

3 METHODEN

3.1 Allgemeines

Alle Versuche mit Substanzen, die eine photospaltbare Gruppe enthielten, wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Dazu wurden alle Glasgeräte und Säulen mit Alufolie abgeschirmt bzw. braune Reaktions-Gefäße verwendet. Vor den Experimenten wurden alle Glasgeräte bei 170°C ausgeheizt, alle Eppendorf-Gefäße, PCR-Gefäße und Pipetten-Spitzen autoklaviert. CH₂Cl₂ wurde als Lösungsmittel in den Synthesen 3.2.2, 3.2.5, 3.2.8, 3.2.11 und 3.2.19 frisch über CaH₂ destilliert. Alle Experimente mit Di- und Oligonukleotiden wurden steril durchgeführt, eigene Lösungen und Puffer wurden mit vorentsatztem deionisierten Wasser (Millipore) angesetzt und steril filtriert.

3.2 Organische Synthesen

3.2.1 Dünnschicht-Chromatographie (DC)

R_f-Werte wurden durch Dünnschichtchromatographie auf 2,5x8,5cm Kieselgel-beschichteten Aluminiumplatten bestimmt. In den Versuchen 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.7 – 3.2.12 fand ein Vorlauf im entsprechenden Laufmittel statt.

3.2.2 1-*o*-Nitrophenyl-3-buten-1-ol 5

1,375 g (9 mmol) *o*-Nitrobenzaldehyd **4** wurden in 50 ml CH₂Cl₂ unter Argon in einem Zweihalskolben vorgelegt. Unter Rühren bei -78°C wurden nun zunächst 21,75 ml einer 1M TiCl₄-Lösung (in CH₂Cl₂) und anschließend 5,25 ml (32,5 mmol) Allyltrimethylsilan vorsichtig zugetropft. Nach 1h Rühren bei -78°C wurde das Reaktionsgemisch in 30 min auf RT erwärmt und anschließend bei 0°C unter Rühren mit 40 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt. Das Zweiphasengemisch wurde viermal mit 100 ml H₂O ausgeschüttelt und die vereinigten wässrigen Phasen mit 200 ml Ethylacetat reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. An dieser Stelle war bereits eine Ozonisierung des Rohprodukts möglich (vergl. 3.2.3).

Das Rohprodukt wurde nun über eine Kieselgelsäule (3,5x14,5 cm) mit Hexan:Ethylacetat (8:2) als Laufmittel gereinigt, um 0,82 g (4,26 mmol, 47%) des gewünschten Produkts als orange-weißen Feststoff zu erhalten.

R_f = 0,32 (Hexan:Ethylacetat = 8:2)

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3 , bezogen auf TMS): δ = 2.3-2.4 (m, 1H, $\text{Ar}(\text{CHOH})\text{C}\underline{\text{H}}\text{H}'\text{C}_2\text{H}_3$); 2.5-2.7 (m, 1H, $\text{Ar}(\text{CHOH})\text{CH}\underline{\text{H}}'\text{C}_2\text{H}_3$); 2.7-3.0 (s, 1H, $\text{RO}\underline{\text{H}}$); 5.0-5.2 (m, 2H, $\text{ArC}\underline{\text{H}}\text{ROH}$, $\text{RCH}=\text{C}\underline{\text{H}}\text{H}'$); 5.2-5.3 (m, 1H, $\text{RCH}=\text{CH}\underline{\text{H}}'$); 5.7-5.9 (m, 1H, $\text{RC}\underline{\text{H}}=\text{CH}_2$); 7.3-7.45 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7.5-7.6 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7.65-7.8 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7.8-7.9 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$)

^{13}C NMR (62,5 MHz, CDCl_3): δ = 42.65; 68.25; 118.63; 124.17; 127.95(2x); 133.28; 133.85; 139.22; 147.52

MS (EI): m/z = 194 (0.06%, MH^+); 176 (0.58%, $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$); 152 (100%, $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_3$); 104 (70%, $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O} - \text{NO}$); 77 (49%, C_6H_5^+)

Elementaranalyse für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$: Berechnet: C=62.17%; H=5.74%; N=7.25%;
Gefunden: C=61.52%; H=5.73%; N=6.67%

3.2.3 1-*o*-Nitrophenyl-1,3-propandiol **6**

Ozon wurde bei -78°C für 45 min durch eine gerührte Lösung von 0,82 g (4,26 mmol) 1-*o*-Nitrophenyl-3-buten-1-ol **5** in 90 ml wasserfreiem Methanol geleitet, bis die Farbe der Lösung von gelb nach schwach blau umschlug. Anschließend wurde für weitere 30 min mit O_2 gespült. Nach langsamer Zugabe von 1,7 g (45 mmol) NaBH_4 wurde das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt, weitere 30 min gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der zurückbleibende Feststoff wurde in 130 ml Ethylacetat aufgenommen und bei 0°C unter Rühren mit 90 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigte organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Nach Reinigung des Rohproduktes über eine Kieselgelsäule (Hexan:Ethylacetat = 6:4) wurden 0,246 g (1,25 mmol, 30%) des gewünschten Diols als gelbes Öl erhalten.

Eine Ozonisierung des Rohprodukts von 3.2.2 führte bei gleichen Bedingungen nach Ozonolyse, reduktiver Aufarbeitung und Extraktion mit einer Ausbeute von 86% direkt zum reinen Diol.

R_f = 0,15 (Hexan:Ethylacetat = 6:4)

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3 , bezogen auf TMS): δ = 1.6-2.2 (2H, $\text{Ar}(\text{CHOH})\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 3.3-3.7 (s, 1H, $\text{RCH}_2\text{O}\underline{\text{H}}$); 3.7-4.1 (2H, $\text{RC}\underline{\text{H}}_2\text{OH}$); 4.3-4.7 (s, 1H, $\text{ArCHRO}\underline{\text{H}}$); 5.2-5.5 (1H, $\text{ArC}\underline{\text{H}}\text{ROH}$); 7.2-7.45 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7.45-7.65 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7.65-8.0 (2H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$)

^{13}C NMR (62,5 MHz, CDCl_3): δ = 39.47; 61.18; 68.96; 124.18; 127.99(2x) ; 133.55; 139.91; 147.08

UV (in H_2O): λ_{max} = 262.5 nm

3.2.4 1-*o*-Nitrophenyl-3-O-dimethoxytrityl-1,3-propandiol 7

173 mg des Diols 6 (0,88 mmol) in 10 ml Pyridin wurden bei 0°C mit 175 µl (1,26 mmol) Triethylamin (TEA), 5 mg (0,04 mmol) 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) und 0,414 g (1,2 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht (15 h) bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und viermal mit 50 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden mit 50 ml Ethylacetat reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet, und das Solvens am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Reinigung des Rohproduktes über eine Kieselgelsäule mit Hexan:Ethylacetat:TEA (6,9:2,9:0,2) als Laufmittel ergab 0,21 g (0,42 mmol, 48%) des gewünschten Produkts 5 als gelben Schaum.

R_f = 0,27 (Hexan:Ethylacetat:TEA=6,9:2,9:0,2); Rotfärbung im HCl-Dampf

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃, bezogen auf TMS): δ = 1.7-2.0 (m, 1H, Ar(CHOH)CHH'CH₂ODMTr); 2.05-2.2 (m, 1H, Ar(CHOH)CHH'CH₂ODMTr); 3.3-3.45 (m, 2H, Ar(CHOH)CHH'CH₂ODMTr); 3.7-3.75 (s, 6H, DMTr-OCH₃); 4.0-4.15 (m, 1H, ArRCHOH); 5.3-5.4 (dd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 2.5 Hz, 1H, ArRCHOH); 6.7-6.8 (4H, DMTrH); 7.1-7.4 (10H, DMTrH, ArH); 7.45-7.55 (1H, ArH); 7.75-7.85 (2H, ArH)

¹³C NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 37.93; 55.21 (2C); 62.58; 69.51; 87.19; 113.25; 124.28; 126.93; 127.81; 127.99; 128.31; 129.94; 133.36; 135.64; 135.71; 139.86; 144.48; 147.45; 158.56

MS (EI): m/z = 500 (3.2%, MH⁺); 499 (8.7%, M⁺); 422 (2.8%, MH⁺ - C₆H₅[•]); 303 (100%, DMTr⁺)

3.2.5 1-*o*-Nitrophenyl-1-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidyl)-3-O-dimethoxytrityl-1,3-propandiol 9

Zu einer gerührten Lösung von 200 mg (0,4 mmol) des Alkohols 7 in 3,5 ml CH₂Cl₂ und 250 µl (1,44 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) wurde unter Argon bei Raumtemperatur 160 µl (0,68 mmol) Phosphorigsäure(2-cyanoethylester)diisopropylamid-chlorid 8 getropft. Nach 15 min war der Ausgangsstoff 7 vollständig umgesetzt. Das Gemisch wurde mit 20 ml Ethylacetat verdünnt und viermal mit 20 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung ausgeschüttelt, wobei

sich eine kirschrote Substanz bildete, die z.T. ausfiel. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden mit 20 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 gefiltert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte über eine Kieselgelsäule (1x20 cm) mit Hexan:Ethylacetat:TEA (6,9:2,9:0,2) als Elutionsmittel und lieferte 0,17 g (0,23 mmol, 60%) des gewünschten Phosphoramidits 9 als gelben, glasartigen Feststoff.

Das Produkt wurde in 1 ml Acetonitril aufgenommen, in ein braunes, für die Automaten-synthese geeignetes Fläschchen überführt und im Hochvakuum getrocknet.

$R_f = 0,38; 0,49$ (Hexan:Ethylacetat:TEA=6,9:2,9:0,2)

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , bezogen auf TMS): $\delta = 0.9-1.3$ (dd, 12H, $\text{NCH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$); 2.0-2.2 (m, 1H, $\text{Ar}(\text{CHOR})\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{CH}_2\text{ODMTr}$); 2.2-2.4 (m, 3H, $\text{Ar}(\text{CHOR})\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{CH}_2\text{ODMTr}$, $\text{OCH}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CN}$); 3.2-3.35 (t, 2H, $\text{Ar}(\text{CHOH})\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{ODMTr}$); 3.4-3.7 (m, 4H, $\text{NCH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$, $\text{OCH}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CN}$); 3.7-3.8 (s, 6H, DMTr-OCH_3); 5.4-5.5 (m, 1H, $\text{ArRC}\underline{\text{H}}\text{OP}$); 6.7-6.8 (4H, $\text{DMTr}\underline{\text{H}}$); 7.1-7.45 (10H, $\text{DMTr}\underline{\text{H}}$, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7.45-7.65 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7.65-7.8 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$); 7,8-7,95 (1H, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$)

$^{13}\text{C NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3 , DEPT = -/0/+): $\delta = 19.80$ (+); 19.92 (+); 24.33 (+); 24.44 (+); 39.25 (-); 42.92 (+); 43.11 (+); 55.03 (+); 57.69 (-); 58.02 (-); 60.29 (-); 68.99 (+); 69.26 (+); 86.00 (0); 112.86 (+); 117.24 (0); 123.82 (+); 126.45 (+); 127.60 (+); 127.75 (+); 127.99 (+); 129.21 (+); 129.86 (+); 132.89 (+); 136.37 (0); 139.18 (0); 145.10 (0); 147.18 (0); 158.18 (0)

$^{31}\text{P NMR}$ (200MHz, CDCl_3): $\delta = 146,20$ (Sextett, $J=7\text{Hz}$); 147,81 (Sextett, $J=9\text{Hz}$)

MS (EI): $m/z = 716$ (0.23%, $\text{MH}^+ + \text{O}$); 715 (0.55%, $\text{M}^{+\bullet} + \text{O}$); 499 (0.23%, $\text{M}^{+\bullet}$ - $(\text{CNEtO})\text{NiPr}_2\text{POH}$); 465 (0.64%); 396 (0.97%, $\text{MH}^+ - \text{DMTr}$); 320 (1.17%, $\text{DMTrOH}^{+\bullet}$); 303 (100%, DMTr^+)

3.2.6 4-[2-Methoxy-4-(1-hydroxyethyl)-5-nitrophenoxy]-butanol 12

In einer ausgeheizten und mit Schutzgas gespülten Apparatur wurden 970 mg (3,25 mmol) des getrockneten Nitroveratryl-Derivates 10 in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und anschließend unter Gasentwicklung bei -5°C tropfenweise mit 4 ml (4 mmol) einer 1M BH_3 -THF-Lösung versetzt. Der klare, gelbe Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur 16 Stunden gerührt, worauf sich eine gelblich-gallertartige Masse bildete. Diese wurde durch Zugabe von 6 ml Essigsäure/ H_2O (1:1) aufgelöst, das Lösungsmittel wurde abgezogen und der gelbe Rückstand in 12 ml einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung aufgenommen. Nach dreifacher Extraktion mit 15 ml Ethylacetat wurden die vereinigten organischen Phasen mit

15 ml NaHCO₃ (ges.) gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen anschließend mit 15 ml Ethylacetat reextrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das gelbe Produkt (530 mg, 1,86 mmol, 60%) erwies sich als so rein (DC, ¹H-NMR, MS), sodass es ohne Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden konnte.

R_f = 0,54 (CH₂Cl₂ : MeOH = 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.35 (d, 6.2 Hz, 3H, CH₃-CHOH-Ar), 1.6 (quin, 8.3 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂OH), 1.75 (quin, 7.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂OH), 3.43 (quar, 6.2 Hz, 2H, CH₂-CH₂OH), 3.85 (s, 3H, CH₃-O-Ar), 4.05 (t, 6.3 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-), 5.25 (quar, 6.4 Hz, 1H, CH₃-CHOH-Ar), 7.35 (s, 1H, H-Ar), 7.5 (s, 1H, H-Ar)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, DEPT = - / 0 / +) δ = 25.17 (-), 25.3 (+), 28.9 (-), 56.04 (+), 60.37 (-), 63.92 (+), 68.66 (-), 108.17 (+), 109.00 (+), 137.86 (0), 138.89 (0), 146.40 (0), 153.40 (0)

MS (FAB⁻): m/z = 285 (100%, M⁻), 270 (77%, [M-CH₃]⁻), 212 (55%, [M-C₄H₈OH]⁻), 197 (27%, [M-CH₃, -C₄H₈OH]⁻)

3.2.7 1-[4,4'-Dimethoxytrityloxy]-4-[2-methoxy-4-(1-hydroxyethyl)-5-nitrophenoxy]-butan 14

0,53 g (1,86 mmol) des Diols 12 gelöst in 14 ml Pyridin wurden unter Argon bei 0 °C 388 µl (2,77 mmol) Triethylamin (TEA), 11 mg (8,8 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und 913 mg (2,65 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) hinzugegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in 40 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit 20 ml Ethylacetat reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen.

Über eine Flash-Säule (Silicagel; h = 21cm; Ø = 4cm) wurde das Rohprodukt gereinigt, wobei zunächst mit Hexan : Ethylacetat (1:1) + 1%TEA gewaschen und anschließend das Produkt mit Hexan: Ethylacetat:TEA (5,9 : 3,9 : 0,2) eluiert wurde. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 180 mg (0,31 mmol, 17%) des gelben, öligen Produktes isoliert werden.

R_f = 0,16 (Hex : EE : TEA = 5,9:3,9:0,2)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.55 (d, 6.7 Hz, 3H, CH₃-CHOH-Ar), 1.75 (quin, 6.7 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-), 2.0 (quin, 7.4 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-), 3.17 (t, 6.3 Hz, 2H,

-CH₂-CH₂-ODMTr), 3.75 (s, 6H, CH₃-O-DMTr), 3.9 (s, 3H, CH₃-O-Ar), 4.0 (t, 6.5 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-), 5.55 (quar, 6.2 Hz, 1H, CH₃-CH(OH)-Ar), 6.78-6.84 (m, 4H, H-DMTr), 7.18-7.35 (m, 8H, H-DMTr, H-Ar), 7.4-7.47 (m, 2H, H-DMTr), 7.5 (s, 1H, H-Ar)

¹³C-NMR (CDCl₃, DEPT = - / 0 / +) δ = 24.20 (+), 26.00 (-), 26.34 (-), 55.16 (+), 56.31 (+), 62.65 (-), 65.71 (+), 69.17 (-), 85.78 (0), 108.55 (+), 108.76 (+), 112.96 (+), 119.04 (0), 126.60 (+), 127.69 (+), 128.12 (+), 129.94 (+), 136.5 (0), 139.56 (0), 145.16 (0), 147.14 (0), 154 (0), 158.28 (0)

MS (FAB⁺): m/z = 587 (4%, M⁺), 570 (5%, [M-OH]⁺), 303 (39%, [DMTr]⁺)

3.2.8 1-[4,4'-Dimethoxytrityloxy]-4-[2-methoxy-4-(1-[2-cyanoethyl-N,N'-diisopropylphosphoramiditoxy]-ethyl)-5-nitrophenoxy]-butan 16

Unter Argon wurden 180 mg (0,31 mmol) des Alkohols 14 in 3 ml Dichlormethan gelöst, bei Raumtemperatur mit 200 µl Diisopropylethylamin (DIPEA) und 125 µl (0,53 mmol) Phosphorigsäure(2-cyanethylester)diisopropylamid-chlorid 8 versetzt und für 20 Minuten gerührt. Dann wurde der Ansatz mit 20 ml Ethylacetat verdünnt und viermal mit 18 ml einer gesättigten Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit 20 ml Ethylacetat reextrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Reinigung des Rohproduktes über eine Flash-Säule (Silicagel; h = 21cm, Ø = 3cm) mit den Laufmitteln Hexan:Ethylacetat (1:1 + 1% TEA) und CH₂Cl₂:MeOH (9:1 + 1% TEA) ergab 141 mg (1,8 mmol, 58%) des gewünschten gelben Phosphoramidites 16.

R_f = 0,78 (Hexan : Ethylacetat = 1:1 + 1% TEA)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.2 (dd, 7.5Hz, 12H, iPr-CH₃), 1.58 (d, 5.5 Hz, 3H, CH₃-CHOR-Ar), 1.79 (quin, 6.9 Hz, 2H, ArO-CH₂-CH₂-CH₂-), 2.0 (quin, 6.9 Hz, 2H, ArO-CH₂-CH₂-CH₂-), 2.61 (d/t/d, 35.5/6.4/2.5 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CN), 3.14 (t, 6.1 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-ODMTr), 3.45-4.0 (m, 4H, N(CH₂(CH₃)₂)₂), O-CH₂-CH₂-CN), 3.78 (s, 6H, CH₃-O-DMTr), 3.96 (d, 2.8 Hz, 3H, CH₃-O-Ar), 4.05 (t, 2H, Ar-O-CH₂-), 5.62-5.77 (m, 1H, CH₃-CH(OH)-Ar), 6.84 (s, 2H, H-DMTr), 6.87 (s, 2H, H-DMTr), 7.2-7.4 (m, 9H, H-DMTr, H-Ar), 7.43-7.5 (m, 2H, H-DMTr), 7.55 (d, 2.5 Hz, 1H, H-Ar)

¹³C-NMR (CDCl₃, DEPT = - / 0 / +) δ = 20.32 (-), 20.44 (-), 24.27 (+), 24.38 (+), 24,58(+), 24.98 (+), 26.04 (-), 26.37 (-), 43.0 (+), 43.25 (+), 55.15 (+), 56.34.(+), 58.12 (-), 58.45 (-), 58.65 (-), 62.67 (-), 67.30 (+), 67,67 (+), 69,13 (-), 85.77 (0), 108.32 (+), 109,37 (+), 112.96

(+), 118.46 (?), 126.6 (+), 127.69 (+), 128.12 (+), 129.95 (+), 136.48 (0), 139.01 (0), 145.19 (0), 147.07 (0), 153.87 (0), 153.97 (0), 158.31 (0)

^{31}P -NMR (CDCl_3): δ = entkoppelt: 148.185, 148.148 (gekoppelt: Sextett)

MS (FAB $^-$): m/z = 787 (23%, M^-)

3.2.9 4-[2-Methoxy-4-(1-[4,4'-dimethoxytrityl]-ethyl)-5-nitrophenoxy]-butansäure **11**

In einer ausgeheizten und mit Schutzgas gespülten Apparatur wurden 992 mg (3,32 mmol) der getrockneten 4-[2-Methoxy-4-(1-hydroxyethyl)-5-nitrophenoxy]-butansäure **10** gelöst in 24 ml Pyridin bei 0°C mit 664 μl (4,78 mmol) Triethylamin (TEA), 18 mg (0,15 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und 1,64 g (4,55 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) versetzt und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand mit 55 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 50 ml einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden zweimal mit 25 ml Ethylacetat reextrahiert und die organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde über eine Flash-Säule (Silicagel; h = 24 cm; \varnothing = 4 cm) nacheinander mit den Laufmitteln Hexan:Ethylacetat:TEA (8:2:1), Hexan:Ethylacetat (1:1 + 1% TEA), Hexan:Ethylacetat (3:4 + 1% TEA) und CH_2Cl_2 :MeOH (8:2 + 1% TEA) gereinigt. Mit dem letzten Laufmittel wurden 0,94 g (1,56 mmol, 47%) des gewünschten gelben, öligen Produktes **11** nach Trocknen an der Ölpumpe erhalten.

R_f = 0,35 (Hexan : Ethylacetat = 7:3 + 1% TEA)

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.6 (d, 5.5 Hz, 3H, CH_3 -CH(ODMTr)-Ar), 2.1 (quin, 5.5 Hz, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -), 2.55 (t, 5.7 Hz, 2H, $-\text{CH}_2$ - CH_2 -COOH), 3.7 (s, 3H, CH_3 -O-DMTr), 3.72 (s, 3H, CH_3 '-O-DMTr), 3.8 (s, 3H, CH_3 -O-Ar), 4.0 (t, 6.3 Hz, 2H, $-\text{CH}_2$ - CH_2 -O-Ar), 5.3 (quar, 6.2 Hz, 1H, CH_3 - CH (ODMTr)-Ar), 6.65 (t, 4H, H -DMTr), 7.25 (m, 9H, H -DMTr), 7.45 (s, 1H, H -Ar), 7.5 (s, 1H, H -Ar)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , DEPT = - / 0 / +): δ = 22.5 (+), 24 (+), 24.5 (+), 55 (+), 56.5 (+), 67.5 (+), 68 (+), 87 (+), 107.5 (+), 110 (+), 113 (+), 118.5 (-), 123 (+), 126.5 (+), 127.5 (+), 130 (+), 136 (+), 138 (+), 145 (0), 145.5 (0), 148.5 (0), 153 (0), 158 (0), 177 (0)

MS (FAB $^-$): m/z = 601 (18%, M^-), 586 (4%, $[\text{M}-\text{CH}_3]^-$), 514 (19%, $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8\text{OH}]^-$)

3.2.10 4-[2-Methoxy-4-(1-[4,4'-dimethoxytrityl]-ethyl)-5-nitrophenoxy]-butanol 13

0,86 g (1,43 mmol) des in Pyridin vorgetrockneten Carboxylates 11 wurden mit 165 mg N-Hydroxysuccinimid unter Argon in 10 ml THF (sureseal) : Pyridin (9:1) gelöst und bei 0°C mit 277 mg (1,43 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) versetzt. Nach 15-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der entstandene weiße Niederschlag abgefiltert und mit 10 ml THF gewaschen. Das Eluat wurde bei 0°C mit 541 mg (14,3 mmol) NaBH₄ versetzt, für zwei Stunden gerührt und anschließend mit 5 ml Methanol verdünnt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der gelbliche Feststoff in 35 ml Ethylacetat aufgenommen. Auf einem Eisbad wurde nun unter starkem Rühren 50 ml einer gesättigten NaHCO₃-Lösung hinzugefügt und danach die wässrige Phase zweimal mit 45 ml Ethylacetat reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über eine Flash-Säule (Silicagel; h = 21cm; Ø = 4cm) mit Hexan:Ethylacetat (6:4 + 1% TEA) als Laufmittel und Hexan:Ethylacetat (4:6 + 1% TEA) als Elutionsmittel. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 100 mg (12%) des gewünschten Produktes 13 erhalten werden.

R_f = 0,67 (Hexan : Ethylacetat = 2:8 + 1% TEA)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.52 (d, 5.5 Hz, 3H, CH₃-CH(ODMTr)-Ar), 1.66 (quin, 5.5 Hz, 2H), 1.85 (-CH₂-CH₂-CH₂OH (quin, 5.6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂OH), 3.3 (d/quar, 18.7/6.75 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂OH), 3.71 (s, 3H, CH₃-O-DMTr), 3.73 (s, 3H, CH₃'-O-DMTr), 3.82 (s, 3H, CH₃-O-Ar), 3.97 (t, 5.6 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-), 5.32 (quar, 5.8 Hz, 1H, CH₃-CH(ODMTr)-Ar), 6.57-6.68 (m, 4H, H-DMTr), 7.08-7.28 (m, 9H, H-DMTr), 7.45 (s, 1H, H-Ar), 7.48 (s, 1H, H-Ar)

¹³C-NMR (CDCl₃, DEPT = - / 0 / +): δ = 24.6 (+), 25.37 (-), 29.5 (-), 55.12 (+), 56.0 (+), 62.21 (-), 67.99 (+), 69.08 (-), 87.03 (0), 107.64 (+), 110.04 (+), 112.74 (+), 112.88 (+), 126.68 (+), 127.70 (+), 129.97 (+), 130.10 (+), 135.94 (0), 136.34 (0), 138.27 (0), 138.47 (0), 145.63 (0), 145.70 (0), 153.16 (0), 158.28 (0), 158.37 (0)

3.2.11 1-[2-Cyanoethyl-N,N'-diisopropylphosphoramiditoxy]-4-[2-methoxy-4-(1-[4,4'-dimethoxytrityl]-ethyl)-5-nitrophenoxy]-butan 15

Unter Argon wurden 0,1 g (0,17 mmol) des Alkohols 13 in 5 ml Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur mit 110 µl Diisopropylethylamin (DIPEA) und 168 µl (0,71 mmol) 2-Phosphorigsäure(2-cyanethylester)diisopropylamid-chlorid 8 versetzt. Nach 80-minütigem Rühren wurde der Reaktionsansatz mit 20 ml Ethylacetat verdünnt und viermal mit je 15 ml

einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit 15 ml Ethylacetat reextrahiert. Die getrockneten und eingeeengten organischen Phasen wurden über eine Flash-Säule (Silicagel; h = 21cm, Ø = 2cm) mit Hexan:Ethylacetat (1:1 + 1% TEA) als Laufmittel gereinigt. Nach Trocknen an der Ölpumpes konnten 45 mg (57 µmol, 34%) des gelben Phosphoramidites 15 isoliert werden.

R_f = 0,82 (Hexan : Ethylacetat = 1:1 + 1% TEA)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.1 (dd, 0.3 Hz, 12H, (CH₃)₂CH-N), 1.51 (d, 5.2 Hz, 3H, CH₃-CH(ODMTr)-Ar), 1.71 (quin, 6.7 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-O-P), 1.84 (quin, 7 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-), 2.57 (d/t, 1.2/6.9 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-OP), 3.45-3.75 (-CH₂-CH₂-CN, CH₃)₂CH-N), 3.54 (s, 3H, CH₃-O-DMTr), 3.56 (s, 3H, CH₃'-O-DMTr), 3.77 (s, 3H, CH₃-O-Ar), 3.91 (t, 5.5 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-), 5.27 (quar, 1H, CH₃-CH(ODMTr)-Ar), 6.55-6.65 (m, 4H, H-DMTr), 7.05-7.35 (m, 9H, H-DMTr), 7.4 (s, 1H, H-Ar), 7.45 (s, 1H, H-Ar)

¹³C-NMR (CDCl₃, DEPT = - / 0 / +): δ = 20.4 (-), 24.66 (+), 25.6 (-), 27.75 (-), 29.68 (-), 42.9 (+), 43.09 (+), 55.15 (+), 56.04 (+), 58.10 (-), 58.41 (-), 63.01 (-), 63.29 (-), 68.04 (+), 68.97 (-), 87.09 (0), 107.83 (+), 110.5 (+), 112.79 (+), 112.92 (+), 126.71 (+), 127.71 (+), 127.81 (+), 130.01 (+), 130.11 (+), 136.06 (0), 136.41 (0), 138.39 (0), 145.62 (0), 145.96 (0), 153.31 (0), 158.34 (0)

³¹P-NMR (CDCl₃): δ = 148,46 (Sextett)

3.2.12 4-DMTr-O-buttersäure 23

3,27 g (26 mmol) Natrium-4-hydroxybutyrat 22 wurden mit 250 ml Pyridin und 10,3 g Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) unter Ausbildung von gelblich-weißen Flocken vermengt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden die Reaktion durch Zugabe von Eis gestoppt, worauf sich zwei klare Phasen trennten, die als Gemisch am Rotationsverdampfer abgezogen wurden. Der Rückstand wurde in 150 ml Ethylacetat aufgenommen und viermal mit 100 ml Wasser extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden mit 50 ml Ethylacetat reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingeeengt und das Produkt durch Flashchromatographie auf einer Kieselgelsäule (l = 20 cm, d = 7 cm) mit CH₂Cl₂:MeOH:Pyridin (9:1:0,025) als Laufmittel gereinigt. Nach Trocknen im Vakuum konnten 8 g (16,5 mmol, 63%) des gewünschten Produktes als gelbes, dünnflüssiges Öl erhalten werden, das noch Spuren eines DMTr-haltigen Nebenproduktes aufwies.

R_f = 0,49 (CH₂Cl₂:MeOH:Pyridin = 9:1:0,025)

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.99 (Quintett, 5,5 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.5 (t, 7 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.19 (t, 5,6 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$); 3.66 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{O-DMTr}$); 6.68-6.86 (m, 4H, DMTr); 7.12-7.3 (m, 5H, DMTr); 7.3-7.44 (m, 3H, DMTr); 7.44-7.56 (m, 2H, DMTr).

^{13}C NMR (62,5 MHz, CDCl_3 , DEPT = -/0/+): δ = 25.10 (-); 31.07 (-); 54.57 (+); 62.04 (-); 85.42 (0); 112.60 (+); 123.75 (+); 126.21 (+); 127.32 (+); 127.72 (+); 128.82 (+); 129.61 (+); 136.04 (0); 136.84 (+); 139.46 (0); 144.95 (0); 147.71 (+); 157.93 (0); 176.88 (0).

MS (FAB, DMSO/mNBzOH, positiv): m/z = 303 (100%, DMTr^+); 227; 135; 105; 77; 63.

MS (FAB, DMSO/mNBzOH, negativ): m/z = 405 (100%, M-H^-); 319 (51%, DMTrO^-); 273; 211; 103.

3.2.13 4-Hydroxybutyryl-amidoalkyl-CPG 500 24

1 g Aminoalkyl-CPG (controlled pore glass, 500Å) wurde in 10 ml EtOH/ H_2O /TEA (7:2:1) für 10 Minuten äquilibriert, anschließend mit einer G3-Fritte filtriert und mit weiteren 6 ml EtOH/ H_2O /TEA (7:2:1) gewaschen. Die Festphase wurde in 16 ml Acetonitril aufgenommen und in einen Glaskolben überführt. Der flüssige Überstand wurde abgenommen und der Feststoff für eine Stunde im Vakuum getrocknet. Unter einer Argonatmosphäre wurden nun 126 mg (1,1mmol) N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 486 mg (1 mmol) 4-DMTr-O-buttersäure 23 gelöst in 4,5 ml Pyridin hinzugefügt. Nach Zugabe von 300 μl (1,9 mmol) Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurde der Reaktionsansatz über Nacht gerührt, anschließend über eine G1-Fritte filtriert und mit 15 ml Pyridin gewaschen. Die derivatisierte Festphase wurde nun für 15 Minuten mit 7 ml einer 1:5:1 Mischung von Acetanhydrid/Pyridin/N-Methylimidazol behandelt und auf einer G3-Fritte mit 25 ml Et_2O gespült. Zur Entschützung der Hydroxylgruppen wurden der Glasträger viermal mit 5 ml 5%-iger Trichloressigsäure in 1,2-Dichlorethan (DCE), bis keine roten Verfärbung mehr erkennbar war. Abschließend wurde die 4-Hydroxybutyryl-derivatisierte Festphase 24 mit 50 ml CH_2Cl_2 gewaschen und für zwei Stunden an der Ölpumpe getrocknet.

3.2.14 Synthese der carboxyl-generierenden Festphasen 25

Ca. 0,85 g der getrockneten 4-Hydroxybutyryl-derivatisierte Festphase 24 wurde unter Argon in 2 ml Pyridin aufgenommen und mit 486 mg (1 mmol) 4-DMTr-O-buttersäure 23 gelöst in 1 ml Pyridin versetzt. Nach Zugabe von 0,54 g (1,78 mmol) Triisopropyl-benzolsulfonsäurechlorid (TBS-Cl) ebenfalls gelöst in 1 ml Pyridin und 150 μl N-Methylimidazol wurde die

Reaktionsmischung über Nacht gerührt, wobei sich diese schwarz färbte. Durch Filtration auf einer G2-Fritte und Waschen mit 45 ml Pyridin wurde eine schwach bräunliche, sandartige Festphase erhalten, die für 15 Minuten mit 7 ml Acetanhydrid/Pyridin/N-Methylimidazol (1:5:1) versetzt wurde. Nach sukzessivem Waschen auf einer G3-Fritte mit 10 ml Pyridin und fünfmal 10 ml Et₂O konnten 0,73 g des doppelt butyrylierten Glasträgers 25 nach Trocknen im Hochvakuum erhalten werden.

Zur Bestimmung der Beladungsdichte wurden davon 15 mg mit 80 ml 5%-iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) in DCE komplett entschützt und der Überstand UV-spektroskopisch vermessen. Bei einem Extinktionskoeffizienten des Dimethoxytritylkations im sauren, organischen Milieu von $\epsilon_{498} = 71.000$ [Gait 1984] entspricht die gemessene Absorption $A_{504} = 0,629$ einer Beladung von 48 $\mu\text{mol/g}$.

3.2.15 N-(6-Purinyl)-capronsäure 30a

Eine Mischung von 1.67g (12.7 mmol) Capronsäure 29, 0.77g (7 mmol) Na₂CO₃ und 1g (7 mmol) 6-Chloropurin 28 in 10 ml Wasser wurde durch Zugabe von ca. 1 ml HCl (18%) auf einen pH von 9.5-10 eingestellt. Die Suspension löste sich bei Kochen am Rückfluss auf, und nach einer Stunde wurde der pH-Wert durch weitere Zugabe von Na₂CO₃ korrigiert. Nach drei Stunden Kochen am Rückfluss wurde der Reaktionsansatz auf Eis gekühlt, das Produkt durch Zugabe von 10 ml Essigsäure gefällt und durch Filtration abgetrennt. Dieses Rohprodukt wurde durch zweifaches Lösen in 0,1M NaOH und Fällen mit Essigsäure gereinigt und nach Trocknen im Hochvakuum als HPLC-reines Endprodukt in 0,85 g Ausbeute (3,4 mmol, 50%) erhalten.

$R_f = 0.51$ (CH₂Cl₂:MeOH:CF₃COOH = 8:1.5:0.5). HPLC = 16,74 min (Gradient A).

¹H NMR (250 MHz, 4%NaOD/D₂O): $\delta = 1.39$ -1.5 (Quintett, 2H, J = 7.5 Hz); 1.59-1.78 (m, 4H); 2.24-2.3 (t, 2H, J = 7.5 Hz); 3.53-3.58 (t, 2H, J = 7.5 Hz); 8.01 (s, 1H); 8.21 (s, 1H).

¹³C NMR (62.9 MHz, DEPT = +/-): $\delta = 28.40$ (-); 28.88 (-); 31.543 (-); 40.32 (-); 43.44 (-); 122.69 (0); 152.24 (+); 154.20 (+); 156.43 (0); 160.70 (0); 186.34 (0).

MS (ED): m/z = 249 (24.5 %, M⁺•); 190 (36%); 162 (35%); 148 (100%); 135 (45%).

3.2.16 N-(6-Purinyl)-caproyl-N-oxysuccinimid 31a

350 mg (1.4 mmol) N-(6-Purinyl)-capronsäure 30a und 176 mg (1.5 mmol) N-Hydroxysuccinimid wurden in 1 ml trockenem HMPT unter Argon gelöst und bei 0°C mit 0.31 g (1,5 mmol) DCC versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde das entstandene

Nebenprodukt Dicyclohexyl-Harnstoff abgefiltert und mit 0,1 ml HMPT gewaschen. Das Rohprodukt wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur aus 10 ml Petroleumbenzin und 1,2 ml Isopropanol gefällt und durch Filtration gewonnen. Nach Lösen des Rückstandes in 4 ml Acetonitril:Aceton (1:1) und Umkristallisieren mit 7 ml Petroleumbenzin:Isopropanol (6:1) konnten 90 mg (0,26 mmol, 18%) des gewünschten Produktes als weißer Feststoff nach Trocknen im Hochvakuum erhalten werden.

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.34-1.46 (2H); 1.54-1.7 (m, 4H); 2.57 (s, 1H); 2.63-2.69 (t, 2H, $J=7.5$ Hz); 2.78 (s, 4H); 3.44 (br, 2H); 7.48 (s, 1H); 8.06 (s, 1H); 8.14 (s, 1H).

^{13}C NMR (62.9 MHz): δ = 23.99; 25.43; 28.66; 30.14; 33.64; 36.45; 118.66; 138.54; 149.45; 152.36; 154.46; 168.97; 170.25. MS (FAB): m/z = 347 ($\text{M}+\text{H}^+$).

3.2.17 Nicotinyl-N-oxy-succinimid 31b

1,45g (12,6 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 1,48g (12 mmol) Nicotinsäure 30b wurden in 25 ml trockenem DMF (sureseal) unter Argon gelöst, mit 2,7g (13 mmol) DCC versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt und aus Petroleumbenzin:Isopropanol (6:1) kristallisiert. Das Produkt wurde durch Filtration gewonnen und als weißer Feststoff nach Trocknen im Hochvakuum in 1,67g (63%) Ausbeute erhalten.

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.89 (s, 4H, NHS); 7.64-7.72 (m, 1H); 8.42-8.49 (m, 1H); 8.92-8.98 (m, 1H); 9.28-9.3 (m, 1H).

^{13}C NMR (62.9 MHz, DEPT =+/-): δ = 25.60 (-); 121.08 (0); 124.49 (+); 137.77 (+); 150.54 (+); 155.65 (+); 161.01 (0); 170.21 (0).

MS (EI): m/z = 220 (2.3%, M^+); 106 (100%, $\text{M}-\text{NHS}^+$); 78 (50%, $\text{M}-\text{NHS}-\text{CO}^+$).

3.2.18 Orotidyl-N-oxy-succinimid 31c

1,2 g (10,4 mmol) N-Hydroxy-succinimid (NHS) und 1,53 g (10mmol) Orotsäure 30c wurden in 25 ml DMF (sureseal) unter Argon gelöst und nach Zugabe von 2,26 g (11 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) über Nacht gerührt. Das ausgefallene Nebenprodukt wurde filtriert, die Membran mit 5 ml DMF gewaschen und das Filtrat mit 180 ml einer 6:1 Mischung aus Petroleumbenzin und Isopropanol versetzt. Nach zwei Stunden Kristallisation bei Raumtemperatur wurde das Rohprodukt durch Filtration gewonnen, in 5 ml DMF gelöst und erneut mit 31 ml Petroleumbenzin:Isopropanol (6:1) gefällt. Nach Filtration und

Trocknen im Vakuum konnten 0,71 g (2,8 mmol, 28%) des Produktes als weißer Feststoff isoliert werden.

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.84 (s, 4H, NHS); 6.3 (s, 1H, CH); 11.58 (s, 2H, NH); Spuren von Orotsäure und NHS bei δ = 2.58; 6.0; 10.82; 11.3.

^{13}C NMR (62.9 MHz, DMSO- d_6): δ = 25.64; 106.54; 137.14; 150.74; 157.09; 163.29; 169.73; Spuren von Orotsäure: 25.314; 103.266; 142.673; 150.946; 161.851; 164.181; 172.901.

3.2.19 ω -(9-Methylantracen)-PEG600-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit 44

120 mg (150 μmol) ω -(9-Methylantracen)-PEG 600 43 (synthetisiert von Dr. B. Seelig) wurden in einem 25 ml Kolben zusammen mit einem Magnetrührstab vorgelegt, über Nacht an der Ölpumpe getrocknet und anschließend unter Argon mit einem Septum verschlossen. Mit Einwegspritzen wurden daraufhin 250 μl (1,4 mmol) DIPEA und 2 ml CH_2Cl_2 sowie mit einer Gilsonpipette unter Argon-Gegenstrom 35 μl (156 μmol) Phosphorigsäure-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid 8 zugegeben. Nach zwanzigminütigem Rühren wurde die Reaktion daraufhin mit 100 μl Methanol gestoppt, mit 5 ml CH_2Cl_2 verdünnt und dreimal mit je 7 ml einer gesättigter NaHCO_3 -Lösung direkt im Kolben extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt anschließend im Vakuum über Nacht getrocknet. Der orangefarbige Rückstand wurde in einer Argonatmosphäre in 1,4 ml trockenem Acetonitril ($\text{H}_2\text{O} < 9$ ppm) aufgenommen, in ein braunes für die Automatsynthese geeignetes Fläschchen überführt und direkt zur automatisierten Festphasensynthese von 45 eingesetzt.

3.3 Festphasensynthese von Oligonukleotiden und deren Modifikation

3.3.1 Synthese der Dinukleotidanaloga 1 und 3

Die Dinukleotidanaloga 1a, 1b, 3a und 3b wurden auf einem Pharmacia Gene Assembler in einem 1,3 μmol DMT-on Modus synthetisiert, wobei die kommerziellen Phosphoramidite 19-21 von Chemgenes sowie das photoaktive Phosphoramidit 9 (s. 3.2.5) jeweils als 0,1 M CH_3CN -Lösungen ($\text{H}_2\text{O} < 9$ ppm) verwendet wurden. Die Kopplungszeiten betragen 90 Sekunden, außer für die Cytidin-Phosphoramidite 20 (720 s) und für die abschließende chemische Phosphorylierung mit 21 (3 x 90 s). Als Festphasenträger wurden 32,3 mg (1,3

μmol) des 3'-Biotin-TEG-Modifiers 17 von Glen Research bzw. 26,6 mg (1,28 μmol) der carboxyl-generierenden Festphasen 25 (s. 3.2.14) eingesetzt.

Für die biotinylierten Ribonukleotide 1a und 1b erfolgte die Abspaltung von der Säule und die Entschützung der basenlabilen Schutzgruppen manuell in einem 1,7 ml braunen Schraubdeckelgefäß mit 1 ml einer 1:3-Mischung aus Ethanol und wässriger Ammoniaklösung (30%) bei 55-60°C über Nacht. Dies geschah sicherheitshalber in einem zweiten druckstabilen 5 ml Schraubglas. Die carboxylierten Dinukleotide 3a und 3b wurden unter denselben Bedingungen zunächst innerhalb von 12 Stunden bei 60°C mit 0,5 ml Wasser und 0,25 ml TEA von der Festphase abgespalten und anschließend durch Zugabe von 0,5 ml 1:3 EtOH/NH₄OH (30%) für weitere 8 Stunden bei 60°C entschützt.

Nach 15 h wurde die überstehende Lösung abpipettiert, von verbleibenden festen Resten durch Spinfiltration (Nylon, 0,2 μm) abgetrennt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde mit 0,3 ml 1M Tetrabutylammoniumfluoridlösung (TBAF) in THF aufgenommen, durch eine Stunde im Ultraschallbad gelöst und für zwei Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Desilylierung wurde mit 0,3 ml eines 1M Triethylammoniumacetat-Puffers (TEAAc) gestoppt und mit Wasser auf 10 ml verdünnt. Diese Lösung wurde anschließend auf eine 1,5 ml Sephadex A25-Säule (äquilibriert mit 10 ml 0,05M TEAAc-Puffer pH=7) gegeben, es wurde mit 15 ml 0,1M TEAAc-Puffer (pH=7) gewaschen und dann mit 2M TEAAc-Puffer (pH=7,5) eluiert.

Die bei 270 nm UV-aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mehrfach lyophilisiert, in 100 μl Wasser aufgenommen und mittels HPLC gereinigt. Nach Einengen der Produkt-Fractionen durch Lyophilisierung wurden diese durch UV-MALDI-TOF charakterisiert und die Gesamtausbeute durch UV-Messung bestimmt.

1a: 2,4 OD₂₇₀ (125 nmol, 10%); Elution = 31,6 Minuten (Gradient A); Molmasse m/z = 2488,8 (berechnet [M-H]⁻ = 2487,6 g/mol); 3'-Photofragmentes m/z = 931,8 (berechnet = 930,6 g/mol).

1b: 3,2 OD₂₇₀ (165 nmol, 13%); Elution = 18,1 Minuten (Gradient B); Molmasse m/z = 3179,3, 3164,5 (berechnet [M+H]⁺ = 3179,6 g/mol); 5'-Photofragmente m/z = 1904,2, 1889,2 (berechnet = 1903,4 g/mol); 3'-Photofragmente m/z = 1277,0 (berechnet = 1276,2 g/mol).

3a: 4 OD₂₇₀ (200 nmol, 15%); Elution = 23,6 Minuten (Gradient A); Molmasse m/z = 2084,8 (berechnet [M-H]⁻ = 2084,1 g/mol); 3'-Photofragment m/z = 527,4 (berechnet = 527,1 g/mol).

3b: 2,4 OD₂₇₃ (127 nmol, 10%); Elution = 11,7 Minuten (Gradient B); 3'-Photofragment (positiv) m/z = 874,1 (berechnet [M+H]⁺ = 873,7 g/mol).

3.3.2 Synthese des amino-terminalen Dinukleotides 2a

Die Synthese von 2a erfolgte auf einem DNA-Syntheseautomaten 394 von Applied Biosystems ausgehend von 60 mg (1,5 μ mol) der amino-derivatisierten Festphase 18 (500Å) in einem 1 μ mol DMT-on Modus, wobei die Reaktionszeiten wie 3.3.1 manuell eingestellt wurden. Nach analoger Entschützung und Aufreinigung wie für 1 wurden 6,28 OD₂₇₁ (330 nmol, 22%) des gewünschten Produkts mit einer Retentionszeit von 21-22 Minuten erhalten.

UV-MALDI-TOF (HPA, positiv): m/z = 1789.1, 1772.9 (berechnet [MH⁺] = 1787,2 g/mol); 5'-Cytidin-enthaltendes Photofragment: m/z = 1216.0, 1199.9 (berechnet: 1214.8 g/mol); 3'-amin-enthaltendes Photofragment: m/z = 575.1 (berechnet: 574.5 g/mol).

3.3.3 Präparative Synthese von 2b

Das Dinukleotidanalogen 2b wurde im 160 μ mol DMT-on Maßstab auf einem Milligen 8800 DNA Synthesizer hergestellt und anschließend mit 12 ml 33% NH₄OH und 4 ml EtOH über Nacht bei 55°C entschützt. Nach Lyophilisierung wurde die Zwischenstufe in 1 ml Triethylammonium-Trihydrofluorid (TEA[HF]₃) bei Raumtemperatur für zwei Tage desilyliert [Westman & Strömberg 1994], durch GPC auf einer Sephadex G10 Säule (Pharmacia XK16) entsalzt und das Rohprodukt durch präparative HPLC auf einer Knauer-Eurosphere Säule (100 C₁₈, 10 μ m, 250 x 20 mm) bei einer Flussrate von 10 ml/min gereinigt. Mit einer Retentionszeit von 13,3 Minuten (Gradient B) wurden ca. 150 OD₂₇₀ (8 μ mol, 5%) des gewünschten Produktes mit einer Masse von m/z = 2821,0 (berechnet [M+H]⁺ = 2821.2 g/mol) erhalten.

Photofragmente: m/z = 1904.2, 918,4 (berechnet = 1903.4, 918,8 g/mol).

3.3.4 Synthese des randomisierten DNA Pools

Der partiell gedopte DNA-Ausgangspool sowie die total randomisierte Variante wurden auf einem 394 Syntheseautomaten (Applied Biosystems) ausgehend von 12 mg (0,2 μ mol) dC-CPG 2000Å mit den in Abbildung 20 gezeigten Sequenzen hergestellt:

Dabei wurden der unterstrichene 3'-Bereich im 1 μ mol, der Rest im 0,2 μ mol-Maßstab mit 45 Sekunden Kopplungszeit synthetisiert. Der Capping-Schritt wurde nur bei den fett unterlegten, konstanten Primerbindungsstellen durchgeführt. Die total randomisierten Positionen N wurden mit einer Mischung der Phosphoramidite A:G:C:T = 3:2,5:2,5:2 erzeugt,

während bei den partiell gedopten Nukleotiden das Vorzugsamidit (kleine Buchstaben in Abb. 20) in einem 7:1:1:1 Überschuss verwendet wurde.

Die DNA-Proben wurden in 1,4 ml NH₄OH (33%) bei 55°C für 20 Stunden entschützt, anschließend lyophilisiert und über eine Nick-Säule entsalzt. Das Rohprodukt wurde über ein präparatives, denaturierendes 6% Polyacrylamidgel gereinigt, die Banden durch UV-Shadowing identifiziert und nach Elution und Ethanol-fällung wurden 5,5 OD₂₅₈ (3,3 nmol, 1,6%) des gedopten bzw. 3,82 OD₂₅₈ (2,3 nmol, 1,1%) des total randomisierten Pools erhalten.

3.3.5 Synthese des Anthracen-modifizierten Primers 45

Zunächst wurde die DNA Primersequenz von 45 in einem 15 µmol DNA Standardmodus auf einem Expedite Syntheseautomaten von Perseptive Biosystems hergestellt, anschließend wurden die Phosphoramidite gewechselt und das HEG 19, das photoaktive Phosphoramidit 9 und das Anthracen-PEG-Phosphoramidit 44 gekoppelt. Nach Entschützen in 1 ml NH₄OH (33%) bei 55°C für zwei Tage wurde der Glaträger durch Spinfiltration entfernt, die Reaktionslösung lyophilisiert und in sechs Läufen mit HPLC (Gradient C, Elution bei 16,1 min) gereinigt. Eine Lyophilisierung der fluoreszenz-aktiven Fraktionen ergaben 300 OD₂₅₅ (730 nmol, 5%) mit den Molmassen $m/z = 7035.1; 7079.6; 7123.4; 7167.2; 7210.7; 7255.3; 7300.0$ (berechnet $[M+H]^+ = 7036.2 + n \times 44$ g/mol) und dem DNA-Photofragment $m/z = 6189.9$ (berechnet $[M+H]^+ = 6190.0$ g/mol).

3.3.6 Synthese des amino-funktionalisierten, photospaltbaren Primers 47

Analog zu 3.3.5 wurde 47 auf einem 394 Syntheseautomaten (Applied Biosystems) in einem 1 µmol DNA-Modus synthetisiert, wobei abschließend mit 46 gekoppelt wurde. Nach ammoniakalischer Entschätzung und HPLC-Reinigung (Gradient D) wurden 4,4 OD₂₆₀ des Produktes 47 mit einer Retentionszeit von 19,4 min erhalten. Gefundene Masse: $m/z = 6859.1, 6156.1, 703.1$ (berechnet $[M+H]^+ = 6858.7, 6155.8, 706.0$ g/mol).

3.3.7 Biotinylierung mit N-Hydroxy-sulfosuccinimid-estern

Zu 14,3 nmol des Dinukleotidanalogs 2a in 80 µl Wasser wurden 10 µl 1M KH₂PO₄ (pH=8) und 0,68 mg (1,2 µmol) Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoat 26 gelöst in 20 µl Wasser zupipettiert. Nach 12 Stunden Schütteln bei 25°C wurden 10 µl einer 1M NH₄OAc-Lösung zugegeben, für weitere 2 h geschüttelt, und das Produkt über HPLC

(Gradient A) gereinigt. Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 28,5-29,5 min lieferte 5,3 nmol (37%) des gewünschten Produkts 27 mit einer Masse von $m/z = 2129.2$, (berechnet $[M+H]^+ = 2127.7$ g/mol) und den Photofragmenten bei $m/z = 1215.1, 914.9$ (berechnet: 1214.8, 913.9 g/mol).

3.3.8 Derivatisierung mit NHS-Estern

24 nmol des Dinukleotidanalogen 2b wurden in 10 μ l Ansätzen eines 20% DMF enthaltenden 0,4 M K_2HPO_4 -Puffer (pH = 8.0) mit 1 μ mol der entsprechenden NHS-aktivierten Nukleobase 31a-c gekoppelt. Nach 2-3 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsansätze durch Zugabe von 2 μ l Ammoniumacetat 1M innerhalb 30 Minuten gestoppt, mit Wasser auf 100 μ l verdünnt und durch HPLC mit dem Gradienten B gereinigt:

32a: 0,27 OD₂₇₀ (14 nmol, 60%); Retentionszeit = 17,5 min; Molmasse, Photofragmente $m/z = 3052.1, 1904.3, 1149.6$ (berechnet $[M+H]^+ = 3051.1, 1903.4, 1149.6$ g/mol).

32b: 0,25 OD₂₆₇ (13 nmol, 55%); Retentionszeit = 16,4 min; Molmasse, Photofragmente $m/z = 2925.7, 1904.1, 1023.9$ (berechnet $[M+H]^+ = 2924.9, 1903.4, 1023.4$ g/mol).

32c: 0,26 OD₂₇₄ (13 nmol, 56%); Retentionszeit = 12,8 min; Molmasse, Photofragmente $m/z = 2959.0, 1904.2, 1056.9$ (berechnet $[M+H]^+ = 2957.9, 1903.4, 1056.4$ g/mol).

3.3.9 EDC-Kopplung der carboxylierten Dinukleotide

20 nmol des partiell 5'-³²P-markierten Dinukleotidanalogs 3a wurden mit 2 μ mol von N⁶-(6-Aminohexyl)-AMP 33b oder 5-(Biotinylamido)-pentylamin 33c und 1 μ mol EDC in 4 μ l eines 2M Imidazol/HCl-Puffers pH = 6 für 30 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurden 2 μ l einer frischen 0,25 M EDC-Lösung hinzugegeben und es wurde für weitere 4 Stunden geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden durch Elektrophorese mit einem 20% denaturierenden Polyacrylamidgel gereinigt, anschließend wurden die Reaktionsprodukte durch Autoradiographie identifiziert, ausgeschnitten und in Wasser eluiert. Nach Entsalzen auf einer 4 ml Sephadex G10 Säule wurden die Rohprodukte durch HPLC mit dem Gradienten A gereinigt:

34b: 68 mOD₂₆₅ (2 nmol, 10%); Retentionszeit = 26,8 min; AMP-derivatisiertes Photofragment $m/z = 955.7$ (berechnet = 955.5 g/mol).

34c: 0,12 OD₂₆₅ (6 nmol, 30%); Retentionszeit = 28,9 min; biotinyliertes Photofragment $m/z = 837.5$ (berechnet = 837.6 g/mol).

3.4 Aufarbeitung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

3.4.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Reinigung über HPLC an reverser Phase erfolgte bei 45°C mit einer Beckman-Ultrasphere®-Säule (ODS C₁₈, 5 µm, 80 Å Porengröße, 250 x 4.6 mm) bei einer Flussrate von 1 ml/ min. Dabei wurde eine steril filtrierte mobile Phase aus 0,1M TEAAc mit folgenden Anteil an Acetonitril verwendet:

Gradient A

t [min]	0	15	35	40	45	50
CH ₃ CN[%]	0,8	16	24	80	80	0,8

Gradient B

t [min]	0	5	25	28	32	35
CH ₃ CN[%]	0,8	18	21,2	80	80	0,8

Gradient C

t [min]	0	5	45	50	55	60
CH ₃ CN[%]	0,8	32	48	80	80	0,8

Gradient D

t [min]		0	30	35	40	45
CH ₃ CN[%]		8	32	80	80	8

Die Detektion der Dinukleotidanaloga erfolgt bei $\lambda = 270$ nm durch einen Dioden-Array-Detektor (200 –400 nm), wobei die Gerätekonfiguration System Gold der Firma Beckmann verwendet wurde. Das Primerderivat 45 (Gradient D) wurde bei $\lambda = 366$ nm detektiert und analytisch zusätzlich durch einen Fluoreszenzdetektor RF-535 der Firma Shimadzu vermessen (Exzitation: 255 nm; Emission: 420 nm).

3.4.2 MALDI-TOF Massenspektroskopie

Die gezeigten UV-MALDI-TOF-Spektren der Dinukleotidanaloga sowie der DNA-Primer wurde von Dr. E. Nordhoff (MPI für molekulare Genetik, Berlin) mit NH₄⁺-Ionenaustauscherkügelchen in einer HPA-Matrix im positiven Modus aufgenommen ($\lambda = 355$ nm), wobei ggf. im Reflektormodus zur genaueren Massenbestimmung gemessen wurde [Jäschke *et al.* 1996]. Das IR-MALDI-TOF-Spektrum in Abbildung 12b) wurde von Dr. S. Hahner (Institut für Lasermedizin, Universität Münster) in einer Bernsteinsäure-Matrix bei Anregung mit $\lambda = 2940$ nm ebenfalls im positiven Modus erstellt.

UV-Routine-Messungen zur Bestimmung des 3'-terminalen Photofragmentes wurden von Dr. P. Franke (Institut für Chemie/Biochemie, Freie Universität Berlin) in einer DHB-Matrix bei Anregung mit $\lambda = 377$ nm im negativen Modus durchgeführt.

3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Trennung von Oligonukleotiden durch denaturierende PAGE wurde in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris/HCl pH = 7.5, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) 8.3 M Harnstoff und folgenden Anteilen Acrylamid/Bisacrylamid durchgeführt:

Acrylamidkonzentration (für 100 ml)	5 %	6%	8%	15 %	20 %	22,5 %
Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)	20 ml	24 ml	32 ml	60 ml	80 ml	90 ml
10 x TBE	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Verdünner	70 ml	66 ml	58 ml	30 ml	10 ml	0 ml

Nach Zusammenmischen der entsprechenden fertigen Rotiphorese-Stammlösungen (Roth) wurde die Polymerisation durch Zugabe von 0,8ml Ammoniumperoxodisulfat 10% (APS) und 0,04ml N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet und das Gel blasenfrei zwischen zwei Glasplatten in die Formate 16 x 30 x 1 cm bzw. 32 x 30 x 1 cm gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens zwei Stunden wurde das Gel für 30 Minuten bei 500 V mit 1 x TBE-Puffer ohne Proben laufen gelassen: Anschließend wurden die Proben 1:1 mit Formamid und 10:1 mit Farbmarker versetzt, durch einminütiges Heizen auf 95°C denaturiert und in die Geltaschen eingefüllt. Bei analytischer PAGE wurden die Nukleinsäuren mit 500 V getrennt, bei präparativer Elektrophorese wurden nach zehn Minuten die Leistung auf 35 W erhöht und die Gelplatten mit zwei Ventilatoren gekühlt.

3.4.4 Autoradiogramme

Nach elektrophoretischer Trennung wurden radioaktiv markierte Nukleinsäuren in den Gelen durch Autoradiographie identifiziert. Dazu wurde mindestens eine Glasplatte abgelöst, das Gel in Haushaltsfolie eingeschlagen und die Proben durch Exposition von Fuji X-Ray Filmen nachgewiesen. Alternativ dazu wurde das in Folie eingeschlagene Gel auf dem Phosphorimager Storm 840 der Firma Molecular Dynamics analysiert.

3.4.5 Gelelution

Die PAGE-gereinigten Oligonukleotide wurden anhand einer Röntgenfilmmaske mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in etwa 2 x 2 mm große Stückchen zerteilt und mit ca. 400 µl Wasser oder 0.3 M Natriumacetatlösung pH 5.5 (für evtl. anschließende

Ethanol-fällung) pro Bande für 1 h bei 80°C geschüttelt. Die Elutionslösungen wurden abgezogen, durch Spinfiltration (Cellulose-Acetat 0,45 µm) von verbleibenden Gelresten getrennt und anschließend durch Ethanol-fällung oder Gelfiltration entsalzt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde diese Prozedur ggf. wiederholt.

3.4.6 Ethanol-fällung

Nukleinsäuren wurden standardmäßig durch Ethanol-fällung aufkonzentriert und/oder von niedermolekularen, löslichen Bestandteilen abtrennt. Dazu wurden die Proben 10:1 mit 3 M Natriumacetat (pH = 5,5) zu einer 0,3 M NaOAc-Lösung verdünnt und anschließend mit einem 2-2½-fachen Überschuss an kaltem Ethanol (-20°C) in einem silanisierten Reaktionsgefäß vermischt. Nach mindestens zehnminütiger Präzipitation bei -20°C wurden die Nukleinsäuren für eine halbe Stunde bei 4°C und 11500 rpm (9000 x g) gefällt, wonach der ethanolische Überstand vorsichtig von dem Pellet abgezogen werden konnte. Durch kurzes nachträgliches Zentrifugieren wurden Reste zurückgeblieben Alkohols entfernt. Bei schwer fällbaren Proben (z.B. die selektierten Nukleinsäuren nach photolytischer Freisetzung) wurde vor der Fällung 1µl Glycogen 20mg/ml als Präzipitationsagens zugegeben und die Präzipitationszeiten (-80°C) sowie Zentrifugationszeiten auf mindestens eine Stunde erhöht.

3.4.7 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus enzymatischen Reaktionsansätzen wurden diese ggf. mit Wasser verdünnt und dreimal mit dem 2½-fachen Volumen Phenol/CHCl₃/Isopropanol (25:24:1, pH = 5,2 für RNA, pH = 8.0 für DNA) extrahiert. Dazu wurde auf einem Vortex-Schüttler intensiv geschüttelt, für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen. Die kombinierten phenolischen Phasen wurden anschließend einmal mit einem Volumen Wasser reextrahiert. Bei hochkonzentrierten Lösungen (z.B. Ligationsansätze) wurde der gesamte Vorgang wiederholt. Die wässrige Phase wurde abschließend mit 2 Volumina CHCl₃ gewaschen.

3.4.8 Radioaktivitätsmessungen

Radioaktivitätsbestimmungen von ³²P-markierten Oligonukleotiden wurden nach der Cerenkov-Methode für Feststoffe in einem Szintillationszähler durchgeführt. Dabei wurde die Strahlung durch braune Eppendorf-Gefäße um ca. 80-85% abgeschirmt, während bei Messungen auf Spinfiltern die Strahlung um ca. 5% intensiver war.

3.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in 2 %-igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt und analysiert. Dazu wurde 0.8 g Agarose (tief schmelzend) mit 20 µg Ethidiumbromid in 40 ml 0.5 x TBE gegeben und durch Sieden in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 40°C wurde die Flüssigkeit in eine Flachbett-Gelapparatur (10 x 6.5 cm) mit Kamm gegossen. Nach dem Erkalten und Erstarren des Gels wurden die Proben 5:1 mit einer 30% Glycerin-Lösung und 6:1 mit Farbmaler verdünnt und nativ aufgetragen. In den Nachbarspuren wurden DNA-Referenzen bekannter Konzentration aufgetragen, deren Vergleich eine quantitative Abschätzung der Proben-DNA erlaubte. Die Elektrophorese wurde für 15 Minuten bei 200 Volt durchgeführt, anschließend wurden die Nukleinsäureproben durch Transilluminaton bei $\lambda = 306$ nm als orangefarbige Fluoreszenzbanden innerhalb des Gels sichtbar gemacht.

3.4.10 Photometrische Quantifizierung

Aufgrund der starken Absorption der Nukleobasen können Nukleinsäuren UV-spektroskopisch detektiert und quantifiziert werden. Da die Extinktionsmaxima und -koeffizienten der einzelnen Basen jedoch unterschiedlich sind (G = 250nm, C = 270 nm, A = T/U = 260 nm) und zudem geringfügig von der spezifischen Sequenz beeinflusst werden, wurde zur Quantifizierung der Nukleinsäure-Bibliotheken und Primer ein Mittelwert bei ca. 260 nm bestimmt. Durch diesen kann über die Näherungsformel

$$\text{Menge an Nukleinsäure in } \mu\text{mol} = \frac{\text{Gesamt OD}_{260}}{(10 * \text{Anzahl der Basen im Oligo})}$$

$\text{OD}_{260} =$
optische Dichte bei
 $\lambda = 260$ nm und 1 cm
Küvetten dicke

die Stoffmenge an Oligonukleotid abgeschätzt werden.

Für die Quantifizierung der Dinukleotidanaloga wurden alle anderen chromophoren Gruppen gegenüber den beiden Cytidinen vernachlässigt, sodass ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{270} = 19.200$ zugrunde gelegt wurde. Zur Bestimmung der Konzentration des Anthracen-konjugierten Primers wurde von einem molaren Extinktionskoeffizienten für Anthracen von $\epsilon_{255} = 220.000$ [Seelig 1999a] sowie für die Nukleotide von $\epsilon_{255}(\text{A}) = 14.166$; $\epsilon_{255}(\text{G}) = 13.634$; $\epsilon_{255}(\text{C}) = 6.300$ und $\epsilon_{255}(\text{U}) = 8.548$ ausgegangen. Wegen der geringen Probenmenge wurden die Nukleinsäuren in 100 µl Wasser gelöst und in einer Mikroküvette vermessen.

3.4.11 Nachweis durch das HABA/Avidin-Reagenz

Die photometrische Bestimmung bei 500 nm von 90 µl einer Nachweislösung aus 2-[4'-Hydroxyphenylazo]-benzoesäure (HABA) und Avidin ergaben in einer Mikroküvette mit Wasser als Referenz eine Grundabsorption von ca. $A_{500}^1 = 0,964$. Die Zugabe von 10 µl der biotinylierten Probe (z.B. 27) senkte die Absorption auf A_{500}^2 . Die Konzentration der Stammlösung errechnete sich über

$$c[\text{mM}] = (0,9 * A_{500}^1 - A_{500}^2) * 10 / 34 \text{ mM}^{-1},$$

wobei der Faktor 10 die Verdünnung der Stammlösung berücksichtigte und der Faktor 34 mM^{-1} dem Extinktionskoeffizienten des gebundenen HABA-Farbstoffes bei 500 nm entspricht.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 T7-Transkription

RNA-Transkripte wurden standardmäßig in 50 µl Reaktionen mit 80 mM HEPES pH=7.5, 22 mM MgCl_2 , 1 mM Spermidin, 10 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, je 4 mM der NTPs, 5 mU/µl Pyrophosphatase, (optional: 0,7 U/µl RNasin), 10-100 µCi $^{32}\text{P}\alpha\text{CTP}$ und 1 U/µl T7-Polymerase für 4 Stunden bei 37°C hergestellt. Als Templat wurden üblicherweise ¼ der amplifizierten dsDNA aus der Vorrunde oder ca. 50 pmol eingesetzt, die anschließend mit 40 U DNase I für 30 Minuten bei 37°C verdaut wurden. Die 159nt RNA-Transkripte wurden über ein 5%-denaturierendes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) gereinigt, durch Autoradiographie identifiziert, eluiert, mit Ethanol gefällt und in Wasser gelöst durch UV-Spektroskopie vermessen. Alternativ wurde die Ausbeute durch den Einbau von radioaktivem $^{32}\text{P}\alpha\text{CTP}$ bestimmt:

$$\text{Einbaurate des } \alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP} [\%] = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]}}{\text{eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$

$$\text{RNA-Stoffmenge [nmol]} = \frac{\text{Einbaurate} * \text{Konzentration CTP} [\mu\text{M}] * \text{Ansatzvolumen} [\mu\text{l}]}{\text{Anzahl der im Transkript vorkommenden Cytidine}}$$

Die Einbaurate betrug üblicherweise 20-30%, was bei einem 50µl-Ansatz 0,88 – 1,33 nmol RNA entspricht.

Zur Transkription der 25mer RNA wurden die beiden chemisch synthetisierten Stränge 3'-d[AG ATT ATG CTG AGT GAT ATC CTC GAG TCG GAA GTG ACG AGG TGG]-5'

5'-d[TC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG CTC AGC CTT CAC TGC]-3'

durch einminütiges Heizen auf 95°C hybridisiert und nach langsamem Abkühlen wie oben transkribiert. Nach Reinigung über ein 15%-PAA-Gel wurde die untere der entstandenen Doppelbande eluiert und gefällt.

Die Massentranskription in der ersten Runde wurde im 10 ml Maßstab (1000 U RNasin, 15 U Pyrophosphatase) durchgeführt, wobei nach 3 Stunden je 4 µmol NTPs und 2000 U T7-Polymerase nachdosiert wurden. Nach DNase-Verdau wurde der Reaktionsansatz gefällt und anschließend für 3 Stunden bei 200V über ein dickes 5% PAA-Gel (28x18x0,8 cm) gereinigt. Als Template wurden je 5 Komplexitäten des gedopten (2,1 nmol) bzw. des total randomisierten (1,25 nmol) dsDNA-Pools eingesetzt, die in 90 nmol RNA umgeschrieben wurden.

3.5.2 T4-RNA-Ligation

Vor der Ligation wurden die RNA-Transkripte mit einem doppelten Überschuss an Primer 42 durch zweiminütiges Erhitzen auf 95°C 3'-terminal hybridisiert, dieser Schritt ist jedoch optional. Die 50-200 µl Reaktionsansätze enthielten ca. 10 µM RNA, 20 µM Primer 42, 50 mM HEPES/NaOH pH = 8.3, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20 µg/ml BSA, 0.1 mM ATP, 10% (v/v) DMSO, 80 µM des entsprechenden Dinukleotidanalogs und 1.5 U/µl T4-RNA-Ligase. Nach Ligation über Nacht bei Raumtemperatur erfolgte die Reinigung der 159nt RNA-Konjugate über ein 5% PAA-Gel oder im Falle der Selektion nach Photoredoxribozymen durch Chloroform/Phenolextraktion, NAP 25-Entscheidung und Ethanol-Fällung. Letzteres geschah in der Dunkelkammer. Die präparative Ligation der ersten Runde erfolgte dabei in 2 ml mit 40 µM des Biotinlinkers 2b.

Zur 3'-radioaktiven Markierung wurden in 20 µl Reaktionen statt der Dinukleotide 15 µCi pCp verwendet.

RNasin schien generell die Ausbeute zu verringern und wurde daher weggelassen.

3.5.3 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Selektierte RNA-Moleküle wurden für 10 Minuten bei 70°C mit 16,6 µM Primer 42 hybridisiert und anschließend in 20 µl einer Lösung mit 50 mM Tris/HCl pH=8.3; 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs (MBI Fermentas) und 200 U SuperscriptTM II (Gibco BRL) für 1 Stunde bei 55°C revers transkribiert. Immobilisierte RNA wurden auf dem Spinfilter mit 60 µl revers transkribiert.

Zur PCR-Amplifikation wurden diese Reaktionsansätze anschließend auf 100 µl einer Endkonzentration mit je 6 µM der Primer 41 und 42, 30 mM Tris/HCl pH 8.5, 65 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.3 mM dNTPs und 5 U Taq-Polymerase verdünnt. Nach 12-14 Zyklen mit 1 Minute bei 94°C, 1.5 Minuten bei 50°C und 2.5 Minuten bei 72°C wurden ein Aliquot der PCR-Mischung auf einem Agarose-Gel analysiert und der Rest durch Chloroform/Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung aufgearbeitet.

Mutagene PCR wurde in 100 µl mit ca. 1,7 nM Templat, je 6 µM der Primer 41 und 42, 20 mM Tris/HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 11 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 0.1 mM dCTP, 0.26 mM dATP, 1.2 mM dGTP, 3.94 mM dTTP und 10 U Taq-Polymerase für 20 Zyklen durchgeführt, anschließend wurde 0.1 µl abgenommen und unter gleichen Bedingungen erneut für 30 Zyklen amplifiziert [Fromant *et al.* 1995].

Die präparative Vervielfältigung der chemisch synthetisierten Ausgangspools erfolgte je in 20 ml verteilt auf zwei Mikrotiterplatten (96 x 200 µl), die 3,3 nmol des gedopten bzw. 2,3 nmol des total randomisierten einzelsträngigen DNA-Pools und jeweils 7.5 µM des Primers 41, 5 µM Primers 42, 20 mM Tris/HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs und 30 mU/µl Taq-Polymerase enthielten. Nach einminütigem Vorheizen bei 94°C wurden 8 Zyklen 2 Minuten bei 94°C, 6 Minuten bei 50°C und 10 Minuten bei 72°C durchgeführt, abschließend wurde die Temperatur für 20 Minuten auf 72°C gehalten.

3.5.4 Radioaktive 5'-Markierung

300 pmol des Dinukleotides 3a wurden gelöst in 10 µl 20 mM Tris/HCl pH = 8.8, 10 mM MgCl₂ durch 2 U alkalische Shrimp-Phosphatase für eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert und dann mit 1,5 µl 0,1 M EDTA für 10 Minuten auf 80°C erwärmt. Nach Abkühlen wurden 2,5 µl 10x T4-Kinase-Puffer (500 mM Tris/HCl pH = 7.5, 70 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 1,5 µl MgCl₂ 0,1M, 2,5 µl DTT 35 mM, 5 µl ³²P γ-ATP (10 µCi/µl) und 2 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) hinzugefügt und für weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Dinukleotidanalogen wurde anschließend über ein 20% denaturierendes PAA-Gel gereinigt, das radioaktive Produkt durch Autoradiographie visualisiert und in Wasser eluiert. Die erhaltene Lösung wurde durch Lyophilisierung konzentriert und über eine 0,8 ml Sephadex G10-Säule entsalzt.

3.6 In vitro Selektion mit photospaltbaren Linkern

3.6.1 Laserspaltung in Lösung

50 pmol des ligierten 25-mers 36 gelöst in 80 μl 0,1M Tris/HCl pH = 7; 10 mM EDTA wurden in einer Quarzküvette mit einem Nd-YAG-Lasers (50 mJ/Puls, 10 ns Pulsdauer, 8 Hz Pulsfrequenz, $\lambda=355$ nm) bestrahlt. Nach $n = 0, 8, 32, 480$ Pulsen wurden jeweils 10 μl -Aliquots entnommen, die anschließend auf ein denaturierenden 15% PAA-Gel aufgetragen wurden.

3.6.2 Laserspaltung von der Festphase

50 μl einer Streptavidin-Agarose-Suspension (19 $\mu\text{mol/ml}$) wurden auf einem Spinfilter (Cellulose-Acetat 0,45 μm) gegeben und durch vorsichtiges Zentrifugieren bei 1000 rpm für 2 Minuten bei 4°C von der überstehenden Lösung getrennt, ohne die Agarose dabei zu trocknen. Die Festphase wurde in 200 μl tRNA-Lösung (3 mg/ml) resuspendiert, für 30 s intensiv geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Auf diesen Spinfilter wurden 10 pmol des biotinylierten 72nt-Pools (Ligationsprodukt von 27) gelöst in 200 μl tRNA 3 mg/ml gegeben, für 30 min bei 4°C geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Das Eluat wurde auf frische Streptavidin-Agarose gegeben (präpariert wie oben) und wiederum für 30 min bei 4°C geschüttelt und zentrifugiert. Die beiden Streptavidin-Festphasen wurden vereinigt und zweimal mit 200 μl 8 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Tris/HCl pH= 7.5, 10 mM EDTA bzw. 3 $\mu\text{g/ml}$ tRNA gewaschen, anschließend wurden die vereinigten Eluate und die Festphase am Cerenkov-Zähler vermessen. Letztere wurde dreimal jeweils in 200 μl tRNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ resuspendiert, für 0.5, 1.5 bzw. 5min von oben mit einem Nd-YAG-Laser (50 mJ/Puls, 10 ns Pulsdauer, 8 Hz Pulsfrequenz, $\lambda=355$ nm) bestrahlt und zentrifugiert. Abschließend wurde die Festphase mit 200 μl 8 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Tris/HCl pH= 7.5, 10 mM EDTA gewaschen. Die Radioaktivität der verbleibenden Festphase und der gepoolten Eluate wurde vermessen, dann wurden letztere mit Ethanol gefällt und 1 % davon zur RT-PCR eingesetzt.

3.6.3 Immobilisierung und photolytische Selbstspaltung

100 μl einer Streptavidin-Agarose-Suspension (19 $\mu\text{mol/ml}$) wurden auf einem Spinfilter (Cellulose-Acetat 0,45 μm) durch Zentrifugieren sedimentiert, zweimal durch heftiges Schütteln in 400 μl tRNA 3 mg/ml bzw. in Wasser äquilibriert und jeweils durch Zentrifugation vom Waschpuffer getrennt. In einer Dunkelkammer wurden die entsalzten

RNA-Konjugate (120nt, ligiert an 2b) gelöst in 160µl 0,2M NaCl, 0,1M KCl, 50mM Hepes pH=7,2 für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Spinfilter mit der Festphase inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Eluat erneut mit 50 µl frischer Streptavidin-Agarose für 30 min inkubiert und durch Spinfiltration vom Puffer getrennt. Die vereinigten Festphasen wurden sukzessive sechsmal mit 1M NaCl, 15mal mit 7M Harnstoff und fünfmal mit 0,2M NaCl, 50 mM Hepes pH = 7.2 gewaschen (jeweils 400 µl, 30 s Schütteln, 30s Zentrifugation 10000rpm). Die immobilisierte RNA wurde anschließend in 400 µl 0,2M NaCl, 0,1M KCl, 50mM Hepes pH=7,2 für 10 min auf 80°C erwärmt und langsam renaturiert (5 min). Nach fünf Waschungen mit 400 µl Reaktionspuffer (0,2M NaCl, 0,1M KCl, 50mM Hepes pH=7.2, 20mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 1mM NAD, je 10µM CuCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, CoCl₃, AlCl₃, (NH₄)Fe^{III}(SO₄)₂) erfolgte die Gegenselektion durch eine Stunde Inkubation im Reaktionspuffer, gefolgt von weiteren sechs Waschungen mit 400 µl Reaktionspuffer. Bei der ersten Selektion wurde die Belichtung in 200 µl Reaktionspuffer für 30 min bei Neonlicht durchgeführt, bei der zweiten Selektion wurde für 5 min mit einer HBO200 Xenon-Lampe in 30 cm Entfernung belichtet (ab Runde 6: 1 min bei 130 cm). In beiden Fällen waren die Belichtungsbedingungen so gewählt, dass unselektierte RNA mit ca. 0,1 % gespalten wurden, während ohne Belichtung weniger als 0,02% wiedergewonnen wurden. Nach Spinfiltration wurde die Festphase ein letztes mal mit 200 µl Reaktionspuffer gewaschen, die bestrahlten Lösungen vereinigt und selektierte RNA nach Ethanol-fällung (mit Glycogen) zur RT-PCR eingesetzt.

In der ersten Runde wurden 4 ml Streptavidin-Agarose-Suspension eingesetzt und die Waschschrte um 60% gekürzt.

3.6.4 Klonierung

Zur Vorbereitung der DNA-Proben für die Klonierung wurde bei der RT-PCR der 10. Runde nach dem letzten Zyklus die Reaktionsmischung für 10 Minuten bei 72°C gehalten. Anschließend wurden die PCR-Produkte gemäß dem Protokoll des TOPO TA Cloning-Kit (Invitrogen) mit einer Topoisomerase in einen Plasmidvektor (pCR[®] 2.1-TOPO) ligiert und anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10F') transformiert. Die Zellen wurden über Nacht auf LB-Platten (Luria-Bertani-Medium) ausgestrichen, die zuvor mit Ampicillin, X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β,D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropylthio-β,D-galactopyranosid) behandelt worden waren. Die weißen, rekombinanten Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und direkt auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Reaktionsansätzen (je 10 µl) übertragen. Nach fünfminütigem Lysieren der Zellen bei 94°C

erfolgten 30 Zyklen der parallelen PCR (je 30 Sekunden bei 94°C, 55°C und 72°C) in 6 µM der Primer 41, 4 µM Primer 42, 20 mM Tris/HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs und 50 mU/µl Taq-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert und von den amplifizierten Klonen wurden je 4 µl zur T7-Transkription eingesetzt (je 20 µl).

Nach Reinigung über ein 5% denaturierendes PAA-Gel wurden die eluierten und gefällten Transkripte in 50 µl Reaktionen an radioaktives pCp (0,5 µCi/µl) ligiert und wiederum mit einem 5% PAA-Gel gereinigt.

3.6.5 Charakterisierung selbstspaltender RNA-Sequenzen

Zur Selbstspaltungsreaktion wurden die pCp-RNA-Konjugate für 10 Minuten in 5 µl eines 50 mM NaCl-Puffers (25mM Hepes pH = 7.2) auf 80°C erhitzt und langsam abgekühlt. Nach Zugabe von 0,5 µl MgCl₂ 0,1 M und Inkubation für 4 Stunden wurde die Selbstspaltung mit 1 µl EDTA 0,1 M und 5 µl Formamid gestoppt, anschließend wurden die Proben erhitzt und mit Farbmarker auf ein 20% denaturierendes PAA-Gel aufgetragen.

Für die alkalische Hydrolyse-Leiter wurde eine 3µl-Probe von Klon 4 in 25 mM NaOH, 0,5 mM EDTA und 1 µg/µl tRNA für 1-2 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktion mit 1µl eines Stopp-Puffers (75 mM HCl, 89 mM Tris/HCl pH = 8.4, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 0,83 M Harnstoff) versetzt und auf Eis gekühlt.

Der RNase-T1-Verdau erfolgt mit 3µl einer Probe von Klon 9 in 16,5 mM Natriumcitrat pH = 5.0, 3,5 M Harnstoff, 0,85 mM EDTA und 0,5 µg/µl tRNA für 30 Minuten bei 55°C.

3.6.6 Herstellung einzelsträngiger Anthracen-DNA-Konjugate

Anthracen-DNA-Konjugate wurden in 300 µl Reaktionen mit 50 mM KCl, 20 mM Tris/HCl pH = 8.4, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM je dNTP, 15 µCi α³²P-dCTP, 100 U Taq-Polymerase, ca. 50 fmol (selektiertem) DNA- Templat und je 5 µM der Primer 45 und 50 (5'-d(GTG GAT CCG ACC GTG GTG C) rC^{3'}) hergestellt. Nach 12-18 Zyklen mit 1 Minute bei 95°C, 1.5 Minuten bei 55°C und 2.5 Minuten bei 72°C wurde die PCR-Mischung mit 60 µl NaOH versetzt und für 10 Minuten auf 80°C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung mit 60 µl HCl 1M und 50 µl 3M NaOAc pH = 5,5 neutralisiert, mit Ethanol gefällt und das Pellet über ein denaturierendes 5% PAA-Gel gereinigt. Nach Gelelution und Fällung wurde ein Aliquot der Probe durch UV- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

Die Massen-PCR der ersten Runde wurde in zwei Mikrotiterplatten in 20 ml Gesamtvolumen mit 1,26 nmol des gedopten bzw. 0,75 nmol des total randomisierten 120nt Pools (je 3 Kopien) für 12 Runden durchgeführt. Die erste Runde des 18nt Motivs erfolgte unter den oben genannten Standard-Bedingungen.

3.6.7 Selektion von Diels-Alder-Reaktionsprodukten

Die gelgereinigten und gefällten Anthracen-ssDNA-Konjugate (ca. 50-100 pmol) wurden in 360 μ l 0,22 M NaCl, 0,11 M KCl, 33 mM Tris/HCl pH = 7,8 bei 95°C für 2 min gelöst und durch langsames Abkühlen (5 min) renaturiert. Ab der 3. Runde wurde nun alle zwei Runden für 1 Stunde mit 50 μ l vorgewaschener Streptavidin-Agarose auf einem Spinfilter (Durapore) inkubiert. Die filtrierte DNA-Lösung wurde nun auf 0,2M NaCl, 0,1M KCl, 30 mM Tris/HCl pH = 7.8, 5mM MgCl₂, 5mM CaCl₂, je 5 μ M CuCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, CoCl₃, AlCl₃ und 25 μ M Biotinmaleinimid 53 verdünnt und nach einer Stunde zweimal mit Ethanol gefällt. Die Pellets wurden in 100 μ l Immobilisierungspuffer (1 M NaCl, 10 mM Hepes/NaOH pH = 7.2, 5 mM EDTA) gelöst auf einem Spinfilter mit 50 μ l Streptavidin-Agarose inkubiert, die zuvor dreimal mit 600 μ l Immobilisierungspuffer (1 M NaCl, 10 mM Hepes/NaOH pH = 7.2, 5 mM EDTA, 3,3 mg/ml tRNA) equilibriert worden war. Nach 45 min Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Festphase 4 mal mit 600 μ l 7M Harnstoff, 0.1M Tris/HCl pH = 7.4 gewaschen und anschließend auf einen frisch äquilibrierten Spinfilter übertragen. Nach weiteren 11 Waschungen mit 600 μ l 7M Harnstoff, 0.1M Tris/HCl pH = 7.4 und 2x 600 μ l Wasser wurde die DNA-Beladung der Festphase durch Cerenkov-Zählung bestimmt und die immobilisierte DNA direkt an der Phase durch RT-PCR amplifiziert.

Alternativ wurde die Festphase erneut mit 2 x 600 μ l 7M Harnstoff, 0.1M Tris/HCl pH = 7.4 gewaschen, zweimal in 200 μ l desselben Puffers resuspendiert und jeweils von oben für 30 s mit einem Nd-YAG-Laser (50 mJ/Puls, 10 ns Pulsdauer, 8 Hz Pulsfrequenz, λ =355 nm) bestrahlt. Die freigesetzte DNA wurde durch Spinfiltration gewonnen, gefällt und zur RT-PCR eingesetzt.