

Entwicklung einer neuen Methode zur Injektion von
Elektronen in DNA

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines
Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Diplom-Chemikerin

Barbara Carl

aus Stuttgart (Deutschland)

Basel 2004

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren:

Prof. Dr. B. Giese

Prof. Dr. A. Pfaltz

Basel, den 08.06.04

Prof. Dr. M. Tanner
(Dekan)

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Giese in der Zeit von Dezember 1999 bis März 2004 am Institut für Organische Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden an folgender Veranstaltung vorgestellt:

22. *Regio-Symposium*, Falkau, Deutschland, September **2002**.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Giese, B.; Carl, B.; Carl, T.; Carell, T.; Behrens, C.; Hennecke, U.; Schiemann, O.; Feresin, E. "Excess Electron Transport through DNA: A Single Electron Repairs more than One UV-Induced Lesion." *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1884-1887; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848-1851.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernd Giese danke ich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, die stete Unterstützung und die interessanten Diskussionen.

Dr. Olav Schiemann und Emiliano Feresin danke ich für die ESR-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Carell und seinen Mitarbeitern danke ich für die interessante Zusammenarbeit.

Den Angestellten des Institutes danke ich für ihre Unterstützung.

Stephan Bürgi danke ich für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Giese danke ich für das tolle Arbeitsklima und eine unvergeßliche Zeit.

Meinem Mann Thomas danke dafür, daß er immer für mich da war.

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen	I
--	---

Theoretischer Teil

1	Einleitung	1
1.1	Geschichte der Entdeckung der Erbsubstanz DNA	1
1.2	Struktur und Funktion der DNA	2
2	Lochtransfer	5
2.1	Ladungstransfermechanismen	8
2.1.1	Der Superaustausch-Mechanismus	8
2.1.2	Der Hopping-Mechanismus	10
3	Überschußelektronentransfer	13
3.1	Radiolyse-Experimente	16
3.2	Photochemische Studien	18
3.2.1	Untersuchungen und Ergebnisse von Carell und Rokita	20
3.2.2	Untersuchungen und Ergebnisse von Lewis und Wasielewski	23
3.2.3	Untersuchungen und Ergebnisse von Netzel und Wagenknecht	26
4	Aufgabenstellung	30
5	Mögliche Reaktionswege von <i>tert.</i>-Butylketonen	32
6	Modellversuche: <i>N</i>-verknüpfte Modellsysteme	34
6.1	Zusammenfassung	42
7	Das Zielsystem für die Injektion eines Überschusselektrons in DNA	44
7.1	(<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (56) - Injektorbaustein und Schlüssel-molekül für die Ladungsinjektion	45
7.2	Synthese des Zielsystems für die Injektion von Überschusselektronen in DNA sowie weiterer Modellsysteme	48
7.3	Photolyseexperimente	54
7.4	Zusammenfassung	62

7.5	ESR-Messungen	63
8	Transfer eines Überschusselektrons in DNA - Ergebnisse und Vergleich mit den Systemen von Carell und Rokita	66
9	Detektorsysteme	75
9.1	Redoxindikatoren	76
9.1.1	Phenazin-Derivate des Typs B	78
9.1.2	Phenazin-Derivate des Typs C	80
10	Zusammenfassung und Ausblick	85

Experimenteller Teil

1	Allgemeines	89
2	Synthesen der Verbindungen für die Vorversuche	94
2.1	Syntheseübersicht des Modellsystems	94
2.1.1	Synthese des Injektorbausteins	95
2.1.2	Synthese der Edukte und Referenzverbindungen für die Vorversuche	97
3	Synthesen auf dem Weg zum Zielsystem	99
3.1	Syntheseübersicht für die Synthese des Injektorbausteins	99
3.1.2	Synthese des Injektorbausteins	99
4	Synthese des Injektorsystems (76) und der Bestrahlungsreferenzen	106
4.1	Syntheseübersicht	106
4.2	Synthese des Injektorsystems α -[(R,S)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (76)	107
4.3	Synthese der Ketoreferenz (79) und der Hydroxylreferenz (81)	113
5	Synthese weiterer Modellverbindungen	118
5.1	Syntheseübersicht	118
5.2	Synthese der Modellverbindungen	119

6	Synthese des modifizierten Nucleotids (Elektroneninjektorsystem in der DNA)	127
6.1	Syntheseübersicht	127
6.2	Synthese des Injektorsystems (70) für die automatisierte DNA-Festphasensynthese	127
7	Phenazinderivate als alternative Detektorsysteme zum T-Dimer für den Elektronentransfer in DNA	131
7.1	Syntheseübersicht	131
7.2	Synthese der Modellsysteme	134
Photolysen		
1	Photolyseexperimente	141
1.1	allgemeine Photolysevorschrift	141
1.2	Bestrahlung der <i>N</i> -verknüpften Modellsysteme	141
1.3	Bestrahlung von 76 , 86 und 90	144
1.4	Bestrahlung der Phenazinderivate	147
Literaturverzeichnis		151

Liste der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (wasserfrei)
Ac	Acetyl
Bn	Benzyl
ber.	berechnet
^t Bu	<i>tert.</i> -Butyl
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
cm	Zentimeter
CMC	<i>N</i> -Cyclohexyl- <i>N'</i> -(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-methyl- <i>p</i> -toluolsulfonat
d	Schichtdicke (UV-VIS)
δ	Chemische Verschiebung in ppm (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ε	molarer Extinktionskoeffizient in l mol ⁻¹ cm ⁻¹ (UV-VIS)
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid-hydrochlorid
EE	Ethylacetat (Essigester)
eq.	Äquivalente
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
G	Guanin
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
hν	Strahlung (Licht)

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
I	Intensität
IR	Infrarotspektroskopie
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
K	Kelvin
λ	Wellenlänge
M	molar
m/z	Masse pro Ladung
MALDI-ToF MS	Matrizen unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit- Massenspektrometrie
mM	millimolar
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz
OD	optische Dichte
ppm	parts per million
R_f	Retentionsfaktor (DC)
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
s	Sekunde(n)
T	Thymin
T_x	5-modifiziertes Thymidin mit Pivaloylgruppe (Photoedukt)
T_y	5- modifiziertes Thymidin ohne Pivaloylgruppe (Photoprodukt)
TBAF	<i>n</i> -Tetrabutylammoniumfluorid
TBAN	<i>n</i> -Tetrabutylammoniumnitrat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
<i>tert.</i>	tertiär
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs NHE	bezogen auf Standardwasserstoffelektrode
z.B.	zum Beispiel

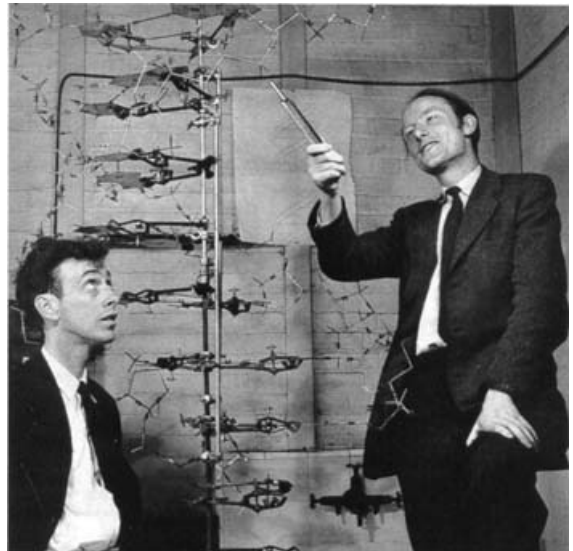
Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Entdeckung der Erbsubstanz DNA

Als Träger der Erbinformation mit hochgeordneter Struktur fasziniert die Desoxyribonucleinsäure (DNA) seit langem Biologen und Chemiker gleichermaßen. Den Anfang der Suche nach dem Grundbaustein des Lebens machte der Augustinermönch Gregor Mendel, der im Jahre 1855 mit seinen Kreuzungsversuchen von Erbsen begann (erste Publikation 1866: *Versuche über Pflanzenhybriden*) und die Behauptung aufstellte, daß alle Lebensformen von vererblichen Elementen (Genen) bestimmt werden. 1871 entdeckte der Chemiker F. Miescher im Zellkern weißer Blutzellen eine bislang unbekannte Substanz, eine phosphorhaltige Säure, die er Nuklein nannte (DNA) und der Zellforscher Walter Flemming beobachtete die Bildung von Chromosomen in sich teilenden Zellen.

1900 wurden die Mendelschen Kreuzungsexperimente wieder aufgenommen und 1902 erkannten Theodor Boveri und Walter Sutton unabhängig voneinander die Chromosomen als Träger der von Mendel entdeckten Erbmerkmale. 1909 prägte Wilhelm Johannsen das Konzept des Gens als Träger der Vererbung. 1923 wurde von Thomas H. Morgan durch Versuche mit Fruchtfliegen die Lage der



Gene auf den Chromosomen lokalisiert. 1926 führte Hermann J. Muller erste Experimente mit ionisierender Strahlung durch und stellte fest, daß die Auswirkungen der Strahlung zur Änderung der Erbmerkmale und damit zu Mutationen führten. 1944 schließlich erkennt Theodor Avery anhand der Transformation von Pneumococccen, daß nicht Proteine Träger der Erbinformation sind, sondern der DNA diese Aufgabe zukommt. Im Jahre 1950 stand fest, daß die Basen gepaart vorliegen (Untersuchungen von Erwin Chargaff). Die Aufklärung der Sekundärstruktur nativer DNA (B-DNA) gelang 1953 Watson und Crick ausgehend von der Auswertung vieler Röntgenbeugungsmuster von DNA-Fasern (Abb. 1.1).^[1,2] Seither wurde und wird viel auf dem Gebiet der DNA geforscht, jüngste Meilensteine in der Geschichte sind das erste geklonte erwachsene Tier (Klonschaf Dolly 1997) und die Entschlüsselung des Genoms des Menschen (2003).

1.2 Struktur und Funktion der DNA

Die Nucleinsäuren DNA und RNA sind aus Nucleobasen (Heterocyclen: Purine und Pyrimidine) aufgebaute Biopolymere, die kovalent an ein Zucker-Phosphat-Rückgrat gebunden sind. Die DNA erfüllt die zentrale Rolle der Speicherung der genetischen Information, die RNA, welche durch Transkription aus der DNA erhalten wird, ist für den Transport der genetischen Information und, via Translation, für die Biosynthese von Proteinen verantwortlich (vgl. Abb. 1.2).^[3-5]

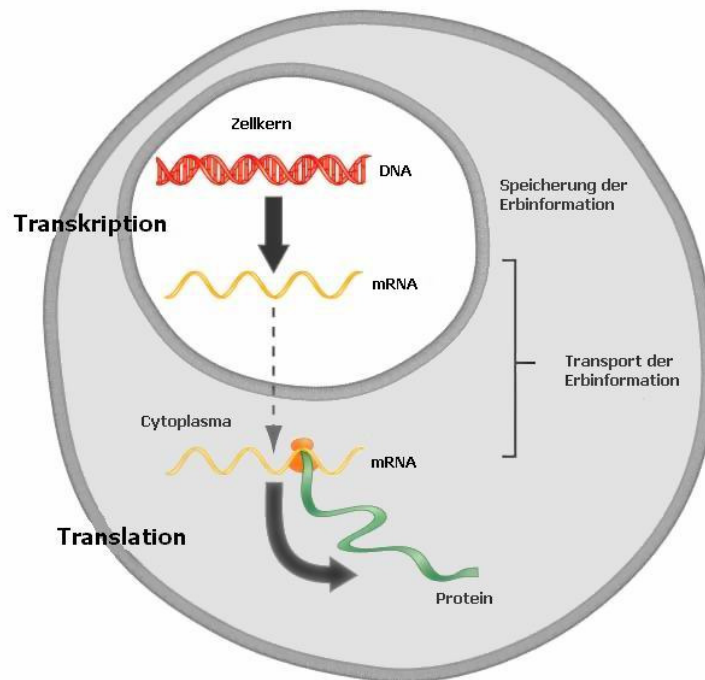


Abbildung 1.2: Funktion der DNA: Transkription und Translation.

Im Einzelstrang können DNA und RNA viele Sekundär- und Tertiär-Strukturen annehmen. Zelluläre DNA liegt jedoch hauptsächlich als Doppelstrang vor. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der Doppelhelix liegt außen, die hydrophoben Purin- und Pyrimidinbasenpaare zeigen nach innen. Die beiden Stränge sind antiparallel gerichtet. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA ist aus 2'-Desoxyribose (in RNA Ribose) aufgebaut, wobei die 5'-Position der 2'-Desoxyribose über eine Phosphatgruppe mit der 3'-Position der nächsten 2'-Desoxyribose verknüpft ist. Die beiden in der DNA vorkommenden Pyrimidinbasen sind Cytosin (C) und Thymin (T), die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G). In der RNA ist anstelle der Pyrimidinbase Thymin Uridin (U) eingebaut. Über Wasserstoffbrückenbindungen ist je eine Purinbase des einen Stranges mit einer Pyrimidinbase des Komplementärstranges verbunden, so daß die entsprechenden Watson-Crick-Basenpaare A:T (1) und G:C (2)

vorliegen (Abb. 1.3). Jede H-Brücke (im C:G-Basenpaar sind es drei, im T:A-Basenpaar zwei) stabilisiert den Duplex um 2 kcal/mol.

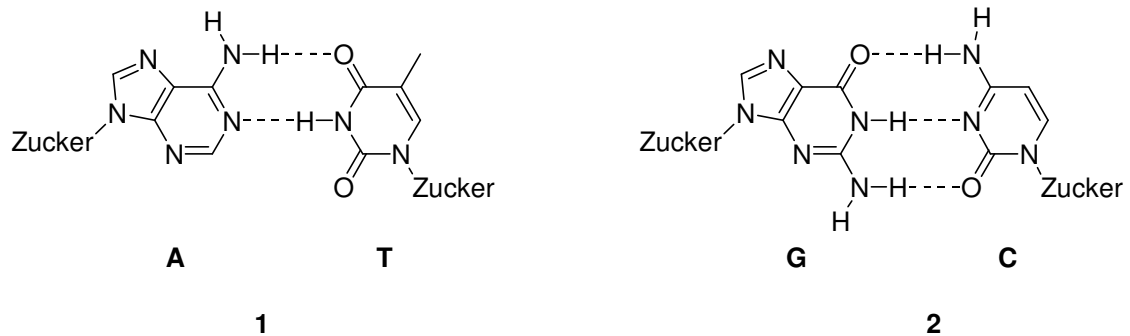
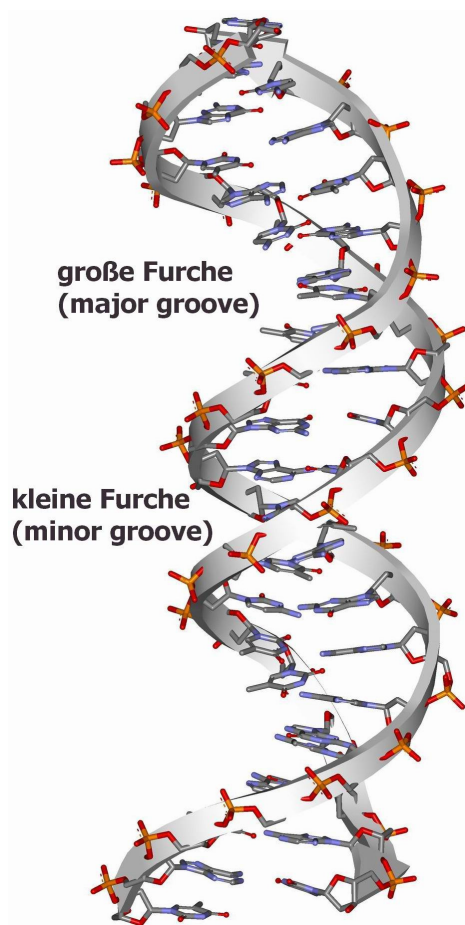


Abbildung 1.3: Purin-Pyrimidin-Basenpaarung nach Watson-Crick.

Der Doppelstrang kann in mehreren Sekundärstrukturen vorliegen: A-, Z- und B-DNA, die native DNA liegt in der B-Form vor, deren Struktur in den 50er Jahren von Watson und Crick aufgeklärt wurde.^[1,2] B-DNA (Abb. 1.4) besitzt eine rechtsgängige helikale Struktur, in der



die hydrophoben Basenpaare senkrecht zur helikalen Achse π -gestapelt (Stapelabstand 3.4 Å) sind. Die π -Wechselwirkungen tragen neben den H-Brücken erheblich zur thermodynamischen Stabilität der DNA bei. Nach zehn Basenpaare ist eine DNA-Windung vollständig, was bedeutet, daß jedes Basenpaar um ca. 36° (die Rotation variiert zwischen 28° und 43°) gegenüber den benachbarten Basenpaaren verdreht ist. Die beiden Basen sind außerdem wie die Blätter eines Propellers gegeneinander verdreht. Die Propellerverdrehung beträgt bei G:C-Basenpaaren durchschnittlich 11°, bei AT-Basenpaaren 17° und ermöglicht eine kompaktere Stapelung der Basen im Doppelstrang.^[6] Das Zucker-Phosphat-Rückgrat bildet zwei Furchen (grooves) mit vergleichbarer Tiefe aber unterschiedlicher Länge, welche als große (major) und kleine (minor) Furche bezeichnet werden.

Abbildung 1.4: Struktur der B-DNA

Fehler in der DNA-Sequenz (Primärstruktur) sind die Ursache zahlreicher Erbkrankheiten (genetische Defekte). Intakte DNA ist während des Lebens einer Vielzahl von Umwelteinflüssen ausgesetzt, die zur Schädigung der DNA führen und so mutagene, karzinogene und letale Auswirkungen haben können.^[7,8] Für die Reparatur solcher DNA-Schäden sind spezielle Reparaturenzyme zuständig.^[9]

Häufig wird DNA durch chemische oder photochemische Oxidationsmittel oder durch ionisierende Strahlung oxidativ geschädigt (Oxidation der Nucleobasen).^[10-14] Oxidation kann zum Strangbruch und damit zum Verlust oder zur Mutation der Erbinformation führen, was den Zelltod zur Folge haben kann. Da die bedeutendste Auswirkung ionisierender Strahlung auf lebende Zellen die oxidative Schädigung des DNA-Doppelstranges ist, war dieses Forschungsgebiet Gegenstand vieler intensiver Untersuchungen.^[14] Es wurde festgestellt, daß die oxidative Spaltung des DNA-Doppelstranges ortsspezifisch ist und vor allem an Guaninreichen Stellen (vorzugsweise bei zwei oder drei aufeinanderfolgenden Guaninen im selben Strang) stattfindet. Da Strahlung jedoch alle Nucleobasen ionisieren kann, muß ein Ladungstransfer von der ursprünglich ionisierten Base zur Guaninreichen Stelle im Doppelstrang stattfinden. Um die oxidative Schädigung des DNA-Stranges verstehen zu können, ist es daher notwendig, die Ladungstransferprozesse zu verstehen. Gleiches gilt für die Reparaturenzyme (z. B. Photolyasen), die sich zur Reparatur von DNA-Schäden ebenfalls des Ladungstrfers bedienen^[9], sowie für die Entwicklung von Biosensoren (DNA-Chips)^[15].

Basierend auf Leitfähigkeitsuntersuchungen von DNA und RNA-Strängen durch Eley und Spivey wurde 1962 erstmals vorgeschlagen, daß die Anordnung der Basenpaare (π -Stapelung) in der DNA durch die Überlappung von π - und σ -Orbitalen benachbarter Basen DNA elektrisch leitfähig macht (" π "-way).^[16] Die Frage, ob DNA ein "molekularer Draht" ist, war in den letzten Jahren Thema vieler Forschungsarbeiten. Vor allem der positive Ladungstransfer (Lochtransport, Transport von Radikalkationen) wurde intensiv untersucht und man erhielt dabei viele Informationen über den DNA-Strangbruch und die Distanzabhängigkeit des Ladungstrfers. Zur Zeit wird außerdem heftig auf dem Gebiet des Überschusselektronentransfers (Transport von Elektronen) geforscht. Ein Überblick über diese Arbeiten und den derzeitigen Stand der Forschung wird in den folgenden Kapiteln gegeben.

2 Lochtransfer

Daß DNA in der Lage ist, Ladung über größere Distanzen zu transportieren, wurde nach intensiven Untersuchungen in den letzten Jahren eindeutig geklärt. Entscheidend für den Lochtransfer ist die Oxidierbarkeit der Nucleobasen. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, findet die oxidative Spaltung an einer Guaninbase - der Nucleobase mit dem niedrigsten Oxidationspotential (vgl. Tab. 2.1) - statt.

Nucleobase	$E_{\text{ox}}, \text{CH}_3\text{CN}^{\text{a}}$	$E_{\text{ox}}, \text{H}_2\text{O}^{\text{b}}$
Guanin (G)	1.49 V	1.29 V
Adenin (A)	1.96 V	1.42 V
Cytosin (C)	2.14 V	~ 1.6 V
Thymin (T)	2.11 V	~ 1.6 V
Uracil (U)	≥ 2.39 V	~ 1.6 V

Tabelle 2.1: Oxidationspotentiale der Nucleobasen; a) gemessen in CH_3CN (polar aprotisch) mittels cyclischer Voltametrie^[17]; b) gemessen in wässriger Lösung mittels Pulsradiolyse und zeitaufgelöster spektrophotometrischer Detektion^[18].

Guanine mit weiteren Guaninbasen in der Nachbarschaft sind leichter zu oxidieren als eine einzelne Guaninbase. Das Oxidationspotential wird durch die Stapelung von mehreren Guaninbasen um ca. 0.7 V abgesenkt.^[19] Folglich kann ein unter oxidativem Streß entstandenes, langlebiges Guaninradikalkation durch exergonische Einelektronenoxidation mittels Elektronentransfer von einer entfernten GG- oder GGG-Einheit repariert werden (Abb. 2.1).

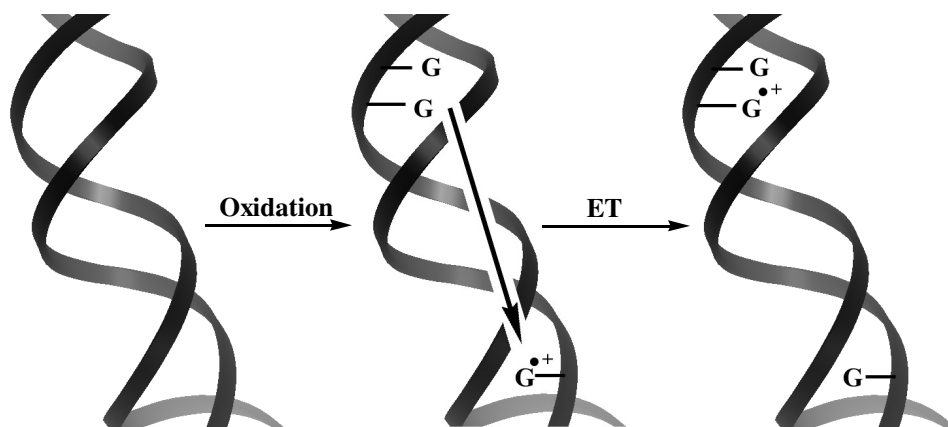
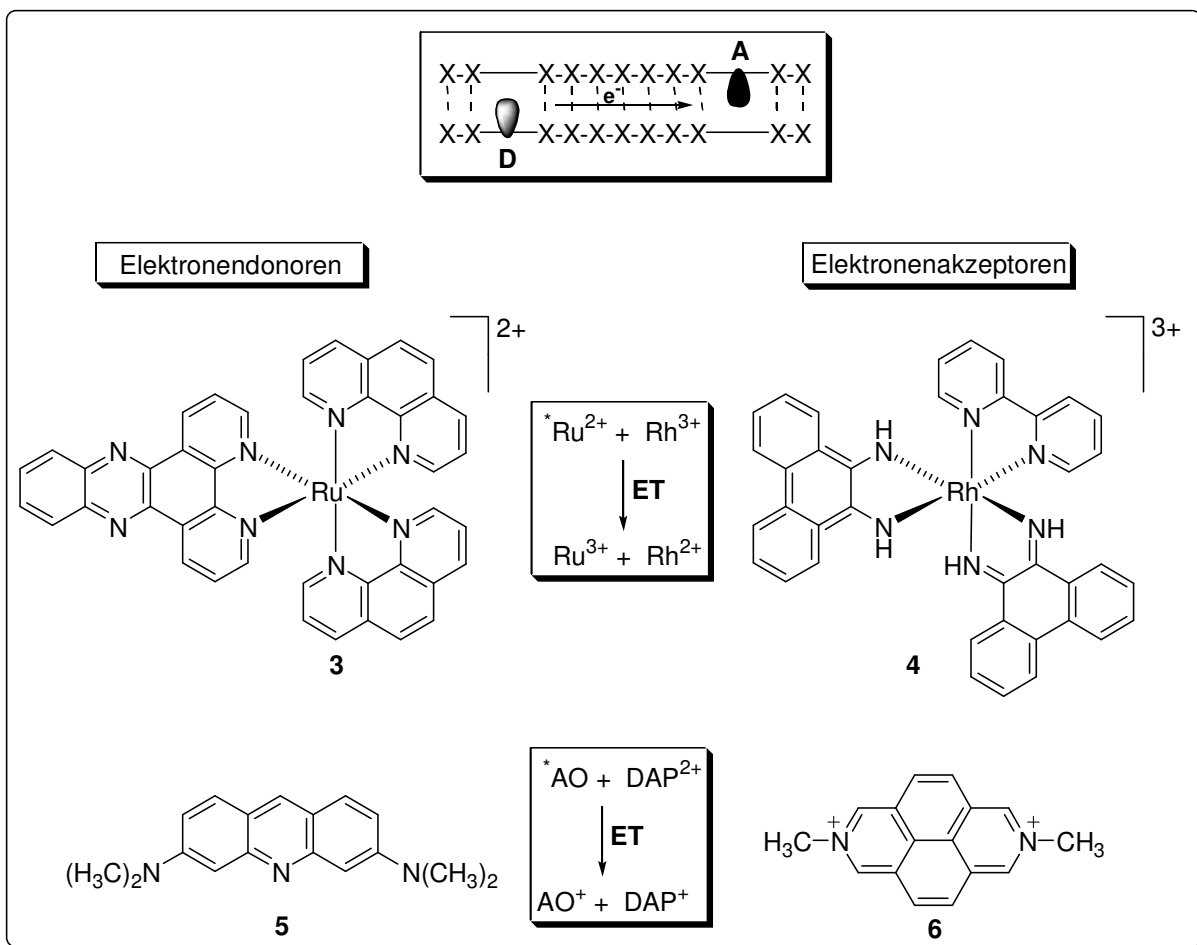


Abbildung 2.1: Reparatur eines einzelnen G-Radikalkations durch Elektronentransfer von einer benachbarte GG-Einheit.

Mutationen im Erbgut (Guaninradikalkationen reagieren mit Sauerstoff u.a. zu 8-Oxo-Guanin, welches bei der Replikation gegen Thymin ausgetauscht wird) liegen daher hauptsächlich in G-reichen Regionen vor. Interessanterweise finden sich solche G-reichen Regionen an den Enden eukaryontischer Chromosomen, den sogenannten Telomeren, deren Bedeutung als möglicher kathodischer Schutz vor Oxidationen in benachbarten, essentiellen Genabschnitten derzeit diskutiert wird.^[20]

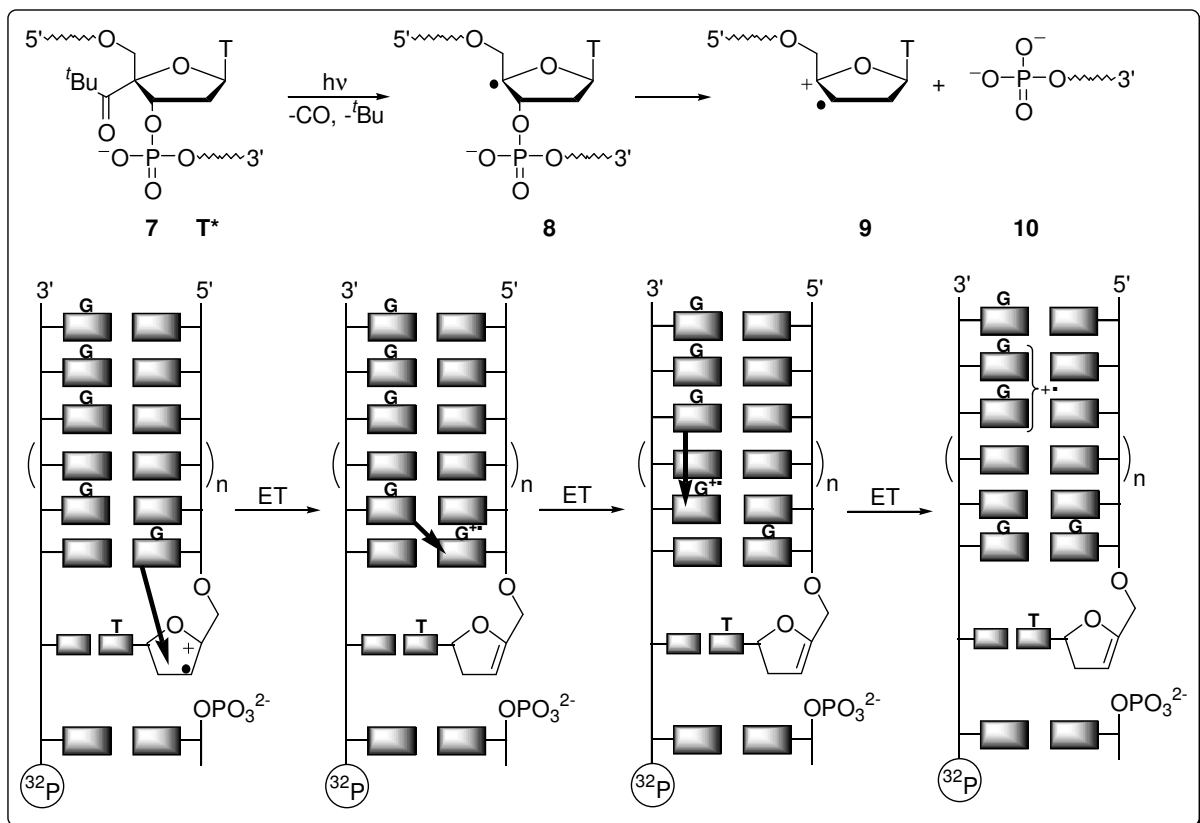
Um Elektronentransferprozesse im Labor mechanistisch untersuchen zu können, wurden für die Ladungsinjektion, d.h. für die Oxidation des Guanins zum Guaninradikal verantwortliche Systeme direkt in den DNA-Doppelstrang eingebaut oder interkaliert. Bei den meisten durchgeführten Untersuchungen wurden photoaktive Metallkomplexe oder aromatische Verbindungen - π -Systeme, die im photoangeregten Zustand Elektronen abgeben oder aufnehmen können - an die DNA gebunden. Nach photolytischer Anregung wird die Löschung der Fluoreszenz infolge des Elektronentransfers gemessen. Einige wichtige Beispiele solcher π -Systeme sind in Schema 2.1 gezeigt.



Schema 2.1: Beispiele nicht kovalent gebundener Donoren und Akzeptoren, die zur Untersuchung des Elektronentransfers (ET) in DNA eingesetzt wurden.

Erste Untersuchungen dieser Art wurden von J. Barton *et al.* durchgeführt, die einen Rutheniumkomplex **3** als Elektronendonator und einen Rhodiumkomplex **4** als Akzeptor (vgl. auch Schema 2.1) in den DNA-Doppelstrang interkalierte.^[21] In Arbeiten von Meade *et al.* wurden die Metallkomplexe kovalent an DNA gebunden (Verknüpfung über Ribose), wobei wegen fehlender π - π -Wechselwirkungen mit den DNA-Basen eine vergleichsweise geringere Geschwindigkeit für den Elektronentransfer gemessen wurde ($1.6 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ anstelle von $3 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$).^[22]

Ausgehend von Untersuchungen zum 4'-radikalinduzierten DNA-Strangbruch verfolgte die Gruppe von B. Giese einen anderen Weg zur Untersuchung des positiven Elektronentransfers in DNA-Doppelsträngen.^[23, 24] Ein 4'-pivaloylmodifiziertes Nucleosid **7** (T*), welches in die DNA eingebaut wird, generiert mittels Bestrahlung bei 320 nm in einer Norrish I-Reaktion ein 4'-Radikal **8**. Nach einem spontanen, heterolytischen C,O-Bindungsbruch zum 3'-Radikal **9**, kann dieses Intermediat entweder mit Wasser reagieren oder in einem Elektronentransferschritt von einer Guaninbase zum 3'-Radikal reduziert werden. Mit diesem Prozeß konnte gezielt ein Guanin-Radikalkation im Doppelstrang erzeugt werden (vgl. Schema 2.2). Der Elektronentransfer zum 3'-Radikal findet hierbei nur von benachbarten Guaninbasen statt, da das Oxidationspotential (vgl. Tab. 1.1) der anderen DNA-Basen nicht niedrig genug ist.



Schema 2.2: Erzeugung des Riboseradikalkations, Heterolyse, Ladungsinjektion und Elektronentransfer.

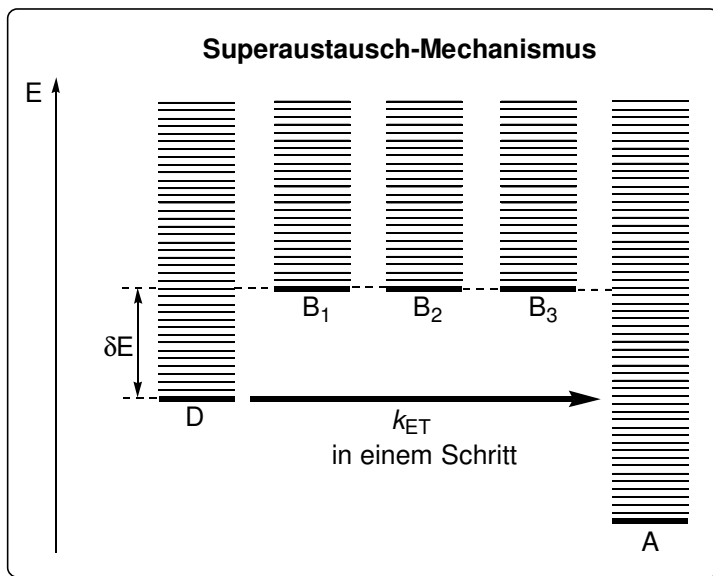
Mit Adenin oder Thymin als benachbarter Base wurde nur Wasseradditionsprodukt und kein Enolether (ET-Produkt) gefunden. Als Detektor für den Elektronentransfer wurde zudem eine GGG-Einheit eingebaut, da diese, wie bereits beschrieben, leichter zu oxidieren ist, als ein einzelnes G und somit die thermodynamische Triebkraft des Prozesses verstärkt. Da die Ladung durch die Wasseraddition an der GGG-Einheit abgefangen wird, findet auch kein Rückelektronentransfer mehr statt - im Gegensatz zu den bereits erwähnten Systemen, bei denen die Elektronentransfer-Effizienz daher auch geringer ist. Die dadurch entstandene oxidativ geschädigte DNA (G^{ox}) ist basenlabil. Nach Behandlung mit Piperidin wird der Stang an der G^{ox} -Position gespalten. Ob die Wasseraddition am primär entstandenen Guaninradikalkation oder an der Tripel-G-Einheit stattfindet, hängt davon ab, wie schnell das Elektron übertragen wird. Das Produktverhältnis ist proportional zum Verhältnis der Ladungstransfergeschwindigkeit zur Wasseradditionsgeschwindigkeit. Über das Verhältnis der beiden Strangbruchprodukte kann man also Aussagen über die Effizienz des Elektronentransfers machen.

2.1 Ladungstransfermechanismen

Zur Interpretation der Ergebnisse wurden zwei Mechanismen postuliert, welche nachfolgend näher ausgeführt werden. Es handelt sich hierbei um den stark distanzabhängigen Superaustausch- und den mehrstufigen Hoppingmechanismus. Von Schuster *et al.* wurde außerdem das Polaron-Hopping-Modell diskutiert, wobei ein bestimmter Bereich der DNA, über den die positive Ladung delokalisiert ist, als Polaron bezeichnet wird.^[25]

2.1.1 Der Superaustausch-Mechanismus

Beim Superaustausch-Mechanismus wird die DNA-Brücke zwischen Ladungsdonor (D) und Ladungsakzeptor (A) als großes delokalisiertes Molekülorbital betrachtet. Die Ladung tunnelt in einem Schritt vom Donor zum Akzeptor, ohne sich auf der DNA-Brücke aufzuhalten (Schema 2.3).^[26] Solche einstufigen Elektronentransferreaktionen können mit der Marcus Theorie beschrieben werden. Diese sagt eine exponentielle Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k_{ET} von der Donor-Akzeptor-Distanz Δr voraus (Marcus-Levich-Jortner-Gleichung).^[27]



$$k_{ET} = k_0 \cdot e^{-\beta \Delta r}$$

Marcus-Levich-Jortner-Gleichung

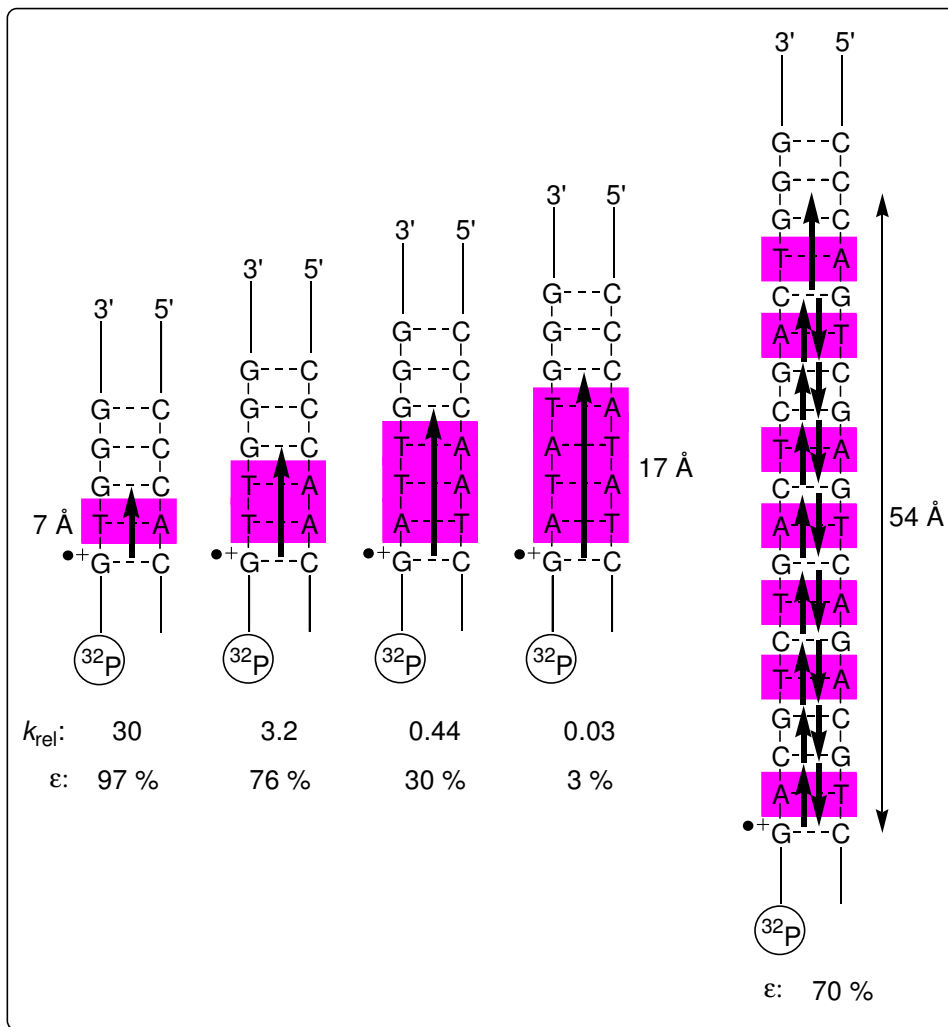
Schema 2.3: Lage der Energieniveaus von Donor (D), Akzeptor (A) und Brücke (B) beim Superaustausch-Mechanismus.

Der Parameter β ist ein Maß für die Distanzabhängigkeit der Elektronentransfergeschwindigkeit. Er gibt an, wie gut ein Medium den Elektronentransfer unterstützen kann. Je tiefer die Orbitale des überbrückenden Mediums (B) energetisch liegen, desto wahrscheinlicher ist eine elektronische Wechselwirkung mit den Orbitalen des Donors (D) und des Akzeptors (A). Dadurch erhöht sich die elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor und die Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers sinkt. Da die Dimension des β -Wertes eine reziproke Distanz ist, ist ein "großer" β -Wert ($\sim 1 \text{ \AA}^{-1}$) gleichbedeutend mit einer starken Distanzabhängigkeit der Elektronentransfergeschwindigkeit, während ein "kleiner" β -Wert ($\sim 0.1 \text{ \AA}^{-1}$) eine geringe Abhängigkeit repräsentiert.

Auf Elektronentransferprozesse in Proteinen konnte die Marcus-Theorie erfolgreich angewendet werden (β -Werte um 1.0 \AA^{-1}), für DNA wurde hingegen eine breite Streuung der β -Werte zwischen 0.1 und 1.4 \AA^{-1} ermittelt. Ausgehend von der Marcus-Theorie sollten Elektronentransferschritte auf kurze Reichweiten um ca. $10 - 15 \text{ \AA}$ beschränkt sein (typische β -Werte liegen zwischen 0.6 und 0.8 \AA^{-1}). Die Experimente zeigten diesbezüglich jedoch widersprüchliche Ergebnisse die nicht alle mit dem Superaustausch-Modell vereinbar waren. Vor allem β -Werte $< 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ und Elektronentransferprozesse über große Distanzen (bis zu 200 \AA) deuten auf einen anderen Mechanismus hin. Daraufhin wurde 1998 von Giese *et al.* das Hopping-Modell postuliert, mit welchem sich eine geringe Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers in DNA erklären läßt.

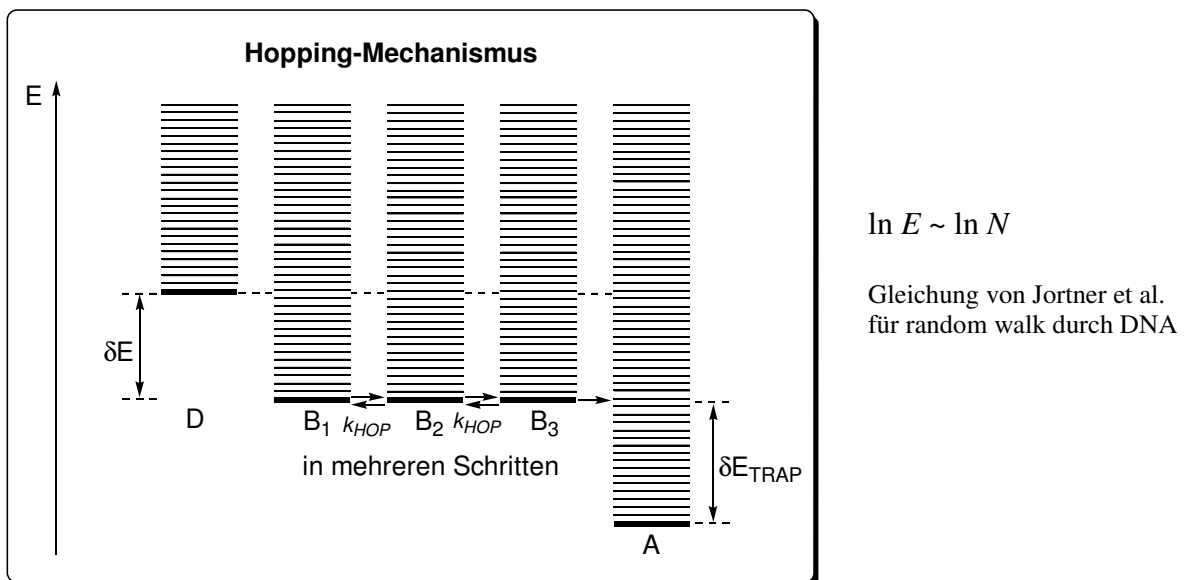
2.1.2 Der Hopping-Mechanismus

Mit dem in Kapitel 2 vorgestellten 4'-pivaloylmodifizierten Nucleosid **7** (T*) von Giese *et al.* wurden zahlreiche Experimente durchgeführt. Die zunächst untersuchten DNA-Doppelstränge, bei denen Donor und Akzeptor durch eine unterschiedliche Anzahl an A:T-Basenpaaren getrennt waren, zeigten die durch den einstufigen Superaustausch-Mechanismus erwarteten Ergebnisse.^[28] Die Effizienz des Elektronentransfers, die über die Ausbeute an durch Wasseraddition an der GGG-Einheit abgefangenen Ladung bestimmt wurde, nahm in Korrelation mit der Distanz von 97 % bei 7 Å auf 3 % bei 17 Å ab (Schema 2.4). Es konnte jedoch auch ein sehr effizienter Elektronentransfer über 15 Basenpaare (54 Å) gemessen werden, was mit dem Superaustausch-Mechanismus nicht zu erklären ist. Dies führte zu der Schlußfolgerung, daß für den Elektronentransfer in DNA nicht nur die Distanz, sondern auch die Sequenz eine entscheidende Rolle spielt.



Schema 2.4: Elektronentransferraten und -effizienzen für den Ladungstransfer von G⁺ nach GGG in DNA-Doppelsträngen.

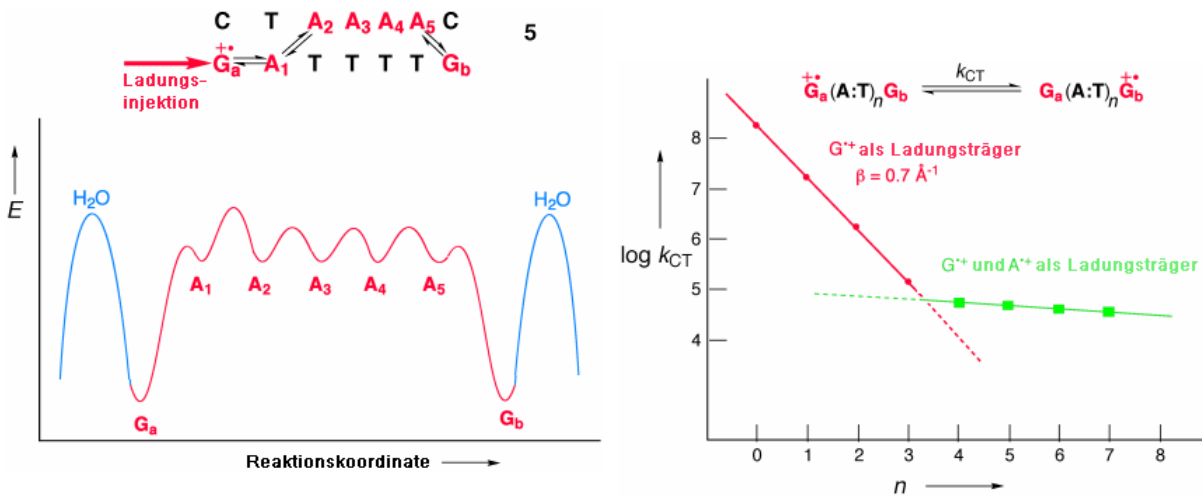
Im Gegensatz zum einstufigen Superaustausch-Mechanismus wird im Hopping-Mechanismus die Ladung in mehreren Hoppingschritten vom Donor zum Akzeptor transportiert (Schema 2.4).^[26, 28] Das letzte, in Schema 2.4 dargestellte Oligonucleotid enthält 8 Guaninbasen zwischen dem Guaninradikalkation und der GGG-Einheit. Als Basen mit dem niedrigsten Oxidationspotential (vgl. Tab. 1) fungieren die Guaninbasen als Relais-Station, über die die positive Ladung in mehreren Hoppingschritten transportiert wurde. Die Ladungstransfargeschwindigkeit hängt folglich nicht von der Distanz, sondern von der Zahl der Hoppingschritte und der Lage der Potentiale von Donor und Akzeptor relativ zur DNA-Brücke ab (vgl. Schema 2.5). Damit ist β kein geeigneter Parameter mehr. Die Marcus-Levich-Jortner-Gleichung ist auf den Hopping-Mechanismus nicht anwendbar. Eine solche Zufallsbewegung (random walk) wurde durch Jortner *et al.* beschrieben.^[26]



Schema 2.5: Lage der Energieniveaus von Donor (D), Akzeptor (A) und Brücke (B) beim Hopping-Mechanismus.

E repräsentiert die Effizienz des Ladungstransfers, N die Anzahl gleichlanger Hoppingschritte. Entscheidend für die Ladungstransfargeschwindigkeit ist der längste Hopping-Schritt über die A:T-Basenpaare, wenn die Wasseraddition ungefähr gleich schnell oder schneller als das Hopping ist. Wäre die Wasseraddition deutlich langsamer als das Hopping würde man eine thermodynamische Verteilung der Ladung über den DNA-Doppelstrang erwarten. Für ein durch ein A:T-Basenpaar von der GGG-Einheit getrenntes Guaninradikalkation wurde von Lewis und Wasielewski *et al.* eine Ladungstransfargeschwindigkeit für den Hoppingschritt von $5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ gemessen.^[30] Zunächst wurde angenommen, daß sich jeder einzelne Hoppingschritt mit der Marcus-Levich-Jortner-Gleichung beschreiben läßt und die A:T-Basenpaare als Brücke fungieren, die während des

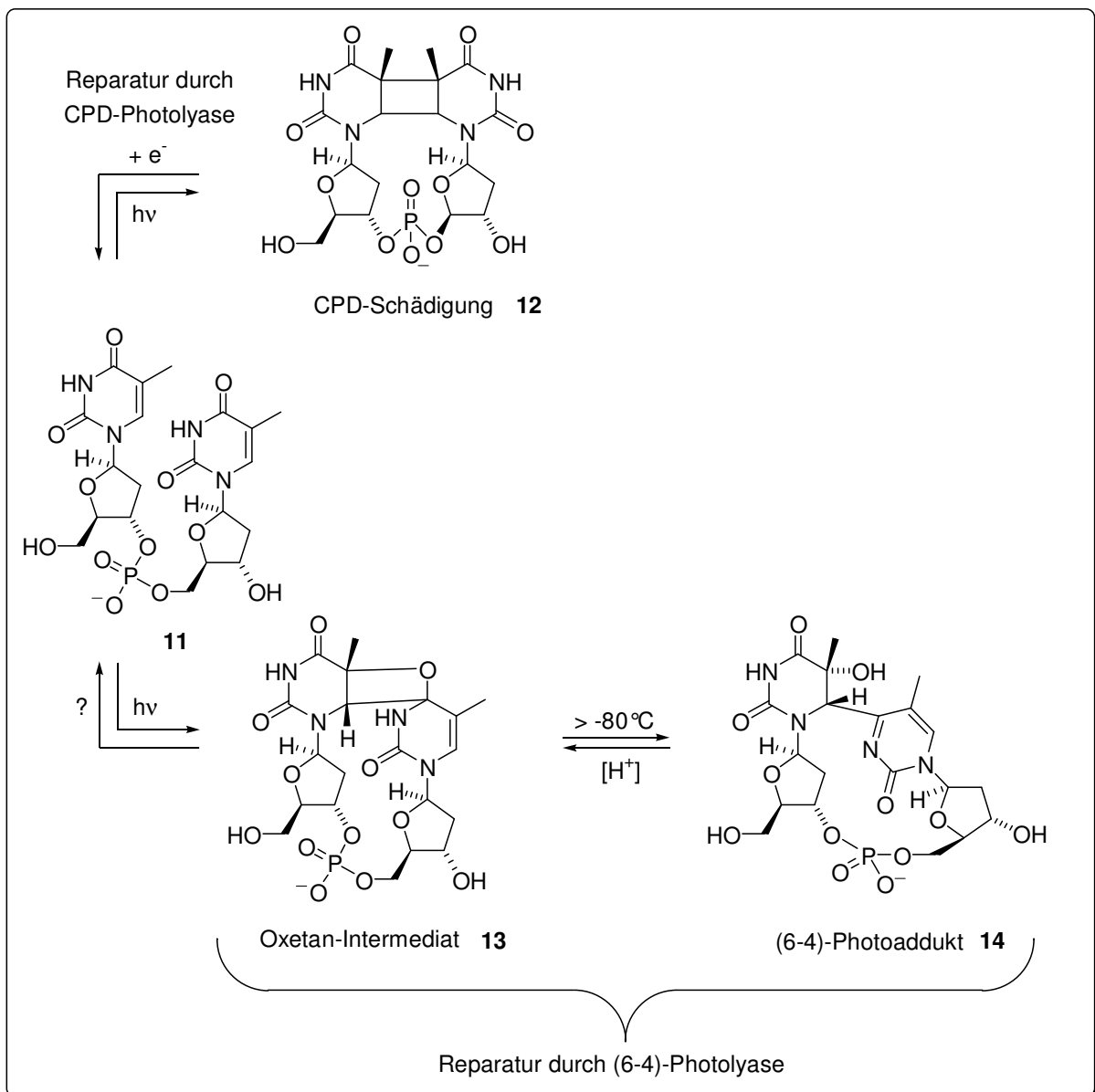
Ladungstransfers nicht oxidiert wird.^[28a, 28c] Ein Ladungstransfer zwischen zwei Guaninen, die durch vier oder mehr A:T-Basenpaare getrennt sind, sollte demnach nicht mehr möglich sein, da er zu langsam ist, um mit der Wasserabfangreaktion zu konkurrieren. In den von Giese *et al.* durchgeführten Experimenten nimmt die Effizienz des Ladungstransfers bei kurzen Brücken (ein bis drei A:T-Basenpaare) mit jedem zusätzlichen A:T-Basenpaar zunächst tatsächlich um Faktor acht ab. Bei längeren Brücken (vier bis sieben A:T-Basenpaare) konnte jedoch kaum noch ein Effekt für ein zusätzliches A:T-Basenpaar beobachtet werden.^[31] Ab sieben A:T-Basenpaaren verschwindet die Distanzabhängigkeit völlig. Auch andere Gruppen konnten einen Elektronentransfer über längere A:T-Brücken beobachten. Dies wurde von Giese *et al.* durch einen Wechsel des Mechanismus des Ladungstransfers der einzelnen Hoppingschritte vom Superaustausch-Mechanismus bei kurzen Brücken zum A-Hopping bei längeren Brücken erklärt (Schema 2.6).^[31] Hierbei ist die Oxidation des Adenins, der DNA-Base mit dem zweitniedrigsten Oxidationspotential, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Der folgende Ladungstransfer über die Adeninbasen (A-Hopping) ist so schnell, daß die Länge der Brücke nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. Es kommt zu einer thermodynamischen Verteilung der positiven Ladung, was von Giese *et al.* durch Untersuchungen mit 4'-pivaloylmodifiziertem Adenin als Ladungsinjektor untermauert werden konnte.^[32]



Schema 2.6: Ladungstransfer über längere A:T-Sequenzen.

3 Überschusselektronentransfer

DNA wird nicht nur oxidativ geschädigt. Ultraviolette Strahlung führt zu einer Vielzahl an DNA-Schäden, die mutagene, karzinogene und letale Auswirkungen auf die geschädigten Zellen haben können.^[7,8] Die häufigsten durch UV-Strahlung verursachten Schäden an DNA sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere **12** (CPD-Schäden), die in einer photochemisch erlaubten $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition gebildet werden, sowie (6-4)-Photoaddukte **14**, die im Verdacht stehen sogar noch mutagener zu sein (Schema 3.1).^[33,34]



Schema 3.1: Durch UV-Strahlung entstandene DNA-Schäden und zuständige Reparaturenzyme.

Diese werden vermutlich in einer Paterno-Büchi-Reaktion zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen im Doppelstrang gebildet. Es entsteht zuerst das Oxetan-Intermediat **13**, welches

bei -80°C durch CO-Bindungsbruch und Protonenwanderung zum (6-4)-Photoaddukt **14** umlagert.^[35] Diese DNA-Schäden werden ebenso wie die oxidativen Schäden durch Enzyme repariert. Bei oxidativer Schädigung sind hierfür zum Beispiel die Reparaturenzyme Endonuclease III und MutY, die einen Eisen-Schwefel-Cluster im Bereich der DNA-Bindungsstelle enthalten, zuständig.^[26] Die Photoaddukte werden hingegen von sogenannten DNA-Photolyasen repariert, die die Schäden in einer photoinduzierten, Einelektronentransferreaktion zurück in die Monomere spalten.^[36] Bei der CPD-Photolyase ist das für den Elektronentransfer verantwortliche Element ein reduziertes, deprotoniertes Flavin (FADH⁻), welches nach Anregung mit Licht ein Elektron an das CPD-Dimer abgibt, das dann in einer Cycloreversion in die Monomere gespalten wird.^[8, 37, 38] Die (6-4)-Photolyasen sind bisher weniger untersucht und die Reparaturmechanismen noch nicht verstanden. Um die Reparatur der DNA-Schäden durch Photolyasen zu verstehen, sind Kenntnisse über den Transport von Überschusselektronen in DNA essentiell. Auch für biomedizinische Anwendungen, vor allem für die DNA-Chiptechnologie, liegt im reduktiven Elektronentransfer ein großes Potential.

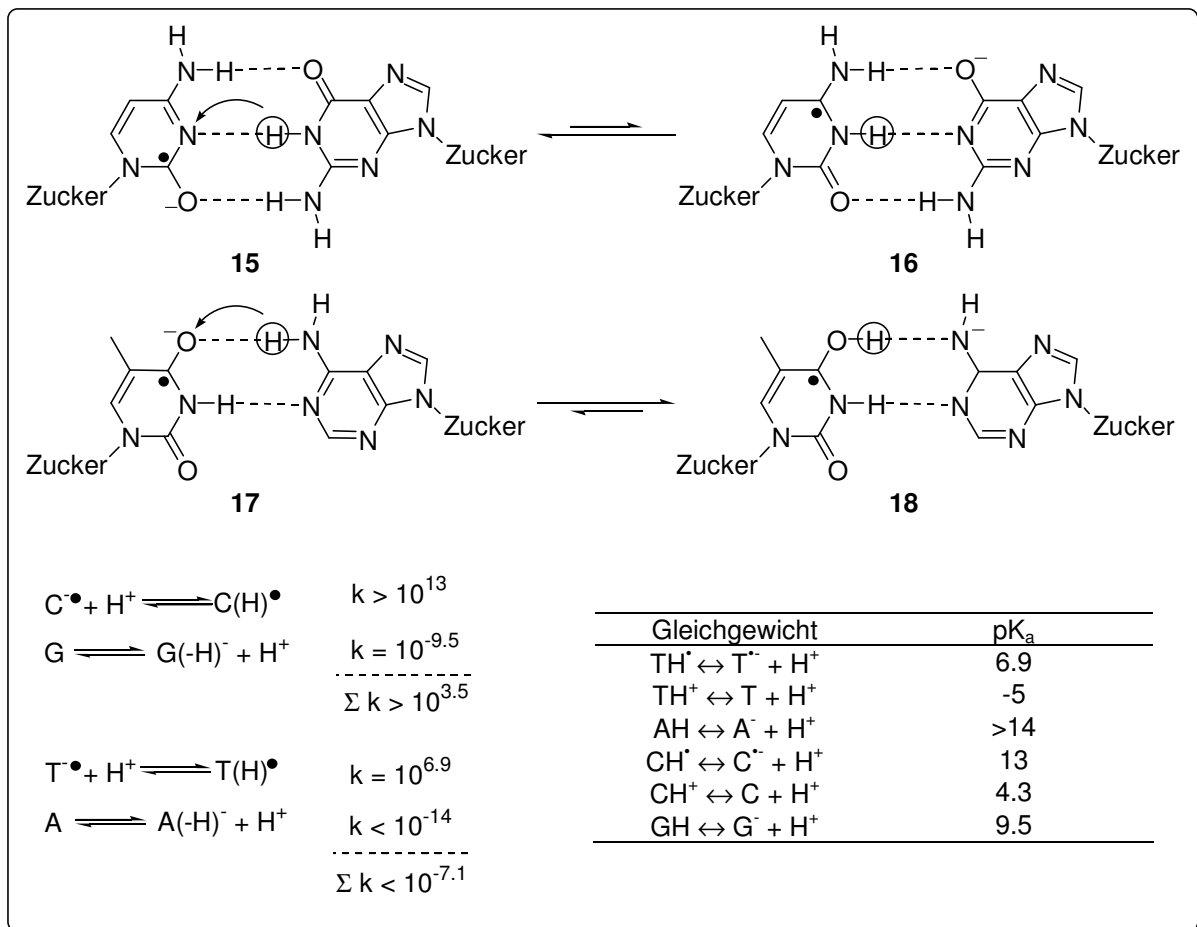
Der Transport negativer Ladung durch DNA ist jedoch weitaus weniger untersucht als der Lochtransfer. Wie genau Elektronen entlang des Doppelstranges transportiert werden ist noch nicht geklärt, jedoch wurden die Reduktionspotentiale der Nucleobasen analog zu den Oxidationspotentialen gemessen (Tab. 3.1).

Nucleobase	$E_{\text{red}}, \text{CH}_3\text{CN}^{\text{a}}$	$E_{\text{red}}, \text{H}_2\text{O}^{\text{b}}$
Guanin (G)	$< -2.76 \text{ V}$	
Adenin (A)	-2.52 V	
Cytosin (C)	-2.35 V	-1.12 V
Thymin (T)	-2.18 V	-1.11 V
Uracil (U)	-2.07 V	-1.11 V

Tabelle 3.1: Reduktionspotentiale der Nucleobasen; a) gemessen in CH_3CN (polar aprotisch) mittels cyclischer Voltametrie^[17]; b) gemessen in wässriger Lösung mittels Pulsradiolyse und zeitaufgelöster spektrophotometrischer Detektion^[18].

Für den Überschusselektronentransfer ist die Reduzierbarkeit der Nucleobasen von großer Bedeutung; die am leichtesten zu reduzierende Nucleobase ist Thymin (in RNA Uracil). Ebenfalls relativ leicht zu reduzieren ist Cytosin, der Unterschied der Reduktionspotentiale ist wesentlich geringer als der der Oxidationspotentiale von Guanin und Adenin. Als Ladungsträger für den Transport von Elektronen durch DNA werden daher Thymin und Cytosin erwartet, was ein sequenzunabhängiges Hopping zur Folge hätte. Durch die Existenz

zweier potentieller Ladungsträger sollte DNA ein gutes Medium für den Transfer von Überschusselektronen sein. Ab initio Rechnungen zur Auswirkung der Basenpaarung auf die Elektronenaffinität der DNA-Basen von Sevilla *et al.* ergaben im Einklang mit experimentellen Daten,^[39] daß in DNA-Doppelsträngen Cytosin die Base mit der höchsten Elektronenaffinität ist, während in Einzelsträngen Thymin diese Rolle zukommt.^[40-42] In Pyrimidin-Purin-Basenpaaren ist die Ladung außerdem hauptsächlich auf den Pyrimidinen lokalisiert.^[40-43] Ein Unterschied bei Cytosin und Thymin besteht in der Basizität der durch Reduktion intermediär gebildeten Radikalanionen $C^{\bullet-}$ ($pK_a = 13$) und $T^{\bullet-}$ ($pK_a = 6.9$).^[44] Die Protonierung der Radikalanionen durch komplementäre Basen, Wasser oder das Zuckerphosphatrückgrat kann Elektronentransfer und Hopping behindern. $C^{\bullet-}$ ist basisch und liegt meist als $C(H)^{\bullet}$ vor. Cytosinradikalanionen werden von Guanin am N3 zu $C(H)^{\bullet}$ (**15** \leftrightarrow **16**) protoniert, was zu einer energetisch tiefer liegenden Elektronenfalle führt.^[45, 46] Außerdem wird durch die Protonierung die Elektronenaffinität des Cytosins um 0.54 eV erhöht. Diese Protonierung ist reversibel, man braucht aber eine etwas höhere Aktivierungsenergie (5 kcal/mol) um die Elektronenwanderung fortzusetzen.^[46, 47]



Schema 3.2: Basenpaarung, Protonentransfer^[46c] und pK_a-Werte reduzierter Nucleobasen.

Auch das Thymidinradikalanion kann an der C6-Position (bei Temperaturen über 130 K) protoniert (**17** \leftrightarrow **18**) werden. Das entstehende 5,6-Dihydrothymin-5-yl-radikal quencht jedoch den Elektronentransfer in DNA, da die Protonierung irreversibel ist (Schema 3.2).^[46]

Ebenso wie beim Lochtransfer wurden auch beim Überschubelektronentransfer Experimente mit Modellsystemen durchgeführt, um Erkenntnisse über den Mechanismus, die Ladungstransfergeschwindigkeit und die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers zu erhalten. Die wichtigsten Experimente werden nachfolgend aufgeführt.

3.1 Radiolyse-Experimente

Die ersten Untersuchungen auf dem Gebiet des reduktiven Elektronentransfers wurden mit γ -Puls-Radiolyse durchgeführt.^[48-53] Für die Untersuchung der mechanistischen Details wurden Elektronenakzeptoren eingesetzt, die in die DNA interkaliert sind (Abb. 3.1).

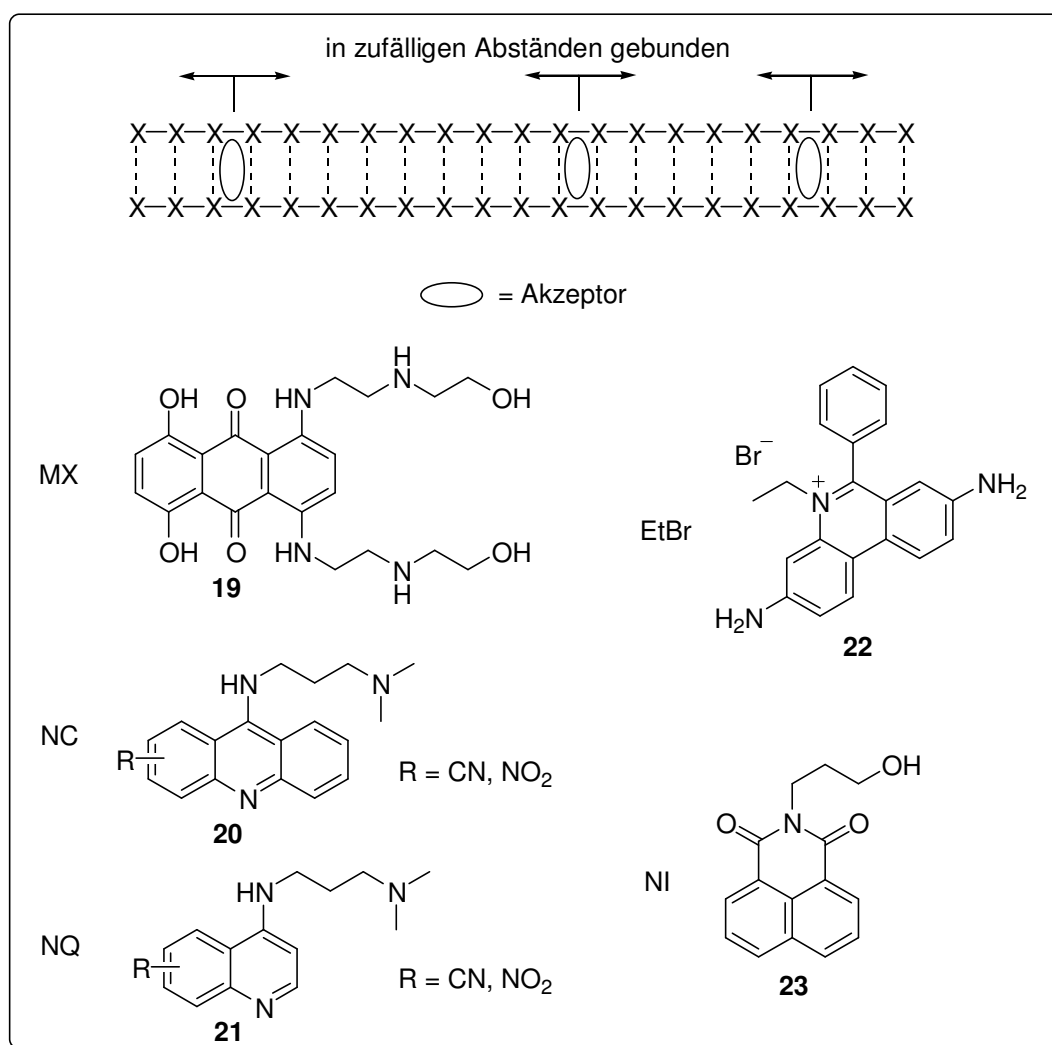


Abbildung 3.1: Interkalierende Elektronenakzeptoren zur Untersuchung des Überschubelektronentransfers mit γ -Puls-Radiolyse und ESR.

Der Nachteil bei nicht kovalenter Bindung an die DNA ist, daß sowohl die Elektroneninjektion wie auch das Abfangen der negativen Ladung nicht ortsspezifisch erfolgen kann. Die meisten dieser Studien wurden in Eis oder glasartigen, wässrigen LiBr-Lösungen durchgeführt. Durch Aktivierung mit γ -Strahlung wurden solvatisierte Elektronen hergestellt. Als thermodynamische Triebkraft wurden Akzeptoren mit hoher Elektronenaffinität, wie z. B. Mitroxantron [MX (**19**): EA = -6.25 eV] interkaliert.

Diese Akzeptoren interkalieren in zufälligen Abständen. In früheren Arbeiten von Sevilla *et al.* wurden außerdem bromierte Nucleobasen als Akzeptoren verwendet.^[46] Diese wurden durch Zugabe einer Bromlösung zu DNA hergestellt und waren somit zwar nicht interkaliert, aber dennoch auch nicht regiospezifisch, da die Basen nicht gezielt bromiert wurden. Mittels ESR wurde die Abnahme der Signale der intermediär gebildeten Nucleobasen-Anionenradikale und die Zunahme der Akzeptor-Elektron-Addukt-Signale beobachtet. Aus diesen Untersuchungen konnten einige prinzipielle Aussagen zum reduktiven Elektronentransfer in DNA gewonnen werden.

Der Überschusselektronentransfer erfolgt unter 77 K nach dem Superaustausch-Mechanismus (Abb. 3.2). Die Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers beträgt durchschnittlich $\beta = 0.9 \text{ \AA}^{-1}$ und ist erwartungsgemäß temperaturunabhängig.

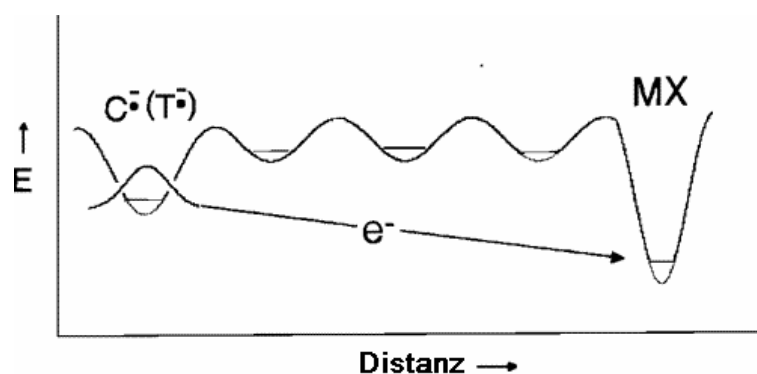


Abbildung 3.2: Überschusselektronentransfer nach dem Superaustausch-Mechanismus unter 77 K.

Die Distanz, über die Elektronen transportiert werden (4.2 ± 0.5 bp/min bei EtBr **22**, 9.5 ± 1.0 bei MX **19**) variiert ebenso wie die Elektronentransfergeschwindigkeiten (10^3 bis 10^{13}) mit den verwendeten Interkalatoren bzw. deren Elektronenaffinität,^[49a] was durch theoretischen Rechnungen bestätigt wurde.^[54] Auch die Sequenz scheint einen Einfluß auf die Distanz zu haben. In polyA:T-Bereichen ist der Superaustausch weitreichender als in polyG:C-Abschnitten. DNA ist bei 77 K also kein gutes Medium für Elektronentransfer, was im

Einklang mit dem Superaustausch beim Lochtransfer und Elektronen-Tunnelprozessen bei den Proteinen steht.^[55]

Bei höheren Temperaturen werden Elektronen auch durch Hoppingschritte transportiert. Die Aktivierungsenergie für das Hopping von Überschusselektronen wurde auf ca. 5 kcal/mol bestimmt, was interessanterweise der Stabilisierungsenergie entspricht, die beim Protonieren eines Cytosinradikalanions von Guanin frei wird.^[56] Bei Temperaturen von 77 K kann kein Hopping stattfinden (vgl. Abb. 3.2), weil die Aktivierungsenergie nicht aufgebracht werden kann. Ab 200 K scheint Hopping der entscheidende Mechanismus für Überschusselektronentransfer zu sein.^[49a] Hopping ist im Gegensatz zum Superaustauschmechanismus temperaturabhängig.

Oberhalb von 130 K tritt außerdem als Konkurrenzprozeß zum Tunneln die irreversible Deuterierung der Thyminradikalanionen bei Messungen in D₂O auf, was ein irreversibles Abfangen des Elektrons zur Folge hat. Elektronentransfer ausgehend von Cytosinradikalanionen ist unterhalb von 170 K noch zu langsam um beobachtet werden zu können. Oberhalb von 170 K spielt in einem thermisch aktivierten Prozeß auch das Cytosinradikalanion als Ladungsträger eine Rolle. Wie bereits geschrieben, wird C[•] von der komplementären Base Guanin am N3 zu C(H)[•] protoniert, weil dabei eine hohe Stabilisierungsenergie frei wird.^[46, 51] Da die Protonierung reversibel und thermisch aktiviert verläuft, sollte der Protonentransfer in einem C:G-Basenpaar die Reichweite des Elektronen-Hoppings nicht limitieren.

Anderson *et al.* verwendeten als interkalierende Elektronenakzeptoren für die γ -Pulsradiolyse Nitroachridine (NC, **20**, Schema 3.1) und Nitrochinoline (NQ, **21**, Schema 3.1) und gelangten in Übereinstimmung mit den oben angeführten Resultaten von Sevilla *et al.* zu der Aussage, daß der Überschusselektronentransfer in DNA über die Aktivierungsenergie kontrolliert wird.^[52] Die Aktivierungsenergie für die Elektronentransferenergie ausgehend vom Thyminradikalanion wurde von Anderson *et al.* zu 2 kcal/mol, die vom protonierten Cytosinradikal zu 5 kcal/mol bestimmt.

3.2 Photochemische Studien

Für photochemische Untersuchungen zur Injektion und zum Transport von Überschusselektronen in der DNA wurden in Analogie zu den Untersuchungen zum Lochtransfer photoaktivierbare Elektronendonoren kovalent mit den jeweiligen

Oligonucleotiden verknüpft. Als Elektronendonoren wurden beispielsweise Flavin-, Stilbendiether- und Pyrenderivate eingesetzt.^[48]

Ausgehend von den bereits erwähnten Erkenntnissen zur Reparatur von UV-induzierten Schäden der DNA durch Photolyasen verwendete die Gruppe von T. Carell ein DNA-Modell, in das für die Injektion der Ladung ein Flavinderivat und für die Detektion des Ladungstransfers ein Thymindimer eingebaut wurde. Flavin ist im reduzierten, deprotonierten und photoangeregten Zustand ein starker Elektronendonator, welcher das T-Dimer spalten kann. Da das T-Dimer ohne verbindende Phosphordiesterbrücke zwischen der 3' und der 5'-Hydroxygruppe der beiden Ribofuranosid-Einheiten eingebaut wurde, führte die Cycloreversion zudem zum DNA-Strangbruch. Die Strangbruchprodukte konnten mittels HPLC analysiert werden.

Ebenfalls basierend auf Untersuchungen zur Spaltung von Thymindimeren in der Natur, bei denen anstelle von Flavin *N,N*-Dimethylanilin als Modellsystem für die photoinduzierte Elektroneninjektion verwendet wurde,^[57] entwickelten Rokita *et al.* ein System, bei dem ein *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,5-diaminonaphthalen (TMDN) als Elektronendonator und 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) als Akzeptor eingesetzt wurde. Aromatische Amine werden oft als Elektronendonoren eingesetzt, weil sie im photoangeregten Zustand niedrige Oxidationspotentiale haben und zudem bei Bestrahlung oberhalb von 300 nm photoangeregt werden können.^[58] Die Bildung eines Uridin-5-yl-Radikals ausgehend von BrdU induziert einen Strangbruch (spontanen Strangbruch und basenlabile Stellen), dessen Strangbruchprodukte analysiert werden können.

Lewis und Wasielewski untersuchten Energetik und Kinetik der photoinduzierten Injektion von Überschusselektronen in DNA in Haarnadel-Systemen, die als Kopfgruppe ein Stilbendietherderivat enthielten.^[30] Der Stilbendiether diente hierbei als Elektronendonator, die Nucleobasen Thymin und Cytosin als Elektronenakzeptoren.

Netzel *et al.* untersuchten die Löscheffizienzen der photoangeregten Pyren-Emission.^[71-74] Mittels Fluoreszenzspektroskopie und durch Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustandes von in DNA eingebauten pyrenmarkierten Oligonucleotiden konnte ein Elektronentransfer von Py* auf Cytosin und Thymin nachgewiesen werden.

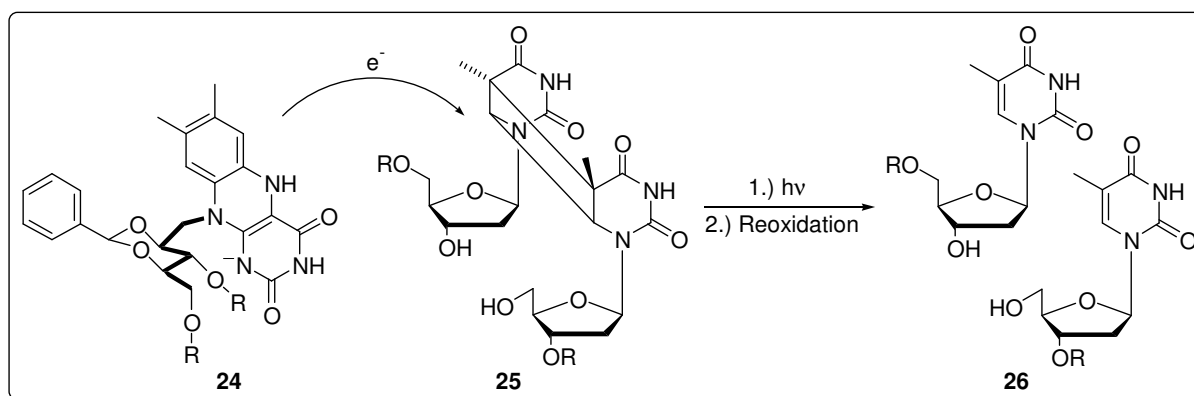
Auch Wagenknecht *et al.* untersuchen den Elektronentransfer von photoangeregtem Pyren auf DNA-Basen. Es wurden pyrenmodifizierte Uridine und Cytidine dargestellt, in den Doppelstrang eingebaut und durch photochemische Anregung ein ladungstrennter Zustand erzeugt. Der Elektronentransfer vom Pyren auf die Nucleobase wurde durch stationäre

Fluoreszenzspektroskopie und Femtosekunden-zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie untersucht.

Die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen sind nachfolgend im Einzelnen aufgeführt.

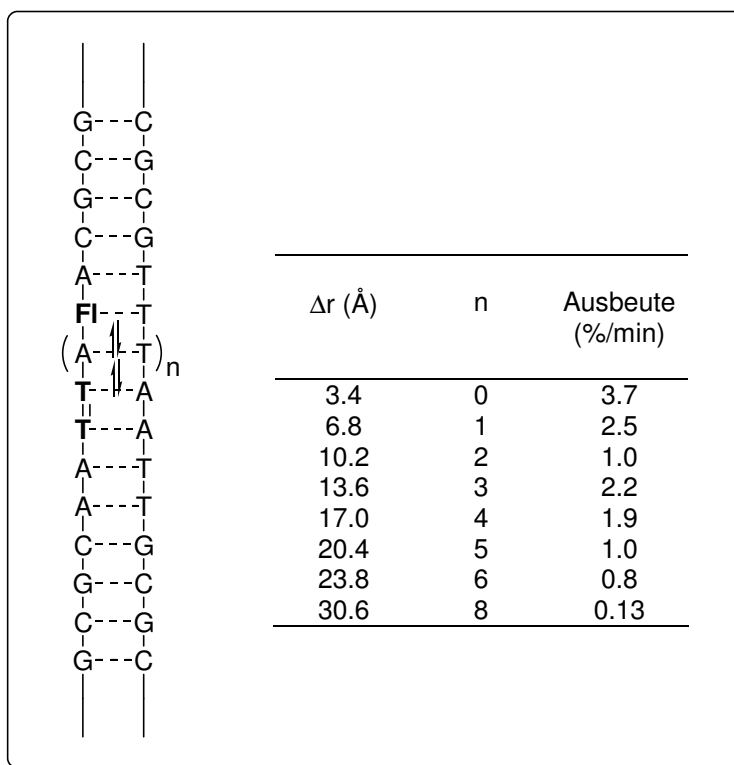
3.2.1 Untersuchungen und Ergebnisse von Carell und Rokita

In der Natur werden Zellen, deren DNA durch Schädigung mittels UV-Strahlung verschiedene Cyclobutan-Photoaddukte enthalten, von Enzymen repariert. Ein Beispiel für ein solches Enzym ist die CPD-Photolyase, welche als Schlüsselement für die Elektroneninjektion ein reduziertes, deprotoniertes und photoangeregtes Flavin (*FADH⁻), enthält, das nach Anregung mit Licht ein Elektron an das CPD-Dimer abgibt und dieses so durch Cycloreversion in die Monomere spaltet.^[8, 37, 38] *FADH⁻ hat im photoangeregten Zustand ein Reduktionspotential von -2.6 V (gegen NHE) und ist daher in der Lage, alle Nucleobasen und das T-Dimer ($E_{\text{red}} = -2.2$ V gegen NHE) in einem thermodynamisch begünstigten Prozeß zu reduzieren.^[59-62] T. Carell *et al.* synthetisierten zur mechanistischen Untersuchung des Überschusselektronentransfers Oligonucleotide, in die regiospezifisch Flavin **24** und ein T-Dimer **25** eingebaut wurden (Schema 3.3). Das Dimer wurde mit einem offenen Rückgrat eingebaut, um nach der Cycloreversion einen Strangbruch des modifizierten DNA-Stranges zu erhalten. Die so erhaltenen Strangbruchprodukte wurden mit HPLC und MALDI analysiert.^[59, 63, 64]



Schema 3.3: von Carell *et al.* eingebautes Flavin- und T=T-Derivat, Flavin-induzierte T=T-Spaltung und Strangbruch.

Es wurden verschiedene Stränge hergestellt, wobei der Abstand zwischen Injektor (Flavin) und Detektor (T-Dimer) systematisch erhöht wurde. Angefangen von direkter Nachbarschaft zwischen Injektor und Detektor (Distanz 3.4 Å) wurde die Distanz für den Elektronentransfer bis zu 30.6 Å (8 A:T-Basenpaare) vergrößert (Schema 3.4).^[59, 63, 64] Für die untersuchten Stränge konnte nur eine schwache Abnahme der Reparatureffizienz mit der Distanz festgestellt werden. Da die Bestrahlungsexperimente in Gegenwart von Natriumdithionit durchgeführt werden, verbleibt *FADH⁻ während der gesamten Bestrahlungsdauer im reduzierten, deprotonierten Zustand. Da deshalb kontinuierlich Elektronen transportiert werden, sind die Reparaturausbeuten in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (%/min) angegeben. Dies ist, im Einklang mit den γ -Puls-Radiolyse-Experimenten, ein weiterer Hinweis darauf, daß der Überschusselektronentransfer bei höheren Temperaturen nach dem



Schema 3.4: untersuchte Stränge und Reparaturausbeuten.

β -Wert von 0.1 Å^{-1} , vergleichbar mit den β -Werten des weitreichenden Lochtransfers. Logarithmische Auftragung der Ausbeute gegen $\ln(N)$, wobei N die Anzahl der Hoppingschritte ist, lieferte ebenfalls eine Gerade mit einem η -Wert von 1.95, was nahezu dem idealen Wert eines random-walks entspricht und damit auf einen Hoppingmechanismus hindeutet (vgl. Kap. 2.1.1, .2).

Dieses Ergebnis wird außerdem durch thermodynamische Überlegungen gestützt, da Thymin ($E_{\text{red}} = -2.18 \text{ V}$) und T-Dimer ($E_{\text{red}} = -2.2 \text{ V}$) vergleichbare Reduktionspotentiale haben.^[65]

Hoppingmechanismus verläuft, wobei die A:T-Basenpaare als intermediäre Ladungsträger fungieren. Ein

Superaustauschmechanismus nach Marcus-Levich-Jortner würde eine starke Distanzabhängigkeit bedingen. Pro zusätzlich eingebautem A:T-Basenpaar wurde ein Ausbeuteverlust von ca. 30 % beobachtet. Logarithmische Auftragung der Ausbeute gegen Δr (nach der Marcus-Levich-Jortner-Gleichung) lieferte eine

Gerade mit einem sehr kleinen

Um Aussagen zur Sequenzabhängigkeit machen zu können und festzustellen, ob der Hoppingmechanismus über C- und T-Basen funktioniert, wurden in späteren Arbeiten von Carell *et al.* auch G:C-Basenpaare eingebaut.^[65-67] Diese Stränge wurden als Haarnadel-Systeme (hairpins) mit Flavin als Kopf dargestellt, weil hairpins aufgrund ihres hohen und konzentrationsunabhängigen Schmelzverhaltens eine Untersuchung des Elektronentransfers auch über kurze Distanzen in eindeutig definierter Struktur gewährleisten. Untersucht wurden Stränge mit zwei und drei Basenpaaren zwischen T=T und Flavin. Der Austausch von einem oder mehreren A:T-Basenpaaren gegen G:C-Basenpaare hatte hierbei keinen Einfluß auf die Reparaturausbeuten. Daraus folgt, daß auch Cytosin intermediärer Ladungsträger beim Elektronentransfer via Hopping ist.

Rokita *et al.* konnten mit ihren Untersuchungen bestätigen, daß Überschusselektronentransfer über A:T-Basenpaare nur schwach distanzabhängig ist (\rightarrow Hopping-Mechanismus). Jedoch stellten sie eine Sequenzabhängigkeit fest, die den Ergebnissen von Carell *et al.* widerspricht.^[68] Sie verwendeten 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU, **28**) als Elektronenakzeptor und *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,5-diaminonaphthalen (TMDN, **27**) als Elektronendonator (Abb. 3.3). TMDN wurde durch Kupplung des aminooxy-derivatisierten TMDN-Analogons mit einer abasischen Stelle **29** in die DNA eingebaut. TMDN ist im photoangeregten Zustand ein guter Elektronendonator ($E^*_{ox} \sim -2.8$ V gegen SCE), der sich bei $\lambda_{max} = 325$ nm anregen läßt.

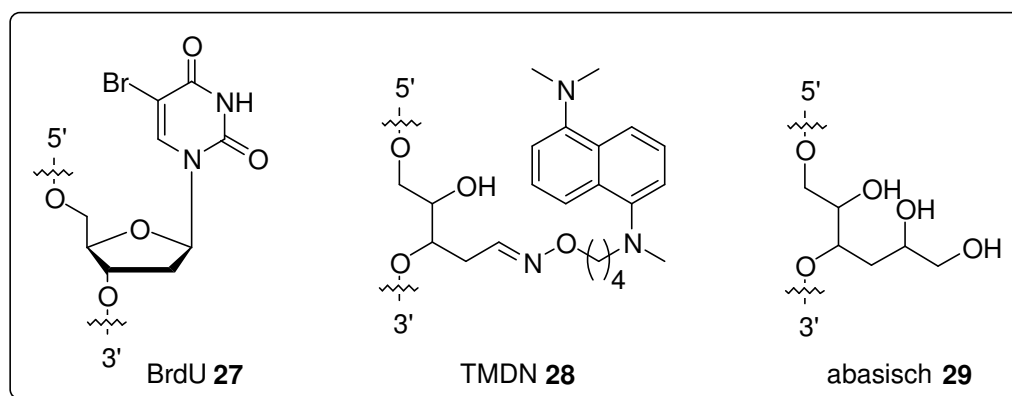


Abbildung 3.3: von Rokita *et al.* verwendeter Elektroneninjektor bzw. -detektor.

Nach photolytischer Anregung wurde geringer Strangbruch am Thymin, das dem BrdU in 5'-Richtung benachbart ist, beobachtet der durch Elektronentransfer von TMDN zu BrdU verursacht wurde. Nach Behandlung mit heißem Piperidin erhielt man einen weiteren großen Anteil an Strangbruchprodukt, der auf die C1'-Oxidation am benachbarten Thymin ausgehend vom Uridin-5-yl-Radikal des BrdU zurückzuführen ist. Die Distanz zwischen Donor und Akzeptor wurde durch zusätzliche Basenpaare schrittweise erhöht. Als β -Wert für den Überschusselektronentransfer wurden 0.3 \AA^{-1} (\rightarrow Hopping-Mechanismus) ermittelt. Daß der

β -Wert höher ist als der von Carell führte Rokita darauf zurück, daß nicht nur A:T- sondern auch G:C-Basenpaare, die aufgrund der Protonierung des Cytosinradikalanions zum Cytosinradikal durch Guanin den Hoppingprozeß verlangsamen, im Doppelstrang enthalten sind. Diese Vermutung wurde auch in neueren Untersuchung dieser Gruppe bestätigt.^[69] Nach Rokita *et al.* ist der Elektronentransfer von Überschusselektronen also sequenzabhängig und verläuft nach dem Hopping-Mechanismus vorzugsweise über Thyminbasen.

Wie bereits bei den bei den γ -Puls-Radiolyse-Experimenten bei tiefen Temperaturen ermittelten β -Werten für den Superaustauschmechanismus, die stark vom verwendeten Interkalator abhängen, muß bedacht werden, daß Carell und Rokita unterschiedliche Akzeptor- und Donorsysteme verwenden und dies zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Die Spaltgeschwindigkeit k_{split} des von Carell *et al.* als Detektor verwendeten T-Dimers liegt zwischen $k_{\text{split}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$ und 10^9 s^{-1} .^[67] Die Geschwindigkeit des Lochtransfers liegt zwischen 10^6 s^{-1} und 10^8 s^{-1} . Vorausgesetzt der Überschusselektronentransfer durch A:T- und G:C-Basenpaare ist etwas schneller als 10^8 s^{-1} läßt sich die Sequenzunabhängigkeit der Geschwindigkeit dadurch erklären, daß die T-Dimer-Spaltung zumindest teilweise der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und somit mit diesem System die Sequenzabhängigkeit nicht untersucht werden kann. Das Detektorsystem von Rokita hat ein niedrigeres Reduktionspotential, reagiert daher vermutlich schneller und liefert deshalb Aussagen über die Sequenzabhängigkeit.^[30c]

3.2.2 Untersuchungen und Ergebnisse von Lewis und Wasielewski

Lewis *et al.* synthetisierten stabile synthetische DNA-Haarnadelstrukturen mit Stilbendiether-Linkern als Kopfgruppe (Abb. 3.4).

Der Lochtransfer konnte von Lewis *et al.* bereits mit Stilbendicarboxamid (Sa, **30**) als Kopfgruppe mechanistisch untersucht werden, weil Sa im Singulett-Zustand Guanin im Gegensatz zu Adenin photooxidieren kann. Dabei wird ein ladungstrennter Zustand generiert. Der Zerfall des Signale des Singulett Stilbendicarboxamides, sowie die Bildung (durch Elektronentransfer) und der Zerfall (durch Ladungsrekombination) des Anionenradikals Sa^- wurden beobachtet. Es konnten wichtige Aussagen über die Kinetik des Lochtransfers gemacht und die Geschwindigkeit eines Hoppingschrittes ($5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$) gemessen werden (vgl. Kap. 2.1.2).^[30e] Die Effizienz des Elektronentransfers ist aufgrund des ladungstrennten Zustandes und der damit verbundenen Ladungsrekombination als Konkurrenzreaktion zum Ladungstransfer vermindert.

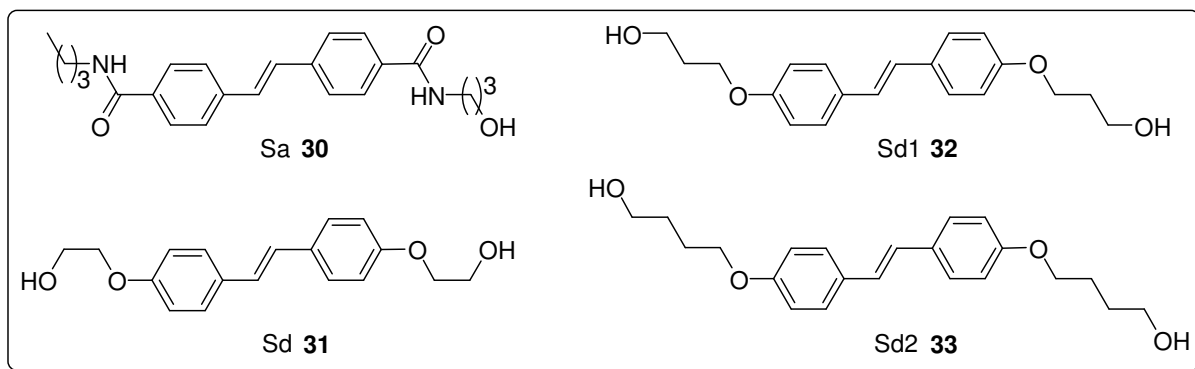
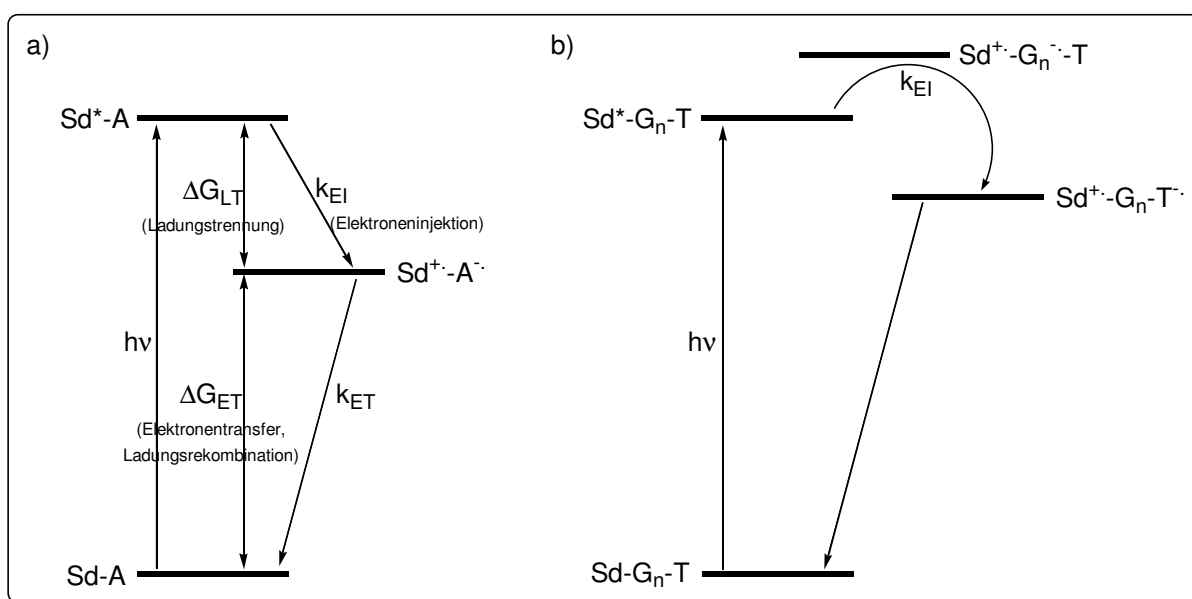


Abbildung 3.4: von Lewis *et al.* (für die Synthese von DNA-Haarnadeln zur Untersuchung von Kinetik und Energetik des Überschusselektronentransfers in DNA als Kopfgruppe) entwickelte Stilbendiether-Linker (Sd, Sd1 und Sd2) und für die Untersuchung des Lochtransfers als Kopfgruppe verwendetes Stilbendicarboxamid (Sa).^[30d]

Analog zu den Untersuchungen beim Lochtransfers mit Stilbendicarboxamid als Kopfgruppe der DNA-Haarnadeln, konnten Untersuchungen zum Überschusselektronentransfer mit DNA-Haarnadeln, die als Kopfgruppe Stilbendiether-Linker besaßen, durchgeführt werden. Die stabilsten synthetischen Haarnadeln erhielt man mit Bis(2-hydroxyethyl)stilben 4,4'-diether-Linkern (Sd, **31**), wo bereits zwei T:A-Basenpaare ausreichen, um bei Raumtemperatur stabile DNA-Haarnadel-Strukturen in der B-DNA-Form vorliegen zu haben (Abb. 3.5).^[30d]



Schema 3.5: Kinetik und Thermodynamik der Elektroneninjektion (Ladungstrennung) und Ladungsrekombination; a.) Quenchen durch benachbarte Akzeptornucleobase (A); b.) Thymin als Akzeptornucleobase nach G:T-Brücke.^[30c]

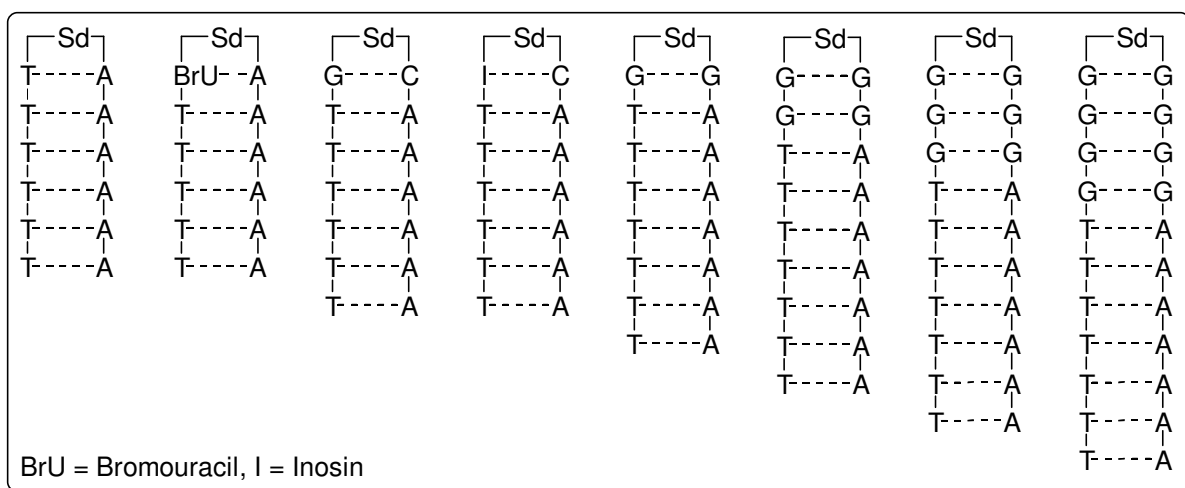


Abbildung 3.5: von Lewis *et al.* zur Untersuchung der photoinduzierten Elektroneninjektion dargestellte DNA-Haarnadeln.^[30c]

Die starke Fluoreszenz der Stilbendiether-Linker wird ebenso wie die *trans-cis*-Photoisomerisierung in DNA-Haarnadeln mit benachbarten A:T- und G:C-Basenpaaren vollständig gequencht. Ursache für das Quenchen ist ein Elektronentransfer, bei dem Singlet-Stilben als Elektronendonator und T oder C als Elektronenakzeptor fungiert (Schema 3.5). Sind benachbart zur Kopfgruppe hingegen G:G-Basenpaare eingebaut, kann noch deutliche Photoisomerisierung beobachtet werden.

Untersucht wurde die Pikosekundendynamik der Elektroneninjektion in synthetischen DNA-Haarnadeln ausgehend von Stilbendiether im photoangeregten Singlet-Zustand ($^1\text{Sd}^*$) zu vier verschiedenen benachbarten Basenpaaren (Elektronenakzeptoren), sowie die Distanzabhängigkeit der Elektroneninjektion auf Thymin bei räumlicher Trennung von Donor und Akzeptor durch G:G-Basenpaare. Bei letzterem sollte kein Ladungstransfer auf Guanin stattfinden, da aufgrund des Reduktionspotentials der Nucleobase Guanin der Elektronentransfer mit 0.5 eV endergonisch ist.^[30c] G:G-Basenpaare wirken somit als Brücke für den Elektronentransfer zum nächsten A:T-Basenpaar. Die Reduktion von C und T ist exergonisch. Die Reduktion von A und G endergonisch.

Nach Photoanregung wurde der Zerfall des $^1\text{Sd}^*$ -Signals, sowie die Bildung und der Zerfall des Signals des Stilbendietherradikalkations $\text{Sd}^{+\bullet}$ (bei 525 nm) beobachtet (Pikosekundenzeitaufgelöste Laserspektroskopie). Es wurde beobachtet, daß die Elektroneninjektionsgeschwindigkeiten mit T als Elektronenakzeptor ($> 2 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$) größer sind als mit C ($3.3 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$), was darauf hindeutet, daß das Reduktionspotential von Thymin in B-DNA kleiner sein muß als das von Cytosin und außerdem die von Rokita *et al.* festgestellte Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers untermauert. Außerdem konnte ein Unterschied der Elektroneninjektionsgeschwindigkeit auf Cytosin gemessen werden, wenn anstelle des

G:C-Basenpaares ein I:C-Basenpaar verwendet wurde. Für letzteres wurde die Elektroneninjektionsgeschwindigkeit $k_{EI} = 1.4 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ gemessen. Grund hierfür ist das stärkere Wasserstoffbrückennetzwerk des G:C-Basenpaares und damit verbundene kleine Unterschiede im Reduktionspotential von Cytosin. Bromouracil, das von Rokita *et al.* als Akzeptorsystem verwendet wurde, wird sogar noch schneller reduziert als Thymin.

Die Trennung von Donor und Akzeptor durch eine G:G-Brücke führte zu deutlich langsameren Ladungsinjektionsgeschwindigkeiten. Für ein und zwei G:G-Basenpaare konnte noch Elektroneninjektion ($57 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ bzw. $4.4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$) und -transfer beobachtet werden, für drei oder vier G:G-Basenpaare nicht mehr. Diese Werte sind verglichen mit denen von Lewis *et al.* mittels Stilbendicarboxamid für Lochtransfer über A:T-Brücken gemessenen um den Faktor 25 kleiner. Zwar können die kleineren Geschwindigkeiten teilweise mit verminderten Donor-Brücke-Akzeptor-Wechselwirkungen begründet werden, das Fehlen des Elektronentransfers bei bereits drei G:G-Basenpaaren ließ Lewis *et al.* jedoch zu dem Schluß kommen, daß der einstufige Überschusselektronentransfer auf kurze Distanzen beschränkt sein muß.^[30c]

3.2.3 Untersuchungen und Ergebnisse von Netzel und Wagenknecht

Pyren kann im photoangeregten Zustand Py^* Elektronen auf benachbarte Nucleobasen übertragen und dabei analog zum System von Lewis und Wasielewski einen ladungstrennten Zustand erzeugen. Die Triebkraft für einen Elektronentransfer auf U oder C wurde basierend auf deren Reduktionspotentialen^[18], dem Oxidationspotential (1.5 V gegen NHE) und der Singulettenergie von Pyren ($E_{00} = 3.25 \text{ eV}$) zu -0.5 bzw. -0.6 eV bestimmt.

Netzel *et al.*^[70] untersuchten die Löscheffizienzen der photoangeregten Pyren-Emission ausgehend von pyren-markierten Oligonucleotiden in Abhängigkeit der benachbarten Nucleobasen. Für die Löscheffizienz wurde folgender Trend ermittelt: $A < G < T < C$. Durch Fluoreszenzspektroskopie und Messungen der Lebensdauer konnte ein Elektronentransfer von Py^* auf die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin nachgewiesen werden. Die Zuordnung wurde durch Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzlebensdauer von 5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin (Py-dU, **34**) überprüft.^[71] Da die Oxidation des Pyrens reversibel ist und der Elektronentransfer auf benachbarte Nucleobasen vom Uridinradikalanion des primär erzeugten ladungstrennten $\text{Pyren}^+/\text{dU}^-$ -Produkts ausgeht, steht der Rückelektronentransfer vom Uridinradikalanion zum Pyrenradikalkation in Konkurrenz zum Elektronentransfer auf die DNA-Basen. Um die Lebensdauer der reduzierten Deoxyuridin-

Spezies und damit die Effizienz des Ladungstransfers auf benachbarte Elektronenakzeptoren (Nucleobasen) zu erhöhen, stellten Netzel *et al.* in neueren Arbeiten Modifikationen^[72] des ursprünglich synthetisierten Py-dU **34**^[73] vor (Abb. 3.6).

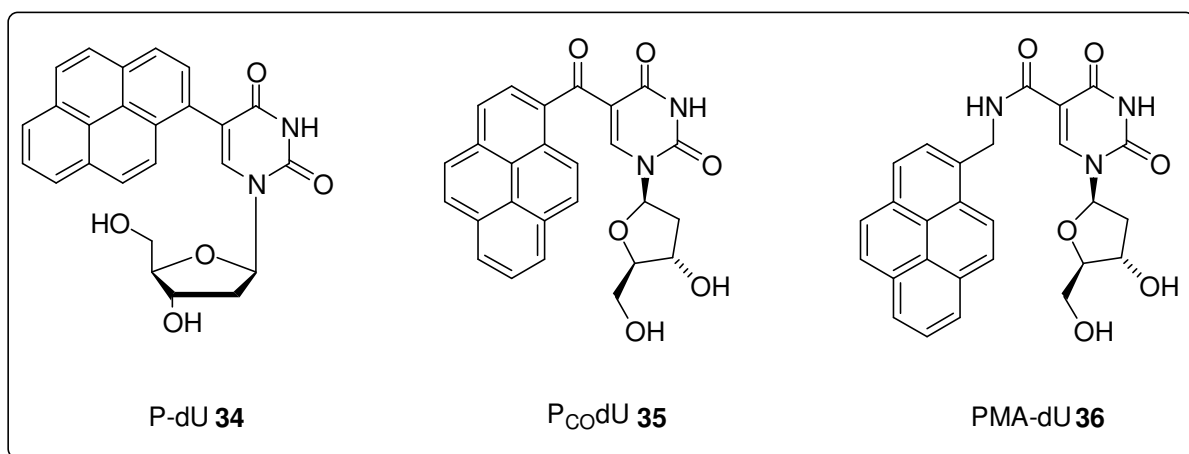
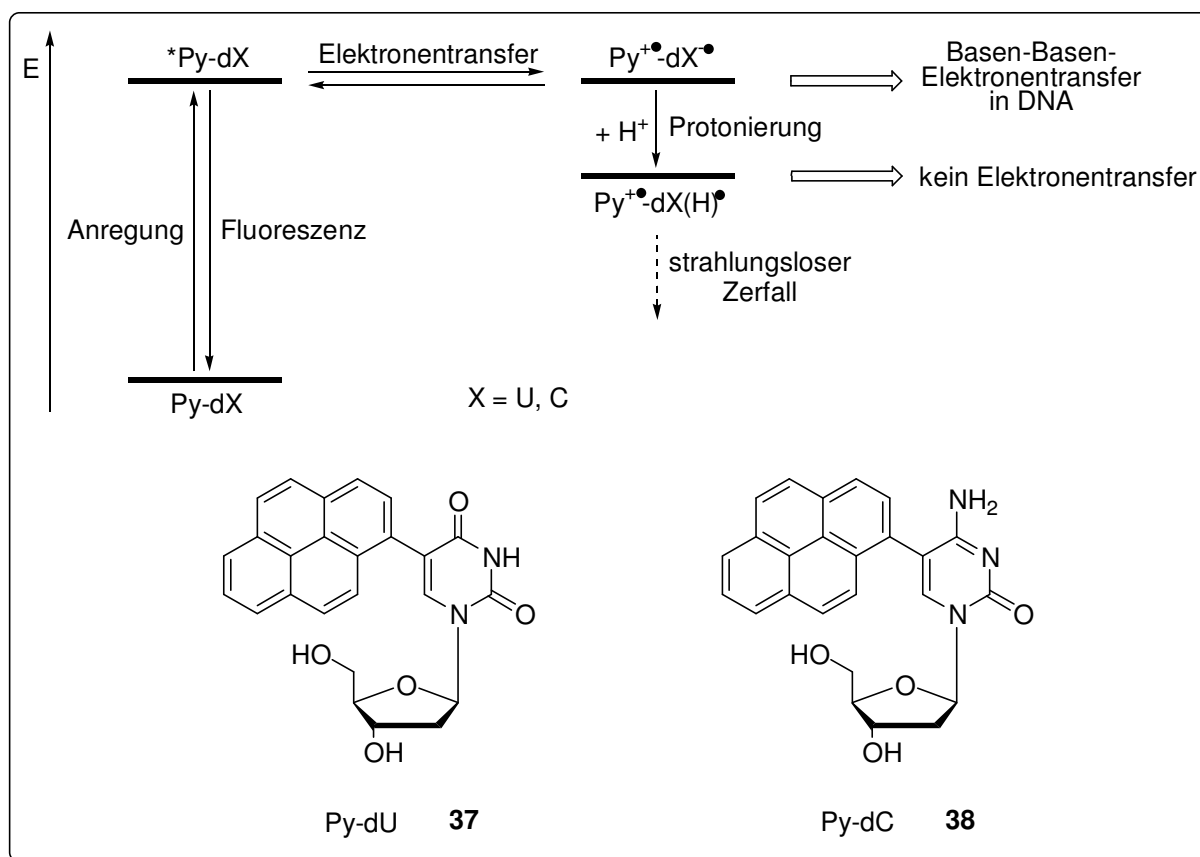


Abbildung 3.6: von Netzel *et al.* zur Untersuchung der photoinduzierten Elektroneninjektion dargestellte Pyren-markierte Oligonucleotide.^[72, 73]

Hierfür wurde die Anzahl der Atome des Linkers zwischen Pyridin und Uridin erhöht. Um Elektronentransfer auf benachbarte Nucleobasen effizient zu ermöglichen, sollte die Rekombinationsgeschwindigkeit im Bereich von 0.5 ns liegen. Dies wurde mit PMA-dU **36**, das als Linker zusätzlich eine $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ Gruppe enthält, erreicht (430 anstelle von 67 ps für die Modifikation mit der schnellsten Ladungsrekombination).^[72a] Eine andere Möglichkeit die Lebensdauer der Uridinradikalanionen zu erhöhen, wäre Abfangen durch Reduktion des Pyrenradikalkations mit einem benachbarten Donor, der in Konkurrenz zur Ladungsrekombination von $\text{Pyren}^+/\text{dU}^\bullet$ das Pyrenradikalkation reduziert.^[72a]

Von Fiebig *et al.* wurden bei zeitaufgelösten Untersuchungen der Reduktion von T und C durch photoangeregtes 2-Aminopurin die Reduktionspotentiale der nicht-protonierten Paare $\text{C}^\bullet/\text{C}$ und $\text{T}^\bullet/\text{T}$ zu -1.8 V bzw. -1.9 V (gegen NHE) gemessen. Dies deutet darauf hin, daß der Protonentransfer den reduktiven Elektronentransfer in DNA wesentlich beeinflusst und der Überschusselektronentransfer daher als pH-abhängiger protonengekoppelter Prozeß verstanden werden muß.^[74]

Auch die Gruppe um H.-A. Wagenknecht nutzte Pyren-modifizierte Nucleoside als Modelle für spektroskopische Untersuchungen zum Überschusselektronentransfer in DNA. Es wurden Py-dU **37** und 5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxycytidin (Py-dC, **38**) dargestellt, in DNA eingebaut und die Eigenschaften und die Dynamik des intramolekularen Elektronentransfers in Py-dU und Py-dC durch stationäre Fluoreszenzspektroskopie und Femtosekunden-zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie in Wasser bei unterschiedlichen pH-Werten charakterisiert (Schema 3.6).^[48, 75, 76]



Schema 3.6: von Wagenknecht *et al.* zur Untersuchung der photoinduzierten Elektroneninjektion dargestellte Pyren-markierte Oligonucleotide; Ladungstrennung durch intramolekularen ET nach Photoanregung und davon ausgehend Elektronentransfer in DNA (Fluoreszenzlöschung) oder Protonierung zum Diradikal bei pH < 5 und strahlungsloser Zerfall.^[48, 72, 73]

Nach Anregung bei 340 nm entsteht wie bei Netzel das ladungstrennte $\text{Py}^{+\bullet}/\text{dX}^{\bullet}$ (nicht fluoreszent), das im Gleichgewicht mit dem fluoreszenten Py^*/dX steht und zum Diradikal $\text{Py}^{+\bullet}/\text{dX}(\text{H})^{\bullet}$ protoniert werden kann (Schema 3.6). Ist in direkter Nachbarschaft zum Py-dU im DNA-Doppelstrang ein T oder C eingebaut, wird eine Löschung der Fluoreszenz beobachtet, was auf Elektroneninjektion in den DNA-Strang zurückzuführen ist. Um die Beteiligung von Cytosin als Ladungsträger beim Überschusselektronentransfer zu untersuchen wurde von Wagenknecht *et al.* zusätzlich zu den modifizierten Uridinen auch Py-dC dargestellt. Daß ein kleiner Energieunterschied zwischen T^{\bullet} und C^{\bullet} besteht, ist bereits bekannt und der von Steenken *et al.*^[44a] beschriebene Unterschied in der Basizität konnte durch die Experimente ebenfalls bestätigt werden. Das nichtprotonierte Radikalanion von C (C^{\bullet}) konnte in wässrigen Lösungen nicht beobachtet werden. Zwar lassen sich eine wässrige Lösung von Monomeren und DNA nicht direkt miteinander vergleichen, da in Wasser mehrere Wasserstoffbrückenbindungsarten strukturell und energetisch begünstigt sein können, dennoch vermuten Wagenknecht *et al.* aufgrund der Untersuchungsergebnisse, daß die Protonierung des Cytosinradikalanions durch die komplementäre Guaninbase schnell stattfindet. Bei pH 5 wurden für intramolekularen Elektronentransfer und Protonierung in Py-

dU weniger als 4.7 ps und in Py-dC weniger als 40 ps gemessen. Während dieser Zeit kann sich das Wasserstoffbrücken-Netzwerk dahingehend verändern, daß Spin und Ladung des Überschusselektrons getrennt werden. Diese Prozesse laufen zwar mikroskopisch reversibel ab, dennoch haben sie einen Einfluß auf den Elektronentransfer, welchen sie limitieren oder gar beenden könnten. Wagenknecht *et al.* nehmen daher an, daß Cytosin als Ladungsträger in der DNA im Gegensatz zu Thymin (oder Uridin) keine Rolle spielen sollte.^[48]

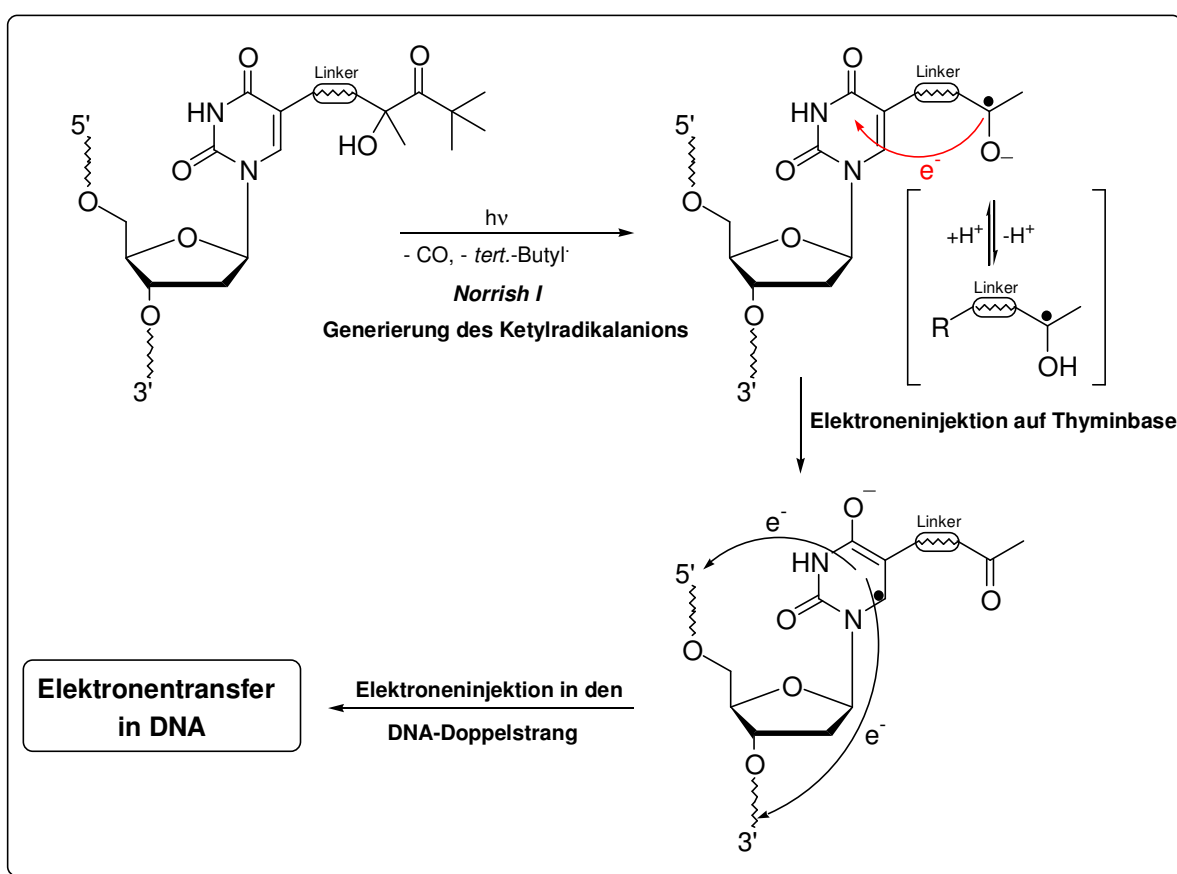
Auf die Unterschiede der einzelnen für die Photolyseexperimente eingesetzten Systeme und die daraus resultierenden Ergebnisse wird in Kap. 4 zusammenfassend nochmal kurz eingegangen.

4 Aufgabenstellung

Nachdem der Lochtransfer in der Gruppe Giese in den letzten Jahren intensiv untersucht worden ist und die Mechanismen des Elektronentransfers (Hopping-Mechanismus) geklärt werden konnten, sollte ein Injektorsystem gefunden werden, mit dem eine Untersuchung des Überschusselektronentransfers möglich ist.

In den letzten Jahren wurde von anderen Arbeitsgruppen intensiv auf dem Gebiet des reduktiven Elektronentransfers geforscht (vgl. Kapitel 3), dennoch blieben mechanistische Fragen offen. So herrscht vor allem über die Beteiligung von Cytosin als Ladungsträger beim Überschusselektronentransfer Uneinigkeit. Während Carell *et al.* mit ihrem Flavin/T-Dimer-System keine Sequenzabhängigkeit feststellen konnten, beobachteten Rokita *et al.* eine Zunahme der Distanzabhängigkeit, wenn der DNA-Strang G:C-Basenpaare enthielt. Die Gruppe von Wagenknecht hingegen nimmt an, daß Cytosin als Ladungsträger wegen der Protonierung durch G gar keine Rolle spielt. Die Ergebnisse aus der γ -Puls-Radiolyse weisen auf einen Superaustauschmechanismus bei tiefen Temperaturen (77 K) und bei höheren Temperaturen auf einen Hoppingmechanismus hin, wobei ab 170 K auch Cytosin als Ladungsträger fungieren kann. Eine Limitation des Elektronentransfers durch Protonierung des C-Radikalanions wird im Gegensatz zu den Untersuchungen von Wagenknecht *et al.* nicht erwartet, da die Protonierung reversibel ist. Auch die Ergebnisse von Rokita *et al.* und Carell *et al.* untermauern den Hoppingmechanismus für den Transfer von Überschusselektronen in DNA ($\beta = 0.3$ bzw. 0.1 \AA^{-1}) bei höheren Temperaturen. Die bisher verwendeten Systeme haben verschiedene Nachteile. Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, wurden die γ -Puls-Radiolyse-Experimente mit interkalierenden Elektronenakzeptoren durchgeführt und auch die Ladungsinjektion durch γ -Puls-Radiolyse verläuft nicht regiospezifisch. Das von Carell als Elektroneninjektor für die Photolyseexperimente im reduzierten, deprotonierten und photoangeregten Zustand eingesetzte Flavin hat den Nachteil, daß permanent Elektronen abgegeben werden, da es durch Dithionit während der gesamten Bestrahlung im reduzierten Zustand verbleibt. So kann zwar eine Quantifizierung des gespaltenen T-Dimers in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit angegeben werden, eine Aussage bzgl. der Elektronentransfer- und Spalteffizienz eines einzelnen Elektrons bzw. einer definierten Ladungsmenge ist mit diesem System jedoch nicht möglich. Gleiches gilt für das von Rokita *et al.* verwendete System. Die Stilbendiether-Derivate von Lewis und Wasielewski *et al.* und die Pyren-Derivate, die von Netzel *et al.* und Wagenknecht *et al.* eingesetzt wurden erzeugen nach Photoanregung einen ladungstrennten Zustand. Die Ladungsrekombination steht hier

in direkter Konkurrenz mit dem Ladungstransfer, was ein deutlicher Nachteil dieser Systeme ist (geringe Effizienz). Weitreichender Elektronentransfer kann so kaum untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es, ein Ladungsinjektorsystem zu entwickeln, das - vergleichbar mit den für die Studien des Lochtransfers von Giese *et al.* eingesetzten 4'-pivaloyl-modifizierten Nucleosiden - regiospezifisch ein Elektron in die DNA injiziert ohne einen ladungstrennten Zustand zu erzeugen und so Aussagen über die Effizienz des Ladungstransfers einer definierten Ladungsmenge über größere Distanzen möglich macht. Da Dialkylketone ein stärker negatives Reduktionspotential^[77] aufweisen als die am leichtesten zu reduzierende Nucleobase Thymin^[17, 18], sollte für die Synthese des neuen Injektorsystems ein Thyminderivat synthetisiert werden, das mit einem Ketylradikalvorläufer verknüpft ist (Schema 4.1).

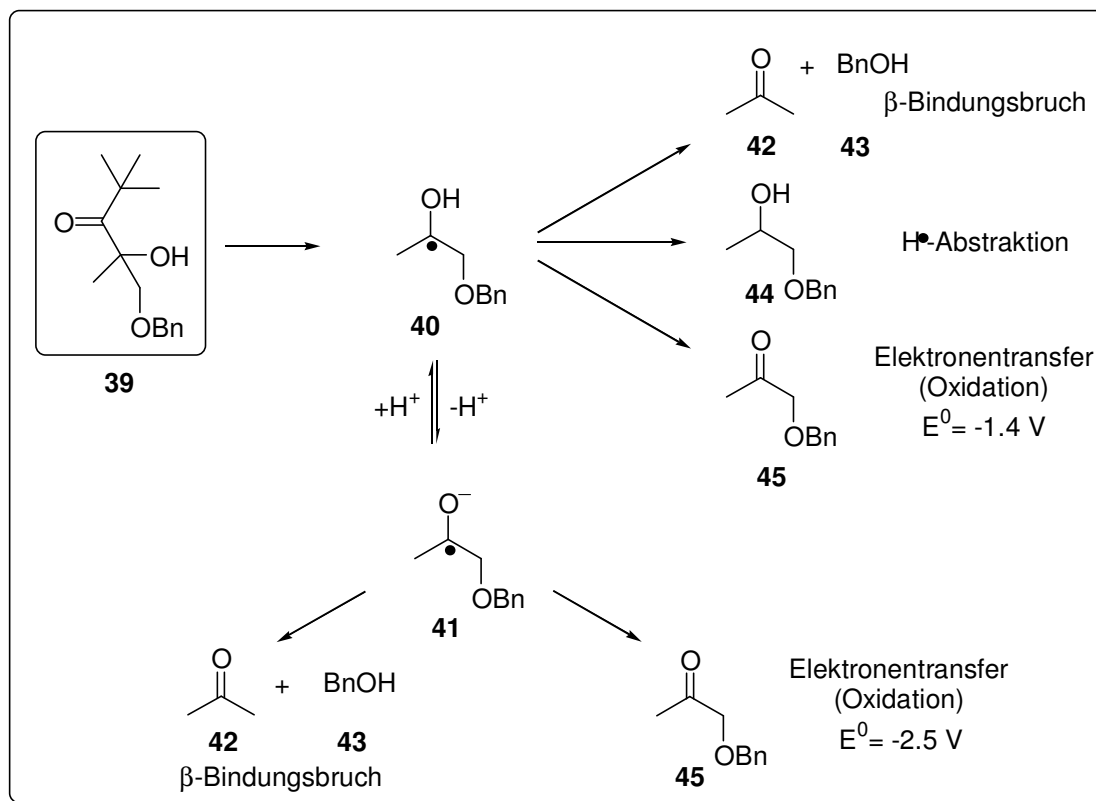


Schema 4.1: Elektroneninjektion in DNA ausgehend vom Ketylradikalanion über eine gekoppelte Thyminbase.

Ketylradikale lassen sich durch Photolyse von *tert*-Butylketonen erzeugen. In einer Norrish-I-Reaktion wird das *tert*-Butylradikal und CO abgespalten und nach Deprotonierung des Hydroxylradikals das Ketylradikal gebildet. Auf den Mechanismus wird in Kap. 5 näher eingegangen. Ausgehend vom primär erzeugten Thyminradikalanion sollte die Ladung dann auf benachbarte Thyminbasen übertragen und so durch den DNA-Strang transferiert werden können.

5 Mögliche Reaktionswege von *tert.*-Butylketonen

In der Gruppe Giese wurde die Photochemie von *tert.*-Butylketonen, die bei Bestrahlung (Absorptionsmaximum für den $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Carbonylgruppe des *tert.*-Butylketons: ~ 305 nm) in einer Norrish I-Reaktion das *tert.*-Butylradikal und CO freigegeben, in verschiedenen Systemen genutzt. So wurde zum Beispiel Thymidin 4'-Pivaloyl-modifiziert, um nach Norrish I-Spaltung das 4'-DNA-Radikal zu erhalten, welches nach heterolytischer Spaltung zu Strangbruch und Bildung des Zuckerradikalkations führt und über Elektronentransfer zu einem benachbarten Guanin den Lochtransfer in DNA einleitet (vgl. Kap. 2). Die *tert.*-Butylketone besitzen zwar kein hohes Absorptionsmaximum ($\epsilon_{\max} = 30$), jedoch eine hohe Quantenausbeute $\Phi = 0.56$, so daß bei Bestrahlung eine quantitative Spaltung erfolgt. R. Glatthar verwendete im Rahmen seiner Doktorarbeit *tert.*-Butylketone für die Entwicklung eines photolabilen Linkers an der festen Phase, welcher zur Abspaltung von Ethern und Peptiden (Peptidsynthese) eingesetzt werden kann.^[78] In Vorexperimenten in homogener Phase, bei denen der photoinduzierte β -Bindungsbruch zur Abspaltung von Benzylether untersucht wurde, beobachtete R. Glatthar eine pH-Abhängigkeit der Reaktion (Schema 5.1).



Schema 5.1: mögliche Reaktionswege des primär gebildeten Radikals nach photolytischer Abspaltung der *tert.*-Butylgruppe.

In Gegenwart von Säure war die Ausbeute an Benzylalkohol (**43**) deutlich höher, bei pH-Werten > 6.0 traten Konkurrenzreaktionen auf, die mit zunehmendem pH-Wert immer dominanter wurden.^[78a] Bei diesen pH-Werten wurde die Bildung eines Ketoproduktes (**45**) beobachtet. Da sich die Ausbeutezunahme an Ketoprodukt mit der Ausbeuteabnahme an abgespaltenem Benzylalkohol (**43**) einhergeht, müssen zwei Reaktionen in Konkurrenz zueinander stehen. Die möglichen Reaktionswege sind in Schema 5.1 dargestellt.

Das Primärradikal **40** wird bei basischen Bedingungen schnell deprotoniert, es entsteht das Radikalanion **41**. Dieses kann durch Elektronenabgabe (an das Lösungsmittel oder einen Reaktionspartner) zum Ketoprodukt **45** oxidiert werden. Grundlage für diesen Reaktionsweg ist, daß sich die Azidität des Radikalzentrums durch die Nachbarschaft zur Hydroxylgruppe im Primärradikal um ca. 5 pK_s -Einheiten erniedrigt und eine Deprotonierung so erleichtert wird. Mit dem vergleichbaren Isopropylalkohol-System wurden physikalische Messungen durchgeführt - der pK_s -Wert des Isopropylalkohol liegt hier bei 17.0, während das entsprechende sekundäre kohlenstoffzentrierte Radikal einen pK_s -Wert von 12.1 aufweist.^{[79,}

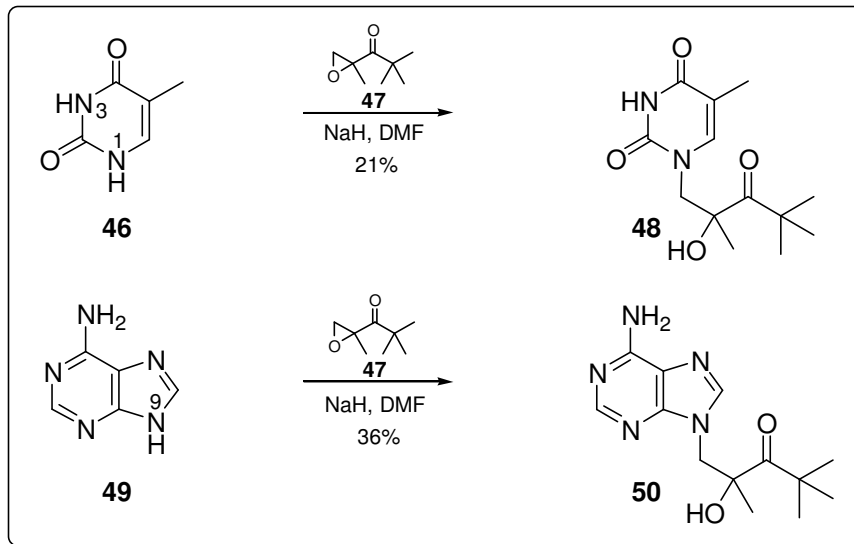
^{80]} Auch die Redoxpotentiale sind stark pH-abhängig. Während das Ketylradikal ein Reduktionspotential von $E^0 = -1.4$ V besitzt, ist das Ketylradikalanions mit $E^0 = -2.5$ V ein wesentlich stärkerer Reduktant. Auch dadurch kann eine vermehrte Bildung des Oxidationsproduktes erklärt werden - Ketylradikalanionen sind gute Reduktionsmittel.^[79-81] Der photolabile Linker wird daher vorzugsweise im sauren Milieu verwendet.

Während der Elektronentransfer und die damit verbundene Oxidation zum Ketoprodukt bei den Studien von R. Glatthar ein unerwünschter Reaktionsweg war, sollte im Rahmen dieser Arbeit ebendieser Reaktionsweg ausgenutzt werden, um negative Ladung auf den DNA-Strang aufzubringen. Daß *tert.*-Butylketone folglich nicht nur für den Lochtransfer sondern auch für den Überschusselektronentransfer als Vorläufer für die photoinduzierte Ladungsinjektion fungieren können, wird beim Vergleich der Reduktionspotentiale des entstehenden Radikalanions **41** ($E^0 = -2.5$ V) und der Thyminbase ($E_{\text{red}} = -2.18$ V)^[17] deutlich. Auch Cytosinbasen ($E_{\text{red}} = -2.35$ V)^[17] sollten durch das Radikalanion reduziert werden können. Da Thymidin jedoch die am einfachsten zu reduzierende Nucleobase ist, sollte das Injektorsystem mit einem modifizierten Thymidin hergestellt werden. Hierbei sollte vom Radikalanion ausgehend die Ladung auf das Thymin gebracht werden, das direkt mit dem Radikalanionenvorläufer (*tert.*-Butylketon) verknüpft ist. Ausgehend von der reduzierten Nucleobase kann die Ladung dann im DNA-Strang weiter transportiert werden.

6 Modellversuche: N-verknüpfte Modellsysteme

Um Kenntnisse über die Effizienz der Elektroneninjektion von einem durch Bestrahlung eines *tert.*-Butylketons und Norrish I-Spaltung erzeugten Radikalanions auf eine Nucleobase zu erhalten, sollte zunächst ein leicht zugängliches Modellsystem entwickelt werden. Da Thymin die am leichtesten zu reduzierende DNA-Base ist und aus diesem Grund auch im Injektorsystem für die DNA-Experimente eingesetzt werden sollte, wurde ein Thymin/*tert.*-Butylketon-Modellsystem hergestellt.

Thymin (**46**) wird bei Basenbehandlung zunächst am N-1 (ab pH > 13 auch am N-3, 2. Ionisationsstufe) deprotoniert, so daß die Modifikation am N-1 am einfachsten ist.^[82] Der *tert.*-Butylketon-Linker wurde folglich am N-1 eingeführt (**48**, Schema 6.1). Thymin kann außerdem als Abgangsgruppe ($pK_s = 9.87$)^[82] fungieren, wenn wie bei dem System von R. Glatthar (vgl. Kap. 4.1) ein β -Bindungsbruch möglich ist. Man hat auf diese Weise bei einem entsprechend gewählten Modellsystem (**48**) - eine Konkurrenzreaktion in der Hand, mit der die Effizienz des Elektronentransfers auf die Nucleobase Thymin durch das Verhältnis der beiden Reaktionswege direkt angegeben werden kann.



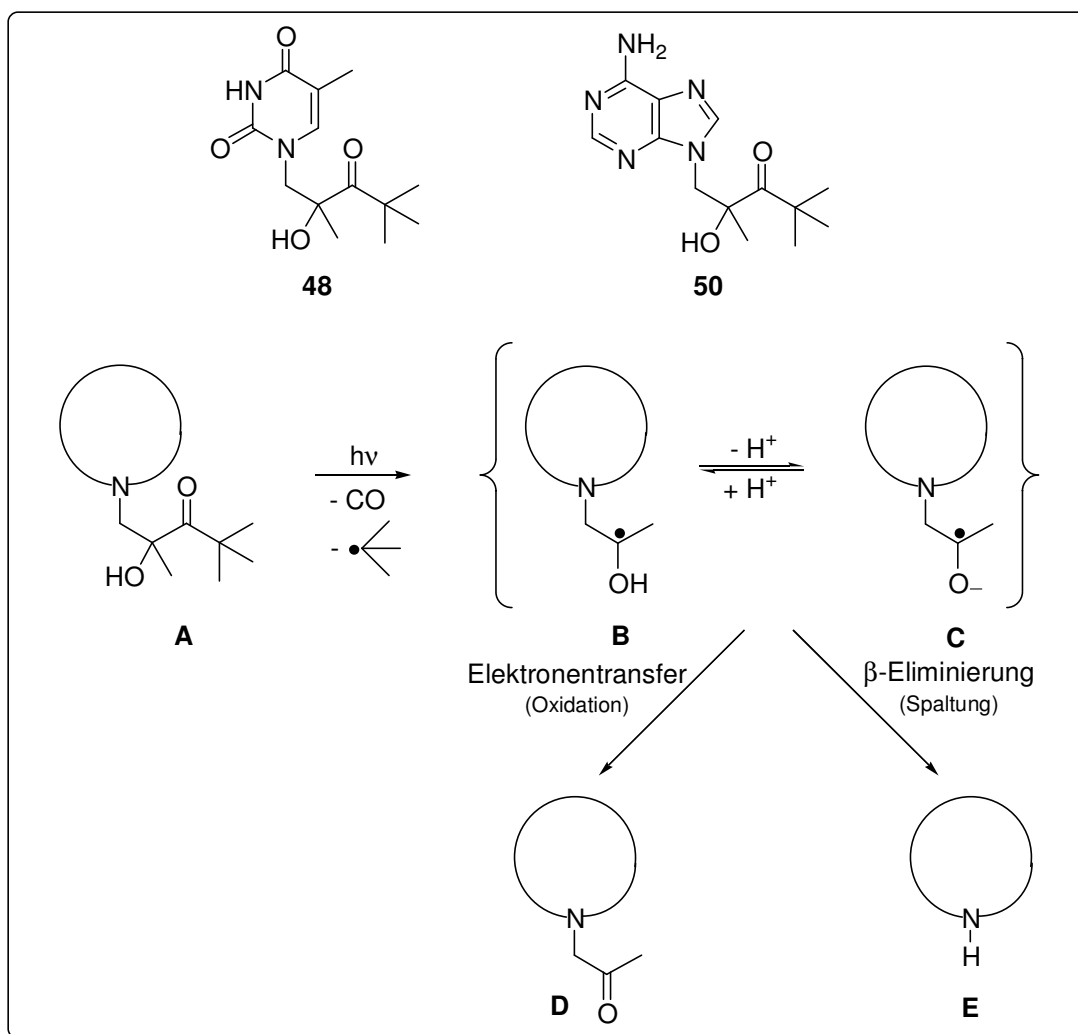
Schema 6.1: für die Modellexperimente synthetisiertes Thymin(**48**)- bzw. Adeninderivat (**50**).

Als Vergleichssystem, bei dem kein Elektronentransfer stattfinden sollte, wurde zusätzlich das mit einem *tert.*-Butylketon modifizierte Adeninderivat **50** dargestellt. Als Nucleobase mit stärker negativem Reduktionspotential ($E_{\text{red}} = -2.52$)^[17] kann Adenin durch das Radikalanion nicht in einem thermodynamisch günstigen Schritt reduziert werden. Auch

Adenin fungiert als Austrittsgruppe ($pK_s = 4.25$) beim β -Bindungsbruch und kann relativ leicht am N-9 modifiziert werden.^[82b, 83]

Durch Reaktion des Epoxides (*rac*)-1,2-Epoxy-2,4,4-trimethylpentan-3-on (**47**) mit der entsprechenden Nucleobase und Natriumhydrid konnten die gewünschten *tert.*-Butylketon-Systeme für die Modellversuche in Ausbeuten von 36% (für das Adeninderivat **50**) bzw. 21% (für das Thyminderivat **48**) erhalten werden (Schema 6.2). Das Epoxid **47** wird ausgehend von Pivalonitril in zwei Stufen in einer Gesamtausbeute von 26% dargestellt. Hierfür wird Pivalonitril zunächst mit Isopropylmagnesiumbromid unter Kupfer(I)-bromid-Katalyse in einer Grignard-Reaktion umgesetzt. Nach Hydrolyse erhält man 2,4,4-Trimethylpent-1-en-3-on in 87 % Ausbeute, welches mit Wasserstoffperoxid in 30% Ausbeute zum (*rac*)-1,2-Epoxy-2,4,4-trimethylpentan-3-on epoxidiert wird.

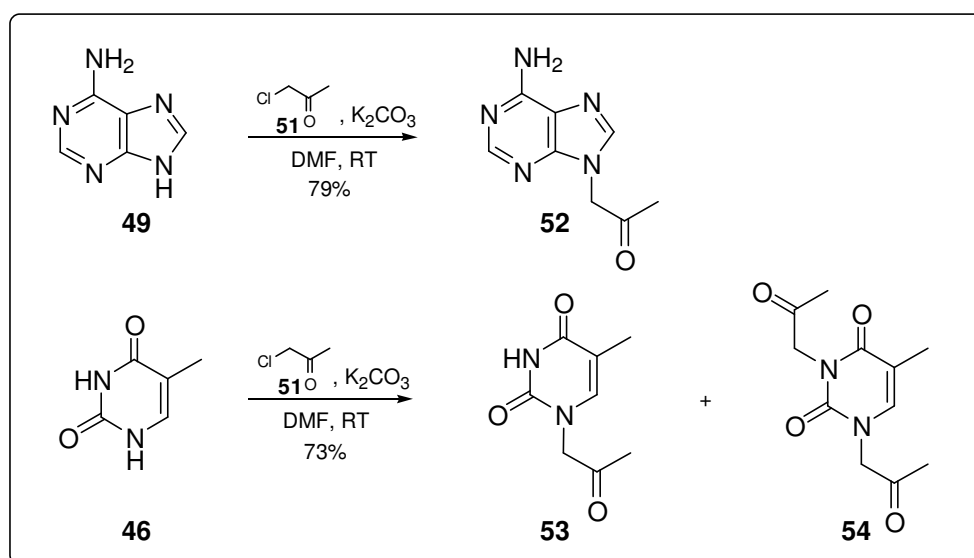
Die so synthetisierten Modellsysteme haben, wie bereits geschrieben, zwei mögliche Reaktionswege, die in Abb. 6.2 dargestellt werden.



Schema 6.2: konkurrierende Reaktionswege nach Bestrahlung und Norrish I-Reaktion.

Da Thymin vom Radikalanion **C** reduziert werden kann, Adenin jedoch auf Grund des negativeren Reduktionspotentials nicht, wird bei Bestrahlung des Thyminderivats das Ketoderivat **D** (Elektronentransferprodukt), beim Adeninderivat die freie Base **E** als Hauptprodukt erwartet.

Die Ketoprodukt-Referenzverbindungen (Referenzverbindungen für den Elektronentransfer) konnten durch Umsetzung der jeweiligen Base mit Chloraceton in DMF in Gegenwart von Kaliumcarbonat erhalten werden (Schema 6.3). Man erhielt 9-(Propyl-2'-on)-adenin (**52**) in 79% Ausbeute und 1-(Propyl-2'-on)-thymin (**53**) bzw. 1,3-Di-(propyl-2'-on)-thymin (**54**) in 21% bzw. 52% Ausbeute. Da Thymin bei stark basischen Bedingungen an N-1 und N-3 deprotoniert werden kann, wurden hier sowohl das Mono- als auch das Di-substituierte Produkt gefunden, die säulenchromatographisch voneinander getrennt werden konnten.



Schema 6.3: Synthese der Photolyse-Referenzverbindungen **52** und **53**.

Für die Bestrahlung wurden die *N*-verknüpften Photoedukte 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (**48**) und 9-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-adenin (**50**) in verschiedenen Lösungsmitteln in einer 3 ml UV-Quarzglas-Küvette gelöst, die Proben während 20 min mit Argon entgast und anschließend mit einer Quecksilberbogenlampe und einem 320 nm Cut-Off Filter bestrahlt. Zur Analyse wurden in Zeitabständen von 1, 2, 5 und 10 Minuten Bestrahlungsdauer Proben von je 0.2 ml entnommen und die Produkte per HPLC analysiert. Die am HPLC ermittelten absoluten Ausbeuten sind in Prozent bezogen auf die unbestrahlte Startprobe angegeben. Um die pH-Abhängigkeit der Reaktion zu testen, wurden als Lösungsmittel neben Methylchlorid auch pH-Puffer mit pH 4 [Natrium-citratpuffer], pH 7 [Phosphorsäure/di-Natriumhydrogenphosphatpuffer], und pH 9 [Phosphorsäure/di-

Natriumhydrogenphosphatpuffer] verwendet. Die Ergebnisse der Bestrahlungen sind in Tab. 6.1 zusammengefaßt.

Lösungsmittel	Zusatz	Elektronentransfer / β -Eliminierung		Ausbeute	
		E / D		53 + 46	52 + 49
		Keton : Thymin 53 : 46	Keton : Adenin 52 : 49		
Puffer pH 4	kein Zusatz	4 : 1	1 : 2	71%	69%
Puffer pH 7	kein Zusatz	1 : 25	1 : 17	80%	79%
Puffer pH 7	O ₂ -gesättigt	100 : 0	-	82%	-
Puffer pH 9	kein Zusatz	1 : 22	1 : 18	67%	58%
CH ₂ Cl ₂	kein Zusatz	20 : 1	1 : 4	88%	73%

Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte per HPLC: T-Edukt **48**: 16.8, Thymin **46**: 3.0, T-Keton **53**: 4.2; A-Edukt **50**: 15.5, Adenin **49**: 2.9, A-Keton **52**: 3.7, Standard [1,3-Di-(propyl-2'-on)-thymin] (**54**): 9.2.

Tabelle 6.1: Ergebnisse der Bestrahlung der Thymin- bzw. Adeninderivate (**48** bzw. **50**) bei unterschiedlichen pH-Werten sowie in CH₂Cl₂.

Als Beispiel für die Analytik sind in Abb. 6.1 nachfolgend zwei HPLC-Diagramme aufgeführt: Bestrahlung von 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (**48**) in pH 4-Citratpuffer und in Methylenchlorid.

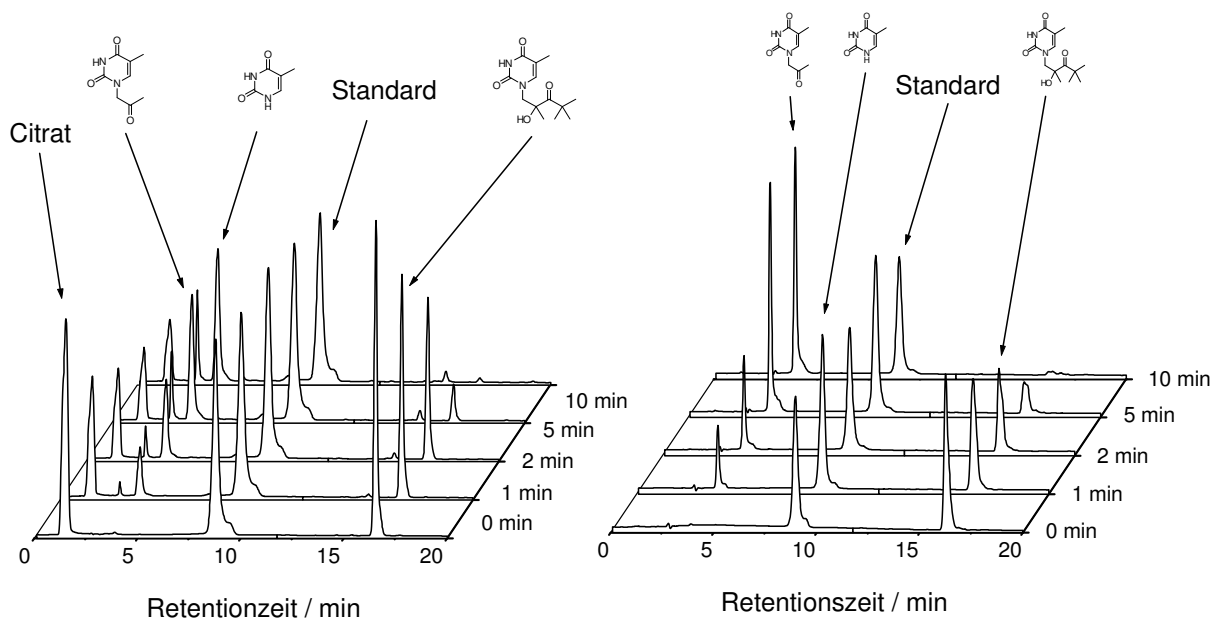


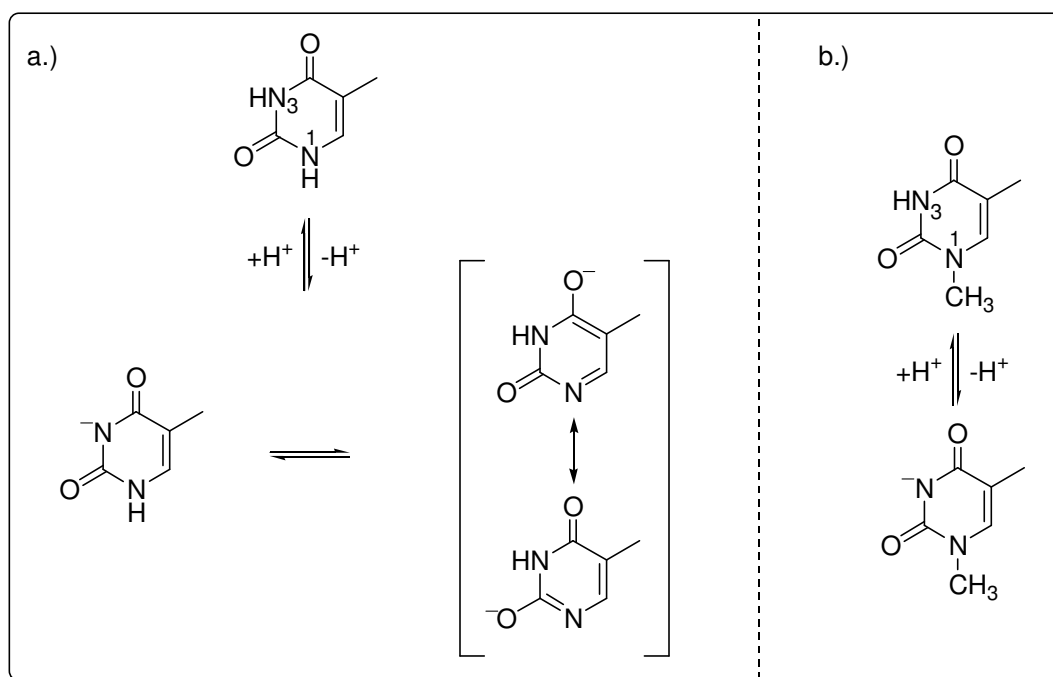
Abbildung 6.1: HPLC-Analytik des in pH-4 Puffer (links) und in CH₂Cl₂ bestrahlten Thyminderivates **48**.

Die Ergebnisse der bestrahlten Modellsysteme entsprechen für das Adeninderivat **50** den Erwartungen. Das Hauptprodukt ist hier immer das Spaltprodukt, also die durch β -Bindungsbruch entstehende freie Base Adenin (**49**).

Beim Thyminderivat **48** erhält man in leicht saurem Milieu (pH 4) und in Methylenchlorid (bei Bestrahlung von CH_2Cl_2 entstehen Spuren an HCl, so daß auch hier das Experiment im sauren Milieu durchgeführt wird) als Hauptprodukt das Elektronentransferprodukt **53**. Für die Bestrahlung in pH 4-Pufferlösung liegt das Verhältnis bei 4 : 1, im Falle von Methylenchlorid sogar bei 20 : 1. Bei neutralem und alkalischen pH (pH 9) erhält man jedoch, ebenso wie beim Adeninderivat **50**, das β -Eliminierungsprodukt **46** als Hauptprodukt.

Dieses Ergebnis wurde so nicht erwartet, da der Elektronentransfer aufgrund der Reduktionspotentiale vom Radikalanion **C** ($E^0 = -2.5 \text{ V}$) ausgehen muß und dieses durch Deprotonierung des Primärradikals **B** ($E^0 = -1.4 \text{ V}$) gebildet wird. Bei höheren pH-Werten liegen größere Mengen des Radikalanions im Gleichgewicht vor und es werden deshalb auch höhere Ausbeuten an Elektronentransferprodukt erwartet. Für niedrige pH-Werte wie pH 4 erwartet man hingegen wenig Elektronentransferprodukt **53** (vgl. auch die Ergebnisse von R. Glatthar, Kap. 4.1). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch ein gegenteiliges Bild. Man muß aber beachten, daß sich das hier verwendete Modellsystem von dem von R. Glatthar verwendeten Benzyletherderivat [(*rac*)-1-Benzylloxy-2-hydroxy-2,4,4-trimethylpentan-3-on (**39**)] darin unterscheidet, daß Benzylether als Elektronenakzeptor nicht in Frage kommt. Bei seinen Experimenten muß die negative Ladung also an das Lösemittel abgegeben werden. Thymin hingegen kann als Elektronenakzeptor wirken, auch wenn im Gleichgewicht nur wenig Radikalanion vorhanden ist. So kann die Bildung des Elektronentransferproduktes bei niederem pH erklärt werden.

Warum bei höheren pH-Werten kaum Elektronentransferprodukt beobachtet werden kann, muß andere Gründe haben. Ein Grund dafür könnte die Deprotonierung der Thyminbase sein, was natürlich Einfluß auf die Akzeptoreigenschaften des Thymins hat. Thymin (pK_s von Thymin = 9.87) liegt im alkalischen Milieu als Monoanion, im stark alkalischen Milieu (pH > 13) auch als Dianion vor, wobei N-1 zuerst deprotoniert wird (vgl. Schema 6.4a).^[82] Die entstehenden Anionen sind resonanzstabilisiert.



Schema 6.4: a.) Struktur der Monoanionen von Thymin; b.) Struktur des Monoanions von 1-Methyl-thymin. ^[82]

Das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (**48**) ist am N-1 durch den *tert.*-Butylketyl linker substituiert. Für dieses System ist also nur eine Deprotonierung am N-3 möglich.

Von Wittenburg *et al.* wurde unter anderem das vergleichbare 1-Methyl-thymin untersucht (Schema 6.4b).^[82] Auch hier ist das Proton am N-1 substituiert - durch eine Methylgruppe. 1-Methylthymin hat einen pK_s -Wert von 10.09, was bedeutet, daß es am N-3 noch relativ leicht deprotoniert werden kann. Bei pH 5.9 liegt 1-Methylthymin in der neutralen Form vor, bei höheren pH-Werten als 1-Methyl-thymin-Anion (vgl. Schema 6.4b).^[82]

Bei den in pH 9 Pufferlösung durchgeführten Bestrahlungsversuchen sollte also auch 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (**48**) am N-3 deprotoniert vorliegen, teilweise liegt auch bei pH 7 schon das Anion vor. Die Elektronenakzeptoreigenschaften des Thymins werden durch die Tatsache, daß die Nucleobase deprotoniert vorliegt, verringert. Die Bedingungen für den Elektronentransfer werden schlechter, die Konkurrenzreaktion - der β -Bindungsbruch - wird zur dominierenden Reaktion. Dies ist eine mögliche Erklärung für die pH-Abhängigkeit der Bestrahlungsexperimente und die schlechten Ausbeuten an Elektronentransferprodukt bei niederem pH-Wert.

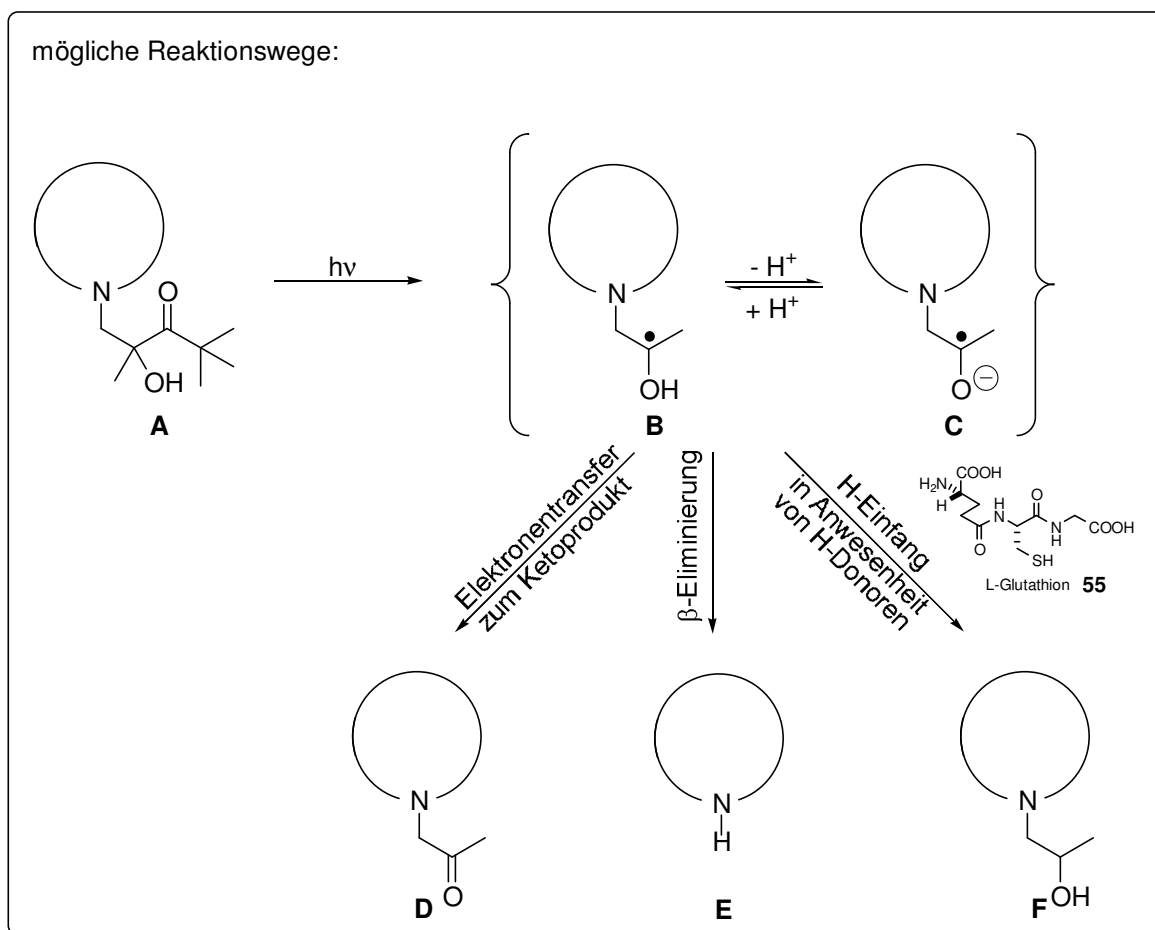
Da in Methylchlorid als organischem Lösungsmittel außerdem neben den durch Bestrahlung gebildeten Spuren an HCl eine Deprotonierung des 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymins (**48**) an N-3 unwahrscheinlich ist, erhält man einen großen Überschuß an Elektronentransferprodukt (Verhältnis 20 : 1). Der Elektronentransfer ist, wenn

Thymin nicht deprotoniert vorliegt, dominant, und läuft schneller ab als der β -Bindungsbruch. Die Menge des bei pH 4 und in Methylenchlorid vorhandenen Radikalanions im Gleichgewicht reicht für einen effizienten Elektronentransfer auf die neutrale Thyminbase aus. Man findet 80% Elektronentransferprodukt bei Bestrahlung in pH 4-Pufferlösung, in CH_2Cl_2 sogar 95%.

Es ist denkbar, daß nach dem Spülen der Lösung mit Argon noch Spuren an Sauerstoff in der Lösung vorhanden sind. Dies würde zur Bildung von Elektronentransferprodukt (Keton **53**) führen. Um zu überprüfen, daß die Proben sauerstofffrei waren und das Ketoprodukt tatsächlich durch Elektronentransfer gebildet wird, wurde das Thyminderivat **48** in pH 7 Pufferlösung in An- und Abwesenheit von Sauerstoff bestrahlt. Bei Bestrahlung in Abwesenheit von Sauerstoff wurde kaum Ketoprodukt **53** (< 4%) gebildet. Bei der sauerstoffgesättigten Probe (Tab. 6.1, Zeile 3) wurde nach Bestrahlung ausschließlich Ketoprodukt **53** gefunden. Damit konnte gezeigt werden, daß das bei pH 4 und in Methylenchlorid beobachtete Ketoprodukt durch Elektronentransfer gebildet wurde.

Daß auch für das Adeninderivat Ketoprodukt gefunden werden konnte, liegt daran, daß der Elektronentransfer zwar thermodynamisch ungünstiger als beim Thymin, die Differenz der Reduktionspotentiale aber nicht so groß ist, daß eine Reduktion des Adenins durch das Radikalanion unmöglich wäre. Das Reduktionspotential des Radikalanions ist mit $E^0 = -2.5 \text{ V}$ mit dem des Adenins $E_{\text{red}} = -2.52 \text{ V}$ vergleichbar. Der Reduktionsprozeß ist zwar schwach endotherm, aber möglich, weshalb Elektronentransferprodukt beim Adenin gefunden werden konnte. Auch eine Abgabe der negativen Ladung an das Lösungsmittel (wie bei den Experimenten von R. Glatthar, Kap. 4.1) wäre denkbar. Daß das Hauptprodukt immer das β -Bindungsbruch-Produkt - die freie Adeninbase (**49**) - war, zeigt jedoch deutlich die aufgrund der Reduktionspotentiale erwartete Tendenz.

Um Aussagen über die Geschwindigkeit des Elektronentransfers machen zu können und außerdem zu sehen, wie effizient der Elektronentransfer beim Adenin trotz der Tatsache, daß er endotherm ist, stattfindet, wurden die Experimente bei pH 4 auch in Anwesenheit eines H-Donors durchgeführt. Zusätzlich zur β -Eliminierung hat man so mit dem H-Einfang noch eine weitere Konkurrenzreaktion zum Elektronentransfer (vgl. Schema 6.5). Als Elektronendonator wurde L-Glutathion (**55**) verwendet ($k_{\text{H}} = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Die Bestrahlungsexperimente wurden mit 5, 10, 25 und 50 Äquivalenten H-Donor durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tab. 6.2 zusammengefaßt.



Schema 6.5: konkurrierende Reaktionswege nach Bestrahlung und Norrish I-Reaktion in Gegenwart von H-Donoren.

Lösungsmittel	Zusatz	ET / β -Eliminierung / H-Abstraktion		Ausbeute	
		D / E / F	Keton : Thymin : H-Abstraktion	Keton : Adenin : H-Abstraktion*	D + E + F
Puffer pH 4	kein Zusatz	4 : 1 : -	1 : 2 : -	71% 69%	
Puffer pH 4	5 eq. H-Donor	12 : 1 : -	- : 1 : 30	68% 65%	
Puffer pH 4	10 eq. H-Donor	12 : 1 : -	- : 1 : 24	72% 67%	
Puffer pH 4	25 eq. H-Donor	16 : 1 : -	- : 1 : 28	71% 70%	
Puffer pH 4	50 eq. H-Donor	18 : 1 : -	- : 1 : 36	69% 64%	

Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte per HPLC: T-Edukt **48**: 16.8, Thymin **46**: 3.0, T-Keton **53**: 4.2; A-Edukt **50**: 15.5, Adenin **49**: 2.9, A-Keton **52**: 3.7, A-H-Einfang: 4.3, Standard [1,3-Di-(propyl-2'-on)-thymin] (**54**): 9.2.

*Das H-Abstraktionsprodukt wurde durch ESI (sammeln des Peaks am HPLC und lyophilisieren des Produktes) charakterisiert [MS (ESI, m/z): 193 (M^+ , 82)].

Tabelle 6.2: Ergebnisse der Bestrahlung der Thymin- bzw. Adeninderivate (**48** bzw. **50**) in pH-4 Pufferlösung in Gegenwart von L-Glutathion als H-Donor.

Die Zugabe von L-Glutathion hat vor allem auf das Produktverhältnis des bestrahlten 9-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-adenins (**50**) einen starken Einfluß. Während ohne H-Donor noch 33% Elektronentransferprodukt **52** beobachtet werden konnten, wurde schon in Gegenwart von 5 Äquivalenten kein Elektronentransferprodukt mehr beobachtet. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß der Elektronentransfer auf Adenin energetisch ungünstig und daher vermutlich auch langsam ist. Auch die β -Eliminierung tritt in den Hintergrund, es wurde als Hauptprodukt (97% bei Zugabe von 5 eq. L-Glutathion) das H-Einfangprodukt **F** gefunden, was bedeutet, daß im Falle von Adenin β -Eliminierung und Elektronentransfer langsamer sind als der H-Einfang ($k_H = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Im Falle von 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (**48**) konnte kein H-Einfangprodukt beobachtet werden. Daß hier in Gegenwart von L-Glutathion (**55**) sogar mehr Elektronentransferprodukt **53** gefunden werden konnte, als ohne H-Donor, mag daran liegen, daß L-Glutathion eine Säure ist und damit zusätzlichen Einfluß auf das bereits erwähnte Deprotonierungsgleichgewicht der Nucleobase ausüben kann. Der Elektronentransfer ist beim Thyminderivat **48** also deutlich schneller als der H-Einfang ($k_H = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

6.1 Zusammenfassung

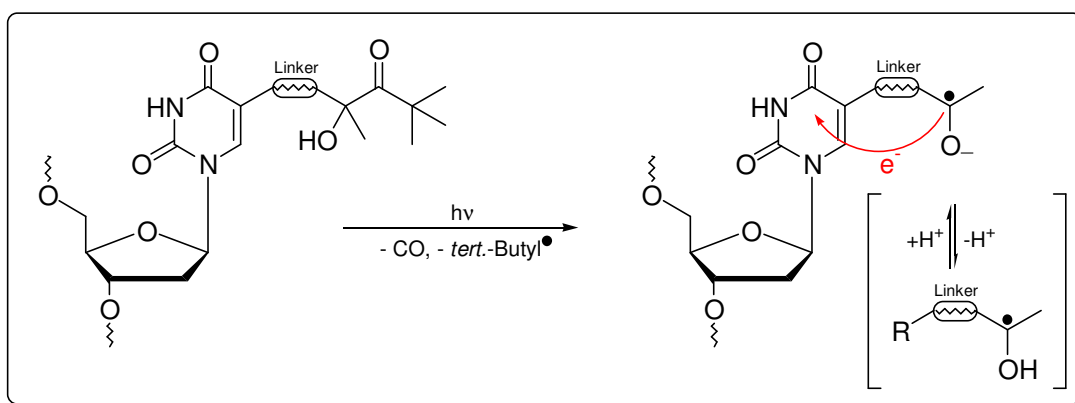
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das durch Bestrahlung und Norrish I-Spaltung aus einem *tert.*-Butyllinker entstehende Radikal(anion) in der Lage ist, unter sauren Bedingungen Thymin zu reduzieren. Der Elektronentransfer ist schneller als der β -Bindungsbruch, ein Abfangen des Primärradikals mit einem H-Donor (L-Glutathion) ist nicht möglich. Adenin kann ebenfalls reduziert werden, jedoch ist beim untersuchten Adeninderivat immer das β -Eliminierungsprodukt das Hauptprodukt und der Elektronentransfer ist hier langsam; bei Zugabe von H-Donoren wird das Primärradikal nahezu vollständig abgefangen und kein Elektronentransfer mehr beobachtet. Adenin ist also, wie anhand der Reduktionspotentiale vorausgesagt, im Gegensatz zum Thymin kein geeigneter Elektronenakzeptor. Die Experimente am Modellsystem zeigen, daß das Thymin/*tert.*-Butyllinker-System geeignet ist, ein Elektron in einen DNA-Strang zu injizieren, indem zunächst das mit dem *tert.*-Butyllinker verknüpfte Thymin reduziert wird, von welchem dann die Ladung in den Doppelstrang transportiert werden kann. Basierend auf den positiven Ergebnissen aus den Modellexperimenten soll demnach ein vergleichbares System für den Einbau in DNA entwickelt werden.

Das für die Modelluntersuchungen verwendete System hat zwei entscheidende Nachteile:

1. Während die β -Eliminierung als Konkurrenzreaktion für die Untersuchungen des Modellsystems ein guter Parameter ist (pH-Abhängigkeit, Vergleich mit Adenin, Effizienz des Elektronentransfers), ist für das Zielsystem, das die Ladung in den DNA-Strang injizieren soll, eine Konkurrenzreaktion nicht erwünscht. In diesem System soll keine Ladung durch Konkurrenzreaktionen verloren gehen, sondern das Elektron möglichst effizient auf die Thyminbase aufgebracht werden. Die Verknüpfung der Thyminbase mit dem *tert.*-Butyllinker muß im Zielsystem also so gewählt werden, daß kein β -Bindungsbruch möglich ist.
2. Für die Modelluntersuchungen wurde der *tert.*-Butyllinker aufgrund der leichten Zugänglichkeit an der N-1-Position (bzw. am N-9 im Falle von Adenin) angebracht. Die Modifikation am N-1 ist zwar chemisch am einfachsten durchzuführen und die resultierenden Modellsysteme waren für die mechanistischen Untersuchungen geeignet und schnell zugänglich, für das Zielsystem jedoch kommt die Verknüpfung über die N-1-Position nicht in Frage, da an dieser Stelle die Nucleobase mit der Desoxyribose zum Nucleosid verknüpft ist. Um also modifizierte Nucleoside in DNA einbauen zu können, muß Thymin im Zielsystem über eine andere Position mit dem *tert.*-Butyllinker verknüpft werden.

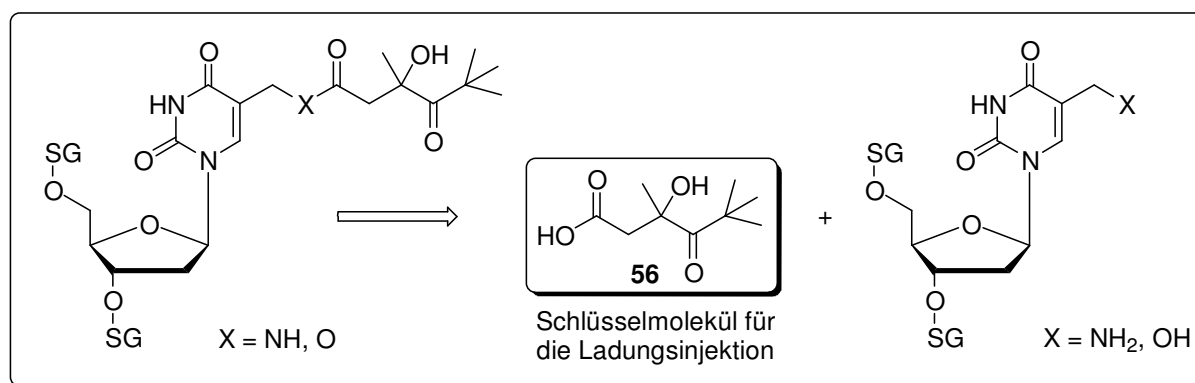
7 Das Zielsystem für die Injektion eines Überschusselektrons in DNA

Wie bereits in Kapitel 6 beschrieben ist das für die Modelluntersuchungen zum Elektronentransfer *N*-verknüpfte 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymidin (**48**) aus zwei Gründen nicht für die Elektroneninjektion in DNA geeignet. Das N-1 ist hier anstatt für die Desoxyribose für die Verknüpfung mit dem *tert.*-Butyllinker verwendet worden und es kann β -Eliminierung als Konkurrenzreaktion zum Elektronentransfer stattfinden. Da das Zielinjektorsystem direkt in die DNA eingebaut werden soll, ist die Verknüpfung über die 5-CH₃-Gruppe des Thymidins am einfachsten (Schema 7.1). Der Linker sollte so gewählt werden, daß keine β -Eliminierung möglich ist.



Schema 7.1: Zielsystem für die Elektroneninjektion in DNA.

Eine günstige Möglichkeit, die *tert.*-Butylfunktionalität mit dem Nucleosid zu verknüpfen ist über eine Amid- oder Esterbindung (Schema 7.2).

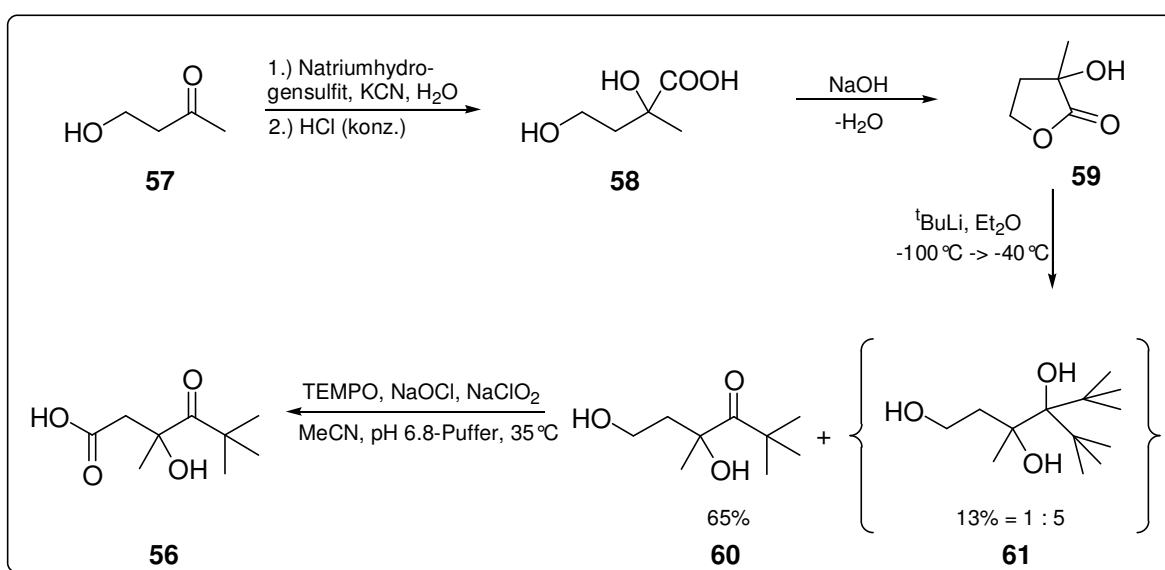


Schema 7.2: Kupplung von *tert.*-Butylfunktionalität und Nucleosid zum Zielsystem.

Ein Vorteil hierbei ist, daß der photolabile Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) unabhängig von der Nucleobase 3',5'-Di-*O*-**SG**- α -aminothymidin bzw. 3',5'-Di-*O*-**SG**- α -hydroxythymidin synthetisiert werden kann und die beiden Bausteine erst spät in der Synthese miteinander gekuppelt werden können. Dadurch sind größere Mengen des Injektorsystems zugänglich, als es bei einer linearen Synthese der Fall wäre. Durch die Methyleninheit zwischen Radikalzentrum und Amid bzw. Esterfunktionalität kann eine β -Eliminierung ausgeschlossen werden. Außerdem ist von Vorteil, daß das für die Elektroneninjektion auf das erste Thymin zuständige, photolabile Schlüsselsystem, die 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**), so auch einfach an andere Systeme wie z. B. andere Nucleobasen, Benzylamin, etc. gekuppelt werden kann. So können den Modelluntersuchungen vergleichbare Versuche zur Effizienz des Elektronentransfers auf die Base (Thymin) durchgeführt werden.

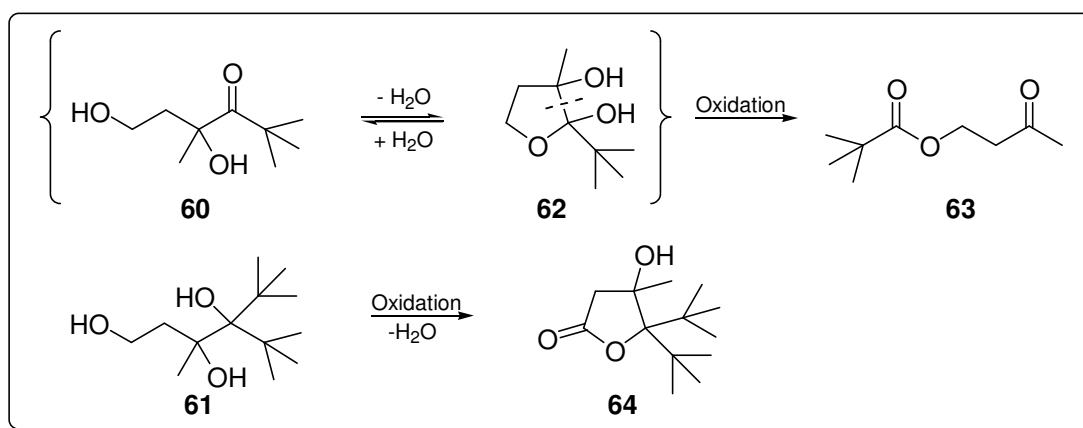
7.1 (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) - Injektorbaustein und Schlüssel-molekül für die Ladungsinjektion

Zunächst sollte im Rahmen dieser Arbeit (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) - das Schlüssel-molekül für die Injektion eines Elektrons auf DNA synthetisiert werden (vgl. Schema 7.3). Ausgehend von kommerziell erhältlichem 4-Hydroxy-2-butanon (**57**) konnte der Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure in vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 39% synthetisiert werden (Schema 7.3).



Schema 7.3: Synthese der (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**).

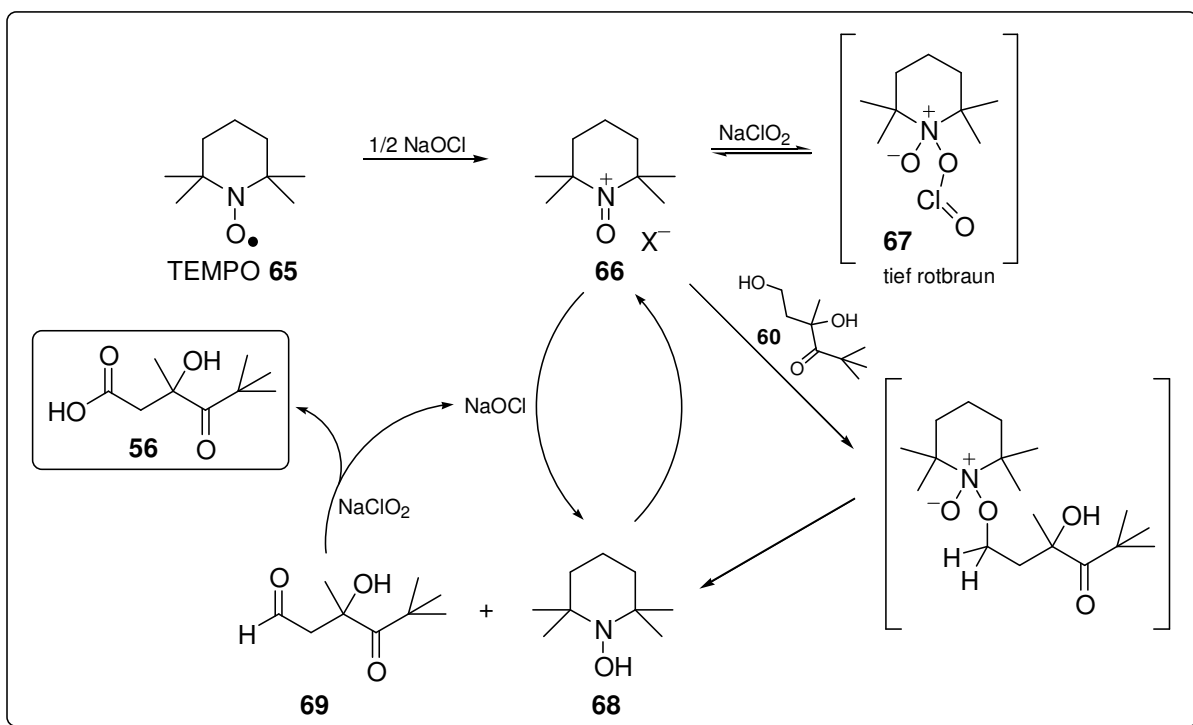
Hierfür wurde zunächst Cyanid an 4-Hydroxy-2-butanon (**57**) addiert und das entstehende Cyanhydrin anschließend hydrolysiert. Durch Trocknen im Exsikkator (über NaOH-Plätzchen) konnte das Lacton 3-Hydroxy-3-methyl-dihydro-furan-2-on (**59**) in 60% Ausbeute über beide Stufen erhalten werden. Durch Umsetzung von **59** mit *tert.*-Butyllithium konnte die *tert.*-Butylgruppe eingeführt werden. Hierbei entstanden in einem Verhältnis von 5 : 1 das gewünschte Monoaddukt 4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (**60**) (65%) und das Bisaddukt 4-*tert.*-Butyl-3,5,5-trimethyl-hexan-1,3,4-triol (**61**). Die beiden Produkte können durch Kugelrohrdestillation voneinander getrennt werden. Diese Trennung war jedoch nicht nötig, da das Bisaddukt bzw. sein Oxidationsprodukt bei der Aufarbeitung der folgenden Oxidationsreaktion in der wässrigen Phase verbleibt und so einfacher abgetrennt werden kann. Die Oxidationsreaktion erwies sich als schwierig, da das 4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (**60**) im Gleichgewicht mit dem entsprechenden Lacton **62** vorliegt und die gängigen Oxidationsmittel zu einer C-C-Bindungsspaltung am Lacton **62** führen (Schema 7.4). So wird mit Cr(VI)-Reagenzien (z. B. Jones-Oxidation) oder mit Permanganat die C-C-Bindung gespalten. Man erhält anstelle der gewünschten (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) den 2,2-Dimethylpropionsäure-3-oxo-butylester (**63**), sowie das vom Bisaddukt **61** ausgehende Oxidationsprodukt als Lacton **64**. Die gewünschte Säure **56** konnte so nie isoliert werden, obwohl das Gleichgewicht deutlich auf der Seite des 4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-ons (**60**) liegt (Ergebnis der NMR-Messungen), was bedeutet, daß das Lacton **62** schneller oxidiert und so dem Gleichgewicht entzogen und dann nachgebildet wird.



Schema 7.4: Problematik der Oxidationsreaktion.

Auch Oxidationsversuche mit $Ca(OCl)_2$, H_5IO_6 oder eine zweistufige Oxidation über Swern-Oxidation oder Pfitzner-Moffat-Oxidation zum Aldehyd und dann via Kraus-Oxidation zur Carbonsäure schlugen fehl. Erstere führten ebenso wie die Reaktionen mit Cr(VI)-Reagenzien

oder Permanganat zum 2,2-Dimethylpropionsäure-3-oxo-butylester (**63**), weitere scheiterten bereits in der ersten Stufe. Schließlich gelang die Oxidation in einer von Zhao *et al.* publizierten, TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidiny-1-oxo)-katalysierten Oxidation mit Natriumhypochlorit.^[85] Im in Schema 7.5 gezeigten Katalysezyklus wird zunächst von einer katalytischen Menge Natriumhypochlorit das TEMPO-Radikal **65** zum *N*-Oxoammoniumion **66** oxidiert, welches den primären Alkohol **60** schnell zum Aldehyd **69** oxidiert. Dabei wird außerdem das Hydroxylamin **68** gebildet. Der Aldehyd **69** wird dann durch NaClO₂ zur Carbonsäure [(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**)] oxidiert, wodurch ein Natriumhypochlorit-Molekül regeneriert wird. Dieses kann das Hydroxylamin **68** entweder direkt zum *N*-Oxoammoniumion **66** oxidieren, oder es können Hydroxylamin und *N*-Oxoammoniumion in einer syn-Proportionierung zu zwei TEMPO-Radikalen **65** reagieren, welche dann durch NaOCl zu zwei *N*-Oxoammoniumionen oxidiert werden. Die tiefbraune Farbe der Reaktionslösung kann durch Bildung von Komplexen (**67**) erklärt werden.



Schema 7.5: Katalytischer Zyklus der Oxidation von 4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (**60**) zur (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**).

Die Reaktion wurde bei 35°C in Acetonitril und pH 6.8-Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0.67 M) durchgeführt. Mit dieser Oxidationsmethode konnte der gewünschte Injektorbaustein quantitativ [bezogen auf 4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (**60**)] erhalten werden.

Die so erhaltene (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) kann über eine Ester- oder Amidbindung an Nucleobasen oder andere mögliche Elektronenakzeptoren

gekuppelt werden. Synthesen und Bestrahlungsexperimente einiger so dargestellter Moleküle werden ebenso wie die Synthese des für die Elektroneninjektion in DNA verwendeten Injektorsystems nachfolgend aufgeführt, weitere Modellversuche wurden von Thomas Carl im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt.^[86]

7.2 Synthese des Zielsystems für die Injektion von Überschusselektronen in DNA sowie weiterer Modellsysteme

Zunächst stellt sich die Frage, ob für die Kupplung des Injektorbausteins an das Nucleotid eine Ester- oder eine Amidbindung geeigneter ist. Da das modifizierte Nucleotid über die automatisierte DNA-Festphasensynthese in den DNA-Doppelstrang eingebaut werden können soll, muß die Modifikation unter den Einbau- und Spaltbedingungen (Abspaltung von der festen Phase) stabil sein. DNA-Stränge werden üblicherweise von 3' nach 5' aufgebaut, wobei der erste Baustein über einen Succinyllinker kovalent über eine Amidgruppe an die feste Phase (CPG, Controlled Pure Glass, aminoderivatisierte Borsilikate) gebunden ist (Schema 7.6). Die 5'-Hydroxylfunktion ist als Dimethoxytritylether geschützt. Für den Einbau sind die Nucleotidbausteine mit einer Schutzgruppe an 5' (Dimethoxytritylschutzgruppe), die vor der Kupplung abgespalten wird und im Falle von A, C und G mit Schutzgruppen für die Aminofunktionen ausgestattet, die am Ende der Oligonucleotidsynthese abgespalten werden. Die 3'-Position liegt für den Einbau als 3'-O-[(2-Cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-(*R,S*)-phosphoramidit] vor. Zur Abspaltung von der festen Phase und zur Abspaltung der Schutzgruppen von A, C und G wird das Oligonucleotid am Ende der Synthese bei 55°C mit 30%iger wässriger Ammoniaklösung behandelt.

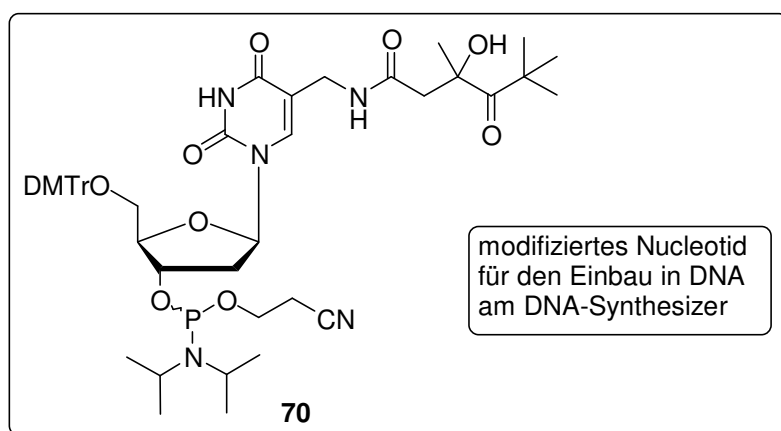
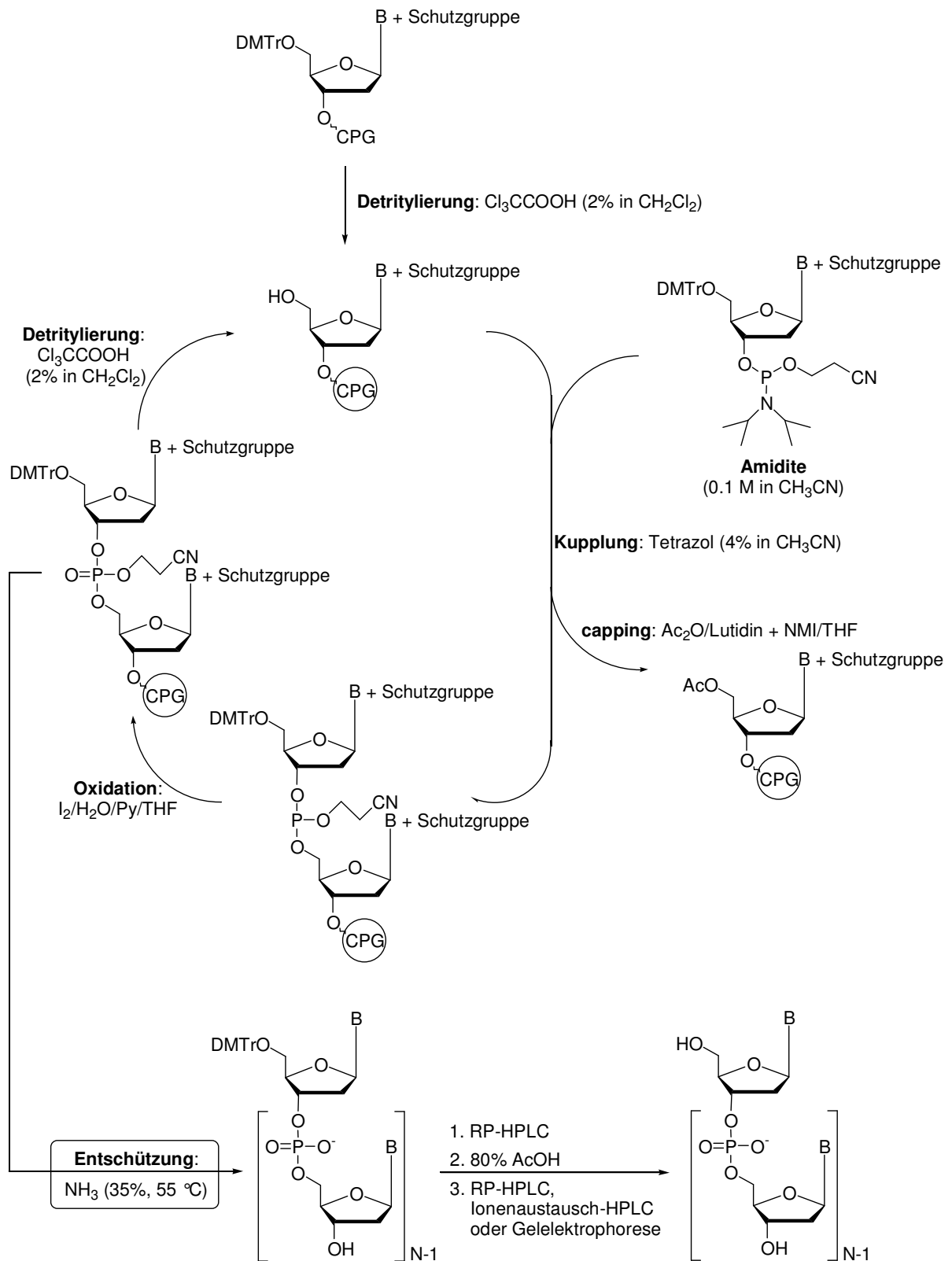


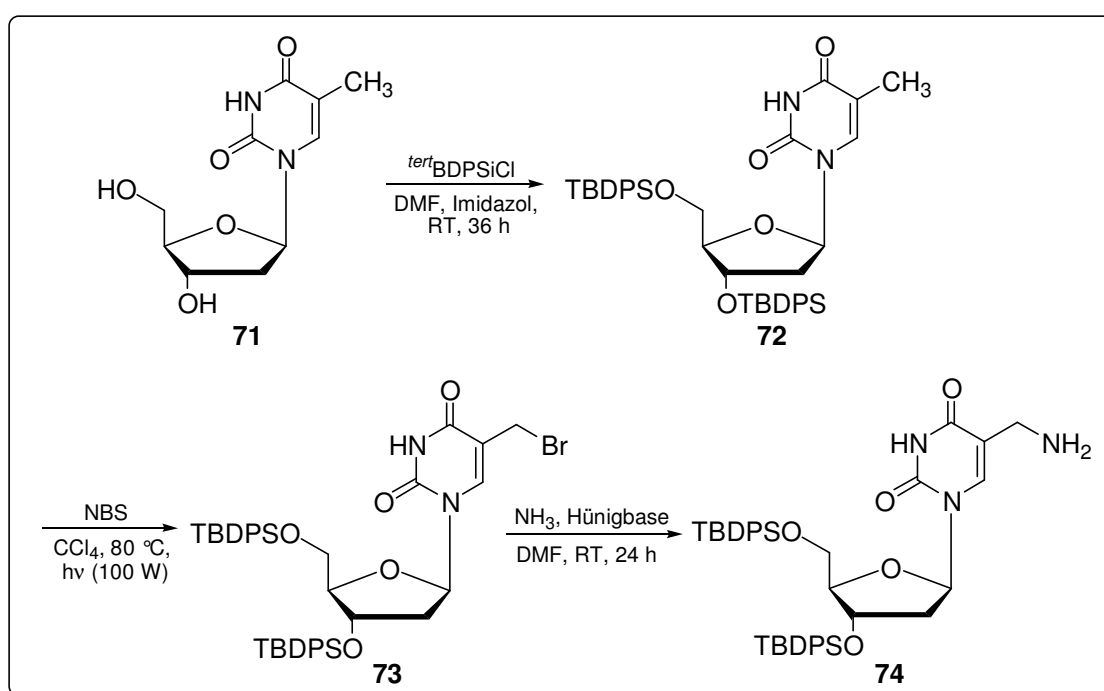
Abbildung 7.1: modifiziertes Nucleotid für die automatische Festphasensynthese.

Unter diesen Bedingungen wäre eine Esterbindung nicht stabil. Daher sollte bei dem für die Elektroneninjektion zuständige Zielsystem der Injektorbaustein über eine Amidbindung an das Thymidin gekuppelt werden (Abb. 7.1).



Schema 7.6: Synthesesyklus des DNA-Synthesizers, Abspaltung des Oligonucleotids von der festen Phase und Reinigung.

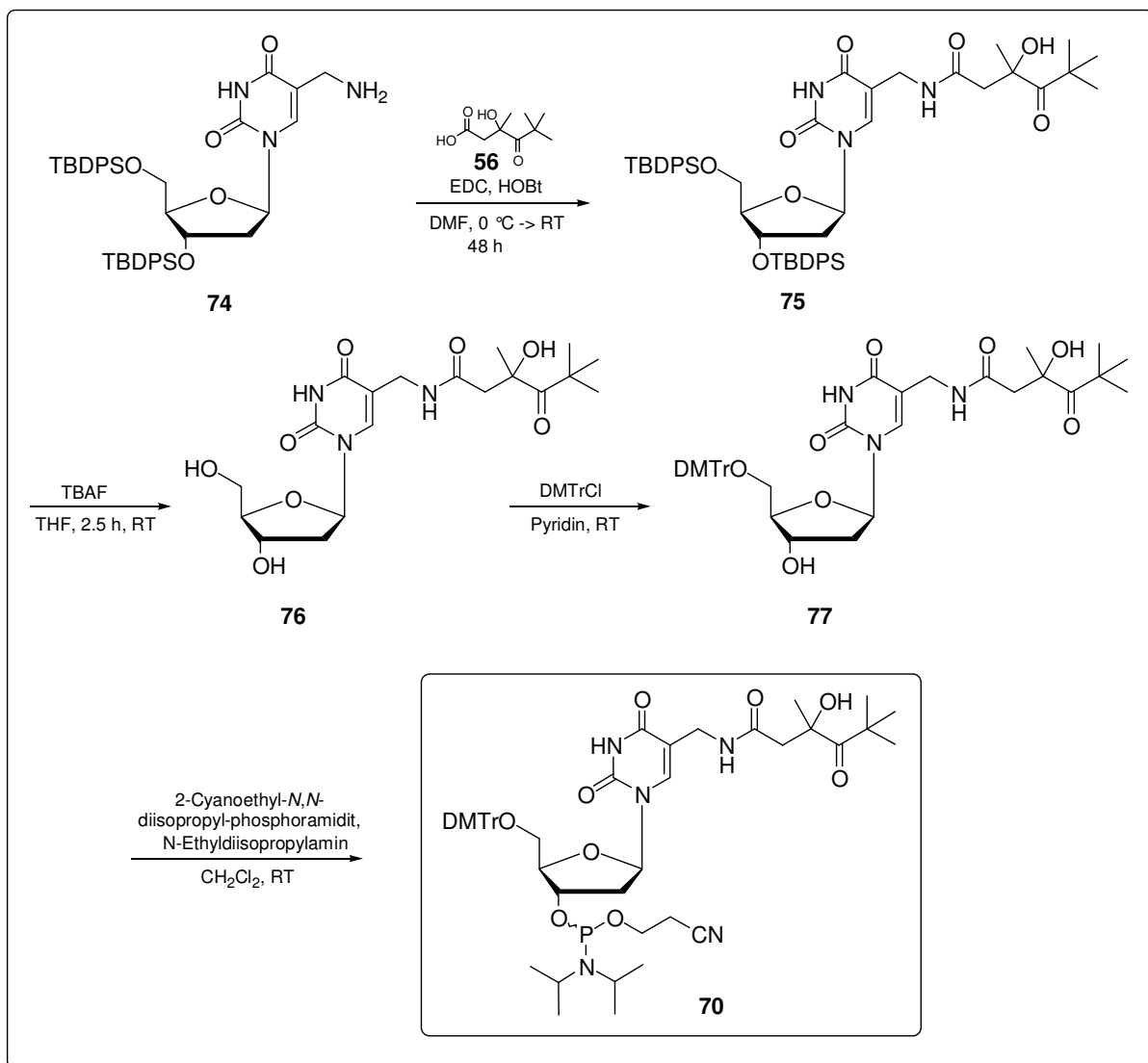
Für die Synthese des modifizierten Nucleotidbausteines mußte zunächst 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin (**74**) hergestellt werden, ein Thymidin-Amin-Derivat, das am 5-CH₃ anstelle eines Protons die -NH₂-Gruppe enthält. Es konnte ausgehend von Thymidin (**71**) in drei Stufen in einer Gesamtausbeute von 52% erhalten werden (Schema 7.7). Hierfür wurden zunächst die freien Hydroxylgruppen des Thymidins mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid geschützt (96% Ausbeute). Anschließend wurde mit *N*-Bromsuccinimid in CCl₄ unter Photolyse mit einer 100 W-Lampe (bei 80°C) an 5-CH₃ zum 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -bromothymidin (**73**) bromiert (90% Ausbeute). Dieses wurde in DMF gelöst und mit Ammoniak und Hünigbase unter Druck (Yang-Gefäß) zum Amin **74** umgesetzt (60% Ausbeute).



Schema 7.7: Synthese von 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin **74**.

3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin (**74**) konnte nun mit dem Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) gekuppelt werden (Schema 7.8). Für die Kupplung wurden die beiden Edukte mit HOBT, EDC und NEt₃ bei 0°C in abs. DMF gelöst und anschließend zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Kupplungsprodukt 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin **75** wurde als Diastereomerenmisch in 70% Ausbeute erhalten. Mit TBAF konnte dann die *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe abgespalten werden (78% Ausbeute). Durch Umsetzung mit 2 eq. Dimethoxytritylchlorid (50% Ausbeute) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit (55% Ausbeute) erhielt man das für die

automatisierte DNA-Festphasensynthese geeignete modifizierte Nucleotid **70** in einer Gesamtausbeute von 13% bezogen auf Amin bzw. Säure, das für die Injektion eines Elektrons in einen DNA-Strang verwendet werden kann.

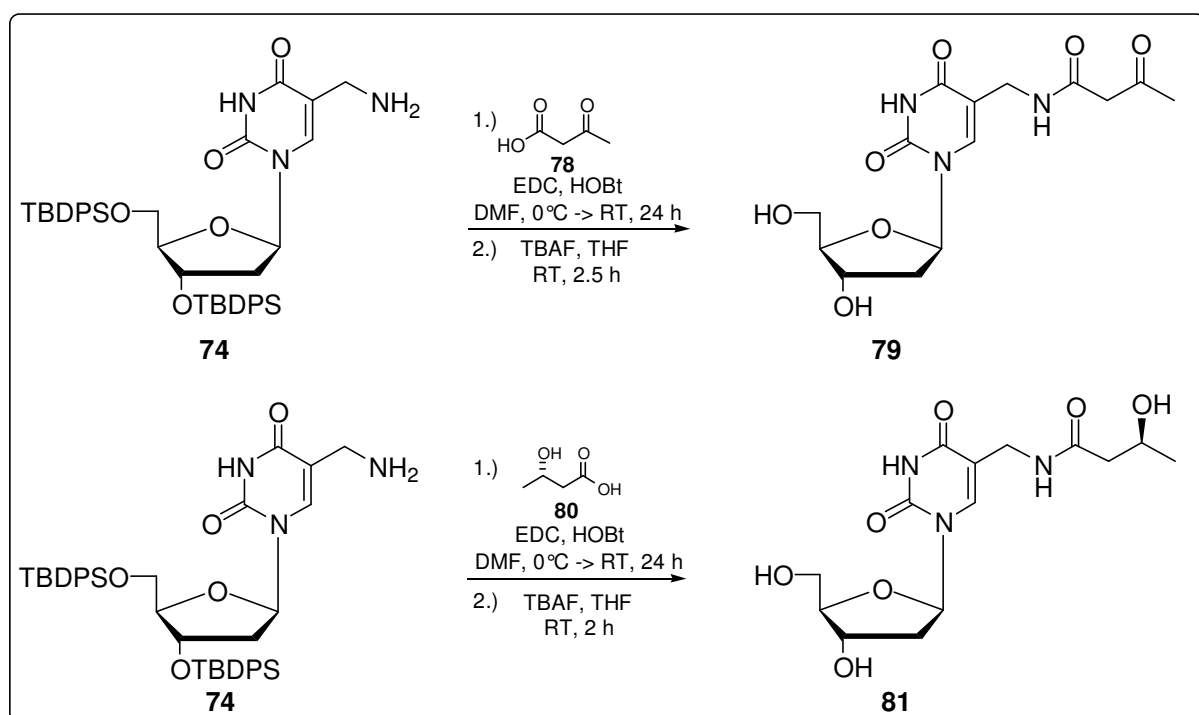


Schema 7.8: Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-(*R,S*)-phosphoramidit] **70** - Injektorsystem für den photoinduzierten Überschußelektronentransfer in DNA.

Die tertiäre Hydroxylfunktion des Injektorbausteins **56** ist sterisch stark abgeschirmt und mußte daher für die Synthese (Kupplung, Umsetzung mit DMTrCl bzw. Phosphoramidit) und für den Einbau des Nucleotids am DNA-Synthesizer nicht geschützt werden.

Für die nachfolgend beschriebenen Monomer-Bestrahlungsexperimente wurde nicht **70**, sondern das entschützte α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) verwendet. Die für die Charakterisierung benötigten Bestrahlungsreferenzen wurden ebenfalls synthetisiert.

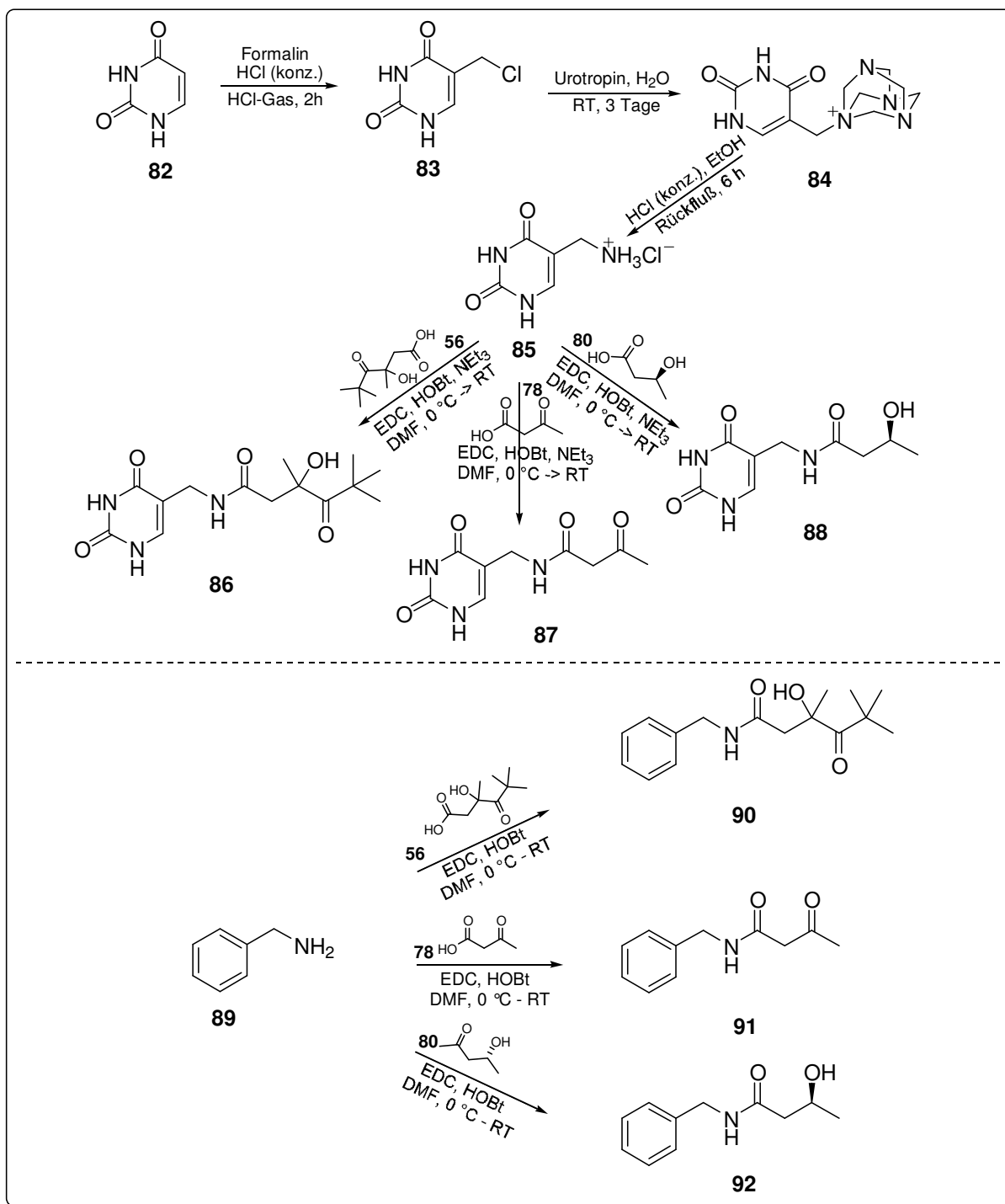
Durch Kupplung des 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidins (**74**) mit (*S*)-3-Hydroxy-buttersäure (**80**) bzw. Acetessigsäure (**78**), die für die Reaktion durch Spaltung von *tert*-Butylacetoacetat mit Trifluoressigsäure frisch hergestellt wurde, und anschließende Entschützung der Kupplungsprodukte mit TBAF, konnten die Referenzverbindungen für die Bestrahlungsexperimente hergestellt werden (Schema 7.9). α -[(*S*)-3-Hydroxy-butanoyl-amino]-thymidin (**81**) wurde in einer Ausbeute von 18%, α -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymidin (**79**) in einer Ausbeute von 13% (jeweils bezogen auf 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin, **74**) erhalten.



Schema 7.9: Referenzverbindungen für die Bestrahlungsexperimente von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**).

Analog zur oben beschriebenen Kupplung wurden zwei Modellsysteme dargestellt: α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**86**) und (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**). Für ersteres wurde der Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) mit 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) gekuppelt, für zweiteres mit Benzylamin (**89**). 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) konnte ausgehend von Uracil (**82**) in einer Gesamtausbeute von 23% erhalten werden (Schema 7.10). Hierfür wurde Uracil (**82**) zunächst mit Formalin und HCl (lösen in konz. HCl und durchleiten von mit HCl-Gas durch die Lösung) umgesetzt und man erhielt 5-Chloromethyluracil (**83**) in 30%iger Ausbeute. Dieses ließ man in Wasser mit Urotropin reagieren und setzte das dabei entstandene 5-Urotropino-uracil-chlorid (**84**) ohne Reinigung

in Ethanol mit HCl um. Dabei erhielt man 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid in 78%iger Ausbeute über beide Stufen. Da 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) als Hydrochlorid vorliegt, wurde für die Kupplungsreaktion mit dem Injektorbaustein zusätzlich zu EDC und HOBt Triethylamin zugegeben. Kupplung mit (*S*)-3-Hydroxy-buttersäure (**80**) bzw. Acetessigsäure (**78**) lieferte die für die Bestrahlungsexperimente benötigten Referenzverbindungen (Schema 7.10).



Schema 7.10: Synthese von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymin **86** und (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid **90** und deren Referenzverbindungen.

Benzylamin (**89**) wurde ebenfalls mit dem Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**), sowie (*S*)-3-Hydroxy-buttersäure (**80**) und Acetessigsäure (**78**) gekuppelt und man erhielt das Modellsystem (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**) in 61% Ausbeute, die Referenz für den H-Einfang (*S*)-3-Hydroxy-buttersäure-benzylamid (**91**) in 69% Ausbeute und das Ketoprodukt Acetessigsäure-benzylamid (**92**), die Referenz für den Elektronentransfer in 64% Ausbeute.

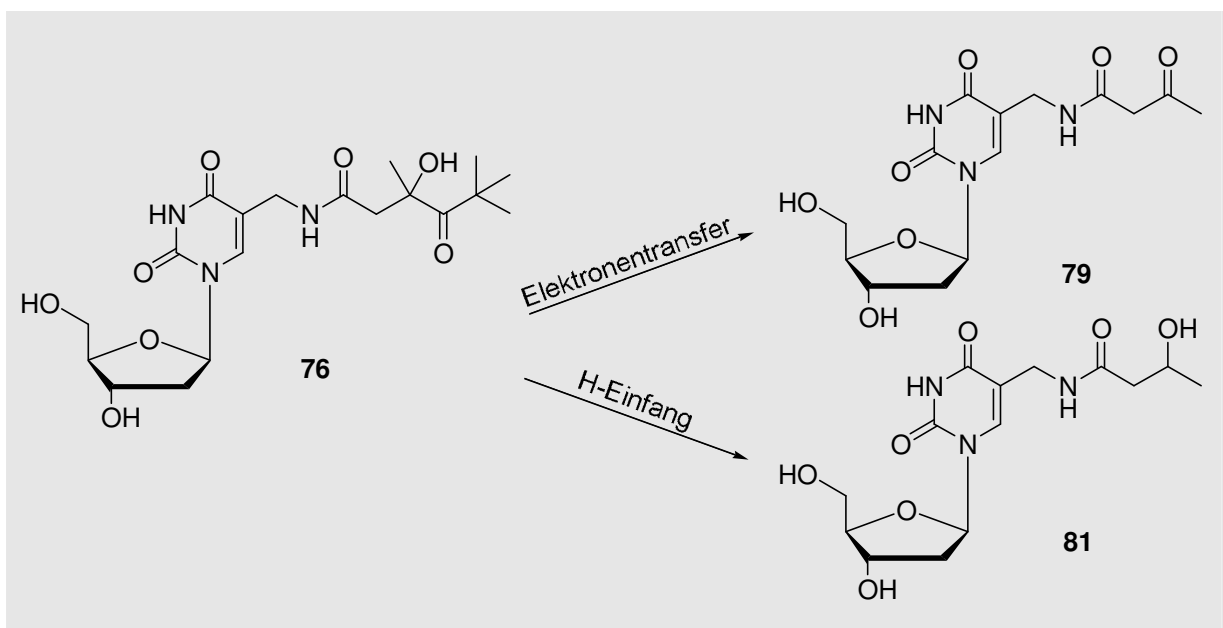
Die so erhaltenen Photoedukte α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**), α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymin (**86**) und (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**) wurden zur Untersuchung des Elektronentransfers des Injektorbausteins auf den gekuppelten Akzeptor bestrahlt. Bei der Bestrahlung von **76** und **86** sollten hauptsächlich Elektronentransferprodukte, die durch Norrish I-Spaltung und Elektronentransfer des Primärradikals bzw. Radikalanions auf Thymidin bzw. Thymin gebildet werden, zu beobachten sein, da das Radikalanion ($E^0 = -2.5$ V) die Thyminbase ($E_{\text{red}} = -2.18$ V) aufgrund des negativeren Reduktionspotentials reduzieren kann (vgl. Kap. 4.1). Der Benzylring hingegen kann durch das Radikalanion nicht reduziert werden, so daß man für das (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**) kein Elektronentransferprodukt erwartet (vgl. Kap. 4.1, Experimente von R. Glatthar^[78a]). Die Akzeptoreigenschaften sind hier noch schlechter als in den in Kapitel 5 vorgestellten Experimenten, bei denen als Vergleichssystem zum 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (**48**) das 9-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-adenin (**50**) als schlechter Elektronenakzeptor (E_{red} von Adenin: -2.52 V) verwendet wurde. Im Unterschied zu den Modelexperimenten und auch zu den Untersuchungen von R. Glatthar ist bei diesen Systemen wegen der zusätzlichen Methyleneinheit kein β -Bindungsbruch mehr möglich.

7.3 Photolyseexperimente

Für die Bestrahlung wurden die Photoedukte in verschiedenen Lösungsmitteln in einer 3 ml UV-Quarzglas-Küvette gelöst, die Proben während 20 min mit Argon entgast und anschließend mit einer Quecksilberkurzbogenlampe und einem 320 nm Cut-Off Filter bestrahlt. Zur Analyse wurden in Zeitabständen von 1, 2, 5 und 10 Minuten Bestrahlungsdauer Proben von je 0.2 ml entnommen und die Produkte am HPLC analysiert. Die per HPLC ermittelten absoluten Ausbeuten sind in Prozent bezogen auf die unbestrahlte Startprobe angegeben. Zur Untersuchung der Effizienz des Elektronentransfers wurden

außerdem Bestrahlungen in Gegenwart von H-Donoren durchgeführt. Für die Bestrahlung von **76** und **86** wurde L-Glutathion als H-Donor eingesetzt, für **90** Decanthiol.

Die Ergebnisse der Bestrahlung von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) - des Systems, das nach Einbau in ein Oligonucleotid das Elektron in den DNA-Strang injizieren soll - sind in Tab. 7.1 zusammengefaßt.



Lösungsmittel	Zusatz	ET / H-Abstraktion		Ausbeute
		Ketoprodukt : Hydroxyprodukt 79 : 81		
MeOH/H ₂ O (1 : 4)	kein Zusatz	9 : 1		83%
MeOH/H ₂ O (1 : 4)	5 eq. H-Donor	3 : 1		73%
MeOH/H ₂ O (1 : 4)	50 eq. H-Donor	2 : 1		82%

Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte per HPLC: Photoedukt **76**: 12.8, Keton **79**: 2.3, H-Einfang **81**: 2.8.

Tabelle 7.1: Bestrahlungsergebnisse von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**).

Die Photolysen wurden in Wasser durchgeführt, dem zur besseren Löslichkeit des Photoeduktes und der entstehenden Produkte 20% Methanol zugefügt wurden. Wie anhand der Reduktionspotentiale des Radikalanions ($E^0 = -2.5$ V) und der Thyminbase ($E_{\text{red}} = -2.18$ V) erwartet, wird als Hauptprodukt das Elektronentransferprodukt gefunden. Ohne Zugabe von L-Glutathion, das als wasserlöslicher H-Donor für diese Experimente verwendet wurde, wurden 90% Ketoprodukt (Elektronentransferprodukt, **79**) bei einer Gesamtausbeute von 83%

gefunden. Bei Zugabe von 5 Äquivalenten L-Glutathion verringerte sich der Anteil an Elektronentransferprodukt auf 75%, in Gegenwart von 50 Äquivalenten H-Donor, wurden noch 66% Ketoprodukt gefunden. Als Nebenprodukt wurde in allen drei Bestrahlungsexperimenten das H-Einfangprodukt (**81**) gefunden. Daß im Gegensatz zu den Experimenten am Modellsystem in Kap. 5 (das *N*-verknüpfte Photoedukt 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymidin **46**) der H-Donor das Primärradikal abfangen kann, liegt daran, daß die Distanz vom Radikalanion zum Elektronenakzeptor in diesem Falle größer ist. Für die Verknüpfung wurde zusätzlich eine Amidgruppe eingeführt und außerdem mußte der Injektorbaustein verlängert werden, um keine β -Eliminierung zu ermöglichen (Abb. 7.2). Ein Transfer über zwei Bindungen läuft sicher schneller ab, als ein Elektronentransfer über fünf Bindungen.

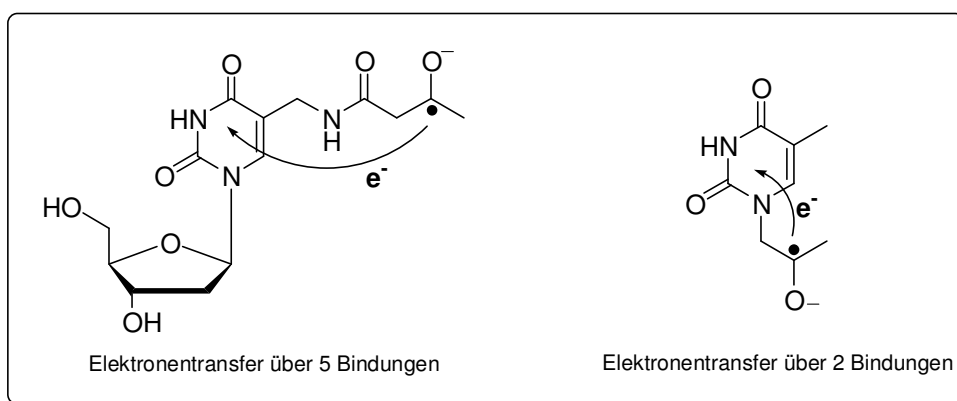
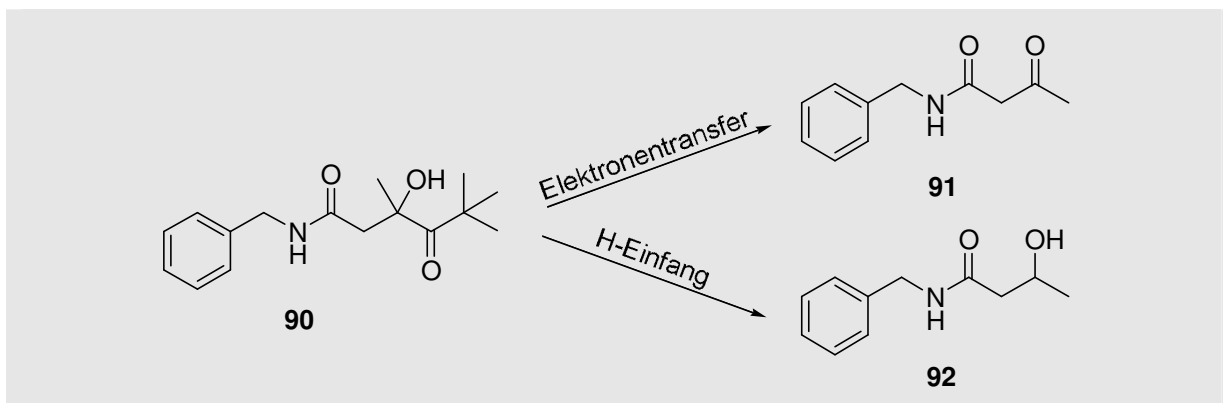


Abbildung 7.2: Elektronentransfer im Zielsystem und im Modellsystem (vgl. Kap. 5).

Daß jedoch in Abwesenheit von H-Donoren 90% Elektronentransferprodukt beobachtet wurden und selbst in Anwesenheit von 50 Äquivalenten L-Glutathion das Ketoprodukt (α -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymidin) als Hauptprodukt (66%) erhalten wurde, zeigt, daß der Elektronentransfer des Radikalanions auf Thymin auch über fünf Bindungen effizient verläuft. Thymin ist ein guter Elektronenakzeptor und α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) geeignet um ein Elektron regioselektiv auf einen DNA-Strang aufzubringen. Die Ladungsinjektion erfolgt hier sogar über eine kürzere Distanz auf die Nucleobase, als es bei den Lochtransferexperimenten der Fall war, bei denen die Pivaloyleinheit an die Desoxyribose und somit an das DNA-Rückgrat gekuppelt war (**7**). Ein Rückelektronentransfer ist bei diesem System durch die irreversible Oxidation des Radikalanions zum Keton nicht möglich, das Elektron wird demnach sehr effizient injiziert.

Um einen direkten Vergleich mit einem schlechten Elektronenakzeptor zu haben, wurde (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**) synthetisiert. Der

Phenylring kann durch das Radikalanion nicht reduziert werden. Die Ergebnisse der Bestrahlung (ebenfalls 10 min bei 15°C mit einem 320 nm cut-off-Filter) dieses Systems sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Als Lösungsmittel wurden Acetonitril und Methanol verwendet, als H-Donor wurde Decanthiol eingesetzt, da L-Glutathion in CH₃CN und MeOH nicht löslich ist. Decanthiol ($k_H \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ist von der H-Übertragungsgeschwindigkeit mit L-Glutathion ($k_H = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) vergleichbar.^[87, 88/Photolysen]



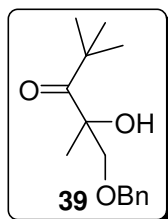
Lösungsmittel	Zusatz	ET / H-Abstraktion	Ausbeute
Acetessigsäure-benzylamid : (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-buttersäure- benzylamid 91 : 92			
CH ₃ CN	kein Zusatz	3 : 2	83%
CH ₃ CN	5.6 eq. H-Donor	1 : 22	87%
MeOH	kein Zusatz	9 : 5	85%
MeOH	5.6 eq. H-Donor	1 : 33	90%

Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte per HPLC: Photoedukt **90**: 23.4, Keton **91**: 14.3, H-Einfang **92**: 13.1.

Tabelle 7.2: Ergebnisse der Bestrahlung von (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**).

Wie in Tab. 7.2 zu sehen, wird auch bei Bestrahlung des Benzylaminderivates in Abwesenheit von H-Donoren das Ketoprodukt gebildet. Da eine Reduktion des Benzylringes jedoch nicht möglich ist, muß das Elektron an das Lösemittel, also an Acetonitril bzw. Methanol abgegeben worden sein.

Auch Ralf Glatthar konnte bei der Untersuchung des photoinduzierten β -Bindungsbruchs zur Abspaltung von Benzylether (**39**) (erwünschte Reaktion, vgl. Kapitel 4.1) bei zunehmendem

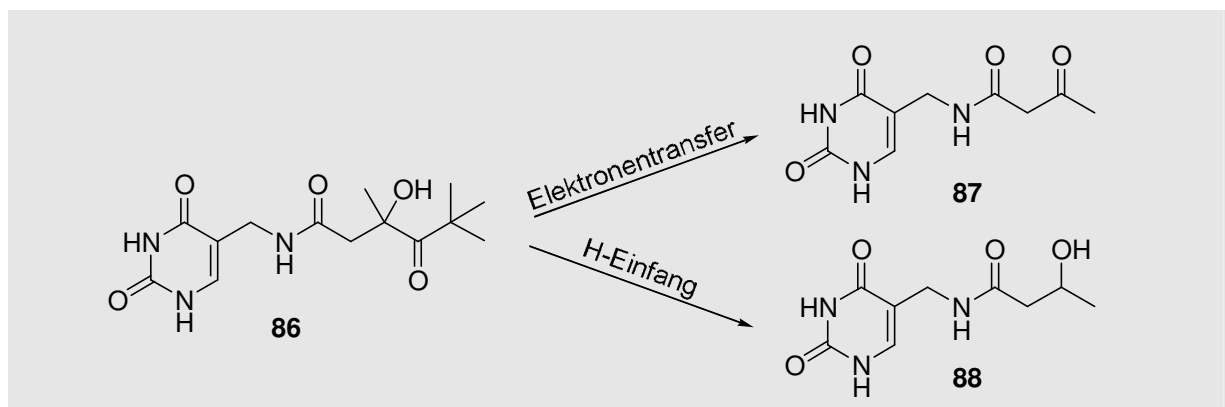


pH (pH > 6.0) die Bildung eines Ketoproduktes beobachten, das auf einen Elektronentransfer ausgehend vom Radikalanion schließen läßt. In Methanol, dem keine Säurespuren zugesetzt wurden, konnte von R. Glatthar 40% dieses Ketoproduktes isoliert werden.^[78a] Die Bildung dieses Produktes führte er auf Elektronentransfer vom gebildeten Radikalanion auf das Lösemittel zurück.

Daß das Elektron tatsächlich an das Lösemittel abgegeben worden sein muß und nicht auf den Phenylring übertragen worden ist, konnte durch Zugabe von Decanthiol (H-Donor) nachgewiesen werden. Während in Acetonitril das Verhältnis von H-Einfangprodukt **92** und Ketoprodukt **91** ohne Zugabe von H-Donor bei 2 : 3 lag, konnten in Anwesenheit von 5.6 Äquivalenten H-Donor nur noch 4% Ketoprodukt **91** gefunden werden. In Methanol änderte sich das Verhältnis H-Einfang- zu Ketoprodukt (**92** : **91**) von 5 : 9 auf 33 : 1 (97% H-Einfangprodukt). Während also in Abwesenheit von H-Donoren sowohl ein Elektron an das Lösemittel abgegeben werden kann, als auch das Primärradikal ein H vom Lösemittel einfangen kann, wird in Anwesenheit von H-Donoren nur noch der H-Einfang beobachtet.

Beim zuvor untersuchten α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin wurde auch in Anwesenheit von H-Donoren das Elektronentransferprodukt bevorzugt gebildet. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß Thymidin als guter Elektronenakzeptor fungiert, während das Benzyl kein Elektron aufnimmt.

Außerdem synthetisiert wurde das Thyminderivat α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**86**). Bestrahlt wurde in Methanol. Als H-Donor wurde Decanthiol verwendet. Da die sehr polaren Photolyseprodukte mittels HPLC nicht getrennt werden können, wurden zur Analyse die beiden Produkte als Gemisch per HPLC von Photoedukt und H-Donor abgetrennt und lyophilisiert. Das Produktgemisch wurde dann per NMR analysiert. Eine Bestrahlung wurde außerdem zur direkten Analyse der Bestrahlungslösung per NMR in DMSO durchgeführt, dem 5 eq. L-Glutathion und zum Lösen des H-Donors 4 Vol.-% D₂O zugegeben wurden. Die Bestrahlungsergebnisse sind in Tab. 7.3 zusammengefaßt.



Lösungsmittel	Zusatz	ET / H-Abstraktion	Ausbeute
		α -(3-Oxo-butanoyl-amino)- thymine : α -[(R,S)-3-Hydroxy- butanoyl-amino]-thymine 87 : 88	
MeOH	kein Zusatz	3 : 1	62%
MeOH	5 eq. Decanthiol	> 95 : 5	86%
DMSO (4 Vol.-% D ₂ O)	5 eq. L-Glutathion	> 95 : 5	91%

Eluierungszeiten [min] der Edukte und Produkte an der HPLC: Photoedukt **86**: 28.1, Keton **87**: 12.1, H-Einfang **88**: 12.3.*

* da Keto- und H-Einfangprodukt (**87** und **88**) nahezu gleich eluieren und kein Gradient gefunden werden konnte, bei dem eine Grundlinientrennung möglich ist, wurden beide Peaks zusammen gesammelt, lyophilisiert und am NMR (500 MHz, DMSO) analysiert, um das Produktverhältnis angeben zu können.

Tabelle 7.3: Ergebnisse der Bestrahlung von α -[(R,S)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymine **86**.

Bei der Bestrahlung in Methanol ohne Zusatz von H-Donor wurde als Hauptprodukt das Elektronentransferprodukt **87** im Verhältnis 3 : 1 zum H-Einfangprodukt **88** beobachtet. Vergleicht man dies mit dem modifizierten Nucleotid, bei dem das Verhältnis Elektronentransfer zu H-Einfang 9 : 1 war, wird klar, daß der Elektronentransfer auf die freie Base deutlich schlechter ist. Wurde nun außerdem H-Donor zugefügt, erhielt man weniger als 5% des Elektronentransferproduktes. Dies galt sowohl für Decanthiol bei der Bestrahlung in MeOH, als auch für L-Glutathion wenn in DMSO (+ 4 Vol.-% D₂O) bestrahlt wurde. Das bedeutet, das Thymine als freie Base von den Elektronenakzeptoreigenschaften mit Benzyl vergleichbar ist. Aufgrund der Reduktionspotentiale ist dieses Ergebnis ungewöhnlich. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist das bereits in Kapitel 5 angesprochene Deprotonierungsgleichgewicht der Thyminebase.^[82, Kap. 5] Bereits bei dem in diesem Kapitel untersuchten Modellsystem **48** konnte beobachtet werden, daß bei neutralen und basischen

pH-Werten bei Experimenten in wässrigen Lösungen der Anteil an Elektronentransferprodukt abnimmt. Hier wurde als Hauptprodukt das β -Bindungsbruchprodukt - die freie Thyminbase (**46**) - gefunden. Die N-1-Position, die beim α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymin (**86**) nicht substituiert ist, kann noch leichter deprotoniert werden als die freie N-3-Position des in Kapitel 5 bestrahlten 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymins (**48**). Der pK_s von Thymin ist 9.87. Deprotoniert wird zuerst am N-1, bei $pH > 13$ zusätzlich am N-3, wobei das Dianion entsteht (im Vergleich: 1-Methylthymin hat einen pK_s -Wert von 10.09, Deprotonierung am N-3, wie beim Modellsystem in Kapitel 5).^[82] Bei neutralem pH liegt Thymin schon teilweise als Monoanion vor.^[82] Die Deprotonierung verändert die Akzeptoreigenschaften der Nucleobase und der Elektronentransfer ist nicht mehr begünstigt. Direkt miteinander vergleichbar sind die Experimente aber nicht, da die Modellexperimente (mit Verbindung **48**) in wässrigen Systemen durchgeführt wurden, am N-3 deprotoniert wird und dort zudem β -Eliminierung als Konkurrenzreaktion stattfindet. Daß die freie N-1 Position der Grund für die schlechten Akzeptoreigenschaften ist, sieht man aber auch im Vergleich mit dem modifizierten Nucleosid. Hier ist Desoxyribose am N-1 verknüpft, eine Deprotonierung deshalb dort nicht möglich und der Elektronentransfer effizient. Für das modifizierte Nucleosid **76** könnte theoretisch auch eine Deprotonierung am N-3 in Betracht gezogen werden, dies scheint aber aufgrund der Ergebnisse (90% Elektronentransferprodukt bei Bestrahlung in MeOH) nicht der Fall zu sein. Die Desoxyribose am N-1 ist auch nicht direkt mit dem Linker des Modellsystems **48** zu vergleichen und die Einflüsse des Zuckers auf den pK_s sind andere. Außerdem findet auch hier die β -Eliminierung als Konkurrenzreaktion statt.

Entscheidend für die Untersuchung des Überschusselektronentransfers in DNA ist aber das eingebaute Nucleotid im Doppelstrang. Hier spielt die Deprotonierung am N-3 aufgrund der Watson-Crick-Basenpaarung zwischen dem modifizierten Thymin und der Gegenbase Adenin im Doppelstrang keine Rolle mehr (Abb. 7.3). Deshalb sind in der DNA eher noch höhere Injektionsausbeuten zu erwarten.

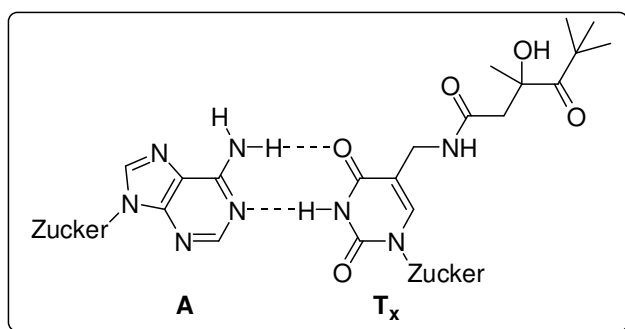


Abbildung 7.3: Watson-Crick-Basenpaarung zwischen α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (T_x , **76**) und Adenosin.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluß der freien N-1-Position auf den Elektronentransfer zu untersuchen, wäre beispielsweise eine Methylierung am N-1. Außerdem könnte man untersuchen, ob durch Zusatz von HCl in An- und Abwesenheit von H-Donoren das Produktverhältnis auf die Seite des Elektronentransferproduktes **87** verschoben wird, da dann Thymin nicht mehr als Monoanion vorliegt.

Da jedoch das modifizierte Nucleosid **76** effizienten Elektronentransfer (90%) bei neutralen Bedingungen in wässriger Lösung zeigte und dieses für die Elektroneninjektion in DNA im wässrigen eingesetzt werden soll, wo dann aufgrund der Watson-Crick Paarung gar keine Deprotonierung mehr möglich ist, wurden am Modellsystem - der Nucleobase - keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Von Thomas Carl wurden im Rahmen seiner Doktorarbeit außerdem die Nucleotide Guanosin und Adenosin mit dem Injektorbaustein gekuppelt.^[86] Er verknüpfte hierfür über die Aminogruppe der Nucleobasen. Die Reduktionspotentiale von Guanin ($E_{\text{red}} < -2.76$) und Adenin ($E_{\text{red}} = -2.52$) sind zu negativ um thermodynamisch begünstigten Elektronentransfer vom Radikalanion ($E^0 = -2.5$ V) auf die Nucleobasen zu ermöglichen.^[17] Ohne Zugabe von H-Donoren wurde von T. Carl sowohl Keto- als auch H-Einfangprodukt beobachtet, was bereits erwähnt, auf eine Abgabe des Elektrons ans Lösungsmittel oder auch einen langsamen, endothermen Elektronentransfer bzw. auf Wirkung des Lösemittels (MeOH) als H-Donor zurückzuführen ist. Bei Zugabe von H-Donoren konnte wie erwartet nur noch H-Einfangprodukt gefunden werden. Dies steht im Einklang mit den Bestrahlungsergebnissen von (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**89**).

Außerdem verknüpfte T. Carl den Injektorbaustein über eine Esterbindung mit der 5'-Hydroxylgruppe der Desoxyribose von Thymin.^[86] Es wurde in An- und Abwesenheit von H-Donor bestrahlt. In Gegenwart von H-Donor wurde zwar noch Elektronentransferprodukt beobachtet (ET zu H-Einfang = 1 : 5 bei 5 eq. L-Glutathion bzw. 1 : 10 bei 50 eq. und 3 : 1 ohne H-Donor), es konnte aber deutlich mehr Primärradikal abgefangen werden als beim hier untersuchten α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin. Dies bestätigt die bereits geschriebene Tendenz, daß die Effizienz des Elektronentransfers mit der Distanz des Primärradikals zum Elektronenakzeptor abnimmt (vgl. Ergebnisse des Zielsystems mit dem Modellsystem aus Kap. 5). Bei der Kupplung an 5' ist die Distanz noch größer als bei der Kupplung über das Amid. Dennoch findet auch bei 50fachem Überschuß des H-Donors noch Elektronentransfer auf die Thyminbase statt, was wiederum die Eignung der Thyminbase als Elektronenakzeptor zeigt.

7.4 Zusammenfassung

Das im Rahmen der Doktorarbeit synthetisierte α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) ist für die Elektroneninjektion in DNA geeignet. Bei der Bestrahlung des Nucleosids konnten 90% Elektronentransferprodukt isoliert werden und selbst in Gegenwart eines H-Donors blieb das Elektronentransferprodukt das Hauptprodukt. Nach dem Elektronentransfer des durch Deprotonierung des Primärradikals entstandenen Radikalanions auf das Thymin sollte ausgehend vom Thyminradikal das Elektron über benachbarte Thyminbasen hoppen können. Injiziert wird nur ein einzelnes Elektron und damit eine definierte Ladungsmenge an einer genau definierten Stelle (über T-Radikal). Das Kupplungsprodukt des Injektorbausteines mit einem schlechten Elektronenakzeptor (Benzyl, von T. Carl außerdem Guanosin und Adenosin) liefert in Gegenwart von H-Donoren nur H-Einfangprodukt. In Abwesenheit von H-Donoren konnte Ketoprodukt isoliert werden, da das Radikalanion als gutes Oxidationsmittel das Elektron auch an das Lösungsmittel abgeben kann. Das ebenfalls in Abwesenheit eines H-Donors entstandene H-Einfangprodukt ist auf die Wirkung des Lösemittels (Methanol oder Acetonitril) als H-Donor zurückzuführen. Daß beim aus dem Zielsystem entstandenen Elektronentransferprodukt tatsächlich Elektronentransfer stattfindet und das Elektron dort nicht an das Lösemittel abgegeben wird, kann dadurch nachgewiesen werden, daß auch in Gegenwart der H-Donoren das Elektronentransferprodukt das Hauptprodukt bleibt. Die Abgabe des Elektrons ans Lösemittel ist langsamer als der H-Einfang, wenn H-Donoren anwesend sind, wie man anhand der Ergebnisse mit den schlechten Elektronenakzeptoren sieht.

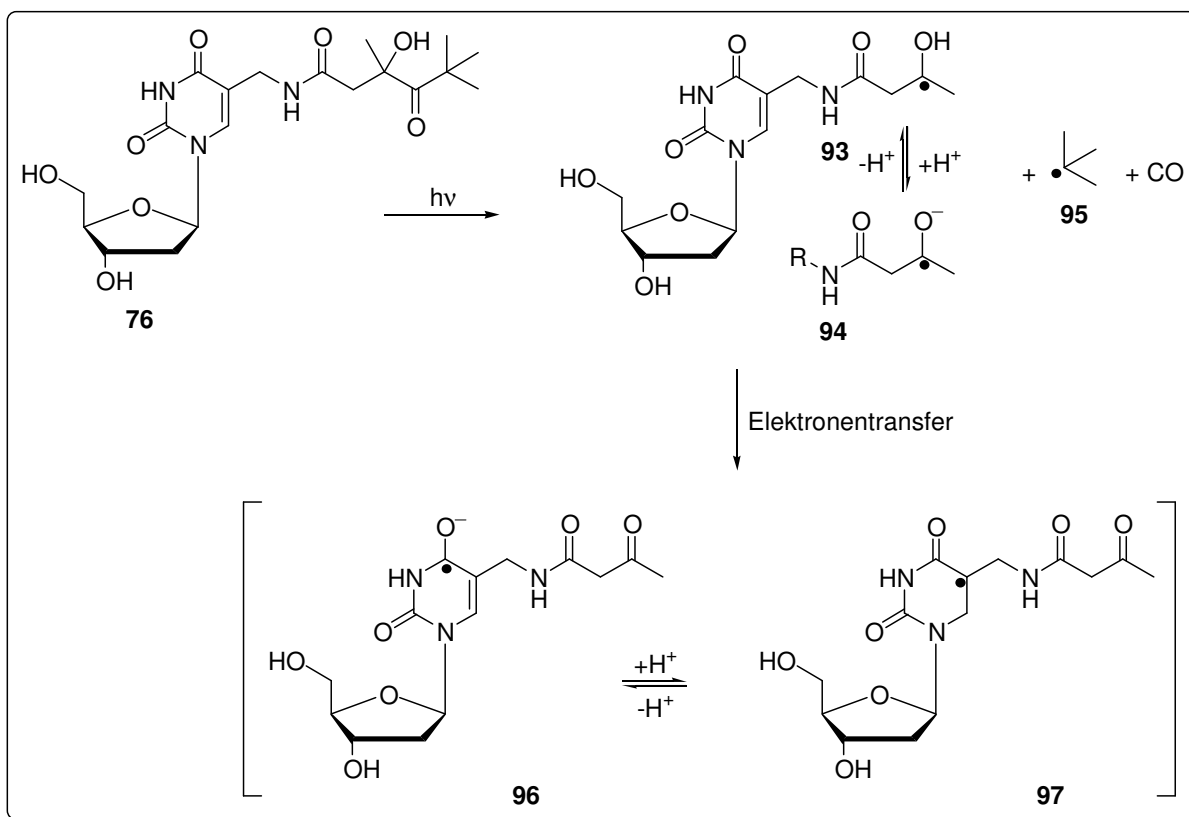
Ein Einfluß der Linkerlänge auf die Effizienz des Elektronentransfers konnte ebenfalls nachgewiesen werden. So ist der Transport über fünf Bindungen im Zielsystem etwas schlechter als er es im Modellsystem über zwei Bindungen war. Eine kürzere Linkerlänge könnte die Effizienz begünstigen, 90% Elektronentransferausbeute sollten aber für die Untersuchungen in DNA ausreichen und die Einfachheit und Flexibilität der nicht linearen Synthese spricht für das hier dargestellte System. Vermutlich ist die Elektronentransferausbeute im Doppelstrang sogar höher, da ja aufgrund der Watson-Crick-Basenpaarung keine Deprotonierung des Thymidins am N-3 möglich ist.

Mit den Photolyseergebnissen konnten zwar deutliche Hinweise des Elektronentransfers vom Ketylradikalanion auf das Thymin gegeben werden, ein Nachweis für das nach der Photolyse entstandene Thyminradikal ist so aber nicht möglich. Dies gelang mit ESR-Messungen in der

Gruppe von Olav Schiemann an der Universität Frankfurt. Die Ergebnisse werden nachfolgend aufgeführt.

7.5 ESR-Messungen

Um nachzuweisen, daß das Radikalanion, welches nach Photolyse und Norrish I-Spaltung des *tert.*-Butylketons entsteht, tatsächlich Ladung auf die Thyminbase transferiert, wurden von Emiliano Feresin in der Gruppe von Olav Schiemann (Universität Frankfurt) ESR-Messungen durchgeführt. Das Spektrum des bestrahlten α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidins (**76**) wurde aufgenommen. Für die Bestrahlung wurde das Photoedukt in Acetonitril gelöst, die Probe mit Argon gespült und in flüssigem Stickstoff auf 77 K gekühlt. Es wurde während 10 min bei 77 K mit einer 500 W Quecksilber-Hochdrucklampe unter Verwendung eines 320 nm Steilkantenfilters bestrahlt.^[89] Die ESR-Spektren wurden mit einem Bruker ESR 300E Spektrometer aufgenommen.^[89, 90] Im direkt nach der Bestrahlung aufgenommenen ESR-Spektrum sah man überlagert die Signale des *tert.*-Butylradikales (**95**) und des Primärradikals **93**. Nach einer Woche (bei 77 K) war im ESR-Spektrum nur noch das Thymylradikal **97** zu sehen, die beiden anderen Radikale nicht mehr.



Schema 7.11: Photolyse von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin **76**, Norrish I-Reaktion und Elektronentransfer.

Das Spektrum des Thyminradikals wurde mit dem simulierten Spektrum verglichen, so daß das Thyminradikal **97** eindeutig identifiziert werden konnte.

Die Hyperfein-Kopplungskonstanten des simulierten Spektrums sind 39.2 G und 10.5 G für die beiden benachbarten CH₂-Gruppen. Die beiden ESR-Spektren - aufgenommen direkt nach der Bestrahlung und nach einer Woche - sind nachfolgend zu sehen (Abb. 7.4 und 7.5).

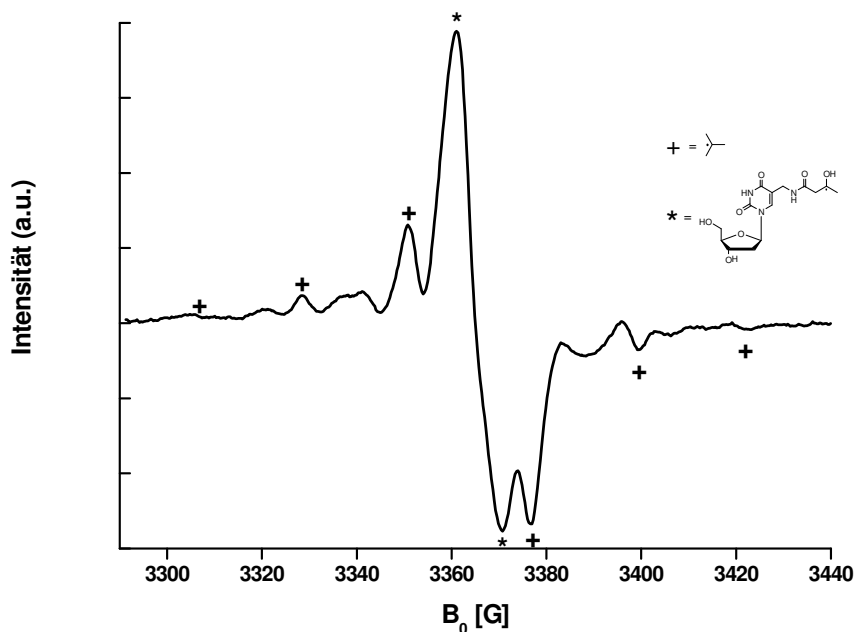


Abbildung 7.4: ESR-Spektrum nach Photolyse von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**), Bestrahlung 10 min bei 77 K (320 nm).

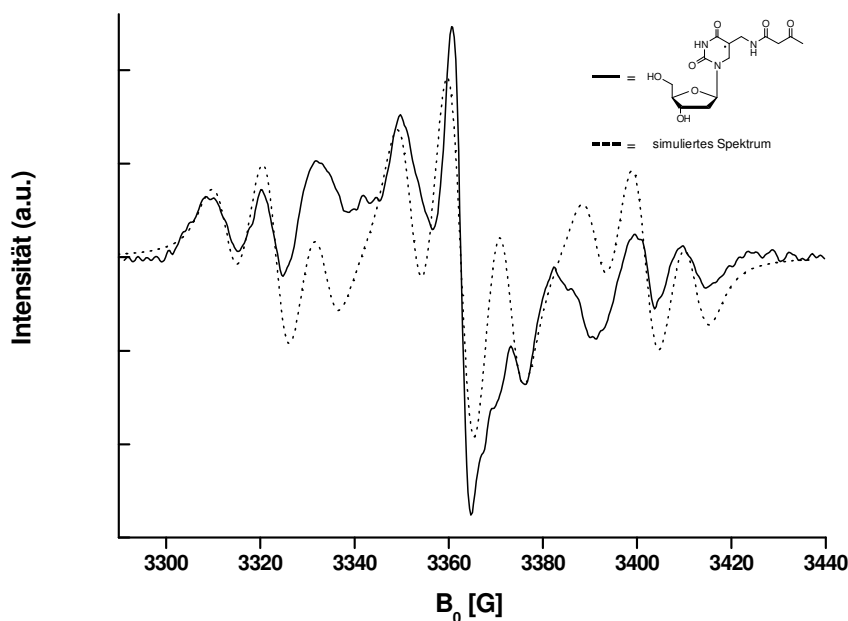


Abbildung 7.5: ESR-Spektrum nach Photolyse von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) und einwöchiger Lagerung der Probe bei 77 K, Bestrahlung 10 min bei 77 K (320 nm).

Bei 77 K konnten nach Bestrahlung des Photoeduktes sowohl das durch Norrish I-Spaltung gebildete Primärradikal **93** als auch der Elektronentransfer auf die Thyminbase zum Thymylradikal **97** beobachtet werden. Der Elektronentransfer läuft bei tiefen Temperaturen sehr langsam ab, nach einer Woche konnte aber nur noch das Elektronentransferprodukt detektiert werden. Das Thymylradikal ist bei 77 K stabil.

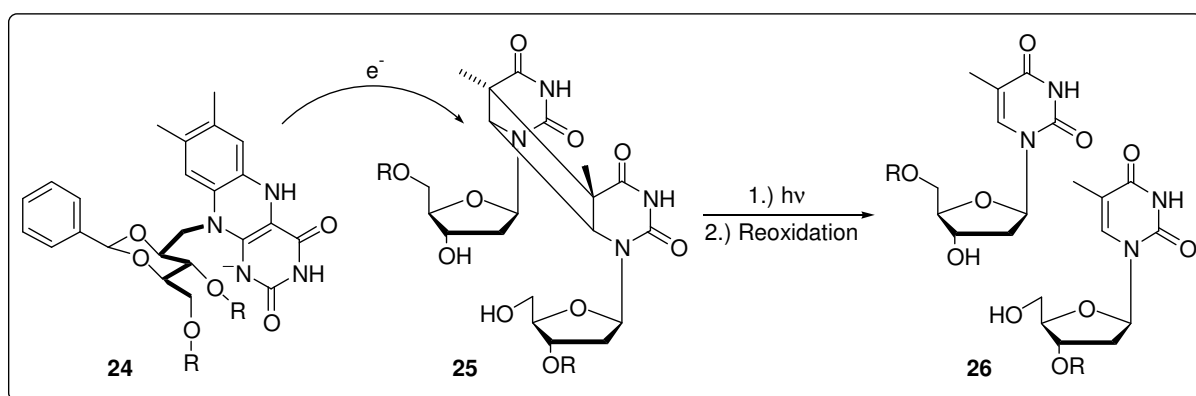
Um nachzuweisen, daß es sich bei der Bildung des Thymylradikals um einen intramolekularen Prozeß handelt, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, mit denen die Möglichkeit eines intermolekularen Elektronentransfers untersucht werden sollte. Hierfür wurde das unmodifizierte Thymidin in Gegenwart von Di-*tert.*-Butylketon bestrahlt. Es konnten nur *tert.*-Butylradikale beobachtet werden. Bildung des Thymylradikals durch Schädigung mittels UV-Strahlung konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da bei alleiniger Bestrahlung von unmodifiziertem Thymidin keine Thymylradikale detektiert werden konnten. Es findet deshalb ein protonengekuppelter intramolekularer Elektronentransfer vom Radikalanion **96** auf die Thyminbase statt.

Diese Experimente bestätigten den Mechanismus der Elektroneninjektion vom Ketylradikalanion auf die Nucleobase und die Existenz des Thyminradikals konnte bewiesen werden. Es findet also tatsächlich der Elektronentransfer vom Primärradikal bzw. vom Radikalanion auf die Thyminbase statt. Das hier als intermediärer Ladungsträger nachgewiesene Thymyl-Radikal ist das erste für regiospezifische Injektion eines einzelnen Elektrons in DNA nachgewiesene Intermediat. Bei der γ -Puls-Radiolyse konnten zwar von Steenken *et al.* auch Thymidin-Radikalanionen mittels UV-Absorptionsspektren nachgewiesen werden, jedoch wurden diese nicht ortsspezifisch erzeugt.^[18]

Das so entstandene Thyminradikal startet nun den Elektronentransfer in der DNA. Man kann also über die modifizierte Thyminbase wie gewünscht eine definierte Ladungsmenge, d. h. ein Elektron, ortsspezifisch in einen DNA-Strang injizieren. Ob die Ladung von dort durch die DNA transferiert wird, wurde in Kooperation mit der Gruppe von T. Carell an der Universität Marburg, im Rahmen der Doktorarbeit von T. Carl in dieser Gruppe untersucht. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Kapitel 8 kurz zusammengefaßt.

8 Transfer eines Überschusselektrons in DNA - Ergebnisse und Vergleich mit den Systemen von Carell und Rokita

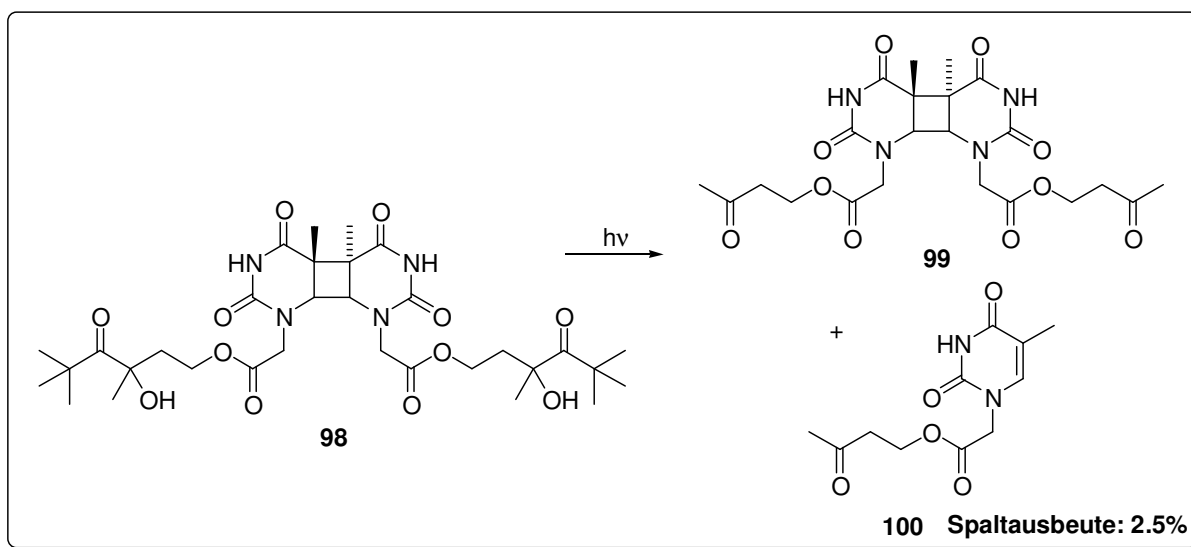
Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden in der Gruppe von T. Carell viele Untersuchungen zum reduktiven Elektronentransfer durchgeführt.^[59, 64-67] Da der Hintergrund für die Untersuchungen in der Reparatur von UV-geschädigten DNA-Strängen, insbesondere von T-Dimeren, durch die CPD-Photolyase liegt, wurde von Carell *et al.* für die Untersuchung ein Modellsystem verwendet, in welchem als Injektor reduziertes, deprotoniertes und photoangeregtes Flavin (*FADH⁻, **24**) in die DNA eingebaut wurde. *FADH⁻ ist das für die Elektroneninjektion in der CPD-Photolyase zuständige Schlüsselement. Um die Reparatur leicht per HPLC verfolgen zu können, wurde für die Detektion das T-Dimer **25** mit einem offenen Rückgrat eingebaut (Schema 8.1). So führt die Cycloreversion außerdem zum Strangbruch und die Strangbruchprodukte können via HPLC und MALDI detektiert, identifiziert und quantifiziert werden.



Schema 8.1: von Carell *et al.* eingebautes Flavin- und T=T-Derivat, Flavin-induzierte T=T-Spaltung und Strangbruch.

Um das in dieser Arbeit synthetisierte Injektorsystem α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) zur Untersuchung von Elektronentransfer in DNA einsetzen zu können, benötigt man ebenfalls ein Detektorsystem. Ohne Detektorsystem wäre zwar der Elektronentransfer möglich, ein Nachweis und Aussagen über seine Effizienz jedoch nicht. Das von Carell verwendete *FADH⁻ **24** ist mit einem Reduktionspotential von -2.6 V (gegen NHE) in der Lage die Nucleobasen und das T-Dimer ($E_{\text{red}} = -2.2$ V gegen NHE) zu reduzieren. Hopping über die Thyminbasen ist thermoneutral, die Reduktion des T-Dimers **25** durch ein Thyminradikal aufgrund der vergleichbaren Reduktionspotentiale von T ($E_{\text{red}} = -2.18$ V) und T-Dimer ($E_{\text{red}} = -2.2$ V) auch.^[65] Da das beim hier entwickelten Injektorsystem nach Photolyse, Norrish I-Reaktion und Deprotonierung entstehende Radikalanion mit einem

Reduktionspotential von -2.5 V mit dem Reduktionspotential von Flavin vergleichbar ist, sollte das T-Dimer auch für dieses System ein geeignetes Detektorsystem sein. Die Eignung wurde von T. Carl außerdem in Monomereperimenten untersucht (Schema 8.2), analog zu den von Carell *et al.* durchgeführten ersten Modellexperimenten, bei denen T-Dimer und Flavin auch direkt gekuppelt waren.^[86, 91] Hierfür wurde das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte 4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (**60**) mit dem T-Dimer gekuppelt.^[86]



Schema 8.2: von T. Carl untersuchtes Modellsystem zur Untersuchung der Eignung des Radikalanions als Elektroneninjektor bzgl. der Reduktion des T-Dimers.

Da im Modellsystem eine Spaltung des T-Dimers nachgewiesen werden konnte, sollte auch für die Detektion des Überschusselektronentransfers im DNA-Strang das System von Carell verwendet werden. Die vergleichsweise niedrige Spaltausbeute im Modellsystem ist darauf zurückzuführen, daß für die Modellversuche aufgrund der leichteren Zugänglichkeit das *trans,syn*-Dimer **98** verwendet wurde, welches ein negativeres Reduktionspotential als das *cis,syn*-Dimer besitzt und außerdem langsamer spaltet. Außerdem steht für die Spaltung nur ein Elektron zur Verfügung. Carell *et al.* haben im Gegensatz dazu einen permanenten Elektronenfluß ausgehend vom $^*FADH^-$. Daß Spaltprodukt beobachtet werden konnte, obwohl der Elektronentransfer endotherm ist, zeigt, daß Ketylradikale effizient Elektronen injizieren können. Für die Untersuchung des Elektronentransfers wurde also in Kooperation mit der Gruppe von T. Carell das T-Dimer als *cis,syn*-Dimer mit einem offenen Rückgrat eingebaut.

Der für die automatische Festphasensynthese dargestellte Nucleotidbaustein 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-(*R,S*)-phosphoramidit] (**70**, vgl. Kapitel 6.2) konnte gelöst in

Methylenchlorid am DNA-Synthesizer in guten Ausbeuten in das Oligonucleotid eingebaut werden. Der Injektorbaustein zeigt in die große Furche (major groove). Die Seitenkette weist eine hohe Flexibilität auf, führt aber zu keinen Interaktionen mit dem DNA-Rückgrat oder sterischen Hinderungen. Der Einbau der modifizierten Thyminbase verzerrt den DNA-Strang daher nicht. Ein Modell mit eingebauter Modifikation ist in Abb. 8.1 zu sehen.

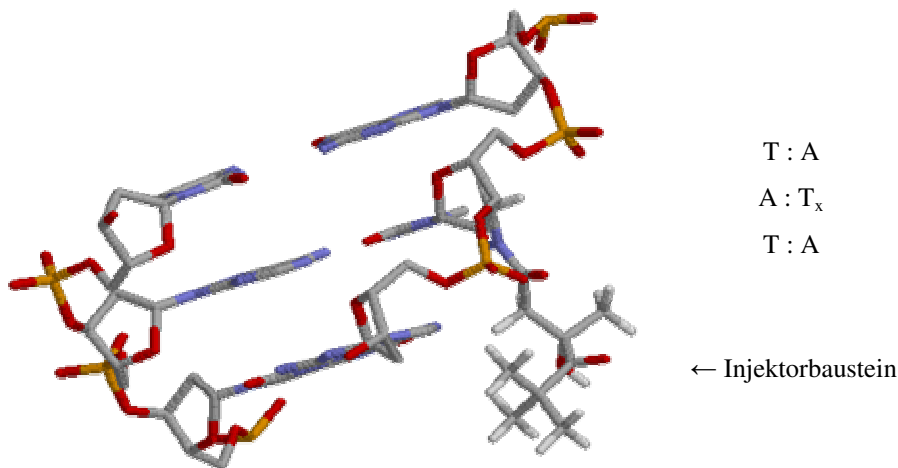
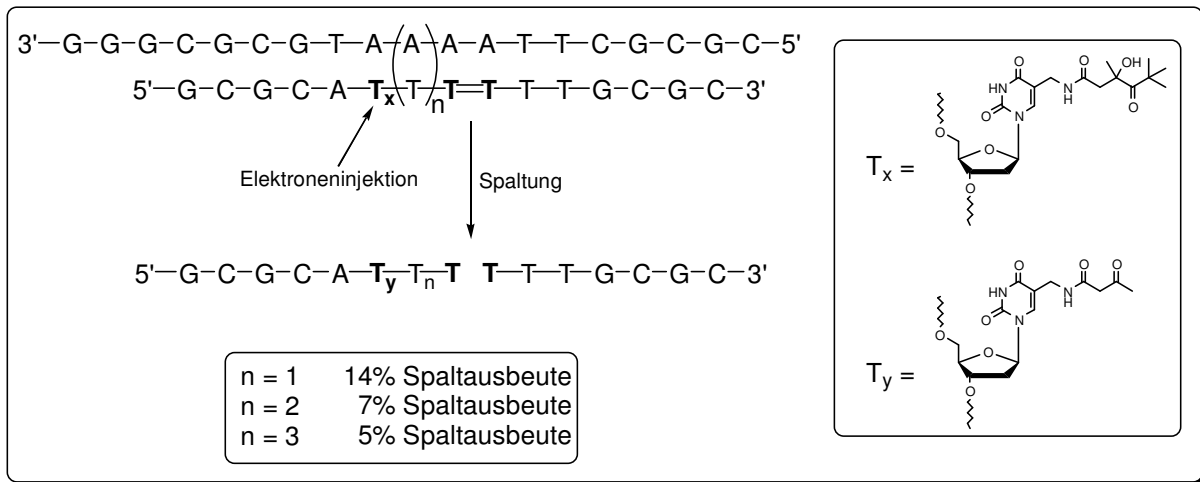


Abbildung 8.1: Ausschnitt eines DNA-Doppelstrangs mit eingebautem Injektorsystem (T_x : 70).

Zur Untersuchung des Elektronentransfers in DNA wurden von T. Carl mehrere DNA-Stränge synthetisiert, in denen T-Dimer und das Injektorsystem im selben Strang eingebaut waren. Untersuchungen eines Stranges, der nur das Injektorsystem enthielt, zeigten, daß der entsprechende Doppelstrang als B-DNA vorliegt (CD-Spektrum) und durch den Einbau des modifizierten Thymidins zusätzlich stabilisiert wird (Erhöhung des Schmelzpunktes). Auch die Stränge, die T-Dimer und Injektorbaustein enthalten liegen als B-DNA vor und die Schmelzpunkte sind bis zu 4°C höher als analoge unmodifizierte Stränge, obwohl das T-Dimer einen leicht destabilisierenden Effekt auf den Doppelstrang hat (Erniedrigung der Schmelztemperatur um 3 bis 5°C). Die stabilisierende Wirkung des modifizierten Thymidins überwiegt also sogar die Destabilisierung durch das T-Dimer. Die Distanz zwischen Injektor und Detektor wurde durch den Einbau von ein bis drei A:T-Basenpaaren selektiv erhöht (Schema 8.3).^[86, 89]



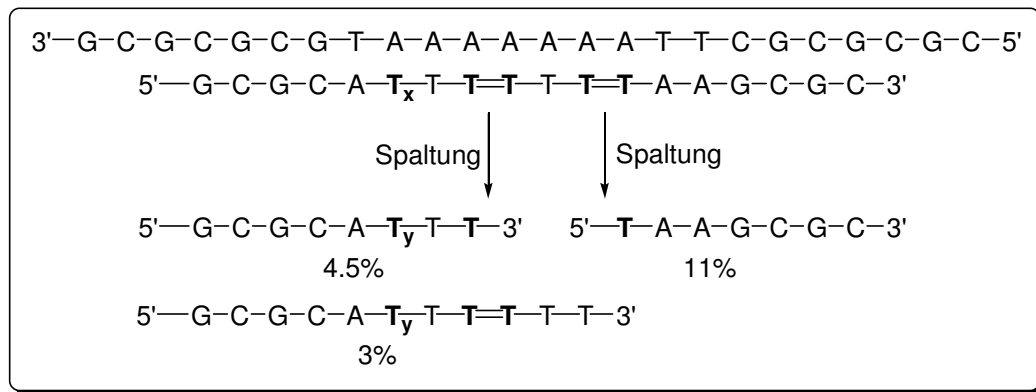
Schema 8.3: von T. Carl synthetisierte und bestrahlte Oligonucleotide mit eingebautem Injektorsystem (T_x) und T-Dimer; T_y = Ketoprodukt nach Norrish I-Reaktion und Elektroneninjektion.

Um für die HPLC-Analytik eine gute Trennung von Gegenstrang und nicht gespaltenem modifizierten Strang (mit T_y) zu erhalten, wurden etwas längere Gegenstränge eingesetzt. Nach der Photolyse erhielt man die durch Elektronentransfer und Cycloreversion gebildeten beiden Strangbruchprodukte im Verhältnis 1 : 1 (Schema 8.3). Die Ausbeute an Strangbruchprodukten nahm mit der Distanz von 14 über 7 zu 5% ab, wenn die Anzahl an A:T-Basenpaaren zwischen Injektor und Donor von eins auf drei erhöht wurde. Diese Ausbeuteabnahme ist typisch für einen mehrstufigen Hoppingprozeß und unterstützt somit die bisherigen Erkenntnisse zum Transfer von Überschusselektronen in DNA, daß die Ladung bei höheren Temperaturen (ab 200 K) nach einem Hoppingmechanismus transferiert wird (vgl. Kap. 3).^[48, 89, 92] Die logarithmische Auftragung der Strangbruchausbeuten gegen die Distanz (Superaustausch nach Marcus-Levich-Jortner: $k_{ET} = k_0 \cdot e^{-\beta\Delta r}$) bzw. gegen die Anzahl der Hoppingschritte [random walk nach Jortner: $\ln(k_{ET}) = -\eta \cdot \ln(N)$] liefert einen β -Wert von 0.13 \AA^{-1} und einen η -Wert von 1.80. Der niedrige β -Wert zeigt eine für den Hopping-Mechanismus typische schwache Distanzabhängigkeit an - Superaustausch ist stärker distanzabhängig und der β -Wert daher höher - und der η -Wert von 1.8 kommt dem Idealwert von zwei sehr nahe.

In Kapitel 3 wurde jedoch bereits angesprochen, daß Carell *et al.* bei Untersuchungen mit gemischten Sequenzen zwischen Injektor (*FADH⁻) und Donor (T-Dimer) keine Sequenzabhängigkeit beobachten konnte, während Rokita *et al.* (Elektronendonator: *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,5-diaminonaphthalen (TMDN), Elektronenakzeptor: 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)) einen Einfluß der Sequenz auf die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers ermittelte ($\beta\text{-Wert}_{\text{Rokita}} = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$, $\beta\text{-Wert}_{\text{Carell}} = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$). Grund für die Sequenzabhängigkeit

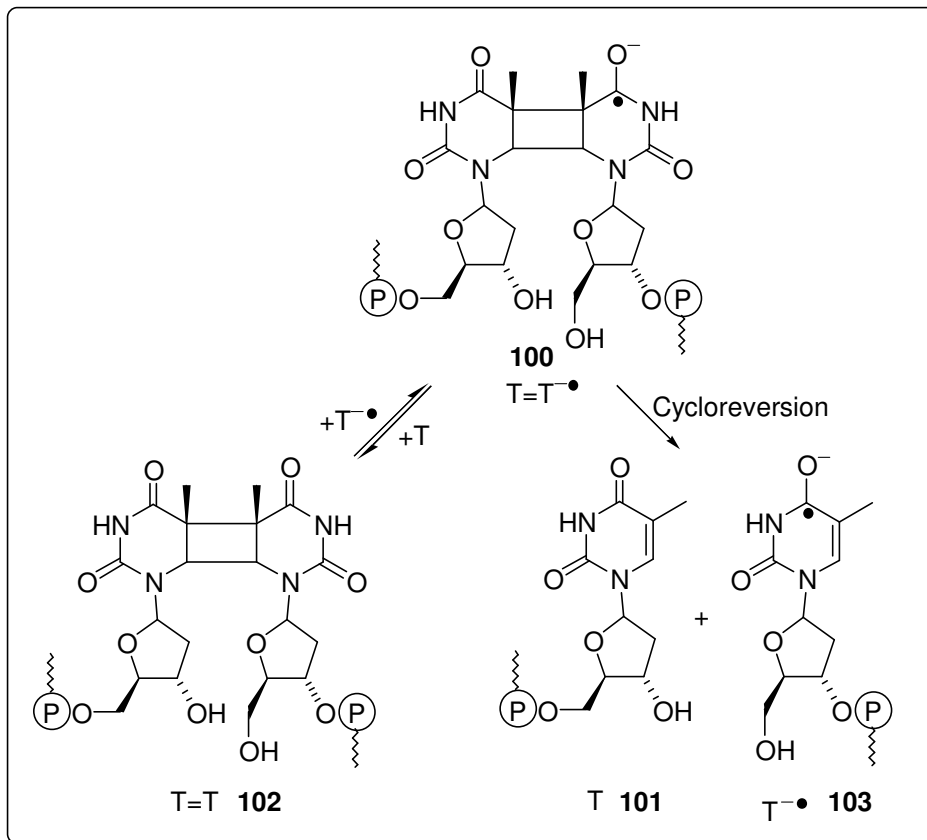
ist die (reversible) Protonierung des Cytosinradikalanions zum Cytosinradikal durch Guanin, was den Hoppingprozeß verlangsamt. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse ist, daß für die Detektion mit dem T-Dimer nicht der Elektronentransfer, sondern die Cycloreversion geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Spaltgeschwindigkeit des von Carell *et al.* als Detektor verwendeten T-Dimers liegt zwischen $k_{\text{split}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$ und 10^9 s^{-1} .^[67] Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers liegt, wenn man davon ausgeht, daß die für den Lochtransfer ermittelten Raten für den Hoppingmechanismus auf den Überschusselektronentransfer übertragbar sind, zwischen 10^6 s^{-1} und 10^8 s^{-1} . Vorausgesetzt der Überschusselektronentransfer durch A:T- und G:C-Basenpaare ist etwas schneller als 10^8 s^{-1} läßt sich die von Carell *et al.* beobachtete Sequenzunabhängigkeit der Geschwindigkeit dadurch erklären, daß die T-Dimer-Spaltung zumindest teilweise der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und somit mit diesem System die Sequenzabhängigkeit nicht untersucht werden kann. Das Detektorsystem von Rokita hat ein niedrigeres Reduktionspotential als T und T-Dimer, reagiert vermutlich schneller und liefert deshalb Aussagen über die Sequenzabhängigkeit.^[30c] Da sowohl Carell *et al.* als auch Rokita *et al.* keine definierte Ladungsmenge injizieren, ist eine quantitative Aussage nicht - bzw. nur in Abhängigkeit von der Zeit - möglich. Beobachtet wird nur die Spaltung, wieviele Elektronen für die Spaltung nötig waren, kann nicht angegeben werden.

Da mit dem hier entwickelten Injektorsystem T_x (**70**) nur ein einzelnes Elektron auf den DNA-Doppelstrang aufgebracht wird (Strangbruchausbeuten sind somit vergleichbar mit Quantenausbeuten), ist eine Untersuchung, inwieweit Elektronentransfer und Cycloreversion/Spaltung des T-Dimers miteinander konkurrieren möglich. Hierfür wurde im Rahmen der Doktorarbeit von T. Carl ein Strang synthetisiert, der neben dem Injektorbaustein zwei T-Dimere enthält (Schema 8.4). Da nach der Cycloreversion am ersten T-Dimer die Ladung nicht verloren geht, sondern weiter durch den DNA-Strang transportiert werden kann und damit eine katalytische Wirkung hat, sollte die Spaltung beider T-Dimere durch ein einzelnes Elektron möglich sein (siehe auch Schema 8.5). Tatsächlich konnten die beide Strangbruchprodukte gefunden werden. Interessanterweise wurden die Strangbruchprodukte jedoch nicht im Verhältnis 1 : 1 zueinander gefunden. Man fand mehr Strangbruchprodukt ausgehend von der Cycloreversion des vom Elektroneninjektor weiter entfernten T-Dimeres (Schema 8.4) - Verhältnis 1 : 2.4.



Schema 8.4: von T. Carl synthetisierte und bestrahlte Oligonucleotide mit eingebautem Injektorsystem (T_x) und zwei T-Dimeren; T_y = Ketoprodukt nach Norrish I-Reaktion und Elektroneninjektion.

Geht man davon aus, daß das weiter entfernte T-Dimer nur dann gespalten werden kann, wenn zuvor bereits das nähere T-Dimer gespalten wurde, dürfte das Verhältnis der beiden Strangbruchprodukte zueinander höchstens 1 : 1 sein. Das Strangbruchproduktverhältnis läßt sich also nur erklären, wenn das Elektron auch über das T-Dimer hoppen kann ohne daß eine Cycloreversion stattfindet. Da T-Dimer und T ein vergleichbares Reduktionspotential haben und dieser Hoppingschritt daher thermoneutral ist (T-Dimer ist nicht wie GGG eine Elektronenfalle), ist dieser Weg denkbar, wenn die Spaltung gleich schnell oder langsamer ist als der Elektronentransfer.



Schema 8.5: Konkurrenz zwischen Spaltung und Elektronentransfer ausgehend vom T-Dimer-Radikalanion.

Die Ergebnisse zeigen, daß Spaltung und Elektronentransfer mit vergleichbarer Geschwindigkeit ablaufen und die Geschwindigkeit des Elektronentransfers damit bei ca. 10^9 liegt. Ein weiterer Hinweis darauf ist auch, daß das Spaltprodukt, bei dem das erste T-Dimer intakt ist und nur das weiter entfernte T-Dimer gespalten wurde, ebenfalls isoliert werden konnte (Schema 8.4). Die beiden konkurrierenden Reaktionswege des T-Dimerradikalanions **100** - direkter Elektronentransfer zu einer T-Base und Elektronentransfer nach Cycloreversion und Bildung des T-Radikalanions - sind in Schema 8.5 dargestellt.

Da also, wenn das T-Dimer-System verwendet wird, nicht jedes Elektron zum Strangbruch führt, sondern teilweise einfach weiterer Elektronentransfer ausgehend vom T-Dimer-Radikalanion auf eine benachbarte Thymin-Base stattfindet, können Carell *et al.* mit diesem System Sequenzabhängigkeiten nicht beobachten, bzw. sehen nur eine schwache Änderung, da *FADH⁻ permanent Elektronen abgibt. Es kommen genügend Elektronen am T-Dimer an, um dennoch eine Cycloreversion herbeizuführen. Da das System von Rokita ein niedrigeres Reduktionspotential hat (Elektronenfälle - vergleichbar mit dem GGG beim Lochtransfer) und möglicherweise schneller reagiert als das T-Dimer-System sind damit eher Aussagen zur Sequenzabhängigkeit möglich, wenn beim Injektorsystem nicht ebenschnell neue Elektronen generiert und transferiert werden. Auch die in neueren Untersuchungen von Rokita *et al.* beobachtete bevorzugte Richtung des Elektronentransfers entlang des DNA-Strangs (3' gegen 5') konnte von Carell *et al.* daher nicht beobachtet werden.^[69] Der Grund für diese Unterschiede - die Konkurrenz zwischen Elektronentransfer und Spaltung des T-Dimeres aufgrund vergleichbarer Geschwindigkeit - konnte mit dem hier vorgestellten Injektorsystem gefunden werden. Das Verhältnis von 1 : 2.4 spricht ebenfalls für eine Bevorzugung der 3'-Richtung. Das liegt aber auch darin begründet, daß das T-Dimer den Strang leicht deformiert und daher 3' gegenüber 5' an den Enden des T-Dimers bevorzugt wird. Darauf wird in der Doktorarbeit von T. Carl näher eingegangen.^[86]

Erste Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit wurden ebenfalls durchgeführt, der Einbau eines G:C-Basenpaares zwischen Detektor und Injektor führte zu einer deutlichen Abnahme der Strangbruchprodukte, was die von Rokita *et al.* beobachtete Sequenzabhängigkeit unterstützt.^[86] Es wurde eine Abnahme um Faktor 10 beobachtet. Da bei Verwendung des mit dem *tert.*-Butylketon modifizierten Thymidins nur ein Elektron injiziert werden kann ist diese Aussage im Unterschied zu den Experimenten mit *FADH⁻ möglich, auch wenn nicht jedes Elektron zur Cycloreversion führt. Hat man nur ein Elektron, kann man anhand der Strangbruchausbeuten quantitative Aussagen machen, da das Verhältnis der beiden Konkurrenzreaktionen (Cycloreversion und ET ausgehend vom T-Dimerradikalanion) das

selbe ist (wenn in Nachbarschaft zum T-Dimer in 3'-Richtung eine Thyminbase ist) und die durch Cycloreversion gebildeten Produkte damit im Verhältnis zur transferierten Ladung stehen.

Auch Untersuchungen mit Difluortoluol (**104**) als Gegenbase zu Adenin wurden von T. Carl durchgeführt, weitere Experimente sind in Planung. Difluortoluol (Abb. 8.2) kann wegen des stark negativen Reduktionspotentials vom Thyminradikalanion nicht reduziert werden und daher soll so untersucht werden, ob auch Elektronentransfer über den Superaustauschmechanismus stattfinden kann. Die von Kool *et al.* entwickelte artifizielle Nucleobase Difluortoluol ist ein Isooster zur Nucleobase Thymin, da die Anzahl der Atome, die Gesamtzahl der Elektronen und somit Elektronenkonfiguration und Gesamtladung übereinstimmen. Die DNA liegt auch mit A:F-Basenpaaren als B-DNA vor, die Konformation wird nicht beeinträchtigt.

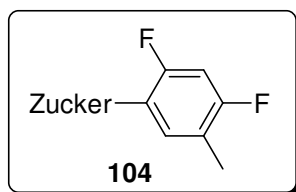


Abbildung 8.2: Difluortoluol-Nucleotid.

Der Einbau eines A:F-Basenpaares zwischen Donor und Akzeptor verringert die Ausbeute an Strangbruchprodukten wie beim Einbau des G:C-Basenpaares um den Faktor 10.

Daß der Elektronentransfer über ein G:C-Basenpaar ebenso schlecht verläuft wie über das A:F-Basenpaar, liegt vermutlich daran, daß bei dem hier synthetisierten Injektionssystem die Injektion in den DNA-Strang zunächst vom Ketylradikalanion auf das Thymin und ausgehend vom Thyminradikal weiter in den DNA-Strang verläuft. Das Reduktionspotential, das für den eigentlichen Injektionsschritt in den DNA-Strang betrachtet werden muß, ist also nicht das des Ketylradikalanions von -2.5 V, sondern das des Thyminradikal(anion)s ($E_{\text{red}} = -2.18 \text{ V}$). Das Thyminradikalanion kann zwar in einem thermoneutralen Hoppingschritt das T-Dimer ($E_{\text{red}} = -2.2 \text{ V}$) reduzieren, für die Reduktion des Cytosins zum Cytosinradikalanion ($E_{\text{red}} = -2.35 \text{ V}$) reicht die Reduktionskraft jedoch nicht aus, bzw. die Reduktion verläuft endotherm. Carell *et al.* und Rokita *et al.* injizieren über $^*\text{FADH}^-$ (**24**) bzw. über TMDN (**28**). Beide Injektorsysteme können alle Nucleobasen reduzieren. Es sind aromatische Systeme, die zwar regiospezifisch in die DNA eingebaut sind, deren Lage jedoch nicht so genau definiert ist, wie das hier dargestellte modifizierte Thymidin. Es ist ausgehend von diesen Injektionssystem sowohl die Oxidation des Thymins als auch die des Cytosins in einem exothermen Prozeß und damit auch die Untersuchung des Hoppings über Cytosinradikalanionen, vergleichbar dem A-

Hopping beim Lochtransfer, möglich. Daß also Carell *et al.* und Rokita *et al.* Elektronentransfer über G:C-Basenpaare beobachten können, ein Elektronentransfer mit dem hier dargestellten Injektionssystem jedoch nicht möglich ist, liegt am Reduktionspotential des Injektionssystems. Eine Untersuchung des Hoppings über G:C-Basenpaare wäre evtl. durch Synthese einem mit dem Injektorbaustein modifizierten Cytidin möglich. Mit modifiziertem Thymidin kann nur der Elektronentransfer über längere A:T-Sequenzen untersucht werden.

9 Detektorsysteme

Für die Detektion des Elektronentransfers ausgehend vom hier dargestellten α -[(R,S)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) wurde im Rahmen der Doktorarbeit von T. Carl in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von T. Carell das T-Dimer **25** mit einem offenen Rückgrat verwendet. Ein großer Vorteil dieses Systems ist, daß durch Elektronentransfer eines einzelnen Elektrons eine chemische Reaktion beobachtet werden kann - die Cycloreversion. Durch das offene Rückgrat erhält man zwei Strangbruchprodukte die mit HPLC analysiert und quantifiziert werden können. Man kann so also quantitative Aussagen zum Strangbruchs durch ein einzelnes Elektron und dessen katalytische Wirkung (Spaltung von zwei T-Dimeren) machen. Ein Nachteil hingegen ist, daß, wenn T-Dimer als Detektorsystem eingebaut wird, keine thermodynamische Triebkraft für den Elektronentransfer vorliegt. Die für den Lochtransfer eingebaute Triple-G-Einheit ist so leicht zu oxidieren, daß man dort eine thermodynamische Triebkraft hat, während das T-Dimer mit einem Reduktionspotential von -2.2 V mit dem der Thyminbasen ($E_{\text{red}} = -2.18 \text{ V}$) vergleichbar ist, über die die Ladung hoppt. Hat man eine Ladungsfalle, so hat man auch eine bevorzugte Richtung für den Elektronentransfer. Dies ist im T-Dimer-System nicht der Fall. Die Ladung wird also ausgehend vom primär erzeugten Thyminradikal in beide Richtungen transferiert. Zwar beobachteten Rokita *et al.*, daß der Überschußelektronentransfer bevorzugt von 5' nach 3' stattfindet und die von T. Carl untersuchten Stänge (vgl. Kap. 6) wurden von 5' nach 3' synthetisiert, dennoch wird sicher auch Ladung in die 5' Richtung transferiert werden, da auch von Rokita *et al.* Elektronentransfer in beide Richtungen beobachtet werden konnte.^[69] Folglich wird nicht in jedem bestrahlten Strang die Ladung das T-Dimer erreichen und zwar nicht, weil der Elektronentransfer nicht weitreichend genug ist, sondern weil bei einem Teil der bestrahlten Oligonucleotide das Elektron in die "falsche" Richtung geht und der Elektronentransfer dann nicht detektiert werden kann. Außerdem führt nicht - wie in Kapitel 6 bereits geschrieben - jedes Elektron zur Cycloreversion, da die Geschwindigkeit des Elektronentransfers ausgehend vom Thymindimerradikalanion auf ein benachbartes T mit der Geschwindigkeit für die Cycloreversion vergleichbar ist (Experiment mit zwei Detektormolekülen im DNA-Strang). Das bedeutet auch, daß die maximal beobachtbare Geschwindigkeit für Elektronentransfer auf die Spaltgeschwindigkeit des T-Dimers limitiert ist. Durch diese Konkurrenzreaktion wird wiederum ein Teil der Elektronen, der zwar zum T-Dimer transferiert wird, aber eben nicht zur Cycloreversion führt, nicht detektiert. Das heißt, daß mit dem T-Dimer-Detektorsystem aufgrund der Konkurrenzreaktion und der fehlenden

thermodynamischen Triebkraft für den Teil der Oligonucleotide, bei dem das Elektron entweder in die "falsche" Richtung transportiert wird oder nicht zur Spaltung führt, der Elektronentransfer nicht detektiert werden kann. Da außerdem beim Elektronentransfer über den Hoppingmechanismus die Ausbeute mit der Distanz abnimmt, wird die Untersuchung des Elektronentransfers über große Distanzen mit dem T-Dimer-Detektorsystem schwierig, da die Ausbeute an Strangbruchprodukt rasch zu klein wird, um noch per HPLC untersucht werden zu können. Diese Problematik stellt sich bei den Untersuchungen von Carell *et al.* nicht oder nicht in dem Maße, da vom *FADH⁻ mehrere Elektronen injiziert werden. Hier liegt permanenter Elektronenfluß vor, da Flavin durch Natriumdithionit während der gesamten Bestrahlung im reduzierten Zustand verbleibt.

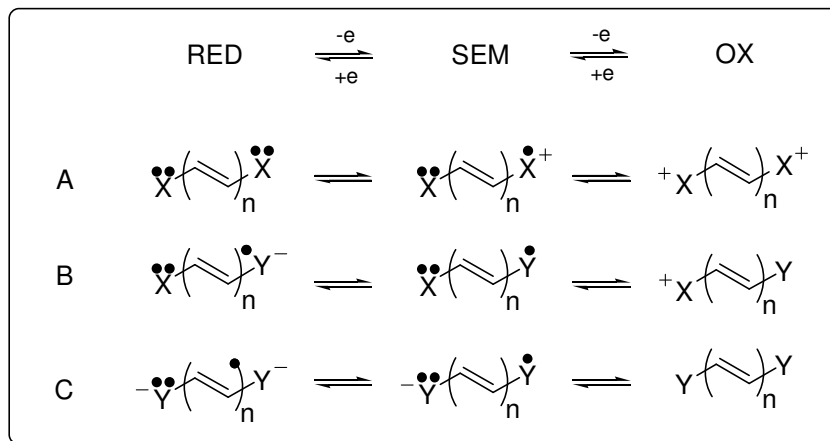
Für die Untersuchung von weitreichendem Elektronentransfer bei dem nur ein einzelnes Elektron injiziert wird, wäre also ein Detektorsystem von Vorteil, das sehr leicht zu reduzieren ist (thermodynamische Triebkraft und Elektronenfalle) und außerdem schnell reagiert. Das Elektron sollte also abgefangen und dort detektiert werden und nicht weitertransferiert werden ohne dabei detektiert zu werden, wie es im T-Dimersystem der Fall ist.

Das System von Rokita *et al.* ist leichter zu reduzieren als das T-Dimer und scheint außerdem schneller/empfindlicher zu reagieren (vgl. auch die Messungen von Lewis *et al.*, Kap. 3.1.2), was der Grund für das Beobachten der Sequenzabhängigkeit und der bevorzugten Richtung (5' nach 3') ist.^[68, 69] Untersuchungen mit dem von ihm verwendeten Detektorsystem 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) und dem hier synthetisierten Injektorsystem α -[(R,S)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin könnten interessante Ergebnisse liefern. Denn auch das von Rokita *et al.* verwendete Injektorsystem TMDN hat den Nachteil, daß keine definierte Ladungsmenge injiziert wird. Untersuchungen mit T_x als Injektor- und BrdU als Detektorsystem könnten Elektronentransferexperimente über längere DNA-Sequenzen mit einem Elektron möglich machen.

9.1 Redoxindikatoren

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden außerdem Redoxindikatoren auf ihre mögliche Verwendung als Detektorsystem für den Überschusselektronentransfer untersucht. Nachfolgende Systeme sind Redoxindikatoren, die stufenweise zwei Elektronen aufnehmen bzw. abgeben können. Generell gibt es davon drei verschiedene Typen - A, B und C, wobei die mittlere Oxidationsstufe (SEM) ein Radikalkation, ein Radikalanion oder ein neutrales

Radikal sein kann (Schema 9.1).^[93] Bei den von Hünig *et al.* untersuchten Systemen (Weitz-Typ) sind die Atome X und Y Teil eines cyclischen π -Systems und haben in der reduzierten Form chinoiden, in der oxidierten Form aromatische Eigenschaften. Die mittlere Oxidationsstufe hat semichinoiden Charakter.



Schema 9.1: zweistufige Oxidation bzw. Reduktion von Redoxsystemen des Weitz-Typs.

	A	B	C
R^1	CH ₃	CH ₃	-
R^2	CH ₃	-	-
	$2.8 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^{12}$	$3.7 \cdot 10^{11}$
	$8 \cdot 10^{13}$	$3.7 \cdot 10^{15}$	$3.7 \cdot 10^{14}$
	$2.4 \cdot 10^{12}$	$4.1 \cdot 10^{21}$	$1.6 \cdot 10^{15}$

Schema 9.2: Vergleich der Semichinonbildungskonstanten K_{SEM} für iso- π -elektronische Redoxsysteme des Typs A, B und C in DMF gegen Ag/AgCl in Acetonitril.^[93]

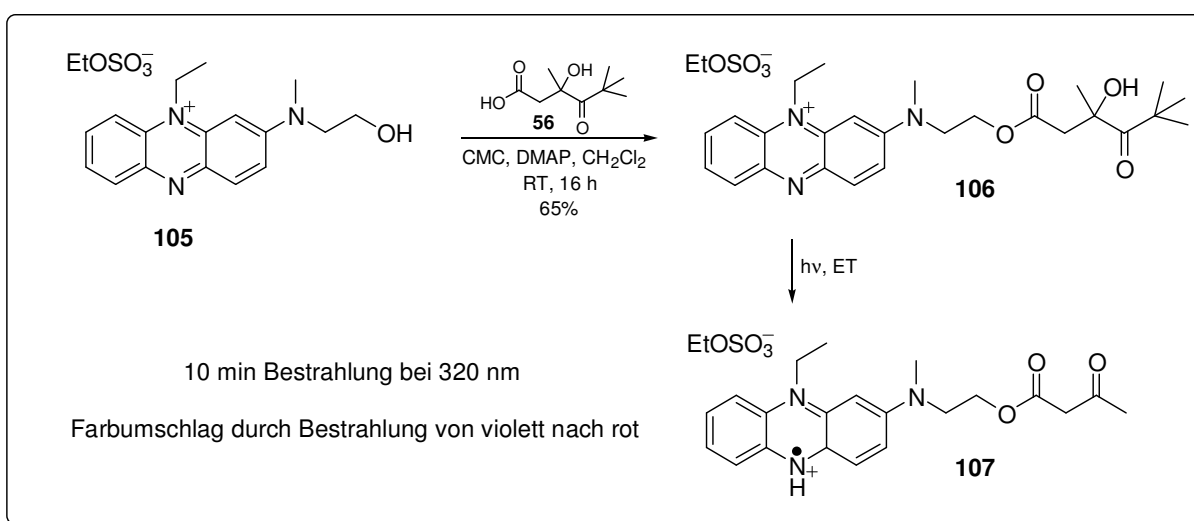
Elektronenschiebende Substituenten an X bzw. Y erschweren die Reduktion, elektronenziehende die Oxidation. Die stufenweise (reversible) Oxidation bzw. Reduktion kann mit UV/VIS beobachtet werden.^[93]

Am meisten untersucht wurden Systeme des Typs A, in Schema 9.2 ist aber ein Vergleich der unterschiedlichen Typen A, B und C für die Bildungskonstante des Semichinons für drei Moleküle dargestellt. Für alle drei untersuchten Verbindungen nimmt die thermodynamische Stabilität der Radikale in der Reihenfolge $SEM_A^+ < SEM_C^+ < SEM_B^+$ zu. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil das neutrale Radikal des Typs B, SEM_B , kinetisch instabil ist. Diese unerwartete Stabilität kann dadurch erklärt werden, daß der reduzierte Zustand RED^- oft nicht generiert werden kann.^[93] Daß SEM_A^+ weniger stabil ist als SEM_C^+ , war hingegen bereits aus anderen Untersuchungen bekannt.^[93]

9.1.1 Phenazin-Derivate des Typs B

Besonders stabil sind die SEM-Stufen von Phenazin-Derivaten (Zeile 3, Schema 9.2). Am stabilsten sind Verbindungen des Typs B. Die Heterocyclen haben sehr niedrige Redoxpotentiale (im Bereich von -0.3 bis -1.0 V) und sind daher als Detektorsystem, das leicht durch Ketalradikalanion und Thyminradikalanion reduziert werden kann, geeignet.^[94]

Von T. Carl wurden im Rahmen seiner Doktorarbeit Untersuchungen mit Phenazinium-Verbindungen (Typ B) durchgeführt.^[86] Hierfür wurde der Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) mit dem von Chattopadhyaya *et al.* entwickelten 2-[(*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl)amino]-9-ethylphenazinium-ethylsulfat (**105**)^[95] gekuppelt und das resultierende Photoedukt (**106**) in wässriger Lösung bestrahlt (Schema 9.3).



Schema 9.3: Synthese und Bestrahlung eines mit dem Injektorbaustein gekuppelten Phenaziniumderivats.^[86]

Durch Bestrahlung erhält man die SEM-Stufe **107**, da nur ein Elektron übertragen wird. Beobachtet wurde ein Farbumschlag von violett (Photoedukt, **106**) nach rot/orange nach der Bestrahlung. Daß das Phenazyradikal **107** entsteht, konnte durch ESI-Messungen nachgewiesen werden. Auch im UV-Spektrum waren Veränderungen zu sehen. Die Absorptionsbanden des Photoeduktes nahmen stark an Intensität ab. Da durch den Elektronentransfer das aromatische System zerstört wird, kann die Reaktion nicht wie üblich per HPLC verfolgt werden, da die entstehende Verbindung nicht genügend absorbiert um im HPLC beobachtet zu werden. Die Angabe einer Ausbeute ist durch HPLC-Analytik nicht möglich.

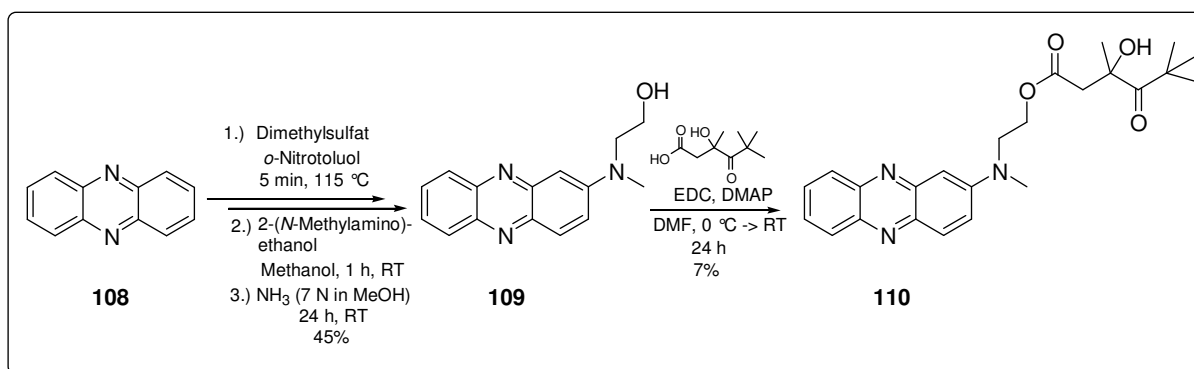
Daß 2-[(*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl)amino]-9-ethylphenazinium-ethylsulfat (**106**) ein guter Elektronenakzeptor ist, konnte außerdem durch Zugabe eines Äquivalents des Phenaziniumsalses zum *N*-verknüpften Photoedukt 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymine - dem in Kapitel 5 näher beschriebenen Modellsystem - und Bestrahlung der Mischung gezeigt werden.^[86] Durch intermolekularen Elektronentransfer auf das Phenaziniumderivat, das als Elektronenakzeptor für das Ketylradikalanion fungiert, konnte die Ausbeute an Ketoprodukt massiv gesteigert werden [pH 9 = 1 : 1 (ohne Phenaziniumsals: 1 : 36), pH 7 = 3 : 1 (ohne Phenaziniumsals: 1 : 25), pH 4 = 5 : 1 (ohne Phenaziniumsals: 1 : 36)]. Daß bei pH 4 die Änderung durch Zugabe des Phenaziniumsalses - eines sehr guten Elektronenakzeptors - nicht sonderlich groß ist, bestätigt die in Kap. 5 gemachten Aussagen, daß Thymine, wenn es im Neutralzustand vorliegt ein guter Akzeptor für den Elektronentransfer ausgehend vom Ketylradikalanion ist.

Phenaziniumsalses sollten also als leicht zu reduzierendes alternatives Akzeptorsystem verwendet werden können.

Da die von T. Carl untersuchten Phenaziniumsalses jedoch synthetisch schwierig zu handhaben sind und die Modifikation und der Einbau in Oligonucleotide nicht so einfach machbar sind, wie es bei Neutralverbindungen der Fall sein sollte, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Phenazinderivat des Typs C (vgl. Schema 9.2) näher untersucht. Die SEM-Stufe ist auch hier noch relativ stabil - wenn auch nicht ganz so, wie die von Typ B. Auch dieses Phenazinderivat ist relativ leicht zu reduzieren (E_{Red} im Bereich von -0.3 bis -1.0 V).^[94] 2-[(*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl)aminophenazin (**109**) wurde für diese Untersuchungen als Phenazinderivat ausgewählt und mit dem Injektorbaustein gekuppelt.^[96]

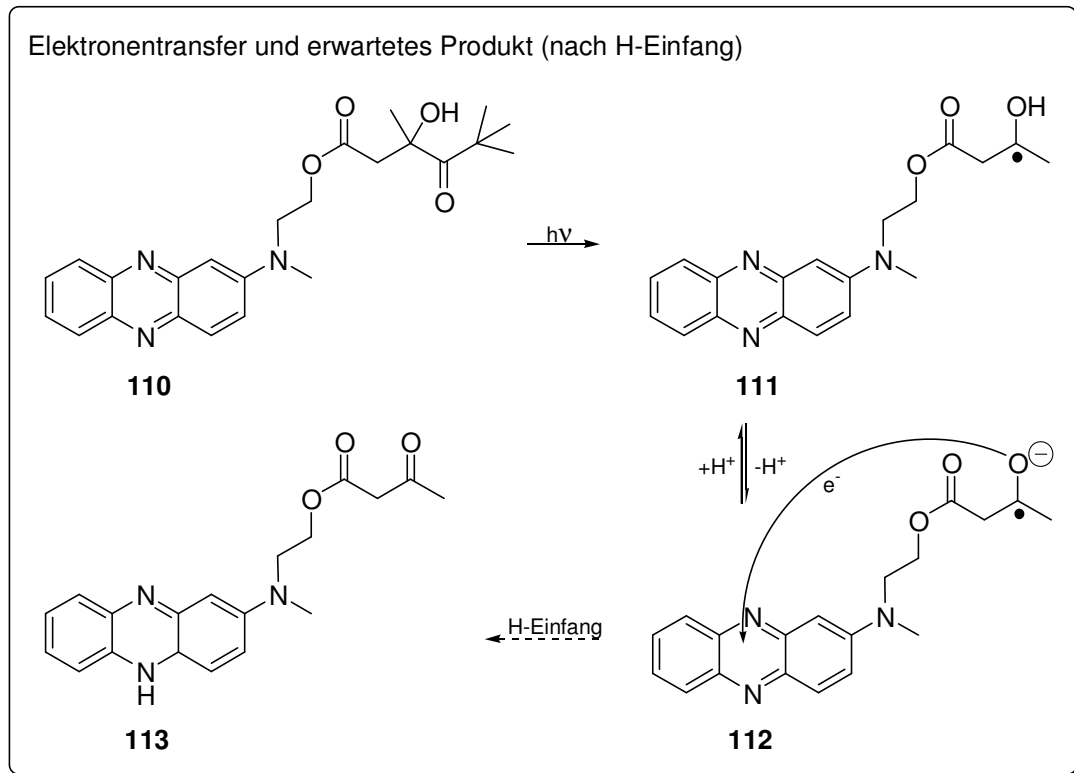
9.1.2 Phenazin-Derivate des Typs C

Für die Untersuchungen wurde 2-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl]aminophenazin (**109**) mit dem in Kap. 6.1 dargestellten Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) gekuppelt (Schema 9.4). **109** konnte ausgehend von Phenazin (**108**) in drei Stufen erhalten werden. Phenazin wurde hierfür mit Dimethylsulfat zum einfach *N*-substituierten Phenaziniumsalz umgesetzt. Dieses bildete bei Zugabe von 2-(*N*-Methylamino)-ethanol das Phenaziniumderivat. Die Methylgruppe konnte mit methanolischer Ammoniaklösung (7 N in MeOH) abgespalten werden und man erhielt das gewünschte 2-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl]aminophenazin (**109**) in 45% Ausbeute über drei Stufen. Wichtig war, die Abspaltung in methanolischer Ammoniaklösung durchzuführen. Wässrige Ammoniaklösung (wie beschrieben) lieferte nicht das gewünschte Produkt. Die Kupplung mit dem Injektorbaustein nach Standardmethoden lieferte Photoedukt (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)ethylester (**110**) in 7% Ausbeute.



Schema 9.4: Synthese eines mit dem Injektorbaustein gekuppelten Phenazinderivats.

Das so erhaltene Photoedukt wurde in Methanol gelöst (10^{-4} M) und nach den üblichen Bedingungen in einer 3 ml Quarzküvette mit einem 320 nm Steilkantenfilter 10 min bestrahlt. Vor Beginn der Bestrahlung und nach 10 min Bestrahlung wurde ein UV-Spektrum der Probe aufgenommen (Schema 9.5). Nach zehnminütiger Bestrahlung konnten noch 27% des Photoeduktes detektiert werden. Da bei der nach Norrish I-Reaktion erfolgten Spaltung ein Elektronentransfer auf das Phenazingerüst stattfindet und das aromatische System so zerstört wird, kann man im UV-Spektrum nur die Abnahme des Photoeduktes sehen (gleiches gilt für HPLC-Messungen). Die Ausbeute ist also bezogen auf die Abnahme der UV-Signale des Photoeduktes angegeben (Abb. 9.1).



Schema 9.5: Elektronentransfer und evtl. H-Einfang beim Bestrahlen des Phenazinderivates.

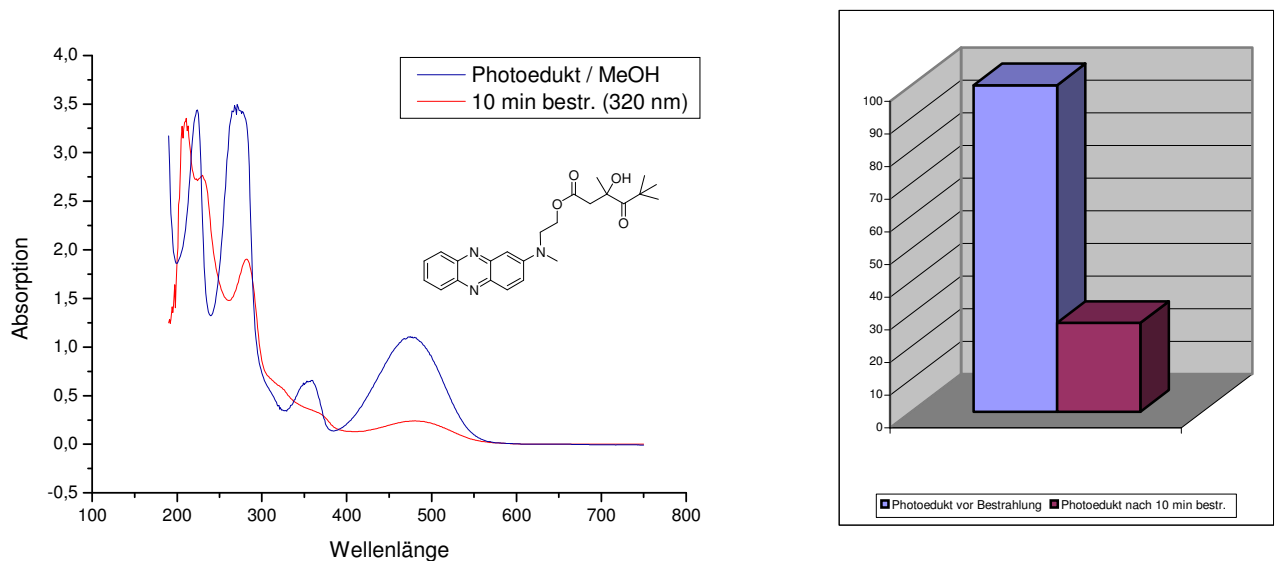
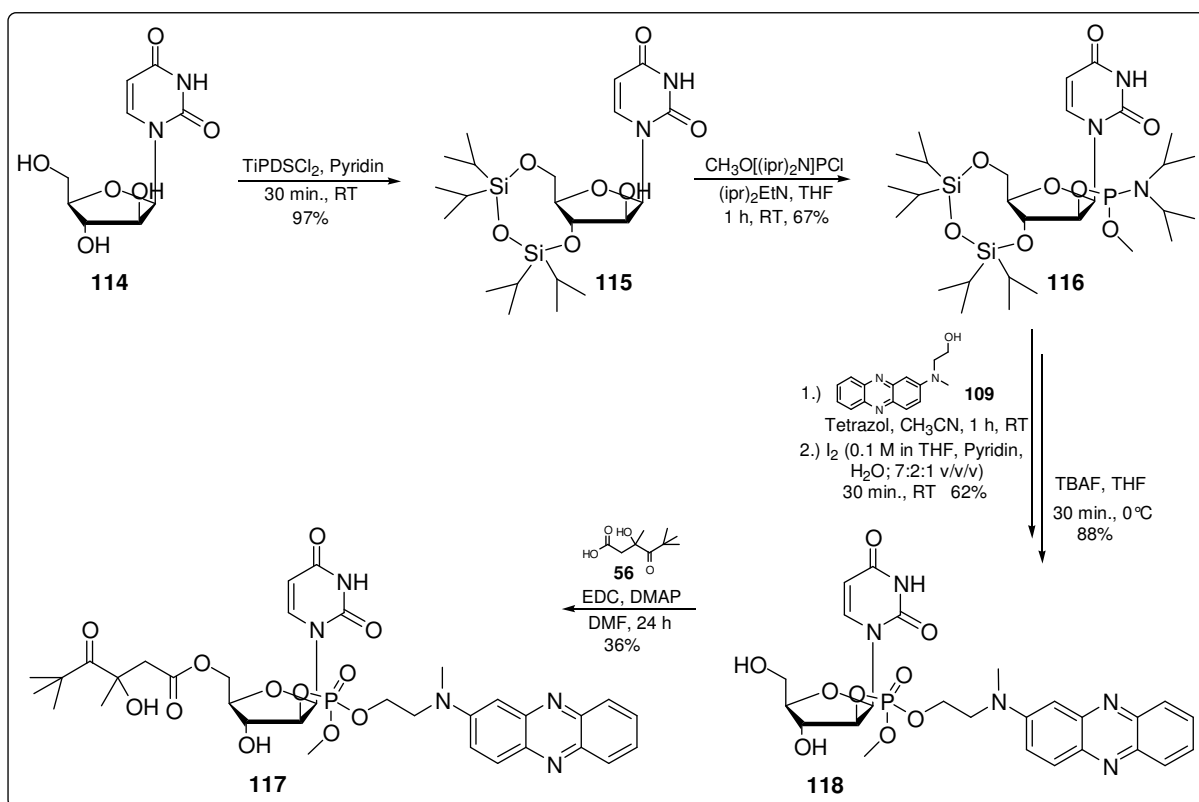


Abbildung 9.1: Bestrahlung von (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)ethylester **110**, Abnahme des Photoeduktes (bzgl. 486 nm-Signal).

Um zu überprüfen, ob die Abnahme an Photoedukt tatsächlich auf den Elektronentransfer zurückzuführen ist, wurde 2-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl]aminophenazin (**109**) - der Redoxindikator ohne Injektorbaustein - unter den gleichen Bedingungen bestrahlt. Hier konnte keine Abnahme der Signale des Phenazingerüsts beobachtet werden. Die Abnahme der Photoeduktssignale kann also als Maß für die Effizienz des Elektronentransfers auf das

Phenazinderivat herangezogen werden. Daß dabei tatsächlich das Elektronentransferprodukt gebildet wird, konnte durch massenspektroskopische Untersuchungen der Bestrahlungslösung bewiesen werden [MS (ESI, m/z) nach 10 min Bestrahlung: 424.4 (MH^+ , 100, Photoedukt, **110**), 339.4, 338.5 (MH^+ , 12, M^+ , 58, Produkt, **113**), vgl. Schema 9.5].

Ebenfalls untersucht wurde ein modifiziertes Nucleosid - Arabinouridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-ester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]phosphat (**118**). Das Arabinose-Zuckergerüst wurde an 5'-Position mit dem Injektorbaustein (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**), an 2'-Position mit dem Redoxindikatorbaustein 2-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl]aminophenazin (**109**) derivatisiert, die Nucleobase war Uracil. Das Photoedukt konnte ausgehend von Uracil-1- β -D-arabinofuranosid (**114**) in 13% Ausbeute erhalten werden (Schema 9.6).



Schema 9.6: Synthese und Bestrahlung eines den Injektorbaustein und das Phenazinderivat enthaltenden Nucleotids.

Die Arabinose wurde hierfür mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan an 3' und 5' geschützt (97% Ausbeute).^[97] Durch Umsetzung mit Hünig-Basis und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchloro-phosphoramidit konnte am 2' das Phosphoramidit **116** erhalten werden (67% Ausbeute), welches in Gegenwart von Tetrazol in Acetonitril mit dem Redoxindikator gekuppelt wurde. Nach Oxidation mit Iod erhielt man 3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-

disiloxyl-arabino-uridin-2'-[*O*-methyl]-(*O*-2-(*N*-methyl)-aminophenazin-(2-*N*-ethyl)-phosphat (**117**) in 62% Ausbeute. Dieses wurde mit TBAF an 3' und 5' entschützt (88% Ausbeute) und dann an 5' mit EDC und DMAP mit dem Injektorbaustein gekuppelt. Man erhielt Arabinouridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäureester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)amino-phenazin-2-*N*-ethyl]phosphat (**118**) in 36% Ausbeute.

Das Photoedukt wurde in Methanol gelöst (10^{-4} M) und nach den üblichen Bedingungen in einer 3 ml Quarzküvette mit einem 320 nm Steilkantenfilter 10 min bestrahlt. Vor Beginn der Bestrahlung und nach 10 min Bestrahlung wurde ein UV-Spektrum der Probe aufgenommen (Abb. 9.2). Nach zehnminütiger Bestrahlung konnten noch 48% des Photoeduktes detektiert werden. Da auch hier durch den Elektronentransfer auf das Phenazingerüst das aromatische System so zerstört wird, kann man im UV-Spektrum nur die Abnahme des Photoeduktes sehen (gleiches gilt für HPLC-Messungen). Die Ausbeute ist also bezogen auf die Abnahme der UV-Signale des Photoeduktes angegeben (Abb. 9.2).

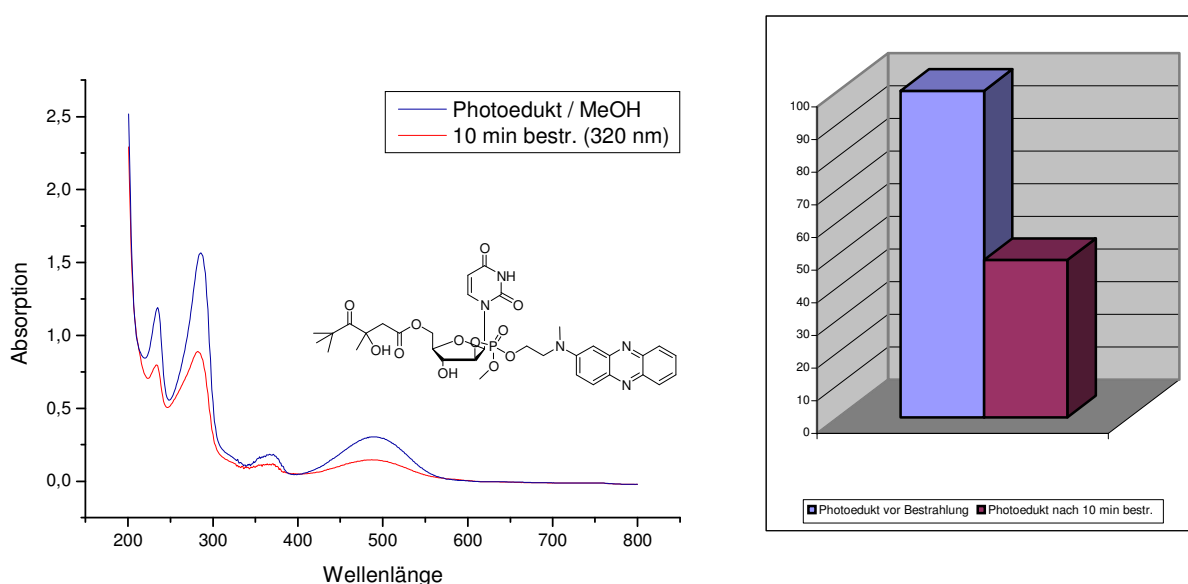
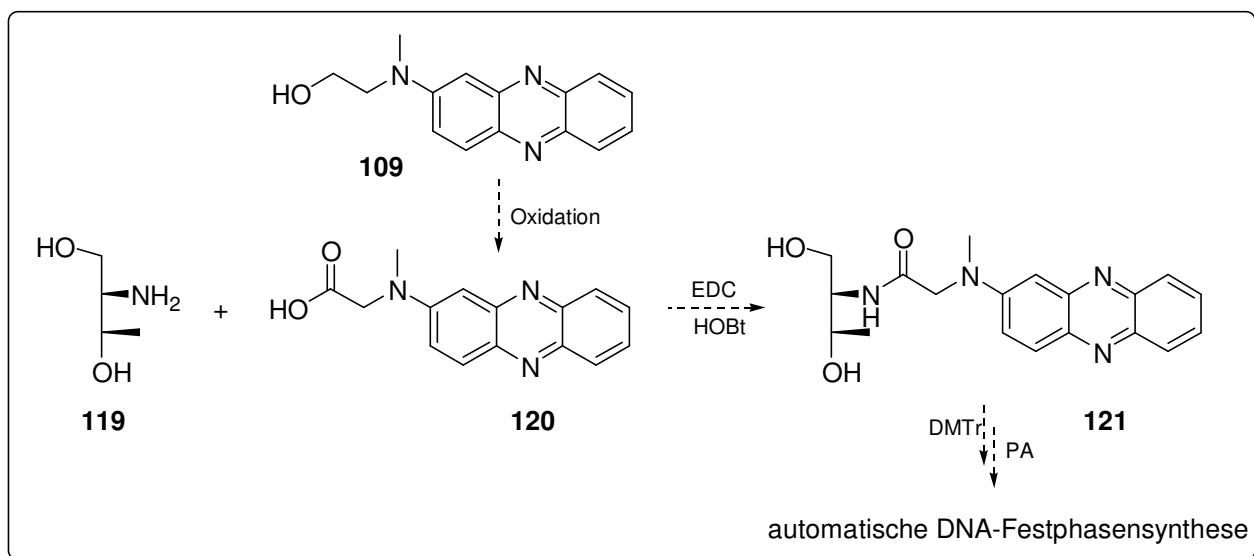


Abbildung 9.2: Bestrahlung von Arabinouridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-ester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]phosphat **118**, Abnahme des Photoeduktes (bzgl. 486 nm-Signal).

Auch hier konnte noch eine deutliche Abnahme des Photoeduktes (auf 48%) festgestellt werden, die zeigt, daß auch über eine größere Distanz Elektronentransfer stattfindet. Im Gegensatz zum direkt mit dem Injektorbaustein gekuppelten Phenazinderivat liegen hier zwischen Donor (Ketylradikalanion) und Akzeptor (Redoxindikator) 14 Einfachbindungen. Außerdem ist als Base Uracil enthalten, das ebenfalls vom Radikalanion ($E^0 = -2.5$ V) reduziert werden kann. Uracil ist sogar leichter zu reduzieren als Thymin [$E_{\text{red}}(\text{Uracil}) = -2.07$ V, $E_{\text{red}}(\text{Thymin}) = -2.18$ V]. Trotz der Tatsache, daß das Elektron eine lange Strecke zurücklegen muß und durch die Reduktion des Uracils einen alternativen Reaktionsweg (über

8 Bindungen) hat, findet man nur noch 48% des Signals des intakten Phenazins. Phenazinderivate sollten daher als leicht zu reduzierende Substanzen für die Untersuchung des Elektronentransfers in DNA geeignet sein und aufgrund der leichten Reduzierbarkeit und der damit verbundenen thermodynamischen Triebkraft größere Elektronentransferausbeuten detektieren, als das mit dem T-Dimer-System möglich ist. Die Analytik ist hier jedoch nicht so einfach wie im T-Dimer-System, bei dem ein Strangbruch entsteht und so Analyse und Quantifizierung der Strangbruchprodukte per HPLC und MALDI durchgeführt werden kann.

Für den Einbau eines solchen Phenazinderivates könnte Verbindung **118** verwendet werden. Bei Verknüpfung des Phenazinderivates über die 3'-Position der Arabinose bindet der Phenazinlinker jedoch schwach von außen an die heterocyclischen Basen des DNA-Duplexes (Fluoreszenzuntersuchungen).^[97] Das Phenazinderivat ist demnach nicht in die DNA interkaliert, sondern liegt außerhalb des Basenstapels, was zu geringeren Detektionsausbeuten führen könnte. Eine andere Möglichkeit, das Phenazinderivat in DNA einzubauen, wäre über ein L-Threoninol-Grundgerüst (**119**) nach der Methode von Shimidzu *et al.* (Schema 9.7).^[98]



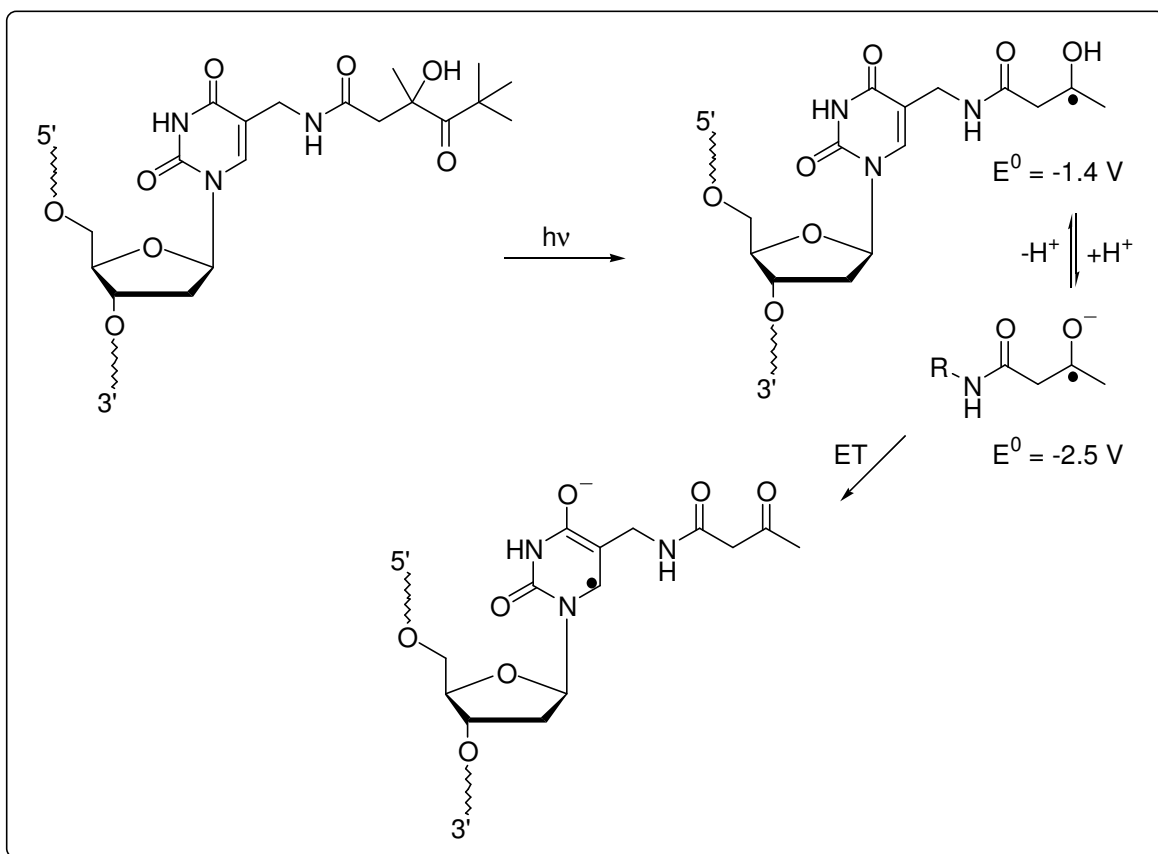
Schema 9.7: möglicher Syntheseweg zum Einbau des Phenazin-Derivates in den DNA-Doppelstrang.

Untersuchungen mit diesem Detektorsystem und evtl. auch dem Detektorsystem von Rokita (BrdU) könnten weitere interessante Ergebnisse zum Elektronentransfer in DNA ermöglichen. Durch ein schnelles Detektorsystem mit einem niedrigen Reduktionspotential sollten Aussagen über den weitreichenden Elektronentransfer eines einzelnen Elektrons, das mit dem im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Injektionssystem regioselektiv injiziert werden kann, möglich sein.

10 Zusammenfassung und Ausblick

Nachdem der Transfer einer positiven Ladung durch DNA (Lochtransfer) in den letzten Jahren Ziel intensiver Forschungen war und die Ladungstransfermechanismen untersucht und aufgeklärt worden waren, sollten im Rahmen dieser Arbeit Studien zum Transfer negativer Ladung durch DNA (Überschußelektronentransfer) durchgeführt werden. Der Überschusselektronentransfer ist weit weniger untersucht und erst seit kurzem ins Zentrum des Interesses gerückt.

Vorgestellt wurde hier die Entwicklung eines neuen Injektionssystems, das regiospezifisch ein einzelnes Elektron in die DNA injizieren kann. Die Experimente basierten auf *tert.*-Butylketonen, die bei Photolyse in einer Norrish I-Reaktion ein Radikal erzeugen, welches zum Radikalanion deprotoniert werden kann. Das Radikalanion ist aufgrund seines stark negativen Reduktionspotentials ($E^0 = -2.5 \text{ V}$) in der Lage ein Elektron auf die am leichtesten zu reduzierende Nucleobase Thymin ($E_{\text{Red}} = -2.18 \text{ V}$) zu übertragen. Durch die Kupplung einer *tert.*-Butyleinheit an Thymidin konnte ein Injektormolekül synthetisiert werden, das die Injektion eines Elektrons in den Doppelstrang ermöglicht und für die automatische DNA-Festphasensynthese geeignet ist. Die zuerst reduzierte Thyminbase kann das Elektron dann an benachbarte Thyminbasen abgeben.



In Experimenten an Modellsystemen konnte gezeigt werden, daß das Radikalanion das Elektron effizient ($\geq 90\%$) auf Thymin überträgt. Die Injektion auf das Thymin ist schneller als $k = 10^6 \text{ s}^{-1}$, was durch Untersuchungen in Gegenwart von H-Donoren gezeigt werden konnte. Die Generierung des Thymylradikals konnte durch ESR-spektroskopische Untersuchungen bewiesen werden.

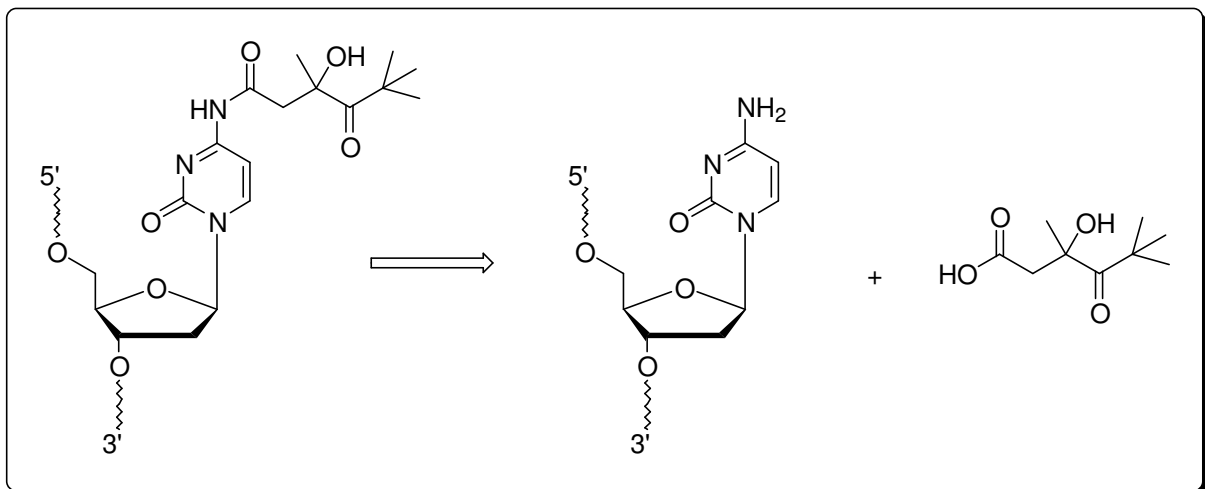
Das modifizierte Nucleotid kann in guten Ausbeuten in die DNA eingebaut werden und stört die Struktur der B-DNA nicht, es konnte sogar eine stabilisierende Wirkung festgestellt werden (Erhöhung der Schmelztemperatur).

Experimente im DNA-Doppelstrang, die in Zusammenarbeit mit T. Carell von T. Carl durchgeführt wurden, zeigten, daß das Elektron effizient in den DNA-Strang injiziert und über Thyminbasen transportiert werden kann. Die Detektion erfolgte durch Cycloreversion eines T-Dimeres. Der Transport über Thyminbasen verläuft nach dem Hopping-Mechanismus ($\beta = 0.13 \text{ \AA}^{-1}$, $\eta = 1.80$). Die Elektronentransfergeschwindigkeit für den Überschußelektronentransfer ist $\geq 10^9 \text{ s}^{-1}$, wie durch die Konkurrenzreaktion zwischen Cycloreversion und ET ausgehend vom T-Dimerradikalanion gezeigt werden konnte. Das Elektron kann nach Spaltung eines T-Dimeres weitertransferiert werden und so in katalytischer Weise mehrere Strangschäden reparieren.

Durch die Einführung eines neuen, schnelleren Detektionssystems könnte Elektronentransfer über größere Distanzen untersucht werden. Ein mögliches System für solche Untersuchungen wäre das von Rokita *et al.* vorgestellte BrdU, eine andere Möglichkeit könnten Phenazinderivate sein. Diese Systeme bilden bei Aufnahme eines Elektrons eine stabile SEM-Stufe aus. Vorexperimente zeigten, daß ein Elektron durch das Radikalanion auf das Phenazingerüst übertragen werden kann.

Ein interessantes Ziel für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet wäre also einerseits die Suche nach einem neuen Injektorsystem. Andererseits wurde mit dem hier vorgestellten Injektorsystem eine starke Sequenzabhängigkeit bzgl. G:C-Basenpaaren festgestellt, was darauf zurückzuführen ist, daß über das Thyminradikalanion Ladung injiziert wird und ausgehend von dort Cytosin, welches ein stärker negatives Reduktionspotential ($E_{\text{red}} = -2.35$) als Thymin hat, nur schlecht in einem endothermen Prozeß reduziert werden kann. Um Elektronentransfer über G:C-Basenpaare untersuchen zu können, wäre die Darstellung einer

modifizierten Cytosinbase ebenfalls interessant (vgl. Abb.). Der *tert.*-Butylbaustein könnte über die Aminofunktion an Cytosin gekoppelt werden. Die Reduktionskraft des Radikalanions reicht für den Elektronentransfer auf die gekoppelte Cytosinbase aus. Der Linker ist sogar um eine Bindung kürzer als im Falle des modifizierten Thymins. Durch selektive Injektion eines einzelnen Elektrons auf eine Cytosinbase und anschließendem Elektronentransfer auf benachbarte Cytosinbasen könnte untersucht werden, inwieweit die vielfach diskutierte Protonierung des Cytosinradikalanions durch Guanosin zum C(H)[•] Einfluß auf Effizienz und Geschwindigkeit des Überschusselektronentransfers hat. Ein direkter Vergleich mit dem Hopping über Thyminbasen wäre möglich.



Experimenteller Teil

1 Allgemeines

Schmelzpunkte

Gerät: Büchi 530. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Siedepunkte

Gerät: Kugelrohr-Destillationsapparatur GKR-51 der Firma Büchi. Die angegebenen Siedepunkte beziehen sich auf die Temperatur des Luftbades.

Elementaranalysen

Geräte: Leco CHN-900 (C-, H-, N-Nachweis), Leco RO-478 (O-Nachweis). Die Elementaranalysen wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Basel von Herrn W. Kirsch durchgeführt. Die Angaben erfolgen in Massenprozenten.

Massenspektren

Geräte: Doppelfokussierende Massenspektrometer VG70-250 und Finnigan MAT 312. Die Massenspektren wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Basel von Herrn Dr. H. Nadig durchgeführt. Die Ionenerzeugung erfolgt durch Elektronenstoßionisation (EI) oder durch Beschuß mit Xenonatomen (FAB) unter Verwendung von Nitrobenzylalkohol als Matrix und KCl als Zusatz. Die Angaben erfolgen in atomaren Masseneinheiten pro Ladung (m/z). Die Intensitäten der Signale sind jeweils in Prozent bezogen auf das Basision in Klammern angegeben.

Gerät: Finnigan MAT LCQ, oktapoliges Massenspektrometer. Die Analysenproben wurden in Lösung direkt injiziert. Die Ionenerzeugung erfolgte durch Elektronenstoßionisation (LCQ, Elektrospray-Massenspektrometrie). Alle Angaben beziehen sich auf atomare Masseneinheiten pro Elementarladung (m/z , Intensität).

IR-Spektroskopie

Gerät: Perkin-Elmer-1600 Series FT-IR. Die Lage der Absorptionsbanden ist in cm^{-1} angegeben. Die Spektren wurden durch Überlagerung von vier Einzelspektren abzüglich des Hintergrundspektrums erhalten. Die Substanzen wurden als KBr-Preßling bzw. als Film vermessen.

UV/VIS-Spektroskopie

Gerät: Perkin-Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 2. Die Wellenlängen (λ) der Absorptionsmaxima sind in nm angegeben, die Extinktionskoeffizienten (ϵ) in $\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Kernresonanzspektroskopie

^1H -NMR-Spektren: Varian Gemini 300 (300 MHz)

Bruker DPX-400 (400 MHz)

Bruker DRX-500 (500 MHz)

^{13}C -NMR-Spektren: Varian Gemini 300 (75.5 MHz)

Bruker DPX-400 (101.0 MHz)

Bruker DRX-500 (125.8 MHz)

^{31}P -NMR-Spektren: Bruker DPX-400 (162.0 MHz)

Die Messung erfolgte in deuterierten Lösungsmitteln mit Tetramethylsilan als internem Standard ($\delta_{\text{TMS}} = 0.0$ ppm). Die chemischen Verschiebungen sind in Bezug auf die δ -Skala, Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz) angegeben. Die Signalmuster wurden wie folgt beschrieben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett), b (breit). Bei aufgespaltenen Signalen mit definierter Multiplizität ist die Verschiebung durch das arithmetische Mittel der Signallinien charakterisiert. Bei Multipletts ist der Bereich angegeben. Die Auswertung der ^1H -NMR-Spektren erfolgte - sofern nicht ausdrücklich anders angegeben - nach 1. Ordnung.^[99-100] Die Bezifferung der Wasserstoffatome entspricht in allen Fällen der Bezifferung der Kohlenstoffatome. 1- H_a ist das hochfeldverschobene Wasserstoffatom am Kohlenstoffatom C-1, 1- H_b das tieffeldverschobene.

Falls notwendig erfolgte die Zuordnung der Signale durch COSY-, HMQC-, HMBC-, ROESY- und NOESY-Messungen.

Bei der ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurden die relativen Lagen der Signale mit Hilfe der ^1H -Breitband-Entkopplung ermittelt, während die Multiplizitäten der einzelnen Linien aus DEPT 135 -Spektren bestimmt wurden. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die folgenden Lösungsmittelsignale: $\delta = 77.0$ (Chloroform- d_1), $\delta = 49.9$ (Methanol- d_4) und $\delta = 39.5$ (Dimethylsulfoxid- d_6). Zur Signalkennzeichnung wurden folgende Abkürzungen verwendet: C_p = primäres C-Atom, C_s = sekundäres C-Atom, C_t = tertiäres C-Atom, C_q = quartäres C-Atom und C_{ar} = aromatische C-Atome. Die Bestimmung von Diastereomerenverhältnissen aus den ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte durch Mittelwertbildung der Intensitäten getrennter signalpaarentsprechender Kohlenstoffatome im breitband-entkoppelten Spektrum; ähnliche Relaxationszeiten wurden dabei vorausgesetzt.^[100-101]

Bei der ^{31}P -NMR-Spektroskopie sind die chemischen Verschiebungen (δ) in ppm bezogen auf ortho-Phosphorsäure ($\delta = 0.0$) als externe Referenz in Chloroform- d_1 als Lösungsmittel angegeben. Die chemische Verschiebung (δ) wird durch das arithmetische Mittel der Signallinien charakterisiert und die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz angegeben. Die Signale wurden wie folgt bezeichnet: d = Dublett und t = Triplet.

Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurden DC-Aluminiumfolien Kieselgel Si 60 F $_{254}$ der Firma Merck. Die verwendeten Laufmittelgemische sind beim jeweiligen Versuch angegeben. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe (254 nm) bzw. durch Tauchen eine Cerammoniumsulfatlösung (10 g Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat, 25 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, 100 ml konzentrierte Schwefelsäure und 900 ml Wasser) und anschließende Erwärmung. Alternativ wurden noch eine Permanganatlösung (3 g Kaliumpermanganat, 5 ml 5%ige Natronlauge, 20 g Kaliumcarbonat und 300 ml Wasser) und für freie Amine eine Ninhydrinlösung (0.2 g Ninhydrin in 100 ml Ethanol) mit anschließendem Erwärmen eingesetzt.

Säulenchromatographie, Blitzchromatographie (Filtration über Kieselgel)

Die Flash-Säulenchromatographie wurde unter erhöhtem Druck durchgeführt (~ 1.5 bar, Aquariummembranpumpe) an Kieselgel C 560 KV (35-70 µm) der Firma Uetikon, Kieselgel 60 (40-63µm) der Firma Merck oder Kieselgel 60 (40-63 µm) der Firma Fluka. Für Säulenchromatographie wurde die stationäre Phase 15 cm hoch gepackt, für Blitzchromatographie ca. 5 cm hoch. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Die angegebenen Lösungsmittelverhältnisse bei Gemischen beziehen sich auf Volumenanteile.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Gerät: Waters Alliance mit einem *photodiode array detector*.

Es wurden Merck LiChroCART® 250-4 Säulen (LiChrospher 100 RP-18e, 250 x 4 mm, 5 µm) verwendet. Der Fluß betrug 1 ml/min. Verwendet wurde - wenn nicht ausdrücklich anders angegeben - folgendes Gradientenprogramm: 90% A (5 min), 90% B (15 min); A = Wasser (nanopur), B = Acetonitril.

Die Zuordnung der Reaktionsprodukte (betrachtete Wellenlänge: 254 nm) erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten von Referenzverbindungen und anschließender Koinjektion bzw. Elektrospray-Massenspektrometrie der gesammelten und lyophilisierten Produkte. Die HPLC-Ausbeuten wurden mit den ermittelten Flächenfaktoren bezogen auf einen internen Standard bestimmt.

Bestrahlungsapparatur

Gerät: Bestrahlungsstand der Firma ORIEL 68810, mit einer Quecksilberkurzbogenlampe von Osram (HBO 500 W/2) und 305, 320 sowie 335 nm Steilkantenfilter (3 mm x 50 mm x 50 mm) der Firma Schott. Bei der angegebenen Wellenlänge beträgt die Lichtdurchlässigkeit ca. 50 %. Für die Bestrahlung wurden außerdem Präzisions-Küvetten der Firma Hellma aus Quarzglas SUPRASIL® (10.00 mm) verwendet.

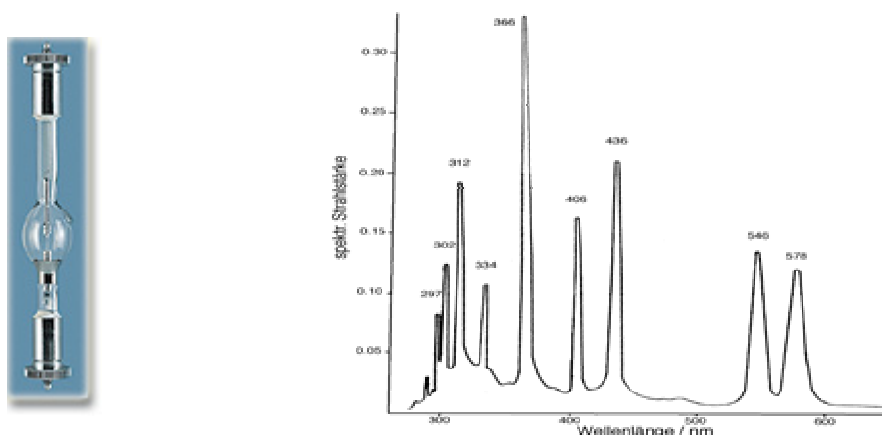


Abbildung 1.1: Hg-Kurzbogenlampe und ihre spektrale Strahlstärkeverteilung.

Lösungsmittel und Reagenzien

Diethylether und THF wurden nach Standardvorschriften über Natrium oder Natriumhydrid frisch absolutiert. Die weiteren absoluten Lösungsmittel wurden von der Firma Fluka Chemie AG bezogen und ohne zusätzliche Reinigung direkt eingesetzt. Die übrigen Lösungsmittel und Reagenzien für chemische Umsetzungen wurden von Aldrich, Acros Organics, Fluka Chemie AG, Lancaster, Riedel-de Haën und J. T. Baker bezogen und ebenfalls direkt eingesetzt. Die technischen Lösungsmittel für die chromatographischen Trenngänge wurden jeweils vor Gebrauch frisch destilliert.

Produktreinigung und Aufarbeitung

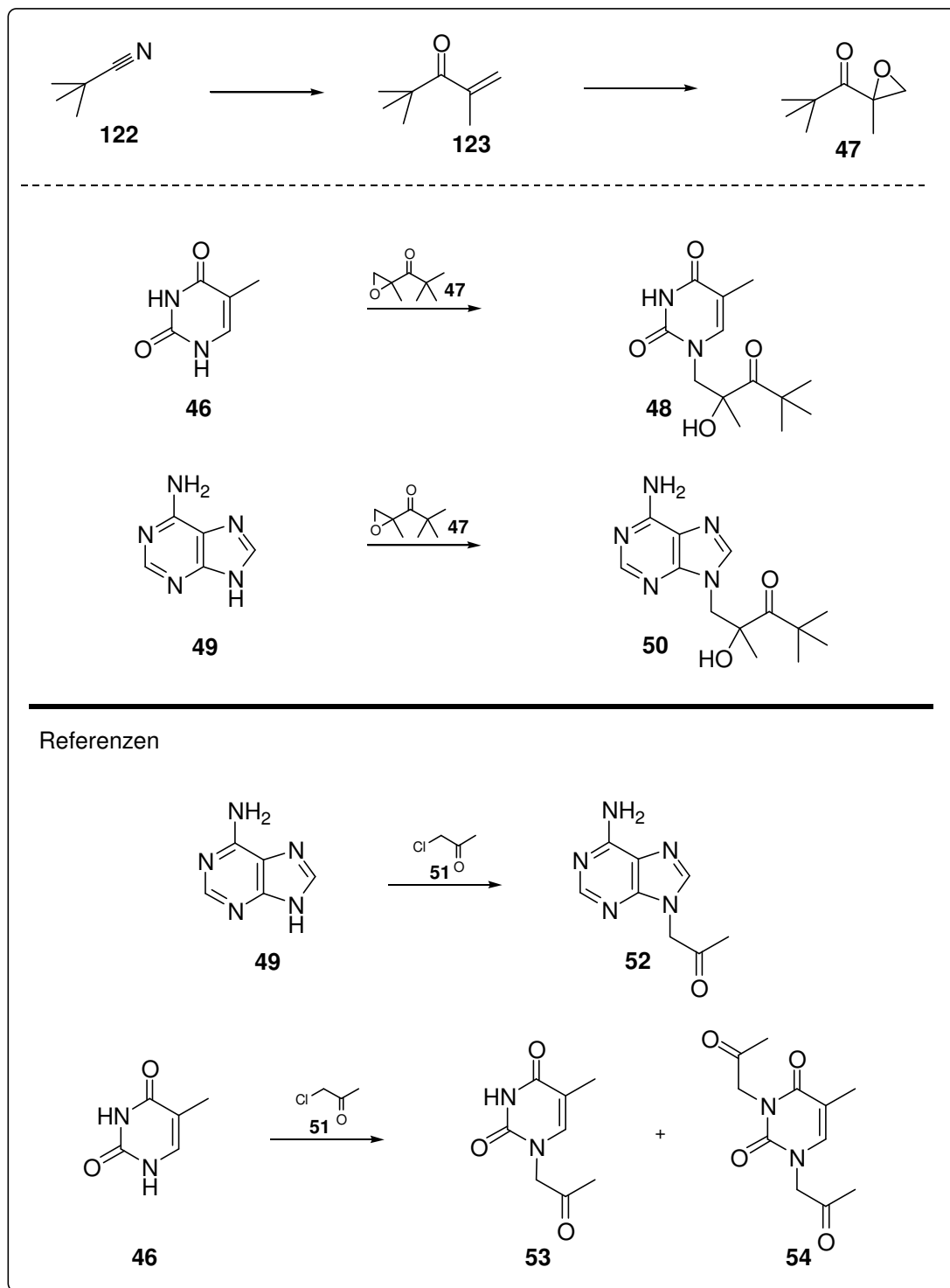
Soweit nicht anders angegeben wurden Reaktionslösungen und Filtrate am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei 40°C Badtemperatur eingengt und im Ölpumpenvakuum (0.1 mbar) von flüchtigen Verbindungen befreit.

Charakterisierung der Verbindungen

Verbindungen die bereits literaturbekannt und charakterisiert sind, wurden im allgemeinen mit $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ sowie MS-Daten beschrieben. Sofern nicht anders bemerkt, wurden chirale Verbindungen in racemischer Form erhalten.

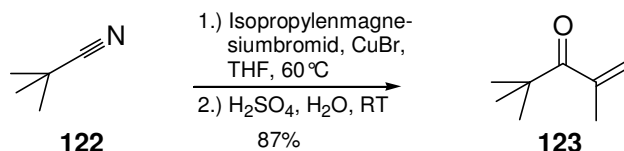
2 Synthesen der Verbindungen für die Vorversuche

2.1 Syntheseübersicht des Modellsystems



2.1.1 Synthese des Injektorbausteins

2,4,4-Trimethylpent-1-en-3-on (**123**)^[102]



5.34 g Pivalonitril (**122**) (7.0 ml, 62.2 mmol) wurden unter Argon in 40 ml absolutem THF gelöst und unter Rühren mit 181 mg Kupfer-(I)-bromid (2 mol%, 1.24 mmol) versetzt. Unter starkem Rühren gab man nun langsam 137 ml Isopropylmagnesiumbromidlösung (0.5 M in THF) zu und lässt während 20 Stunden unter Rückfluß rühren.^[103] Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen und hydrolisiert durch Zugabe von 20 ml Wasser und 90 ml einer 15%igen Schwefelsäure. Die Reaktionsmischung wurde weitere 24 Stunden gerührt, bevor man das braune Zweiphasengemisch mit 200 ml Diethylether in einen Scheidetrichter überführte und die organische Phase abtrennte. Die organische Phase wird zweimal mit je 150 ml 10%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis auf 100 ml eingengt. Die Rückstandslösung wurde bei Normaldruck fraktioniert destilliert (103-105°C). Man erhielt 6.88 g 2,4,4-Trimethylpent-1-en-3-on (**123**) (54.2 mmol, 87 %) als hellgelbes Öl.

C₈H₁₄O (126.20).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

5.40 - 5.38 (m, 2 H, H-1), 1.19 (s, 3 H, CCH₃), 1.24 (s, 9 H, H-5).

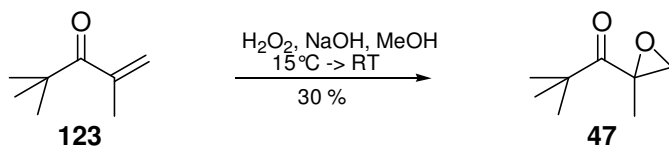
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

211.6 (C_q, 1 C, C-3), 144.2 (C_q, 1 C, C-2), 118.2 (C_s, 1 C, C-1), 44.0 (C_q, 1 C, C-4), 27.6 (C_p, 3 C, C-5), 21.2 (C_p, 1 C, CCH₃).

MS (EI, m/z):

126 (M⁺, 2), 111 (2), 98 (6), 83 (7), 69 (30), 57 (^tBu, 52), 41 (100).

Sdp (1013 mbar): 103 - 105°C.

(rac)-1,2-Epoxy-2,4,4-trimethylpentan-3-on (47)^[104]

4.51 g (35.7 mmol) 2,4,4-Trimethylpent-1-en-3-on (**123**) wurden bei Raumtemperatur in einem 100 ml Kolben in 35 ml Methanol gelöst und mittels Eisbad auf 10 - 15°C abgekühlt. Unter Rühren wurden 10.8 ml (3.0 eq., 93.6 mmol) 30%ige Wasserstoffperoxidlösung und 2.6 ml (0.5 eq., 15.6 mmol) 6 M Natrolauge zugetropft. Die Reaktionslösung wurde auf 15°C erwärmt und eine Stunde bei 15°C gerührt, bevor man auf Raumtemperatur erwärmen und weitere fünf Stunden rühren liwß. Nun wurde das Reaktionsgemisch erneut auf 15°C abgekühlt und nochmals 10.8 ml (3.0 eq., 93.6 mmol) 30%ige Wasserstoffperoxidlösung sowie 2.6 ml (0.5 eq., 15.6 mmol) 6 M Natrolauge zugegeben. Die Reaktionslösung wurde nun noch eine Stunde bei 15°C und anschließend 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die farblose Suspension wurde mit 35 ml gesättigter Natriumchloridlösung in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit je 35 ml Dimethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Pentan : Diethylether = 20 : 1 → 10 : 1) gereinigt und man erhielt 1.42 g (10.0 mmol, 28%) des Epoxids **47** als farbloses Öl.

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2$ (142.20).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

2.77 (dd, $J = 10.0, 4.9$, 2 H, 1-H), 1.53 (s, 3 H, CCH_3), 1.20 (s, 9 H, ^tBu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

213.0 (C_p , 1 C, C-3), 61.2 (C_q , 1 C, C-2), 52.3 (C_s , 1 C, C-1), 44.5 (C_q , 1 C, C-4), 25.6 (C_p , 3 C, C-5), 20.6 (C_p , 1 C, CCH_3).

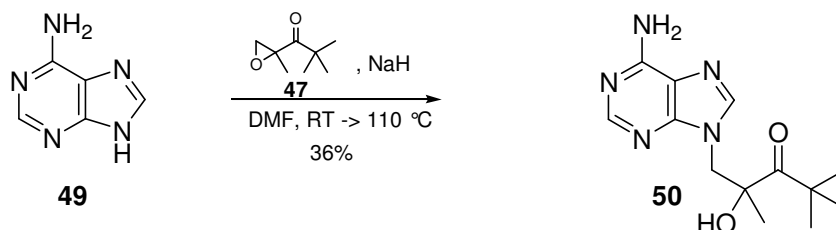
MS (EI, m/z):

142 (M^+ , 6); 127 (21), 114 (1), 97 (2), 86 (11), 79 (1), 69 (5), 57 (^tBu , 100), 41 (42).

R_f (Pentan : Diethylether = 10 : 1): 0.36.

2.1.2. Synthese der Edukte und Referenzverbindungen für die Vorversuche

9-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-adenin (50)



430 mg Adenin (**49**) (3.18 mmol, 1.5 eq.) und 40 mg Natriumhydrid (60%ig in Öl) wurden in 4 ml abs. DMF gelöst und 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. 300 mg (*rac*)-1,2-Epoxy-2,4,4-trimethylpentan-3-on (2.11 mmol) wurden in 1 ml abs. DMF gelöst und langsam zur Reaktionslösung getropft. Die Reaktionsmischung wurde nun auf 110°C erhitzt und 40 min unter Rückfluß gekocht.^[105] Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel DCM : MeOH = 20 : 1). Man erhielt 211 mg 9-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-adenin (**50**) (0.76 mmol, 36%) als farblosen Feststoff.

C₁₃H₁₉N₅O₂ (277.32).

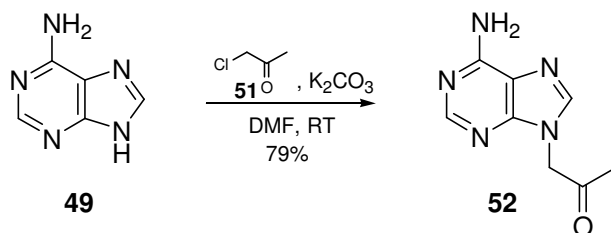
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

8.19 (s, 1 H, 2-H), 8.01 (s, 1 H, 8-H), 4.59 (A von AB, *J* = 13.9, 1 H, 1'-H_A), 4.26 (B von AB, *J* = 14.1, 1 H, 1'-H_B), 1.36 (s, 3 H, 2'-CH₃), 1.07 (s, 9 H, ^tBu).

¹³C-NMR (101.0 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

218.14 (C_q, 1 C, C-3'), 156.27 (C_q, 1 C, C-6), 152.63 (C_t, 1 C, C-2), 150.32 (C_q, 1 C, C-4), 142.84 (C_t, 1 C, C-8), 118.42 (C_q, 1 C, C-5), 81.97 (C_q, 1 C, C-2''), 52.64 (C_s, 1 C, C-1'), 45.22 (C_q, 1 C, C-4'), 25.67 (C_p, 3 C, ^tBu), 25.64 (C_p, 1 C, 2'-CH₃).

R_f (DCM : MeOH = 20 : 1): 0.39.

9-(Propyl-2'-on)-adenin (52)

1.08 g Adenin (**49**) (7.9 mmol) und 1.10 g Kaliumcarbonat (7.9 mmol, 1.0 eq.) wurden in 30 ml abs. DMF suspendiert. Unter Rühren wurden nun langsam 1.85 g Chloroacetone (**51**) (19.9 mmol, 25 eq.) zugetropft und die Reaktionsmischung 16 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt.^[106] Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 300 ml Methylenchlorid/Methanol (9 : 1) aufgenommen. Die resultierende Suspension wurde filtriert, das Filtrat einrotiert und chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel DCM : MeOH = 97 : 3). Man erhielt 1.20 g (6.3 mmol, 79%) des Ketons **52** farblosen Feststoff.

$C_8H_9N_5O$ (191.19).

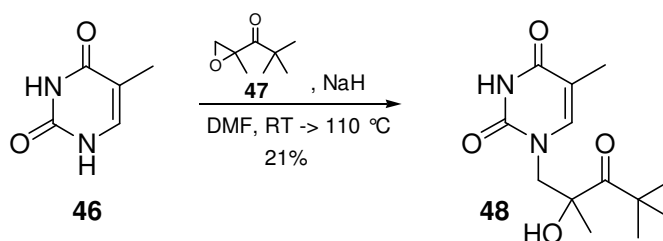
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

8.08 (s, 1 H, 2-H), 7.96 (s, 1 H, 8-H), 7.19 (s, 2 H, 6-NH₂), 5.14 (s, 2 H, 1'-H), 2.21 (s, 3 H, 3'-H).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

202.62 (C_q , 1 C, C-2'), 156.81 (C_q , 1 C, C-6), 153.32 (C_q , 1 C, C-2), 150.58 (C_q , 1 C, C-4), 142.19 (C_t , 1 C, C-8), 119.10 (C_q , 1 C, C-5), 52.75 (C_s , 1 C, C-1'), 27.83 (C_p , 1 C, C-3').

R_f (DCM : MeOH = 97 : 3): 0.09.

1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (48)

400 mg Thymin (**46**) (3.17 mmol, 1.5 eq.) und 40 mg NaH (60%ig in Öl) wurden in 4 ml abs. DMF gelöst und 150 min bei Raumtemperatur gerührt. 300 mg (*rac*)-1,2-Epoxy-2,4,4-trimethylpentan-3-on (**47**) (2.11 mmol) wurden in 1 ml abs. DMF gelöst und langsam zur Reaktionslösung getropft. Die Reaktionsmischung wurde nun auf 110°C erhitzt und 40 min unter Rückfluß gekocht.^[105] Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Methanol). Man erhielt 179 mg (0.66 mmol, 21%) des Produktes **48** als farblosen Feststoff.

C₁₃H₂₀N₂O₄ (268.31).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

7.30 (s, 1 H, H-6), 4.07 (A von AB, *J* = 5.0, 1 H, 1'-H_A), 3.85 (B von AB, *J* = 5.0, 1 H, 1'-H_B), 1.85 (d, *J* = 1.2, 3 H, 5-CH₃), 1.33 (s, 3 H, 2'-CH₃), 1.22 (s, 9 H, ^tBu).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

219.8 (C_q, 1 C, C-3'), 164.2 (C_q, 1 C, C-4), 151.2 (C_q, 1 C, C-2), 144.8 (C_t, 1 C, C-6), 110.7 (C_q, 1 C, C-5), 83.5 (C_q, 1 C, C-2'), 57.4 (C_s, 1 C, C-1'), 46.5 (C_q, 1 C, C-4'), 27.1 (C_p, 3 C, ^tBu), 26.6 (C_p, 1 C, 1'-CH₃), 12.5 (C_p, 1 C, 5-CH₃).

IR (KBr, v/cm⁻¹):

3450, 3170, 3044, 2971, 2821, 2564, 2322, 1662, 1475, 1419, 1366, 1269, 1219, 1202, 1158, 1117, 1047, 997, 969, 933, 902, 854, 762, 540, 456.

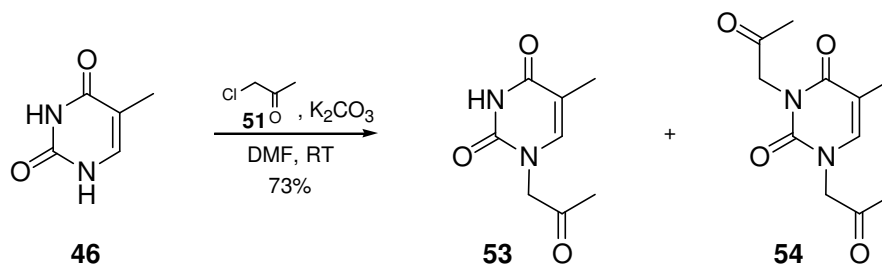
MS (FAB + KCl, m/z):

307 (MK⁺, 14), 269 (MH⁺, 100), 183 (47), 127 (21), 57 (^tBu, 37).

Smp: 195- 204°C.

R_f (MeOH): 0.13.

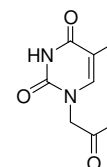
1-(Propyl-2'-on)-thymin (**53**) und 1,3-Di-(propyl-2'-on)-thymin (**54**)



1.00 g Thymin (**46**) (7.9 mmol) und 1.10 g Kaliumcarbonat (7.9 mmol, 1.0 eq.) wurden in 30 ml abs. DMF suspendiert. Unter Rühren wurden nun langsam 1.85 g Chloraceton (**51**) (19.9 mmol, 25 eq.) zugetropft und die Reaktionsmischung 16 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt.^[106] Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 300 ml Methylenchlorid/Methanol (9 : 1) aufgenommen. Die resultierende Suspension wurde filtriert, das Filtrat einrotiert und chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel DCM : MeOH = 97 : 3). Man erhielt 302 mg (1.7 mmol, 21 %) des 1-(Propyl-2'-on)-thymins **53** und 979 mg (4.1 mmol, 52 %) des 1,3-Di-(propyl-2'-on)-thymins (**54**) als farblose Feststoffe.

1-(Propyl-2'-on)-thymin (**53**)

C₈H₁₀N₂O₃ (182.18).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

11.30 (s, 1 H, NH), 7.32 (d, *J* = 1.3, 1 H, 6-H), 4.55 (s, 2 H, 1'-H), 2.12 (s, 3 H, 3'-H), 1.72 (d, *J* = 1.3, 3 H, CH₃).

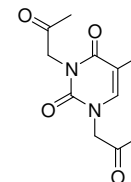
¹³C-NMR (101.0 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

202.2 (C_q, 1 C, C-2'), 164.3 (C_q, 1 C, C-4), 150.9 (C_q, 1 C, C-2), 141.8 (C_t, 1 C, C-6), 108.2 (C_q, 1 C, C-5), 56.0 (C_s, 1 C, C-1'), 26.8 (C_p, 1 C, C-3'), 11.8 (C_p, 1 C, 5-CH₃)

Extinktionskoeffizient ϵ bei 270 nm = $10823 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

R_f (DCM : MeOH = 97 : 3): 0.21.

1,3-Di-(propyl-2'-on)-thymidin (54)



$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ (238.24).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

11.30 (s, 1 H, NH), 7.32 (d, $J = 1.3$, 1 H, 6-H), 4.55 (s, 2 H, 1'-H), 2.12 (s, 3 H, 3'-H), 1.72 (d, $J = 1.3$, 3 H, 5- CH_3).

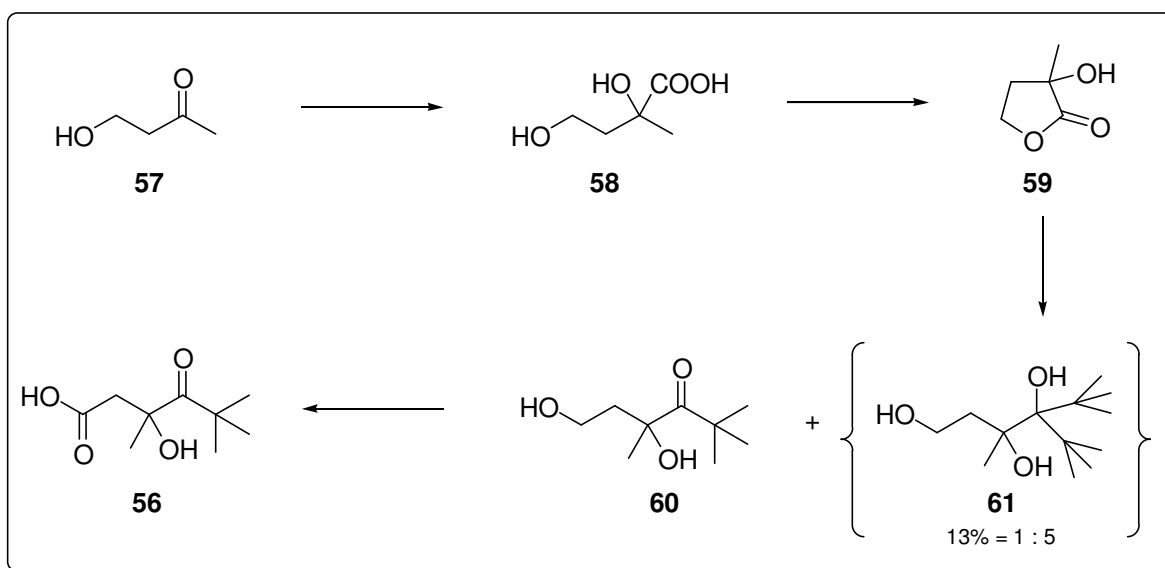
$^{13}\text{C-NMR}$ (101.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

202.2 (C_q , 1 C, C-2'), 164.3 (C_q , 1 C, C-4), 150.9 (C_q , 1 C, C-2), 141.8 (C_t , 1 C, C-6), 108.2 (C_q , 1 C, C-5), 56.0 (C_s , 1 C, C-1'), 26.8 (C_p , 1 C, C-3'), 11.8 (C_p , 1 C, 5- CH_3).

R_f (DCM : MeOH = 97 : 3): 0.43.

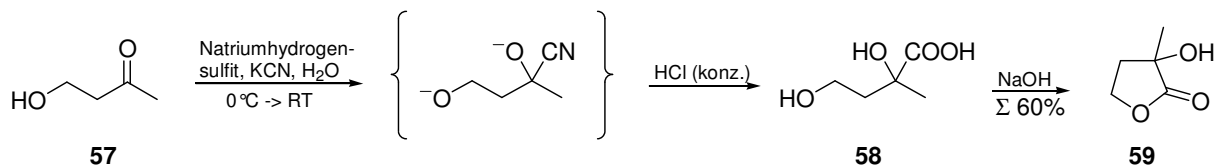
3 Synthesen auf dem Weg zum Zielsystem

3.1 Syntheseübersicht für die Synthese des Injektorbausteins



3.1.2 Synthese des Injektorbausteins

3-Hydroxy-3-methyl-dihydro-furan-2-on (**59**)^[107]



6.5 g Natriumhydrogensulfid (605 mmol) wurden in 120 ml Wasser gelöst (schlecht löslich). Unter Rühren tropfte man bei 0 °C in ca. 20 min 52.5 g 4-Hydroxy-2-butanon (**57**) (595 mmol, Lancaster) zu. Anschließend tropfte man in ca. 40 min eine KCN-Lösung (45 g KCN in 125 ml Wasser) zu, ließ auf Raumtemperatur erwärmen und 1 h rühren. Dann wurden 300 ml konz. HCl sehr langsam zugetropft (Vorsicht: exotherme Reaktion, Kühlung erforderlich) und die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Das Wasser wurde am Rotationsverdampfer abgezogen, der tiefbraune Rückstand von den Salzen abfiltriert und in einem Perforator 48 h mit Diethylether extrahiert. Die Salze wurden dreimal mit siedendem Essigester gewaschen und die Essigesterextrakte mit dem Diethyletherextrakt vereinigt. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt **58** (braunes Öl) wurde über Nacht im Exsikkator (über NaOH) getrocknet und mit einer Membranpumpe über einen Claisenkühler destilliert (132 °C, 10 mbar). Man erhielt 41.3 g (356 mmol, 60%) **59** als farbloses Öl.

C₅H₈O₃ (116.05).

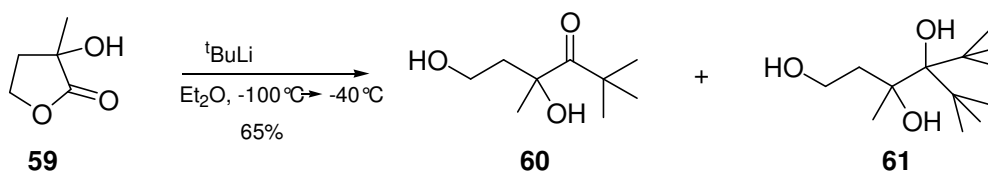
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

4.32 (A von AB, *J* = 9.1, 1 H, 5-H_A), 4.14 (B von AB, *J* = 9.1, 1 H, 5-H_B), 3.84 (bs, 1 H, 3-OH), 2.35 (A von AB, *J* = 13.1, 1 H, 4-H_A), 2.17 (B von AB, *J* = 4.8, 1 H, 4-H_B), 1.40 (s, 3 H, 3-CH₃).

¹³C-NMR (101.0 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

180.1 (C_q, 1 C, C-2), 77.6 (C_q, 1 C, C-3), 65.7 (C_s, 1 C, C-5), 37.1 (C_s, 1 C, C-4), 23.8 (C_p, 1 C, 3'-CH₃).

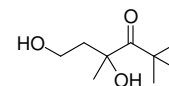
Sdp (10 mbar): 132 °C.

4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (60) und 4-tert-Butyl-3,5,5-trimethyl-hexan-1,3,4-triol (61)

3.38 g (29 mmol) 3-Hydroxy-3-methyl-dihydro-furan-2-on (**59**) wurden in 15 ml abs. Diethylether gelöst und auf -78°C (MeOH/ N_2 -Kältebad) abgekühlt. Man tropfte langsam 3.4 ml ${}^t\text{BuLi}$ -Lösung (1.5 M in Pentan) zu und kühlte anschließend auf -100°C .^[108] Nach Zugabe von weiteren 36.6 ml ${}^t\text{BuLi}$ -Lösung (insgesamt 2.1 eq.) ließ man wieder langsam auf -78°C erwärmen, 90 min bei -78°C rühren und dann auf -40°C erwärmen. Bei -40°C ließ man weitere 60 min rühren, bevor man die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmen ließ und die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Wasser quenchte. Man ließ nun weitere 12 Stunden rühren und trennte dann die organische von der wässrigen Phase ab. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 30 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhielt man 5.42 g (78%) eines 5:1 Gemisches aus Mono- (4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on **60**, 3.28 g, 18.9 mmol, 65%) und Bisaddukt (4-*tert*-Butyl-3,5,5-trimethyl-hexan-1,3,4-triol **61**, 0.88 g, 3.8 mmol, 13%) als farbloses Öl. Mono- und Bisaddukt konnten für analytische Zwecke mittels Kugelrohrdestillation voneinander getrennt werden, wurden aber für die Synthese als Gemisch in der nächsten Stufe eingesetzt.

4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (60)

$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_3$ (174.24).



${}^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO, δ/ppm):

4.51 (t, $J = 5.0$, 1 H, 6-OH), 3.35 (dddd, $J = 10.4, 8.5, 5.7, 4.8$, 1 H, 6- H_a), 3.47 (dddd, $J = 10.4, 8.4, 6.1, 5.1$, 1 H, 6- H_b), 1.97 (ddd, $J = 13.4, 8.5, 5.8$, 1 H, 5- H_a), 1.61 (ddd, $J = 13.5, 8.5, 6.1$, 1 H, 5- H_b), 1.23 (s, 3 H, 4- CH_3), 1.20 (s, 9 H, ${}^t\text{Bu}$).

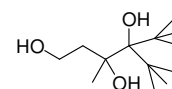
${}^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO, δ/ppm):

218.7 (C_q, 1 C, C-3), 80.6 (C_q, 1 C, C-4), 57.3 (C_s, 1 C, C-6), 44.5 (C_q, 1 C, C-2), 44.0 (C_s, 1 C, C-5), 28.7 (C_p, 1 C, 4-CH₃), 26.6 (C_p, 3 C, 2-(CH₃)₂, C-1).

MS (FAB + KCl, m/z):

215 (MK⁺, 7), 175 (MH⁺, 4), 57 (^tBu, 100), 43 (45).

4-*tert*-Butyl-3,5,5-trimethyl-hexan-1,3,4-triol (**61**)



C₁₃H₂₈O₃ (232.36).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO, δ/ppm):

4.52 (br t, *J* = 5.0, 1 H, 1-OH), 4.25 (s, 1 H, 3-OH), 3.69 (s, 1 H, 4-OH), 3.68 (dtd, *J* = 10.4, 7.4, 5.1, 1 H, 1-H_a), 3.58 (tdd, *J* = 10.4, 8.0, 5.1, 1 H, 1-H_b), 2.27 (dbt, *J* = 13.6, 7.6, 1 H, 2-H_a), 1.61 (ddd, *J* = 13.6, 7.5, 5.2, 1 H, 2-H_b), 1.37 (s, 3 H, 1'-H), 1.20 (2s, 18 H, 4-(^tBu)₂).

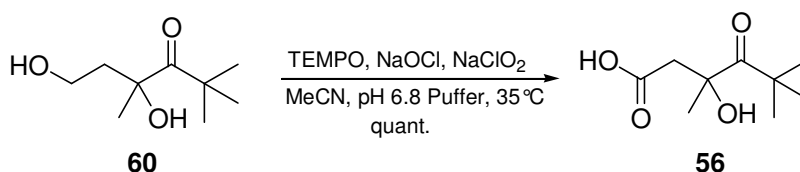
¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO, δ/ppm):

84.6 (C_q, 1 C, C-4), 81.5 (C_q, 1 C, C-3), 58.0 (C_s, 1 C, C-1), 42.8 (C_q, 1 C, C-4'), 42.5 (C_q, 1 C, C-4''), 41.1 (C_s, 1 C, C-2), 27.0 (C_p, 1 C, C-1').

MS (FAB + KCl, m/z):

271 (MK⁺, 10), 233 (MH⁺, 5), 57 (^tBu, 100), 43 (45).

(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**)



645 mg des 5:1 Gemisches aus Mono- (**60**, 509 mg, 2.93 mmol) und Bisaddukt (**61**, 136 mg, 0.59 mmol) und TEMPO (38 mg, 0.24 mmol) wurden in einem Gemisch aus 17.25 ml Acetonitril und 13 ml Phosphatpuffer (pH 6.8, 0.67 M) gelöst und auf 35°C erhitzt.^[85] Man tropfte zunächst 20% der NaClO₂-Lösung (788 mg NaClO₂ in 3.5 ml H₂O), dann 20% der NaOCl-Lösung (0.04 ml 12-15%ige NaOCl-Lösung in 1.73 ml H₂O) und schließlich langsam die restliche NaClO₂- und NaOCl-Lösung gemeinsam zu (gesamte Zutropfdauer 120 min). Man ließ zwölf Stunden bei 35°C rühren, auf Raumtemperatur abkühlen und gab 26 ml Wasser zu. Mit 2 N NaOH wurde der pH-Wert auf 8 eingestellt und die Lösung in auf 0°C

abgekühlte Na₂SO₃-Lösung (1.05 g in 17.25 ml H₂O) geschüttet. Man ließ 30 min bei Raumtemperatur rühren und gab dann 17.25 ml MTBE zu. Die organische Phase wurde abgetrennt und verworfen. Man gab erneut 25 ml MTBE zu, stellte die wässrige Phase mit 2 N HCl sauer (pH 3-4), trennte die organische Phase ab und extrahierte die wässrige Phase noch zweimal mit je 25 ml MTBE. Die vereinigten organischen Phasen wurden erst mit Wasser (zweimal je 9 ml), dann mit 13 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und man erhielt 550 mg (2.92 mmol, quant. bezogen auf Monoaddukt **60**) (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) als farblosen, analysenreinen Feststoff.

C₉H₁₆O₄ (188.22).

ber.: C 57.43, H 8.57, O 34.00; gef.: C 57.46, H 8.54, O 33.86.

Smp: 58-61°C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

3.14 (A von AB, *J* = 16.9, 1 H, 4-H_A), 2.52 (B von AB, *J* = 16.7, 1 H, 4-H_B), 1.39 (s, 3 H, 1'-H), 1.29 (s, 9 H, ^tBu).

¹³C-NMR (101.0 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

218.1 (C_q, 1 C, C-5), 178.0 (C_q, 1 C, C-2), 80.4 (C_q, 1 C, C-3), 45.3 (C_q, 1 C, C-1), 44.8 (C_s, 1 C, C-4), 28.1 (C_p, 3 C, ^tBu), 27.0 (C_p, 1 C, C-1').

IR (KBr, ν/cm⁻¹):

3527, 2983, 2649, 1692, 1674, 1482, 1444, 1380, 1324, 1276, 1228, 1142, 1065, 1045, 1002, 959, 917, 869, 818, 706, 652, 612, 526, 414.

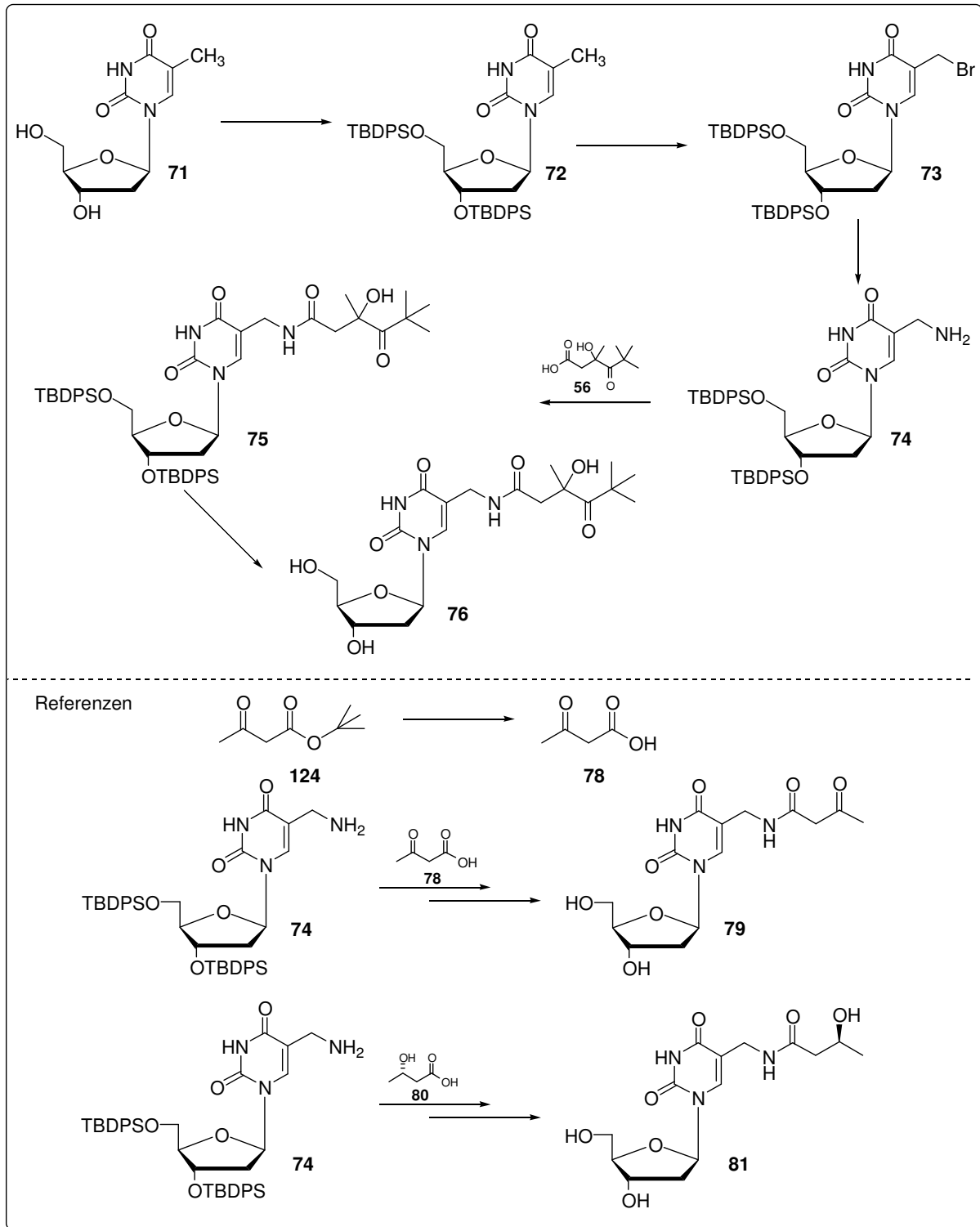
MS (FAB, m/z):

189 (MH⁺, 56), 171 (21), 153 (15), 137 (19), 125 (11), 103 (34), 85 (48), 69 (36), 57 (^tBu, 100), 43 (84).

R_f (Hexan : EE = 4 : 1): 0.08.

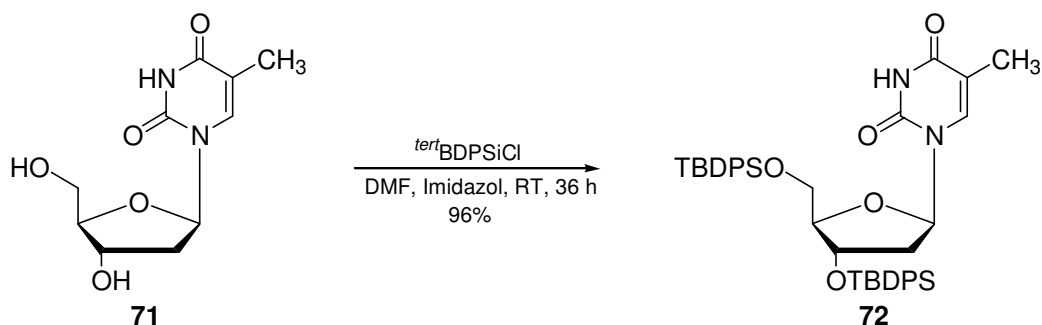
4 Synthese des Injektorsystems (76) und der Bestrahlungsreferenzen

4.1 Syntheseübersicht



4.2 Synthese des Injektorsystems α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (76)

3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silylthymidin (72)^[109]



2.5 g Thymidin (**71**) (10.3 mmol) und 6.7 ml *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (25.75 mmol, 2.5 eq.) wurden in 50 ml absolutem DMF gelöst. Man gab 3.1 g (45.5 mmol, 4.4 eq.) Imidazol zu und ließ 36 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Essigester/Wasser (je 100ml) aufgenommen und extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit je 50 ml Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Der Essigester wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand chromatographisch (Hexan : EE = 4 : 1 → 3 : 1) gereinigt. Man erhielt 7.1 g 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silylthymidin (**72**) (9.9 mmol, 96%) als farblosen Schaum.

$C_{42}H_{50}N_2O_5Si_2$ (719.03).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

8.21 (s, 1 H, 3-NH), 7.65 - 7.27 (m, 21 H, 6-H, H_{ar}), 6.51 (dd, $J = 9.1, 5.3$, 1 H, 1'-H), 4.55 (d, $J = 5.6$, 1 H, 3'-H), 3.99 (m, 1 H, 4'-H), 3.75 (dd, $J = 11.5, 2.1$, 1 H, 5'- H_a), 3.31 (dd, $J = 11.4, 2.5$, 1H, 5'- H_b), 2.35 (ddd, $J = 13.1, 5.3, 1.3$, 1 H, 2'- H_a), 1.96 (ddd, $J = 13.1, 9.1, 5.8$, 1 H, 2'- H_b), 1.08 (s, 9 H, tBu), 0.93 (s, 9 H, tBu).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

163.5 (C_q , 1 C, C-4), 150.6 (C_q , 1C, C-2), 136.1 (C_t , 1 C, C-6), 136.1, 135.8, 130.4, 128.3 (24C, C_{ar}), 111.4 (C_q , 1 C, C-5), 88.2 (C_t , 1 C, C-4'), 85.2 (C_t , 1 C, C-1'), 74.4 (C_t , 1 C, C-3'),

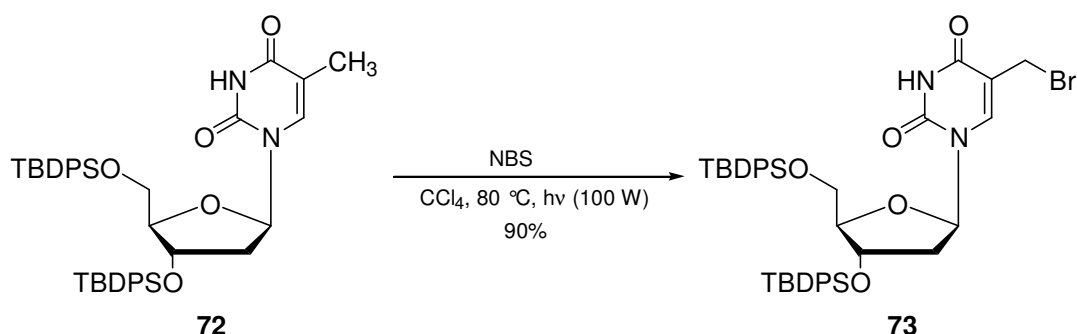
64.4 (C_s, 1 C, C-5'), 41.7 (C_s, 1 C, C-2'), 27.3 (C_p, 6 C, ^tBu), 19.7, 19.4 (C_q, 2 C, ^tBu), 12.3 (C_p, 1 C, 1''-C).

MS (FAB, m/z):

405 (MH⁺, 14), 269 (24), 197 (47), 135 (100).

R_f (Hexan : EE = 4 : 1): 0.16.

3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -bromothymidin (**73**)^[109]



4.62 g 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silylthymidin (**72**) (6.43 mmol) wurde zusammen mit 1.5 g NBS (8.43 mmol, 1.3 eq.) in 200 ml CCl₄ gelöst und mit einer 100 W Lampe unter Rückfluß (80°C) drei Stunden bestrahlt. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen, filtrierte ab und engte das Filtrat am Rotationsverdampfer ein. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel (Hexan : EE = 4 : 1 → 3 : 1) gereinigt, und man erhielt 4.61 g 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -bromothymidin (**73**) (5.79 mmol, 90%) als farblosen Schaum.

C₄₂H₄₉N₂O₅Br (796.24).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm):

8.24 (s, 1 H, 3-NH), 7.71 - 7.29 (m, 21 H, 6-H, H_{ar}), 6.47 (dd, *J* = 8.9, 5.3, 1 H, 1'-H), 4.55 (bd, *J* = 5.6, 1 H, 3'-H), 4.03 (m, 1 H, 4'-H), 3.76 (dd, *J* = 11.5, 2.3, 1 H, 5'-H_a), 3.69 (A von AB, *J* = 10.6, 1 H, 1''-H_A), 3.60 (B von AB, *J* = 10.6, 1 H, 1''-H_B), 3.36 (dd, *J* = 11.5, 2.3, 1 H, 5'-H_b), 2.40 (ddd, *J* = 13.1, 5.4, 1.3, 1 H, 2'-H_a), 1.95 (ddd, *J* = 13.1, 8.7, 5.8, 1 H, 2'-H_b), 1.09, 0.95 (2s, je 9 H, je ^tBu).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

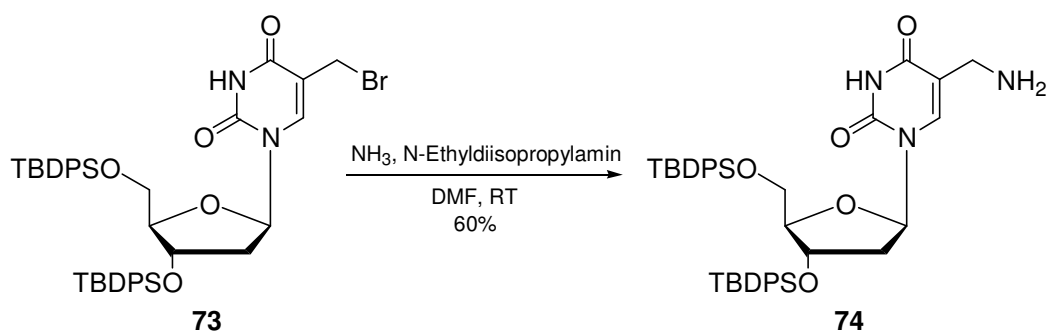
161.4 (C_q , 1 C, C-4), 149.9 (C_q , 1 C, C-2), 139.1 (C_t , 1 C, C-6), 136.1, 136.1, 130.5, 128.3 (24C , C_{ar}), 112.4 (C_q , 1 C, C-5), 88.5 (C_t , 1 C, C-4'), 85.8 (C_t , 1 C, C-1'), 74.4 (C_t , 1 C, C-3'), 64.4 (C_s , 1 C, C-5'), 42.1 (C_s , 1 C, C-2'), 27.4, 27.2 (C_p , je 3 C, je ^tBu), 25.0 (C_s , 1 C, C-1''), 19.8, 19.4 (C_q , je 2 C, je ^tBu).

MS (FAB, m/z):

797 (MH^+ , 2), 319 (7), 269 (18), 197 (48), 165 (12), 135 (100), 77 (14).

R_f (Hexan : EE = 4 : 1): 0.16.

3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin (**74**)



1.00 g 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -bromothymidin (**73**) (1.26 mmol) und 810 mg N-Ethyl-diisopropylamin (6.27 mmol, 5 eq.) wurden in einem Yang-Gefäß in 20 ml DMF gelöst, auf 0°C gekühlt und mit NH_3 gesättigt.^[110] Das Yang-Gefäß wurde verschlossen und die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt. Nach zehn Stunden wurde wieder auf 0°C abgekühlt, erneut mit NH_3 gesättigt, das Gefäß verschlossen und bei Raumtemperatur für weitere zwölf Stunden gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf 0°C wurde das Yang-Gefäß wieder geöffnet, und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel gereinigt (MeOH : DCM = 1 : 15), und man erhielt 545 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin (**74**) (0.74 mmol, 60%) als blaßgelben Schaum.

$\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_2$ (734.04).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.65 - 7.27 (m, 21 H, 6-H, H_{ar}), 6.49 (dd, $J = 9.1, 5.3$, 1 H, 1'-H), 4.55 (bd, $J = 9.1, 5.3$, 1 H, 1'-H), 4.55 (bd, $J = 5.8$, 1 H, 3'-H), 4.02 (m, 1 H, 4'-H), 3.75 (dd, $J = 11.7, 2.7$, 1 H, 5'- H_a), 3.34 (dd, $J = 11.6, 2.5$, 1 H, 5'- H_b), 3.04 (d, $J = 2.8$, 2 H, 1''-H), 2.36 (ddd, $J = 13.1, 5.3, 1.3$, 1 H, 2'- H_a), 1.96 (ddd, $J = 13.1, 9.1, 5.8$, 1 H, 2'- H_b), 1.09 (s, 9 H, ^tBu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

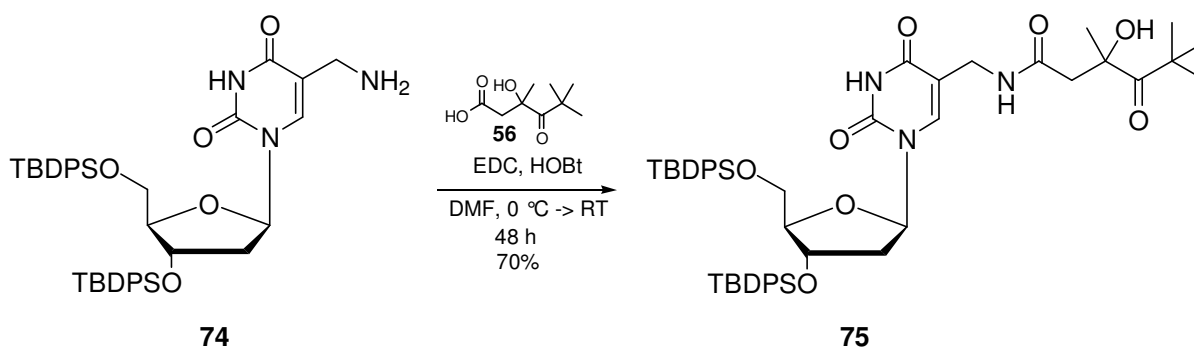
163.5 (C_q , 1 C, C-4), 150.3 (C_q , 1 C, C-2), 141.0 (C_t , 1 C, C-6), 136.1, 135.7, 130.5, 128.3 (24 C, C_{ar}), 112.0 (C_q , 1 C, C-5), 88.4 (C_t , 1 C, C-4'), 85.8 (C_t , 1 C, C-1'), 74.4 (C_t , 1 C, C-3'), 64.4 (C_s , 1 C, C-5'), 41.7 (C_s , 1 C, C-2'), 38.0 (C_s , 1 C, C-1''), 27.3 (C_p , 6 C, ^tBu), 19.7, 19.4 (C_q , 2 C, ^tBu).

MS (FAB, m/z):

734 (MH^+ , 7), 269 (15), 197 (35), 135 (100).

R_f (MeOH : DCM = 1 : 15): 0.20.

3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (75)



270 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin (**74**) (0.37 mmol), 69 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) (0.37 mmol, 1.0 eq.), 59 mg HOBT (0.44 mmol, 1.2 eq.), 78 mg EDC (0.41 mmol, 1.1 eq.) und 37 mg NEt_3 (0.37 mmol, 1.0 eq.) wurden bei 0°C in 8 ml abs. DMF gelöst und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und das Rohprodukt von den Reagenzien mittels Säulenfiltration abgetrennt (DCM : MeOH = 15 : 1). Das Rohprodukt wurde anschließend chromatographisch an Kieselgel (Hexan : EE = 3 : 1 \rightarrow 2 : 1) gereinigt,

und man erhielt 234 mg (0.26 mmol, 70%) 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -[3-(*R,S*)-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**75**) als farblosen Schaum.

C₅₁H₆₅N₃O₈Si₂ (904.25).

*2 H₂O

ber.: C 65.11, H 7.34, N 4.47, O 14.15; gef.: C 64.80, H 7.03, N 4.36, O nicht gemessen wegen Si.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm):

8.25, 8.24 (2s, je 1 H, NH), 7.62 - 7.27 (m, je 21 H, 6-H, H_{ar}), 6.40 - 6.33 (m, je 1 H, 1'-H), 4.49 - 4.44 (m, je 1 H, 3'-H), 4.02 (m, je 1 H, 4'-H), 3.73 - 3.62 (m, je 3 H, 5'-H_a und 1''-H), 3.37 - 3.32 (m, je 1 H, 5'-H_b), 2.73, 2.70 (2d, je 1 H, $J = 14.7$ bzw. 14.8, 4''-H_a), 2.39 - 2.32 (m, je 1 H, 2'-H_a), 2.15, 2.14 (2d, je 1 H, $J = 14.7$ bzw. 14.7, 4''-H_b), 1.97 - 1.86 (m, je 1 H, 2'-H_b), 1.29, 1.27 (2s, je 3 H, 5''-CH₃), 1.22, 1.21 (2s, je 9 H, 5''-C(CH₃)₃), 1.07, 0.92 (2s, je 9 H, ^tBu von TBDPS).

¹³C-NMR (101.0 MHz, CDCl₃, δ /ppm):

219.65, 219.62 (2 C_q, je 1 C, C-6''), 172.95, 172.87 (2 C_q, je 1 C, C-3''), 164.33 (C_q, 2 C, C-4), 150.64 (C_q, 2 C, C-2), 139.04 (C_t, 2 C, C-6), 136.13, 135.83, 130.35, 128.28 (2·24 C, C_{ar}), 111.28 (C_q, 2 C, C-5), 88.46, 88.40 (2 C_t, je 1 C, C-4'), 86.16, 86.02 (2 C_t, je 1 C, C-1'), 81.47 (C_q, 2 C, C-5''), 74.35, 74.26 (2 C_t, je 1 C, C-4'), 64.41, 64.32 (2 C_s, je 1 C, C-5'), 45.34, 45.32 (2 C_q, je 1 C, C-7''), 41.53 (C_s, 2 C, C-2'), 36.67, 36.60 (2 C_s, je 1 C, C-1''), 27.64, 27.60 (2 C_p, je 1 C, 7''-(CH₃)₃), 27.31, 27.28 (C_p, je 6 C, ^tBu von BDPS), 19.59, 19.41 (C_q, je 1 C, ^tBu von BDPS).

IR (KBr, ν /cm⁻¹):

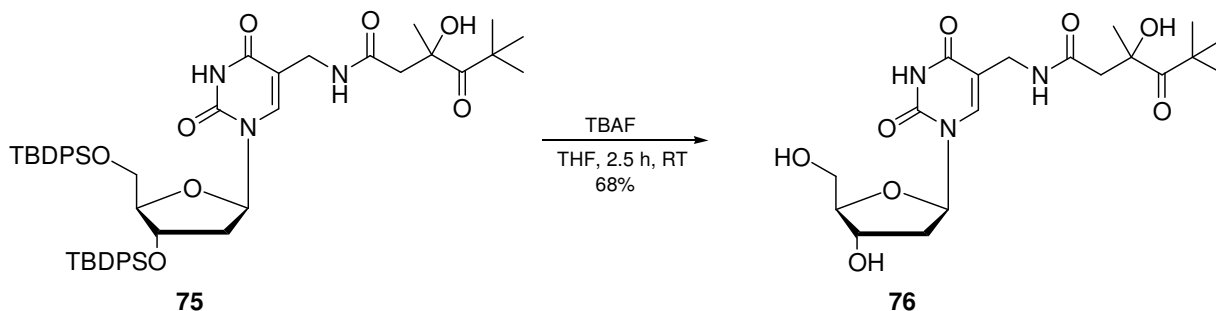
3338, 3198, 3071, 2932, 2858, 1960, 1890, 1830, 1692, 1589, 1522, 1472, 1428, 1391, 1363, 1322, 1276, 1195, 1113, 1032, 999, 969, 823, 796, 7740, 701, 612, 507, 488, 420.

MS (FAB, m/z):

904 (MH⁺, 5), 818 (4), 312 (21), 269 (9), 239 (11), 226 (25), 197 (33), 135 (100), 57 (^tBu, 18).

R_f (MeOH : DCM = 1 : 15): 0.18.

α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (76)



750 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**75**) (0.82 mmol) wurden unter Argon in 10 ml abs. THF gelöst. Man gab 2.18 ml einer TBAF-Lösung (2.18 mmol, 1 M in THF, 2.6 eq.) zu und ließ 2.5 h bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wurde anschließend bei RT im Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH = 20:1). Man erhielt 237 mg (0.56 mmol, 68%) α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) als farblosen Schaum.

C₁₉H₂₉N₃O₈ (427.45).

*1/4 H₂O

ber.: C 52.83, H 6.83, N 9.72, O 29.94; gef.: C 51.70, H 6.87, N 9.22, O -.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ /ppm):

7.92, 7.89 (2s, je 1 H, 6-H), 6.27, 6.26 (2t, $J = 6.8$ bzw. 6.8, je 1 H, 1'-H), 4.41 - 4.37 (m, je 1 H, 3'-H), 4.03 - 3.97 (m, je 2 H, 1''-H_{a,b}), 3.93 - 3.90 (m, je 1 H, 4'-H), 3.81 - 3.71 (m, je 2 H, 5'-H_{a,b}), 2.89, 2.88 (2d, $J = 14.8$ bzw. 14.7, je 1 H, 4''-H_a), 2.35, 2.34 (2d, $J = 14.8$ bzw. 14.7, je 1 H, 4''-H_b), 2.28 - 2.18 (m, je 2 H, 2'-H), 1.34, 1.33 (2s, je 3 H, 5''-CH₃), 1.26, 1.25 (2s, je 9 H, ^tBu).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

220.07, 220.02 (2 C_q , je 1 C, C-3"), 174.01, 173.98 (2 C_q , je 1 C, C-6"), 165.40, 165.18 (2 C_q , je 1 C, C-4), 152.14 (C_q , 2 C, C-2), 140.00, 139.90 (2 C_t , je 1 C, C-6), 112.10, 112.03 (2 C_q , je 1 C, C-5), 88.97 (C_t , 2 C, C-4'), 86.58, 86.56 (2 C_t , je 1 C, C-1'), 81.89, 81.88 (2 C_q , je 1 C, C-5"), 72.36, 72.28 (C_t , je 1 C, C-3'), 63.00, 62.93 (2 C_s , je 1 C, C-5'), 46.99, 46.92 (2 C_s , je 1 C, C-4"), 46.00 (C_q , 2 C, C-7"), 41.26, 41.20 (2 C_s , je 1 C, C-2'), 36.84, 36.76 (2 C_s , je 1 C, C-1"), 27.94 (C_p , 2 C, 5"- C_H_3), 27.83, 27.80 (2 C_p , je 3 C, ^tBu).

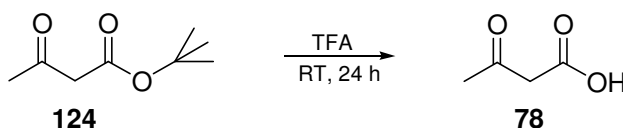
MS (FAB, m/z):

428 (MH^+ , 32), 312 (25), 226 (27), 186 (100), 117 (30), 57 (^tBu , 28), 43 (22).

R_f (DCM : MeOH = 20 : 1): 0.15.

4.3 Synthese der Ketoreferenz (79) und der Hydroxylreferenz (81)

Acetessigsäure (78)^[111]



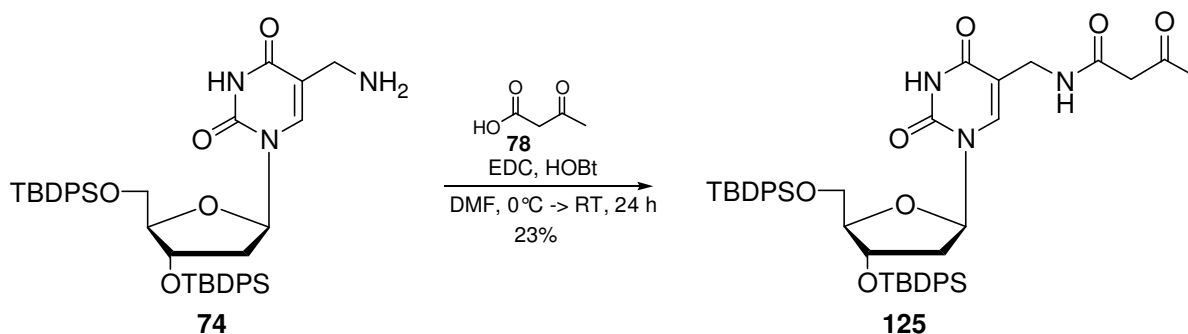
3.17 g *tert.*-Butylacetoacetat (**124**) (20 mmol) wurden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Trifluoressigsäure wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Man koevaporierte dreimal mit Benzol und befreite das Rohprodukt am Ölpumpenvakuum von letzten TFA-Resten. Die erhaltene Acetessigsäure (**78**) wurde als Rohprodukt direkt weiter umgesetzt. Nicht direkt umgesetztes Rohprodukt wurde bei -20°C unter Argon aufbewahrt (Produkt ist stark hygroskopisch) und hielt sich so einige Monate.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

11.30 (bs, 1 H, 4-OH), 3.57 (s, 2 H, 3- CH_2), 2.33 (s, 3 H, 1- CH_3).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

203.0 (C_q , 1 C, C-4), 172.6 (C_q , 1 C, C-2), 49.1 (C_s , 1 C, C-3), 21.9 (C_p , 1 C, C-1).

3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -(3-oxo-butanoyl-amino)-thymidin (125)

3.30 g 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin (**74**) (4.50 mmol), 947 mg EDC (4.94 mmol, 1.1 eq.) und 727 mg HOBT (5.38 mmol, 1.2 eq.) wurden unter Argon in 50 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 920 mg Acetessigsäure (**78**) (9.01 mmol, 2.0 eq.) in 15 ml abs. DMF wurde bei 0°C während 10 min zugetropft. Man ließ die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmen und 24 Stunden rühren. Das DMF wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand wurde in Methylenchlorid aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (EE/Hexan = 1 : 2) und man erhielt 864 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -(3-oxo-butanoyl-amino)-thymidin (**125**) (1.05 mmol, 23%) als farblosen Schaum.

$\text{C}_{46}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2$ (817.32).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

8.30 (bs, 1 H, NH), 7.73 (s, 1 H, 6-H), 7.63 - 7.24 (m, 20 H, H_{ar}), 6.44 (dd, $J = 8.8, 5.2$, 1 H, 1'-H), 4.51 (dt, $J = 5.3, 1.2$, 1 H, 3'-H), 4.43 (bd, $J = 12.0$, 1 H, 1''- H_a), 4.40 (bd, $J = 12.0$, 1 H, 1''- H_b), 4.01 (m, 1 H, 4'-H), 3.72 (dd, $J = 11.7, 2.5$, 1 H, 5'- H_a), 3.33 (dd, $J = 11.7, 3.0$, 1 H, 5'- H_b), 3.28 (s, 2 H, 4''-H), 2.41 (ddd, $J = 12.9, 5.2, 1.1$, 1 H, 2' H_a), 2.41 (ddd, $J = 12.9, 5.2, 1.1$, 1 H, 2' H_a), 2.17 (s, 3 H, CH_3), 1.96 (ddd, $J = 13.2, 8.8, 5.7$, 1 H, 2' H_b), 1.08 (s, 9 H, ^tBu von TBDPS), 0.92 (s, 9 H, ^tBu von TBDPS).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

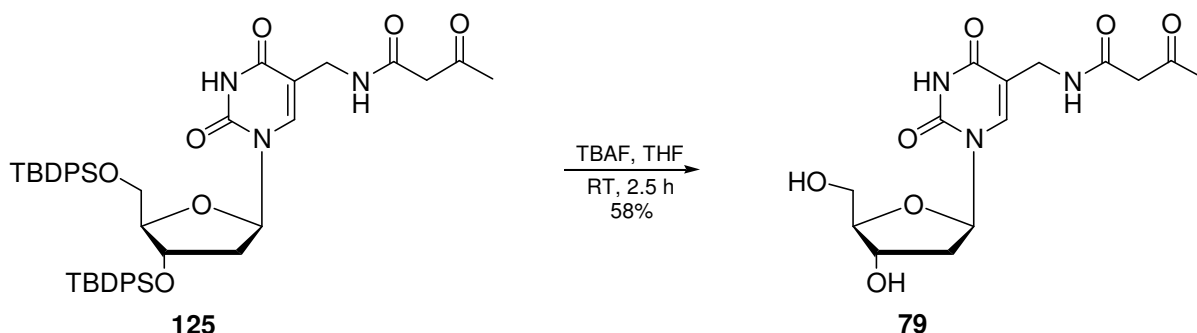
200.6 (C_q , 1 C, C-5"), 167.0 (C_q , 1 C, C-3"), 162.2 (C_q , 1 C, C-4), 150.1 (C_q , 1 C, C-2), 141.2 (C_t , 1 C, C-6), 136.2, 136.1, 130.4, 128.3 (24 C, C_{ar}), 109.2 (C_q , 1 C, C-5), 88.5 (C_t , 1 C, C-4"), 86.0 (C_t , 1 C, C-1'), 74.4 (C_t , 1 C, C-3'), 64.4 (C_s , 1 C, C-5'), 60.1 (C_s , 1 C, C-1"), 50.1 (C_s , 1 C, C-4"), 41.9 (C_s , 1 C, C-2'), 30.4 (C_p , 1 C, C-6"), 27.28 (C_p , 6 C, ^tBu), 19.5, 19.4 (C_q , 2 C, ^tBu).

MS (FAB, m/z):

819 (MH^+ , 0.5), 269 (12), 197 (27), 135 (100).

R_f (EE : Hexan = 1 : 2): 0.25.

α -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymidin (**79**)



500 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -(3-oxo-butanoyl-amino)-thymidin (**125**) (0.611 mmol) wurden unter Argon in 2 ml absolutem THF gelöst. 1.63 ml einer TBAF-Lösung (1 M in THF, 1.63 mmol, 2.67 eq.) wurden langsam zugetropft. Anschließend wurde 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand auf Kieselgel aufgezogen und chromatographisch (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1 \rightarrow 15 : 1) gereinigt. Man erhielt 120 mg (0.352 mmol, 58%) α -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymidin (**79**) als farbloses Öl.

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$ (341.32).

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , δ/ppm):

7.93 (s, 1 H, 6-H), 6.28 (t, $J = 6.6$), 4.38 - 4.41 (m, 1 H, 3'-H), 4.07 - 4.05 (m, 2 H, 1''- H_a , H_b), 3.92 - 3.90 (m, 1 H, 4'-H), 3.79 - 3.71 (m, 2 H, 5'- H_a , H_b), 3.35 - 3.33 (m, 1 H, 4''- H_a), 3.31 - 3.29 (m, 1 H, 4''- H_b), 2.27 - 2.24 (m, 2 H, 2'- H_a , H_b), 2.21 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, CD_3OD , δ/ppm):

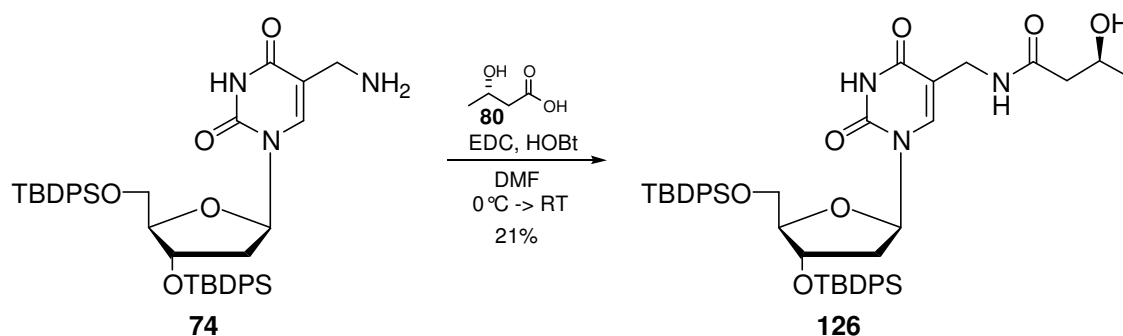
204.1 (C_q , 1 C, C-5''), 169.4 (C_q , 1 C, C-3''), 164.1 (C_q , 1 C, C-4), 151.2 (C_q , 1 C, C-2), 137.5 (C_t , 1 C, C-6), 111.0 (C_q , 1 C, C-5), 87.0 (C_t , 1 C, C-4'), 85.4 (C_t , 1 C, C-1'), 71.3 (C_t , 1 C, C-3'), 62.0 (C_s , 1 C, C-5'), 58.6 (C_s , 1 C, C-4''), 40.1 (C_s , 1 C, C-2'), 36.0 (C_s , 1 C, C-1''), 29.31 (C_p , 1 C, CH_3).

MS (FAB, m/z):

342 (MH^+ , 4), 186 (100), 117 (42).

R_f (DCM/MeOH = 15:1): 0.17.

3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl- α -[(*S*)-3-hydroxy-butanoyl-amino]-thymidin



500 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- α -aminothymidin (**74**) (0.68 mmol), 170 mg EDC (0.89 mmol) und 110 mg HOBt (0.82 mmol) wurden in 8 ml absolutem DMF gelöst. Man ließ die Reaktionslösung 15 min bei 0°C rühren und tropfte dann während 10 min eine Lösung von 114 mg (*S*)-3-Hydroxy-buttersäure (**80**) (1.09 mmol) in 5 ml absolutem DMF zu. Man ließ das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen und über Nacht weiterrühren. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 20 ml Dichlormethan aufgenommen. Nach je zweimaligem Waschen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (CH_2Cl_2 : MeOH = 30 : 1) an Kieselgel gereinigt. Man erhielt 115 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl- α -[(*S*)-3-hydroxy-butanoyl-amino]-thymidin (**126**) (141 μmol , 21 %) als farbloses Öl.

$\text{C}_{46}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2$ (819.37).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

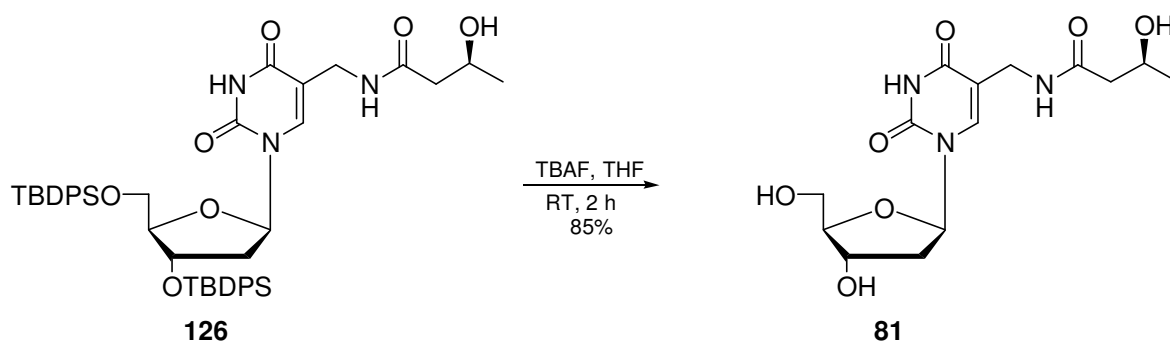
8.42 (bs, 1 H, NH), 7.61 (s, 1 H, 6-H), 7.59 - 7.26 (m, 20 H, H_{ar}), 6.40 (dd, $J = 8.8, 5.2$, 1 H, 1'-H), 4.49 (m, 1 H, 3'-H), 4.06 (m, 1 H, 5''-H), 4.02 (m, 1 H, 4'-H), 3.77 (m, 2 H, 1''- H_a , 1''- H_b), 3.71 (dd, $J = 11.6, 2.4$, 1 H, 5'- H_a), 3.33 (dd, $J = 11.7, 2.9$, 1 H, 5'- H_b), 3.28 (s, 2 H, 4''-H), 2.41 (m, 1 H, 2' H_a), 2.41 (m, 2' H_a), 2.17 (m, 2 H, 4''- H_a , 4''- H_b), 1.96 (m, 1 H, 2' H_b), 1.15 (d, $J = 6.0$, 3 H, CH_3), 1.04 (s, 9 H, ^tBu von BDPS), 0.93 (s, 9 H, ^tBu von BDPS).

MS (FAB, m/z):

820 (MH^+ , 8), 506 (3), 269(10), 228 (71), 197 (30), 135 (100).

R_f (CH_2Cl_2 : MeOH = 10 : 1): 0.52.

α -[(*S*)-3-Hydroxy-butanoyl-amino]-thymidin (**81**)



115 mg 3',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl- α -[(*S*)-3-hydroxy-butanoyl-amino]-thymidin (**126**) (0.14 mmol) wurden unter Argon in 10 ml absolutem THF gelöst. Nach Zugabe von 0.39 ml einer TBAF-Lösung (1 M in THF, 0.39 mmol, 2.6 eq.) ließ man die Reaktionslösung zwei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wurde anschließend bei Raumtemperatur im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (CH_2Cl_2 : MeOH = 15 : 1 \rightarrow 10 : 1). Man erhielt 50 mg α -[(*S*)-3-Hydroxy-butanoyl-amino]-thymidin (**81**) (0.12 mmol, 85%) als farblosen Schaum.

$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7$ (343.14).

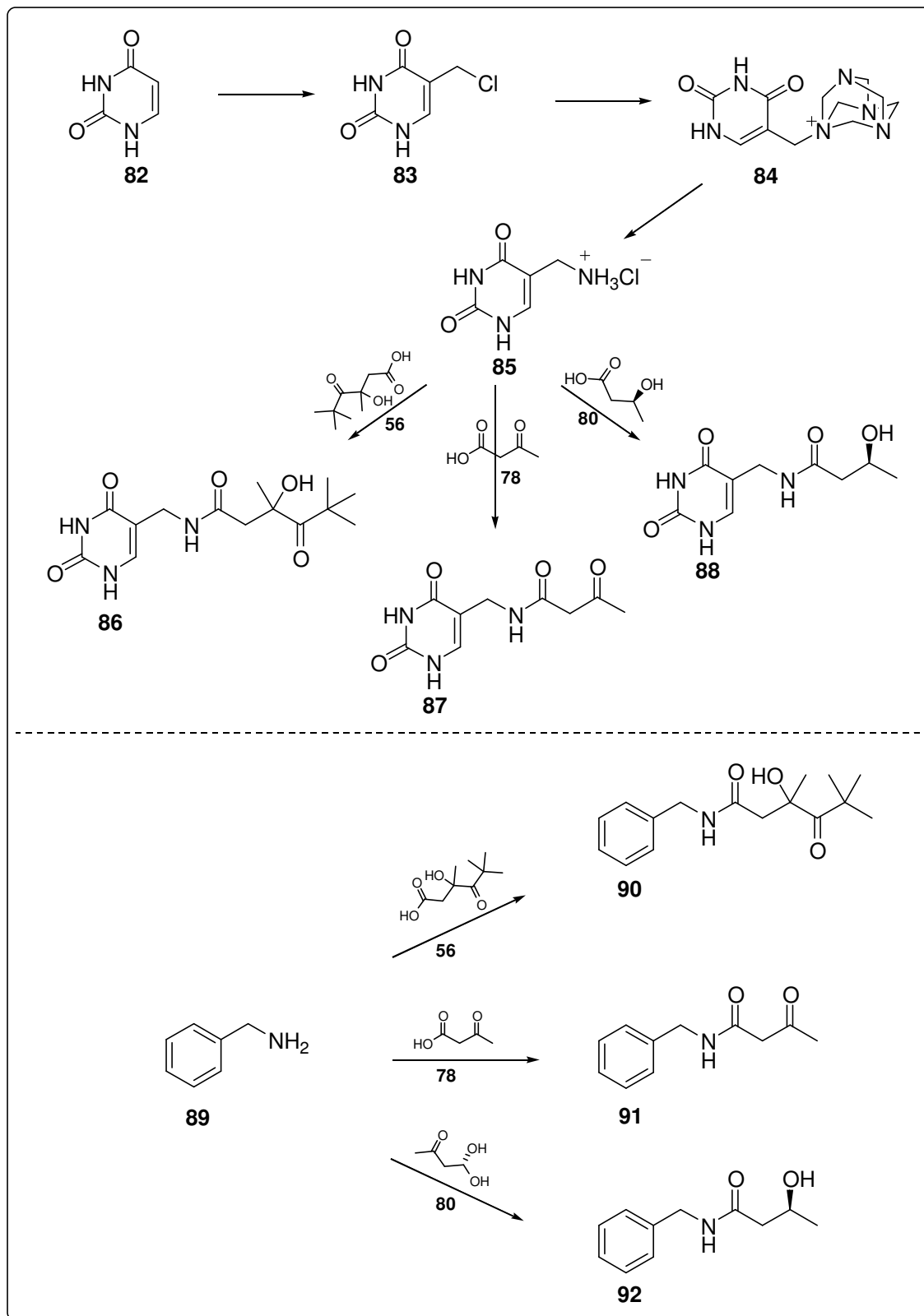
$^1\text{H-NMR}$ (101.0 MHz, CD_3OD , δ/ppm):

7.92 (bs, 1 H, NH), 7.77 (s, 1 H, 6-H), 6.40 (t, $J = 6.6$, 1 H, 1'-H), 4.50 (m, 1 H, 3'-H), 4.15 (m, 1 H, 5''-H), 4.04 (m, 1 H, 4'-H), 3.88 (m, 2 H, 1''- H_a , 1''- H_b), 3.73 (m, 2 H, 5'- H_a , 5'- H_b), 2.32 (m, 1 H, 2' H_a), 2.18 (m, 3 H, 2'- H_a , 4''- H_a , 4''- H_b), 1.18 (d, $J = 6.0$, 3 H, CH_3).

R_f (CH_2Cl_2 : MeOH = 10 : 1): 0.11.

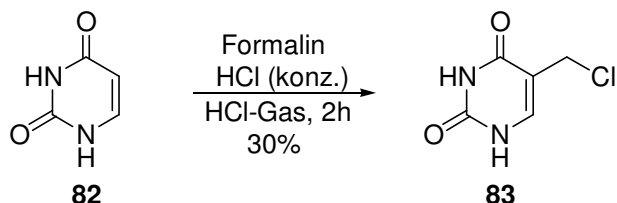
5 Synthese weiterer Modellverbindungen

5.1 Syntheseübersicht

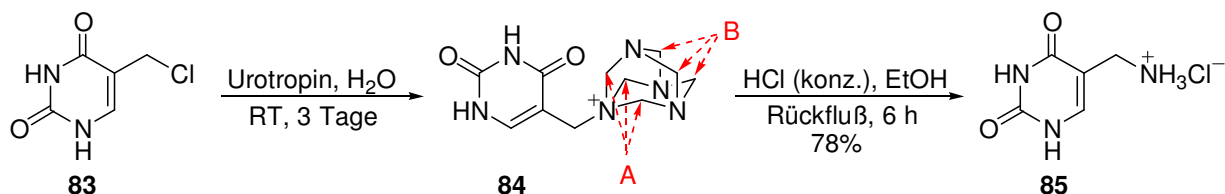


5.2 Synthese der Modellverbindungen

5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) via 5-Chloromethyl-uracil (**83**)^[111]:



4 g Uracil (**82**) (35.7 mmol) wurden in 14.5 ml konzentrierter Salzsäure gelöst. Nach Zugabe von 3.5 ml 38%iger Formalin-Lösung wurde während zwei Stunden HCl-Gas durch die Lösung geleitet. Die Reaktionslösung wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, wodurch das farblose, kristalline 5-Chloromethyl-uracil (**83**) ausfiel. Dieses wurde abfiltriert und mit wenig Eiswasser gewaschen. Man erhielt 1.75 g 5-Chloromethyl-uracil (**83**) (10.7 mmol, 30%), welches ohne Charakterisierung direkt weiter umgesetzt wurde.



1.75 g 5-Chloromethyl-uracil (**83**) (10.7 mmol) und 1.64 g Urotropin (Hexamethylentetramin, 11.4 mmol, 1.07 eq.) wurden in 10.5 ml Wasser gelöst und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Um einen geringen Feststoffanteil (welcher anschließend verworfen wurde) abzutrennen, wurde die Reaktionslösung filtriert. Das Filtrat wurde mit Ethanol und Diethylether (insgesamt ca. 200 ml) verdünnt, woraufhin 2.26 g 5-Urotropino-uracil-chlorid (**84**) als kristalline, farblose Zwischenstufe ausfielen. Das Zwischenprodukt wurde abfiltriert und in einem Gemisch aus 16.5 ml konzentrierter Salzsäure und 115 ml Ethanol suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde nun unter Rückfluß erhitzt. Nach ca. zehn Minuten erhielt man eine klare Lösung, nach einer Stunde begann ein weißer Feststoff auszufallen. Man ließ insgesamt sechs Stunden unter Rückfluß rühren bevor die Reaktionsmischung über Nacht bei -18°C aufbewahrt wurde. Das auskristallisierte Produkt wurde abfiltriert und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert um ebenfalls auskristallisiertes Ammoniumchlorid abzutrennen. Man erhielt 1.37 g (8.3 mmol, 78 %) 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) als farblosen Feststoff.

5-Urotropino-uracil-chlorid (84)

$C_{11}H_{17}N_6O_2^+$ (265.29).

1H -NMR (400 MHz, DMSO, δ /ppm):

11.44 (d, $J = 5.8$, 1 H, 1-NH), 11.41 (s, 1 H, 3-NH), 7.80 (d, $J = 6.0$, 1 H, 6-H), 5.03 (s, 6 H, 3-CH₂, Urotropin-A), 4.55 (A von AB, $J = 12.4$, 1H, 3-CH_A, Urotropin-B), 4.42 (B von AB, $J = 12.2$, 1H, 3-CH_B, Urotropin-B), 3.66 (s, 2 H, 5-CH₂).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, DMSO, δ /ppm):

165.5 (C_q, 1 C, C-4), 152.0 (C_q, 1 C, C-2), 145.2 (C_t, 1 C, C-6), 99.0 (C_q, 1 C, C-5), 78.4, 70.6 (C_s, je 3 C, 3·A,3·B), 52.5 (C_s, 1 C, 1'-C).

5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (85)

$C_5H_8ClN_3O_2$ (177.59).

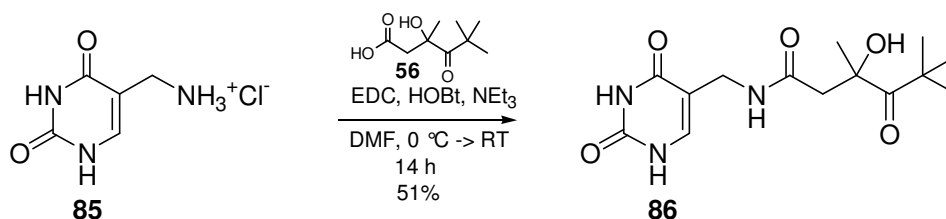
1H -NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm):

11.32 (s, 1 H, 3-NH), 11.19 (d, $J = 4.1$, 1 H, 1-NH), 8.17 (s, 3 H, 1'-NH₃⁺), 7.70 (d, $J = 5.0$, 1 H, 6-H), 3.60 (s, 2 H, 1-CH₂).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, CDCl₃, δ /ppm):

164.8 (C_q, 1 C, C-4), 151.9 (C_q, 1 C, C-2), 143.7 (C_t, 1 C, C-6), 105.8 (C_q, 1 C, C-5), 35.3 (C_s, 1C, 1'-C).

Smp: 251-253°C.

α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymin (86**)**

200 mg 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) (1.13 mmol), 192 mg EDC (1.23 mmol, 1.1 eq.), 183 mg HOBT (1.35 mmol, 1.2 eq.) und 115 μ l Triethylamin (114 mg, 1.13 mmol, 1.0 eq.) wurden unter Argon in 12 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 212 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) (1.13 mmol, 1.0 eq.) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0°C innerhalb von 10 min zugetropft. Man ließ die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmen und über Nacht rühren. DMF wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand chromatographisch gereinigt (DCM : MeOH = 20 : 1 \rightarrow 10 : 1). Man erhielt 180 mg α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymin (**86**) (58 μ mol, 51%) als farblosen Feststoff.

C₁₄H₂₁N₃O₅ (311.33).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ /ppm):

7.35 (s, 1 H, 6-H), 4.02 - 3.93 (m, 2 H, 1'-CH₂), 2.88 (d, $J_{AB} = 14.7$, 1 H, 4'-H_A), 2.32 (d, $J_{AB} = 14.7$, 1 H, 4'-H_B), 1.33 (s, 3 H, 5'-CH₃), 1.28 (s, 9 H, 6'-^tBu).

¹³C-NMR (101.0 MHz, CD₃OD, δ /ppm):

219.0 (C_q, 1 C, C-6'), 173.1 (C_q, 1 C, C-3'), 165.2 (C_q, 1 C, C-4), 152.4 (C_q, 1 C, C-2), 140.0 (C_t, 1 C, C-6), 110.2 (C_q, 1 C, C-5), 81.0 (C_q, 1 C, C-5'), 45.9 (C_s, 1 C, C-4'), 45.0 (C_q, 1 C, C-7'), 35.5 (C_s, 1 C, C-1'), 26.9 (C_p, 3 C, 7'-(CH₃)₃), 24.3 (C_p, 1 C, 5'-CH₃).

MS (FAB, m/z):

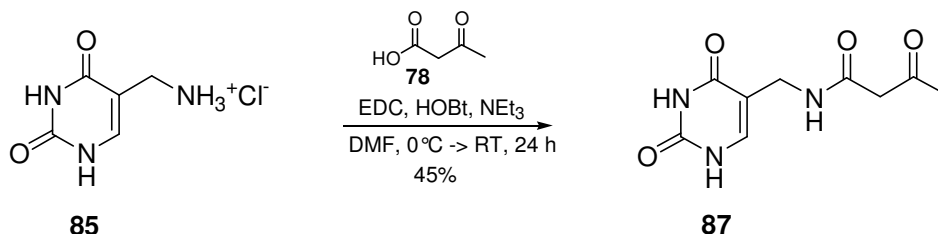
312 (MH⁺, 100), 226 (M -^tBu, -CO, 56), 57 (^tBu, 40).

MS (FAB + KCl, m/z):

350 (MK⁺, 75), 312 (MH⁺, 100), (M -^tBu, -CO, 68), 57 (^tBu, 45).

R_f (DCM : MeOH = 10 : 1): 0.34.

α -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymin (**87**)



200 mg 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) (1.13 mmol), 192 mg EDC (1.23 mmol, 1.1 eq.), 183 mg HOBT (1.35 mmol, 1.2 eq.) und 115 μ l Triethylamin (114 mg, 1.13 mmol, 1.0 eq.) wurden unter Argon in 12 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 115 mg Acetessigsäure (**78**) (1.13 mmol, 1.0 eq.) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0°C während 10 min zugetropft. Man ließ die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmen und 24 Stunden rühren. DMF wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand chromatographisch gereinigt (DCM : MeOH = 20 : 1 \rightarrow 10 : 1). Das chromatographisch gereinigte Produkt enthielt noch kleine Mengen an HOBT und EDC, welche durch Waschen mit wenig kaltem Methanol entfernt werden konnten. Man erhielt 115 mg α -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymin (**87**) (51 μ mol, 45%) als farblosen Feststoff.

C₉H₁₁N₃O₄ (225.20).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, δ /ppm):

11.11 (s, 1 H 3-NH), 10.77 (d, J = 2.5, 1 H, 1-NH), 8.19 (t, J = 5.5, 1 H, 2'-NH), 7.29 (d, J = 5.5, 1 H, 6-H), 3.83 (d, J = 5.3, 2 H, 1'-CH₂), 3.31 (s, 2 H, 4'-CH₂), 2.11 (s, 3 H, 6'-CH₃).

¹³C-NMR (101.0 MHz, DMSO, δ /ppm):

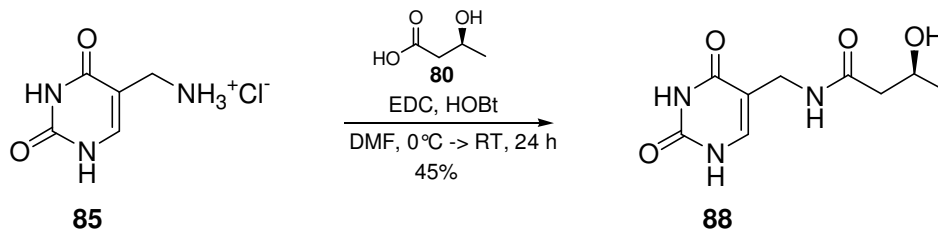
204.1 (C_q, 1 C, C-5'), 167.1 (C_q, 1 C, C-3'), 164.8 (C_q, 1 C, C-4), 152.1 (C_q, 1 C, C-2), 140.1 (C_t, 1 C, C-6), 109.9 (C_q, 1 C, C-5), 46.5 (C_s, 1 C, C-4'), 35.9 (C_s, 1 C, C-1'), 30.9 (C_p, 1 C, C-6').

MS (ESI, m/z):

472.8 ((2·M + Na)⁺, 86), 248.2 (MNa⁺, 61).

R_f (DCM : MeOH = 10 : 1): 0.16.

α -[(S)-3-Hydroxy-butanoyl-amino]-thymin (88**)**



200 mg 5-Aminomethyl-uracil-hydrochlorid (**85**) (1.13 mmol), 192 mg EDC (1.23 mmol, 1.1 eq.) und 183 mg HOBt (1.35 mmol, 1.2 eq.) 115 μ l Triethylamin (114 mg, 1.13 mmol, 1.0 eq.) wurden unter Argon in 12 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 118 mg (S)-3-Hydroxybuttersäure (**86**) (1.13 mmol, 1.0 eq.) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0°C während 10 min zugegeben. Man ließ die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmen und 24 Stunden rühren. DMF wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Man erhielt 98 mg α -[(S)-3-Hydroxy-butanoyl-amino]-thymin (**88**) (43 μ mol, 38%) als farblosen Feststoff.

C₉H₁₃N₃O₄ (227.22).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, δ /ppm):

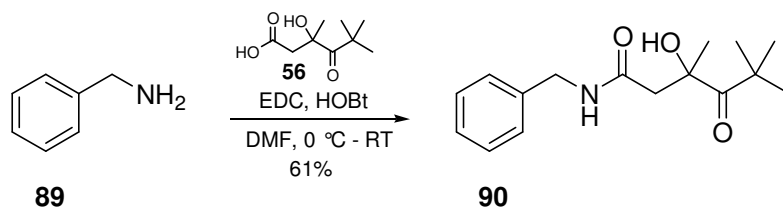
11.08 (s, 1 H 3-NH), 10.73 (d, $J = 5.0$, 1 H, 1-NH), 7.95 (t, $J = 6.8$, 1 H, 2'-NH), 7.21 (d, $J = 5.8$, 1 H, 6-H), 4.60 (bs, 1 H, 5'-OH), 3.96 - 3.91 (m, 1 H, H-5'), 3.80 (d, $J = 5.6$, 2 H, 1'-CH₂), 2.19 (dd, $J_{AB} = 13.9$, $J_{A,5'-H} = 7.3$, 1 H, 4'-H_A), 2.11 (dd, $J_{AB} = 13.8$, $J_{B,5'-H} = 5.7$, 1 H, 4'-H_B), 1.03 (d, $J = 6.3$, 3 H, 6'-CH₃).

¹³C-NMR (101.0 MHz, DMSO, δ /ppm):

171.7 (C_q, 1 C, C-3'), 164.8 (C_q, 1 C, C-4), 152.1 (C_q, 1 C, C-2), 139.8 (C_t, 1 C, C-6), 110.3 (C_q, 1 C, C-5), 64.6 (C_t, 1 C, C-4'), 43.0 (C_s, 1 C, C-1'), 24.3 (C_p, 1 C, C-6').

MS (FAB, m/z):

228 (MH⁺, 5), 174 (76), 129 (14), 102 (100), 58 (20), 44 (7).

(R,S)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (90)

71 mg Benzylamin (**89**) (0.66 mmol), 140 mg EDC (0.73 mmol, 1.1 eq.) und 107 mg HOBT (0.80 mmol, 1.2 eq.) wurden unter Argon in 10 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 125 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) (0.66 mmol, 1.0 eq.) in 5 ml abs. DMF wurde bei 0°C innerhalb 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf RT erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 20 ml Essigsäureethylester aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (EE : Hexan = 1 : 3). Man erhielt 110 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**) (0.40 mmol, 61%) als farbloses Öl.

$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ (277.36).

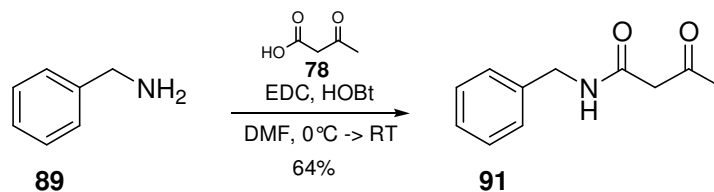
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.26 - 7.22 (m, 5 H, H_{ar}), 4.40 (d, $J = 5.8$, 2 H, 1'-H), 2.91 (d, $J_{\text{AB}} = 14.4$, 1 H, 4'- H_{A}), 2.33 (d, $J_{\text{AB}} = 14.4$, 1 H, 4'- H_{B}), 1.36 (s, 3 H, CH_3), 1.28 (s, 9 H, ^tBu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

219.9 (C_{q} , 1 C, C-6'), 172.8 (C_{q} , 1 C, C-3'), 137.9 (C_{q} , 1 C, $\text{C}_{\text{ar-ipso}}$), 129.2, 128.0 (C_{t} , 5 C, C_{ar}), 81.5 (C_{q} , 1 C, C-5'), 45.8 (C_{s} , 1 C, C-4'), 45.5 (C_{q} , 1 C, C-7'), 43.8 (C_{s} , 1 C, C-1'), 28.0 (C_{p} , 1 C, 5'- CH_3), 27.7 (C_{p} , 3 C, ^tBu).

R_f (EE : Hexan = 1 : 3): 0.41.

Acetessigsäure-benzylamid (91)

210 mg Benzylamin (**89**) (1.96 mmol), 413 mg EDC (2.15 mmol, 1.1 eq.) und 318 mg HOBT (2.35 mmol, 1.2 eq.) wurden unter Argon in 40 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 200 mg Acetessigsäure (**78**) (1.96 mmol, 1.0 eq.) in 10 ml abs. DMF wurde bei 0°C innerhalb 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf RT erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 40 ml Essigester aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (EE : Hexan = 1 : 1). Man erhielt 239 mg Acetessigsäure-benzylamid (**91**) (1.25 mmol, 64%) als farbloses Öl.

C₁₁H₁₃NO₂ (191.23).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

7.35 - 7.25 (m, 5 H, H_{ar}), 4.46 (d, *J* = 5.8, 2 H, 1'-H), 3.45 (s, 2 H, 4'-H), 2.26 (s, 3 H, CH₃).

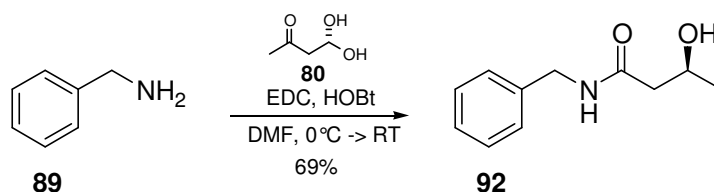
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

205.0 (C_q, 1 C, C-5'), 165.7 (C_q, 1 C, C-3'), 138.3 (C_q, 1 C, C_{ar-ipso}), 129.1, 128.1, 127.9 (C_t, 5 C, C_{ar}), 49.9 (C_s, 1 C, C-4'), 44.0 (C_q, 1 C, C-1'), 31.5 (C_p, 1 C, CH₃).

MS (FAB, *m/z*):

192 (MH⁺, 89), 91 (100).

R_f (EE : Hexan = 1 : 1): 0.15.

(S)-3-Hydroxy-buttersäure-benzylamid (92)

210 mg Benzylamin (**89**) (1.96 mmol), 413 mg EDC (2.15 mmol, 1.1 eq.) und 318 mg HOBT (2.35 mmol, 1.2 eq.) wurden unter Argon in 40 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 204 mg (*S*)-3-Hydroxybuttersäure (1.96 mmol, 1.0 eq.) in 10 ml abs. DMF wurde bei 0°C innerhalb 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf RT erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). Man erhielt 261 mg (*S*)-3-Hydroxybuttersäure-benzylamid (**92**) (1.35 mmol, 69%) als farblosen Feststoff.

C₁₁H₁₅NO₂ (193.24).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

7.37 - 7.26 (m, 5 H, H_{ar}), 4.45 (d, *J* = 5.8, 2 H, 1'-H), 4.44 - 4.17 (m, 1 H, 5'-H), 3.06 (bs, 1 H, 5'-OH), 2.39 (dd, *J* = 15.3, 3.2, 1 H, 4'-H_a), 2.31 (dd, *J* = 15.4, 8.6, 1 H, 4'-H_b), 1.23 (d, *J* = 6.3, 3 H, CH₃).

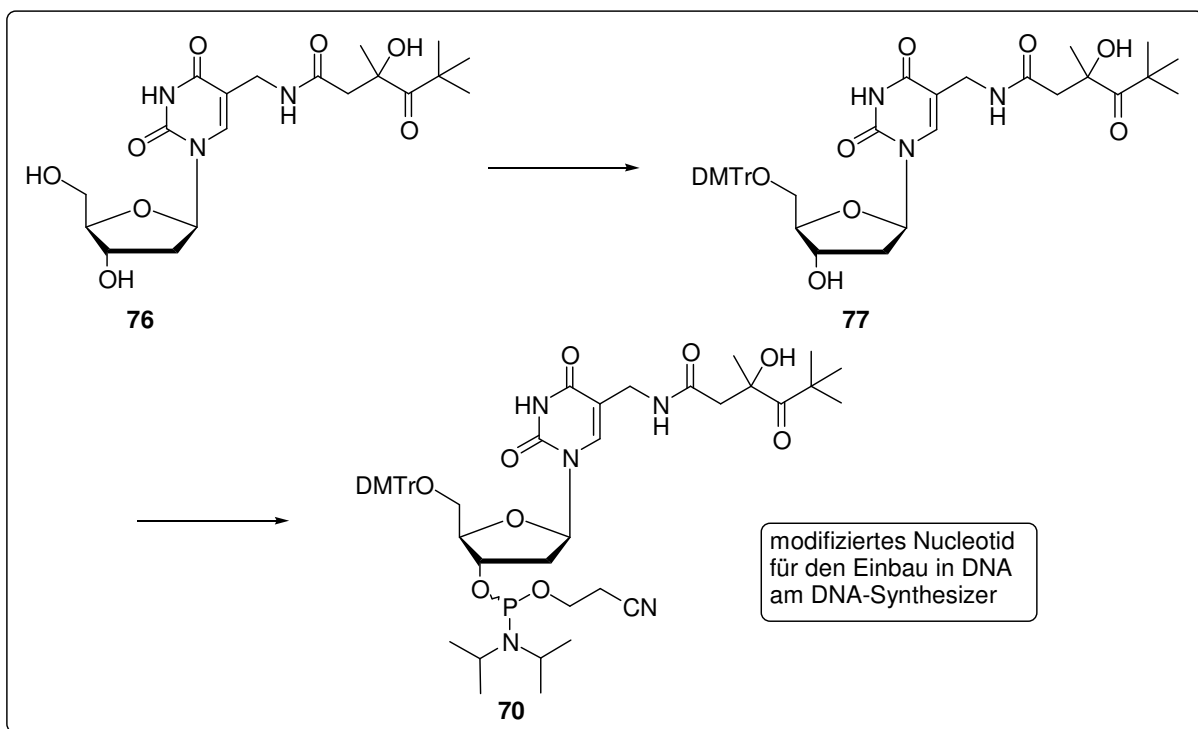
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

172.6 (C_q, 1 C, C-3'), 138.3 (C_q, 1 C, C_{ar-ipso}), 129.2, 128.2, 128.0 (C_t, 5 C, C_{ar}), 65.3 (C_t, 1 C, C-5'), 44.3 (C_s, 1 C, C-4'), 23.3 (C_p, 1 C, CH₃).

R_f (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1): 0.32.

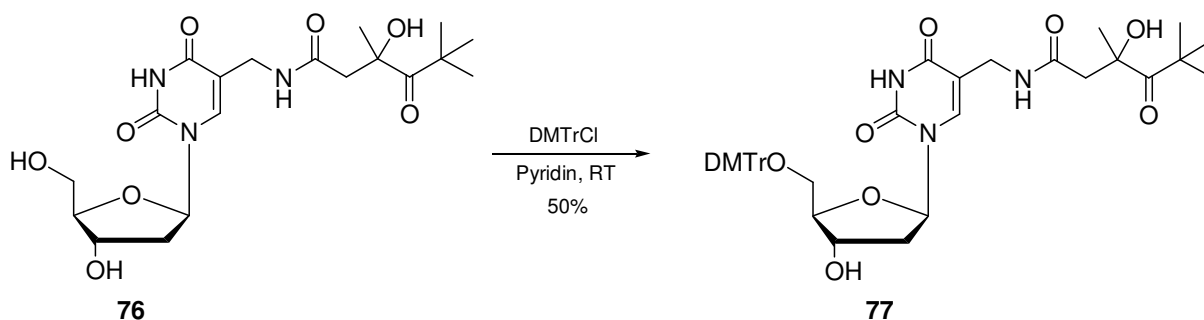
6 Synthese des modifizierten Nucleotids (Elektroneninjektorsystem in der DNA)

6.1 Syntheseübersicht



6.2 Synthese des Injektorsystems (70) für die automatisierte DNA-Festphasensynthese

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (77)



200 mg α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**) (0.47 mmol) wurden dreimal mit je 8 ml abs. Pyridin koevaporiert und anschließend 60 min im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Das Nucleosid wurde anschließend in 20 ml abs. Pyridin gelöst (Argon-Atmosphäre) und man gab 316 mg Dimethoxytritylchlorid (0.93 mmol, 2.0 eq.) und 215 mg Tetrabutylammoniumnitrat (0.76 mmol, 1.5 eq.) zu. Die Reaktionsmischung wurde 15 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 5 ml MeOH gequenchet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert und im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Der Rückstand wurde in 35 ml Dichlormethan aufgenommen und je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{NEt}_3 = 30 : 1 : 0.03 \rightarrow 20 : 1 : 0.02$). Man erhielt 175 mg 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**77**) (0.24 mmol, 50%) als farblosen Schaum.

$\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{10}$ (729.82).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.73, 7.72 (2 br s, je 1H, 6-H), 7.43 - 6.86 (m, 2.13 H, H_{ar}), 6.25 (m, 2.1 H, 1''-H), 4.44 (m, 2.1 H, 3''-H), 3.99 (m, 2.1 H, 4''-H), 3.78 (2s, je 3 H, ar-OCH₃), 3.63 (A von AB, $J = 14.6$, 2.1 H, 1''-H_A), 3.59 (B von AB, $J = 14.6$, 2.1 H, 1''-H_B), 3.36 (m, 2.2 H, 5''-H), 2.72 (2d, $J = 14.7$, 2.1 H, 4''-H_a), 2.31 (m, 2.2 H, 2''-H), 2.18 (2d, $J = 14.7$, 2.1 H, 4''-H_b), 1.28, 1.27 (2s, 2.3 H, 5''-CH₃), 1.22 (s, 2.9 H, ^tBu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

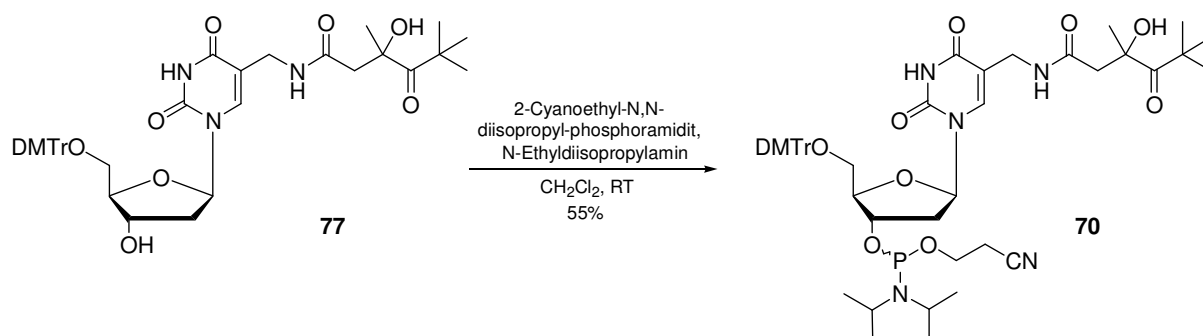
219.95, 219.85 (2 C_q, je 1 C, C-6''), 173.80, 173.70 (2 C_q, je 1 C, C-3''), 165.10 (C_q, 2C, C-4), 160.20 (C_q, 4 C, C_{ar-OMe}), 152.10 (C_q, 2 C, C-2), 146.20 (C_q, 2 C, ^{ipso}C_{Phenyl}), 140.60, 140.40 (2C_t, je 1 C, C-6), 136.90 (C_q, 4 C, ^{ipso}C_{ar}), 131.40, 129.40, 128.90, 128.00, 114.20 (C_t, 13 C, C_{Phenyl, ar}), 111.86, 111.81 (C_q, je 1 C, C-5), 87.90 (C_q, 2 C, 5'-CH₂-C_{R3}), 87.70 (C_t, 2 C, C-4''), 86.60 (C_t, 2 C, C-1'), 82.00, 81.90 (2 C_q, je 1 C, C-5''), 72.50, 72.40 (2 C_q, je 1 C, C-3''), 65.00 (C_s, 2 C, C-5'), 55.70 (C_p, 4 C, ar-OCH₃), 48.40 (C_s, 2 C, C-4''), 48.00 (C_q, 2 C, C-7''), 41.20 (C_s, 2 C, C-2'), 37.00, 36.90 (2 C_s, je 1 C, C-1''), 27.87, 27.84 (2 C_p, je 1 C, 5''-CH₃), 27.80, 27.74 (2 C_p, je 3 C, ^tBu).

MS (FAB + KCl, m/z):

769 (MK⁺, 2), 303 (80), 242 (100), 154 (57), 136 (41), 102 (81), 39 (34).

R_f (DCM : MeOH = 20 : 1): 0.15.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-(*R,S*)-phosphoramidit] (70)



100 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**77**) (0.14 mmol) wurden dreimal mit je 5 ml absolutem Acetonitril koevaporiert und 60 min im HV getrocknet. Das Nucleosid wurde unter Argon in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 98 mg *N*-Ethyl-diisopropylamin (0.75 mmol, 5.5 eq.) sowie 81 mg 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit (0.34 mmol, 2.5 eq.) versetzt. Nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml MeOH abgebrochen. Es wurde mit 25 ml Methylenechlorid verdünnt und zweimal mit je 25 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel gereinigt (EE : Hexan : NEt₃ = 1 : 1 : 0.02). Man erhielt 72 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-(*R,S*)-phosphoramidit] (**70**) (0.08 mmol, 55%) als farblosen Schaum.

C₄₉H₆₄N₅O₁₁P (930.03).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.64 (2 s, 1 H, NH), 7.42 - 7.40 (m, 2 H, *o*-H von Ph), 7.34 - 7.21 (m, 7 H, 2-*m*-H, *o*-H von Ph, *o*-H von PhOMe), 6.84 - 6.82 (m, 4 H, *m*-H von Ph), 6.28 - 6.26 (m, 1 H, 1'-H), 4.62 - 4.57 (m, 1 H, 3'-H), 4.12 - 4.11 (m, 1 H, 4'-H), 3.78 (s, 6 H, 2·OCH₃), 3.82 - 3.28 (m, 8 H, 1''-H_{a,b}, 5'-H_{a,b}, N[CH(CH₃)₂]-POCH₂-), 2.69 - 2.60 (m, 3 H, -CH₂CN, 4''-H_a), 2.55 - 2.51 (m, 1 H, 2'-H_a), 2.31 - 2.25 (m, 1 H, 2'-H_b), 2.12 (m, 1 H, 4''-H_b), 1.30 - 1.22 (m, 24 H, N[CH(CH₃)₂]₂, 5''-CH₃, ^tBu).

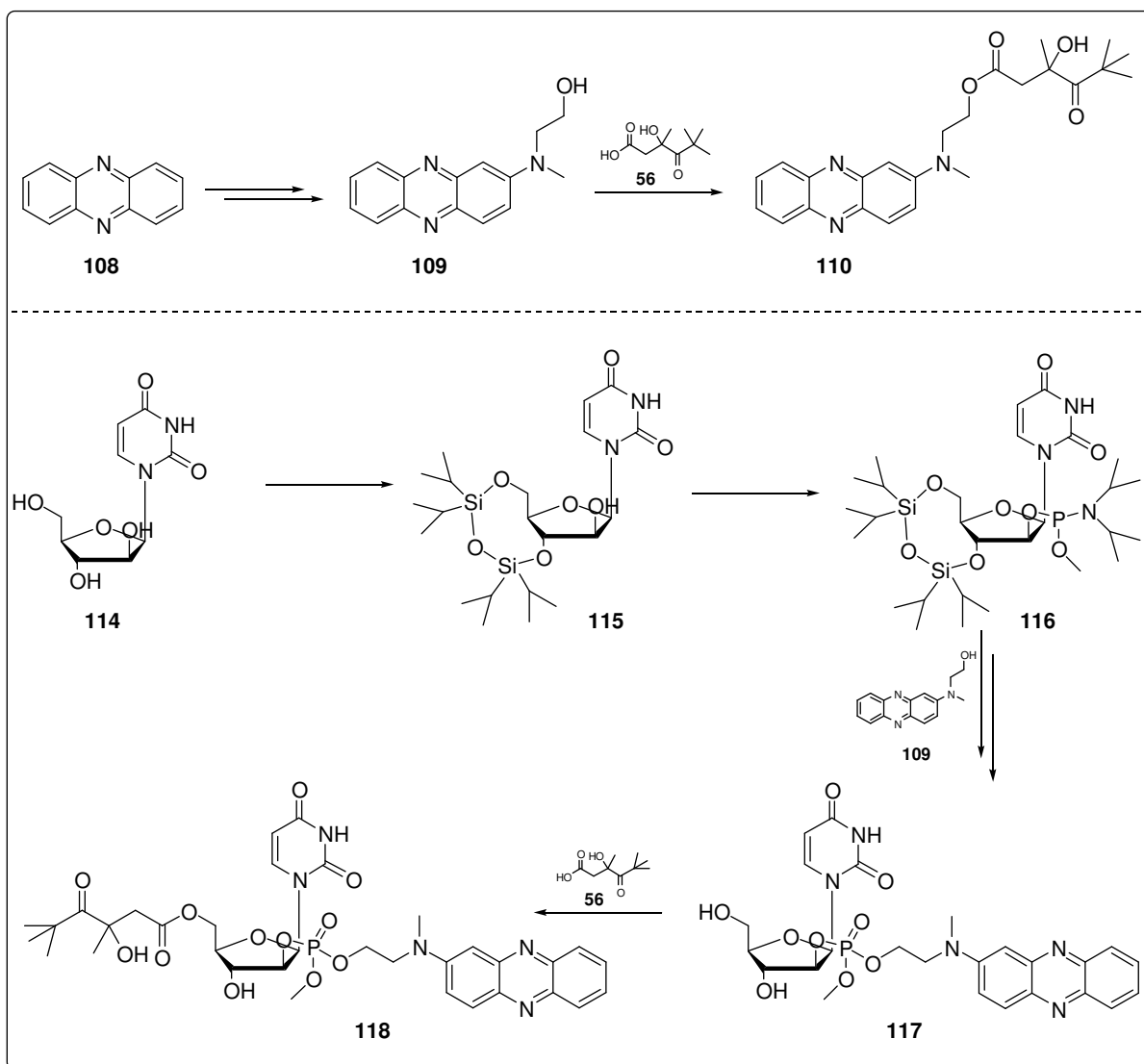
$^{13}\text{C-NMR}$ (101.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

219.5 (C_q, 1 C, C-6''), 173.4 (C_q, 1 C, C-3''), 159.1 (C_q, 1 C, C-4), 136.1 (C_q, 1 C, C-6), 130.6, 128.6, 128.4, 128.1, 127.5 (18 C, C_{ar}), 113.5 (C_q, 1 C, CN), 111.32 (C_q, 1 C, C-5), 87.1 (C_q, 1 C, 5'-CR₃), 86.1 (C_t, 1 C, C-4'), 85.7 (C_t, 1 C, C-1'), 81.3 (C_q, 1 C, C-5''), 78.0 (C_t, 1 C, C-3'), 65.1 (C_s, 1 C, C-5'), 58.6 (C_s, 1 C, -POCH₂-), 51.6 (C_p, 2 C, OCH₃), 46.2 (C_s, 1 C, C-4''), 45.8 (C_q, 1 C, C-7''), 43.6 (C_s, 1 C, C-2'), 37.1 (C_s, 1 C, C-1''), 27.65 (C_p, 3 C, ^tBu), 24.1 (C_p, 1 C, 5''-CH₃), 23.3 (C_p, 4 C, -N(ⁱPr)₂), 20.5 (C_s, 1 C, -CH₂CN).

R_f (DCM : MeOH = 20 : 1): 0.21.

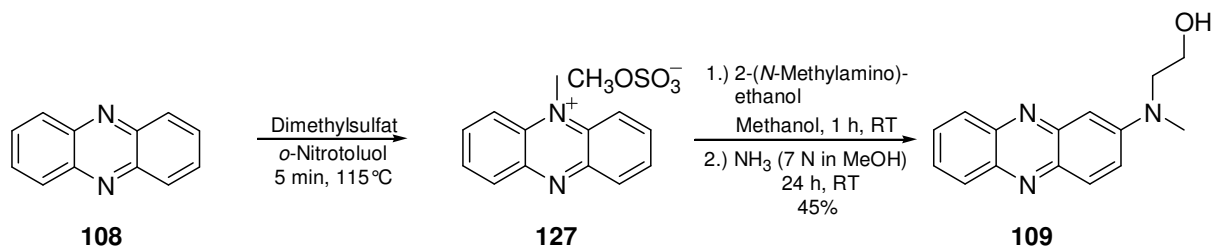
7 Phenazinderivate als alternative Detektorsysteme zum T-Dimer für den Elektronentransfer in DNA

7.1 Syntheseübersicht



7.2 Synthese der Modellsysteme

2-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl]aminophenazin (**109**)^[96]



1.8 g Phenazin (**108**) (10 mmol) wurden in 10 ml destilliertem *o*-Nitrotoluol gelöst und auf 115°C erwärmt. Unter Rühren gab man 2.84 ml Dimethylsulfat (30 mmol, 3.0 eq.) zu und ließ die hellbraune Lösung fünf Minuten lang bei 115°Citerrühren. Anschließend ließ man abkühlen und gab dann im Eiswasserbad 40 ml Diethylether zu. Die dunkelgrünen *N*-Methylphenazinium-sulfat-Kristalle (**127**) wurden abfiltriert und mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt wurde ohne Charakterisierung direkt weiterumgesetzt. 1.25 g *N*-Methylphenazinium-sulfat wurden in 6 ml Methanol gelöst und unter Rühren mit 1.9 ml 2-(*N*-Methylamino)-ethanol (826 mg, 1.1 eq.) versetzt. Die Lösung änderte ihre Farbe direkt bei Zugabe des 2-(*N*-Methylamino)-ethanols von dunkelgrün nach tief violett. Man ließ die Reaktionsmischung eine weitere Stunde rühren und entfernte das Lösungsmittel dann am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wurde dreimal mit je 20 ml Dimethylether versetzt, welcher abdekantiert wurde. Anschließend wurde der Rückstand mit 150 ml methanolischer Ammoniak-Lösung (7 N in MeOH) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die rote Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1 → 20 : 1). Man erhielt 482 mg 2-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl]aminophenazin (**109**) (1.9 mmol, 45 %) als roten Feststoff.

C₁₅H₁₅N₃O (253.30).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

8.13 - 8.04 (m, 2 H, H_{ar}), 7.91 (bs, 1 H, H_{ar}), 7.77 - 7.50 (m, 3 H, H_{ar}), 6.96 (d, *J* = 2.7, 1-H), 3.96 (t, *J* = 5.4, 2 H, -CH₂OH), 3.69 (t, 2 H, -NCH₂CH₂OH), 3.11 (s, 3 H, -NCH₃), 2.36 (bs, 1 H, -OH).

^{13}C -NMR (101.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

141.0, 130.1, 129.3, 128.2, 127.5, 122.9, 102.5 (C_q , C_t , 12 C, C_{ar}), 60.1 (C_s , 1 C, C-2), 54.6 (C_s , 1 C, C-1), 39.2 (C_p , 1 C, NCH_3).

MS (EI, m/z):

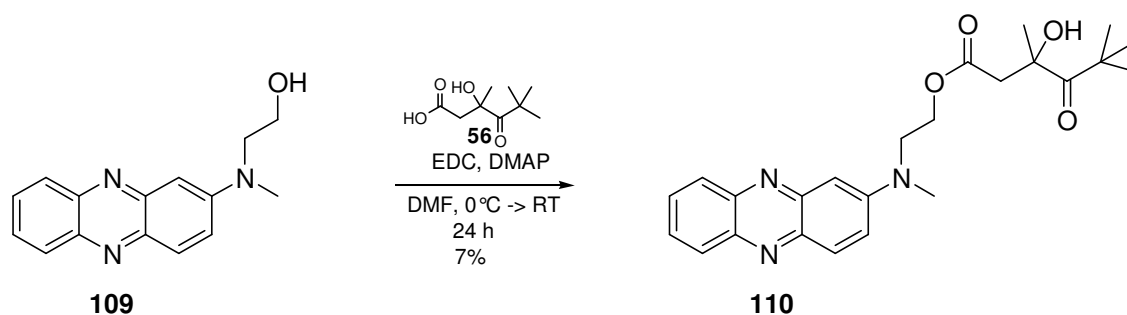
253 (M^+ , 28), 222 (100), 207 (11).

MS (FAB, m/z):

254 (MH^+ , 100), 222 (39), 208 (15), 57 (18), 43 (18).

R_f (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1): 0.45.

(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)-ethylester



100 mg 2-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methyl]aminophenazin (**109**) (0.395 mmol), 92.8 mg EDC (0.474 mmol, 1.2 eq.) und 96.4 mg DMAP (0.237 mmol, 0.6 eq.) wurden unter Argon in 3 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 37.2 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (**56**) (0.395 mmol, 1.0 eq.) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0°C innerhalb 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CH_2Cl_2 : MeOH = 40 : 1). Man erhielt 11 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)ethylester (**110**) (0.026 mmol, 7%) als orangegelben Feststoff.

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ (423.50).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

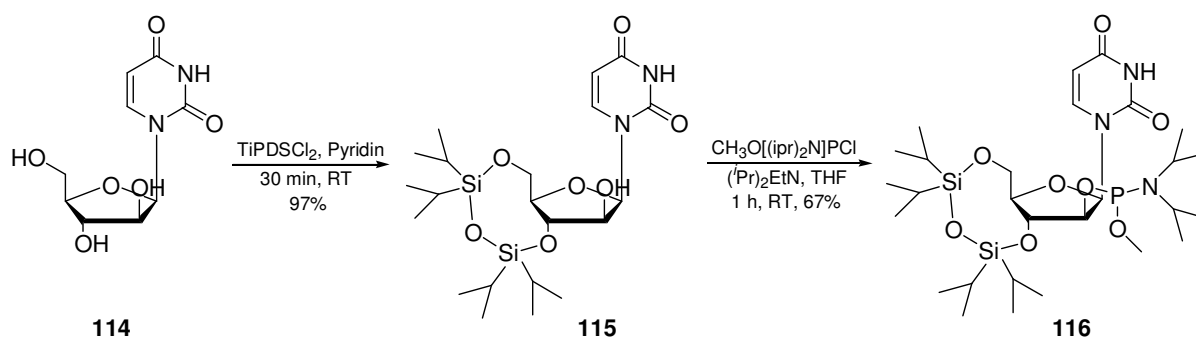
8.13 - 8.04 (m, 2 H, H_{ar}), 7.91 (d, $J = 0.5$, 1 H, H_{ar}), 7.77 - 7.50 (m, 3 H, H_{ar}), 6.96 (d, $J = 2.7$, 1-H), 4.37 (t, $J = 5.4$, 2 H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OR}$), 3.83 (t, 2 H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OR}$), 3.22 (s, 3 H, $-\text{NCH}_3$), 3.11 (A von AB, $J = 16.7$, 1 H, $-\text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{OHCO}^t\text{Bu}-\text{H}_\text{A}$), 2.43 (B von AB, $J = 16.6$, 1 H, $-\text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{OHCO}^t\text{Bu}-\text{H}_\text{B}$), 1.35 (s, 3 H, $-\text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{OHCO}^t\text{Bu}$), 1.29 (s, 9 H, ^tBu).

MS (EI, m/z):

424 (MH^+ , 100).

R_f (DCM : MeOH = 40 : 1): 0.47.

3',5'-O-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabino-uridin-2'-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (116) via 3',5'-O-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabinouridin (115)^[97]



500 mg Uracil-1- β -D-arabinofuranosid (**114**) (2.05 mmol) wurden in 17 ml absolutem Pyridin gelöst. Unter Rühren wurden 693 μl 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan (2.22 mmol, 1.1 eq.) während 10 Minuten zuge tropft und man ließ 30 Minuten bei Raumtemperatur weiter rühren. Anschließend wurde zur Verdünnung der Reaktionslösung Dichlormethan zugegeben und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (Pentan : $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1 \rightarrow 1 : 1 \rightarrow \text{MeOH}$, mit dem Pentan : Et_2O -Lösemittelgemisch eluiert nur das Edukt, das Produkt wird mit Methanol von

der Säule gespült) gereinigt. Man erhielt 960 mg 3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabinouridin (**115**) (1.99 mmol, 97%) als farblosen Feststoff, der direkt weiter umgesetzt wurde.

3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabinouridin (115)

C₂₁H₃₈N₂O₇Si₂ (486.71).

MS (FAB, m/z):

487 (MH⁺, 52), 443 (22), 261 (100), 97 (73).

MS (FAB + KCl, m/z):

525 (MK⁺, 15), 487 (MH⁺, 39), 443 (19), 261 (100), 97 (68), 39 (92).

100 mg 3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabinouridin (**115**) (0.205 mmol) wurden in 4 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren wurden zunächst 350 µl Diisopropyl-ethylamin (1.97 mmol, 9.5 eq.) und dann 61.6 µl 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchloro-phosphoramidit (0.308 mmol, 1.5 eq.) zugetropft. Man ließ die Reaktionsmischung eine Stunde rühren, bevor die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Methanol abgebrochen wurde. Man ließ noch weitere 15 Minuten rühren, gab Essigsäureethylester zu und schüttelte dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie gesättigter Natriumchloridlösung aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und chromatographisch (DCM : MeOH = 100 : 0 → 80 : 1 → 40 : 1, Lösungsmittelgemisch enthielt 2 Vol.% NEt₃) an Kieselgel gereinigt. Man erhielt 89 mg 3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabino-uridin-2'-*O*-(2-cyanoethyl)-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit (**116**) (0.137 mmol, 67%) als farblosen Feststoff.

3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabino-uridin-2'-*O*-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (116)

C₂₈H₅₄N₃O₈PSi₂ (647.89).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.82 (d, $J = 8.1$, 1 H, 6-H), 6.07 (d, $J = 6.1$, 1-H, 1'-H), 5.70 (d, $J = 8.1$, 1 H, 5-H), 4.58 - 4.54 (m, 1 H, 3'-H), 4.16 - 4.10 (m, 3 H, POCH_3), 4.01 (A von AB, $J = 2.8$, 1 H, 5'-H_A), 3.98 (B von AB, $J = 2.8$, 1 H, 5'-H_B), 3.78 - 3.77 (m, 1 H, 4'-H), 1.11 - 1.01 (m, 54 H, ^iPr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

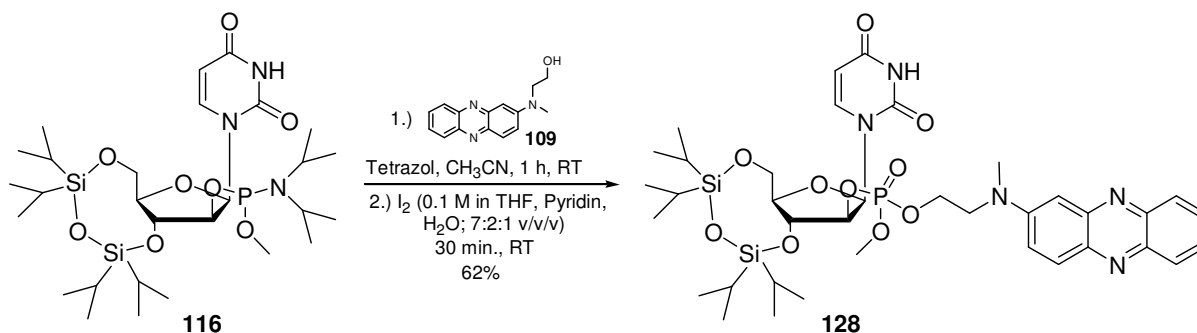
164.4 (C_q , 1 C, C-4), 151.8 (C_q , 1 C, C-2), 141.0 (C_t , 1 C, C-6), 102.0 (C_t , 1 C, C-5), 84.7 (C_t , 1 C, C-4'), 81.3 (C_t , 1 C, C-1'), 75.8 (C_t , 1 C, C-3'), 72.1 (C_t , 1 C, C-2'), 60.5 (C_s , 1 C, C-5'), 17.7 (C_p , 12 C, ^iPr), 13.5 (C_t , 6 C, ^iPr).

MS (ESI, m/z):

1317.2 ($(2 \cdot \text{M} + \text{Na})^+$, 71), 670.6 (MNa^+ , 80).

R_f (DCM : MeOH = 80 : 1, + 2 Vol.% NEt_3): 0.13.

3',5'-O-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabino-uridin-2'-[O-methyl)-(O-2-(*N*-methyl)-aminophenazin-(2-*N*-ethyl)-phosphat (128)^[97]



204 mg 3',5'-O-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabino-uridin-2'-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (**116**) (0.315 mmol) wurden zusammen mit 65 mg 2-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methyl]aminophenazin (**109**) (0.256 mmol, 0.8 eq.) dreimal mit je fünf ml absolutem Acetonitril koevaporiert und anschließend in 0.5 ml absolutem Acetonitril gelöst. Man gab unter Rühren 2.8 ml Tetrazol zu und ließ eine Stunde bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.5 ml I_2 -Lösung (0.1 M in THF, Pyridin, H_2O ; 7:2:1 v/v/v) abgebrochen und die Reaktionsmischung eine weitere halbe Stunde gerührt.

Anschließend gab man Dichlormethan zu und schüttelte dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie gesättigter Natriumchloridlösung aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und chromatographisch (2% - 4% EtOH/DCM) an Kieselgel gereinigt. Man erhielt 135 mg 3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabino-uridin-2'-[*O*-methyl)-(2-(*N*-methyl)-aminophenazin-(2-*N*-ethyl)-phosphat (**128**) (0.195 mmol, 62%) als tiefroten Feststoff.

$C_{37}H_{54}N_5O_{10}PSi_2$ (816.00).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

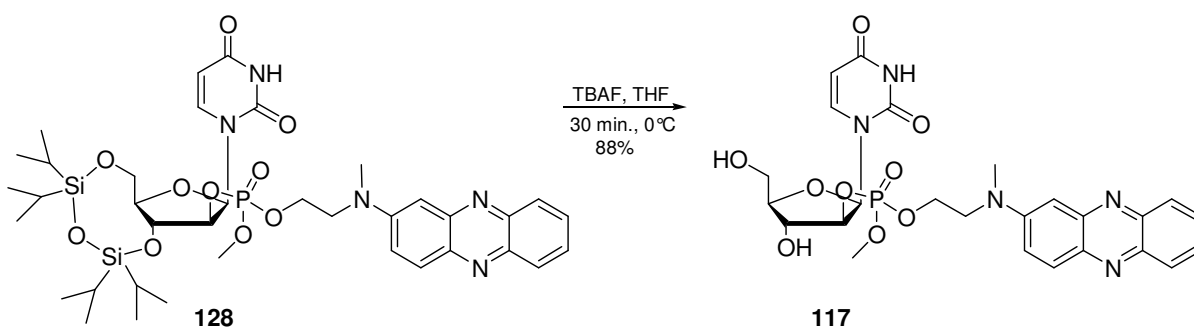
8.04 - 7.84 (m, 3 H, H_{ar}), 7.65 - 7.35 (m, 4 H, H_{ar}), 7.01 - 6.89 (m, 1 H, H_{ar}), 6.11 - 6.07 (m, 1 H, 1'-H), 5.63 - 5.59 (m, 1 H, 5-H), 4.98 - 4.79 (m, 1 H, 2'-H), 4.37 - 4.32 (m, 1 H, 3'-H), 4.19 - 4.13 (m, 2 H, PO- $\underline{CH_2}$ -), 3.90 - 3.83 (m, 2 H, 5'- $H_{a,b}$), 3.61 - 3.49 (m, 3 H, 4'-H, N- $\underline{CH_2}$ -), 3.44 (s, 3 H, PO- $\underline{CH_3}$), 3.15 - 3.05 (m, 3 H, N- $\underline{CH_3}$), 1.00 - 0.85 (m, 28 H, iPr).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

7.83, 6.62, 0.27, -1.41.

R_f (DCM : EtOH = 96 : 4): 0.71.

Arabinouridin-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]phosphat (117**)^[97]**



135 mg 3',5'-*O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxyl-arabinouridin-2'-[*O*-methyl)-(2-(*N*-methyl)-aminophenazin-(2-*N*-ethyl)-phosphat (**128**) (0.158 mmol) wurden in 1.7 ml

absolutem THF gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren wurden 0.24 ml einer TBAF-Lösung (1 M in THF, 0.237 mmol, 1.5 eq.) zugetropft und die Reaktionsmischung bei 0°C 30 Minuten gerührt. Anschließend gab man 20 ml Hexan zu, dekantierte das Lösungsmittel vom zähflüssigen Rückstand ab und reinigte diesen chromatographisch (6 - 7% EtOH in DCM) an Kieselgel. Man erhielt 80 mg Arabinouridin-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]phosphat (**117**) (0.139 mmol, 88%) als tiefroten Feststoff.

C₂₅H₂₈N₅O₉P (573.49).

¹H-NMR (400 MHz, MeOH, δ/ppm):

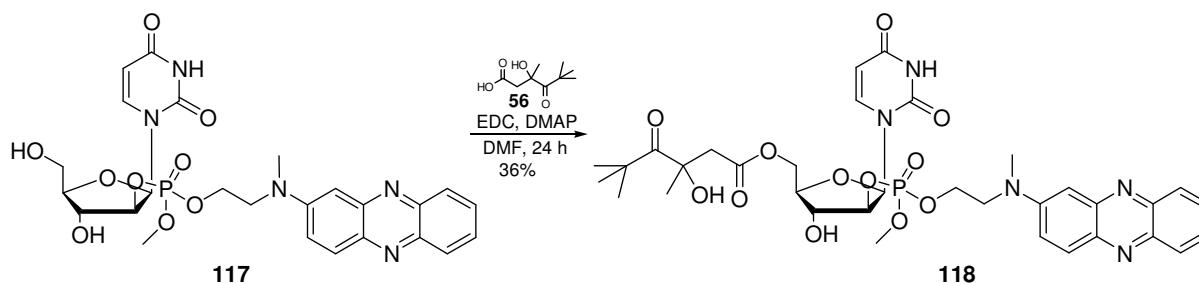
8.07 - 7.96 (m, 3 H, H_{ar}), 7.94 - 7.67 (m, 4 H, H_{ar}), 6.94 (bs, 1 H, H_{ar}), 6.19 (bs, 1 H, 1'-H), 5.71 - 5.67 (m, 1 H, 5-H), 4.55 - 4.54 (m, 1 H, 3'-H), 4.26 (bs, 2 H, PO-CH₂-), 3.98 - 3.74 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H_{A,B}, N-CH₂-, PO-CH₃), 3.35 - 3.32 (m, 3 H, N-CH₃), 2'-H liegt unter dem Lösungsmittelsignal von CD₃OD.

¹³C-NMR (101.0 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

164.3 (C_q, 1 C, C-4), 151.4 (C_q, 1 C, C-2), 141.0 (C_t, 1 C, C-6), 140.4, 130.8, 129.6, 128.9, 127.51, 124.2, 100.8 (C_q, C_t, 12 C, C_{ar}), 99.8 (C_t, 1 C, C-5), 85.6 (C_t, 1 C, C-4'), 79.1 (C_t, 1 C, C-1'), 75.1 (C_t, 1 C, C-3'), 63.1 (C_t, 1 C, C-2'), 61.3 (1 C, N-CH₂CH₂), 58.5 (C_s, 1 C, C-5'), 52.5 (1 C, N-CH₂CH₂), 38.7 (1 C, NCH₃).

R_f (DCM : EtOH = 93 : 7): 0.29.

Arabinouridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-ester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]phosphat (118**)**



80 mg Arabinouridin-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]phosphat (**117**) (0.139 mmol), 65.6 mg EDC (0.167 mmol, 2.4 eq.) und 68.2 mg DMAP (0.237 mmol, 1.2 eq.) wurden unter Argon in 2 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 26 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (0.139 mmol, 1.0 eq.), in 2 ml abs. DMF wurde bei 0°C innerhalb 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, während man auf Raumtemperatur erwärmen ließ. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1). Man erhielt 37 mg Arabinouridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-ester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]-phosphat (**118**) (0.05 mmol, 36%) als tiefrot-violetten Feststoff.

C₃₄H₄₂N₅O₁₂P (743.70)

¹H-NMR (400 MHz, MeOH, δ/ppm):

8.07 - 7.97 (m, 3 H, H_{ar}), 7.85 - 7.64 (m, 4 H, H_{ar}), 6.97 - 6.96 (m, 1 H, H_{ar}), 6.24 - 6.18 (m, 1 H, 1'-H), 5.75 - 5.68 (m, 1 H, 5-H), 4.55 - 4.54 (m, 1 H, 3'-H), 4.26 (bs, 2 H, PO-CH₂-), 3.89 - 3.73 (m, 8 H, 4'-H, 5'-H_{A,B}, N-CH₂-, PO-CH₃), 3.31 - 3.30 (m, 3 H, N-CH₃), 3.04 (A von AB, *J* = 16.4, 1 H, -OCOCH₂C(CH₃)OHCO^tBu-H_A), 2.43 (B von AB, *J* = 16.6, 1 H, -OCOCH₂C(CH₃)OHCO^tBu -H_B), 1.35 (s, 3 H, -OCOCH₂C(CH₃)OHCO^tBu), 1.29 (s, 9 H, ^tBu), 2'-H liegt unter dem Lösungsmittelsignal von CD₃OD.

MS (ESI, m/z):

7435 (M⁺, 100).

R_f (DCM : MeOH = 10 : 1): 0.14.

Photolysen

1 Photolyseexperimente

1.1 allgemeine Photolysevorschrift

Eine angegebene Menge des Photoedukts wurde im jeweiligen Lösungsmittel in einer 3 ml UV-Quarzglas-Küvette (SUPRASIL[®]) gelöst (für einige Versuche wurde außerdem ein interner Standard, manchmal auch ein H-Donor* zugegeben). Nun wurde während 20 Minuten mit Argon entgast und die Küvette mit einem Septum verschlossen. Die Probe wurde bei 15 °C unter Argon am Bestrahlungsstand (ORIEL 68810) mit einer Quecksilberkurzbogenlampe und dem angegebenen Steilkantenfilter belichtet. Der Bestrahlungslösung wurden in Zeitabständen von 1, 2, 5, 10, 20 und 30 Minuten Bestrahlungsdauer Proben von je 0.2 ml entnommen und die Produkte am HPLC analysiert (qualitativ durch Koinjektion der unabhängig synthetisierten Referenzen, quantitativ mit den ermittelten Flächenfaktoren bzgl. eines Standards). Als Vergleich wurde am HPLC ebenfalls die unbestrahlte Lösung (Start) untersucht. Die per HPLC ermittelten absoluten Ausbeuten sind in Prozent bezogen auf die Startprobe angegeben.

* als H-Donor wurde in wässrigen Lösungen L-Glutathion ($k_H = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), in organischen Lösungsmitteln Decanthiol ($k_H \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) verwendet (Abb. 1.1).^[87, 88]

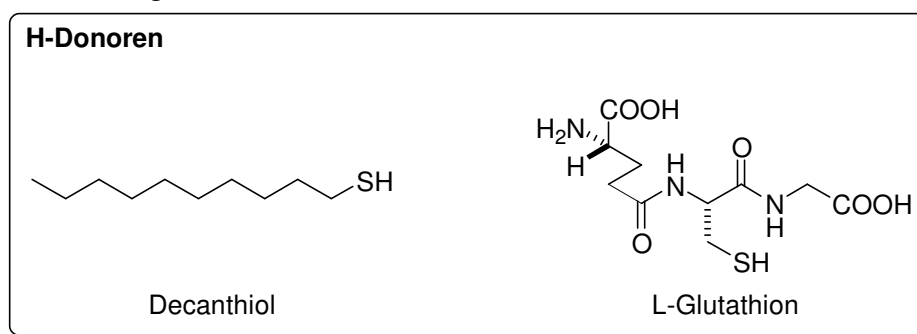


Abbildung 1.1: verwendete H-Donoren

1.2 Bestrahlung der N-verknüpften Modellsysteme

Die N-verknüpften Photoedukte 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin (**48**) und 9-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-adenin (**50**) wurden wie in der obigen allgemeinen Photolysevorschrift beschrieben bestrahlt. Als Lösungsmittel wurden pH-Puffer mit pH 4 [Natrium-citratpuffer für die HPCE (Fluka)], pH 7 [Phosphorsäure/di-Natriumhydrogenphosphatpuffer für die HPCE (Fluka)], und pH 9 [Phosphorsäure/di-

Natriumhydrogenphosphatpuffer für die HPCE (Fluka)], sowie Methylenchlorid verwendet. Außerdem wurde für einige Experimente L-Glutathion als H-Donor zugegeben.

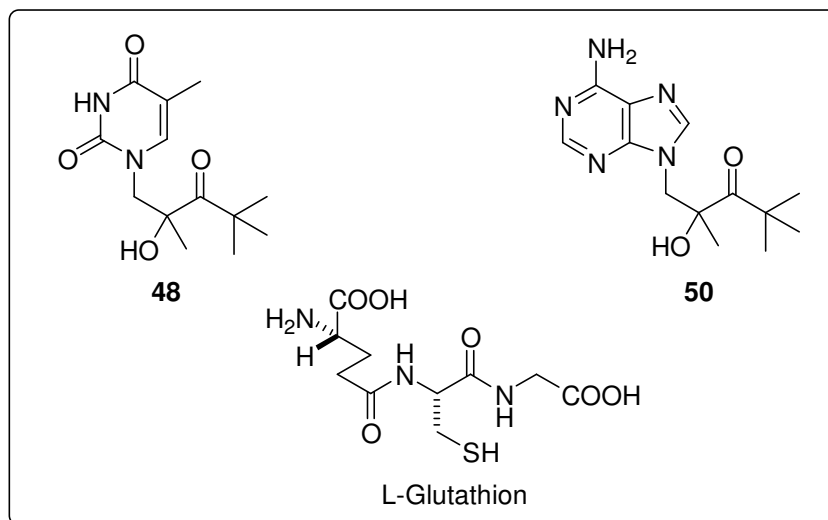
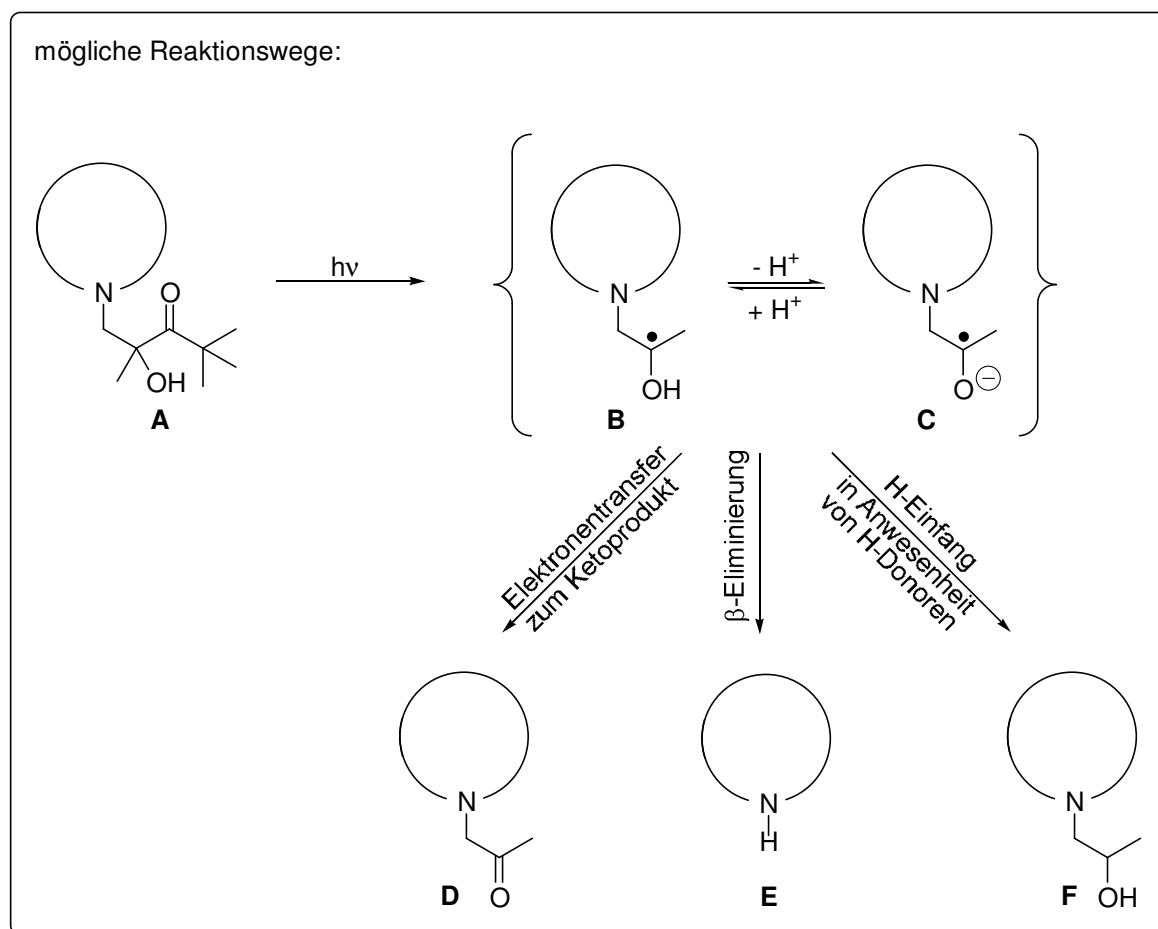


Abbildung 1.2: verwendete N-verknüpfte Photoedukte.

Die möglichen Reaktionswege und die daraus resultierenden Produkte der N-verknüpften Derivate sind in Schema 1.1 dargestellt.



Schema 1.1: Reaktionswege und Produkte der Bestrahlung von 1-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-thymin und 9-(2'-Hydroxy-2',4',4'-trimethylpentyl-3'-on)-adenin

Um auszuschließen, daß das Elektronentransferprodukt (Ketoprodukt) durch evtl. nach dem Spülen der Lösung mit Argon noch vorhandenen Sauerstoff gebildet worden sein könnte, wurde zudem eine Probe (T-Derivat, pH 7-Puffer) mit Sauerstoff gesättigt und bestrahlt.

Lösungsmittel: siehe Tab. 1.1

	HPLC-Gradient (RP-18e-Säule)			
	Zeit [min]	Fluß [ml/min]	% Wasser	% Acetonitril
H-Donor: L-Glutathion	0	1	90	10
Bestrahlungstemperatur: 15°C	5	1	90	10
Wellenlänge: 320 nm Cut-Off Filter	30	1	10	90
Bestrahlungsdauer: 10 min	33	1	90	10

Lösungsmittel	Zusatz	ET / β -Eliminierung / H-Abstraktion		Ausbeute	
		Keton : Thymin : H-Abstraktion D : E : F	Keton : Adenin : H-Abstraktion* D : E : F	D + E + F	
Puffer pH 4	kein Zusatz	4 : 1 : -	1 : 2 : -	71%	69%
Puffer pH 4	5 eq. H-Donor	12 : 1 : -	- : 1 : 30	68%	65%
Puffer pH 4	10 eq. H-Donor	12 : 1 : -	- : 1 : 24	72%	67%
Puffer pH 4	25 eq. H-Donor	16 : 1 : -	- : 1 : 28	71%	70%
Puffer pH 4	50 eq. H-Donor	18 : 1 : -	- : 1 : 36	69%	64%
Puffer pH 7	kein Zusatz	1 : 25 : -	1 : 17 : -	80%	79%
Puffer pH 7	O ₂ -gesättigt	100 : - : -	-	82%	-
Puffer pH 9	kein Zusatz	1 : 22 : -	1 : 18 : -	67%	58%
CF ₃ CH ₂ OH	kein Zusatz	1 : 40 : -	-	70 %	-
CF ₃ CH ₂ OH	+ HCl (\rightarrow pH 3)	20 : 1 : -	-	74 %	-
CH ₂ Cl ₂	kein Zusatz	20 : 1 : -	1 : 4 : -	88%	73%

Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte an der HPLC: T-Edukt: 16.8, Thymin: 3.0, T-Keton: 4.2; A-Edukt: 15.5, Adenin: 2.9, A-Keton: 3.7, A-H-Einfang: 4.3, Standard [1,3-Di-(propyl-2'-on)-thymine]: 9.2.

*H- Abstraktionsprodukt wurde durch ESI (sammeln des Peaks am HPLC und lyophilisieren des Produktes) identifiziert [MS (ESI, m/z): 193 (M⁺, 82)].

Table 1.1: Ergebnisse der Bestrahlung der N-verknüpften Modellsysteme **48** und **50**.

1.3 Bestrahlung von 76, 86 und 90

α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**), α -(3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino)-thymidin (**86**) und (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**) wurden wie in der obigen allgemeinen Photolysevorschrift beschrieben bestrahlt. Als Lösungsmittel wurde für die Photolyse (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**) Methanol, sowie Acetonitril, ein Methanol/Wasser-Gemisch (1 : 4) für α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**), sowie DMSO (mit 4 Vol.-% D₂O) für α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**86**) verwendet. Als H-Donoren wurden L-Glutathion und Decanthiol verwendet.

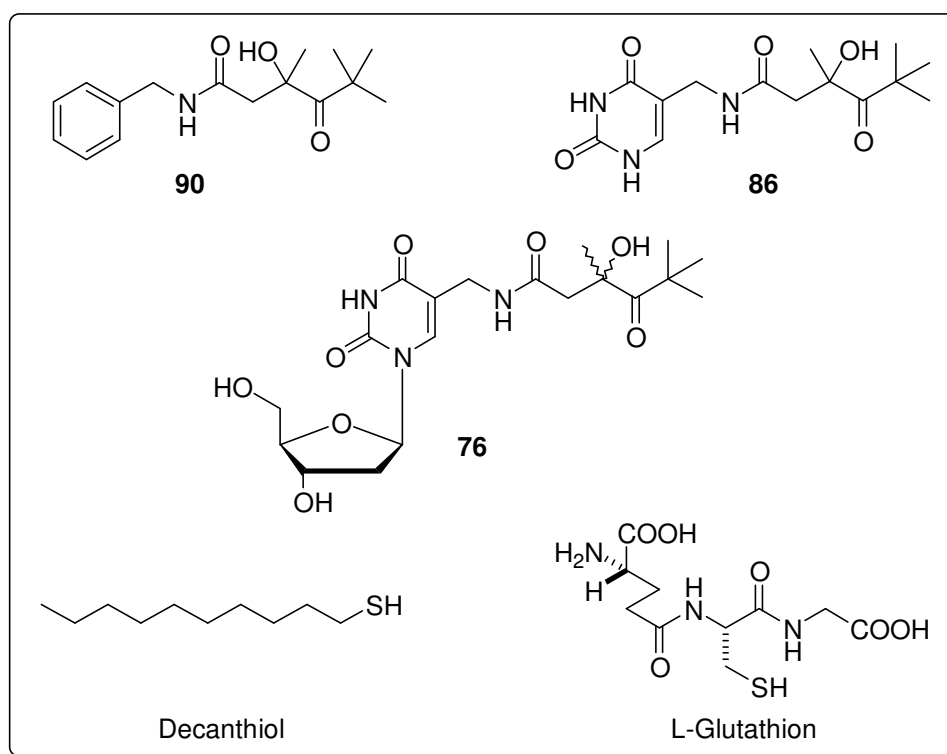
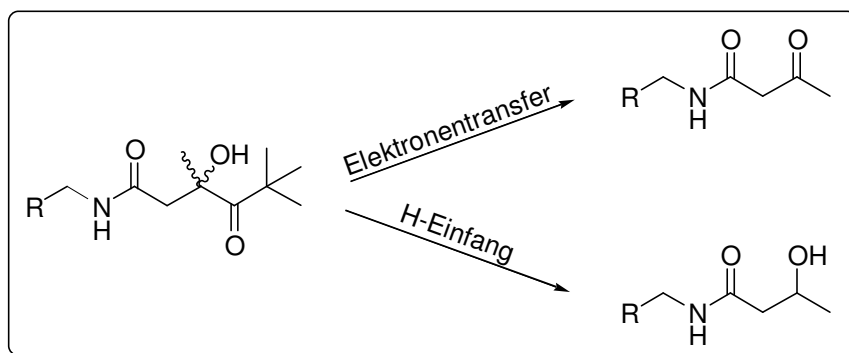


Abbildung 1.3: verwendete Photoedukte und H-Donoren

Da bei diesen Systemen keine β -Eliminierung stattfinden kann, hat man nur noch Elektronentransfer und H-Einfang als mögliche Reaktionswege und somit nur noch das Keto- und das Hydroxylprodukt als mögliche Produkte (vgl. Schema 1.2).



Schema 1.2: Reaktionswege und Produkte der Bestrahlung der amid-verknüpften Systeme.

Lösungsmittel: siehe Tab. 1.2

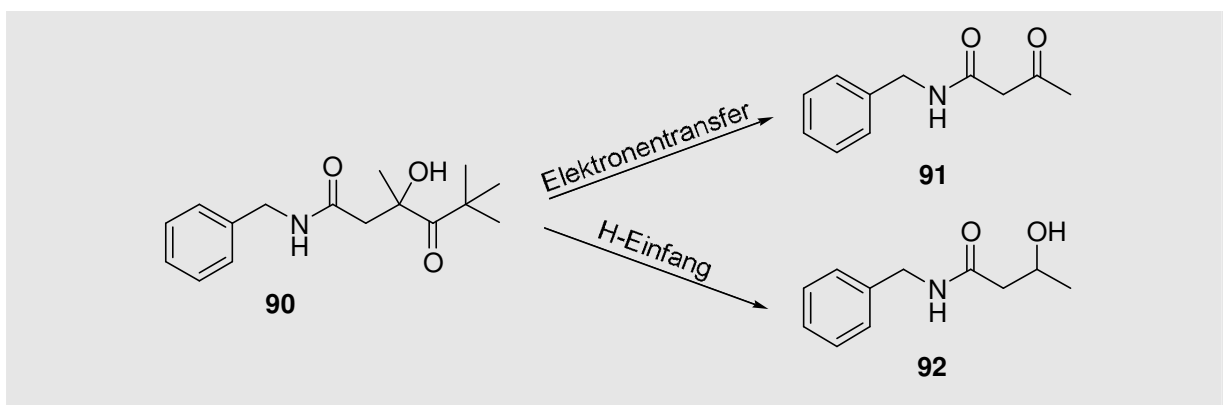
H-Donor: Decanthiol

Bestrahlungstemperatur: 15°C

Wellenlänge: 320 nm Cut-Off Filter

Bestrahlungsdauer: 10 min

HPLC-Gradient (RP-18e-Säule)			
Zeit [min]	Fluß [ml/min]	% Wasser	% Acetonitril
0	1	90	10
5	1	90	10
30	1	10	90
35	1	10	90
38	1	90	10



Lösungsmittel	Zusatz	ET / H-Abstraktion	Ausbeute
Acetessigsäure-benzylamid : (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-buttersäure- benzylamid 91 : 92			
CH ₃ CN	kein Zusatz	3 : 2	83%
CH ₃ CN	5.6 eq. H-Donor	1 : 22	87%
MeOH	kein Zusatz	9 : 5	85%
MeOH	5.6 eq. H-Donor	1 : 33	90%

Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte an der HPLC: Photoedukt: 23.4, Keton: 14.3, H-Einfang: 13.1.

Tabelle 1.2: Ergebnisse der Bestrahlung von (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-benzylamid (**90**).

Lösungsmittel: siehe Tab. 1.3

H-Donor: Decanthiol, L-Glutathion

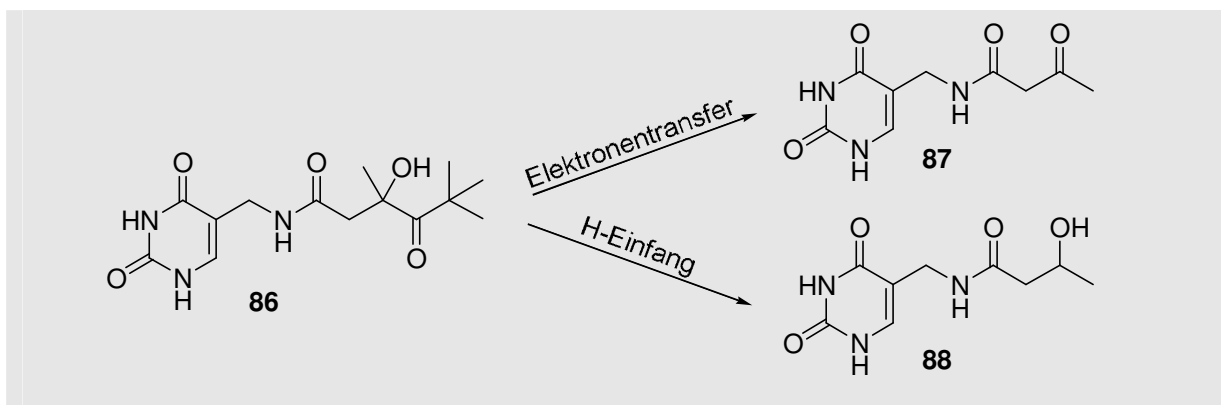
Bestrahlungstemperatur: 15 °C

Wellenlänge: 320 nm Cut-Off Filter

Bestrahlungsdauer: 10 min

HPLC-Gradient (RP-18e-Säule)

Zeit [min]	Fluß [ml/min]	% Wasser	% Acetonitril
0	1	100	0
5	1	100	0
25	1	80	20
45	1	10	90
50	1	100	0



Lösungsmittel	Zusatz	ET / H-Abstraktion	Ausbeute
		α -(3-Oxo-butanoyl-amino)- thymine : α -[(R,S)-3-Hydroxy- butanoyl-amino]-thymine 87 : 88	
MeOH	kein Zusatz	3 : 1	62%
MeOH	5 eq. Decanthiol	ET < 5%	86%
DMSO (4 Vol.-% D ₂ O)	5 eq. L-Glutathion	ET < 5%	91%

Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte an der HPLC: Photoedukt: 28.1, Keton: 12.1, H-Einfang: 12.3.*

* da Keto- und H-Einfangprodukt nahezu gleich eluieren und kein Gradient gefunden werden konnte, bei dem eine Grundlinientrennung möglich ist, wurden beide Peaks zusammen gesammelt, lyophilisiert und am NMR (500 MHz, DMSO) analysiert, um das Produktverhältnis angeben zu können.

Tabelle 1.3: Ergebnisse der Bestrahlung von α -[(R,S)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymine (**86**).

Lösungsmittel: siehe Tab. 1.4

H-Donor: L-Glutathion

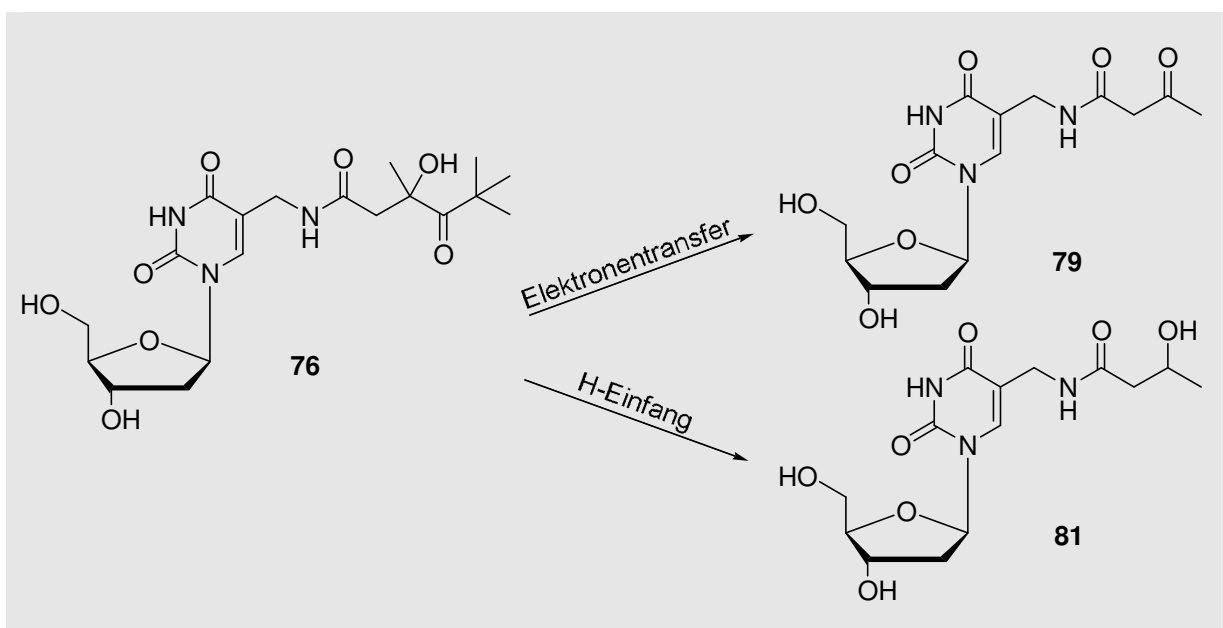
Bestrahlungstemperatur: 15°C

Wellenlänge: 320 nm Cut-Off Filter

Bestrahlungsdauer: 10 min

HPLC-Gradient (RP-18e-Säule)

Zeit [min]	Fluß [ml/min]	% Wasser	% Acetonitril
0	1	90	10
5	1	90	10
25	1	10	90
30	1	90	10



Lösungsmittel	Zusatz	ET / H-Abstraktion	Ausbeute
Ketoprodukt : Hydroxylprodukt 79 : 81			
MeOH/H ₂ O (1 : 4)	kein Zusatz	9 : 1	83%
MeOH/H ₂ O (1 : 4)	5 eq. H-Donor	3 : 1	73%
MeOH/H ₂ O (1 : 4)	50 eq. H-Donor	2 : 1	82%

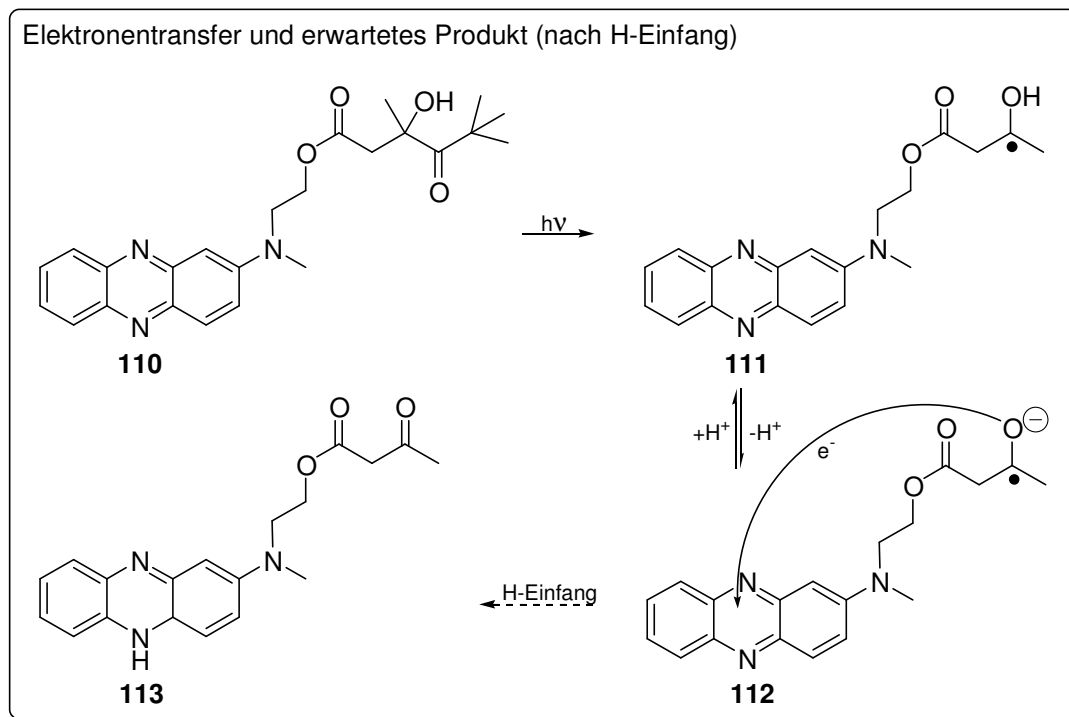
Eluationszeiten [min] der Edukte und Produkte an der HPLC: Photoedukt: 12.8, Keton: 2.3, H-Einfang: 2.8.

Tabelle 1.4: Bestrahlungsergebnisse von α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**76**).

1.4 Bestrahlung der Phenazinderivate

Die Photoedukte Arabinouridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-ester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]-phosphat (**118**) und (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)-ethylester (**110**) wurden wie in der obigen allgemeinen Photolysevorschrift beschrieben bestrahlt. Als Lösungsmittel für die Photolysen wurde Methanol (10^{-4} M Lösungen) verwendet. Da bei der Bestrahlung und dem folgenden Elektronentransfer das Chromophor (das Phenazingerüst) zerstört wird, konnte bzgl. der Produkte keine eindeutige Aussage gemacht werden. Bei der Analyse mittels HPLC und UV konnte nur die Abnahme der Photoeduktssignale beobachtet werden. Die UV-Spektren sind nachfolgend aufgeführt.

Von der Bestrahlungslösung des (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)ethylesters wurde ein ESI-Spektrum aufgenommen, welches die Masse des durch Elektronentransfer und H-Einfang erwarteten Produktes enthielt (vgl. Schema 1.3).



Schema 1.3: Elektronentransfer und evtl. H-Einfang beim Bestrahlen des Phenazinderivates.

Das UV-Spektrum des Penazinderivates vor der Bestrahlung in Methanol ist in Abb. 1.4 dargestellt.

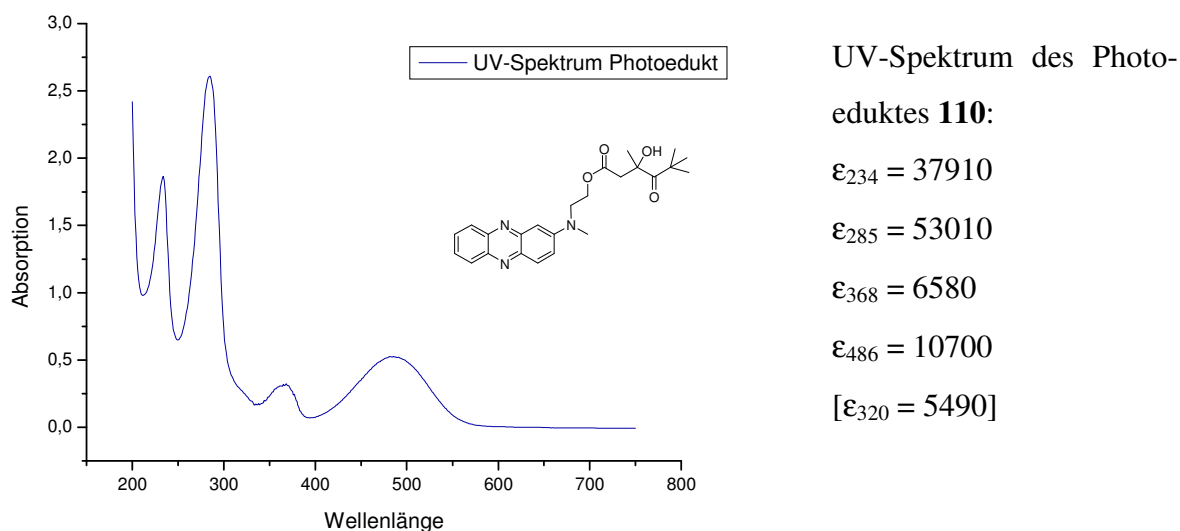


Abbildung 1.4: UV-Spektrum und Extinktionskoeffizienten von (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)-ethylester (**110**).

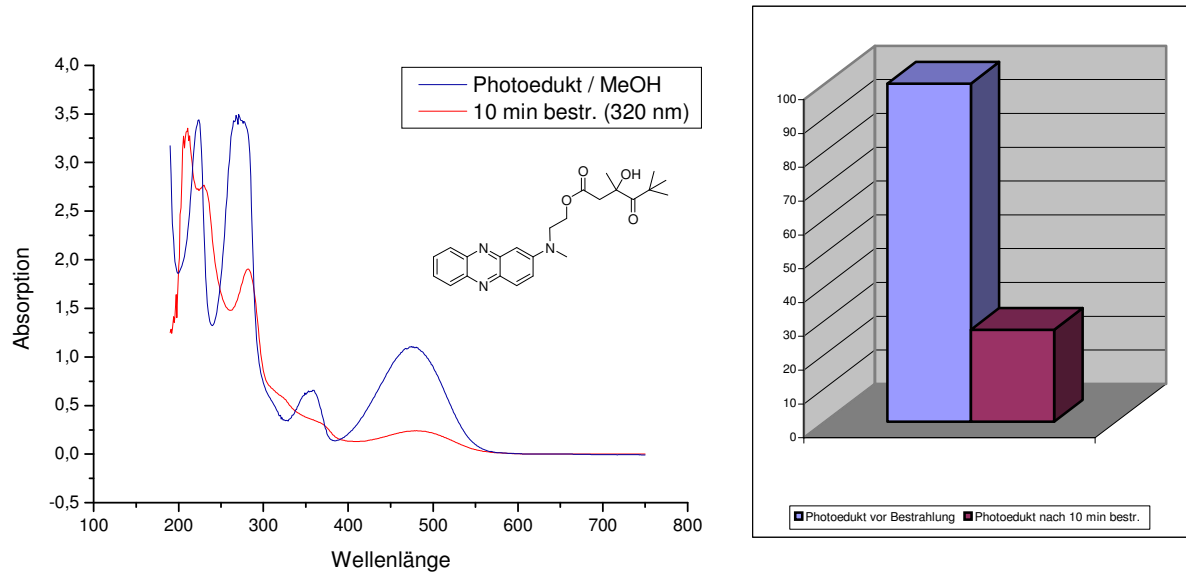


Abbildung 1.5: Bestrahlung von (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-(methyl-phenazin-2-yl-amino)ethylester **110**, Abnahme des Photoeduktes (bzgl. 486 nm-Signal).

MS (ESI, m/z) nach 10 min Bestrahlung: 424.4 (MH^+ , 100, Photoedukt), 339.4, 338.5 (MH^+ , 12, M^+ , 58, Produkt).

Das Ergebnis der Bestrahlung des Arabino-uridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäureester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]-phosphates (**118**) sind in Abb. 1.6 dargestellt.

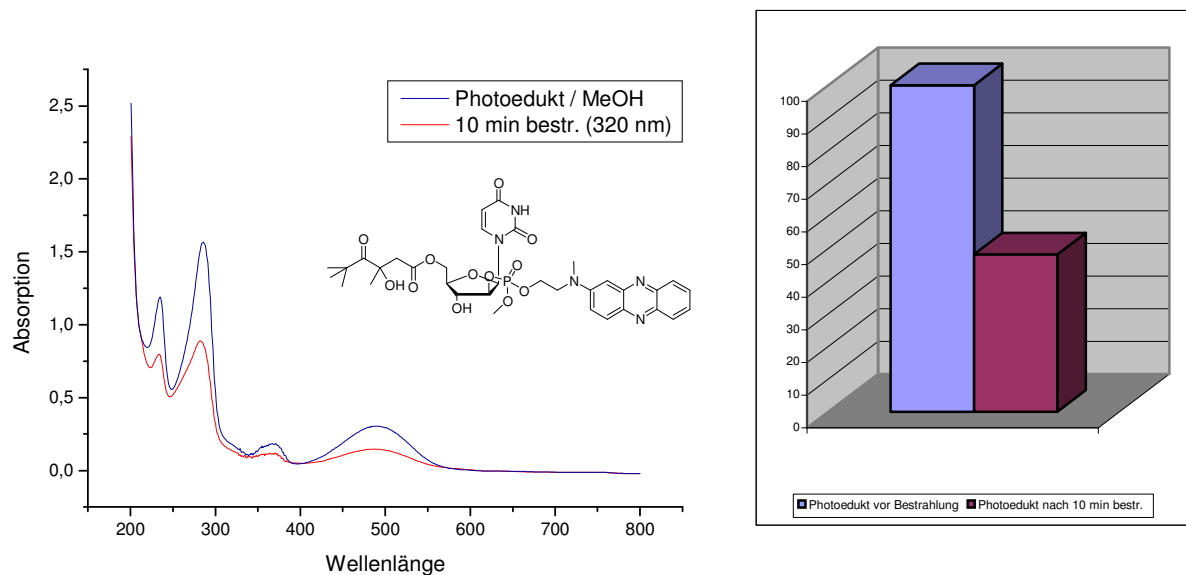


Abbildung 1.6: Bestrahlung von Arabinouridin-5'-[*O*-(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäureester]-2'-(*O*-methyl)-[*O*-2-(*N*-methyl)aminophenazin-2-*N*-ethyl]phosphat (**118**), Abnahme des Photoeduktes (bzgl. 486 nm-Signal).

- 1.) Watson, J. D. *Die Doppelhelix*, Rohwolt Verlag, Rheinbek, **1997**.
- 2.) Watson, J. D.; Crick, F. H. *Nature* **1953**, *171*, 737 und 964.
- 3.) Blackburn, G. M.; Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- 4.) Shabarova, Z.; Bogdanov, A. *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, VCH, Weinheim, **1994**.
- 5.) Hecht, S. M. *Ed. Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- 6.) Kool, E. T. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1473.
- 7.) Taylor, J.-S. *J. Chem. Ed.* **1990**, *67*, 835.
- 8.) Taylor, J.-S. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76.
- 9.) Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W. *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington D.C., **1995**.
- 10.) Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109.
- 11.) Armitage, B. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171.
- 12.) Cadet, J.; Vigny, P. *Bioorganic Photochemistry*, Vol. 1 (Ed.: Morrison, H.), Jon Wiles & Sons, New York, **1990**, 1.
- 13.) Kraft, G.; Kramer, M. *Adv. Radiation Biol.* **1993**, *17*, 1.
- 14.) O'Neill, E. M.; Fieldew, E. M. *Adv. Radiation Biol.* **1993**, *17*, 53.
- 15.) Sancar, A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2.
- 16.) Eley, D. D.; Spivey, D. I. *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411.
- 17.) Seidel, C. A. M.; Schulz, A.; Sauer, M. H. M. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541.
- 18.) Steenken, S.; Telo, J. P.; Novais, H. M.; Candeias, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701.
- 19.) Saito, I.; Takayama, M.; Sugiyama, H.; Nakatani, K.; Tsuchida, A.; Yamamoto, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6406.
- 20.) Heller, A. *Faraday Discuss.* **2000**, *116*, 1.
- 21.) Murphy, C. J.; Arkin, M. R.; Jenkins, Y.; Ghatlia, N. D.; Bossmann, S. H.; Turro, N. J.; Barton, J. K. *Science* **1996**, *273*, 475.
- 22.) Meade, T. J.; Kayyem, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 352.
- 23.) Meggers, E.; Kusch, D.; Spichty, M.; Wille, U.; Giese, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 460.
- 24.) Meggers, E.; Michel-Beyerle, M. E.; Giese, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950.
- 25.) Schuster, G. B. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253.
- 26.) Wagenknecht, H.-A. *Chemie in unserer Zeit* **2002**, *36*, 318.
- 27.) Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265.
- 28.) a) Giese, B. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631-636; b) Giese, B.; Meggers, E.; Wessely, S.; Spormann, M.; Biland, A. *Chimia* **2000**, *54*, 547-551; c.) Jortner, J.; Bixon, M.; Langenbacher, T.; Michel-Beyerle, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *95*, 12759.
- 29.) Jornter, J.; Bixon, M.; Langenbacher, T.; Michel-Beyerle, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1998**, *95*, 12759.
- 30.) a.) Lewis, F. D.; Liu, X.; Liu, J.; Miller, S. E.; Hayes, R. T.; Wasielewski, M. R. *Nature* **2000**, *406*, 51; b.) Lewis, F. D.; Letsinger, R. L.; Wasielewski, M. R. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 159; c) Lewis, F. D.; Liu, X.; Miller, S. E.; Hayes, R. T.; Wasielewski, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14020; d.) Lewis, F. D.; Wu, Y.;

- Liu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12165; e.) Lewis, F. D.; Liu, X.; Zuo, X.; Hayes, R. T.; Wasielewski, M. *R. J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4850.
- 31.) a) Giese, B.; Amaudrut, J.; Köhler, A.-K.; Spormann, M.; Wessely, S. *Nature* **2001**, 318; b) Giese, B. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51.
- 32.) Furrer, E.; Giese, B. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3623.
- 33.) Heelis, P. F.; Hartman, R. F.; Rose, S. D. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 289.
- 34.) Smith, C. A.; Wang, N.; Jiang, N.; Che, L.; Zhao, X.; Taylor, J.-S. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4146.
- 35.) Taylor, J.-S., Nadji, S. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2579.
- 36.) Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W. *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., **1995**.
- 37.) Carell, T.; Burgdorf, L. T.; Kundu, L. M.; Cichon, M. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 491.
- 38.) Popović, D. M.; Zmirić, A.; Zarić, S. D.; Knapp, E.-W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3775.
- 39.) Lewis, F. D.; Liu, X.; Miller, S. E.; Wasielewski, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *121*, 9905.
- 40.) Colson, A.-O.; Besler, B.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem.* **1994**, *96*, 9787.
- 41.) Sevilla, M. D.; Besler, B.; Colson, A.-O. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1060.
- 42.) a.) Sevilla, M. D.; Backer, D.; Yan, M.; Summerfield, S. R. *J. Phys. Chem.* **1993**, *95*, 3410; b.) Bernhard, W. A. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 2187.
- 43.) Al-Jihad, I.; Smets, J.; Adamowicz, L. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 2994.
- 44.) a.) Steenken, S. *Free Radical Res. Commun.* **1992**, *16*, 349; b.) Steenken, S.; Telo, J. P.; Novais, H. M.; Candeias, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701; c.) Steenken, S. *Biol. Chem.* **1997**, 378, 1293.
- 45.) Colson, A.; Besler, B.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 9787.
- 46.) Razskazovskii, Y.; Swarts, S. G.; Falcone, J. M.; Taylor, C.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460-1467 und zitierte Literatur.
- 47.) Steenken, S. *Biol. Chem.* **1997**, 378, 1293.
- 48.) Wagenknecht, H.-A. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2558.
- 49.) a.) Messer, A.; Carpenter, K.; Forzley, K.; Buchanan, J.; Yang, S.; Razskazovskii, Y.; Cai, Z.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128; b.) Cai, Z.; Gu, Z.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10406; c.) Cai, Z.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6942.
- 50.) Cai, Z.; Li, X.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2755.
- 51.) Li, X.; Cai, Z.; Sevilla, M. D. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10115.
- 52.) Anderson, R. F.; Wright, G. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 4827.
- 53.) Debije, M. G.; Milano, M. T.; Bernhard, W. A. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2926.
- 54.) Smith, D. M. A.; Adamowicz, L. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9345.
- 55.) a.) Winkler, J. R.; Gray, H. B. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 369; b.) Isied, S. S.; Ogawa, M. Y.; Wishart, J. F. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 381; c.) Wasielewski, M. R. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 435.
- 56.) Risser, S. M.; Beratan, D. N.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2508.
- 57.) a.) Yeh, S.-R.; Falvey, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8557; b.) Ito, T.; Shinohara, H.; Hatta, H.; Fujita, S.; Nishimoto, S. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 2886.
- 58.) Kavarnos, G. J.; Turro, N. J. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 401.
- 59.) Carell, T.; Behrens, C.; Gierlich, J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2221.
- 60.) Yeh, S.-R.; Falvey, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* , **1992**, *114*, 7313.

- 61.) Scannell, M. P.; Fenick, D. J.; Yeh, S. R.; Falvey, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* , **1997**, *119*, 1971.
- 62.) Scannell, M. P.; Prakash, G.; Falvey, D. E. *J. Phys. Chem. A* , **1997**, *101*, 4332.
- 63.) Schwögler, A.; Burgdorf, L. T.; Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3918.
- 64.) Behrens, C.; Burgdorf, L. T.; Schwögler, A.; Carell, T. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1841.
- 65.) Behrens, C.; Carell, T. *Chem. Comm.* **2003**, 1632.
- 66.) Rahe, N.; Rinn, C.; Carell, T. *Chem Comm.* **2003**, 2120.
- 67.) Breeger, S.; Hennecke, U.; Carell, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1302.
- 68.) Ito, T.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480.
- 69.) Ito, T.; Rokita, S. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839.
- 70.) Manoharan, M.; Tivel, K. L.; Zhao, M.; Nafisi, K.; Netzel, T. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461.
- 71.) a.) Netzel, T. L.; Zhao, M.; Nafisi, K.; Headrick, J.; Sigman, M. S.; Eaton, B. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119.
- 72.) a.) Kerr, C. E.; Mitchell, C. D.; Ying, Y.-M.; Eaton, B. E.; Netzel, T. L. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2166; b.) Mitchell, C. D.; Netzel, T. L. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 125; c.) Kerr, C. E.; Mitchell, C. D.; Headrick, J.; Eaton, B. E.; Netzel, T. L. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1637.
- 73.) Gaballah, S. T.; Netzel, T. L. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2002**, *21 (10)*, 681.
- 74.) Fiebig, T.; Wan, C.; Zewail, A. H. *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781.
- 75.) Amann, N.; Wagenknecht, H.-A. *Synlett* **2002**, 687.
- 76.) Amann, N.; Pandurski, E.; Fiebig, T.; Wagenknecht, H.-A. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1084.
- 77.) Schwarz, H. A.; Dodson, R. W. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 409.
- 78.) a.) Glatthar, R. *Dissertation* **2000**, Universität Basel; b.) Glatthar, R.; Giese, B. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2315; c.) Kessler, M.; Glatthar, R.; Giese, B.; Bochet, C. G. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1179.
- 79.) Akhlaq, M. S.; Murthy, C. P.; Steenken, S.; von Sonntag, C. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 4331.
- 80.) Schwarz, H. A.; Dodson, R. W. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 409.
- 81.) Die angegebenen Reduktionspotentiale beziehen sich auf die Reduktion von 4,5-Dihydroxy-1,2-dithian (ox-DDT) zum entsprechenden Radikalanion (ox-DDT⁻).
- 82.) a.) Wittenburg, E. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 2391; b.) Shabarosa, Z.; Bogdanov, A. *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, VCH Weinheim, 93.
- 83.) a.) Albert, A.; Brown, D. J. *Journal of the Chemical Society, Abstracts* **1954**, 2060; b.) Catalán, J.; Claramunt, R. M.; Elguero, J.; Laynez, J.; Menéndez, M.; Anvia, F.; Quian, J. H.; Taagerpera, M.; Taft, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4105.
- 84.) Lee, D. G.; Chang, V. S. . *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *44*, 2726.
- 85.) Zhao, M.; Li, J.; Mano, E.; Song, Z.; Tschaen, D. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2564.
- 86.) Carl, T. *Dissertation* **2004**, Universität Basel.
- 87.) Musa, O. M.; Horner, J. H.; Shahin, H.; Newcomb, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3862.
- 88.) Horner, J. H.; Martinez, F. N.; Musa, O. M.; Newcomb, M.; Shahin, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11124.
- 89.) Giese, B.; Carl, B.; Carl, T.; Carell, T.; Behrens, C.; Hennecke, U.; Schiemann, O.; Feresin, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848.
- 90.) Schiemann, O.; Feresin, E.; Giese, B.; Carl, T. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 270.

- 91.) Butenandt, J.; Epple, R.; Wallenborn, E.-U.; Eker, A. P. M.; Gramlich, V.; Carell, T. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 62.
- 92.) Giese, B.; Wessely, S.; Spormann, M.; Lindemann, U.; Meggers, E.; Michel-Beyerle, M.-E. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1050.
- 93.) Hünig, S.; Berneth, H. *Topics in Current Chemistry* **1980**, *92*, 1.
- 94.) Hulanicki, A.; Glab, S. *Pure and Appl. Chem.* **1978**, *50*, 463.
- 95.) a.) Puri, N.; Zamaratski, E.; Sund, C.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10409; b.) Zamaratski, E.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8183.
- 96.) Puri, N.; Zamaratski, E.; Sund, C.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10409.
- 97.) Zamaratski, E.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8183.
- 98.) Fukui, K.; Morimoto, M.; Segawa, H.; Tanaka, K.; Shimidzu, T. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 349.
- 99.) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* 5. Aufl. **1995**, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- 100.) Günther, H. *NMR-Spektroskopie* 3. Aufl. **1992**, 151-185, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- 101.) Kalinowski, H.-O.; Berger, S.; Braun, S. *¹³C-NMR-Spektroskopie* **1984**, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- 102.) Glatthar, R. *Dissertation* **2000**, Universität Basel.
- 103.) Weibert, F. J.; Hall, S. S. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 3901.
- 104.) Wasson, R. L.; House, H. O. *Organic Synthesis* **1963**, *Coll. Vol. IV*, 552.
- 105.) Martin, J. C.; Smee, D. F.; Verheyden, J. P. H. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 755.
- 106.) Kim et al. *Arch. Pharmaceutical Res.* **1996**, *19*(3), 235.
- 107.) Cavallito, C. J.; Huskell, T. H. *J. Org. Chem.* **1946**, 2332.
- 108.) Creary, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5568.
- 109.) Matulic-Adamic, J.; Watanabe, K.A. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36* (4), 1554.
- 110.) Schönleber, R. *Dissertation* **2003**, Universität Basel.
- 111.) Ohta, S.; Tsujimara, A.; Okamoto, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29* (10), 2762.
- 112.) Burckhalter, J. H.; Seiwald, R. J.; Scarborough, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 991.

Dipl.-Chem. Barbara Carl

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation "Entwicklung einer neuen Methode zur Injektion von Elektronen in DNA" selbständig und nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Basel, den 07.05.04

(Barbara Carl)

An meiner Ausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

Universität Stuttgart: Becker, G.; Bertagnolli, H.; Bredereck, K.; Burger, B.; Effenberger, F.; Eisenbach, C.; Engelhardt, G.; Föhlisch, B.; Hardtke, B.; Hunger, M.; Jäger, V.; Kaim, W.; Müller, K.; Pietruszka, J.; Podlech, J.; Roduner, E.; Schleid, T.; Schmid, R. D.; Schmidt, A.; Stoll, H.; Weidlein, J.; Weitkamp, J.; Werner, H.-J.; Westerhausen, M.; Zabel, F.

Università degli studi di Firenze: Brandi, A.; Goti, A.; Guarna, A.

Universität Basel: Giese, B.

Lebenslauf

Barbara Carl (geb. Fischer)

Geburtsdatum und -ort: 30. Januar 1975 in Stuttgart-Bad Cannstatt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstatus: verheiratet mit Thomas Carl

Ausbildung

Grundschule, Leonberg-Warmbronn 1981-1985

evang. Mörike-Gymnasium, Stuttgart 1985-1994

Universität Stuttgart 1994-1999

Studiengang Lebensmittelchemie 1994

Studiengang-Wechsel auf Diplom-Chemie 1995

Università degli studi di Firenze, Italien 1998

Forschungsaufenthalt im Rahmen des Erasmus-Austauschprogramms europäischer Universitäten in der Gruppe von Prof. Alberto Brandi mit dem Thema "Total Synthesis of (-)-Rosmarinecine".

Universität Stuttgart 1999

Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie unter Anleitung von Prof. Volker Jäger mit dem Thema "Versuche zu Anwendungsbereich und Stereoselektivität von 1,2- bzw. 1,4-Additionen von Nitronaten an Nitrone bzw. ungesättigte Carbonylverbindungen".

Universität Basel, Schweiz 2000-2004

Dissertation am Institut für Organische Chemie in der Gruppe von Prof. Bernd Giese auf dem Gebiet des "Überschußelektronentransfers durch DNA".

Anstellungen

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart. 1999

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie der Universität Basel. 2003-2004

Stipendien

Erasmus-Stipendium der Europäischen Union. 1998

Stipendium des Schweizerischen Nationalfonds. 1999-2002