

Michael Graber

Weitreichender Elektronentransfer in biologischen Systemen

 Cuvillier Verlag Göttingen

Weitreichender Elektronentransfer in biologischen Systemen

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Würde eines
Doktors der Philosophie

vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von Michael Graber

aus Basel
Basel, 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008

Zugl.: Basel, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-670-2

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel auf Antrag der Professoren:

Prof. Dr. B. Giese

Prof. Dr. H. Wennemers

Basel, den 24. Juni 2008

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri

Dekan

Umschlag: Umschlagsgestaltung durch den Autor. Hintergrundbild: © by iStockphoto, Datei-Nummer: 5165315. Das Bild unterliegt dem Urheberrecht und wurde lizenziert.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-670-2

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Giese in der Zeit von November 2003 bis Juni 2008 im Departement Chemie der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden an folgender Konferenz vorgestellt:

26. Regio Symposium, D-Beuggen, September 2006.

Danksagungen

Prof. Dr. Bernd Giese danke ich für das grosszügige Angebot, meine Doktorarbeit in seiner Gruppe durchführen zu dürfen, die wissenschaftliche Freiheit, die ich genießen durfte, und für die anregenden Diskussionen, die wir führten.

Meinen Laborkollegen und Freunden Stephan Bürgi, Meike Cordes, Agnieszka Köttgen und Christian Jasper danke ich für die gute Zeit im Labor, das Aufmuntern nach Rückschlägen und für die tollen gemeinsamen Freizeitaktivitäten. Meine "Diss-Jahre" werden mir nicht zuletzt wegen ihnen immer in guter Erinnerung bleiben.

Ich danke Dr. Min Wang für seine tatkräftige und engagierte Unterstützung unseres Projektes und die fruchtbaren Diskussionen im Rahmen seines Post-Doktorats.

Der ganzen Arbeitsgruppe Giese danke ich für die gute Zusammenarbeit und all die vielen Einführungen an den verschiedenen wissenschaftlichen Geräten.

Dr. Yavor Kamdzhilov und Dr. Pavel Müller danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz am Laser, die vielen nützlichen Hinweise und die ungemein wichtigen "Hast Du eigentlich schon daran gedacht...?"-Fragen, ohne die das Projekt schon in den Startlöchern gestorben wäre.

Prof. Dr. Eugen Stulz danke ich für die Synthese zweier DNA-Stränge und das Zusammenstellen von hilfreichen Daten bezüglich des Porphyrin-Radikals.

Prof. Dr. Britt-Marie Sjöberg und MariAnn Westman danke ich für die Versorgung mit *E. coli* Zellen und dafür, dass ich während mehrerer Wochen bei ihnen in Stockholm arbeiten durfte. Ohne ihren Einsatz hätte ich noch heute keine aktiven Proteine.

Dr. Annett Bachmann und Andreas Reiner aus der Gruppe von Prof. Dr. T. Kiefhaber danke ich für die freundliche Hilfe bei den Stopped-Flow-Messungen und für unermüdliche Unterstützung bei Lasermessungen.

Dr. Peter Schmidt danke ich für seine Bereitschaft mir in biologischen Assays zu helfen und mir so das nötige Rüstzeug zu geben, um als Chemiker in der Mikrobiologie zu arbeiten.

Matthias Jecklin danke ich für seine tatkräftige Mithilfe bei der Synthese des cumarinyl-geschützten Substrats im Rahmen seines Wahlpraktikums.

Ich danke allen Institutsangestellten für ihre Mithilfe bei allerlei technischen Problemen und Fragestellungen.

Ein grosser Dank gebührt auch meiner Familie und meiner Verlobten Mirjam fürs Aufmuntern, Trösten, Loben und Rumalbern. You made my day! Everyday.

*»Alles ist Chemie. Aber Chemie ist nicht Alles.«
(Sprichwort)*

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Radikale in der Organischen Chemie.....	2
1.2 Radikalische Cofaktoren.....	2
1.3 Proteine und Radikale.....	3
1.4 Radikale und DNA.....	4
2 Grundlagen des Elektronentransfers.....	6
2.1 Die Marcus-Gleichung.....	6
2.2 Superaustauschmechanismus.....	7
2.3 Hoppingmechanismus.....	9
3 Der Elektronentransfer in der Ribonukleotid Reduktase.....	12
3.1 Eigenschaften der Klasse I Ribonukleotid Reduktase.....	12
3.2 Aufgabenstellung.....	17
3.3 Herstellung von R1 und R2.....	18
3.4 Stopped Flow Experimente.....	18
3.5 Laserflash Photolyse.....	21
3.5.1 Versuchsaufbau.....	21
3.5.2 Gegenüberstellung der verwendeten Käfigverbindungen.....	22
3.5.3 Syntheseübersicht der photolabil geschützten Substraten 10 und 11.....	25
3.5.4 Effizienz der photolytischen Spaltung.....	27
3.5.5 Bioaktivität von freigesetztem CDP.....	29
3.5.6 Ergebnisse der Laserflash Photolysen.....	30
3.6 Interpretation der Ergebnisse und Ausblick.....	31
3.7 Photochemische Generierung von Tyr ₃₅₆	33
3.8 Zusammenfassung: ET durch RNR.....	34
4 Reduktiver Elektronentransfer durch die DNA.....	35
4.1 Aufgabenstellung.....	35
4.2 Injektorsystem: Eigenschaften, Syntheseübersicht.....	36
4.3 Detektorsystem: Eigenschaften, Syntheseübersicht.....	39
4.4 Das Porphyrinradikal-Anion.....	42
4.5 DNA-Sequenzen.....	43
4.6 Laserflashphotolysen des DNA-Doppelstrangs 55.....	45
4.7 Interpretation der Ergebnisse.....	46
4.8 Zusammenfassung und Ausblick.....	47
Experimenteller Teil.....	49

5	Verwendete Apparaturen und Materialien	50
5.1	Apparaturen	50
5.2	Zuordnung der NMR-Signale	52
5.3	Lösungsmittel und Reagenzien	53
6	Synthesen.....	54
6.1	Cumarinylgeschütztes CDP	54
6.2	pHP-geschütztes CDP	58
6.3	T*-Injektor	63
6.4	Porphyrin-Detektor.....	72
7	Biologische Assays und allgemeine Arbeitsvorschriften	80
7.1	Überexpression und Aufreinigung von R1 und R2	80
7.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von R1 und R2	82
7.3	Aktivitätsmessung von RNR	83
7.4	Messung der Bioaktivität von freigesetztem CDP.....	83
7.5	Stopped Flow Messungen	84
7.6	Laserflashphotolysen.....	84
7.7	DNA-Oligosynthese	85
7.8	HPLC-Reinigung von DNA-Strängen.....	85
7.9	Abspaltung der letzten Trityl-Gruppe eines DNA-Stranges	86
7.10	Maldi-Tof Messungen von DNA-Strängen	86
7.11	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	87
7.12	Hybridisierung von DNA-Doppelsträngen.....	87
7.13	Schmelzkurven von Doppelstrang-DNA	88
8	Referenzen	89

Liste der verwendeten Abkürzungen

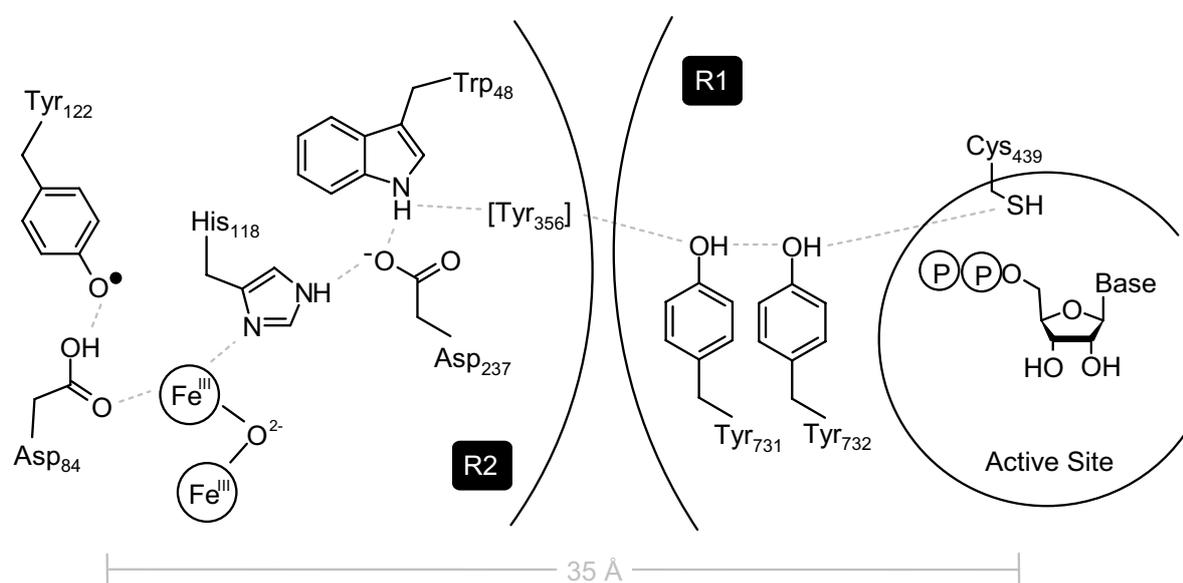
°C	Grad Celsius
A	Adenin oder Akzeptor, je nach Kontext
Ac	Acetat
ar	aromatisch
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
B	Base (DNA)
ber.	berechnet
Bn	Benzyl-
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled device
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CDP	Cytidin-diphosphat
CMP	Cytidin-monophosphat
Cys	Cystein
D	Donor
DC	Dünnschichtchromatographie
dCDP	Deoxycytidin-diphosphat
Det	Detektor
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMTr	4,4'-Dimethoxy-trityl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Thymidin-triphosphat
E	Energie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Bakterienstamm)
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EE	Essigsäurethylester
ESI	Elektronenstossionisation (Massenspektrometrie)
<i>et al.</i>	et alii
Et	Ethyl

ET	Elektronentransfer
FAB	Fast atom bombardment (Massenspektrometrie)
G	Guanin
gem.	gemessen
ges.	gesättigt
Glu	Glutaminsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hex	<i>n</i> -Hexan
His	Histidin
HOBT	1-Hydroxy-benzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
hν	Strahlung (Licht)
Inj	Injektor
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR)
JACS	Journal of the American Chemical Society
LB	Lysogeni Broth (Nährmedium)
LHC	Light harvesting complex (Lichtsammelkomplex, Protein)
M	Molar (mol / L)
m/z	Masse pro Ladung (Massenspektrometrie)
MALDI-ToF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometry (Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation – Flugzeit-Massenspektrometrie)
NADP ⁺ / NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat
NBS	N-Brom-succinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
Me	Methyl-
OMA	Optical multichannel analyzer (Optischer Mehrfrequenzanalysator)
P	Phosphat
PCET	Proton Coupled Electron Transfer (Protonengekoppelter Elektronentransfer)
Ph	Phenyl-
pHP	<i>p</i> -Hydroxyphenacyl
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
R	Gaskonstante (8.31 J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)
R1	Untereinheit der RNR mit dem katalytischen Zentrum

R2	Untereinheit der RNR mit dem Tyrosylradikal
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
R _f	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie)
RNA	Ribonukleinsäure
RNR	Ribonukleotid Reduktase
RP	Reversed phase (Umkehrphase)
rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SET	Single Electron Transfer
Smp.	Schmelzpunkt
T	Thymin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl-
TBDPS	<i>tert.</i> -Butyldiphenylsilyl-
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-piperidinyloxyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSCN	Trimethylsilylcyanid
Tol	Toluoyl-
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Trp	Tryptophan
Ts	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
Tyr	Tyrosin
UV/Vis	Ultraviolett / Sichtbares Licht
ÜZ	Übergangszustand
wt	wildtyp

Abstract

Ribonucleotide Reductases (RNR) are enzymes, which catalyze the reduction of all ribonucleotides to their deoxyribonucleotides and therefore play an important role in DNA repair and replication mechanisms. The class I RNR contains a stable diferric-tyrosyl radical cofactor which is essential for the reduction of the substrates. This radical can directly be observed by UV/Vis spectroscopy at 410 nm. After a substrate has bound in the active site, the radical will be transferred along a conserved hydrogen bridge across a distance of 35 Å (see scheme below).



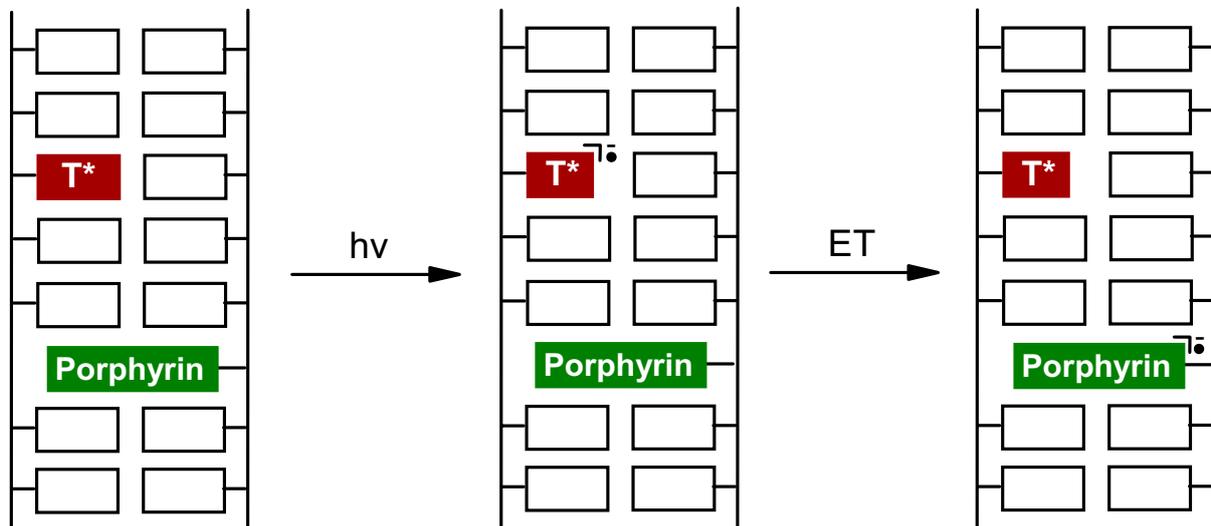
Conserved residues of class I RNR that compose the putative PCET pathway for radical transport from Tyr₁₂₂ in R2 to Cys₄₃₉ in the R1 active site.

The RNR's proton coupled electron transfer (PCET) is in the focus of this thesis. The goal was to gain insight in this process by stopped flow measurements and by laser flash photolysis of caged substrates.

We could show that upon mixing cytidine diphosphate (CDP) and RNR no change of the tyrosyl radical signal can be observed in millisecond scale. To examine faster processes in the micro- and nanosecond scale, we synthesized two different caged substrates. We demonstrated that upon irradiation, photocleavage takes place and CDP is released, which can be converted to deoxycytidine diphosphate by RNR. After laser flash photolysis we observed no change of the tyrosyl signal at $\lambda = 410$ nm. This might be due the fact that the PCET is even faster than ~ 100 ns. Such a fast process is only in accordance with a hopping mechanism.

The goal of a second project was to build up a system to measure the speed of an electron transfer in a double strand DNA-oligomer. We synthesized a modification based on thymidin,

which will be reduced to its radical anion upon laser irradiation at $\lambda = 308$ nm. An incorporated porphyrin system acts as the electron acceptor and will be reduced to its radical anion. By time dependent observation of the porphyrins absorption, the k_{ET} of this electron hopping process can be measured. The following scheme sketches this electron transfer.



Electron transfer in DNA between a thymidine as donor and porphyrin as acceptor.

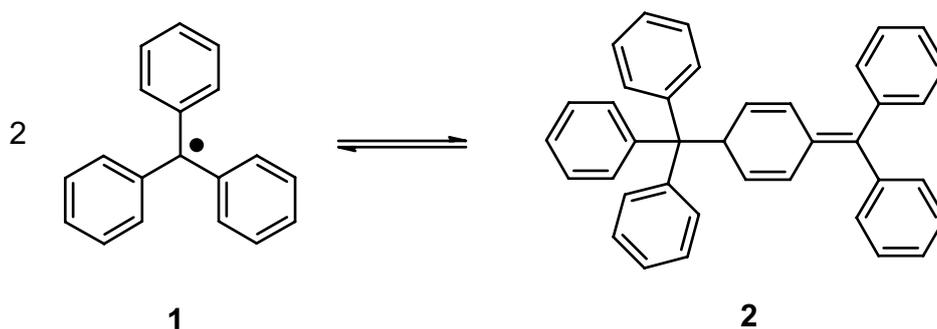
We could synthesize both modifications (T^* and porphyrin) and they were incorporated into a double strand DNA-oligomer. We could show that upon irradiation of the porphyrin the chromophore is stable against photochemical processes and no phosphorescence takes place. Upon laser flash photolysis we observed a fast increase of the absorption at 445 nm followed by a slow decrease. Fitting of the measured curves showed that the ET is faster than $k_{ET} \geq 10^6$ s⁻¹ if only one A:T pair is between donor and acceptor. Future experiments with a larger distance between thymidine and porphyrin will yield in more precise results concerning the speed of the ET.

Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Radikale in der Organischen Chemie

Als im Jahr 1900 mit dem Triphenylmethylradikal (**1**) das erste stabile Radikal synthetisiert und charakterisiert wurde, war dies eine grosse Errungenschaft in der Chemie.^[1] Galten doch die Radikale mit ihren ungepaarten Elektronen als besonders reaktive und kurzlebige Spezies unter den Molekülen. Dieser Meilenstein war zugleich der Startschuss für die Radikal-Chemie.



Schema 1: Das Triphenylmethyl-Radikal (**1**) und das entsprechende Dimer **2** – der Beginn der Radikalchemie.

Im Verlaufe der Zeit wurden weitere stabile Radikale hergestellt und deren Eigenschaften und mögliche Anwendungen untersucht. Heute, gut hundert Jahre später, haben die Radikale von einer kuriosen Nischenerscheinung einen festen Platz in der Chemie erobert und werden standardmässig bei vielen Reaktionen eingesetzt.^[2]

1.2 Radikalische Cofaktoren

Die Natur hat schon vor Milliarden von Jahren gelernt mit Radikalen umzugehen. So ist z. B. Vitamin B₁₂ ein Vorläufer eines Radikals, das durch Homolyse der C-Co-Bindung entsteht.^[3] In der Zelle katalysiert Vitamin B₁₂ die Biosynthese der Purinbasen Adenin und Guanidin, sowie der Pyrimidinbase Thymin. Besteht ein Mangel dieses Vitamins, kommt die Synthese von DNA und RNA in den Zellen zum Erliegen. Dies äussert sich vorrangig in einer verminderten Produktion von roten Blutkörperchen. Der Körper leidet an einer Blutarmut.^[4] Ein weiteres Beispiel eines Radikale erzeugenden Cofaktors ist P450. Die Mitglieder der Familie dieser Proteine beinhalten ein Häm, ein Porphyrin-System mit zentralem Eisen-Atom. Die Cytochrome P450 sind am Aufbau der Steroide, Prostaglandine und Retinoide beteiligt. Die Zahl 450 deutet auf ein Absorptionsmaximum bei 450 nm bei UV/Vis Spektren hin, welches auf das Häm zurückzuführen ist.^[5]

1.3 Proteine und Radikale

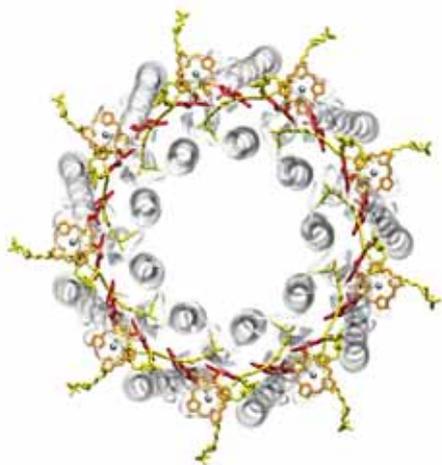


Abbildung 1: Barrel-Struktur des Proteins LHC2. Die Cofaktoren sind farblich markiert. Quelle: J. Mol. Biol., 2006.^[6]

Der Transfer von Ladungen spielt auch in Proteinen eine grosse Rolle.^[7] So gehören die Lichtsammelkomplexe LHC1 und LHC2 aufgrund der Verbreitung von Pflanzen und Algen zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen. Die verschiedenen Chromophore (Chlorophylle a und b, sowie Carotinoide) dieser Proteine absorbieren Licht im sichtbaren Spektrum, wobei eine Ladungstrennung erfolgt. Die entstehenden Ladungen werden separat ins Zentrum der Proteine geleitet, in welchem dann Photosystem I resp. Photosystem II angeregt werden. Hierbei werden Ladungen über mehrere Ångström transferiert.^[8, 9]

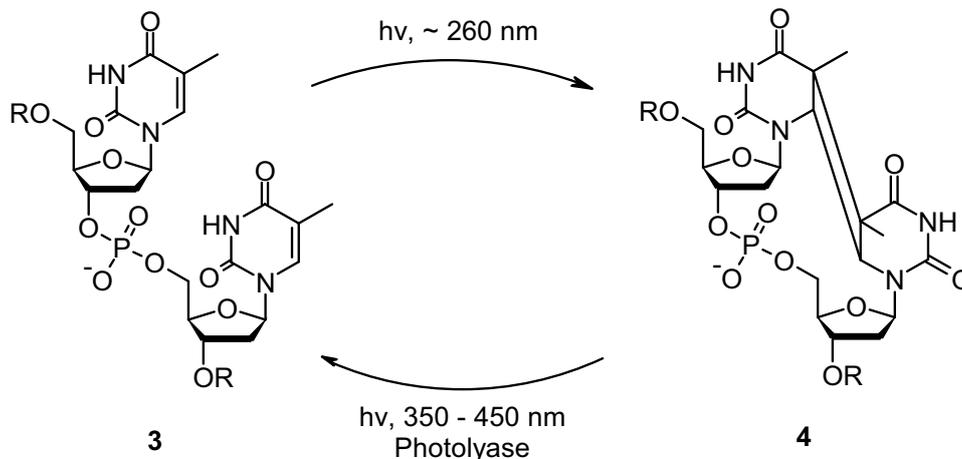
Ein weiteres prominentes Beispiel für Radikalreaktionen in Proteinen ist die Ribonukleotid Reduktase (RNR), ein Enzym welches die Purin- und Pyrimidin-Ribonukleotide in ihre entsprechende Desoxyribonukleotide überführt. Somit bildet die RNR eine Art Bindeglied zwischen der RNA- und der DNA-Welt und es wird vermutet, dass das Enzym eine zentrale Rolle in der chemischen Evolution der ersten Zelle gespielt hat.^[10, 11]

Es gibt mehrere Klassen der Ribonukleotid Reduktase, die zumeist in drei Hauptklassen I bis III eingeteilt werden. Deren Strukturen unterscheiden sich grundlegend, jedoch ist ihnen allen eine Gemeinsamkeit: alle Enzyme enthalten ein langlebiges Radikal. In der Klasse I, auf die in dieser Arbeit Bezug genommen wird, ist dies ein Tyrosylradikal, welches durch ein Fe-O-Fe-Komplex stabilisiert wird. Während der enzymatischen Katalyse wird die Radikaleigenschaft auf ein Cystein im katalytischen Zentrum übertragen. Der Mechanismus des Transfers ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wird vermutet, dass er über eine durchgehende Wasserstoff-Brücke abläuft und die Ladung dabei über mehrere aromatische Aminosäuren hüpft. Bei diesem Elektronentransfer (ET) wird eine erstaunliche Distanz von 35 Å überwunden. Nach erfolgter Reduktion des Substrats wird Tyrosin wieder zum Tyrosylradikal oxidiert, wo die Ladung bis zum nächsten Einsatz ‚gespeichert‘ wird.^[12]

Aufgrund der zentralen Stellung der RNR im Nukleinsäure-Metabolismus ist das Enzym auch im Fokus der Wirkstoffsuche gegen Viren und Tumore. Die Substanz Gemcitabine wurde bereits erfolgreich bei der Bekämpfung von Lungenkrebs eingesetzt.^[13, 14]

1.4 Radikale und DNA

Die Radikalreaktionen und der Elektronentransfer ist jedoch nicht auf Enzyme beschränkt.^[15] Auch in der DNA werden *in vivo* Radikale erzeugt und über mehrere Basen hinweg transportiert. Dabei stellt das π -Stacking der Aromaten im Inneren der DNA-Doppelhelix ein ideales Gerüst für den Elektronentransfer dar. Ein interessantes Beispiel in der Biologie ist das Enzym DNA-Photolyase, das durch eine Elektroneninjektion in die DNA UV-Schäden repariert.^[16, 17] Wenn eine DNA-Doppelhelix UV-Licht ausgesetzt ist, so bilden sich in einer [2,2]-Cyclisierungsreaktion Cyclobutandimere (Schema 2, **3** \rightarrow **4**).^[18]



Schema 2: Photochemische Bildung und enzymatische Cycloreversion eines TT-Dimers.

Bei Anwesenheit dieser Dimere kann keine Transkription und Replikation durchgeführt werden und es kommt zu Immunsuppression, Tumorbildung oder Zelltod.^[19-21] Um diesen unerwünschten Prozessen zu entgehen, repariert die Photolyase die Schäden (Schema 2, **4** \rightarrow **3**). Vor der eigentlichen Reparatur bindet dabei das Enzym in einer lichtunabhängigen Reaktion an die DNA. Die Cycloreversion erfolgt durch eine Elektroneninjektion von einem lichtangeregten, reduzierten und deprotonierten Flavin-Coenzym innerhalb des Enzyms. Ein weiterer Chromophor des Enzyms wird durch Photonenabsorption im sichtbaren Wellenlängenbereich (350 bis 450 nm) angeregt und überträgt die Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zum FADH^- , welches ein Elektron auf den Cyclobutanring des TT-Dimers überträgt und diesen öffnet.^[22] In der DNA-Photolyase wird das Elektron dabei über mehrere Aminosäuren transportiert, bis es dann auf die DNA übertragen wird. Abbildung 2 zeigt die räumliche Struktur des Enzyms und die am ET beteiligten Aminosäuren.

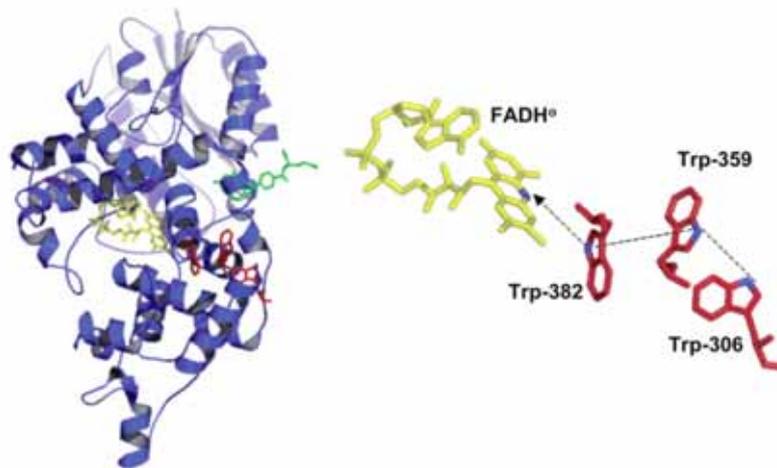


Abbildung 2: Kristallstruktur der *E. coli* DNA-Photolyase. Rechts daneben ist die räumliche Anordnung des FADH-Coenzym und die drei am ET beteiligten Tryptophane abgebildet. Quelle: *Biochemistry*, 2004.^[23]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl Radikale typischerweise eine relativ instabile Spezies sind, die Natur viele Wege gefunden hat, diese Moleküle zu stabilisieren. Sie werden bei verschiedenen zentralen biologischen Prozessen eingesetzt und manchmal über mehrere dutzend Ångström transportiert.

Genau hier setzt die vorliegende Doktorarbeit ein: Es werden zwei verschiedene, weitreichende Elektronentransfers in biologischen Systemen untersucht: der Elektronentransfer der RNR und der reduktive ET in einem doppelsträngigen DNA-Oligomer.

2 Grundlagen des Elektronentransfers

2.1 Die Marcus-Gleichung

Im Jahr 1957 publizierte Marcus eine Theorie des Elektronentransfers, für die er 1992 mit dem Nobelpreis geehrt wurde.^[24, 25] Die Theorie wird noch heute als Grundlage für den ET verwendet.

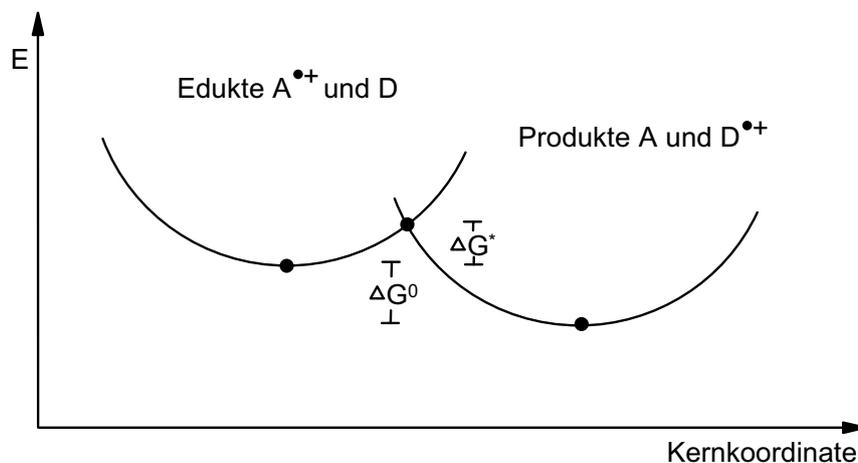
Die Marcus-Theorie geht davon aus, dass jeder ET über einen Übergangszustand mit einer bestimmten Aktivierungsenergie ΔG^* verläuft. Für die Geschwindigkeit k_{ET} gilt dabei die Arrheniusgleichung.

$$k_{ET} = A \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$$

Gemäss der Theorie von Marcus wird ΔG^* von zwei Faktoren bestimmt: von der freien Standardreaktionsenthalpie ΔG^0 , sowie von der Reorganisationsenergie λ . Dabei ist λ die Energie, die aufgewendet werden muss, um die Atomkerne des Edukts in die Geometrie des Produkts zu überführen. Der präexponentielle Faktor A wird in der klassischen Marcus-Gleichung durch die Geschwindigkeit des aktivierungsfreien ETs ($\Delta G^0 = -\lambda$) ersetzt. Folgende Formel gibt den Zusammenhang der genannten Faktoren wieder:

$$k_{ET} = k_{ET(0)} \cdot e^{-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda RT}}$$

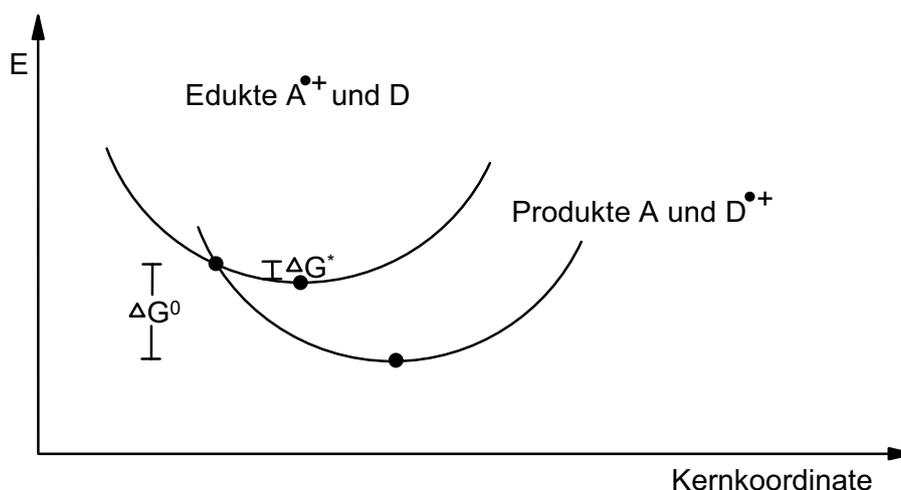
In Schema 3 wird die Reorganisationsenergie λ gegen die Kernkoordinaten der Edukte bzw. Produkte aufgetragen.



Schema 3: Reaktionsverlauf eines ETs mit Elektronen-Akzeptor A und -Donor D. Bevor der Transfer stattfinden kann, muss die Aktivierungsenergie ΔG^* überwunden werden.

Da ein ET nur dann stattfinden kann, wenn der Akzeptor und Donor die gleiche atomare Geometrie aufweisen, muss zunächst die Energie ΔG^* aufgebracht werden, um die Atome zu verschieben. Sobald die Geometrie des ÜZs erreicht ist, wandert das Elektron vom Donor zum Akzeptor und beide können unter Energieabgabe ihren neuen Grundzustand einnehmen.

Je nach System und damit Anordnung der Potentialtöpfe gibt es gemäss Marcus-Theorie zwei Bereiche: den normalen und den sogenannten inversen Marcus-Bereich (Schema 4).



Schema 4: Akzeptor-Donor-System im inversen Marcus-Bereich. Obwohl ΔG^0 sehr gross ist, muss in diesem Fall ebenso eine Aktivierungsenergie überwunden werden, damit die Reaktion ablaufen kann.

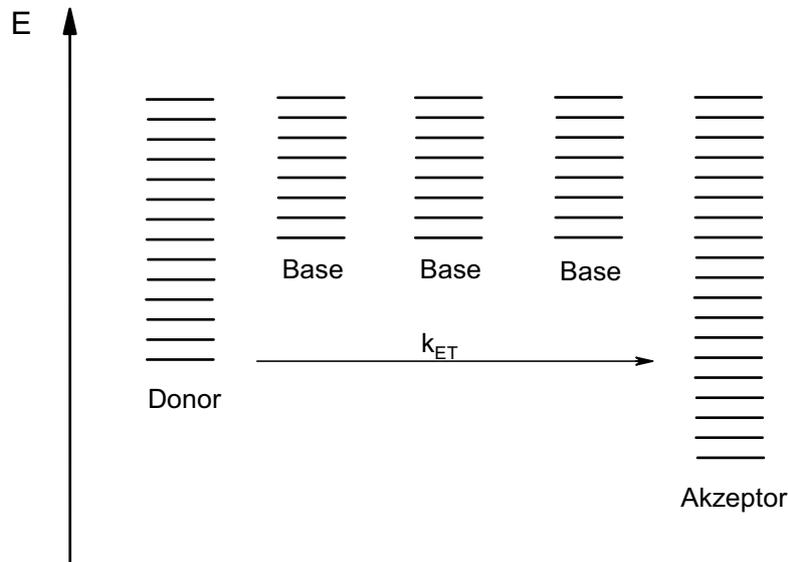
Sowohl im normalen, wie auch im inversen Bereich muss zum Erreichen des Übergangszustandes Energie aufgewendet werden. Dazwischen gibt es einen Bereich, in welchem $\Delta G^* = 0$ ist und somit die Reaktion ohne Energiezufuhr spontan abläuft und die Geschwindigkeit ein Maximum durchläuft. Die Reaktion ist dann diffusionskontrolliert und bei jedem Zusammenstoss eines Donor und Akzeptors findet ein Elektronentransfer statt. Wegen der ungewohnten Postulate im Zusammenhang mit dem inversen Marcus-Bereich wurde die Theorie über Jahrzehnte kritisiert, bis sie 1984 experimentell bestätigt wurde.^[26]

2.2 Superaustauschmechanismus

Die Marcus-Theorie beschreibt den Elektronentransfer durch einen Einstufenprozess. Dabei wandert die Ladung in einem Schritt vom Molekülorbital des Donors zum Molekülorbital des Akzeptors.

Aufbauend auf der Marcus-Theorie hat McConnell in den 1960er Jahren das Model des Superaustauschmechanismus entwickelt.^[27] Bei einem ET durch ein Enzym oder einen DNA-Strang kann das Elektron nach dieser Theorie nie auf einer Aminosäure oder Base zwischen

Donor und Akzeptor beobachtet werden. In Schema 5 wird ein solcher ET-Prozess in der DNA gezeigt.



Schema 5: Superaustausch eines Elektrons in der DNA mit drei Nukleobasen zwischen Donor und Akzeptor.

Die Geschwindigkeit k_{ET} eines solchen Superaustausches hängt dabei exponentiell von der Distanz gemäss folgender Formel ab:

$$k_{ET} \propto e^{-\beta r}$$

Der Parameter r ist dabei die Distanz zwischen Donor und Akzeptor und β ist eine Materialkonstante, die ein Mass für die Distanzabhängigkeit darstellt. Dutton hat für Proteine folgende Formel entwickelt, die einen Näherungswert für β liefert:^[28]

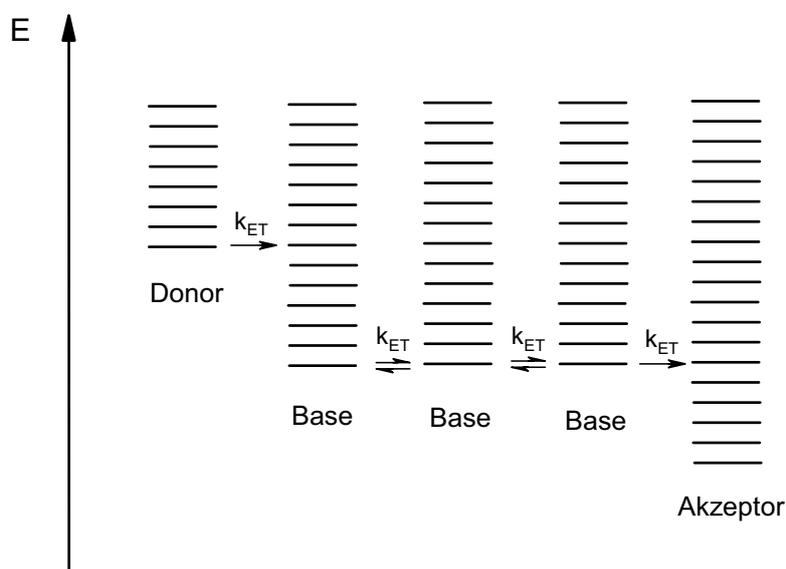
$$\beta \cong \rho \cdot 0.9 \cdot \text{\AA}^{-1} + (1 - \rho) \cdot 2.8 \cdot \text{\AA}^{-1}$$

Dabei ist ρ ein Wert für die Packungsdichte der Atome, der sich zwischen 0 (absolutes Vakuum) und 1 (dichteste mögliche Packung) bewegt. Typische β -Werte für Proteine und DNA liegen bei 0.6 bis 0.8 \AA^{-1} .^[29]

Die Reichweite von Elektronentransfers mit Superaustauschmechanismus ist beschränkt. So ergab eine strukturelle Überprüfung von rund 200 Redox-Proteinen, welche in der RCSB Protein Data Bank eingetragen sind, dass die Donor-Akzeptor-Distanz bei 3 bis 12 \AA liegt.^[29] Werden Elektronen über grössere Distanzen transportiert, liegt möglicherweise ein Hopping-mechanismus vor.

2.3 Hoppingmechanismus

Beim Hoppingmechanismus wird die Ladung nicht direkt vom Donor zum Akzeptor verschoben, sondern hüpft dazwischen über mehrere Schritte. Bei der DNA bilden die Nukleobasen im Innern der Doppelhelix die Zwischenstationen, in Proteinen sind es meistens Redox-Cofaktoren oder aromatische Aminosäuren wie Tyrosin, Histidin oder Tryptophan. Bei jedem Schritt wird somit die Zwischenstufe kurzzeitig oxidiert bzw. reduziert, bevor sie dann die Ladung selbst weitergibt. Anders als beim Superaustausch könnte theoretisch die Ladung auf jeder einzelnen Stufe experimentell beobachtet werden. In Anlehnung an das oben abgebildete Schema, wird in Schema 6 ein Hopping-Prozess in der DNA dargestellt.



Schema 6: Hoppingprozess in der DNA mit drei Basen zwischen Donor und Akzeptor.

Die Kinetik eines Hopping-Prozesses unterscheidet sich grundlegend von der eines Superaustausches. Bei einem Superaustausch spielt die Distanz zwischen Donor und Akzeptor für die Geschwindigkeit des Transfers eine entscheidende Rolle und die Redoxpotentiale der dazwischenliegenden Basen haben einen sehr geringen Einfluss. Demgegenüber ist die Distanz beim Hopping-Prozess für die Geschwindigkeit nicht massgebend, sondern die Redoxpotentiale der dazwischenliegenden Basen. Mit der Formel

$$k_{ET} \propto N^{-\eta}$$

wird die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Anzahl der Nukleobasen N angegeben. Der Faktor η ist eine Konstante, welche beim oxidativen Lochtransfer den Wert 1.7 ± 0.2 hat.^[30]

Mit dem Hopping-Mechanismus kann ein ET über Distanzen von 4 Basen und mehr erklärt werden. Denn ein derart weitreichender ET ohne Hopping würde durch Superaustausch viel länger dauern, als experimentell beobachtet wird. Abbildung 3 zeigt die beiden Mechanismen (Superaustausch und Hopping) im Zusammenhang mit einem oxidativen Lochtransfer in der DNA. Bei einer Distanz von ein bis drei Basen findet ein Superaustausch statt. Bei einer Distanz von mehr als drei Basen ($\sim 11 \text{ \AA}$) findet ein Hopping statt, wobei die Distanzabhängigkeit deutlich vermindert ist.^[31]

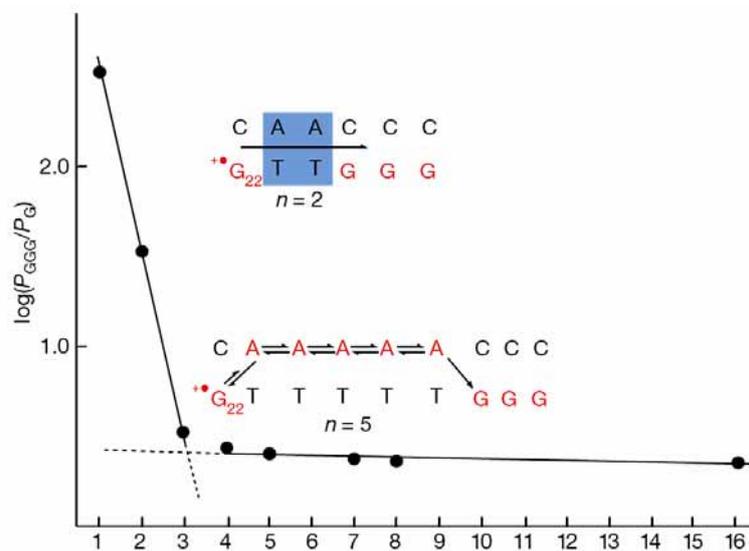


Abbildung 3: Oxidativer Lochtransfer in der DNA. Ab 4 und mehr Basen findet ein Hoppingprozess statt. Quelle: Nature, 2001.^[31]

Beratan et al. konnte mit Ruthenium-modifizierten Histidinen an Cytochrom b_{562} zeigen, dass bei zunehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor die Geschwindigkeit des Superaustausches exponentiell abnimmt (Abbildung 4).^[32] Die beiden Ausnahmen His_{12} und His_{73} werden damit erklärt, dass die Ladung über einen weiteren und ungünstigeren Weg wandern muss.

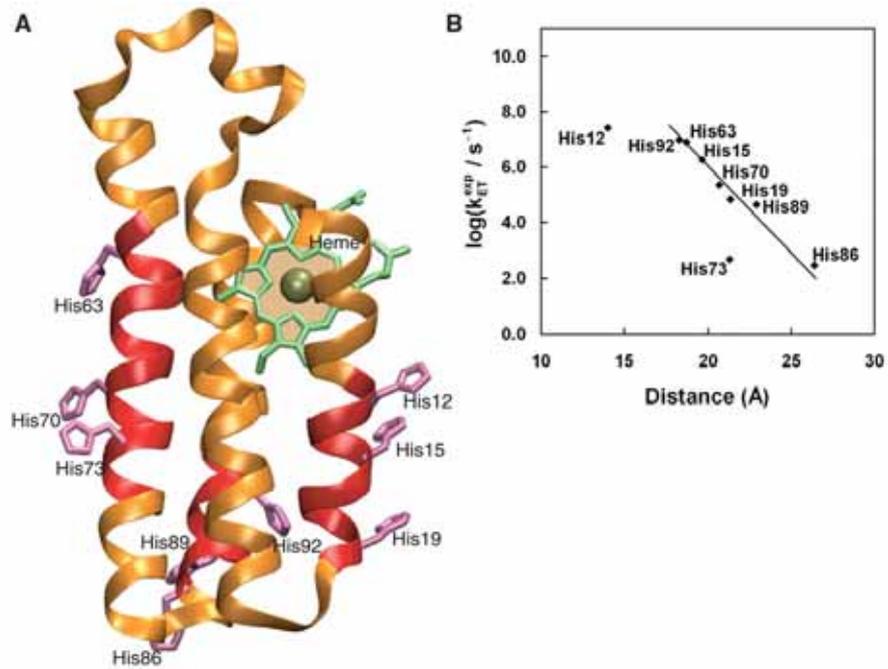


Abbildung 4: (A) Superposition von neun Cytochrom b_{562} mit verschiedenen Ruthenium-modifizierten Histidinen. (B) Logarithmische Auftragung der Geschwindigkeit des ETs zwischen dem Rutheniumkomplex und dem Häm-System. Mit Ausnahme von zwei Messpunkten (His12 und His73) liegen alle auf einer Gerade. Quelle: Science, 2007.^[32]

3 Der Elektronentransfer in der Ribonukleotid Reduktase

3.1 Eigenschaften der Klasse I Ribonukleotid Reduktase

Die Ribonukleotid Reduktase wurde erstmals 1961 in der Literatur erwähnt: Extrakte von *E. coli* Zellen ermöglichten die Reduktion von Cytidinphosphaten in ihre Deoxycytidinphosphate.^[33] In den folgenden Jahren und Jahrzehnten zeigte sich, dass es eine Vielzahl von strukturell verschiedenen RNRs gibt, die in verschiedene Klassen unterteilt werden. Heute kennt man drei Klassen (Klasse I, II und III), die nach der Art der Radikale geordnet sind.^[10]

Die Klasse I Ribonukleotid Reduktase ist als $\alpha_2\beta_2$ -Struktur aufgebaut, wobei in der Literatur die Untereinheit α_1 meistens R1 und β_2 dementsprechend R2 benannt wird. Die Kristallstrukturen der beiden Untereinheiten wurden in den 1990er Jahren veröffentlicht, jedoch konnte das Enzym bis heute nicht als Gesamtkomplex kristallisiert werden.^[34, 35] Dies liegt vor allem an der niedrigen Dissoziationskonstante K_D von 0.1 - 0.2 μM .^[12] Um trotzdem eine Vorstellung vom Gesamtkomplex der RNR zu haben, wurden die beiden Untereinheiten *in silico* ‚zusammengefügt‘. Abbildung 5 zeigt ein räumliches Bild dieses Docking Modells.

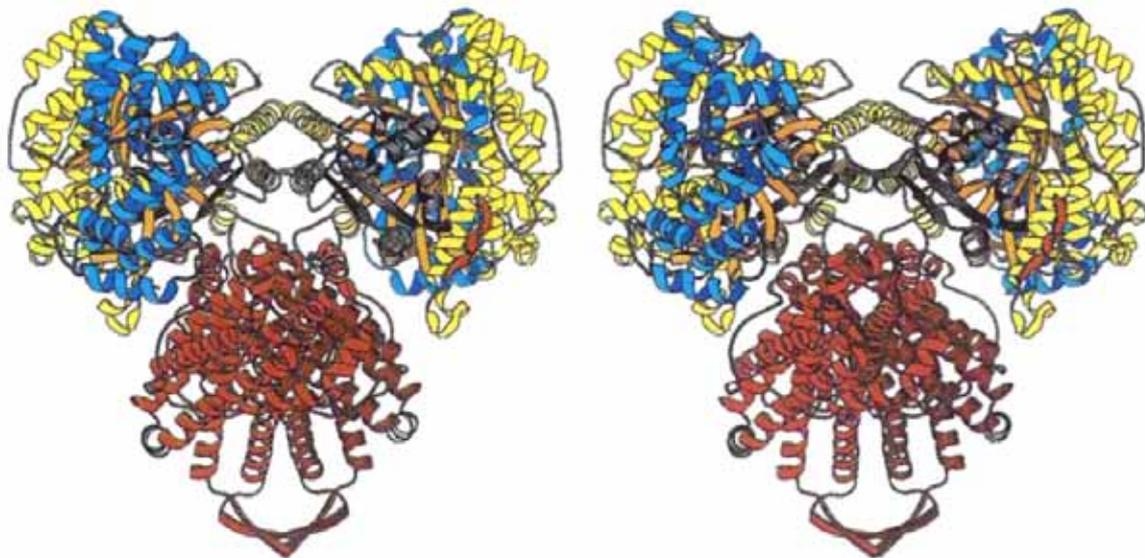


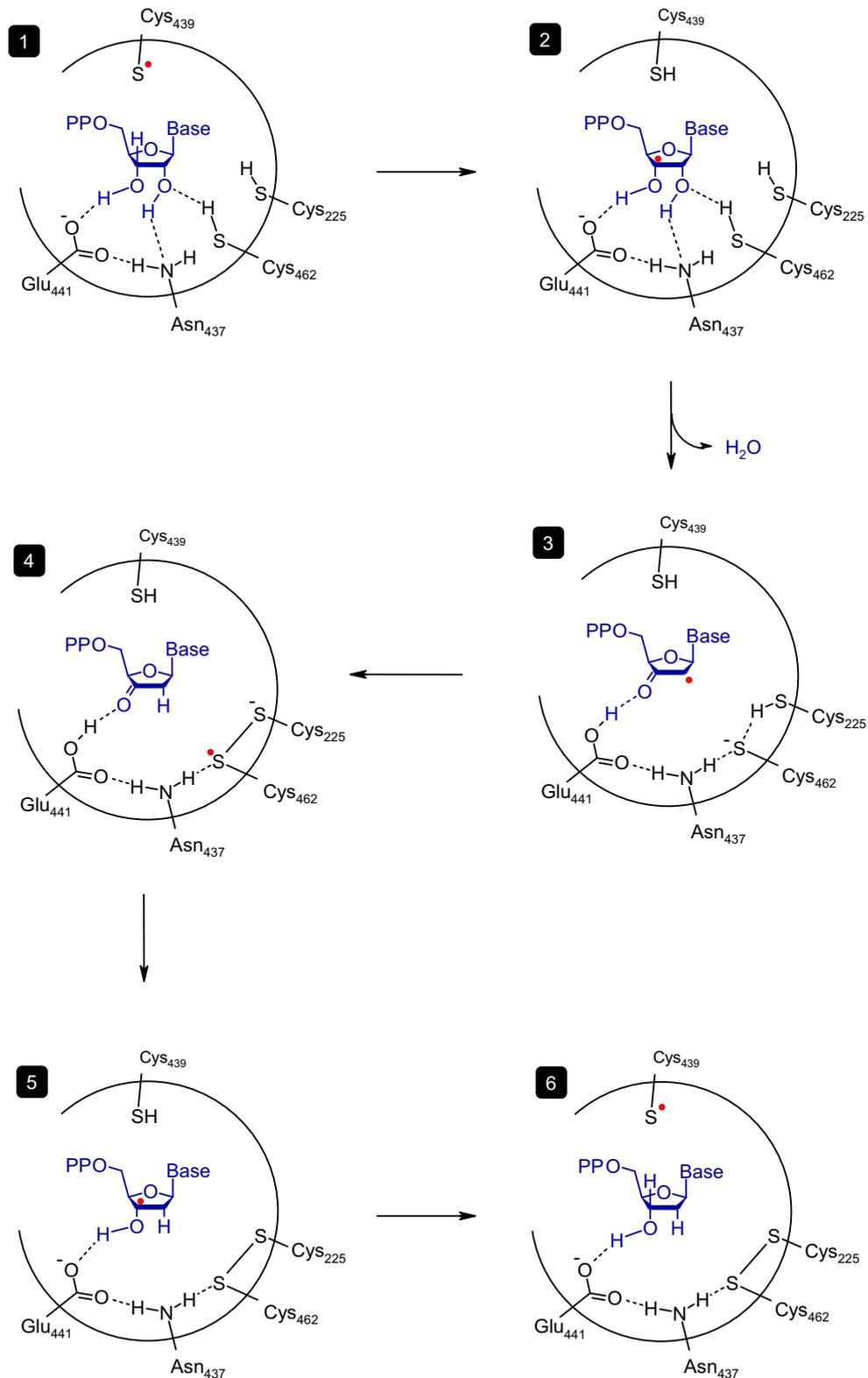
Abbildung 5: 3D-Bild des Docking Modell von R1 (blaugelb, oben) und R2 (rot, unten). Um die Struktur räumlich zu sehen, muss man die Bilder schielend betrachten. Quelle: Nature, 1994.^[34]

Die Untereinheiten R1 und R2 sind sich in ihrer Funktion und Grösse verschieden. Tabelle 1 fasst die wichtigsten Eckdaten der beiden Untereinheiten zusammen.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der beiden Untereinheiten der Klasse I RNR.

Name	R1	R2
Masse [g mol ⁻¹]	171'000	87'000
Anzahl Aminosäuren	2 x 761	2 x 375
Enzymatische Funktion	Katalytisches Zentrum	Tyrosin-Radikal

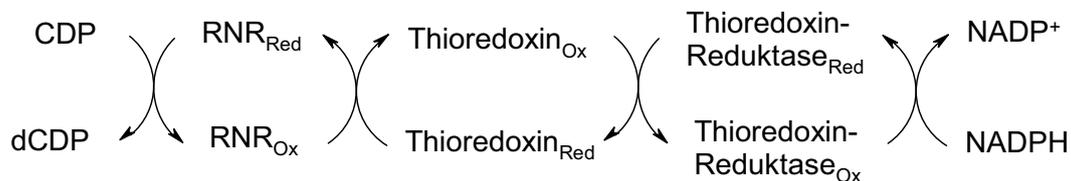
Wie bereits weiter oben kurz erwähnt, katalysiert die RNR die Reduktion der Ribonukleotidphosphate in ihre entsprechenden Desoxyribonukleotidphosphate. Dabei werden sowohl Di- wie auch Triphosphate gleichermaßen reduziert. Diese Reaktion ist der letzte Schritt in der Biosynthese der Nukleotide, bevor sie durch die DNA-Synthase in die DNA eingebaut werden. Es ist der zur Zeit einzig bekannte Mechanismus, wie Zellen Desoxyribonukleotide *de novo* synthetisieren.^[36, 37] Die Reduktion des Substrats verläuft dabei über einen radikalischen Mechanismus, der in Schema 7 gezeigt wird.^[38] Der Übersicht halber wurde das Substrat blau und das Radikal rot markiert.



Schema 7: Mechanismus der radikalischen Ribonucleotid-Reduktion im katalytischen Zentrum von R1.

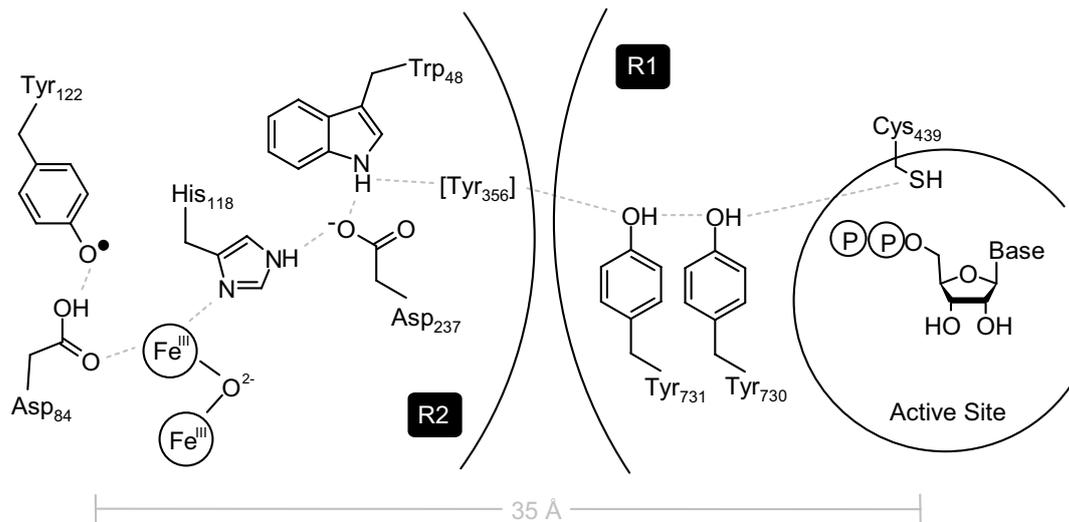
In einem ersten Schritt wird das zu reduzierende Substrat im katalytischen Zentrum von R1 gebunden. In einem protonengekoppelten Elektronentransfer (proton coupled electron transfer, PCET) wird das Wasserstoffatom der 3'-Position des Substrates auf Cys₄₃₉ übertragen (Schritt 1 → 2). In der Folgereaktion wird die OH-Gruppe der 2'-Position als

Wasser abgespalten und an 3' vorübergehend eine Ketofunktionalität erzeugt (Schritt 2 → 3). Das Substrat abstrahiert nun ein Wasserstoffatom von Cys₂₅₅, worauf in der im katalytischen Zentrum die Disulfidbindung zwischen Cys₂₅₅ und Cys₄₆₂ gebildet wird (Schritt 3 → 4). In der nun folgenden Reaktion wird die Ketofunktion an 3' des Substrats zum Hydroxy-Radikal reduziert und die negative Ladung von Cys₂₅₅ auf Glu₄₄₁ übertragen (Schritt 4 → 5). Zuletzt wird das Radikal wieder in einem PCET zurück aufs ursprüngliche Cys₄₃₉ übertragen (Schritt 5 → 6). Unter dem Strich wurde das Substrat unter Wasserabspaltung an der 2'-Position reduziert, wobei zwei Cysteine im katalytischen Zentrum zum Disulfid oxidiert wurden. Bevor die RNR ein weiteres Substrat reduzieren kann, muss die gebildete Disulfidbrücke ihrerseits wieder reduziert werden. Dies geschieht *in vivo* durch Thioredoxin und weitere beteiligte Enzyme. Schema 8 zeigt den Mechanismus der Reduktion bis zu NADPH.



Schema 8: Reduktions-Kaskade des RNR-Zyklus. Um Nukleotide in ihre entsprechenden Desoxynukleotide zu überführen, sind *in vivo* mehrere Redox-Enzyme beteiligt, die sich gegenseitig reduzieren.

In Schema 7 wurde die Ausgangslage der Reduktion so dargestellt, dass die Thiofunktion des Cys₄₃₉ als Radikal vorliegt. Dies ist jedoch nur die halbe Geschichte. Denn die RNR speichert zwischen den Katalysezyklen das Radikal nicht auf Cys₄₃₉ von R1, sondern auf Tyr₁₂₂ von R2, welches 35 Å vom katalytischen Zentrum entfernt ist. Bei jedem Katalysezyklus wird in einem ET das Radikal vom Tyrosin auf das Cystein übertragen und am Ende wieder zurück transportiert. Dabei wandert das Elektron über mehrere Aminosäuren einer durchgehenden Wasserstoffbrücke entlang. Der Mechanismus hierzu ist noch nicht vollständig geklärt, aber man vermutet, dass die im Schema 9 abgebildeten Aminosäuren involviert sind.^[39]



Schema 9: Beteiligte Aminosäuren der RNR im Elektronentransfer zwischen R2 und R1.

Die Aminosäure Tyr₃₅₆ ist bei diesem Modell ein unbekannter Faktor. Obwohl die Kristallstrukturen von beiden Untereinheiten bekannt sind, ist die Struktur der letzten 35 Aminosäuren (Nr. 340-375)^[40] von R2 nicht aufgelöst, da dieser Teil des Enzyms im Kristallsystem zu flexibel ist.^[34, 35] Deshalb wird vermutet, dass Tyr₃₅₆ während des Ladungstransfers in einem „Swing-Manöver“ eine Konformationsänderung durchmacht und dabei das Radikal von R2 nach R1 transportiert. Gesicherte Erkenntnisse hierzu gibt es jedoch noch nicht.^[12]

Gemäss Tabelle 2 vermag ein Tyrosylradikal nur die deprotonierte Form eines Cysteins zu oxidieren. Deswegen geht man davon aus, dass zusammen mit dem Elektron gleichzeitig ein Proton übertragen wird. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem PCET (proton coupled electron transfer).^[41]

Tabelle 2: Oxidationspotentiale ausgewählter Aminosäuren.

Aminosäure	Oxidationspotential
Tyr	+ 0.84 V
Cys	+ 1.33 V
Cys _{Anion}	+ 0.77 V
DOPA	+ 0.57 V

Eine charakteristische Eigenschaft von R2 ist ein lokales Absorptionsmaximum bei 410 nm (Abbildung 6) mit einem Extinktionskoeffizienten ϵ_{410} von 400-1200 M⁻¹ cm⁻¹. Die Ursache hierfür liegt im Tyrosyl-Radikal (siehe Schema 9), welches in Lösung bei einer Wellenlänge von 407 nm und ϵ_{407} von 3200 M⁻¹ cm⁻¹ ein Absorptionsmaximum aufweist.^[42]

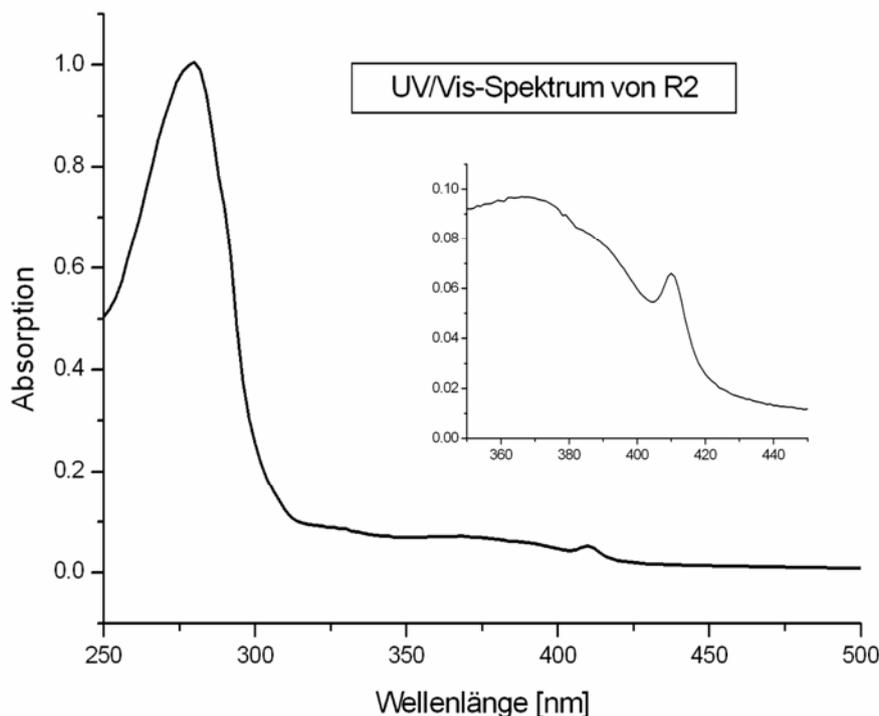


Abbildung 6: UV/Vis-Spektrum der Untereinheit R2 mit dem charakteristischen lokalen Maximum bei 410 nm hervorgerufen durch ein Tyrosyl-Radikals. Oben rechts ist eine Vergrößerung des Bereichs um 410 nm eingebettet.

Bei Abwesenheit der Tyrosylradikals ist das Signal bei 410 nm nicht mehr vorhanden.^[43]

3.2 Aufgabenstellung

Wenn man sich die grosse Distanz von 35 Å vergegenwärtigt, die das Elektron in der RNR zurücklegt, so stellt sich unweigerlich die Frage, wie die Natur das schafft. Unter der Annahme, dass ein Superaustausch stattfindet, würde der Transfer zwischen 10^2 und 10^3 s, also mehrere Minuten, brauchen. Dies ist jedoch unmöglich, weil die Geschwindigkeit des Katalysezyklus je nach Substrat bei 2 bis 10 s^{-1} liegt und der Elektronentransfer natürlich nicht langsamer sein kann.^[12] Es liegt demnach auf der Hand, dass ein Hoppingprozess vermutlich über die im Schema 9 dargestellten Aminosäuren stattfinden muss. Doch eine Frage bleibt: wie *schnell* wandert das Elektron von Tyr₁₂₂ zu Cys₄₃₉? In der Literatur ist bis dato keine Publikation zu finden, in welcher die Geschwindigkeit dieses ETs im Gesamtkomplex der Wildtyp-RNR näher bestimmt wurde.

In der Arbeitsgruppe von Prof. B. Giese wurde in den letzten Jahren viele Experimente zum ET in DNA und Peptiden durchgeführt und man gewann neue Erkenntnisse über den Hopping-Mechanismus.^[44] Aufbauend auf diesen Arbeiten soll nun der Schritt vom „Modellsystem Peptid“ auf das „Anwendungssystem Ribonukleotid Reduktase“ vollzogen werden. Dabei sollen zwei Ansätze verfolgt werden. Einerseits sollen „Stopped Flow“ Messungen

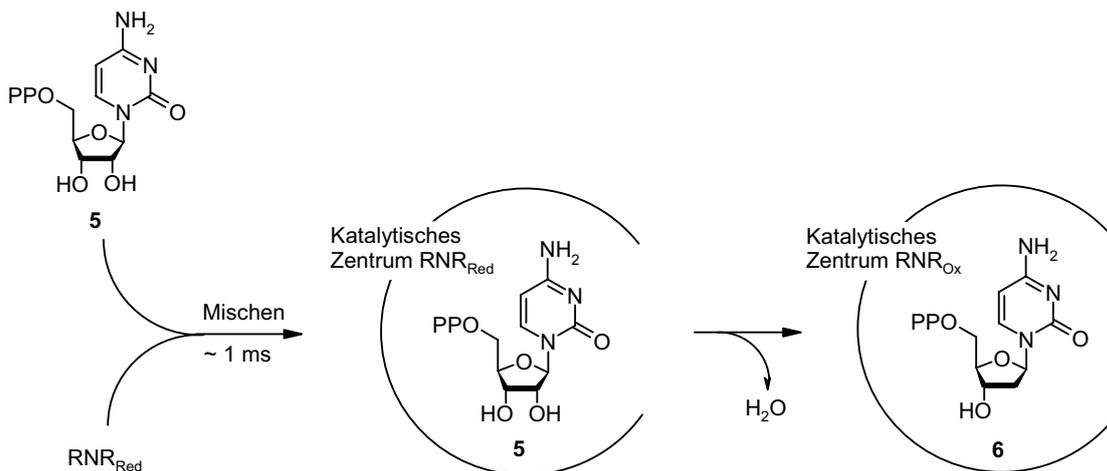
durchgeführt werden mit denen Prozesse bis in den Millisekundenbereich verfolgt werden. Andererseits sollen Laserflashphotolysen durchgeführt werden, womit man Prozesse im Sub-Mikrosekundenbereich auflösen kann. Bei beiden Methoden soll mit UV/Vis-Spektroskopie die Absorption von RNR bei 410 nm beobachtet werden, um die Abnahme der Konzentration des Tyrosylradikals zeitabhängig messen zu können. Sobald das Substrat bindet und der PCET beginnt, nimmt im ersten Katalysezyklus die Radikal-Konzentration bei Tyr₁₂₂ ab. Es wird erwartet, dass dieser Rückgang durch eine Abnahme des Signals bei 410 nm beobachtet werden kann. Mit der Beobachtung des Tyrosyl-Signals bei 410 nm soll somit die Geschwindigkeit des ETs direkt im Enzym messbar sein.

3.3 Herstellung von R1 und R2

Die Herstellung der beiden Untereinheiten R1 und R2 wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von BrittMarie Sjöberg an der *Stockholms Universitet* durchgeführt. In Kapitel 7.1 wird der genau Prozess der Überexpression und Aufreinigung beschrieben.

3.4 Stopped Flow Experimente

Mit der Technik der „Stopped Flow“ Experimente kann man kinetische Prozesse von chemischen Reaktionen in den Millisekundenbereich messen. Der Versuchsaufbau ist der folgende: Die zu mischenden Proben werden in zwei Spritzen gefüllt. Per Knopfdruck werden die Lösungen in eine Kammer gepresst und dabei gleichzeitig vermischt. Diese Kammer hat zwei gegenüberliegende Glasfenster, wodurch man bei einer gegebenen Wellenlänge zeitabhängig die Absorption messen kann. Mit Stopped Flow Messungen können UV/Vis-Prozesse beobachtet werden, die zwischen 1 ms und mehreren Minuten dauern. Schnellere Prozesse können nicht aufgelöst werden, da der Vorgang des Mischens der limitierende Faktor ist. Schema 10 zeigt den Aufbau des Experiments.



Schema 10: Versuchsaufbau der Stopped Flow Messung mit CDP (5) und RNR.

Cytidindiphosphat (5) wird in eine der beiden Spritzen gefüllt, RNR in die andere. Durch Mischen werden beiden Substanzen in Verbindung miteinander gebracht, wobei CDP ins katalytische Zentrum von R1 gelangt. Das Enzym reduziert im folgenden Schritt das Substrat unter Wasserabspaltung zu Verbindung 6 (Schema 10). RNR selbst wird bei diesem Prozess oxidiert.

Die Transienten-Spektren der Stopped-Flow Messungen (Abbildung 7) zeigen eine rasche Abnahme der Absorption nach dem Mischen mit $k_{\text{Abnahme}} = 28 \text{ s}^{-1}$, gefolgt von einer langsamen Zunahme auf die ursprüngliche Absorption mit $k_{\text{Zunahme}} = 9.4 \text{ s}^{-1}$. Kontrollmessungen ohne CDP ergaben jedoch vergleichbare Spektren, so dass anzunehmen ist, dass nur das Verdünnen der Enzymlösung einen kurzzeitigen Einfluss auf die Absorption des Signals von Tyr₁₂₂ hat. Die Ursache dieses Effektes liegt somit nicht in einem ET zwischen R2 und R1.

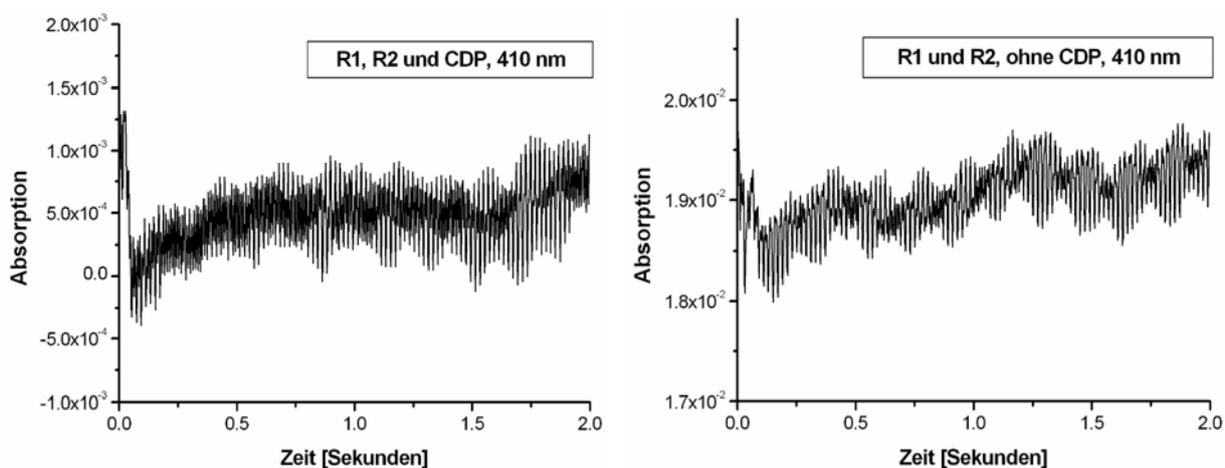
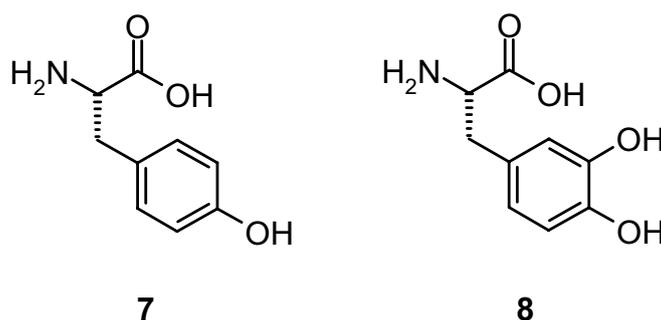


Abbildung 7: Stopped Flow Messungen von R1, R2 und CDP (links) und das entsprechende Kontrollexperiment (rechts). Das Kontrollexperiment ohne CDP zeigt einen vergleichbaren Transienten, so dass keine eindeutige Aussage zu treffen ist. Die gezeigten Spektren sind jeweils ein Durchschnitt von 4 einzelnen Messungen.

Beide Absorption-Spektren in Abbildung 7 wurden mit einer oszillierenden Absorptionsschwankung von 50 Hz überlagert. Dieser Effekt ist jedoch gerätebedingt (Netzspannung des Wechselstroms)^[45] und zeigte sich auch beim Mischen von zwei Pufferlösungen. Diese Experimente zeigen, dass die ET Prozesse schneller als im Millisekundenbereich ablaufen.

Die Gruppe um JoAnne Stubbe führte Stopped Flow-Messungen mit modifizierter RNR durch. Durch Intein-Techniken stellten sie die Untereinheit R2 her, wobei die Aminosäure Tyr₃₅₆ (**7**) durch 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA, **8**) ersetzt wurde.



Schema 11: Struktureller Vergleich von Tyrosin (**7**) und 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA, **8**).

DOPA liegt mit einem Oxidationspotential von +0.57 V um 0.27 V unter Tyrosin (siehe Tabelle 2 auf Seite 13). Dadurch ist die Oxidation von DOPA schneller als die von Tyrosin und deprotoniertem Cystein (siehe Tabelle 2). Somit dient DOPA₃₅₆-R2 als Radikalfalle und das Enzym ist biologisch nicht mehr aktiv. Zudem hat das DOPA-Radikal eine starke Absorptionsbande bei 305 nm mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 12'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, was einen Radikalnachweis mit UV/Vis-Spektroskopie ermöglicht. Durch die in Abbildung 8 gezeigten Stopped Flow Messungen konnte ein Anstieg der Absorption bei 305 nm und ein Rückgang bei 410 nm gemessen werden, was in guter Übereinstimmung mit der Annahme ist, dass das Radikal von Tyr₁₂₂ ($\lambda = 410 \text{ nm}$) auf DOPA₃₅₆ ($\lambda = 305 \text{ nm}$) wandert. Man beobachtete eine zweistufige Kinetik mit folgenden Werten: $k_1 = 32 \text{ s}^{-1}$ (schneller Prozess) und $k_2 = 1.7 \text{ s}^{-1}$ (langsamer Prozess).^[46]

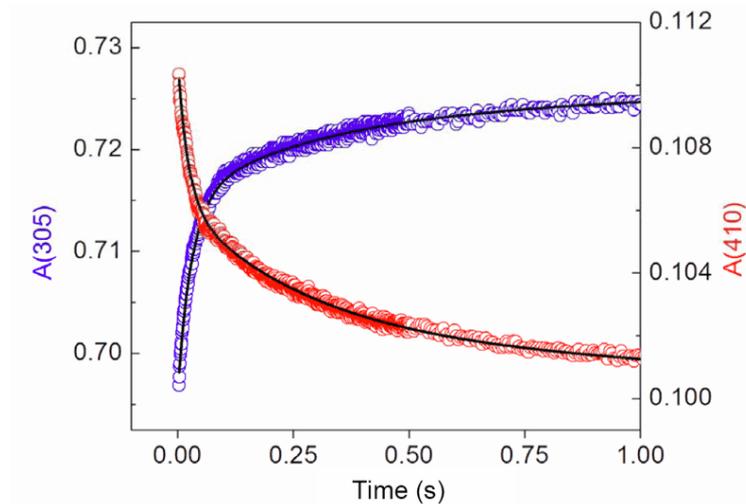


Abbildung 8: Stopped Flow Messungen von Stubbe et al. bei 305 (blau) und 410 nm (rot) mit DOPA-modifizierter RNR. Schwarze Kurve: Gefittete Kinetik zweiten Grades. Quelle: JACS, 2006.^[46]

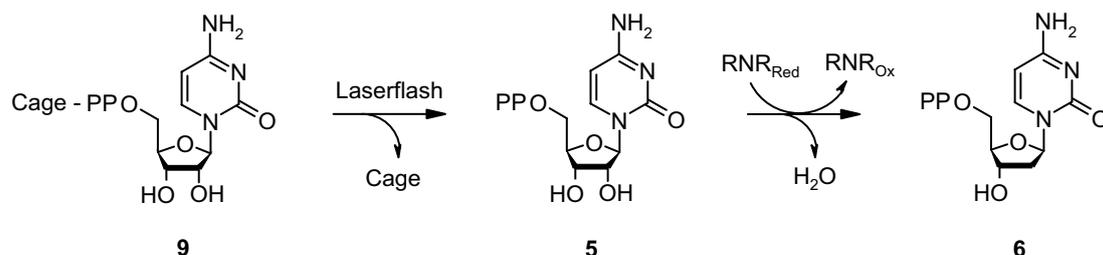
Dies sind interessante Resultate, gewähren sie doch einen Einblick in die erste ‚Hälfte‘ des ETs zwischen Tyr₁₂₂ und Tyr₃₅₆. Aber da mit modifizierter R2 gearbeitet wurde, können damit keine verlässliche Aussagen getroffen werden, wie schnell der ET in Wildtyp-RNR stattfindet.

3.5 Laserflash Photolyse

Da mit Stopped Flow Messungen keine Abnahme des Tyrosylradikals in den ersten Millisekunden nach dem Mischen gemessen werden konnten, bietet sich mit der Laserflash Photolyse eine Methode an, die Prozesse auflösen kann, die schneller als 10^3 s^{-1} stattfinden.

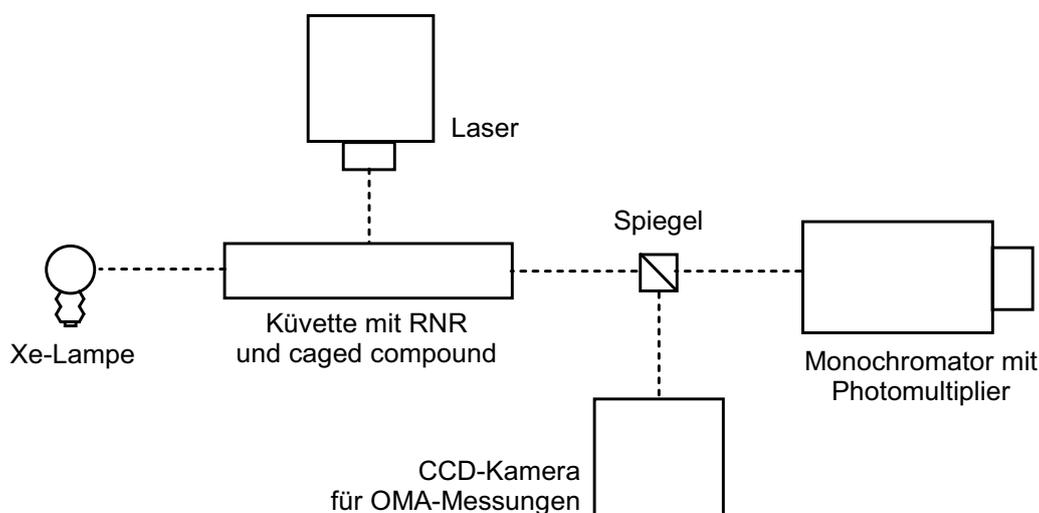
3.5.1 Versuchsaufbau

Gegenüber Stopped Flow Messungen wird bei Laser Flash Photolysen nicht mit dem eigentlichen Substrat (in dieser Arbeit Cytidindiphosphat, **5**) gearbeitet, sondern man verwendet eine „gefangene“ Substanz. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer Käfigverbindung oder *Caged Compound*.^[47] Das eigentliche Substrat wird mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen (Verbindung **9**), so dass das Enzym die Verbindung nicht umsetzen kann. In einer Quarzküvette werden Enzym und photolabil geschütztes Substrat gemischt. Mit einem Laserblitz wird nun die photolabile Schutzgruppe abgespalten, worauf das freigesetzte Substrat ins katalytische Zentrum diffundiert und der katalytische Prozess des Enzyms beginnt (**5** → **6**). Orthogonal zur Laserrichtung wird die Absorption bei einer frei wählbaren Wellenlänge zeitabhängig gemessen. In Schema 12 ist die Substratfreisetzung mit anschließender enzymatischer Reduktion dargestellt.



Schema 12: Abspaltung des Käfigs nach Laserflash mit anschließender Reduktion durch RNR.

Der Versuchsaufbau der Laseroptik ist in Schema 13 dargestellt.



Schema 13: Geräteanordnung und Aufbau der Optik der Laserflash Photolyse.

Alternativ zur zeitabhängigen Messung bei einer Wellenlänge (Transienten-Messung), kann nach einer bestimmten Zeit ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen werden (OMA-Messung, Optical Multichannel Analyzer). Dies dient meistens dazu, ein Absorptionsmaximum zu bestimmen, um sicher zu gehen, dass das korrekte Signal gemessen wird. Durch Zusammensetzung mehrerer OMA-Spektren, die bei verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen werden, kann eine dreidimensionale Oberfläche erzeugt werden, die die spektroskopischen Daten und wellenlängen- und zeitaufgelöst darstellt.

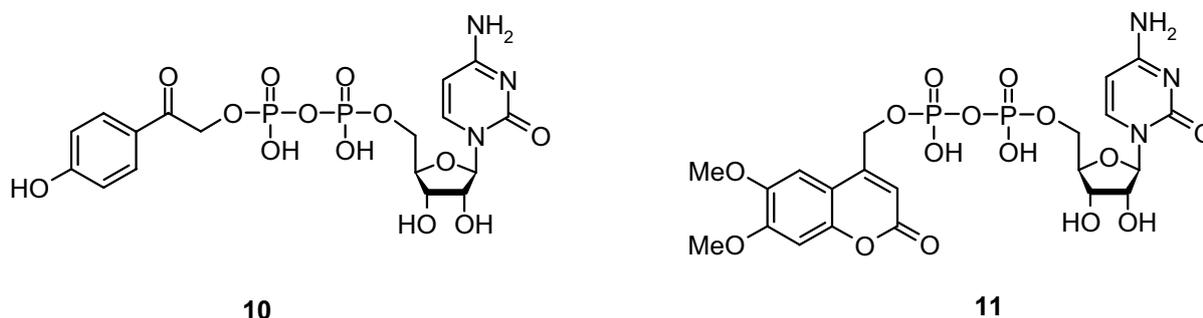
Der grosse Vorteil der Laser Flash Photolyse liegt darin, dass im Nanosekunden-Bereich ein sehr schneller Konzentrationsanstieg erzielt werden kann, indem man gänzlich auf mechanische Prozesse verzichtet. Dadurch können chemische Prozesse im Mikro- bis Nanosekundenbereich beobachtet und gemessen werden.

3.5.2 Gegenüberstellung der verwendeten Käfigverbindungen

Als Substrat wurde Cytidin-diphosphat (CDP) eingesetzt. CDP bietet den Vorteil, dass nur ein einziger Aktivator, nämlich wahlweise dTTP oder ATP, vorhanden sein muss. Bei allen

anderen möglichen Substraten muss eine Kombination aus mindestens einem Aktivator und einem Effektor vorhanden sein, damit das Enzym das Substrat reduzieren kann.^[10] Als Käfig wurden zwei verschiedene photolabile Schutzgruppen verwendet, die unterschiedliche photochemische Eigenschaften aufweisen. Die Schutzgruppe wurde jeweils an der endständigen Phosphatgruppe angebracht. So ist sichergestellt ist, dass das geschützte Substrat aus sterischen Gründen nicht mehr ins katalytische Zentrum passt.

Einerseits wurde *p*-Hydroxy-acetophenyl-ester **10**, andererseits wurde (6,7-Dimethoxy-cumarin-4-yl)methyl-ester **11** verwendet. Tabelle 3 stellt die wichtigsten optischen Eigenschaften der beiden Chromophore gegenüber.



Schema 14: Die in dieser Arbeit verwendeten geschützten Substrate: *p*-Hydroxy-acetophenyl-ester **10** und (6,7-Dimethoxy-cumarin-4-yl)methyl-ester **11**. Bei beiden Verbindungen wird durch Bestrahlung CDP freigesetzt.

Tabelle 3: Einige substanzspezifischen Eckdaten der beiden verwendeten Käfige.

Name	$\rho\text{HP}^{[48]}$	Cumarinyl ^[49]
Absorptionsmaximum λ_{max} [nm]	286	349
Extinktionskoeffizient ϵ [$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]	14'600	11'000
Quantenausbeute Φ	0.3 ^[50]	0.04
Spaltungsgeschwindigkeit [s^{-1}]	$\sim 10^7$	$\sim 10^9$

Die beiden verwendeten photolabilen Schutzgruppen haben bis auf die Spaltungsgeschwindigkeit und Quantenausbeute ähnliche Eigenschaften. Die Substratfreisetzung ist bei der Cumarinylverbindung **11** etwa 100-mal schneller, so dass hier die schnelleren Geschwindigkeiten gemessen werden können als bei Laserflash-Photolysen der *p*-Hydroxyphenacylverbindung **10**. Die relativ geringe Quantenausbeute von 0.04 des Cumarinylgeschützten Substrats bedeutet, dass nur gerade 4% der angeregten Moleküle das Substrat freisetzen. Dies muss bei Laserflash Photolysen mit einer entsprechend höheren Konzentration des geschützten Substrats ausgeglichen werden.

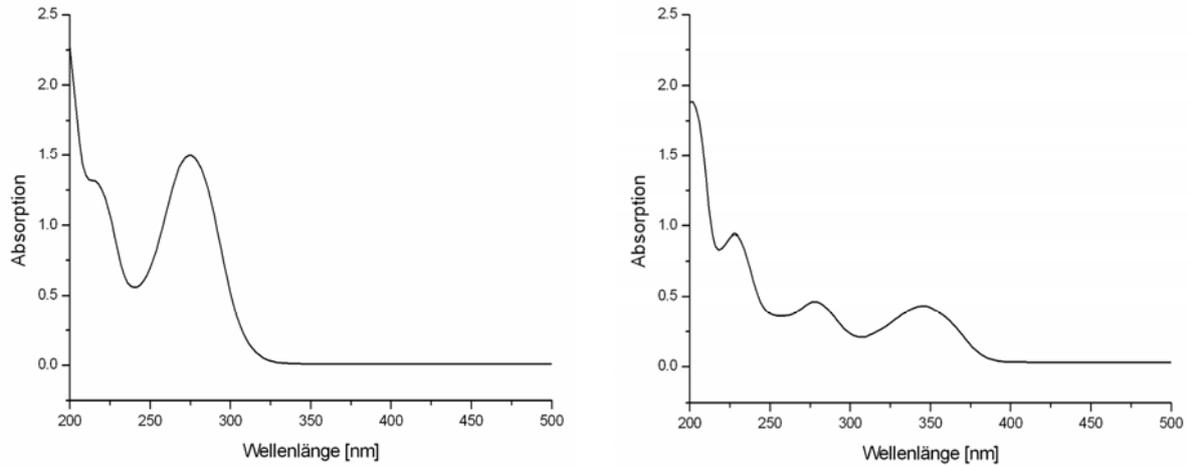
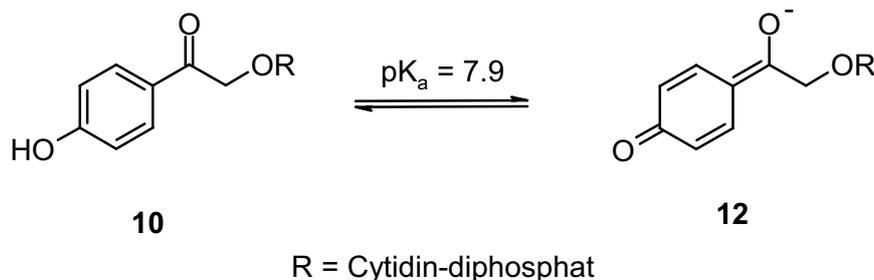


Abbildung 9: UV/Vis-Spektren der Käfigverbindungen **10** (pHP-ester) und **11** (Cumarinyl-ester). Beide Chromophore haben eine zu vernachlässigende Absorption bei 410 nm, was für ihre Wahl entscheidend war.

Abbildung 5 zeigt die nicht-normierten UV/Vis-Spektren der beiden Käfigverbindungen **10** und **11**. Entscheidend für die Wahl dieser beiden Phototrigger war deren optische Transparenz bei 410 nm. Denn bei dieser Wellenlänge soll die Beobachtung des Tyrosylradikals von R2 stattfinden.

Ein Nachteil des pHP-Käfigs ist der relativ tiefe pK_a -Wert der aromatischen Hydroxyfunktion von 7.9 (siehe Schema 15).

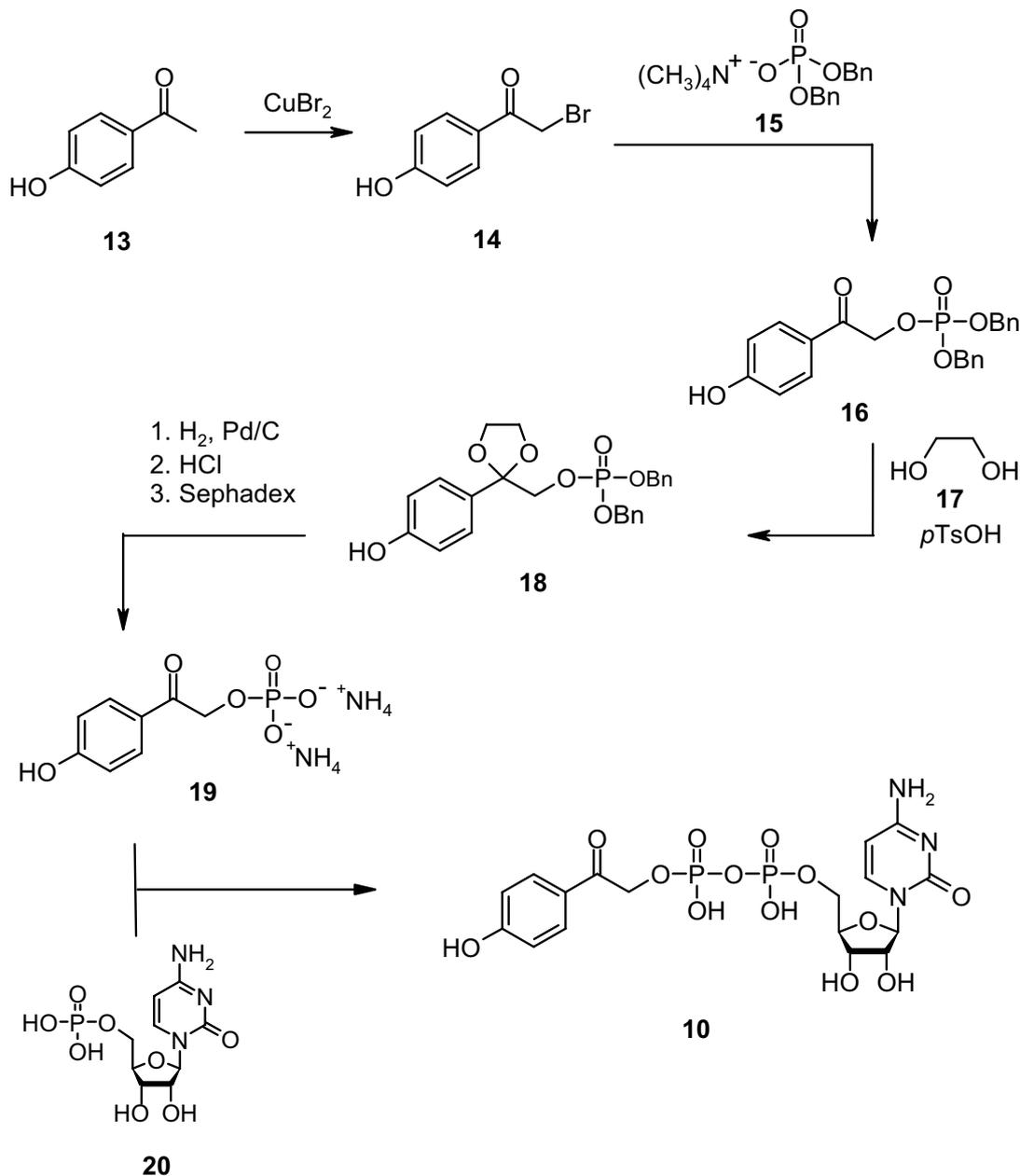


Schema 15: Protonierte und deprotonierte Form des p-Hydroxyphenacylesters **10**. Nur die linke, protonierte Form des Käfigs geht bei Bestrahlung eine Spaltung ein.

Nur die protonierte (ungeladene) Form des Käfigs wird bei Bestrahlung abgespalten, so dass ein möglichst tiefer pH-Wert von Vorteil ist.^[51] Da jedoch RNR nur in einem engen pH-Bereich um 7.6 die maximale Aktivität zeigt, lässt dies nicht viel Spielraum. Deshalb wurden sämtliche Experimente mit RNR bei pH 7.6 durchgeführt. So musste man jeweils berücksichtigen, dass nur gerade etwas mehr als 50% der phenolischen Hydroxyfunktion protoniert sind.

3.5.3 Syntheseübersicht der photolabil geschützten Substraten 10 und 11

Wie in Schema 16 ersichtlich, geht die Synthese des *p*HP-geschützten CDP von *p*-Hydroxyacetophenon aus und verläuft über 5 Stufen.^[52]

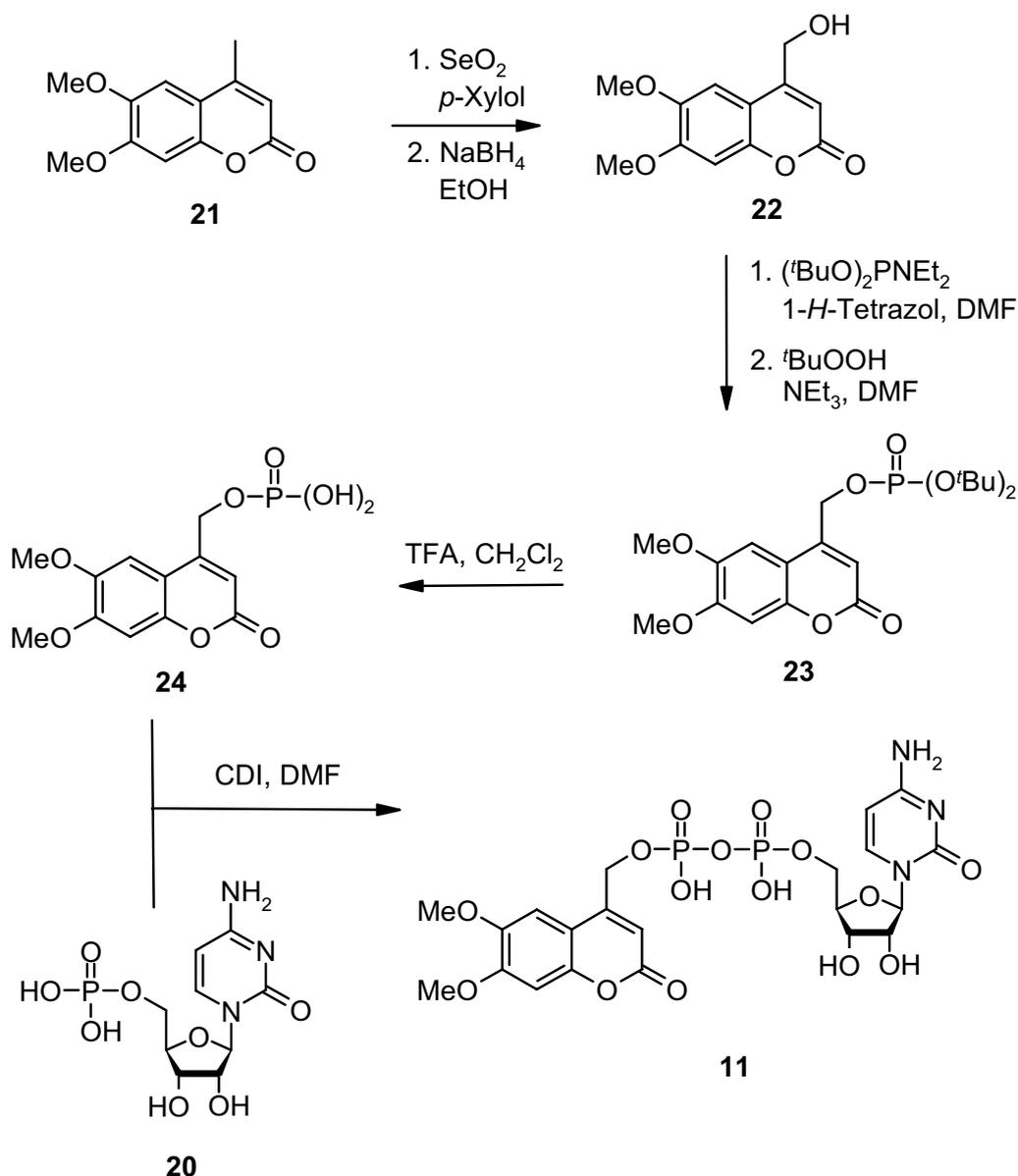


Schema 16: Syntheseübersicht des *p*HP-geschützten Cytidin-diphosphat **10**.

Kommerziell erhältliches *p*-Hydroxyacetophenon (**13**) wurde mit Kupfer(II)-bromid in das Monobromid **14** überführt und anschliessend mit dem Phosphat **15** zum Phosphatester **16** umgesetzt. Man schützte die Carbonylgruppe säurekatalytisch mit Ethylenglykol (**17**) und spaltete die Benzylphosphate mit Wasserstoff ab. Nach saurer Aufarbeitung und Reinigung an Sephadex konnte das Ammoniumsalz **19** isoliert werden. In einer letzten Stufe wurde das Salz mit Cytidinmonophosphat (**20**) zum gewünschten Diphosphat **10** umgesetzt. Der

Schlüsselschritt der Synthese ist die letzte Stufe, in der die Pyrophosphatbindung geknüpft wird. Das Produkt dieser Stufe konnte trotz fünftägiger Reaktionszeit nur in einer Ausbeute von 11% gewonnen werden. Aufgrund der hohen Polarität der Zielverbindung wurde die Reinigung mit präparativer HPLC durchgeführt.

Schema 17 zeigt eine Übersicht der 6-stufigen Synthese der Käfigverbindung **11**.



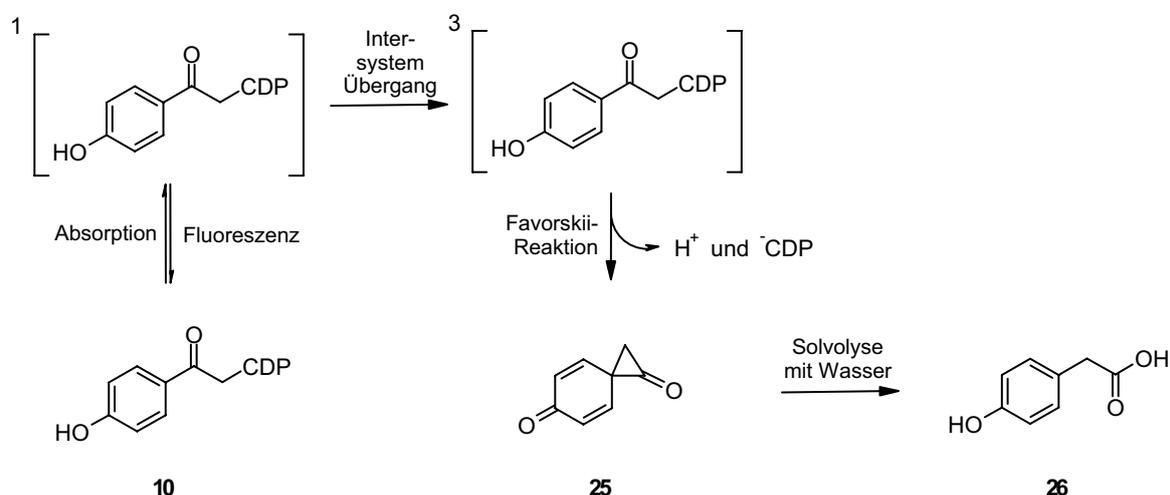
Schema 17: Übersicht der 6-stufigen Synthese des cumyrylgeschützten CDPs **11**.

Man oxidierte kommerziell erhältliches 6,7-Dimethoxy-4-methyl-cumarin (**21**) mit Selendioxid an der Methylgruppe zum entsprechenden Aldehyd, welcher in der folgenden Stufe mit Natriumborhydrid zum primären Alkohol **22** reduziert wurde. Durch Umsetzung mit N,N-Diethyl-di-*tert*-butylphosphoramidit und anschließender Oxidierung mit *tert*-Butylperoxid

gewann man den Phosphatriester **23**. Die beiden *tert.*-Butylgruppen wurden mit TFA abgespalten und der erhaltene Phosphatmonoester **24** mit Cytidinmonophosphat (**20**) gekoppelt. Auch hier zeigte sich die letzte Stufe als schwierigster Schritt, bei der die Ausbeute nicht über 15% gebracht werden konnte. Das Endprodukt **11** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

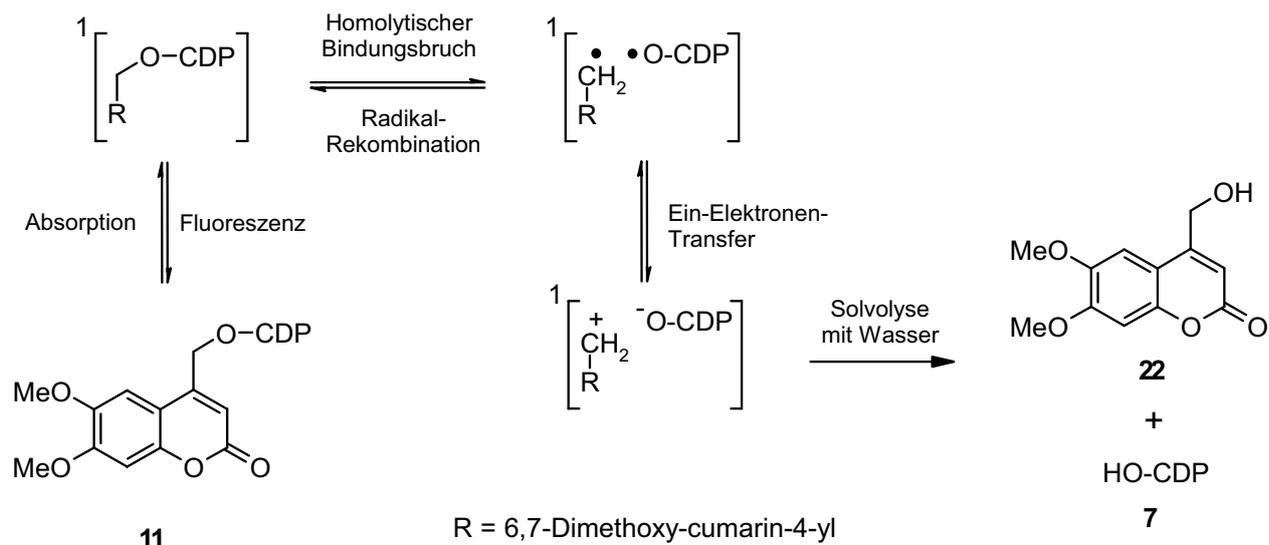
3.5.4 Effizienz der photolytischen Spaltung

Wie bereits weiter oben erwähnt, wird bei Bestrahlung von Käfigverbindungen die Schutzgruppe photochemisch vom Substrat abgespalten. Die Mechanismen dieser Spaltung sind in Schema 18 und Schema 19 aufgeführt.



Schema 18: Mechanismus der Spaltung von *p*HP und Substrat.

Nach Bestrahlung von *p*-Hydroxyphenacyl-ester **10** wird die Substanz in den Singlett-Zustand gehoben. Sofern das System unter Abstrahlung von Licht (Fluoreszenz) nicht wieder in den Grundzustand zurückfällt, kann es in einem Intersystem Übergang zum Triplett überführt werden. Nun bildet sich in einer Favorskii-Reaktion unter Abspaltung des CDP-Anions und eines Protons intermediär die Cyclopropanverbindung **25**. Der Ring wird zuletzt durch Solvolyse mit Wasser zu Phenacylsäure (**26**) umgesetzt.^[52]



Schema 19: Mechanismus der Abspaltung des Cumarinyl-Käfigs vom Substrat.

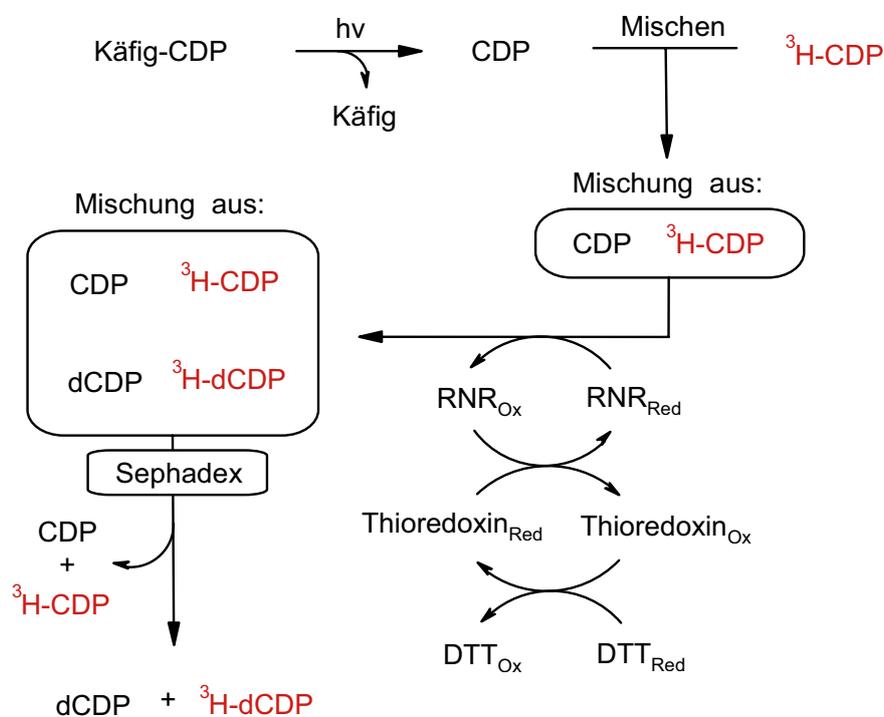
Der photochemischen Abspaltung des cumarinylgeschützten Substrats liegt ein anderer Mechanismus zu Grunde (Schema 19). Nach Absorption eines Photons ($\lambda = 351 \text{ nm}$) durch den Cumarin-Chromophor wird Verbindung **11** in den angeregten Singlett-Zustand überführt. Die Bindung zwischen der Methylengruppe und dem Sauerstoffatom wird daraufhin homolytisch gebrochen. Durch einen Ein-Elektronen-Transfer (SET, single electron transfer) wird das ungepaarte Elektron vom Kohlenstoff auf den Sauerstoff übertragen. Es hat somit eine Ladungstrennung stattgefunden. Das Phosphatanion wird anschliessend durch Wasser protoniert und damit CDP freigesetzt. Das Carbokation bildet in einer Solvolyse mit Hydroxid-anion eine neue Alkoholfunktion.^[49]

Um zu berechnen, welche Menge an Substrat bei dieser Spaltung freigesetzt wird, musste die Effizienz der Spaltung pro Laserflash ermittelt werden. Dafür wurde eine Probe mit pHP-geschützten Substrat (Verbindung **10**) sieben mal mit einem Laserflash mit einer Energie von $\sim 100 \text{ mJ}$ pro Puls bei 308 nm bestrahlt und die entstandenen Photoprodukte anschliessend mit RP-HPLC analysiert.

Dabei zeigte sich, dass 36% der Verbindung **10** zu Phenacylsäure umgesetzt wird. Wenn man davon ausgeht, dass bei jedem Laserflash die gleiche Menge des Käfigs abgespalten wird, werden 5.1% pro Flash gespalten. In absoluten Zahlen bedeutet dies, dass bei einer Anfangskonzentration von 1.3 mM geschütztem CDP pro Laserflash $66 \text{ }\mu\text{M}$ CDP freigesetzt wird. Im Vergleich zur Konzentration von RNR von $30 \text{ }\mu\text{M}$ wird mehr als die doppelte Menge und somit genug Substrat freigesetzt um einen Katalysezyklus des Enzyms einzuleiten.

3.5.5 Bioaktivität von freigesetztem CDP

Es ist denkbar, dass Nebenprodukte der Photoreaktion die RNR hemmen. So musste sichergestellt werden, dass das freigesetzte CDP durch das Enzym zu dCDP reduziert werden kann. Um dies zu messen, bestrahlte man geschütztes CDP **10** während 60 s mit einer 500 W Quecksilberkurzbogenlampe, um CDP zu gewinnen. Dieses CDP wurde zusammen mit ^3H -CDP in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen mit RNR inkubiert. Nach 10 min wurde die Reaktion mit 1 M Perchlorsäure gequencht und das nicht umgesetzte CDP von dCDP chromatografisch an Sephadex getrennt. Mit einem Szintillator wurde die Tritiumkonzentration gemessen, um so die Menge an ^3H -dCDP zu berechnen. Schema 20 gibt eine Übersicht über den Versuchsaufbau dieses Experimentes.



Schema 20: Aufbau des Assays für die Messung der Bioaktivität von durch Bestrahlung freigesetztem CDP. Radioaktive Substanzen sind der Übersicht halber rot eingefärbt.

Tabelle 4: Ergebnisse des Aktivitätsassays mit bestrahltem **10** und ^3H -CDP.

[Bestrahltes 10]	[^3H -CDP]	Tritiummessung [CDP / dCDP]	Umsatz an ^3H -CDP
0.0 mM	0.5 mM	1066 / 2210 cpm	67%
0.5 mM	0.5 mM	1674 / 724 cpm	30%
3.5 mM	0.5 mM	1894 / 410 cpm	18%

Aus Tabelle 4 kann entnommen werden, dass mit steigender Konzentration von bestrahltem **10** die Reduktion von ^3H -CDP zurückgeht. Das Enzym reduziert dementsprechend bestrahltes **10** und ^3H -CDP in gleicher Masse. Es konnte somit gezeigt werden, dass nach Abspaltung des Käfigs mit Licht bioaktives CDP freigesetzt wird.

3.5.6 Ergebnisse der Laserflash Photolysen

Für die Laserflash Photolysen wurde eine speziell angefertigte Küvette eingesetzt, die in Abbildung 10 dargestellt ist. Der Innenraum hat die Masse $3 \times 3 \times 42.5$ mm mit einem Volumen von $382.5 \mu\text{l}$. Diese Geometrie hat den Vorteil, dass trotz des 12-mal kleineren Volumens gegenüber Standard-Bestrahlungsküvetten die gesamte Schichtdicke von den üblichen 42.5 mm verwendet werden kann. Damit behält man dieselbe Nachweisgrenze bei geringerem Materialverbrauch. Nachteile dieser Küvette sind die erschwerte Entfernung von Luftblasen und der grössere Aufwand zur Justierung der Laseroptik.



Abbildung 10: Küvette für die Laser-Flash Photolysen von RNR und geschütztem CDP.

Typischerweise wurde eine Lösung mit folgenden Komponenten bestrahlt: $40 \mu\text{M}$ R1, $30 \mu\text{M}$ R2, 1.3 mM geschütztes CDP **10** oder **11**, $250 \mu\text{M}$ dTTP und 15 mM AcOMg in 50 mM Tris mit $\text{pH} = 7.6$. R1 wurde im 33% igen Überschuss zugegeben, damit sichergestellt ist, dass trotz der niedrigen Dissoziationskonstante von $K_D = 0.1 - 0.2 \mu\text{M}$ jede R2-Untereinheit an eine R1-Untereinheit gekoppelt ist.^[12] Für jede Lasermessung wurde eine frische Lösung hergestellt und jeweils nur einmal bestrahlt. Da nach Freisetzung des Substrates die gesamte Menge an RNR oxidiert ist, kann bei einer allfällig zweiten Bestrahlung kein Turnover des Enzyms mehr stattfinden.

Um eine maximale Absorption des Lasers beim jeweiligen Chromophor des Käfigs zu gewährleisten, wurde beim $p\text{HP}$ -Verbindung **10** bei 308 nm und beim 6,7-Dimethoxycumarinyl-Verbindung **11** bei 351 nm eingestrahlt. Dabei wurde jeweils die Transientenspur bei 410 nm beobachtet, wo das Tyrosylradikal der R2-Einheit ein lokales Absorptionsmaximum aufweist.

Bei Bestrahlung des Systems mit dem Cumarin-Käfigs konnte während den ersten 200 ns nach dem Laserpuls ein Rückgang der Absorption bei 410 ns festgestellt werden. Kontrollexperimente zeigten jedoch, dass ein vergleichbares Signal auch bei Bestrahlung der Küvette *ohne* RNR gemessen wird (Abbildung 11). Vermutlich wird keine reelle Absorption gemessen, sondern man beobachtet nur ein Artefakt des Detektors, welcher durch die starke Fluoreszenz des Cumarinderivats überladen ist und keine verlässlichen Daten liefert.^[45]

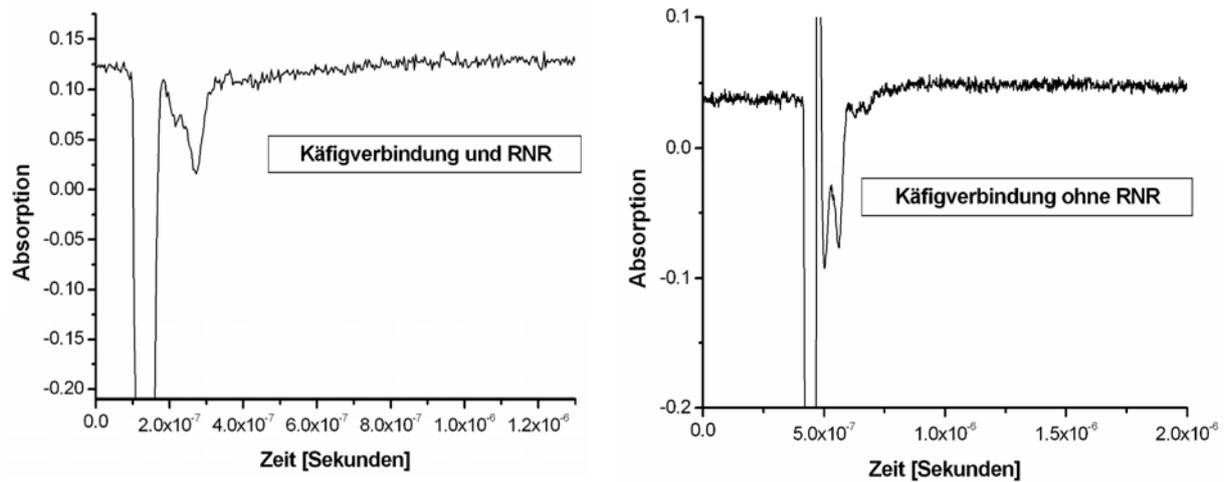


Abbildung 11: Spuren bei 410 nm mit resp. ohne RNR und **11**. Die kurzzeitige Absorption während den ersten 150 ns nach dem Laserflash geht auf Fluoreszenzeffekte des Cumarinsystems und damit verbundene Überladung des Photomultiplier zurück. Die exakte Form dieses Artefakts war nicht reproduzierbar.

Die Laserflash Photolysen der RNR-Lösungen mit *p*-Hydroxyphenacyl als Käfigs zeigten vergleichbare Ergebnisse. Es konnten sowohl im Nano- wie auch im Mikrosekundenbereich keine Veränderung der Absorption bei 410 nm gemessen werden (Abbildung 12).

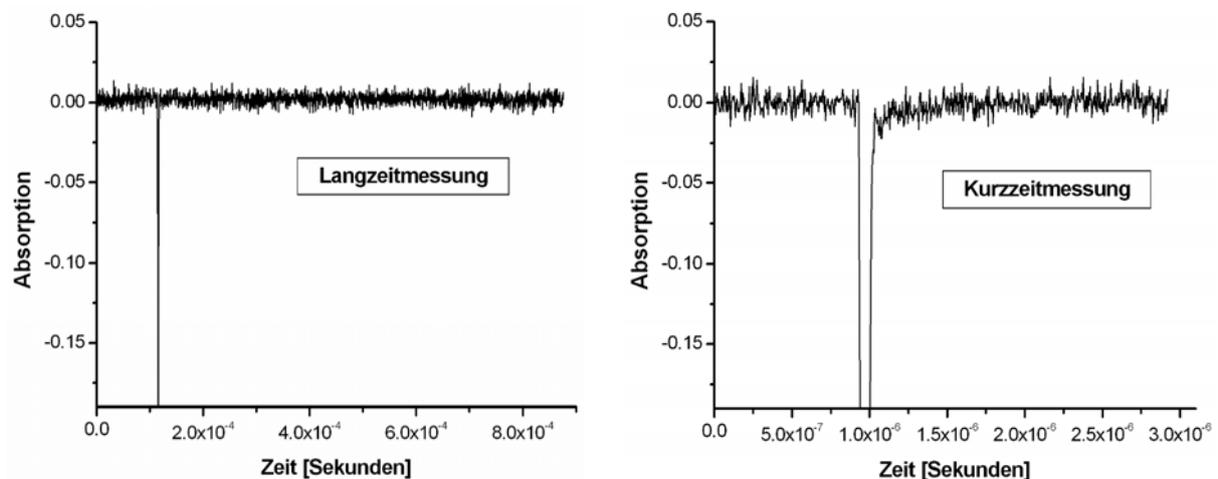


Abbildung 12: Laserflash Spuren bei 410 nm unter Verwendung des *p*HP-geschützten Substrat **10**. Das rechte Spektrum hat mit 3 μ s eine viel kürzere Beobachtungszeit als das linke (900 μ s).

Auch OMA-Spektren bei verschiedenen Zeitfenstern nach Laserbeschuss zeigten keinerlei Signale.

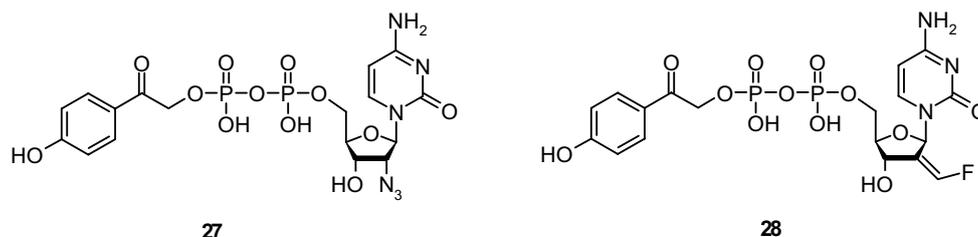
3.6 Interpretation der Ergebnisse und Ausblick

Aus den obengenannten Ergebnissen lassen sich mehrere Schlüsse ziehen.

- Man konnte mit Stopped Flow Experimenten zeigen, dass die Geschwindigkeit des Elektronentransfers zwischen R2 und R1 höher als 10^3 s^{-1} ist.
- Es zeigte sich, dass für Laserflash Photolyse *p*-Hydroxyphenacyl die bessere Wahl als photolabile Schutzgruppe war (Verbindung **10**). Nicht nur ist die Quantenausbeute mit 0.3 gegenüber 0.04 (Tabelle 3 auf Seite 23) signifikant höher, sondern auch die Fluoreszenz bei Bestrahlung des Cumarin-Käfigs zeigte sich als ernst zu nehmendes Problem. Der Cumarinkäfig konnte so seinen Vorteil der schnelleren Substratfreisetzung von 10^9 gegenüber 10^7 s^{-1} gar nicht ausspielen.
- In mehreren Laserflash Photolyse-Experimenten mit zwei verschiedenen Käfigverbindungen konnten bei 410 nm keine Signale gemessen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Elektronentransfer schneller zwischen Tyr₁₂₂ und Cys₄₃₉ als $k_{\text{ET}} > 10^6 \text{ s}^{-1}$ stattfindet.

Um den ET der Ribonukleotid Reduktase weiter aufzuklären, bieten sich folgende Experimente an:

- Durch Verwendung eines ‚besseren‘ Käfigs gewönne man vertiefte Einsichten in die schnellen Prozessen des Elektronentransfers im unteren Nanosekundenbereich. Die ideale Schutzgruppe zeichnet sich für diese Zwecke durch folgende Eigenschaften aus: (a) möglichst hohe Quantenausbeute, (b) Substratfreisetzung im schnellen Nanosekundenbereich ($k_{\text{Freisetzung}} \geq 10^9 \text{ s}^{-1}$) und (c) einer hohen Anregungswellenlänge von $\lambda \geq 500 \text{ nm}$ wobei die Absorption bei 410 nm verschwindend gering sein muss. Bis dato ist in der Literatur kein solcher Käfig bekannt.
- Falls die Reduktion des Substrates gegenüber dem ET zwischen R2 und R1 sehr schnell ist, beginnt bereits der Rücktransfer, bevor die Radikalkonzentration am Tyr₁₂₂ messbar abgenommen hat. Diesem Fall kann man durch Einsatz von geschützten Suizidinhibitoren (z.B. Verbindung **27** und **28**) begegnen. Ein Suizidinhibitor bildet während der Reduktion im katalytischen Zentrum eine kovalente Bindung zum Enzym. Das Radikal wird dadurch nicht mehr zurück auf Cys₄₃₉ übertragen, wobei folglich kein Rücktransfer zum Tyr₁₂₂ stattfinden kann.^[12]



Schema 21: Zwei photolabil geschützte Suizidinhibitoren der RNR. Bei Einsatz dieser Substrate würde das Enzym inaktiviert und es fände kein Rücktransfer des Radikals auf Tyr₁₂₂ statt.

3.7 Photochemische Generierung von Tyr₃₅₆

Stubbe, Nocera et al. haben in diesem Zusammenhang interessante Forschungsergebnisse publiziert, die hier nicht unerwähnt bleiben sollen.^[53] Sie bestrahlten mit einem Laser eine Lösung aus R1 und einem 20er-Peptid, welches durch Wasserstoffbrücken eine reversible Bindung mit R1 eingeht (Dissoziationskonstante $K_D \geq 40 \mu\text{M}$). Das Peptid beinhaltet ein Tyrosin (Tyr₃₅₆) mit einem benachbarten Chromophor (Benzophenon resp. Anthrachinon). Durch Einstrahlung mit einem Laser bei 300 nm wird der Chromophor angeregt, wodurch das benachbarte Tyr₃₅₆ zum Tyrosylradikal oxidiert wird. Dieses Tyrosylradikal wiederum gibt die Ladung an Tyr₇₃₁ von R1 weiter, so dass der ET in R1 initiiert wird (siehe Abbildung 13).

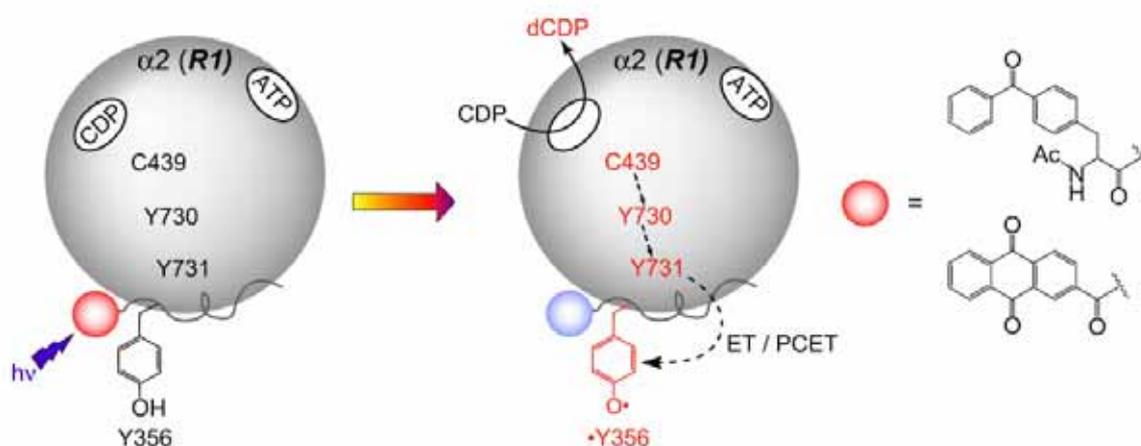


Abbildung 13: Photoinduzierte Reduktion von CDP zu dCDP: Durch Laserflash erzeugtes Radikal wird in diesem Experiment von einem Peptid auf Tyr₇₃₁ von R1 übertragen. Quelle: JACS, 2007.^[53]

Durch Transientenabsorptions-Spektroskopie und OMA-Messungen konnte der zeitliche Verlauf der Radikale bei verschiedenen Wellenlängen beobachtet und zurückverfolgt werden. Stubbe et al. konnten zeigen, dass sowohl das UV/Vis-Signal des Chromophor- wie auch des Tyrosyl-Radikals nach Anregung durch den Laserflash sofort sichtbar ist ($k_{\text{ET}} > 10^8 \text{ s}^{-1}$). Das Abklingen des Signals entspricht einem monoexponentiellen Verlauf mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{Abnahme}} = 2.0 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Benzophenon) und $1.7 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Anthrachinon). Zudem konnten sie nachweisen, dass bei Bestrahlung die Unterinheit R1 in der Lage ist CDP zu dCDP zu reduzieren, wenn auch nur mit 12-13%iger Ausbeute. Bei Verwendung eines Rheniumkomplexes als Chromophor und 3,5-Difluortyrosin an Position 356 beobachteten sie eine Ausbeute von 29%.^[54]

Dies sind sehr aufschlussreiche Ergebnisse, gewähren sie doch einen Einblick in die zweite ‚Hälfte‘ des ETs (Tyr₇₃₁ bis Cys₄₃₉) in R1. Aber sie geben wenig Aufschluss darüber, wie schnell das Radikal von R2 auf R1 übertragen wird.

3.8 Zusammenfassung: ET durch RNR

Mit „Stopped Flow“ Messungen und Laserflash Photolysen soll die Geschwindigkeit des ETs zwischen den Untereinheiten R2 und R1 in der Ribonukleotid Reduktase untersucht werden. Dabei zeigten Stopped Flow Messungen mit Cytidindiphosphat (CDP) als Substrat, dass keine langsame Prozesse im Millisekundenbereich zu beobachten sind, die auf einen ET schliessen lassen. Für die Beobachtung schneller Prozesse wurden erfolgreich zwei verschiedene photolabil geschützte CDP synthetisiert. Es konnte mit HPLC-Analysen gezeigt werden, dass bei deren Laserbeschuss CDP freigesetzt wird. Die Bioaktivität dieses freigesetzten CDP konnte durch konkurrierende Substratumsetzung mit ^3H -CDP nachgewiesen werden. Die Laserflash Photolysen mit geschütztem CDP und RNR zeigten jedoch keine Signale für Prozesse mit einer Geschwindigkeit von $k_{\text{ET}} \leq 10^6 \text{ s}^{-1}$. Es ist daher anzunehmen, dass der Elektronentransfer zwischen Tyr₁₂₂ und Cys₄₃₉ schneller als $k_{\text{ET}} > 10^6 \text{ s}^{-1}$ stattfindet. Diese hohe Geschwindigkeit lässt sich nur mit einem Hopping-Mechanismus in Einklang bringen, weil ein ET über 35 Å in einem Superaustausch-Prozess mehrere Minuten in Anspruch nehmen würde (siehe Abbildung 14).

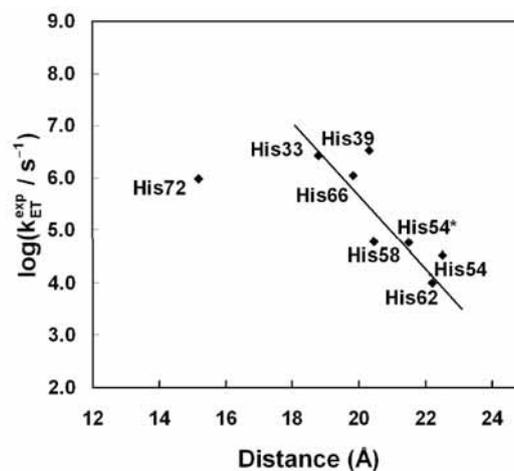


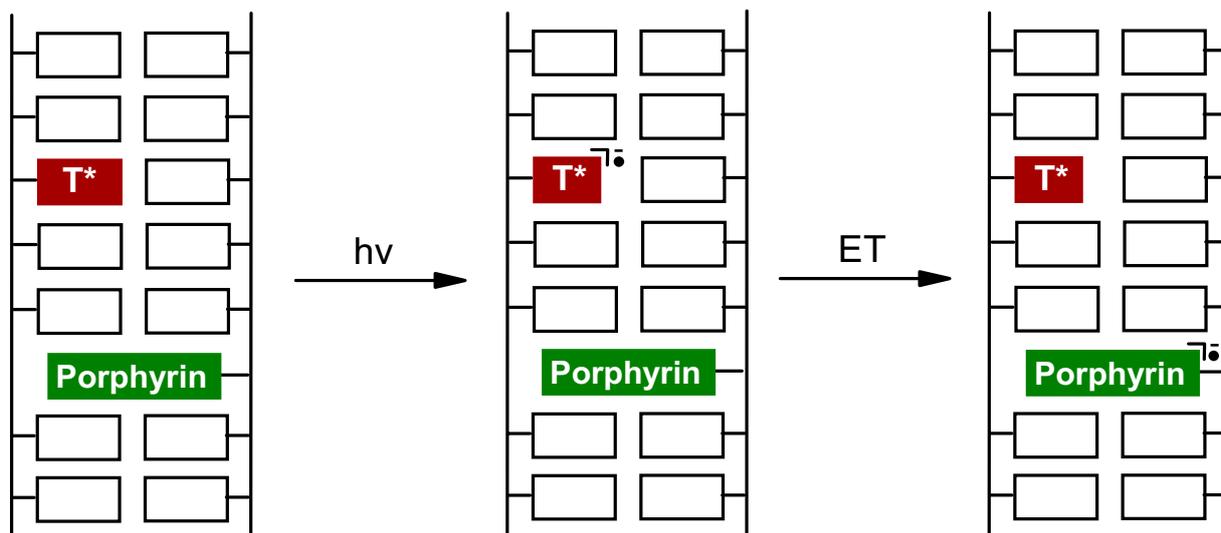
Abbildung 14: Geschwindigkeit acht verschiedener Elektronentransfers logarithmisch gegen die Distanz aufgetragen. Beratan et al. konnten mit Rutheniummodifizierten Histidinen in Cytochrom b_{562} zeigen, dass die Geschwindigkeit des ETs bei einem Superaustausch exponentiell mit der Distanz abnimmt. Bei 35 Å würde ein ET theoretisch mehrere Minuten brauchen.

4 Reduktiver Elektronentransfer durch die DNA

4.1 Aufgabenstellung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, finden in der Natur Elektronentransferreaktionen nicht nur in Enzymen, sondern auch in der DNA statt. Die Photolyase repariert UV-Schäden durch Übertragung eines Elektrons auf das Thymidin-Dimer. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht vollständig geklärt und es besteht Bedarf an weiteren Experimenten. Ein möglicher Zugang zu komplexen biologischen Prozessen ist die Untersuchung an Modellsystemen. Dabei können die einzelnen Parameter frei gewählt werden und man gewinnt nach und nach Erkenntnisse, die sich auf das Gesamtsystem übertragen lassen.

Das Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines solchen Modellsystems zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch ein Doppelstrang-DNA-Oligomer. Als Injektor kommt ein modifizierter Thymidin-Baustein zum Zug, welcher bei Laser-Bestrahlung bei 308 nm eine Norrish-Reaktion eingeht und ein Elektron auf die Thymidin-Base überträgt. Der Detektor ist ein in die DNA eingebettetes Porphyrin-Derivat. Das aromatische System des Porphyrins soll durch das transferierte Elektron zum Radikalanion reduziert werden (siehe Schema 22). Die daraus folgende Zunahme der Absorption bei 445 nm soll mit Laser Flash Photolyse zeitaufgelöst verfolgt werden. Dadurch kann berechnet werden, wie schnell ein reduktiver ET über eine gegebene DNA-Sequenz stattfindet.

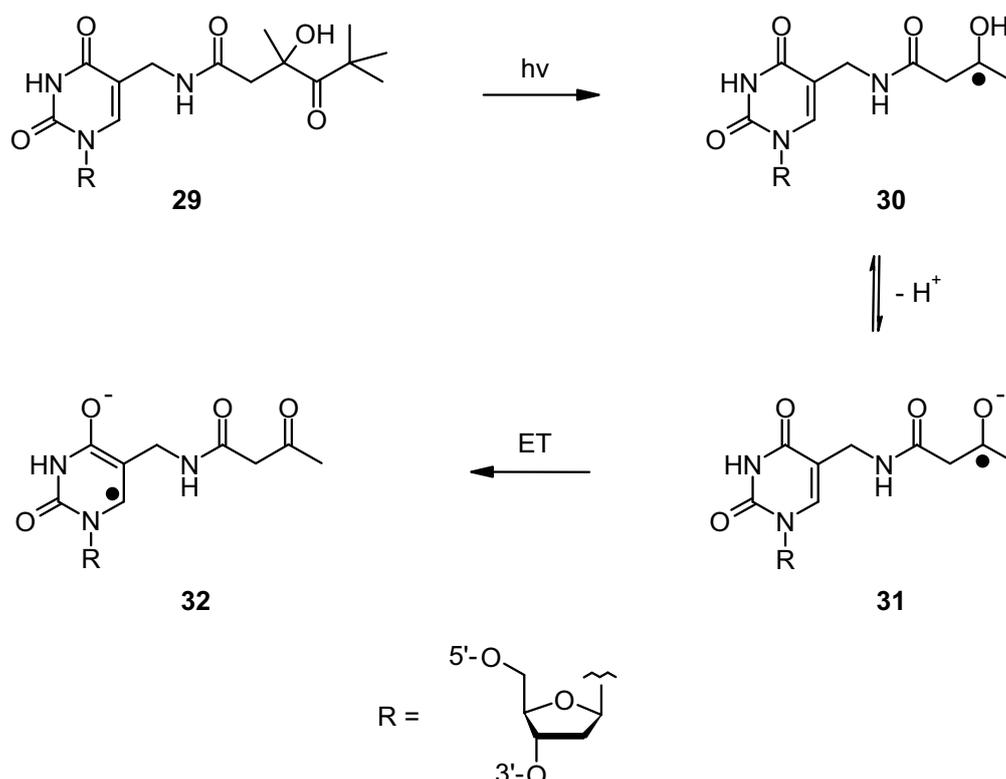


Schema 22: Reduktiver Elektronentransfer durch die DNA: Ein modifiziertes Thymidin-Derivat wird durch Laserbeschuss zum Radikalanion reduziert. Dieses Radikal wird durch einen Elektronentransfer auf ein Porphyrin-Derivat übertragen. Das resultierende Radikalanion des Porphyrin kann UV/Vis spektroskopisch nachgewiesen werden.

In der Arbeitsgruppe von Giese wurde bereits von Thomas und Barbara Carl ein Injektorsystem für den reduktiven Elektronentransfer entwickelt und erfolgreich getestet.^[22, 55] Als Detektor diente ihnen ein Thymin-Dimer, dessen Cyclobutanring durch die Reduktion geöffnet wurde. Die Geschwindigkeit dieses Systems konnte jedoch nur über einen Vergleich mit der Konkurrenzreaktion – der Abfangreaktion mit Wasser – abgeschätzt werden. Mit dem hier vorgestellten System ist man in der Lage, die Geschwindigkeit direkt spektroskopisch zu messen.

4.2 Injektorsystem: Eigenschaften, Syntheseübersicht

Wie eingangs erwähnt, wird das Elektron durch Laserbestrahlung der modifizierten Thyminidbase **29** in die DNA injiziert. An der Methylgruppe von Thyminid wurde über eine Amidbindung ein Pivaloylderivat angebracht, welches unter Absorption eines Photons bei $\lambda = 308$ nm eine Norrish-Spaltung vom Typ I eingeht. Der niedrige Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 30 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wird durch eine hohe Quantenausbeute von $\Phi = 0.56$ ausgeglichen, womit eine hohe Spaltungsausbeute erzielt wird.^[22] Das so generierte sekundäre Radikal **30** spaltet ein Proton ab (Struktur **31**) und reduziert den Aromaten von Thyminid zum Enolat **32**. Somit wurde ein einzelnes überschüssiges Elektron in die DNA injiziert, welches nun über das π -System von Base zu Base hüpfen kann. Schema 23 zeigt den Mechanismus dieses Injektionsprozesses.



Schema 23: Mechanismus der Elektroneninjektion auf den Aromaten des Thyminid-Derivats **32**.

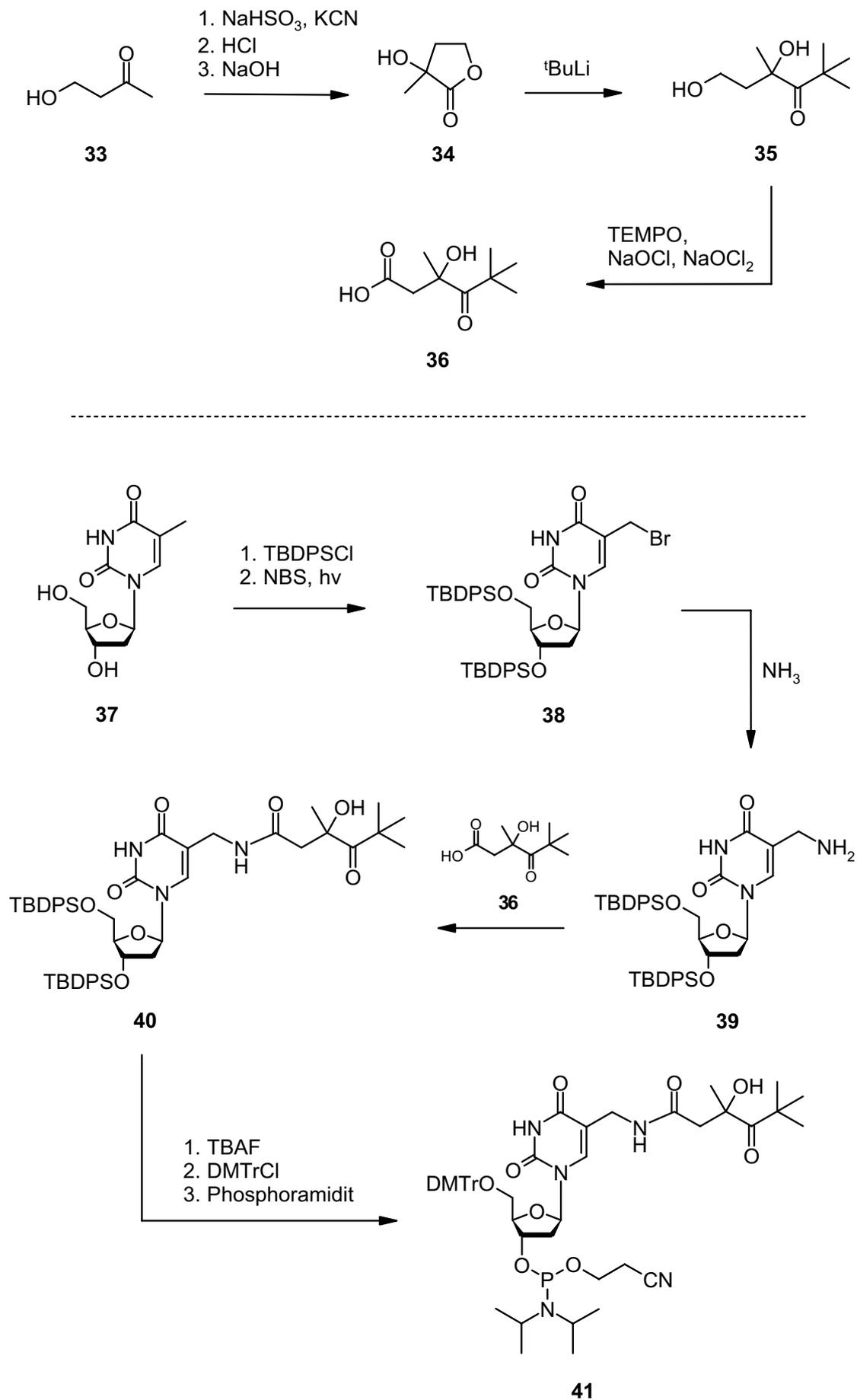
Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass pro Doppelstrang ein Elektron ortsselektiv injiziert werden kann. Thymin hat mit $E = -2.18 \text{ V}$ das niedrigste Reduktionspotential der vier Nucleobasen (siehe Tabelle 5), womit eine maximale Effizienz gewährleistet wird.

Tabelle 5: Reduktionspotentiale der vier DNA-Basen und Porphyrin. ^[56, 57]

Base	Reduktionspotential [V]
Adenin	- 2.76
Guanin	- 2.52
Cytosin	- 2.35
Thymin	- 2.18
Porphyrin	- 1.4 ^[58]

Lewis et al. untersuchte die Elektroneninjektion in Hairpin-DNA über Stilbendietherderivate, die durch Laserbeschuss in den angeregten Singletzustand überführt wurden. Kinetikmessungen zeigten, dass die Ladung mit $k = 5 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ auf Thymin übertragen wird, sofern Donor ($^1\text{Sd}^*$) und Akzeptor (T) benachbart sind.^[59] Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Elektroneninjektion auf Thymin schnell genug läuft, um Hoppingprozesse innerhalb der DNA nachweisen zu können.

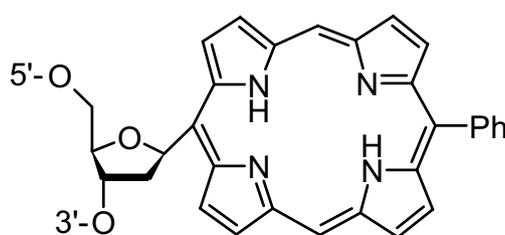
Die Synthese des Injektorbausteins **41** ging von 4-Hydroxy-butan-2-on und Thymin aus und verlief über 10 Stufen. Schema 24 zeigt eine Übersicht der Synthese.



Schema 24: Syntheseübersicht des T*-Injektorsystems.

Ausgehend von 4-Hydroxy-2-butanon (**33**) wurde mit Kaliumcyanid und Salzsäure und anschließender basischer Aufarbeitung das Lacton **34** gewonnen. Der Ring wurde mit *tert.*-Butyllithium geöffnet, wobei die für die Norrish-Reaktion wichtige Pivaloylgruppe gebildet wurde (Verbindung **35**). Anschliessende TEMPO-Oxidation der primären Hydroxyfunktion führte zur Carbonsäure **36**. Parallel zu diesen Reaktionen wurde Thymidin (**37**) an 3'- und 5'-Position geschützt und anschliessend an der Methylgruppe bromiert. Das resultierende Bromid **38** wurde mit Ammoniak ins primäre Amin **39** überführt. Die folgende Amidkupplung mit der oben erwähnten Carbonsäure **36** führte zur Verbindung **40**. Anschliessend wurde mit TBAF die beiden Silylschutzgruppen abgespalten, an 5'-Position mit Dimethoxytritylchlorid geschützt und mit Phosphoramidit zum DNA-Baustein **41** umgesetzt.

4.3 Detektorsystem: Eigenschaften, Syntheseübersicht



42

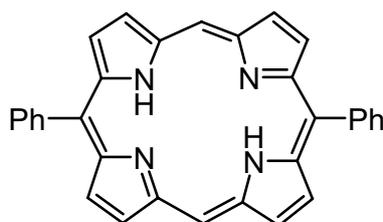
Schema 25: Porphyrinderivat **42** als Detektor des reduktiven Elektronentransfer.

Die Wahl des Detektorsystems fiel auf das Porphyrin-Derivat **42**, welches von Kool et. al. entwickelt wurde.^[60] Das aromatische System des Porphyrins bietet für den reduktiven ET mehrere Vorteile: Der Porphyrinring ist direkt in das DNA- π -Stacking eingebettet, womit eine hohe Effizienz bei der Übertragung des Elektrons auf den Detektor gewährleistet ist. Das Reduktionspotential von Porphyrin liegt bei -1.4 V, womit es sich durch allen vier reduzierten Nucleobasen reduzieren lässt (siehe Tabelle 5 auf Seite 37). Porphyrin absorbiert Licht bei 420 nm. Diese Wellenlänge ist insofern günstig, da die DNA hier optisch transparent ist. Zudem ist der Extinktionskoeffizient mit $\epsilon = 320'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ausgesprochen hoch, wodurch der Detektor sehr empfindlich ist.

Die Synthese des Detektor-Systems geht von kommerziell erhältlicher 1'-(α)-Chloro-3',5'-di-O-(*p*-toluoyl)-2'-deoxy-D-ribose (**43**) aus, die über 6 Stufen ins DMTr-geschützten Porphyrin-Derivat überführt wird. Schema 26 zeigt eine Übersicht der Synthese.

schliessende Umsetzung mit Diphenylethylendiamin (**45**) führte zum Imidazol **46**, welches säurekatalisch in den Aldehyd **47** überführt wurde. Aus dem Aldehyd, Dipyrrromethan (**48**) und Benzaldehyd (**49**) wurde in einer asymmetrischen Porphyrin-Reaktion Produkt **50** gebildet. In den folgenden zwei Stufen spaltete man die Schutzgruppen an 3'- und 5'-Position ab (Struktur **51**) und brachte an 5'-Position die 4,4'-Dimethoxytrityl-Gruppe an (Struktur **52**). Die für die folgende DNA-Synthese benötigte Phosphorylierung an 5'-Position, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Stulz übernommen, da der DNA-Baustein aufgrund der Porphyrin-Gruppe sehr reaktiv ist und der Phosphor(III) bei längerer Lagerung leicht zum Phosphor(V) oxidiert wird.

Um die photochemische Stabilität des Detektors zu ermitteln, wurde das symmetrische (und damit synthetisch leichter zugänglichere) Diphenylporphyrin (**53**) hergestellt, um es in Laserflash Photolyse-Experimente zu bestrahlen und allfällige Photoreaktionen zu beobachten.

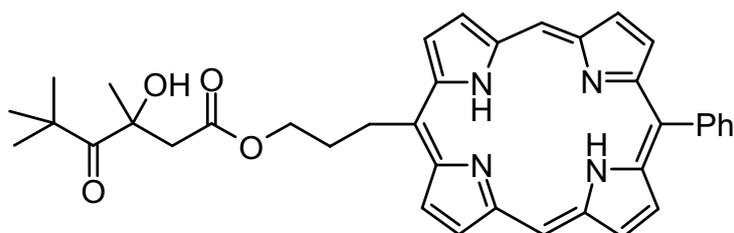
**53**

Schema 27: Diphenylporphyrin als einfach zugängliches Modellsystem zur Untersuchung der photochemischen Stabilität des Detektors.

Es wurde eine 1 μM Lösung in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (70:30 Volumenprozent) hergestellt und in einer Quarzküvette entgast. Die Lösung wurde mit Laserflash Photolyse bei 308 nm bestrahlt und die zeitabhängige Absorption bei 420 und 445 nm beobachtet. Falls eine vorübergehende Ladungstrennung oder eine Phosphoreszenz stattfindet, sollte dies bei den erwähnten Wellenlängen feststellbar sein. Die resultierenden Spektren zeigten, dass nach Bestrahlung keine Veränderung der Absorption feststellbar war. Auch vergleichende UV/Vis-Spektren vor und nach 10-maliger Bestrahlung zeigten keine signifikanten Beeinflussung der Absorption der Verbindung. Man konnte mit diesen Experimenten zeigen, dass der Detektor bei Bestrahlung bei 308 nm ausserordentliche Stabilität zeigt und keine ungewollten chemischen Reaktionen eingeht.

4.4 Das Porphyrinradikal-Anion

Um die spektroskopischen Eigenschaften des Porphyrinradikal-Anions an einem Modellsystem zu untersuchen, hat Timur Coskun Verbindung **54** synthetisiert. Hierbei ist das Elektroneninjektorsystem über eine lineare Kohlenwasserstoffkette kovalent an ein Porphyrin gebunden.^[61] Dieser kurze Abstand von ca. 8 Å gewährleistet eine effiziente Übertragung der Ladung zwischen den Systemen.



54

Schema 28: Die von Stulz et al. hergestellte Modellverbindung zur Untersuchung des T^* -Injektors und Porphyrinradikal-Anions.

Durch elektrochemische Reduktion der Verbindung wurde das Porphyrin-System zum Radikalanion reduziert. Dabei wurde mit zunehmender Stromstärke die UV/Vis-Absorption der Lösung gemessen. In Abbildung 15 ist erkennbar, dass die charakteristische Absorption des Porphyrin-Aromaten bei 420 nm zurückgeht und ein neues Signal bei 445 nm entsteht. Das Signal bei 445 nm scheint einen vergleichbar starken Extinktionskoeffizienten wie das Signal bei 420 nm ($\epsilon = 324'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) zu haben. Dies bedeutet, dass der Detektor eine hohe Empfindlichkeit aufweist und somit auch geringe Konzentrationen von Porphyrinradikal-Anion spektroskopisch nachgewiesen werden können.

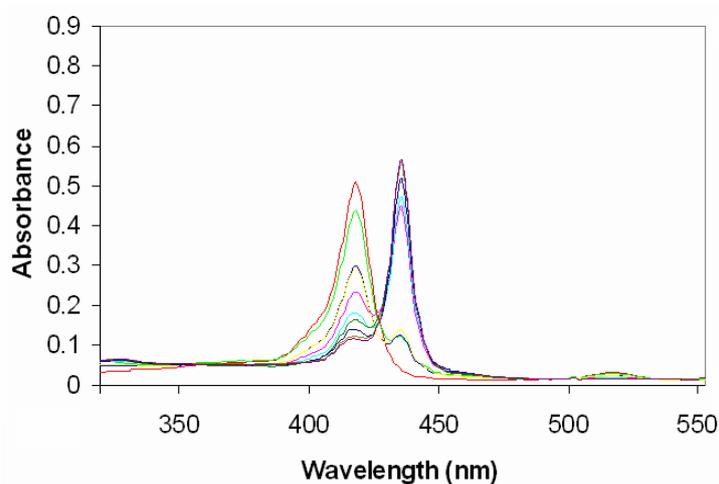


Abbildung 15: UV/Vis-Spektrum des elektrochemisch erzeugten Porphyrinradikal-Anion.

Timur Coskun führte zudem Laserflash Photolyse Experimente mit Modellverbindung **54** durch, um nachzuweisen, dass das durch Laserbeschuss bei $\lambda = 308$ nm generierte Radikalanion vom Injektorsystem auf den Aromaten des Porphyrins übertragen wird und das Porphyrinradikal-Anion spektroskopisch gemessen werden kann. OMA-Messungen zeigten dabei ein deutliches Signal bei 445 nm (Abbildung 16).

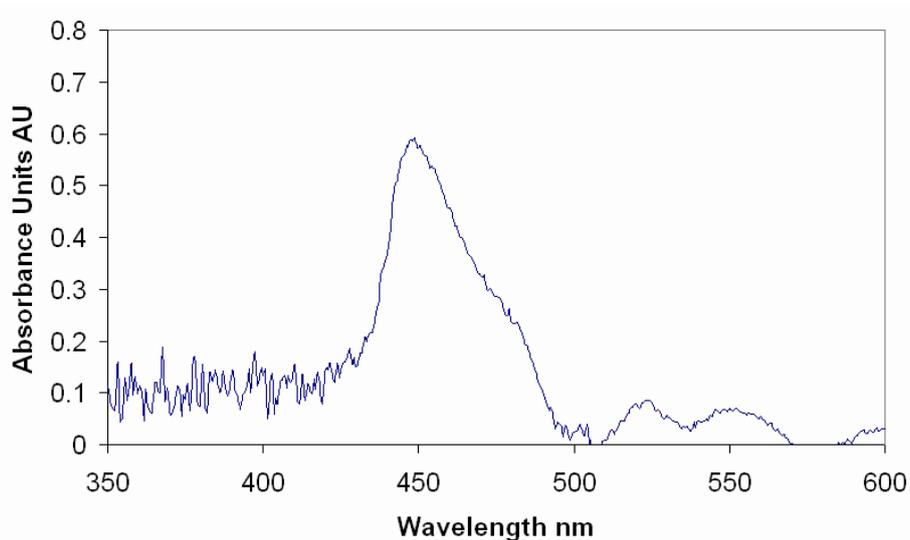


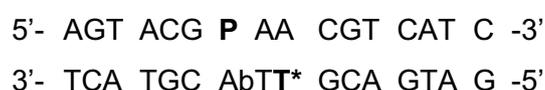
Abbildung 16: OMA-Spektrum der Modellverbindung **54**.

Da die Konzentration von Porphyrin im Grundzustand im gleichen Masse zurückgeht, wie angeregtes Porphyrin erzeugt wird, wäre gemäss Abbildung 16 bei OMA-Messungen bei 420 nm eine Abnahme der Absorption zu erwarten. Obwohl dieser Rückgang bei eigenen OMA-Spektren klar erkennbar war, ist auf Abbildung 16 keine Abnahme der Absorption („negative Absorption“) bei 420 nm ersichtlich. Der Grund dafür ist nicht bekannt.

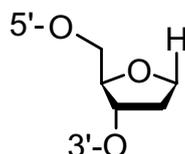
Anhand dieser Ergebnisse mit der Modellverbindung **54** konnte gezeigt werden, dass das Zusammenspiel von Injektor- und Detektor funktioniert und das charakteristische Signal des Porphyrinradikal-Anion bei 445 nm nachweisbar ist.

4.5 DNA-Sequenzen

Um den reduktiven Elektronentransfer in der DNA zu untersuchen, wurden Injektor- und Detektorsystem in zwei komplementäre DNA-Stränge eingebaut. Die Stränge haben folgende Sequenz:



P steht für das Porphyrin-Detektorsystem **42**, T* für die modifizierte Thymidinbase (Injektor, Verbindung **29**) und Ab für die abasische Desoxyribose **56** mit einem Wasserstoff an Stelle der Base. Das ausgedehnte aromatische Systems des Porphyrins lässt aus sterischen Gründen keine Purin- oder Pyrimidin-Base an der gegenüberliegenden Stelle des Gegenstranges zu.

**56**

Schema 29: Abasischer (Ab) Baustein **56** mit einem Wasserstoffatom anstelle einer Nucleobase.

Beim Doppelstrang **55** (16mer) ist zwischen Injektor und Detektor eine A:T-Einheit eingebaut, was einem Abstand von 7.2 Å gleichkommt. Der ET sollte demnach über einen Superaustauschmechanismus so rasch stattfinden, dass mit Laserflash Photolyse keine Geschwindigkeit ermittelt werden kann. Das System dient der Kontrolle, ob das Elektron auf das Porphyrin-System übertragen wird und ob demgemäß eine Absorptionsänderung am Detektorsystem festgestellt werden kann. Injektor und Detektor wurden aus synthesesstrategischen Gründen nicht in den gleichen Strang eingebaut. Denn bei der DNA-Oligosynthese führt der Einbau einer modifizierten Base in den meisten Fällen zu geringeren Ausbeuten. Des Weiteren befinden sich vor dem Detektor und nach dem Injektor jeweils zwei G:C-Paare. Die höheren Reduktionspotentiale dieser Basen (siehe Tabelle 5) bilden eine natürliche „Barriere“ und sollen verhindern, dass das Elektron in die falsche Richtung wandert. Bei der Wahl der Sequenzen wurde darauf geachtet, dass die DNA keine Palindrome aufweist und mit sich selbst komplementär ist.

Die Synthesen der Einzelstränge wurden von Stulz et al. (Detektorstrang) und der Firma MicroSynth AG (Injektorstrang) durchgeführt. Der Injektorstrang wurde „Trityl-On“ geliefert, der Detektorstrang „Trityl-Off“. Beide Stränge wurden chromatographisch mit HPLC aufgereinigt und gegebenenfalls die Tritylgruppe an 5'-Ende abgespalten.

Die Maldi-Tof-Analysen und Schmelzpunktmessungen ergaben folgende Ergebnisse:

Tabelle 6: Massenspektrometrische Daten und Schmelzpunkt des verwendeten DNA-Oligomers **55**.

Basenpaare	Inj (m/z, ber./gem.)	Det (m/z, ber./gem.)	Smp (gem.)
16	4947.4 / 4953.5	5125.6 / 5120.8	41°C

4.6 Laserflashphotolysen des DNA-Doppelstrangs 55

Der DNA-Doppelstrang **55** wurde in 0.1 M TEAA pH 7 gelöst (1 μ M, 6 ml), dreimal entgast und in eine Quarzküvette umgefüllt. Bestrahlungen mit einem Laser bei 308 nm mit einer Pulsenergie von \sim 100 mJ führten zu den Transientenspektren von Abbildung 17.

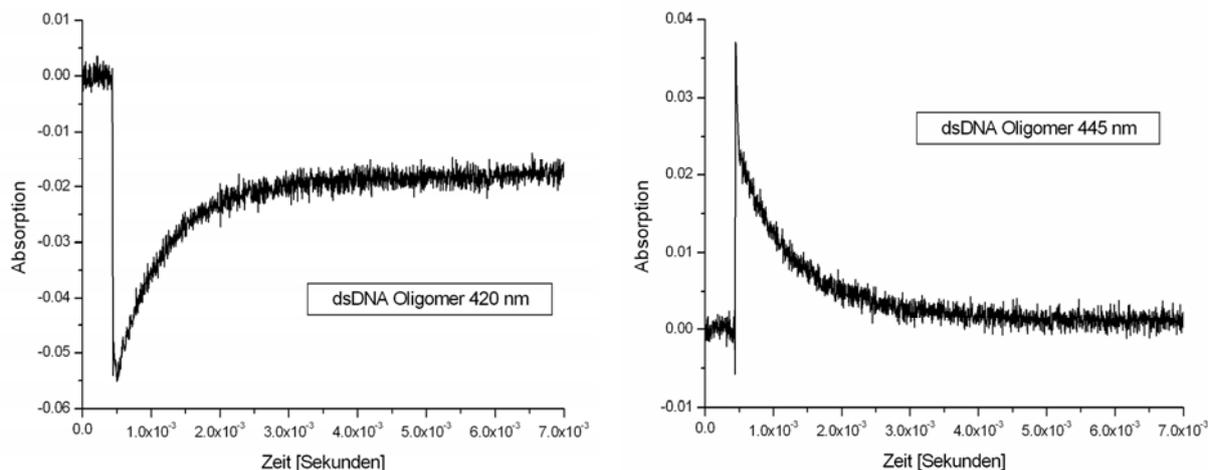


Abbildung 17: Transientenabsorptions-Spektren nach Bestrahlung von **55** bei 308 nm. Links ist die Spur bei 420 nm, rechts bei 445 nm aufgezeichnet. Der Verlauf der Kurve entspricht einer Kinetik zweiter Ordnung.

Etwa 100 Nanosekunden nach dem Laserpuls ist bei 445 nm eine deutliche Absorption vorhanden, die im Millisekundenbereich langsam wieder abklingt. Der Anstieg ist zu schnell, als dass man mit dem verwendeten System eine Kinetik messen könnte. Das langsame Abklingen entspricht einer Kinetik zweiter Ordnung mit den Geschwindigkeitskonstanten $k_1 = 2.4 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ und $k_2 = 5.1 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$. Diese Zahlen sind jedoch mit Vorsicht zu geniessen, da sie stark von der Sauerstoff-Konzentration abhängig sind. Denn die Gegenwart von molekularem Sauerstoff quencht die bei der Photoreaktion entstandenen Radikale: je höher die O_2 -Konzentration der Lösung ist, desto schneller ist das Abklingen der Signale.

Wie in Abbildung 17 ersichtlich ist, geht die Absorption bei 420 nm nicht auf den ursprünglichen Wert von 0.0 zurück, sondern nur bis ca. -0.15. Dies deutet darauf hin, dass das aromatische System des Porphyrins Nebenreaktionen eingeht und nicht wieder vollständig rekonstituiert wird. Vergleichende UV/Vis-Spektren vor und nach Laserflash Photolyse bestätigten diesen Befund: die Absorption des Porphyrins bei 420 nm geht pro Laserflash um ca. 4% zurück.

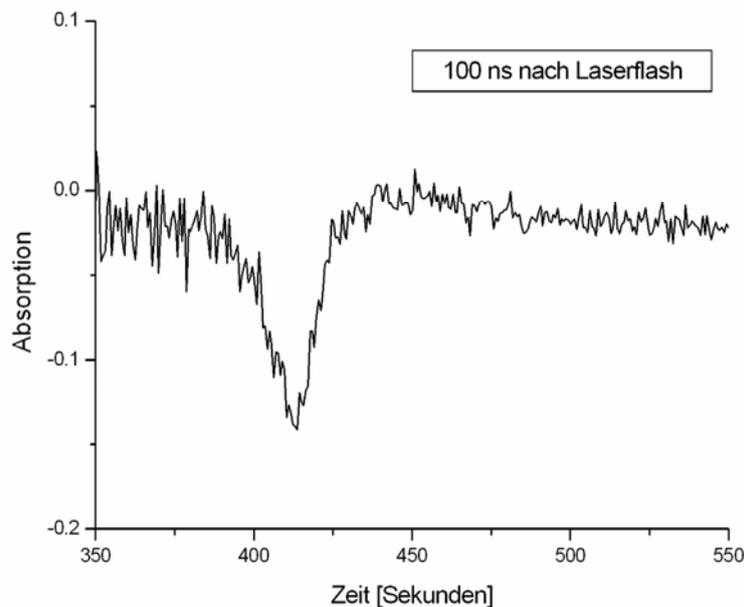


Abbildung 18: UV/Vis-Spektrum der DNA-Lösung 55, 100 ns nach Laserflash.

Das Spektrum der OMA-Messungen derselben Lösung wird in Abbildung 18 gezeigt. Deutlich sichtbar ist eine Abnahme der Absorption bei 410-420 nm und ein kleiner, jedoch etwas breiterer Anstieg bei 440-470 nm. Die OMA-Spektren haben typischerweise ein schlechteres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis, da bei der Verwendung eines CCD-Chips ohne Photomultiplier gearbeitet wird.

4.7 Interpretation der Ergebnisse

Die oben erwähnten Ergebnisse zeigen, dass bei Laserbestrahlung die Absorption des Porphyrins bei 420 nm schnell abnimmt und langsam wieder zunimmt. Bei 445 nm beobachtet man das Gegenteil: eine rasche Zunahme, gefolgt von einem langsamen Abklingen des Signals. Dies ist ein starker Hinweis, dass nach Laserbestrahlung mit 308 nm Porphyrin-Radikalkationen gebildet werden, deren Lebensdauer im Bereich von Millisekunden liegen. Somit konnte man erfolgreich zeigen, dass mit dem gezeigten System ein reduktiver Elektronentransfer durch die DNA möglich ist und dessen Geschwindigkeit durch Laserflash Photolyse messbar ist.

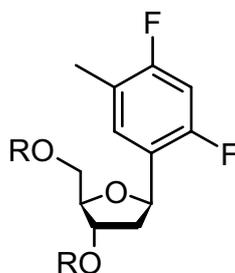
Als Geschwindigkeits dieses Elektronentransfers kann bei dieser kurzen Donor-Akzeptor-Distanz nur die Untergrenze von $k_{ET} \geq 10^6 \text{ s}^{-1}$ angegeben werden. Als nächstes soll deshalb ein DNA-Oligomer hergestellt werden, bei dem der Injektor-Detektor Abstand so gross ist, dass ein Ladungstransfer über diese Distanz sehr langsam wird. Bei Einbau von 4 und mehr A:T-Paaren zwischen Injektor und Detektor sollte der Hoppingmechanismus gegenüber dem Superaustausch dominieren und die Geschwindigkeit des ETs genug langsam sein, dass sie mit Laserflash Photolyse messbar ist.

4.8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein System aufgebaut werden, mit dem man die Geschwindigkeit eines reduktiven Elektronentransfers durch die DNA messen kann. Als Injektor diente ein modifizierter Thymidin-Baustein, ein Porphyrin-Derivat wurde als Detektor eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Bestrahlung des Detektors keine störende Signale messbar sind und das aromatische System keine unerwünschte Photoprodukte bildet. Sowohl Injektor wie auch Detektor wurden in einen DNA-Doppelstrang eingebaut. Der dazwischenliegende Abstand wurde so gewählt, dass eine möglichst hohe Effizienz des ETs gewährleistet ist. Bei Bestrahlung mit $\lambda = 308$ nm konnte das charakteristische UV/Vis-Signal des Porphyrinradikal-Anions beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass ein Elektronentransfer stattgefunden hat. Wie erwartet, war die Geschwindigkeit des ETs zu schnell, als dass man den genauen Wert ermitteln konnte. Man konnte somit zeigen, dass der reduktive Elektronentransfer mit diesem System beobacht- und quantifizierbar ist.

Aufbauend auf diesen Versuchen sind eine Vielzahl möglicher Experimente denkbar:

- In einem ersten Schritt kann die Distanz zwischen Injektor und Detektor variiert werden. Dazu können weitere Adenin-Thymin Basenpaare eingeschoben werden. Beim oxidativen Lochtransfer wurden Ladungen über Distanzen bis 16 Basenpaare verschoben. Bei Verwendung von 4 oder mehr A:T-Paare zwischen Injektor und Detektor ist zu erwarten, dass der ET genug langsam stattfindet, um die Kinetik mit Laserflash Photolyse aufzulösen.
- Der Einbau von unnatürlichen Nucleinsäuren bietet weitere Möglichkeiten zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit des reduktiven Elektronentransfers. Kool et al. publizierten Arbeiten mit der difluorierten Nucleobase **57**.^[62] Diese geht mit Adenin eine normale Watson-Cricks-Paarung ein, wobei jedoch das Redoxpotential dieses Basenpaars deutlich höher als ein A:T-Basenpaar ist. Dadurch würde ein Hoppingprozess stark verlangsamt. Die Geschwindigkeit eines Superexchange würde jedoch nicht merklich beeinflusst, da der Donor-Akzeptor-Abstand konstant bleibt.



57

- Durch Komplexierung von Metallen im Zentrum des Porphyrin-Systems können die chemo-elektrischen Eigenschaften des Detektors stark beeinflusst werden. So

reduziert der Einbau von Sn^{2+} das Reduktionspotential von -1.4 auf 0.9 V.^[63] Die Triebkraft für den Elektronentransfer würde dementsprechend zunehmen. Es bleibt abzuwarten, inwiefern dies die Geschwindigkeit des ETs beeinflussen würde.

Experimenteller Teil

5 Verwendete Apparaturen und Materialien

5.1 Apparaturen

Laser: Für die Laser Flash Photolysen kam ein COMPex 205 XeCl-Excimer Laser der Firma Lambda Physik zum Einsatz. Die Emissionswellenlängen betragen je nach Experiment 308 oder 351 nm bei einer Pulsenergie von 100 - 150 mJ und einer Halbwertsbreite des Pulses von ca. 25 ns. Zur Beobachtung der Kinetik bei einer bestimmten Wellenlänge umfasste der Versuchsaufbau eine gepulste Xenon-Lampe, einen Monochromator, sowie einen 1P28 Photomultiplier. Der Einsatz eines iStar 720 ICCD Detektors der Firma Andor ermöglichte die Aufnahme eines Transienten-Spektrums zu einem gewählten Zeitpunkt (OMA-Versuchsaufbau). Die Messdaten wurden mit MacFitFlash 2.0.1 aufbereitet und bearbeitet.

Bestrahlungslampe: Bestrahlungsstand der Firma Oriel, Modell 68810, mit einer 500 W Quecksilberkurzbogenlampe der Firma Osram. Die verwendeten Filter der Firma Schott werden jeweils im Text erwähnt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Bestrahlungen bei RT in Quarzglasküvetten (3 ml, 1.00 cm Schichtdicke) der Firma Hellma durchgeführt.

UV/Vis-Spektroskopie: Die UV/Vis-Analysen und Schmelzpunktmessungen von DNA-Doppelsträngen wurden an einem Lambda Bio 40 von Perkin Elmer Instruments durchgeführt und mit der Software UV WinLab ausgewertet. Als Temperaturregler wurde PTP-6 Peltier System von Perkin Elmer Instruments eingesetzt. Für eine akurateren Temperaturmessung wurde eine mit Wasser gefüllte Referenz-Küvette mit Temperatur-Sensor angeschlossen.

Dünnschichtchromatographie (DC): Zur qualitativen Verfolgung des Reaktionsverlaufs wurden Kieselgelbeschichtete CD-Platten aus Aluminium mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F₂₅₄) der Firma Merck verwendet. Die Visualisierung der Spots erfolgte je nach Verbindung UV-Spektroskopisch (254 oder 366 nm) oder durch Eintauchen in einen DC-Dip mit anschließender Erhitzung durch eine Heat-Gun. Als Dip wurden folgende Lösungen verwendet: (a) 3 g Kaliumpermanganat, 3 ml 5%ige Natronlauge, 20 g Kaliumcarbonat und 300 ml Wasser (b) 10 g Cer(IV)sulfat-tetrahydrat, 25 g Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat, 100 ml konzentrierter Schwefelsäure und 900 ml Wasser.

Säulenchromatographie: Die Aufreinigung synthetisierter Verbindungen wurde mit Hilfe der Säulenchromatographie unter erhöhtem Druck an Kieselgel 60 (40 - 63 µm) der Firma Merck durchgeführt. Die verwendeten Eluationsmittel werden im Text erwähnt. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und dünnschichtchromatographisch charakterisiert.

HPLC: Analytische HPLC, sowie die Reinigung der DNA-Stänge wurden mit Waters Alliance 2690 Separation Module mit einem 2680 Dual Mode Detector, Hewlett-Packard 1050 Series durchgeführt. Man verwendete Merck LiChroCART 250-4 Säulen (Lichrospher 100 RP-18e, 250 x 4 mm, 5 µm). Als Steuerungssoftware kam das Programm Millennium³², Version 3.05.01 von Waters Corporation zum Einsatz. Die jeweiligen Gradientenprogramme werden bei den entsprechenden Versuchen angegeben. Die Zuordnung der Fraktionen erfolgte entweder durch Vergleich der Retentionszeiten von Referenzverbindungen und anschließender Koinjektion oder durch MALDI-ToF-MS der gesammelten und lyophilisierten Produkte.

Lyophilisator: Um DNA-Proben aufzukonzentrieren, wurden die Lösungen in Standard-1.5 ml-Eppendorfgefäße für ca. 3 h im Speed Vac Plus der Firma Savant bei 40°C zentrifugiert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Die Proteinproben wurden mit SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurde mit dem Proteom II Ready Gel System von Bio-Rad gearbeitet. In der Regel wurden vorgefertigte Acrylamid-Gele mit 10%iger Quervernetzung verwendet. Die entwickelten und gefärbten Gele wurden auf dem Model 543 Gel Dryer von Bio-Rad getrocknet. Als Standard wurde ein Broad-Range Protein Ladder von Bio-Rad mit Proteinen von 10 bis 260 kDalton verwendet.

Szintillator: Die Szintillations-Messung von tritiumhaltigen Proben wurde mit dem 2000CA Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer von Packard durchgeführt. Falls im Text nicht anders vermerkt, dauerte eine Messung 2 min. Als Matrix wurde pro Sample 10 ml Ultima Gold XR von Perkin Elmer zugegeben.

Massenspektrometer (EI und FAB): Es wurden doppelfokussierende Massenspektrometer VG70-250 und Finnigan MAT 312 verwendet. Die Analysen wurden von Herrn Dr. H. Nadig am Institut für Organische Chemie der Universität Basel durchgeführt. Die Ionenerzeugung erfolgte durch Elektronenstrossionisation (ESI) oder durch Fast atom bombardment (FAB) mit Xenon-Atomen.

Massenspektrometer (MALDI-ToF): Die Massenspektrogramme von DNA-Strängen, sowie von R1 und R2 wurde an einem Voyager DE PRO von Perseptive Biosystems aufgenommen. Als Kontrollsoftware wurde Control Panel v.5.1.0 eingesetzt. Die Proben wurden ohne vorherige Entsalzung mit einer Matrix auf einem Probenhalter vermischt (1 + 1 µl) und an der Luft getrocknet. Sofern nicht anders vermerkt, wurde folgende Matrix-

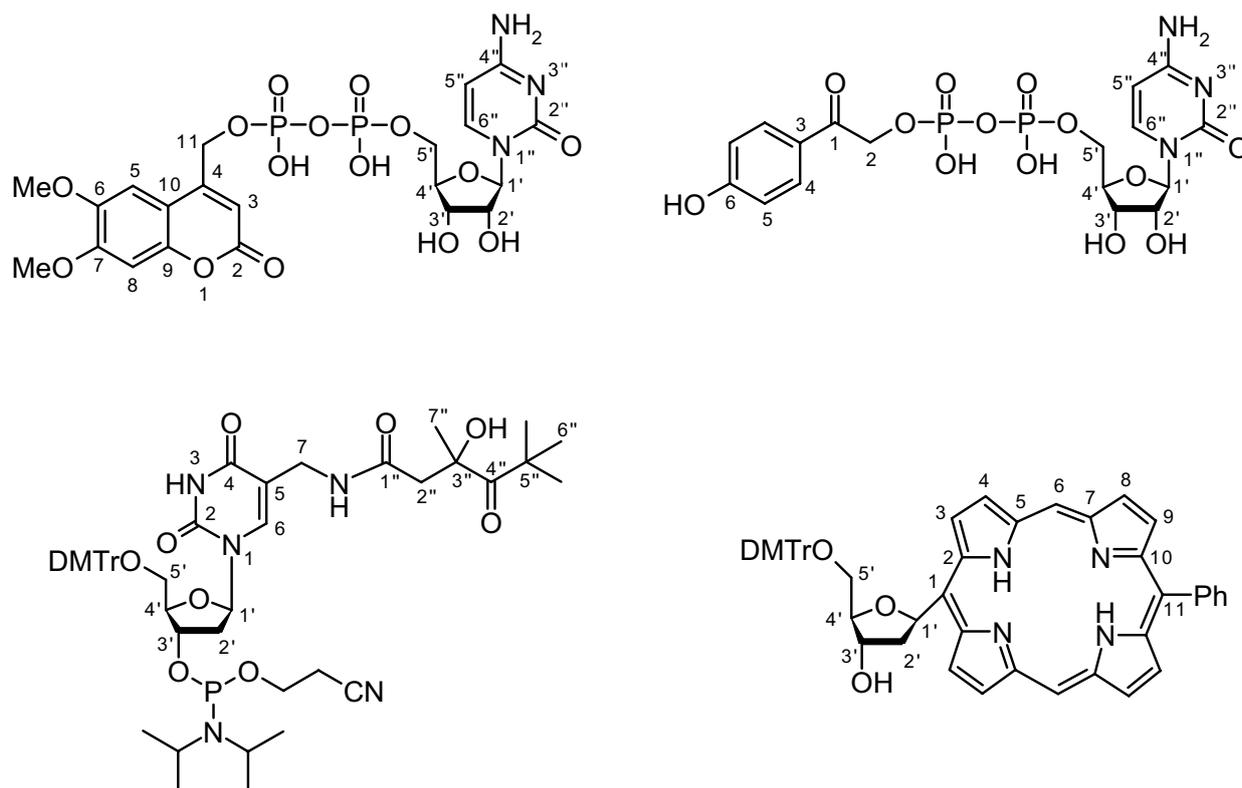
Lösung verwendet: 0.5 M 2,6-Dihydroxy-acetophenon und 0.3 M Di-ammoniumtartrat in Wasser/Acetonitril 1:1.

NMR-Spektroskopie: Die NMR-Analysen wurden an folgenden Geräten aufgenommen: Bruker BZH 250/52 (250 MHz), Bruker DPX-400 (400 MHz) und Bruker DRX-500 (500 MHz). Die Messungen erfolgte in deuterierten Lösungsmitteln mit Tetramethylsilan als internem Standard ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm). Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz) angegeben. Sämtliche Spektren sind nach erster Ordnung interpretiert. In Fällen von aufgespaltenen Signalen mit definierter Multiplizität bezieht sich δ auf das gewichtete, arithmetische Mittel der Signallinien, Die Signalmuster werden folgendermassen beschrieben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett) und br (breit). Die chemischen Verschiebungen der Signale beziehen sich bei der ^{13}C -NMR-Spektroskopie auf folgende Lösungsmittel: $\delta = 77.16$ ppm (Chloroform- d_1), $\delta = 39.52$ ppm (DMSO- d_6) und $\delta = 49.00$ ppm (Methanol- d_4).^[64] Zur Signalkennzeichnung wurden folgende Abkürzungen verwendet: C_p (primäres C-Atom), C_s (sekundäres C-Atom), C_t (tertiäres C-Atom), C_q (quartäres C-Atom) und C_{ar} (aromatisches C-Atom). Bei der ^{31}P -NMR-Spektroskopie bezieht sich die chemische Verschiebung δ auf *ortho*-Phosphorsäure in Chloroform- d_1 als externen Standard. Sämtliche 1D- und 2D-Spektren wurden mit der Software WINNMR v.6.1.0.0 ausgewertet.

Schmelzpunkt: Die Schmelzpunkte der synthetisierten Verbindungen wurden an einem Büchi 530 gemessen und sind unkorrigiert.

5.2 Zuordnung der NMR-Signale

Soweit möglich und sinnvoll wurde bei der Nomenklatur für die Zuordnung der NMR-Signale die IUPAC-Regeln verwendet. Die Wasserstoff-Atome wurden mit den gleichen Nummern versehen wie die zugehörigen Kohlenstoffatomen. Schema 30 gibt einen Überblick über die Zuordnung der Endprodukte der jeweiligen Synthesen.



Schema 30: Nomenklatur der in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen.

5.3 Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel: Absolute Lösungsmittel wurden von den Firma Fluka und J. T. Baker bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Technische Lösungsmittel wurden vor Verwendung destilliert.

Chemikalien: Die Ausgangsstoffe der Synthesen und Reagenzien wurden von den Firmen Acros, Aldrich, Bio-Rad und Fluka bezogen und wurden ohne vorgängige Reinigung eingesetzt.

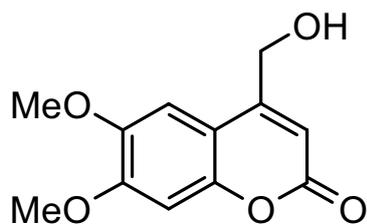
Salze: Einfache anorganische Salze wie NaCl, MgSO₄, NaHCO₃ usw. wurden am Chemikalienschalter des Chemischen Instituts der Universität Basel bezogen.

Enzyme: Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase wurden von IMCO Corporation Ltd. AB bezogen.

6 Synthesen

6.1 Cumarinylgeschütztes CDP

6,7-Dimethoxy-4-hydroxymethylcumarin (**22**)



In einem 250 ml Rundkolben wurden 5.50 g (25.0 mmol, 1.00 eq.) 6,7-Dimethoxy-4-methylcumarin (**21**) in 100 ml *p*-Xylol suspendiert. Man gab 4.16 g (37.5 mmol, 1.50 eq.) Selendioxid zu und liess die Lösung bei 130°C unter Rückfluss während 8 h rühren. Die vom ausgefallenen Selen tiefschwarze Suspension wurde heiss über Celite filtriert, mehrmals mit heissem *p*-Xylol nachgewaschen und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Der orangefarbene Feststoff wurde abfiltriert und während 30 min am HV getrocknet (Rohausbeute: 5.99 g). Für die folgende Reduktion wurde der Feststoff in 100 ml abs. Ethanol gelöst und unter Argon 1.00 g (25.0 mmol, 1.00 eq.) Natriumborhydrid zugegeben. Die hellbraune Suspension erwärmte sich leicht und es bildeten sich kleinste Bläschen. Nach 5 h Rühren bei RT wurden weitere 200 mg (5 mmol, 0.2 eq.) Natriumborhydrid zugegeben. Nach 40 min wurden 20 ml 1 M Salzsäure zugegeben. Der Reaktionsmischung wurden 50 ml Wasser zugegeben und dreimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Man trocknete den Rückstand während 30 min am HV. Das Rohprodukt wurde dreimal in ca. 50 ml Ethanol suspendiert und abgenutscht. Nach erneuter Trocknung am HV isolierte man 2.51 g (41%) eines braun-gelben Feststoffs.

C₁₂H₁₂O₅: 236.23 g/mol

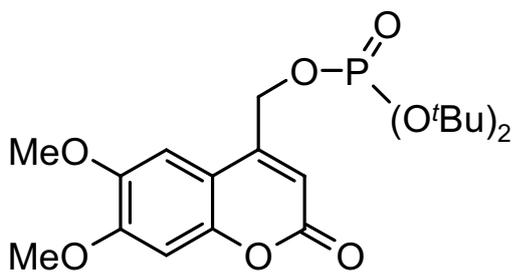
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 7.07 (s, 1H, H-8); 7.06 (s, 1H, H-5); 6.31 (t, ³J_{HH} = 1.5 Hz, 1H, OH), 5.63 (t, ³J_{HH} = 5.6 Hz, 1H, H-3); 4.75 (q, ²J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 1.5 Hz, 2H, H-11); 3.86 (s, 3H, CH₃-O-C-7); 3.83 (s, 3H, CH₃-O-C-6).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 160.7 (C_q, 1C, C-2); 156.8 (C_q, 1C, C-4); 152.5 (C_q, 1C, C-7); 148.8 (C_q, 1C, C-9); 145.7 (C_q, 1C, C-6); 109.5 (C_q, 1C, C-10); 107.5 (C_t, 1C, C-3); 105.1 (C_t, 1C, C-5); 100.2 (C_t, 1C, C-8); 59.3 (C_s, 1C, C-11); 56.1 (C_p, 2C, CH₃-O-C-6 und CH₃-O-C-7).

MS (FAB, m/z): 275 ([M+K]⁺), 237 ([M+H]⁺, 100); 236 (M⁺, 50).

Smp: 208.8 - 209.6°C.

DC: Substanz nur in DMF und DMSO löslich.

(6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)-methyl-di-*tert.*-butylphosphat (23)

In 10 ml DMF wurden 1.01 g (4.26 mmol, 1.00 eq.) 6,7-Dimethoxy-4-hydroxymethylcumarin (**22**) gelöst und 1.2 g (17.0 mmol, 4.0 eq.) einer 0.45 M Tetrazollösung in Acetonitril zugetropft. Man kühlte die Mischung in einem Eis-Salz-Bad auf -12°C und tropfte während 10 min 1.78 ml (6.39 mmol, 1.5 eq.) N,N-Diethyl-di-*tert.*-butyl-

phosphoramidit mit einer Spritze zu. In den folgenden 15 min färbte sich die Lösung gelblich. Die Kühlmischung wurde danach entfernt und liess 2 h bei RT rühren. Man gab nochmals 800 μl Phosphoramidit hinzu und liess die Reaktion über Nacht bei RT rühren. Die gelbe Lösung wurde auf 0°C gekühlt und langsam 5.96 ml (42.6 mmol, 10.0 eq.) NEt_3 , sowie 2.94 ml (21.4 mmol, 5.00 eq.) 70%ige ${}^t\text{BuOOH}$ in Wasser zugespritzt und anschliessend die Eiskühlung entfernt. Die Lösung färbte sich in den folgenden 4 h von Dunkelgelb über Rot zu einem dunklen Braun. Die Oxidation wurde anschliessend durch Zugabe von 25 ml ges. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gequenchet. Die Lösung wurde dreimal mit je 50 ml EE extrahiert, die org. Phase mit ges. NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Rohprodukt am Rotavap eingeeignet. Man erhielt 2.94 g einer roten Flüssigkeit, welche mit EE an Kieselgel gereinigt wurde. Es konnten 1.29 g (71%) eines hellgelben Feststoffes isoliert werden.

$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{P}$: 428.42 g/mol

${}^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 6.91 (s, 1H, H-5); 6.81 (s, 1H, H-8); 6.47 (t, ${}^3J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1H, H-3); 5.15 (dd, ${}^2J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, ${}^3J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 2H, H-11); 3.96 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O-C-6}$); 3.94 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O-C-7}$).

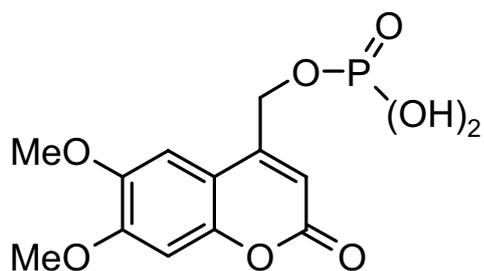
${}^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 161.2 (C_q , 1C, C-2); 152.9 (C_q , 1C, C-7); 149.7 (C_q , d, ${}^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, 1C, C-4); 149.6 (C_q , 1C, C-9); 146.3 (C_q , 1C, C-6); 110.4 (C_t , 1C, C-3); 109.4 (C_q , 1C, C-10); 104.1 (C_t , 1C, C-5); 100.2 (C_t , 1C, C-8); 83.5 (C_q , d, ${}^2J_{\text{CP}} = 7.7$ Hz, 2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 63.8 (C_s , d, ${}^2J_{\text{CP}} = 4.5$ Hz, 1C, C-11); 56.6 (C_p , 1C, $\text{CH}_3\text{-O-C-7}$); 56.3 (C_p , 1C, $\text{CH}_3\text{-O-C-6}$); 29.9 (C_p , d, ${}^3J_{\text{CP}} = 4.3$ Hz, 6C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

${}^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): -12.7.

MS (FAB, m/z): 467 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 31), 429 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 13); 428 (M^+ , 30); 373 (14); 317 (100).

Smp: $130.9 - 131.7^{\circ}\text{C}$.

DC: $R_f = 0.17$ (Hex/EE = 1:2).

(6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)-methyl-phosphat (24)

Um Spuren von Wasser zu entfernen wurden 530 mg (1.24 mmol, 1.00 eq.) Phosphatester **23** zweimal mit je 20 ml Toluol koevaporiert und in 15 ml Dichlormethan gelöst. Man kühlte die Lösung auf 0°C und tropfte 568 µl TFA hinzu. Nach 20 min entfernte man das Eisbad und liess auf RT erwärmen, worauf ein weisser Niederschlag ausfiel.

Nach weiteren 20 min nutschte man die Suspension ab und trocknete den Feststoff während 15 min am HV. Man erhielt ohne weitere Reinigung einen weissen Feststoff in quantitativen Ausbeuten.

C₁₂H₁₃O₈P: 316.21 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ/ppm): 6.53 (s, 1H, H-8); 6.43 (s, 1H, H-5); 6.06 (s, 1H, H-3); 4.74 (d, ³J_{HH} = 5.8 Hz, 2H, H-11); 3.68 (s, 3H, CH₃-O-C-7); 3.61 (s, 3H, CH₃-O-C-6).

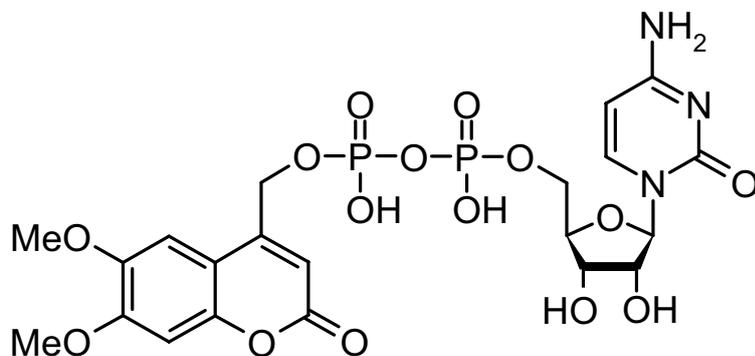
¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, δ/ppm): 160.4 (C_q, 1C, C-2); 152.6 (C_q, 2C, C-4 und C-7); 148.9 (C_q, 1C, C-9); 145.9 (C_q, 1C, C-6); 109.0 (C_t, 1C, C-3); 109.0 (C_q, 1C, C-10); 105.4 (C_t, 1C, C-5); 100.3 (C_t, 1C, C-8); 63.0 (C_{s,t}, 1C, C-11); 56.2 (C_p, 1C, CH₃-O-C-7); 56.1 (C_p, 1C, CH₃-O-C-6).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, δ/ppm): -4.1.

MS (FAB, m/z): 671 ([2M+K]⁺, 5); 633 ([2M+H]⁺, 13); 355 ([M+K]⁺, 27); 317 ([M+H]⁺, 100); 219 (36).

Smp: 245.3 - 246.8°C.

DC: nicht sinnvoll, da Polarität der Verbindung zu hoch.

P²-(6,7-Dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)-methyl-cytidin-5'-diphosphat (11)

In einem 50 ml-Rundkolben wurden ca. 5 g P₂O₅ vorgelegt und darin ein Probegläschen gefüllt mit 1.23 g (3.80 mmol, 4.00 eq.) CMP eingelassen. Der Kolben wurde in einem Ölbad auf 50°C erwärmt und gleichzeitig während 2 h mit einer HV-Pumpe evakuiert.

Die Pumpe wurde abgeschaltet und die Probe über Nacht bei RT über P₂O₅ stehen gelassen. Die so getrocknete Substanz wurde zusammen mit 1.65 ml (3.80 mmol, 4.00 eq.) Tri-*n*-octylamin in 5 ml abs. DMF vermischt. Die weisse Suspension wurde unter Rühren während 20 min auf 100°C erwärmt. Dem erkalteten Reaktionsgemisch wurden 1.23 g (7.59 mmol, 8.00 eq.) in 4.0 ml DMF gelöstem CDI zugegeben und über Nacht bei RT gerührt.

Währenddessen wurden 300 mg (0.95 mmol, 1.00 eq.) Phosphorsäure-monoester **24** in 5.0 ml (MeOH/EtOH = 1:1) gelöst und 238 µl (1.00 mmol, 1.05 eq.) Tri-*n*-butylamin dazugegeben. Die Lösung wurde kurz verrührt, anschliessend am Rotavap eingeeengt und zweimal mit je 5.0 ml Pyridin koevaporiert. Der Rückstand wurde in 5.0 ml DMF gelöst und der ersten Lösung zugegeben. Die weisse Suspension wurde während 13 Tagen bei RT gerührt.

Die hellbraune Suspension wurde abgenutscht und die Lösung am Rotavap eingeeengt. Man erhielt 512 mg eines leicht bräunlichen Feststoffes, welcher semipräparativ an RP-HPLC gereinigt wurde. Verwendete Säule: LiChrocart 250-10, RP-18e (10 µm). Der Gradient ist in Tabelle 7 beschrieben. Als Puffer wurde 0.1 M AcONH₄/AcOH, pH 4.0 verwendet.

Tabelle 7: HPLC-Gradient für die präparative Reinigung der Zielverbindung **11**.

	Puffer	Acetonitril
0 min	100%	0%
60 min	80%	20%
70 min	0%	100%
75 min	0%	100%
85 min	100%	0%

Für die RP-HPLC-Aufarbeitung wurde das Rohprodukt in 5.0 ml Wasser gelöst und jeweils 500 µl eingespritzt. Das gewünschte Produkt eluierte nach ca. 30 min. Die gesammelten Fraktionen wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht am HV lyophilisiert. Man gewann 76 mg (13%) eines weissen Feststoffes.

C₂₁H₂₅N₃O₁₅P₂: 621.33 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, δ/ppm): 7.59 (d, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 1H, H-6''); 6.87 (s, 1H, H-8); 6.80 (s, 1H, H-5); 6.41 (s, 1H, H-3); 5.68 (d, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 1H, H-5''); 5.47 (d, ³J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H-1'); 5.11 (d, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 2H, H_a-11); 5.09 (d, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 2H, H_b-11); 4.34 (d, ³J_{HH} = 9.0 Hz, 1H, H_a-5'); 4.10 (m, 3H, H_b-5' und H-4', H-3'); 3.96 (dd, ³J_{HH} = 2.5 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, 1H, H-2'); 3.90 (s, 3H, CH₃-O-C-7); 3.85 (s, 3H, CH₃-O-C-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , δ/ppm): 164.4 (C_q , 1C, C-2); 163.0 (C_q , 1C, C-4''); 153.3 (C_q , 2C, C-4 und C-2''); 152.2 (C_q , 1C, C-7); 148.5 (C_q , 1C, C-9); 145.7 (C_q , 1C, C-6); 141.1 (C_t , 1C, C-6''); 109.3 (C_q , 1C, C-10); 107.9 (C_t , 1C, C-3); 103.8 (C_t , 1C, C-5); 99.7 (C_t , 1C, C-8); 95.0 (C_t , 1C, C-5''); 89.5 (C_t , 1C, C-1'); 81.5 (C_t , 1C, C-4'); 74.4 (C_t , 1C, C-2'); 67.8 (C_t , 1C, C-3'); 63.6 (C_s , 1C, C-5'); 63.2 (C_s , 1C, C-11); 56.1 (C_p , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-O-C-7}$); 55.8 (C_p , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-O-C-6}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O , δ/ppm):

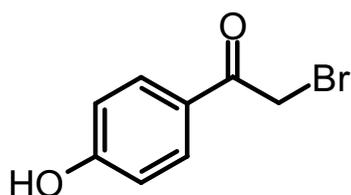
MS (FAB, m/z): 660 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 3); 622 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 4); 324 (21); 171 (100); 112 (21).

Smp: Substanz schmilzt ab $\sim 205^\circ\text{C}$. Bei höheren Temperaturen verfärbt sie sich schwarz. Bei 240°C sind noch feste Strukturen erkennbar.

UV/Vis: 349 nm ($11'00 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); 275 nm ($10'300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); 228 nm ($25'300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.2 *p*HP-geschütztes CDP

2-Bromo-*p*-hydroxyacetophenon (**14**)^[65, 66]



In 30 ml EE wurden 5.91 g (26.4 mmol, 1.20 eq.) CuBr_2 gegeben und unter Rückfluss auf 90°C erhitzt.^[67] Man gab 3.00 g (22.04 mmol, 1.00 eq.) in 20 ml warmen CHCl_3 gelöstes *p*-Hydroxy-acetophenon (**13**) hinzu, wobei sich die Suspension innert wenigen Minuten grün färbte. Nach 2.5 h

wurde die mittlerweile tiefschwarze Suspension im Rotavap eingeeengt. Der schwarze Feststoff wurde ohne vorherige Aufarbeitung an ca. 300 g Kieselgel chromatographiert, wobei ein langsamer Gradient von 2 - 8% MeOH in CH_2Cl_2 verwendet wurde. Man gewann 7.4 g eines schwarzen, zähen Feststoffes, welcher nochmals an Kieselgel gereinigt wurde (2 - 4% MeOH in CH_2Cl_2). Man isolierte 1.20 g (25%) eines weissen Feststoffes.

$\text{C}_8\text{H}_7\text{BrO}_2$: 215.05 g/mol

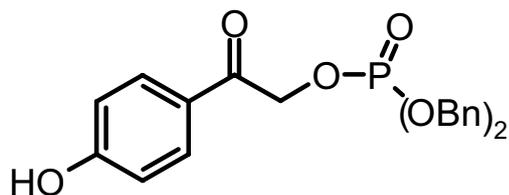
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6 , δ/ppm): 7.95 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.6 \text{ Hz}$, 2H, H-4); 6.94 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.6 \text{ Hz}$, 2H, H-5); 4.62 (s, 2H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, Aceton- d_6 , δ/ppm): 189.9 (C_q , 1C, C-1); 131.9 (C_t , 1C, C-4); 126.7 (C_q , 1C, C-3); 115.8 (C_t , 1C, C-5); 32.0 (C_s , 1C, C-2).

MS (FAB, m/z): 214, 216 (M^+ , 4.64 und 4.54); 121 (100).

Smp: $130.7 - 133.5^\circ\text{C}$.

DC: $R_f = 0.42$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20:1$).

***p*-Hydroxyphenacyl-dibenzylphosphat (16)**

Um das Edukt und das Phosphat-Salz zu trocknen, wurden 2.00 g (9.30 mmol, 1.00 eq.) 2-Bromo-*p*-hydroxyacetophenon (**14**) zweimal mit je 20 ml abs. DMF koevaporiert. In einem separaten Kolben wurden 3.27 g (9.30 mmol, 1.00 eq.) Tetramethylammonium-dibenzylphosphat (**15**) zweimal mit je 20 ml abs. DMF koevaporiert. Unter strengen Schutzgas-Massnahmen wurden die beiden Substanzen in einem ausgeheizten und auf 90°C vorgewärmten Schlenkkolben in 70 ml DMF gelöst und verrührt. Innert wenigen Minuten fiel aus der hellgelben Lösung ein weisser Feststoff aus. Nach 30 min war die Reaktion abgeschlossen und man nutschte den Feststoff ab. Um für die folgende Säulenchromatographie das restliche DMF zu entfernen, wurde der Feststoff dreimal mit je 30 ml CH₂Cl₂ koevaporiert. Anschliessend reinigte man das Rohprodukt an Kieselgel unter Verwendung von CH₂Cl₂/EE = 4:1 als Eluent. Man konnte 2.05 g (53%) eines weissen Feststoffes isolieren.

C₂₂H₂₁O₆P: 412.38 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 10.52 (s, 1H, OH); 7.81 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 2H, H-4); 7.38 (m, 10H, H_{Bn}); 6.86 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 2H, H-5); 5.36 (d, ²J_{HH} = 11.1 Hz, 2H, H-2); 5.12 (d, ²J_{HH} = 7.8 Hz, 4H, H_{Bn}).

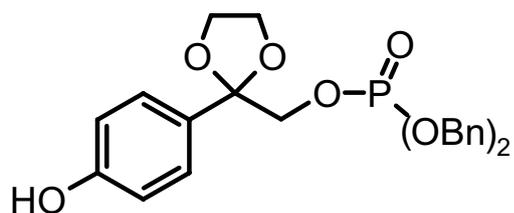
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 190.8 (C_q, 1C, C-1); 162.7 (C_q, 1C, C-6); 136.1 (C_q, d, ³J_{CP} = 6.9 Hz, 1C, C_{Bn}); 130.4 (C_q, 1C, C-4); 129.3 (C_t, 4C, C_{Bn}); 129.2 (C_q, 2C, C_{Bn}); 128.7 (C_t, 4C, C_{Bn}); 126.1 (C_q, 1C, C-3); 116.3 (C_t, 2C, C-5); 69.6 (C_s, d, ²J_{CP} = 5.4 Hz, 1C, C_{Bn}); 59.8 (C_s, 1C, C-2).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): -3.7.

MS (FAB, m/z): 413 ([M+H]⁺, 71); 369 (36); 91 (100).

Smp: 119.3 - 121.4°C.

DC: R_f = 0.1 (Hex/EE = 1:1).

p-Hydroxyphenacyl-dibenzylphosphat-ethylenketal (18)

In einer ausgeheizten Wasserabscheide-Apparatur wurden 1.19 g (2.89 mmol, 1.00 eq.) Dibenzylphosphat **16** in 40 ml Benzol gelöst. Man gab 3.22 ml (57.7 mmol, 20.0 eq.) Ethylenglykol und 28 mg (0.14 mmol, 0.05 eq.) *p*TsOH als Säurekatalysator hinzu. Die Lösung wurde

während 3 h unter Rühren erhitzt, wobei sich mehrere Tropfen Wasser im Wasserabscheider ansammelten. Nach beendeter Reaktion wurde 0.24 g NaHCO₃ zugegeben und das Lösungsmittel am Rotavap abgezogen. Man extrahierte den Rückstand zweimal mit EE und ges. NaCl-Lösung, trocknete die organische Phase mit MgSO₄ und erhielt nach dem Einengen 1.43 g eines gelblichen Öls. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel mit Hex/EE = 1:1 - 1:2 chromatographiert und es konnten 882 mg (67%) farblose Kristalle isoliert werden.

C₂₄H₂₅O₇P: 456.44 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.43 (s, 1H, OH); 7.29 (m, 10H, H_{Bn}); 7.27 (d, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 2H, H-4); 6.86 (d, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 2H, H-5); 4.99 (d, ²J_{HH} = 7.8 Hz, 2H, H_{Bn}); 4.11 (d, ²J_{HH} = 7.6 Hz, 2H, H-2); 3.98 (m, 2H, H_{Ethylen}); 3.81 (m, 2H, H_{Ethylen}).

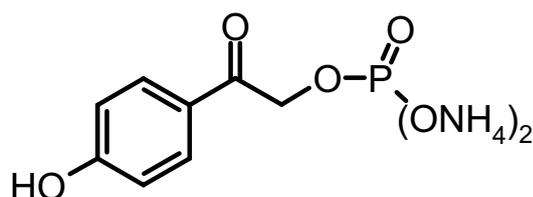
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 157.5 (C_q, 1C, C-6); 135.5 (C_q, d, ³J_{CP} = 7.3 Hz, 1C, C_{Bn}); 129.5 (C_t, 2C, C_{Bn}); 128.6 (C_t, 4C, C_{Bn}); 127.9 (C_t, 4C, C_{Bn}); 127.5 (C_t, 2C, C-4); 115.3 (C_t, 2C, C-5); 107.7 (C_q, d, ³J_{CP} = 7.3 Hz, 1C, C-1); 70.1 (C_s, d, ²J_{CP} = 6.2 Hz, 1C, C-2); 69.5 (C_s, d, ²J_{CP} = 5.4 Hz, 2C, C_{Bn}); 65.4 (C_s, 2C, C_{Ethylen}).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, δ/ppm): -4.7.

MS (FAB, m/z): 457 ([M+H]⁺, 15); 179 (37); 165 (46); 91 (100).

Smp: 97.6 – 99.6°C.

DC: R_f = 0.59 (Hex/EE = 1:2).

p-Hydroxyphenacyl-diammonium-phosphat (19)

Für die Benzyl-Abspaltung wurden 412 mg (903 μm, 1.00 eq.) Benzylester **18** in 15 ml MeOH gelöst und eine Spatelspitze Pd/C (10% Pd-gehalt) zugegeben. Der Kolben wurde mehrmals evakuiert und mit Wasserstoff belüftet. Danach wurde die schwarze Suspension während 3 h heftig gerührt. Nach beendeter

belüftet. Danach wurde die schwarze Suspension während 3 h heftig gerührt. Nach beendeter

Reaktion nutschte man die Suspension über Celite ab und gab 250 μl 10%ige HCl dazu. Nach Aufkonzentrierung am Rotavap erhielt man 262 mg eines klaren Öls, welches bis zur Reinigung bei 4°C aufbewahrt wurde. Um das Produkt als Di-ammoniumsalz zu isolieren, wurden 1.5 g DEAE Sephadex (40-125 μm bead size, 30'000 Da exclusion limit) in 80 ml Wasser aufgeschlämmt und in eine Säule mit 1 cm Durchmesser gefüllt (Füllhöhe ca. 10 cm), welche anschliessend mit 200 ml Wasser equilibriert wurde. Das Rohprodukt wurde in wenig Wasser gelöst und aufgetragen. Man eluierte das Salz mit AcONH_4 mit steigender Konzentration von 0.00 bis 0.20 M. Die Produkt-Fractionen wurden mehrmals lyophilisiert und in Wasser gelöst, bis ein konstantes Produktgewicht erreicht war. Man gewann 150 mg (62%) eines flockigen, weissen Feststoffes.

$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$: 266.19 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , δ/ppm): 7.77 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 2H, H-4); 6.84 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 2H, H-5); 5.06 (d, $^3J_{\text{HP}} = 6.0$ Hz, 2H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O , δ/ppm): 197.8 (C_q , d, $^3J_{\text{CP}} = 7.7$ Hz, 1C, C-1); 162.1 (C_q , 1C, C-6); 131.0 (C_t , 2C, C-4); 126.4 (C_q , 1C, C-3); 115.9 (C_t , 2C, C-5); 67.2 (C_s , d, $^2J_{\text{CP}} = 4.2$ Hz, 1C, C-2).

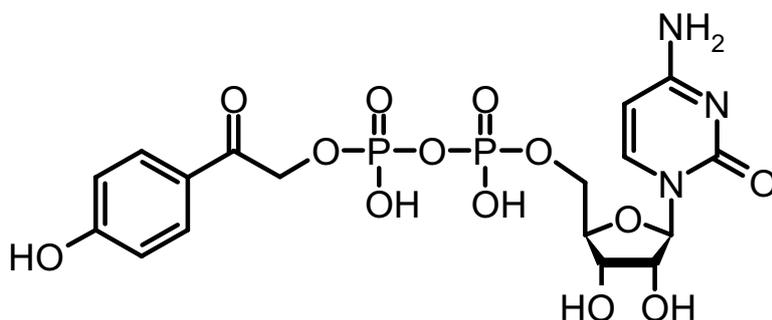
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O , δ/ppm): -0.1.

MS (FAB, m/z): Substanz nicht messbar.

Smp: Degradation über 176°C.

DC: Verbindung zu polar.

***p*-Hydroxyphenacyl-cytidin-5'-diphosphat (10)**



Ein 50 ml-Rundkolben wurde mit ca. 5 g P_2O_5 gefüllt und ein mit 1.00 g (3.09 mmol, 9.14 eq.) CMP gefülltes Probegläschen vorsichtig dazugegeben. Während einer Stunde wurde die Verbindung unter HV bei

50°C getrocknet. Danach wurde zweimal mit je 7 ml abs. DMF ko-evaporiert und anschliessend 5 ml abs. DMF sowie 760 μl (1.74 mmol, 5.16 eq.) Tri-*n*-octylamin zugegeben. Die Lösung wurde während 10 min bei 100°C verrührt. Man entfernte das Lösungsmittel am Rotavap und gab 1.00 g (6.17 mmol, 18.3 eq.) in 7 ml DMF gelöstes CDI hinzu. Die Lösung

wurde über Nacht bei RT gerührt. In der Zwischenzeit wurden 90 mg (338 μm , 1.00 eq.) Phosphat **19** zweimal in je 3 ml MeOH/EtOH (1:1) suspendiert, 81 μl (338 μm , 1.00 eq.) Tri-n-butylamin zugegeben und nach kurzem Rühren am Rotavap eingeeengt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 2 ml Pyridin und einmal mit 2 ml DMF koevaporiert. Die so getrocknete Verbindung wurde in 3 ml DMF gelöst und zur oben hergestellten CMP-Lösung gegeben, worauf sich sofort ein weisser Niederschlag bildete. Die Suspension wurde während 5 Tagen bei RT gerührt, wobei der Kolben mehrmals ins Ultraschallbad gehalten wurde.

Die hellgelbe Suspension wurde abfiltriert und der Feststoff in wenig Wasser gelöst. Für die folgender semipräparative RP-HPLC-Reinigung mit LiChrocart 250-10, RP-18e (10 μm) wurde folgendes Gradientenprogramm verwendet:

Tabelle 8: Gradientenprogramm für die HPLC-Reinigung der Zielverbindung **10**.

	A	B
0 min	100%	0%
30 min	94%	6%
40 min	0%	100%
45 min	0%	100%
50 min	100%	0%

Als A (Puffer) verwendete man 0.1 M TEAA, pH 7 und B war Acetonitril + 0.1% TFA. Der Fluss betrug konstant 8 ml/min. Das Produkt eluiert bei ca. 17-19 min. Das Rohprodukt konnte mit 11 RP-HPLC Runs in der gewünschten Reinheit isoliert werden. Nach Lyophilisierung der Fraktionen, gewann man 20 mg (11%) der Zielverbindung als weissen Feststoff.

C₁₇H₂₁N₃O₁₃P₂: 537.32 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, δ /ppm): 7.82 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, 1H, H-6''); 7.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, 1H, H-4); 6.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, 1H, H-5); 5.88 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, 1H, H-5''); 5.70 (d, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, 1H, H-1'); 5.18 (m, 2H, H-2); 4.30 (d, $^2J_{\text{HH}} = 11.5$ Hz, 1H, H_a-5'); 4.22-4.07 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' und H_b-5').

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, δ /ppm): 195.0 (C_q, 1C, C-1); 163.0 (C_q, 1C, C-4''); 161.6 (C_q, 1C, C-6); 153.6 (C_q, 1C, C-2''); 141.6 (C_t, 1C, C-6''); 130.5 (C_t, 2C, C-4); 125.6 (C_q, 1C, C-3); 115.5 (C_t, 2C, C-5); 95.8 (C_t, 1C, C-5''); 89.3 (C_t, 1C, C-1'); 82.2 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.4$ Hz, 1C, C-4'); 74.2 (C_t, 1C, C-2'); 68.5 (C_t, 1C, C-3'); 67.8 (C_s, 1C, C-2); 64.1 (C_s, 1C, C-5').

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O, δ /ppm): -14.6.

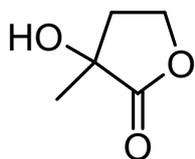
MS (MALDI-ToF, m/z): 537 (M+).

DC: Verbindung zu polar.

UV/Vis(H₂O, λ/nm): 286 nm (ε = 12'900 M⁻¹ cm⁻¹).

6.3 T*-Injektor

3-Hydroxy-3-methyl-dihydrofuran-2-on (34)



Man löste 13.13 g (150 mmol, 1.00 eq.) 4-Hydroxy-2-butanon (**33**) in 30 ml Wasser und gab 4.2 ml (15.0 mmol, 0.10 eq.) 39%ige NaHSO₃ hinzu.^[68] Die Lösung wurde in einem Eisbad auf 0°C gekühlt und innert 20 min 11.25 g (173 mmol, 1.15 eq.) Kaliumcyanid zugegeben. Man liess für 30 min bei RT rühren und tropfte danach äusserst vorsichtig 75 ml konz. HCl bei 0°C hinzu. Während des Zutropfens wurde darauf geachtet, dass die gerade zu Beginn sehr starke Gasentwicklung von Blausäure nicht zu heftig wurde. Man liess die Reaktion über Nacht rühen, wobei die Lösung allmählich RT erreichte. Die Lösung wurde anschliessend in einem flüssig-flüssig-Extraktor während 90 min mit Et₂O extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotavap abgezogen und das Rohprodukt in einer Destillation ausgereinigt. Man gewann 8.29 g (48%) einer farblosen Flüssigkeit.

C₅H₈O₃: 116.12 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 4.43 (ddd, ³J_{HH} = 9.1 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, 1H, H_a-1''); 4.24 (ddd, ³J_{HH} = 9.1 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, 1H, H_b-1''); 2.45 (m, 1H, H_a-2''); 2.26 (ddd, ³J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, 1H, H_b-2''); 2.92 (s, br, 1H, OH); 1.51 (s, 1H, C-3''-CH₃).

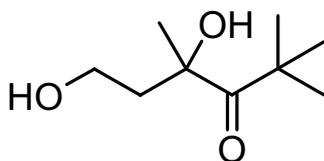
¹³C-NMR (102 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 179.5 (C_q, 1C, C-4''); 72.3 (C_q, 1C, C-3''); 65.3 (C_s, 1C, C-1''); 36.7 (C_s, 1C, C-2''); 22.9 (C_p, 1C, C-3''-CH₃).

MS (FAB, m/z): nicht messbar.

Smp: zwischen 4 und 20°C.

Sdp: 128-135°C (18 mbar).

4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on (35)



Man löste 3.38 g (29.1 mmol, 1.00 eq.) des Lactons **34** in 15 ml Et₂O und kühlte den Kolben auf -78°C. Es wurden 3.4 ml (5.19 mmol, 0.18 eq.) *tert.*-Butyllithium zugespritzt und danach mit einem Flüssigstickstoff/Methanol-Gemisch auf -100°C gekühlt.^[69] Man gab weitere 36.6 ml (55.9 mmol, 1.92 eq.) *tert.*-

Butyllithium hinzu, liess die Lösung wieder auf -78°C erwärmen und rührte für weitere 2 Stunden. Der Kolben wurde auf -40°C erwärmt und weitere 60 min gerührt. Danach gab man 30 ml Wasser hinzu und liess das Gemisch über Nacht bei RT rühren. Die beiden Phasen wurden in einem Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml Et_2O extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotavap und HV eingengt. Man isolierte 5.11 g (quant.) eines farblosen Öls.

Anmerkung: Das gewünschte Mono-Addukt war stets mit dem Bis-Addukt verunreinigt. Da jedoch das Bis-Addukt nach der folgenden Oxidation abgetrennt werden konnte, wurde eine Trennung mittels Kugelrohrdestillation auf dieser Stufe nur zu analytischen Zwecken durchgeführt.

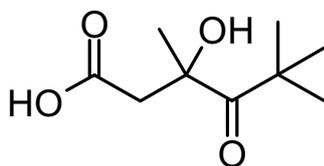
$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_3$: 174.24 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ/ppm): 5.14 (s, 1H, OH); 3.44 (m, 1H, $\text{H}_a\text{-1''}$); 3.32 (m, 1H, $\text{H}_b\text{-1''}$); 1.95 (m, 1H, $\text{H}_a\text{-2''}$); 1.59 (m, 1H, $\text{H}_b\text{-2''}$); 1.35 (s, 3H, H-7''); 1.18 (s, 9H, H-6'').

$^{13}\text{C-NMR}$ (102 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ/ppm): 218.7 (C_q , 1C- C-4''); 80.7 (C_q , 1C, C-3''); 57.3 (C_s , 1C, C-1''); 44.7 (C_q , 1C, C-5''); 44.0 (C_s , 1C, C-2''); 28.7 (C_p , 1C, C-7''); 26.6 (C_p , 3C, C-6'').

MS (FAB, m/z): 215 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 5); 57 (100).

(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (36)



In einem 500 ml-Rundkolben wurden 4.45 g (25.5 mmol, 1.00 eq.) Diol **35** in 90 ml Phosphatpuffer (670 mM, pH 6.8) und 120 ml Acetonitril gelöst, auf 35°C erwärmt und 327 mg (2.09 mmol, 0.08 eq.) TEMPO hinzugegeben.^[70] Mit einer Spritzenpumpe wurde innert 2 h parallel zwei Lösungen bestehend aus 5.44 g (80%ig, 60.1 mmol, 2.35 eq.) NaClO_2 in 24 ml Wasser sowie 276 μl NaClO (13%ige Lösung) in 12 ml Wasser zugetropft. Man liess über Nacht bei 35°C rühren. Für die Aufarbeitung wurde mit 1 M NaOH der pH auf 8 eingestellt und 0°C kalte Na_2SO_3 -Lösung (7.24 g in 100 ml Wasser) zugegeben, wobei die leichte Trübung aufklarte. Man liess 30 min bei RT rühren und überführte die Lösung in einen Scheidetrichter. Es wurde mit 100 ml Et_2O extrahiert und die wässrige Phase mit 1 M HCl auf pH 2 angesäuert. Man extrahiert die protonierte Säure dreimal mit je 100 ml Et_2O und wusch die organische Phase anschliessend mit 100 ml einer ges. NaCl -Lösung. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotavap abgezogen. Es konnten 1.25 g (26%) des gewünschten Produkts als farblose Flüssigkeit isoliert werden.

C₉H₁₆O₄: 188.23 g/mol

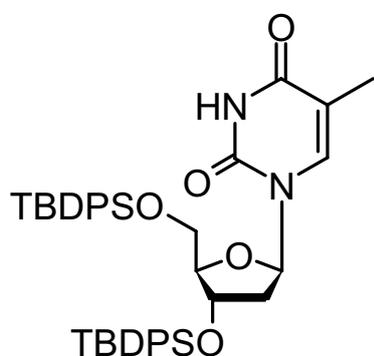
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 3.18 (d, ³J_{HH} = 16.9 Hz, 1H, H_a-2''); 2.57 (d, ³J_{HH} = 16.9 Hz, 1H, H_b-2''); 1.41 (s, 3H, H-7''); 1.30 (s, 9H, H-6'').

¹³C-NMR (102 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 218.0 (C_q, 1C, C-1''); 177.9 (C_q, 1C, C-4''); 80.1 (C_q, 1C, C-3''); 45.0 (C_q, 1C, C-5''); 44.6 (C_s, 1C, C-2''); 27.7 (C_p, 3C, C-6''); 26.6 (C_p, 1C, C-7'').

MS (FAB, m/z): nicht messbar.

DC: R_f = 0.11 (Hex/EE = 4:1).

3',5'-Di-O-(tert.-butyl-diphenylsilyl)-thymidin (58)



Man löste 2.00 g (8.26 mmol, 1.00 eq.) Thymidin in 30 ml abs. Pyridin und gabe 8.45 ml (33.0 mmol, 4.00 eq.) TBDPSCI, sowie 2.47 g (36.3 mmol, 4.40 eq.) Imidazol hinzu. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt, wobei sich nach wenigen Minuten ein weisser Niederschlag bildete. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel am Rotavap abgezogen, der Feststoff in CH₂Cl₂ gelöst und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über

MgSO₄ getrocknet und am Rotavap und HV eingengt. Das so erhaltende farblose Öl (11.9 g) wurden mit Hex/EE = 2:1 an Kieselgel chromatographiert. Man isolierte 6.05 g (quant.) des geschützten Thymidins als weissen Schaum.

C₄₂H₅₀N₂O₅Si₂: 719.05 g/mol

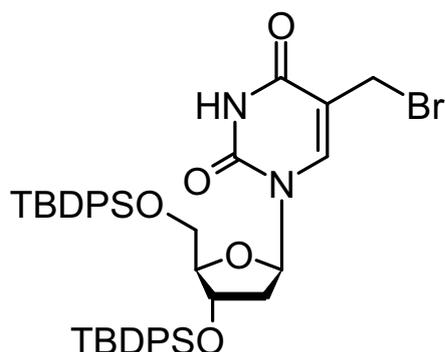
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.28 (s, 1H, NH); 7.64-7.28 (m, 21H, H-6 und H_{Ph}); 6.52 (dd, ³J_{HH} = 9.1 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 1H, H-1'); 4.55 (d, ³J_{HH} = 5.5 Hz, 1H, H-3'); 3.99 (d, ³J_{HH} = 1.5 Hz, 1H, H-4'); 3.74 (dd, ³J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H_a-5''); 3.29 (dd, ³J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H_b-5''); 2.33 (ddd, ³J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, ³J_{HH} = 1.2 Hz, 1H, H_a-2'); 1.92 (m, 1H, H_b-2'); 1.49 (d, ³J_{HH} = 1.0 Hz, 3H, H-7); 1.08 (s, 9H, ^tBu); 0.93 (s, 9H, ^tBu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 163.6 (C_q, 1C, C-4); 150.3 (C_q, 1C, C-2); 135.9, 135.8, 135.6, 135.5, 135.3, 133.3, 133.2, 133.1, 132.3, 130.2, 130.1 und 128.0 (24C, C_{ar}); 111.2 (C_q, 1C, C-5); 87.9 (C_t, 1C, C-4'); 84.9 (C_t, 1C, C-1'); 74.1 (C_t, 1C, C-3'); 64.1 (C_s, 1C, C-5'); 41.4 (C_s, 1C, C-2'); 27.0 (C_p, 6C, C-^tBu); 19.4 und 19.1 (C_t, 2C, C-^tBu); 12.0 (C_p, 1C, C-7).

MS (FAB, m/z): 757 ([M+K]⁺, 11); 719 (M⁺, 5); 405 (11); 197 (42); 135 (100).

Smp: 60.8 - 63.3°C.

DC: R_f = 0.19 (Hex/EE = 3:1).

3',5'-Di-O-(*tert.*-butyl-diphenylsilyl)- α -bromothymidin (38)

Es wurden 500 mg (695 μ mol, 1.00 eq.) des geschützten Thymidinderivat **58** in 25 ml CCl_4 gelöst und 161 mg (904 μ mol, 1.30 eq.) NBS zugegeben.^[71]

Man erhitzte die Lösung unter Rückfluss auf 90°C und bestrahlte mit einer 250 W-Lampe. Hinweis: Es zeigte sich, dass die Reaktion mit Chloroform als Lösungsmittel nur äusserst geringe Ausbeute lieferte.

Bereits nach wenigen Minuten setzte eine Braunfärbung der Lösung ein. Nach drei Stunden war die Reaktion beendet und man zog das Lösungsmittel am Rotavap ab. Der Rückstand wurde ohne vorherige Aufarbeitung an Kieselgel mit Hex/EE = 1:3 \rightarrow 1:2 als Eluent chromatographiert. Man erhielt 530 mg (96%) des Bromids **38** als hellbraunen Schaum.

C₄₂H₄₉BrN₂O₅Si₂: 797.95 g/mol

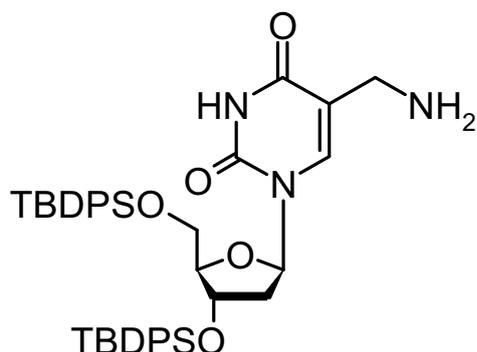
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 8.76 (s, 1H, NH); 7.77- 7.26 (m, 21H, H-6, H_{Ph}); 6.49 (dd, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, H-1'); 4.55 (d, ³J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, H-3'); 4.02 (s, 1H, H-4'); 3.76 (dd, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_a-5'); 3.33 (dd, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_b-5'); 2.41 (dd, ²J_{HH} = 13.1 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, H_a-2'); 1.96 (m, 1H, H_b-2'); 1.24 (s, 9H, ^tBu); 0.94 (s, 9H, ^tBu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 161.5 (C_q, 1C, C-4); 149.8 (C_q, 1C, C-2); 138.9 (C_t, 1C, C-6); 135.8, 135.7, 135.6, 135.2, 133.3, 133.2, 133.1, 132.0, 130.3, 130.2, 128.2, und 128.1 (24C, C_{Ph}); 112.1 (C_q, 1C, C-5); 88.2 (C_t, 1C, C-4'); 85.4 (C_t, 1C, C-1'); 74.1 (C_t, 1C, C-3'); 64.1 (C_s, 1C, C-5'); 41.9 (C_s, 1C, C-2'); 27.1 und 27.0 (C_p, 6C, ^tBu); 24.8 (C_s, 1C, CH₂-Br); 19.5 und 19.1 (C_q, 2C, ^tBu).

MS (FAB, m/z): 797 und 799 ([M+H]⁺, 3.18 und 3.55, dies entspricht dem erwarteten Isotopenmuster eines Monobromids); 307 (18); 169 (25); 197 (37); 135 (100).

Smp: 70.5 - 74.1°C.

DC: R_f = 0.28 (Hex/EE = 3:1).

3',5'-Di-O-(tert.-butyl-diphenylsilyl)- α -aminothymidin (39)


In einem 250 ml-Schlenkkolben wurden 1.41 g (1.77 mmol, 1.00 eq.) Bromid **38** in 25 ml abs. DMF gelöst und 1.51 ml (8.84 mmol, 5.00 eq.) N-Ethyl-diisopropylamin zugegeben. Man kühlte die hellgelbe Lösung in einem Eisbad auf 0°C, liess während 10 min gasförmiges Ammoniak durchblubbern und verschloss anschliessend den Kolben mit einem Stopfen. Die Lösung wurde während 5 h gerührt, wobei sich die Lösung langsam auf RT erwärmte. Es wurde darauf nochmals bei 0°C 10 min Ammoniak durchgeblasen und über Nacht gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung am Rotavap bei 55°C Wassertemperatur eingeeengt und der dunkelbraune Rückstand mit CH₂Cl₂/MeOH = 10:1 als Eluent an Kieselgel gereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden eingeeengt und zweimal mit wenigen Milliliter Chloroform koevaporiert. Man erhielt 661 mg (51%) eines off-white-Schaumes.

C₄₂H₅₁N₃O₅Si₂: 734.06 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 7.65-7.27 (m, 21H, H-6 und H_{Ph}); 6.52 (dd, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 1H, H-1'); 4.55 (d, ³J_{HH} = 5.6 Hz, 1H, H-3'); 4.02 (d, ³J_{HH} = 1.5 Hz, 1H, H-4'); 3.75 (dd, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, H_a-5'); 3.33 (dd, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, H_b-5'); 3.04 (d, ³J_{HH} = 2.8 Hz, 2H, H-7); 2.35 (dd, ²J_{HH} = 12.4 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, 1H, H_a-2'); 1.98 (m, 1H, H_b-2'); 1.09 und 0.93 (s, 18H, ^tBu).

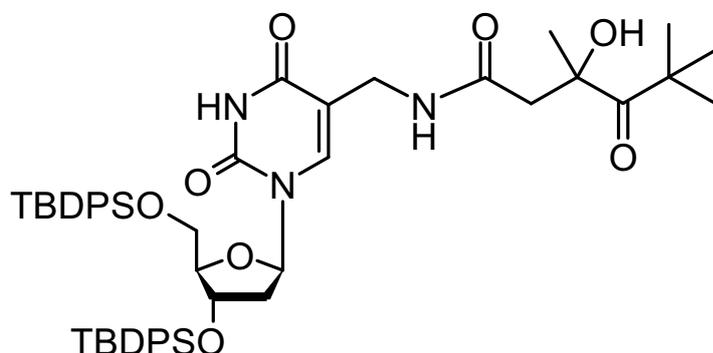
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 163.5 (C_q, 1C, C-4); 150.4 (C_q, 1C, C-2); 135.8, 135.5, 135.2, 130.2, 130.1 und 128.0 (20C, C_{Ph}); 132.3 (C_t, 1C, C-6); 116.3 (C_q, 1C, C-5); 87.9 (C_t, 1C, C-4'); 85.0 (C_t, 1C, C-1'); 74.1 (C_t, 1C, C-3'); 64.1 (C_s, 1C, C-5'); 41.4 (C_s, 1C, C-2'); 39.0 (C_s, 1C, C-7); 27.0 (C_p, 6C, ^tBu); 19.4 und 19.1 (C_q, 2C, ^tBu).

MS (FAB, m/z): 734 ([M+H]⁺, 14); 169 (21); 197 (32); 135 (100).

Smp: 67.4 - 69.6°C.

DC: R_f = 0.28 (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1).

3',5'-Di-O-(*tert.*-butyl-diphenylsilyl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (40)



Man löste 3.00 g (4.09 mmol, 1.00 eq.) Amin **39** und 1.00 g (5.31 mmol, 1.30 eq.) Carbon-säure **36** in 100 ml abs. DMF und gab 1.02 g (5.31 mmol, 1.30 eq.) EDC, sowie 717 mg (5.31 mmol, 1.30 eq.) HOBT dazu. Die Lösung wurde in einem Eisbad auf 0°C

gekühlt und 569 μ l Triethylamin zugegeben. Man liess die Reaktion über Nacht rühren, wobei allmählich RT erreicht wurde. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel am Rotavap abgezogen und das hellbraune, dickflüssige Öl mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10:1$ über Kieselgel filtriert. Sämtliche produktenthaltenden Fraktionen wurden aufkonzentriert und mit Hex/EE = 1:2 \rightarrow 1:1 an Kieselgel gereinigt. Man isolierte 2.33 g (63%) eines weissen Schaumes.

C₅₁H₆₅N₃O₈Si₂: 904.27 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 8.55 und 8.39 (s, br, je 1H, NH_a und NH_b); 7.62 - 7.25 (m, 21H, H-6 und H_{Ph}); 6.37 (m, 1H, H-1'); 4.46 (dd, ³J_{HH} = 12.4 Hz, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 1H, H-3'); 4.02 (m, 1H, H-4'); 3.72 - 3.61 (m, 3H, H_a-5' und H-7); 3.32 (dd, ³J_{HH} = 11.6 Hz, ³J_{HH} = 3.5 Hz, 1H, H_b-5'); 2.73 (d, ²J_{HH} = 14.9 Hz, 1H, H_a-2''); 2.36 (m, 1H, H_a-2'); 2.15 (dd, ²J_{HH} = 14.9 Hz, ³J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, H_b-2''); 1.92 (m, 1H, H_b-2''); 1.21 (d, ³J_{HH} = 4.6 Hz, 3H, H-7''); 1.12 (s, 9H, H-6''); 1.07 (s, 9H, ^tBu); 0.93 (s, 9H, ^tBu).

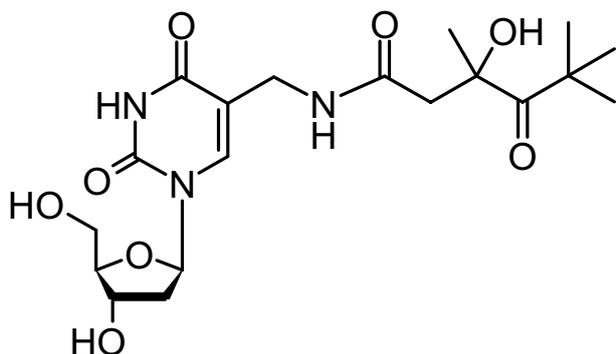
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 219.4 (C_q, 1C, C-4''); 172.7 und 172.6 (C_q, 1C, C-1''); 164.1 (C_q, 1C, C-4); 150.4 (C_q, 1C, C-2); 138.8 (C_t, 1C, C-6); 135.9, 135.6, 130.1 und 128.0 (24C, C_{ar}); 111.0 (C_q, 1C, C-5); 88.2 (C_t, 1C, C-4'); 85.9 und 85.8 (C_t, 1C, C-1'); 81.2 (C_s, 1C, C-3''); 74.1 und 74.0 (C_t, 1C, C-2''); 64.2 und 64.1 (C_s, 1C, C-5'); 45.1 (C_q, 1C, C-5''); 41.3 (C_s, 1C, C-2'); 36.4 (C_s, 1C, C-7); 27.4 (C_p, 3C, C-6''); 27.0 (C_p, 6C, ^tBu); 19.6 und 19.2 (C_q, 2C, ^tBu).

MS (FAB, m/z): 942 ([M+K]⁺, 4); 904 ([M+H]⁺, 5); 818 (3); 312 (100).

Smp: 77.0 - 79.5°C.

DC: R_f = 0.77 resp. 0.73 (Diastereomere A und B, Hex/EE = 2:1).

α -[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (59**)**



In einem 25 ml-Rundkolben wurden 1.00 g (1.11 mmol, 1.00 eq.) **40** in 13 ml trockenem THF gelöst und 2.91 ml (2.89 mmol, 2.60 eq.) 1 M in THF gelöstes TBAF zugegeben. Die gelbliche Lösung wurde 3 h bei RT gerührt, bis die Reaktion beendet war. Das Lösungsmittel wurde anschliessend bei 25°C am Rotavap entfernt und das Rohprodukt

am HV für 1 h aufkonzentriert. Das 2.05 g hellbraune Öl wurde mit CH₂Cl₂/MeOH = 20:1 an Kieselgel gereinigt. Es konnten 274 mg (58%) eines hellbraunen Schaums gewonnen werden.

C₁₉**H**₂₉**N**₃**O**₈: 427.46 g/mol

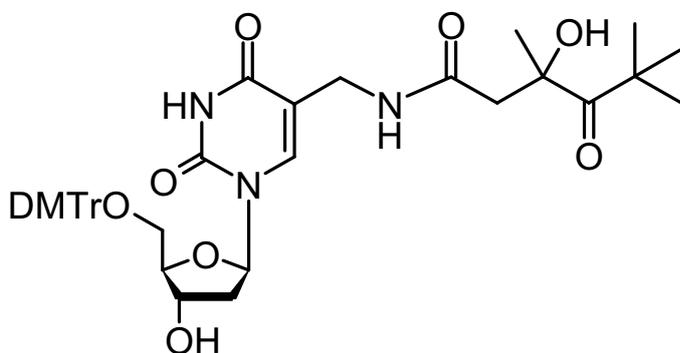
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄, δ /ppm): 7.91 und 7.88 (2s, 1H, H-6 Diastereomere A und B); 6.26 (m, 1H, H-1'); 4.39 (m, 1H, H-3'); 4.00 (m, 2H, H-7); 3.91 (m, 1H, H-4'); 3.76 (m, 2H, H-5'); 2.88 (dd, ²J_{HH} = 14.6 Hz, ³J_{HH} = 2.3 Hz, 1H, H_a-2''); 2.25 (dd, ²J_{HH} = 14.6 Hz, ³J_{HH} = 2.3 Hz, 1H, H_b-2''); 2.24 (m, 2H, H-2'); 1.32 (2s, 3H, H-7'' Diastereomere A und B); 1.25 (s, 9H, H-6'').

¹³C-NMR (101 MHz, MeOH-*d*₄, δ /ppm): 220.0 und 219.9 (C_q, 1C, C-1''); 174.0 (C_q, 1C, C-4''); 165.2 (C_q, 1C, C-4); 152.2 (C_q, 1C, C-2); 140.1 und 139.9 (C_t, 1C, C-6); 112.1 und 112.0 (C_q, 1C, C-5); 89.0 (C_t, 1C, C-4'); 86.5 (C_t, 1C, C-1'); 81.9 (C_q, 1C, C-3''); 72.4 und 72.3 (C_t, 1C, C-3'); 63.0 und 62.9 (C_s, 1C, C-5'); 47.0 und 46.9 (C_s, 1C, C-2''); 46.0 (C_p, 1C, C-5''); 41.3 und 41.2 (C_s, 1C, C-2'); 36.8 und 36.7 (C_s, 1C, C-7); 27.9 (C_p, 1C, C-7''); 27.8 und 27.7 (C_p, 3C, C-6'').

MS (FAB, *m/z*): 428 ([M+H]⁺, 11); 391 (22); 242 (100).

DC: R_f = 0.15 resp. 0.18 (Diastereomere A und B, CH₂CH₂/MeOH = 10:1).

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (60)



Um letzte Feuchtigkeitsreste zu entfernen wurden 35 mg (81.9 μ mol, 1.00 eq.) **59** einmal mit 4 ml abs. Pyridin am Rotavap bei 32°C koevaporiert und für 20 min am HV getrocknet. Man löste den Rückstand in 2 ml abs. Pyridin und gab 56 mg (164 μ mol, 2.00 eq.)

4,4'-Dimethoxytrityl-chlorid sowie 38 mg (124 μ mol, 1.50 eq.) Tetrabutyl-ammoniumnitrat dazu. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Obwohl die Reaktion noch nicht vollständig umgesetzt hatte, wurde auf eine weitere Zugabe von 4,4'-Dimethoxytrityl-chlorid verzichtet, um eine Kupplung an 3'-Position zu vermeiden. Die Reaktion wurde mit 1.5 ml MeOH gequenchet und die Lösungsmittel am Rotavap bei 32°C abgezogen. Der Rückstand wurde über Nacht am HV aufkonzentriert. Das Rohprodukt wurde in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst und zweimal mit je 20 ml einer ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel bei 32°C am Rotavap abgezogen. Man erhielt 85 mg eines gelben Öls. Dies chromatographierte man mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10:1$ an Kieselgel und isolierte 23 mg (39%) einer farblosen Flüssigkeit.

$\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 729.83 g/mol

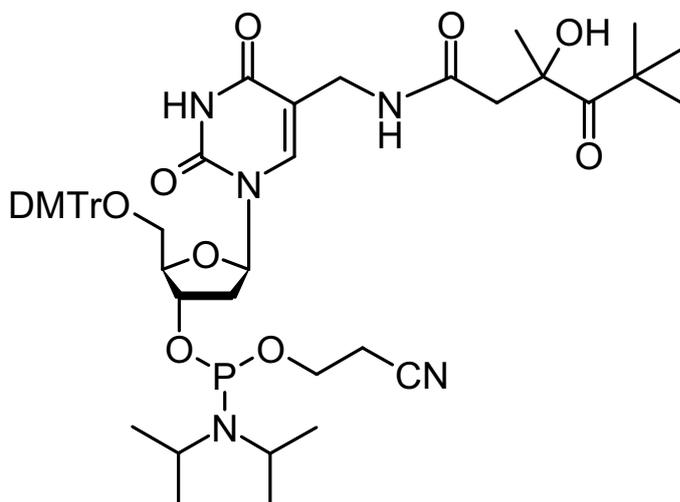
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ/ppm): 7.74 und 7.72 (2s, Diastereomere A und B, 1H, H-6); 7.44-6.85 (m, 13H, H_{ar}); 6.25 (m, 1H, H-1'); 4.44 (m, 1H, H-3'); 3.99 (m, 1H, H-4'); 3.78 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-O-}$); 3.69-3.60 (m, 2H, H-7); 3.36 (m, 2H, H-5'); 2.72 (d, $^2J_{\text{HH}} = 14.8$ Hz, Diastereomere A und B, $\text{H}_{\text{a-2'}}$); 2.30 (m, 2H, H-2'); 2.18 (d, $^2J_{\text{HH}} = 14.8$ Hz, Diastereomer A, 0.5H, $\text{H}_{\text{b-2'}}$); 2.19 (d, $^2J_{\text{HH}} = 14.8$ Hz, Diastereomer B, 0.5H, $\text{H}_{\text{b-2'}}$); 1.27 (s, 3H, H-7''); 1.22 (s, 9H, H-6'').

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, δ/ppm): 220.0 und 219.9 (C_{q} , 1C, C-4''); 173.9 und 173.8 (C_{q} , 1C, C-1''); 165.0 (C_{q} , 1C, C-4); 160.1 (C_{q} , 1C, C_{ar}); 152.0 (C_{q} , 1C, C-2); 146.1 (C_{q} , 1C, C_{ar}); 140.5 und 140.3 (C_{t} , 1C, C-6); 136.8, 131.3, 129.3, 128.8, 127.9 und 114.2 (17C, C_{ar}); 111.8 und 111.7 (C_{q} , 1C, C-5); 87.8 (C_{q} , 1C, C-5'-O-CR₃); 86.6 (C_{t} , 1C, C-1'); 82.0 und 81.9 (C_{q} , 1C, C-3'') 72.4 und 72.3 (C_{t} , 1C, C-3'); 64.9 (C_{s} , 1C, C-5'); 55.7 (C_{p} , 2C, $\text{CH}_3\text{-O-}$); 48.4 (C_{a} , 1C, C-2''); 48.0 (C_{q} , 1C, C-5''); 41.2 (C_{s} , 1C, C-2'); 37.0 und 36.9 (C_{s} , 1C, C-7); 27.9 und 27.8 (C_{p} , 1C, C-7''); 27.8 und 27.7 (C_{p} , 3C, C-6'').

MS (FAB, m/z): 768 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 8); 303 (100).

DC: $R_f = 0.48$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2/\text{MeOH} = 10:1$).

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- α -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-(*R,S*)-phosphoramidit (41)



Man koevaporierte 82 mg Nukleosid **40** dreimal mit je 3 ml abs., entgastem Acetonitril und trocknete den Rückstand über Nacht am HV. Es wurden 3 ml abs., entgastem CH_2Cl_2 , Hünigbase sowie 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 2 ml entgastem MeOH gequencht und die Lösung in 20 ml entgastem CH_2Cl_2

aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 20 ml ges., entgaster NaHCO_3 -Lösung und mit 20 ml entgastem Wasser gewaschen. Man trocknete die organische Phase über MgSO_4 und destillierte das Lösungsmittel am Rotavap bei 30°C ab. Die so erhaltene gelbliche Flüssigkeit wurde mit Hex/EE/ $\text{NEt}_3 = 1:1:0.02$ an Kieselgel gereinigt und isolierte 64 mg (61%) eines hellbraunen Schaums.

$\text{C}_{49}\text{H}_{64}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$: 930.06 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.64 (s, 1H, NH); 7.41 (m, 2H, H_{ar}); 7.34-7.21 (m, 7H, H_{ar}); 6.83 (m, 4H, H_{ar}); 6.27 (m, 1H, H-1'); 4.59 (m, 1H, H-3'); 4.11 (m, 1H, H-4'); 3.78 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{O-}$); 3.82-2.28 (m, 8H, H-7, H-5', $\text{N}[\text{CH}(\text{CH}_3)]_2$, $-\text{POCH}_2-$); 2.70-2.60 (m, 3H, $\text{H}_{\text{a-2''}}$, $-\text{CH}_2\text{CN}$); 2.53 (m, 1H, $\text{H}_{\text{a-2''}}$); 2.28 (m, 1H, $\text{H}_{\text{b-2''}}$); 2.12 (m, 1H, $\text{H}_{\text{b-2''}}$); 1.30-1.23 (m, 24H, $\text{N}[\text{CH}(\text{CH}_3)]_2$, H-6'', H-7'').

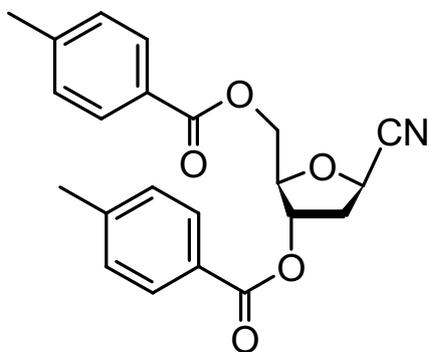
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 219.5 (C_{q} , 1C, C-4''); 173.4 (C_{q} , 1C, C-1''); 159.1 (C_{q} , 1C, C-4); 136.1 (C_{t} , 1C, C-6); 130.6, 128.6, 128.4, 128.1 und 127.5 (18C, C_{ar}); 113.5 (C_{q} , 1C, CN); 111.3 (C_{q} , 1C, C-3''); 78.0 (C_{t} , 1C, C-3'); 65.1 (C_{s} , 1C, C-5'); 58.6 (C_{s} , 1C, $-\text{POCH}_2-$); 51.6 (C_{p} , 2C, $\text{CH}_3\text{O-}$); 46.2 (C_{s} , 1C, C-2''); 45.8 (C_{q} , 1C, C-5''); 43.6 (C_{s} , 1C, C-2'); 37.1 (C_{s} , 1C, C-7); 27.7 (C_{p} , 3C, C-6''); 24.1 (C_{p} , 1C, C-7''); 23.3 (C_{p} , 4C, $\text{N}[\text{CH}(\text{CH}_3)]_2$); 20.5 (C_{s} , 1C, $-\text{CH}_2\text{CN}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 145.8 und 145.7 (Diastereomere A und B).

DC: $R_f = 0.29$ resp. 0.23 (Diastereomere A und B, $\text{CH}_2\text{CH}_2/\text{MeOH} = 20:1$).

6.4 Porphyrin-Detektor

1'-(α)-Cyano-3',5'-di-O-(*p*-toluoyl)-2'-deoxy-D-ribose (**44**)^[72]



In einem ausgeheizten Kolben wurden 10.36 g (26.6 mmol, 1.00 eq.) 1'-(α)-Chloro-3',5'-di-O-(*p*-toluoyl)-2'-deoxy-D-ribose (**43**), 3.91 ml (29.3 mmol, 1.10 eq.) Trimethylsilycyanid und 335 μ l (2.66 mmol, 0.10 eq.) Bortrifluorid-ethyletherat bei 0°C in 150 ml CH₂Cl₂ abs. suspendiert und über Nacht rühren gelassen, wobei die Temperatur allmählich RT erreichte. Man gab 20 ml Wasser hinzu und extrahierte zweimal die wässrige Phase mit je ca. 40 ml CH₂Cl₂.

Die organische Phasen wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotavap das Lösungsmittel abgezogen. Man isolierte 25.3 g Rohprodukt als braunes, viskoses Öl. Um die beiden entstandenen Diastereomere zu trennen, wurde die Substanz an Kieselgel mit Hex/EE als Eluent (4:1 - 2:1) gereinigt. Die Mischfraktionen wurden dabei zusammengesüttet und nochmals chromatographiert, so dass insgesamt drei Säulenchromatographien durchgeführt wurden. Man gewann 4.06 g (40%) α -Produkt als weissen Feststoff.

C₂₂H₂₁NO₅: 379.42 g/mol

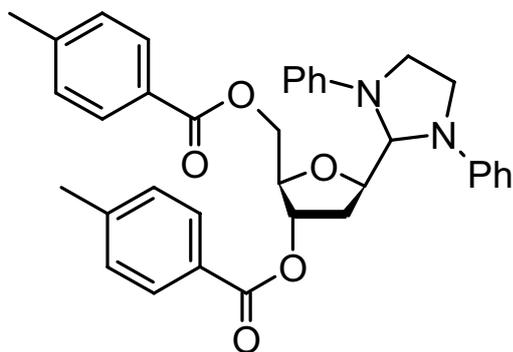
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 7.97 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, H_a-Tol_{ortho}); 7.89 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, H_b-Tol_{ortho}); 7.27 (d, ³J_{HH} = 3.8 Hz, 2H, H_a-Tol_{meta}); 7.24 (d, ³J_{HH} = 3.8 Hz, 2H, H_b-Tol_{meta}); 5.60 (m, 1H, H-4'); 4.92 (dd, ³J_{HH} = 8.9 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1C, H-1'); 4.63-4.48 (m, 3H, H-5' und H-3'); 2.75 (ddd, ²J_{HH} = 9.4 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, ³J_{HH} = 2.1 Hz, 1H, H_a-2'); 2.64 (ddd, ³J_{HH} = 13.9 Hz, ²J_{HH} = 9.4 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1H, H_b-2'); 2.42 (d, ⁴J_{HH} = 3.3 Hz, 6H, H_{Tol}).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 166.3 (C_q, 1C, C_a-Tol_{Carbonyl}); 165.9 (C_q, 1C, C_b-Tol_{Carbonyl}); 144.7 (C_q, 1C, C_a-Tol_{para}); 144.3 (C_q, 1C, C_b-Tol_{para}); 129.9 (C_t, 2C, C_a-Tol_{ortho}); 129.9 (C_t, 2C, C_b-Tol_{ortho}); 129.4 (C_t, 2C, C_a-Tol_{meta}); 129.4 (C_t, 2C, C_b-Tol_{meta}); 126.8 (C_q, 1C, C_a-Tol_{ipso}); 126.4 (C_q, 1C, C_b-Tol_{ipso}); 118.0 (C_q, 1C, C_{Cyanid}); 84.0 (C_t, 1C, C-4'); 75.5 (C_t, 1C, C-3'); 66.0 (C_s, 1C, C-5'); 63.9 (C_t, 1C, C-1'); 38.0 (C_s, 1C, C-2'); 21.9 (C_p, 1C, C_a-Tol_{Me}); 21.9 (C_p, 1C, C_a-Tol_{Me}).

MS (FAB, m/z): 380 ([M+H]⁺, 42); 119 (100).

Smp: 113.6 - 114.5°C.

DC: R_f = 0.65 (Hex/EE = 2:1).

1'-(α)-N,N'-Diphenylimidazolin-3',5'-di-O-(*p*-toluoyl)-2'-deoxy-D-ribose (46**)^[72]**


In einem 500 ml-Rundkolben wurden 2.41 g (6.35 mmol, 1.00 eq.) Cyanid **44** in 25 ml Essigsäure verrührt. Man gab 2.70 g (12.7 mmol, 2.00 eq.) N,N'-Diphenylethylendiamin (**45**) und 6.73 g Natriumhypophosphit (63.5 mmol, 10.0 eq.) hinzu und verdünnte die Lösung mit 50 ml Pyridin und 25 ml Wasser. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 gehäufte Spatel Raney-Nickel (suspendiert in Wasser) gestartet.

Der Verlauf der Reaktion konnte durch einen aufgesetzten Blasenähler mitverfolgt werden. Nach 2 h wurde die schwarze Suspension über Celite filtriert und dreimal mit je ca. 70 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotavap abgezogen und das Rohprodukt am HV aufkonzentriert. Die erhaltenen 5.99 g Rohprodukt wurden an Kieselgel mit Toluol/Aceton = 100:4 chromatographiert, wobei man 3.57 g (97%) eines leicht bräunliches, dickflüssiges Öl isolierte.

C₃₆H₃₆N₂O₅: 576.70 g/mol

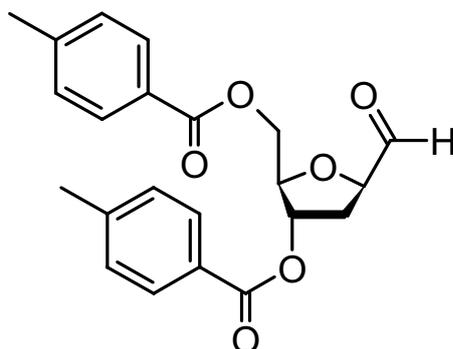
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 7.86 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, H_aTol_{ortho}); 7.81 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, H_bTol_{ortho}); 7.23-7.13 (m, 8H, H-Tol_{meta}, H_{Ph}); 6.84-6.64 (m, 6H, H_{Ph}); 5.65 (dd, ³J_{HH} = 11.9 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H-4'); 5.39 (d, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1H, PhN-CH_R-NPh); 4.72 (ddd, ³J_{HH} = 10.6 Hz, ³J_{HH} = 4.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H-1'); 4.43-4.23 (m, 3H, H-3' und H-5'); 3.78-3.53 (m, 4H, PhN-CH₂-CH₂-NPh); 2.40 (s, 3H, H_a-Tol_{Me}); 2.39 (s, 3H, H_b-Tol_{Me}); 2.35-2.24 (m, 1H, H_a-2'); 2.14 (dd, ³J_{HH} = 12.9 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 2H, H-2').

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 166.4 (C_q, 1C, C_a-Tol_{Carbonyl}); 166.3 (C_q, 1C, C_a-Tol_{Carbonyl}); 146.8 (C_q, 1C, C_a-Ph_{ipso}); 146.7 (C_q, 1C, C_b-Ph_{ipso}); 144.2 (C_q, 1C, C_a-Tol_{para}); 143.7 (C_q, 1C, C_b-Tol_{para}); 129.8 (C_t, 2C, C_a-Tol_{ortho}); 129.8 (C_t, 2C, C_b-Tol_{ortho}); 129.2 (C_t, 2C, C_a-Tol_{meta}); 129.2 (C_t, 2C, C_b-Tol_{meta}); 127.2 (C_q, 1C, C_a-Tol_{ipso}); 127.0 (C_q, 1C, C_b-Tol_{ipso}); 117.9 (C_q, 1C, C_a-Ph_{para}); 117.8 (C_q, 1C, C_b-Ph_{para}); 113.7 (C_t, 4C, Ph_{ortho} oder Ph_{meta}); 113.1 (C_t, 4C, Ph_{meta} oder Ph_{ortho}); 82.3 (C_t, 1C, C-4'); 80.9 (C_t, 1C, PhN-CH_R-NPh); 74.7 (C_t, 1C, C-3'); 64.8 (C_s, 1C, C-5'); 47.1 (C_s, 1C, PhN-CH₂-CH₂-NPh); 46.8 (C_s, 1C, PhN-CH₂-CH₂-NPh); 34.1 (C_s, 1C, C-2'); 21.8 (C_p, 2C, C-Tol_{Me}).

MS (ESI, m/z): 576 (M⁺, 0.8); 223 (100); 119 (10).

Smp: Substanz wurde als Flüssigkeit isoliert.

DC: R_f = 0.28 (Hex/EE = 4:1).

3',5'-Di-O-(*p*-toluoyl)-(4*S*,5*R*)-tetrahydro-2-furancarbaldehyd (47)^[72]


In einem mit Alufolie umwickelten 250 ml-Rundkolben wurden 7.00 g (12.1 mmol, 1.00 eq.) Imidazolderivat **46** in 200 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. Man gab über einen Zeitraum von 4 h solange in abs. Aceton gelöstes *p*TsOH hinzu, bis ein pH < 1 gemessen wurde (ca. 8 g (42 mmol, 3.5 eq.) in 35 ml Aceton, Menge variierte jedoch von Ansatz zu Ansatz). Innert wenigen Sekunden fiel ein weisser Feststoff aus.

Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Suspension abgenutscht, den Feststoff mehrmals mit CH₂Cl₂ gewaschen und die Mutterlauge am Rotavap bei 25°C Wassertemperatur eingengt. Man isolierte 3.75 g (81%) eines violetten Feststoffes, welcher ohne weitere Reinigung für die folgende Reaktion eingesetzt wurde. Eine Chromatographie mit Hex/EE = 3:1 wurde nur für die Charakterisierung durchgeführt. Bis zu weiteren Verwendung wurde das Produkt bei -20°C aufbewahrt.

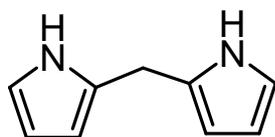
C₂₂H₂₂O₆: 382.42 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.71 (s, 1H, H_{Aldehyd}); 7.91 (dd, ³J_{HH} = 6.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz; 4H, H-Tol_{ortho}); 7.25 (m, 4H, H-Tol_{meta}); 5.54 (d, ³J_{HH} = 6.1 Hz, 1H, H-1'); 4.56 (m, 4H, H-3', H-4', H-5'); 2.43 (s, 3H, H_a-Tol_{Me}); 2.42 (s, 3H, H_b-Tol_{Me}); 2.36 (m, 2H, H-2').

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 200.8 (C_t, 1C, C_{Aldehyd}); 166.0 (C_q, 1C, C_a-Tol_{Carbonyl}); 165.8 (C_q, 1C, C_b-Tol_{Carbonyl}); 144.2 (C_q, 1C, C_a-Ph_{ipso}); 143.9 (C_q, 1C, C_b-Ph_{ipso}); 129.6 (C_t, 2C, C_a-Tol_{ortho}); 129.5 (C_t, 2C, C_b-Tol_{ortho}); 129.1 (C_t, 2C, C-Tol_{meta}); 126.6 (C_q, 1C, C_a-Ph_{para}); 126.5 (C_q, 1C, C_b-Ph_{para}); 83.6 (C_t, 1C, C-4'); 82.7 (C_t, 1C, C-1'); 75.8 (C_t, 1C, C-3'); 64.2 (C_s, 1C, C-5'); 34.0 (C_s, 1C, C-2'); 21.6 (C_p, 1C, C_a-Tol_{Me}); 21.5 (C_p, 1C, C_a-Tol_{Me}).

MS (FAB, m/z): 383 ([M+H]⁺, 9); 125 (27); 119 (100).

DC: R_f = 0.06 (Hex/EE = 3:1).

Dipyrromethan (48)


In einer Destillationsapparatur wurden 200 ml Pyrrol bei einer Öltemperatur von 160°C bei Normaldruck destilliert. Danach löste man in einem mit Alufolie umwickelten 1 l-Rundkolben 2.17 g (72.3 mmol, 1.00 eq.) Formaldehyd in 150 ml (2.17 mol, 30 eq.)

Pyrrol und gab 250 ml Essigsäure sowie 80 ml trockenes MeOH dazu. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Für die folgende Aufreinigung wurde die schwarze Lösung in einen 2 l-Scheidetrichter gefüllt und mit 400 ml CH₂Cl₂ verdünnt. Man schüttelte die Lösung einmal mit 300 ml Wasser, zweimal mit je 300 ml 1 M KOH und zuletzt zweimal mit je 300 ml Wasser aus. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotavap eingengt. Dabei konnte 70 ml Pyrrol zurückgewonnen werden. Das schwarze, dünnflüssige Öl wurde über Nacht am HV getrocknet. Man chromatographierte die 9.0 g Rohprodukt an Kieselgel mit CH₂Cl₂/NEt₃ = 100:1 als Eluent. Man konnte 4.89 g (103%) eines braunen, klebrigen Feststoffes isolieren.

C₉H₁₀N₂: 146.19 g/mol

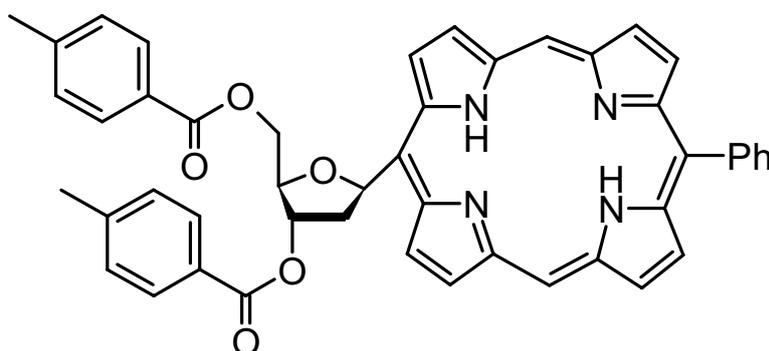
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.83 (s, br, 2H, NH); 6.65 (dd, ³J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_a-5); 6.64 (dd, ³J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_b-5); 6.15 (dd, ³J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_a-4); 6.13 (dd, ³J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_b-4); 6.03 (dd, ³J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_a-3); 6.03 (dd, ³J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H_b-3); 3.97 (s, 2H, H-6).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 129.2 (C_q, 2C, C-2); 117.4 (C_t, 2C, C-5); 108.5 (C_t, 2C, C-4); 106.5 (C_t, 2C, C-3); 26.5 (C_s, 1C, C-6).

MS (EI, m/z): 146 (M⁺, 100); 118 (13); 80 (37); 67 (20).

DC: R_f = 0.49 (CH₂Cl₂/NEt₃ = 100:1, Nachweis mit Br₂-Dampf).

1',2'-Dideoxy-1'-(5-(15-phenyl)porphyrinyl)-3',5'-di-O-toluoyl-β-D-ribofuranose (**50**)^[60]



In einem ausgeheizten, mit Alufolie umwickelten 250 ml-Rundkolben wurden 398 mg (1.04 mmol, 1.00 eq.) Aldehyds **47** in 100 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. Man gab 304 mg (2.08 mmol, 2.00 eq.) Dipyromethan (**48**) sowie 106 µl (1.04 mmol,

1.00 eq.) Benzyldehyd (**49**) hinzu und säuerte die Lösung mit 40 µl (520 µmol, 0.50 eq.) TFA an. Die Reaktion wurde unter vollständigem Lichtausschluss während 4 h bei RT gerührt. Die dunkelrote Lösung wurde mit 85 mg (1.04 mmol, 1.00 eq.) AcONa neutralisiert und man gab

768 mg (3.12 mmol, 3.00 eq.) *p*-Chloranil hinzu, worauf sich die Lösung sofort schwarz verfärbte. Man liess die Reaktion über Nacht bei RT rühren.

Um den schmierig-klebrigen Feststoff abzutrennen, wurde die Substanz in mehrere 50 ml-Falcongefässe abgefüllt und während 20 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und der abgesetzte Niederschlag mit insgesamt 100 ml CH₂Cl₂ aufgeschlämmt und nochmals zentrifugiert. Sämtliche Überstände wurden im Rotavap bei 20°C eingengt. Man reinigte das Rohprodukt an Kieselgel in einer grosszügig dimensionierten Säule mit CH₂Cl₂ + 0 bis 2% Acetonitril als Eluent. Sämtliche produktenthaltenden Fraktionen wurden eingengt und nochmals chromatographiert. Man isolierte 135 mg (17%) eines roten Feststoffes.

C₄₇H₃₈N₄O₅: 738.85 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.28 (s, 1H, H-Porph_{meso}); 10.02 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H, H_a-Porph_β); 9.36 (d, ³J_{HH} = 4.5 Hz, 2H, H_b-Porph_β); 9.31 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H, H_c-Porph_β); 9.07 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H, H_d-Porph_β); 8.33 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, H-Tol_{ortho}); 8.25 (m, 2H, H-Ph_{meta}); 8.21 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, H-Tol_{meta}); 7.87 (dd, ³J_{HH} = 11.1 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, H-1'); 7.80 (m, 3H, H-Ph_{ortho} und H-Ph_{para}); 6.19 (ddd, ³J_{HH} = 6.3 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, 1H, H-3'); 5.29 (m, 2H, H-5'); 5.11 (m, 1H, H-4'); 3.61 (m, 1H, H_a-2'); 3.33 (ddd, ³J_{HH} = 13.6, ³J_{HH} = 4.8, ³J_{HH} = 4.8, 1H, H_b-2'); 2.53 (s, 3H, H-Tol_{Me}); 2.52 (s, 3H, H-Tol_{Me}); -2.95 (s, br, 2H, NH_{Porph}).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 166.9 (C_q, 2C, C_a-Tol_{Carbonyl}); 166.7 (C_q, 2C, C_a-Tol_{Carbonyl}); 147.1 (C_q, 2C, C_{Porph}); 146.5 (C_q, 2C, C_{Porph}); 145.0 (C_q, 2C, C_{Porph}); 144.5 (C_q, 2C, C_a-Tol_{para}); 144.5 (C_q, 2C, C_{Porph}); 144.3 (C_q, 2C, C_b-Tol_{para}); 135.0 (C_q, 2C, C_{Porph}); 131.8 (C_q, 2C, C_{Porph}); 131.2 (C_q, 1C, C_{Porph}); 130.2 (C_t, 1C, C_{Porph}); 130.1 (C_t, 2C, C_{Porph}); 129.6 (C_t, 4C, C-Tol_{ortho}); 128.7 (C_t, 4C, C-Tol_{meta}); 128.7 (C_t, 1C, C_{Porph}); 127.2 (C_q, 2C, C-Tol_{ipso}); 116.5 (C_t, 1C, C-Ph_{para}); 113.1 (C_t, 2C, C-Ph_{meta}); 105.5 (C_t, 2C, C-Ph_{ortho}); 84.3 (C_s, 2C, C_{Porph}); 82.4 (C_t, 1C, C-4'); 77.4 (C_t, 1C, C-3'); 64.9 (C_s, 1C, C-5'); 48.5 (C_s, 1C, C-2'); 22.0 (C_p, 1C, C-Tol_{Me}).

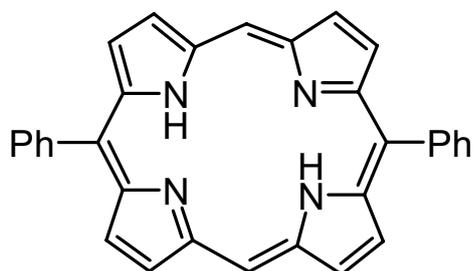
MS (FAB, m/z): 739 ([M+H]⁺, 11); 425 (5); 119 (37); 39 (100).

Smp: beginnende Zersetzung ab 110°C.

DC: R_f = 0.21 (CH₂Cl₂/CH₃CN = 100:1).

UV/Vis (CH₂Cl₂, λ/nm): 403 (320'000 M⁻¹ cm⁻¹); 502 (15'000 M⁻¹ cm⁻¹), 536 (5400 M⁻¹ cm⁻¹), 574 (5100 M⁻¹ cm⁻¹), 628 (1900 M⁻¹ cm⁻¹).

Diphenylporphyrin (53)



Diphenylporphyrin wurde als Nebenprodukt von obiger Reaktion isoliert. Man gewann **53** als roten, kristallinen Feststoff (53 mg, 11%).

C₃₂H₂₂N₄: 462.56 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.26 (s, 2H, H-Porph_{meso}); 9.40 (dd, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 4.6 Hz, 4H, H_a-Porph_β); 9.09 (dd, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 4.6 Hz, 4H, H_b-Porph_β); 8.28 (dd, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, 4H, H-Ph_{meta}); 7.81 (m, 6H, H-Ph_{ortho} und H-Ph_{para}); -3.12 (s, br, 2H, NH_{Porph}).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 147.3 (C_q, 4C, C_{Porph}); 145.3 (C_q, 4C, C_{Porph}); 141.5 (C_q, 2C, C-Ph_{ipso}); 135.0 (C_t, 4C, C-Ph_{ortho}); 131.8 (C_t, 4C, C_{Porph}); 131.2 (C_t, 4C, C_{Porph}); 127.9 (C_t, 2C, C_{Porph}); 127.1 (C_t, 4C, C-Ph_{meta}); 119.3 (C_t, 2C, C_{Porph}); 105.4 (C_t, 2C, C_{Porph}).

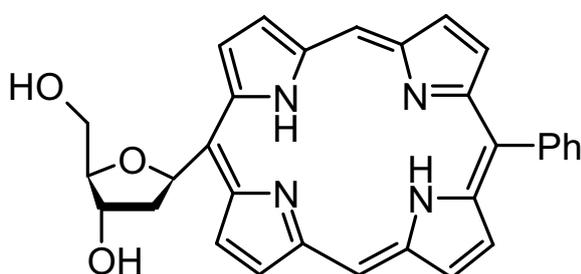
MS (ESI, m/z): 462 (M⁺, 100); 386 (6); 231 (11).

Smp: Zersetzung bei > 240°C

DC: R_f = 0.95 (CH₂Cl₂).

UV/Vis (CH₂Cl₂, λ/nm): 405 nm (180'000 M⁻¹ cm⁻¹).

1',2'-Dideoxy-1'-(5-(15-phenyl)porphyrinyl)-β-D-ribofuranose (51)



In einem ausgeheiztem 10 ml-Kölbchen wurden 40 mg Natrium vorsichtig in 3.5 ml Methanol gelöst. Diese 0.5 M Natrium-methanolat-Lösung wurde zu einer Lösung aus 350 mg (474 μmol, 1.00 eq.) **50** in 45 ml trockenem CH₂Cl₂ zugegeben. Bereits nach wenigen Sekunden begann ein

roter Feststoff auszufallen. Nach einer Stunde wurde nochmals 20 mg in 1 ml Methanol gelöstes Natrium zugegeben. Nach 50 min war die Reaktion beendet und man filtrierte das Produkt an einer Nutsche (Porengröße 4) ab und spülte es mehrfach mit CH₂Cl₂. Der Feststoff wurde am HV getrocknet und man isolierte 247 mg (quant.) des entschützten Produkts als roten Feststoff, welcher nur in Pyridin löslich ist.

C₃₁H₂₆N₄O₃: 502.58 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, Pyridin-*d*₅, δ/ppm): 10.46 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_a-Porph_β); 10.44 (s, 2H, H-Porph_{meso}); 9.54 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_b-Porph_β); 9.47 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_c-Porph_β); 9.07 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_d-Porph_β); 8.24 (m, 3H, H-1' und H-Ph_{meta}); 7.78 (m, 3H, H-Ph_{ortho} und H-Ph_{para}); 5.72 (m, 1H, H-3'); 5.19 (m, 1H, H-4'); 4.87 (dd, ³J_{HH} = 11.6 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, 1H, H_a-5'); 4.82 (dd, ³J_{HH} = 11.6 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, 1H, H_a-5'); 3.68 (m, 1H, H_a-2'); 3.46 (m, 1H, H_b-2'); -2.43 (s, 1H, NH_a); -2.51 (s, 1H, NH_b).

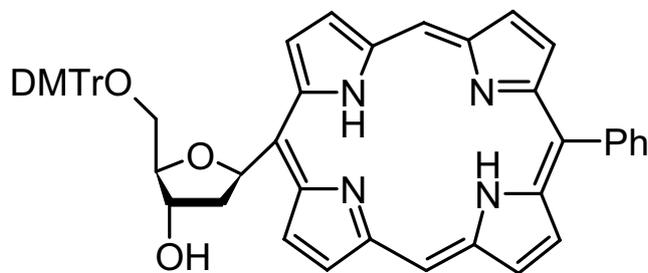
¹³C-NMR (101 MHz, Pyridin-*d*₅, δ/ppm): 147.7 (C_q, 2C, C_{Porph}); 147.4 (C_q, 2C, C_{Porph}); 145.3 (C_q, 2C, C_{Porph}); 145.0 (C_q, 2C, C_{Porph}); 141.5 (C_q, 2C, C_{Porph}); 133.0 (C_t, 1C, C-Ph_{ipso}); 132.4 (C_t, 2C, C_{Porph}); 131.2 (C_t, 2C, C_{Porph}); 130.3 (C_t, 2C, C_{Porph}); 128.2 (C_t, 2C, C_{Porph}); 127.7 (C_t, 2C, C_{Porph}); 119.7 (C_t, 1C, C-Ph_{para}); 117.3 (C_t, 2C, C-Ph_{meta}); 105.8 (C_t, 2C, C-Ph_{ortho}); 91.0 (C_t, 1C, C-1'); 82.1 (C_t, 1C, C-4'); 73.4 (C_t, 1C, C-3'); 62.9 (C_s, 1C, C-5'); 52.9; 49.7 (C_s, 1C, C-2').

MS (FAB, m/z): 503 ([M+H]⁺, 30); 329 (33); 176 (57); 77 (87); 51 (100).

Smp: > 300°C

DC: Substanz nur in Pyridin löslich.

1',2'-Dideoxy-5'-(4,4'-dimethoxytrityl)-1'-(5-(15-phenyl)porphyrinyl)-β-D-ribofuranose (52)



Man koevaporierte 123 mg (245 μmol, 1.00 eq.) **51** dreimal in je 10 ml abs. Pyridin und löste anschliessend den Feststoff in 7 ml Pyridin. Es wurden 63 μl (367 μmol, 1.50 eq.) Diisopropylethylamin und 145 mg (428 μmol, 1.75 eq.) 4,4'-Dimethoxy-tritylchlorid

zugegeben und die Reaktion bei RT gerührt. Nach 5 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml EtOH gequencht. Das Lösungsmittel wurde am Rotavap abgezogen und der Rückstand mit Hex/EE/NEt₃ = 1:1:0.03 → 0:1:0.03 an Kieselgel gereinigt. Man isolierte 108 mg (55%) eines roten Feststoffes.

C₅₂H₄₄N₄O₅: 804.95 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.46 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_a-Porph_β); 10.44 (s, 2H, H-Porph_{meso}); 9.54 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_b-Porph_β); 9.47 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_c-Porph_β); 9.07 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H_d-Porph_β); 8.24 (m, 3H, H-1' und H-Ph_{meta}); 7.98-7.11 (m, 16H, H-Ph_{ortho}, H-

Ph_{para} und H_{DMTr}); 5.72 (m, 1H, H-3'); 5.19 (m, 1H, H-4'); 4.87 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, 1H, H_a-5'); 4.82 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, 1H, H_a-5'); 3.68 (m, 1H, H_a-2'); 3.46 (m, 1H, H_b-2'); 3.18 (s, 3H, MeO); 3.09 (s, 3H, MeO); -2.43 (s, 1H, NH_a); -2.51 (s, 1H, NH_b).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 147.7 (C_q, 2C, C_{Porph}); 147.4 (C_q, 2C, C_{Porph}); 145.3 (C_q, 2C, C_{Porph}); 145.0 (C_q, 2C, C_{Porph}); 141.5 (C_q, 2C, C_{Porph}); 139.5 (C_q, 2C, C_{ar}); 137.0 (C_q, 1C, C_{ar}); 133.0 (C_t, 1C, C-Ph_{ipso}); 132.4 (C_t, 2C, C_{Porph}); 131.2 (C_t, 2C, C_{Porph}); 130.3 (C_t, 2C, C_{Porph}); 128.2 (C_t, 2C, C_{Porph}); 127.7 (C_t, 2C, C_{Porph}); 123.6, 123.5 und 123.2 (C_t, 6C, C_{ar}); 119.7 (C_t, 1C, C-Ph_{para}); 118.9 und 118.7 (C_t, 4C, C_{ar}); 117.3 (C_t, 2C, C-Ph_{meta}); 113.8 und 113.2 (C_t, 6C, C_{ar}); 105.8 (C_t, 2C, C-Ph_{ortho}); 91.0 (C_t, 1C, C-1'); 82.1 (C_t, 1C, C-4'); 73.4 (C_t, 1C, C-3'); 62.9 (C_s, 1C, C-5'); 59.3 (C_p, 1C, CH₃O_{DMTr}); 57.3 (C_p, 1C, CH₃O_{DMTr}); 49.7 (C_s, 1C, C-2').

MS (FAB, m/z): 805 ([MH⁺, 14); 329 (42); 51 (100).

DC: R_f = 0.22 (Hex/EE = 1:1).

7 Biologische Assays und allgemeine Arbeitsvorschriften

7.1 Überexpression und Aufreinigung von R1 und R2

Die beiden Enzyme wurden separat hergestellt, wobei *E. coli*-Zellen mit folgenden Plasmiden verwendet wurden:

- R1: MC1009 / pGP1-2, pTB1wt
- R2: MC1009 / pGP1-2, pTB2wt

Die Zellen, notwendigen Geräte und Materialien wurden vom Arbeitskreis von Prof. Britt-Marie Sjöberg der *Stockholms Universitet*, zur Verfügung gestellt. Die meisten Arbeitsschritte sind bei R1 und R2 identisch und werden einmal beschrieben. Sind unterschiedliche Vorgehen notwendig, so wird im Text speziell darauf hingewiesen.

Man versetzte in einem Reagenzglas 10 ml käufliches LB-Medium mit den Antibiotika Carbenicillin und Kanamycin (je 50 µg/ml). Von einer Agarplatte wurden mit einer sterilisierten Metallöse mehrere oben genannte Kolonien gepickt und in das Medium transferiert. Das Reagenzglas wurde 4 h bei 30°C inkubiert.

Es wurden 7 l LB-Medium hergestellt, wobei pro Liter 10 g Bacto Tryptone, 5 g Yeast Extract und 10 g NaCl verwendet wurden. Das Medium wurde mit 5 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt und in 7 Erlenmeyerkolben à 2 l Fassungsvermögen verteilt.

Man entnahm vom Reagenzglas mit den Zellen 1 ml und mass eine UV/Vis-Absorption bei $\lambda_{640 \text{ nm}}$ von 0.643. Um eine Anfangskonzentration von $\lambda_{640 \text{ nm}} = 0.06$ im grossen Medium zu erhalten, wurde zu 1 l LB-Medium 93 µl LB-Medium zugegeben und mit je 50 mg/l Carbenicillin und Kanamycin versetzt. Der Erlenmyerkolben wurden über Nacht bei 30°C und 100 rpm geschüttelt. Am folgenden Morgen wurde eine Zelldichte bei $\lambda_{640 \text{ nm}}$ von 0.621 gemessen. Es wurde pro Liter Medium 115 ml Zellkultur zugegeben, wiederum mit je 50 mg/l Carbenicillin und Kanamycin versetzt und je einen Tropfen Schaumhemmer zugegeben. Man liess die Erlenmyerkolben bei 30°C und 250 rpm schütteln. Nach 3.5 h wurde eine Zelldichte bei $\lambda_{640 \text{ nm}}$ von 0.516 gemessen, wobei die Temperatur der Kulturen auf 42°C erhöht wurde. Durch diese Temperatur-Erhöhung wird die Überproduktion von R1 resp. R2 angeregt. Nach weiteren 3 h 20 min wurde eine stagnierende Zelldichte bei $\lambda_{640 \text{ nm}}$ von 1.665 gemessen (hierfür war eine Verdünnung von Kultur/Wasser = 1:2 notwendig). Die Zellkulturen wurden in einen Kühlraum bei 4°C zwischengelagert und nach und nach für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Man gewann 12 g eines hellbraunen, schmierigen Pellets, welches über Nacht bei -78°C gelagert wurde.

Für die folgende Aufarbeitung des Enzyms stellte man 100 ml von folgendem Puffer her: 1 mM PMFS (Serin-Protease Inhibitor), 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl pH 7.6 und 20% Glycerin. Bei der Aufarbeitung bei R1 wurde zudem 2 mM DTT zugegeben, damit die

Cysteine an der Luft nicht oxidiert werden. Das tiefgefrorene Pellet wurde mit einem Hammer in kleinere Stücke zertrümmert und in einer „French-Press“ die Zellen aufgeschlossen. Man suspendierte das Lysat wurde in 40 ml Puffer und homogenisierte bei 4°C mit einem Mixer. Es wurden weitere 8 ml Puffer zugegeben und die Suspension in einer Ultrazentrifuge für 90 min bei 19'000 rpm zentrifugiert. Das Pellet (Zellmembran und unlösliche Stoffe) wurde verworfen und der Überstand (54 ml) bei 4°C unter behutsamen Rühren langsam mit 18 ml 7.5%iger Streptomycin-Lösung versetzt, wobei sich ein weißer Niederschlag (gefällte DNA) bildete. Nach der Zugabe wurde für 60 min bei 4°C nachgerührt. Die Suspension wurde für 20 min bei 15'000 rpm zentrifugiert. Man verwarf das gebildete Pellet und gab dem Überstand (69 ml) bei 4°C 26.9 g gemahlene Ammoniumsulfat zu, wobei sich wieder ein Niederschlag bildete. Die Suspension wurde während 1 h bei 4°C nachgerührt und 20 min bei 15'000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Puffer gelöst. Bis zur weiteren Verwendung frohr man die Lösung bei -78°C ein.

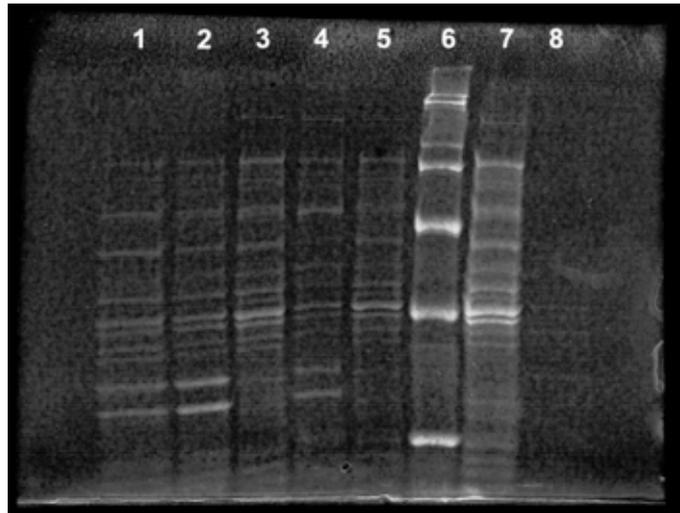


Abbildung 19: Polyacrylamid-Gel der R2-Produktion: 1) Rohpellet. 2+3) Pellet und Überstand nach Frenchpress / Zentrifuge. 4+5) Pellet und Überstand nach Streptomycin-Fällung 6) Broad-Range Protein-Leiter. 7+8) Pellet und Überstand nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung.

Für die chromatographische Reinigung der Enzyme wurden verschiedene Systeme verwendet.

- **Enzym R1:** Säule: HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance von Amersham Biosciences. Puffer A (1 Liter): 0.75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM DTT; Puffer B (1 Liter): 0.50 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM DTT. Flow: 2.5 ml/min. Linearer Gradient von 100% A zu 100% B innert 100 min.
- **Enzym R2:** Vor der Chromatographie von R2 wurde die Probe in einen Dialyseschlauch gefüllt und in einem 1 l-Becherglas mit 0.15 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 und 10 μM PMSF über Nacht bei 4°C dialysiert. Säule: DEAE Sepharose, fast flow, von Pharmacia Biotech. Puffer A: 0.15 M Kaliumphosphat pH 7.0, 10 μM PMSF; Puffer B: 0.3 M Kaliumphosphat pH 7.0, 10 μM PMSF. Flow: 2.5 ml/min. Linearer Gradient von 100% A zu 100% B innert 100 min.

Die Reinigungen wurden jeweils bei 4°C durchgeführt und mit einem Autosampler 3 ml-Fractionen gesammelt. Es wurde laufend die Absorption des Eluenten bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ gemessen, um nach beendeter Chromatographie die produktenthaltenden Fraktionen

bestimmen zu können. Bei der Reinigung von R1 wurde darauf geachtet, dass der Nachlauf des R1-enthaltenden Eluats verworfen wurde, da diese Fraktionen erfahrungsgemäss verunreinigt waren. Man schüttete die produktenthaltenden Fraktionen zusammen und konzentrierte die Lösung bei 4°C über einen Grössenausschluss-Filter auf ca. 6-8 ml auf.

Um bei R2 eine vollständige Radikalrekonstitution an Tyr₁₂₂ zu gewährleisten, wurde die R2-Probe mit (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ und Ascorbinsäure versetzt. Man stellte dazu eine entgaste Lösung bestehend aus 50 mM Tris pH 7.6, 200 mM Ascorbinsäure und 100 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ her und kühlte sie auf 4°C. Die Lösung muss farblos sein, sonst wurde das Eisen durch Luftsauerstoff oxidiert. Danach wurde die Differenz-Absorption von 280-310 nm gemessen und man erhielt dafür den Wert A = 350. Für diese Menge an R2 wurde 17.5 µmol der hergestellten Fe(II)-Lösung zugegeben und die Probe für 5 min bei 25°C gehalten. Nach erfolgter Radikalrekonstitution entsalzte man die Lösung an einer NAP-10-Säule und nahm zur Überprüfung ein UV/Vis-Spektrum auf. Es konnte ein lokales Absorptions-Maximum bei 410 nm gemessen werden.

Ein weiterer Nachweis der Proteine konnte durch MALDI-ToF-MS erbracht werden. Dabei konnte auf einer 2,6-Dihydroxyacetophenon-Matrix für R1 ein Signal bei m/z = 85'558 (ber.^[34]: 2 x 86'011) und auf einer Sinapinsäure-Matrix für R2 ein Signal bei 86'682 (ber.^[73]: 86'740) gemessen werden.

7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von R1 und R2

Man stellte eine Lösung aus 950 µl einer 20%igen (w/v) SDS-Lösung von Bio-Rad und 50 µl 2-Mercaptoethanol her. Zur Probe wurden 200 µl dieser Lösung zugegeben und in einem Eppendorfgefäss auf dem Vortexschüttler kräftig durchmischt. Die Probe wurde während 5 min bei 95°C denaturiert und der gebildete Feststoff während 3 min bei 13'200 rpm zentrifugiert. Die Probe wurde auf ein 10% Acrylamid-Gel von Bio-Rad aufgetragen und während ca. 60 min laufen gelassen. Nach beendeter Auftrennung wurde das Gel direkt aus der Halterung in eine mit Wasser gefüllte Petrischale überführt und durch vorsichtiges Schwenken gespült. Danach färbte man das Gel mit einer Staining-Solution von Bio-Rad bestehend aus 62.5 mM Tris pH 6.8, 25% Glycerin, 2% SDS und 0.01% Bromphenolblau bis die gewünschte Färbung erreicht war. Das Gel wurde über Nacht mit Wasser gespült und anschliessend während 2 h bei 80°C auf einem Papierfilter unter Vakuum getrocknet.

7.3 Aktivitätsmessung von RNR



Hinweis zur Handhabung von Tritium:

Tritium ist ein radioaktives Isotop mit einer Halbwertszeit von 12.3 Jahren (Betastrahler, Strahlungsenergie: 19 keV).^[74] Obschon die Strahlungsintensität relativ gering ist und schon allein durch Eppendorfgefässe, Plastikfolie und der obersten Hautschicht abgeschirmt wird, ist darauf zu achten, dass tritiumhaltige Substanzen nicht versehentlich eingenommen werden. Der Arbeitsplatz ist mit dem nebenstehend abgebildeten Signet zu kennzeichnen und es nach jedem Experiment ist eine Kontaminationskontrolle durchzuführen.

Dowex 50 WX8 100-200 mesh Ionentauscher-Gel wurde mehrmals in Wasser aufgequollen und überschüssiges Wasser abgegossen. Das Gel wurde in 5 Säulen mit 1.0 cm Innendurchmesser gefüllt bis eine Füllhöhe von 13 cm erreicht war. Mit einem Wattenbausch wurde das Gel leicht verdichtet und oben fixiert. Es wurde darauf geachtet, dass das Gel immer befeuchtet blieb.

In fünf Eppendorfgefässe wurde je 50 µl von folgender wässrigen Lösung zusammenpipettiert: 1.5 mM ATP, 11 mM Magnesiumacetat, 13.5 µM Thioredoxin, 34 mM HEPES, 10 mM DTT, 0.18 µM R1, 1.15 µM R2 und 0.5 mM ³H-CDP. Die Lösungen wurden bei 25°C gehalten, nach 10.0 min mit 1.0 M Perchlorsäure gequencht und auf 0°C abgekühlt. Man gab jeweils 50 µl einer dCMP-Lösung (5 mg/ml) dazu und schüttelte die Proben für 10 min bei 99°C. Es wurden 2 µl einer Phenolrot-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und so lange 4 M KOH dazupipetiert, bis die Lösung auf ein helles Rosa umschlug (ca. 270 µl). Anschliessend zentrifugierte man die Proben während 30 min bei 13'200 rpm und trug 800 µl des Überstandes auf die Ionentauschersäulen. Die Proben wurden dreimal mit je 1.0 ml Wasser gespült. Man eluierte CMP mit 140 ml 0.2 M Essigsäure und danach dCMP mit 100 ml 0.2 M Essigsäure. Für die folgende Szintillations-Messung wurde je 1 ml in ein Plastik-Vial überführt, 10 ml Szintillations-Matrix zugegeben und kräftig geschüttelt. Die Tritiumbestimmung am Szintillator wurde über Nacht durchgeführt.

7.4 Messung der Bioaktivität von freigesetztem CDP

In einer 300 µl Küvette mit 1 mm Schichtdicke wurde eine 8.5 mM Lösung aus geschütztem CDP in Wasser vorgelegt und auf der Bestrahlungsbank montiert. Zwischen Lampe und Küvette wurde ein 305 nm Cutoff-Filter installiert und die Probe während 60 s bestrahlt. In vier Eppendorfgefässe wurde je 50 µl von folgender Lösung hergestellt: 34 mM HEPES pH

7.5, 11 mM MgOAc, 10 mM DTT, 1.5 mM ATP, 0.5 mM ^3H -CDP, 13.5 mM Thioredoxin, 1.15 μM R2 und 0.1 μM R1. Zu diesen vier Lösungen wurden 0.0, 2.9, 8.8 und 20.6 μl der bestrahlten Substrat-Lösung zugegeben. Dies entspricht einer CDP-Konzentration von 0.0, 0.5, 1.5 und 3.5 mM. Die vier Eppengefässe wurden während 120 min bei RT leicht geschüttelt, danach mit 500 μl 1 M HClO_4 gequencht und die Proben gemäss Abschnitt 7.3 aufgearbeitet.

7.5 Stopped Flow Messungen

„Stopped Flow“-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Annett Bachmann aus der Gruppe von Prof. T. Kiefhaber durchgeführt. Spritze A enthielt eine Lösung aus 50 mM Tris pH 7.6, 15 mM Magnesiumacetat, 250 μM dTTP, 40 μM R1 und 30 μM R2. Spritze B: 50 mM Tris pH 7.6, 15 mM Magnesiumacetat, 4 mM CDP und 250 μM dTTP. Die Temperatur betrug 5°C und die Schichtdicke der Messzelle 1.0 cm. Die beiden Lösungen wurden mit maximaler Geschwindigkeit (innert ca. 1 ms) vermischt. Man beobachtete die UV/Vis-Absorption während 2 s bei 410 nm.

7.6 Laserflashphotolysen

Falls notwendig wurde das Gasgemisch des Lasers am Vortag erneuert um eine maximale Leistung zu gewährleisten.

- Probenvorbereitung bei RNR-haltigen Lösungen: Die einzelnen Stammlösungen wurden auf Eis gehalten und erst kurz vor der Messung in einem Eppendorfgemisch gemischt. Danach wurde die Lösung mit einer 1 ml-Spritze vorsichtig in die Küvette gefüllt und allfällige Luftblasen durch behutsames Schütteln und/oder mit der Spritze entfernt.
- Probenvorbereitung bei DNA-haltigen Lösungen: Falls nicht anders vermerkt, wurden 6 ml einer 1 μM olaren DNA-Lösung am Vortag gemäss Abschnitt 7.12 hybridisiert und über Nacht bei 4°C gehalten. Mit einer Pipette fülle man die Lösung in eine Küvette mit angeschmolzendem Kolben (Abbildung 20). Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff unter HV und anschliessendem Auftauen wurde die Probe entgast. Die entgaste Lösung wurde durch den Verbindungskanal in die Küvette umgefüllt.



Abbildung 20: Speziell angefertigte 5 ml-Küvette mit angeschmolzenem 50 ml-Rundkolben für die Entgasung der Probe vor der Laserflash Photolyse.

Vor den Laserflashphotolysen wurde ein Referenz-UV/Vis-Spektrum aufgenommen. Die Bestrahlungsküvette wurde anschliessend in den Probenhalter gesetzt und der Photomultiplier auf die entsprechende Absorption der gemessenen Wellenlänge justiert.

Bei allen Laserflash-Experimenten wurde darauf geachtet, dass die Absorption bei der Wellenlänge des Lasers (in dieser Arbeit 308 und 351 nm) den Wert 0.4 nicht überschreitet. Ansonsten wird die Lösung nicht homogen bestrahlt und die gemessenen Kinetiken werden mit Diffusionsphänomenen überlagert.

7.7 DNA-Oligosynthese

Die DNA-Oligosynthesen wurden von der Arbeitsgruppe Stulz von der University of Southampton, England (Synthese des Detektorstrang) und von der Firma Microsynth AG aus Balgach, Schweiz (Synthese des Injektorstrang) durchgeführt. Der Detektorstrang von **55** wurde vorgereinigt als Trityl-Off geliefert, der Injektorstrang von **55** ungereinigt als Trityl-On. Der Porphyrin-Baustein wurde vor der Oligosynthese mit Zn^{2+} komplexiert. Diese Komplexierung erlaubt eine höhere Effizienz bei der Kupplung; das Zentralatom wird dann bei der ersten Reinigung automatisch wieder entfernt. Des Weiteren wurden die Kupplungszeiten beim Einbau der Modifikationen auf 30 min verlängert um eine höhere Ausbeute zu erzielen.

7.8 HPLC-Reinigung von DNA-Strängen

Man verwendete ein Reversed Phase HPLC-System um die DNA zu reinigen. Dazu wurden für die verschiedenen Stränge folgende Gradienten verwendet:

Tabelle 9: HPLC-Methode für die Aufreinigung von tritylgeschütztem **55** (Injektorstrang). Die Retentionszeit betrug ca. 11 min.

Zeitpunkt	0.1 M TEAA pH 7	MeOH
0 min	75%	25%
8 min	50%	50%
12 min	50%	50%

Tabelle 10: HPLC-Methode für die Aufreinigung von **55** (Detektorstrang). Die Retentionszeit betrug ca. 14 min.

Zeitpunkt	0.1 M TEAA pH 7	MeOH
0 min	85%	15%
8 min	70%	30%
18 min	70%	30%

Der Fluss betrug stets 1.0 ml/min und die Säulentemperatur 55°C um eine allfällige Hybridisierung während der Trennung zu vermeiden. Die Absorption des Eluenten wurde laufend bei $\lambda = 260$ nm aufgezeichnet und die produkthaltenden Fraktionen manuell gesammelt.

7.9 Abspaltung der letzten Trityl-Gruppe eines DNA-Stranges

Falls die Abspaltung der letzten Trityl-Schutzgruppe am 5'-Ende des DNA-Oligomers nicht bereits durch die Aufkonzentrierung im Lyophilisator geschah, wurde die DNA-Probe in 200 μ l 80%iger Essigsäure gelöst und während 20 min bei RT stehen gelassen. Die Lösung wurde danach durch Zugabe von 50 μ l 3 M Natriumacetat neutralisiert. Man gab 800 μ l Isopropanol dazu und fällte die DNA über Nacht bei -18°C. Die Suspension wurde während 10 min bei 13'200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Man wusch das Pellet zweimal mit je 500 μ l Isopropanol und löste es anschliessend in einem geeigneten Puffer.

7.10 MALDI-ToF Messungen von DNA-Strängen

Auf einer goldbeschichteten Probenplatte wurde 1 μ l der zu messenden DNA-Lösung mit 1 μ l der Matrix-Lösung, bestehend aus 500 mM 2,6-Dihydroxyacetophenon und 300 mM Ammoniumtartrat in Wasser/Acetonitril 3:1, gemischt. Man liess die Probe während 15 min an der Luft auskristallisieren. Üblicherweise wurde die Messungen mit folgenden Parametern

durchgeführt: Negativ und Positive Mode, Spannung: 25 kV, Verzögerungszeit: 350 ns, Wellenlänge des Stockstofflasers: 337 nm, Schussfrequenz: 20 Hz.

7.11 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben wurde mittel UV/Vis-Absorption bestimmt. Die Absorption einer etwa 1 nM DNA-Lösung wurde bei 260 nm resp. 420 nm bei porphyrinhaltigen DNA-Strängen gemessen. Durch das Gesetz von Lambert-Beer

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

konnte aus der Absorption der Lösung deren Konzentration bestimmt werden. A ist die gemessene Absorption, ε der molare Extinktionskoeffizient, c die zu bestimmende Konzentration und l die Schichtdicke in Zentimeter.

Für ε wurde folgende Werte verwendet:

Porphyrinhaltige DNA: $\varepsilon_{420nm} = 324'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[60]

Nicht-porphyrinhaltige DNA: $\varepsilon_{260nm} = \sum_{i=1}^n \varepsilon_{i,260} \cdot 0.9$

Die molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Extinktionskoeffizienten der vier Nukleobasen.^[75]

Base	$\varepsilon_{i,260} [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$
Adenin	15'400
Guanin	11'500
Thymin	7'400
Cytosin	8'700

7.12 Hybridisierung von DNA-Doppelsträngen

Die beiden komplementären DNA-Stränge wurden in einem Eppendorfgefäß in der gewünschten Konzentration gelöst und in einem Wasserbad während 5 min auf 80°C erhitzt. Die Lösung wurde innert ca. 3 h langsam auf RT abgekühlt.

7.13 Schmelzkurven von Doppelstrang-DNA

Etwa 1 nM des zu messenden Doppelstrangs wurde in eine 1 ml fassende Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm in Puffer gelöst. Folgende Puffer wurden verwendet:

- 100 mM Kaliumphosphat pH 7.0, 100 mM NaCl
- 15 mM Cacodylatpuffer pH 7.0
- 100 mM TEAA pH 7.0

Die komplementären DNA-Stränge wurden gemäss Abschnitt 7.12 hybridisiert und mit dem UV/Vis-Spektrometer die Absorption der Lösung bei 260 nm bei Temperaturen von 15 bis 80°C bestimmt (1°C/min). Die angegebenen Schmelzpunkte sind Mittelwerte aus mindestens einer Aufwärm- und Abkühlungsphase. Der Schmelzpunkt ist das globale Maximum der Ableitung der sigmoidalen Kurve.

8 Referenzen

- [1] M. Gomberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1900**, 22, 757.
- [2] D. Lefort and J. Sorba J. Fossy, *Free Radicals in Organic Chemistry*, Wiley, New York, **1995**.
- [3] R. Bonnett, *Chem. Rev.*, **1963**, 63, 573.
- [4] Victor Herbert, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1988**, 48, 852.
- [5] Danièle Werck-Reichhart, *Genome Biology*, **2000**, 1, 1.
- [6] Jeffrey Clogston Vadim Cherezov, Miroslav Z. Papiz and Martin Caffrey, *J. Mol. Biol.*, **2006**, 357, 1605.
- [7] Adrian D. Hegeman Perry A. Frey, and George H. Reed, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3302.
- [8] Roberto Bassi and Paola Dainese, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 204, 317.
- [9] Da Neng Wang & Yoshinori Fujiyoshi Werner Kühlbrandt, *Nature*, **1994**, 367, 614.
- [10] P. Reichard A. Jordan, *Ann. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, 71.
- [11] P. Reichard, *Science*, **1993**, 260, 1773.
- [12] Daniel G. Nocera JoAnne Stubbe, Cyril S. Yee, and Michelle C. Y. Chang, *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 2167.
- [13] J. Lisziewicz L. M. Kelly, and F. Lori, *Curr. Pharm. Design*, **2004**, 10, 4103.
- [14] L. Crino R. Rosell, K. Danenberg, G. Scagliotti, G. Bepler, M. Taron, V. Alberola, M. Provencio, C. Camps, F. De Marinis, J. J. Sanchez, and R. Penas, *Seminars in Oncology*, **2003**, 30, 19.
- [15] Bernd Giese, *Chimia*, **2001**, 55, 275.
- [16] Marten H. Vos Corinne Aubert, Paul Mathis, André P. M. Eker and Klaus Brettel, *Nature*, **2000**, 405, 586.
- [17] A. Sancar, *Science*, **1996**, 272, 48.
- [18] Tobias E. Schrader Wolfgang J. Schreier, Florian O. Koller, Peter Gilch, Carlos E. Crespo-Hernández, Vijay N. Swaminathan, Thomas Carell, Wolfgang Zinth, Bern Köhler, *Science*, **2007**, 315.
- [19] H. N. Ananthaswamy V. O. Melnikova, *Mutat. Res.*, **2005**, 571, 91.
- [20] L. Roza A. A. Vink, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **2001**, 65.
- [21] J. S. Taylor, *Acc. Chem. Res.*, **1994**, 27.
- [22] Thomas Carl, *Chemie auf Distanz: Reduktiver Elektronentransport in DNA*, Universität Basel, **2004**.
- [23] I. Halil Kavakli and Aziz Sancar, *Biochemistry*, **2004**, 43, 15103.
- [24] R. A. Marcus, *Transactions of the New York Academy Sciences*, **1957**, 19, 423.
- [25] R. A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32.

- [26] L. T. Calcaterra J. R. Miller, G. L. Closs, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 3047.
- [27] H. M. McConnel, *J. Chem. Phys.*, **1961**, *35*.
- [28] C. C. Moser C. C. Page, X. Chen, P. L. Dutton, *Nature*, **1999**, *402*, 47.
- [29] Christopher C Moser and P Leslie Dutton Christopher C Page, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 551.
- [30] Stephan Wessely Bernd Giese, Martin Spormann, Ute Lindemann, Eric Meggers, and Maria E. Michel-Beyerle, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 996.
- [31] Jérôme Amaudrut Bernd Giese, Anne-Kathrin Köhler, Martin Spormann & Stephan Wessely, *Nature*, **2001**, *412*, 318.
- [32] Igor V. Kurnikov Tatiana R. Prytkova, David N. Beratan, *Science*, **2007**, *315*, 622.
- [33] Astor Baldesten Peter Reichard, and Lars Rutberg, *J. Biol. Chem.*, **1961**, *236*, 1150.
- [34] Ulla Uhlin & Hans Eklund, *Nature*, **1994**, *370*, 533.
- [35] B-M. Sjöberg P. Nordlund, and H. Eklund, *Nature*, **1990**, *345*, 593.
- [36] S. Licht and J. Stubbe, *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 5*, **1999**.
- [37] B.-B. S. Zhou and S. J. Elledge, *Nature*, **2000**, *408*, 433.
- [38] Ulla Uhlin Hans Eklund, Mathias Färnegardh, Derek T. Logan, Pär Nordlund, *Progr. in Biophys. & Mol. Biol.*, **2001**, *77*, 177.
- [39] Margareta Sahlin Monica Ekberg, Mathias Eriksson, and Britt-Marie Sjöberg, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 20655.
- [40] Cyril S. Yee Michelle C. Y. Chang, JoAnne Stubbe, and Daniel G. Nocera, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2004**, *101*, 6882.
- [41] Michelle C. Y. Chang Christopher J. Chang, Niels H. Damrauer, Daniel G. Nocera, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1655*, 13.
- [42] JoAnne Stubbe and Wilfried A. van der Donk, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 705.
- [43] Derek T. Logan Matthias Kolberg, Günther Bleifuss, Stephan Pötsch, Britt-Marie Sjöberg, Astrid Gräslund, Wolfgang Lubitz, Günter Lassmann, and Friedhelm Lenzian, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 11233.
- [44] Bernd Giese, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, *14*, 6139.
- [45] Persönliche Mitteilung von Annett Bachmann.
- [46] Mohammad R. Seyedsayamdost and JoAnne Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 2522.
- [47] J. H. Kaplan and A. P. Somlyo, *Trends in Neurosciences*, **1989**, *12*, 54.
- [48] Richard Givens Maurice Goeldner, *Dynamic Studies in Biology - Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*, Wiley-VCH, **2005**.
- [49] Volker Hagen Torsten Eckardt, Björn Schade, Reinhardt Schmidt, Claude Schweitzer, and Jürgen Bendig, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 703.
- [50] Richard S. Givens and Chan-Ho Park, *Tetrahedron Letters*, **1996**, *37*, 6259.

-
- [51] Richard S. Givens Peter G. Conrad, Bruno Hellrung, Cheruvallil S. Rajesh, Markus Ramseier, and Jakob Wirz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 9346.
- [52] Chan-Ho Park and Richard S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2453.
- [53] Mohammad R. Seyedsayamdost Steven Y. Reece, JoAnne Stubbe, and Daniel G. Nocera, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 8500.
- [54] Mohammad R. Seyedsayamdost Steven Y. Reece, JoAnne Stubbe, and Daniel G. Nocera, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 13828.
- [55] Barbara Carl, Entwicklung einer Methode zur Injektion von Elektronen in DNA, Universität Basel, **2004**.
- [56] Steen Steenken and Slobodan V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 617.
- [57] Andreas Schulz and Markus H. M. Sauer Claus A. M. Seidel, *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 5541.
- [58] George S. Wilson and Bruce P. Neri, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1973**, 206, 568.
- [59] R. L. Letsinger F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34.
- [60] Hugo Morales-Rojas and Eric T. Kool, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 4377.
- [61] Timur Coskun, *Unveröffentlichtes Manuskript*, **2005**.
- [62] Tae Woo Kim and Eric T. Kool, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 3949.
- [63] Karl M. Hadish Jurgen-Heinrich Fuhrhop, and Donald G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 5140.
- [64] Vadim Kotlyar Hugo E. Gottlieb, and Abraham Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7512.
- [65] D. Lavit N. P. Buu-Hoi, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 18.
- [66] A. V. Juorio D. S. Durden, B. A. Davis, *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 1815.
- [67] Augusto V. Juorio David A. Durden, and Bruce A. Davis, *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 1815.
- [68] T. H. Huskell C. J. Cavallito, *J. Org. Chem.*, **1946**.
- [69] X. Creary, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106.
- [70] Jing Li Mangzhu Zhao, Eiichi Mano, Zhiguo Song, David M. Tschaen, Edward J. J. Grabowski, and Paul J. Reider, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 2564.
- [71] K. A. Watanabe J. Matulic-Adamic, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 29.
- [72] Donald E. Bergstrom and Peiming Zhang, *Tetrahedron Letters*, **1991**, 32, 6485.
- [73] H. Eklund P. Nordlund, *J. Mol. Biol.*, **1993**, 232, 123.
- [74] Paul A. Tipler, *Physik*, Spektrum Akademischer Verlag, **2006**.
- [75] M. M. Warshaw W. D. Cantor, *Biopolymers*, **1970**, 9.

Dipl. Chem. Michael Graber

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation „Weitreichender Elektronentransfer in biologischen Systemen“ selbständig nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Basel, 24. Juni 2008

A handwritten signature in black ink that reads "Michael Graber". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping underline for the letter 'M'.

Michael Graber

An meiner Universitätsausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

H. Burkhart

E. Constable

J. Engel

W. Gehring

G. Gescheidt

B. Giese

S. Grzesiek

H.-P. Hauri

P. C. Hauser

U. Jenal

M. Jungen

T. A. Kaden

W. Keller

H. Kraft

J. P. Maier

W. Meier

M. Neuenburger-Zehnder

M. Oehme

A. Pfaltz

M. A. Rüegg

T. Schirmer

C. Schönenberger

U. Séquin

D. Sick

H. Sigel

M. Spiess

P. Strazewski

A. Vedani

H. Wennemers

T. Wirth

H.-J. Wirz

W.-D. Woggon

A. D. Zuberbühler

Lebenslauf

Michael Graber

geboren am 17.12.1978 in Basel



Ausbildung

- 2003 - 2008 Doktorarbeit in Chemie an der Universität Basel, Thema: Weitreichender Elektronentransfer in biologischen Systemen
- 1998 - 2003 Studium der Chemie an der Universität Basel, Schwerpunkt Organische Chemie
- 1998 Rekrutenschule bei den Übermittlungstruppen der Schweizer Armee
- 1990 - 1998 Schulausbildung am Gymnasium Kirschgarten

Berufliche Tätigkeiten

- 2004 - 2007 Assistent an der Universität Basel: Führung des Praktikums für Organische Chemie für Chemiestudenten
- 2003 Werkstudent bei der Solvias AG: Retrospektive Qualifizierung von wissenschaftlichen Geräten

Praktika

- 2001 Solvias AG: Synthese von Katalysatoren für die homogene Hydrierung
- 2001 Roche: Synthese eines Wirkstoffs gegen Alzheimer

Sprachen und Fähigkeiten

Deutsch (Muttersprache), Englisch (Fließend), Französisch (sehr gut)
IT: HTML, PHP & MySQL, JavaScript
Hobbies: Segeln, Tauchen, Surfen, Klavierspielen, Fotografieren

Referenzen sind auf Anfrage erhältlich.

