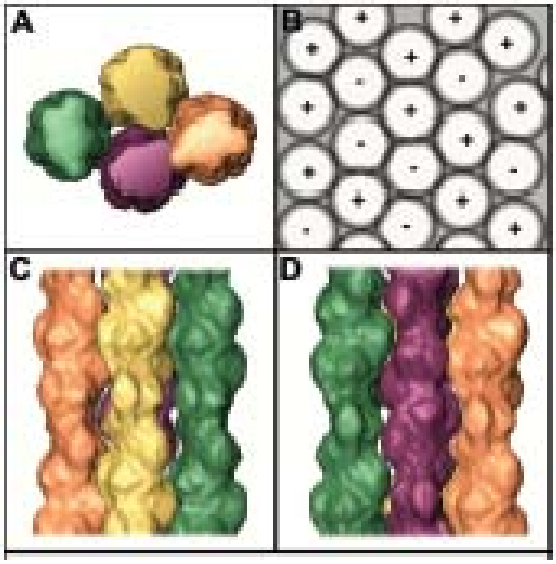


Abb. 1-21: Dreidimensionale Anordnung von vier benachbarten Filamenten. A) Aufsicht auf die Filamente. Das lila eingefärbte Filament bildet antiparallele Kontakte mit den anderen drei Filamenten. B) Schematische Aufsicht, die zeigt wie mehrere Filamente eine hexagonale Anordnung einnehmen, jeweils mit parallelen und antiparallelen Kontakten. C) Parallele Kontakte der orange, gelb und grün eingefärbten Filamente. D) Antiparallele Kontakte zwischen dem lila eingefärbten Filament sowie den grün und orange eingefärbten.[99]

Als weiterer Schutzmechanismus der Sporen-DNA neben der Sättigung der DNA mit α/β-Typ SASPs lässt sich der geringe Wassergehalt im Sporenkern mit nur 27 bis 55 Gewichtsprozent nennen.[119] Bei wachsenden *Bacillus* Zellen liegt dieser dagegen bei 75 bis 80 Gewichtsprozent. Durch den extrem geringen Wassergehalt wird jegliche enzymatische Aktivität beendet, da die Beweglichkeit der Makromoleküle wie z.B. von DNA, stark eingeschränkt ist.[120] Die Dehydratisierung ist zudem der wichtigste Faktor für die Resistenz gegen feuchte Hitze[119]. Wie es während der Sporenbildung zu solch einer drastischen Reduzierung des Wassergehalts im Sporenkern kommen kann, ist unbekannt.

Zu einer weiteren Verringerung an freien Wassermolekülen im Sporenkern führt die Komplexierung des Wassers mit DPA (Dipicolinsäure). Bei Sporen der Gattung *Bacillus* und *Clostridium* ist DPA mit einem Anteil von 5 - 15% des Trockengewichts ausschließlich im Sporenkern vorhanden. Hier bildet es Chelatkomplexe mit zweiwertig positiven

Kationen wie Ca^{2+} im Verhältnis 1:1 aus (Abbildung 1-22).[98, 119, 121, 122] Dabei liegt die Konzentration an DPA weit über der Löslichkeitsgrenze.

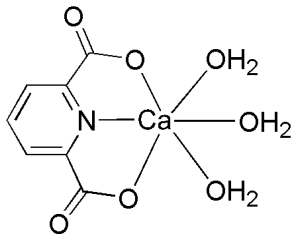


Abb. 1-22: Komplex aus DPA mit Ca2+ und Wasser im Verhältnis 1:1.

Auf Grund dessen wird vermutet, dass DPA im Sporenkern eine glasähnliche Struktur ausbildet. Dies konnte aber noch nicht eindeutig nachgewiesen werden.[123, 124] DPA wird in der Mutterzelle zum Zeitpunkt der Sporulation synthetisiert, danach im Sporenkern der Vorspore akkumuliert und innerhalb der ersten Minuten, während der Sporengermination, wieder ausgeschieden. Wie das DPA ausgeschieden wird, ist bislang jedoch unbekannt.

1.1.4.3 DNA-Schädigung in Sporen

Der Hauptangriffspunkt vieler sporenschädigender Reagenzien ist die DNA. Durch den Sporenaufbau, die DNA-Verpackung und Reparatur erwirkt die Spore eine gewisse Resistenz gegenüber Hitze, Trockenheit, Oxidationsmittel und UV-Strahlung.[91] Letztere wird im folgendem näher erläutert.

Sporen von verschiedenen *Bacillus* Spezies sind 5 bis 50 mal resistenter gegenüber UV-Strahlung (254 nm) als ihre entsprechenden wachsenden Zellen.[91, 101, 105, 125] Diese erhöhte UV-Resistenz lässt sich auf eine veränderte Photochemie der DNA in Sporen zurückführen.[105] Im Gegensatz zur UV-Belichtung von wachsenden Zellen, bei denen bevorzugt CPD und 6-4PP zwischen benachbarten Pyrimidinen gebildet werden, entsteht bei Sporen fast ausschließlich das SP, welches nur in Sporen zu finden ist. [81, 105, 126, 127] Dabei wird das SP zu 99% zwischen zwei benachbarten Thymidinen innerhalb eines DNA-Stranges (intrastrang-Schaden) und zu 1% zwischen eines DNA-Doppelstranges (interstrang-Schaden) gebildet.[82] Diese neuartige Photochemie beruht unter anderem auf dem dehydratisierten Zustand des Sporenkerns. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass mit abnehmendem Wassergehalt der DNA die Bildung von SP zunimmt und gleichzeitig die Entstehung anderer Photoprodukte und die Gesamtmenge gebildeter Schäden unterdrückt wird. [118, 126, 128-138]

Einen weitaus größeren Anteil an der Photochemie trägt jedoch die Sättigung der DNA mit α/β–Typ SASPs. *Douki et al.* konnte zeigen, dass bei UV-Bestrahlung von *Bacillus subtilis* Mutanten, welche einen Mangel an α/β–Typ SASPs aufweisen ($\alpha^-\beta^-$-Sporen), weniger SP

und signifikante Mengen an CPD und 6-4PP gebildet werden (Abbildung 1-23A).[82] Des weiteren konnten sie mit *in vitro* Experimenten zeigen, dass durch Komplexierung der DNA mit α/β–Typ SASPs sowohl in Lösung als auch im Trockenfilm die Bildung von CPD und 6-4PP unterdrückt und die des SP bevorzugt wird (Abbildung 1-23B). Die Änderung der Photochemie in Sporen durch die Komplexierung mit α/β–Typ SASPs lässt sich auf die in 1.1.4.2 besprochene, außergewöhnliche Konformation der Sporen-DNA zurückführen. Der SP ist allerdings ein potentieller mutagener oder letaler Schaden. Die erhöhte UV-Resistenz kann deshalb nicht nur mit der veränderten Photochemie erklärt werden.[126] Die Entstehung eines einzelnen Photoschadentyps ermöglicht jedoch eine schnelle und effektive Reparatur. Die DNA-Reparatur leistet deshalb in Sporen einen weiteren wichtigen Beitrag zur erhöhten UV-Resistenz.[139, 140]

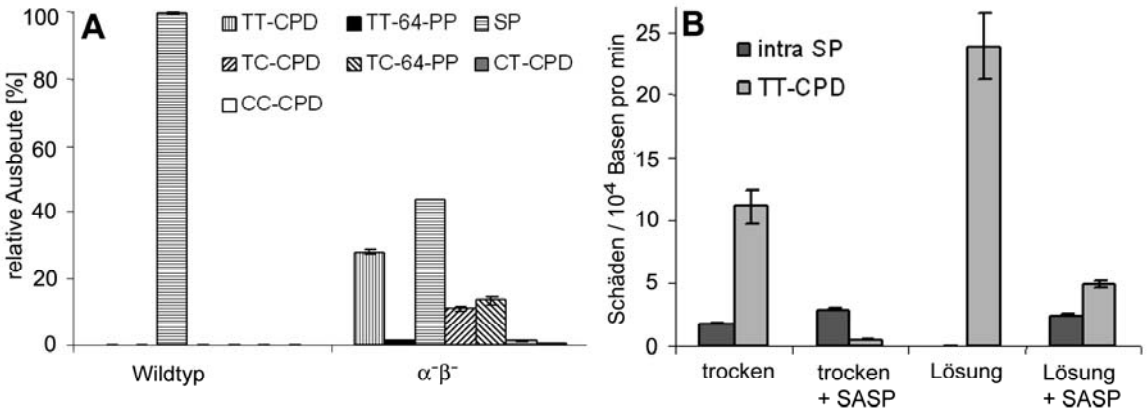


Abb. 1-23: **A)** Relative Ausbeuten der häufigsten Photoprodukte zwischen benachbarten Pyrimidinen in Wildtyp-Sporen und in α^-/β^--Sporen nach Belichtung mit UVC-Strahlung im trockenen Zustand. **B)** Auswirkung der Komplexierung mit SspC auf die Bildung von TT-CPD und intrastrang Sporen-Photoprodukt in DNA nach Belichtung mit UVC-Strahlung (im trockenen Zustand und in Lösung).[82]

1.1.4.4 Strukturaufklärung des Sporenphotoproduktes

Bereits in den 60iger Jahren konnte *Donnellan et al.* über Belichtungsexperimente eindeutig ein neues TT-Dimer, welches er SP nannte, nachweisen.[81, 126, 141] Die durch UV-Strahlung gebildeten Photoschäden wurden nach der damals verwendeten *Whatmann*-Papier-Methode[142] durch Dünnschichtchromatographie identifiziert. Hierfür wurde die radioaktiv markierte DNA von belichteten Sporen und vegetativen Zellen nach Aufschluss der Zellen isoliert, mit TFA hydrolysiert, auf ein *Whatmann*-Papier aufgetragen und in einem geeigneten Laufmittel entwickelt. Anschließend wurde zur Erstellung des Chromatogramms das *Whatmann*-Papier quer zur Laufrichtung in dünne Streifen geschnitten und mit Wasser eluiert. Die gemessene Radioaktivität der einzelnen Streifen wurde dann als Funktion der Entfernung von der Startlinie des Dünnschicht-chromatogramms aufgetragen (Abbildung 1-24A). Durch die identischen Retentionszeiten

konnte somit gezeigt werden, dass sich sowohl bei Bakteriensporen[81] und gefrorenen Bakterien,[131, 141, 143] sowie bei gefrorenen DNA-Lösungen[128, 131, 133, 135, 137, 138, 144] immer dasselbe Photoprodukt und kein CPD bildet (Abbildung 1-24B). Die Belichtungsstudien zeigten zudem, dass das SP durch benachbarte Thymidinreste in der DNA gebildet wird.[126]

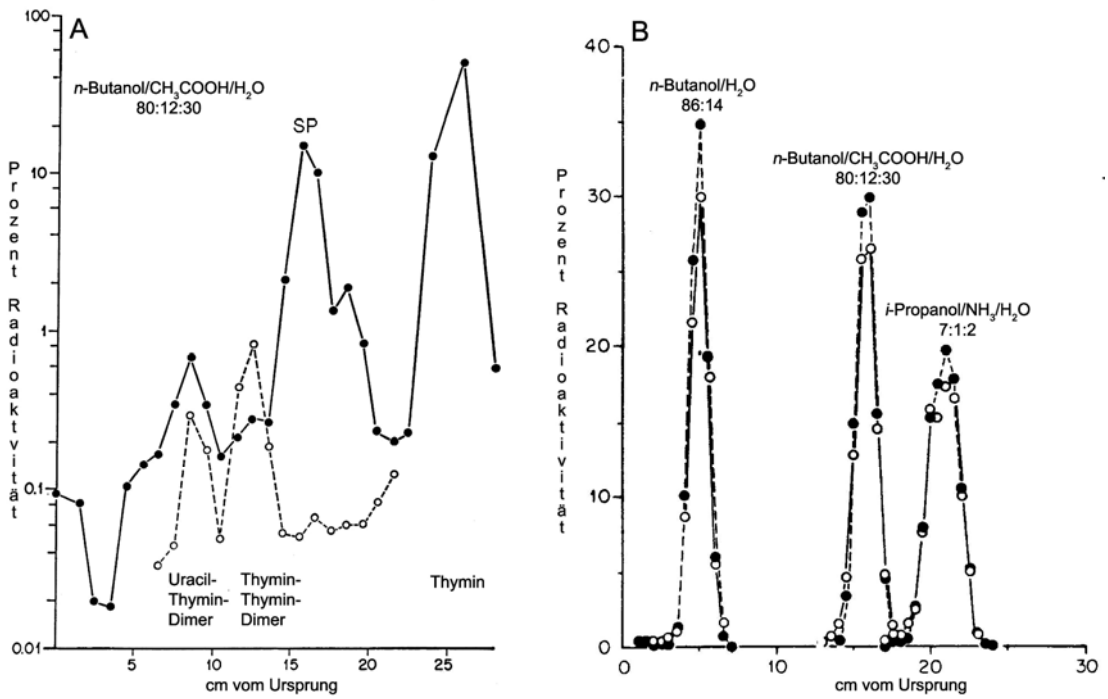


Abb. 1-24: Chromatogramme erhalten nach der *Whatman*-Papier-Methode aus ^{3}H- und ^{14}C-markierter DNA. **A)** Chromatogramme von hydrolysierter DNA aus *B. megaterium* Sporen (durchgehende Linie) und *B. megaterium* vegetativen Zellen (gestrichelte Linie) nach Belichtung mit UVC-Strahlung (265 nm).[81] **B)** Co-Chromatogramme in drei verschiedenen Laufmitteln des ^{3}H-markierten SP aus *B. megaterium* belichtet bei 25 °C (●-●-●) und ^{14}C-markierte SP aus *E. coli* belichtet bei -196 °C (○-○-○), jeweils mit 280 nm.

Anschließend erfolgte durch *Varghese* im Jahr 1970 die exakte Strukturaufklärung des SP.[127] Dabei isolierte er das SP analog über die vorher beschriebene Methode. Das SP wurde mehrmals säulenchromatographisch aufgereinigt und in einem letzten Schritt umkristallisiert. Für die Experimente wurde eine gefrorene Lösung aus Kalbsleber-DNA verwendet. Vergleiche mit dem R_f-Wert des in Sporen gebildeten Schadens zeigten, dass beide Produkte ein identisches Laufverhalten besaßen. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass der in gefrorener, belichteter Kalbsleber-DNA entstandene Photoschaden dem SP entsprach. Mit diesem Verfahren war es möglich aus 5 g DNA 7 mg SP zu isolieren. Auf Grundlagen von UV-, IR-, NMR- und Massenspektren wurde 5-Thyminyl-5,6-dihydrothymin (**7**) als wahrscheinlichste Struktur für das SP vorgeschlagen.

Im UV-Absorptionsspektrum konnte bei einer Verschiebung des pH-Werts von pH 2, bzw. 6 zu pH 12 eine Verschiebung des Maximums von 265 nm zu 290 nm beobachtet werden.

Dies ist charakteristisch für 5-substituierte Uracilderivate, wie 5-Hydroxy-methyluracil und Thymin.[145]

Auch das IR-Spektrum wies charakteristische Banden für gesättigte Thyminderivate (1745 cm^{-1}) bzw. Thymin (1695 cm^{-1}) auf.[146]

Das in d_1-TFA aufgenommene ^{1}H-NMR-Spektrum (Abbildung 1-25) zeigte ein Singulett mit 3 Protonen bei 1.35 ppm. Solch ein Singulett ist typisch für eine Methylgruppe. Die CH_2-Gruppe vom 5,6-Dihydrothymin spaltete zu einem AB-Quartett, bestehend aus zwei Dubletts (2.70 ppm und 3.06 ppm), auf. Die Kopplungskonstante lag bei J = 14 Hz, welche somit mit der geminalen Proton-Proton-Kopplung über ein sp^3-hybridisiertes C-Atom übereinstimmt. Die Methylenbrücke (3.34 ppm) zwischen den Thyminen lag, ebenso wie das 6-Vinylproton vom Thyminyl (7.58 ppm), als Singulett vor. Die zwei breiten Peaks bei 7.17 ppm und 9.15 ppm resultierten vermutlich aus den NH-Protonen. Die zwei anderen NH-Gruppen waren in d_1-TFA nicht detektierbar. Bei Aufnahme des NMR-Spektrums in d_6-DMSO konnten jedoch zwei zusätzliche breite Peaks bei 10.70 ppm und 10.94 ppm gesehen werden, die vermutlich diese zwei NH-Gruppen darstellten.

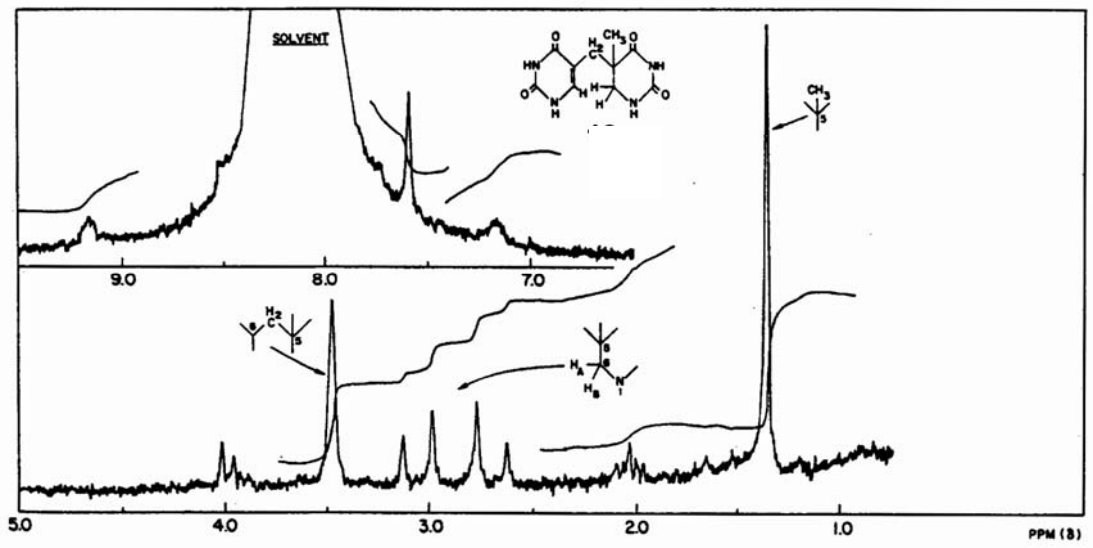


Abb. 1-25: ^{1}H-NMR-Spektrum (100 MHz, CF_3COOD) des isolierten Photoproduktes **7** nach UV-Bestrahlung von Kalbsleber-DNA bei -78 °C.[127]

Durch das Massenspektrum konnte des Weiteren die vorgeschlagene Struktur bestätigt werden. Neben einem schwachen Peak bei *m/z* = 252, welcher der Summenformel ($C_{10}H_{12}N_4O_4$) von 5-(α-Thyminyl)-5,6-dihydrothymin entspricht, zeigte es das typische Fragmentationsmuster von 2,4-Dioxy-5,6-dihydropyrimidin (Abbildung 1-26).[147] Der Peak bei *m/z* = 237 zeigt den für Dihydrothymin typischen Verlust einer *tert*-Methylgruppe.

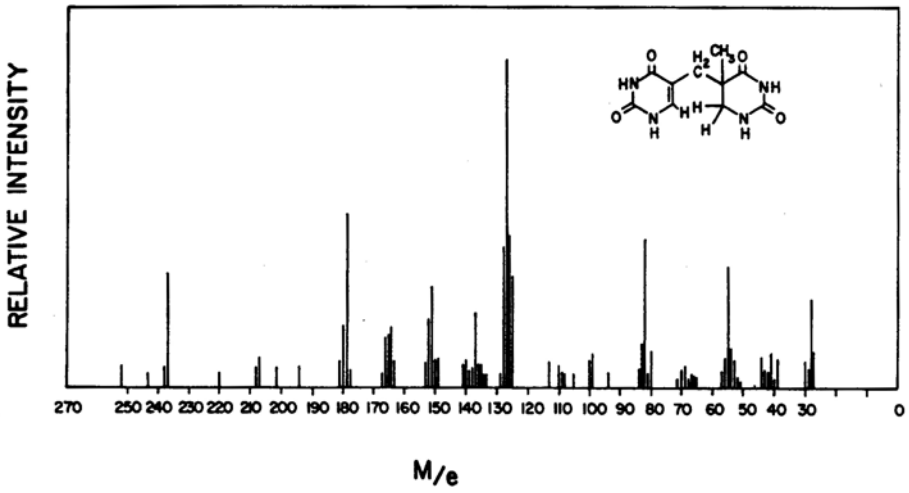


Abb. 1-26: Massenspektrum (70 eV) des isolierten Photoproduktes **7** nach UV-Bestrahlung von Kalbsleber-DNA bei -78 °C.[127]

Die erste Totalsynthese des 5,6-Dihydro-5-(α-thyminyl)thymidin **7** erfolgte im Jahr 1979 durch *Bergstrom et al.* (Abbildung 1-27).[148, 149] Hierbei wurde 5-Hydroxymethyluracil **8** in Trifluoressigsäure mit Trifluoressigsäureanhydrid *in situ* zu 5-Trifluoracetoxymethyluracil **9** umgesetzt und durch eine nukleophile Substitution mit 6-Aminothymin **10** zu 5,6-Dihydro-6-imino-5-(α-thyminyl)thymidin **11** addiert. Anschließend wurde **11** mit Natriumcyanoborhydrid im sauren zu 5,6-Dihydro-5-(α-thyminyl)thymidin **7** reduziert. Die Ausbeute wurde zunächst mit 38% angegeben, später jedoch auf 3% korrigiert.[148]

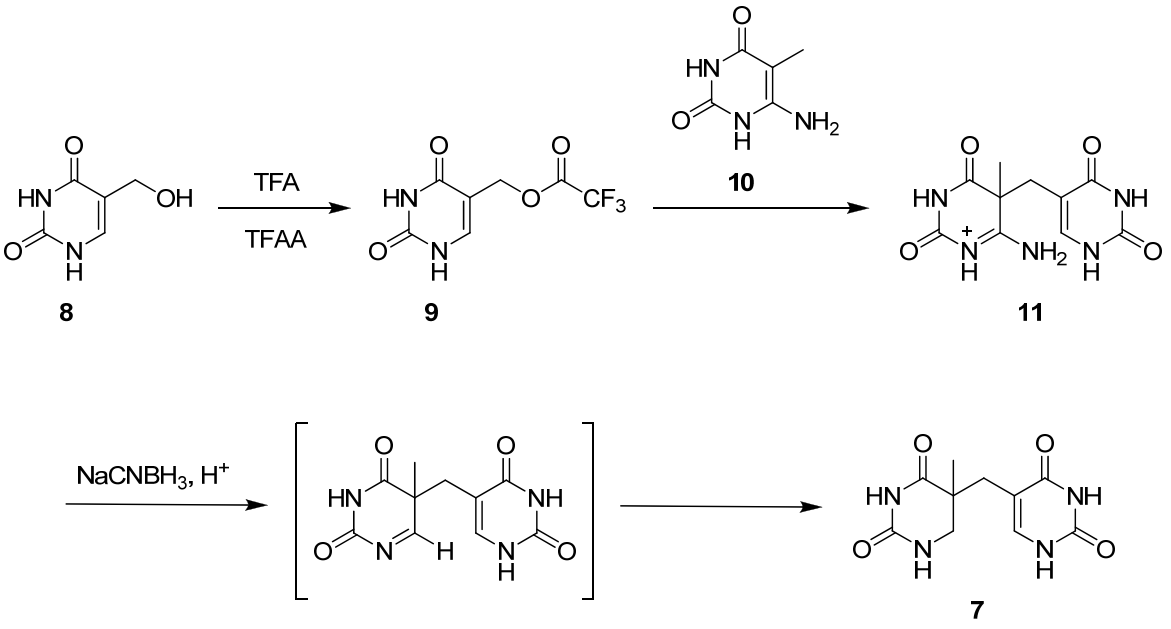


Abb. 1-27: Erste Totalsynthese von 5-(α-Thyminyl)-5,6-dihydrothymin **7**.[148]

Nach einem Vergleich mit den beiden Referenzsubstanzen Thymin und Dihydrouracil wurden die Signale des ^{1}H-NMRs (Abbildung 1-28) des Produktes sowohl in d_1-TFA als

auch d_6-DMSO zugeordnet. Die CH_2(6)-Gruppe spaltete hierbei in d_6-DMSO im Gegensatz zum d_1-TFA (s, 3.57 ppm) zu einem Dublett von Dubletts (2.88 ppm und 3.06 ppm) mit einer geminalen Kopplungskonstante J = 13 Hz auf. Neben der geminalen Kopplungskonstante von 13 Hz konnte bei 25 °C eine weitere Aufspaltung durch das benachbarte N^1-Proton beobachtet werden, welche bei 140 °C nicht mehr vorhanden war. 5,6-Dihydrouracil zeigte in d_6-DMSO ein breites Signal bei 7.47 ppm für das N^1-Proton, welches mit den C6-Protonen (3.21 ppm) mit einer Kopplungskonstante von 3 Hz koppelte. Die Zuordnung der CH_2(6)-Gruppe wurde durch die Reduktion von **11** mit deuteriertem Natriumcyanoborhydrid zu **7** bestätigt, wobei nun die Protonen am C6 deuteriert vorlagen. Nach der Deuterierung an C6 wurde das Singulett bei 3.57 ppm in d_1-TFA nicht mehr beobachtet. Das in d_1-TFA beobachtete AB Quartett wird demnach den diastereotopen Protonen der Methylenbrücke zugeordnet. Vergleiche mit den chromatographischen und spektroskopischen Daten von *Varghese*[127] bestätigten, dass das von *Varghese* isolierte Photoprodukt 5-(α-Thyminyl)-5,6-dihydrothymin **7** ist. Allerdings kommt es zu einer abweichenden Zuordnung der Signale.

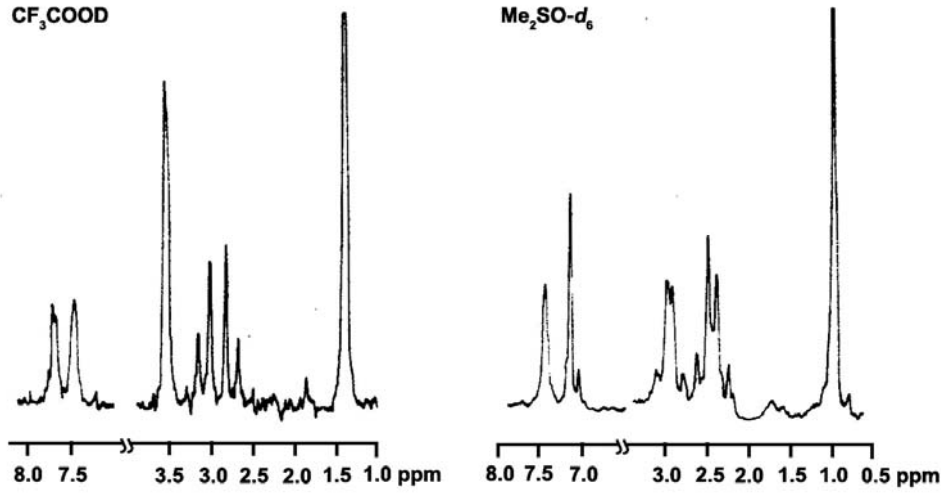


Abb. 1-28: ^{1}H-NMR-Spektrum (100 MHz) von synthetisiertem 5-(α-Thyminyl)-5,6-dihydrothymin **7** in deuterierter Trifluoressigsäure (CF_3OOD) und deuteriertem Dimethylsulfoxid (Me_2SO-d_6).[148]

Ein weiterer „Meilenstein“ in der Strukturaufklärung des SP gelang *Shaw* und *Cadet* im Jahr 1990 durch die Trennung der beiden Diastereomere des 5-(α-Thymidyl)-5,6-dihydrothymidin.[150] Hierbei wurde eine gefrorene, wässrige Lösung aus Thymidin γ–Strahlung ausgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde über *rp*-HPLC gereinigt und die einzelnen Fraktionen mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert. Hierbei erlaubten 2D-NMR-Untersuchungen (COSY, 400 MHz) eine genaue Zuordnung der ^{1}H-Signale. So konnte die Charakterisierung des AB-Quartetts durch *Bergstrom et al.*[148] bestätigt werden. Dies ist die erste bekannte Strukturuntersuchung des

angenommenen SPs, bei der die beiden N^1-Stickstoffatome noch über eine glykosidische Bindung mit der Desoxyriboseeinheit verknüpft sind. Es gelang jedoch keine eindeutige stereochemische Zuordnung der beiden Isomere bezüglich des chiralen Zentrums an C5 des 5,6-Dihydrothymidins.

Die stereochemische Zuordnung der Diastereomere eines Sporenphotoprodukt-analogen Dinukleotides gelang im Jahr 1995 *Begley et al.* (Abbildung 1-29).[151] Der Schlüsselschritt der Synthese war die Kupplung eines geschützten 5,6-Dihydrothymidinenolates **12** mit einem geschützten Bromethyldesoxyuridins **13**. Bei der Synthese von **13** wird kommerziell erhältliches Thymidin **1** zunächst an der 5'- und 3'-OH-Gruppe mit TBDMSCl und am 3-NH mit SEMCl geschützt, anschließend wird durch eine Bromierung mit Brom das Allylbromid **13** generiert. In der Synthese des 5,6-Dihydrothymidins **12** wird zunächst die Doppelbindung von **1** mittels Rhodium auf Aluminiumoxid hydriert, anschließend werden die 5'- und 3'-OH-Gruppen mit TESCl, sowie die 3-NH-Gruppe mit SEMCl zu **12** geschützt. Zur Synthese des Kupplungsproduktes **14** wird nach Lithiierung von **12** mit LDA **13** zugegeben und die labileren TES-Schutzgruppen mit 4%iger HF abgespalten. Die freie 5'-Position wird DMT-geschützt und die 3'-Position mit 2-Chlorphenyl-dichlorophosphat zu **15a** und **15b** phosphoryliert. Nach TBAF-Entschützung wird in einem MSNT-induzierten Ringschluss der Phosphotriester als Gemisch von vier Diastereomeren **16a**-**16d** gebildet. Die Entfernung der SEM- und DMT-Schutzgruppe mittels Zinntetra-chlorid, anschließende Entschützung des Phosphotriesters durch Ammoniumhydroxid und Trennung des Isomeren-Gemisches über *rp*-HPLC liefert die Sporenphotoprodukt-analogen Dinukleotide **17a** und **17b**.

Die Zuordnung der Stereochemie an C5 von **17a** und **17b** erfolgte über 2D-ROESY-Experimente. Für **17a** konnte eindeutig die *R*-Konfiguration bestimmt werden. Allerdings war bei **17b** die Zuordnung auf Grund des nicht aussagekräftigen ROESY-Kreuzsignalmuster nicht möglich, da die diastereotopen Protonen der CH_2(6)-Gruppe keine Aufspaltung aufzeigten. Es wurde postuliert, dass die DNA in der A-Form vorliegt. Somit wurde das *R*- Isomer wegen der geometrischen Anordnung der Basen in jener Form als das natürlich gebildete vorgeschlagen. Beweise wurden dafür nicht vorgelegt.

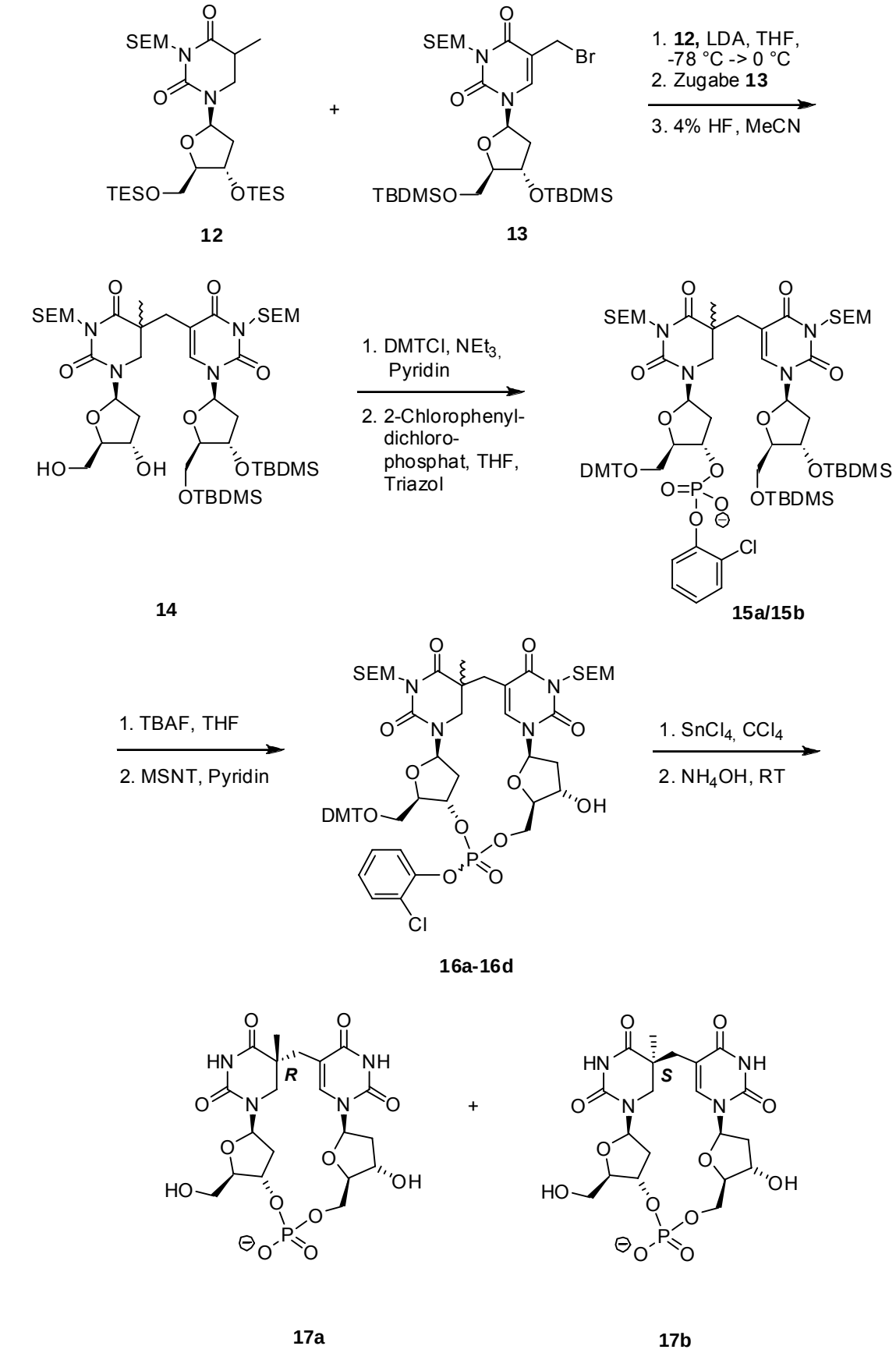


Abb. 1-29: Synthese der getrennten Isomere **17a** und **17b** des Sporenphotoprodukt-analogen Dinukleotides nach *Begley*.[151]

1.1.4.5 DNA-Reparatur in Sporen

Die im Genom während des Sporenstadiums angehäuften Schäden bleiben aufgrund der Stoffwechselinaktivität der Spore unrepariert. Das gebildete SP kann die Replikation und Transkription der DNA blockieren und so zu Mutationen und Zelltod führen. Die effiziente Reparatur dieses Dimers ist deshalb notwendig.[152] Die angehäuften Schäden müssen aus diesem Grunde zu einem frühen Zeitpunkt im Keimungsprozess beseitigt werden, bevor die Reaktivierung der Genexpression überhaupt einsetzen kann. Dies erfolgt teilweise über NER, hauptsächlich aber über die SP-Lyase.[153, 154] Die Existenz dieses speziellen Enzyms zur Reparatur des SP wurde erstmalig im Jahr 1972 von *Munakata* und *Rupert* beschrieben.[139] *Rupert* konnte in weiteren Studien zeigen, dass die Reparatur des Schadens zu den ursprünglichen Thymidinen im Gegensatz zu den anderen Photolyasen auch unter Lichtausschluss stattfindet.[140] Im Jahr 1993 konnte die SP-Lyase in *E. coli* kloniert werden. Mit dieser rekombinanten Variante erfolgte daraufhin die weitere Charakterisierung des Enzyms aus *Bacillus subtilis.*[155] Das *spl*-Operon ist bicistronisch aufgebaut,[156] d.h. die Expression von zwei Genen wird durch diesen Promoter reguliert. Das Operon besteht aus dem *splA*- und dem *splB*-Gen. Das *splA*-Gen kodiert ein 9-kDa großes Enzym mit zurzeit unbekannter Funktion. Es weist dabei Homologien in der Aminosäuresequenz zu dem TRAP (*trp RNA-binding attenuation protein)* auf.[157] Dieses Protein hat Regulationsfunktionen in der Expression, was eine ähnliche Funktion für das splA vermuten ließe. Ein Protein mit Sequenzhomologien zur splA ist in anderen *Bacillus* Arten bisher jedoch noch nicht identifiziert worden, wodurch solch eine Regulation von splB durch splA eher unwahrscheinlich erscheint. Das *splB*-Gen kodiert die 40-kDa große SP-Lyase und liegt als Homodimer vor.[158] Es besitzt dabei eingeschränkte Sequenzhomologien zu anderen DNA-Photolyasen.[155, 158] Das *splB*-Gen wird nur in Phase III der Sporenbildung in der Vorspore abgelesen. Die SP-Lyase wird also zum selben Zeitpunkt exprimiert wie die SASPs.[156] Für die SP-Lyase wurde keine Induzierung der Transkription durch DNA-Schäden gefunden, wie sie bei anderen DNA-Reparaturgenen wie *uvr* und *rec* beobachtet wird.[156]

Untersuchung der 342 Aminosäuren enthaltenen splB-Sequenz ergaben, dass die SP-Lyase vier Cysteine besitzt, wobei drei eng benachbart (C91, 95 und 98) vorliegen. Dabei weißt die Region um C91 bis C98 Ähnlichkeiten zu den SAM-abhängigen Radikalenzymen auf.[159, 160] Zu dieser Enzymklasse zählen z.B. die anaerobe Ribonukleotid-Reduktase (RNR), Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL), Lysin-2,3-Aminomutase (KAM) und die Biotinsynthase (BioB).[158, 161] Bei den SAM-abhängigen Radikalenzymen dienen die Cysteine als Liganden zur Bildung von sauerstofflabilen Eisen-Schwefel-Clustern ([4Fe-4S]).[154] Diese Enzyme benötigen zudem *S*-Adenosylmethionin (SAM) als

Cofaktor zur Ausbildung von Adenosylradikalen. Dieses Radikal initiiert direkt oder indirekt die Katalyse.[159, 162] Die SP-Lyase besitzt ebenfalls je einen sauerstoffempfindlichen [4Fe-4S]-Cluster pro Monomer und benötigt SAM als Cofaktor. Die Verknüpfung der beiden splB-Untereinheiten im homodimeren Enzym erfolgt vermutlich über eine Disulfidbrücke. Diese könnte durch das vierte Cystein (C141) erfolgen, welches in allen *Bacillus* Arten hoch konserviert und essentiell für die *in vivo* Aktivität ist.[163] Aufgrund dieser Übereinstimmungen wird die SP-Lyase den SAM-abhängigen Radikalenzymen zugeordnet.[154]

Die SP-Lyase bindet und repariert spezifisch das SP und keine anderen Photoschäden.[154] Durch die Bindung des Enzyms an die DNA kommt es zu einer zusätzlichen Verzerrung der Doppelhelix in der Nähe des Schadens.[154] Solch eine Verzerrung konnte auch in der Cokristallstruktur der CPD-Photolyase aus *A. nidulans* beobachtet werden (*base-flipping*-Mechanismus).[51] Bei dem *base-flipping*-Mechanismus wird der Schaden aus der DNA-Doppelhelix in die aktive Tasche des Enzyms gedreht und repariert. Basierend auf Untersuchungen an Modellverbindungen postuliert *Mehl* und *Begley* 1999 den in Abbildung 1-30 gezeigten Reparaturmechanismus.[164] Das 5'dAdo-Radikal, welches aus SAM durch einen Elektronenübergang vom [Fe-S]-Cluster generiert wurde, initiiert die Reparatur durch die Abspaltung eines der C6-sp^3-Wasserstoffatome am SP. Die Folge der Abstraktion des Wasserstoffes ist eine Schwächung der Methylenbrücke zwischen den Thymidinen, was zu einer β-Fragmentierung führt. Das abstrahierte Wasserstoffatom wird im letzten Schritt vom 5'-dAdoH auf das Thymidinradikal übertragen. Hierbei wird das 5'dAdo-Radikal durch Elektronenübergabe regeneriert. Durch Isotopenmarkierungs-arbeiten von *Cheek* und *Broderick* 2001 wurde der postulierte Mechanismus gestützt.[162] Sie verwendeten für die Herstellung des SP mit Tritium an der Methylgruppe, bzw. der C6-Position, markierte Thymidine. Im Reparaturassay konnten sie zeigen, dass nur im Fall mit der Markierung am C6 ein Transfer des Tritiums auf SAM erfolgt. Auch *Rebeil* und *Nicholson* konnten 2001 mittels ESI-Massenspektrometrie und HPLC die Existenz des 5'dAdo-Radikal weiter untermauern.[159]

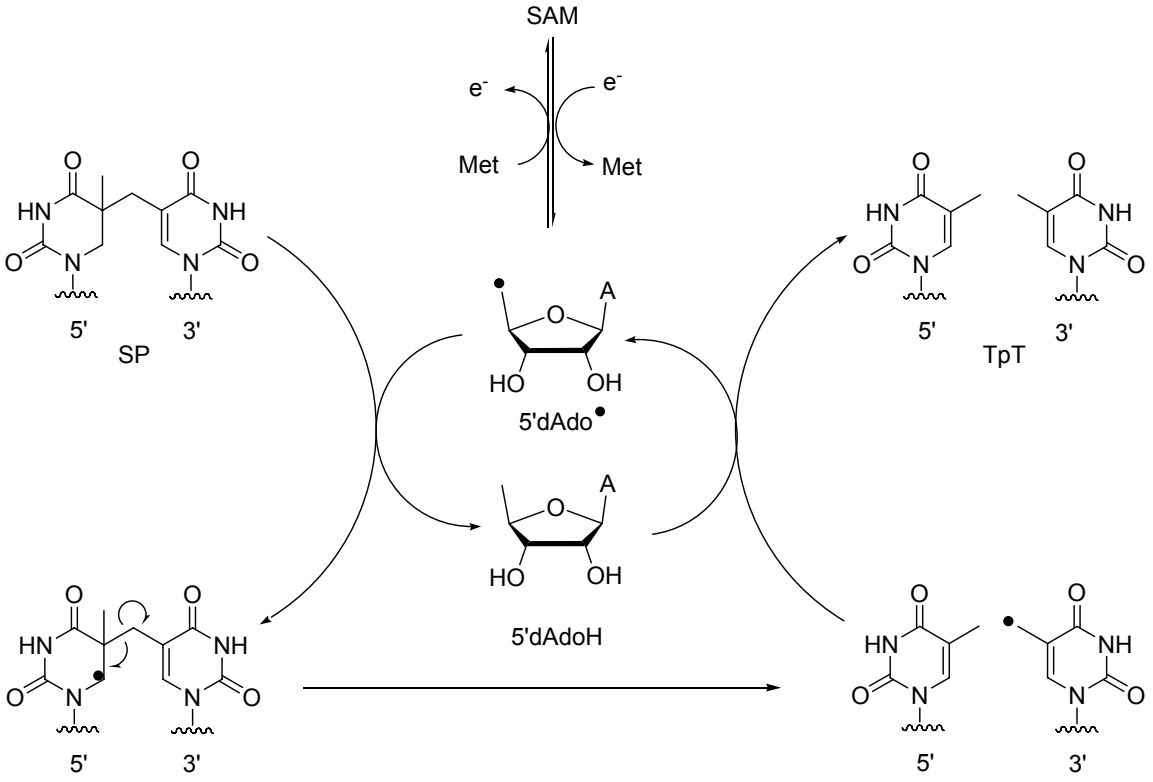


Abb. 1-30: Postulierter Reparaturmechanismus des SP durch die SP-Lyase.

Quantenchemische DFT-Rechnungen von *Guo et al.* konnten 2003 zusätzlich den Mechanismus stützen.[152] Hier wird jedoch davon ausgegangen, dass vor der Wasserstoffübertragung vom Cofaktor ein intermolekularer Wasserstofftransfer zwischen den Thymidinen erfolgt. Dieser Schritt ist den Berechnungen zufolge geschwindigkeitsbestimmend. Die SP-Lyase ist mit diesem radikalischen Reparaturmechanismus einzigartig unter den DNA-Reparaturenzymen.[165]

Es wurden bereits Reparaturstudien mit belichteter DNA durchgeführt. Das SP lässt sich so über drei Arten erzeugen: Belichtung von DNA im trockenem Zustand,[83, 138, 166, 167] in gefrorenen Lösungen[131-133] und durch Komplexierung mit α/β-Typ SASPs.[83, 168, 169] Allerdings entstehen hierbei unterschiedliche Schadensmuster. *Douki et al.* entdeckten bereits 2000, dass bei Belichtung von DNA im trockenem Zustand im Gegensatz zu gefrorenen Lösungen nur ein Diastereomer des SP gebildet wird.[166, 167] Zusätzlich konnten sie zeigen, dass bei der Belichtung zu 30% *cross-links* gebildet werden, wobei das Interstrang-SP den Hauptteil darstellt.[83] Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass das SP auch in Sporen zu einem großen Teil als Interstrang-Schaden gebildet wird. Eine Studie von 2005 widerlegte jedoch diese Annahme. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass in Sporen bei Belichtung nur zu 1% das Interstrang-SP entsteht.[82] Bei der *in-vitro* Belichtung von DNA-α/β-Typ SASP-Komplexen wurde auch hauptsächlich der Intrastrang-Schaden gefunden. Das Interstrang-SP könnte trotz seiner geringen Bildungsrate

jedoch eine biologische Relevanz besitzen, da nicht reparierte *cross-links* gefährlicher sind als ihre analogen Intrastrang-Schäden.[170-173]

Das erste Reparaturexperiment mit genau definiertem Schaden wurde 2006 durch *Carell et al.* durchgeführt.[174, 175] Hier wurde das SP synthetisiert und die Diastereomere getrennt. Im Reparaturassay konnte gezeigt werden, dass nur das *S*-Isomer, nicht jedoch das *R*-Isomer, repariert wird (Abbildung 1-31).

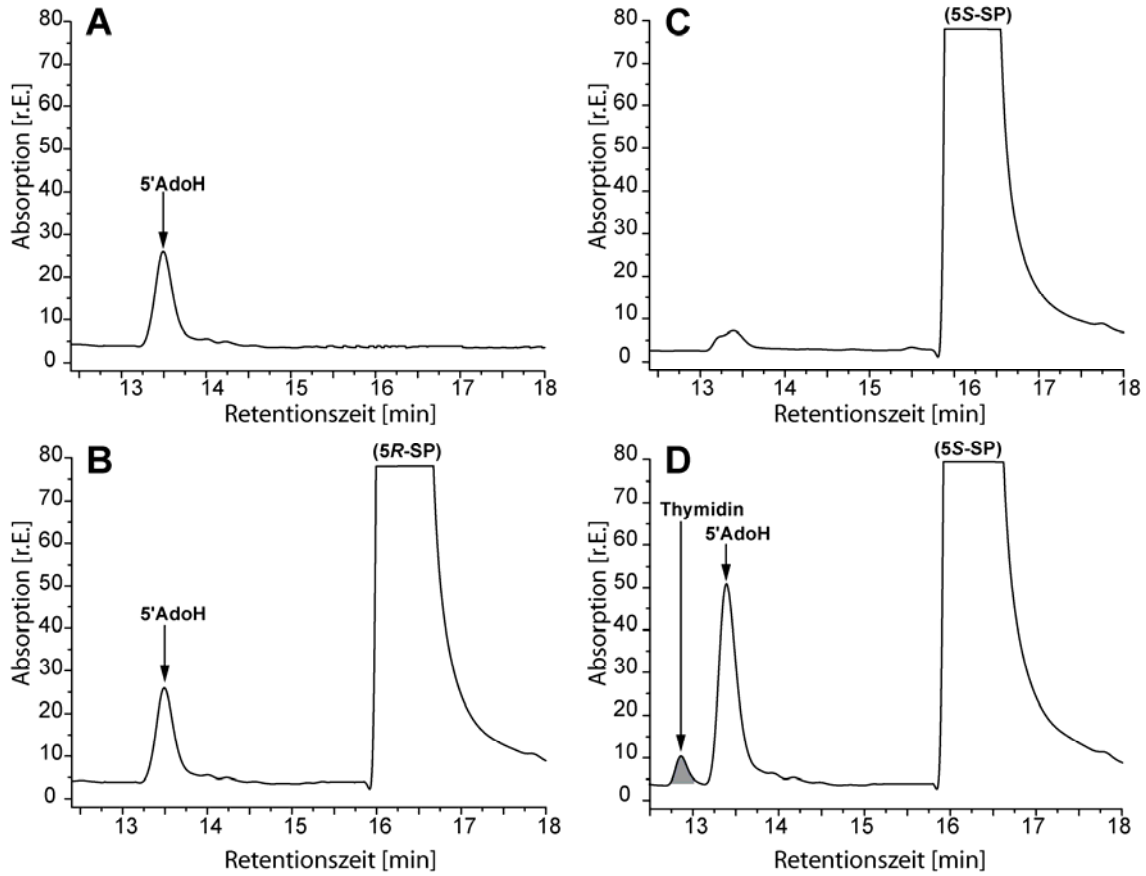


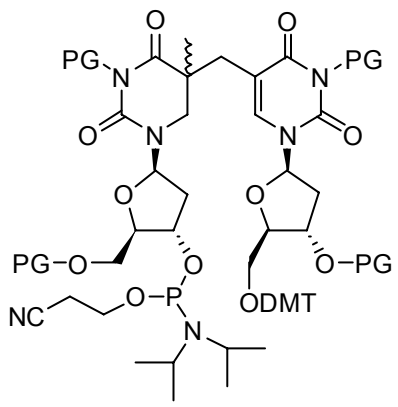
Abb. 1-31: HPL-Chromatogramme zur enzymatischen Aktivität von SplG. **A)** Assay mit SplG und SAM führt zur Spaltung von SAM in 5´-Desoxyadenosin (5`-AdoH) und Methionin; **B)** Assay mit SplG, 5*R*-SP und SAM zeigt ausschließlich SAM Spaltung; **C)** Assay mit 5*S*-SP und SAM führt zu keiner Produktneubildung; **D)** Assay mit SplG, 5*S*-SP und SAM zeigt die Reparatur des 5*S*-SP und damit die Entstehung von Thymidin.[175]

Trotz der ausführlichen Struktur- und Reparaturstudien bleiben einige wichtige Fragen ungeklärt. Handelt es sich bei der vorgeschlagenen Struktur wirklich um das SP? Bisher wurde die Strukturbestimmung des SP nur am isolierten Schaden von belichteten Trockenfilmen, nicht aber von belichteten Sporen, vorgenommen. Ein direkter Strukturbeweis fehlt somit. Welche Konfiguration besitzt das natürliche SP an C5? Werden in der DNA beide möglichen Diastereomere von der SP-Lyase erkannt und repariert? Erkennt die SP-Lyase gleichermaßen Interstrang- und Intrastrang-Schäden, oder werden sie unterschiedlich effektiv repariert?

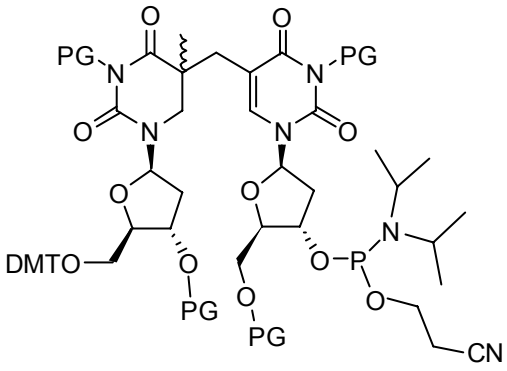
2. Synthese und Untersuchung des Sporenphoto-produktes

2.1 Aufgabenstellung

Ziel dieser Doktorarbeit war zunächst die Synthese eines SP-analogen Dinukleotides und dessen Einbau jeweils als Intrastrang-Schaden mit offenem Rückgrat in die DNA (Abbildung 2-1).



18a/b



19a/b

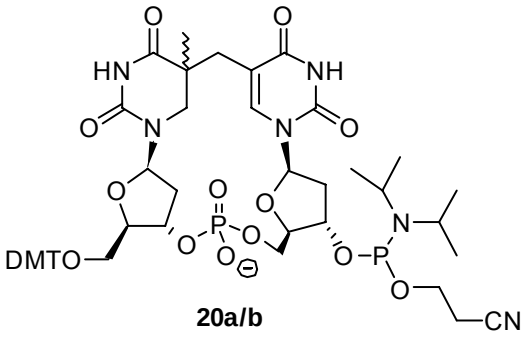
Abb. 2-1: Diastereomere der geschützten 5-Thyminyl-5,6-dihydrothymidinphosphoramidite **18a/b** und **19a/b** (PG = Schutzgruppe).

Die Synthese der SP-Analoga sollte in Anlehnung an die Vorschrift von *Begley*[151] über die Kupplung eines Dihydrothymidinenolates mit einem 5-Bromomethyl-2'-desoxyuridins erfolgen. Für die Alkohole und Imide der zu kuppelnden Monomere mussten zunächst geeignete Schutzgruppen gefunden werden, welche sowohl unter den Bromierungs- als auch den Kupplungsbedingungen stabil sind. Zudem sollten die Alkohol-Schutzgruppen zum einen selektiv entschützbar sein, um die für die Festphase notwendigen Schutzgruppen einführen zu können. Zum anderen sollten die Alkohol- und Imid-Schutzgruppen unter milden Bedingungen, nach der Inkorporation in die DNA, abspaltbar sein. Die beiden diastereomeren Dinukleoside sollten mittels HPLC getrennt und ihre Stereochemie an C5 mittels NOESY-Experimenten bestimmt werden.

Die Zielverbindungen **18a/b** und **19a/b** sollten anschließend über automatische Festphasensynthese in genau definierte Oligonukleotide eingebaut werden. Nach Abspaltung aller Schutzgruppen entstünde ein Oligonukleotid mit einem offenen Phosphatrückgrat an der Position des Schadens. Das offene DNA-Rückgrat würde eine einfache Detektion der nachfolgenden Reparatur mittels HPLC und Massenspektrometrie ermöglichen. Mit diesen synthetisierten Oligonukleotiden würden erstmals stereochemisch

eindeutig definierten DNA-Strängen für einen Reparaturassay mit der SP-Lyase zur Verfügung stehen. Durch eine erfolgreiche Reparatur könnte zudem bestätigt werden, dass es sich bei der von *Varghese*[127] angenommenen Struktur tatsächlich um das natürliche SP handelt.

Im Laufe der Arbeit entwickelte sich zudem die Idee, zusätzlich das SP-analoge Dinukleotid mit einem geschlossenen Phosphatrückgrat zu synthetisieren und dessen Diastereomere anschließend als Intrastrang-Schaden in die DNA zu inkorporieren (Abbildung 2-2).



20a/b

Ab. 2-2: Diastereomere des Sporenphotoprodukt-analogen Dinukleotides mit Phosphatrückgrat **20 a/b**.

Für die Synthese boten sich drei Möglichkeiten an: 1) Belichtung eines Dithymidinmonophosphates im Trockenfilm[138, 176] 2) Inkorporation des Phosphats nach Kupplung der Monomere zum Dimer[151] 3) Einführung des Phosphats nach der DNA-Synthese über Enzyme. Im Falle 1) und 2) würden sich noch die Phosphoramiditsynthese und der Einbau des Schadens **20a/b** in DNA durch automatische Festphasensynthese anschließen. Mit diesen synthetisierten Oligonukleotiden könnte erstmals durch einen Vergleich mit belichteten DNA-Strängen geklärt werden, ob nur ein oder beide Diastereomer(e) in der Natur gebildet werden. Zudem könnte die biologische Relevanz des Schadens über *Primer Extension*-Experimente untersucht werden. Auch über Kristallisationsversuche der geschädigten DNA mit der SP-Lyase könnten weitere Rückschlüsse über den Reparaturmechanismus gewonnen werden.

2.2 Synthese des Sporenphotoproduktes 18a/b zum Einbau in DNA

2.2.1 Retrosynthese

Die Retrosynthese der beiden Diastereomere **18a/b** ist in Abbildung 2-3 dargestellt. Für den Einbau des Intrastrang-Schadens in die DNA muss in den beiden letzten Schritten der Synthese nach der Auftrennung der Diastereomere die 5'-Hydroxyfunktion der einen

Desoxyriboseeinheit dimethoxytrityliert und an der 3'-Hydroxyfunktion der anderen Desoxyriboseeinheit ein Phosphoramidit eingeführt werden. Die 5'- und die 3'-Hydroxygruppen, die später das offene Rückgrat bilden, müssen mit Schutzgruppen maskiert werden, die gegenüber der automatischen Festphasensynthese stabil sind und anschließend unter milden Bedingungen entfernt werden können. Das Diastereomerengemisch **21a/b** lässt sich analog zur Synthesevorschrift nach *Begley*[151] in zwei Bausteine zerlegen. Im Schlüsselschritt wird das Enolat des geschützten Dihydrothymidins **22** mit dem geschützten Allylbromid **23** gekuppelt. Die beiden Monomere lassen sich in wenigen Schritten durch mehrere Schützungen aus Thymidin **1** generieren. Im Falle von **23** erfolgt zudem noch eine Bromierung.

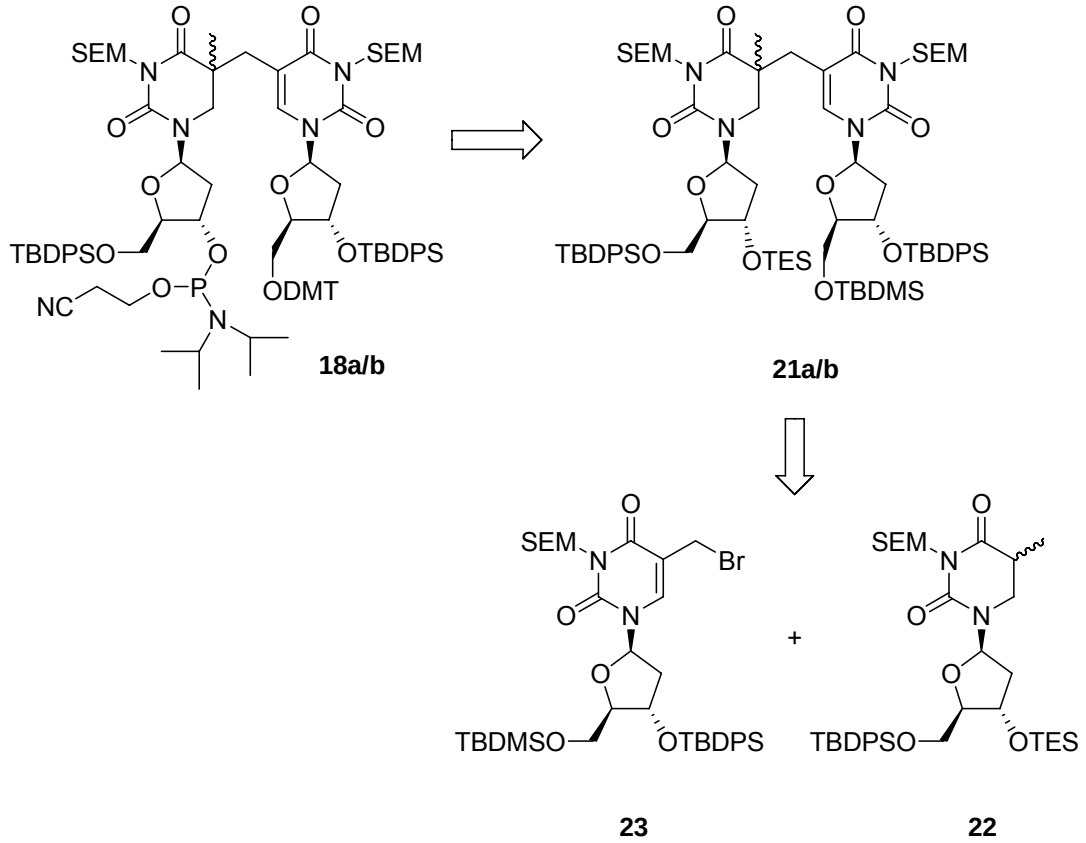


Abb. 2-3: Retrosynthetische Betrachtung der SP-analogen Phosphoramiditbausteine **18a/b**.

2.2.2 Synthese der Dihydrothymidineinheit 22

Der geschützte Dihydrothymidinbaustein **22** wurde in 4 bzw. 5 Schritten aus Thymidin **1** dargestellt (Abbildung 2-4). Im ersten Schritt wurde das Thymidin **1** in Anlehnung an *Greenberg et al.*[9] mit H_2 und Rhodium auf Aluminiumoxid (5% Rh) unter Normaldruck zu **24** hydriert. Die Reaktionsdauer betrug zwischen 1 Woche und 6 Wochen. Der Umsatz wurde mittels der UV-Inaktivität des Produktes detektiert. Teilweise war die Umsetzung

nicht quantitativ. Die Abtrennung des Eduktes vom Produkt bei solch einer unvollständigen Hydrierung ist jedoch aufgrund der ähnlichen Polarität sehr schwer, weswegen zu einem späteren Zeitpunkt ein zusätzlicher Schritt eingeführt werden musste. Auch mit Pd/C als Katalysator oder mit erhöhtem H_2-Druck konnte keine effizientere Hydrierung erzielt werden. Nach Abtrennung des Katalysators und azeotroper Entfernung der Wasserreste wurde die 5'-Hydroxygruppe mit TBDPSCl in Gegenwart von Imidazol und in DMF bei Raumtemperatur in 2.5 h zu **25** silyliert.[177] Das Produkt **25** wurde in einer Ausbeute von 71% in Bezug auf **1** erhalten.

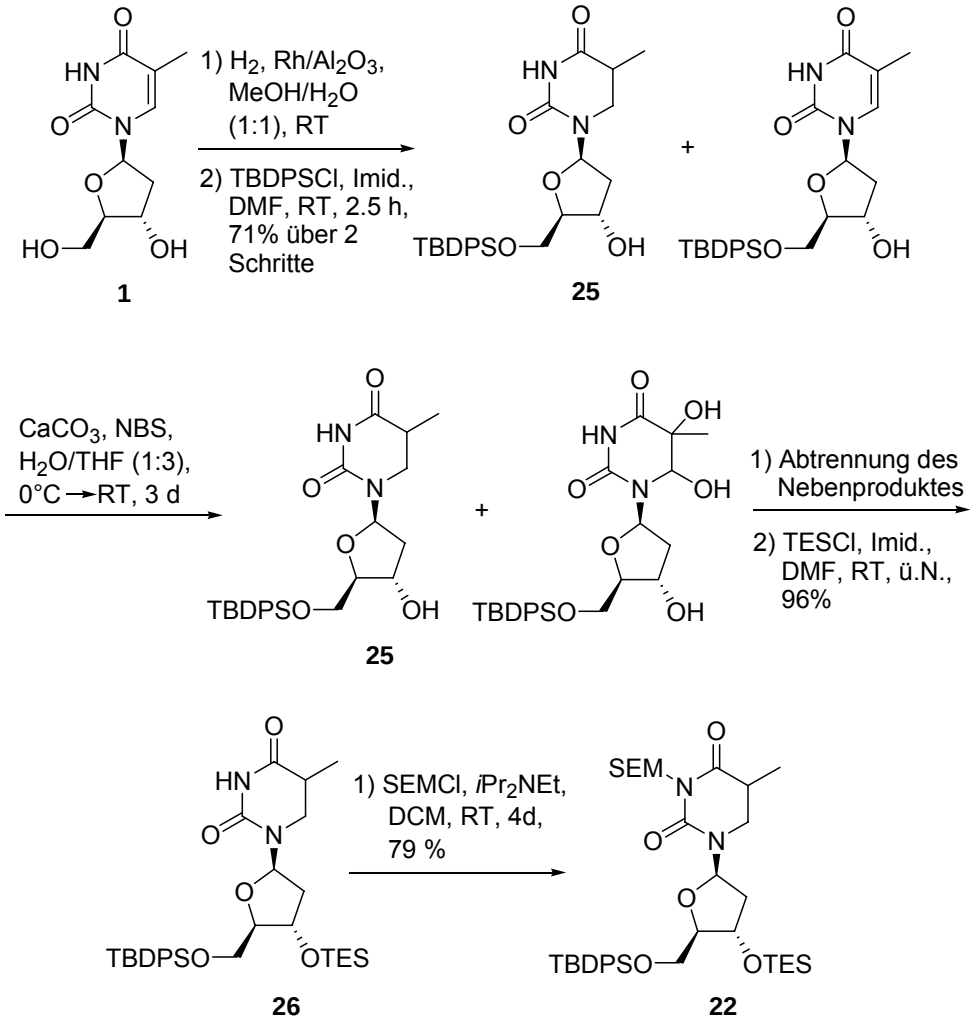


Abb. 2-4: Synthese des *N*-SEM-5'-TBDPS-3'-TES-5,6-Dihydrothymidins **22**.

Im Falle einer unvollständigen Hydrierung wurde nun ein Zwischenschritt eingefügt. Hierbei wurde versucht, die Polarität des Nebenproduktes soweit zu erhöhen, dass eine säulenchromatographische Auftrennung möglich ist. Es wurden mehrere Methoden, z.B. die Bromierung der Doppelbindung mit Brom[178], die Dihydroxylierung der Doppelbindung mit OsO_4[179] oder die mit NBS/$CaCO_3$ mit wässriger Aufarbeitung,[180] getestet. Letzteres erwies sich dabei als die günstigste. Hierfür wurde das Gemisch in THF/Wasser gelöst

und bei 0 °C mit NBS und $CaCO_3$ versetzt. Die Reaktionsdauer betrug 5 Tage. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt. Anschließend wurde in **25** die TES-Schutzgruppe mit TESCl und Imidazol in DMF über Nacht bei Raumtemperatur mit einer 96%igen Ausbeute eingeführt.[177] Die N^3-Position wurde in einem letzten Schritt mit SEMCl und Hünig-Base in DCM bei Raumtemperatur in 4 Tagen mit 79% Ausbeute geschützt.[151] Aufgrund der Licht- und Hydrolyseempfindlichkeit des SEMCl wurde dieses portionsweise über 4 Tage zugegeben.

2.2.3 Synthese des Allylbromids 23

Das vollständig geschützte Monomer **23** wurde in einer vierstufigen Synthese aus Thymidin **1** dargestellt (Abbildung 2-5). Die 5'-Hydroxygruppe des Thymidins **1** wurde zunächst mit TBDMSCl und Imidazol in DMF bei Raumtemperatur in 6 h mit 86% Ausbeute zu **27**[181, 182] und anschließend die 3'-Hydroxygruppe mit TBDPSCl und Imidazol in DMF bei Raumtemperatur über Nacht quantitativ geschützt **28**.[182] Aus der SEM-Schützung der Imidfunktion von **28** ging **29** in einer Ausbeute von 85% hervor.[183]

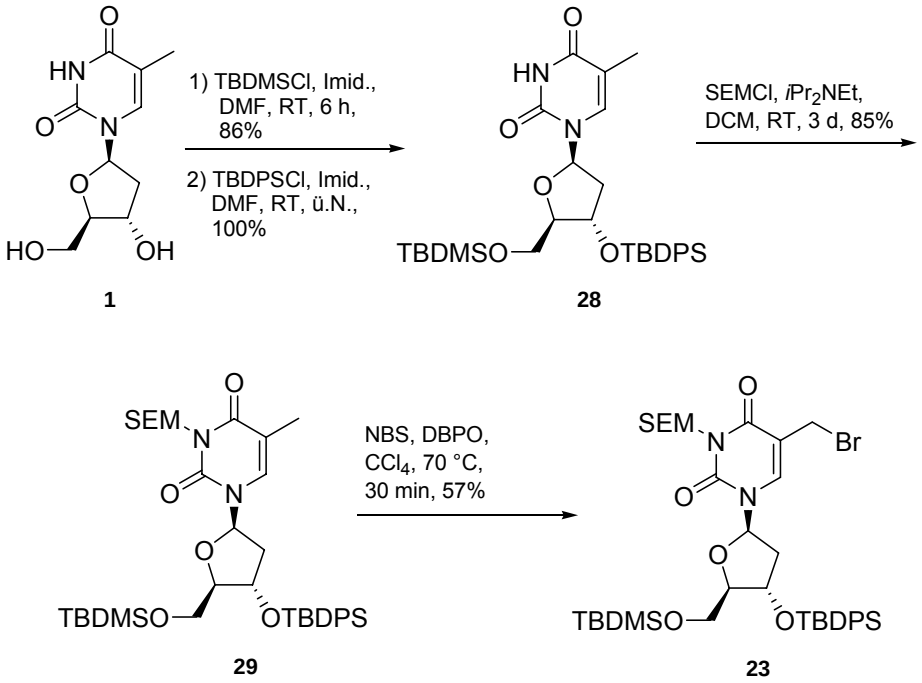


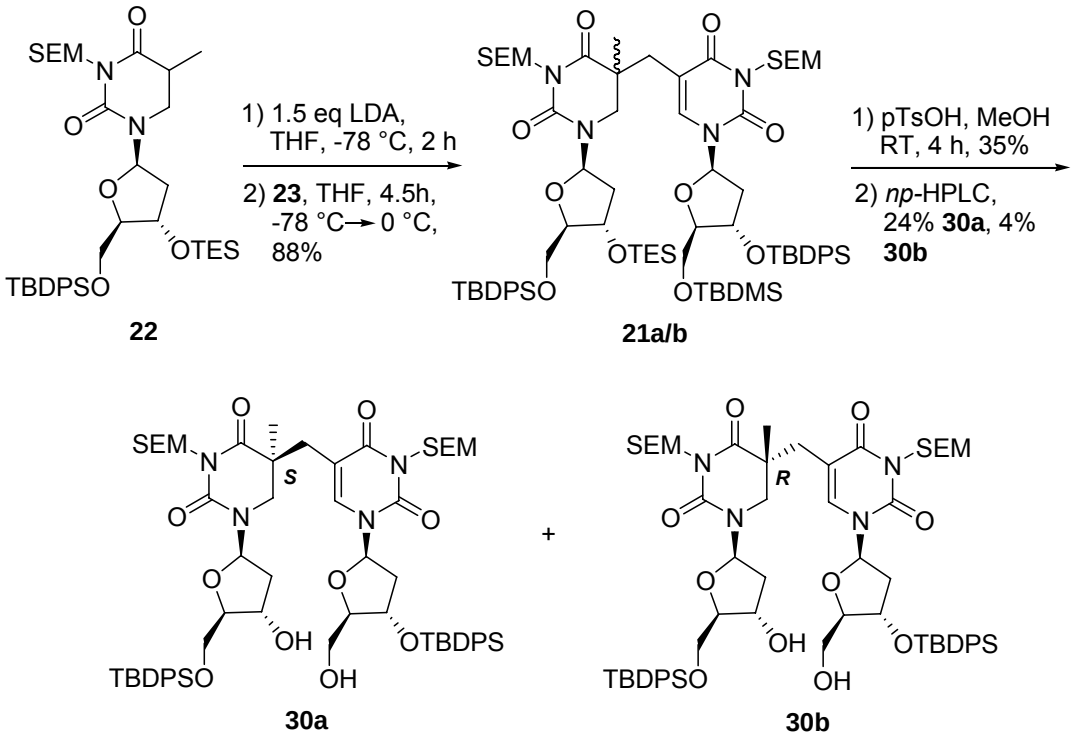
Abb. 2-5: Synthese des *N*-SEM-5'-TBDMS-3'-TBDPS-5-Bromomethyl-desoxyuridins **23**.

In der Synthese von *Begley*[151] wurde das Allylbromid des komplett geschützten Thymidins in einer Photoreaktion mit elementarem Brom radikalisch erzeugt. Vorarbeiten im Arbeitskreis *Carell*[177, 184] ermöglichten eine gut untersuchte, einfacherer und sauberer zu handhabende *Wohl-Ziegler*-Bromierung in Anlehnung an eine Synthese von

Greenberg et al..[185] Die Bromierung erfolgte an **29** mit NBS und Dibenzoylperoxid in Tetrachlorkohlenstoff in 30 min bei 70 °C. Das gebildete hydrolyse- und luftempfindliche Allylbromid konnte unter N_2-Atmosphäre bei -20 °C gelagert werden. Die Ausbeuten von knapp 60% ließen sich nicht weiter steigern.

2.2.4 Kupplung zum Dimer und Synthese der Phosphoramidite 18a/b

Für die Kupplung (Abbildung 2-6) der beiden Bausteine **22** und **23** wurde zunächst **22** mit LDA bei -78 °C für 2 h enolisiert. Daraufhin wurde **23** bei -78 °C zugegeben und die Reaktion für 1.5 h bei -78 °C, dann für 3 h bei 0 °C gerührt.[151] Das Diastereomerengemisch **21a/b** wurde mit 88% Ausbeute erhalten. Anschließend wurde mit pTsOH die TES- und die TBDMS-Schutzgruppen in MeOH bei Raumtemperatur in 4 h selektiv entschützt[186-188] und das Diastereomerengemisch **30a/b** in 35% Ausbeute erhalten.



22 **21a/b** **30a** **30b**

Abb. 2-6: Kupplung der Bausteine **22** und **23** und Trennung der Diastereomere zu **30a** und **30b**.

Auf dieser Stufe gelang die Trennung der Diastereomeren **30a/b** mittels *np*-HPLC. Für die Trennung wurde eine *VP 250/21 Nucleodur 100-5 np*-Säule der Firma *Macherey-Nagel* unter Verwendung eines Heptan/Essigestergemisches verwendet. Ein typisches HPL-Chromatogramm des Rohproduktes ist in Abbildung 2-7 gezeigt.

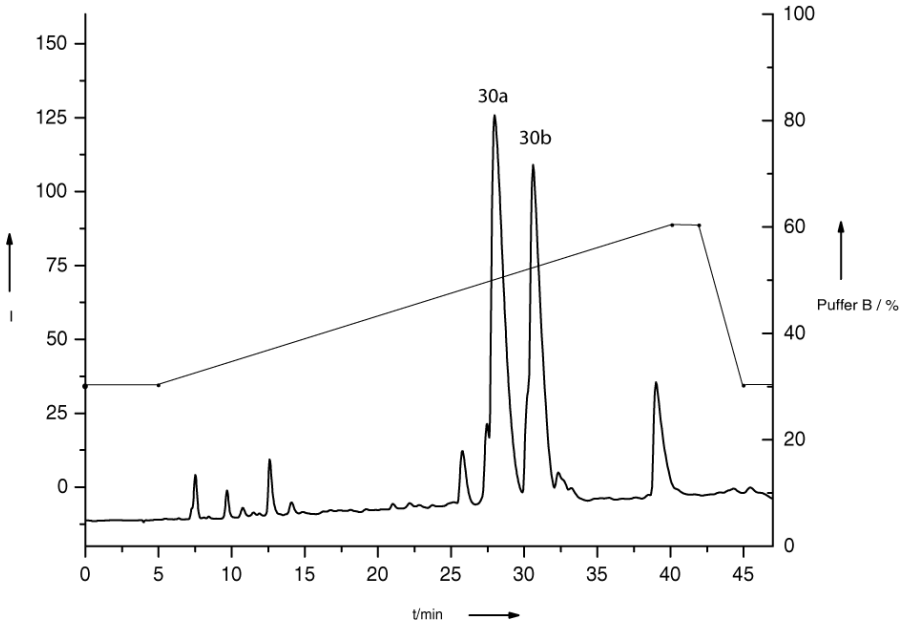


Abb. 2-7: Präparatives HPL-Chromatogramm des Diastereomerengemisches **30a/b**. *np*-HPLC: Heptan (A) und Essigester (B); Gradient: 30-60% B in 35 min; Säule: *VP 250/21 Nucleodur 100-5*; Flussrate: 15 mL/min; Detektion: 250 nm; Retentionszeit: R_T(**30a**) 21.58 min, R_T(**30b**) 23.33 min.

Alle aufgefangenen Fraktionen wurden mit Hilfe einer analytischen HPLC unter Verwendung einer *CC 250/4 Nucleodur 100-3 np*-Säule der Firma *Macherey-Nagel* auf Reinheit überprüft (Abbildung 2-8). Die vereinigten Produktfraktionen ergaben das *S*-Isomer **30a** mit 24% Ausbeute und das *R*-Isomer **30b** mit 4% Ausbeute jeweils als weißen Feststoff. Die Bestimmung der Konfiguration an C5 wird unter 2.2.5 genauer besprochen.

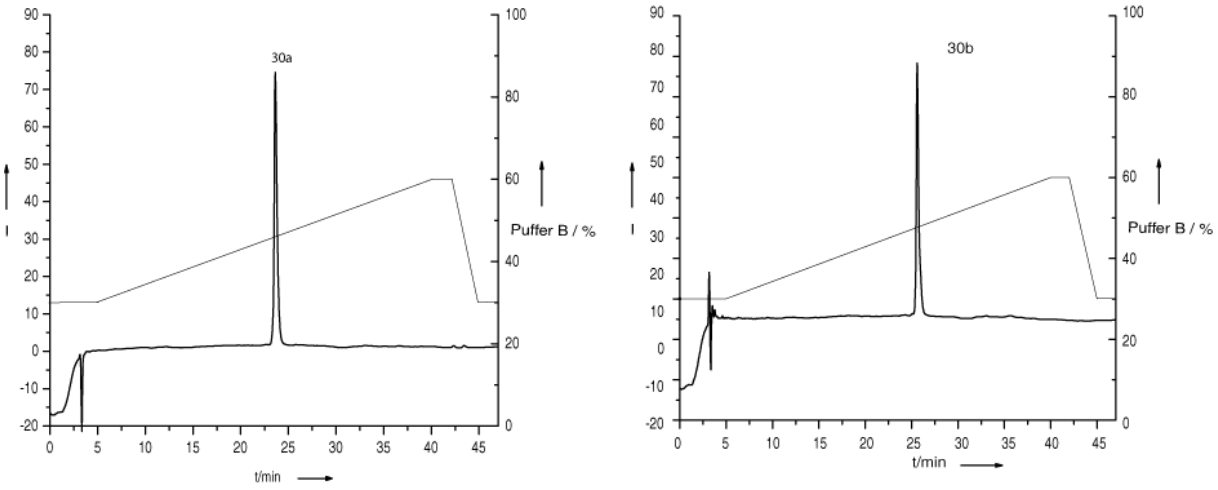
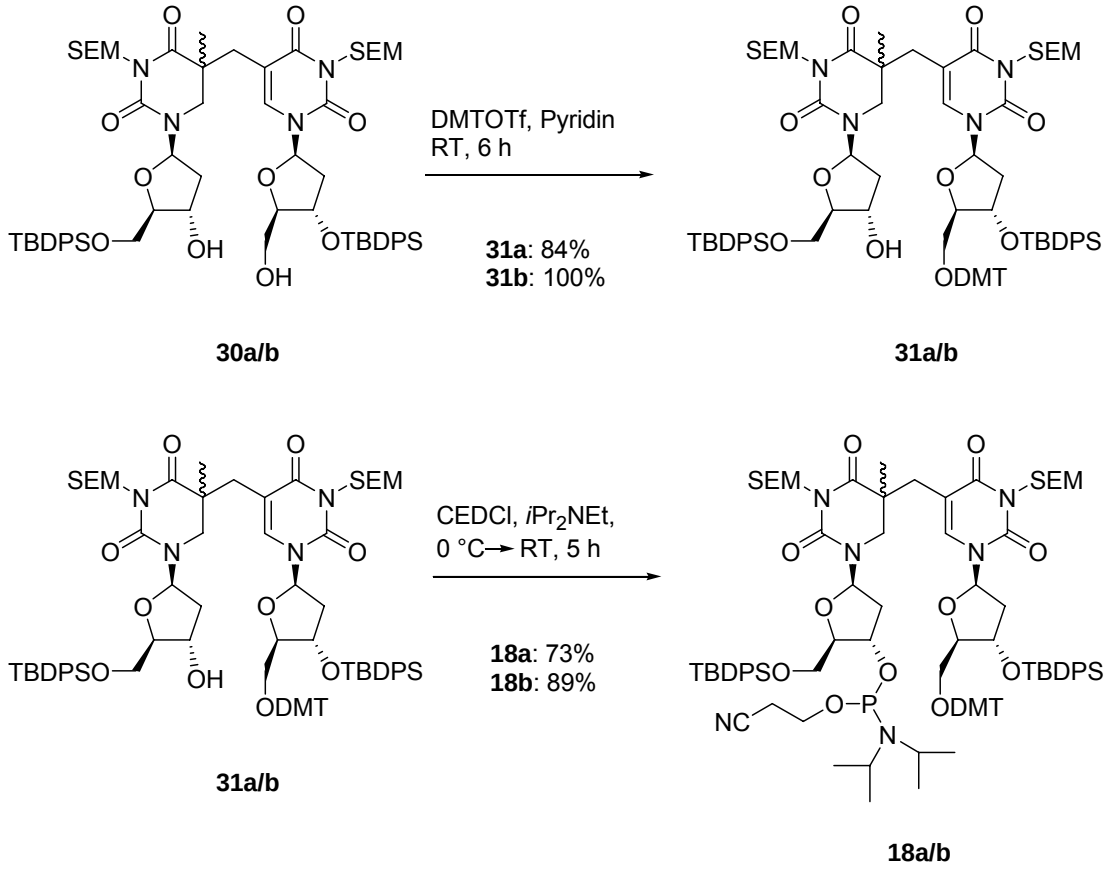


Abb. 2-8: Analytische HPL-Chromatogramme der getrennten Diastereomere **30a** und **30b**. *np*-HPLC: Heptan (A) und Essigester (B); Gradient: 30-60 % B in 35 min; Säule: *CC 250/4 Nucleodur 120-3*; Flussrate: 0.7 mL/min; Detektion: 250 nm; Retentionszeit: R_T(**30a**) 23.65 min, R_T(**30b**) 25.45 min.

Die getrennten Isomere **30a/b** wurden anschließend mit DMTOTf in Pyridin bei RT in 5 h mit guten Ausbeuten (für **31a**: 84%, für **31b**: 100%) Dimethoxytrityl-geschützt (Abbildung 2-9). Hierfür musste zunächst das DMTOTf **38** aus DMTCl und Silbertriflat nach bekannter

Vorschrift hergestellt werden,[189] da die Schützung mit kommerziell erhältlichem, weniger reaktiven, DMTCl nur sehr schlechte Ausbeuten ergab. Für die abschließende Phosphitylierung wurde **31a/b** mit Hünig-Base und CEDCl in THF zunächst bei 0 °C, dann bei Raumtemperatur, innerhalb von 5 h zu **18a/b** umgesetzt. Da sowohl das eingesetzte Reagenz, als auch die entstehenden Phosphoramidite **18a/b**, extrem sauerstoff-empfindlich waren, wurden alle Lösungsmittel entgast und die Reaktion zügig aufgearbeitet. Das Phosphoramidit **18a** konnte mit 73% Ausbeute, das Phosphoramidit **18b** mit 89% Ausbeute erhalten werden.



30a/b **31a/b** **31a/b** **18a/b**

Abb. 2-9: Phosphoramiditsynthese der Isomere **18a/b**.

2.2.5 Aufklärung der Konfiguration an C5

Zur Strukturaufklärung wurden die getrennten Isomere des Gemisches **30a/b** NMR-spektroskopisch untersucht. Die ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Signale konnten mit Hilfe von 2D-NMR-Methoden (COSY, HMQC, HMBC) eindeutig zugeordnet werden. Die Zuordnung der, dem jeweiligen Nukleosid A, bzw. B zugehörigen, ^{1}H-NMR-Signale konnte beginnend mit den OH-Gruppen gut bestimmt werden. Bei beiden Isomeren waren die diastereotopen CH_2-Gruppen (CH_2(6A) und die Methylenbrücke) gut aufgelöst und lassen eine Differenzierung zu (Abbildung 2-10 und 2-11).

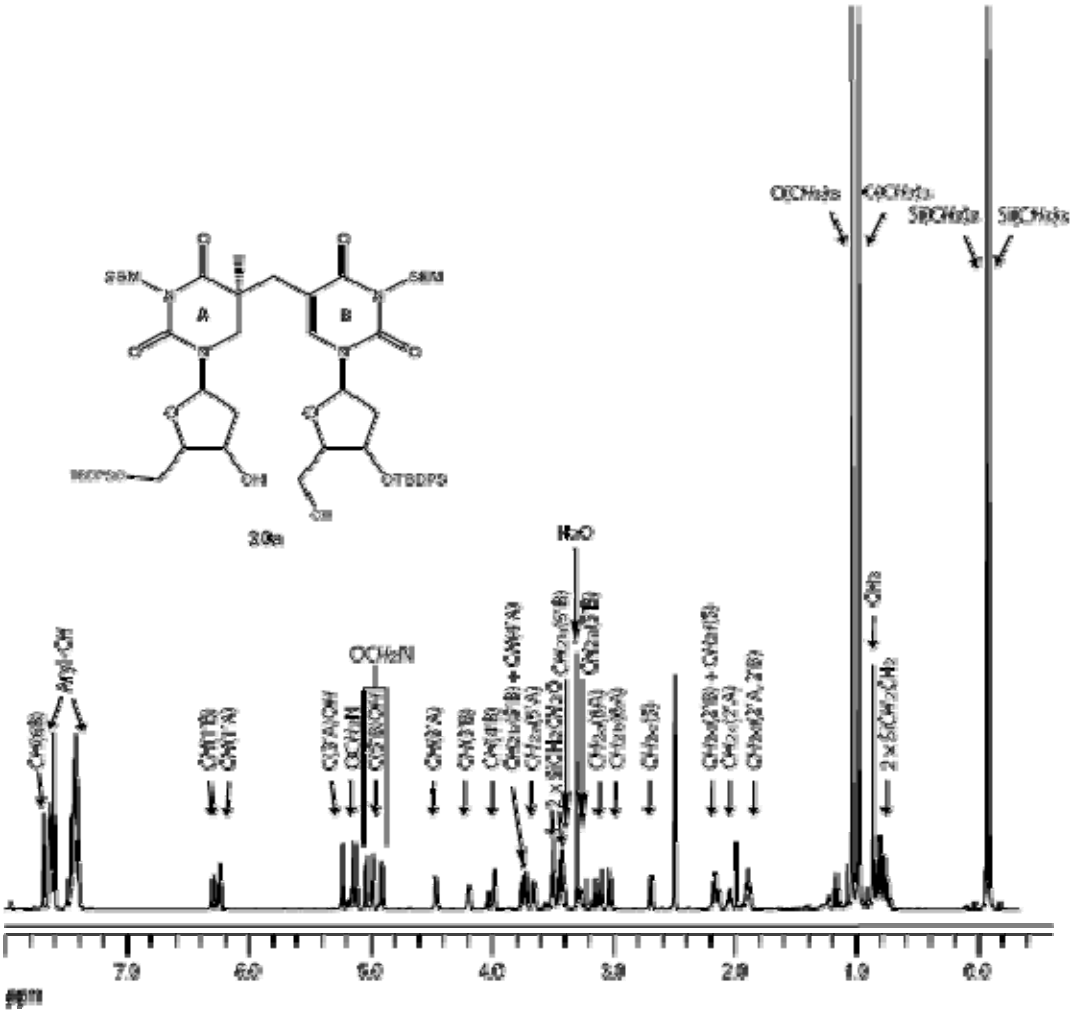


Abb. 2-10: ^{1}H-NMR-Spektrum von **30a** in DMSO-d_6 (600 MHz).

Zur Klärung der absoluten Konfiguration an C(5A) des jeweiligen Diastereomers wurden NOESY-Experimente durchgeführt. Diese führten meist zu keinem eindeutigen Ergebnis auf Grund der Flexibilität der Moleküle (freie Drehbarkeit der Zuckereinheiten um die glykosidischen Bindungen und um die Methylenbrücke). Die Beweglichkeit der Moleküle wurde jedoch durch die TBDPS-Schutzgruppen soweit eingeschränkt, dass eine vorläufige Aussage über die Stereochemie möglich ist. Bei der Zuordnung der Stereochemie wurde zunächst angenommen, dass die glykosidischen Bindungen in der *anti*-Konformation vorliegen.[184]

Durch Makrozyklisierung der Zucker ließe sich die Flexibilität der Zucker zudem weiter verringern und somit die Stereochemie eindeutig zuordnen. *Dr. M. Friedel* hat sich im Rahmen seiner Doktorarbeit intensiv mit der Zuordnung der Stereochemie am C(5A) eines SP-Analoga beschäftigt.[184] Er konnte bei seinen synthetisierten SP-Analoga mit offenem Rückgrat zunächst die Stereochemie nur vorläufige zuordnen. Anschließend gelang es ihm, dass jeweilige Rückgrat der Isomere über Ringschlussmetathese zu schließen. Durch die Makrozyklisierung war die Flexibilität des Moleküls stark

eingeschränkt. Die eindeutige NMR-spektroskopische Zuordnung der Stereochemie an C(5A) wurde somit möglich. Mit diesem Experiment konnte er zeigen, dass die vorläufige Zuordnung der Stereochemie trotz der Flexibilität der jeweiligen Isomere mit offenem Rückgrat zu demselben Ergebnis führt, wie diejenige mit geschlossenem Rückgrat.

Für die Bestimmung der Stereochemie mittels NMR müssen die diastereotopen Protonen an CH_2(6A) eindeutig den jeweiligen Dubletts im ^{1}H-NMR zugeordnet werden. Mit dieser Zuordnung lässt sich dann, über den Vergleich der NOESY-*crosspeaks* zur Methylgruppe an C(5A), bestimmen, ob die Methylgruppe nach hinten (*S*-Isomer) oder nach vorne (*R*-Isomer) steht. Die Zuordnung der Protonen an CH_2(6A) erfolgte über die NOESY-*crosspeaks* mit dem 1'-Proton und dem 2'-Proton des Zuckers, welches oberhalb der Zuckerebene liegt (H_c).

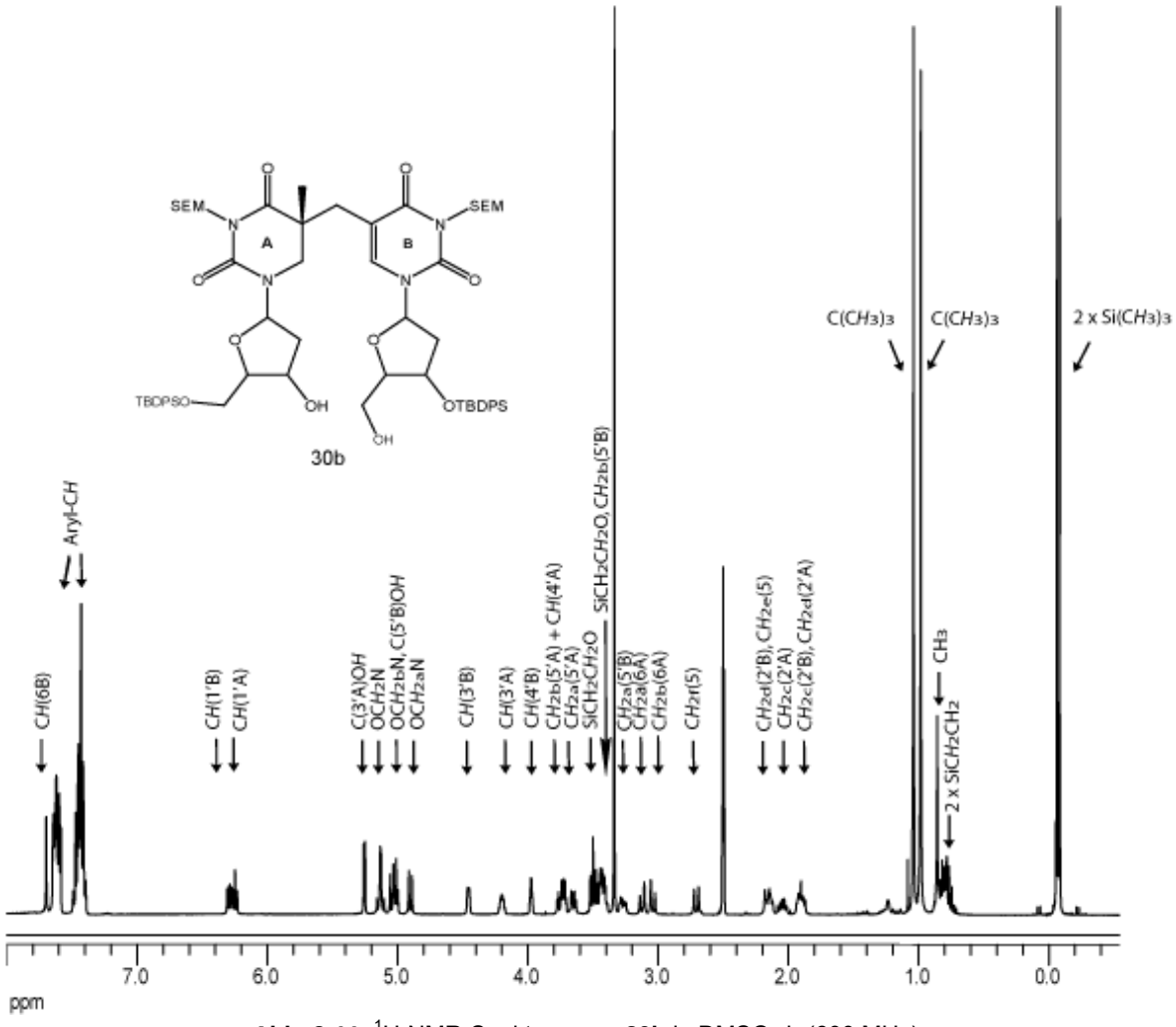
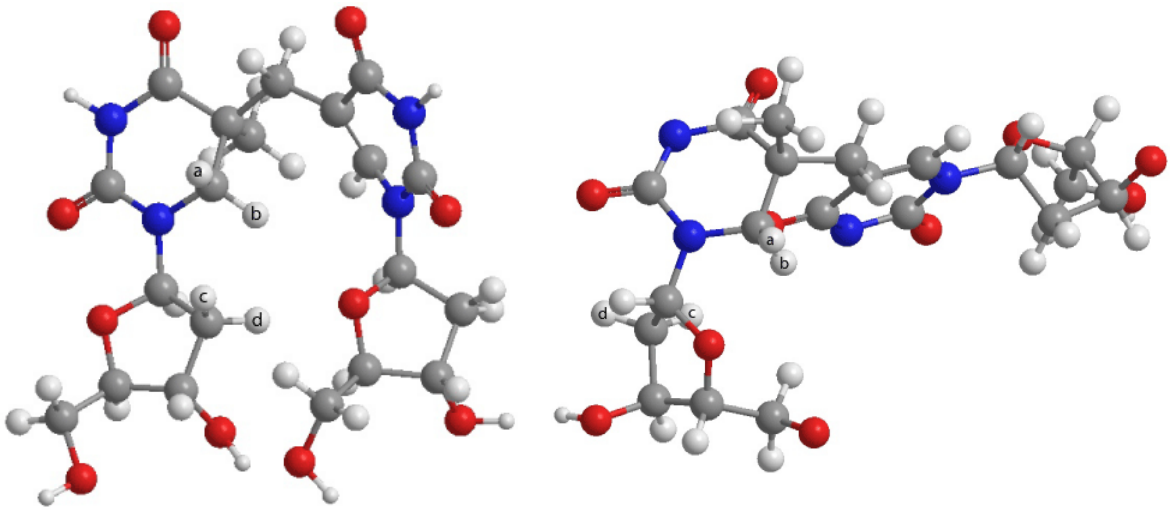


Abb. 2-11: ^{1}H-NMR-Spektrum von **30b** in DMSO-d_6 (600 MHz).

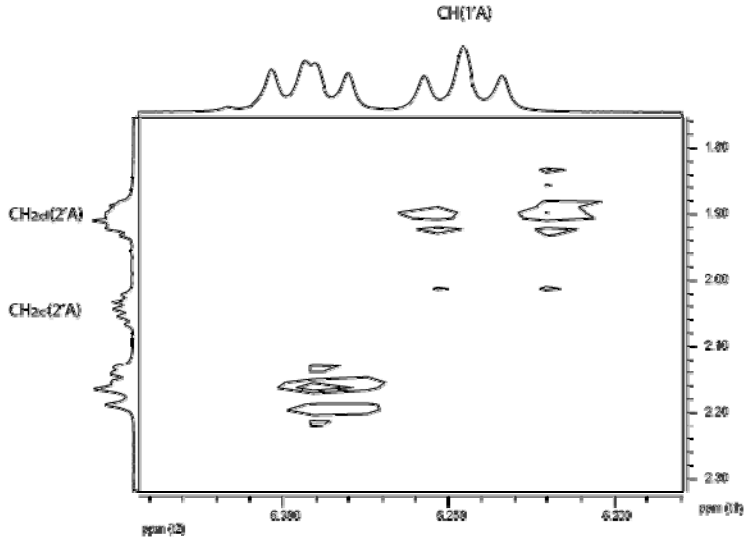
In Abbildung 2-12 sind die beiden Diastereomere **30a** und **30b** „dreidimensional" dargestellt. Der Übersicht halber wurden die Schutzgruppen gegen Wasserstoffe ausgetauscht.

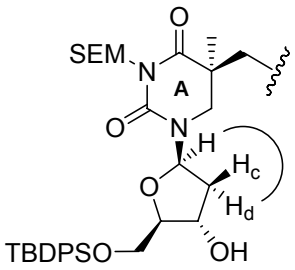


30a **30b**

Abb. 2-12: „Dreidimensionale“ Darstellung der beiden Diastereomere: **30a** in der *S*-Konfiguration, **30b** in der *R*-Konfiguration.

Betrachtet man im Fall vom Isomer **30a** das Wasserstoffatom CH(1’A)- und dessen Wechselwirkung mit den Protonen der CH_2(2’A)-Gruppe, so weißt nur das Proton bei 1.90 ppm (H_d) ein starkes Kreuzsignal auf (Abbildung 2-13).





30a

Abb. 2-13: NOESY-Kreuzsignal von Diastereomer **30a** in DMSO-d_6 (600 MHz) zwischen CH(1’A) und CH_2(2’A).

Zugleich existieren Kreuzsignale zwischen dem CH(1’A)-Proton und den Wasserstoffatomen H_a und H_b (Abbildung 2-14A). Zudem weißt das Proton H_c der CH_2(2’A)-Gruppe (2.04 ppm) starke NOE-Kontakte zur CH_2(6A)-Gruppe auf. Hier kann ein stärkerer *crosspeak* zum H_a (3.12 ppm) als zum H_b (3.04 ppm) der CH_2(6A)-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 2-14B). Entsprechend dem Signalmuster sollte H_a nach vorne und H_b nach hinten weisen.

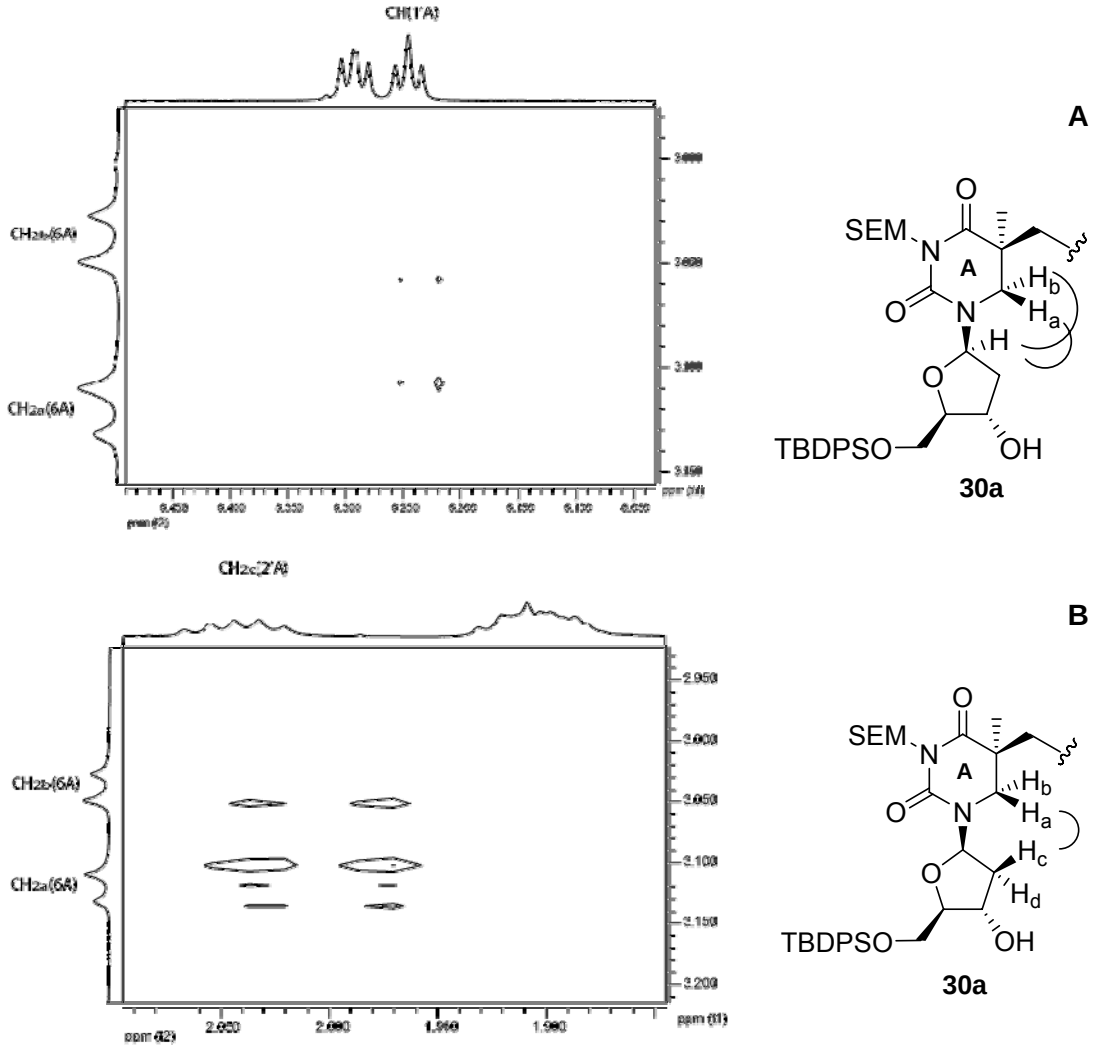


Abb. 2-14: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **30a** in DMSO-d_6 (600 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH(1'A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH_2(2'A).

Das Proton der CH_2(6A)-Gruppe, welches einen sehr viel schwächeren *crosspeak* zur 2'-Position besitzt (H_b-H_c), zeigt dagegen ein starkes Kreuzsignal zur Methylgruppe bei 0.87 ppm (Abbildung 2-15A). Dies legt nahe, dass die Methylgruppe auch nach hinten weist. Die räumliche Lage der Methylgruppe wird zudem über den *crosspeak* zur CH(1'A)-Gruppe weiter bestätigt (Abbildung 2-15B).

Insgesamt kann dieses Kreuzsignalmuster so gedeutet werden, dass das Diastereomer **30a** vermutlich in der *S*-Konfiguration vorliegt.

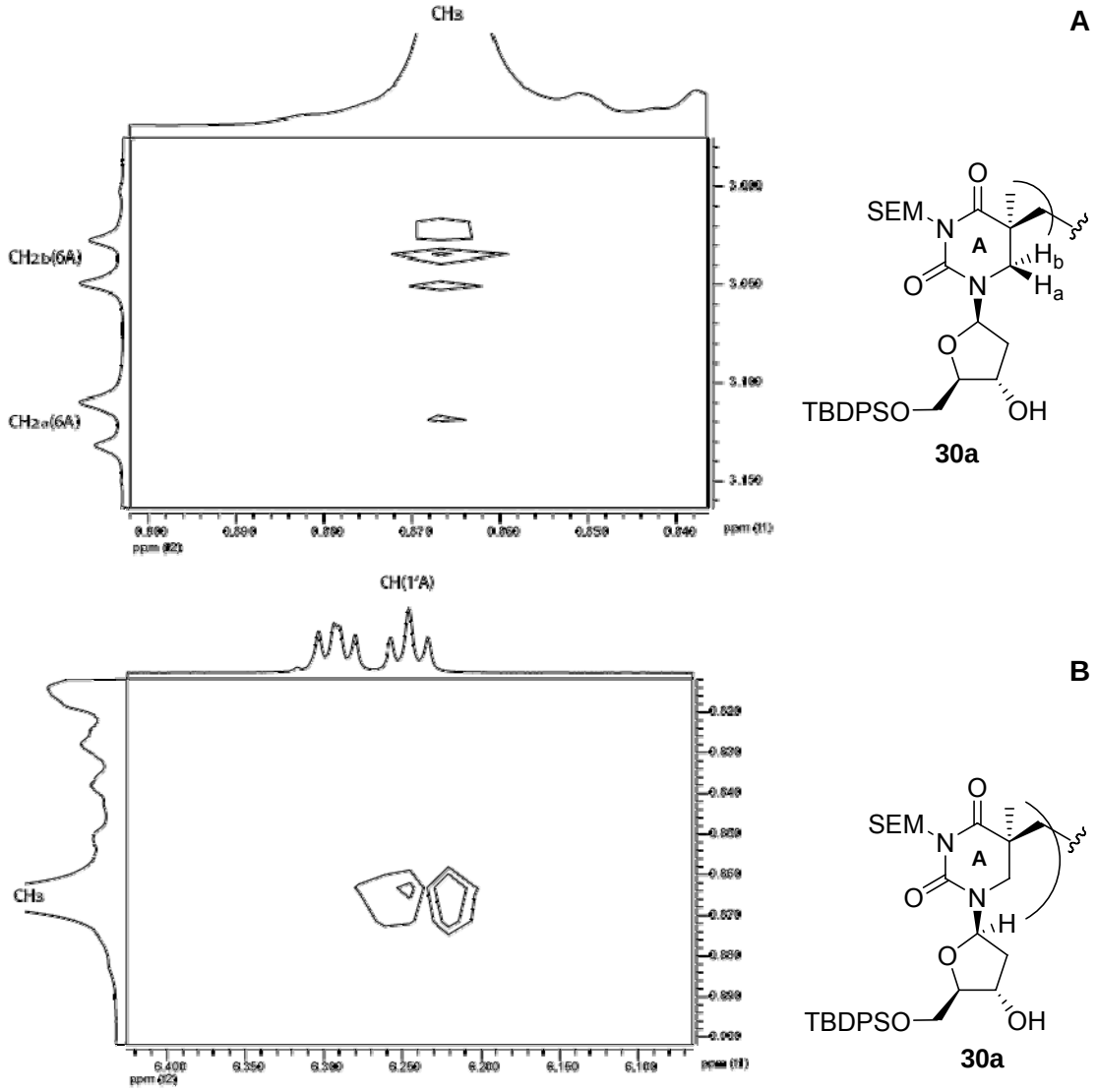


Abb. 2-15: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **30a** in DMSO-d_6 (600 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH_3 und CH_2(6A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_3 und CH(1'A).

Im Fall des Isomers **30b** besitzt die CH_2(6A)-Gruppe (H_a bei 3.12 ppm, H_b bei 3.03 ppm) NOE-Kontakte zum Proton H_c (2.04 ppm) der CH_2(2'A)-Gruppe, wobei der *crosspeak* zwischen H_c-H_a deutlich stärker ist als zwischen H_c-H_b (Abbildung 2-16A). Das Wasserstoffatom der CH(1'A)-Gruppe (6.24 ppm) zeigt ebenfalls NOE-Kontakte zur CH_2(6A)-Gruppe (Abbildung 2-16B). Hier ist jedoch kein Intensitätsunterschied zu sehen. Dies lässt sich vermutlich auf die Flexibilität des Moleküls zurückführen. Außerdem besteht ein ausgeprägtes Kreuzsignal zwischen der CH(3'A)-Gruppe bei 4.18 ppm und dem Proton H_a der CH_2(6A)-Gruppe (Abbildung 2-16C).

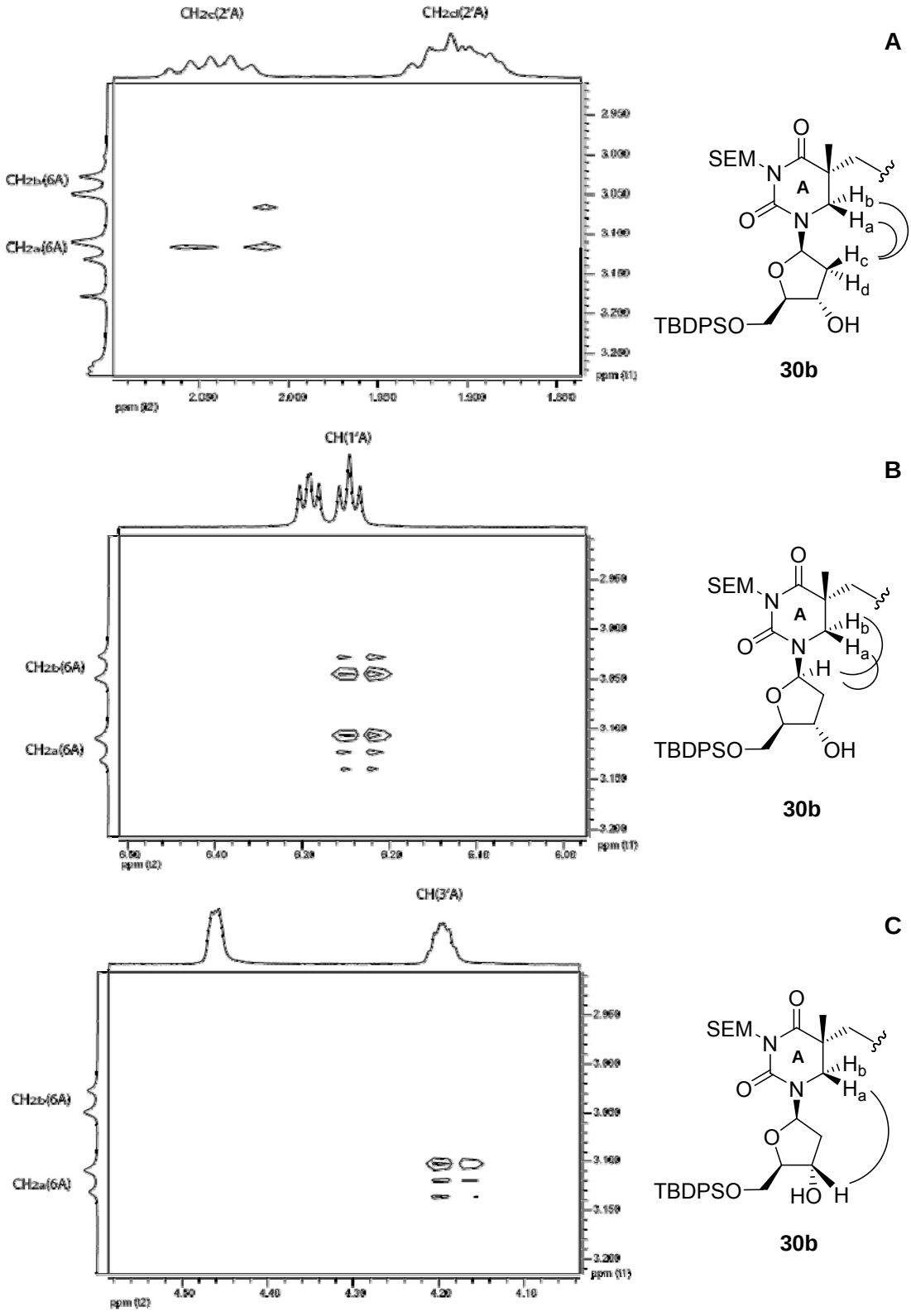


Abb. 2-16: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **30b** in DMSO-d_6 (600 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH_2(2'A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH(1'A). **C)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH(3'A).

Über die CH_2(6A)-Gruppe lässt sich nun die Lage der Methylgruppe (0.86 ppm) bestimmen. Hier zeigt das nach vorne weisende Proton H_a ein deutlich stärkeres Kreuzsignal (Abbildung 2-17A). Dies legt nahe, dass die Methylgruppe auch nach vorne zeigt. Durch den fehlenden NOE-Kontakt zwischen der CH(1'A)-Gruppe und der Methylgruppe kann diese Vermutung bestätigt werden (Abbildung 2-17B). Insgesamt lässt sich somit sagen, dass es sich im Falle des Isomers **30b** vermutlich um die *R*-Konfiguration handelt.

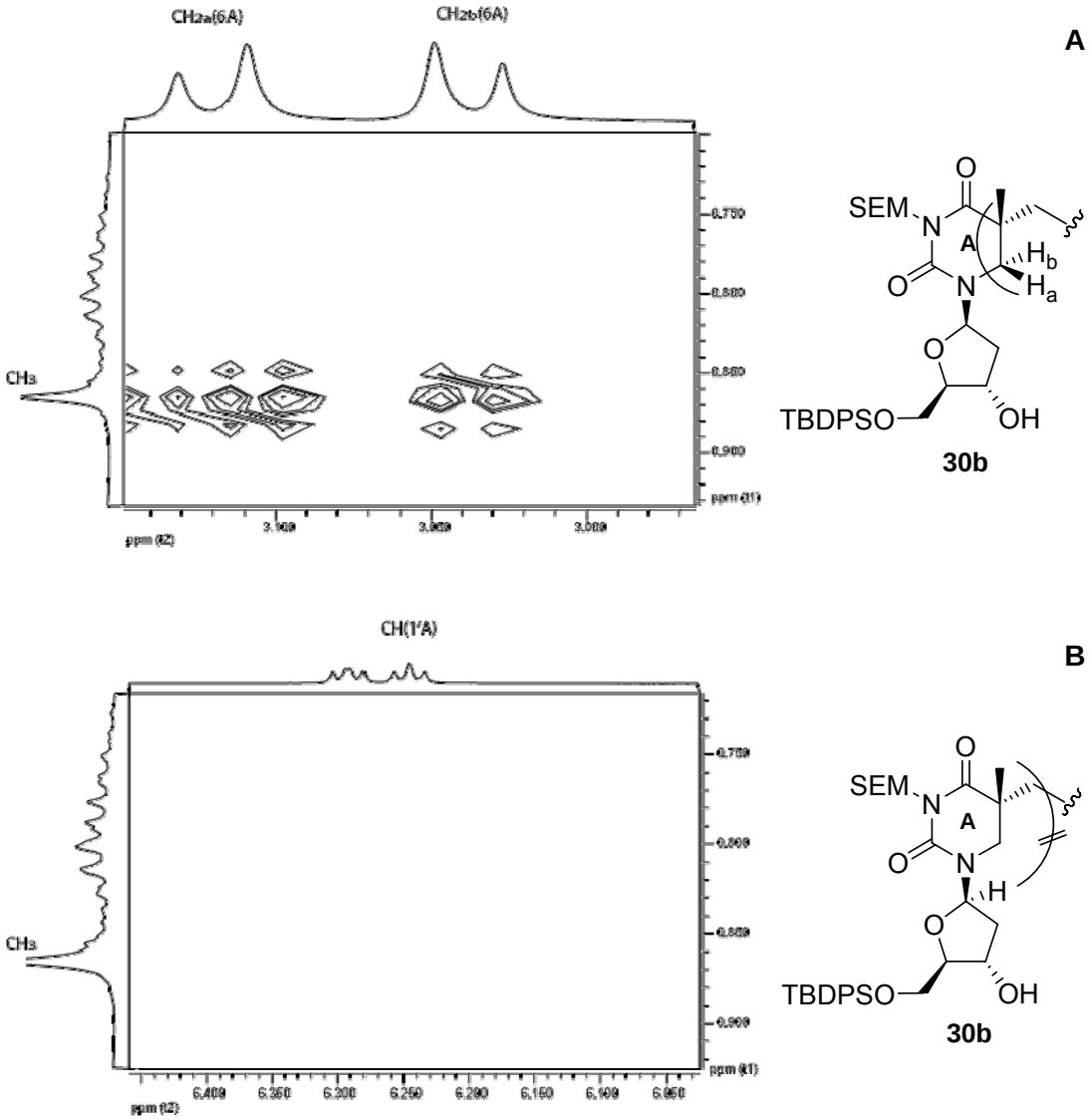


Abb. 2-17: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **30b** in DMSO-d_6 (600 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH_3 und CH_2(6A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_3 und CH(1'A).

2.3 Synthese des Sporenphotoproduktes 19a/b zum Einbau in DNA

2.3.1 Retrosynthese

Die Retrosynthese der Diastereomere **19a/b** erfolgt analog zu **18a/b** (Abbildung 2-18).

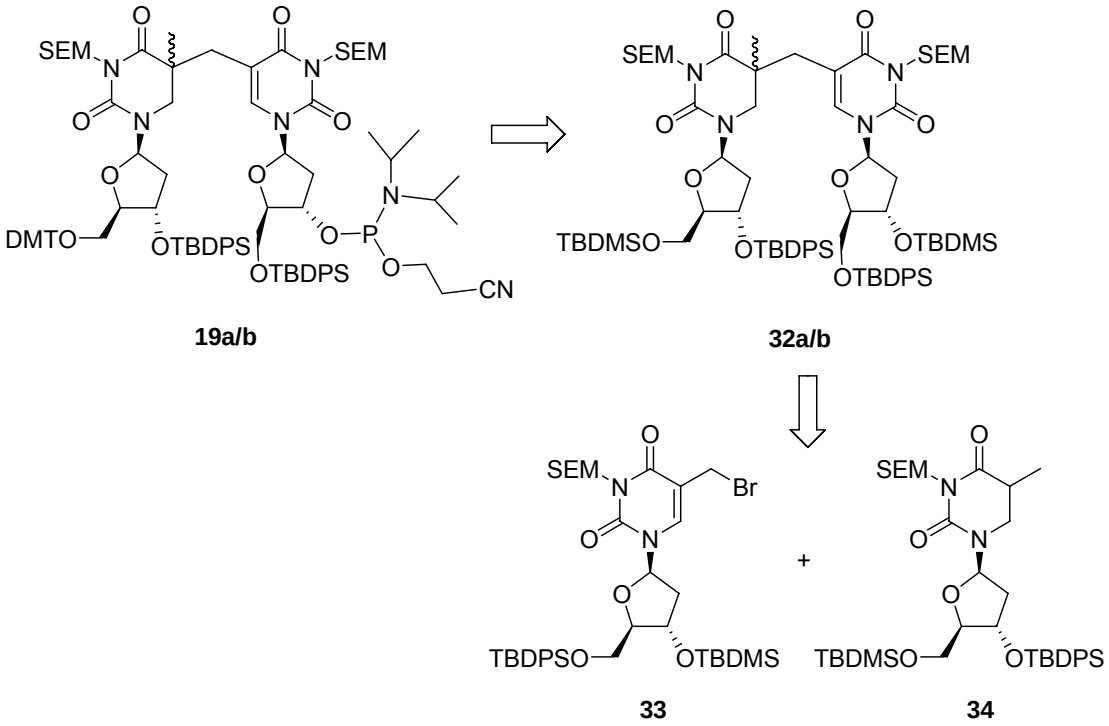


Abb. 2-18: Retrosynthetische Betrachtung der Sporenphotoprodukt-analogen Phosphoramiditbausteine **19a/b**.

2.3.2 Synthese der Dihydrothymidineinheit 34

Der geschützte Dihydrothymidinbaustein **34** wurde wiederum in 4 bzw. 5 Schritten aus Thymidin **1** dargestellt (Abbildung 2-19). Analog zu **18a/b** wurde im ersten Schritt das Thymidin **1** mit H_2 und Rhodium auf Aluminiumoxid (5% Rh) unter Normaldruck zu **35** hydriert. Nach Abtrennung des Katalysators und azeotroper Entfernung der Wasserreste wurde die 5'-Hydroxygruppe mit TBDMSCl in Gegenwart von Imidazol in DMF bei Raumtemperatur in 3.5 h zu **36** in 86% Ausbeute in Bezug auf **1** silyliert.[190]

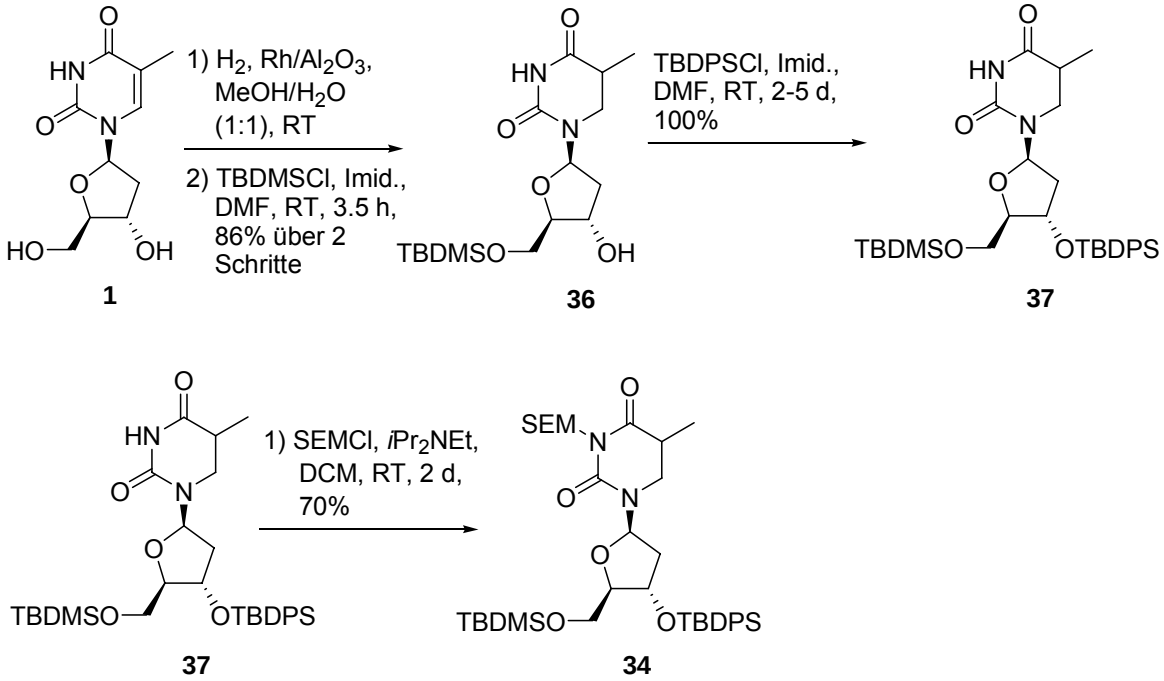


Abb. 2-19: Synthese des *N*-SEM-5'-TBDPS-3'-TES-5,6-Dihydrothymidins **34**.

Nach der Schützung der 3'-OH-Gruppe zu **37** mit TBDPSCl und Imidazol in DMF über mehrere Tage bei Raumtemperatur mit einer quantitativen Ausbeute wurde die N^3-Position in einem letzten Schritt mit SEMCl und Hünig-Base in DCM bei Raumtemperatur in 2 Tagen mit 70% Ausbeute geschützt **34**.[151] Aufgrund der Licht- und Hydrolyseempfindlichkeit des SEMCl wurde dieses erneut portionsweise zugegeben.

2.3.3 Synthese des Allylbromids 33

Das vollständig geschützte Monomer **33** wurde in einer fünfstufigen Synthese aus Thymidin **1** dargestellt (Abbildung 2-20). Die Hydroxygruppe des Thymidins **1** wurden analog einer Vorschrift von *C. Dauth*[177] zunächst doppelt mit TBDMSCl und Imidazol in DMF bei Raumtemperatur über Nacht mit 97% Ausbeute zu **39** geschützt, anschließend wurde die 5'-TBDMS-Schutzgruppe selektiv mit TFA bei 0 °C für 7 h mit 77% Ausbeute zu **40** entschützt. Die 5'-Hydroxygruppe wurde nun mit TBDPSCl und Imidazol in DMF bei Raumtemperatur über Nacht in 99% Ausbeute zu **41** geschützt. Durch dieses Verfahren sollten höhere Selektivitäten und somit Ausbeuten bei der Schützung erzielt werden können. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Aus der SEM-Schützung der Imidfunktion von **41** ging **42** in einer Ausbeute von 70% hervor.[183] Die Bromierung erfolgte an **42** mit NBS und Dibenzoylperoxid in Tetrachlorkohlenstoff in 30 min bei 70 °C mit 64% Ausbeute **33**. Das gebildete hydrolyse- und luftempfindliche Allylbromid konnte unter N_2-Atmosphäre bei -20 °C gelagert werden.

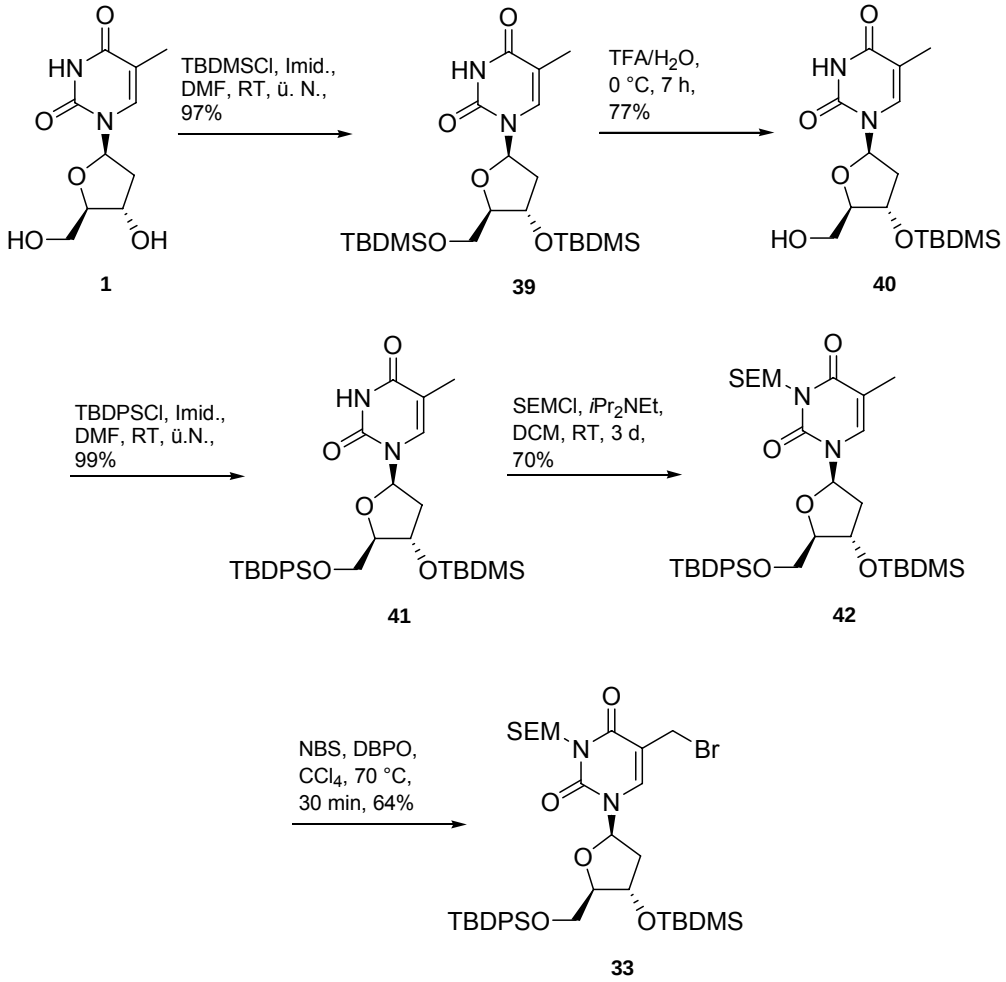


Abb. 2-20: Synthese des *N*-SEM-5'-TBDMS-3'-TBDPS-5-Bromomethyl-desoxyuridins **33**.

2.3.4 Kupplung zum Dimer und Synthese der Phosphoramidite 19a/b

Für die Kupplung (Abbildung 2-21) der beiden Bausteine **33** und **34** wurde wie bei **18a/b** zunächst **34** mit LDA bei -78 °C für 2 h enolisiert. Anschließend wurde **33** bei -78 °C zugegeben und die Reaktion für 1.5 h bei -78 °C, dann für 3 h bei 0 °C gerührt.[151] Das Diastereomerengemisch **32a/b** wurde mit 25% Ausbeute erhalten. Die schlechte Ausbeute könnte in der veränderten sterischen Anordnung begründet liegen. Anschließend wurde mit pTsOH die TBDMS-Schutzgruppen in MeOH bei 50 °C in 2 h selektiv entschützt[186-188] und das Diastereomerengemisch **43a/b** in 78% Ausbeute erhalten. Bei der analogen Versuchsdurchführung wie bei **18a/b** konnte keine vollständige Entschützung erzielt werden. Auf dieser Stufe wurde wiederum die Trennung der Diastereomeren **43a/b** mittels *np*-HPLC unter denselben Bedingungen wie bei **30a/b** durchgeführt. Die Zuordnung der Stereochemie wird unter 2.3.5 ausführlich besprochen.
Die getrennten Isomere **43a/b** wurden nun mit DMTOTf **38** in Pyridin bei Raumtemperatur in 5 h mit guten Ausbeuten (für **44a**: 100%, für **44b**: 84%) dimethoxytrityl-geschützt. Für

die abschließende Phosphitylierung von **44a/b** wurde CEDCl verwendet, welches mit Hünig-Base zuvor aktiviert wurde. Die Reaktion verlief in THF zunächst bei 0 °C, dann bei Raumtemperatur in 5 h. Da sowohl das eingesetzte Reagenz, als auch die entstehenden Phosphoramidite **19a/b** extrem sauerstoffempfindlich waren, wurden alle Lösungsmittel entgast und die Reaktion zügig aufgearbeitet. Es konnte jedoch nur im Falle von **44b** das Phosphoramidit **19b** mit 44% Ausbeute erhalten werden. Im Falle von **44a** oxidierte der Baustein aufgrund der geringen Substanzmenge vollständig zum Amidat.

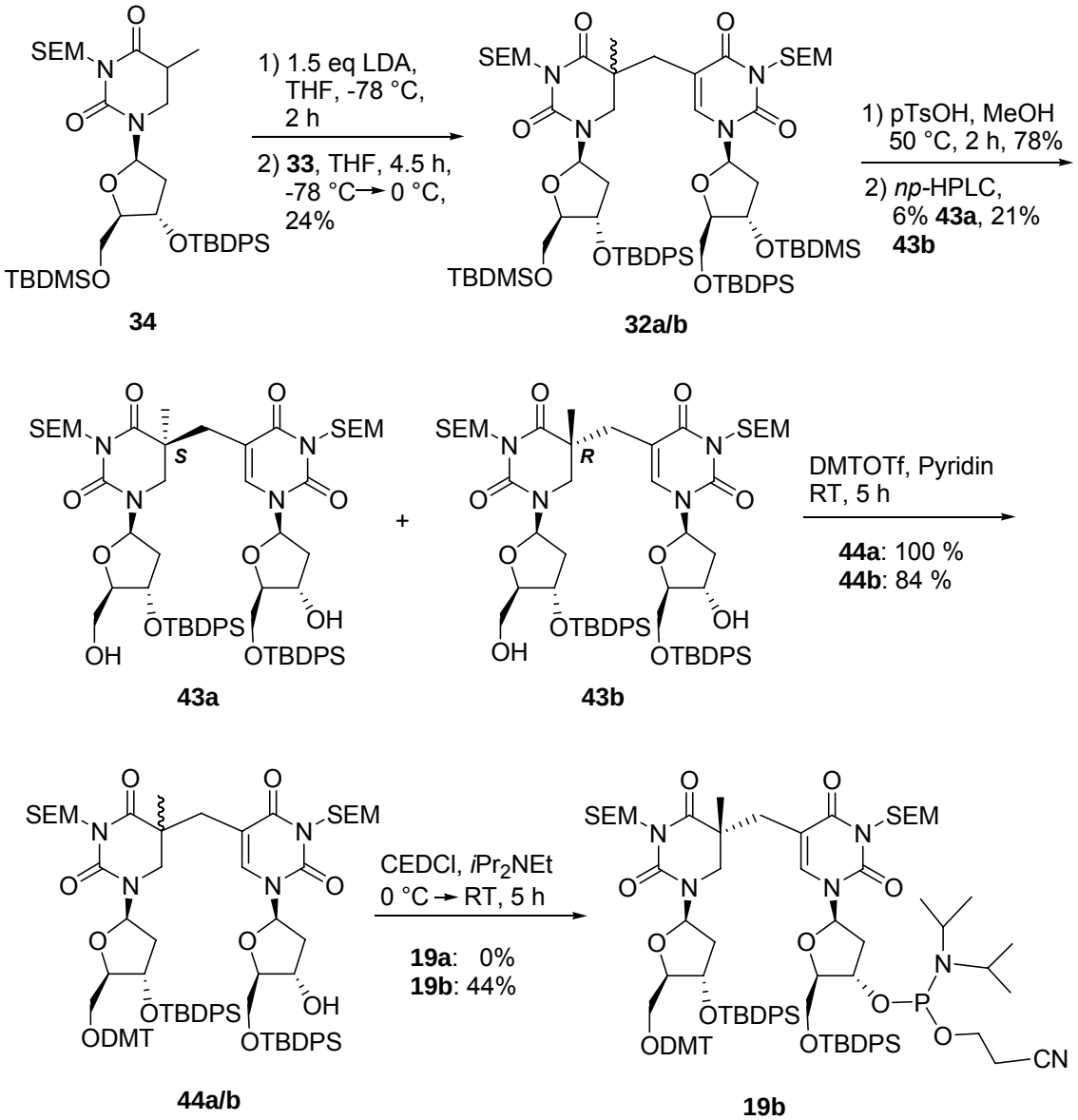


Abb. 2-21: Kupplung der Bausteine **33** und **34**, Trennung der Diastereomere zu **43a** und **43b** und Phosphoramiditsynthese der Isomere.

2.3.5 Aufklärung der Konfiguration an C5

In Abbildung 2-22 und 2-23 sind die ^{1}H-NMR-Spektren (400 MHz) der beiden möglichen Diastereomerenpaare gezeigt. Die Zuordnung der Signale erfolgte wie unter 2.2.5 durch 2D-NMR-Experimente (COSY, NOESY, HMBC, HMQC). In beiden Fällen sind die diastereotopen CH_2-Gruppen (CH_2(6A) und die Methylenbrücke) gut aufgelöst und lassen eine Differenzierung zu.

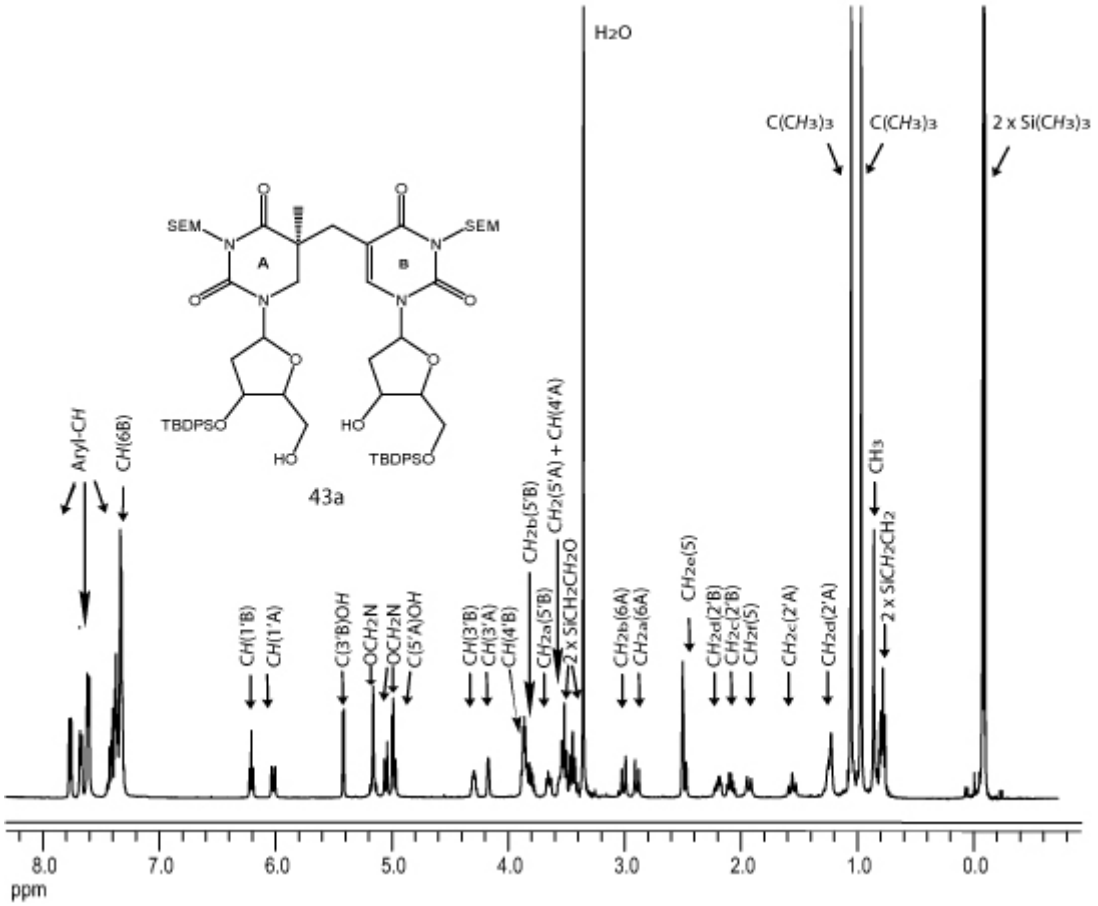


Abbildung 2-22: ^{1}H-NMR-Spektrum von **43a** in DMSO-d_6 (400 MHz).

Zur Klärung der absoluten Konfiguration an C5 der jeweiligen Diastereomeren wurden wiederum NOESY-Experimente durchgeführt. Bei der Zuordnung der Stereochemie wurde erneut angenommen, dass die glykosidischen Bindungen in der *anti*-Konformation vorliegen.

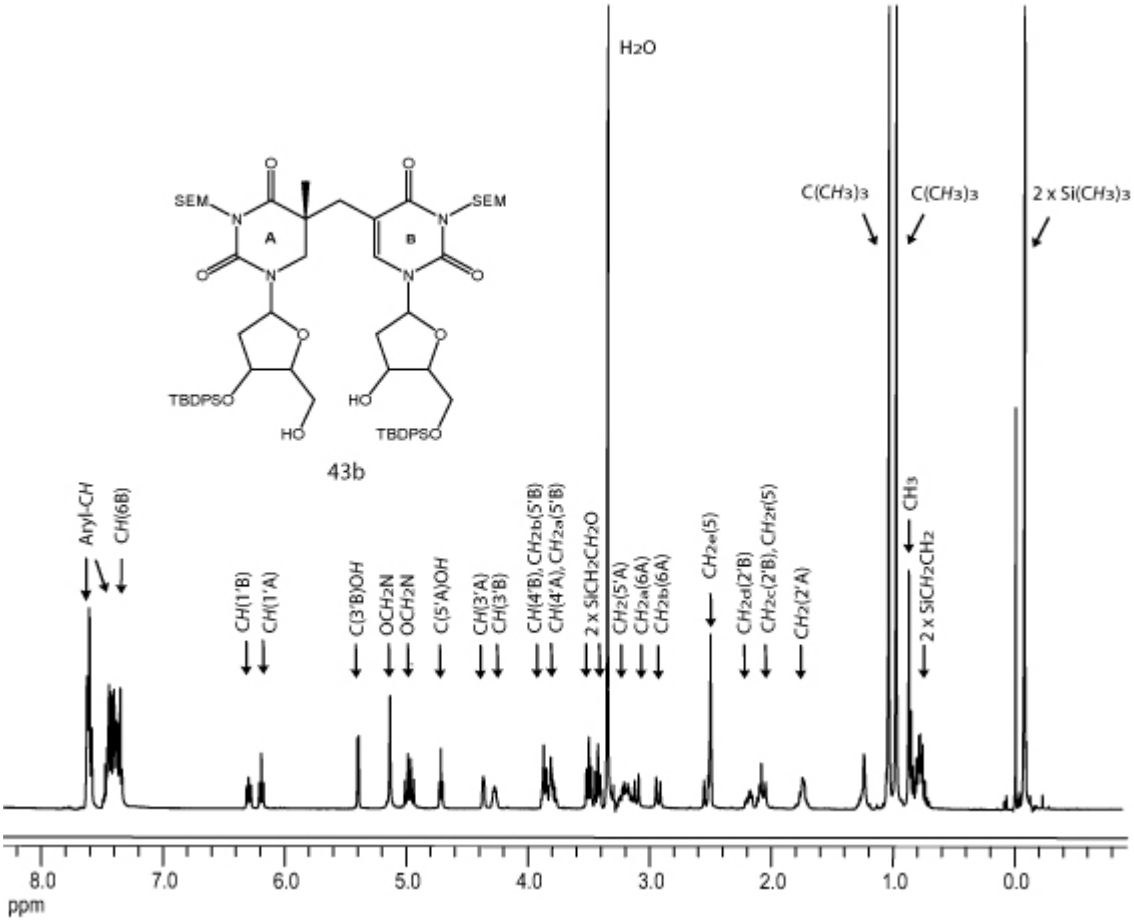
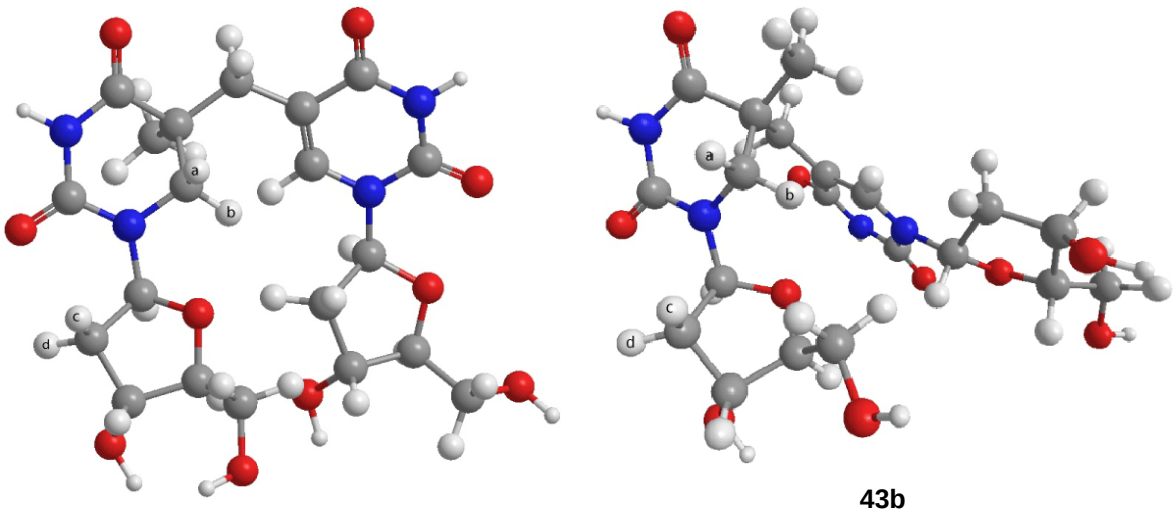


Abbildung 2-23: ^{1}H-NMR-Spektrum von **43b** in DMSO-d_6 (400 MHz).

In Abbildung 2-24 sind die beiden Diastereomere **43a** und **43b** dreidimensional dargestellt. Aus Übersichtsgründen wurden erneut die Schutzgruppen gegen Wasserstoffe ausgetauscht.



43a **43b**

Abb. 2-24: „Dreidimensionale“ Darstellung der beiden Diastereomere: **43a** in der *S*-Konfiguration, **43b** in der *R*-Konfiguration.

Im Falle vom Isomer **43a** besitzt nur das Proton bei 1.23 ppm (H_d) der CH_2(2'A)-Gruppe ein starkes Kreuzsignal mit dem CH(1'A)-Proton bei 5.99 ppm (Abbildung 2-25A). Zugleich weißt das Proton H_c (1.56 ppm) der CH_2(2'A)-Gruppe starke NOE-Kontakte mit der CH_2(6A)-Gruppe auf. Hier kann ein etwas stärkerer *crosspeak* zum H_a (2.91 ppm) als zum H_b (2.99 ppm) der CH_2(6A)-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 2-25B).

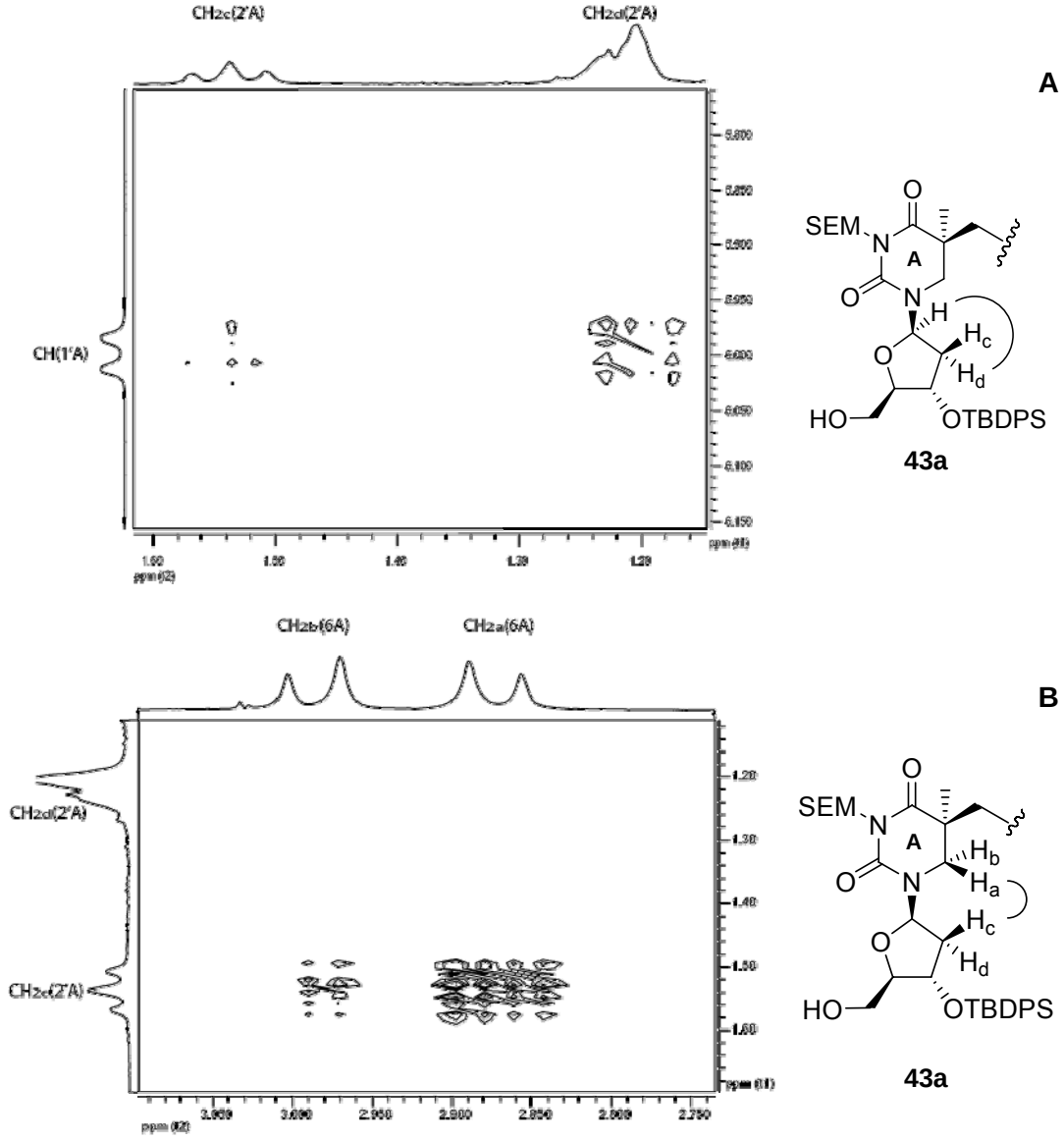


Abbildung 2-25: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **43a** in DMSO-d_6 (400 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH(1'A) und CH_2(2'A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_2(2'A) und CH_2(6A).

Zudem existiert ein ausgeprägtes Kreuzsignal zwischen der CH(1'A)-Gruppe und dem Wasserstoffatom H_b (Abbildung 2-26A). Das Proton H_b zeigt somit nach hinten und H_a nach vorne. Das Proton H_b der CH_2(6A)-Gruppe weist auch einen *crosspeak* zur Methylgruppe (0.84 ppm) auf (Abbildung 2-26B), womit diese auch nach hinten zeigen würde.

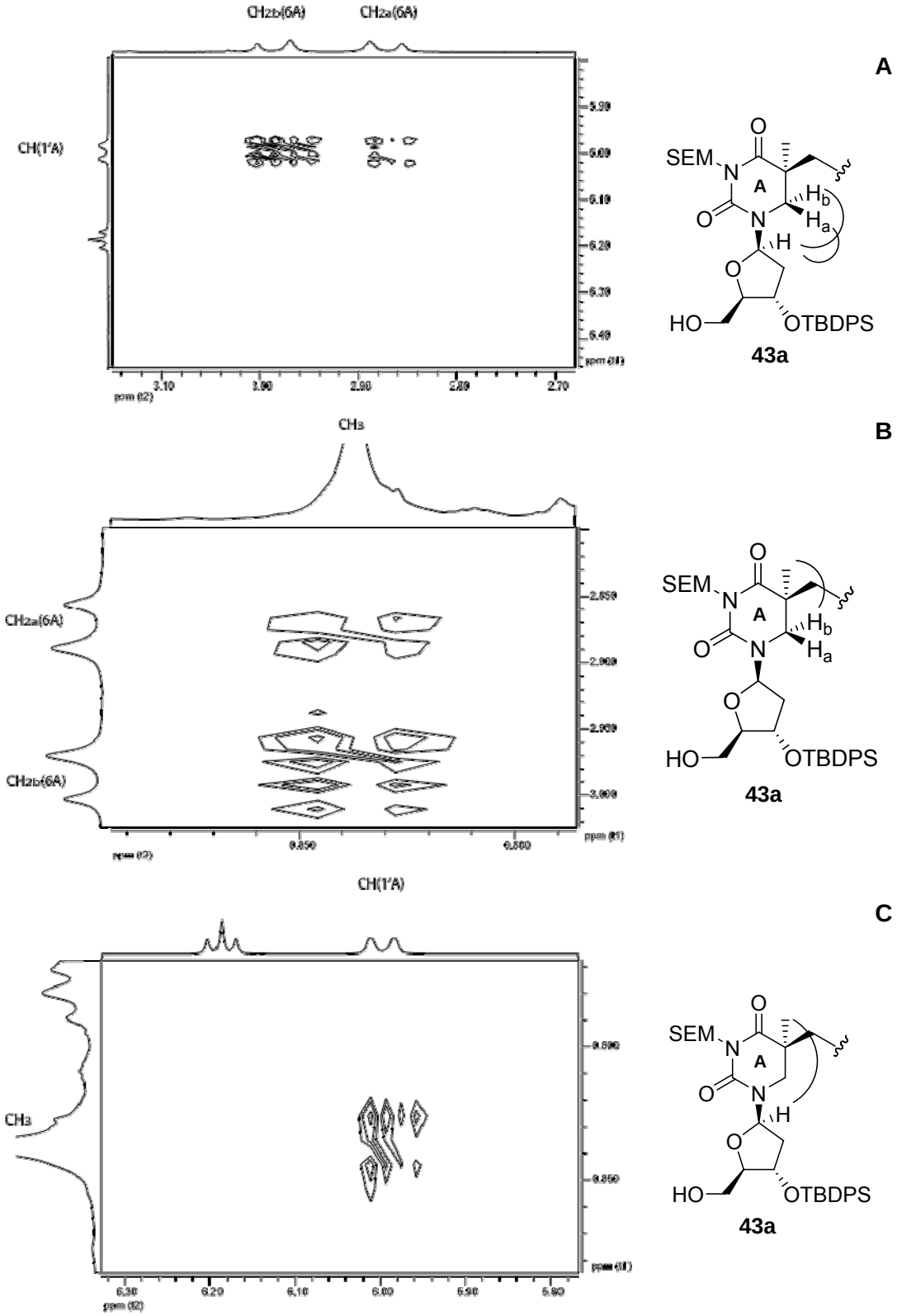


Abbildung 2-26: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **43a** in DMSO-d_6 (400 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH(1'A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH_3. **C)** Kreuzsignal zwischen CH(1'A) und CH_3.

Dies wird durch den NOE-Kontakt zwischen der Methylgruppe und dem CH(1'A) bestätigt (Abbildung 2-26C). Es handelt sich beim Diastereomer **43a** deshalb vermutlich um das *S*-Isomer.

Im Fall des Isomers **43b** hat das Proton der CH(1'A)-Gruppe (6.15 ppm) mit beiden Wasserstoffatomen der CH_2(6A)-Gruppe NOE-Kontakte (Abbildung 2-27A). Allerdings zeigt hauptsächlich das H_a (3.09 ppm) *crosspeaks* zur CH_2(2'A)-Gruppe bei 1.70 ppm (Abbildung 2-27B) und zum Proton der CH(3'A)-Gruppe bei 4.34 ppm (Abbildung 2-28A). Es lässt sich somit sagen, dass H_a nach vorne und H_b nach hinten weisen.

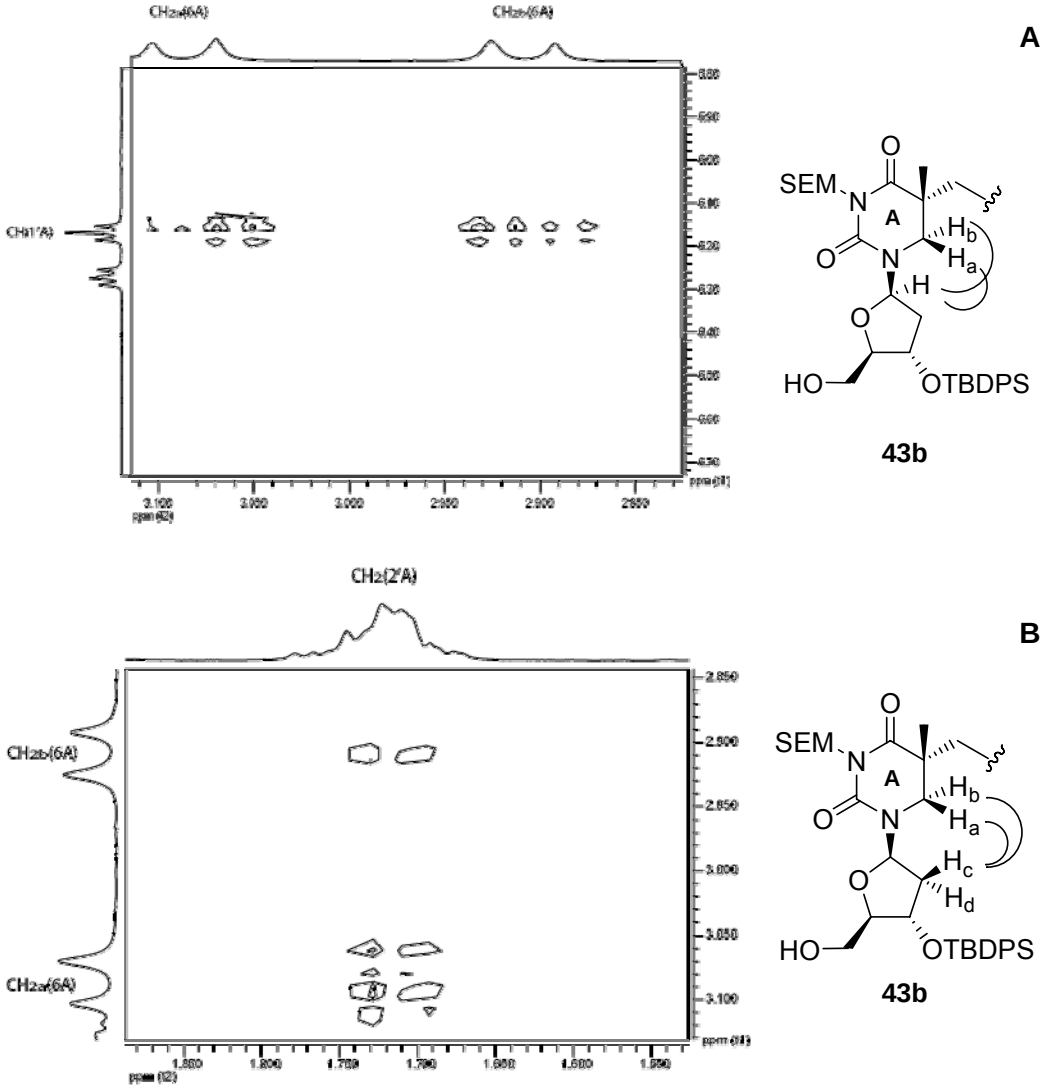


Abbildung 2-27: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **43b** in DMSO-d_6 (400 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH(1'A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH_2(2'A).

Die Methylgruppe besitzt einen deutlich stärkeren *crosspeak* zum Proton H_a als zum Proton H_b (Abbildung 2-28B). Dies legt nahe, dass die Methylgruppe nach hinten zeigt.

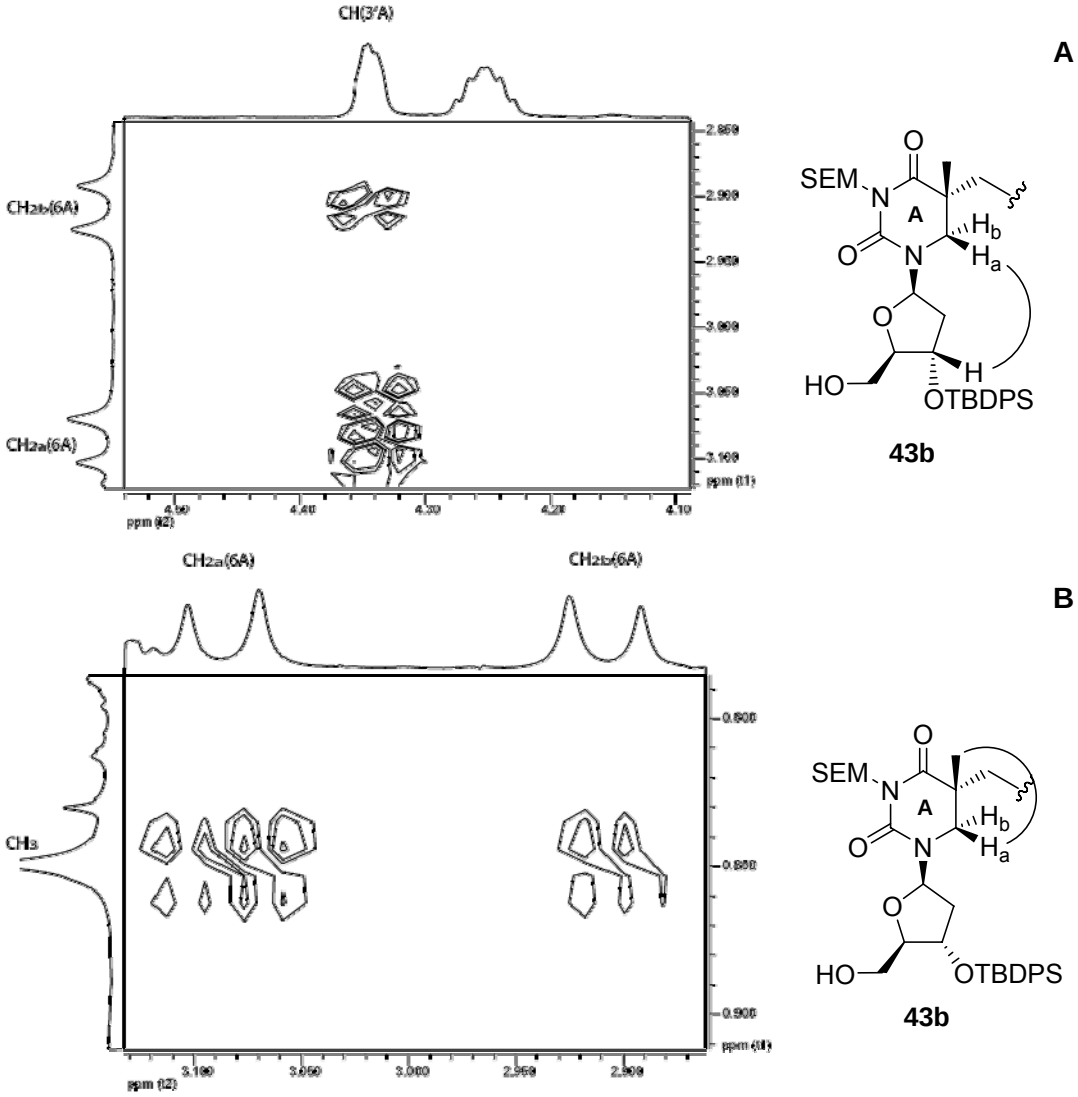


Abbildung 2-28: NOESY-Kreuzsignale von Diastereomer **43b** in DMSO-d_6 (400 MHz). **A)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH(3'A). **B)** Kreuzsignal zwischen CH_2(6A) und CH_3.

Diese Vermutung wird durch den fehlenden NOE-Kontakt zwischen der Methylgruppe und dem CH(1'A)-Proton bestätigt (Abbildung 2-29). Insgesamt lässt sich somit sagen, dass es sich im Falle des Isomers **43b** vermutlich um das mit *R*-Konfiguration handelt.

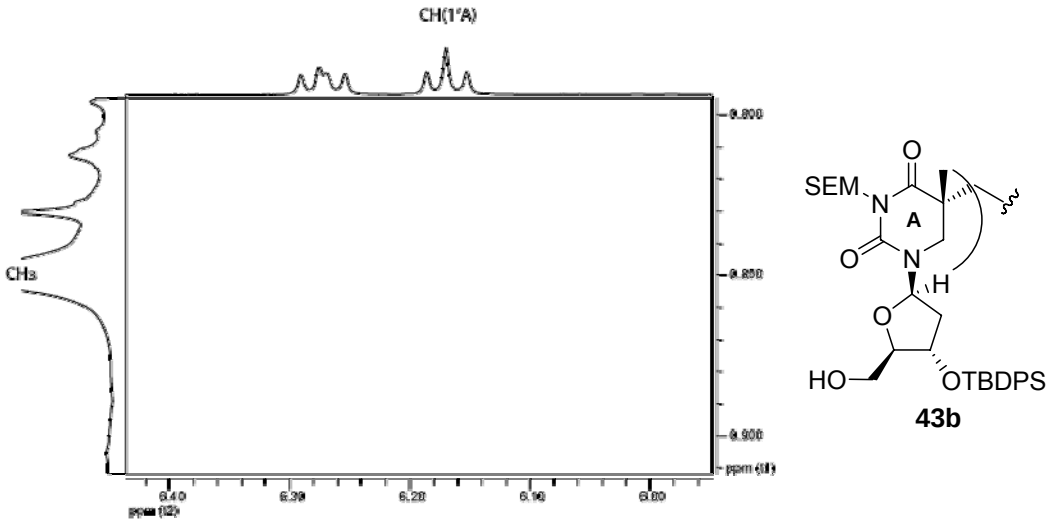


Abbildung 2-29: NOESY-Kreuzsignal von Diastereomer **43b** in DMSO-d_6 (400 MHz). zwischen CH(1'A) und CH_3.

2.4 DNA-Festphasensynthese

Zur Untersuchung der speziellen Eigenschaften von DNA-Schäden ist es wichtig, diese Schäden zum einen stereochemisch einheitlich und zum anderen in einer definierten Sequenz in Oligonukleotide zu inkorporieren. Der Einbau von natürlichen oder modifizierten Nukleotiden lässt sich mit unterschiedlichen Methoden, wie der *H*-Phosphonat-Chemie[191] oder der Phosphoramidit-Chemie[192] mit Hilfe eines DNA-Synthesizers durchführen. Welche Methodik dabei zum Einsatz kommt, ist von der einzubauenden, modifizierten Base abhängig. Im Falle des SP wurde die Phosphoramidit-Methode verwendet.

Die Festphasensynthese erfolgt für gewöhnlich entgegengesetzt der natürlichen *in vivo* Synthese in 3'→5'-Richtung an einen basenbeladene CPG-Träger. An diesen ist die erste Base durch einen basenlabilen *Linker* an das Glas gebunden. Die Desoxyriboseeinheit der Basen besitzt an der 5'-OH-Gruppe eine säurelabile Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT) und an der 3'-OH-Gruppe eine *N,N*-Di-*iso*propyl-cyanoethylphosphoramidit-Gruppe (CED). Die Basen sind ebenfalls geschützt (Abbildung 2-30).

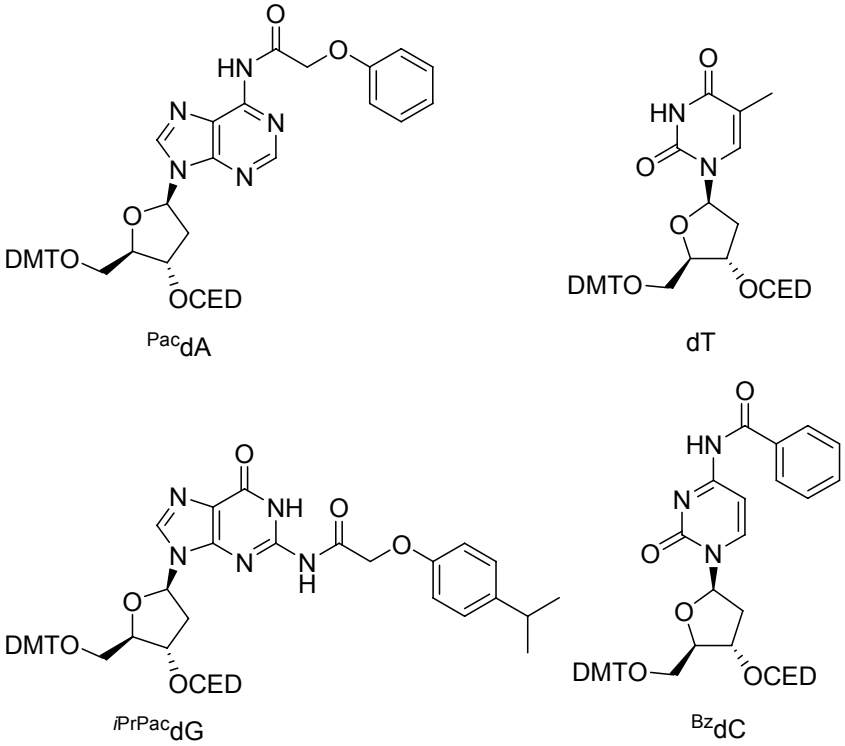


Abb. 2-30: Für die DNA-Synthese verwendete, geschützte Nukleotide.

Die DNA-Synthese wurde im 1 µmol-Maßstab an einem Expedite-DNA-Synthesizer durchgeführt. Für die Kupplung der kommerziell erhältlichen Nukleotide wurden die vom Gerätehersteller vorgeschlagenen Standardprotokolle verwendet. Die DNA-Synthese verläuft dabei in einem Zyklus, der sich in vier Schritte aufteilen lässt (Abbildung 2-31). Im ersten Schritt erfolgt die Abspaltung der DMT-Schutzgruppe mit einer 3%igen Dichloressigsäure in Dichlormethan (Standardentschützungszeit: 49 s). Im zweiten Schritt kuppelt die freie 5'-OH-Gruppe mit dem hinzukommenden, mit 5-Benzylthiotetrazol aktivierten, Phosphoramidit (Standardkupplungszeit: 96 s). Um die Ausbeute zu verbessern, wurden die Kupplungszeiten hierbei für das SP wegen des sterischen Anspruchs und der darauffolgenden Base erhöht (zweimal je 10 min für die Sonderbase, 5 min für die darauffolgende Base). Im dritten Schritt werden die nicht elongierten Oligonukleotide durch Veresterung mit Phenoxyessigsäureanhydrid (PAC) für die nachfolgende Kupplung blockiert (*Capping*). Im vierten Schritt wird die entstandene Phosphor(III)-Spezies (Phosphit) unter Verwendung einer wässrigen Iod-Lösung zum Phosphor(V)säuretriester oxidiert. Nach Abschluss des vierten Syntheseschrittes kann der Zyklus entweder wiederholt oder die Synthese beendet werden. Am Ende der Synthese kann zudem entweder die DMT-Schutzgruppe der letzten Base abgespalten oder, speziell für längere Oligonukleotide, behalten werden, um die Aufreinigung mittels HPLC zu

erleichtern. Im Falle der SP-geschädigten Oligonukleotide wurde die DMT-Schutzgruppe abgespalten.

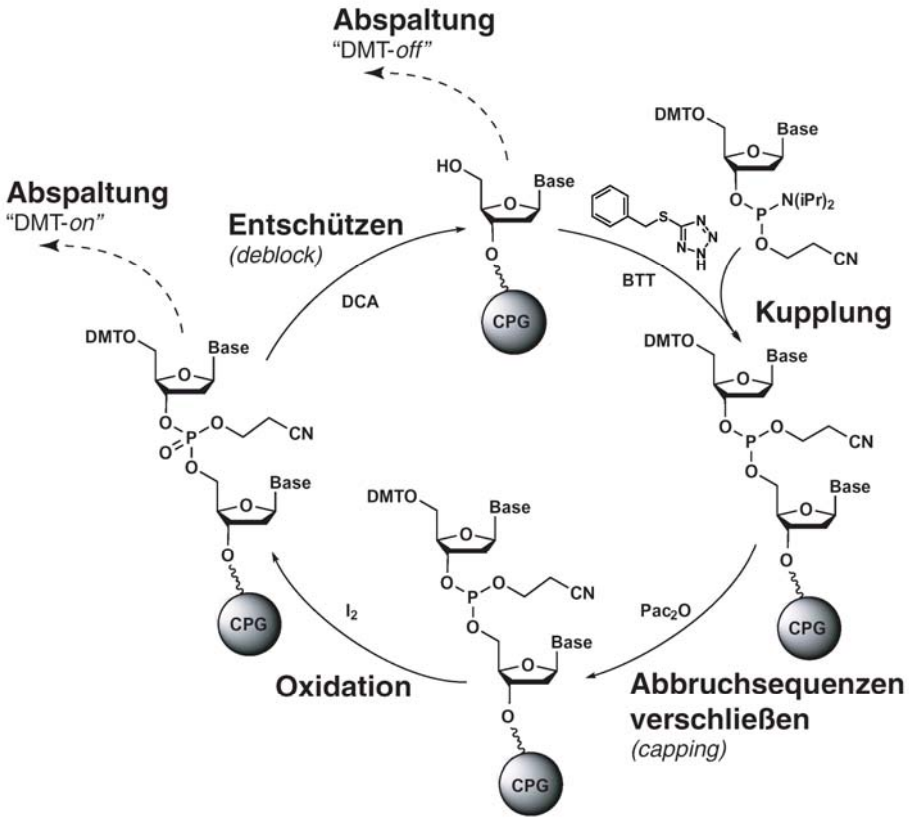


Abb. 2-31: Synthesezyklus in der Phosphoramiditchemie.[199]

Nach erfolgreicher DNA-Synthese musste eine Methode zur Entschützung des SP-analogen Dimers gefunden werden. Standardentschützungsbedingungen für die SEM-Schutzgruppe wie Fluoride (TFA,[193] TBAF,[194] HF*Pyr[195]) waren ebenso wenig erfolgreich wie Basen (NaOH oder NaOMe[196]) oder Säuren.[197, 198] Die einzige erfolgreich Methode war die Entschützung mit 1 M Zinntetrachlorid-Lösung in DCM.[151] Zur besseren Aufarbeitung wurde die SEM-Schutzgruppe noch an der Festphase zunächst bei -20 °C für 2 h, dann bei -4 °C für 1 h entfernt (Abbildung 2-32).

Abb. 2-32: Versuchsaufbau zur Abspaltung der SEM-Schutzgruppen an der Festphase.

Es folgte die Abspaltung vom CPG-Träger und die Entfernung der permanenten Schutzgruppen von den Basen und dem Phosphat mit wässrigen Ammoniak/Ethanol 3:1 über Nacht bei 25 °C. Im letzten Schritt wurden die TBDPS-Schutzgruppen des SP-analogen Dimers mit TBAF in THF bei 57 °C über Nacht entfernt.
Nach Synthese, Abspaltung vom Träger und Entschützung wurde die DNA unter Standardbedingungen *rp*-HPL-chromatographisch gereinigt, um unvollständig entschützte Stränge und vor allem bei der Synthese aufgetretene Abruchfragmente abzutrennen.
Es konnten folgende DNA-Stränge synthetisiert und isoliert werden (Tabelle 2-1):

Name	Sequenz	Ausbeute	Einsatz
ASA	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	2%	Enzymatische Studien
ASB	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	2%	Enzymatische Studien
asb	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	0.4%	Enzymatische Studien
CSA	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	6%	Einbau Phosphatrückgrat
CSB	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	5%	Einbau Phosphatrückgrat
GS2A	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	2%	Kooperation Prof. Goosen
GS2B	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	3%	Kooperation Prof. Goosen

Tab. 2-1: Sequenz, Ausbeute und Verwendungszweck der synthetisierten DNA-Stränge: ASA, CSA und GSA aus **18a**, ASB, CSB und GSB aus **18b**, asb aus **19b**.

2.5 Versuche zur Synthese des Sporenphotoproduktes 20a/b mit einem Phosphat-Rückgrat

Durch Inkorporation des Phosphats in den SP-analogen Schaden könnte der natürlich vorkommende Schaden synthetisiert werden. Dies ist von großem Interesse, um die biologische Relevanz des SPs zu untersuchen und aussagekräftige Kristallstrukturen zu gewinnen. Der Einbau des Phosphats in das Dimer ist allerdings sehr komplex. Dies wurde über drei verschiedene Wege versucht: 1) Generierung des SPs aus einem Dithymidinmonophosphat über Belichtung, 2) Inkorporation des Phospates nach der Dimersynthese und 3) Bildung des Phosphatrückgrats nach Einbau des Schadens in DNA mit Hilfe von Enzymen. Nachfolgend werden diese drei Versuche beschrieben.

2.5.1 Aufbau des Rückgrates über Belichtung

2.5.1.1 Syntheseplanung

Die Retrosynthese des Zielmoleküls **45a/b/c/d** ist in Abbildung 2-33 gezeigt. Die Synthese von **46** ist literaturbekannt.[151] Der Schlüsselschritt ist neben der Bildung der Methylen-brücke über Belichtung[200] die Aufreinigung von **45a/b/c/d**.

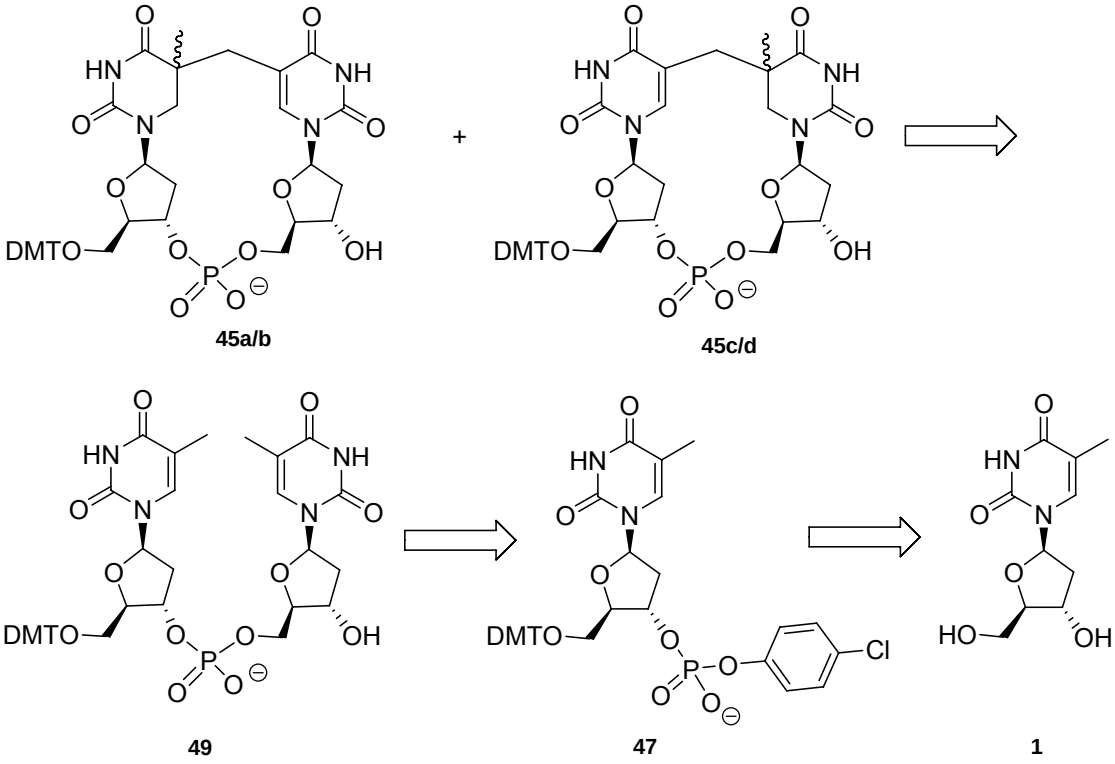


Abb. 2-33: Retrosynthese von **45a/b/c/d**.

2.5.1.2 Synthese der Dimeren 45a/b/c/d

Die Synthese von **45a/b/c/d** startet mit kommerziell erhältlichem Thymidin (**1**) und verläuft über 5 Stufen (Abbildung 2-34). Die Synthese des Dithymidinmonophosphats (**46**) verläuft analog zu der Synthesevorschrift von *Begley et al..*[151] Im ersten Schritt wurde Thymidin (**1**) mit DMTCl in Pyridin über Nacht bei Raumtemperatur quantitativ zu **48** geschützt. Anschließend wurde **48** mit 4-Chlorphenyldichlorophosphat und Triazol in THF 3 h bei Raumtemperatur zu **47** in guten Ausbeuten phosphoryliert. Die Kupplung zu **46** erfolgte in Pyridin mit **1** und MSNT bei Raumtemperatur innerhalb 3.5 h mit 76% Ausbeute. Im letzten Schritt wurde das Phosphat mit Ammoniumhydroxid bei Raumtemperatur in 3 d in 61% Ausbeute entschützt.

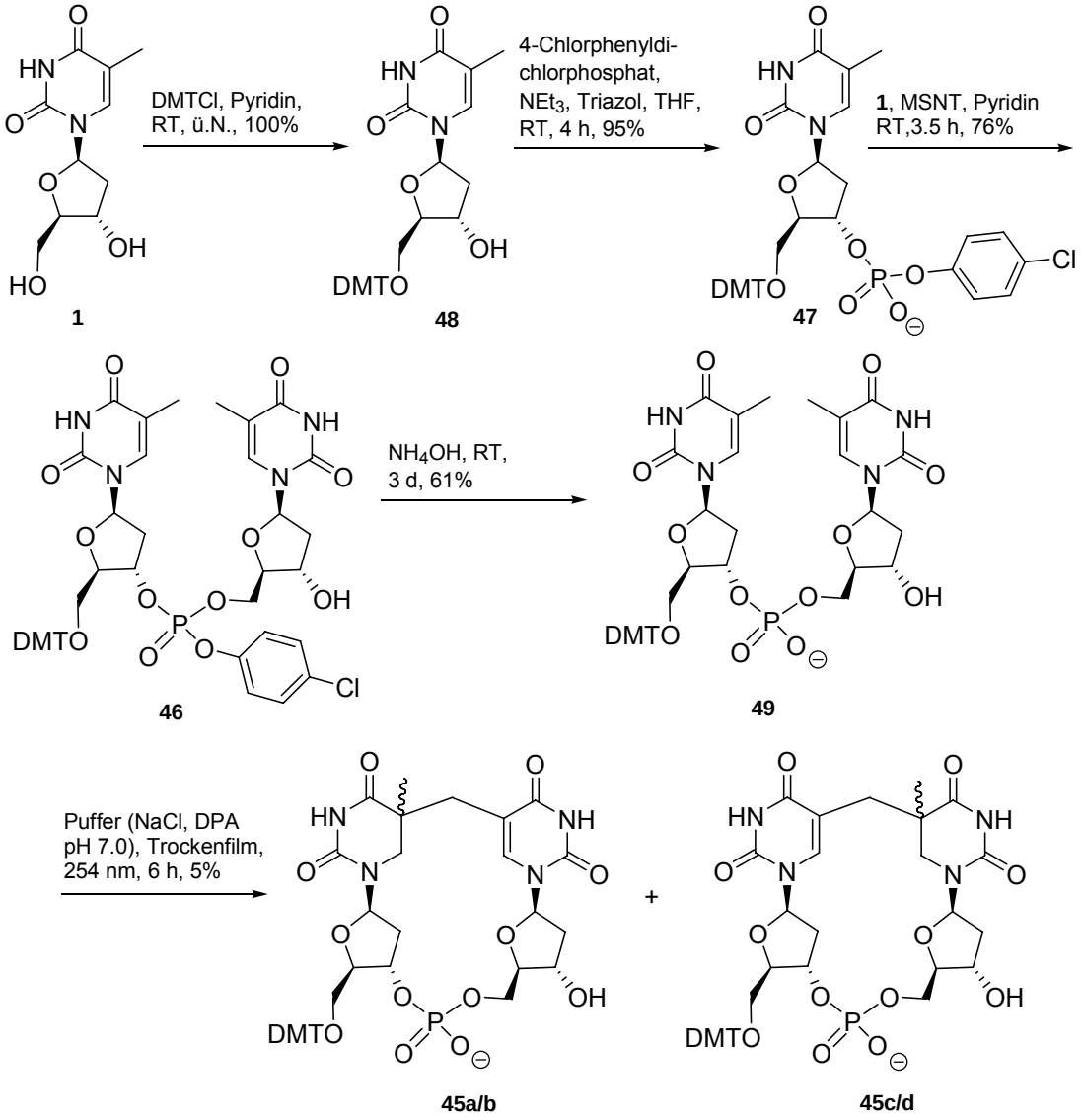


Abb. 2-34: Synthese der Dimere **45a/b/c/d**.

Der Schlüsselschritt war nun die Belichtung von **49** in Gegenwart von DPA im Trockenfilm.[200] Viele Studien haben gezeigt, dass bei Belichtung von DNA mit DPA im Trockenfilm fast ausschließlich das SP gebildet wird.[122, 127, 138, 167] Es wurde versucht dieses Wissen auf **49** anzuwenden. Hierfür wurde **49** in einem DPA-Puffer (10 mM DPA, 10 mM NaCl, pH 7.0) gelöst und in Petrischalen lyophilisiert. Anschließend wurde in einer Glovebox für 4 h bei Raumtemperatur mit 254 nm belichtet. Der Feststoff wurde nochmals gelöst (H_2O), lyophilisiert und weitere 6 h belichtet. Über *rp*-HPLC konnte das Produkt in geringen Mengen isoliert werden. Wegen der geringen Mengen konnte allerdings das Produkt nur massenspektrometrisch charakterisiert werden. Somit kann nicht gesagt werden, ob sich nur eines, zwei oder alle vier Diastereomere bildeten. Zur massenspektrometrischen Charakterisierung musste der Produktpeak fragmentiert werden. Nur so lässt sich sagen, welches TT-Dimer sich gebildet hat. Da mit ESI-MS/MS nicht die

komplette Fragmentierung erzielt werden konnte, musste das Produkt zunächst sauer hydrolysiert werden. Das Fragmentierungsmuster entsprach anschließend dem gewünschten Produkt.[215]

2.5.2 Aufbau des Rückgrates über Synthese

2.5.2.1 Retrosynthese

Die Totalsynthese beginnend mit **30a/b** war ein weiterer Versuch das Phosphatrückgrat in die SP-Analoga einzuführen (Abbildung 2-35).[151, 201] Für diesen Versuch wurde allerdings nur das Diastereomerengemisch eingesetzt. Die Analytik wurde durch das komplexe Gemisch so erschwert, dass nur massenspektrometrische Nachweise möglich waren.

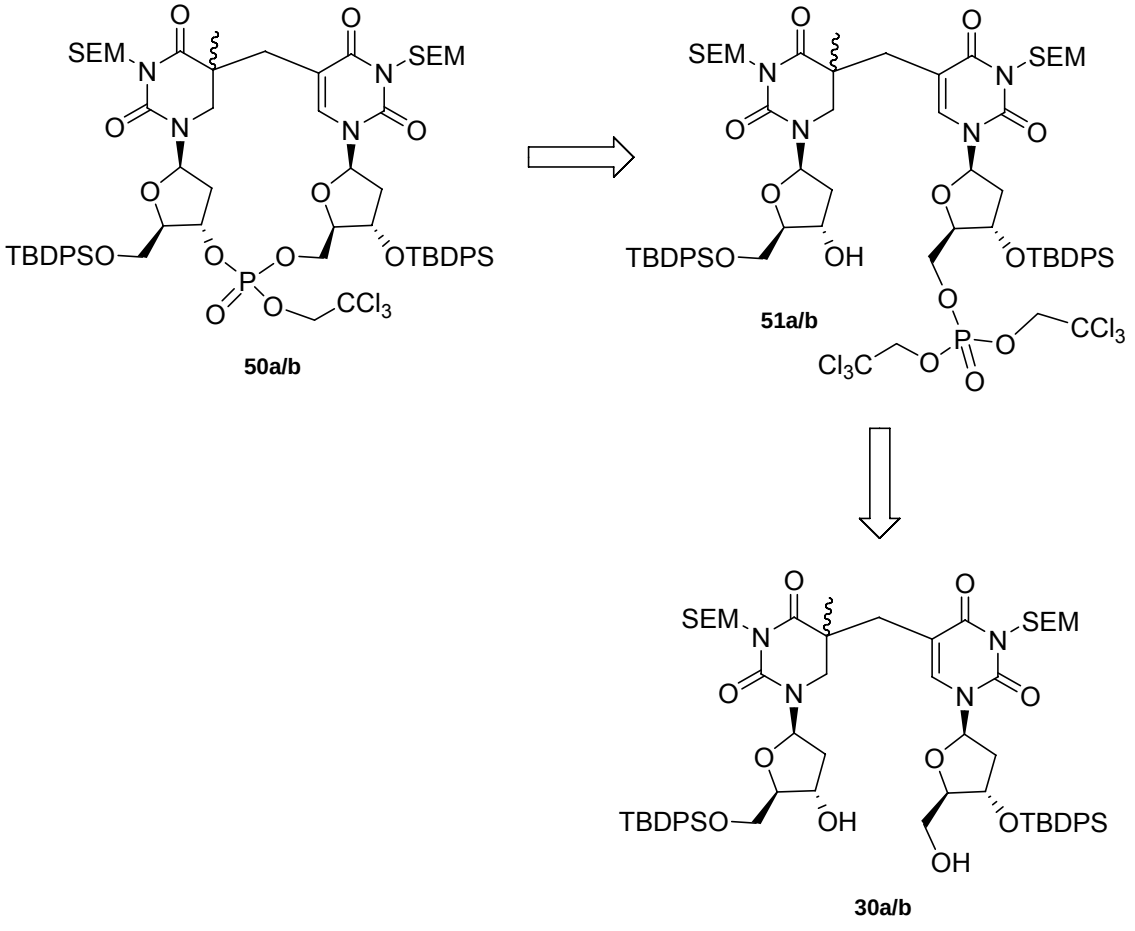


Abb. 2-35: Retrosynthese von **50a/b**.

Begley et al. publizierte bereits im Jahre 1995 eine Synthese für das SP mit Phosphatrückgrat.[151] Diese war jedoch nicht reproduzierbar, wie sich bei Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe *Carell* herausstellte.[184] Im Fall von **30a/b** war es auch nicht möglich das Phosphat direkt auf diesen publizierten Weg zu inkorporieren. Grund dafür könnten

hierbei die unterschiedlichen Schutzgruppen sein. Durch die TBDPS-Schutzgruppen wird das Dimer sterisch extrem anspruchsvoll, wodurch wiederum die Reaktivität stark herabgesetzt wird. Um dem entgegenzuwirken, wurden erfolglos auch reaktivere Phosphorylierungsreagenzien wie z.B. Phosphorsäuredi(trichlorethylester)chlorid eingesetzt.[201] Die geringe Reaktivität war aber ständig ein Problem beim Versuch des Ringschlusses zu **50a/b**. Das würde sich bei den folgenden Schritten zum Phosphoramidit **20a/b** wahrscheinlich fortsetzen, weshalb dieser Syntheseweg aufgegeben wurde.

2.5.2.2 Synthese des Dimers 50a/b

Bei dieser Syntheseroute wurde um so mehr darauf geachtet, so wenig Reaktionsschritte wie möglich zu planen, damit die geringe Reaktivität einen nicht so hohen Einfluss hat. Dies gelang durch die Wahl eines selektiven Phosphorylierungsreagenzes, so dass auf die Schützung und spätere Entschützung der zweiten OH-Gruppe verzichtet werden konnte. Die Generierung des Phosphatrückgrates gelang in zwei Schritten (Abbildung 2-36). Im ersten Schritt wurde der Phosphorsäuretriester **51a/b** aus Phosphorsäuredi(trichlorethylester)chlorid, welches selektiv primäre OH-Gruppen angreift, in Pyridin bei 3 °C über Nacht in 24% Ausbeute erzeugt.[201] Bei der Reaktion konnte nicht umgesetztes Edukt (43%) zurück gewonnen werden. Die vollständige Umsetzung ließ sich jedoch auch durch längere Reaktionszeiten nicht bewerkstelligen. Im zweiten Schritt wurde aus **51a/b** *in situ* durch basische Behandlung der Phosphorsäurediester erzeugt, der ohne weitere Aufarbeitung mit MSNT in Pyridin bei Raumtemperatur in 7 h mit 20% Ausbeute zu **50a/b** abreagierte.[151]

Dieser Syntheseansatz wurde auf Grund der schlechten Ausbeuten (5% über 2 Schritte) verworfen. Bis zum Dimer **50a/b** wurden bereits 12 Stufen mit einer Gesamtausbeute unter 1% (ohne Trennung der Diastereomere über HPLC) synthetisiert. Für den Einbau in DNA müssten bei dem Dimer zudem die TBDPS-Schutzgruppen abgespalten werden, anschließend auf der 5'-Position dimethoxytrityliert und auf der 3'-Position das Phosphoramidit synthetisiert werden.

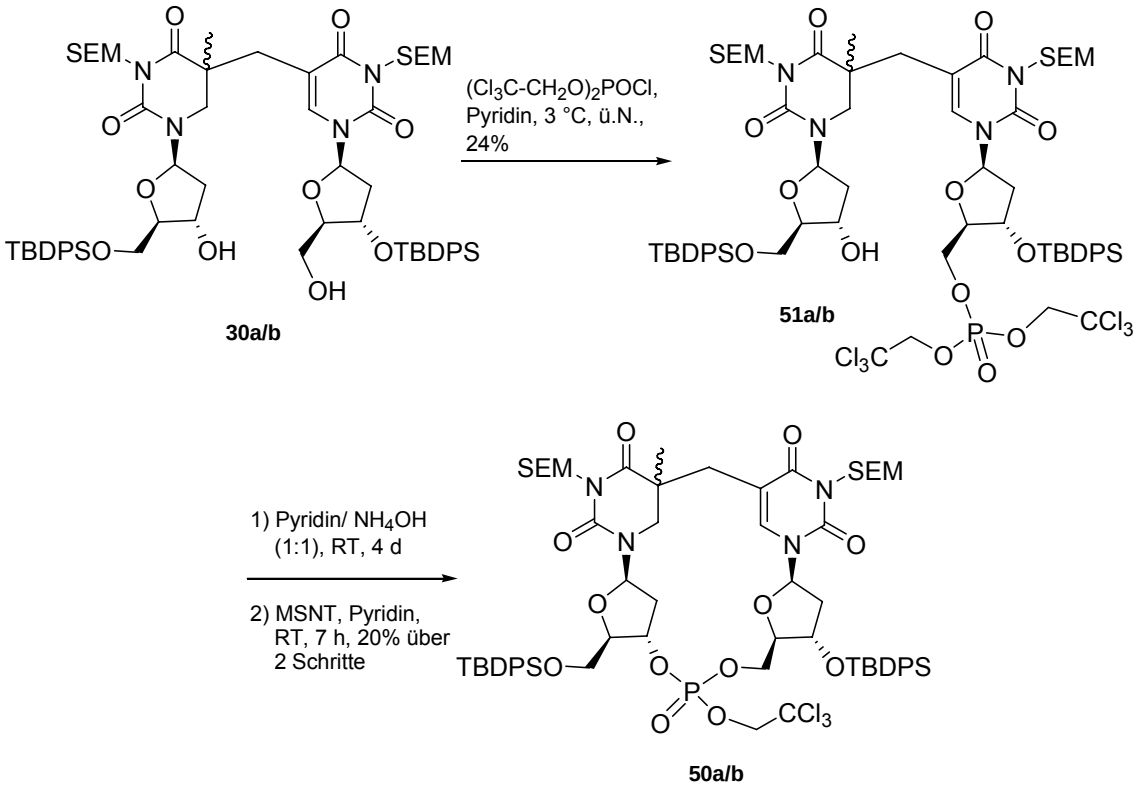


Abb. 2-35: Synthese von **50a/b**.

2.5.3 Aufbau des Rückgrates enzymatisch

Der letzte eingeschlagene Weg ein geschlossenes Phosphatrückgrat zu generieren war postsynthetisch durch Enzyme. Hierfür wurden zunächst zwei Phosphate an den beiden freien 5'-OH-Gruppen des DNA-Einzelstranges über eine Polynukleotidkinase (PNK) eingeführt. Dies erfolgte nach einem Standardprotokoll von *NEB*. Die ATP-Konzentration wurde dabei zunächst variiert und konnte mit 10 mM als Optimum bestimmt werden. Die Doppelphosphorylierung verlief für CSA und CSB quantitativ, dagegen konnte bei ASA und ASB, bei denen der Schaden mittig in der DNA liegt, nur eine Einfach-phosphorylierung (Endständige 5'-OH-Gruppe des DNA-Stranges) festgestellt werden. Bei dem Versuch, die Lücke mit einer Ligase zu schließen, wurden mehrere Bedingungen untersucht. So wurde versucht, die Ligation im Einzel- oder Doppelstrang durchzuführen. Zudem wurden verschiedene Ligasen (T4 DNA-Ligase, T4 RNA-Ligase 2, ASFV-Ligase[202, 203]) und unterschiedliche Reaktionsbedingungen (Zeit, Temperatur, Puffer) getestet. Es war allerdings nicht möglich eine Ligation zu erzielen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Synthese eines SP mit geschlossenem Phosphatrückgrat auf die unterschiedlichen, getesteten Arten und Weisen nur mit sehr geringen Ausbeuten möglich war. Vielleicht kann aber über andere Phosphorylierungs-reagenzien die SP-geschädigte DNA synthetisiert werden.

3. Biologische Eigenschaften

3.1 Schmelzpunktstudien

Durch die Bestimmung des Schmelzverhaltens definierter *ds* DNA lassen sich Aussagen über die Stabilität der Basenpaarung machen. In Abbildung 3-1 ist eine schematische Darstellung einer Schmelzkurve zu sehen. Bei niedrigen Temperaturen liegt die DNA als Doppelstrang vor, bei höheren Temperaturen ist sie vollständig denaturiert. Am Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Schmelzkurve liegt der sogenannte „Schmelzpunkt“ (T_m) der jeweiligen *ds* DNA. Der Schmelzpunkt T_m einer *ds* DNA ist somit der Punkt, an dem 50 % der doppelsträngigen DNA in die beiden Einzelstränge dissoziiert ist.

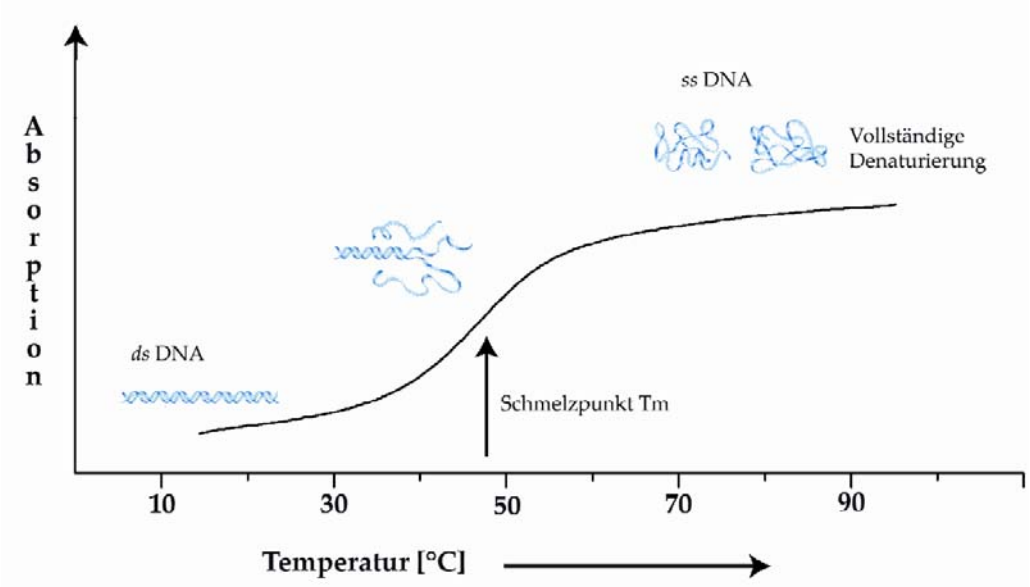


Abb. 3-1: Schematische Darstellung einer sigmoidalen Schmelzkurve. Die DNA-Schmelzkurve wird hierbei als der sich in Abhängigkeit von der Temperatur verändernde Absorptionsverlauf dargestellt.

Der Schmelzpunkt T_m ist dabei von vielen Faktoren abhängig. Neben der Länge der Oligonukleotide, der Konzentration der DNA und der sich in Lösung befindlichen Salze, ist auch der Einfluss der Sequenz zu nennen. Die Schmelztemperatur eines Oligonukleotides ist umso höher, je mehr G:C-Basenpaare vorhanden sind.

Zur Messung der Schmelzkurven wurden 1000 µL einer 3 µM Lösung der zu bestimmenden *ds* DNA mit NaCl (150 mM) und Tris*HCl (10 mM, pH 7.3) hergestellt. Anschließend wurde die Lösung in UV-Küvetten gefüllt und über 5 Zyklen in 0.5 °C-Schritten von 0 – 95 °C abgekühlt, bzw. von 95 – 0 °C erwärmt. Währenddessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und für die Hintergrundsbestimmung bei 320 nm detektiert.

In Abbildung 3-2 sind die Schmelzkurven der CS-Sequenz beispielhaft dargestellt. Es lässt sich hierbei eine leichte Hysterese sowohl im ungeschädigten als auch im geschädigten Strang beobachten. Im Falle einer Hysterese (gr. *hysteros* = hinterher) unterscheidet sich die Aufwärmkurve von der Abkühlkurve. Dieses Verhalten kann sequenzbedingt sein.

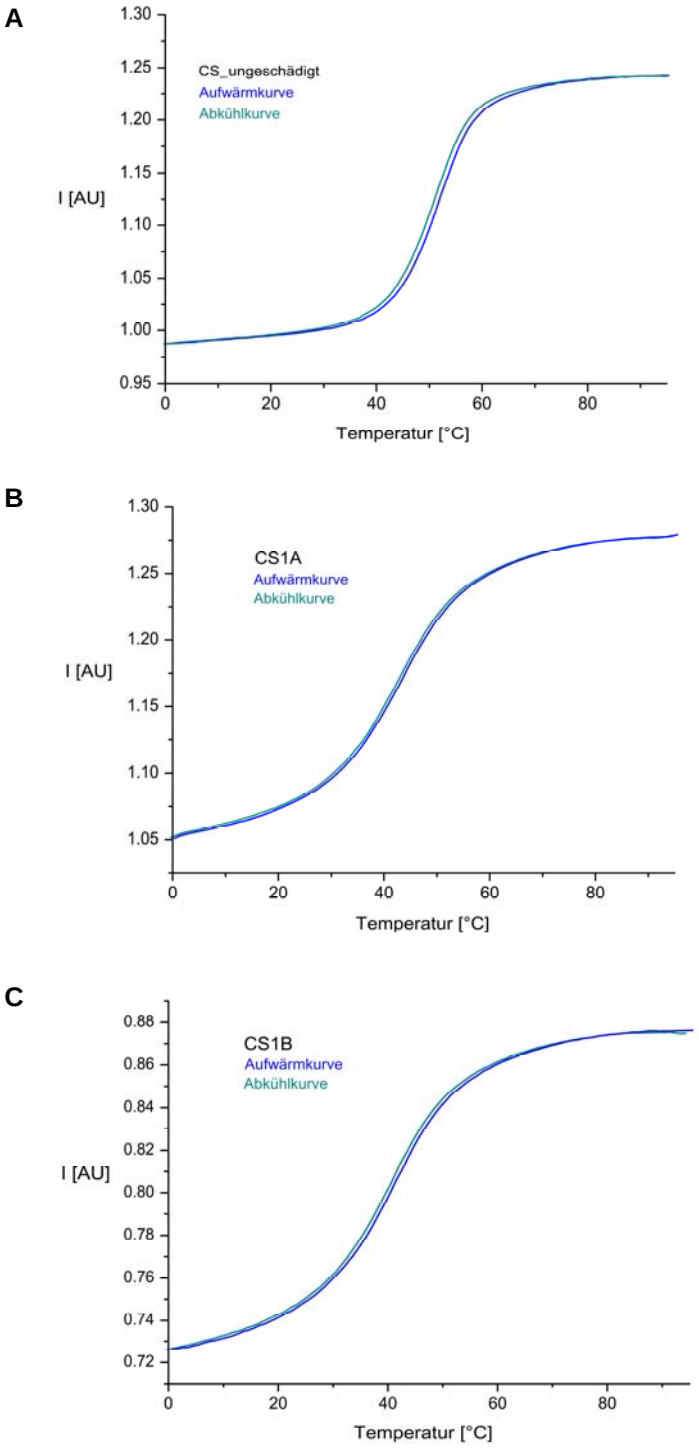


Abb. 3-2: Darstellung der Schmelzkurven im Falle von CS. **A)** CS_ungeschädigt. **B)** CS1A. **C)** CSB.

Zur Bestimmung des Schmelzpunktes T_m wurde das Mittel der 5 Zyklen bestimmt und die so erhaltene Kurve durch ein Polynom 9. Ordnung approximiert. Die Nullstellen der 2. Ableitung dieser Approximationsfunktion stellen die gesuchten Schmelzpunkte dar. In Tabelle 3-1 sind die ermittelten Schmelzpunkte dargestellt. Aus den Schmelzpunkten lässt sich erkennen, dass die SP-analogen Dimere eine Destabilisierung der *ds* DNA hervorrufen. Die Destabilisierung ist dabei sequenzabhängig. Zudem ist die Destabilisierung geringer je randständiger der Schaden liegt. Die Destabilisierung lässt sich mit der lokalen Verzerrung erklären, die das sterisch anspruchsvolle SP-Dimer auf seine direkte Umgebung ausübt.

Bennenung	Sequenz	Schmelzpunkt [°C]
AS_ungeschädigt	5'-ATC GGC TTC GCG CA-3'	64.8-65.8
ASA	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	44.6-45.4
ASB	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	41.7-42.7
CS_ungeschädigt	5'-T ATT GCA TCA TGC-3'	51.1-52.0
CSA	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	42.5-43.5
CSB	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	40.8-41.4
GS_ungeschädigt	5'-CAG CAT CTT CAT CAT ACA GT-3'	60.0-61.2
GS2A	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	50.5-51.7
GS2B	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	50.7-51.5

Tab. 3-1: Schmelzpunkte der synthetisierten, geschädigten DNA-Stränge im Vergleich zu den ungeschädigten DNA-Strängen.

3.2 Modelling des SPs in die DNA

Die *ds* DNA ASA und ASB wurden unter Verwendung des Software-Paketes MOLOC moduliert.[204, 205] Hierzu muß erwähnt werden, dass für das Modelling zunächst der ungeschädigte DNA Doppelstrang eingesetzt wurde. Anschließend wurde im ungeschädigten Strang zwischen den benachbarten Thymidinen der Photoschaden generiert. Für die Energieoptimierung waren nur der Sporenphotoschaden, die beiden benachbarten Phosphatgruppen und die beiden gegenüberliegenden Adenine beweglich, während der Rest der DNA stationär gehalten wurde. Es konnte trotz der Beweglichkeit der Adenine sowohl bei ASA, als auch bei ASB, keine Verzerrung des ungeschädigten Gegenstranges beobachtet werden.

Im Fall von ASA liegt die Base B, also die ungesättigte Base, des SPs in *anti*-Stellung zum Zucker vor und besitzt weiterhin die regulären Wasserstoffbrückenbindungen. Die Base A, also die gesättigte Base, des SPs dagegen weist eine *syn*-Stellung zum Zucker

auf. Dadurch ist die Base so verdreht, dass keine stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zum gegenüberliegenden Adenin möglich sind. Anstelle des Phosphats im Rückgrat des SP bilden die beiden freien OH-Gruppen zudem Wasserstoffbrückenbindungen aus. Dies führt zu einer weiteren Stabilisierung (Abbildung 3-3).

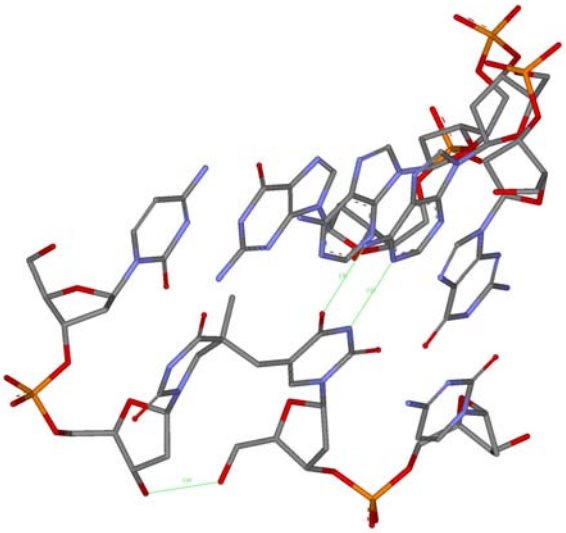


Abb. 3-3: Ausschnitt aus einem DNA-Modell der ASA-Sequenz. Zwischen den Basen sind in grün die Wasserstoffbrückenbindungen eingezeichnet.

Im Fall von ASB musste für das Modelling die Base A in eine *syn*-Stellung zum Zucker gebracht werden. Die DNA ist dadurch so stark verzerrt, dass die Base A des SPs keine stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zum gegenüberliegenden Adenin ausbilden kann. Die Base B des SPs dagegen liegt in einer *gauche*-ähnlichen Stellung zum Zucker vor. Durch die starke Verzerrung der DNA um das SP kann nur eine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden. (Abbildung 3-4).
Mit dem Modelling der DNA können nun die unterschiedlichen Schmelzpunkte zwischen ASA und ASB erklärt werden. Die *R*-Konfiguration scheint in der DNA zu einer stärkeren Verzerrung und somit zu einer größeren Destabilisierung des Doppelstranges als die *S*-Konfiguration.

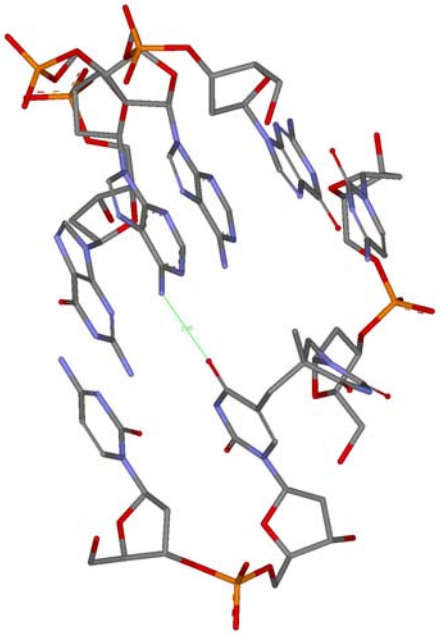


Abb. 3-4: Ausschnitt aus einem DNA-Modell der ASB-Sequenz. Zwischen den Basen sind in grün die Wasserstoffbrückenbindungen eingezeichnet.

3.3 Bindungsstudien

Zur Untersuchung der Bindung der DNA an die SP-Lyase wurde deren Fluoreszenzpolarisation (FP) gemessen. Diese Methode wurde erstmals von *Perrin* im Jahre 1926 als Detektionsart beschrieben[206] und später durch *Dandliker* und dessen Mitarbeiter weiterentwickelt.[207, 208]

Die FP beruht auf der Beobachtung, dass fluoreszierende Moleküle in Lösungen, welche durch polarisiertes Licht angeregt werden, polarisiertes Licht emittieren. Die Ebene des emittierten Lichtes ändert sich hierbei aufgrund der Bewegung des Moleküls. Die Fluoreszenzintensität dieses emittierten Lichtes kann über zwei Polarisationsfilter gemessen werden. Diese stehen einerseits parallel und andererseits senkrecht zur Anregungslichtquelle.

Des Weiteren ist die Polarisation des Moleküls proportional zur Rotationsgeschwindigkeit. Diese ist wiederum von der Molekülgröße abhängig, d.h. für große Molekülkomplexe gibt es andere Messwerte als für kleine Moleküle. Kleine Fluorophor-Komplexe können dabei schneller rotieren. Somit tritt öfters ein Wechsel zwischen der parallelen und perpendikulären Ebene ein. Große Fluorophor-Komplexe rotieren sehr langsam, d.h. es gibt kaum einen Wechsel zwischen den beiden Ebenen.

Die Polarisation (P) wird durch folgende Formel definiert:

$$P = (I_{parallel} - I_{perpendikulär}) / (I_{parallel} + I_{perpendikulär})$$

Bei unendlich schneller Rotationsgeschwindigkeit (bei unendlich kleinen Molekülen) wäre die perpendikuläre Intensität gleich der parallelen ($I_{parallel} = I_{perpendikulär}$). Somit ergäbe sich für die Polarisation:

$$P = 0 / (I_{parallel} + I_{perpendikulär}) = 0$$

Bei unendlich langsamer Rotationsgeschwindigkeit (bei unendlich großen Molekülen), wäre die perpendikuläre Intensität gleich 0, d.h. das Molekül bewegt sich nicht. Hier ergäbe sich für die Polarisation:

$$P = I_{parallel} / I_{parallel} = 1$$

Somit ergeben sich für die Polarisation gültige Werte zwischen 0 und 1. Meist werden die „millipolarization untis“ für die leichtere Handhabung der Dezimalstellen angegeben, d.h. die Polarisation wird mit 1000 multipliziert (mP).
Für das Experiment wurde die FP folgender Fluorescein-markierter DNA-Stränge gleichbleibender Konzentration (5 µM) mit ansteigender SP-Lyase-Konzentration gemessen. Bei der SP-Lyase handelte es sich um das nicht rekonstituierte, d.h. dem oxidierten und somit nicht aktiven, Enzym, welches durch *Dr. C. Chiocchini* bereitgestellt wurde.

ss-GS: 3’-TAG CCG AAG CGC GA-Fluo-5’

ds-(S)-SP: 5’-ATC GGC T^TC GCG CT-3’
3’-TAG CCG AAG CGC GA-Fluo-5’

ds-(R)-SP: 5’-ATC GGC T^TC GCG CT-3’
3’-TAG CCG AAG CGC GA-Fluo-5’

ds-ung.: 5’-ATC GGC TTC GCG CT-3’
3’-TAG CCG AAG CGC GA-Fluo-5’

Die erhaltenen Werte wurden dabei gegen die Enzymkonzentration aufgetragen und sigmoide gefittet. Bei einer zunehmenden Bindung des DNA-Stranges an die SP-Lyase wird der Fluorophor-Komplex größer. Bei einer Bindung sollte somit eine ansteigende Polarisation zu beobachten sein (Abbildung 3-5).

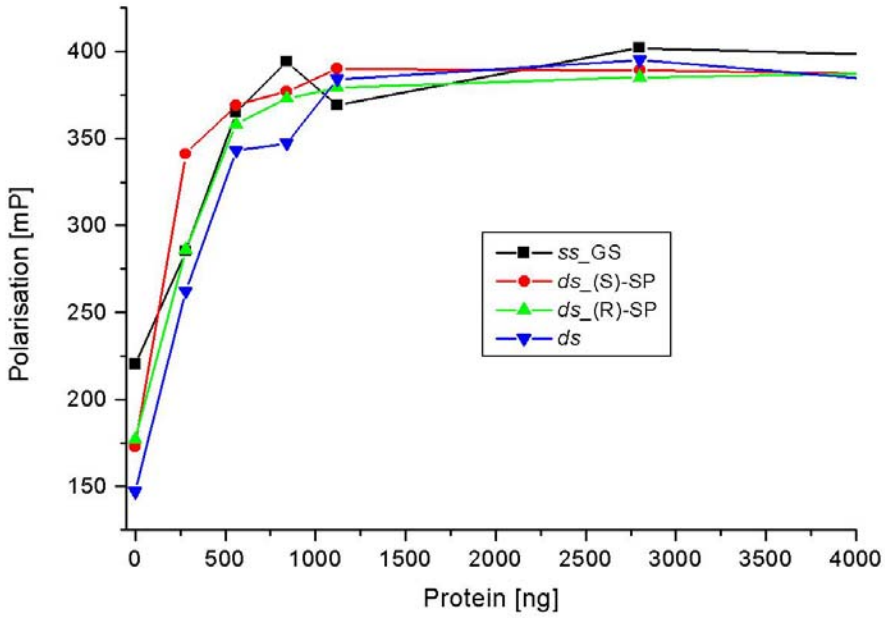


Abb. 3-5: FP-Messung mit *ss*-DNA, *ds*-(S)-SP, *ds*-(R)-SP und ungeschädigter *ds*-DNA.

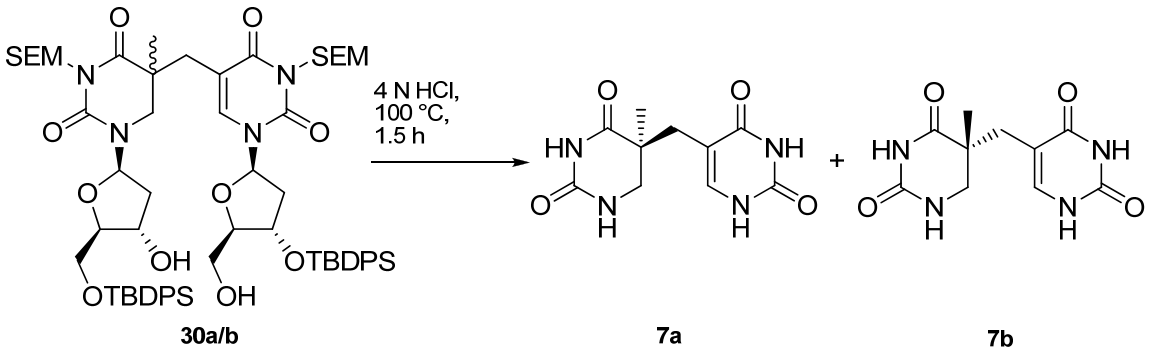
In der Abbildung 3-5 lässt sich erkennen, dass die SP-Lyase immer bindet. Die Bindung ist unabhängig davon, ob die DNA als Einzelstrang oder als Doppelstrang und geschädigt oder ungeschädigt vorliegt. Bei der SP-Lyase handelt es sich um ein DNA-bindendes Protein, womit sich diese Beobachtung erklären lassen könnte. Die CPD-Photolyase ist allerdings auch ein DNA-bindendes Protein und unterscheidet bei der Bindung zwischen CPD-geschädigter und ungeschädigter DNA. Dabei bindet sie selektiv an geschädigte DNA.[209, 210] Somit weist die SP-Lyase im nicht rekonstituierten Zustand ein unterschiedliches Bindungsverhalten auf. Für eine aussagekräftige Studie wäre es jedoch wichtig zu wissen, wie sich das Enzym im rekonstituierten Zustand, d.h. in der holo-Form mit dem aktiven katalytischen Zentrum, verhält. Nur dann lässt sich sagen, ob die SP-Lyase wirklich anders bindet als die CPD-Photolyase. Es wurde mehrfach versucht diese interessanten Bindungsstudien mit der aktiven SP-Lyase durchzuführen. Allerdings gestaltete sich das Überexprimieren und vor allem Rekonstituieren der SP-Lyase als extrem schwierig. Bisher konnte deshalb das Experiment nicht durchgeführt werden.

3.4 Abgleich mit der Natur

Es wurde versucht einen Assay zu entwickeln, mit dem sich zeigen lässt, ob in der Natur nur ein oder beide Diastereomere des SP gebildet werden. Dies ist schnell und einfach über den Vergleich der jeweiligen Nukleobasen mittels eines HPLC-Assays möglich. Als

Standard für diesen Assay wurden die synthetisierten, getrennten Diastereomere, bzw. deren Nukleobasen eingesetzt.

In Abbildung 3-6 ist dargestellt, wie hierfür die SP-Analoga **30a** und **30b** nach einer Vorschrift von *Varghese* mit 4 N HCl unter Rückfluss 1.5 h zu den enantiomeren Nukleobasen **7a** und **7b** hydrolysiert wurden.[211] Diese wurden mittels *rp*-HPLC gereinigt.



30a/b **7a** **7b**

Abb. 3-6: Synthese der Nukleobasen **7a** und **7b**.

Des weiteren wurde DNA im Trockenfilm durch *Dr. C. Pieck* belichtet.[212] Hierfür wurde ein DNA-Einzelstrang mit der Sequenz 5'-GGTTGG-3' in Gegenwart von 5 mM DPA-Ca lyophilisiert und im Anschluss für 5 h bei Raumtemperatur anaerob belichtet. Die belichtete DNA wurde mittels *rp*-HPLC gereinigt. Durch saure Hydrolyse der DNA mit TFA lassen sich die Nukleobasen von den Zuckern abspalten.[142]

Über einen HPLC-Assay mit einer chirale Säule und den zuvor synthetisierten Standards wäre es nun möglich zu klären, welches der beiden Enantiomere bei der Belichtung von DNA im Trockenfilm gebildet wird. Zudem wäre es interessant zu sehen, ob bei der Belichtung von Sporen dasselbe Ergebnis zu sehen ist.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals die Diastereomere der teilweise entschützten SP-Analoga **30a/b** und **43a/b** in so großen Mengen synthetisiert werden, dass diese für die folgende Phosphoramiditsynthese in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Im Zuge der Synthese wurde eine effektive Trennung mittels *np*-HPLC erzielt, welche die Untersuchung der einzelnen Diastereomere ermöglichte. Die Bestimmung der Konfiguration an C5 der Dihydrothymidineinheit der Isomere **30a/b**, bzw. **43a/b** mittels 2D-NMR-Spektroskopie (NOESY) war aufgrund der eingeschränkten Flexibilität der Moleküle möglich. Diese Bestimmung konnte durch vorangegangenen Arbeiten von *Dr. M. Friedel*[184] gestützt werden.

Nach der Trennung der Diastereomere und der Synthese der Phosphoramiditbausteine **18a/b** und **19b** konnten erstmals die SP-Analoga in DNA-Stränge beliebiger Sequenz eingebaut werden. Die Standardentschützungsbedingungen für die TBDPS- und SEM-Schutzgruppen waren allerdings nicht anwendbar.[193-198] Nach der DNA-Festphasen-synthese konnten die Entschützungsbedingungen jedoch erfolgreich optimiert werden.

Durch die synthetischen DNA-Stränge lassen sich nun die Ergebnisse der ersten enzymatischen Studien,[174] die im Arbeitskreis *Carell* durchgeführt wurden, verifizieren. Zudem sollte aufgrund der Fixierung des Schadens in die DNA-Helix durch die benachbarten Nukleotide eine höhere Reparaturrate beobachtet werden. Auch die Kinetik des Enzyms und die Rolle des SAM (Cofaktor oder Cosubstrat) mit diesem Substrat könnte so bestimmt werden. Somit wäre der Weg bereitet ein unter den DNA-Reparaturenzymen bisher einzigartiges Enzym, die SP-Lyase, eingehender mechanistisch zu untersuchen.

Des Weiteren konnten die ersten Schritte zum Abgleich des synthetisierten Schadens mit dem in der Natur vorkommenden unternommen werden. Hierfür wurden die SP-Analoga **30a** und **30b** sauer zu **52a** und **52b** hydrolysiert, um sie als Standards für einen Vergleichs-Assay einzusetzen. Nach saurer Hydrolyse der im Trockenfilm belichteten DNA, oder sogar der in Sporen belichteten DNA, könnten nun die Nukleobasen über einen HPLC-Assay verglichen werden. So ließe sich schnell detektieren, ob nur ein oder beide Enantiomere **52a/b** in der Natur, d.h. in der DNA, durch UV-Bestrahlung gebildet werden.

Im Rahmen der Arbeit konnte zusätzlich das natürliche SP mit geschlossenem Phosphatrückgrat in Form von **45a/b** und **50a/b** über zwei unterschiedliche Wege synthetisiert werden. Diese können nach erfolgreicher Phosphoramiditsynthese in DNA eingebaut werden. Allerdings ist eine Optimierung der Synthese dringend nötig.

Der Versuch, das Phosphatrückgrat nach der DNA-Synthese über Enzyme einzubauen, war bisher jedoch nicht möglich. Hierzu müssten noch mehr Bedingungen und vor allem Ligasen getestet werden. Durch die synthetisierten DNA-Stränge mit getrennten Diastereomeren des natürlichen SP könnten erstmals eindeutige enzymatische Untersuchungen des Schadens auf seine Toxizität und Mutagenität durchgeführt werden. Bisher war dies aufgrund des nicht genau definierten Substrates nicht möglich. Zudem könnte der natürliche Schaden mit der SP-Lyase cokristallisiert werden, umso genaueres über den Reparaturprozess zu lernen.

5. Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Aluminium-Fertigplatten *Kieselgel-60* F_{254} der Firma *Merck* angefertigt. Die Substanzen wurden durch Betrachtung unter einer UV-Lampe (254 nm bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit Anisaldehyd-Tauchreagenz (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL Schwefelsäure, Platte auf 100 °C erwärmen) sichtbar gemacht.

Säulenchromatographie wurde nach der Flash-Methode durchgeführt. Es wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines N_2-Überdruckes. Das verwendete Lösungsmittel-gemisch ist jeweils in Volumenanteilen angegeben.

Schmelzpunkte wurden auf einer *Büchi B-540*-Schmelzpunktapparatur gemessen und sind nicht korrigiert.

Kernresonanzspektren (NMR) wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Varian VNMRS 300*, *Varian VNMRS 600* und *Varian Oxford 200* aufgenommen. Bei den höherfrequenten Spektrometern erfolgte die Messung durch die NMR-Service Abteilung des Departments für Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel sind jeweils in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, relativ zu TMS (es wurde das Lösungsmittel als interner Standard verwendet), und die Kopplungskonstante *J* in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplett), *q* (Quadruplett), *m* (Multiplett) sowie ggf. deren Kombination gekennzeichnet.

Massenspektren (MS) wurden durch den MS-Service des Departments Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. ESI-Massenspektren wurden mit einem *Finnegan LTQ-FT* FT-ICR-Spektrometer mit ESI-Quelle gemessen. FAB-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan MAT 90* aufgenommen (Matrix: *m*-Nitrobenzylalkohol). MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *Bruker Autoflex II* bei einer Beschleunigungsspannung von 19 kV gemessen (Matrix: 6-Aza-2-thiothymin (ges. in Wasser/Acetonitril 1:1) für Kleinmoleküle oder 3-Hydroxypicolinsäure (7 mg in 100 µL Wasser/Acetonitril 1:1) für Oligonukleotide). Die wichtigsten Signale werden in *m/z*-Einheiten angegeben, wobei, wenn möglich, eine Zuordnung in Klammern angemerkt ist.

Infrarot-Spektren (IR) wurden auf einem *Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100*-Spektrometer, welches mit einer ATR-Einheit (Totalreflexionsverfahren) ausgestattet war, aufgenommen. Die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *s* (stark), *m* (mittel), *w* (schwach), *br* (breit) gekennzeichnet.

HPL-Chromatographie wurde auf mehreren *Merck-Hitachi*- bzw. *Waters*-Anlagen durchgeführt. Die Komponenten waren im Einzelnen:

- *Merck*$_{\text{analytisch}}$: *L-7000* Interface Modul, *L-7100* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *L-7400* UV-Detektor, *L-7480* Fluoreszenzdetektor, *L-7612* Lösungsmittel Entgaser, bzw. *L-7000* Interface Modul, *L-7100* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *L-7420* UV/Vis-Detektor, *L-7612* Lösungsmittel Entgaser;
- *Merck*$_{\text{präparativ}}$: *L-1000* Interface Modul, *L-7150* Pumpe, *Rheodyne P/N 77 25i* Einspritzventil, *L-7420* UV-Detektor, *ERC-3415 a* Lösungsmittel Entgaser;
- *Waters*$_{\text{analytisch}}$: 2996 *Diode Array Detector,* 2695 *Separation Module;*
- *Waters*$_{\text{präparativ}}$: 1525 *HPLC Pump,* 2487 *Dual Wavelength UV Detector.*

Alle eingesetzten Säulen waren von der Firma *Macherey-Nagel*. Zum Einsatz für analytische *rp*-Trennungen kamen hierbei die *VP 250/4 Nucleodur 100-3 C18 ec* und *CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18* Säulen. Für analytische *np*-Trennungen wurden die *CC 250/4 Nucleosil 100-5* und *CC 250/4 Nucleosil 120-3* Säulen verwendet. Für präparative *rp*-Trennungen wurde eine *VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18* Säule und für präparative *np*-Trennungen eine *VP 250/10 Nucleodur 100-5* und eine *VP 250/21 Nucleodur 100-5* Säule eingesetzt.

Oligonukleotidsynthese wurden auf einem *Expedite Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *Per-Septive Biosystems* im Maßstab 1 µmol durchgeführt. Die geschützen Amidite wurden von der Firma *Glen Research* bezogen, die nukleosidbeladenen CPG-Träger stammten von der Firma *PE Biosystems.* Phosphoramidite und Aktivatoren wurden in Acetonitril der Firma *Riedel de Haen* (Wassergehalt ≤ 0.1 ppm) gelöst, für die übrigen Reagenzien wurde Acetonitril der Firma *Roth* (Wassergehalt ≤ 0.3 ppm) als Lösungsmittel verwendet. Alle hergestellten Lösungen wurden vor der Synthese 24 h über Molekularsieb 4 Å getrocknet. Die Synthese natürlicher Oligonukleotide erfolgte nach Standard-protokollen des Geräteherstellers, Stränge ohne Sonderbasen wurden bei der Firma *Metabion* bzw. *IBA* bezogen.

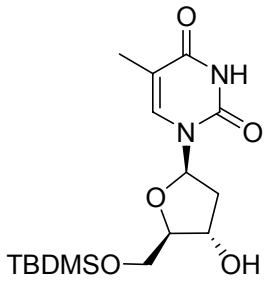
Schmelzpunkte von Oligonukleotiden wurden mit einem *Varian Cary 100 Bio* mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *MultiCellBlock* aufgenommen. Der Temperaturgradient betrug 0.5 °C/min. Es wurden pro Messung je 5 Abkühlkurven

(85 °C → 0 °C) und 5 Aufheizkurven (0 °C → 85 °C) bei 260 nm und 320 nm aufgenommen. Die Temperaturmessung erfolgte hierbei in einer Referenzküvette. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült, um ein Anlaufen der Küvette bei tiefen Temperaturen zu verhindern. Für die Messungen wurden Küvetten mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlendurchgang (Messvolumen 750 – 1000 µL) der Firma *Helma* verwendet. Für die Schmelzkurven wurden 3 µM DNA-Duplexlösungen angesetzt, welche zusätzlich 150 mM NaCl und 10 mM Tris HCl (pH 7.4) enthielten. In den Küvetten wurden die Lösungen mit Dimethylpolysiloxan überschichtet, um ein Verdampfen der Probe zu verhindern. Die Auswertung der Messung erfolgte unter Verwendung von *Microcal Origin.* Hierzu wurden die erhaltenen Kurven bei 260 nm gemittelt und hiervon die gemittelte Hintergrundmessung bei 320 nm subtrahiert. Die so erzeugten Kurven wurden durch ein Polynom 9. Ordnung approximiert, die Nullstellen der 2. Ableitung der Näherungsfunktionen stellen den gesuchten Schmelzpunkt dar.

Lösungsmittel und **Chemikalien** wurden, falls nicht anders erwähnt, in der kommerziell erhältlichen Qualität *puriss p.a.* oder *purum* eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Acros*, *Merck*, *Lancaster* oder *Sigma* bezogen. Bidestilliertes Wasser wurde mit einer *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka, Acros* oder *Aldrich* bezogen. Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung destilliert. Das Einengen von Lösungsmittel *in vacuo* wurde in einem Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph* im Membranpumpenvakuum (*Vario PC2001*-Membranpumpenstand der Firma *Vacuubrand*) durchgeführt. Zur Feintrocknung *in vacuo* wurde in eine Ölvakuumpumpe *RZ-4* der Firma *Vacuubrand* verwendet. Kleinere Mengen an wässrigen oder acetonitrilhaltigen Lösungen wurden mit einer *SpeedVac Plus SC110A*, *SpeedVac SPD 111V* der Firma *Savant* bzw. einer *RVC 2-25* mit *CT 62-50*-Kompressorkühlfalle der Firma *Christ* entfernt. Zur Lyophilisierung wässriger Lösungen wurde eine *Alpha 2-4* Lyophille der Firma *Christ* verwendet.

5.2 Synthese des SP 18a/b

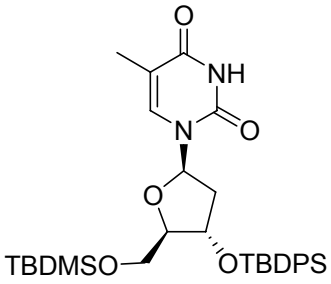
5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-thymidin **27**[181, 182]



5.00 g (20.7 mmol) Thymidin (**1**) wurden unter Stickstoffatmosphäre in 25 mL DMF abs. gelöst und mit 3.09 g (41.3 mmol, 2.2 eq) Imidazol versetzt. Die Lösung wurde anschließend mit 3.42 g (22.7 mmol, 1.1 eq) TBDMSCl versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 100 mL Chloroform aufgenommen, 7 x mit je 100 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung und 1 x mit 100 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die farblose, organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH = 20 : 1) konnte ein farbloser Feststoff **27** erhalten werden (6.35 g, 17.8 mmol, 86%).

R_f = 0.34 ($CHCl_3$: MeOH = 20 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)**: δ = 11.32 (*s*, 1H; N*H*), 7.47 (*s*, 1H; C*H*(6)), 6.17 (*dd*, *J* = 7.59, 6.36 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.27 (*d*, *J* = 4.15 Hz, 1H; C(3)O*H*), 4.25-4.19 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.83-3.67 (*m*, 3H; C*H*(4'), CH_2(5')), 2.16-1.90 (*m*, 2H; CH_2(2')), 1.77 (*d*, *J* = 1.10 Hz, 3H; C(5)C*H*(3')), 0.88 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.07 (*d*, *J* = 1.28 Hz, 6H; Si(CH_3)$_2$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6)**: δ = 164.10 (*C*O), 150.82 (*C*O), 135.93 (*C*H(6)), 109.83 (*C*(5)), 87.27 (*C*H(4')), 84.34 (*C*H(1')), 70.97 (*C*H(3')), 63.76 (*C*H_2(5')), 39.41 (*C*H_2(2')), 26.26 (C(*C*H_3)$_3$), 18.48 (*C*(CH$_3$)$_3$), 12.67 (C(5)*C*H_3), -4.96 (Si(*C*H_3)$_2$), -4.98 (Si(CH$_3$)$_2$); **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{16}H_{28}N_2O_5Si$+H]$^+$: 357.1840; gef.: 357.1838; **Smp**.: 198 °C; **IR**: 3437*br*, 3064*w*, 2930*s*, 2858*s*, 1699*s*, 1472s, 1362*w*, 1274*m*, 1259*m*, 1203*m*, 1125*m*, 1097*w*, 1061*w*, 1004*w*, 942*w*, 836*s*, 781*w*.

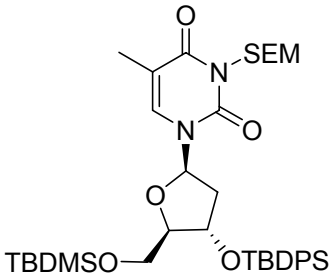
5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-thymidin **28**[182]



In 40 mL DMF abs. wurden 6.00 g (16.8 mmol) **27** unter Stickstoffatmosphäre gelöst und mit 3.44 g (50.4 mmol, 3 eq) Imidazol und 6.53 mL (25.2 mmol, 1.5 eq) TBDPSCl versetzt. Die blass gelbe Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 200 mL Essigester aufgenommen, 3 x mit je 200 mL Wasser dest. und 1 x mit 200 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographische gereinigt (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 7 : 3) und das Produkt als farbloser Feststoff **28** erhalten (10.19 g, 16.5 mmol, 99%).

R_f = 0.31 (Isohexan : EE = 7 : 3); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 11.32 (*s*, 1H; N*H*), 7.69-7.37 (*m*, 10H; C$_{ar}$*H*), 7.31 (*d*, *J* = 1.13 Hz, 1H; C*H*(6)), 6.26 (*dd*, *J* = 8.72, 5.58 Hz, 1H; C*H*(1')), 4.29-4.27 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.93-3.92 (*m*, 1H; C*H*(4')), 3.52 (*dd*, *J* = 11.36, 3.32 Hz, 1H; CH_{2b}(5')), 3.25 (*dd*, *J* = 11.37, 3.36 Hz, 1H; CH_{2b}(5')), 2.11 (*ddd*, *J* = 12.89, 5.48, 1.27 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 1.96-1.85 (*m*, 1H; CH_{2a}(2')), 1.69 (*d*, *J* = 0.92 Hz, 3H; C(5)CH_3), 1.01 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.71 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), -0.14 (*d*, *J* = 11.13 Hz, 6H; Si(CH_3)$_2$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 164.00 (*C*O), 150.81 (*C*O), 135.71 (*C*$_{ar}$H, *C*H(6)), 135.55 (*C*$_{ar}$H), 133.21 (*C*$_{ar}$), 133.15 (*C*$_{ar}$), 130.57 (*C*$_{ar}$H), 128.45 (*C*$_{ar}$H), 128.43 (*C*$_{ar}$H), 110.02 (*C*(5)), 87.41 (*C*H(4')), 84.39 (*C*H(1')), 74.26 (*C*H(3')), 63.33 (*C*H$_2$(5')), 39.42 (*C*H$_2$(2')), 27.17 (C(*C*H$_3$)$_3$), 26.09 (C(*C*H$_3$)$_3$), 19.09 (*C*(CH$_3$)$_3$), 18.32 (*C*(CH$_3$)$_3$), 12.63 (C(5)*C*H$_3$), -5.14 (Si*C*H$_3$), -5.30 (Si*C*H$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2+Na]^+$: 617.2837; gef.: 617.2825; **Smp**.: 148-150 °C; **IR**: 3424*br*, 3184*w*, 3051*m*, 2954*s*, 2931*s*, 2858*s*, 1692*s*, 1590*w*, 1472s, 1428*m*, 1363*w*, 1276*m*, 1257*m*, 1200*s*, 1114*m*, 1032*w*, 968*m*, 835*s*, 779*m*, 741*w*, 703*m*, 508*m.*

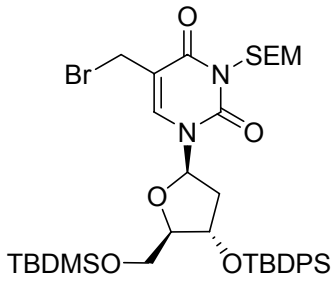
N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-3'-*O-tert*-butyldiphenylsilyl-thymidin **29**[183]



5.30 g (8.6 mmol) **28** wurden unter Argonatmosphäre in 20 mL DCM abs. gelöst und mit 6.10 mL (34.3 mmol, 4.0 eq) Hünig-Base versetzt. Anschließend wurde langsam 2.36 mL (12.9 mmol, 1.5 eq) SEMCl zugetropft. Nach Rühren bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss über Nacht wurden erneut 6.10 mL (34.3 mmol, 4 eq) Hünig-Base und 2.36 mL (12.9 mmol, 1.5 eq) SEMCl zugegeben und weitere 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung in 30 mL DCM aufgenommen und 3 x mit je 40 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und unter verminderten Druck eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 9 : 1) und das Produkt **29** als farbloses Öl erhalten (5.46 g, 7.2 mmol, 85%).

R_f = 0.44 (Isohexan : EE = 7 : 3); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 7.67-7.40 (*m*, 11H; C$_{ar}$*H*, C*H*(6)), 6.31 (*dd*, *J* = 8.45, 5.64 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.21 (*s*, 2H; OCH_2N), 4.33-4.32 (*m*, 1H; C*H*(3')), 4.14-3.93 (*m*, 1H; C*H*(4')), 3.64-3.51 (*m*, 4H; CH_2(5'), SiCH_2CH_2O), 2.18 (*ddd*, *J* = 12.92, 5.52, 1.41 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 1.94 (*ddd*, *J* = 13.60, 10.15, 5.83 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.77 (*d*, *J* = 0.44 Hz, 3H; C(5)CH_3), 1.05 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.85-0.80 (*m*, 2H; SiCH_2CH$_2$O), 0.74 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), -0.05 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$), -0.09 (*s*, 3H; SiCH_3), -0.12 (*s*, 3H; SiCH_3); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 164.41 (*C*O), 150.27 (*C*O), 135.08 (*C*H(6)), 135.07 (*C*$_{ar}$H), 134.29 (*C*$_{ar}$H), 132.56 (*C*$_{ar}$), 132.51 (*C*$_{ar}$), 129.96 (*C*$_{ar}$H), 127.83 (*C*$_{ar}$H), 127.81 (*C*$_{ar}$H), 108.58 (*C*(5)), 87.06 (*C*H(4')), 84.96 (*C*H(1')), 73.60 (*C*H(3')), 69.50 (O*C*H$_2$N), 66.17 (SiCH$_2$*C*H$_2$O), 62.67 (*C*H$_2$(5')), 39.72 (*C*H$_2$(2')), 26.54 (C(*C*H$_3$)$_3$), 25.45 (C(*C*H$_3$)$_3$), 18.47 (*C*(CH$_3$)$_3$), 17.69 (*C*(CH$_3$)$_3$), 17.32 (Si*C*H$_2$CH$_2$O), 12.66 (C(5)*C*H$_3$), -1.54 (Si(*C*H$_3$)$_3$), -5.77 (Si*C*H$_3$), -5.92 (Si*C*H$_3$); **ESI-MS** (neg.): ber. für [$C_{38}H_{60}N_2O_6Si_3$+Cl]$^-$: 759.3453; gef.: 759.3455; **IR**: 3072*w*, 2954*s*, 2931*s*, 2859*s*, 1713*s*, 1674*s*, 1590*w*, 1464s, 1428*m*, 1390*w*, 1362*m*, 1250*s*, 1195*m*, 1105*s*, 1026*w*, 970*m*, 835*s*, 777*m*, 741*w*, 703*m*, 613*m*, 508*m.*

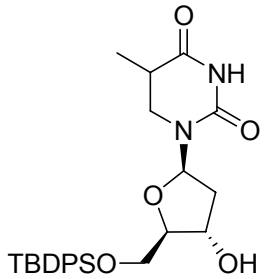
N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-3'-*O-tert*-butyldiphenylsilyl-5-bromomethyl-2'-desoxyuridin **23**[177]



1.50 g (2.1 mmol) **29** wurden unter Argonatmosphäre in 20 mL trockenem CCl_4 gelöst und mit 774 mg (4.4 mmol, 2.1 eq) *N*-Bromsuccinimid und 15.00 mg (0.06 mmol, 0.03 eq) Dibenzoylperoxid versetzt. Anschließend wurde solange auf 70 °C erhitzt, bis das gebildete Succinimid oben auf schwamm. Dieses wurde abfiltriert, mit wenig trockenem CCl_4 nachgewaschen und die Reaktionsmischung *in vacuo* eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 9 : 1) und das Produkt **23** als farbloses Öl erhalten (939 mg, 1.2 mmol, 57%).

***R*$_f$** = 0.23 (Isohexan : EE = 9 : 1); **^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.85 (*s*, 1H; C*H*(6)), 7.65-7.61 (*m*, 5H; $C_{ar}H$), 7.42-7.37 (*m*, 5H; $C_{ar}H$), 6.49 (*dd*, *J* = 8.82, 5.28 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.42 (*s*, 2H; OCH_2N), 4.33-4.32 (*m*, 1H; C*H*(3')), 4.26 (*d*, *J* = 10.51 Hz, 1H; CH_{2b}(5')), 4.18 (*d*, *J* = 10.47 Hz, 1H; CH_{2a}(5')), 4.03 (*bs*, 1H; C*H*(4')), 3.71-3.66 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$), 3.64 (*dd*, *J* = 11.38, 2.10 Hz, 1H; CH_{2b}(5)), 3.16 (*dd*, *J* = 11.58, 2.28 Hz, 1H; CH_{2a}(5)), 2.37 (*ddd*, *J* = 18.23, 13.10, 5.60 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 1.83-1.77 (*m*, 1H; CH_{2a}(2')), 1.09 (*s*, 9H; $C(CH_3)_3$), 0.99-0.97 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$), 0.80 (*s*, 9H; $C(CH_3)_3$), 0.00 (*s*, 9H; $Si(CH_3)_3$), -0.07 (*s*, 3H; $SiCH_3$), -0.09 (*s*, 3H; $SiCH_3$); **^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 161.31 (*C*O), 150.45 (*C*O), 137.86 (*C*H(6)), 135.70 ($C_{ar}H$), 135.66 ($C_{ar}H$), 133.28 (C_{ar}), 133.02 (C_{ar}), 130.05 ($C_{ar}H$), 130.03 ($C_{ar}H$), 127.67 ($C_{ar}H$), 110.98 (*C*(5)), 88.42 (*C*H(4')), 86.40 (*C*H(1')), 74.36 (*C*H(3')), 70.25 (OCH_2N), 67.64 (CH_2(5)), 63.30 ($SiCH_2CH_2O$), 41.87 (CH_2(5')), 26.86 ($C(CH_3)_3$), 26.55 ($C(CH_3)_3$), 26.08 (CH_2(2')), 25.80 ($C(CH_3)_3$), 19.05 ($C(CH_3)_3$), 18.10 ($SiCH_2CH_2O$), -1.43 ($Si(CH_3)_3$), -5.50 ($SiCH_3$), -5.57 ($SiCH_3$); **MALDI-MS** (pos): ber. für $[C_{38}H_{59}BrN_2O_6Si_3+Na]^+$: 827.0; gef.: 827.1.

5'-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-5,6-dihydrothymidin **25**[9]



In 200 mL MeOH/Wasser dest. (1:1) wurden 10.0 g (41 mmol) **1** gelöst und 600 mg Rh/Al_2O_3 (5% Rh) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für drei Wochen unter H_2-Atmosphäre unter Normaldruck gerührt, wobei nach einer Woche nochmals 500 mg Katalysator zugegeben wurden. Es konnte keine vollständige Hydrierung erzielt werden. Der Katalysator wurde über Kieselgur abfiltriert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und 3 x mit Pyridin coevaporiert.
Das Rohprodukt wurde in 50 mL DMF abs. gelöst, mit 6.20 g (90 mmol, 2.2 eq) Imidazol und 11.40 mL (45 mmol, 1.1 eq) TBDPSCl versetzt und 5.5 h unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionsmischung in 200 mL Essigester aufgenommen, 3 x mit je 200 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung und 1 x mit 200 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH = 20 : 1) wurde das Produkt **25** als farbloser Feststoff erhalten (14.00 g, 28 mmol, 71%).

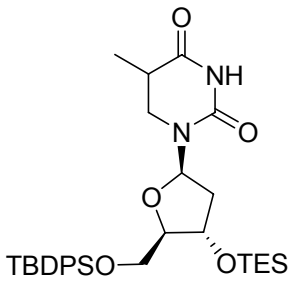
R_f = 0.15 ($CHCl_3$: MeOH = 20 : 1);

Zum Abtrennen des Nebenproduktes 5'-TBDPS-Thymidins vom gewünschten Produkt **25** wurde 6.50 g (13 mmol) des Gemisches in 180 mL THF/Wasser dest. (3:1) gelöst und bei 0 °C mit 2.00 g (20 mmol, 1.5 eq) Kalziumcarbonat und 2.90 g (16 mmol, 1.2 eq) *N*-Bromsuccinimid versetzt.[180] Die Reaktionsmischung wurde 5 Tage gerührt, wobei die Temperatur auf Raumtemperatur anstieg. Die Reaktionsmischung wurde über Celite abfiltriert und *in vacuo* eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH = 15 : 1) wurde das Produkt **25** als farbloser Feststoff erhalten (5.05 g, 9.99 mmol, 99%).

R_f = 0.37 ($CHCl_3$: MeOH = 15 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 10.22 (*s*, 1H; N*H*), 7.65-7.62 (*m*, 5H; $C_{ar}H$), 7.47-7.42 (*m*, 5H; $C_{ar}H$), 6.16 (*t*, *J* = 7.06 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.21 (*d*, *J* = 4.53, 1H; C(3')O*H*), 4.25 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.80-3.66 (*m*, 3H; C*H*(4'), CH_2(5')), 3.34 (*dd*, *J* = 12.51, 5.63 Hz, 1H; CH_{2b}(6)), 2.92 (*dd*, *J* = 12.54, 10.67 Hz, 1H; CH_{2a}(6)), 2.57-

2.52 (*m*, 1H; C*H*(5)), 2.14-2.09 (*m*, 1H; CH_{2b}(2')), 1.89 (*ddd*, *J* = 13.24, 6.57, 3.86 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.00 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.91 (*d*, *J* = 6.97 Hz, 3H; C(5)CH_3); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 173.43 (*C*O), 153.40 (*C*O), 135.60 (*C*$_{ar}$H), 135.46 (*C*$_{ar}$H), 130.39 (*C*$_{ar}$), 130.34 (*C*$_{ar}$), 128.37 (*C*$_{ar}$H), 128.35 (*C*$_{ar}$H), 85.60 (*C*H(4')), 83.16 (*C*H(1')), 70.43 (*C*H(3')), 64.54 (*C*H$_2$(5')), 42.03 (*C*H$_2$(6)), 37.06 (*C*H$_2$(2')), 35.00 (*C*H(5)), 27.16 (C(*C*H$_3$)$_3$), 19.31 (*C*(CH$_3$)$_3$), 12.82 (C(5)*C*H$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{26}H_{34}N_2O_5Si$+Na]$^+$: 505.2129; gef.: 505.2121; **Smp**.: 58-63 °C; **IR**: 3431*br*, 2932*s*, 2858*s*, 1703*s*, 1590*w*, 1473m, 1428*s*, 1390*w*, 1235*m*, 1192*w*, 1113*s*, 1026*w*, 971*m*, 939*w*, 823*s*, 741*s*, 702*s*, 612*m*, 506*s*.

5'-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-3'-*O*-triethylsilyl-5,6-dihydrothymidin **26**[177]

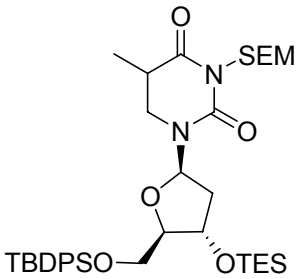


4.90 g (9.7 mmol) **25** wurden unter Argonatmosphäre in 30 mL DMF abs. gelöst und mit 2.07 g (29.1 mmol, 3 eq) Imidazol und 2.52 mL (14.5 mmol, 1.5 eq) TESCl versetzt. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung in 200 mL Chloroform aufgenommen, 6 x mit je 150 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung und 1 x mit 150 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 7 : 3) und das Produkt **26** als farbloses Öl erhalten (5.71 g, 9.6 mmol, 96%).

***R*$_f$** = 0.33 (Isohexan : EE = 7 : 3); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 10.26 (*s*, 1H; N*H*), 7.65-7.61 (*m*, 4H; C$_{ar}$*H*), 7.50-7.36 (*m*, 6H; C$_{ar}$*H*), 6.15 (*t*, *J* = 7.07 Hz, 1H; C*H*(1')), 4.38 (*td*, *J* = 6.66, 3.52, 3.52 Hz, 1H; C*H*(3')), 3.72 (*dd*, *J* = 10.63, 3.72 Hz, 2H; CH_2(5')), 3.64 (*dd*, *J* = 10.58, 3.55 Hz, 1H; C*H*(4')), 3.34 (*dd*, *J* = 12.59, 5.73 Hz, 1H; CH_{2b}(6)), 2.93 (*dd*, *J* = 12.45, 10.61 Hz, 1H; CH_{2a}(6)), 2.60-2.52 (*m*, 1H; C*H*(5)), 2.21 (*ddd*, *J* = 13.75, 6.79, 6.79 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 1.87 (*ddd*, *J* = 13.12, 6.44, 3.58 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.01 (*s*, 9H, C(CH_3)$_3$), 0.94-0.88 (*m*, 12H; Si(CH$_2$CH_3)$_3$, C(5)CH_3), 0.58-0.56 (*m*, 6H; Si(CH_2CH$_3$)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 172.83 (*C*O), 152.85 (*C*O), 134.95 (*C*$_{ar}$H), 134.91 (*C*$_{ar}$H), 132.54 (*C*$_{ar}$), 132.34 (*C*$_{ar}$), 129.91 (*C*$_{ar}$H), 129.82 (*C*$_{ar}$H), 127.80 (*C*$_{ar}$H), 127.76 (*C*$_{ar}$H), 84.94 (*C*H(4')), 82.58 (*C*H(1')), 71.07 (*C*H(3')), 63.35 (*C*H$_2$(5')),

41.45 (CH_2(6)), 36.55 (CH_2(2')), 34.38 (CH(5)), 26.50 (C(CH_3)$_3$), 18.66 (C(CH_3)$_3$), 12.27 (C(5)CH_3), 6.48 (Si(CH_2CH_3)$_3$), 4.05 (Si(CH_2CH_3)$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{32}H_{48}N_2O_5Si_2+H]^+$: 597.3175; gef.: 597.3177; **IR** : 3212*br*, 2956*s*, 2876*m*, 1713*s*, 1590*w*, 1483s, 1428*s*, 1385*m*, 1234*m*, 1191*m*, 1113*s*, 1027*m*, 970*m*, 940*w*, 823*m*, 795*m*, 741*s*, 703*s*, 606*m*, 505*s.*

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-3'-*O*-triethylsilyl-5,6-dihydro-thymidin **22**[151]

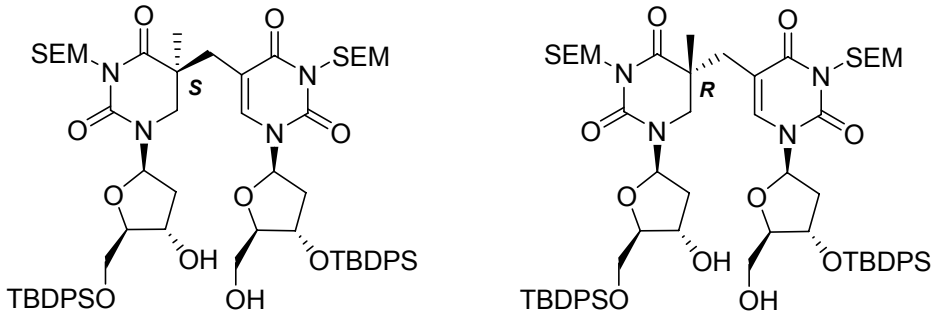


In 10 mL DCM abs. wurden 2.07 g (3.5 mmol) **26** unter Argonatmosphäre gelöst und mit 2.37 mL (13.8 mmol, 4 eq) Hünig-Base versetzt. Anschließend wurde langsam 0.92 mL (5.2 mmol, 1.5 eq) SEMCl zugetropft und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach 4 Tagen war das Edukt vollständig umgesetzt, wobei nach 2 Tagen weitere 2.37 mL (13.8 mmol, 4 eq) Hünig-Base und 0.92 mL (5.2 mmol, 1.5 eq) SEMCl zugegeben wurden. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung in 20 mL DCM aufgenommen und 3 x mit je 50 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 9 : 1) wurde das Produkt **22** als farbloses Öl erhalten (1.98 g, 2.7 mmol, 79%).

R_f = 0.22 (Isohexan : EE = 9 : 1); **^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.70-7.59 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.47-7.41 (*m*, 2H; $C_{ar}H$), 7.41-7.36 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 6.38 (*t*, *J* = 7.14 Hz, 1H; CH(1')), 5.22 (*s*, 2H; OCH_2N), 4.46-4.45 (*m*, 1H; CH(3')), 3.84-3.82 (*m*, 2H; CH_{2b}(5'), CH(4')), 3.72 (*dd*, *J* = 12.20, 3.77 Hz, 1H; CH_{2a}(5')), 3.62 (*dd*, *J* = 9.10, 7.45 Hz, 2H; SiCH_2CH_2O), 3.33 (*dd*, *J* = 12.80, 5.22 Hz, 1H; CH_{2b}(6)), 3.19 (*dd*, *J* = 12.82, 8.92 Hz, 1H; CH_{2a}(6)), 2.55 (*ddd*, *J* = 8.81, 7.06, 5.26 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 2.06-2.00 (*m*, 2H; CH(5), CH_{2a}(2')), 1.11 (*d*, *J* = 7.04 Hz, 3H; C(5)CH_3), 1.07 (*m*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.97-0.90 (*m*, 11H; SiCH_2CH_2O, Si(CH_2CH_3)$_3$), 0.73-0.44 (*m*, 6H; Si(CH_2CH_3)$_3$), -0.01 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 172.62 (CO), 152.98 (CO), 135.58 (C_{ar}H), 135.41 (C_{ar}H), 133.05 (C_{ar}), 132.66 (C_{ar}), 129.99 (C_{ar}H), 129.88 (C_{ar}H), 127.85 (C_{ar}H), 86.41 (CH(4')), 83.38 (CH(1')), 71.69 (CH(3')), 69.80 (OCH_2N), 66.82 (CH_2(5')), 63.68 (SiCH_2CH_2O), 40.80 (CH_2(6)), 38.22 (CH_2(2')), 35.79 (CH(5)), 26.94 (C(CH_3)$_3$), 19.26 (SiCH_2CH_2O), 18.10

(*C*(CH_3)$_3$), 13.30 (C(5)*C*H_3), 6.73 (SiCH_2*C*H_3), 4.71 (Si*C*H_2CH$_3$), -1.42 (Si(*C*H_3)$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{38}H_{62}N_2O_6Si_3$+Na]$^+$: 749.3808; gef.: 749.3830; **IR**: 2955*s*, 2933*m*, 2877*s*, 1728*s*, 1683*s*, 1590*w*, 1472s, 1429*s*, 1392*w*, 1360*w*, 1243*m*, 1191*m*, 1105*s*, 1027*m*, 971*w*, 797*w*, 742*s*, 703*s*, 505*s*.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **30a/b**[151, 186-188]



Zur Herstellung einer LDA-Lösung wurde unter Argonatmosphäre zu 0.66 mL THF abs. 51.7 µL (0.37 mmol, 1.5 eq) Diisopropylamin und 0.23 mL n-BuLi (1.6 M in Hexan) zugetropft und für 1 h bei 0 °C gerührt.

Die LDA-Lösung wurde auf –78 °C abgekühlt, langsam zu einer Lösung aus 177 mg (0.24 mmol) **22**, das zuvor dreimal mit Toluol azeotrop getrocknet wurde, in 1.5 mL THF abs. bei –78 °C zugetropft. Die Lösung wurde 2 h bei –78 °C gerührt, bevor 200 mg (0.25 mmol, 1.2 eq) **23**, gelöst in 2.3 mL THF abs., zugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde 1.5 h bei –78 °C, dann 3 h bei 0 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wurde mit 15 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gequencht und 3 x mit je 8 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-*H*, Isohexan : EE = 7 : 1) wurde das Produkt **21a/b** als gelbes Öl erhalten (310 mg, 0.21 mmol, 88%).

Zur selektiven Entschützung der OH-Gruppen wurde **21a/b** in 40 mL Methanol gelöst und nach Zugabe von 40.7 mg (0.21 mmol, 1 eq) *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit ges. $NaHCO_3$-Lösung neutralisiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der weiße Rückstand wurde in 60 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gelöst und 3 x mit je 70 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Eine folgende säulenchromatographische Aufreinigung (Kieselgel-*H*, $CHCl_3$: MeOH = 50 : 1) ergab einen weißen Feststoff **30a/b** (100 mg, 0.08 mmol, 35%).

Der Feststoff **30a/b** wurde in 4 mL Heptan/Essigester (4:1) gelöst und die Diastereomere mittels *np*-HPLC getrennt. Als Säule wurde eine *VP 250/21 Nucleodur 100-5 np*-Säule und als mobile Phase Heptan/Essigester mit einer Flussrate von 15 mL/min verwendet. Es wurde für jede Trennung 1 mL Lösung durch ein *rheodyne*-Ventil auf die Säule gegeben, so dass pro Trennung ca. 25 mg des Gemisches getrennt wurden. Die Detektion erfolgte bei 250 nm. Der Essigestergradient wurde wie folgt gefahren:

0 – 5 min 30% Essigester
5 – 30 min 30 – 50% Essigester
30 – 40 min 50 – 60% Essigester
40 – 42 min 60% Essigester
42 – 45 min 60 – 30% Essigester
45 – 47 min 30% Essigester

Es wurden insgesamt 68 mg (0.06 mmol, 24%) des *S*-Isomers **30a** und 11 mg (0.01 mmol, 4%) des *R*-Isomers **30b** jeweils als farblose Feststoffe erhalten.

(S)-Diastereomer **30a***:*

$\boldsymbol{R_f}$ = 0.19 ($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1); **^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 7.69 (*s*, 1H; C*H*(6)), 7.65-7.59 (*m*, 10H; $C_{ar}H$), 7.47-7.40 (*m*, 10H; $C_{ar}H$), 6.29 (*dd*, *J* = 7.80, 5.99 Hz, 1H; C*H*(1'B)), 6.25 (*t*, *J* = 7.05 Hz, 1H; C*H*(1'A)), 5.23 (*d*, *J* = 4.58 Hz, 1H; C(3')O*H*), 5.13 (*d*, *J* = 3.85 Hz, 2H; OCH_2N(B)), 5.04 (*d*, *J* = 9.86 Hz, 1H; OCH_{2b}N(A)), 4.99 (*t*, *J* = 5.18 Hz, 1H; C(5')O*H*), 4.91 (*d*, *J* = 9.86 Hz, 1H; OCH_{2a}N(A)), 4.46-4.45 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.21-4.18 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 3.98-3.97 (*m*, 1H; C*H*(4'B)), 3.76 (*dd*, *J* = 10.75, 3.44 Hz, 1H; CH_{2b}(5'A)), 3.72-3.71 (*m*, 1H; C*H*(4'A)), 3.65 (*m*, dd, *J* = 10.76, 4.70 Hz,1H; CH_{2a}(5'A)), 3.51 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$(B)), 3.47-3.39 (*m*, 3H; $SiCH_2CH_2O$(A), CH_{2b}(5'B)), 3.30-3.23 (*m*, 1H; CH_{2a}(5'B)), 3.12 (*d*, *J* = 13.22 Hz, 1H; CH_{2a}(6A)), 3.04 (*d*, *J* = 13.29 Hz, 1H; CH_{2b}(6A)), 2.70 (*d*, *J* = 13.76 Hz, 1H; CH_{2f}(5)), 2.18-2.13 (*m*, 2H; CH_{2e}(5), CH_{2d}(2'B)), 2.06-2.02 (*m*, 1H; CH_{2c}(2'A)), 1.93-1.89 (*m*, 2H; CH_{2c}(2'B), CH_{2d}(2'A)), 1.04 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.99 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.87 (*s*, 3H; C(5A)CH_3), 0.81-0.75 (*m*, 4H; 2 x SiCH_2CH_2O), -0.06 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$), -0.08 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 172.53 (*C*O(4A)), 162.46 (*C*O(4B)), 152.96 (*C*O(2A), 149.98 (*C*O(2B), 137.79 (*C*H(6B)), 135.10 (2 x C_{ar}H), 134.99 (C_{ar}H) 134.87 (C_{ar}H), 132.83 (C_{ar}), 132.58 (C_{ar}), 129.93 (C_{ar}H), 129.76 (C_{ar}H), 129.71 (C_{ar}H), 127.83 (C_{ar}H), 127.75 (C_{ar}H), 127.57 (C_{ar}H), 107.54 (*C*(5B)), 87.75 (*C*H(4'B)), 84.97 (*C*H(1'B), *C*H(4'A)), 83.44 (*C*H(1'A)), 73.65 (*C*H(3'B)), 69.73 (*C*H(3'A)), 69.62 (O*C*H_2N(A)), 69.41 (O*C*H_2N(B)), 66.17 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 65.33 ($SiCH_2CH_2O$(B)), 63.91 (*C*H_2(5'A)), 60.81 (*C*H_2(5'B)), 44.75 (*C*H_2(6A)), 41.06 (*C*H_2(2'B)), 35.95 (*C*H_2(2'A)), 31.50 (*C*H_2(5)), 28.53 (C(*C*H_3)$_3$), 26.56

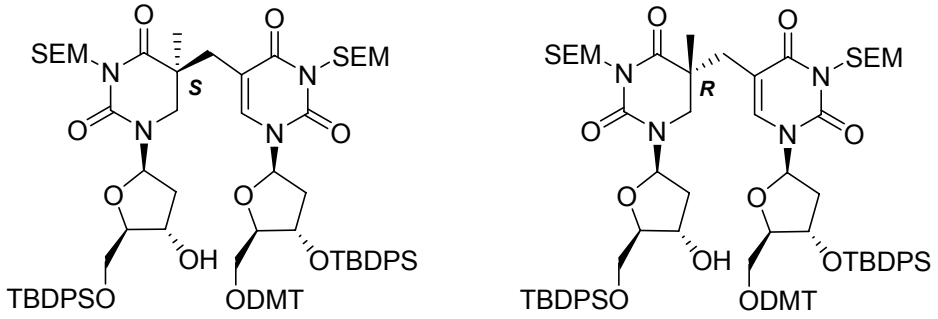
(*C*(CH_3)$_3$), 19.61 (C(5A)*C*H_3), 18.69 (Si*C*$H_2$$CH_2$O(A)), 17.43 (Si*C*$H_2$$CH_2$O(B)), -1.47 (Si(*C*$H_3$)$_3$)*; **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{64}H_{92}N_4O_{12}Si_4$+Na]$^+$: 1243.5681; gef.: 1243.5700; **Smp**.: 65-77 °C; **IR**: 3466*br*, 3072*w*, 2953*m*, 2932*m*, 2859*s*, 1713*s*, 1661*s*, 1589*w*, 1461s, 1428*m*, 1245*m*, 1192*w*, 1087*s*, 1027*w*, 997*w*, 937*w*, 858*m*, 835*s*, 741*m*, 701*s.*

(R)-Diastereomer **30b***:*

***R*$_f$** = 0.16 ($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1); **^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 7.69 (*s*, 1H; C*H*(6)), 7.69-7.59 (*m*, 10H; C_{ar}*H*), 7.47-7.42 (*m*, 10H; C_{ar}*H*), 6.29 (*dd*, *J* = 7.8, 6.0 Hz, 1H; C*H*(1'B)), 6.25 (*t*, *J* = 7. 0 Hz, 1H; C*H*(1'A)), 5.23 (*d*, *J* = 4.6 Hz, 1H; C(3')O*H*), 5.13 (*d*, *J* = 4. 0 Hz, 2H; OCH_2N(B)), 5.04 (*d*, *J* = 9.9 Hz, 1H; OCH_{2b}N(A)), 4.99 (*t*, *J* = 5.2 Hz, 1H; C(5'B)O*H*), 4.90 (*d*, *J* = 9.9 Hz, 1H; OCH_{2a}N(A)), 4.47-4.46 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.20-4.19 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 3.98-3.97 (*m*, 1H; C*H*(4'B)), 3.77-3.76 (*m*, 1H; C*H*(4'A)), 3.75-3.74 (*m*, 1H; CH_{2b}(5'A)), 3.72-3.71 (*m*, 1H; CH_{2a}(5'A)), 3.65 (*dd*, *J* = 10.7, 4.7 Hz, 2H; SiCH_2CH_2O(B)), 3.44-3.42 (*m*, 3H; SiCH_2CH_2O(A), CH_{2b}(5'B)), 3.12-3.11 (*m*, 1H; CH_{2a}(5'B)), 3.11 (*d*, *J* = 13.2 Hz, 1H; CH_{2a}(6A)), 3.04 (*d*, *J* = 13.2 Hz, 1H; CH_{2b}(6A)), 2.70 (*d*, *J* = 13.8 Hz, 1H; CH_{2f}(5)), 2.18-2.12 (*m*, 2H; CH_{2e}(5), CH_{2d}(2'B)) , 2.04 (*dd*, *J* = 13.6, 6.9 Hz, 1H; CH_{2c}(2'A)), 1.92-1.89 (*m*, 2H; CH_{2c}(2'B), CH_{2d}(2'A)), 1.04 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.99 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.86 (*s*, 3H; C(5A)CH_3), 0.81-0.73 (*m*, 4H; 2 x Si$CH_2$$CH_2$O), -0.06 (*s*, 9H; Si(C$H_3$)$_3$), -0.08 (*s*, 9H; Si(C$H_3$)$_3$); **^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 173.10 (*C*O(4A)), 162.46 (*C*O(4B)), 151.76 (*C*O(2A), 150.06 (*C*O(2B), 137.88 (*C*H(6B)), 135.10 (C_{ar}H), 134.99 (C_{ar}H) 134.96 (C_{ar}H), 132.72 (C_{ar}), 132.64 (C_{ar}), 129.92 (C_{ar}H), 129.75 (C_{ar}H), 129.72 (C_{ar}H), 127.84 (C_{ar}H), 127.82 (C_{ar}H), 127.77 (C_{ar}H), 107.59 (*C*(5B)), 87.69 (*C*H(4'B)), 84.46 (*C*H(4'A)), 84.98 (*C*H(1'B)), 83.53 (*C*H(1'A)), 73.64 (*C*H(3'B)), 70.25 (*C*H(3'A)), 69.64 (O*C*H_2N(A)), 69.21 (O*C*H_2N(B)), 66.14 (SiCH_2*C*H_2O(A)), 65.21 (SiCH_2*C*H_2O(B)), 64.51 (*C*H_2(5'A)), 60.81 (*C*H_2(5'B)), 44.74 (*C*H_2(6A)), 40.83 (*C*H_2(2'B)), 38.80 (*C*H_2(2'A)), 31.80 (*C*H_2(5)), 26.58 (C(*C*H_3)$_3$), 26.46 (C(*C*H_3)$_3$), 19.34 (C(5A)*C*H_3), 18.61 (*C*(CH_3)$_3$), 18.53 (*C*(CH_3)$_3$), 17.44 (Si*C*$H_2$$CH_2$O(A)), 17.21 (Si*C*$H_2$$CH_2$O(B)), -1.48 (Si(*C*$H_3$)$_3$)*; **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{64}H_{92}N_4O_{12}Si_4$+Na]$^+$: 1243.5681; gef.: 1243.5701; **Smp**.: 66-75 °C; **IR**: 3412*br*, 3072*w*, 2954*s*, 2930*s*, 2858*s*, 1710*s*, 1664*s*, 1589*w*, 1461*s*, 1428*m*, 1246*m*, 1194*w*, 1085*m*, 1053*m*, 1006*m*, 937*w*, 939*w*, 859*w*, 822*s*, 742*w*, 702*s*.

* das quatäre C(5A) liegt hierbei unter dem Lösungsmittelsignal

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **31a/b**[189]



(S)-Diastereomer:

In 0.8 mL Pyridin wurden 168 mg (0.14 mmol) **30a**, welches zuvor dreimal mit Pyridin azeotrop getrocknet wurde, gelöst, mit Molsieb (4 Å) versetzt und 3 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Zugleich wurden 124 mg (0.28 mmol, 2 eq) Dimethoxytrityltriflat **38** in 0.4 mL Pyridin gelöst und über Molsieb (4 Å) unter Argonatmosphäre gerührt. **38** wurde zum Dimer zugegeben und weitere 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 1 mL MeOH gequencht, das Molsieb über Kieselgur abfiltriert, mit wenig DCM nachgewaschen und unter vermindertem Druck eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-*H*, $CHCl_3$: MeOH : Pyr = 50 : 1 : 0.1) wurde das Produkt **31a** als blass gelber, klebriger Feststoff erhalten (176 mg, 0.14 mmol, 84%).

***R*$_f$** = 0.29 ($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, Aceton-d$_6$)**: δ = 7.50-7.30 (*m*, 4H; C$_{ar}$*H*), 7.27-7.13 (*m*, 4H; C$_{ar}$*H*), 7.47-7.29 (*m*, 16H; C$_{ar}$*H,* C*H*(6B)), 7.26-7.17 (*m*, 6H; C$_{ar}$*H*), 6.81-6.79 (*m*, 4H; C$_{ar}$*H*), 6.41-6.36 (*m*, 2H; C*H*(1'A), C*H*(1'B)), 5.26 (*s*, 2H; OCH_2N(B)), 5.05 (*d*, *J* = 9.73 Hz, 1H; OCH_{2b}N(A)), 5.00 (*d*, *J* = 9.74 Hz, 1H; OCH_{2a}N(A)), 4.50-4.49 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.46-4.41 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 4.24-4.21 (*m*, 1H; C*H*(4'B)), 3.88-3.87 (*m*, 1H; C*H*(4'A)), 3.85-3.78 (*m*, 2H; CH_2(5'A)), 3.75 (*s*, 6H; 2 x OCH_3), 3.66-3.57 (*m*, 2H; SiCH$_2$CH_2O(B)), 3.48 (*t*, *J* = 7.81 Hz, 2H; SiCH$_2$CH_2O(A)), 3.19-2.99 (*m*, 4H; CH_2(6A), CH_2(5'B)), 2.61 (*d*, *J* = 13.89 Hz, 1H; CH_{2b}(5)), 2.34 (*ddd*, *J* = 13.46, 5.79, 2.96 Hz, 1H; CH_{2b}(2'B)), 2.12-2.07 (*m*, 2H; CH_{2b}(2'A), CH_{2a}(5)), 2.03-1.93 (*m*, 2H; CH_{2a}(2'B), CH_{2a}(2'A)), 1.06 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 1.05 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.93-0.76 (*m*, 7H; C(5A)CH_3, 2 x SiCH_2CH$_2$O), -0.02 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$), -0.04 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, Aceton-d$_6$)**: δ = 175.51 (*C*O(4A)), 164.81 (*C*O(4B)), 160.60 (*C*$_{ar}$), 154.26 (*C*O(2A), 152.46 (*C*O(2B), 146.75 (*C*$_{ar}$), 139.53 (*C*H(6B)), 137.55 (*C*$_{ar}$H), 137.49 (*C*$_{ar}$H) 137.40 (*C*$_{ar}$H), 137.30 (*C*$_{ar}$H), 135.12 (*C*$_{ar}$), 135.12 (*C*$_{ar}$), 135.00 (*C*$_{ar}$), 134.89 (*C*$_{ar}$), 131.95

(C_{ar}H), 131.91 (C_{ar}H), 131.71 (C_{ar}H), 131.69 (C_{ar}H), 129.97 (C_{ar}H), 129.93 (C_{ar}H), 129.79 (C_{ar}H), 129.72 (C_{ar}H), 129.64 (C_{ar}H), 125.56 (C_{ar}H), 114.94 (C_{ar}H), 110.35 (*C*(5B)), 88.06 (*C*H(1'A)), 88.02 (*C*H(1'B)), 87.35 (*C*H(4'A)), 85.91 (*C*H(4'B)), 75.70 (*C*H(3'B)), 72.34 (*C*H(3'A)), 71.95 (O*C*H_2N(A)), 71.90 (O*C*H_2N(A)), 68.68 (*C*H_2(5'A)), 67.80 (SiCH_2*C*H_2O(A)), 66.23 (SiCH_2*C*H_2O(B)), 65.72 (*C*H_2(5'B)), 56.54 (O*C*H_3), 47.05 (*C*H_2(6A)), 43.34 (*C*(5A), 41.63 (*C*H_2(2'A)), 40.74 (*C*H_2(2'B)), 34.27 (*C*H_2(5)), 28.33 (C(*C*H_3)$_3$), 28.25 (*C*(CH_3)$_3$), 21.74 (*C*(CH_3)$_3$), 20.75 (C(5A)*C*H_3), 19.66 (Si*C*$H_2$$CH_2$O(A)), 19.54 (Si*C*$H_2$$CH_2$O(B)), -0.12 (Si(*C*$H_3$)$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{85}H_{110}N_4O_{14}Si_4+NH_4]^+$: 1540.7434; gef.: 1540.7580; **IR**: 3492*br*, 2953*s*, 2859*s*, 1719*s*, 1663*s*, 1509*m*, 1460s, 1428*m*, 1392*w*, 1246*s*, 1182*m*, 1084*s*, 1032*w*, 995*m*, 936*w*, 833*s*, 743*w*, 700*s*, 611*m.*

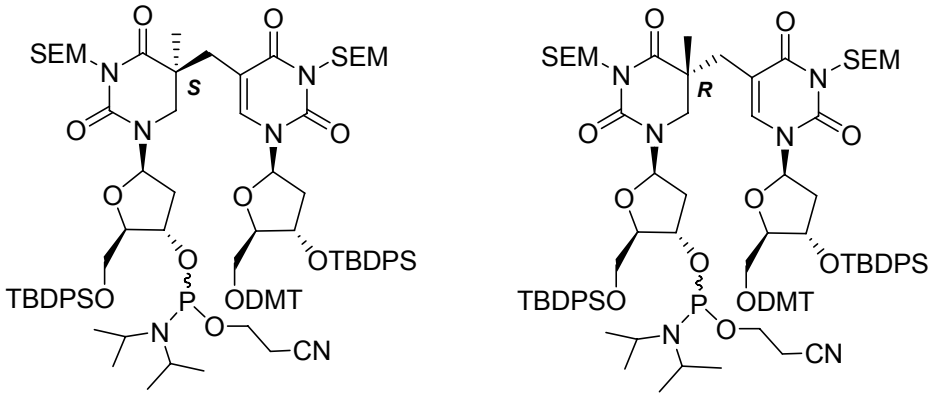
(R)-Diastereomer:

In 0.3 mL Pyridin wurden 88 mg (0.07 mmol) **30b**, welches zuvor dreimal mit Pyridin azeotrop getrocknet wurde, gelöst, mit Molsieb (4 Å) versetzt und 3 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Zugleich wurden 62 mg (0.14 mmol, 2 eq) Dimethoxytrityltriflat **38** in 0.3 mL Pyridin gelöst und über Molsieb (4 Å) unter Argonatmosphäre gerührt. **38** wurde zum Dimer zugegeben und weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 1 mL MeOH gequencht, das Molsieb über Kieselgur abfiltriert, mit wenig DCM nachgewaschen und unter vermindertem Druck eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-*H*, $CHCl_3$: MeOH : Pyr = 50 : 1 : 0.1) und das Produkt **31b** als blass gelber, klebriger Feststoff erhalten (110 mg, 0.07 mmol, 100%).

$\boldsymbol{R_f}$ = 0.25 ($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, Aceton-d$_6$)**: δ = 7.78-7.71 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 7.67-7.60 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 7.47-7.29 (*m*, 16H; C_{ar}*H,* C*H*(6)), 7.26-7.17 (*m*, 6H; C_{ar}*H*), 6.90-6.70 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 6.48-6.19 (*m*, 2H; C*H*(1'A), C*H*(1'B)), 5.27 (*s*, 2H; OCH_2N(B)), 5.13 (*d*, *J* = 9.69 Hz, 1H; OCH_{2b}N(A)), 5.05 (*d*, *J* = 9.69 Hz, 1H; OCH_{2a}N(A)), 4.57-4.50 (*m*, 2H; C*H*(3'B), C*H*(3'A)), 4.19-4.18 (*m*, 1H; C*H*(4'B)), 4.13-4.12 (*m*, 1H; C*H*(4'A)), 3.76 (*s*, 6H; 2 x OCH_3), 3.71 (*dd*, *J* = 7.80, 3.73 Hz, 2H; CH_2(5'A)), 3.65-3.60 (*m*, 2H; SiCH_2CH_2O(B)), 3.53 (*t*, *J* = 7.85 Hz, 2H; SiCH_2CH_2O(A)), 3.41 (*d*, *J* = 13.35 Hz, 1H; CH_{2b}(6A)), 3.27 (*d*, *J* = 13.34 Hz, 1H; CH_{2a}(6A)), 3.18 (*dd*, *J* = 10.30, 4.20 Hz, 1H; CH_{2b}(5'B)), 3.09 (*dd*, *J* = 10.29, 4.92 Hz, 1H; CH_{2a}(5'B)), 2.85 (*bs*, 1H; CH_{2b}(5)), 2.66-2.56 (*m*, 1H; CH_{2b}(2'B)), 2.35 (*ddd*, *J* = 13.48, 5.99, 3.09 Hz, 1H; CH_{2b}(2'A)), 2.12-2.11 (*m*, 1H; CH_{2a}(2'A)), 2.10-2.06 (*m*, 1H; CH_{2a}(5)), 1.92-1.84 (*m*, 1H; CH_{2a}(2'B)), 1.06 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 1.05 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.93 (*s*, 3H; C(5A)CH_3), 0.90-0.80 (*m*, 4H; 2 x Si*C*$H_2$$CH_2$O), -0.02 (*s*, 9H; Si(C$H_3$)$_3$), -0.03 (*s*, 9H; Si(C$H_3$)$_3$); **^{13}C-NMR**

(100 MHz, Aceton-d_6): δ = 175.51 (*C*O(4A)), 164.81 (*C*O(4B)), 160.61 (C_{ar}), 154.26 (*C*O(2A)), 152.46 (*C*O(2B)), 146.75 (C_{ar}), 139.53 (*C*H(6B)), 137.54 (C_{ar}H), 137.51 (C_{ar}H) 137.49 (C_{ar}H), 137.43 (C_{ar}H), 135.12 (C_{ar}), 135.12 (C_{ar}), 135.00 (C_{ar}), 134.89 (C_{ar}), 131.93 (C_{ar}H), 131.91 (C_{ar}H), 131.71 (C_{ar}H), 131.69 (C_{ar}H), 129.97 (C_{ar}H), 129.78 (C_{ar}H), 129.77 (C_{ar}H), 129.72 (C_{ar}H), 128.65 (C_{ar}H), 125.56 (C_{ar}H), 114.95 (C_{ar}H), 110.35 (*C*(5B)), 89.47 (*C*H(4'A)), 88.22 (*C*H(4'B)), 87.79 (*C*H(1'B)), 87.43 (*C*H(1'A)), 73.36 (*C*H(3'A)), 71.94 (O*C*H_2N(A)), 71.55 (O*C*H_2N(A)), 68.63 (SiCH_2*C*H_2O(A)), 67.67 (SiCH_2*C*H_2O(B)), 66.78 (*C*H_2(5'A)), 65.60 (*C*H_2(5'B)), 56.55 (O*C*H_3), 47.05 (*C*H_2(6A)), 43.34 (*C*(5A)), 41.63 (*C*H_2(2'A)), 40.74 (*C*H_2(2'B)), 34.27 (*C*H_2(5)), 28.29 (C(*C*H_3)$_3$), 28.25 (*C*(CH$_3$)$_3$), 21.74 (*C*(CH$_3$)$_3$), 20.75 (C(5A)*C*H_3), 19.66 (Si*C*H_2CH$_2$O(A)), 19.54 (Si*C*H_2CH$_2$O(B)), -0.14 (Si(*C*H$_3$)$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{85}H_{110}N_4O_{14}Si_4+H]^+$: 1523.7168; gef.: 1523.7312; **IR**: 3390*br*, 2954*s*, 2862*s*, 1718*s*, 1660*s*, 1507*m*, 1461*s*, 1425*m*, 1390*w*, 1244*s*, 1181*m*, 1082*s*, 1030*w*, 993*m*, 935*w*, 832*s*, 743*w*, 701*s*, 610*m.*

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-3'-*O*-*β*-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-aminophosphanoxy-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyl-diphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **18a/b**[213]



(S)-Diastereomer:

120 mg (0.08 mmol) **31a** wurden in 0.6 mL THF abs. unter Argonatmosphäre gelöst, mit 54 µL (0.32 mmol, 4 eq) Hünig-Base versetzt und 3 x entgast. Nach Abkühlen auf 0 °C wurden 33 µL (0.12 mmol, 1.5 eq) CEDCl zugegeben und 5 h unter Auftauen des Eisbades gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt schnell säulenchromatographisch aufgereinigt (deaktiviertes Kieselgel-60, Isohexan : EE = 3 : 1). Das Produkt **18a** konnte als farbloser Feststoff erhalten werden (100 mg, 0.06 mmol, 73%).

R_f = 0.12 (Isohexan : EE = 3 : 1); **^{31}P-NMR (200 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 149.52, 149.30; **^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.71-7.60 (*m*, 4H, $C_{ar}H$), 7.60-7.51 (*m*, 4H, $C_{ar}H$), 7.45-7.24 (*m*, 16H, $C_{ar}H$, C*H*(6)), 7.20-7.09 (*m*, 6H, $C_{ar}H$), 6.75-6.65 (*m*, 4H, $C_{ar}H$), 6.42-6.30 (*m*, 2H, C*H*(1'A), C*H*(1'B)), 5.32-5.24 (*m*, 2H, OCH_2N(B)), 5.09 (*d*, *J* = 9.63 Hz, 1H, OCH_{2b}N(A)), 5.04-4.98 (*m*, 1H, OCH_{2a}N(A)), 4.42-4.32 (*m*, 1H, C*H*(3'B)), 4.19-4.12 (*m*, 2H, C*H*(3'A), C*H*(4'B)), 4.11-4.04 (*m*, 2H, CH_{2b}(5'A), C*H*(4'A)), 3.84-3.83 (*m*, 1H, CH_{2a}(5'A)), 3.75 (*s*, 6H, 2 x OCH_3), 3.66-3.58 (*m*, 4H, $SiCH_2CH_2O$(B), OCH_2CH_2CN), 3.53-3.47 (*m*, 3H, $SiCH_2CH_2O$(A), CH_{2b}(5'B)), 3.45-3.39 (*m*, 1H, CH_{2a}(5'B)), 3.16-3.08 (*m*, 3H, $N(CH(CH_3)_2)_2$, CH_{2b}(6A)), 3.05-2.96 (*m*, 2H, CH_{2a}(6A), $CH_{2b}CN$), 2.62-2.49 (*m*, 2H, $CH_{2a}CN$, CH_{2b}(5)), 2.33-2.22 (*m*, 2H, CH_{2b}(2'B), CH_{2a}(5)), 2.15-2.10 (*m*, 2H, CH_{2a}(2'B), CH_{2b}(2'A)), 2.04-1.92 (*m*, 1H, CH_{2a}(2'A)), 1.84-1.73 (*m*, 6H, $NCH(CH_3)_2$), 1.42-1.32 (*m*, 6H, $NCH(CH_3)_2$), 1.15-1.11 (*m*, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.07-1.00 (*m*, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.97-0.85 (*m*, 7H, C(5)CH_3, 2 x $SiCH_2CH_2O$), -0.01 (*s*, 9H, $Si(CH_3)_3$), -0.04 (*s*, 9H, $Si(CH_3)_3$); **^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 172.97 (*C*O(4A)), 163.05 (*C*O(4B)), 158.42 (C_{ar}), 152.77 (*C*O(2A)), 150.62 (*C*O(2B)), 144.63 (C_{ar}), 139.48 (*C*H(6B)), 135.68 (C_{ar}H), 135.63 (C_{ar}H) 135.61 (C_{ar}H), 135.56 (C_{ar}H), 133.13 (C_{ar}), 133.06 (C_{ar}), 132.72 (C_{ar}), 130.00 (C_{ar}H), 129.98 (C_{ar}H), 129.97 (C_{ar}H), 129.83 (C_{ar}H), 129.81 (C_{ar}H), 128.04 (C_{ar}H), 128.02 (C_{ar}H), 127.88 (C_{ar}H), 126.81 (C_{ar}H), 123.68 (C_{ar}H), 116.77 (C_{ar}H), 116.59 (C_{ar}H), 113.07 (CH_2CN), 108.38 (*C*(5B)), 86.39 (*C*H(4'A)), 86.33 (*C*H(4'B)), 85.52 (*C*H(1'B)), 84.08 (*C*H(1'A)), 73.72 (*C*H(3'A)), 71.01 (*C*H(3'B)), 70.33 (OCH_2N(A)), 70.24 (OCH_2N(B)), 67.40 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 66.57 ($SiCH_2CH_2O$(B)), 63.75 (CH_2(5'A)), 63.73 (CH_2(5'B)), 60.11 (OCH_2CH_2CN), 55.15 (OCH_3), 46.35 (*C*(5A)), 43.25 (CH_2(6A)), 41.93 ($NCH(CH_3)_2$), 41.87 ($NCH(CH_3)_2$), 40.24 (CH_2(2'A)), 38.72 (CH_2(2'B)), 32.52 (CH_2(5)), 26.87 ($C(CH_3)_3$), 26.46 (C(5)CH_3), 22.53 ($C(CH_3)_3$), 22.41 ($C(CH_3)_3$), 19.23 ($NCH(CH_3)_2$), 19.02 ($NCH(CH_3)_2$), 18.15 (OCH_2CH_2CN), 18.04 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 17.59 ($SiCH_2CH_2O$(B)), -1.37 ($Si(CH_3)_3$), -1.39 ($Si(CH_3)_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{94}H_{127}N_6O_{15}PSi_4+NH_4]^+$: 1740.8512; gef.: 1740.8615.

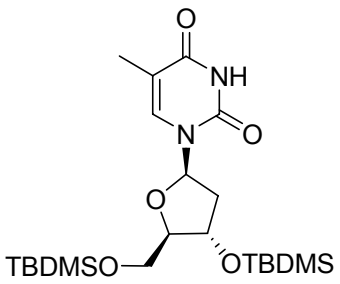
(R)-Diastereomer:

100 mg (0.07 mmol) **31b** wurden in 0.5 mL THF abs. unter Argonatmosphäre gelöst, mit 45 µL (0.26 mmol, 4 eq) Hünig-Base versetzt und 3 x entgast. Nach Abkühlen auf 0 °C wurden 28 µL (0.10 mmol, 1.5 eq) CEDCl zugegeben und 5.5 h unter Auftauen des Eisbades gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand schnell säulenchromatographisch gereinigt (deaktiviertes Kieselgel-60, Isohexan : EE = 3 : 1). Das Produkt **18b** wurde als farbloser Feststoff erhalten (101 mg, 0.06 mmol, 89%).

R_f = 0.10 (Isohexan : EE = 3 : 1); **^{31}P-NMR (200 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 149.47, 149.44; **^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)**:. δ = 7.70-7.64 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.60-7.53 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.44-7.30 (*m*, 16H; $C_{ar}H$, C*H*(6)), 7.30-7.23 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 6.73-6.71 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 6.39-6.34 (*m*, 2H; C*H*(1'A), C*H*(1'B)), 5.30 (*d*, *J* = 3.99 Hz, 2H; OCH_2N(B)), 5.16 (*d*, *J* = 9.63 Hz, 1H; OCH_{2b}N(A)), 4.98 (*d*, *J* = 9.67 Hz, 1H; OCH_{2a}N(A)), 4.65-4.50 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.42-4.40 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 4.04-4.02 (*m*, 2H; C*H*(4'B), C*H*(4'A)), 3.74 (*s*, 6H; 2 x OCH_3), 3.70-3.59 (*m*, 6H; CH_2(5'A), SiCH$_2$CH_2O(B), OCH_2CH$_2$CN), 3.59-3.55 (*m*, 3H; SiCH$_2$CH_2O(A), CH_{2b}(6A)), 3.45-3.37 (*m*, 1H; CH_{2a}(6A)), 3.27-3.17 (*m*, 2H; N(C*H*(CH$_3$)$_2$)$_2$), 3.15-3.10 (*m*, 1H; CH_{2b}(5'B)), 3.01 (*dd*, *J* = 10.17, 4.54 Hz, 1H; CH_{2a}(5'B)), 3.03-2.99 (*m*, 1H; CH_{2b}CN), 2.72-2.61 (*m*, 1H; CH_{2a}CN), 2.58-2.49 (*m*, 1H; CH_{2b}(5)), 2.40-2.36 (*m*, 1H; CH_{2b}(2'B)), 2.30-2.21 (*m*, 1H; CH_{2b}(2'A)), 1.94-1.92 (*m*, 1H; CH_{2a}(5)), 1.28-1.16 (*m*, 2H; CH_{2a}(2'B), CH_{2a}(2'A)), 1.26-1.12 (*m*, 12H; N(CH(CH_3)$_2$)$_2$), 1.06 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 1.04 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.95-0.86 (*m*, 7H; C(5A)CH_3, 2 x SiCH_2CH$_2$O), -0.01 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$), -0.04 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 173.27 (*C*O(4A)), 163.00 (*C*O(4B)), 158.44 (*C*$_{ar}$), 152.22 (*C*O(2A)), 150.69 (*C*O(2B)), 144.64 (*C*$_{ar}$), 139.48 (*C*H(6B)), 135.68 (*C*$_{ar}$H), 135.64 (*C*$_{ar}$H) 135.62 (*C*$_{ar}$H), 135.59 (*C*$_{ar}$H), 133.15 (*C*$_{ar}$), 133.14 (*C*$_{ar}$), 133.11 (*C*$_{ar}$), 130.01 (*C*$_{ar}$H), 129.97 (*C*$_{ar}$H), 129.92 (*C*$_{ar}$H), 129.80 (*C*$_{ar}$H), 129.11 (*C*$_{ar}$H), 128.06 (*C*$_{ar}$H), 127.83 (*C*$_{ar}$H), 127.78 (*C*$_{ar}$H), 126.78 (*C*$_{ar}$H), 123.67 (*C*$_{ar}$H), 117.48 (*C*$_{ar}$H), 116.94 (*C*$_{ar}$H), 113.08 (CH$_2$*C*N), 108.70 (*C*(5B)), 86.32 (*C*H(4'A)), 85.67 (*C*H(4'B)), 85.61 (*C*H(1'B)), 81.39 (*C*H(1'A)), 73.66 (*C*H(3'A), 71.01 *C*H(3'B)), 70.38 (O*C*H$_2$N(A)), 70.04 (O*C*H$_2$N(B)), 67.37 (SiCH$_2$*C*H$_2$O(A)), 66.45 (SiCH$_2$*C*H$_2$O(B)), 64.29 (*C*H$_2$(5'A)), 63.81 (*C*H$_2$(5'B)), 60.36 (O*C*H$_2$CH$_2$CN), 55.15 (O*C*H$_3$), 45.09 (*C*(5A), 43.21 (*C*H$_2$(6A)), 42.14 (N*C*H(CH$_3$)$_2$), 41.77 (N*C*H(CH$_3$)$_2$), 40.27 (*C*H$_2$(2'A)), 38.38 (*C*H$_2$(2'B)), 32.88 (*C*H$_2$(5)), 26.84 (C(*C*H$_3$)$_3$), 24.55 (C(5A)*C*H$_3$), 22.61 (*C*(CH$_3$)$_3$), 22.37 (*C*(CH$_3$)$_3$), 20.62 (NCH(*C*H$_3$)$_2$), 20.20 (NCH(*C*H$_3$)$_2$), 19.63 (OCH$_2$*C*H$_2$CN), 19.01 (Si*C*H$_2$CH$_2$O(A)), 18.15 (Si*C*H$_2$CH$_2$O(B)), -0.14 (Si(*C*H$_3$)$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{94}H_{127}N_6O_{15}PSi_4+NH_4]^+$: 1740.8512; gef.: 1740.8535.

5.3 Synthese des SP 19a/b

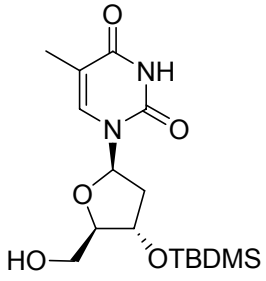
5,3'-*O*-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-thymidin **39**[177]



In 50 mL DMF abs. wurden 5.00 g (20.7 mmol) Thymidin (**1**), 8.40 g (124.0 mmol, 6 eq) Imidazol und 9.30 g (62.0 mmol, 3 eq) TBDMSCl unter Stickstoffatmosphäre gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 150 mL Chloroform aufgenommen, 5 x mit je 200 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH = 20 : 1) wurde ein farbloser Feststoffe **39** erhalten (9.60 g, 19.5 mmol, 97%).

R_f = 0.29 ($CHCl_3$: MeOH = 20 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)**: δ = 11.34 (*s*, 1H; N*H*), 7.43 (*d*, *J* = 1.19 Hz, 1H; C*H*(6)), 6.15 (*dd*, *J* = 7.80, 6.15 Hz, 1H; C*H*(1')), 4.36-4.35 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.81-3.68 (*m*, 3H; C*H*(4'), CH_2(5')), 2.19 (*ddd*, *J* = 13.61, 7.82, 6.02 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 2.05 (*ddd*, *J* = 13.24, 6.11, 3.02 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.77 (*d*, *J* = 1.09 Hz, 3H; C(5)CH_3), 0.88-0.84 (*m*, 18H; 2 x C(CH_3)$_3$), 0.08-0.07 (*m*, 12H; 2 x Si(CH_3)$_2$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6)**: δ = 163.45 (*C*O), 150.22 (*C*O), 135.37 (*C*H(6)), 109.38 (*C*(5)), 86.54 (*C*H(4')), 83.55 (*C*H(1')), 71.89 (*C*H(3')), 62.55 (*C*H_2(5')), 39.01 (*C*H_2(2')), 25.66 (C(*C*H_3)$_3$), 25.51 (C(*C*H_3)$_3$), 17.85 (*C*(CH$_3$)$_3$), 17.53 (*C*(CH$_3$)$_3$), 12.06 (C(5)*C*H_3), -3.35 (Si(*C*H_3)$_2$), -4.93 (Si(*C*H_3)$_2$), -5.08 (Si(CH$_3$)$_2$), -5.64 (Si(CH$_3$)$_2$); **APCI-MS** (pos.): ber. für [$C_{22}H_{42}N_2O_5Si_2$+Na]$^+$: 493.2524; gef.: 493.2539; **Smp**.: 53-59 °C; **IR**: 3432*br*, 3176*w*, 3042*w*, 2955*s*, 2930*s*, 2896*w*, 2858*m*, 1706*s*, 1472s, 1402*w*, 1362*m*, 1275*m*, 1257*m*, 1198*m*, 1104*m*, 1035*w*, 969*m*, 890*w*, 837*s*, 778*s*, 673*w*.

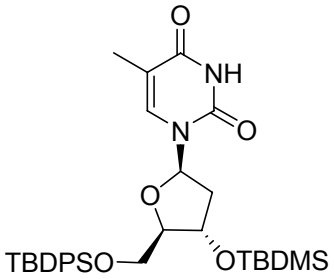
3'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-thymidin **40**[177]



Zu einer Lösung aus 9.50 g (19.3 mmol) **39** in 110 mL DCM abs. bei 0 °C wurde unter Stickstoffatmosphäre 11.03 mL (129.0 mmol, 6.7 eq) TFA/H_2O (10:1) zugegeben. Nach 7 h rühren bei 0 °C wurde die Reaktionsmischung mit je 100 mL kalten Wasser dest., ges. $NaHCO_3$-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH = 30 : 1) und das Produkt **40** als farbloser Feststoff erhalten (5.45 g, 15.3 mmol, 77%).

***R*f** = 0.38 ($CHCl_3$: MeOH = 20 : 3); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 11.30 (*s*, 1H; N*H*), 7.66 (*d*, *J* = 1.19 Hz, 1H; C*H*(6)), 6.15 (*dd*, *J* = 7.79, 6.07 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.08 (*t*, *J* = 5.15 Hz, 1H; C(5)O*H*), 4.41 (*td*, *J* = 5.74, 2.82, 2.82 Hz, 1H; C*H*(3')), 3.75-3.74 (*m*, 1H; C*H*(4')), 3.64-3.44 (*m*, 2H; CH_2(5')), 2.18 (*ddd*, *J* = 13.56, 7.82, 2.82 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 2.02 (*ddd*, *J* = 13.20, 6.02, 2.96 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.77 (*d*, *J* = 1.08 Hz, 3H; C(5)C*H*(3')), 0.87 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.08 (*s*, 6H; Si(CH_3)$_2$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 164.15 (*C*O), 150.92 (*C*O), 136.49 (*C*H(6)), 109.89 (*C*(5)), 87.83 (*C*H(4')), 84.20 (*C*H(1')), 72.65 (*C*H(3')), 61.46 (*C*H_2(5')), 39.43 (*C*H_2(2')), 26.17 (C(*C*H_3)$_3$), 18.17 (*C*(CH$_3$)$_3$), 12.71 (C(5)*C*H_3), -4.32 (Si(*C*H_3)$_2$), -4.38 (Si(CH$_3$)$_2$); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{16}H_{29}N_2O_5Si+H]^+$: 357.1840; gef.: 357.1846; **Smp**.: 105 °C; **IR**: 3437*br*, 3065*w*, 2930*s*, 2858*s*, 1695*s*, 1473s, 1363*w*, 1276*m*, 1256*m*, 1199*w*, 1132*w*, 1106*m*, 1062*w*, 1034*w*, 959*w*, 877*m*, 837*s*, 779*s.*

5'-*O-tert*-Butyldiphenylsilyl-3'-*O-tert*-butyldimethyl-thymidin **41**

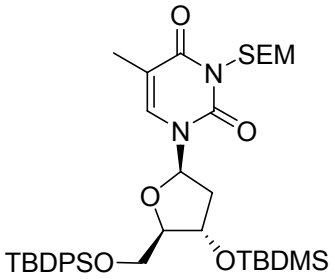


In 20 mL DMF abs. wurden 2.00 g (5.6 mmol) **40** unter Stickstoffatmosphäre gelöst und mit 840 mg (12.3 mmol, 2.2 eq) Imidazol und 1.60 mL (6.2 mmol, 1.1 eq) TBDPSCl versetzt. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung in 70 mL Essigester aufgenommen, 3 x mit je 70 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung und 1 x mit 70 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 7 : 3) und **41** als farbloser Feststoff erhalten (2.08 g, 3.5 mmol, 62%).

***R*f** = 0.25 (Isohexan : EE = 7 : 3); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 11.36 (*s*, 1H; N*H*), 7.80-7.14 (*m*, 11H; C$_{ar}$*H*, C*H*(6)), 6.18 (*t*, *J* = 6.84 Hz, 1H; C*H*(1')), 4.46-4.45 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.88-3.82 (*m*, 2H; CH_2(5')), 3.75-3.71 (*m*, 1H; C*H*(4')), 2.26-2.25 (*m*, 1H; CH_{2b}(2')), 2.12 (*ddd*, *J* = 13.26, 6.35, 3.52 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.56 (*d*, *J* = 1.02 Hz, 3H; C(5)CH_3), 1.01 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.84 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.04 (*d*, *J* = 7.15 Hz, 6H; Si(CH_3)$_2$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 164.20 (*C*O), 151.01 (*C*O), 136.18 (*C*H(6)), 135.72 (*C*$_{ar}$H), 135.66 (*C*$_{ar}$H), 133.50 (*C*$_{ar}$), 133.28 (*C*$_{ar}$), 130.67 (*C*$_{ar}$H), 128.56 (*C*$_{ar}$H), 128.53 (*C*$_{ar}$H), 110.26 (*C*(5)), 87.21 (*C*H(4')), 84.57 (*C*H(1')), 72.38 (*C*H(3')), 64.32 (*C*H_2(5')),

39.83 (CH_2(2')), 27.40 (C(CH_3)$_3$), 26.33 (C(CH_3)$_3$), 19.51 (C(CH_3)$_3$), 18.28 (C(CH_3)$_3$), 12.47 (C(5)CH_3), -4.09 (SiCH_3), -4.30 (SiCH_3); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2+Na]^+$: 617.2837; gef.: 617.2828; **Smp**.: 55-60 °C; **IR**: 3177.7*w*, 3050*m*, 2954*s*, 2929*s*, 2857*s*, 1687*s*, 1590*w*, 1471s, 1428*m*, 1362*w*, 1274*m*, 1252*m*, 1197*m*, 1104*s*, 1064*w*, 1032*w*, 968*m*, 832*s*, 776*s*, 740*w*, 701*m.*

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-thymidin **42**

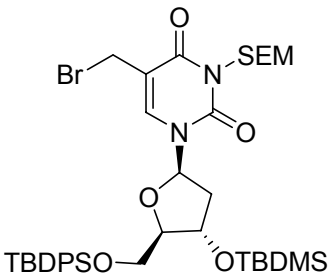


2.66 g (4.5 mmol) **41** wurden unter Argonatmosphäre in 20 mL DCM abs. gelöst und mit 3.0 mL (17.9 mmol, 4 eq) Hünig-Base versetzt. Anschließend wurde langsam 1.18 mL (6.7 mmol, 1.5 eq) SEMCl zugetropft. Nach Rühren bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss über Nacht wurden erneut 3.0 mL (17.9 mmol, 4 eq) Hünig-Base und 1.18 mL (6.7 mmol, 1.5 eq) SEMCl zugegeben und weitere 2 Tage gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung in 50 mL DCM aufgenommen und 3 x mit je 50 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 9 : 1) wurde ein farbloses Öl **42** (2.27 g, 3.1 mmol, 70%) erhalten.

R_f = 0.28 (Isohexan : EE = 4 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 7.64-7.62 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.51-7.38 (*m*, 7H; $C_{ar}H$, C*H*(6)), 6.19 (*t*, *J* = 6.74 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.21 (*d*, *J* = 3.01 Hz, 2H; OCH_2N), 4.59-4.29 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.97-3.83 (*m*, 2H; C*H*(4'), CH_{2b}(5')), 3.79-3.72 (*m*, 1H; CH_{2a}(5')), 3.57 (*t*, *J* = 7.95 Hz, 2H; $SiCH_2CH_2O$), 2.28-2.26 (*m*, 1H; CH_{2b}(2')), 2.17 (*ddd*, *J* = 13.36, 6.44, 3.83 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.61 (*d*, *J* = 0.91 Hz, 3H; C(5)CH_3), 1.01 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.85 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.83-0.81 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$), 0.04 (*s*, 6H; Si(CH_3)$_2$), -0.05 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 162.49 (*C*O), 150.31 (*C*O), 134.97 (*C*H(6)), 134.90 (C_{ar}H), 134.89 (C_{ar}H), 132.51 (C_{ar}), 129.93 (C_{ar}H), 127.81 (C_{ar}H), 127.78 (C_{ar}H), 108.67 (*C*(5)), 86.47 (*C*H(4')), 84.69 (*C*H(1')), 71.34 (*C*H(3')), 69.53 (OCH_2N), 66.22 ($SiCH_2CH_2O$), 63.30 (CH_2(5')), 39.72 (CH_2(2')), 26.54 (C(CH_3)$_3$), 25.49 (C(CH_3)$_3$), 20.60 (C(CH_3)$_3$), 18.69 (C(CH_3)$_3$), 17.49 ($SiCH_2CH_2O$), 13.94

(C(5)CH_3), -1.52 (Si(CH_3)$_3$), -4.94 (SiCH_3), -5.15 (SiCH_3); **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{38}H_{60}N_2O_6Si_3$+Na]$^+$: 747.3651; gef.: 747.3655; **IR**: 3072*w*, 2953*s*, 2930*s*, 2858*s*, 1711*s*, 1666*s*, 1590*w*, 1464*s*, 1428*m*, 1389*w*, 1361*m*, 1248*s*, 1193*m*, 1097*s*, 1026*m*, 966*m*, 832*s*, 773*s*, 741*w*, 700*s.*

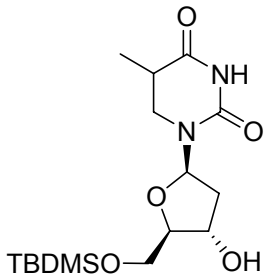
N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O-tert*-butyldiphenylsilyl-3'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-5-bromomethyl-2'-desoxyuridin **33**



1.0 g (1.4 mmol) **42** wurde unter Argonatmosphäre in 10 mL trockenem CCl_4 gelöst und mit 500 mg (2.8 mmol, 2.1 eq) *N*-Bromsuccinimid und 10.0 mg (0.06 mmol, 0.03 eq) Dibenzoylperoxid versetzt. Anschließend wurde auf 70 °C erhitzt, bis das gebildete Succinimid oben auf schwamm. Dieses wurde abfiltriert, mit wenig trockenem CCl_4 nachgespült und die Reaktionsmischung *in vacuo* eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 9 : 1) wurde **33** als farbloses Öl erhalten (709 mg, 0.89 mmol, 64%).

R_f = 0.28 (Isohexan : EE = 9 : 1); **^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.84 (*s*, 1H; C*H*(6)), 7.68-7.64 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.48-7.36 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 6.33 (*dd*, *J* = 7.86, 5.68 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.41 (*d*, *J* = 2.13 Hz, 2H; OCH_2N), 4.70-4.34 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.98-3.96 (*m*, 2H; C*H*(4'), CH_{2b}(5')), 3.91 (*d*, *J* = 10.53 Hz, 1H; CH_{2a}(5')), 3.84-3.78 (*m*, 2H; CH_2(5)), 3.69 (*dd*, *J* = 9.21, 7.52 Hz, 2H; $SiCH_2CH_2O$), 2.38 (*ddd*, *J* = 13.18, 5.67, 2.51 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 2.07 (*ddd*, *J* = 13.51, 7.86, 6.02 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.11 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.99-0.97 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$), 0.88 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.06 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$), 0.03 (*s*, 3H; SiCH_3), 0.00 (*s*, 3H; SiCH_3); **^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 161.51 (*C*O), 150.66 (*C*O), 137.69 (*C*H(6)), 135.79 (C_{ar}H), 135.54 (C_{ar}H), 133.16 (C_{ar}), 132.47 (C_{ar}), 130.47 (C_{ar}H), 130.43 (C_{ar}H), 128.32 (C_{ar}H), 111.37 (*C*(5)), 88.29 (*C*H(4')), 86.29 (*C*H(1')), 72.35 (*C*H(3')), 70.47 (OCH_2N), 67.92 (CH_2(5)), 63.85 ($SiCH_2CH_2O$), 62.67 (CH_2(5')), 42.17 (CH_2(2')), 27.31 (C(*C*H_3)$_3$), 25.94 (C(*C*H_3)$_3$), 22.84 ($SiCH_2CH_2O$), 19.64 (*C*(CH$_3$)$_3$), 18.34 (*C*(CH$_3$)$_3$), -1.21 (Si(*C*H_3)$_3$), -4.45 (Si*C*H_3), -4.66 (Si*C*H_3); **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{38}H_{59}BrN_2O_6Si_3$+NH_4]$^+$: 820.3203; gef.: 820.3215;

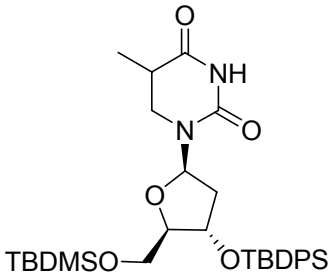
5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-5,6-dihydrothymidin **36**



In 150 mL MeOH/Wasser dest. (1:1) wurden 5.0 g (20.7 mmol) **1** gelöst und 330 mg Rh/Al_2O_3 (5% Rh) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 6 Tage unter H_2-Atmosphäre unter Normaldruck gerührt, wobei nach 4 Tagen nochmals 250 mg Katalysator zugegeben wurden. Der Katalysator wurde über Kieselgur abfiltriert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und 3 x mit Pyridin coevaporiert.
Das Rohprodukt wurde in 25 mL DMF abs. gelöst, mit 3.09 g (45.4 mmol, 2.2 eq) Imidazol und 3.4 g (22.7 mmol, 1.1 eq) TBDMSCl versetzt und 3.5 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionsmischung in 100 mL Chloroform aufgenommen und 3 x mit je 80 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung sowie 1 x mit 80 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 7 : 3 → 0 : 1) und **36** als farbloser Feststoff erhalten (6.3 g, 17.7 mmol, 86%).

***R*$_f$** = 0.24 ($CHCl_3$: MeOH = 20 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 10.21 (*s*, 1H; N*H*), 6.13 (*dd*, *J* = 8.00, 6.39 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.15 (*d*, *J* = 4.26 Hz, 1H; C(5')O*H*), 4.11-4.07 (*bs*, 1H; C*H*(3')), 3.75-3.60 (*m*, 3H; C*H*(4'), CH_2(5')), 3.38 (*dd*, *J* = 12.66, 5.57 Hz, 1H; CH_{2b}(6)), 2.99 (*dd*, *J* = 12.68, 10.24 Hz, 1H; CH_{2a}(6)), 2.64-2.54 (*m*, 1H; C*H*(5)), 2.05 (*ddd*, *J* = 14.30, 7.95, 6.48 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 1.81 (*ddd*, *J* = 13.20, 6.36, 3.27 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.06 (*d*, *J* = 7.00 Hz, 3H; C(5)CH_3), 0.87 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.05 (*d*, *J* = 4.19 Hz, 6H; Si(CH_3)$_2$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 173.54 (*C*O), 153.34 (*C*O), 85.84 (*C*H(4')), 83.25 (*C*H(1')), 70.78 (*C*H(3')), 63.85 (*C*H$_2$(5')), 41.85 (*C*H$_2$(6)), 36.91 (*C*H$_2$(2')), 35.08 (*C*H(5)), 26.29 (C(*C*H$_3$)$_3$), 18.47 (*C*(CH$_3$)$_3$), 13.08 (C(5)*C*H$_3$), -4.94 (Si(*C*H$_3$)$_2$), -5.00 (Si(CH$_3$)$_2$); **ESI-MS** (neg.): ber. für $[C_{16}H_{30}N_2O_5Si+Cl]^-$: 393.1618; gef.: 393.1598; **Smp**.: 136-146 °C; **IR**: 3440*br*, 2930*s*, 2884*w*, 2858*s*, 1695*s*, 1493s, 1450*m*, 1387*m*, 1242*m*, 1192*w*, 1123*m*, 1050w, 935*m*, 835*s*, 779*s*, 670*w.*

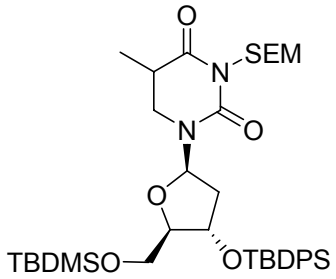
5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-5,6-dihydrothymidin **37**



In 12 mL DMF abs. wurden 1.6 g (4.5 mmol) **36**, 0.91 g (13.4 mmol, 3 eq) Imidazol und 1.7 mL (6.7 mmol, 1.5 eq) TBDPSCl unter Argonatmosphäre gelöst und bei Raumtemperatur für 5 Tage gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch in 100 mL Essigester aufgenommen, 3 x mit je 100 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, die org. Phase über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 7 : 2) gereinigt und das Produkt **37** als farbloses Öl erhalten (2.7 g, 4.5 mmol, 100%).

$\boldsymbol{R_f}$ = 0.12 (Isohexan : EE = 7 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.66-7.62 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.48-7.33 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 6.42 (*dd*, *J* = 8.97, 5.60 Hz, 1H; C*H*(1')), 4.32-4.28 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.90-3.86 (*m*, 1H; C*H*(4')), 3.53 (*dd*, *J* = 11.10, 2.34 Hz, 1H; CH_{2b}(5')), 3.29 (*dd*, *J* = 13.07, 5.42 Hz, 1H; CH_{2b}(6)), 3.21 (*dd*, *J* = 13.11, 9.25 Hz, 1H; CH_{2a}(6)), 3.16 (*dd*, *J* = 11.16, 2.56 Hz, 1H; CH_{2a}(5')), 2.56-2.47 (*m*, 1H; C*H*(5)), 2.01 (*ddd*, *J* = 12.97, 5.65, 1.99 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 1.79 (*ddd*, *J* = 12.91, 9.06, 5.96 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.20 (*d*, *J* = 7.10 Hz, 3H; C(5)CH_3), 1.08 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.77 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), -0.11 (*s*, 3H; Si(CH_{3})$_{2b}$), -0.13 (*s*, 3H; Si(CH_{3})$_{2a}$); **^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 172.95 (*C*O), 152.58 (*C*O), 135.99 (C_{ar}H), 135.97 (C_{ar}H), 133.71 (C_{ar}), 133.69 (C_{ar}), 130.14 (C_{ar}H), 128.04 (C_{ar}H), 86.91 (*C*H(4')), 84.13 (*C*H(1')), 73.97 (*C*H(3')), 63.45 (CH_2(5')), 41.93 (CH_2(6)), 38.08 (CH_2(2')), 35.64 (*C*H(5)), 27.14 (C(CH_3)$_3$), 26.03 (C(CH_3)$_3$), 19.31 (*C*(CH_3)$_3$), 18.44 (*C*(CH_3)$_3$), 13.16 (C(5)CH_3), -5.34 (SiCH_3), -5.51 (SiCH_3); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{32}H_{48}N_2O_5Si_2+H]^+$: 597.3175; gef.: 597.3200; **IR**: 3209*br*, 3072*w*, 2954*m*, 2930*s*, 2857*s*, 1700*s*, 1590*w*, 1472*m*, 1428*m*, 1386*m*, 1231*m*, 1191*m*, 1104*s*, 1025*s*, 969*m*, 832*s*, 777*m*, 740*w*, 700*s*.

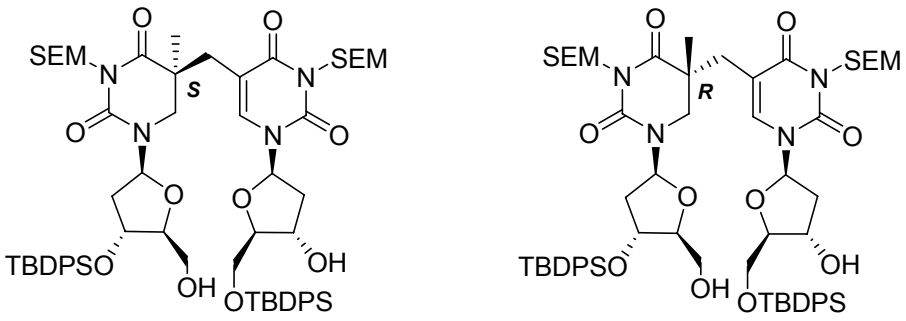
N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-3'-*O-tert*-butyldiphenylsilyl-5,6-dihydrothymidin **34**



In 20 mL DCM abs. wurden 2.7 g (4.5 mmol) **37**, 3.0 mL (17.9 mmol, 4 eq) Hünig-Base und 1.2 mL (6.7 mmol, 1.5 eq) SEMCl gelöst und unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurden weitere 3.0 mL (17.9 mmol, 4 eq) Hünig-Base und 1.2 mL (6.7 mmol, 1.5eq) SEMCl zugegeben und nochmals einen Tag gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionsmischung in 60 mL DCM aufgenommen und 3 x mit je 80 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, Isohexan : EE = 9 : 1) wurde **34** als farbloses Öl erhalten (2.3 mg, 3.1 mmol, 70%).

R_f = 0.3 (Isohexan : EE = 7 : 1); **^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.65-7.62 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.42-7.44 (*m*, 2H; $C_{ar}H$), 7.36-7.40 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 6.47 (*dd*, *J* = 9.08, 5.52 Hz, 1H; C*H*(1')), 5.21 (*s*, 2H; OCH_2N), 4.29-4.28 (*m*, 1H; C*H*(3')), 3.89-3.87 (*m*, 1H; C*H*(4')), 3.52 (*dd*, *J* = 11.12, 2.37 Hz, 2H; CH_2(5')), 3.25 (*dd*, *J* = 12.95, 5.22 Hz, 1H; SiCH$_2$CH_{2b}O), 3.21-3.18 (*m*, 1H; SiCH$_2$CH_{2a}O), 3.15 (*dd*, *J* = 11.12, 2.56 Hz, 2H; CH_2(6)), 2.73-2.32 (*m*, 1H; C*H*(5)), 2.00 (*ddd*, *J* = 12.81, 5.52, 1.72 Hz, 1H; CH_{2b}(2')), 1.77 (*ddd*, *J* = 12.89, 9.11, 5.88 Hz, 1H; CH_{2a}(2')), 1.20 (*d*, *J* = 7.06 Hz, 3H; C(5)CH_3), 1.07 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.95-0.93 (*m*, 2H; SiCH_2CH$_2$O), 0.76 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), -0.01 (*s*, 9H; Si(CH$_3$)$_3$), -0.11 (*s*, 3H; SiCH$_3$), -0.14 (*s*, 3H; SiCH$_3$); **^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 172.97 (*C*O), 171.33 (*C*O), 135.97 (*C*$_{ar}$H), 135.95 (*C*$_{ar}$H), 133.74 (*C*$_{ar}$), 132.68 (*C*$_{ar}$), 130.10 (*C*$_{ar}$H), 128.01 (*C*$_{ar}$H), 128.00 (*C*$_{ar}$H), 86.86 (*C*H(4')), 84.89 (*C*H(1')), 74.02 (*C*H(3')), 70.00 (O*C*H$_2$N), 66.99 (SiCH$_2$*C*H$_2$O), 63.49 (*C*H$_2$(5')), 40.64 (*C*H$_2$(6)), 38.08 (*C*H$_2$(2')), 36.02 (*C*H(5)), 27.10 (C(*C*H$_3$)$_3$), 26.00 (*C*(CH$_3$)$_3$), 19.28 (*C*(CH$_3$)$_3$), 18.30 (Si*C*H$_2$CH$_2$O), 13.60 (C(5)*C*H$_3$), -1.20 (Si(*C*H$_3$)$_3$); -5.38 (Si(*C*H$_3$)$_2$), -5.54 (Si(*C*H$_3$)$_2$); **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{38}H_{62}N_2O_6Si_3$+NH_4]$^+$: 744.4254; gef.: 744.4276; **IR**: 2954*s*, 2931*m*, 2894*m*, 2858*s*, 1727*s*, 1682*s*, 1590*w*, 1472*s*, 1428*s*, 1392*m*, 1360*m*, 1248*m*, 1191*m*, 1092*s*, 1024*m*, 970*w*, 832*s*, 777*m*, 739*m*, 700*s*, 611*m*.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **43a/b**



Zur Herstellung der LDA-Lösung wurde unter Argonatmosphäre zu 14.0 mL THF abs. 1.0 mL (7.5 mmol, 1.5 eq) Diisopropylamin und 3.2 mL n-BuLi (2.5 M in Hexan) zugetropft und für 1 h bei 0 °C gerührt.

Die LDA-Lösung wurde auf –78 °C abgekühlt, langsam zu einer Lösung aus 3.63 g (5.0 mmol) **34**, das zuvor dreimal mit Toluol azeotrop getrocknet wurde, in 29 mL THF abs. bei –78 °C zugetropft. Die Lösung wurde 2.5 h bei –78 °C gerührt, bevor 4.8 g (6.0 mmol, 1.2 eq) **33**, gelöst in 31 mL THF abs., zugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde 1.5 h bei –78 °C, dann 3 h bei 0 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wurde mit 120 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gequencht und 3 x mit je 120 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-*H*, Isohexan : EE = 7 : 1) wurde **32a/b** als farbloser Feststoff erhalten (1.8 g, 1.2 mmol, 25%).

Zur selektiven Entschützung der OH-Gruppen wurde **32a/b** in 120 mL Methanol gelöst und nach Zugabe von 233 mg (1.2 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat für 2 h bei 50 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit ges. $NaHCO_3$-Lösung neutralisiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der blass gelbe Rückstand wurde in 200 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gelöst und 3 x mit je 120 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Eine folgende säulenchromatographische Aufreinigung (Kieselgel-*H*, $CHCl_3$: MeOH = 50 : 1) ergab einen weißen Feststoff **43a/b** (1.2 g, 0.95 mmol, 78%).

Der Feststoff **43a/b** wurde in 47 mL Heptan/Essigester (3:1) gelöst und die Diastereomere mittels *np*-HPLC getrennt. Als Säule wurde eine *VP 250/21 Nucleodur 100-5 np*-Säule und als mobile Phase Heptan/Essigester mit einer Flussrate von 15 mL/min verwendet. Es wurde für jede Trennung 1 mL Lösung durch ein *rheodyne*-Ventil auf die Säule gegeben, so dass pro Trennung ca. 25 mg des Gemisches getrennt wurden. Die Detektion erfolgte bei 250 nm. Der Essigestergradient wurde wie folgt gefahren:

0 – 5 min 30% Essigester
5 – 30 min 30 – 50% Essigester
30 – 40 min 50 – 60% Essigester
40 – 42 min 60% Essigester
42 – 45 min 60 – 30% Essigester
45 – 47 min 30% Essigester

Es wurden insgesamt 96 mg (0.08 mmol, 6%) des *S*-Isomers **43a** und 313 mg (0.26 mmol, 21%) des *R*-Isomers **43b** jeweils als farblose Feststoffe erhalten.

(S)-Diastereomer **43a***:*

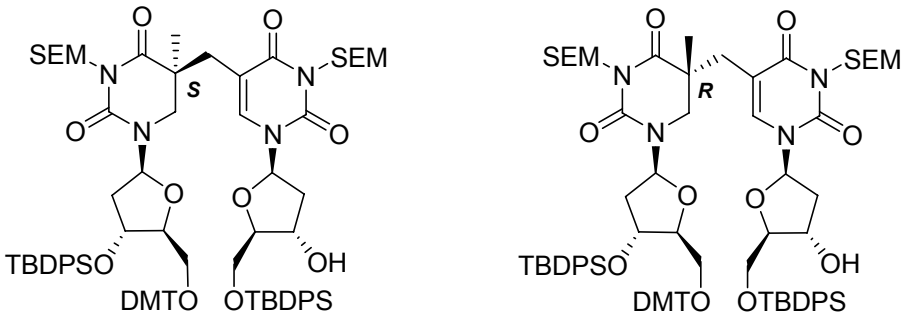
R_f = 0.20 ($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 7.63-7.60 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 7.59 (*s*, 1H; C*H*(6B)), 7.50-7.30 (*m*, 14H; $C_{ar}H$), 6.29 (*dd*, *J* = 8.83, 5.86 Hz, 1H; C*H*(1'A)), 6.19-6.18 (*m*, 1H; C*H*(1'B)), 5.37 (*d*, *J* = 4.56 Hz, 1H; C(3')O*H*), 5.14 (*s*, 2H; OCH_2N(A)), 5.00 (*d*, *J* = 9.74 Hz, 1H; OCH_{2b}N(B)), 4.96 (*d*, *J* = 9.73 Hz, 1H; OCH_{2a}N(B)), 4.69 (*t*, *J* = 5.37, 5.37 Hz, 1H; C(5')O*H*), 4.42-4.33 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 4.27-4.26 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 3.89-3.84 (*m*, 2H; C*H*(4'B), CH_{2b}(5'B)), 3.83-3.76 (*m*, 2H; C*H*(4'A), CH_{2a}(5'B)), 3.52-3.50 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$(A)), 3.44-3.42 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$(B)), 3.24-3.22 (*m*, 1H; CH_{2b}(5'A)), 3.18-3.16 (*m*, 1H; CH_{2a}(5'A)), 3.11 (*d*, *J* = 13.35 Hz, 1H; CH_{2b}(6A)), 2.94 (*d*, *J* = 13.28 Hz, 1H; CH_{2a}(6A)), 2.54 (*d*, *J* = 13.85 Hz, 1H; CH_{2b}(5)), 2.18 (*ddd*, *J* = 13.26, 6.33, 4.00 Hz, 1H; CH_{2b}(2'B)), 2.09-2.07 (*m*, 2H; CH_{2a}(2'B), CH_{2a}(5)), 1.80-1.69 (*m*, 2H; CH_2(2'A)), 1.04 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.98 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.88 (*s*, 3H C(5A)CH_3), 0.82-0.73 (*m*, 4H; 2 x $SiCH_2CH_2O$), -0.07 (*s*, 18H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 173.10 (*C*O(4A)), 162.60 (*C*O(4B)), 151.96 (*C*O(2A), 150.08 (*C*O(2B), 135.11 (*C*H(6B)), 134.93 (2 x C_{ar}H), 134.85 (2 x C_{ar}H), 132.94 (C_{ar}), 132.87 (C_{ar}), 129.87 (C_{ar}H), 129.75 (C_{ar}H), 127.82 (C_{ar}H), 127.79 (C_{ar}H), 127.75 (C_{ar}H), 127.71 (C_{ar}H), 107.54 (*C*(5B)), 91.92 (*C*H(4'B)), 86.44 (*C*H(4'A)), 84.68 (*C*H(1'B)), 83.79 (*C*H(1'A)), 73.81 (*C*H(3'A)), 69.79 (*C*H(3'B)), 69.74 (O*C*H_2N(A)), 69.32 (O*C*H_2N(B)), 66.24 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 65.37 ($SiCH_2CH_2O$(B)), 63.97 (*C*H_2(5'B)), 61.33 (*C*H_2(5'A)), 43.63 (*C*H_2(6A)), 41.19 (*C*H_2(2'B)), 36.06 (*C*H_2(2'A)), 31.19 (*C*H_2(5)), 26.59 (C(*C*H_3)$_3$), 26.53 (C(*C*H_3)$_3$), 19.84 (C(5)*C*H_3), 18.73 (*C*(CH$_3$)$_3$), 18.52 (*C*(CH$_3$)$_3$), 17.42 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 17.24 ($SiCH_2CH_2O$(B)),-1.50 (Si(*C*H$_3$)$_3$)*; **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{64}H_{92}N_4O_{12}Si_4+NH_4]^+$: 1238.6127; gef.: 1238.6145; **Smp**.: 72-78 °C; **IR**: 3152*br*, 2952*s*, 2888*m*, 2851*m*, 1705*m*, 1661*s*, 1461s, 1428*m*, 1361*w*, 1247*m*, 1192*m*, 1086*s*, 1000*w*, 856*w*, 835*s*, 740*w*, 701*s*.

(R)-Diastereomer **43b***:*

$\boldsymbol{R_f}$ = 0.13 ($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 7.73-7.55 (*m*, 8H; $C_{ar}H$), 7.51-7.34 (*m*, 13H; $C_{ar}H$, C*H*(6)), 6.31 (*dd*, *J* = 9.01, 5.61 Hz, 1H; C*H*(1'A)), 6.16 (*t*, *J* = 6.84, 6.84 Hz, 1H; C*H*(1'B)), 5.34 (*d*, *J* = 4.56 Hz, 1H; C(3')O*H*), 5.17 (*d*, *J* = 9.81 Hz, 1H; OCH_{2b}N), 5.12 (*d*, *J* = 9.86 Hz, 1H; OCH_{2a}N), 5.02 (*d*, *J* = 9.76 Hz, 1H; OCH_{2b}N), 4.88 (*d*, *J* = 9.78 Hz, 1H; OCH_{2a}N), 4.70 (*t*, *J* = 5.51, 5.51 Hz, 1H; C(5')O*H*), 4.39-4.37 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 4.33-4.20 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 3.90-3.89 (*m*, 1H; C*H*(4'B)), 3.87-3.85 (*m*, 2H; C*H*(4'A), CH_{2b}(5'B)), 3.73 (*dd*, *J* = 11.03, 4.98 Hz, 1H; CH_{2a}(5'B)), 3.57-3.47 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$(A)), 3.42-3.40 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$(B)), 3.29-3.20 (*m*, 2H; CH_2(5'A)), 3.18 (*d*, *J* = 13.14 Hz, 1H; CH_{2b}(6A)), 3.01 (*d*, *J* = 13.14 Hz, 1H; CH_{2a}(6A)), 2.76 (*d*, *J* = 13.94 Hz, 1H; CH_{2b}(5)), 2.20-2.15 (*m*, 2H; CH_2(2'B)), 2.07 (*d*, *J* = 14.11 Hz, 1H; CH_{2a}(5)), 1.88 (*ddd*, *J* = 13.64, 9.62, 4.97 Hz, 1H; CH_{2b}(2'A)), 1.81-1.72 (*m*, 1H; CH_{2a}(2'A)), 1.05 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.99 (*s*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.86 (*s*, 3H; C(5A)CH_3), 0.82 (*t*, *J* = 7.99 Hz, 2H; $SiCH_2CH_2O$), 0.79-0.73 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$), -0.05 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$), -0.08 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)** : δ = 172.80 (*C*O(4A)), 162.48 (*C*O(4B)), 151.81 (*C*O(2A), 150.06 (*C*O(2B), 137.79 (*C*H(6B)), 135.83 (C_{ar}H), 135.14 (C_{ar}H), 135.12 (C_{ar}H), 134.97 (C_{ar}H), 132.98 (C_{ar}), 132.65 (C_{ar}), 129.85 (C_{ar}H), 129.82 (C_{ar}H), 127.82 (C_{ar}H), 127.78 (C_{ar}H), 127.76 (C_{ar}H), 127.71 (C_{ar}H), 107.59 (*C*(5B)), 86.75 (*C*H(4'B)), 86.33 (*C*H(4'A)), 84.19 (*C*H(1'B)), 83.85 (*C*H(1'A)), 73.95 (*C*H(3'A)), 70.27 (*C*H(3'B)), 69.71 (O*C*H_2N(A)), 69.20 (O*C*H_2N(B)), 66.21 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 65.22 ($SiCH_2CH_2O$(B)), 64.15 (*C*H_2(5'B)), 61.39 (*C*H_2(5'A)), 43.96 (*C*H_2(6A)), 40.83 (*C*H_2(2'B)), 35.91 (*C*H_2(2'A)), 31.68 (*C*H_2(5)), 26.59 (C(*C*H_3)$_3$), 26.51 (C(*C*H_3)$_3$), 20.64 (C(5)*C*H_3), 18.65 (*C*(CH$_3$)$_3$), 18.55 (*C*(CH$_3$)$_3$), 17.40 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 17.19 ($SiCH_2CH_2O$(B)), -1.47 (Si(*C*H_3)$_3$), -1.5 (Si(*C*H_3)$_3$)[*]; **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{64}H_{92}N_4O_{12}Si_4+NH_4]^+$: 1238.6127; gef.: 1238.6148; **Smp**.: 70-74 °C; **IR**: 3290*br*, 2953*s*, 2859*s*, 1714*s*, 1659*s*, 1462s, 1428*m*, 1360*w*, 1246*m*, 1190*m*, 1081*s*, 998*m*, 834*s*, 740*w*, 700*s*.

[*] das quartäre C-Atom C(5A) liegt hierbei unter dem Lösungsmittelsignal

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O-tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethyl-silylethoxymethyl-5'-*O-tert*-butyldiphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **44a/b**



(S)-Diastereomer:

In 0.4 mL Pyridin wurden 96 mg (0.08 mmol) **43a**, welches zuvor dreimal mit Pyridin azeotrop getrocknet wurde, gelöst, mit Molsieb (4 Å) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zugleich wurden 71 mg (0.16 mmol, 2 eq) Dimethoxytrityltriflat **38** in 0.4 mL Pyridin gelöst und über Molsieb (4 Å) gerührt. **38** wurde zum Dimer zugegeben und weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 1 mL MeOH gequencht, das Molsieb über Kieselgur abfiltriert, mit wenig DCM nachgewaschen und unter vermindertem Druck eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-*H*, $CHCl_3$: MeOH : Pyr = 80 : 1 : 0.1) wurde ein blass gelber, klebriger Feststoff **44a** erhalten (120 mg, 0.08 mmol, 100%).

***R*$_f$** = 0.16 ($CHCl_3$: MeOH = 50 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, Aceton-d$_6$)**: δ = 7.77-7.74 (*m*, 4H; C$_{ar}$*H*), 7.36-7.33 (*m*, 4H; C$_{ar}$*H*), 7.32-7.27 (*m*, 16H; C$_{ar}$*H,* C*H*(6)), 7.20-7.16 (*m*, 6H; C$_{ar}$*H*), 6.87-6.78 (*m*, 4H; C$_{ar}$*H*), 6.35 (*t*, *J* = 6.69, 6.69 Hz, 1H ; C*H*(1'B)), 6.19 (*dd*, *J* = 11.20, 1.97 Hz, 1H; C*H*(1'A)), 5.27 (*s*, 2H; OC*H*$_2$N(A)), 5.14 (*s*, 2H; OC*H*$_2$N(B)), 4.60-4.53 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.35-4.32 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 4.06-4.00 (*m*, 2H; C*H*(4'B), C*H*(4'A)), 3.98 (*dd*, *J* = 7.37, 4.66 Hz, 2H; C*H*$_2$(5'A)), 3.77 (*s*, 6H; 2 x OC*H*$_3$), 3.76-3.73 (*m*, 1H; C*H*$_{2b}$(5'B)), 3.67-3.60 (*m*, 3H; SiCH$_2$C*H*$_2$O(A), C*H*$_{2a}$(5'B)), 3.57-3.56 (*m*, 2H; SiCH$_2$C*H*$_2$O(B)), 3.11 (*d*, *J* = 13.06 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(6A)), 2.95 (*d*, *J* = 13.05 Hz, 1H; C*H*$_{2a}$(6A)), 2.58 (*d*, *J* = 13.92 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(5)), 2.33 (*ddd*, *J* = 13.58, 6.36, 3.93 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(2'B)), 2.20 (*dd*, *J* = 13.68, 6.81 Hz, 1H; C*H*$_{2a}$(2'B)), 2.12 (*d*, *J* = 14.54 Hz, 1H; C*H*$_{2a}$(5)), 1.60 (*ddd*, *J* = 13.30, 11.41, 2.02 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(2'A)), 1.43 (*ddd*, *J* = 13.30, 3.72, 2.04 Hz, 1H; C*H*$_{2a}$(2'A)), 1.14 (*s*, 9H, C(C*H*$_3$)$_3$), 1.07 (*s*, 9H, C(C*H*$_3$)$_3$), 0.97 (*s*, 3H, C*H*$_3$), 0.91-0.78 (*m*, 4H, 2 x SiC*H*$_2$CH$_2$O), -0.02 (*s*, 9H, Si(C*H*$_3$)$_3$), -0.04 (*s*, 9H, Si(C*H*$_3$)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, Aceton-d$_6$)**: δ = 175.24 (*C*O(4A)), 165.03 (*C*O(4B)), 160.40 (*C*$_{ar}$), 153.80 (*C*O(2A)), 152.45 (*C*O(2B)), 150.31 (*C*$_{ar}$), 142.17 (*C*H(6B)), 138.02 (*C*$_{ar}$H), 137.89 (*C*$_{ar}$H) 137.63 (*C*$_{ar}$H), 137.31 (*C*$_{ar}$H), 135.28 (*C*$_{ar}$), 135.21 (*C*$_{ar}$), 135.12 (*C*$_{ar}$),

135.04 (C_{ar}), 131.98 (C_{ar}H), 131.87 (C_{ar}H), 131.75 (C_{ar}H), 131.74 (C_{ar}H), 129.74 (C_{ar}H), 129.67 (C_{ar}H), 129.66 (C_{ar}H), 129.43 (C_{ar}H), 128.38 (C_{ar}H), 125.57 (C_{ar}H), 114.78 (C_{ar}H), 110.16 (*C*(5B)), 88.90 (*C*H(4'A)), 88.45 (*C*H(1'B)), 86.93 (*C*H(4'B)), 86.92 (*C*H(1'A)), 82.44 (*C*H(3'A)), 82.34 (*C*H(3'B)), 71.98 (O*C*H_2N(A)), 71.78 (O*C*H_2N(B)), 69.29 (SiCH$_2$*C*H_2O(A)), 69.17 (SiCH$_2$*C*H_2O(B)), 67.81 (*C*H_2(5'B)), 66.10 (*C*H_2(5'A)), 56.45 (O*C*H_3), 46.74 (*C*H_2(6A)), 43.87 (*C*H_2(5)), 41.47 (*C*(5A)), 36.41 (*C*H_2(2'A)), 33.83 (*C*H_2(2'B)), 28.97 (C(*C*H_3)$_3$), 28.55 (C(*C*H_3)$_3$), 22.21 (C(5)*C*H_3), 21.11 (Si*C*H_2CH$_2$O(A)), 20.90 (Si*C*H_2CH$_2$O(B)), 19.64 (*C*(CH$_3$)$_3$), 19.57 (*C*(CH$_3$)$_3$), -0.12 (Si(*C*H_3)$_3$), -0.16 (Si(*C*H_3)$_3$); **MALDI-MS** (pos.): ber. für [$C_{85}H_{110}N_4O_{14}Si_4$+Na]$^+$: 1547.1; gef.: 1547.3; **IR**: 3474*br*, 3060*w*, 2953*s*, 2858*w*, 1716*s*, 1662*s*, 1607*s*, 1508*s*, 1463*m*, 1443*m*, 1428*w*, 1360*w*, 1296*m*, 1246*s*, 1175*s*, 1157*w*, 1081*w*, 1032*s*, 942*w*, 826*s*, 779*w*, 754*w*, 700*s.*

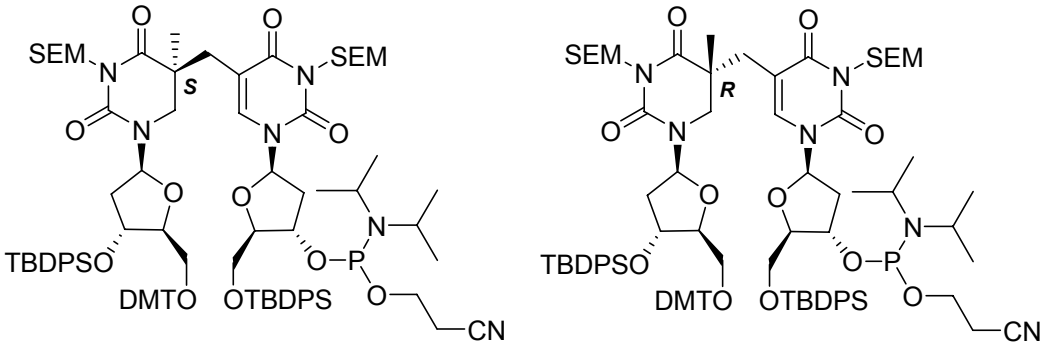
(R)-Diastereomer:

In 0.5 mL Pyridin wurden 172 mg (0.14 mmol) **43b**, welches zuvor dreimal mit Pyridin azeotrop getrocknet wurde, gelöst, mit Molsieb (4 Å) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zugleich wurden 127 mg (0.28 mmol, 2 eq) Dimethoxytrithyltriflat **38** in 0.5 mL Pyridin gelöst und über Molsieb (4 Å) gerührt. **38** wurde zum Dimer zugegeben und weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 1 mL MeOH gequencht, das Molsieb über Kieselgur abfiltriert, mit wenig MeOH nachgewaschen und unter vermindertem Druck eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-H, $CHCl_3$: MeOH : Pyr = 80 : 1 : 0.1) konnte ein blass gelber Feststoff **44b** erhalten werden (181 mg, 0.12 mmol, 84%).

***R*$_f$** = 0.15 ($CHCl_3$: MeOH = 50 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, Aceton-d$_6$)**: δ =.68-7.61 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 7.47-7.42 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 7.40-7.35 (*m*, 16H; C_{ar}*H,* C*H*(6)), 7.27-7.19 (*m*, 6H; C_{ar}*H*), 6.85-6.80 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 6.44 (*dd*, *J* = 7.82, 6.26 Hz, 1H; C*H*(1'A)), 6.31 (*t*, *J* = 6.63, 6.63 Hz, 1H; C*H*(1'B)), 5.22 (*d*, *J* = 1.67 Hz, 2H; OC*H*$_2$N(A)), 5.09 (*d*, *J* = 2.40 Hz, 2H; OC*H*$_2$N(B)), 4.55-4.49 (*m*, 2H; C*H*(3'B), C*H*(3'A)), 4.07-4.01 (*m*, 2H; C*H*(4'B), C*H*(4'A)), 3.96 (*d*, *J* = 5.03 Hz, 2H; C*H*$_2$(5'B)), 3.77 (*s*, 6H; 2 x OC*H*$_3$), 3.62 (*dd*, *J* = 11.85, 4.26 Hz, 2H; SiCH$_2$C*H*$_2$O(A)), 3.55-3.47 (*m*, 2H; SiCH$_2$C*H*$_2$O(B)), 3.12 (*dd*, *J* = 10.29, 4.17 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(5'A)), 3.07 (*bs*, 1H; C*H*$_{2b}$(6A)), 3.03 (*d*, *J* = 7.22 Hz, 1H; C*H*$_{2a}$(6A)), 3.02-2.98 (*m*, 1H; C*H*$_{2a}$(5'A)), 2.54 (*d*, *J* = 13.46 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(5)), 2.33 (*ddd*, *J* = 13.52, 6.37, 3.73 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(2'B)), 2.21 (*d*, *J* = 13.78 Hz, 1H; C*H*$_{2a}$(5)), 2.14-2.13 (*m*, 1H; C*H*$_{2a}$(2'B)), 1.99 (*ddd*, *J* = 13.15, 6.15, 3.50 Hz, 1H; C*H*$_{2b}$(2'A)), 1.90-1.81 (*m*, 1H; C*H*$_{2a}$(2'A)), 1.06 (*s*, 9H; C(C*H*$_3$)$_3$), 1.04 (*s*, 9H; C(C*H*$_3$)$_3$), 0.92 (*s*, 3H; C(5)C*H*$_3$), 0.90-0.78 (*m*, 4H; 2 x SiC*H*$_2$CH$_2$O), -0.03 (*s*, 9H; Si(C*H*$_3$)$_3$), -0.05 (*s*, 9H; Si(C*H*$_3$)$_3$);

^{13}C-NMR (100 MHz, Aceton-d$_6$): δ = 174.98 (*C*O(4A)), 165.13 (*C*O(4B)), 160.55 (C_{ar}), 154.14 (*C*O(2A)), 152.37 (*C*O(2B)), 146.99 (C_{ar}), 140.41 (*C*H(6B)), 137.69 (C_{ar}H), 137.54 (C_{ar}H) 137.49 (C_{ar}H), 137.32 (C_{ar}H), 135.27 (C_{ar}), 135.21 (C_{ar}), 135.12 (C_{ar}), 135.00 (C_{ar}), 131.96 (C_{ar}H), 131.93 (C_{ar}H), 131.85 (C_{ar}H), 131.71 (C_{ar}H), 129.96 (C_{ar}H), 129.76 (C_{ar}H), 129.75 (C_{ar}H), 129.61 (C_{ar}H), 128.45 (C_{ar}H), 125.57 (C_{ar}H), 114.93 (C_{ar}H), 110.10 (*C*(5B)), 88.98 (*C*H(4'A)), 87.95 (*C*H(1'B)), 86.33 (*C*H(4'B)), 85.12 (*C*H(1'A)), 75.29 (*C*H(3'A)), 72.65 (*C*H(3'B)), 71.94 (O*C*H$_2$N(A)), 71.65 (O*C*H$_2$N(A)), 68.67 (SiCH$_2$*C*H$_2$O(A)), 67.83 (SiCH$_2$*C*H$_2$O(B)), 66.15 (*C*H$_2$(5'B)), 65.30 (*C*H$_2$(5'A)), 56.54 (O*C*H$_3$), 46.54 (*C*H$_2$(6A)), 44.36 (*C*H$_2$(5)), 41.45 (*C*(5A)), 38.46 (*C*H$_2$(2'A)), 33.96 (*C*H$_2$(2'B)), 28.34 (C(*C*H$_3$)$_3$), 28.32 (C(*C*H$_3$)$_3$), 22.90 (C(5)*C*H$_3$), 20.87 (Si*C*H$_2$CH$_2$O(A)), 20.63 (Si*C*H$_2$CH$_2$O(B)), 19.69 (*C*(CH$_3$)$_3$), 19.51 (*C*(CH$_3$)$_3$), -0.12 (Si(*C*H$_3$)$_3$), -0.15 (Si(*C*H$_3$)$_3$); **ESI-MS** (pos.): ber. für [$C_{85}H_{110}N_4O_{14}Si_4$+$NH_4$]$^+$: 1540.7434; gef.: 1540.6439; **Smp**.: 66-74 °C; **IR**: 3488*br*, 2953*s*, 2859*w*, 1715*m*, 1661*s*, 1508*w*, 1462s, 1428*m*, 1361*m*, 1247*m*, 1180*w*, 1085*s*, 936*w*, 858*w*, 834*s*, 741*w*, 701*s.*

<u>*N*-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O-tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethyl-silylethoxymethyl-5'-*O-tert*-butyldiphenyl-3'-*O-β*-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphanoxy-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **19a/b**</u>



(S)-Diastereomer:

120 mg (0.08 mmol) **44a** wurden in 0.6 mL THF abs. gelöst, mit 55 µL (0.32 mmol, 4 eq) Hünig-Base versetzt und 3 x entgast. Nach Abkühlen auf 0 °C wurden 33 µL (0.12 mmol, 1.5 eq) CEDCl zugegeben und die Lösung 6 h unter Auftauen des Eisbades gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt schnell säulenchromatographisch aufgereinigt (deaktiviertes Kieselgel-60, Isohexan : EE = 4 : 1). Es konnte nur die oxidierte Form des Produktes **19a** als farbloser Feststoff erhalten werden (25 mg, 0.02 mmol, 18%).

***R*$_f$** = 0.12 (Isohexan : EE = 3 : 1); **^{31}P-NMR (200 MHz, CDCl$_3$)**: δ = 8.72, 8.51; **^{1}H-NMR (600 MHz, CDCl$_3$)**: δ = 7.79-7.69 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 7.69-7.61 (*m*, 4H; C_{ar}*H*), 7.48-7.31 (*m*,

16H; $C_{ar}H$, C*H*(6)), 7.23-7.15 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 6.85-6.80 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 6.43-6.31 (*m*, 1H; C*H*(1'A)), 6.23-6.17 (*m*, 1H; C*H*(1'B)), 5.35-5.30 (*m*, 2H; OCH_2N(B)), 5.17-5.15 (*m*, 2H; OCH_2N(A)), 4.39-4.29 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.27-4.22 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 4.21-4.14 (*m*, 2H; C*H*(4'B), C*H*(4'A)), 3.99-3.92 (*m*, 2H; CH_2(5'A)), 3.79-3.78 (*m*, 6H; 2 x OCH_3), 3.74-3.68 (*m*, 1H; CH_{2b}(5'B)), 3.67-3.61 (*m*, 3H; CH_{2a}(5'B), OCH_2CH_2CN), 3.60-3.53 (*m*, 2H; SiCH_2CH_2O(A)), 3.50-3.39 (*m*, 3H; CH_{2b}(6A), SiCH_2CH_2O(B)), 3.19-3.09 (*m*, 2H; N(C*H*(CH_3)$_2$)$_2$), 2.91-2.82 (*m*, 1H; CH_{2a}(6A)), 2.74-2.72 (*m*, 1H; CH_{2b}CN), 2.68-2.59 (*m*, 1H; CH_{2a}CN), 2.59-2.47 (*m*, 4H; CH_2(5), CH_2(2'B)), 2.25-2.12 (*m*, 2H; CH_2 (2'A)), 1.28-1.22 (*m*, 6H; N(CH(CH_3)$_2$)), 1.22-1.18 (*m*, 6H; N(CH(CH_3)$_2$)), 1.17-1.10 (*m*, 9H; C(CH_3)$_3$), 1.10-1.05 (*m*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.95-0.89 (*m*, 7H; C(5)CH_3, 2 x SiCH_2CH_2O), -0.03 (*s*, 18H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 173.57 (*C*O(4A)), 163.35 (*C*O(4B)), 158.36 (*C*$_{ar}$), 152.00 (*C*O(2A), 150.70 (*C*O(2B), 144.23 (*C*$_{ar}$), 139.45 (*C*H(6B)), 136.08 (*C*$_{ar}$H), 136.05 (*C*$_{ar}$H) 135.50 (*C*$_{ar}$H), 135.35 (*C*$_{ar}$H), 133.20 (*C*$_{ar}$), 133.17 (*C*$_{ar}$), 132.75 (*C*$_{ar}$), 130.35 (*C*$_{ar}$H), 130.26 (*C*$_{ar}$H), 129.36 (*C*$_{ar}$H), 129.28 (*C*$_{ar}$H), 128.25 (*C*$_{ar}$H), 127.91 (*C*$_{ar}$H), 127.87 (*C*$_{ar}$H), 127.85 (*C*$_{ar}$H), 127.77 (*C*$_{ar}$H), 123.70 (*C*$_{ar}$H), 116.76 (*C*$_{ar}$H), 116.61 (*C*$_{ar}$H), 113.65 (CH$_2$*C*N), 108.77 (*C*(5B)), 87.15 (*C*H(4'A)), 86.42 (*C*H(4'B)), 85.01 (*C*H(1'B)), 84.97 (*C*H(1'A)), 73.97 (*C*H(3'A)), 71.04 *C*H(3'B)), 70.60 (O*C*H$_2$N(A)), 70.53 (O*C*H$_2$N(B)), 67.52 (SiCH$_2$*C*H$_2$O(A)), 66.62 (SiCH$_2$*C*H$_2$O(B)), 63.69 (*C*H$_2$(5'A)), 63.67 (*C*H$_2$(5'B)), 60.20 (O*C*H$_2$CH$_2$CN), 55.19 (O*C*H$_3$), 46.34 (*C*(5A)), 43.25 (*C*H$_2$(6A)), 42.10 (N*C*H(CH$_3$)$_2$), 41.85 (N*C*H(CH$_3$)$_2$), 38.73 (*C*H$_2$(2'A)), 35.41 (*C*H$_2$(2'B)), 33.69 (*C*H$_2$(5)), 26.99 (C(*C*H$_3$)$_3$), 26.95 (C(*C*H$_3$)$_3$), 26.47 (C(5)*C*H$_3$), 22.83 (*C*(CH$_3$)$_3$), 22.52 (*C*(CH$_3$)$_3$), 19.49 (NCH(*C*H$_3$)$_2$), 19.32 (NCH(*C*H$_3$)$_2$), 18.16 (Si*C*H$_2$CH$_2$O(B)), 18.14 (Si*C*H$_2$CH$_2$O(A)), 17.60 (OCH$_2$*C*H$_2$CN), -1.34 (Si(*C*H$_3$)$_3$), -1.39 (Si(*C*H$_3$)$_3$); **ESI-MS** (neg.): ber. für [$C_{94}H_{127}N_6O_{15}PSi_4$+COO]$^-$: 1783.8469; gef.: 1783.8307.

.

(R)-Diastereomer:

123 mg (0.08 mmol) **44b** wurden in 0.6 mL THF abs. gelöst, mit 56 µL (0.32 mmol, 4 eq) Hünig-Base versetzt und 3 x entgast. Nach Abkühlen auf 0 °C wurde 34 µL (0.12 mmol, 1.5 eq) CEDCl zugegeben und die Lösung 6 h unter Auftauen des Eisbades gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand schnell säulenchromatographisch gereinigt (deaktiviertes Kieselgel-60, Isohexan : EE = 4 : 1). Das Produkt **19b** wurde als farbloserFeststoff erhalten (62 mg, 0.04 mmol, 44%).

***R*$_f$** = 0.10 (Isohexan : EE = 3 : 1); **^{31}P-NMR (200 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 150.32, 149.76; **^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.67-7.62 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.61-7.54 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 7.43-7.25 (*m*, 16H; $C_{ar}H$, C*H*(6)), 7.24-7.10 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 6.80-6.70 (*m*, 4H; $C_{ar}H$),

6.56-6.37 (*m*, 1H; C*H*(1'A)), 6.35-6.16 (*m*, 1H; C*H*(1'B)), 5.26-5.19 (*m*, 2H; OCH_2N(B)), 5.16-5.08 (*m*, 2H; OCH_2N(A)), 4.40-4.33 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.17-4.00 (*m*, 3H; C*H*(3'A), C*H*(4'B), C*H*(4'A)), 3.97-3.81 (*m*, 2H; CH_2(5'A)), 3.76 (*s*, 6H; 2 x OCH_3), 3.76-3.75 (*m*, 1H; CH_{2b}(5'B)), 3.74-3.64 (*m*, 1H; CH_{2a}(5'B)), 3.64-3.58 (*m*, 4H; $SiCH_2CH_2O$(B), OCH_2CH_2CN), 3.58-3.51 (*m*, 2H; $SiCH_2CH_2O$(A),), 3.49-3.37 (*m*, 1H; CH_{2b}(6A)), 3.10-3.02 (*m*, 2H; N(C*H*$(CH_3)_2)_2$), 2.93-2.91 (*m*, 2H; CH_{2a}(6A), CH_{2b}CN), 2.63-2.60 (*m*, 1H; CH_{2b}(5)), 2.59-2.53 (*m*, 1H; CH_{2a}CN), 2.52-2.48 (*m*, 1H; CH_{2a}(5)), 2.22-2.15 (*m*, 1H; CH_{2b}(2'B)), 2.14-2.04 (*m*, 1H; CH_{2a}(2'B)), 1.97-1.87 (*m*, 1H; CH_{2b}(2'A)), 1.77-1.69 (*m*, 1H; CH_{2a}(2'A)), 1.26-1.24 (*m*, 6H; NCH(CH_3)$_2$), 1.22-1.16 (*m*, 6H; NCH(CH_3)$_2$), 1.10-1.05 (*m*, 9H; C(CH_3)$_3$), 1.04-1.02 (*m*, 9H; C(CH_3)$_3$), 0.94-0.84 (*m*, 7H; C(5)CH_3, 2 x $SiCH_2CH_2O$), -0.02 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$), -0.03 (*s*, 9H; Si(CH_3)$_3$); **^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 173.20 (*C*O(4A)), 163.14 (*C*O(4B)), 158.60 (C_{ar}), 152.48 (*C*O(2A)), 150.61 (*C*O(2B)), 144.74 (C_{ar}), 139.44 (*C*H(6B)), 135.82 (C_{ar}H), 135.66 (C_{ar}H) 135.54 (C_{ar}H), 135.42 (C_{ar}H), 133.40 (C_{ar}), 133.22 (C_{ar}), 133.21 (C_{ar}), 130.05 (C_{ar}H), 130.02 (C_{ar}H), 129.80 (C_{ar}H), 129.10 (C_{ar}H), 128.10 (C_{ar}H), 127.82 (C_{ar}H), 127.77 (C_{ar}H), 127.74 (C_{ar}H), 127.72 (C_{ar}H), 123.68 (C_{ar}H), 116.69 (C_{ar}H), 116.61 (C_{ar}H), 113.14 (CH_2*C*N), 108.49 (*C*(5B)), 86.14 (*C*H(4'A)), 86.06 (*C*H(4'B)), 85.47 (*C*H(1'B)), 84.76 (*C*H(1'A)), 73.40 (*C*H(3'A), 71.01 *C*H(3'B)), 70.33 (O*C*H_2N(A)), 70.13 (O*C*H_2N(B)), 67.41 ($SiCH_2$*C*H_2O(A)), 66.62 ($SiCH_2$*C*H_2O(B)), 63.56 (*C*H_2(5'A)), 63.52 (*C*H_2(5'B)), 60.17 (O*C*H_2CH_2CN), 55.22 (O*C*H_3), 46.34 (*C*(5A)), 43.34 (*C*H_2(6A)), 42.18 (N*C*H$(CH_3)_2$), 41.32 (N*C*H$(CH_3)_2$), 38.71 (*C*H_2(2'A)), 36.89 (*C*H_2(2'B)), 32.46 (*C*H_2(5)), 26.92 (C(*C*H_3)$_3$), 26.86 (C(*C*H_3)$_3$), 26.45 (C(5)*C*H_3), 22.60 (C(*C*H_3)$_3$), 22.37 (C(*C*H_3)$_3$), 19.30 (NCH(*C*H_3)$_2$), 19.29 (NCH(*C*H_3)$_2$), 18.16 ($SiCH_2CH_2O$(B)), 18.09 ($SiCH_2CH_2O$(A)), 17.59 (OCH_2CH_2CN), -1.38 (Si(*C*H_3)$_3$), -1.39 (Si(*C*H_3)$_3$); **ESI-MS** (neg.): ber. für $[C_{94}H_{127}N_6O_{15}PSi_4+COO]^-$: 1783.8469; gef.: 1783.8329.

5.4 Festphasensynthese

5.4.1 Synthese

Für die Kupplung der unmodifizierten Nukleoside wurden die vom Gerätehersteller vorgeschlagenen Standardprotokolle verwendet. Demzufolge wurden für das *Deblocking, Capping,* die Oxidation und die Aktivierung folgende Lösungen genutzt:

Deblocking: 3% Dichloressigsäure in DCM

Capping A: 0.53 M Phenoxysäureanhydrid (Pac_2O), 11.1% 2,6-Lutidin in Acetonitril

Capping B: 16% *N*-Methylimidazol in Acetonitril

Oxidation: 0.015 M Iod in 2,6-Lutidin/Wasser/Acetonitril 0.6 : 3 : 6.5

Aktivator: 0.25 M 5-Benzylthiotetrazol (BTT) in Acetonitril

Für die DNA-Synthese wurden mit der ersten Base beladene CPG-gefüllte Kartuschen verwendet (Ansatzgröße 1 µmol). Die Kupplungszeit für die Standardbasen (0.1 M in Acetonitril) betrug 96 s. Für die SP-Phosphoramidite (**18a/b**, **19b**) wurde ein Doppelkupplungsprotokoll eingesetzt, das heißt nach einer zehnminütigen Kupplung wurde gewaschen und mit frischem Amidit/Aktivator erneut 10 min gekuppelt. Zudem wurde die *Deblocking*-Zeit auf 120 s erhöht, um eine vollständige Entschützung zu erreichen. Die dem SP nachfolgende Base wurde für 5 min gekuppelt.
Nach Abschluss der Synthese wurde die DMT-Gruppe am 5'-Ende des endständigen Nukleotides abgespalten.

5.4.2 Entschützung und Aufreinigung

Nach der DNA-Synthese wurden noch an der Festphase die SEM-Schutzgruppen von **18a/b** und **19b** entfernt. Dies erfolgte mit 1 M Zinntetrachlorid-Lösung (in DCM) bei -20 °C für 2 h, dann bei 4 °C für 1 h. Anschließend wurde mit DCM nachgespült und die DNA im Hochvakuum getrocknet. Die Kartuschen wurden vorsichtig geöffnet und ca. die Hälfte einer Kartusche jeweils in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß (1.5 mL) überführt. Es wurden 600 µL einer wässrigen Ammoniak/Ethanol-Lösung (3 : 1) zugegeben und über Nacht bei 25 °C in einem Thermomixer der Firma *Eppendorf* inkubiert, um die DNA von der Festphase abzuspalten und die permanenten Schutzgruppen zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung von dem Trägermaterial abdekantiert und *in vacuo* eingeengt. Der Rückstand wurde zur Abspaltung der verbliebenen TBDPS-Schutzgruppen in 400 µL 1 M TBAF in THF gelöst und bei 57 °C über Nacht in einem Thermomixer inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde mit 500 µL NH_4OH gequencht und *in vacuo* eingeengt. Der Rückstand wurde daraufhin in 500 µL Wasser aufgenommen und das verbliebene CPG-Trägermaterial über einen Spritzenfilter der Firma *Macherey-Nagel* abfiltriert. Die so erhaltene Roh-DNA wurde nun zunächst per analytische *rp*-HPLC untersucht und anschließend *rp*-HPL-chromatographisch gereinigt. Für die Trennung wurde folgendes Protokoll verwendet:

Säule: *VP 250/10 Nucleosil 100/7 C18*
Puffer: (**A**) 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser
(**B**) 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/ 80% Acetonitril
Flussrate: 5 mL/min
Gradient: 0 – 45% **B** in 45 min

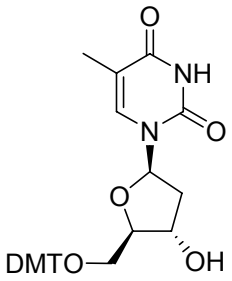
Die erhaltenen DNA-Stränge wurden *in vacuo* zunächst auf 1 mL eingeengt, anschließend über eine *SepPak*^{TM} C_{18}-Säule der Firma *Waters* entsalzt und dann weiter eingeengt. Der Rückstand wurde in 500 µL Wasser gelöst und die Konzentration mittels eines Spectrophotometers ND-1000 der Firma *Nanodrop*® bestimmt. In der nachfolgenden Tabelle sind die erhaltenen DNA-Stränge aufgelistet. Im Falle von ASA, ASB und CSA wurden hochauflösende ESI-Massenspektren aufgenommen, in den restlichen Fällen niederauflösende MALDI-Massenspektren.

Benennung	Sequenz	Ausbeute	m/z ber.	m/z gef.
ASA	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	2 %	4175.78	4175.78
ASB	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	2 %	4175.78	4175.77
asb	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	0.4 %	4175.78	4179.15
CSA	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	6 %	3860.74	3860.73
CSB	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	5 %	3860.74	3864.89
GS2A	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	2 %	5971.09	5976.44
GS2B	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	3 %	5971.09	5977.83

Tab. 5-1: Synthetisierte DNA-Stränge mit Ausbeute und Masse.

5.5 Synthese des SP mit Phosphatrückgrat 45a/b/c/d

5'-*O*-Dimethoxytrityl-thymidin **48**[151]

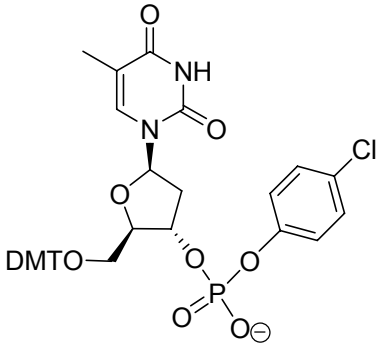


500 mg (2.0 mmol) **1** wurden unter Argonatmosphäre in 6 mL Pyridin abs. über Molsieb (4 Å) gelöst und mit 10 mg (0.08 mmol, 0.04 eq) DMAP versetzt. Nach 1 h Rühren wurde zu dieser Lösung 791 mg (2.3 mmol, 1.1 eq) DMTCl, gelöst in 4 mL Pyridin abs. über Molsieb (4 Å), zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 10 mL MeOH abgestoppt und unter vermindertem Druck eingeengt. Der Rückstand wurde in 25 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung aufgenommen, 3 x mit je 25 mL Chloroform extrahiert, die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch

gereinigt (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH : Pyr = 20 : 1 : 0.1) und ein weißer Feststoffe **48** erhalten (1.1 g, 2.0 mmol, 100%).

R_f = 0.26 ($CHCl_3$: MeOH = 9 : 1); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)**: δ = 11.35 (*s*, 1H; NH), 7.51 (*s*, 1H; CH(6)), 7.46-7.19 (*m*, 9H; $C_{ar}H$), 6.93-6.80 (*m*, 4H, $C_{ar}H$), 6.21 (*t*, *J* = 6.72, Hz, 1H; CH(1')), 5.34 (*d*, *J* = 4.47 Hz, 1H; OH(3')), 4.38-4.25 (*m*, 1H; CH(3')), 3.93-3.80 (*m*,1H; CH(4')), 3.73 (*s*, 6H; 2 x OCH_3), 3.25-3.11 (*m*, 2H; CH_2(5')), 2.36-2.02 (*m*, 2H; CH_2(2')), 1.45 (*s*, 3H; C(5)CH_3); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6)**: δ = 164.34 (*C*O), 158.85 (C_{ar}), 158.83 (C_{ar}), 151.06 (C_{ar}), 150.28 (*C*O), 145.41 (*C*H(6)), 136.78 (C_{ar}), 136.36 (C_{ar}), 136.13 (C_{ar}), 130.41 ($C_{ar}H$), 128.57 ($C_{ar}H$), 128.35 ($C_{ar}H$), 127.46 ($C_{ar}H$), 124.56 ($C_{ar}H$), 113.93 ($C_{ar}H$), 110.26 (*C*(5)), 86.53 (*C*Ph(Ph-OMe)$_2$), 86.19 (*C*H(4')), 84.45 (*C*H(1')), 71.24 (*C*H(3')), 64.47 (CH_2(5')), 55.72 (OCH_3), 39.79 (CH_2(2')), 12.39 (C(5)CH_3); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{31}H_{32}N_2O_7+Na]^+$: 567.2102; gef.: 567.2096; **Smp**.: 114-116 °C; **IR**: 3402*br*, 3216*br*, 3088*m*, 2932*m*, 1684*s*, 1607*w*, 1508s, 1440*w*, 1248*s*, 1259*m*, 1175*m*, 1031*w*, 674*w*, 444*w.*

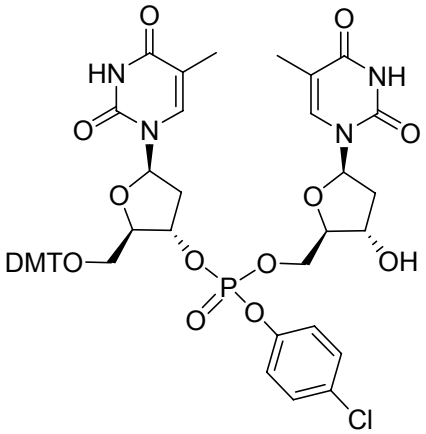
5'-*O*-Dimethoxytrityl-3'-*O*-(4-chlorphenylphosphoryl)-thymidin **47**



In 30 mL THF abs. wurden 445 mg (6.5 mmol, 10 eq) 1,2,4-Triazol, 910 µL (6.5 mmol, 10 eq) NEt_3 und 536 µL (3.2 mmol, 5 eq) 4-Chlorphenyldichlorphosphat unter Argonatmosphäre gelöst und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wurde über einen Spritzenfilter zu 351 mg (0.65 mmol) **48** in 40 mL Pyridin abs. zugetropft und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. $NaHCO_3$-Lösung beendet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 30 mL $CHCl_3$ aufgenommen, 3 x mit je 30 mL ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH = 7 : 1 → 2 : 1 + 1% Pyr.) und das Produkt als gelber, klebriger Feststoff **47** erhalten (450 mg, 0.61 mmol, 95%).

***R*f** = 0.31 ($CHCl_3$: MeOH = 7 : 3); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 11.37 (*s*, 1H; N*H*), 7.47 (*s*, 1H; C*H*(6)), 7.41-7.32 (*m*, 3H; $C_{ar}H$), 7.29 (*t*, *J* = 7.45 Hz, 2H; $C_{ar}H$), 7.26-7.15 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 7.07 (*d*, *J* = 8.79 Hz, 2H; $C_{ar}H$), 6.87 (*dd*, *J* = 8.99, 2.96 Hz, 4H; $C_{ar}H$), 6.18 (*dd*, *J* = 7.83, 6.39 Hz, 1H; C*H*(1')), 4.79-4.75 (*m*, 1H; C*H*(3')), 4.09-4.03 (*m*, 1H; C*H*(4')), 3.73 (*s*, 6H; 2 x OCH_3), 3.27-2.97 (*m*, 2H; CH_2(5')), 2.45-2.10 (*m*, 2H; CH_2(2')), 1.37 (*s*, 3H; C(5)CH_3); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 163.58 (*C*O), 158.09 (C_{ar}), 158.06 (C_{ar}), 152.66 (C_{ar}), 150.33 (*C*O), 149.54 (*C*H(6)), 144.57 (C_{ar}), 136.06 (C_{ar}), 135.25 (C_{ar}), 135.09 (C_{ar}), 129.63 (C_{ar}H), 128.51 (C_{ar}H), 127.84 (C_{ar}H), 127.58 (C_{ar}H), 126.74 (C_{ar}), 123.84 (C_{ar}H), 121.25 (C_{ar}H), 113.16 (C_{ar}H), 109.64 (*C*(5)), 85.87 (*C*Ph(Ph-OMe)$_2$), 84.27 (*C*H(4')), 83.67 (*C*H(1')), 74.98 (*C*H(3')), 63.86 (CH_2(5')), 54.96 (O*C*H_3), 39.79 (CH_2(2')), 11.57 (C(5)*C*H_3); **ESI-MS** (neg.): ber. für [$C_{37}H_{35}N_2O_{10}P$+Cl]$^-$: 733.1723; gef.: 733.1703; **IR**: 3381*br*, 3168*br*, 3062*m*, 2932*m*, 2836*m*, 1683*s*, 1607*s*, 1508*s*, 1464m, 1440*m*, 1248*s*, 1175*s*, 1091*m*, 1031*s*, 827*m*, 751*m*, 701*m*, 583*m.*

5'-*O*-Dimethoxytrityl-thymidinyl-3'-hydroxy-thymidinyl-4-chlorphenyl-phosphat **46**

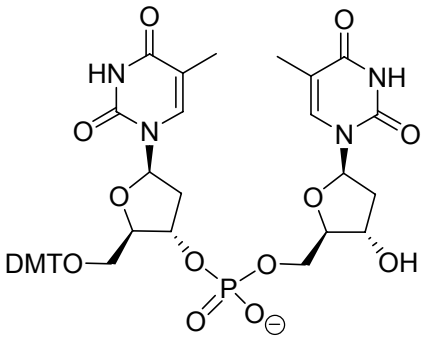


430 mg (0.59 mmol) **47** wurden unter Argonatmosphäre in 100 mL Pyridin abs. gelöst und mit 142 mg (0.59 mmol, 1 eq) **1** und 870 mg (2.9 mmol, 5 eq) 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 3.5 h wurde mit 100 mL H_2O dest. gequencht und 3 x mit je 100 mL DCM extrahiert. Die org. Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und unter verminderten Druck eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH : Pyr = 40 : 1 : 0.1 → 20 : 3 : 0.1) und das Produkt **46** als gelbes Öl erhalten (437 mg, 0.46 mmol, 76%).

***R*f** = 0.37 ($CHCl_3$: MeOH = 20 : 3); **^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 11.38 (*s*, 1H; N*H*), 11.30 (*s*, 1H; N*H*), 7.47 (*s*, 1H; C*H*(6A)), 7.43 (*s*, 1H; C*H*(6B)), 7.42-7.33 (*m*, 6H; $C_{ar}H$), 7.29 (*t*, *J* = 7.86 Hz, 2H; $C_{ar}H$), 7.26-7.19 (*m*, 2H; $C_{ar}H$), 6.89-6.82 (*m*, 4H; $C_{ar}H$), 6.25-6.13

(*m*, 2H; C*H*(1'A), C*H*(1'B)), 5.47-5.43 (*m*, 1H; C(3')O*H*), 5.20-5.16 (*m*, 1H; C*H*(3'A)), 4.41-4.26 (*m*, 2H; CH_2(5'B)), 4.25-4.20 (*m*, 1H; C*H*(3'B)), 4.16-4.13 (*m*, 1H; C*H*(4'A)), 3.95-3.91 (*m*, 1H; C*H*(4'B)), 3.72 (*s*, 6H; 2 x OCH_3), 3.29-3.21 (*m*, 2H; CH_2(5'A)), 2.59-2.51 (*m*, 2H; CH_2(2'A)), 2.31-2.00 (*m*, 2H; CH_2(2'B)), 1.68 (*d*, *J* = 3.76 Hz, 3H; C(5)CH_3(B)), 1.48 (*s*, 3H; C(5)CH_3(A)); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 163.46 (*C*O), 158.09 (*C*O), 150.24 (C_{ar}), 150.21 (C_{ar}), 149.48 (*C*H(6)), 148.55 (*C*O), 146.41 (C_{ar}), 144.37 (*C*O), 136.06 (C_{ar}H), 135.66 (C_{ar}), 135.54 (C_{ar}), 134.97 (C_{ar}), 129.67 (C_{ar}H), 127.78 (C_{ar}H), 127.53 (C_{ar}H), 127.58 (C_{ar}H), 126.73 (C_{ar}), 123.78 (C_{ar}H), 121.66 (C_{ar}H), 113.12 (C_{ar}H), 109.80 (C_{ar}), 109.64 (*C*(5)), 86.03 (*C*Ph(Ph-OMe)$_2$), 84.02 (*C*H(1'A)), 83.95 (*C*H(4'B)), 83.64 (*C*H(1'B)), 83.10 (*C*H(4'A)), 78.67 (*C*H(3'A)), 69.81 (*C*H(3'B)), 68.22 (*C*H_2(5'B)), 63.01 (*C*H_2(5'A)), 54.91 (O*C*H_3), 38.46 (*C*H_2(2'B)), 37.13 (*C*H_2(2'A)), 11.89 (C(5)*C*H_3), 11.59 (C(5)*C*H_3); **ESI-MS** (pos.): ber. für $[C_{47}H_{48}ClN_4O_{14}P+Na]^+$: 981.2485; gef.: 981.2475; **Smp:** 105 °C, **IR**: 3188*w*, 3052*w*, 2875*w*, 1684*s*, 1614*w*, 1507*m*, 1491*m*, 1461*m*, 1402*w*, 1271*m*, 1250*s*, 1174*s*, 1012*s*, 954*m*, 701*m*, 659*w.*

5'-*O*-Dimethoxytrityl-dithymidinyl-monophosphat **49**



296 mg (0.31 mmol) **46** wurden unter Argonatmosphäre in 5 mL NH_4OH gelöst und bei Raumtemperatur für 3 Tage gerührt. Die Reaktionsmischung wurde *in vacuo* eingeengt und mittels *rp*-HPLC gereinigt. Als Säule wurde eine *VP 250/10 Nucleosil 120-7 rp*-Säule und als mobile Phase Puffer A (0.1 M NEt_3OAc in Wasser)/Puffer B (0.1 M NEt_3OAc in 80% MeCN) mit einer Flussrate von 5 mL/min verwendet. Es wurde für jede Trennung 1 mL Lösung durch ein *rheodyne*-Ventil auf die Säule gegeben, so dass pro Trennung ca. 20 mg des Gemisches getrennt wurden. Die Detektion erfolgte bei 260 nm. Der Puffer B-gradient wurde wie folgt gefahren:

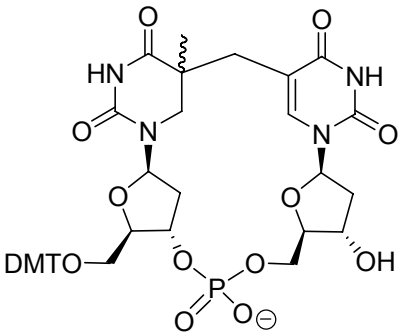
0 – 45 min 10 - 35% Puffer B

45 – 49 min 35 – 100% Puffer B.

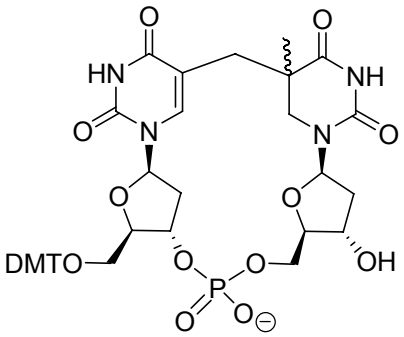
Das Produkt **49** konnte als farbloser Feststoff isoliert werden (160 mg, 0.19 mmol, 61%).

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 7.76 (d, *J* = 0.82 Hz, 1H; CH(6B)), 7.48 (s, 1H; CH(6A)), 7.30 (t, *J* = 7.57 Hz, 2H; $C_{ar}H$), 7.24-7.22 (m, 4H; $C_{ar}H$), 7.19-7.12 (m, 3H; $C_{ar}H$), 6.88-6.86 (m, 4H; $C_{ar}H$), 6.21 (dd, *J* = 7.58, 5.04 Hz, 1H; CH(1'B)), 6.20-6.16 (m, 1H; CH(1'A)), 4.77 (m, 1H; CH(3'B)), 4.22 (m, 1H; CH(3'A)), 4.14-4.12 (m, 1H; CH(4'B)), 3.82-3.76 (m, 3H; CH_2(5'A), CH(4'A)), 3.73 (s, 6H; 2 x OCH_3), 3.26 (dd, *J* = 10.33, 4.04 Hz, 1H; CH_{2b}(5'B)), 3.17 (dd, *J* = 10.26, 2.60 Hz, 1H; CH_{2a}(5'B)), 2.41-2.32 (m, 1H; CH_{2b}(2'B)), 2.32-2.22 (m, 1H; CH_{2a}(2'B)), 2.10-1.95 (m, 2H; CH_2(2'A)), 1.74 (s, 3H; C(5B)CH_3), 1.35 (s, 3H; C(5A)CH_3); **^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 163.64 (*C*O), 163.48 (*C*O), 158.08 (*C*O), 156.31 (*C*O), 150.37 (C_{ar}), 150.27 (C_{ar}), 144.40 (C_{ar}), 136.09 (C_{ar}), 135.34 (C_{ar}), 135.20 (*C*H(6B)), 135.05 (*C*H(6A)), 129.63 (C_{ar}H), 128.96 (C_{ar}H), 127.77 (C_{ar}H), 127.57 (C_{ar}H), 116.82 (C_{ar}H), 113.13 (C_{ar}H), 109.61 (*C*(5B)), 109.56 (*C*(5A)), 85.81 (*C*H(4'A)), 84.39 (*C*H(4'B)), 83.72 (*C*H(1'A)), 83.64 (*C*H(1'B)), 74.63 (*C*H(3'B)), 70.90 (*C*H(3'A)), 64.63 (CH_2(5'A)), 63.83 (CH_2(5'B)), 54.91 (O*C*H_3), 38.22 (CH_2(2'A)), 38.21 (CH_2(2'B)), 11.88 (C(5A)CH_3), 11.45 (C(5B)CH_3); **ESI-MS** (neg.): ber. für [$C_{41}H_{44}N_4O_{14}P$]: 847.7802; gef.: 847.7571; **Smp:** 109 °C, **IR**: 3191*w*, 3062*w*, 2836*w*, 1658*s*, 1607*w*, 1508*m*, 1670*s*, 1444*m*, 1367*w*, 1272*w*, 1248*m*, 1204*m*, 1174*s*, 1061*s*, 1032*m*, 962*w*, 826*m.*

Belichtung von 5'-*O*-Dimethoxytrityl-di-thymidin-monophosphat **49**[200*]



45a/b



45c/d

Zu einem Puffer (pH 7.0) aus 269 mg (1.6 mmol, 10 mM) Dipicolinsäure (DPA), 94 mg (1.6 mmol, 10 mM) Natriumchlorid in 161 mL Wasser dest. wurden 136 mg (0.16 mmol, 1 mM) **49** gegeben. Die Lösung wurde auf 6 Petrischalen verteilt, in der Lyophille vollständig getrocknet und in eine *Glovebox* eingeschleust. Es wurde bei 254 nm 4 h belichtet. Der feste Trockenfilm wurde nochmals gelöst, lyophilisiert und in der *Glovebox* bei 254 nm 6 h belichtet.

* IUPAC-Name: (2*R*,4*R*,5*S*,10*R*,11*S*,13*R*,20*S*)-4-{[bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy]methyl}7,11-dihydroxy-20-methyl-3,6,8,26-tetraoxa-1,14,16,22-tetraaza-7-phosphapentacyclo[18.3.1.1^{2,5}.1^{10,13}.1^{14,18}]-heptacos-18(25)-en-15,17,21,23-teron-7-oxid

Das Rohprodukt wurde mittels *rp*-HPLC gereinigt. Als Säule wurde eine *VP 250/10 Nucleosil 120-7 rp*-Säule und als mobile Phase Puffer A (1% TFA in Wasser)/Puffer B (1% TFA in MeCN) mit einer Flussrate von 5 mL/min verwendet. Es wurde für jede Trennung 1 mL Lösung durch ein *rheodyne*-Ventil auf die Säule gegeben, so dass pro Trennung ca. 15 mg des Gemisches getrennt wurden. Die Detektion erfolgte bei 260 nm. Der Puffer B-gradient wurde wie folgt gefahren:

0 – 50 min 0 - 80% Puffer B

50 – 56 min 80 – 0% Puffer B.

Das Produkt **45a/b/c/d** konnte als farbloser Feststoff isoliert werden (7 mg, 0.01 mmol, 5%). Wegen der geringen Substanzmenge konnte kein NMR-Spektrum aufgenommen werden.

ESI-MS (neg.): ber. für $[C_{41}H_{44}N_4O_{14}P]$: 847.7802; gef.: 847.2514; **Zersetzungspunkt**: 192 °C, **IR**: 3200*w*, 2943*w*, 1683*s*, 1471*m*, 1352*s*, 1271*s*, 1189*m*, 1173*s*, 1079*w*, 965*m*, 810*m*, 662*m.*

Für den eindeutigen Nachweis, dass es sich beim Produkt um das SP und nicht um ein anderes TT-Dimer handelte, musste der Produktpeak über ESI-MS/MS fragmentiert werden. Über das Fragmentierungsmuster kann dann eindeutig zugeordnet werden, um welches TT-Dimer es sich handelt. Allerdings konnte das Produkt über ESI-MS/MS nur zweimal fragmentiert werden, wodurch noch keine Aussage möglich war. Deshalb wurde das Produkt mit 3 N HCl 2 h bei 100 °C sauer hydrolysiert. Anschließend wurde das erhaltene Spaltungsprodukt erneut massenspektrometrisch untersucht. Hierbei konnte das charakteristische Fragmentierungsmuster für 5-(α-Thyminyl)-5,6-dihydrothymin **7** gefunden werden.[215]

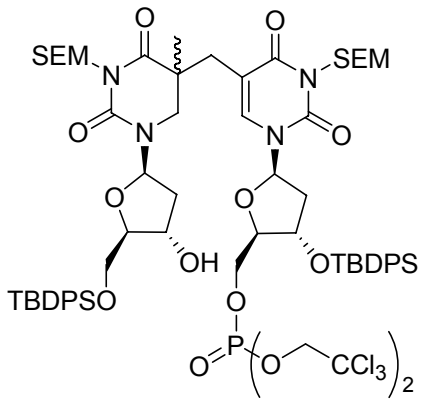
ESI-MS (neg.): ber. für $[C_{10}H_{12}N_4O_4\text{-}H]^-$: 251.0786; gef.: 251.0811.

Fragmentierungsmuster: ber. für $[C_{10}H_{12}N_4O_4\text{-}H]^-$: 251, 208,179,127.

gef. für $[C_{10}H_{12}N_4O_4\text{-}H]^-$: 251, 208,179.

5.6 Synthese des SP mit Phosphatrückgrat 50a/b

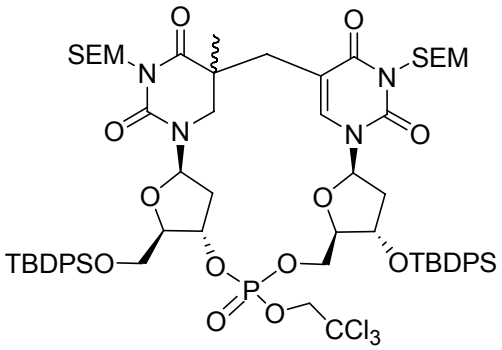
(*N*-Trimethylsilylethoxymethyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5,6-dihydrothymidyl)-thymidinyl-bis(trichloroethyl)-phosphat **51a/b**[201]



100 mg (0.08 mmol) **18a/b** wurden in 1 mL Pyridin gelöst und entgast. Nach Zugabe von 37 mg (0.10 mmol, 1.2 eq) Phosphorsäuredi(trichlorethylester)chlorid bei 0 °C wurde die Reaktion 19 h bei 4 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde *in vacuo* eingeengt, der Rückstand in 10 mL Chloroform aufgenommen und 3 x mit je 10 mL Wasser dest. gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silica-H, $CHCl_3$: MeOH = 50 : 1) wurde das Produkt **51a/b** als farbloses Öl erhalten (31 mg, 0.02 mmol, 24%).

R_f = 0.4 ($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1); **MALDI-MS** (pos.): ber. für $[C_{68}H_{95}Cl_6N_4O_{15}Psi_4+Na]^+$: 1587.5; gef.: 1587.8.

Ringschluß von **51a/b** zu **50a/b**[201*]



* IUPAC-Name: (2*R*,4*R*,5*S*,10*R*,11*S*,13*R*,20*S*)-11-{[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy}-4-({[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]-oxy}methyl)-20-methyl-7-(2,2,2-trichloroethoxy)-16,22-bis{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl}-3,6,8,26-tetraoxa-1,14,16,22-tetraaza-7-phosphapentacyclo[18.3.1.1^{2,5}.1^{10,13}.1^{14,18}]heptacos-18(25)-en-15,17,21,23-teron-7-oxid

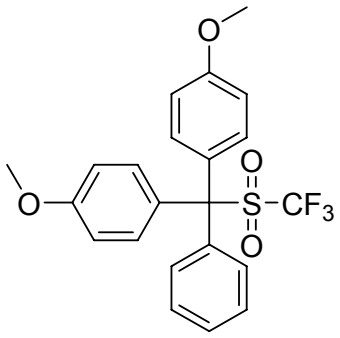
31 mg (0.02 mmol) **51a/b** wurden in 1 mL Pyridin/NH_4OH konz. (1:1) gelöst, bei Raumtemperatur 4 Tage gerührt und *in vacuo* eingeengt (35 mg), so dass der Diester enstand.

MALDI-MS (pos.): ber. für $[C_{66}H_{93}Cl_3N_4O_{15}PSi_4+Na]^+$: 1455.1; gef.: 1455.6.

Das Rohprodukt wurde in 1 mL Pyridin gelöst und mit 3.6 mg (0.12 mmol, 5 eq) MSNT versetzt. Nach 7 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 1 mL Wasser dest. beendet und 3 x mit je 2 mL $CHCl_3$ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel-60, $CHCl_3$: MeOH = 50 : 1) wurde das Produkt **50a/b** als farbloses Öl erhalten (8 mg, 6.2 µmol, 26%).

MALDI-MS (pos.): ber. für $[C_{64}H_{91}N_4O_{14}PSi_4^-+H]^+$: 1283.7; gef.: 1283.0.

5.7 Synthese von Dimethoxytrityltriflat 38[189]

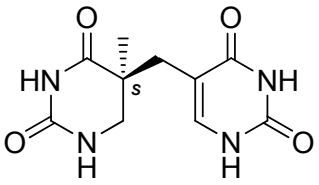


Zu einer Lösung aus 4.4 g (17.1 mmol) Silbertriflat in 20 mL THF abs. wurden unter Stickstoffatmosphäre 5.8 g (17.1 mmol) Dimethoxytritylchlorid in 25 mL THF abs. zugegeben. Nach 2 h wurde unter Stickstoffgegenstrom das gebildete Silberchlorid abfiltriert und mit 50 mL THF abs. gespült. Das Filtrat wurde über eine Etherbrücke *in vacuo* eingeengt und der Rückstand in 20 mL DCM abs. gelöst. Durch Zugabe von 50 mL Diethylether wurde über Nacht bei -20 °C auskristallisiert. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit 100 mL Diethylether gespült. Das Produkt **38** konnte als roter Feststoff erhalten und unter Argonatmosphäre bei -20 °C gelagert werden (3.1 g, 7.0 mmol, 41%).

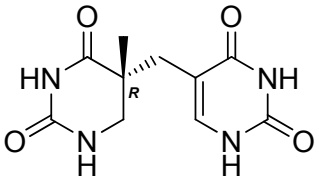
^{19}F-NMR (376 MHz, $CDCl_3$): δ = -76.59; **^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 7.98-7.90 (*m*, 1H; $C_{ar}H$), 7.74-7.70 (*m*, 2H; $C_{ar}H$), 7.65 (*d*, *J* = 8.62 Hz, 4H; $C_{ar}H$), 7.49-7.48 (*m*, 2H; $C_{ar}H$), 7.36 (*d*, *J* = 9.04 Hz, 4H; $C_{ar}H$), 4.15 (*s*, 6H; OCH_3); **^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$)**: δ = 144.9 (C_{ar}), 138.3 (CF_3), 137.9 (C_{ar}), 129.9 (C_{ar}H), 129.8 (C_{ar}H), 128.6 (C_{ar}H), 117.8

(C_{ar}H), 77.1 (C_{ar}), 58.0 (OCH$_3$); **Smp:** 135 °C, **IR**: 2980*w*, 2959*w*, 2840*w*, 1611*m*, 1576*s*, 1509*m*, 1487*w*, 1453*s*, 1437*s*, 1366*s*, 1321*s*, 1295*m*, 1255*s*, 1144*s*, 1124*s*, 1030*m*, 1004*s*, 912*m*, 844*s*, 753*m*, 636*m,* 576*m.*

5.8 Synthese von 5-(α-Thyminyl)-5,6-dihydrothymin[214]



7a



7b

64 mg (0.05 mmol) **30a** wurden in 7 mL 4 N HCl, bzw. 120 mg (0.10 mmol) **43b** wurden in 13 mL 4 N HCl, gelöst und 1.5 h refluxiert. Die Säure wurde anschließend abdestilliert und der Rückstand in 1.8 mL Methanol gelöst. Die Lösung wurde abzentrifugiert, abdekantiert und *in vacuo* eingeengt. Der Rückstand **7a/b** wurde in je 1 mL H_2O gelöst und mittels *rp*-HPLC gereinigt. Als Säule wurde eine *VP 250/10 Nucleosil 120-7 C18* Säule und als mobile Phase 0.1 M Triethylammoiniumacetat-Puffer in H_2O isokratisch mit einer Flussrate von 5 mL/min verwendet. Es wurde für jede Trennung 0.5 mL Lösung durch ein *rheodyne*-Ventil auf die Säule gegeben. Die Detektion erfolgte bei 250 nm. Es wurden insgesamt 200 µg (0.79 µmol, 2%) **7a** und 600 µg (2.38 µmol, 3%) **7b** jeweils als grauer Feststoff erhalten.
Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte von **7a** kein ^{13}C-NMR aufgenommen werden.

S-Enantiomer:

^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 10.16 (*s*, 1H; N*H*), 9.87 (*s*, 1H; C*H*(6B)), 7.44 (*s*, 1H; N*H*), 7.11 (*s*, 1H; N*H*), 3.02 (*dd*, *J* = 12.83, 2.70 Hz, 1H; CH_{2b}(6A)), 2.86 (*dd*, *J* = 12.80, 2.73 Hz, 1H; CH_{2a}(6A)), 2.33 (*d*, *J* = 13.81 Hz, 2H; CH_2(5)), 0.97 (*s*, 3H; C(5)CH_3); **ESI-MS** (neg.): ber. für [$C_{10}H_{12}N_4O_4$-H]$^-$: 251.0786; gef.: 251.0777.

R-Enantiomer:

^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 11.37 (*s*, 1H; N*H*), 9.90 (*s*, 1H; C*H*(6B)), 7.47 (*s*, 1H; N*H*), 7.14 (*s*, 1H; N*H*), 3.04 (*dd*, *J* = 12.91, 2.75 Hz, 1H; CH_{2b}(6A)), 2.89 (*dd*, *J* = 12.91, 2.75 Hz, 1H; CH_{2a}(6A)), 2.35 (*d*, *J* = 13.90 Hz, 2H; CH_2(5)), 1.00 (*s*, 3H; C(5)CH_3); **^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d$_6$)**: δ = 176.3 (*C*O), 165.9 (*C*O), 155.0 (*C*O), 153.8

(*C*O), 141.7 (*C*H(6B)), 107.4 (*C*(5B)), 104.9 (*C*(5A)), 44.2 (*C*H_2(6A)), 30.6 (*C*H_2(5)), 21.0 (C(5)*C*H_3); **ESI-MS** (neg.): ber. für $[C_{10}H_{12}N_4O_4\text{-}H]^-$: 251.0786; gef.: 251.0784.

5.9 Schmelzpunkt-Messungen

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte der DNA-Stränge wurden 3 µM DNA-Duplex, 150 mM NaCl und 10 mM Tris*HCl (pH 7.3) in 1000 µL Gesamtvolumen in eine UV-Küvette gegeben und mit 3 Tropfen Silikonöl überschichtet, um das Verdampfen der Probe während der Messung zu verhindern. Anschließend wurde über fünf Zyklen in 0.5 °C-Schritten von 0 – 85 °C abgekühlt und erwärmt. Währenddessen wurde die Absorption der Lösung bei den Wellenlängen 260 nm und als Hintergrund bei 320 nm gemessen. Durch mathematische Umformungen konnten die Schmelzpunkte bestimmt werden. Diese sind in Tabelle 5-2 aufgeführt.

Bennenung	Sequenz	Schmelzpunkt [°C]
AS_ungeschädigt	5'-ATC GGC TTC GCG CA-3'	64.8-65.8
ASA	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	44.6-45.4
ASB	5'-ATC GGC T^TC GCG CA-3'	41.7-42.7
CS_ungeschädigt	5'-T ATT GCA TCA TGC-3'	51.1-52.0
CSA	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	42.5-43.5
CSB	5'-T AT^T GCA TCA TGC-3'	40.8-41.4
GS_ungeschädigt	5'-CAG CAT CTT CAT CAT ACA GT-3'	60.0-61.2
GS2A	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	50.5-51.7
GS2B	5'-CAG CAT CT^T CAT CAT ACA GT-3'	50.7-51.5

Tab. 5-2: Schmelzpunkte der DNA-Stränge.

5.10 FP-Messung

Die Fluoreszenzpolarisation bietet die Möglichkeit, Bindungsstudien zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen, in diesem Fall die SP-Lyase, zu erstellen. Die FP-Messungen wurden mit dem *POLARION*™ Fluoreszenzphotometer der Firma Tecan durchgeführt. Da der Spiegel und das Monochromatorgitter des Gerätes selbst schon einen Einfluss auf die Polarisation haben, musste ein Korrekturfaktor, der sogenannte G-Faktor, von reinem Fluorescein (1.1079) berücksichtigt werden. Für die Messungen wurden Konzentrationsreihen der SP-Lyase (0 ng/µL – 56 ng/µL) mit der zu untersuchenden DNA (10 pg) in einem Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, pH 7.0) präpariert. Das Gesamtproben-

volumen umfasste 100 µL. Bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm wurden die Proben bei 37 °C vermessen.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Ångström (1 Å = 10^{-10} m)
Abs.	absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
AdoH	5'-Desoxyadenosin
Aq.	Wässrig
ATP	Adenosintriphosphat
ATT	6-Aza-2-thiothymin
B.	*Bacillus*
ber.	berechnet
BER	Basenexzisionsreparatur
BTT	5-Benzylthiotetrazol
BuLi	Butyllithium
Bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CC	*chromcart*
CEDCl	Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid
COSY	*correlated spectroscopy*
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CPG	*controlled pore glass*
Cy	Cyclohexyl
d	Dublett
d	Tage
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
DBPO	Dibenzoylperoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DFT	Dichte-Funktional-Theorie
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl

DMTCl	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl-chlorid
DNA	*deoxyribonucleic acid*
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
e^-	Elektron
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigester
eq.	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisierung
Et_2O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FAB	*fast atom bombardment*
FTICR	*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HATU	*N*-[(Dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylen]-*N*-methylaminium Hexafluorophospat-*N*-oxid
HMBC	*long range heteronuclear multiple quantum correlation*
HMQC	*heteronuclear multiple quantum correlation*
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HRMS	Hochaufgelöstes Massenspektrum
Hz	Hertz
I	Intensität
i-Hex	*iso*-Hexan
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
L	Liter
LDA	Lithiumdiisopropylamin
LFP	Laser-Flash-Photolyse
M	molar
MALDI-TOF	*matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight*

Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MEM	Methoxyethoxymethyl
MeOH	Methanol
Mes	Mesitylen
min	Minute(n)
MS	Massenspektrum
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol
NBS	*N*-Bromsuccinimid
np	*normal phase*, Normaöphase
NOE	*nuclear overhauser effect*
NOESY	*nuclear overhauser effect spectroscopy*
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NEt_3	Triethylamin
NMR	*nuclear magnetic resonance*
PAA	Polyacrylamid
Pac_2O	Phenoxyessigsäureanhydrid
Pent	Pentan
PG	Schutzgruppe (*protecting group*)
ppm	*parts per million*
*p*TsOH	*para*-Toluolsulfonsäure
quant.	quantitativ
R	Rest
rel.	relativ
R_f	Retentionsfaktor
RNA	*ribonucleic acid*
ROESY	*rotating frame overhauser effect spectroscopy*
rp	*reversed phase*, Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	*S*-Adenosylmethionin
SASP's	*small, acid-soluble spore proteins*
SEM	Trimethylsilylethoxymethyl
SEMCl	Trimethylsilylethoxymethylchlorid
Smp.	Schmelzpunkt
SP	Sporen-Photoprodukt
spl	Sporen-Photoprodukt-Lyase

T	Thymin
T	Temperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	*tert*-Butyldimethylsilyl
TBDMSCl	*tert*-Butyldimethylsilylchlorid
TBDPS	*tert*-Butyldiphenylsilyl
TBDPSCl	*tert*-Butyldiphenylsilylchlorid
TBTU	2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
t-Bu	*tert*-Butyl
TES	Triethylsilyl
TESCl	Triethylsilylchlorid
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TMS-OMe	Methoxytrimethylsilan
TOF	*time of flight,* Flugzeit
U	Uracil
UV	ultraviolett
ü. N.	über Nacht
Vis	*visable*
VP	*varioprep*
W	Watt
z. B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

1. McCarty, M., *The Transforming Principle-Discovering that Genes are made of DNA*, W. W. Norton & Company, Inc.: New York, **1985**.
2. Simons, C., *Nucleosides Mimetics-Their Chemistry and Biological Properties*, Gordon and Breach Science Publishers: Singapore, **2001**; *3*.
3. Michelson, A. M.; Todd, A. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 951-959. Mononucleotides derived from thymidine. Identity of thymidylic acid from natural sources with thymidine-5' phosphate.
4. Bülle Jan, H. A., *Das Basiswissen der organischen Chemie*, Thieme Verlag: Stuttgart, **2000**.
5. Chargaff, E., *Experiential* **1950**, *6*, 201-209. Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation.
6. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., *Nature* **1953**, *171*, 737-738. A structure for deoxyribose nucleic acid.
7. DePinho, R. A., *Nature* **2000**, *408 (6809)*, 248-254. The age of cancer.
8. Friedberg, E. C.; Wagner, R.; Radman, M., *Science* **2002**, *296 (5573)*, 1627-1630. Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival, and the Genesis of Mutations.
9. Greenberg, M. M.; Barvian, M. R.; Cook, G. P.; Goodman, B. K.; Matray, T. J.; Tronche, C.; Venkatesan, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119 (8)*, 1828-1839. DNA damage induced via 5,6-dihydrothymid-5-yl in single-stranded oligonucleotides.
10. Rich, T.; Allen, R. L.; Wyllie, A. H., *Nature* **2000**, *407 (6805)*, 777-783. Defying death after DNA damage.
11. Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W., *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press: Washington, D. C., **1995**; *1*.
12. Lindahl, T., *Nature* **1993**, *362 (6422)*, 709-715. Instability and decay of the primary structure of DNA.
13. Zhou, B.-B. S.; Elledge, S. J., *Nature* **2000**, *408 (6811)*, 433-439. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.
14. Hoeijmakers, J. H. J., *Nature* **2001**, *411 (6835)*, 366-374. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.
15. Friedberg, E. C., *Nature* **2003**, *421 (6921)*, 436-440. DNA damage and repair.
16. Schärer, O. D., *Angew. Chem.* **2003**, *115 (26)*, 3052-3082. Chemie und Biologie der DNA-Reparatur.
17. Weber, S., *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1707*, 1-23. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: A review of recent biophysical studies on photolyase.
18. Ananthaswamy, H. N.; Pierceall, W. E., *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 1119-1136. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis.
19. Taylor, J.-S., *J. Chem. Ed.* **1990**, *67*, 835-841. DNA, sunlight and skin cancer.
20. Taylor, J. S., *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76-82. Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer.
21. Black, H. S.; de Gruijl, F. R.; Forbes, P. D.; Cleaver, J. E.; Ananthaswamy, H. N.; de Fabo, E. C.; Ullrich, S. E.; Tyrrell, R. M., *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *40*, 29-47. Photocarcinogenesis: An overview.
22. Brash, D. E.; Rudolph, J. A.; Simon, J. A.; Lin, A.; McKenna, G. J.; Baden, H. P.; Halperin, A. J.; Pontén, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10124-10128. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma.
23. Daya-Grosjean, L.; Dumaz, N.; Sarasin, A., *J. Photochem. Photobiol., B* **1995**, *28*, 115-124. The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers.
24. Johnston, H., *Science* **1971**, *173*, 517-525. Reduction of stratospheric ozone by nitrogen oxide catalysts from supersonic transport exhaust.

25. Molina, M. J.; Rowland, F. S., *Nature* **1974**, *249*, 810-812. Stratospheric sink for chlorofluormethanes: Chlorine atom catalysed destruction of ozone.
26. Prather, M.; Midgley, P.; Rowland, F. S.; Stolarski, R., *Nature* **1996**, *381*, 551-554. The ozone layer: The road not taken.
27. Ravishankara, A. R.; Hancock, G.; Kawasaki, M.; Matsumi, Y., *Science* **1998**, *280*, 60-61. Photochemistry of ozone: Surprises and recent lessons.
28. Douki, T.; Zalizniak, T.; Cadet, J., *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 171-179. Far-UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: Sequence effects.
29. Perdiz, D.; Grof, P.; Mezzina, M.; Nikaido, O.; Moustacchi, E.; Sage, E., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275 (35)*, 26732-26742. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells - Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis.
30. Yoon, J. H.; Lee, C. S.; O'Connor, T. R.; Yasui, A.; Pfeifer, G. P., *J. Mol. Biol.* **2000**, *299 (3)*, 681-693. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight.
31. Wang, Y. S.; Gaspar, P. P.; Taylor, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122 (23)*, 5510-5519. Quantum chemical study of the electron-transfer-catalyzed splitting of oxetane and azetidine intermediates proposed in the photoenzymatic repair of (6-4) photoproducts of DNA.
32. Cadet, J.; Vigny, P., The photochemistry of nucleic acids. In *Bioorganic Photochemistry*, Morrison, H., Ed. Wiley: New York, **1990**; *1*, 1-272.
33. Friedel, M. G.; Cichon, M. K.; Carell, T., DNA damage and repair: Photochemistry. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2 ed.; Horspool, W.; Lenci, F., Eds. CRC Press: Boca Raton, **2004**; 141/1-141/22.
34. Wood, P. D.; Redmond, R. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256-4263. Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: Intermolecular energy and electron transfer.
35. Douki, T.; Court, M.; Sauvaigo, S.; Odin, F.; Cadet, J., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275 (16)*, 11678-11685. Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
36. Douki, T.; Cadet, J., *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495-2501. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.
37. Johns, H. E.; Pearson, M. L.; LeBlanc, J. C.; Helleiner, C. W., *J. Mol. Biol.* **1964**, *9*, 503-524. The ultraviolet photochemistry of Thymidylyl-(3'->5')-thymidine.
38. Marguet, S.; Markovitsi, D., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127 (16)*, 5780-5781. Time-Resolved Study of Thymine Dimer Formation.
39. Taylor, J.-S.; Garett, D. S.; Brockie, I. R.; Svoboda, D. L.; Telser, J., *Biochemistry* **1990**, *29*, 8858-8866. ^{1}H-NMR assignment and melting temperature study of *cis-syn* and *trans-syn* thymine dimer containing duplexes of d(CGTATTATGC)* d(GCATAATACG).
40. Park, H. J.; Zhang, K.; Ren, Y.; Nadji, S.; Sinha, N.; Taylor, J.-S.; Kang, C. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15965-15970. Crystal structure of a DNA decamer containing a *cis-syn* thymine dimer.
41. Jiang, N.; Taylor, J.-S., *Biochemistry* **1993**, *32*, 472-481. *In vivo* evidence that UV-induced C -> T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of *cis-syn* cyclobutane dimers or their deamination products.
42. M. J. Horsfall; A. Borden; Lawrence, C. W., *J. Bacteriol.* **1997**, *179 (9)*, 2835-2839. Mutagenic Properties of the T-C Cyclobutane Dimer.
43. Tu, Y.; Dammann, R.; Pfeifer, G. P., *J. Mol. Biol* **1998**, *284*, 297-311. Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers *in vivo*.

44. Danilov, V. I.; Les, A.; Alderfer, J. L., *J. Biomol. Struc. Dyn.* **2001**, *19*, 179-191. A theoretical study of the cis-syn pyrimidine dimers in the gas phase and water cluster and a tautomer-bypass mechanism for the origin of UV-induced mutations.
45. Smith, C. A.; Wang, M.; Jiang, N.; Che, L.; Zhao, X. D.; Taylor, J. S., *Biochemistry* **1996**, *35 (13)*, 4146-4154. Mutation spectra of M13 vectors containing site-specific *cis- syn*, *trans-syn-I*, (6-4), and dewar pyrimidone photoproducts of thymidylyl-(3'-5')-thymidine in *Escherichia coli* under SOS conditions.
46. Yasui A., M. S. J., *BioEssays* **1998**, *20 (4)*, 291-297. Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage.
47. Wood, R. D.; Mitchell, M.; Sgouros, J.; Lindahl, T., *Science* **2001**, *291 (5507)*, 1284-1289. Human DNA Repair Genes.
48. Yasui, A.; Eker, A. P. M.; Yasuhira, S.; Yajima, H.; Kobayashi, T.; Takao, M.; Oikawa, A., *EMBO J.* **1994**, *13*, 6143-6151. A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals.
49. Kanai, S.; Kikuno, R.; Toh, H.; Ryo, H.; Todo, T., *J. Mol. Evol.* **1997**, *45*, 535-548. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family.
50. Otoshi, E.; Yagi, T.; Mori, T.; Matsunaga, T.; Nikaido, O.; Kim, S.-T.; Hitomi, K.; Ikenaga, M.; Todo, T., *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1729-1735. Respective role of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4) photoproducts, and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient Xeroderma pigmentosum A cells.
51. Mees, A.; Klar, T.; Gnau, P.; Hennecke, U.; Eker, A. P. M.; Carell, T.; Essen, L. O., *Science* **2004**, *306*, 1789-1793. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair.
52. Sancar, A., *Science* **1996**, *272 (5258)*, 48-49. No "end of history" for photolyases.
53. Essen L. O., K. T., *Cell. Mol. Life. Sci.* **2006**, *63*, 1266-1277. Light-driven DNA repair by photolyases.
54. Lindahl, T.; Karran, P.; Wood, R. D., *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, *7 (2)*, 158-169. DNA excision repair pathways.
55. Vassylyev, D. G.; Kashiwagi, T.; Mikami, Y.; Ariyoshi, M.; Iwai, S.; Ohtsuka, E.; Morikawa, K., *Cell* **1995**, *83*, 773. Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a dna substrate: Structural basis for damaged DNA recognition.
56. Cadet, J.; Anselmino, C.; Douki, T.; Voituriez, L., *J. Photochem. Photobiol., B* **1992**, *15 (4)*, 277-298. New trends in photobiology: Photochemistry of nucleic acids in cells.
57. Kundu, L. M.; Linne, U.; Marahiel, M.; Carell, T., *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5697-5705. RNA is more UV resistent than DNA: The formation of UV-induced DNA lesions is strongly sequence and conformation dependent.
58. Kim, J.-K.; Choi, B. S., *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 849-854. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement.
59. Kim, J.-K.; Patel, D.; Choi, B.-S., *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62 (1)*, 44-50. Contrasting structural impacts induced by *cis-syn* cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: Implication in mutagenesis and repair activity.
60. Hwang, G. S.; Kim, J.-K.; Choi, B. S., *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 359-365. NMR structural studies of DNA decamer duplex containing the dewar photoproduct of thymidylyl(3'->5')thymidine. Conformational changes of the oligonucleotide duplex by photoconversion of a (6-4) adduct to its dewar valence isomer.
61. Lee, J. H.; Hwang, G. S.; Choi, B. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96 (12)*, 6632-6636. Solution structure of a DNA decamer duplex containing the stable 3 ' T · G base pair of the pyrimidine(6- 4)pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: Implications for the highly specific 3 ' T -> C transition of the (6-4) adduct.
62. Mizukoshi, T.; Kodama, T. S.; Fujiwara, Y.; Furuno, T.; Nakanishi, M.; Iwai, S., *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29 (24)*, 4948-4954. Structural study of DNA duplexes containing the (6-4) photoproduct by fluorescence resonance energy transfer.

63. Jing, Y. Q.; Kao, J. F. L.; Taylor, J. S., *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26 (16)*, 3845-3853. Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing *cis-syn*, (6-4) and Dewar photoproducts of TT.
64. Fujiwara, Y.; Iwai, S., *Biochemistry* **1997**, *36 (36)*, 11050-11050. Thermodynamic studies of the hybridization properties of photolesions in DNA.
65. Todo, T.; Takemori, H.; Ryo, H.; Ihara, M.; Matsunaga, T.; Nikaido, O.; Sato, K.; Nomura, T., *Nature* **1993**, *361*, 371-374. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts.
66. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2238. A., Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
67. Todo, T.; Kim, S. T.; Hitomi, K.; Otoshi, E.; Inui, T.; Morioka, H.; Kobayashi, H.; Ohtsuka, E.; Toh, H.; Ikenaga, M., *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25 (4)*, 764-768. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6- 4)photolyase.
68. Nakajima, S.; Sugiyama, M.; Iwai, S.; Hitomi, K.; Otoshi, E.; Kim, S. T.; Jiang, C. Z.; Todo, T.; Britt, A. B.; Yamamoto, K., *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 638-644. Cloning and characterization of a gene (*UVR3*) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*.
69. Hitomi, K.; Kim, S. T.; Iwai, S.; Harima, N.; Otoshi, E.; Ikenaga, M.; Todo, T., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272 (51)*, 32591-32598. Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase.
70. Lin, C. T.; Todo, T., *Genome Biol.* **2005**, *6 (5)*, 220-229. The cryptochromes.
71. Kim, S. T.; Malhotra, K.; Smith, C. A.; Taylor, J. S.; Sancar, A., *J. Biol. Chem.* **1994**, *269 (11)*, 8535-8540. Characterization of (6-4)-photoproduct DNA Photolyase.
72. Heelis, P. F.; Liu, S. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119 (12)*, 2936-2937. Photoenzymic repair of the DNA 6-4 photoproduct - A density functional theory and semiempirical study.
73. Zhao, X. D.; Liu, J. Q.; Hsu, D. S.; Zhao, S. Y.; Taylor, J. S.; Sancar, A., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272 (51)*, 32580-32590. Reaction mechanism of (6-4) photolyase.
74. Hitomi, K.; Nakamura, H.; Kim, S. T.; Mizukoshi, T.; Ishikawa, T.; Iwai, S.; Todo, T., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276 (13)*, 10103-10109. Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction.
75. Courdavault, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Canguilhem, B.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T., *DNA Repair* **2005**, *4*, 836-844. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations.
76. Kan, L.-S.; Voituriez, L.; Cadet, J., *J. Photochem. Photobiol., B* **1992**, *12*, 339-357. The Dewar valence isomer of the (6-4) photoadduct of thymidylyl-(3'-5')-thymidine monophosphate: Formation, alkaline lability and conformational properties.
77. Schaaper, R. M.; Kunkel, T. A.; Loeb, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 487-491. Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites.
78. Sagher, D.; Strauss, B., *Biochemistry* **1983**, *22*, 4518-4526. Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during *in vitro* synthesis: Uniqueness of Adenine nucleotides.
79. Larson, K. L.; Strauss, B. S., *Biochemistry* **1987**, *26*, 2471-2479. Influence of template strandedness on *in vitro* replication of mutagen-damaged DNA.
80. Lee, J. H.; Bae, S. H.; Choi, B. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97 (9)*, 4591-4596. The Dewar photoproduct of thymidylyl(3 '-> 5 ')-thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the "A rule".
81. Donnellan, J. E.; Setlow, R. B., *Science* **1965**, *149*, 308-310. Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores.

82. Douki, T.; Setlow, B.; Setlow, P., *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 163-169. Effects of binding of α/β-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and *in vitro*.
83. Douki, T.; Laporte, G.; Cadet, J., *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3134-3142. Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation.
84. Begley, T. P., Thymine dimer photochemistry: A mechanistic perspective. In *Comprehensive natural products chemistry*, Poulter, C. D., Ed. Elsevier Science B. V.: Amsterdam, Neth., **1999**; *5*, 371-399.
85. Romieu, A.; Bellon, S.; Gasparutto, D.; Cadet, J., *Org. Lett.* **2000**, *2 (8)*, 1085-1088. Synthesis and UV photolysis of oligodeoxynucleotides that contain 5-(phenylthiomethyl)-2'-deoxyuridine: A specific photolabile precursor of 5-(2'-deoxyuridilyl)methyl radical.
86. Koch, R., *Beiträge zur Biologie der Pflanze* **1876**, *2*, 277-308. Untersuchungen über Bakterien. V. Die Aetiologie der Milzbrand Krankheit, begründet auf der Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*.
87. Cohn, F., *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **1876**, *2*, 249-276. Untersuchungen über Bakterien. IV. Beiträge zur Biologie der *Bacillen*.
88. Tyndall, J., *Phil. Trans. R. Soc.* **1877**, *167*, 149-206. Further researches on the department and vital persistence of putrefactive and infective organisms from a physical point of view.
89. Driks, A., *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 389-391. Overview: Development in bacteria: Spore formation in *Bacillus subtilis*.
90. Vreeland, R. H.; Rosenzweig, W. D.; Powers, D. W., *Nature* **2000**, *407*, 897-900. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal.
91. Nicholson, W. L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H. J.; Setlow, P., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64 (3)*, 548-572. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.
92. Nicholson, W. L., *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 410-416. Roles of *Bacillus* endospores in the environment.
93. Phillips, Z. E. V.; Strauch, M. A., *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 392-402. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression.
94. Driks, A., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63 (1)*, 1-20. *Bacillus subtilis* spore coat.
95. Nicholson, W. L.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **1990**, *172 (1)*, 7-14. Dramatic increase in negative superhelicity of plasmid DNA in the forespore compartment of sporulating cells of *Bacillus subtilis*.
96. Moir, A.; Corfe, B. M.; Behravan, J., *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 403-409. Spore germination.
97. Popham, D. L., *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 426-433. Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: The inner wall of the lockbox.
98. Ragkousi, K.; Cowan, A. E.; Ross, M. A.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5556-5562. Analysis of nucleoid morphology during germination and outgrowth of spores of *Bacillus* species.
99. Frenkiel-Krispin, D.; Sack, R.; Englander, J.; Shimoni, E.; Eisenstein, M.; Bullitt, E.; Horowitz-Scherer, R.; Hayes, C. S.; Setlow, P.; Minsky, A.; Wolf, S. G., *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 3525-3530. Structure of the DNA-SspC complex: Implications for DNA packaging, protection, and repair in bacterial spores.
100. Griffith, J.; Makhov, A.; Santiagolara, L.; Setlow, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91 (17)*, 8224-8228. Electron-microscopic studies of the interaction between a *Bacillus subtilis* α/β-type small, acid-soluble spore protein with DNA: Protein binding is cooperative, stiffens the DNA, and induces negative supercoiling.
101. Setlow, P., *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 29-54. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species.

102. Nicholson, W. L.; Setlow, B.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **1990**, *172 (12)*, 6900-6906. Binding of DNA in vitro by small, acid-soluble spore protein from *Bacillus subtilis* and the effectof this binding on DNA topology.
103. Setlow, B.; Sun, D.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **1992**, *174 (7)*, 2312-2322. Interaction between DNA and α/β-type small, acid-soluble spore proteins: A new class of DNA-binding protein.
104. Francesconi, S. C.; MacAlister, T. J.; Setlow, B.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **1988**, *170 (12)*, 5963-5967. Immunoelectron microscopic localization of small, acid-soluble spore proteins in sporulating cells of *Bacillus subtilis*.
105. Setlow, P., *Environ. Mol. Mutagen.* **2001**, *38*, 97-104. Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light.
106. Setlow, B.; Hand, A. R.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **1991**, *173 (5)*, 1642-1653. Synthesis of a *Bacillus subtilis* small, acid-soluble spore protein in *Escherichia coli* causes cell DNA to assume some characteristics of spore DNA.
107. Setlow, P., *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, *42*, 319-338. Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: Structure, synthesis, genetics, function and degradation.
108. Hawes Hackett, R.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **1988**, *170 (3)*, 1403-1404. Properties of spores of *Bacillus subtilis* strains which lack the major small, acid-soluble protein.
109. Popham, D. L.; Sengupta, S.; Setlow, P., *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61 (10)*, 3633-3638. Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins.
110. Setlow, B.; McGinnis, K. A.; Ragkousi, K.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **2000**, *182 (24)*, 6906-6912. Effects of major spore-specific DNA binding proteins on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties.
111. Sohail, A.; Hayes, C. S.; Divvela, P.; Setlow, P.; Bhagwat, A. S., *Biochemistry* **2002**, *41*, 11325-11330. Protection of DNA by α/β-type small, acid-soluble proteins from *Bacillus subtilis* spores against cytosine deamination.
112. Tovar-Rojo, F.; Setlow, P., *J. Bacteriol.* **1991**, *173 (15)*, 4827-4835. Effects of mutant small, acid-soluble spore proteins from *Bacillus subtilis* on DNA in vivo and in vitro.
113. Hayes, C. S.; Setlow, P., *J. Biol. Chem.* **1998**, *273 (28)*, 17326-17332. Identification of protein-protein contacts between α/β-type small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species bound to DNA.
114. Hayes, C. S.; Peng, Z.-Y.; Setlow, P., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275 (45)*, 35040-35050. Equilibrium and kinetic binding interactions between DNA and a group of novel, nonspecific DNA-binding proteins from spores of *Bacillus* and *Clostridium* species.
115. Hayes, C. S.; Alarcon-Hernandez, E.; Setlow, P., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276 (3)*, 2267-2275. N-terminal amino acid residues mediate protein-protein interactions between DNA-bound α/β-type small, acid-soluble spore proteins from *Bacillus* species.
116. Setlow, P., *Mol. Microbiol.* **1992**, *6 (5)*, 563-567. DNA in dormant spores of *Bacillus* species is in an A-like conformation.
117. Mohr, S. C.; Sokolov, N. V. H. A.; He, C.; Setlow, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 77-81. Binding of small acid-soluble spore proteins from *Bacillus subtilis* changes the conformation of DNA from B to A.
118. Patrick, M. H.; Gray, D. M., *Photochem. Photobiol.* **1976**, *24*, 507-513. Independence of photoproduct formation on DNA conformation.
119. Gerhardt, P.; Marquis, R. E., *Spore thermoresistance mechanism,* Am. Soc. Microbiol., Washington DC, **1989**.
120. Cowan, A. E.; Koppel, D. E.; Setlow, B.; Setlow, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100 (7)*, 4209-4214. A soluble protein is immobile in dormant spores of Bacillus subtilis but is mobile in germinated spores: Implications for spore dormancy.

121. Germaine, G. R.; Murell, W. G., *Photochem. Photobiol.* **1973**, *17*, 145-154. Effect of dipicolinic acid on the ultraviolet radiation resistance of *Bacillus cereus* spores.
122. Setlow, B.; Setlow, P., *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59 (2)*, 640-643. Dipicolinic acid greatly enhances production of spore photoproduct in bacterial spores upon UV irradiation.
123. Leuschner, R. G. K.; Lillford, P. J., *Int. J. Food. Sci. Technol.* **2003**, *80*, 131-143. Thermal properties of bacterial spores and biopolymers.
124. Ablett, S.; Darke, A. H.; Lillford, P. J.; Martin, D. R., *Int. J. Food. Sci. Technol.* **1999**, *34 (1)*, 59-69. Glass formation and dormancy in bacterial spores.
125. Setlow, P., *Comments Mol. Cell. Biophys.* **1988**, *5 (5)*, 253-264. Resistance of bacterial spores to ultraviolet light.
126. Donnellan, J. E.; Stafford, R. S., *Biophys. J.* **1968**, *8*, 17-28. The ultraviolet photochemistry and photobiology of vegetative cells and spores of *Bacillus megaterium*.
127. Varghese, A. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1970**, *38 (3)*, 484-490. 5-Thyminyl-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light.
128. Rahn, R. O.; Hosszu, J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *190*, 126-131. Influence of relative humidity on the photochemistry of DNA films.
129. Alcantara, R.; Wang, S. Y., *Photochem. Photobiol.* **1965**, *4*, 473-476. Photochemistry of thymine in aqueous solution.
130. Smith, K. C.; Yoshikawa, H., *Photochem. Photobiol.* **1966**, *5*, 777-786. Variation in the photochemical reactivity of thymine in the DNA of *B. subtilis* spores, vegetative cells and spores germinated in chloramphenicol.
131. Rahn, R. O.; Hosszu, J. L., *Photochem. Photobiol.* **1968**, *8*, 53-63. Photoproduct formation in DNA at low temperatures.
132. Setlow, R. B., *Photochem. Photobiol.* **1968**, *7*, 643-649. Photoproducts in DNA irradiated *in vivo*.
133. Rahn, R. O.; Hosszu, J. L., *Photochem. Photobiol.* **1969**, *10 (2)*, 131-137. Photochemical studies of thymine in ice.
134. Fisher, G. J.; Johns, H. E., *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11*, 429-444. Ultraviolet photochemistry of thymine in aqueous solution.
135. Lindsay, J. A.; Murell, W. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1983**, *113 (2)*, 618-625. A comparison of UV-induced DNA photoproducts from isolated and non-isolated developing bacterial forespores.
136. Slieman, T. A.; Nicholson, W. L., *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66 (1)*, 199-205.
137. Varghese, A. J., Photochemistry of thymidine in ice. *Biochemistry* **1970**, *9 (24)*, 4781-4787. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA.
138. Varghese, A. J., *Photochem. Photobiol.* **1971**, *13*, 357-364. Photochemistry of thymidine as a thin solid film.
139. Munakata, N.; Rupert, C. S., *J. Bacteriol.* **1972**, *111 (1)*, 192-198. Genetically controlled removal of "spore photoproduct" from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores.
140. Munakata, N.; Rupert, C. S., *Mol. Gen. Genet.* **1974**, *130*, 239-250. Dark repair of DNA containing "spore photoproduct" in *Bacillus subtilis*.
141. Stafford, R. S.; Donnellan, J. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *59*, 822-828. Photochemical evidence for conformation changes in DNA during germination of bacterial spores.
142. Smith, K. C., *Photochem. Photobiol.* **1963**, *2*, 503-517. Photochemical reactions of Thymine, Uracil, Uridine, Cytosine and Bromouracil in frozen solution and dried films.
143. Baillie, E.; Germaine, G. R.; Murell, W. G.; Ohye, D. F., *J. Bacteriol.* **1974**, *120*, 516-523. Photoreactivation, photoproduct formation, and deoxyribonucleic acid state in ultraviolet-irradiated sporulating cultures of *Bacillus cereus*.

144. Varghese, A. J., *Biochemistry* **1971**, *10*, 2194-2199. Photochemical reactions of cytosine nucleosides in frozen aqueous solution and in deoxyribonucleic acid.
145. Cline, R. C.; Fink, M. R.; Fink, K. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 2521-2527. Synthesis of 5-substituted pyrimidines *via* formaldehyde addition.
146. Lacher, J. R.; Bitner, J. L.; Emery, D. J.; Sefel, M. E.; Park, J. D., *J. Phys. Chem.* **1955**, *59*, 615-625. The infrared absorption spectra of some substituted purines and pyrimidines in antimony trichloride solution.
147. Rice, J. M.; Dudek, G. O.; Barber, M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4569-4576. Mass spectra of nucleic acid derivatives. Pyrimidines.
148. Bergstrom, D. E.; Rash, K. F., *J. Org. Chem.* **1979**, *44 (9)*, 1414-1417. Synthesis of 5,6-Dihydro-5-(α-thyminyl)thymine.
149. Bergstrom, D. E.; Rash, K. F., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 284. Synthesis of a photoproduct from ultraviolet-irradiation of bacterial spores: 5,6-Dihydro-5-(α-thyminyl)thymine.
150. Shaw, A. A.; Cadet, J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans II* **1990**, 2063-2070. Radical combination processes under the direct effects of gamma radiation on thymidine.
151. Kim, S. J.; Lester, C.; Begley, T. P., *J. Org. Chem.* **1995**, *60 (20)*, 6256-6257. Synthesis of the dinucleotide spore photoproduct.
152. Guo, J.-D.; Luo, Y.; Himo, F., *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11188-11192. DNA repair by spore photoproduct lyase: A density functional theory study.
153. Xue, Y. M.; Nicholson, W. L., *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62 (7)*, 2221-2227. The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation.
154. Slieman, T. A.; Rebeil, R.; Nicholson, W. L., *J. Bacteriol.* **2000**, *182 (22)*, 6412-6417. Spore photoproduct (SP) lyase from *Bacillus subtilis* specifically binds to and cleaves SP (5-thyminyl-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA.
155. Fajardo-Cavazos, P.; Salazar, C.; Nicholson, W. L., *J. Bacteriol.* **1993**, *175 (6)*, 1735-1744. Molecular cloning and characterization of the *Bacilllus subtilis* spore photoproduct lyase (*spl*) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination.
156. Pedraza-Reyes, M.; Gutierrez-Corona, F.; Nicholson, W. L., *J. Bacteriol.* **1994**, *176 (13)*, 3983-3991. Temporal regulation and forespore-specific expression of the spore photoproduct lyase gene by sigma-G RNA-polymerase during *Bacillus subtilis* sporulation.
157. Babitzke, P., *Mol. Microbiol.* **1997,** *26*, 1-9. Regulation of tryptophan biosynthesis: trp-ing the TRAP or how *Bacillus subtilis* reinvented the wheel.
158. Nicholson, W. L.; Chooback, L.; Fajardo-Cavazos, P., *Mol. Gen. Genet.* **1997**, *255*, 587-694. Analysis of spore photoproduct lyase operon (*splAB*) function using targeted deletion-insertion mutations spanning the *Bacillus subtilis ptsHI* and *splAB* operons.
159. Rebeil, R.; Nicholson, W. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98 (16)*, 9038-9043. The subunit structure and catalytic mechanism of the *Bacillus subtilis* DNA repair enzyme spore photoproduct lyase.
160. Rebeil, R.; Sun, Y. B.; Chooback, L.; Pedraza-Reyes, M.; Kinsland, C.; Begley, T. P.; Nicholson, W. L., *J. Bacteriol.* **1998**, *180 (18)*, 4879-4885. Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases.
161. Reichard, P., *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 81-85. The evolution of ribonucleotide reduction.
162. Cheek, J.; Broderick, J. B., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6 (3)*, 209-226. Adenosylmethionine-dependent iron-sulfur enzymes: versatile clusters in a radical new role.

163. Fajardo-Cavazos, P. R., R.; Nicholson, W.L., *Curr. Microbiol.* **2005**, *51*, 331-335. Essential cysteine residues in bacillus subtilis spore photoproduct lyase identified by alanine scanning mutagenesis.
164. Mehl, R. A.; Begley, T. P., *Org. Lett.* **1999**, *1 (7)*, 1065-1066. Mechanistic studies on the repair of a novel DNA photolesion: The spore photoproduct.
165. Lukianova, O. A.; David, S. S., *Curr. Op. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 145-151. A role for iron-sulfur clusters in DNA repair.
166. Douki, T.; Court, M.; Cadet, J., *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *54 (2-3)*, 145-154. Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts.
167. Douki, T.; Cadet, J., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 433-436. Formation of the spore photoproduct and other dimeric lesions between adjacent pyrimidines in UVC-irradiated dry DNA.
168. Nicholson, W. L.; Setlow, B.; Setlow, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8288-8292. Ultraviolet irradiation of DNA complexed with α/β-type small, acid-soluble proteins from spores of *Bacillus* or *Clostridium* species makes spore photoproduct but not thymine dimers.
169. Cheek, J.; Broderick, J. B., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124 (12)*, 2860-2861. Direct H atom abstraction from spore photoproduct C-6 initiates DNA repair in the reaction catalyzed by spore photoproduct lyase: Evidence for a reversibly generated adenosyl radical intermediate.
170. Dronkert, M. L. G.; Kanaar, R., *Mutat. Res.* **2001**, *486*, 217-247. Repair of DNA interstrand cross-links.
171. Thompson, L. H.; Schild, D., *Mutat. Res.* **2001**, *477*, 131-153. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability.
172. Weterings, E.; van Gent, D. C., *DNA Repair* **2004**, *3*, 1425-1435. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis.
173. Zheng, H.; Wang, X.; Warren, A. J.; Legerski, R. J.; Nairn, R. S.; Hamilton, J. W.; Li, L., *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 754-761. Nucleotide excision repair- and polymerase η-mediated error-prone removal of Mitomycin C interstrand cross-links.
174. Friedel, M. G.; Berteau, O.; Pieck, J. C.; Atta, M.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Fontecave, M.; Carell, T., *Chem. Commun.* **2006**, *(4)*, 445-447. The spore photoproduct lyase repairs the 5S- and not the 5R-configured spore photoproduct DNA lesion.
175. Pieck, J. C.; Hennecke, U.; Pierik, A. J.; Friedel, M. G.; Carell, T., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, (47), 36317-36326. Characterization of a New Thermophilic Spore Photoproduct Lyase from Geobacillus stearothermophilus (SplG) with Defined Lesion Containing DNA Substrates.
176. Douki, T.; Setlow, B.; Setlow, P., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 591-597. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of Bacillus species.
177. Dauth, C., *Synthese des Sporen Photoprodukts für die Inkorporation als Intrastrang-DNA-Schaden*, Philipps-Universität, Marburg, **2004**.
178. Drosdziok, W.; Lutze, C.; Kruger, K.; Glusenkamp, K. H.; Rajewsky, M. F., *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2003**, *46 (9)*, 815-835. H-3-labelled alkyl-nucleotides, -nucleosides and -bases for the immunoanalytical quantification of DNA damage and repair.
179. Iwai, S., *Chem. Eur. J.* **2001**, *7 (20)*, 4343-4351. Synthesis and thermodynamic studies of oligonucleotides containing the two isomers of thymine glycol.
180. Carter, K. N.; Greenberg, M. M., *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9 (9)*, 2341-2346. Direct measurement of pyrimidine C6-hydrate stability.
181. Ogilvie, K. K.; Iwacha, D. J., *Tetrahedron Lett.* **1973**, 317-319. Use of the *tert*-butyldimethylsilyl group for protecting the hydroxyl functions of nucleosides.

182. Ogilvie, K. K.; Thompson, E. A.; Quilliam, M. A.; Westmore, J. B., *Tetrahedron Lett.* **1974**, 2865-2868. Selective protection of hydroxyl groups in deoxynucleosides using alkylsilyl reagents.
183. Phadtare, S.; Zemlicka, J., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3675-3679. Synthesis of N^1-(4-hydroxy-1,2-butadien-1-yl)thymine, an analogue of 3'-Deoxythymidine.
184. Friedel, M. G., *Synthese von Modellverbindungen zur Untersuchung der Struktur und Reparatur des Sporen- und (6-4)-Photoproduktes*, Ludwig-Maximilians-Universität, München, **2005**.
185. Anderson, A. S.; Hwang, J.-T.; Greenberg, M. M., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4648-4654. Independent generation and reactivity of 2'-deoxy-5-methyleneuridin-5-yl, a significant reactive intermediate produced from thymidine as result of oxidative stress.
186. Prakash, C.; Saleh, S.; Blair, I. A., *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30 (1)*, 19-22. Selective De-Protection of Silyl Ethers.
187. Bone, E. A.; Davidson, A. H.; Lewis, C. N.; Todd, R. S., *J. Med. Chem.* **1992**, *35 (18)*, 3388-3393. Synthesis and Biological Evaluation of Dihydroeptastatin, a Novel Inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme a Reductase.
188. Baldwin, J. E.; Adlington, R. M.; Mitchell, M. B., *Tetrahedron* **1995**, *51 (17)*, 5193-5206. Stereocontrolled Enantiospecific Synthesis of Anticapsin.
189. Markus Tarköy, M. B. C. L., *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77 (3)*, 716-744. Nucleic-Acid Analogues with Restricted Conformational Flexibility in the Sugar-Phosphate Backbone ('bicyclo-DNA'). Part 3. Synthesis, pairing properties, and calorimetric determination of duplex and triplex stability of decanucleotides from [(3'*S*,5'*R*)-2'-deoxy-3',5'- ethano-β-D-ribofuranosyl]adenine and -thymine.
190. Abbas, S.; Bertram, R. D.; Hayes, C. J., *Org. Lett.* **2001**, *3 (21)*, 3365-3367. Commercially available 5 '-DMT phosphoramidites as reagents for the synthesis of vinylphosphonate-linked oligonucleic acids.
191. Froehler, B. C.; Ng, P. G.; Matteucci, M. D., *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, (13), 5399-5407. Synthesis of DNA Via Deoxynucleoside H-Phosphonate Intermediates.
192. Gait, M. J., *Oligonucleotide Synthesis: A practical approach*. IRL Press: Oxford, **1984**.
193. Jeffrey, S. C.; Torgov, M. Y.; Andreyka, J. B.; Boddington, L.; Cerveny, C. G.; Denny, W. A.; Gordon, K. A.; Gustin, D.; Haugen, J.; Kline, T.; Nguyen, M. T.; Senter, P. D., *J. Med. Chem.* **2005**, *48 (5)*, 1344-1358. Design, synthesis, and in vitro evaluation of dipeptide-based antibody minor groove binder conjugates.
194. Whitten, J. P.; Matthwes, D. P.; McCarthy, J. R., *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1891-1894. [2-(Trimethylsilyl)ethoxy]methyl (SEM) as a novel and effective imidazole and fused aromatic imidazole protecting group.
195. Mellor, B. J.; Thomas, E. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, *(4)*, 747-757. Synthesis of analogues of oligonucleotides; synthesis of unprotected C-linked di- and tri-nucleotides.
196. Van Craynest, N.; Guianvarc'h, D.; Peyron, C.; Benhida, R., *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45 (33)*, 6243-6247. Efficient synthesis of extended guanine analogues designed for recognition of an A center dot T inverted base pair in triple helix based-strategy.
197. Garg, N. K.; Caspi, D. D.; Stoltz, B. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126 (31)*, 9552-9553. The total synthesis of (+)-dragmacidin F.
198. Price, S.; Bull, R.; Cramp, S.; Gardan, S.; van den Heuvel, M.; Neighbour, D.; Osbourn, S. E.; de Esch, I. J. P.; Buenemann, C. L., *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45 (29)*, 5581-5583. A novel synthetic approach towards 2-guanidinomethyl-4(5)-sulfamoylimidazoles.
199. Gierlich, J., *Selektive Modifikation von DNA durch kupferkatalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition*, Ludwig-Maximilians-Universität, München, **2007**.

200. Douki, T.; Setlow, B.; Setlow, P., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4 (8)*, 591-597. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of Bacillus species.
201. Franke, A.; Scheit, K.-H.; Eckstein, F., *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 2998-3001. Selektive Phosphorylierung von Nukleosiden.
202. Lamarche, B. J.; Kumar, S.; Tsai, M. D., *Biochemistry* **2006**, *45 (49)*, 14826-14833. ASFV DNA polymerase X is extremely error-prone under diverse assay conditions and within multiple DNA sequence contexts.
203. Lamarche, B. J.; Tsai, M. D., *Biochemistry* **2006**, *45 (9)*, 2790-2803. Contributions of an endonuclease IV homologue to DNA repair in the African swine fever virus.
204. Gerber, P. R.; Muller, K., *J. Comput.-Aided Mol.r Des.* **1995**, *9 (3)*, 251-268. Mab, a Generally Applicable Molecular-Force Field for Structure Modeling in Medicinal Chemistry.
205. Gerber, P. R., *J. Comput.-Aided Mol.r Des.* **1998**, *12 (1)*, 37-51. Charge distribution from a simple molecular orbital type calculation and non-bonding interaction terms in the force field MAB.
206. Perrin, F., *Journal De Physique Et Le Radium* **1926**, *7*, 390-401. The polarisation of flourescence light. Average life of molecules in their excited state.
207. Dandliker, W. B.; Dandliker, J.; Levison, S. A.; Kelly, R. J.; Hicks, A. N.; White, J. U.; Timasheff, C. H. W. H. a. S. N., *[18] Fluorescence methods for measuring reaction equilibria and kinetics,* Methods in Enzymology, Academic Press: **1978**; 48, 380-415.
208. Dandliker, W. B.; Hsu, M.-L.; Levin, J.; Ramanath Rao, B.; John, J. L. a. H. V. V., *[1] Equilibrium and kinetic inhibition assays based upon fluorescence polarization*, Methods in Enzymology, Academic Press: **1981**; 74, 3-28.
209. Sancar, A., *Biochemistry* **1994**, *33 (1)*, 2-9. Structure and Function of DNA Photolyase.
210. Mees, A.; Klar, T.; Gnau, P.; Hennecke, U.; Eker, A. P. M.; Carell, T.; Essen, L. O., *Science* **2004**, *306 (5702)*, 1789-1793. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair.
211. Varghese, A. J., *Biochemistry* **1971**, *10 (23)*, 4283-4290. Photochemistry of Uracil and Uridine.
212. Pieck, C., *Reparatur und Replikation des Sporen Photoproduktes sowie ortsspezifische Generierung eines CPD- bzw. Sporen-Photoproduktes in DNA*, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, **2007**.
213. Breeger, S., *Elektronentransfergetriebene Reparatur und zelluläre Erkennung von DNA-Photoschäden*, Ludwig-Maximilians-Universität, München, **2007**.
214. Butenandt, J., *Synthese, Erkennung und Reparatur von DNA-Photoschadens-analoga*, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Zürich, **1999**.
215 Chandor, A.; Berteau, O.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Sanakis, Y.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Atta, M.; Fontecave, M., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281 (37)*, 26922-26931. Dinucleotide Spore Photoproduct, a Minimal Substrate of DNA Repair Spore Photoproduct Lyase Enzyme from *Bacillus subtilis*.

Curriculum vitae — Eva Bürckstümmer

Geburtstdatum:	19.09.1979
Geburtsort:	Regensburg
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1986-1990	Grundschule Bad Abbach
1990-1999	J. W. Goethe-Gymnasium Regensburg Notendurchschnitt: 2.2

Studium

1999-2004	Chemiestudium an der J. W. Goethe-Universität Frankfurt a.M.
2002	Vordiplom, Notendurchschnitt: 1.1
2004	Diplom, Notendurchschnitt: 1.1 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Engels „Einführung von Reportergruppen in RNA über Palladium-Kreuzkupplung“

Promotion

2005-2008	Doktorandin im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München