

**Untersuchungen
zur
pyrenmodifizierten DNA**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Olivier Boss

aus Seftigen (BE)

Basel 2004

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag von

Prof. Bernd Giese

Prof. Andreas Pfaltz

Basel, den 14. Dezember 2004

Prof. Hans-Jakob Wirz
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Giese in der Zeit von Februar 2000 bis Oktober 2004 am Institut für Organische Chemie der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgender Veranstaltung vorgestellt:

O. Boss, B. Giese, "Pyrene as electron donor in the electron transfer process through DNA", *23. Regio-Symposium*, Falkau, Deutschland, September **2003**.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

O. Boss, B. Giese, *Helv. Chim. Act.* in Vorbereitung.

Danksagung

Prof. Dr. Bernd Giese danke ich für seine engagierte Betreuung und die Möglichkeit in diesem interessanten Gebiet der organischen Chemie zu arbeiten.

Dr. Andreas Biland danke ich für seine Ideen und kritische Beurteilung meiner Arbeit.

Sandra Thöni, Dr. Andreas Biland, Andreas Gerber und Dr. Christoph Meier danke ich für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei technischen Geräten wie ESI, DNA-Synthesizer und HPLC.

Alex Taylor, Michael Graber, Peter Sommer, Dr. Ralph Schönleber, Dr. Heiko Hocke, Dr. Tsuyoshi Watanabe und Dr. Kaare Rasmussen danke für die Hilfe und Anregungen bei der organischen Synthese.

Stephan Bürgi, Tino Boss, Dr. Eugen Stultz, Dr. Barbara Carl und Saana Perä danke ich für das Durchlesen und Korrekturen des Manuskriptes.

Dr. Klaus Kulicke und Dr. Gerd Scherrer danke ich für die NMR - Messungen.

Dr. Heinz Nadig und Werner Kirsch danke ich für die analytischen Messungen.

Stanislav Ivan danke ich für die computergestützte Chemie.

Dr. Leo Merz und Stefan Aeschbacher danke ich für die Unterstützung bei L^AT_EX-Problemen.

Ich danke allen Mitglieder der Gruppen Giese und Stulz für die allzeitige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

*Für meine Eltern
und Tino*

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.

Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor dem Staunen.

Albert Einstein (1879-1955)

Nichts kann rückgängig gemacht werden, was einmal gedacht wurde.

Friedrich Dürrenmatt (1921-1990)

Zusammenfassung

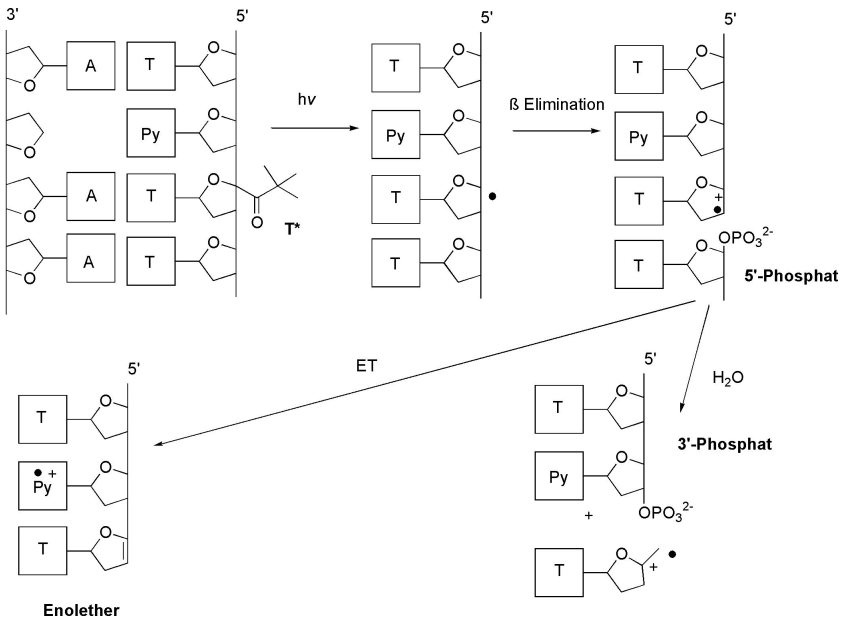
Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob Pyren auch ein geeigneter Elektronendonator beim Elektronentransfer (ET) in DNA wie Guanin ist. Um dieses Ziel zu erreichen wurden Oligonucleotide (20mere) synthetisiert, die folgende Schlüsselsequenz haben:

$5'$ -TPyT $_n$ T* T - $3'$, wobei T* für 4' - Pivaloylthymidin steht, n zwischen null und zwei liegt und Py das Pyren-Nucleotid ist. Gegenüber des Pyrens wurde im DNA-Doppelstrang eine abasische Stelle (Ab) eingebaut, um die Stabilität des DNA-Duplexes nicht zu verringern.

DNA-Experimente

Bei UV-Bestrahlung dieser Oligonucleotide spielt sich folgendes ab (Schema 1): Die Pivaloylgruppe (*tert.* - Butylcarbonyl) wird durch eine Norrish-Typ-I - Reaktion zum 4'-Radikal zersetzt, das durch β -Elimination zum entsprechenden Radikalkation reagiert. Das freigesetzte Oligonucleotid (als 5' - Phosphat) dient als Referenz bei der Analyse. Das Radikalkation hat zwei Optionen offen, um weiterzureagieren. Entweder kann es durch Elektronentransfer zum nächsten Elektronendonator (hier Pyren) wandern oder es reagiert mit Wasser. Durch HPLC-Analyse wurde das Produkteverhältnis bestimmt, aus dem die Geschwindigkeitskonstante des relativen Elektronentransfers ($k_{ET,rel}$) berechnet wurde. $k_{ET,rel}$ gibt an, wie viel effizienter der Elektronentransfer im Vergleich zur Wasseraddition ist. Bei $k_{ET,rel} = 1$ sind beide Reaktionen gleich schnell.

Für die Sequenz 5'-TPyT* T - $3'$ (Sequenz mit Pyren) wurde für $k_{ET,rel}$



Schema 1: T^* reagiert hauptsächlich unter UV-Bestrahlung zum Enolether (Elektronentransfer-Produkt) oder zum 3'-Phosphat (Wasseradditionsprodukt). Gegenüber dem Pyren wurde die abasische Stelle eingebaut, um die Stabilität der DNA nicht zu verringern.

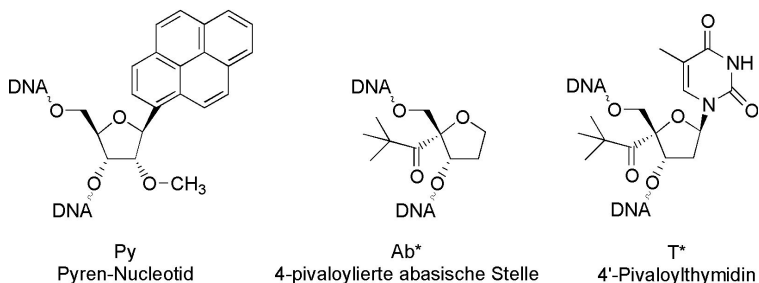


Abbildung 1: Die drei modifizierten DNA-Bausteine, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

ein Wert von 0.9 gefunden, was im Vergleich zum entsprechenden Oligomer mit Guanin ($k_{\text{ET,rel}} = 0.77$) in den Erwartungen liegt.

Durch verschiedene Insertionen in der DNA zwischen der Pivaloylgruppe und dem Pyren wurde auch die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers untersucht. Um diese Abhängigkeit zu quantifizieren wurde der β -Wert aus der Marcus-Levich-Jortner-Gleichung (1) verwendet. k_{ET} ist die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers, d die Distanz zwischen Akzeptor und Donor. Der β -Wert ist eine Materialkonstante, die angibt, wie gut sich das Medium eignet, Elektronentransfer zu unterstützen. Je tiefer der Wert, um so effizienter ist der Elektronentransfer. Es wurde ein Wert von $\beta = 0.5 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ bestimmt, der leicht tiefer liegt, als der vorangehend in der Gruppe Giese bestimmte Wert ($\beta = 0.70 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$).

$$\ln k_{\text{ET}} \propto -\beta \cdot d \quad (1)$$

Neben den Pyren-Experimenten wurde auch eine 4 - pivaloylierte abasische Stelle (Ab*) synthetisiert und untersucht. Bei der Bestrahlung dieses Radikalvorläufers wurde kein Elektronentransfer festgestellt. Die Gründe für dieses überraschende Verhalten sind noch nicht genau bekannt. Eine Theorie besagt, dass durch die Anordnung der abasischen Stelle in der DNA die Orbitale des Akzeptors und des Donors orthogo-

nal zu einander stehen und somit keine Wechselwirkung auftritt.

Synthese

Für die Elektrontransfer-Experimente wurden drei modifizierte DNA-Bausteine synthetisiert und in die DNA eingebaut (s. Abb. 1). Das Pyren-Nucleotid wurde ausgehend vom γ -Ribonolacton mittels 1 - Brompyren und *s*-BuLi und anschließender Reduktion mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ und Et_3SiH dargestellt. Für die Synthese von Ab* wurde der Pivaloylaldehyd zum Pivaloyloximchlorid umgewandelt, das eine Cyclisierung mit Furan einging. Durch Reduktion mit Wasserstoff erhielt man den gesättigten Fünfring, der an der 4'-Position methylhydroxyliert wurde. Das erwünschte Stereoisomer konnte nach Veresterung mit BOC-*L*-Phenylalanin isoliert werden.

Summary

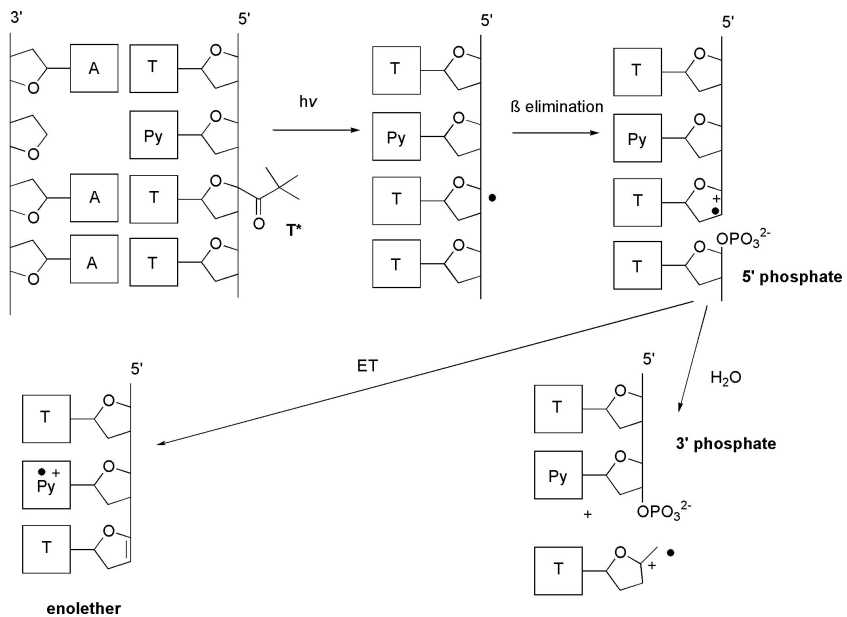
The aim of this work was the investigation, whether pyrene is like guanine a suitable electron donor for electron transfer through DNA. To achieve the goal, oligonucleotides (20mer) with the following key sequence: 5'-TPyT_nT*T-3' were synthesized. T* is the 4'-pivaloyl-modified thymidine, *n* differs from zero to two and Py is the pyrene-nucleotide.

DNA experiments

During the UV irradiation the pivaloyl group (*tert.*-butylcarbonyl) was cleaved by a Norrish type I reaction forming a 4' radical, which then undergoes β elimination to the radical cation. (Scheme 1) The released oligonucleotide (as 5' phosphate) serves as reference in the analysis. The radical cation can react with different pathways. It can either migrate to the nearest electron donor (here pyrene) or react with water. The product ratio was determined by HPLC analysis and the rate constant of the relative electron transfer $k_{\text{ET,rel}}$ was calculated. $k_{\text{ET,rel}}$ indicates how much more efficient the electron transfer is compared to the water addition. Both reactions have the same rates at $k_{\text{ET,rel}}$ equal one.

The sequence 5'-TPyT*T-3' has a $k_{\text{ET,rel}}$ -value of 0.9 for pyrene. The efficiency of pyrene as an electron donor can therefore be compared with guanine ($k_{\text{ET,rel}} = 0.77$).

The distance dependence of the electron transfer was investigated elongating the DNA strand (see the sequence above) between pyrene



Scheme 1: Irradiation of the modified DNA double strands. Electron transfer and water addition as possible reaction pathways.

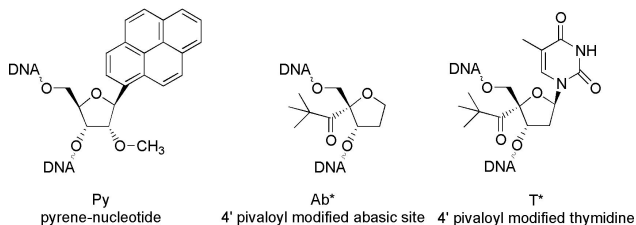


Figure 1: Synthesized nucleotides.

and the pivaloyl group. Regarding to the Marcus Levich Jortner equation (1) the β -value shows the distance dependence. k_{ET} is the rate constant of the electron transfer and d is the distance between acceptor and donor. The β -value is a material constant, which indicates how efficient a medium supports the electron transfer. For the pyrene system a β -value of $0.5 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ was determined, which is slightly lower than the previously determined value for guanine researched in the Giese group ($\beta = 0.70 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$).

$$\ln k_{ET} \propto -\beta \cdot d \quad (1)$$

The 4' pivaloyl modified abasic site (Ab*) was synthesized and additional experiments comparable to the pyrene experiments were performed. In the irradiation of this radical precursor no electron transfer was detected. The explanation for this surprising behaviour is still uncertain. One theory says that the orbitals of the acceptor and donor are orthogonal towards each other at the conformation of the abasic site in the DNA and thus the orbitals cannot interact.

Synthesis

Three modified DNA building blocks were synthesized and incorporated to the experiments (see Fig. 1). The pyrene-nucleotide was synthesized starting from the γ -ribonolactone. γ -Ribonolactone reacted with a mixture of 1-bromopyrene and *s*-BuLi and was subsequently reduced with

$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ and Et_3SiH . In the synthesis of Ab^* the pivaloyl aldehyde was converted to the pivaloyloxime chloride. The oxime chloride reacted with furane via cyclization. The saturated five-membered ring was synthesized via hydrogen reduction. The modified ring was then methyl hydroxylated at the 4' position. After separation of the diastereomers and enantiomeres via synthesizing the corresponding ester with BOC- *L* - phenylalanine Ab^* was obtained enantiomerically pure.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
Summary	xv
I Theoretischer Teil	1
1 Einleitung	3
1.1 Molekulare Struktur der DNA	3
1.2 Leitfähigkeit der DNA	7
1.2.1 Elektronentransfer in DNA in der Gruppe Giese	8
1.3 Oxidativer Stress	12
1.4 Aufgabenstellung	13
2 Marcus-Theorie	15
2.1 Abhängigkeit des ET	15
2.2 Superaustauschmechanismus	20
2.2.1 Die Distanzabhängigkeit des ET: β -Wert	20
2.2.2 Die Marcus-Levich-Jortner-Gleichung	21
3 Eigenschaften des Pyrens	23
3.1 Physikalische Eigenschaften	23
3.1.1 Stabilität der DNA mit Pyren-Nucleotid	23
3.1.2 UV-VIS-Spektroskopie von Pyren	24

3.1.3	Pyren als Elektronendonator	26
3.2	Chemische Eigenschaften	28
3.2.1	Photooxidation	28
3.2.2	Elektronentransfer von Guanosin zum BPT	29
3.2.3	Pyren als Ladungsinitiator	29
3.2.4	Radiolyse	30
3.3	Zusammenfassung	31
4	Elektronentransfer mit Pyren	33
4.1	Experimentelle Bestimmung von $k_{ET,rel}$	33
4.2	$k_{ET,rel}$ vom Pyren-Nucleotid	36
4.2.1	Einzelstrang-Experiment ss1	36
4.2.2	Doppelstrang ds(1-2)	38
4.2.3	Doppelstrang ds(3-4)	42
4.3	Experimentelle Bestimmung des β -Wertes	45
4.3.1	Doppelstränge ds(5-4) und ds(6-7)	45
4.3.2	β -Plot	48
4.4	Zusammenfassung	50
5	Ab* als Radikalvorläufer	51
6	Pyreninduzierter DNA-Strangbruch	57
6.1	Reaktionsbeschreibung	57
6.2	Mechanismus	59
6.3	Konsequenzen	63
6.4	Zusammenfassung	66
7	Synthesekonzepte	67
7.1	Pyren-Nucleotid Py	67
7.2	4-Pivaloylierte abasische Stelle Ab*	71
7.3	4'-Pivaloylthymidin T*	73
II	Experimenteller Teil	75
8	Geräte und Materialien	77

8.1	NMR-Spektroskopie	77
8.1.1	¹ H-NMR	77
8.1.2	¹³ C-NMR	78
8.1.3	³¹ P-NMR	78
8.2	Massenspektrometrie	78
8.2.1	EI, FAB-MS	78
8.2.2	MALDI-ToF-MS	79
8.2.3	ESI-MS	79
8.3	Elementaranalysen	79
8.4	IR-Spektroskopie	80
8.5	Chromatographische Methoden	80
8.5.1	Dünnschichtchromatographie	80
8.5.2	Säulenchromatographie	80
8.5.3	HPLC	80
8.6	UV-VIS-Spektroskopie	81
8.7	DNA-Synthese	81
8.8	Bestrahlungen	81
8.9	Übrige Geräte	81
8.10	Lösungsmittel	82
9	DNA-Arbeitsmethoden	83
9.1	RP18-HPLC	83
9.2	Oligonucleotidsynthese	83
9.3	Massenbestimmung mittels MALDI-ToF-MS	84
9.4	Quantifizierung von Oligonucleotiden	85
9.5	Doppelstrangbildung	85
9.6	Schmelztemperaturbestimmung	86
9.7	Photolysen	86
10	Synthese der Nucleotide	87
10.1	Pyren-Nucleotid	87
10.1.1	Silyliertes Ribonolacton	87
10.1.2	Methyl- und Silyliertes Ribonolacton	89
10.1.3	Methyl- und Silyliertes Ribosylpyren	90
10.1.4	Methyliertes Ribosylpyren	91
10.1.5	Methyl- und Trityliertes Ribosylpyren	93

10.1.6	Methyl- und Trityliertes Ribosylpyren Phosphoramidit	94
10.2	4-Pivaloylierte abasischen Stelle	95
10.2.1	Pivaloylierte abasische Stelle	96
10.2.2	Trennung der Pivaloylierte abasischen Stellen - Diastereomere	97
10.2.3	Pivaloyl- und Tritylierte abasische Stelle	98
10.2.4	Pivaloyl- und Tritylierte abasische Stelle Phenylalaninester	99
10.2.5	Pivaloyl- und Tritylierte abasische Stelle (enantiomerenrein)	101
10.2.6	Pivaloyl- und Tritylierte abasische Stelle Phosphoramidit	102
A	Einzelstränge	105
B	Doppelstränge	107
	Abkürzungen und Symbole	109
	Literaturverzeichnis	115

Teil I

Theoretischer Teil

Kapitel 1

Einleitung

In diesem Kapitel werden wichtige Eigenschaften der DNA behandelt: Struktur, Leitfähigkeit und wie DNA geschädigt werden kann.

1.1 Molekulare Struktur der DNA

Die Desoxyribonucleinsäure (*englisch*: deoxyribonucleic acid, DNA) ist ein Biopolymer, das aus verschiedenen Teilen aufgebaut ist. Das Rückgrat besteht aus Monosaccharid-Einheiten namens Desoxyribose und aus Phosphorsäurediester, der den 5'-Sauerstoff mit dem 3'-Sauerstoff der nächsten Desoxyribose über je eine Esterbindung verknüpft.^[1] Mit dem 1'-C-Atom einer Desoxyribose ist jeweils eine der vier sog. Nucleobasen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) β -glycosidisch verknüpft (Abbildung 1.1).^[2] Die Basen werden in Purine (Adenin, Guanin) und Pyrimidine (Cytosin, Thymin) unterteilt.^[3] Die Desoxyribose mit einer Base nennt sich Nucleosid (Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymidin). Ein Nucleosid mit der Phosphatgruppe an der 5'-Position nennt sich Nucleotid bzw. Oligonucleotid, wenn mehrere Nucleotide verbunden sind.

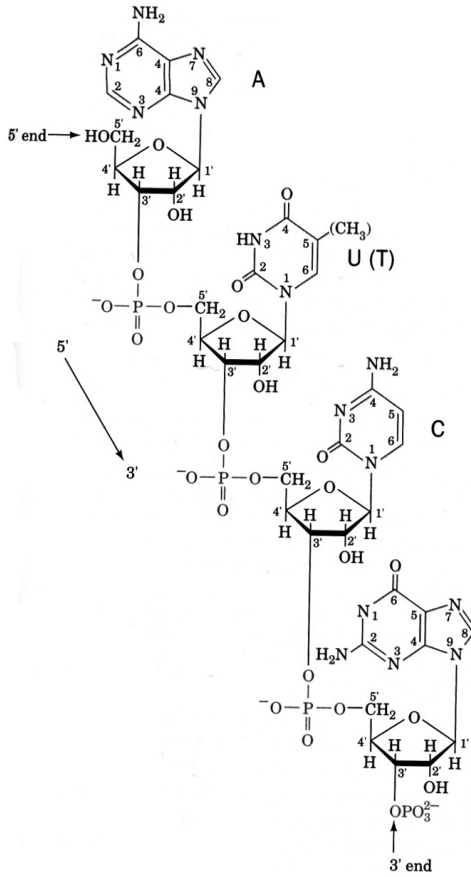


Abbildung 1.1: Struktur eines DNA-Einzelstranges.^[2]

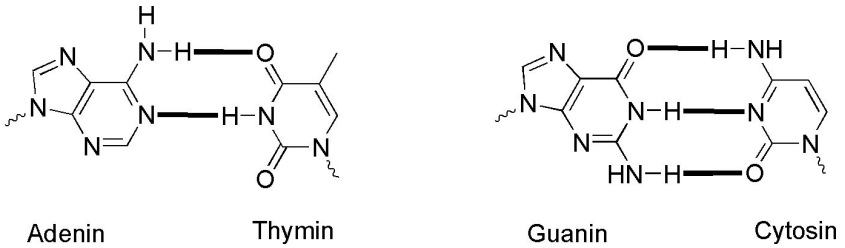


Abbildung 1.2: Die vier Nucleobasen und ihre Watson-Crick-Basenpaarung.

Natürliche DNA besteht aus zwei Strängen, die antiparallel angeordnet sind und eine Doppelhelix bilden. Das polare Rückgrat ist aussen, während sich die hydrophoben Basen im Innern der DNA befinden.^[4] Da die Phosphatgruppen einen pK_a -Wert von ca. 1 haben, sind sie bei physiologischen pH (~ 7.0) deprotoniert und in Zellen mit Mg^{2+} -Ionen stabilisiert. Die Basen paaren sich nach der Regel von Watson und Crick:^[5] Adenin ist mit zwei Wasserstoffbrücken mit Thymin verbunden, Cytosin mit deren drei mit Guanin. (siehe Abbildung 1.2) Die Drehung der häufigsten vorkommenden Konformation der DNA (B-DNA) ist rechtsgängig.^[6] Die Ganghöhe einer Windung beträgt zehn Basenpaare oder 34 \AA , d.h. jede Base ist gegenüber der nächsten um 36° verdreht und um 3.4 \AA entfernt.^[7, 8] Der Durchmesser misst 20 \AA . An der Oberfläche der Helix befindet sich eine kleine und eine grosse Furche, in der Liganden aller Art mit der DNA interagieren können.

Neben der B-DNA existieren auch A- und Z-DNA, die auf aussergewöhnlichen Bedingungen wie spezielle Sequenzen, Salze oder Salzkonzentrationen zurückzuführen sind (Abb. 1.3). Eine Poly-G•Poly-C-Sequenz bevorzugt in wasserarmen Medien die A-DNA.^[1, 9] Sie hat einen grösseren Durchmesser als die B-DNA, ist aber bei gleich vielen Basenpaaren nicht so hoch. Die Z-DNA entsteht hauptsächlich aus $(dG-dC)_n$ -Sequenzen. Der wichtigste Unterschied zur B-DNA ist, dass die Z-DNA linksgängig ist.^[1, 10]

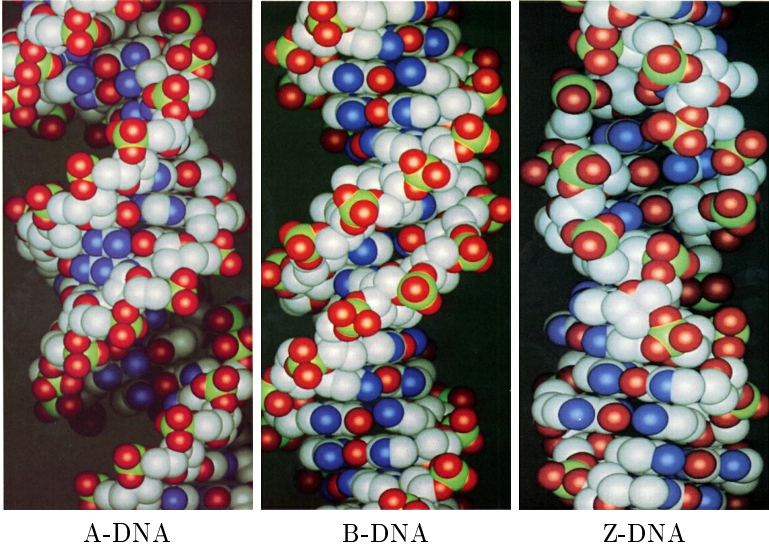


Abbildung 1.3: Verschiedene Konformationen von doppelsträngiger DNA: A, B, und Z-DNA.^[2]

Donor	Akzeptor	β [\AA^{-1}]	Distanz [\AA]	k_{ET} [s^{-1}]	Referenz
Methylviologen	Ethidium	1.0	10–17	10^6 – 10^9	Harriman ^[17]
Deazaguanin	Ethidium	-	10–17	10^{12}	Barton/ Zewail ^[18]
Guanin	Ethenoadenin	1.0	3.4–10.2	10^9 – 10^{10}	Barton ^[19]
Guanin	2-Aminopurin	0.1	3.4–10.2	10^9 – 10^{10}	Barton ^[19]
Guanin	Acridin	1.5	3–10	10^5 – 10^{10}	Tanaka ^[20]
Guanin	Stilben	0.64	-	10^8 – 10^{12}	Lewis ^[21]
G / GGG	T*	0.7–1.0	7–54	10^8	Giese ^[22, 23]
GG	Anthrachinon	-	200	-	Schuster ^[24]
Pyren	Guanin	0.6	7–27	-	Majima ^[25]

Tabelle 1.1: Akzeptor-Donor-Systeme verschiedener Arbeitsgruppen.

Die DNA-Doppelhelix ist durch mehrere Faktoren stabilisiert. Zum einen sind es die Wasserstoffbrücken, die bei A=T 15-25 kJ/mol und bei G≡C 25-40 kJ/mol ausmachen.^[11] Zum anderen trägt die π - π - Wechselwirkung der Nucleobasen einen grossen Betrag zur Stabilität entlang der Helixachse bei. Nach quantenmechanischer Berechnung beträgt die Energie für zwei gestapelte Basenpaare mit den Parameter der B-DNA in Gasphase 10-30 kJ/mol pro Basenpaar.^[12, 13] In wässriger Lösung bei neutralem pH ergibt die Rechnung 2-8 kJ/mol.^[14] Zudem ist die Solvatationsenergie nicht zu unterschätzen, die frei wird, wenn die negativ geladene Phosphate im Wasser gelöst werden.^[15, 16]

1.2 Leitfähigkeit der DNA

In den letzten zehn Jahren wurde eine kontroverse Diskussion geführt, wie gut die DNA elektrisch leitfähig ist.^[17–25] Dabei ging es nicht um die Leitfähigkeit wie bei den Metallen, bei denen Millionen Elektronen gleichzeitig verschoben werden. Sondern es wurde nur ein Elektron pro

DNA-Molekül gleichzeitig transportiert. Dabei wurden ganz unterschiedliche Akzeptor-Donor-Systeme entwickelt, um den Elektronentransfer (ET) zu charakterisieren. So verschieden die Systeme sind, so verschieden sind auch die Resultate^[26] (s. Tabelle 1.1). Als Mass für die Leitfähigkeit dient der β -Wert aus der Marcus-Theorie (s. Kapitel 2 ab S. 15): Je tiefer der β -Wert, desto leitfähiger ist die DNA.

Der β -Wert ist natürlich nicht der einzige Parameter, durch den der ET charakterisiert wird. Die Geschwindigkeitskonstante k_{ET} und die Distanz zwischen Akzeptor und Donor sind ebenso wichtig. Neben dem β -Wert findet man auch sehr unterschiedlich k_{ET} -Werte. Das liegt neben den Akzeptor - Donoren - Paaren auch an der verwendeten Oligonucleotidsequenzen. Wie im Abschnitt 1.2.1 beschrieben wird, ist die Sequenz viel wichtiger für β und k_{ET} als der Akzeptor oder der Donor.

Anders als in der Gruppe Giese (s. Abschnitt 1.2.1 auf S. 8), wird oft mit Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung gearbeitet wie z.B. bei den Ethidium-Systemen in Tabelle 1.1. D.h. der Akzeptor ist ein Fluorophor, dessen Fluoreszenz durch den weiter entfernten Donor gelöscht wird. Die Lebenszeit des Fluorophors widerspiegelt die Reaktionsgeschwindigkeit des ET. Der Vorteil dieser Methode liegt daran, dass der ET zur selben Zeit geschieht, wie er beobachtet wird. Der Nachteil ist, dass man nicht von vornherein weiss, ob ein Elektronentransfer stattfindet, denn es kann auch ein Energie Transfer für die Fluoreszenzlöschung verantwortlich sein. Es gilt den genauen Mechanismus zu untersuchen, bevor man von Elektronentransfer sprechen kann.

Schliesslich einigte man sich, dass die DNA weder ein Isolator noch ein elektrischer Leiter ist, sondern dass die Leitfähigkeit dem eines Halbleiter entspricht. D.h. β liegt im Bereich $0.5 - 0.8 \text{ \AA}^{-1}$. Dies zeigten die Experimente von Lewis^[21] und Giese^[23].

1.2.1 Elektronentransfer in DNA in der Gruppe Giese

In der Gruppe Giese wurden verschiedene DNA-Systeme auf ET getestet. Hier werden drei Beispiele aufgeführt, die das Gebiet des Guaninradikalkations ($G^{+\bullet}$) aufzeigen.

1. Folgende Experimente hatten das Ziel den β -Wert der DNA zu bestimmen^[27, 28] (s. auch in den Abschnitten 4.3 und 4.3). Das 4' - Pivaloylthymidin (T*) wurde in verschiedenen Distanzen in 5'- wie auch in 3'-Richtung von Guanosin in die DNA eingebaut. Das durch UV-Bestrahlung entstandene Radikalkation (s. Abb. 1.4 und Schema 4.1) wanderte zum nächsten G (ET) oder reagierte mit Wasser. Der ET erfolgte im sog. Superaustauschmechanismus.^[29] Wegen den unterschiedlichen Produkten (Enolether vom ET und 3'-Phosphat von der Wasseraddition) konnte die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{ET,rel}}$ und der β -Wert ermittelt werden. Man erhielt $\beta = 1.0 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$.

2. Folgende Experimente zeigen die Grenze des Superaustauschmechanismus auf.^[30] Durch die oben beschriebene Methode wurde ein $G^{+\bullet}$ erzeugt. Bis zum nächsten GGG, das die Radikalkationen wegen dem tiefen Oxidationspotential auffängt, wurde die Distanz von 7 \AA sukzessiv auf 17 \AA erhöht. (s. Abb. 1.5) Dadurch verringerte sich natürlich $k_{\text{ET,rel}}$ und damit die Oxidationsprodukte von GGG bis zur Detektionslimite.

Man beachte auch, dass sich die Methoden geändert haben. Während im ersten Beispiel die Analyse mit HPLC durchgeführt wurde, wurde im zweiten Beispiel Piperidin-Behandlung für die Strangspaltung der Oxidationsprodukte und ^{32}P markierte PAGE-Elektrophorese durchgeführt.

3. Schliesslich wurde neben dem Superaustauschmechanismus auch ein Hopping - Mechanismus für ET entdeckt.^[22] Es wurden drei Sequenzen verglichen (s. Abb. 1.6). Während im ersten Strang der ET in einem Schritt verläuft (Superaustauschmechanismus), sind in den zwei anderen Strängen die AT-Bereiche durch ein GC-Basenpaar unterbrochen. Der ET läuft von einem G zum nächsten, was im Superaustauschmechanismus erfolgt und als ein Hopping - Schritt bezeichnet wird. Im Ganzen erfolgen in diesem Beispiel zwei Hopping - Schritte. Wie am $k_{\text{ET,rel}}$ zu erkennen ist, ist der Hopping - Mechanismus für längere Distanzen sehr effizient.

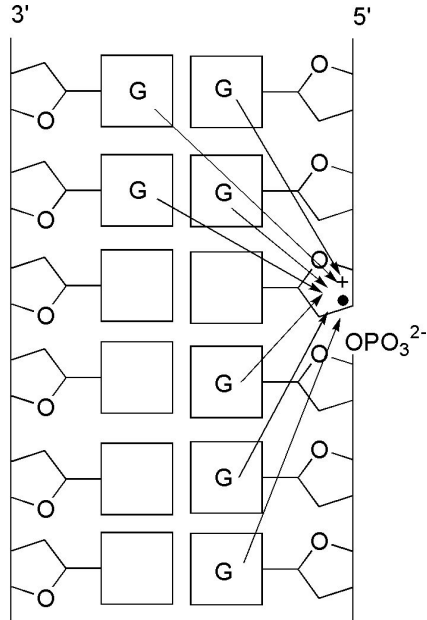


Abbildung 1.4: In dieser Darstellung werden die Sequenzen zusammengefasst, die zur Bestimmung des β -Wertes führten. Jeder Pfeil, an dessen Ende der Elektronendonator G eingebaut wurde, symbolisiert eine Sequenz.

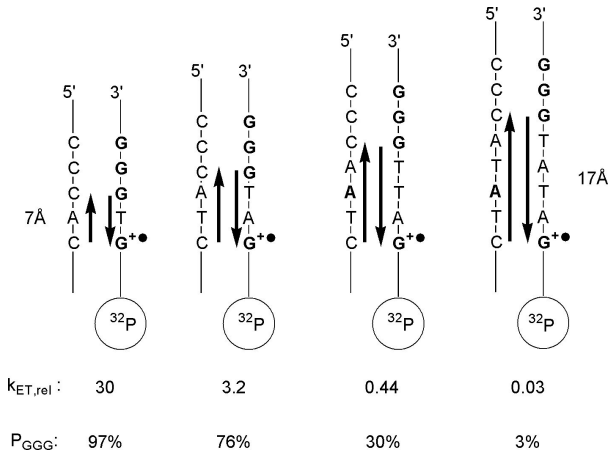


Abbildung 1.5: An diesen Experimenten wird die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers gezeigt. Das Elektron tunnelt durch immer längere AT-Sequenzen, wobei dessen Effizienz sinkt. P_{GGG} sind die Oxidationsprodukte bei der GGG-Sequenz, die vom Wasser abgefangen und mit Piperidin gespalten wurden.

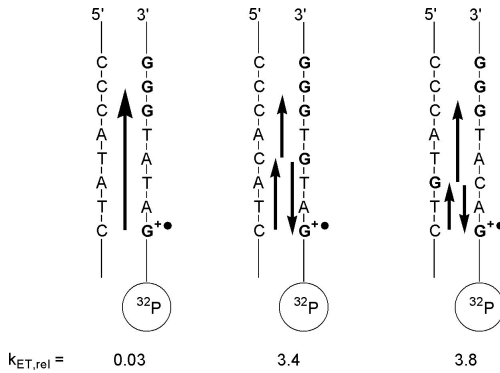


Abbildung 1.6: Der Vergleich zwischen Superaustausch- und Hopping-Mechanismus: Links tunnelt das Elektron mit einem Schritt von GGG (Superaustausch), wobei es in der Mitte und rechts zwei Schritte braucht (Hopping). Der Hopping-Mechanismus ist deutlich effizienter.

1.3 Oxidativer Stress

Durch den Stoffwechsel in Organismen ist die DNA *in vivo* ständig durch “Reactive Oxygen Species” (ROS) ausgesetzt. Das sind Moleküle wie z.B. Sauerstoffradikalanion ($O_2^- \bullet$), H_2O_2 , Hydroxyradikal ($\bullet OH$), Alkoxy- und Peroxyradikale. Diese ROS oxidieren die DNA, die meistens wieder durch Enzyme repariert wird. Dieser Vorgang wird als oxidativer Stress^[31] bezeichnet und findet in einer Zelle ca. 10'000 Mal pro Tag statt. Da jedoch nicht jede Schädigung durch ROS korrekt repariert wird, kann dies zu Mutationen führen, was z.B. Krebs verursachen kann.

Was hat das alles mit ET zu tun? Es wird davon ausgegangen, dass der ET als Schutz eingesetzt wird: Die durch die Oxidation entstandenen Radikalkationen können durch ET in der DNA zu G-reichen Sequenzen wandern, da G das niedrigste Oxidationspotential der vier Nucleobasen hat. Wenn die G-reichen Sequenzen, wie z.B. die Telomere am Ende der DNA, nicht zu den codierenden Sequenzen gehören, hat der entstande-

ne Schaden keine Auswirkung auf die Proteinproduktion und somit auf den ganzen Organismus. Dadurch werden diese "Schutzsequenzen" den codierenden Sequenzen geopfert.

1.4 Aufgabenstellung

Aus den obengenannten Experimenten mit dem ET entstand eine Idee: Wie wäre es, wenn die DNA verbessert werden könnte, so dass der Elektronentransfer effizienter abläuft? Eine mögliche Lösung ist Guanin, das der Träger des ET ist, durch eine geeignetere Struktur zu ersetzen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie Pyren eine geeignete Struktur für den ET darstellt. Warum gerade Pyren gewählt wurde, wird im Kapitel 3 ab S. 23 beschrieben. Pyren wurde also als künstliche Nucleobase benachbart zum Radikalvorläufer in die DNA eingebaut, um den ET von Pyren zum Radikalkation zu messen. Die Strukturen des Radikalvorläufers und des Pyren-Nucleotides sind in der Abbildung 1.7 ersichtlich. Weiter wurde die Distanzabhängigkeit des ET in DNA untersucht, d.h. das Pyren musste in verschiedenen Distanzen von der Pivaloylgruppe in DNA eingebaut werden. Ausführlicher wird das Thema im Kapitel 4 ab S. 33 besprochen.

Ein anderes Thema betraf den Radikalvorläufer: Die Pivaloylgruppe wurde bisher an das Thymin angeknüpft, da Thymin im kationischen ET inert ist, d.h. das Oxidationspotenzial von Thymin ist zu hoch, um mit dem Radikalkation zu reagieren. Wünschenswert wäre natürlich, dass man den Radikalvorläufer universell einsetzen kann und nicht nur gegenüber von Adenosin. So entstand der Gedanke die Pivaloylgruppe an die 4-Position der abasische Stelle zu knüpfen (s. Abb. 1.7). Die 4-pivaloylierte abasische Stelle (Ab*) wurde in dieser Arbeit gegenüber von Pyren eingebaut, um möglichst eine kurze Distanz zwischen dem Radikalkation und dem Donor zu haben. Resultate und Diskussion findet man im Kapitel 5 ab S. 51.

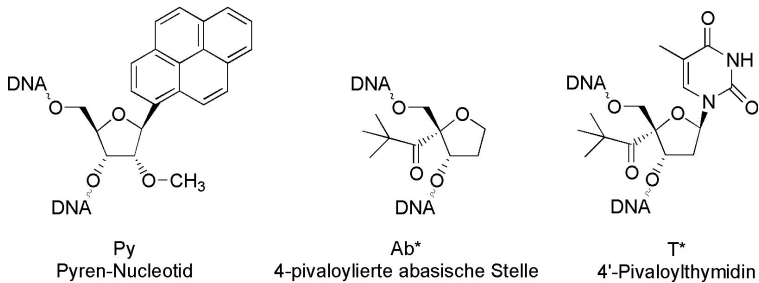


Abbildung 1.7: Die synthetisierten modifizierte DNA-Bausteine. Die ersten beiden wurden das erste Mal synthetisiert. Die eigentlichen Zielmoleküle der organischen Synthese waren die korrespondierenden 5'-Dimethoxytrityl-3'-phosphoramidit-Nucleotide.

Kapitel 2

Marcus-Theorie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch auf die Marcus-Theorie zurückgegriffen. Deshalb werden die wichtigsten Zusammenhänge erklärt. Marcus^[29] hat seit den späteren 1950er Jahren die Theorie des Elektronentransfers nach klassischen Modellen entwickelt. Im Jahr 1992 erhielt er den Nobelpreis in Chemie.

2.1 Abhängigkeit des Elektronentransfers von ΔG^* und ΔG^0

Die Theorie geht davon aus, dass beim ET ein Übergangszustand mit einer bestimmter Aktivierungsenergie ΔG^* existiert. Für solche Reaktionen lässt sich die Geschwindigkeitskonstante k_{ET} folgendermassen formulieren:

$$k_{\text{ET}} = A \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} \quad (2.1)$$

A ist ein präexponentieller Faktor, R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, ΔG^* die freie Aktivierungsenergie. D. h. je grösser die Aktivierungsenergie, desto langsamer läuft der ET ab.

Schematisch kann eine Reaktion wie folgt betrachtet werden (Abb. 2.1): Vom Potentialtopf des Edukts läuft die Reaktion über den Übergangszustand (ÜZ) zum Potentialtopf des Produkts. Genauer gesagt, spielt sich folgendes ab: Die Kernkoordinaten (Reaktionskoordinate) des Edukts verschieben sich, so dass sie im Übergangszustand die gleichen Koordinaten wie das Produkt haben. Dabei muss die Aktivierungsenergie ΔG^* überwunden werden und das System gewinnt die freie Reaktionsenergie ΔG^0 . Anders als in der konventionellen Chemie werden beim Elektronentransfer keine Bindungen gebrochen und neue geknüpft. Als Annäherung für das Potential werden harmonische Oszillatoren (Parabeln) angenommen. Als Beispiel in der Abbildung wurde wie üblich bei den Experimenten dieser Arbeit ein Ladungstransfer eines Radikalkations vorgestellt, das vom Akzeptor A zum Donor D wandert. Die eingezeichnete Reorganisationsenergie λ ist definiert als die Energie, die benötigt wird, die Koordinaten des Edukts in die Koordinaten des Produkts inklusive der Lösungsmittelmoleküle zu verzerren, ohne dass die grundlegende Struktur des Edukts verändert wird.^[32, 33]

Die Aktivierungsenergie ΔG^* hängt von der freien Reaktionsenergie ΔG^0 und Reorganisationsenergie λ wie folgt ab:

$$\Delta G^* = \frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda} \quad (2.2)$$

Wegen der quadratischen Abhängigkeit hat ΔG^* ein Minimum und folglich nach Gleichung 2.1 die Geschwindigkeitskonstante ein Maximum. Unschwer zu erkennen liegt das Minimum bei $-\Delta G^0 = \lambda$. Dieser Sachverhalt wird graphisch in der Abbildung 2.2 dargestellt. Dieses Minimum trennt zwei Bereiche: den normalen und inversen Marcus-Bereich. Im normalen Marcus-Bereich ($-\Delta G^0 < \lambda$) ist es wie in der konventionellen Chemie: Bei einer Erhöhung der freien Reaktionsenergie ($-\Delta\Delta G^0$ pos.) erfolgt eine Verkleinerung der Aktivierungsenergie ($\Delta\Delta G^*$ neg.) und eine Vergrößerung der Geschwindigkeitskonstante. Im inversen Marcus-Bereich ($-\Delta G^0 > \lambda$) ist es, wie der Name sagt, genau umgekehrt: Bei einer Erhöhung der freien Reaktionsenergie ($-\Delta\Delta G^0$ pos.) erfolgt eine Erhöhung der Aktivierungsenergie ($\Delta\Delta G^*$ pos.) und eine Verkleinerung der Geschwindigkeitskonstante.

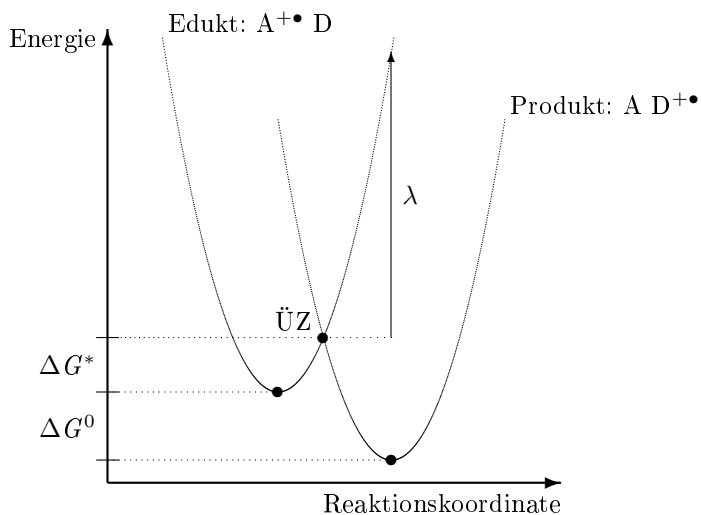


Abbildung 2.1: Ein schematischer Reaktionsverlauf vom Edukt über den Übergangszustand (ÜZ) zum Produkt. Als Beispiel wurde der Ladungstransfer eines Radikalkations gewählt. A: Akzeptor, D: Donor, ΔG^* : Aktivierungsenergie, ΔG^0 : freie Reaktionsenergie, λ : Reorganisationsenergie.

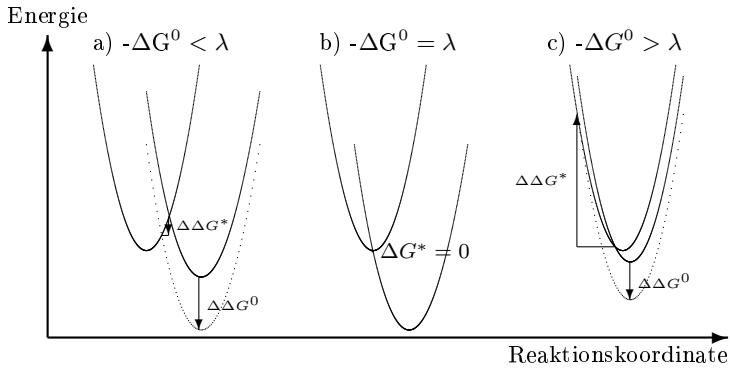


Abbildung 2.2: a) normaler Marcus-Bereich: Bei einer Erhöhung der freien Reaktionsenergie ($-\Delta\Delta G^0$ pos.) erfolgt eine Verkleinerung der Aktivierungsenergie ($\Delta\Delta G^*$ neg.); b) Minimum der Aktivierungsenergie; c) inverser Marcus-Bereich: Bei einer Erhöhung der freien Reaktionsenergie ($-\Delta\Delta G^0$ pos.) erfolgt eine Erhöhung der Aktivierungsenergie ($\Delta\Delta G^*$ pos.).

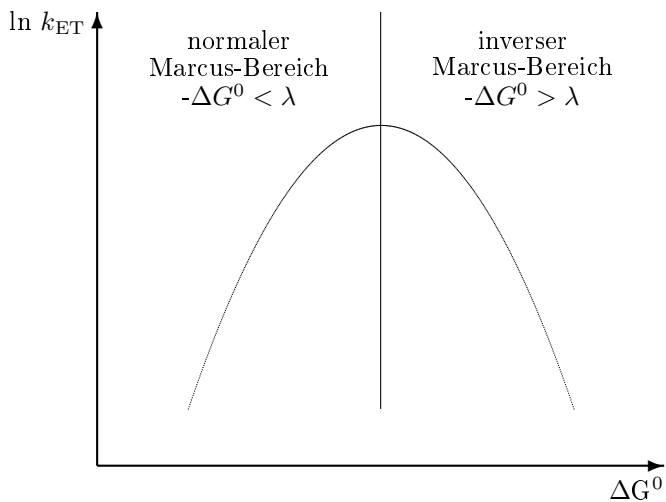


Abbildung 2.3: Im normalen Bereich wird k_{ET} durch die Erhöhung der freien Reaktionsenergie erhöht bis ein Maximum erreicht ist. Danach wird durch eine weitere Erhöhung der freien Reaktionsenergie k_{ET} verringert. (inverser Marcus-Bereich)

Durch Kombination der Gleichungen 2.1 und 2.2 erhalten wir:

$$mk_{\text{ET}} = A \cdot e^{-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT}} \quad (2.3)$$

Die graphische Darstellung dieser Gleichung wird in der Abbildung 2.3 festgehalten, in der das Maximum der Geschwindigkeitskonstante gut sichtbar ist.

Da die Theorie wegen dem inversen Marcus-Bereich ungewohnte Zusammenhänge postulierte, wurde sie lange kritisiert, bis sie 1985 experimentell bestätigt wurde.^[34]

2.2 Superaustauschmechanismus

Bis jetzt wurde der adiabatische Elektronentransfer besprochen: beim Übergangszustand entsteht wegen der starken elektronischen Kopplung zwischen dem Edukt und Produkt in jedem Fall das Produkt. Beim nichtadiabatischen Elektronentransfer, der eine schwache elektronische Kopplung zwischen Edukt und Produkt beschreibt, ist die Produktbildung nicht selbstverständlich. Beispielsweise ist dieser Sachverhalt bei einem über grosse Distanzen ablaufenden ET gegeben. Es ist möglich, dass das System die nötige Energie aufweist, um in den Potentialtopf des Produkts hinüberzuwechseln, jedoch wegen fehlender Kopplung immer noch im Potentialtopf des Edukts bleibt. Um diesen Sachverhalt zu quantifizieren wurde das elektronische Kopplungselement H_{AD} eingeführt und in den präexponentieller Faktor A von Gleichung 2.1 bzw. 2.3 eingebaut. Mit quantenmechanischer Berechnung von Levich und Jortner wurde für A folgendes gefunden:^[35–37]

$$A = \frac{2\pi H_{\text{AD}}^2}{\hbar\sqrt{4\pi RT}} \quad (2.4)$$

2.2.1 Die Distanzabhängigkeit des ET: β -Wert

Das elektronische Kopplungselement H_{AD} ist wie folgt distanzabhängig:
[32, 38]

$$H_{\text{AD}}^2 = H_{\text{AD}}^0{}^2 \cdot e^{-\beta(d-d_0)} \quad (2.5)$$

d_0 ist die Distanz, bei der das Kopplungselement den Wert H_{AD}^0 beträgt. β ist eine Materialkonstante, die angibt wie gut sich das Medium eignet, ET durchzuführen. Je höher der Wert, desto isolierender wirkt das Medium. Im Vakuum wurde β auf $3.4 - 5.0 \text{ \AA}^{-1}$ bestimmt.^[39, 40] Das bedeutet, die Geschwindigkeit des ET nimmt pro weiteres Angström um den Faktor $30 - 150$ ($\approx e^{3.4} - e^{5.0}$) ab.

2.2.2 Die Marcus-Levich-Jortner-Gleichung

Durch Kombination der Gleichungen 2.3, 2.4 und 2.5 wird die semi-klassische Marcus-Levich-Jortner-Gleichung erhalten, in der alle wichtigen Faktoren für die Geschwindigkeitskonstante des ET zusammengefasst sind:

$$k_{\text{ET}} = \frac{2\pi H_{\text{AD}}^0{}^2}{\hbar\sqrt{4\pi RT}} \cdot e^{-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT}} \cdot \beta(d - d_0) \quad (2.6)$$

Dabei ist H_{AD}^0 das elektronische Kopplungselement zwischen Akzeptor und Donor bei der Distanz d_0 , ΔG^0 die freie Reaktionsenergie, T die absolute Temperatur, λ die Reorganisationsenergie, β die Materialkonstante, d die Distanz zwischen Akzeptor und Donor.

Wichtig beim Superaustauschmechanismus ist, dass der Ladungstransfer in *einem* Schritt abläuft. Das Elektron tunnelt vom Donor mittels den Brückenorbitalen, d.h. den Orbitalen, die zwischen dem Akzeptor und Donor liegen, zum Akzeptor.

Kapitel 3

Eigenschaften des Pyrens

Nachdem in den ersten beiden Kapitel viel über DNA und ET zu lesen war, wird in diesem Kapitel eine neue Komponente namens Pyren vorgestellt.

3.1 Physikalische Eigenschaften

Pyren^[41] mit der Formel $C_{16}H_{10}$ und Molekulargewicht von 202.26 g mol⁻¹ schmilzt bei 151.2 °C, siedet bei 404 °C, hat bei 23 °C eine Dichte von 1.271 g cm⁻³ und ist in Wasser unlöslich, jedoch in Ethanol, Ether und Benzol löslich. Neben diesen einfachen Daten weist Pyren auch interessante Eigenschaften in Zusammenhang mit DNA und Elektronentransfer aus.

3.1.1 Stabilität der DNA mit eingebautem Pyren-Nucleotid

Zuerst muss die Frage gestellt werden, ob Pyren die B-Struktur der DNA verzerrt oder ob die DNA inakt bleibt. Welches Molekül ist geeignet gegenüber von Pyren in der DNA eingebaut zu werden? Ein Artikel von Kool^[42] gab darauf die Antwort. Pyren und die abasische Stelle

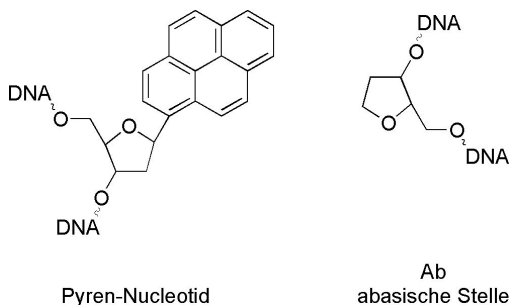


Abbildung 3.1: Pyren und die abasische Stelle als Partner in der DNA.

als Partner haben in DNA minimale Stabilitätsverluste zur Folge, wie seine Schmelztemperatur - Versuche zeigen. (Strukturen s. Abb. 3.1) Wenn ein AT-Paar durch ein Py-Ab-Paar ersetzt wird, verringert sich die Schmelztemperatur T_m um $1.8 - 2.2$ °C oder $-\Delta G_{25}^0$ um $0.6 - 0.7$ kcal/mol (s. Tab. 3.1). ΔG_{25}^0 bezeichnet die freie Hybridisierungsenergie bei 25°C.

Fazit: Die Struktur der DNA bleibt erhalten: Das Pyren verursacht keinen Knick oder ähnlich Störendes, sondern fügt sich in die π -Stapelung der Nucleobasen ein.

3.1.2 UV-VIS-Spektroskopie von Pyren

Wie erwartet für ein ausgedehntes π -System, absorbiert Pyren Licht im UV-VIS-Bereich^[88] (s. Abb. 3.2). Dieses Spektrum bringt für die Bestrahlung einen Vorteil, aber auch ein Problem. Glücklicherweise liegt zwischen 290 nm und 310 nm ein Minimum vor, so dass Pyren in diesem Bereich fast kein Licht absorbiert, das von der Pivaloylgruppe zur Radikalinitiierung benötigt wird. Leider hat das Pyren ein Maximum bei 340 nm, so dass es bei der Bestrahlung angeregt wird und eigene Chemie machen könnte.

Aufgrund der UV-Absorption des Pyrenradikalkations ($\text{Py}^{+\bullet}$) ist es möglich dieses *in situ* bei ET-Prozessen zu beobachten.^[25] Das UV-VIS-

Sequenz	(5'-3') (3'-5')	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	$-\Delta G_{25}^0$ [kcal/mol] (van't Hoff)	$-\Delta\Delta G_{25}^0$ [kcal/mol]
CTT TTC T TT CTT GAA AAG A AA GAA		43.2	-	12.3	-
CTT TTC PyTT CTT GAA AAG AbAA GAA		41.0	-2.2	11.6	-0.7
CTT TTC AbTT CTT GAA AAG PyAA GAA		41.6	-1.8	11.7	-0.6

Tabelle 3.1: Schmelztemperatur von Py-Ab im Vergleich zu A-T in einem 15mer. ΔG_{25}^0 bezeichnet die freie Hybridisierungsenergie bei 25°C.

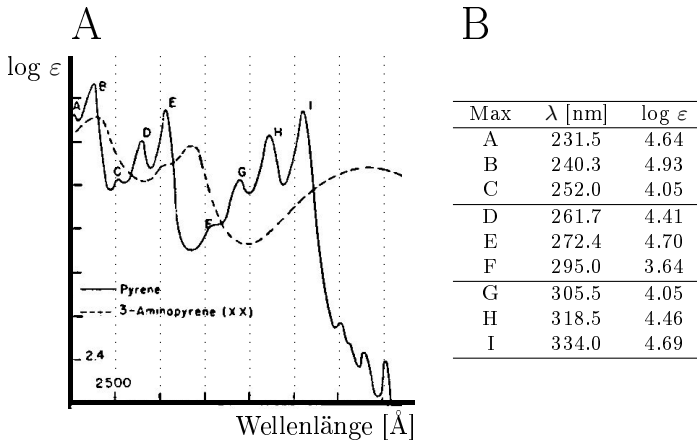


Abbildung 3.2: A: UV-Spektrum von Pyren in Ethanol. Zwischen den Markierungen der X-Achse liegen 200 Å. Die Markierungen der Y-Achse haben ein Intervall von 0.4. B: Die zugehörige Maxima-Tabelle.^[88]

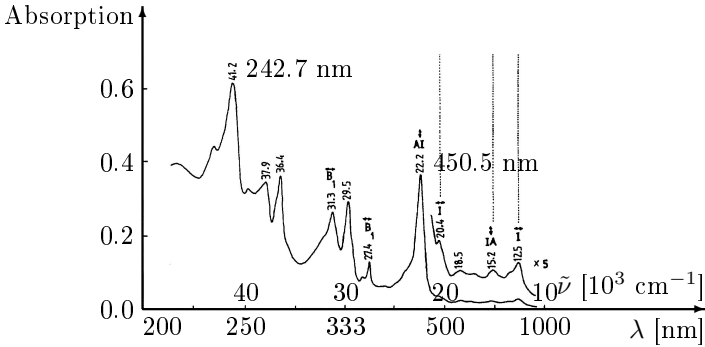


Abbildung 3.3: UV-VIS-Spektrum von Pyrenradikalkation. Die Maxima sind in $\times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ (Wellenzahl) angegeben. Die Buchstaben beziehen sich auf die elektronischen Übergänge.^[44]

Spektrum wird in Abbildung 3.3 wiedergegeben.^[44]

Abgesehen von den Absorptionseigenschaften ist Pyren ein ausgezeichneter Fluorophor^[45], was in zahlreichen Experimenten genutzt wird.^[46–49] (Fluoreszenzspektrum s. Abb. 3.4)

3.1.3 Pyren als Elektronendonator

Wenn Pyren Guanin als Elektronendonator ersetzen soll, muss es ein ähnliches Oxidationspotential oder eine ähnliche Ionisationsenergie besitzen, was in Tabelle 3.2 gezeigt wird. Aufgrund dieser ähnlichen Eigenschaften kann erwartet werden, dass $k_{\text{ET,rel}}$ für Pyren etwa gleich groß ist wie für Guanin.

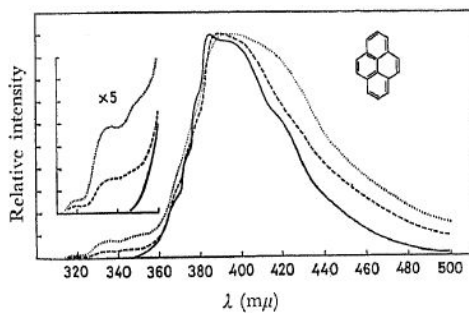


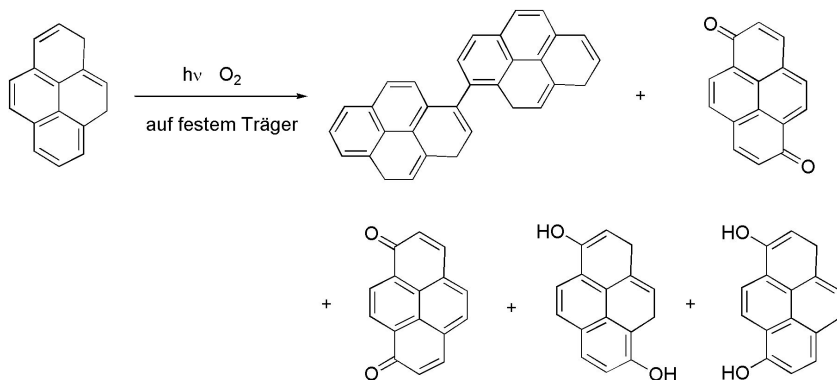
Abbildung 3.4: Fluoreszenzspektrum von Pyrendampf bei 200 °C und einem Druck von ≈ 3 mmHg. Erhalten durch Anregung bei verschiedenen Wellenlängen: ausgezogene Linie 323 nm ($=m\mu$), gestrichelte Linie 268 nm, punktierte Linie 236 nm.^[45]

	Thymin	Cytosin	Adenin	Guanin	Pyren
Oxidationspotential [V] ^a	2.11	2.14	1.96	1.49	1.49 ^[50] 1.44 ^[51]
Ionisationsenergie [eV] ^b	9.14	8.87	8.24	7.75	7.41

^aBez. SHE. Gemessen in CH_3CN mittels cyclischer Voltametrie.^[52]

^bNucleobasen N-Methyliert.^[53] Pyren in Gasphase.^[41]

Tabelle 3.2: Oxidationspotential und Ionisationsenergie der Nucleobasen im Vergleich zum Pyren.



Schema 3.1: Photooxidationsprodukte von Pyren auf einer Oberfläche unter aeroben Bedingungen.

3.2 Chemische Eigenschaften

3.2.1 Photooxidation

Es stellt sich die Frage, wie sich angeregtes Pyren verhält. Geht es wieder in den Grundzustand zurück oder reagiert es mit der Umgebung? Es wurde gezeigt, dass auch letzteres passieren kann.^[54–57] Pyren wurde auf verschiedene Oberflächen wie Gartenerde, Silica Gel G, ausgefälltes Silica Gel, Aluminium, Kieselsäure, Alkali Carbonate adsorbiert und thermo- oder photooxidiert. Dabei entstanden verschiedene Produkte, die im Schema 3.1 gezeigt sind. Diese Versuche kann man nur bedingt mit den Bestrahlungsexperimente in dieser Arbeit vergleichen, da die Bedingungen ganz verschieden sind. Während bei der Photooxidation die Transformation des Pyrens durch die Oberfläche optimiert wurde, wurde bei der DNA-Bestrahlung durch Ausschluss des Sauerstoffs darauf geachtet, dass die unkontrollierte Oxidationen unterdrückt wurden. Nach Pagni^[58] ist Sauerstoff notwendig, um Radikalkationen auf der Oberfläche zu bilden.

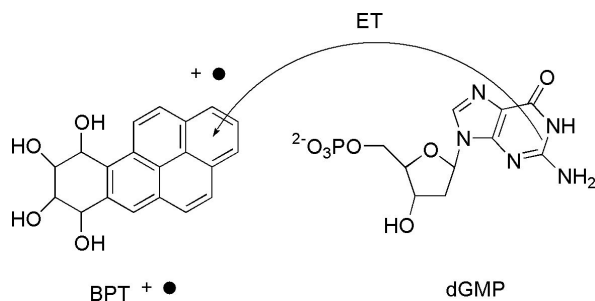


Abbildung 3.5: Elektronentransfer zwischen BPT Radikalkation und Guanodin.

3.2.2 Elektronentransfer von Guanodin zum BPT

Neben der Photooxidation wurde auch mit Pyren Elektronentransfer betrieben.^[48] Dabei wurde BPT (7,8,9,10-Tetrahydroxytetrahydrobenzo-[a]pyren) (s. Abb. 3.5) durch einen Laserpuls in wässriger sauerstoffhaltiger Lösung zum Singlettzustand ^1BPT angeregt. Diese Spezies kann durch einen zweiten Laserpuls zum BPT Radikalkation ($\text{BPT}^{+\bullet}$) und hydratisierten Elektronen reagieren. Die hydratisierten Elektronen werden durch den Sauerstoff abgefangen, bevor sie Nebenreaktionen eingehen. $\text{BPT}^{+\bullet}$ kann einen Elektronentransfer zu einem anwesenden dGMP (2'-Desoxyguanodin 5'-monophosphat) eingehen.

3.2.3 Pyren als Ladungsinitiator

Netzel^[59–61] und Wagenknecht^[46, 62] haben Pyren verwendet, um negative Ladung in DNA zu injizieren. Dabei wurde Pyren kovalent mit Uracil verbunden (s. Abb. 3.6). Durch Bestrahlung bei 340 nm wurde das Pyren angeregt, das eine Ladungstrennung zum $\text{Py}^{+\bullet}$ und $\text{dU}^{-\bullet}$ injizieren konnte, wenn der pH über fünf ist^[59, 62] (Schema 3.2); sonst wird das Radikalanion protoniert. Im Monomer-Versuch rekombinieren die beiden Ionen, aber in der DNA ist es möglich, dass das Radikalanion in der DNA weiterwandert. Es bevorzugt aufgrund des Reduktionspotential T

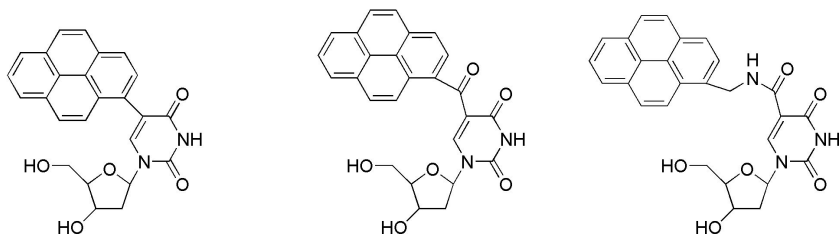
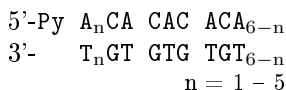


Abbildung 3.6: Pyrenmodifizierte Uracil-Derivate, die in Fluoreszenz Experimenten verwendet wurden. ^[46, 59–62]

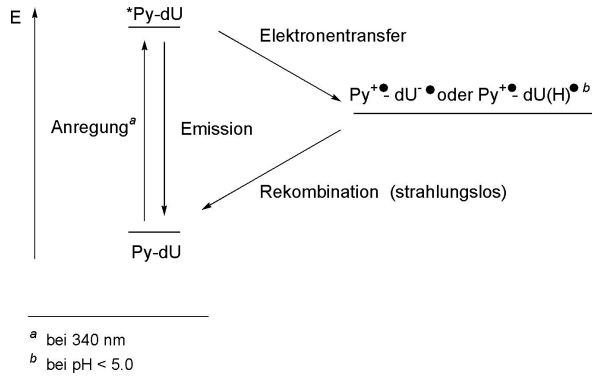
und C beim ET. Wagenknecht^[46] beschreibt, wie er solch ein System entwickelt hatte.

3.2.4 Radiolyse

Pyren wurde auch in Radiolysen-Experimenten verwendet.^[25, 63] Pyren wurde kovalent an die 5' Position eines Oligonucleotids (14mer) mit folgender Sequenz geknüpft:



Während des folgenden Experimentes wurde zeitaufgelöst das Absorptionsspektrum von Pyrenradikalkation ($\text{Py}^{+\bullet}$, $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$) aufgenommen. Mit Puls-Radiolyse (Bestrahlung mit Elektronen, β -Strahlen) wurde in Gegenwart von Peroxodisulfat ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) Sulfat - Radikalanionen ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) erhalten (Schritt 1 im Schema 3.3). Dies passierte in einer Zeitspanne von 20 ns. *tert.*-Butylalkohol diente als Radikalfänger für Hydroxyradikale ($\bullet\text{OH}$). In einem 2. Schritt oxidierte $\text{SO}_4^{\bullet-}$ unspezifisch Nucleobasen und Pyren zu Radikalkationen. Die Radikalkationen von A, T, C wanderten aufgrund des höheren Oxidationspotential (s. Tab. 3.2) zum nächstgelegenen Guanin, so dass im Oligonucleotid $\text{G}^{+\bullet}$ entstand (dargestellt im Schema als $\text{Py-DNA}^{+\bullet}$). In den nächsten 2 μs wurde ein



Schema 3.2: Photoinduzierter ET mit Pyren als Chromophor und Uracil als Akzeptor.

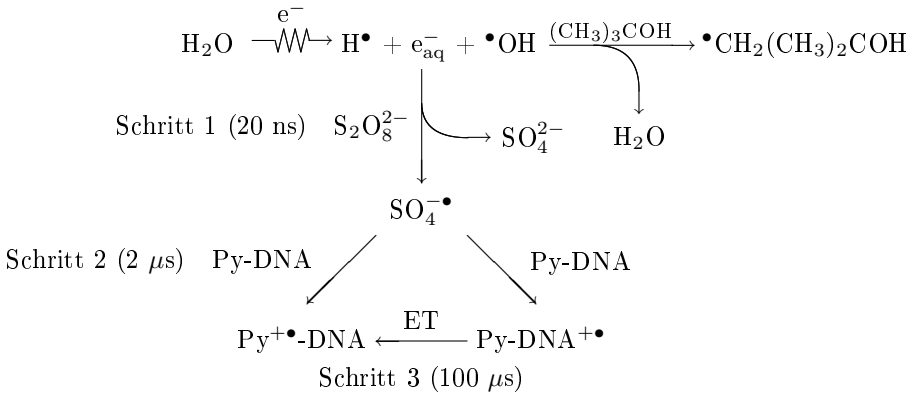
Abfall der $\text{Py}^{+\bullet}$ - Konzentration beobachtet. In den nächsten 100 μs trat der gewünschte Vorgang in Erscheinung (Schritt 3): Vom nächstgelegenen $\text{G}^{+\bullet}$ wanderte das Radikalkation zum Pyren, so dass $\text{Py}^{+\bullet}$ entstand.

Da in verschiedenen Oligonucleotiden unterschiedliche Distanzen von Pyren zu Guanin vorhanden waren, konnte ein β -Wert von 0.6 \AA^{-1} bestimmt werden.

3.3 Zusammenfassung

Verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften machen das Pyren zu einem guten Kandidaten für den Einbau und Elektronentransfer-Experimente in DNA. Wichtig ist vor allem, dass die Stabilität der DNA gewährleistet ist und dass Pyren ein genügend tiefes Oxidationspotential aufweist, um Elektronentransfer durchzuführen.

Pyren vermag Guaninradikalkationen zu reduzieren (Abschnitt 3.2.4); Guanin vermag aber auch Pyrenradikalkationen zu reduzieren (Abschnitt



Schema 3.3: Die Prozesse bei einem Elektronenpuls während der Radiolyse.

3.2.2). Wahrscheinlich liegt es daran, dass die Oxidationspotentiale der beiden Substanzen fast gleich sind und somit je nach System Pyren oder Guanin das höhere Potential besitzt. Durch die UV-Absorption bei 340 nm ist das Pyren photoaktiv und somit können Nebenreaktionen auftreten.

Kapitel 4

Elektronentransfer mit Pyren

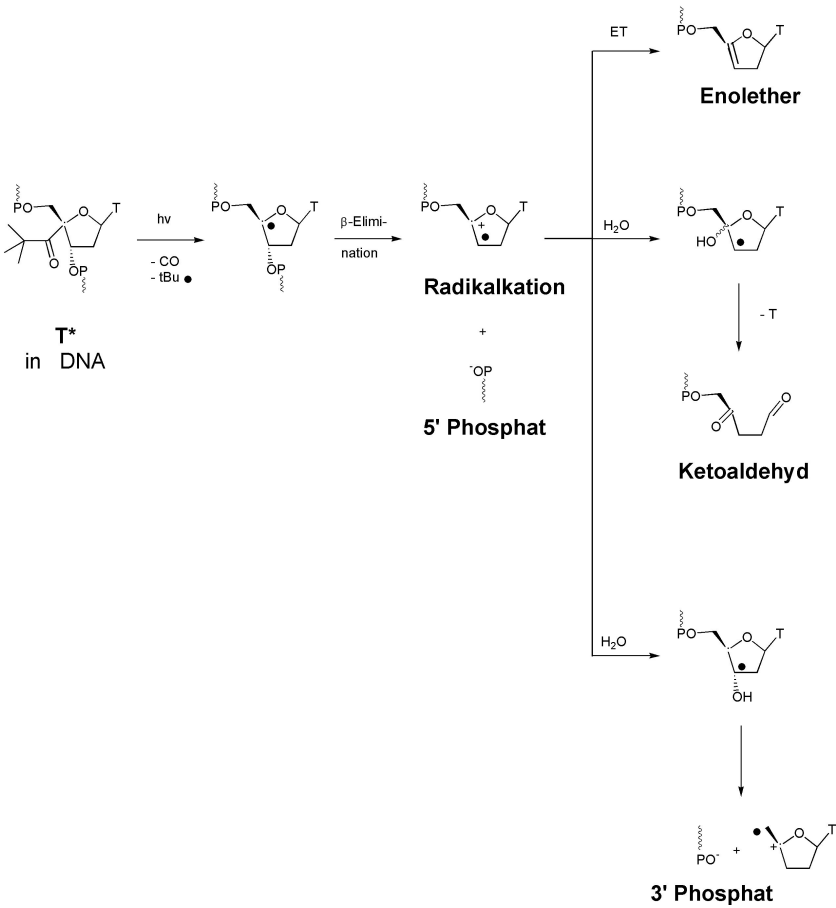
Dieses Kapitel zeigt die Elektronentransfer-Experimente und setzt sie in Zusammenhang mit früheren Experimenten.

4.1 Experimentelle Bestimmung von $k_{\text{ET,rel}}$

In dieser Arbeit durchgeführte Experimente haben prinzipiell die gleiche Schlüssel - DNA-Sequenz: 5'-TPyT_nT*T-3', wobei n die Werte von 0 bis 2 annimmt. Das bedeutet, dass der zu untersuchende ET zwischen dem entstandenen Radikalkation aus der Pivaloylgruppe und dem Pyren als nächste zu oxidierende Nucleobase stattfindet.

Um $k_{\text{ET,rel}}$ zu bestimmen, muss man die möglichen Reaktionswege von T* kennen (s. Schema 4.1). Diese wurde von Meggers bestimmt.^[22, 28] Die Pivaloylgruppe zerfällt bei der Bestrahlung¹ mit UV-Licht der Wellenlängen 300 – 320 nm durch eine Norish Typ I Reaktion zum 4'C-

¹Weitere Bestrahlungsbedingungen: 1 nMol Doppelstrang-DNA in 200 μl einer anaeroben wässriger Lösung mit 20 mM Natriumzitat, pH 5.0, 100 mM NaCl, 15 °C, 10 Min., 320 nm cut-off-Filter.



Schema 4.1: T^* Reaktionswege: Elektronentransfer oder Wasseraddition.

Radikal. Nach der β -Elimination der Phosphatgruppe am 3'-Kohlenstoff entsteht das Radikalkation, das mehrere Reaktionsmöglichkeiten hat. Der freigesetzte Strang als 5'-Phosphat dient als Referenz, wieviele Radikalkationen entstanden sind.

Einerseits kann ein ET stattfinden, welcher der in der Nähe befindlichen zu oxidierenden Nucleobase (z.B. G oder Py) ein Elektron entzieht. Somit wandert das ganze Radikalkation zur Nucleobase. Am Thymin entsteht dadurch ein Enolether, der typisch für den ET ist. Andererseits kann das Radikalkation mit Wasser reagieren und leitet die Zersetzung des Thymins ein. Am Schluss entstehen die Wasseradditionsprodukte 3'-Phosphat und Ketoaldehyd. Die Produkte wurden durch HPLC getrennt und durch MALDI-Tof-MS identifiziert. Durch das Verhältnis zwischen Enolether und 5'-Phosphat kann $k_{\text{ET,rel}}$ wie folgt bestimmt werden:

$$k_{\text{ET,rel}} = \frac{[\text{Enolether}]}{[5' \text{ Phosphat}] - [\text{Enolether}]} \quad (4.1)$$

Der Ausdruck $[5' \text{ Phosphat}] - [\text{Enolether}]$ berechnet die Produkte, die nicht aus dem ET entstanden sind. Das ist hauptsächlich 3'-Phosphat, jedoch fallen auch die kaum produzierte Ketoaldehyd und nicht bekannte Produkte aus anderen Nebenreaktionen darunter. Diese Produkte werden ins Verhältnis des Elektronentransferprodukts Enolether genommen. Somit besagt $k_{\text{ET,rel}}$ aus, wieviel schneller der ET bez. der anderen Reaktionen (hauptsächlich der Wasseraddition) ist.

Aus Versuchen mit externen Elektronendonoren wie Methionin, Selenomethionin und Kaliumiodid wurde die Geschwindigkeitskonstante der Wasseraddition auf 10^8 s^{-1} abgeschätzt.^[28] Folglich kann k_{ET} aus $k_{\text{ET,rel}}$ wie folgt berechnet werden:

$$k_{\text{ET}} = k_{\text{ET,rel}} \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \quad (4.2)$$

4.2 $k_{\text{ET,rel}}$ vom Pyren-Nucleotid

4.2.1 Einzelstrang-Experiment ss1

Das oben beschriebene Verfahren wurde zuerst auf einen Einzelstrang (ss1) mit eingebautem T* und Pyren angewendet. Da sich im Einzelstrang wegen der Flexibilität des Stranges neben dem Pyren kein weiterer Elektronendonator befinden darf, wurde ein Poly-T-Strang synthetisiert.

Die HPLC-Chromatogramme nach der Bestrahlung sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Typischerweise wurde bei 260 nm detektiert, da alle Nucleobasen und Pyren dort absorbieren. Wie gewöhnlich sind in den ersten fünf Minuten Salze und bei dreissig Minuten Peaks vom Waschprogramm zu sehen. Die Photoprodukten 5'-Phosphat (5'(P)), 3'-Phosphat (3'(P)), Enolether und Edukt ss1 konnten gut getrennt werden. Wie bei allen Bestrahlungs-Experimenten wurden die Peaks isoliert und mit MALDI-ToF-MS mit einer Genauigkeit von $\pm 1 - 20$ m/z gemessen, wobei die meisten Messungen mit einer Genauigkeit bei ± 5 m/z durchgeführt wurden. Da die berechneten Massen (in g/mol) 2756 für 5'(P), 3166 für 3'(P), 3372 für Enolether und 6212 für ss1 betragen, konnten die Peaks eindeutig identifiziert werden. Die Peakflächen wurden durch den nach Inkrementwerten berechneten Extinktionskoeffizienten ε_{260} dividiert (Tab. 4.1). Der Extinktionskoeffizient eines Stranges wurde durch einfaches Addieren der Inkrementwerten mit der jeweiligen Anzahl der jeweiligen Nucleobase erhalten. Während die Werte der natürlichen Basen bekannt sind,^[64] wurde der Extinktionskoeffizient des Pyrens experimentell ermittelt. Das Diol **1** wurde in wässriger Lösung mit 20 mM Natriumzitat (pH 5.0) und 100 mM NaCl gelöst. (gleiche Lösung wie bei der Bestrahlung) ε_{260} wurde aus der Absorption bei 260 nm und der Konzentration nach dem Beer-Lambert-Gesetz berechnet. Die aus den bereinigten Peakflächen nach Gleichung 4.1 berechneten $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte aus zwei Experimenten betragen 1.26 und 1.30 (Mittelwert 1.28, gerundet auf 1.3).

Der Einzelstrang ss1 wurde mit dem entsprechenden Poly-T-Strang mit eingebautem Guanosin anstatt Pyren verglichen (s. Tab. 4.2).^[22, 28] Erstaunlich ist, dass Pyren trotz wenig kleinerem Oxidationspotential für einen stark effizienteren Elektronentransfer verantwortlich ist. Dieses

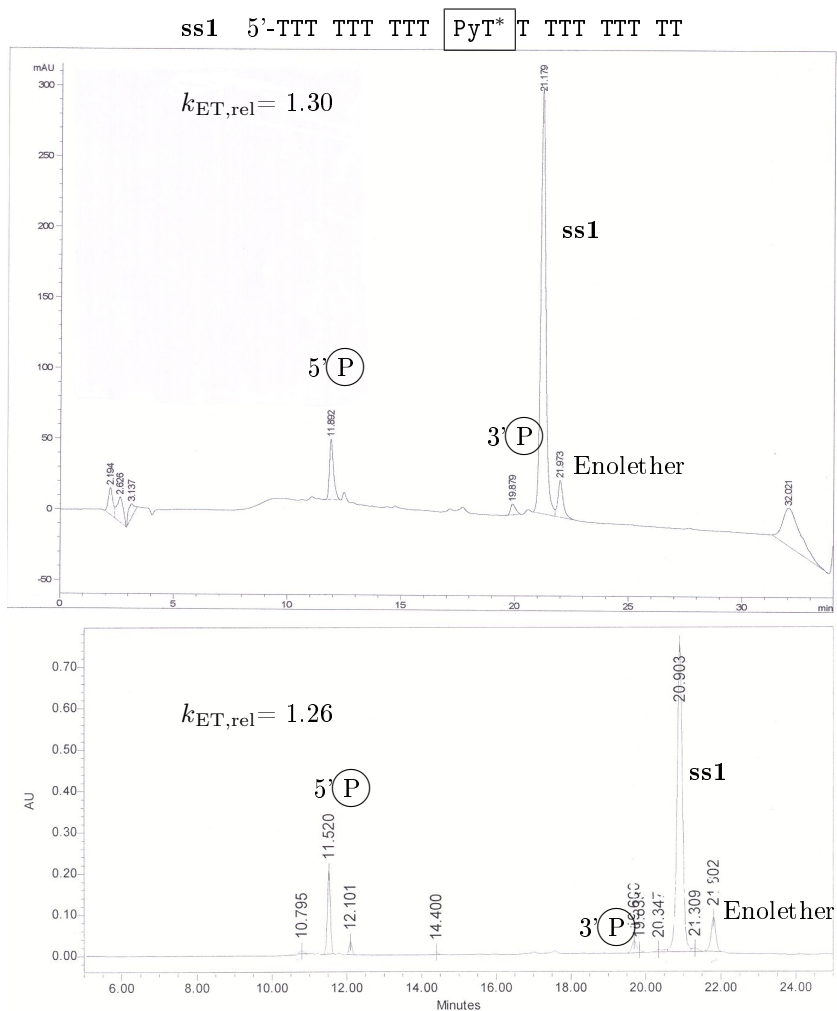
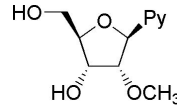


Abbildung 4.1: HPLC-Chromatogramme bei 260 nm nach der Bestrahlung von ss1. Die Photoprodukte 5'P, 3'P und Enolether sowie das Edukt wurden mit MALDI-ToF-MS nachgewiesen. Das obere wurde mit HP 1050 Series und das untere mit Waters Alliance 2690 Separation Module aufgenommen.

Nucleobase	ε_{260}^a
Guanin ^[64]	11.5
Adenin ^[64]	15.4
Cytosin ^[64]	7.4
Thimin ^[64]	8.7
Pyren ^b	1.4

^ain $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

^b ε_{260} von Pyren wurde mit dem Diol **1** bestimmt.



Diol **1**

Tabelle 4.1: Inkrementwerte, nach denen ε_{260} der einzelnen Stränge berechnet wurden.

Name	Sequenz (5'-3')	$k_{\text{ET,rel}}$
ss1	TTT TTT TTT TTT	1.3
	TTT TTT TTT TTT	0.33

Tabelle 4.2: Das Einzelstrang-Experiment mit Pyren (Strang ss1) im Vergleich zum analogen Experiment mit Guanosin^[22,28]. Die Schlüsselsequenzen sind eingerahmt.

Bild ändert sich jedoch beim Doppelstrang.

4.2.2 Doppelstrang ds(1-2)

Bei den Doppelstrang-Experimenten wurde zuerst der Einzelstrang **ss1** mit seinem Gegenstrang **ss2** hybridisiert. Das ergibt den Poly-T•Poly-A-Doppelstrang **ds(1-2)**. Wie im Abschnitt 3.1.1 erwähnt, wurde in der Doppelhelix gegenüber von Pyren eine abasische Stelle (Ab) eingebaut (Abb. 4.2). In dieser Abbildung ist auch die unmittelbare Umgebung des Pyren-Nucleotides gezeigt.

Das HPLC-Chromatogramm nach der Bestrahlung sieht man in Ab-

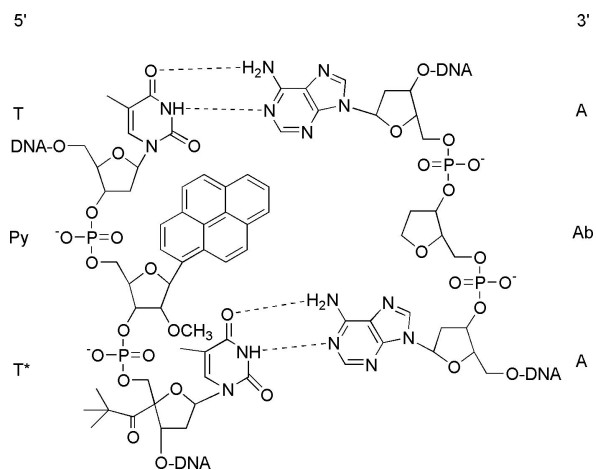


Abbildung 4.2: Die zentrale Sequenz beim ds(1-2): Pyren und eine abasische Stelle (Ab) ersetzen ein natürliches Basenpaar in der Doppelhelix.

bildung 4.3. Die fünf Thymidine, die je an das 5'- und 3'-Ende des Gegenstranges **ss2** synthetisiert wurden, haben zwei Gründe: Erstens wird durch die Thymidine die Stabilität des Doppelstrangs vergrössert, weil sie über den anderen Strang hinüberklappen und so sicherstellen, dass am Rand des Doppelstranges kein Spalt zwischen den beiden Strängen auftritt. Der zweite Grund findet man im Chromatogramm. Zwei Thymidine hätten für den oben beschriebenen Effekt gereicht, jedoch ist bei zwei Thymidine die Retenzionszeit des **ss2** gleich gross wie des 5'Ⓟ. Durch die Verlängerung der Sequenz des **ss2** konnte die Retenzionszeit vergrössert werden, so dass 5'Ⓟ und **ss2** gut getrennt werden konnten.

Der $k_{\text{ET,rel}}$ -Wert des **ds(1-2)** wurde wie in Abschnitt 4.2.1 berechnet: Nach der Isolation der Peaks wurden die gemessenen mit den berechneten Massen verglichen, so dass die Peaks identifiziert werden konnten. Die mit den Extinktionskoeffizienten bereinigten Peakflächen lieferten nach Gleichung 4.1 einen $k_{\text{ET,rel}}$ -Mittelwert von 0.33, gerundet auf 0.3. Die einzelnen Experimente ergaben $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte von 0.32, 0.28 und 0.38.

Dieser Wert ist unerwartet klein und eine Erklärung wird im nächsten Abschnitt (4.2.3) gegeben.

Bei dieser Sequenz wird beispielhaft gezeigt, dass ohne UV-Licht die DNA intakt bleibt (Abb. 4.4). Diese Kontrolle wurde bei jeder Sequenz durchgeführt und zeigt einfach die Einzelstränge, aus denen der Doppelstrang hergestellt wurde.

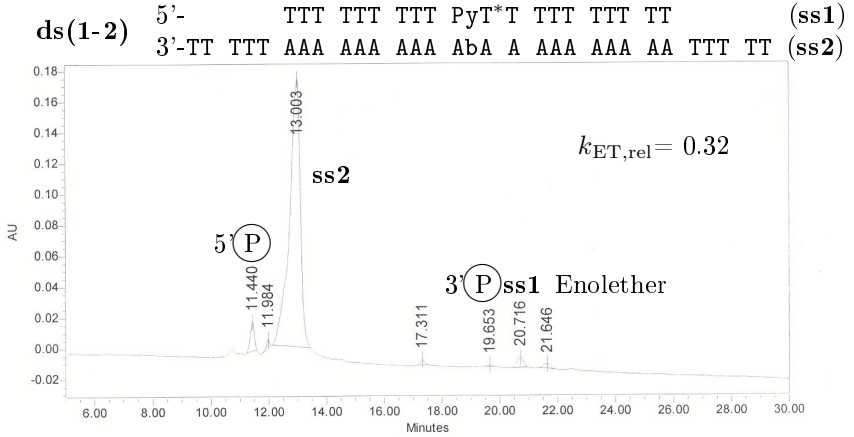


Abbildung 4.3: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm *nach* der Bestrahlung von ds(1-2). Die Photoprodukte 5'(P), 3'(P) und Enolether sowie die Edukte ss1 und ss2 wurden mit MALDI-ToF-MS nachgewiesen.

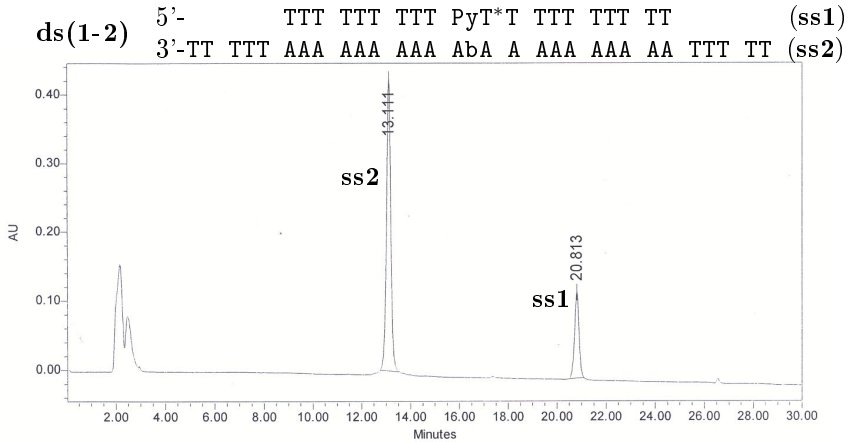


Abbildung 4.4: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm *vor* der Bestrahlung von ds(1-2). Die DNA bleibt intakt und man sieht die beiden Einzelstränge.

Name	Sequenz (5'-3') (3'-5')	$k_{\text{ET,rel}}$	T_{m} [°C]
ds(1-2)	TTT TTT TTT PyT* ^a T TTT TTT TT AAA AAA AAA AbA A AAA AAA AA ^a	0.3	34.9
ds(3-4)	TGC ATC ATPy T*TT ATC AGA GC ACG TAG TAAb A AA TAG TCT CG ^a	0.9	50.7
ss1	TTT TTT TTT PyT* ^a T TTT TTT TT	1.3	

^aDie je 5 überhängenden Thymidine an beiden Enden wurden übersichtshalber nicht gezeichnet.

Tabelle 4.3: Vergleich eines Poly-T•Poly-A-Stranges **ds(1-2)** mit einem gemischten Strang **ds(3-4)** und einem Poly-T-Strang **ss1**.

4.2.3 Doppelstrang **ds(3-4)**

Nachdem der ET im Poly-T-Strang im Einzelstrang effizient, im Doppelstrang jedoch nicht so effizient war, wurde untersucht, wie sich ein Doppelstrang **ds(3-4)** mit allen vier Nucleobasen verhält.

Wie im HPLC-Chromatogramm zu sehen ist (Abb. 4.5), stieg die Effizienz des ET bez. **ds(1-2)** auf $k_{\text{ET,rel}} = 0.86$, gerundet auf 0.9. Dieser Wert ist der Mittelwert aus zwei Versuchen mit $k_{\text{ET,rel}} = 0.79$ und $k_{\text{ET,rel}} = 0.92$. Das Vorgehen für das Bestimmen des $k_{\text{ET,rel}}$ -Wertes ist selbstverständlich dasselbe wie im Abschnitt 4.2.1 beim Einzelstrang **ss1** beschrieben. Bei **ds(3-4)** waren die berechneten Massen (in g/mol) 3107 für 5'(**P**), 2875 für 3'(**P**), 3081 für Enolether, 6272 für **ss3** und 9058 für **ss4**.

Da Pyren nicht nur bei 260 nm, sondern auch bei 346 nm absorbiert, wurde als Kontrolle das Chromatogramm zusätzlich bei 346 nm aufgenommen. Beispielhaft wird es beim **ds(3-4)** gezeigt (Abb. 4.6). Wie erwartet werden von den anwesenden Oligonucleotiden nur die pyrenhaltigen (3(**P**), **ss3** und Enolether) detektiert. Da der Extinktionskoeffizient des Pyrens bei 346 nm viel kleiner als des gesamten Oligonucleotids bei 260 nm ist, ist diese Detektion viel unempfindlicher als die Detektion bei 260 nm. So wurde diese Methode einfach als Kontrolle genutzt.

Der $k_{\text{ET,rel}}$ -Wert des Doppelstrangs **ds(1-2)** wird jetzt mit dem von

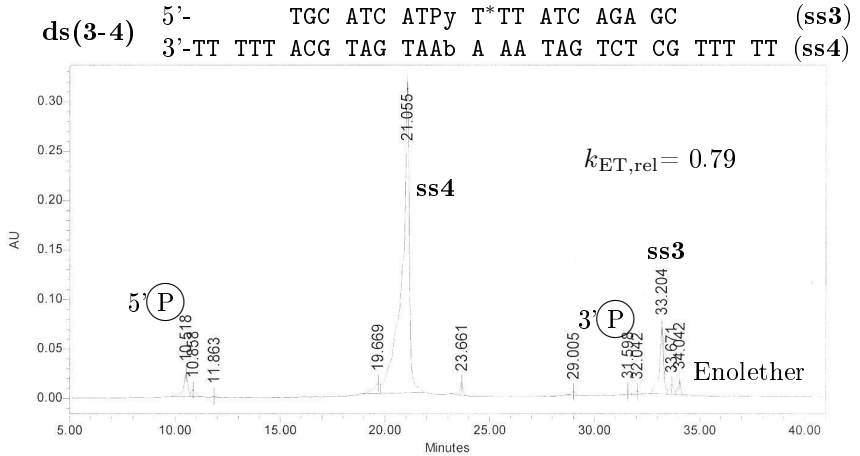


Abbildung 4.5: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von **ds(3-4)**.

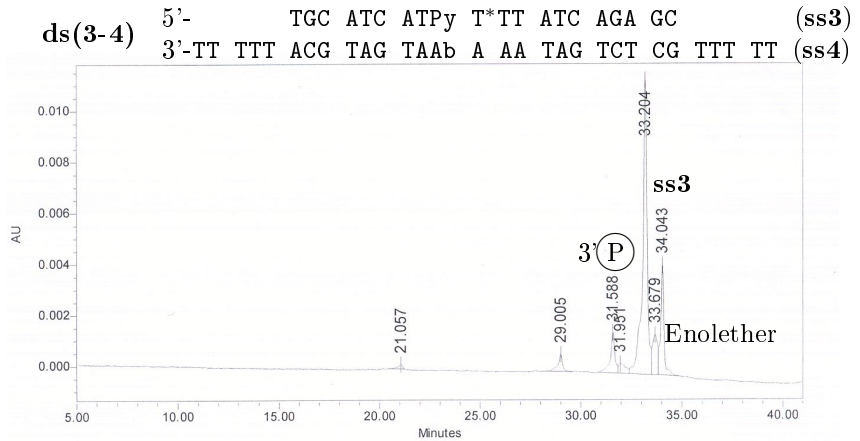


Abbildung 4.6: HPLC-Chromatogramm bei 346 nm nach der Bestrahlung von **ds(3-4)**. Von den anwesenden Oligonucleotiden werden nur die Pyrenhaltigen detektiert.

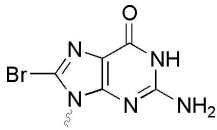
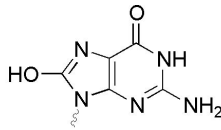
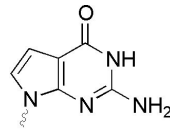
8-Bromoguanin (G^{Br})8-Oxoguanin (G^{oxo})7-Deazaguanin (G^{Z})

Abbildung 4.7: Die Elektronendonoren, mit denen Pyren verglichen wird.

ds(3-4) und von **ss1** verglichen (s. Tab. 4.3).

Dabei fällt auf, dass $k_{\text{ET,rel}}$ im **ds(1-2)** bezüglich **ss1** stark abnimmt, während im **ds(3-4)** bez. **ss1** praktisch gleich bleibt. Den Blick auf die Schmelztemperatur (T_m) gerichtet, sehen wir, dass **ds(1-2)** ungewöhnlich instabil ist. Dies ist ein Hinweis, dass eine lokale Verzerrung der DNA-Struktur beim Pyren auftritt und somit auch das Pyren in einem ungünstigen Winkel zum Radikalkation stehen könnte, um wechselwirken zu können. In Poly-T•Poly-A-DNA-Strukturen haben die Nucleobasen eine sehr hohe Neigung bez. der Längsachse.^[3, 65] Durch das Pyren wird diese besondere Struktur aufgebrochen und wird damit instabil und nicht effizient beim Elektronentransfer.

Der Doppelstrang **ds(3-4)** eignet sich zum Vergleichen von Pyren mit anderen Elektronendonoren wie Guanin, 8-Bromoguanin (G^{Br}), 8-Oxoguanin (G^{oxo}) und 7-Deazaguanin (G^{Z})^[28, 66] (Strukturen s. Abb. 4.7). In der Tab. 4.4 sind die Sequenzen bis auf den Elektronendonator identisch, das heisst der Donor und der Akzeptor sind direkt benachbart. Die Elektronendonoren verhalten sich, wie man es aufgrund des Oxidationspotentials erwartet: Pyren ist ein bisschen schneller als Guanin, jedoch langsamer als die Guanin-Derivate.

Name	Donor ^a	$k_{\text{ET,rel}}$	Ionisationsenergie ^b des Donors [eV]	Oxidationspotential ^c des Donors [V]
ds(3-4)	Py	0.9		1.49 ^[50] / 1.44 ^[51]
	G ^[28]	0.77	6.40	1.49 ^[52]
	G ^{Br[66]}	1.34	6.45	
	G ^{oxo[66]}	1.95	6.19	
	G ^{Z[66]}	12.61	5.99	

^aDie gesamte Sequenz siehe in der Tabelle 4.3 oder im Anhang B.

^bBerechnet als Basenpaar in der DNA nach der UB3LYP/6-31G**Methode.^[66]

^cWerte aus der Tabelle 3.2 übernommen.

Tabelle 4.4: Vergleich des Pyrens mit anderen Elektronendonoren.
Die Stränge sind bis auf den Donor identisch.

4.3 Experimentelle Bestimmung des β -Wertes

4.3.1 Doppelstränge ds(5-4) und ds(6-7)

Die Bestimmung des β -Wertes ist gleichbedeutend mit der Untersuchung der Distanzabhängigkeit. Deshalb werden neben dem $k_{\text{ET,rel}}$ -Wert von **ds(3-4)** weitere $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte benötigt, deren Doppelstränge einen sich vergrößernden Abstand zwischen Pyren und T* aufweisen. Diese Bedingung ist in den Doppelsträngen **ds(5-4)** (Abb. 4.8) und **ds(6-7)** (Abb. 4.9) realisiert. Während in **ds(5-4)** ein Thymin zwischen Pyren und T* liegt, sind es in **ds(6-7)** deren zwei.

Der $k_{\text{ET,rel}}$ -Mittelwert von 0.26 (gerundet auf 0.3) bei **ds(5-4)** besteht aus drei Experimenten, deren $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte 0.24, 0.27 und 0.26 sind. Die berechneten Massen in g/mol, die für die Photoprodukte und Edukte nachgewiesen wurden, betragen für **ds(5-4)**: 2803 für 5(**P**), 3179 für 3'(**P**), 3385 für Enolether, 6272 für **ss5** und 9058 für **ss4**.

Der $k_{\text{ET,rel}}$ -Mittelwert von 0.03 bei **ds(6-7)** besteht aus zwei Experimenten, deren $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte 0.039 und 0.022 betragen. Die berechneten Massen in g/mol, die für die Photoprodukte und Edukte nachgewiesen wurden, betragen für **ds(6-7)**: 2803 für 5'(**P**), 3170 für 3'(**P**), 3376 für Enolether, 6263 für **ss6** und 9067 für **ss7**. Der Elektronentransfer ist bei

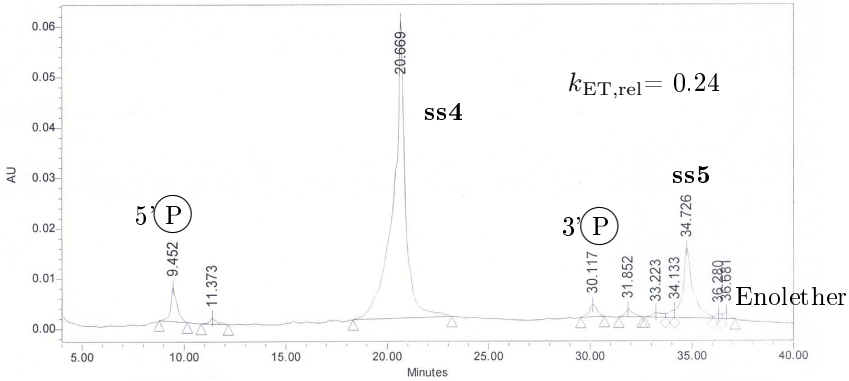
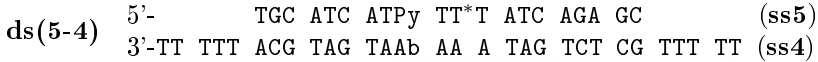


Abbildung 4.8: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von **ds(5-4)**.

ds(6-7) so schwach, dass knapp oberhalb des Detektionslimits gearbeitet wurde. Deshalb weisen die $k_{ET,rel}$ -Werte so eine grosse Streuung auf und der Mittelwert ist mit einem grossen Fehler behaftet.

Der Vergleich der Doppelstränge **ds(5-4)** und **ds(6-7)** mit Doppelsträngen mit anderen Elektronendonoren (G , G^{Br} , G^{oxo} und G^Z)^[28, 66] zeigt überraschendes Verhalten des Pyrens (Tab. 4.5). Pyren weist im Gegensatz beim Vergleich mit **ds(3-4)** (Tab. 4.4) den effizientesten Elektronentransfer auf, sogar noch effizienter als 7-Deazaguanosin, dessen Oxidationspotential am niedrigsten ist. Die $k_{ET,rel}$ -Werte der Doppelstränge mit eingebauten Pyren erreichen das Zehnfache der Doppelstränge mit Elektronendonoren mit ähnlichem Oxidationspotential.

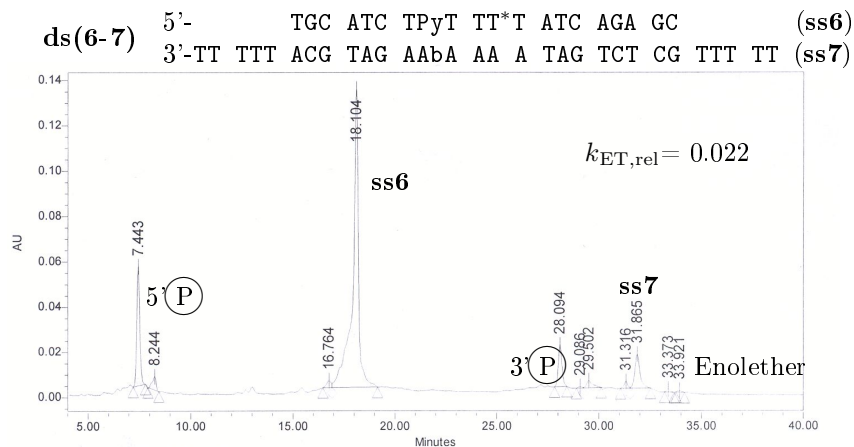


Abbildung 4.9: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von ds(6-7).

Name	Sequenz (5'-3') (3'-5')	Donor	$k_{ET,rel}$
ds(5-4)	TGC ATC ATPy TT*T ATC AGA GC	Py	0.3
	ACG TAG TAAb AA A TAG TCT CG ^a	G	0.012
		G ^{Br}	0.011
		G ^{oxo}	0.046
		G ^Z	0.193
ds(6-7)	TGC ATC TPyT TT*T ATC AGA GC	Py	0.03
	ACG TAG AAbA AA A TAG TCT CG ^a	G	0.003

^aDie je 5 überhängenden Thymidine an beiden Enden wurden übersichtshalber nicht gezeichnet.

Tabelle 4.5: Vergleich des Pyrens mit anderen Elektronendonoren.^[28,66] Die Stränge sind bis auf den Donor identisch.

4.3.2 β -Plot

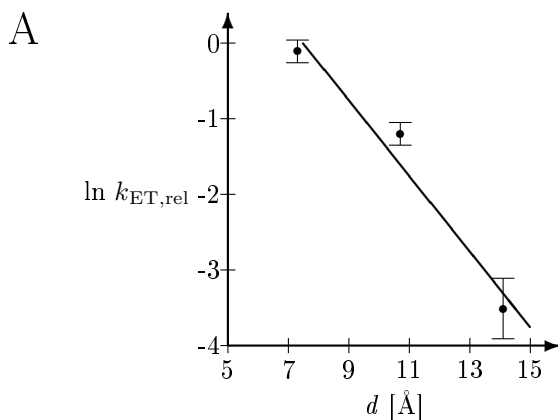
Durch Vereinfachen der Marcus-Levich-Jortner-Gleichung (Gleichung 2.6 auf S. 21) erhält man folgende Gleichung, in der die Beziehung des β -Wertes zu den physikalischen Grössen Geschwindigkeitskonstante k_{ET} und Distanz d zwischen Akzeptor und Donor hervorgehoben ist:

$$\ln k_{\text{ET}} \propto -\beta \cdot d \quad (4.3)$$

Nach der Betrachtung dieser Gleichung ist die Strategie zur Bestimmung des β -Wertes offensichtlich: Durch die Veränderung der Distanz d des Pyrens zur Pivaloylgruppe in der DNA und Messen und Berechnen der jeweiligen $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte, wurden verschiedene ($d/k_{\text{ET,rel}}$)-Wertepaare erhalten. Durch das Auftragen von $\ln k_{\text{ET,rel}}$ gegen d in ein sog. β -Plot, liegen die Punkte nach der Theorie auf einer Gerade. Die negative Steigung der Regressionsgerade ist der β -Wert. Dieses Verfahren wurde mit den Doppelsträngen **ds(3-4)**, **ds(5-4)** und **ds(6-7)** in Abbildung 4.10 verwirklicht. Für den β -Wert wurde 0.5 \AA^{-1} erhalten.

Die Distanz von 7.3 \AA im **ds(3-4)** wurde aus früherer Berechnung für $\text{G}^{+\bullet}$ verwendet.^[22,28] Bei dieser Berechnung wurde von einem bestimmten Radikalzentrum des $\text{G}^{+\bullet}$ ausgegangen. Als Anfangswert darf die Distanz von 7.3 \AA auch für andere Nucleobasen verwendet werden, weil bei der β -Berechnung nicht die absoluten Distanzen eine Rolle spielen, sondern die Unterschiede der Distanzen. Da mit B-DNA gearbeitet wurde, wurde für jedes weitere eingebaute Thymidin die Ganghöhe von 3.4 \AA dazugezählt. So erhielt man die Distanzen von 7.3 \AA im **ds(3-4)**, 10.7 \AA im **ds(5-4)** und 14.1 \AA im **ds(6-7)**.

Der β -Wert von 0.5 \AA^{-1} liegt unter dem Bereich der bisher veröffentlichten Werte mit derselben Methode von 0.70 \AA^{-1} ^[22,30] und 1.0 \AA^{-1} ^[27] mit Guanin als Elektronendonator. Dieser Effekt lässt sich mit der Lösungsmittel - Reorganisationsenergie erklären. Wie in Kapitel 2, Marcus Theorie, erwähnt wird, ist k_{ET} u.a. von der Reorganisationsenergie λ abhängig. λ setzt sich aus der inneren Reorganisationsenergie λ_i und der äusseren Reorganisationsenergie λ_0 (Lösungsmittel-Reorganisationsenergie) zusammen.^[33] In diesem Zusammenhang beschränken wir uns auf λ_0 . In erster Näherung wird in Gleichung 4.3 angenommen, dass λ_0 über die



B

Name	Schlüssel- sequenz (5'-3')	$k_{\text{ET,rel}}$	$\ln k_{\text{ET,rel}}$	d [Å]
ds(3-4)	PyT*	0.9	-0.11	7.3 ^[22, 28]
ds(5-4)	PyTT*	0.3	-1.20	10.7
ds(6-7)	PyTTT*	0.03	-3.51	14.1

Abbildung 4.10: A: β -Plot: Die logarithmierten $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte werden gegen die Distanz d aufgetragen. Der β -Wert entspricht der negativen Steigung der Regressionsgerade. Die eingezeichneten Fehler der $\ln k_{\text{ET,rel}}$ -Werte entsprechen den experimentellen Abweichungen. B: Die zugehörige Wertetabelle.

Distanz konstant bleibt. Mit G als Donor wurde berichtet, dass dies nicht der Fall ist.^[66] Bei kurzen Distanzen (unter 10 Å) nimmt λ_0 rasch zu und erreicht bei längeren Distanzen ein Plateau. Dieser Sachverhalt wurde experimentell bestätigt, indem k_{ET} von 6.1 zu 9.5 Å stark abnimmt, aber für den β -Wert mit G^Z als Donor 0.55 Å⁻¹ erhalten wurde, wenn die Distanzen von 9.5 – 16.1 Å für die Berechnung berücksichtigt wurden.^[66] Im Gegensatz zu Guanin und Deazaguanin ist k_{ET} mit Pyren als Donor wahrscheinlich unabhängig von λ_0 . Durch die hydrophobe Struktur des Pyrens und das ausgedehnte π -System, welches das Radikalkation delokalisiert, ändert sich die unmittelbare wasserarme Umgebung kaum, wenn Pyren zum Pyrenradikalkation wird. Somit hat λ_0 kaum einen Einfluss auf den ET und auch auf k_{ET} . Durch die Unabhängigkeit von λ_0 ist der ET mit Pyren als Donor auch bei kurzen Distanzen nicht so stark distanzabhängig wie mit G als Donor. Deshalb sind die $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte von Pyren bei über 10 Å um das Zehnfache höher als von Guanin und der β -Wert ist kleiner.

4.4 Zusammenfassung

Pyren hat sich beim gemischten Doppelstrang (**ds(3-4)**), bei dem Pyren direkt benachbart zum Akzeptor liegt, gemäss den Erwartungen verhalten. Der $k_{\text{ET,rel}}$ Wert liegt dem Oxidationspotential entsprechend bez. G. Jedoch nicht erwartet wurde der ineffiziente ET beim Poly-T•Poly-A-Doppelstrang (**ds(1-2)**), das durch die spezifischen Tertiärstrukturen des Strangs erklärt werden kann. Unerwartet ist auch der ET bei längerer Distanz (10.7 Å im **ds(5-4)** und 14.1 Å im **ds(6-7)**, s. Tab 4.5), dessen $k_{\text{ET,rel}}$ -Wert um das zehnfache höher liegt als bei den vergleichbaren Donoren. Dadurch ist der aus den Werten berechnete β -Wert von 0.5 Å⁻¹ kleiner. Dieser Effekt wurde mit der Unabhängigkeit der äusseren Reorganisationsenergie λ_0 mit Pyren als Donor erklärt.

Wegen einer Konkurrenzreaktion, die im Kapitel 6, pyreninduzierter DNA-Strangbruch, ausführlich beschrieben wird, sind die $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte zu klein. Der Fehler ist nicht einfach abzuschätzen; er wird wahrscheinlich bei 10 – 20 % liegen.

Kapitel 5

4-Pivaloylierte abasische Stelle als Radikalvorläufer

Im Doppelstrang **ds(3-4)** beträgt der Abstand zwischen Pyren und Pivaloylgruppe 7.3 Å.^[22,28] Da die abasische Stelle gegenüber Pyren eingebaut wird (Abb. 5.1), kann mit einer 4-pivaloylierte abasische Stelle (**Ab***) die Distanz zwischen Pyren und Pivaloylgruppe verkleinert werden. Fügt man das Paar **Py:Ab*** als Basenpaar in ein B-DNA-Modell, so erhält man einen Abstand von 6.0 Å. Dieser wurde zwischen dem 4-C-Atom der 4-pivaloylierte abasischen Stelle (Radikalzentrum) und des 9-C-Atom des Pyrens (nächstes C-Atom) berechnet.

Die aus **ds(3-4)** entwickelten Doppelstränge **ds(8-9a)** und **ds(8-9b)** wurden synthetisiert und bestrahlt (Abb. 5.2 und 5.3). Der Unterschied zwischen den beiden Strängen besteht in der Struktur des **Ab***: Im Strang **ss9a** wurde das Enantiomer a eingebaut, während im **ss9b** das Enantiomer b eingesetzt wurde. Die Stereozentren an den Positionen 3 und 4 sind zwischen Enantiomer a und Enantiomer b verschieden. Die Bezeichnungen a und b wurden in der **Ab***-Synthese eingeführt (Abschnitt 7.2 ab S. 71).

Der $k_{ET,rel}$ -Mittelwert von **ds(8-9a)** beträgt 0.01 und ist entstanden aus zwei Versuchen mit 0.011 und 0.016. Die nachgewiesenen berechneten

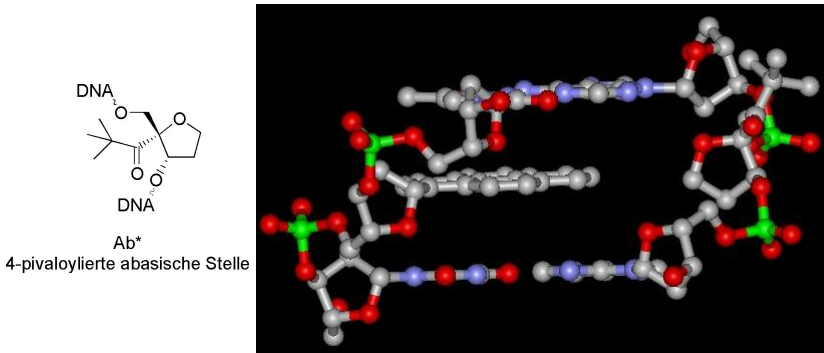


Abbildung 5.1: Ab* in natürlicher Konfiguration in einem Einzelstrang und in einem Doppelstrang. Ab* befindet sich rechts in der Mitte, während sich Pyren leicht links in der Mitte befindet. Der Ausschnitt wurde mit B-DNA-Parameter von Stanislav Ivan gezeichnet.

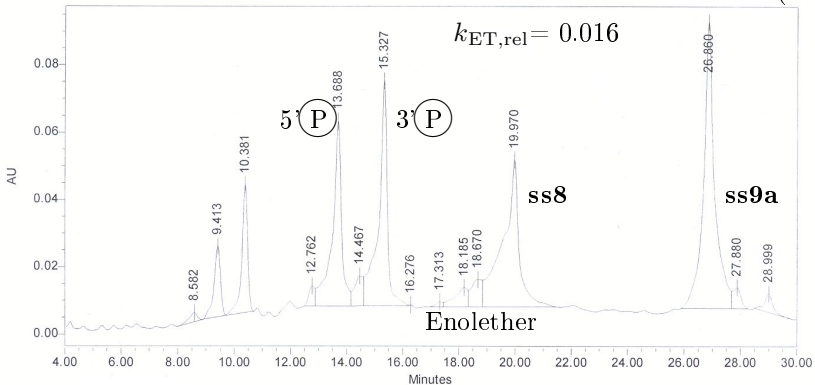
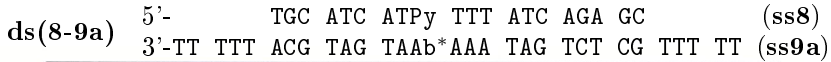


Abbildung 5.2: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von ds(8-9a).

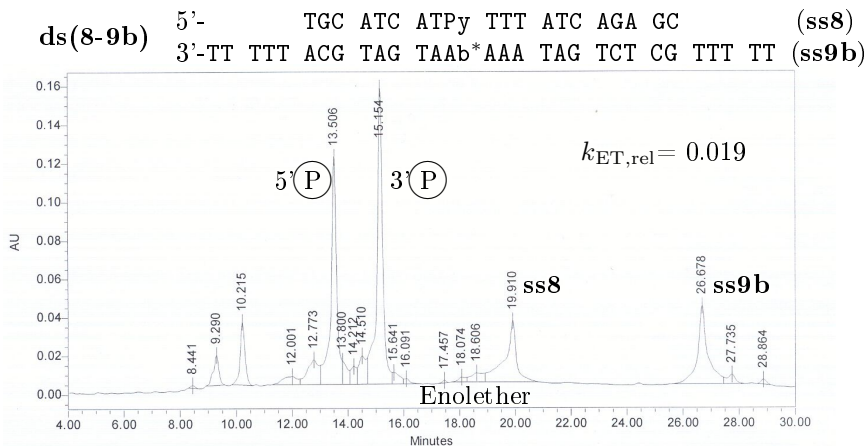


Abbildung 5.3: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von **ds(8-9b)**.

Massen (in g/mol) betragen bei **ds(8-9a)** und **ds(8-9b)** 4035 für 5'(P), 4957 für 3'(P), 5023 für Enolether, 6188 für **ss8** und 9142 für **ss9a** und **ss9b**.

Der $k_{ET,rel}$ -Mittelwert von **ds(8-9b)** beträgt 0.02 und ist entstanden aus drei Versuchen mit 0.021, 0.014 und 0.019. Bei diesen beiden Strängen tauchten diesselben Probleme auf wie bei **ds(6-7)**: Durch den schwachen ET kann die Peakfläche des Enolethers kaum berechnet werden, was einen grossen Fehler in der $k_{ET,rel}$ -Berechnung verursacht.

Trotz des kaum stattfindenden ET kann beobachtet werden, was mit Ab* geschah. Durch die nachgewiesene 5'(P)-Bildung kann kein Zweifel bestehen, dass das 4'-C-Radikal und das entsprechende Radikalkation entstand. Auch durch die 3'(P)-Bildung ist klar, dass die entstandenen Radikalkationen vorwiegend mit Wasser reagierten.

Neben diesen beiden Sequenzen wurde eine dritte synthetisiert (**ds(10-11)**), in der sich neben Pyren ein weiterer Elektronendonator G befindet (Abb. 5.4). Mit Guanin wurde kontrolliert, ob sich die Ineffizienz des ET in **ds(8-9a)** und **ds(8-9b)** auf die gegenüberliegende und damit besondere Position des Pyrens bez. Ab* begründet. Wie in Abbildung 5.4

ds(10-11) 5'- TGC ATC ATPy CTT ATC AGA GC (ss10)
 3'-TT TTT ACG TAG TAAb*GAA TAG TCT CG TTT TT (ss11)

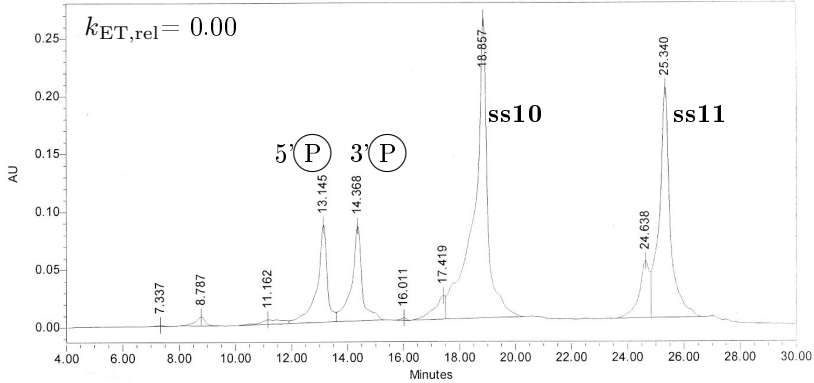


Abbildung 5.4: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von ds(10-11).

gezeigt wird, ist der ET trotz des zusätzlichen Donors G auch in ds(10-11) ineffizient.

Das ET-Produkt Enolether wurde im Doppelstrang ds(10-11) während der Bestrahlung zu wenig gebildet und konnte in zwei Experimenten nicht nachgewiesen werden. Somit beträgt der $k_{ET,rel}$ -Wert 0.00. Die Massen der anderen Produkte und Edukte betragen in g/mol: 4035 für 5'P, 4957 für 3'P, 6173 für ss10 und 9158 für ss11.

Name	Sequenz (5'-3') (3'-5')	Verwendetes Ab*-Enantiomer ^a	$k_{\text{ET,rel}}$
ds(8-9a) ^b	TGC ATC ATPy TTT ATC AGA GC	a	0.01
	ACG TAG TAAb*AAA TAG TCT CG ^c		
ds(8-9b) ^b	TGC ATC ATPy TTT ATC AGA GC	b	0.02
	ACG TAG TAAb*AAA TAG TCT CG ^c		
ds(10-11)	TGC ATC ATPy CTT ATC AGA GC	a	0.00
	ACG TAG TAAb*GAA TAG TCT CG ^c		

^aDie Bezeichnungen a und b sind aus der Ab*-Synthese (s. Abschnitt 7.2)

^bAb* in **ds(8-9a)** ist das Enantiomer von Ab* in **ds(8-9b)**.

^cDie je 5 überhängenden Thymidine an beiden Enden wurden übersichtshalber nicht gezeichnet.

Tabelle 5.1: $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte von Ab als Radikalvorläufer.*

Die $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte mit den dazugehörigen Sequenzen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Es stellt sich die Frage warum Ab* als Radikalvorläufer ineffizient ist. Da der abasischen Stelle eine Nucleobase fehlt, hat sie mehr Freiheiten, sich in der DNA anzuordnen. Es könnte sein, dass die Konformation von Ab* für den ET sehr ungünstig ist. D.h. die Orbitale des Radikalkations würden dann senkrecht zu den Donororbitalen stehen und somit könnte keine Wechselwirkung auftreten und kein ET stattfinden. Dies gilt für beide Enantiomere von Ab* (Vergleiche **ds(8-9a)** mit **ds(8-9b)**) und auch für G als Donor (**ds(10-11)**).

Kapitel 6

Pyreninduzierter DNA-Strangbruch

Die Experimente mit Ab^* als Radikalvorläufer haben ein Phänomen zu Tage gebracht, das in diesem Kapitel erläutert wird. Bei der Bestrahlung des Oligonucleotides **ds(8-9a)** (Sequenz

5' TGC ATC ATP_{Py} TTT ATC AGA GC
3' ACG TAG TAAB*AAA TAG TCT CG) (Abb. 6.1) wurden neben den Wasseradditionsprodukten weitere Photolyseprodukte gefunden. Bei diesem Strangbruch ist Pyren involviert.

6.1 Reaktionsbeschreibung

Sehen wir zuerst, was eigentlich passiert (s. Schema 6.1): Unter gewöhnlichen UV-Bestrahlungsbedingungen¹ wird die DNA an der 5'- und der 3'-Position des Pyren-Nucleotides gespalten, so dass ein 3'-Phosphat^{Py} ($3(\text{P}^{\text{Py}})$), ein 5'-Phosphat^{Py} ($5(\text{P}^{\text{Py}})$) und ein Pyrenderivat entsteht. Die beiden Phosphatprodukte konnten durch MALDI-Tof-MS-Messungen nach-

¹1 nMol Doppelstrang-DNA in 200 μl einer anaeroben wässrigen Lösung mit 20 mM Natriumzitatrat, pH 5,0, 100 mM NaCl, 15 °C, 10 Min., 320 nm cut-off-Filter.

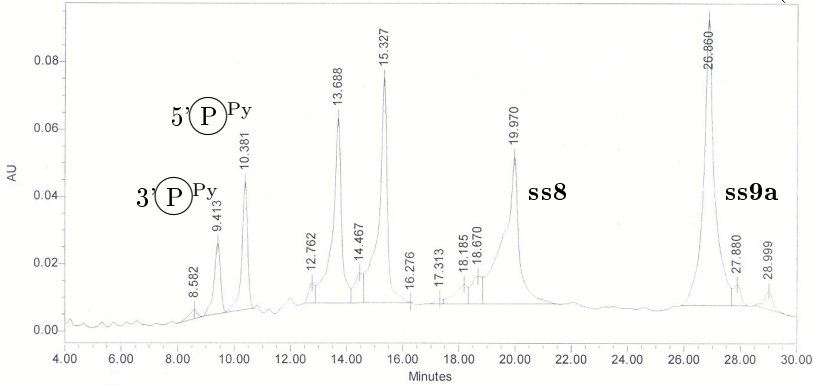
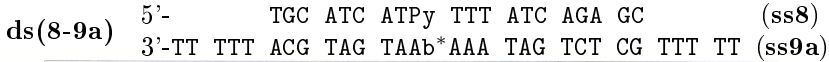


Abbildung 6.1: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von **ds(8-9a)**.

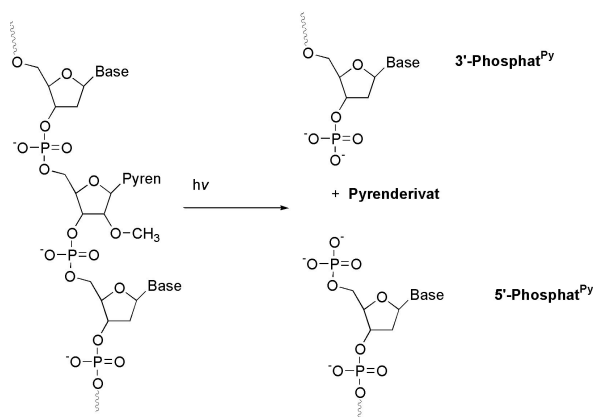
gewiesen werden. Über die Struktur des Pyrenderivates kann man nur spekulieren.

Dieses Phänomen wurde dann systematisch untersucht. Dazu wurde neben dem genauen Betrachten des Chromatogramms von **ds(8-9b)** auch die Doppelstränge **ds(8-4)**, **ds(10-12)**, **ds(13-14)**, **ds(15-16)**, **ds(17-18)** und **ds(19-20)** synthetisiert und bestrahlt (Tab. 6.1). Die Photolyseprodukte $3'(\text{P})\text{Py}$ und $5'(\text{P})\text{Py}$ wurden als Ausbeute bez. des eingesetzten Strangs folgendermassen berechnet (**ssPy** bezeichnet den ungespaltenen pyrenhaltigen Einzelstrang):

$$\text{Ausbeute}(3'(\text{P})\text{Py}) = \frac{3'(\text{P})\text{Py}}{3'(\text{P})\text{Py} + \text{ssPy}} \quad (6.1)$$

$$\text{Ausbeute}(5'(\text{P})\text{Py}) = \frac{5'(\text{P})\text{Py}}{5'(\text{P})\text{Py} + \text{ssPy}} \quad (6.2)$$

Wie in den vorangehenden Kapiteln wurden die Extinktionskoeffizienten bereinigten Peakflächen für die Berechnung der Ausbeute verwendet.



Schema 6.1: Pyreninduzierter DNA-Strangbruch durch UV-Bestrahlung. Die Struktur des Pyrenderivats ist unbekannt.

Ausser bei **ds(8-4)** (Abb. 6.2) wurde bei den neu synthetisierten Sequenzen keine pyreninduzierten Photolyseprodukte gefunden. Das bedeutet, dass diese Reaktion selektiv abläuft. Nur bei der Sequenz 5'-TPyT (**ds(8-9a)**, **ds(8-9b)** und **ds(8-4)**) wird der Strang gebrochen. Die Pivaloylgruppe verbessert die Ausbeute, ist aber grundsätzlich nicht notwendig.

6.2 Mechanismus

Um einen Mechanismus zu formulieren, geben uns Erkenntnisse von Netzel^[59–61] und Wagenknecht^[46, 62] Anhaltspunkte. Kovalent an Uracil gebundenes Pyren (Abb. 3.6) wurde mit Laserpulsen bei 340 nm bestrahlt. Das angeregte Pyren initiierte einen Elektronentransfer und ein Pyren-Radikalkation und ein Uracil-Radikalanion wurden erhalten (Schema 3.2 auf S. 31).

Eine Anregung des Pyrens mit anschliessender ET zum nächstgele-

Name	Sequenz (5'-3') (3'-5')	Ausbeute des 5'(P) ^{Py} in %	Ausbeute des 3'(P) ^{Py} in %
ds(8-9a) ^a	TGC ATC ATPy TTT ATC AGA GC ACG TAG TAAb* AAA TAG TCT GC ^b	28	26
ds(8-9b) ^a	TGC ATC ATPy TTT ATC AGA GC ACG TAG TAAb* AAA TAG TCT CG ^b	40 – 46	33 – 37
ds(8-4)	TGC ATC ATPy TTT ATC AGA GC ACG TAG TAAb AAA TAG TCT CG ^b	15 – 23	12 – 19
ds(10-12)	TGC ATC ATPy CTT ATC AGA GC ACG TAG TAAb GAA TAG TCT CG ^b	0	0
ds(13-14)	TGC ATC ACPy TTT ATC AGA GC ACG TAG TGAb AAA TAG TCT CG ^b	0	0
ds(15-16)	TGC ATC ACPy CTT ATC AGA GC ACG TAG TGAb GAA TAG TCT CG ^b	0	0
ds(17-18)	TGC ATC AGPy GTT ATC AGA GC ACG TAG TCAb CAA TAG TCT CG ^b	0	0
ds(19-20)	TGC ATC AAPy ATT ATC AGA GC ACG TAG TTab TAA TAG TCT CG ^b	0	0

^aAb* in **ds(8-9a)** ist das Enantiomere von Ab* in **ds(8-9b)**.

^bDie je 5 überhängenden Thymidine an beiden Enden wurden übersichtshalber nicht gezeichnet.

Tabelle 6.1: Sequenzspezifische DNA-Spaltung durch Pyren.

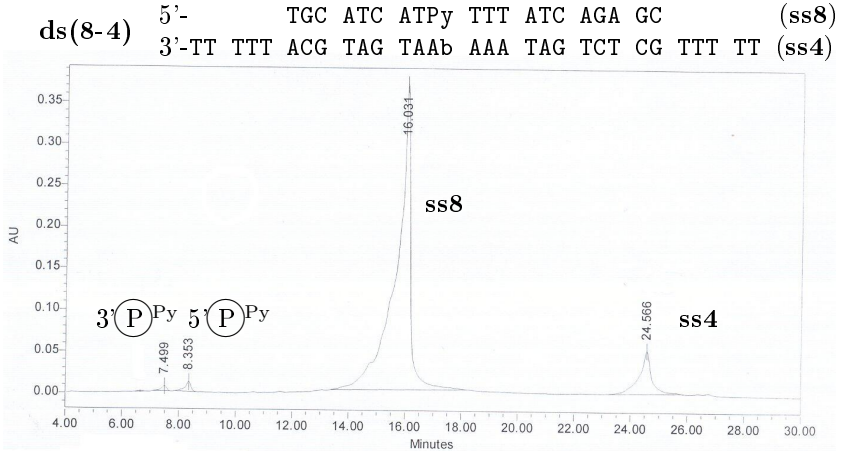


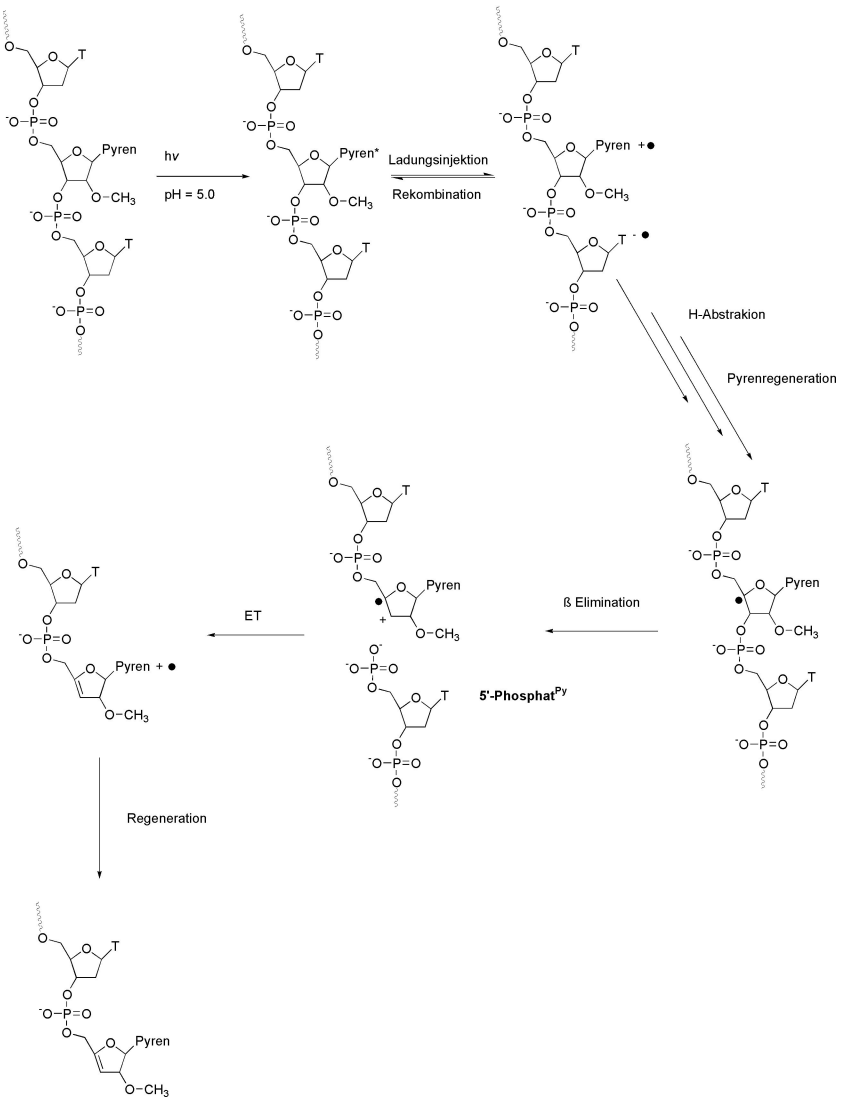
Abbildung 6.2: HPLC-Chromatogramm bei 260 nm nach der Bestrahlung von ds(8-4).

genen Thymin könnte auch in unserem Fall der Anfang einer Reaktionssequenz sein (Schema 6.2). Da bei $\text{pH} = 5.0$ gearbeitet wird, wird im Einzelstrang das protonierte Thymin-Radikalanion erhalten.^[62] Im Doppelstrang bleibt das Radikalanion wahrscheinlich deprotoniert.

Die folgenden Schritte lassen noch Rätsel offen und können möglicherweise mit dem Messen des Fluoreszenzverhaltens des Pyrens aufgeklärt werden. Dabei regeneriert das Pyren-Radikalkation zum Pyren.

Für das Ende der Reaktionssequenz haben wir wieder klare Vorstellungen. Durch eine H-Abstraktion am richtigen C-Atom, wird das 4'-C-Radikal am Pyren-Nucleotid erhalten. Das 4'-C-Radikal spaltet bekannterweise unter β -Elimination die 3'-Phosphatgruppe ab und der DNA-Strang wird das erste Mal gebrochen. Das Radikalkation am Zucker wandert wahrscheinlich zum Pyren und regeneriert zum Pyren.

Für den zweiten DNA-Strangbruch wird wie oben beschrieben noch das verbleibende Thymin reduziert und das H-Atom am Zucker desselben Thymidins abstrahiert.



Schema 6.2: Vorgeschlagener Mechanismus für den pyreninduzierten DNA-Strangbruch.

6.3 Konsequenzen für den pivaloylinduzierten DNA - Strangbruch

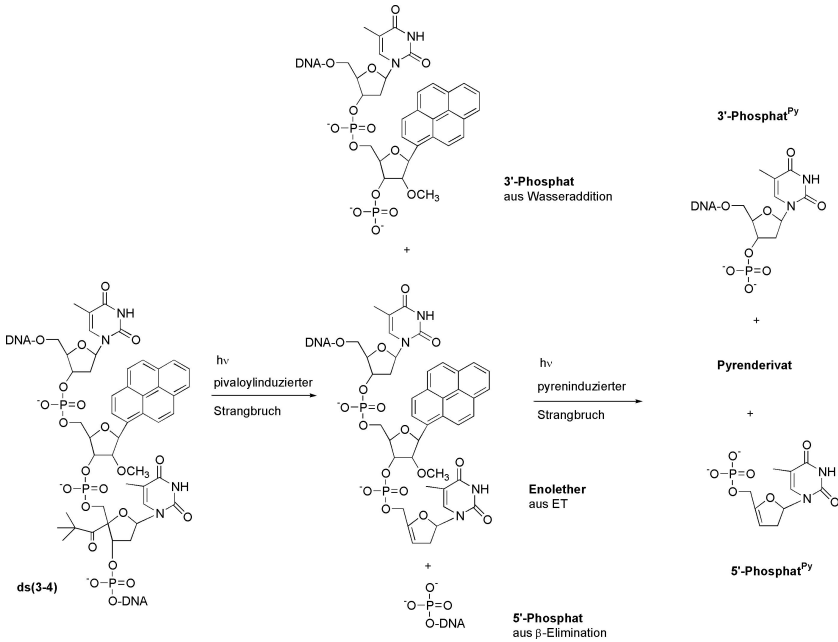
Der pyreninduzierte Strangbruch hat Konsequenzen auf die berechneten $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte in Kapitel 4, Elektronentransfer mit Pyren. Da in diesem Kapitel Sequenzen ausschliesslich mit dem Motiv 5'-TPy-T^(*)-3' verwendet wurden, findet grundsätzlich der pivaloylinduzierte und der pyreninduzierte Strangbruch statt. In Schemen 6.3 und 6.4 werden anhand des Doppelstranges **ds(3-4)** gezeigt, welche Reaktionsmöglichkeiten das System mit den beiden Strangbruchreaktionen hat. Durch die Zersetzung des Enolethers und des 5'-Phosphat^{Py} zum 5'-Phosphat werden mehr 5'-Phosphat und weniger Enolether produziert, als wenn dies nur beim pivaloylinduzierten Strangbruch der Fall wäre.

Da 5'-Phosphat in der folgenden Gleichung (s. Abschnitt 4.1) im Nenner und der Enolether im Zähler liegt und ausserdem der Enolether vom 5'-Phosphat subtrahiert wird, ist der berechnete $k_{\text{ET,rel}}$ -Wert zu klein.

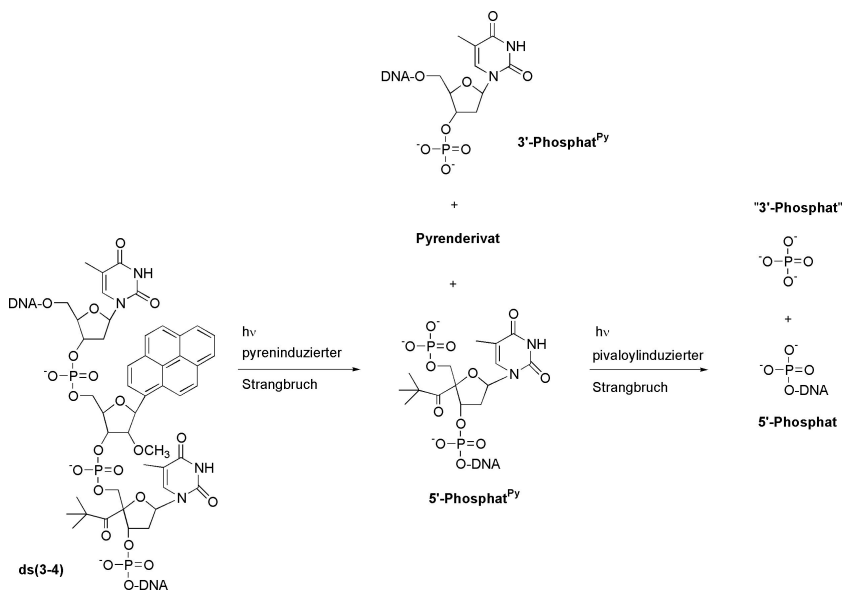
$$k_{\text{ET,rel}} = \frac{[\text{Enolether}]}{[5' \text{ Phosphat}] - [\text{Enolether}]} \quad (6.3)$$

Wie gross der Fehler tatsächlich ist, ist von mehreren Faktoren abhängig. Da der Enolether vom 5'-Phosphat subtrahiert wird, kommt es auf das Verhältnis von Enolether zu 5'-Phosphat an, wie hoch der Fehler liegt. Andererseits spielt die Effizienz der beiden Reaktionen eine bedeutende Rolle. Wenn der pivaloylinduzierte Strangbruch viel effizienter als der pyreninduzierte ist, ist der Fehler marginal. Die Frage ist natürlich auch, ob der pyreninduzierte Strangbruch mit einem Enolether als Substrat stattfindet.

Da der pyreninduzierte Strangbruch bezüglich der Sequenz 5'-TPyT-3' selektiv ist, könnte in der Schlüsselsequenz 5'-APyT*-3' für den pivaloylinduzierten Strangbruch eine Lösung liegen.



Schema 6.3: Ein möglicher Reaktionsweg von **ds(3-4)** während der UV-Bestrahlung: Durch den pivaloylinduzierten Strangbruch entstehen hauptsächlich ein 3'-Phosphat, ein Enolether und ein 5'-Phosphat. Der Enolether kann durch den pyreninduzierten Strangbruch weiterreagieren. Es entstehen ein 3'-Phosphat^{Py}, ein 5'-Phosphat^{Py}, und ein Pyrenderivat. Wegen der Übersicht wurde nur ein Strang des Doppelstrangs gezeichnet.



Schema 6.4: Ein möglicher Reaktionsweg von **ds(3-4)** während der UV-Bestrahlung: Durch den pyreninduzierten Strangbruch entstehen ein 3'-Phosphat^{Py}, ein 5'-Phosphat^{Py}, und ein Pyrenederivat. Das 5'-Phosphat^{Py} kann durch den pivaloylinduzierten Strangbruch weiterreagieren. Es entstehen hauptsächlich ein 5'-Phosphat und ein 3'-Phosphat, das in diesem Fall Phosphat ist. Ein Enolether wird wahrscheinlich infolge des Fehlens eines Donors nicht entstehen. Wegen der Übersicht wurde nur ein Strang des Doppelstrangs gezeichnet.

6.4 Zusammenfassung

Der pyreninduzierte Strangbruch ist bezüglich der Sequenz 5'-TPyT-3' selektiv und ist mit einer Ausbeute von 15 – 46 % ziemlich effizient. Die Ausbeute an 5'(P^{Py}) ist um einen Faktor von ca. 1.2 höher als die an 3'(P^{Py}). Der Mechanismus, der heute nur ansatzweise postuliert wird, könnte diesen Sachverhalt erklären.

Durch den pyreninduzierten Strangbruch würde die Analyse des pivaloylinduzierten Strangbruchs komplizierter. Die $k_{\text{ET,rel}}$ -Werte liegen zu tief. Es muss mit einem geschätzten Fehler von 10 – 20 % ausgegangen werden.

Kapitel 7

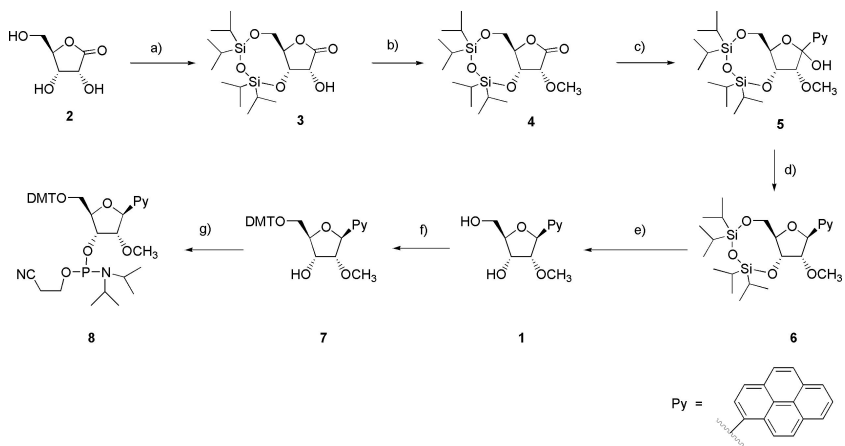
Synthesekonzepte

Der Syntheseweg zum Pyren-Nucleotid (Py), 4-pivaloylierte abasische Stelle (Ab*) und 4'-Pivaloylthymidin (T*) wird in diesem Kapitel beschrieben.

7.1 Pyren-Nucleotid Py

Pyren-Nucleotid wurde wie folgt synthetisiert (Schema 7.1): Das γ -Ribonolacton **2** wird an der 3- und 5-Position zum cyclischen Silylether **3** geschützt. Die 2-Position der Verbindung **3** wird durch Methylierung inaktiviert und man erhält das geschützte Lacton **4**. Zu einer vorbereiteten Lösung von 1-Brompyren und *s*-BuLi wird **4** zugegeben, so dass das Acetal **5** entsteht. Verbindung **5** wird in einem weiteren Schritt zum Ether **6** reduziert. Mit den beiden vorangehenden Schritten wird nur das β -Anomer erhalten. Der Ether **6** wird für die DNA-Synthese vorbereitet: Zuerst wird der Silylether mit Fluorid-Ionen zum **1** gespalten^[70] und danach wird **1** an der 5'-Position zur Verbindung **7** trityliert. An **7** wird an der 3'-Position das Phosphoramidit geknüpft, so dass das Produkt **8** bereit für den Einbau in die DNA ist.

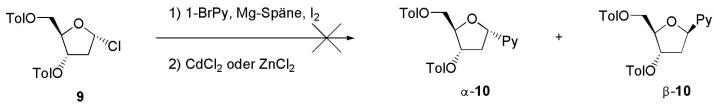
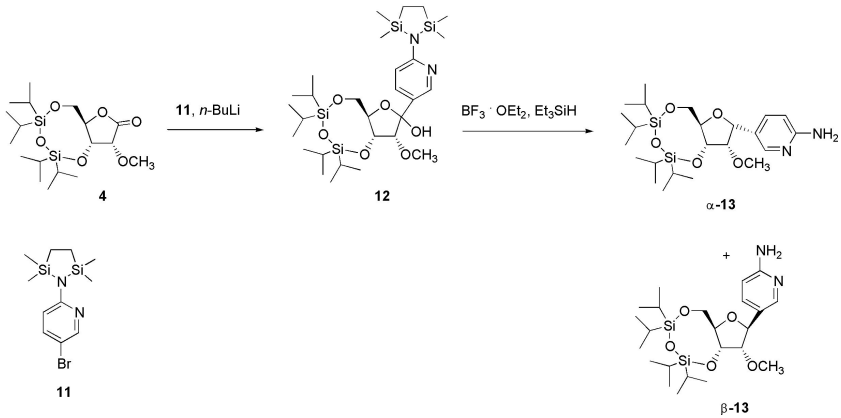
Die grösste Schwierigkeit der Pyren-Nucleotid-Synthese war die Knüpfung der C-C-Bindung zwischen Ribose und Pyren. Die Synthese nach



Schema 7.1: a) TIPDSCl₂, Pyr, 4.5h, 0°C – RT, 20% b) MeI, Ag₂O, 8h, 45°C–55°C, 61% c) *s*-BuLi, 1-BrPy, THF, 5.5h, -78°C d) Et₃SiH, BF₃ · OEt₂, MeCl₂, 5.5h, -78°C, 73% in 2 Schritten e) TBAF · 3H₂O, THF, 2.5h, RT, 97% f) DMTC1, Pyr, DMAP, 24h, RT, 81% g) NCEtOPN(iPr)₂Cl, N(iPr)₂Et, MeCl₂, 2h, RT, 92%.

Kool^[67] mit einer geschützten 2-Desoxyribose und Pyrenylcadmium oder Pyrenylzink-Verbindungen schlug fehl. Auch die kleine Ausbeute in der Synthese nach Woski^[68] konnte bestätigt werden. Schliesslich wurde eine Synthese nach Leumann^[69] mit Aryllithium angewandt (Schema 7.2). Im Unterschied zu Kool wurde ein anderer Aromat (Pyridinderivat **11**) an die Ribose geknüpft. Durch den Wechsel auf Lithium musste eine andere Schutzgruppe und ein Ribosederivat (geschütztes γ -Ribonolacton **4**) anstatt eines Desoxyribosederivat verwendet werden. Der Sauerstoff an der 2-Position ist wichtig für diese Reaktion, da er die Deprotonierung an der 2-Position verhindert. Dieser Weg machte eine Reduktion als zweiten Schritt notwendig. Der Vorteil der Synthese nach Leumann ist, dass vorwiegend β -**13** gebildet wird ($\alpha : \beta = 1 : 10$), während bei der Synthese nach Kool vorwiegend α -**10** erhalten wurde ($\alpha : \beta = \sim 5 : 1$) und durch langwieriges Isomerisieren im sauren Milieu die Ausbeute der gewünschten Verbindung β -**10** verbessert wurde. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass das Lacton **4** über Wochen bei -18°C haltbar ist, während der Chlorzucker **9** in nur wenigen Tage zerfällt.

Die Frage, warum ein Ribosederivat in die DNA eingebaut und nicht die 2'-Position defunktionalisiert wurde, soll hier beantwortet werden. Da die Methylierung nur einen Schritt benötigt, während die Desfunktionalisierung etwa drei Schritte braucht, ist dies ein erheblicher Effizienzgewinn der Synthese. Da die DNA-Experimente im Vordergrund standen, musste die Synthese effizient vorangetrieben werden. Die Schmelztemperaturen (Anhang B) liegen alle von $50 - 60^\circ\text{C}$, was bei einem 20mer üblich ist. D.h. die Methoxygruppe beeinflusst die Stabilität der DNA kaum.

Kool**Leumann**

Schema 7.2: Schlüsselschritt der Pyren-Nucleotid-Synthese. Kool:
 $\alpha : \beta = \sim 5 : 1$, Tol: p-Toluylester; Leumann: $\alpha : \beta = 1 : 10$.

7.2 4-Pivaloylierte abasische Stelle Ab*

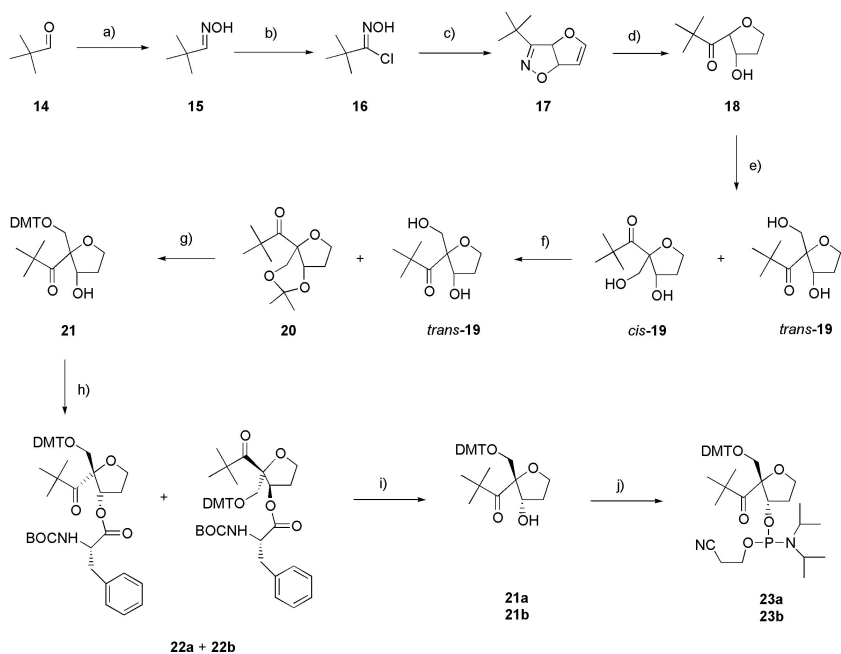
Die Synthese von Ab* ist in Schema 7.3 dargestellt. Ausgehend vom Pivaloylaldehyd **14** wurde in zwei Schritten über das Oxim **15** das Oximchlorid **16** hergestellt. **16** wird mit Furan zur bicyclischen Verbindung **17** cyclisiert und danach mit Wasserstoff in einer wässriger Lösung zum gesättigten Fünfring **18** reduziert und hydrolysiert. Diese vier Stufen wurden in der Dissertation von Gugger^[71] beschrieben. Es folgt die Hydroxymethylierung zum Diol **19**, was einem Gemisch von 4 Stereoisomere resultiert (vergleiche Hydroxymethylierung bei T* auf S. 73). Erstens das bei der Hydroxymethylierung entstandene Diastereomerengemisch, das in *cis* und *trans* bez. der Hydroxylgruppen unterschieden wird. Zweitens das bei der Cyclisierung und Hydrierung entstandene Enantiomerengemisch.

Das *cis*-Stereoisomer des Diastereomerengemisches wird unter gewöhnlichen Bedingungen^[72] zum Acetonid (Isopropyliden) **20** überführt. Das gewünschte *trans*-**19** reagiert wegen der sterischen Anordnung nicht. Durch die unterschiedliche Polarität lässt sich *trans*-**19** von **20** durch FC sehr gut trennen. Diese beiden Stufen entwickelte Alex Taylor im Rahmen eines Praktikums.

Vor der Enantiomerentrennung wurde *trans*-**19** zur Verbindung **21** trityliert. Das hat zwei Vorteile: Die DMT-Gruppe ist die richtige Schutzgruppe für den DNA-Synthesizer und es blieb nur eine Hydroxylgruppe für den nächsten Schritt frei. Dieser ist eine Veresterung^[73] mit einer chiralen Säure (*N*-BOC-*L*-Phe) zu **22a** und **22b**, so dass aus einem Enantiomerengemisch ein Diastereomerengemisch entstand, das mit FC getrennt wurde. Der Diastereomerenüberschuss wurde mit dem Integral des Protons an der 3-Position des ¹H-NMR-Spektrums bestimmt.

Die Synthese der erhaltenen Stereoisomere wurde getrennt weitergeführt. Zuerst kam die Verseifung^[74] mit NaOH und Pyridin. Bei diesem Schritt war die Gefahr der Epimerisierung bei der 3-Position gross. **21a** bzw. **21b** wurde durch eine Substitution am 3'-Sauerstoff mit Phosphoramiditchlorid zu **23a** bzw. **23b** überführt. Bei den letzten zwei Stufen wurde wegen der Übersicht im Schema nur ein Enantiomer gezeichnet.

Die Frage nach der absoluten Konfiguration ist ungeklärt. Da die bei-



Schema 7.3: a) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 50%ige NaOH, $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O} = 1:1$, 2h, RT, 66% b) NCS, $\text{HCl}(\text{cat})$, 2h, RT, DMF, 95% c) Furan, NEt_3 , RT, 3d, 42% d) H_2 , Raney-Ni, $\text{B}(\text{OH})_3$, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 5:1$, RT, 19h, 90% e) $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, Formalin, Dioxan, H_2O , 3.5h, RT, 42% f) Aceton, TsOH , 2.5h, RT - 38°C , *trans*-**19**: 62% g) DMTC1 , DMAP, Pyr, 24h, RT, 83% h) *N*-BOC-*L*-Phe, CMC, DMAP, MeCl_2 , 20h, 0°C - RT, **22a**: 15% (95% de), **22b**: 14% (88% de), Mischfraktion: 41% i) NaOH, Pyr, H_2O , 2h, RT, **21a**: 77%, **21b**: 95% j) $\text{NCEtOPN}(\text{iPr})_2\text{Cl}$, $\text{N}(\text{iPr})_2\text{Et}$, MeCl_2 , 2.5h, RT, **23a**: 95%, **23b**: quant.

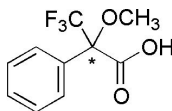
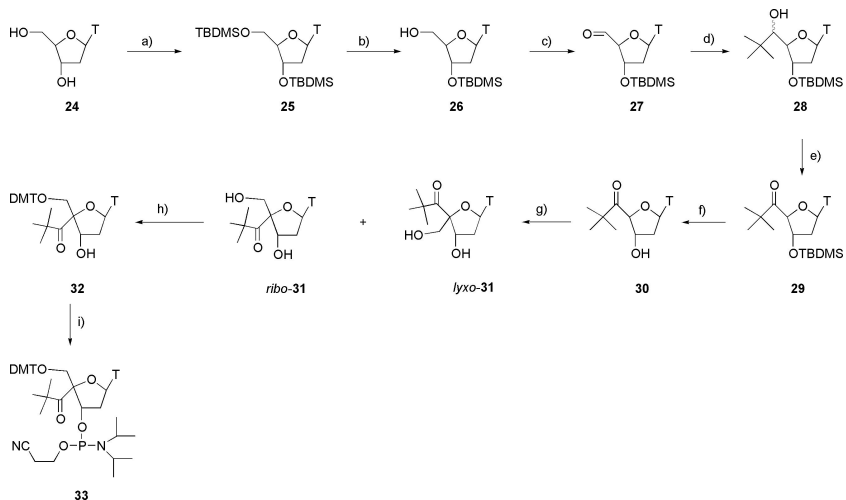


Abbildung 7.1: Moshersäure (MPTA)

den Enantiomere als Radikalvorläufer dieselben Resultate liefern (Tab. 5.1), war die Priorität für die Zuordnung der absoluten Konfiguration nicht gross. Durch das Modell von Mosher^[75] könnte es möglich sein, 3-(*S*),5-(*R*) und 3-(*R*),5-(*S*) den beiden Verbindungen zuzuordnen. Dabei müssen beide Enantiomere als sekundäre Alkohole mit einer optisch reinen Moshersäure (2-Methoxy-2-trifluormethyl-2-phenylelessigsäure (MP-TA), Abb. 7.1) verestert werden. Durch die Verschiebungen im ¹H-NMR-Spektrum der β -, γ -, und δ -Protonen kann die absolute Konfiguration herausgefunden werden. Die genauen Zusammenhänge werden in der Dissertation von Poncioni^[76] erklärt.

7.3 4'-Pivaloylthymidin T*

Die hauptsächlich von Marx^[77, 78] entwickelte Synthese wird in Schema 7.4 wiedergegeben. 2'-Desoxythymidin **24** wurde in zwei Schritten zum 3'-Silylether **26** überführt.^[79–83] Anschliessende Moffatt-^[84] oder Dess-Martin-^[85] Oxidation führte zum Aldehyd **27**, der mit *t*-BuLi und CeCl₃^[86] eine Addition einging. Es stellte sich heraus, dass CeCl₃ nicht notwendig ist. Das Produkt **28** wurde erneut nach der Methode von Swern^[87] oder Jones^[88] zu **29** oxidiert. **29** wurde entschützt und hydroxymethyliert, so dass zwei Diastereomere *ribo*-**31** und *lyxo*-**31** entstanden, die mit FC getrennt wurden. *Ribo*-**31** wurde nach Standardmethoden zum **32** trityliert und zum Phosphoramidit^[89] **33** überführt. Da dieser Weg schon bekannt ist, wird er im Experimentellen Teil nicht erwähnt.



Schema 7.4: a) TBDMSCl, Imidazol, DMF, 6h, 0°C – RT, 98%
 b) AcOH, THF, H₂O, 3d, RT, 47% c) Dess-Martin-Periodinan, MeCl₂, 2h, RT, 92% d) *t*-BuLi, THF, über Nacht, -78 – -50°C 32% e) CrO₃, H₂SO₄, H₂O, Aceton, 45 Min., RT, 54% f) TBAF · 3H₂O, THF, 1.5h, RT, 80% g) Ba(OH)₂ · 8H₂O, Formalin, Dioxan, H₂O, 6d, RT, 49% h) DMTCl, DMAP, Pyr, 24h, RT, 85% i) NCEtOPN(*i*Pr)₂Cl, N(*i*Pr)₂Et, MeCl₂, 2.5h, RT, 50%.

Teil II

Experimenteller Teil

Kapitel 8

Geräte und Materialien

Wenn nicht speziell erwähnt, wurden die Experimente mit Standard-Laborgeräten (Glasgeräte, Magnetrührer, Pipetten, etc.) der geeigneten Dimension durchgeführt. Wenn Wasser- bzw. Sauerstoffausschluss erforderlich war, wurden die Experimente unter Argon durchgeführt. Die Glasgeräte wurden zusätzlich unter HV ausgeheizt.

8.1 NMR-Spektroskopie

8.1.1 ^1H -NMR

Verwendete Geräte:

- *Varian Gemini 300* (300 MHz)
- *Varian Gemini VXR 400* (400 MHz)
- *Bruker DRX500* (500 MHz)

Alle chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm, relativ zum internen Standard Tetramethylsilan ($\delta = 0.00$ ppm) in CDCl_3 angegeben. Alle Spektren wurden nach 1. Ordnung interpretiert. Die Kopplungskonstanten wurden jeweils den besser aufgelösten Signalen entnommen und sind

in Hertz (Hz) angegeben. Entsprechend den gültigen Nomenklaturregeln wurden bei Nucleosiden die Protonen der N-glykosidisch gebundenen Nukleobasen sowie des C-C geknüpften Pyrens mit H-C1 bis H-Cn und die des Kohlenhydrates mit H-C1' bis H-Cn' nummeriert. Die Signale wurden wie folgt bezeichnet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett, b = breit.

8.1.2 ^{13}C -NMR

Verwendete Geräte:

- *Varian Gemini VXR 400* (100 MHz)
- *Bruker DRX500* (125 MHz)

Alle chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben und auf das Lösungsmittelsignal von CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm) bezogen. Die Spektren sind ^1H - breitbandentkoppelt. Die Signale wurden teilweise mit APT-Experimenten^[90] zugeordnet. Die Signale wurden wie folgt bezeichnet: p = primäres C-Atom, s = sekundäres C-Atom, t = tertiäres C-Atom, q = quartäres C-Atom.

8.1.3 ^{31}P -NMR

Verwendetes Geräte: *Varian Gemini VXR 400* (161 MHz) Alle chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm relativ zu Triphenylphosphat ($\delta = -18.0$ ppm) in CDCl_3 als externe Referenz angegeben. Die Spektren sind ^1H -breitbandentkoppelt.

8.2 Massenspektrometrie

8.2.1 EI, FAB-MS

Die Analysen wurden von *Dr. H. Nadiq* im massenspektrometrischen Labor des Institutes für Organische Chemie der Universität Basel gemessen.

Geräte: *VG 70s* und *MAT 312*. Zur Ionenerzeugung diente Elektronenstossionisation (EI) oder Beschuss mit schnellen Xenon Atomen (FAB) unter Verwendung von Nitrobenzylalkohol als Matrix und KCl als Zusatz. Alle Angaben sind in atomaren Masseinheiten pro Elementarladung (m/z) angegeben.

8.2.2 MALDI-ToF-MS

Verwendete Geräte:

- *Voyager Elite, Biospectrometry Research Station* von der Firma *Vestec*. Flugrohr 2 m, N_2 -Laser (337 nm, 3 ns Pulsdauer, 0.2 mJ/Puls), Akkumulierung von 10–256 Pulsen, Beschleunigungsspannung 25 kV.
- *Voyager-DE PRO BioSpectrometry Workstation* von *Applied Biosystems*. Flugrohr 1.3 m, N_2 -Laser (337 nm, 3 ns Pulsdauer, 20 Hz)^[91] Akkumulierung von min. 100 Pulsen, Rigitizer 2 GHz, Beschleunigungsspannung 20 kV.

Es wurde der lineare Negativ-Ionen-Modus verwendet. Zur Massenkalisierung wurden synthetisierte Oligonucleotide als externe Standards verwendet.

8.2.3 ESI-MS

Verwendetes Gerät: *Finnigan MAT LCA*, Oktapoliges Massenspektrometer. Die Analysen wurden in Lösung (max. 0.1 mg/ml) direkt injiziert. Die Ionenerzeugung erfolgte durch Elektronenstossionisation. Alle Angaben beziehen sich auf atomare Masseinheiten pro Elementarladung (m/z , Intensität).

8.3 Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden von *W. Kirsch* im mikroanalytischen Labor des Institutes für Organische Chemie der Universität Basel durchgeführt. Die Angaben erfolgen in Massenprozenten.

8.4 IR-Spektroskopie

Verwendetes Gerät: *Perkin-Elmer-1600-Series* FT-IR. Die Banden sind in cm^{-1} angegeben. Es wurden jeweils vier Einzelspektren überlagert und ein Hintergrundspektrum abgezogen. Die Proben wurden als CHCl_3 -Film gemessen. Die Signale wurden wie folgt bezeichnet: s = stark, m = mittel, w = schwach (weak), b = breit.

8.5 Chromatographische Methoden

8.5.1 Dünnschichtchromatographie

Verwendetes Fabrikat: *Kieselgel 60 F₂₄₅* beschichtete Aluminiumfolien von *Merck*. Die Detektion von nicht UV-aktiven Substanzen (254 nm oder 360 nm) erfolgte durch Eintauchen der DC-Folien in eine der folgenden Lösungen und anschließendem Erhitzen mit einem Heissluftföhn:

- 3 g KMnO_4 , 5 ml NaOH , 20 g K_2CO_3 , 300 ml H_2O
- 10 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 100 ml konz. H_2SO_4 , 900 ml H_2O

8.5.2 Säulenchromatographie

Verwendetes Kieselgel: *C 560 35–70 μm* der *Chemischen Fabrik Uetikon*. Es wurde die Flaschchromatographie (FC) angewandt: Die Säulen wurden nass gefüllt, das Eluieren erfolgte unter leichtem erhöhtem Druck (~ 0.5 Atü, über eine Aquariummembrampumpe). Bei Eluierungsmittelgemischen ist die Zusammensetzung in Volumenverhältnissen angegeben.

8.5.3 HPLC

8.5.3.1 Zur Reinigung von DNA-Strängen

Verwendete Geräte:

- *Kontron Instruments* (Datensystem *MT2*, Pumpe *430*, Detektor *430/1*), UV-Detektion bei 260 nm

- *Hewlett Packard 1050 Series*, UV-Detektion bei 260 nm

8.5.3.2 Zur Analysen von Bestrahlungsexperimenten

Verwendete Geräte:

- *Hewlett Packard 1050 Series*, UV-Detektion bei 260 nm
- *Waters Alliance 2690 Separation Module, 2680 Dual Mode Detector*, UV-Detektion bei 260 und 346 nm

8.6 UV-VIS-Spektroskopie

Verwendetes Gerät: *Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 2*, ausgerüstet mit einem *PTP-6* Temperaturregler.

8.7 DNA-Synthese

Verwendetes Gerät: *Expedite 8909* der Firma *Perseptive Biosystems*. Die Chemikalien zur DNA-Synthese wurden von *Glen Research* bezogen.

8.8 Bestrahlungen

Verwendetes Gerät: 450–1000 W Universal Lichtquelle der Firma *Oriel (Modell 68810)* mit optischer Bank, Fokussierungseinrichtung, Kryostat zur Thermostatisierung von Küvetten und einer 500 W Quecksilberhochdrucklampe von *Osram (HBO 500W/2)*. Zur Wellenlängenbegrenzung wurden *cut-off* Filter der Firma *Schott* verwendet.

8.9 Übrige Geräte

Verwendete Geräte:

- Thermomixer: *Thermomixer 5436*, *Thermomixer compact* und *Thermomixer comfort* von *Eppendorf*

- Vortexer: *Vortexer Genie 2* von *Bender*
- Lyophilisator: *Speed Vac Plus* von *Savant*
- Zentrifuge: *Centrifuge 5415 C* von *Eppendorf*
- Rotationsverdampfer von *Büchi*
- Hochvakuumpumpe von *Edwards*
- Präzisionswaage: *Mettler AE 100* von *Mettler-Toledo*

8.10 Lösungsmittel

Für chromatographische Trennungen wurden destillierte Eluiermittel oder Eluiermittel in HPLC-Qualität verwendet. Absolute Lösungsmittel wurden nach Standardverfahren^[92] hergestellt oder von *Fluka*, *Merck* bzw. *Romil* bezogen. Für chemische Reaktionen wurde entionisiertes Wasser verwendet. Wasser für den Umgang mit DNA wurde in der Qualität *NA-NOpure* verwendet und ausgehend von entionisiertem Wasser auf einer Viersäule-Reinstwasserapparatur von *Barnstead* hergestellt.

Kapitel 9

DNA-Arbeitsmethoden

9.1 RP18-HPLC

Es wurde eine Säule von *Merck* (LiChristopher RP18e, 5μ , 250×4 mm, Flussrate 1 ml/min) verwendet. Eluent A: 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer (TEAA) pH 7.0 mit 1 % Acetonitril. Eluent B: Acetonitril.

Zur Trennung von Oligonucleotidgemischen wurde mit einem Acetonitrilgradienten gearbeitet. Detektiert wurden die Oligonucleotide durch UV-Absorption bei 260 nm. Tritylierte Oligonucleotide eluieren bei einem Acetonitrilanteil von 25 % bis 30 %, nichttritylierte Oligonucleotide bei einem Acetonitril von unter 20 %, pyrenmodifizierte, nichttritylierte Oligonucleotide bei einem Acetonitrilanteil von 20 % bis 40 %. Zur Vermeidung von Aggregationseffekten wurde die Säule auf 55°C erwärmt.

Die Entsalzung von Oligonucleotiden erfolgte in der obenerwähnten RP18-Säule mit anschliessender Lyophilisierung.

9.2 Oligonucleotidsynthese

Die Oligonucleotide wurden an Festphasen (GPG, Porengrösse 500 Å) der Firma *Glen Research* im 0.2 μmol - oder 1.0 μmol -Masstab synthetisiert. Es wurden 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite ver-

wendet und der Synthesizer wurde im Standardmodus betrieben. Die Kupplungszeiten für das 4' - pivaloylmodifizierte und pyrenmodifizierte Nucleotid wurden von 96 s auf 15 Min verlängert. Die Synthesen wurden im Trityl-ON-Modus durchgeführt, anschliessend die Festphasen getrocknet und in 1 ml konz. Ammoniak-Lösung bei 55 °C über Nacht (min. 8 h) inkubiert. Nach Lyophilisierung bis zur Trockene wurde das entschützte und abgespaltene Oligonucleotid dreimal mit Wasser gelöst, von der Festphase über einen Filtereinsatz mit einem 1.5 ml Plastikbehälter der Firma *Sigma* filtriert und lyophilisiert.

Das rohe Oligonucleotidgemisch wurde mit RP18-HPLC gereinigt. Es wurde die erwähnte Säule und Parameter verwendet. (s. Kapitel 9.1) Typischer Gradient: 15 % B bis 40 % B in 30 Min. Tritylierte Oligonucleotide eluieren bei 25 – 30 % Acetonitril. Die lyophilisierte Trityl-ON-Fraktion wurde mit 80%iger Essigsäure (200 μ l) versetzt und 20 Min bei RT geschüttelt. Nach Zugabe einer NaOAc-Lösung (50 μ l, 3 M) und Lyophilisierung wurde das Oligonucleotid mit RP18-HPLC mit der gleichen Säule und Parameter gereinigt. Typischer Gradient: 5 % bis 20 % B in 40 Min. Die Identität wurde mit MALDI-ToF-MS (s. Kapitel 9.3), die Reinheit mit RP18-HPLC überprüft. Für Photolysenexperimente eingesetzte Oligonucleotide hatten eine Reinheit von min. 97 %.

Oligonucleotide ohne modifizierte Base oder mit einer abasischen Stelle (Ab) wurde von den Firmen *Microsynth* und *Qiagen* bezogen.

9.3 Massenbestimmung mittels MALDI-ToF-MS

Zur Messung wurde die entsalzte Analytlösung (1 μ l) mit Matrix-Lösung (0.5 M 2,4-Dihydroxyacetophenon und 0.3 M Ammoniumtartrat in H₂O : MeCN = 3 : 1, 1 μ l) auf dem Probeneller vermischt und an der Luft während ca. 30 Min kristallisiert. Zur Massenkalisierung wurden synthetische Oligonucleotide als externe Standards verwendet.

9.4 Quantifizierung von Oligonucleotiden durch UV-Absorption

Die Absorptionen von wässrigen Oligonucleotidlösungen wurden in Quarzküvetten mit der Schichtdicke von 1 cm bei 260 nm gemessen und entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz quantifiziert. Die molaren Extinktionskoeffizienten ε der Oligonucleotide wurden aus Inkrementwerten berechnet (s. Tabelle unten).

Nucleobase	ε_{260}^a
Guanin	11.5
Adenin	15.4
Cytosin	7.4
Thimin	8.7
Pyren	1.4

^ain mM⁻¹ cm⁻¹

Während die Werte der natürlichen Basen bekannt war,^[64] wurde der Extinktionskoeffizient des Pyrens experimentell ermittelt. Das Diol **1** wurde in wässriger Lösung mit 20 mM Natriumzitat (pH 5.0) und 100 mM NaCl gelöst. (gleiche Lösung wie bei der Bestrahlung) ε_{260} wurde aus der Absorption bei 260 nm und der Konzentration nach dem Beer-Lambert-Gesetz berechnet.

9.5 Doppelstrangbildung

Zur Gewährleistung einer optimalen Doppelstrangbildung wurden die komplementären Stränge in einem Zitat-Puffer (20 mM, pH 5.0) mit 100 mM NaCl kurz auf 85 °C erwärmt und mindestens innert drei Stunden auf RT abgekühlt. Damit die Hybridisation auch am Ende des Doppelstrangs sichergestellt ist, wurde an einem Strang auf beiden Seiten je 5 T mehr synthetisiert.

9.6 Schmelztemperaturbestimmung

Die Messungen wurden bei 260 nm mit einem Temperaturgradienten von 1 °C/Min durchgeführt. Angegebene Schmelztemperaturen (T_m) in °C sind Mittelwerte aus je zwei Aufheiz- und Abkühlkurven. Die gemessene Werte sind im Anhang B zusammengefasst.

9.7 Photolysen

Die Bestrahlungen der Einzelstrang- und Doppelstrangproben wurden in 1.5 ml Polymethylmethacrylat-Küvetten der Firma *Semadeni* durchgeführt. Damit die Proben anaerob wurden, wurden die Lösungen vor der Bestrahlung 5 Min über der Lösung und 10 Min in der Lösung mit Argon (Qualität 59) gespült. Die Küvettenhalterung wurde auf 15 °C thermostatisiert, um eine Erwärmung der Lösungen während der Bestrahlung zu verhindern.

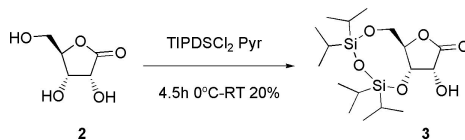
Kapitel 10

Synthese der modifizierten Nucleotide

10.1 Pyren-Nucleotid

Obwohl die ersten beiden Stufen in der Literatur bekannt sind,^[69] wurden sie erneut beschrieben, da sie wichtige Ergänzungen enthalten.

10.1.1 3,5-*O,O*-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl) -*D*-ribo-1,4-lacton **3** ^[69]



Folgende Prozedur wurde parallel zweimal bis zum Ausschütteln durchgeführt: Zu einer eisgekühlter Lösung von 0.96 g *D*-Ribono-1,4-lacton **2** (6.49 mmol) in 15 ml Pyridin wurden 2.5 ml TIPDSCl₂ (7.97 mmol, 1.2 eq) zugegeben. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wurde

das Eisbad entfernt und zur RT erwärmen lassen. Nach $2\frac{1}{2}$ weiteren Stunden Rühren wurden die beiden Ansätze im Scheidetrichter, in dem EtOAc vorgelegt wurde, vereint und zweimal mit 0.1 M HCl extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung einmal gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und im HV entfernt. FC (EtOAc : P = 1 : 7) lieferte 1.028 g **3** (20 %) als weissen Schaum.

DC (EtOAc : P = 1 : 7): $R_f = 0.15$.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 1.00-1.13 (m, 28H, Si-CH(CH₃)₂), 3.0 (sb, OH), 3.98 (dd, $J = 12.5, 6.2$, H-C5), 4.14 (dd, $J = 12.5, 3.7$, H-C5), 4.23 (d, $J = 5.8$, H-C2), 4.42 (ddd, $J = 6.7, 6.2, 3.7$, H-C4), 4.50 (dd, $J = 6.8, 6.1$, H-C3).

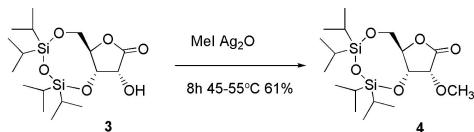
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 12.69, 12.95, 13.22, 13.39, (t, CH(CH₃)₂), 16.89, 16.99, 17.01, 17.16, 17.32, 17.33, 17.36, 17.48, (p, CH(CH₃)₂), 61.76 (s, C5), 68.61, 69.99, 82.78 (t, C2, C3, C4), 171.89 (q, C=O).

MS (EI, m/z): 389 (5, M⁺-1), 347 (25), 329 (32), 235 (44), 147 (20), 135 (15), 121 (47), 105 (25), 91 (20), 77 (39), 72(21), 58 (96), 44 (14), 43 (18), 42 (21), 41 (32), 39 (25), 32 (21), 28 (100), 27 (19).

IR (CHCl₃(Film), $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹): 3500b, 2945s, 2870s, 1792s, 1465m, 1390w, 1250w, 1220w, 1130m, 1090s, 1040s, 905s, 885s, 837m, 730s, 650m.

C₁₇H₃₄O₆Si₂: 390.62.

10.1.2 2-*O*-Methyl-3,5-*O,O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-*D*-ribo-1,4-lacton **4** [69]



Eine Suspension von 1.121 g **3** (2.87 mmol) und 2.245 g Silber(I)oxid (9.69 mmol, 3.4 eq) in 18 ml Methyljodid wurde während 6 h auf 45 °C erwärmt. Das überschüssige Methyljodid wurde während 2 h bei 50–55 °C abdestilliert, der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und über Celite filtriert. Der Rückstand wurde mit möglichst wenig EtOAc gewaschen. Aufkonzentrieren des klaren Filtrats und FC (EtOAc:P = 1:10) lieferte 703.5 mg **4** (61 %) als farbloses Öl.

DC (EtOAc:P = 1:10): $R_f = 0.45$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.00-1.15 (m, 28H, Si- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.61 (s, 3H, C2- OCH_3), 3.81 (d, $J = 4.5$, H-C2), 4.04, (dd, $J = 13.5$, 2.7, H-C5), 4.14 (dd, $J = 13.5$, 2.1, H-C5), 4.40 (dd, $J = 8.6$, 4.8, H-C3), 4.45 (td, $J = 8.6$, 2.2, H-C4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 12.64, 12.90, 13.11, 13.53 (t, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 16.92, 17.08, 17.18, 17.26, 17.33, 17.36, 17.48 (p, (t $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 59.29 (s, C2- OCH_3), 59.47 (s, C5), 69.52 (t, C3) 77.87 (t, C2) 82.31 (t, C4), 170.77 (q, C=O).

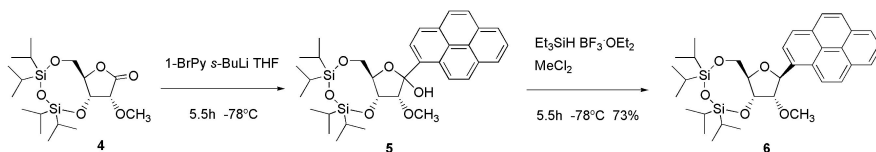
MS (EI, m/z): 404 (<1, M^+), 363 (58), 362 (79), 361 (97), 329 (73), 261 (68), 259 (70), 251 (48), 250 (73), 249 (100), 231 (46), 221 (43), 175 (53), 161 (46), 149 (57), 147 (61), 135 (73), 121 (53), 119 (72), 109 (40), 105 (55), 103 (44), 85 (66), 83 (83), 55 (41), 43 (71), 41 (62).

IR (CHCl_3 (Film), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 2940s, 2895m, 2865s, 1792s, 1465m, 1388w, 1320w, 1290w, 1245m, 1162m, 1130s, 1093m, 1040s, 980m, 940w,

882s, 840w, 775w, 695m.

C₁₈H₃₆O₆Si₂: 404.65.

10.1.3 1-[2'-O-Methyl-3',5'-O,O-(1,1,3,3-Tetraiso-propyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-ribofuranosyl]-pyren 6



Zu einer Lösung von 972.3 mg 1-Brompyren (3.46 mmol, 2 eq) in 20 ml THF wurde bei -78 °C 2.7 ml *s*-BuLi (1.3 M in Cyclohexan, 3.5 mmol, 2 eq) zuge tropft. Die Farbe wechselte sofort auf braun-rot. Nach einer halben Stunde bei -78 °C wurde zur Lösung eine Lösung von 703.5 mg des geschützten Ribonolactons **4** (1.74 mmol), das vorher dreimal mit Toluol coevapuriert wurde, in 6 ml THF bei -78 °C zuge tropft. Die Lösung erhellte sich. Nach 5 h Rühren bei -78 °C wurde die Reaktionslösung dreimal mit EtOAc und ges. NaHCO₃-Lösung extrahiert. Nach dem Trocknen mit Na₂SO₄ und Eindampfen am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt **5** am HV getrocknet.

Das Rohprodukt **5** wurde in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Nacheinander wurden 1.58 ml Triethylsilan (9.94 mmol, 5.7 eq bez. **4**) und 1.25 ml Bortrifluorid-ethyletherat (9.90 mmol, 5.7 eq bez. **4**) zugegeben. Nach 5½ h Rühren bei -78 °C wurde dreimal mit EtOAc mit ges. NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach FC (THF : P = 1 : 100) erhielt man 753.5 mg **6** (73 %) als weissen Schaum. Die DC für das Verfolgen der Säule wurden mit EtOAc : P = 1 : 10 durchgeführt.

DC (EtOAc : P = 1 : 10): R_f = 0.35, (THF : P = 1 : 100): R_f = 0.05.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 0.87-0.92 (m, 7H, Si- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.09-1.16 (m, 21H, Si- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.74 (s, 3H, C2'- OCH_3), 3.79 (d, $J = 4.6$, H-C2'), 4.15 (dd, $J = 13.1$, 2.3 H-C5'), 4.24 (td, $J = 9.4$, 2.0, H-C4'), 4.43 (db, $J = 12.9$, H-C5'), 4.47 (dd, $J = 9.3$, 4.6, H-C3'), 5.97 (s, H-C1'), 7.99-8.08 (m, 3H, Pyren), 8.15-8.26 (m, 5H, Pyren), 8.48 (dd, $J = 8.0$, 0.6, H-Pyren).

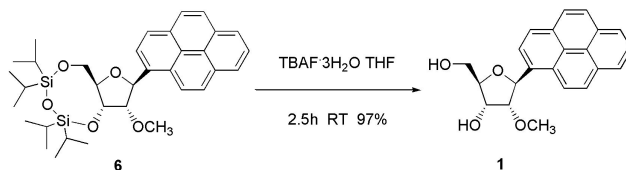
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 12.86, 12.97, 13.24, 13.51 (t, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 17.13, 17.16, 17.24, 17.26, 17.47, 17.53, 17.66 (p, (t $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 60.07 (s, C5'), 60.41 (p, C2'- OCH_3), 71.21 (t, C3'), 80.58 (t, C2'), 83.19 (t, C4'), 87.04 (t, C1'), 122.35, 123.00 (t, Pyren), 124.79 (q, Pyren), 124.98, 125.23, 125.38, 126.00, 127.11, 127.69, 127.95, 130.70 (t, Pyren), 130.74, 131.45, 131.73, 134.81 (q, Pyren).

MS (FAB, m/z): 592 (23, M^++2), 591 (57, M^++1), 590 (100, M^+), 261 (32), 259 (55), 249 (35), 229 (47), 215 (69), 119 (34), 43 (34), 41 (35).

IR (CHCl_3 (Film), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 2925 m , 2866 m , 2360 m , 1464 m , 1143 m , 1062 m , 1043 m , 885 m , 849 m .

$\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{Si}_2$: 590.91.

10.1.4 1-(2'-*O*-Methyl- β -*D*-ribofuranosyl)-pyren 1



Zum Gemisch von 750.8 mg **6** (1.27 mmol) und 4.015 g TBAF · 3H₂O (12.7 mmol, 10 eq) wurde 13 ml absolutes THF zugegeben. Nach 2½ h Rühren bei RT wurde die Reaktion mit Silicagel gequentscht. Nach weiteren 10 Min. Rühren wurde das Silicagel von der Lösung

filtriert. Es wurde mit wenig THF nachgewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. FC (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:20) lieferte 429.6 mg **1** (97 %) als weissen Schaum.

DC (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:20): R_f = 0.25

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 3.41 (s, 3H, C2'-OCH₃), 3.92 (t, *J* = 5.9, H-C2'), 3.97 (dd *J* = 12.0, 4.6, H-C5'), 4.09 (dd, *J* = 12.0, 3.0, H-C5'), 4.18 (ddd, *J* = 5.7, 4.6, 3.0, H-C4'), 4.40 (t, *J* = 5.7, H-C3'), 5.92 (d, *J* = 5.8, H-C1'), 8.00-8.10 (m, 3H, Pyren), 8.14-8.21 (m, 5H, Pyren), 8.44 (d, *J* = 9.3, H-Pyren).

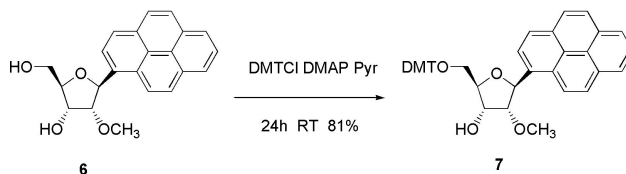
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 59.73 (p, C2'-OCH₃), 63.38 (s, C5'), 71.27 (t, C3'), 80.85 (t, C2'), 85.13 (t, C4'), 87.11 (t, C1'), 123.07, 123.82 (t, Pyren), 125.18 (q, Pyren), 125.48, 125.59, 125.82, 126.47, 127.82, 128.00, 128.32 (t, Pyren), 128.88, 131.08, 131.75 (q, Pyren).

MS (FAB, m/z): 350 (10, M⁺+2), 349 (45, M⁺+1), 348 (100, M⁺), 261 (13), 259 (37), 235 (24), 231 (29), 227 (20), 215 (21), 203 (15), 202 (18), 147 (11), 136 (22), 89 (10), 87 (13), 77 (12), 69 (11), 55 (14), 43 (19), 41 (20).

IR (CHCl₃(Film), $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹): 3415*mb*, 2983*m*, 1459*w*, 1151*m*, 1092*w*, 885*m*, 867*w*.

C₂₂H₂₀O₄: 348.40.

10.1.5 1-[5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methyl- β -D-ribofuranosyl]-pyren 7



Zum Gemisch von 120.0 mg **1** (0.345 mmol), das vorher dreimal mit Pyridin coevapuriert wurde, 140.0 mg DMTCI (0.413 mmol, 1.2 eq) und einer Spatelspitze DMAP wurde 2.0 ml Pyridin zugegeben. Nach 24 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit ges. NaHCO_3 -Lösung und CH_2Cl_2 dreimal ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 und Einengen am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mit FC (zuerst $\text{EtOAc} : \text{P} = 1 : 10 + 1\% \text{ TEA}$, später $\text{EtOAc} : \text{P} = 1 : 2 + 1\% \text{ TEA}$) gereinigt. Man erhielt 181.2 mg **7** (81 %).

DC ($\text{EtOAc} : \text{P} = 1 : 2 + 1\% \text{ TEA}$): $R_f = 0.35$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 2.83 (sb, OH), 3.42 (s, C2'- OCH_3), 3.52 (dd, $J = 10.4, 4.3$, H-C5'), 3.65 (dd, $J = 10.1, 3.00$, H-C5'), 3.77 (s, 3H, Ph- OCH_3), 3.78 (s, 3H, Ph- OCH_3), 4.00 (t, $J = 5.8$, H-C2'), 4.31 (ddd, $J = 5.4, 4.3, 3.0$, H-C4'), 4.47 (t, $J = 5.4$, H-C3'), 5.96 (d, $J = 5.8$, H-C1'), 6.84 (m, 4H, *meta*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.22-7.33 (m, 3H, DMT), 7.46 (m, 4H, DMT), 7.58 (m, 2H, DMT), 7.99-8.10 (m, 4H, Pyren), 8.15-8.21 (m, 3H, Pyren), 8.40 (d, $J = 8.1$, H-Pyren), 8.54 (d, $J = 9.6$, H-Pyren).

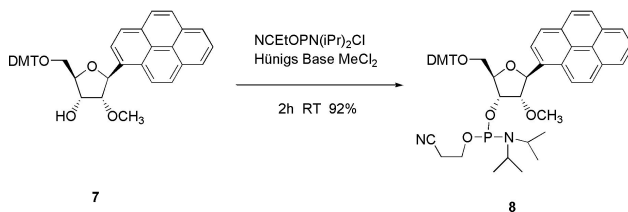
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 55.60 (p, Ph- OCH_3), 59.72 (p, C2'- CH_3), 64.22 (s, C5'), 71.68 (t, C3'), 80.79 (t, C2'), 86.79 (q, C5'- OC), 87.59 (t, C1', C4'), 113.56, 123.44, 124.48 (t), 125.24, 125.28 (q), 125.46, 125.50, 125.67, 126.37, 127.21, 127.79, 127.90, 128.10, 128.28, 128.76, 130.64, 130.67 (t), 131.12, 131.36, 131.78, 134.03, 136.51 (q), 158.89, 158.90 (q, C- OCH_3).

MS (FAB, m/z): 652 (0.5, $M^+ + 2$), 651 (2.2, $M^+ + 1$), 650 (4.3 M^+), 304 (22, DMT+1), 303 (100, DMT), 136 (12), 118 (28), 77 (11), 71 (12), 57 (26), 55 (25), 43 (25), 41 (23).

IR (CHCl_3 (Film), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3484 w b, 2929 s , 2835 w , 1607 s , 1584 w , 1508 s , 1461 w , 1445 w , 1301 w , 1250 s , 1177 w , 1116 m , 1035 s , 849 w , 828 w , 755 s , 703 w .

$\text{C}_{43}\text{H}_{38}\text{O}_6$: 650.77.

10.1.6 1-[3'-*O*-(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-*O*-methyl- β -*D*-ribofuranosyl]-pyren 8



Zu der Lösung von 181.2 mg **7** (0.279 mmol), das vorher dreimal mit MeCl_2 coevapuriert wurde, in 4.6 ml MeCl_2 wurde 0.3 ml *N,N*-Diisopropylethylamin (Hünig's Base, 1.7 mmol, 6 eq) und 0.22 ml 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.0 mmol, 3.5 eq) hinzugegeben. Nach 2 h bei RT wurde die Reaktionslösung direkt mittels FC ($\text{EtOAc} : \text{P} = 1 : 2 + 1\% \text{ TEA}$) gereinigt. Es wurde 218.2 mg **8** (92 %) als Diastereomerenmischung mit Phosphor als neues Stereozentrum erhalten. Die chemische Verschiebung von ca. 150 ppm im ^{31}P -NMR ist charakteristisch für dreiwertigen Phosphor.^[93]

DC ($\text{EtOAc} : \text{P} = 1 : 2 + 1\% \text{ TEA}$): $R_f = 0.6$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.08 (d, $J = 6.8$, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$),

1.23 (m, 9H, CH(CH₃)₂), 2.38 (t, $J = 6.6$, CH(CH₃)₂), 2.70 (t, $J = 6.6$, CH(CH₃)₂), 3.43, 3.45 (s, C2'-OCH₃, Isomer a+b), 3.47 (m, H-C2'), 3.66 (m, 4H, NC-CH₂-CH₂-OP) 3.77, 3.78, 3.79, 3.80 (s, 6H, Ph-OCH₃, Isomer a+b), 3.93 (m, 1H, H-C5), 4.08 (m, 1H, H-C5), 4.47 (dd, $J = 3.5, 6.8$, H-C3, Isomer b), 4.52 (dd, $J = 3.6, 7.2$, H-C3, Isomer a), 4.59 (m, 1H, H-C4), 6.06 (t, $J = 6.32$, H-C1), 6.87 (m, 4H, *meta*-C₆H₄OCH₃), 7.31 (m, 3H, DMT), 7.50 (m, 4H, DMT), 7.62 (m, 2H, DMT), 8.10 (m, 7H, Pyren), 8.44 (d, $J = 8.1$, H-Pyren, Isomer b), 8.49 (d, $J = 8.1$, H-Pyren, Isomer a), 8.55 (d, $J = 4.5$, H-Pyren, Isomer b), 8.57 (d, $J = 4.5$, H-Pyren, Isomer a).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 20.51, 20.68 (s, NC-CH₂), 24.91, 24.99, 25.06 (p, N-CH(CH₃)₂), 43.50, 43.62, 43.73, 43.85 (t, N-CH(CH₃)₂), 55.60, 55.63 (p, Ph-OCH₃), 59.20, 59.36 (s, CH₂-OP), 59.55, 59.58 (p, C2'-OCH₃), 63.79, 64.14 (s, C5'), 73.07, 73.24 (t, C3'), 80.48, 80.80 (t, C2'), 83.50, 83.62 (t, C4'), 86.80, 86.85 (q, C5'-OC), 87.10, 87.68 (t, C1'), 113.55 (t), 118.05, 118.08 (q, CN), 123.72, 123.77, 124.19, 124.30 (t), 125.26 (q), 125.36, 125.39, 125.43, 125.48, 125.54, 126.27, 126.29, 127.22, 127.72, 127.89, 128.03, 128.24, 128.81, 128.91, 129.16, 130.67, 130.71, 130.77 (t), 131.22, 131.31, 131.78, 134.20, 134.27, 136.43, 136.56, 145.34, 145.42 (q), 158.94 (q, C-OCH₃).

³¹P-NMR (161 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 147.08, 147.17.

MS (ESI, m/z): 915 (19, M⁺+K+Na+2), 914 (19, M⁺+K+Na+1), 913 (34, M⁺+K+Na), 889 (10, M⁺+K), 873 (10, M⁺+Na), 304 (22, DMT+1), 303 (100, DMT), 242 (14).

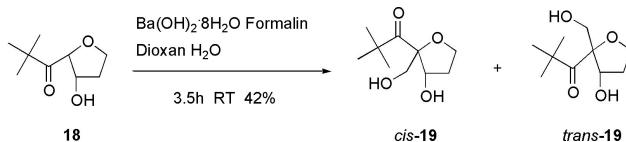
C₅₂H₅₅N₂O₇P: 850.99.

10.2 4-Pivaloylierte abasischen Stelle

Die ersten vier Schritte der Synthese wurde in einer früheren Dissertation beschrieben,^[71] so dass mit dem fünften Schritt weitergefahren wird. Beim vierten Schritt entstand ein Entiomeregemisch, das später

getrennt wird.

10.2.1 2-*tert.*-Butylcarbonyl-3-hydroxyl-2-hydroxyl-methyltetrahydrofuran **19**



Zu der Suspension von 7.33 g $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (23.3 mmol, 2.0 eq) wurden 2.00 g **18** (11.6 mmol) in 7.0 ml Dioxan zugegeben. Während 20 Min. wurde eine Lösung bestehend aus 1.0 ml Formalin (35 %, 13.0 mmol, 1.1 eq), 1.2 ml H_2O und 0.2 ml Dioxan zugetropft. Nach 3 h bei RT wurde 30 ml ges. NH_4Cl -Lösung zugegeben. Nach weiteren 20 Min. Rühren wurde dreimal mit EtOAc gegen ges. NH_4Cl -Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer und am HV eingengt. FC (EtOAc : P = 1 : 2) lieferte 977.9 mg **19** (42 %) als Diastereomerenmisch.

DC (EtOAc : P = 1 : 2): $R_f = 0.20$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.19, 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, trans + cis), 2.07 (m, 2H, H-C2, trans + cis), 2.65 (sb, 2H, OH, trans + cis), 3.46 (d, $J = 11.4$, H-C5, trans), 3.62 (d, $J = 11.1$, H-C5, trans), 3.80 (AB, $J = 11.7$, H-C5, cis), 4.02 (m, H-C1, cis), 4.09 (m, H-C1, trans + cis), 4.21 (m, H-C1, trans), 4.45 (m, H-C3, trans + cis).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 26.16, 26.38 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 33.98, 34.14 (s, C2), 45.63, 45.91 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 65.63, 67.18 (s, C5), 67.64, 67.76 (s, C1), 76.64, 77.93 (t, C3), 94.00, 98.39 (q, C4), 219.97, 220.53 (q, C=O).

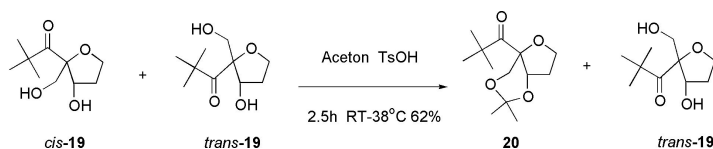
MS (FAB, m/z): 204 (9.8, M^{+2}), 203 (100, M^{+1}), 202 (1.0,

M⁺), 185 (42), 129 (15), 117 (92), 100 (14), 99 (22), 85 (13), 71 (10), 57 (99, C(CH₃)₃), 43 (17), 41 (13).

IR (CHCl₃(Film), $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹): 3448_{sb}, 2968_m, 1686_s, 1111_m, 1035_m.

C₁₀H₁₈O₄: 202.25.

10.2.2 Trennung der 2-tert.-Butylcarbonyl-3-hydroxyl-2-hydroxylmethyltetrahydrofuran-Diastereomere *trans*-19



Zu der Lösung von 977.9 mg **19** (4.84 mmol) in 160 ml Aceton wurden 919.8 mg para-Toluolylsulfonsäure (4.84 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Nach 2 h bei RT wurde das Aceton im Rotationsverdampftr während einer halben Stunde bei 38 °C verdampft. Der Rückstand wurde dreimal mit EtOAc gegen ges. NaHCO₃ ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung erfolgte mit FC (zuerst EtOAc:P = 1:2, später EtOAc:P = 1:1). Zuerst wurde das unerwünschte *cis*-Diastereomer (*cis* bez. den Hydroxyl- und Hydroxylmethyl-Substituenten) als acetyliertes Derivat eluiert. Man erhielt 602.3 mg vom erwünschten *trans*-**19** (62 %).

DC (EtOAc:P = 1:2): R_f = 0.20

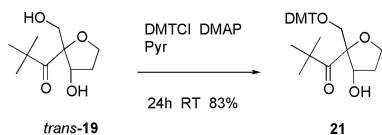
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 1.23 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.99 (dddd, *J* = 1.8, 2.8, 6.1, 13.1, H-C2), 2.18 (m, 1H, H-C2), 3.49 (d, *J* = 11.4, H-C5), 3.63 (d, *J* = 11.4, H-C5), 4.11 (td, *J* = 2.8, 8.3, H-C1), 4.24 (ddd, *J* = 6.1, 8.4, 10.6, H-C1), 4.47 (dd, *J* = 1.8, 5.3, H-C3).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 26.16, (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.09 (s, C2), 45.96 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 65.67 (s, C5), 67.66 (s, C1), 76.67 (t, C3), 98.39 (q, C4), 220.66 (q, $\text{C}=\text{O}$).

IR und MS siehe im Abschnitt 10.2.1 auf S. 96.

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4$: 202.25.

10.2.3 2-*tert.*-Butylcarbonyl-3-hydroxyl-2-[*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-hydroxylmethyl]-tetrahydrofuran **21**



Zum Gemisch von 204.1 mg *trans*-**19** (1.01 mmol), einer Spatelspitze DMAP und 685.0 mg DMTCl (2.02 mmol, 2.0 eq) wurde 4.1 ml Pyridin zugegeben. Nach 24 h bei RT wurde die Reaktionslösung dreimal mit CH_2Cl_2 gegen ges. NaCO_3 -Lösung extrahiert. Nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 , Einengen am Rotationsverdampfer und Trocknen am HV wurde der Rückstand in zwei Stufen gereinigt (1. FC mit $\text{EtOAc}:\text{P} = 1:10 + 1\% \text{ TEA}$, 2. FC mit $\text{EtOAc}:\text{P} = 1:5 + 1\% \text{ TEA}$). Man erhielt 426.6 mg **21** (83%).

DC ($\text{EtOAc}:\text{P} = 1:10 + 1\% \text{ TEA}$): $R_f = 0.15$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.21 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.92 (dddd, $J = 1.9, 3.0, 6.2, 12.8$, H-C2), 2.24 (m, 1H, H-C2), 2.34 (sb, 1H, OH), 3.09 (d, $J = 9.4$, H-C5), 3.27 (d, $J = 9.3$, H-C5), 3.78 (s, 6H, Ph-OCH_3), 4.12 (m, 1H, H-C1), 4.22 (ddd, $J = 6.6, 8.1, 9.6$, H-C1), 4.36 (dd, $J = 1.8, 5.6$, H-C3), 6.82 (m, 4H, *meta*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.20 (m, 1H, DMT), 7.30 (m, 6H, DMT), 7.42 (m, 2H, DMT).

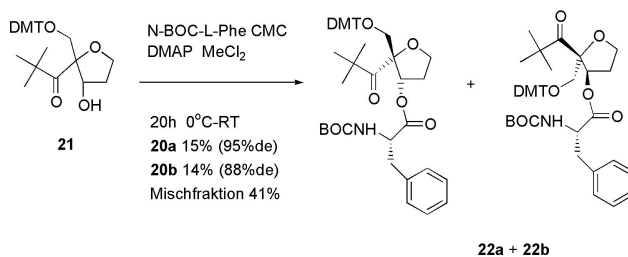
^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 26.51 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 33.91 (s, C2), 46.07 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 55.58 (p, Ph-OCH_3), 68.25 (s, C5), 68.56 (s, C1), 77.29 (t, C3), 87.01 (q, C5-OC), 98.28 (q, C4), 113.49 (t, *ortho*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 127.17, 128.16, 128.70, 130.56, 136.15 (q, *ipso*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 136.25 (q, *ipso*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 145.03 (q, ipso- C_6H_5), 158.88 (q, C-OCH_3), 218.80 (q, C=O).

MS (FAB, m/z): 304 (23), 303 (100, DMT), 201 (11, M^+ -DMT), 167 (6.1), 57 (19, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

IR (CHCl_3 (Film), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3059 w , 2966 s , 2931 s , 2877 s , 2837 m , 2253 w , 2048 w , 1698 s , 1608 s , 1582 m , 1509 s , 1463 s , 1445 s , 1393 m , 1364 s , 1301 s , 1251 s , 1179 s , 1124 s , 1079 s , 1035 s , 975 s , 900 m , 829 s , 790 m , 754 s , 727 s , 705 s , 667 m , 642 m , 584 s .

$\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_6$: 504.62.

10.2.4 *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-phenylalanin-2-*tert*-butylcarbonyl-2-[*O*-(4,4'-Dimethoxytri-tyl)-hydroxymethyl]-3-tetrahydrofuranyl-ester **22a**, **22b**



Zu der Lösung von 1.074 g **21** (2.13 mmol) in 36 ml CH_2Cl_2 bei 0 °C wurden 1.172 g CMC (2.77 mmol, 1.3 eq) und 35 mg DMAP (0.28 mmol, 0.13 eq) zugegeben. Nach einer halben Stunde Rühren im Eisbad wurde 734.3 mg *N*-BOC-*L*-Phenylalanin (2.77 mmol,

1.3 eq) in 4.2 ml CH_2Cl_2 zugegeben. Das Eisbad wurde nicht entfernt, sondern das Eis und Wasser erwärmt bis RT. Nach 20 h wurde dreimal mit CH_2Cl_2 gegen ges. NaHCO_3 -Lösung extrahiert, getrocknet mit Na_2SO_4 und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Zweimal FC (*tert.*-Butylmethylether : Toluol = 1 : 50 + 1 % TEA) lieferte 247.5 mg **22a** (de = 95 %, 15 %). Die DC für das Verfolgen der Säule wurde mit *tert.*-Butylmethylether : Toluol = 1 : 20 + 1 % TEA durchgeführt. Für **22b** wurde nach der ersten Säule eine weitere FC (EtOAc : P = 1 : 5 + 1 % TEA) durchgeführt, um **22b** von **21** zu trennen. Man erhielt 220.3 mg **22b** (de = 88 %, 14 %). Zusätzlich wurde ein Gemisch von **22a** und **22b** erhalten (661.4 mg, 41 %).

DC (*tert.*-Butylmethylether : Toluol = 1 : 20 + 1 % TEA):

22a: $R_f = 0.30$, **22b**: $R_f = 0.35$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): **22a**: 1.19 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, BOC), 1.39 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Pivaloyl), 1.69 (m, 1H, H-C2), 2.37 (m, 1H, H-C2), 2.93 (dd, $J = 6.2, 13.5$, H-C β), 3.04 (dd, $J = 7.0, 13.1$, H-C β), 3.09 (d, $J = 9.8$, H-C5), 3.32 (d, $J = 9.6$, H-C5), 3.77 (s, 6H, OCH_3), 3.96 (m, 1H, H-C1), 4.15 (m, 1H, H-C1), 4.37 (m, 1H, H-C α), 4.90 (d, $J = 8.8$, NH), 5.32 (d, $J = 4.3$, H-C3), 6.80 (m, 4H, *meta*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.12 (m, 2H, *ortho*- C_6H_5 , *L*-Phe), 7.17-7.31 (m, 10H, arom.), 7.38 (m, 2H, DMT).

22b: 1.25 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, BOC), 1.38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Pivaloyl), 1.97 (dd, $J = 4.6, 13.7$, H-C2), 2.47 (m, 1H, H-C2), 2.79 (dd, $J = 6.8, 13.9$, H-C β), 3.05 (dd, $J = 4.7, 14.0$, H-C β), 3.17 (d, $J = 9.6$, H-C5), 3.38 (d, $J = 9.6$, H-C5), 3.80 (s, 6H, OCH_3), 4.20 (m, 2H, H-C1), 4.43 (m, 1H, H-C α), 4.82 (d, $J = 8.6$, NH), 5.26 (d, $J = 4.8$, H-C3), 6.83 (m, 4H, *meta*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.13 (m, 2H, *ortho*- C_6H_5 , *L*-Phe), 7.17-7.33 (m, 10H, arom.), 7.42 (m, 2H, DMT).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): **22a**: 26.10 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, BOC), 28.29 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Pivaloyl), 30.97 (s, C2), 37.45 (s, C β), 45.40 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Pivaloyl), 54.67 (t, C α), 55.21 (p, OCH_3), 68.17 (s, C1), 68.30 (s, C5), 80.02 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, BOC), 80.67 (t, C3), 86.92 (q,

C5-OC), 95.95 (q, C4), 113.06 (t, *meta*-C₆H₄OCH₃), 126.81, 127.80, 128.23, 128.30, 128.57, 129.28, 129.35, 130.14, 130.17, 135.53, 135.71, 144.53 154.99 (q, C=O, Urethan), 158.46, (q, *para*-C₆H₄OCH₃), 170.68 (q, C=O, Ester), 210.24 (q, C=O, Keton).

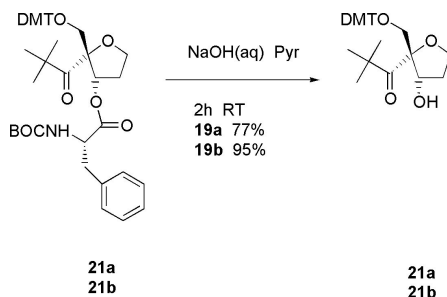
22b: 26.16 (p, C(CH₃)₃, BOC), 28.24 (p, C(CH₃)₃, Pivaloyl), 32.93 (s, C2), 37.60 (s, Cβ), 45.43 (q, C(CH₃)₃, Pivaloyl), 54.17 (t, Cα), 55.20 (p, OCH₃), 68.18 (s, C1), 68.31 (s, C5), 79.92 (q, C(CH₃)₃, BOC), 80.65 (t, C3), 86.95 (q, C5-OC), 95.73 (q, C4), 113.11 (t, *meta*-C₆H₄OCH₃), 125.29, 126.81, 126.97, 127.81, 128.23, 128.53, 129.03, 129.49, 130.15, 135.54, 135.61, 135.71, 137.87, 144.52, 154.98 (q, C=O, Urethan), 158.46, (q, *para*-C₆H₄OCH₃), 170.69 (q, C=O, Ester), 210.34 (q, C=O, Keton).

MS (FAB, m/z): 752 (0.23, M⁺+1), 751 (0.45, M⁺), 304 (24), 303 (100, DMT), 57 (34, C(CH₃)₃).

IR (CHCl₃(Film), $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹): 3420w, 2968m, 1748m, 1699s, 1608m, 1509s, 1456w, 1366m, 1251s, 1176s, 1115w, 1082w, 1035s, 987w, 830m, 754m, 701m.

C₄₅H₅₃NO₉: 751.92.

10.2.5 2-*tert*-Butylcarbonyl-3-hydroxyl-2-[O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-hydroxylmethyl]tetrahydrofuran **21a**, **21b**



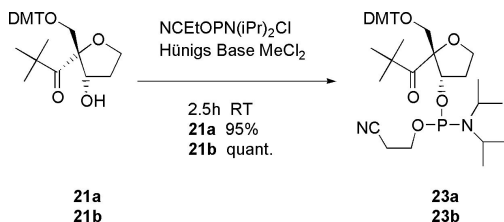
Zur einer Lösung von 323.0 mg **22a** (0.43 mmol) in 2.4 ml Pyridin wurde 0.47 ml NaOH (1 M in H₂O, 0.47 mmol, 1.1 eq) zugegeben. Nach 2 h bei RT wurde Phosphat-Puffer (NaH₂PO₄:Na₂HPO₄ = 1:1, je 0.5 M) zugegeben. Es wurde dreimal mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Na₂SO₄ und Einengen am Rotationsverdampfer wurde mit FC (*tert.*-Butylmethylether:Toluol = 1:20 + 1 % TEA) gereinigt. Man erhielt 167.0 mg **21a** (77 %). Die analoge Behandlung mit 220.3 mg **22b** (0.29 mmol) ergab 0.276 mg **21b** (95 %).

DC (*tert.*-Butylmethylether:Toluol = 1:20 + 1 % TEA): R_f = 0.15

Weitere Daten siehe im Abschnitt 10.2.3 auf S. 98.

C₃₁H₃₆O₆: 504.62.

10.2.6 2-*tert.*-Butylcarbonyl-3-*O*-(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit)-2-[*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-hydroxymethyl]tetrahydrofuran **23a**, **23b**



Zu der Lösung von 167.0 mg **21a** (0.33 mmol), das vorher dreimal mit CH₂Cl₂ coevapuriert wurde, in 5.4 ml CH₂Cl₂ wurde 0.35 ml *N,N*-Diisopropylethylamin (Hünigsbase, 1.98 mmol, 6 eq) und 0.26 ml 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.16 mmol, 3.5 eq) hinzugeotropft. Nach 2½ h bei RT wurde dreimal mittels CH₂Cl₂ und ges. NaHCO₃-Lösung extrahiert, durch Na₂SO₄ getrocknet und mittels Rotationsverdampfer eingengt. FC (Aceton:P = 1:10 + 1 % TEA)

ergab 221.9 mg **23a** (95 %) als Diastereomeregemisch mit Phosphor als neues Stereozentrum. Die analoge Behandlung mit 139.1 mg **21b** (0.276 mmol) ergab 204.5 mg **23b** (quant.).

DC (Aceton:P = 1:10 + 1 % TEA): Für **23a** und **23b**: Diastereomer 1: $R_f = 0.20$, Diastereomer 2: $R_f = 0.10$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): **23a**: Diastereomer 1: 1.11 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.13 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.16 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.18 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.22 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.03 (m, 1H, H-C2), 2.22 (m, 1H, H-C2), 2.54 (t, $J = 6.3$, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.09 (d, $J = 9.6$, H-C5), 3.36 (d, $J = 9.6$, H-C5), 3.53 (m, 2H, CH_2CN), 3.71 (m, 2H, CH_2OP), 3.78 (s, 6H, OCH_3), 4.19 (m, 2H, H-C1), 4.43 (ddd, $J = 1.3$, 4.8, 9.4, H-C3), 6.81 (m, 4H, *meta*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.18 (m, 1H, DMT), 7.24-7.32 (m, 6H, DMT), 7.43 (m, 2H, DMT).

Diastereomer 2: 1.11 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.12 (s, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.14 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.08 (m, 1H, H-C2), 2.26 (m, 1H, H-C2), 2.56 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.08 (d, $J = 9.3$, H-C5), 3.34 (d, $J = 9.3$, H-C5), 3.49 (m, 2H, CH_2CN), 3.68 (m, 1H, CH_2OP), 3.78 (s, 6H, OCH_3), 3.81 (m, 1H, CH_2OP), 4.24 (m, 3H, H-C1, H-C3), 6.80 (m, 4H, *meta*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.17 (m, 1H, DMT), 7.24-7.32 (m, 6H, DMT), 7.41 (m, 2H, DMT).

23b: Diastereomer 1: 1.11 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.13 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.16 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.18 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.22 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.03 (m, 1H, H-C2), 2.22 (m, 1H, H-C2), 2.54 (t, $J = 6.3$, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.08 (d, $J = 9.4$, H-C5), 3.36 (d, $J = 9.4$, H-C5), 3.53 (m, 2H, CH_2CN), 3.70 (m, 2H, CH_2OP), 3.78 (s, 6H, OCH_3), 4.19 (m, 2H, H-C1), 4.43 (dd, $J = 4.5$, 9.0, H-C3), 6.81 (m, 4H, *meta*- $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.18 (m, 1H, DMT), 7.24-7.32 (m, 6H, DMT), 7.42 (m, 2H, DMT).

Diastereomer 2: 1.11 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.12 (s, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.14 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.08 (m, 1H, H-C2), 2.26 (m, 1H, H-C2), 2.56 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.08 (d, $J = 9.6$, H-C5), 3.34 (d, $J = 9.4$, H-C5), 3.49 (m, 2H, CH_2CN), 3.68 (m, 1H, CH_2OP), 3.78 (s, 6H, OCH_3), 3.81 (m, 1H, CH_2OP), 4.19 (m, 2H, H-C1), 4.26 (ddd,

$J = 1.0, 4.8, 9.7$, H-C3), 6.80 (m, 4H, *meta*-C₆H₄OCH₃), 7.17 (m, 1H, DMT), 7.23-7.31 (m, 6H, DMT), 7.41 (m, 2H, DMT).

³¹P-NMR (161 MHz, CDCl₃, δ /ppm): **23a**: Diastereomer 1: 147.84, Diastereomer 2: 146.28, **23b**: Diastereomer 1: 147.90, Diastereomer 2: 146.35.

MS (ESI, m/z): 775 (24, M⁺+K+CH₃OH+1), 774 (53, M⁺+K+CH₃OH), 518 (30), 517 (100), 392 (13), 303(3.3) 270 (6.2).

C₄₀H₅₃N₂O₇P: 704.84.

Anhang A

Einzelstränge

Name ¹	Sequenz ² (5'-3')	ϵ_{260} ³	Masse [g/mol]
ss1	TTT TTT TTT PyT*T TTT TTT TT	166.7	6212.2
ss2 ^{*)}	T ₅ A AAA AAA AAAb AAA AAA AAA AT ₅	397.0	9719.5
ss3	TGC ATC ATPy T*TT ATC AGA GC	203.4	6272.3
ss4 ^{*)}	T ₅ G CTC TGA TAA AAAb TGA TGC AT ₅	306.5	9057.9
ss5	TGC ATC ATPy TT*T ATC AGA GC	203.4	6272.3
ss6	TGC ATC TPyT TT*T ATC AGA GC	196.7	6263.3
ss7 ^{*)}	T ₅ G CTC TGA TAA AAAb AGA TGC AT ₅	313.2	9066.9
ss8	TGC ATC ATPy TTT ATC AGA GC	203.4	6188.2
ss9a ⁴	T ₅ G CTC TGA TAA AAb*A TGA TGC AT ₅	306.5	9142.0
ss9b	T ₅ G CTC TGA TAA AAb*A TGA TGC AT ₅	306.5	9142.0
ss10	TGC ATC ATPy CTT ATC AGA GC	202.1	6173.2
ss11	T ₅ G CTC TGA TAA Gab*A TGA TGC AT ₅	302.6	9158.0
ss13	TGC ATC ACPy TTT ATC AGA GC	202.1	6173.2
ss14 ^{*)}	T ₅ G CTC TGA TAA AAAbG TGA TGC AT ₅	302.6	9073.9
ss12 ^{*)}	T ₅ G CTC TGA TAA GabA TGA TGC AT ₅	302.6	9073.9

ss15	TGC	ATC	ACPy	CTT	ATC	AGA	GC		200.8	6158.2
ss16 ^{*)}	T ₅ G	CTC	TGA	TAA	GAbG	TGA	TGC	AT ₅	298.7	9089.9
ss17	TGC	ATC	AGPy	GTT	ATC	AGA	GC		209.0	6238.2
ss18 ^{*)}	T ₅ G	CTC	TGA	TAA	CAbC	TGA	TGC	AT ₅	290.5	9009.9
ss19	TGC	ATC	AAPy	ATT	ATC	AGA	GC		216.8	6206.2
ss20 ^{*)}	T ₅ G	CTC	TGA	TAA	TAbT	TGA	TGC	AT ₅	293.1	9039.9

¹Die kommerziell erhaltene Oligonucleotide sind mit einem ^{*)} markiert.

²T₅ = TTT TT

³Der berechnete Extinktionskoeffizient wird in der Einheit mM⁻¹ cm⁻¹ angegeben.

⁴Die Ab* aus **ss9a** ist das Enantiomer von Ab* aus **ss9b**.

Anhang B

Doppelstränge

Name	Sequenz	(5'-3')	(3'-5')	T_m [°C]
ds(1-2)	TTT TT	TTT TTT TTT PyT*T	TTT TTT TT AAA AAA AAA AbA A AAA AAA AA TT TTT	34.9
ds(3-4)	TTT TT	TGC ATC ATPy T*TT	ATC AGA GC ACG TAG TAAb A AA TAG TCT CG TT TTT	50.7
ds(5-4)	TTT TT	TGC ATC ATPy TT*T	ATC AGA GC ACG TAG TAAb AA A TAG TCT CG TT TTT	50.0
ds(6-7)	TTT TT	TGC ATC TPyT TT*T	ATC AGA GC ACG TAG AAbA AA A TAG TCT CG TT TTT	51.4
ds(8-9a)	TTT TT	TGC ATC ATPy TTT	ATC AGA GC ACG TAG TAAb* AAA TAG TCT CG TT TTT	59.2
ds(8-9b)	TTT TT	TGC ATC ATPy TTT	ATC AGA GC ACG TAG TAAb* AAA TAG TCT CG TT TTT	56.0
ds(10-11)	TTT TT	TGC ATC ATPy CTT	ATC AGA GC ACG TAG TAAb* GAA TAG TCT CG TT TTT	61.7

Name	Sequenz	(5'-3')	(3'-5')	T_m [°C]
ds(8-4)	TGC ATC ATPy TTT ATC AGA GC	TTT TT ACG TAG TAAb AAA TAG TCT CG TT TTT		58.8
ds(10-12)	TGC ATC ATPy CTT ATC AGA GC	TTT TT ACG TAG TAAb GAA TAG TCT CG TT TTT		46.7
ds(13-14)	TGC ATC ACPy TTT ATC AGA GC	TTT TT ACG TAG TGAb AAA TAG TCT CG TT TTT		52.6
ds(15-16)	TGC ATC ACPy CTT ATC AGA GC	TTT TT ACG TAG TGAb GAA TAG TCT CG TT TTT		51.8
ds(17-18)	TGC ATC AGPy GTT ATC AGA GC	TTT TT ACG TAG TCAb CAA TAG TCT CG TT TTT		54.2
ds(19-20)	TGC ATC AAPy ATT ATC AGA GC	TTT TT ACG TAG TTab TAA TAG TCT CG TT TTT		52.2

Abkürzungen und Symbole

A	Adenosin
Å	Angström
Ab	abasic site (<i>deutsch</i> : abasische Stelle)
Ab*	4'-C-Pivaloyl abasische Stelle
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
Ag ₂ O	Silber(I)oxid
APT	attached proton test (NMR)
ber.	berechnet
bez.	bezüglich
BOC	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BPT	7,8,9,10-Tetrahydroxytetrahydrobenzo[a]pyren
<i>s</i> -BuLi	sekundäres Butyllithium, 2-Butyllithium
<i>t</i> -BuLi	tertiäres Butyllithium, 2-(2-Methyl)propyllithium
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cat	katalytisch
CMC	1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid
CrO ₃ in H ₂ SO ₄	Jones Reagenz

d	Distanz oder Tage
DC	Dünnschichtchromatographie
δ	chemische Verschiebung in ppm (NMR)
dGMP	2'-Desoxyguanosin 5'-monophosphat
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMTCl	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	deoxyribonucleic acid (<i>deutsch</i> : Desoxyribonucleinsäure)
ds	double strand (<i>deutsch</i> : Doppelstrang)
EI	Elektronenstoss-Ionisation
ϵ_{260}	Extinktionskoeffizient bei 260 nm in $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
eq	equivalent (<i>deutsch</i> : Äquivalent)
ESI	Elektrospray-Ionisation
ET	Elektronentransfer
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAB	fast atom bombardment
FC	Flashchromatographie
FT	Fourier Transformation
G	Guanosin
ΔG^*	freie Aktivierungsenergie
ΔG_{25}^0	freie Reaktionsenergie bei 25 °C
$\Delta\Delta G^*$	Unterschied der freien Aktivierungsenergie
$\Delta\Delta G_{25}^0$	Unterschied der freien Reaktionsenergie bei 25 °C
G^{Br}	8-Bromoguanin <i>bzw.</i> 8-Bromoguanosin
G^{oxo}	8-Oxoguanin <i>bzw.</i> 8-Oxoguanosin
G^{Z}	7-Deazaguanin <i>bzw.</i> 7-Deazaguanosin

gem.	gemessen
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HPLC	high performance liquid chromatography
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
IR	Infrarot
k_{ET}	Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers
$k_{ET,rel}$	relative Geschwindigkeitskonstante des ET <i>bez.</i> der Wasseraddition
konz.	konzentriert
m/z	Masse / Ladung
MALDI-Tof	matrix-assisted-laser-desorption-ionisation time-of-flight
max.	maximal
Me	Methyl
MeCl ₂	Dichlormethan, Methylenchlorid
min.	mindestens
Min.	Minute(n)
MPTA	Moshersäure, 2-Methoxy-2-trifluormethyl-2-phenyllessigsäure
MS	Massenspektrometrie
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance (<i>deutsch</i> : Kernspinresonanz)

OAc	Acetat
P	Pentan
Ⓟ	Phosphat
Phe	Phenylalanin
Pivaloyl	<i>tert.</i> -Butylcarbonyl
ppm	parts per million
Py	Pyren-Nucleotid oder Pyren
Pyr	Pyridin
quant.	quantitativ
R	Gaskonstante ($8.31441 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) ^[94]
ROS	Reactive Oxygen Species
RP18	reverse phase; Umkehrphase mit 18 C-Atomen in der Alkylkette
RT	Raumtemperatur (25°C)
SHE	Standard-Wasserstoff-Elektrode
sog.	sogenannt
ss	single strand (<i>deutsch</i> : Einzelstrang)
T	Thymidin
T*	4'-C-Pivaloylthymidin
T _m	DNA-Schmelztemperatur
ΔT _m	Unterschied der DNA-Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TBAF · 3H ₂ O	Tetrabutylamoniumfluorid Trihydrat
TBDMSCl	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TEA	Triethylamin

TEAA	Triethylammoniumacetatpuffer
tert.	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TIPDSCl ₂	1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-dichlorid
Tol	p-Toluoyl
Trityl	Triphenylmethyl
TsOH	para-Toluoylsulfonsäure
UV	ultraviolett
VIS	visible
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- [1] A.L. Lehninger, D.L. Nelso, M.M. Cox in *Prinzipien der Biochemie* **1994**, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- [2] D. Voet, J.G. Voet in *Biochemistry* **1995**, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc. New York.
- [3] G.M. Blackburn, M.J. Gait in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* **1997**, 2nd edition, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- [4] L. Stryer in *Biochemie* **1991**, Nachdruck der völlig Neubearb. Auflage 1991, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- [5] a) J.D. Watson, F.H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737 und 964; b) J.D. Watson in *Die Doppelhelix* **1997**, Rowohlt Verlag, Reinbeck.
- [6] Nobel-Vorträge: a) F.H. Crick, *Angew. Chemie.* **1963**, *75*, 425; b) M.H.F. Wilkins, *Angew. Chemie.* **1963**, *75*, 429; c) J.D. Watson, *Angew. Chemie.* **1963**, *75*, 439.
- [7] W. Saenger in *Principles of Nucleic Acids Structure* **1984**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [8] R.E. Dickerson in Spektrum der Wissenschaft, *Erbsubstanz DNA* **1985**, Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, (Verständliche Forschung), Heidelberg.

- [9] R.D. Wells, S.C. Harvey, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1095.
- [10] A. Rich, A. Nordheim, A.H. Wang, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 791.
- [11] N. Arora, B. Jayaram, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6139.
- [12] J. Šponer, J. Leszczynski, P. Hobza, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5590.
- [13] J. Bertran, A. Oliva, L. Rodriguez-Santiago, M. Sodupe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8159.
- [14] a) J. Florian, J. Šponer, A. Warshal, *J. Phys. Chem.* **1999**, *103*, 884; b) J. Šponer, J. Leszczynski, P. Hobza, *Biopolymers* **2001**, *61*, 3.
- [15] a) O. Sinanoglu in *Molecular Association in Biology* **1968**, Academic Press, New York, 427; b) O. Sinanoglu, S. Abdalnur, *Fed. Proc.* *24* **1965**, *15*, 12.
- [16] D.M. Crothers, D.I. Ratner, *Biochemistry* **1968**, *7*, 1823.
- [17] (a) A.M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656–3660; (b) A. Hariman, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 996–1000.
- [18] C. Wan, T. Fiebig, S.O. Kelly, C.R. Treadway, J.K. Barton, A.H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014–6019.
- [19] S.O. Kelley, J.K. Barton *Science* **1999**, *283*, 375–381.
- [20] (a) K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 167–170; (b) K. Fukui, K. Tanaka, M. Fujitsuka, A. Watanabe, O. Ito, *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *50*, 18–29.
- [21] F.D. Lewis, R. Wu, Y. Zhang, R.L. Letsinger, S.R. Greenfield, M.R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673–676.
- [22] (a) E. Meggers, M.E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950; (b) B. Giese *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631.

- [23] (a) B. Giese, S. Wessely, M. Spormann, U. Lindermann, E. Meggers, M.E. Michel-Beyerle, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1050–1052; (b) E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 474–476.
- [24] (a) D.T. Breslin, G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2311–2319; (b) P.T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G.B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8353–8358.
- [25] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, N. Ichinose, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12688 – 12689.
- [26] M.W. Grinstaff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, Nr. 24, 3845.
- [27] E. Meggers, A. Dussy, T. Schäfer, B. Giese, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, No. 3, 485.
- [28] E. Meggers, *Dissertation* **1999**, Universität Basel.
- [29] (a) R.A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1111; (b) R.A. Marcus, *Biochem. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265.
- [30] B. Giese, E. Meggers, S. Wessely, M. Spormann, A. Biland, *Chimia* **2000**, *54*, No. 10, 547.
- [31] (a) T. Finkel, H.J. Holbrook, *Nature* **2000**, *408*, 239; (b) B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7915; (c) R.S. Sohal, R. Weindurch, *Science* **1996**, *273*, 59; (d) D. Harman, *J. Gerontol* **1957**, *2*, 298.
- [32] R.A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265.
- [33] J.A. Stubbe, D.G. Nocera, C.S. Yee, M.C.Y. Chang, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2167 – 2201.
- [34] J.R. Miller, L.T. Calcaterra, G.L. Closs, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3047.
- [35] V.G. Levich, *Adv. Electrochem. Electrechem. Eng.* **1966**, *4*, 249.

- [36] (a) J. Jortner, N.R. Kestner, *J. Phys. Chem.* **1974**, 78, 2148; (b) J. Jortner, H. Ulstrup, *J. Phys. Chem.* **1976**, 63, 4358.
- [37] (a) P. Sliders, R.A. Marcus, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 741; (b) R.A. Marcus, P. Sliders, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 622.
- [38] O. Farver, O. Pecht, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, 2, 387.
- [39] D.N. Beratan, J.N. Onuchi, J.J. Hopfield, *J. Phys. Chem.* **1987**, 86, 4488.
- [40] M.D. Newton, *Chem. Rev.* **1991**, 91, 767.
- [41] *Handbook of Chemistry and Physics* **1995**, 75th edition, D.R. Lide, H.P.R. Frederikse (Herausgeber), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- [42] T.J. Matray, E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6191 – 6192.
- [43] R.N. Jones *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67, 2127.
- [44] Z. H. Khan, *Spectrochimica Acta* **1989**, 45A, No. 2, 253 – 270.
- [45] A. Nakajima, H. Baba, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1970**, 43, 3, 967.
- [46] (a) N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, No. 16, 2978–2980; (b) N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, No. 21, 4877 – 4883; (c) N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 5, 687 – 691.
- [47] U.B. Christensen, E.B. Pederson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, No. 22, 4918 – 4925.
- [48] (a) N.E. Geacintov, K. Solntsev, L. W. Johnson, J. Chen, A. D. Kolbanovskiy, T. Liu, V.Y. Shafirovich, *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, 11, 561 – 656; (b) V. A. Kuzmin, A. Dourandin, V. Shafirovich, N.E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 1531 – 1535.

- [49] K. Yamana, H. Zako, K. Asazuma, R. Iwase, H. Nakano, A. Murakami, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, No. 6, 1104 – 1106.
- [50] K. Hirakawaa, H. Segawa, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1999**, *123*, 67 – 76.
- [51] E.S. Pysh, N.C. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2124.
- [52] C.A.M. Seidel, A. Schulz, M.H.M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541.
- [53] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063 – 7068.
- [54] A.J. Fatiadi, *Environ. Sci. Technol* **1967**, *1*, 570.
- [55] P.K. Taskar, J.J. Solomon, J.M. Daisey in *Polynuclear aromatic hydrocarbons: Mechanisms, methods and metabolism*. **1985**, M. Cooke, A.J. Dennis (Herausgeber) Battelle Press, Richland WA, p. 1285.
- [56] Y. Mao, J.K. Thomas, *Langmuir* **1992**, *8*, 2501.
- [57] C.A. Reyes, M. Medina, C. Crespo-Hernandez, M.Z. Cedenro, R. Arce, O. Rosario, D.M. Steffenson, I.N. Ivanonov, M.E. Sigman, R. Dabestani, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 415 – 421.
- [58] R.M. Pagni, M.E. Sigman in *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2, Part L, *Environmental Photochemistry* **1999**, P. Boule (Herausgeber), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- [59] (a) M. Manoharan, K.L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **1995**, *99*, 17461; (b) T. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M.S. Sigman, B.E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119.
- [60] (a) C.E. Kerr, C.D. Mitchell, Y.-M. Ying, B.E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2166 – 2175; (b) C.D. Mitchell, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 125; (c) C.E. Kerr, C.D. Mitchell, J. Headrick, B.E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1637.

- [61] S.T. Gaballah T.L. Netzel, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2002**, *21*, 10, 681.
- [62] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Comm.* **2003**, 1878-1879.
- [63] T. Tadaka, K. Kawai, S. Tojo, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14052 – 14057.
- [64] W.D. Cantor, M.M. Warshaw, *Biopolymers* **1970**, *9*, 1059.
- [65] (a) T.E. Haran, D.M. Crothers, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2763 – 2767;
(b) R.E. Dickerson, *Nucleic Acids Research* **1998**, *26*, 8, 1906 – 1926;
(c) W.D. Wilson, E.T. Zuo, R.L. Jones, G.L. Zon, B.R. Baumstark, *Nucleic Acids Research* **1987**, *15*, 1, 105 – 118.
- [66] (a) A.S. Biland-Thommen, *Dissertation* **2002**, Universität Basel;
(b) B. Giese, A. Biland, *Chem. Com.* **2002**, *7*, 667 – 672.
- [67] R. X.-F. Ren, N. C. Chaudhuri, P.L. Paris, S. Rumney IV, E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671 – 7678.
- [68] U. Wichai, S.A. Woski, *Org. Lett.* **1999**, *1*, No. 8, 1173 – 1175.
- [69] (a) S. Hilbrand, *Dissertation* **1997**, Universität Bern; (b) S. Hilbrand, A. Blaser, S. P. Parel, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *120*, 5499–5511.
- [70] (a) R. Khazanchi, P.L. Yu, F. Johnson, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 9, 2552 – 2556; (b) K. Tanaka, M. Shionoya, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 14, 5002 – 5003.
- [71] (a) A. Gugger, *Dissertation* **2000**, Universität Basel, 107–115; (b) R. Glatthar, M. Spichty, A. Gugger, R. Batra, W. Damm, M. Mohr, H. Zipse, B. Giese, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 25, 4117–4128.
- [72] T.W. Greene, P.G.M. Wuts in *Protective Groups in Organic Synthesis* **1999**, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto, Singapore.

- [73] R.O. Schönleber, *Diplomarbeit* **1997**, Universität Basel, p. 34.
- [74] A.R. Maguire, I. Hladezuk, A. Ford, *Carbohydrate Research* **2002**, *337*, 369 – 372.
- [75] (a) J.A. Dale, D.L. Dull, H.S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543; (b) J.A. Dale, H.S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512.
- [76] M. Poncioni, *Dissertation* **1998**, Universität Basel, 58 – 65.
- [77] (a) A. Marx, P. Erdmann, M. Senn, S. Körner, T. Jungo, M. Petretta, P. Imwinkelried, A.P. Dussy, K.J. Kulicke, L. Macko, M. Zehnder, B. Giese, *Helv. Chimica Acta* **1996**, *79*, 7, 1980 – 1994; (b) A. Marx, *Dissertation* **1997**, Universität Basel.
- [78] D. Kusch, *Forschungsbericht über den Postdoc-Aufenthalt* **1997**, Universität Basel, 39 – 54.
- [79] U. Schwitter, *Dissertation* **1998**, Universität Basel, p. 184.
- [80] (a) C.O. Yang, H.Y. Wu, E.B. Fraser-Smith, K.A.M. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 37; (b) C.O. Yang, W. Kurz, E.M. Egli, M.J. McRoberts, J.P.H. Verheyden, L.J. Kurz, K.A.M. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 41.
- [81] R.E. Donaldson, P.L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2108.
- [82] P.G.M. Wuts, S.S. Bigelow, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5023.
- [83] E.J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190.
- [84] K.E. Pfitzner, J.G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 24, 5661 – 5670.
- [85] (a) B.K. Robert Jr., P. Shao, J.J. Mullins, *Organic Syntheses* **2000**, *77*, 141 – 152; (b) I.E. Robert, L. Liu, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 10, 2899.

- [86] (a) T. Imamoto, T. Kusumoto, Y. Tawarayama, Y. Sugiura, T. Mita, Y. Hatanaka, M. Yokoyama, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3904; (b) T. Imamoto, Y. Sugiura, N. Takiyama, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4233.
- [87] A.J. Mancuso, D. Swern, *Synthesis* **1981**, 165.
- [88] N.P. Crouch, R.M. Adlington, J.E. Baldwin, M.-H. Lee, C.H. MacKinnon, D.R. Paul, *Tetrahedron* **1997**, *53*, No. 31, 10827-10840.
- [89] (a) N.D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, *Nucl. Acids. Res.* **1984**, *12*, 4539; (b) M.L. Svendsen, J. Wengel, O. Dahl, F. Kirpekar, P. Roepstorff, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11341.
- [90] E. Pretsch, J. Seibel, W. Simon, T. Clerc in *Strukturaufklärung organischer Verbindungen* **1986**, Fresenius, J.F.K. Huber, E. Pungor, W. Simon, T.S. West (Herausgeber), Springer Verlag, Berlin.
- [91] A. Zryd, T. Liechti, J.D. Wagniere, *Ann. Improbable Res.* **1995**, *1*, No. 3, 45.
- [92] R.K. Müller, R. Keese, A. Pfaltz in *Grundoperationen der präoperativen organischen Chemie* **1988**, R.K. Müller, R. Keese (Herausgeber), Juris Druck & Verlag AG, Zürich.
- [93] Z. Zhang, J.Y. Tang, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 331.
- [94] C.E. Mortimer in *Chemie Das Basiswissen der Chemie* **1987**, 5. Auflage, Ulrich Müller (Herausgeber), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Lebenslauf

Olivier Boss

Geboren am 10. September 1974

Heimatort: Seftigen (BE), Schweiz

Ausbildung

- 1990 – 1995 Realgymnasium Bern-Kirchenfeld.
1995 – 2000 Chemiestudium an der Universität Bern.
Diplomarbeit in organischer Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. J.-L. Reymond. Titel: "Neue Aminocyclopentitol als Glycosidase Inhibitoren"
Seit 2000 Doktorarbeit an der Universität Basel unter Leitung von Prof. Dr. B. Giese. Titel: "Untersuchungen zur pyrenmodifizierten DNA"

Lehrtätigkeit

- Seit 2001 Assistent im anorganischen Praktikum für Studierende der Biologie und Nanowissenschaften an der Universität Basel.

Publikationen

- O. Boss, E. Leroy, A. Blaser, J.-L. Reymond, *Organic Letters* **2000**, *2*, 151 – 154.
O. Boss, B. Giese, *Helv. Chim. Act.* in Vorbereitung.

An meiner Ausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

Y. Allemann, K. Allenbach, A. Arni, P. Bigler, H.-P. Blau, A. Boschetti, R. Braun, G. Calzaferri, U. Candrian, H. Debrunner, S. Decurtins, P. Eberhardt, W. Eichenberger, P. Engel, B. Erni, B. Giese, B. Giovanoli, H. Glättli, H.-U. Güdel, H.E. Herzig, W. Hofstetter, P. Hübner, J. Hulliger, M. Hürzel, F. Joss, R. Keese, T. Kiefhaber, J. Kohli, U. Krähenbühl, C. Leumann, S. Leutwyler, A. Ludi, J. Lüthy, U. Marti, C. Meier, V. Meier, A. Meyer, M. Neuenschwander, H.-P. Pfander, W. Popp, K. Pretzel, J.-L. Reymond, C. Rothen, A. Rudaz, E. Schmidt, H. Siegenthaler, G. Süss-Fink, T. Ward, H. Wennemers.

Dipl. chem. Olivier Boss

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation “Untersuchungen zur pyrenmodifizierten DNA” selbständig und nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Basel, den 30. September 2004

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'OBoss', written in a cursive style.

Olivier Boss