

# ***PhotoDNAzyme* - Asymmetrische Katalyse und Distanzabhängigkeit der T-T-Dimerbildung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Dipl.-Chem. Nadine Gaß**

aus Neustadt an der Weinstraße

Karlsruhe, 2016

KIT-Dekan:	Prof. Dr. Willem Klopper
Referent:	Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Korreferent:	Prof. Dr. Stefan Bräse
Tag der mündlichen Prüfung:	16. Dezember 2016



*Meiner Familie*



*"So much of me  
Is made of what I learned from you  
You'll be with me  
Like a handprint on my heart"*

*- WICKED -*



## Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Dezember 2016 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden von September 2015 bis Dezember 2015 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dipankar Sen im Department of Molecular Biology and Biochemistry der Simon Fraser University in Vancouver durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung und die angenehme und gute Arbeitsatmosphäre. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit, meine Arbeit in Vancouver zu erweitern, bedanken.

Im Speziellen möchte ich mich auch bedanken bei:

- Prof. Dr. Dipankar Sen und seinem ganzen Arbeitskreis für die freundliche Aufnahme und Betreuung und für die Möglichkeit ein neues Land kennenzulernen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Kun Liu und Janet Huang für die erstklassige Einarbeitung auf dem molekularbiologischen Gebiet. Die beiden haben mir nicht nur wissenschaftlich weitergeholfen, sondern auch für lustige Mittagspausen und eine unvergessliche Zeit in Kanada gesorgt.
- Annette Hochgesandt für die ganzen MALDI-Massen, die meist eine mehr oder weniger große Herausforderung darstellten.
- Angelika Möhle und Ingrid Rossnagel für das Messen der Molekülmassen.
- Dr. Andreas Rapp, Tanja Ohmer, Anne-Lena Emmerich, Lennart Oberle und Pia Lang für das Messen meiner NMR-Proben.
- Richard von Budberg für das Reparieren sämtlicher, zerbrochener Glasgeräte und seine freundliche Art.
- Claudia Sommer für die Hilfe bei sämtlichen, organisatorischen Problemen und die Beantwortung meiner unzähligen Fragen.
- Dem Graduiertenkolleg 1626 und all seinen Mitgliedern für die wissenschaftliche Kompetenz, die finanzielle Unterstützung bei Konferenzen und die interessanten, gemütlichen und lustigen Seminartage. Im Speziellen möchte ich hierbei erwähnen: Bernd Mühldorf, Thea Hering, Wolfgang Kraus, Dirk Herrmann und Lilly Speckmeier.

- Meinen Kollegen: Dr. Sabrina Sezi, Dr. Christian Wellner, Dr. Alexander Penner, Dr. Claudia Stubinitzky, Dr. Sebastian Barrois, Dr. Effi Bätzner, Dr. Peggy Bohländer, Dr. Martin Weiser, Dr. Philipp Ensslen, Dr. Marcus Merkel, Heidi Walter, Stefanie Arndt, Barbara Reiß, Krisana Peewasan, Jeannine Steinmeyer, Benjamin Lehmann, David Rombach, Christian Schwechheimer, Robert Hofsäß, Sergej Hermann, Damian Ploschik, Andrea Bijeljanin, Tamina Schneider, Ulrike Reisacher, Linda Antusch, Yannick Fritz, Leonora Nurcaj, Christoph Bickmann, Larissa Doll und Samantha Wörner für die gute Zusammenarbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen, jede Menge Spaß und die schöne Zeit im AK W.
- Meinen Vertiefer- und Bachelorstudenten: Zekun Zhou, Tobias Bender und Julian Gebhard für das Interesse, die gute Arbeit und die schöne Zeit.
- Barbara, Linda und Carmen für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit.
- Andreas, Nathalie und Marcus für die gemeinschaftlichen Glykal-Synthesen.
- Damian für die schönen Messungen sämtlicher, dringender NMR-Proben.
- Uli für die schöne, gemeinsame Zeit beim Betreuen des Biologenpraktikums.
- Sersch für ein lustiges und unvergessliches Weinfest mit Trollschoppen.
- Robert für dein offenes Ohr und deine Anteilnahme in jeder Situation.
- Christian für deine mitreißende Partylaune.
- Yannic für die besten Tanzmoves und deine Art alles ehrlich zu sagen, was du denkst.
- Philipp für sämtliche gute Gespräche während meiner Zeit in Vancouver.
- David für die schöne und abenteuerreiche Zeit in Singapur und die SMUHHGen Skiurlaube.
- Benny für deine große Geduld und Hilfsbereitschaft als Admin und bei meinen unzähligen Formatierungsproblemen.
- Ciske für die lustigen und ausgedehnten, nachmittäglichen Unterhaltungen in der Chemikalienausgabe, die Zeit in Neuseeland, deine zeitlich sehr flexiblen Arbeitszeiten und die schönen Skiurlaube.
- Carsten für die angenehmen Gespräche und deine hinterfragende und ehrliche Art.
- Heidi für die Unterstützung bei DNA- und HPLC-Fragen, die schöne und unbeschwerte Zeit in Polen, einige gemeinsame Ausbruchaktionen und deine fröhliche Art.
- Barry für deine Ratschläge bei einigen meiner Syntheseproblemen, die vielen, schönen Momente nach Feierabend auf dem Balkon und jede Menge Spaß abseits der Arbeit.



- Jeannine für deine Geduld bei technischen HPLC- und Synthesizerproblemen aller Art.
- Effi für die super Betreuung und Geduld während meines Vertieferpraktikums, deine liebenswerte und weltoffene Art und die Inspiration und Ermutigung zum Reisen.
- Jack for teaching me to cook Thai food, for good talks with the best labmates, for the trust to ask me whatever's on your mind and for improving my English skills.
- Marcus für die Geduld bei meinen unzähligen Nukleosid- und DNA-Fragen, die schönen Abende auf deinem Balkon, die beste und kürzeste Dreier-WG der Welt, deine integrierende Art, einige Joggingrunden, die lustige Zeit als roommates im sixty-six, dass du mir zuliebe (wenn auch oft widerwillig) die Gitarre ausgepackt und gespielt hast und dass du selbst in der stressigsten Zeit mit Rat und Tat zur Stelle warst.
- Linda für die sehr gute und lustige Zusammenarbeit bei unserem Themensharing, zahlreiche, kurzweilige Jogging- und Schwimmrunden, deine Hilfsbereitschaft und fröhliche und offene Art.
- Barbara für die treue Begleitung während des kompletten Studiums und der Promotion, die produktive aber auch lustige Zusammenarbeit in sämtlichen Praktika, gemeinsame Lernnachmittage und zahlreiche, schöne GRK-Seminartage.
- Steffie für unterhaltsame und leckere Kochabende, gute Gespräche als Abzugsnachbarin, abwechslungsreiche Walk'n'Talk-Runden und die nervliche Unterstützung als Leidensgenossin beim Zusammenschreiben.

Außerdem möchte ich mich bei Daniel, Camilla, Caro und Otto bedanken, dass meine Konferenzen, Seminartage und mein Auslandsaufenthalt in Canada durch euer Mitwirken unvergesslich geworden sind. Die Freundschaft mit jedem von euch bedeutet mir sehr viel!

Mein weiterer Dank gilt meinen Freunden aus meiner Heimatstadt Neustadt, die mich durch ihre Freundschaft während dem Studium und der Promotion unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Miriam, Carmen und Seb, dafür, dass ihr immer für mich da seid und ein offenes Ohr habt. Danke auch an Doro, Denis, Ramona, Matthias, Tobi, Max, Pia Kirstin und mein Rope Skipping-Team.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: Danke an meine Eltern, meine Schwester Carmen und meine Großeltern, dass ihr an mich glaubt und mich durch eure Liebe und euer Vertrauen unterstützt. Ohne euch wären diese Arbeit, mein Studium und vieles weitere in meinem Leben nicht möglich.



# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Themenstellung .....	1
2.	Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1.	Benzophenon und Acetophenon als Photosensibilisatoren .....	3
2.2.	Photochemische [2+2]-Cycloaddition .....	6
2.3.	Photoinduzierte DNA-Schäden und Reparaturmechanismen.....	8
2.4.	Templatgestützte, enantioselektive Photokatalyse .....	11
2.5.	Asymmetrische Katalyse basierend auf DNA .....	17
2.6.	<i>Three-way junctions</i> als Aptamere .....	20
2.7.	Kombination der Konzepte.....	21
3.	Auswahl des photokatalytischen Systems .....	23
4.	Synthese .....	29
4.1.	Syntheseziele .....	29
4.2.	Synthese der Phosphoramidite .....	30
4.1.	Syntheseübersicht .....	39
4.2.	Oligonukleotidsynthese und Strangdesign.....	40
5.	DNA-gestützte, enantioselektive [2+2]-Cycloaddition.....	43
5.1.	[2+2]-Cycloaddition von 8 .....	43
5.2.	Nicht-nukleosidische Benzophenon-Derivate und C-Nukleoside .....	45
5.3.	Nicht-kovalenter Ansatz .....	53
5.4.	Spezifische Aptamere: SELEX-Verfahren .....	55
5.5.	Unspezifische Aptamere: <i>Three-way junctions</i> .....	60
5.6.	Zusammenfassung.....	69
6.	Distanzabhängigkeit der photoinduzierten T-T-Dimerbildung in DNA.....	71
6.1.	Das Prinzip des DNA-Assays.....	72
6.2.	2'-Methoxyacetophenon als Photosensibilisator.....	73

## Inhaltsverzeichnis

6.3.	Vergleich mit benzophenoninduzierter T-T-Dimerbildung .....	80
6.4.	Zusammenfassung .....	83
7.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick .....	85
8.	Experimenteller Teil .....	89
8.1.	Materialien und Geräte .....	89
8.2.	Synthesevorschriften .....	95
8.3.	Oligonukleotide .....	153
8.3.1.	Synthese der modifizierten Oligonukleotide (DMTr-off) .....	153
8.3.2.	Reinigung der modifizierten Oligonukleotide .....	156
8.3.3.	Abspaltung und Aufreinigung der DMTr-on synthetisierten Oligonukleotide .....	157
8.3.4.	Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide .....	158
8.4.	Belichtungen .....	162
8.4.1.	Lichtquelle .....	162
8.4.2.	Verfolgung und Auswertung der Reaktion .....	164
8.5.	PAGE .....	165
8.6.	SELEX-Verfahren .....	167
9.	Abkürzungen .....	171
10.	Literaturverzeichnis .....	177
11.	Appendix .....	183
11.1.	Publikationen .....	183
11.2.	Poster, Vorträge und Konferenzen .....	183
11.3.	Auslandsaufenthalt .....	184

# 1. Einleitung und Themenstellung

Ultraviolette Strahlung spielt eine signifikante Rolle bei der Entstehung von DNA-Photoschäden.<sup>[1]</sup> Von der UV-Strahlung, die weniger als 10 % des Sonnenlichts ausmacht, wird der UV-C-Bereich (100-280 nm) nahezu vollständig von der Ozonschicht absorbiert. Ca. 10 % der UV-B-Strahlung (280-320 nm) und beträchtliche 90 % der UV-A-Strahlung (320-400 nm) treffen auf die Erdoberfläche. Da UV-A-Strahlung energieärmer ist als UV-B-Strahlung, dringt sie tiefer in die oberen Hautschichten ein, und ist dort in der Lage indirekt Photoschäden der DNA und daraus resultierenden Hautkrebs zu verursachen.<sup>[2-5]</sup> Einige Photosensibilisatoren, wie hydroxy- und methoxysubstituierte Benzophenone, werden in Sonnencremes und anderen Kosmetika eingesetzt, um die UV-A-Strahlung des Sonnenlichts zu absorbieren und somit vor Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer-(CPD) Schäden, (6-4)-Photoprodukten ((6-4)-PP) und *Crosslinks* zu schützen. Diese Reaktionen machen etwa 75 % der DNA-Schäden aus.<sup>[5, 6]</sup> Auf der anderen Seite ist bekannt, dass gerade solche Photosensibilisatoren selbst ein großes Schädigungspotential aufweisen, da sie sowohl als endogene, als auch exogene Substanzen die zuvor genannten Photoschäden auslösen können, indem sie als Energieüberträgersysteme wirken.<sup>[7, 8]</sup> Aus diesem Grund finden sie Einsatz in der Erforschung photoinduzierter DNA-Schäden.<sup>[9]</sup> Nun gilt es diese widersprüchlichen Einsatzgebiete von Photosensibilisatoren zu untersuchen.

Für die Naturstoffsynthese und gerade die Pharmazie ist die Synthese enantiomerenreiner Verbindungen essentiell. Die Entwicklung asymmetrischer Katalysen stellt jedoch eine große Herausforderung an die organische Chemie.<sup>[10-12]</sup> Seitdem bekannt ist, dass DNA als Templat eingesetzt werden kann, um chemische Reaktionen enantioselektiv zu katalysieren, wird sich ihre einzigartige, chirale Struktur zu Nutze gemacht.<sup>[13, 14]</sup> Aufgrund ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit stellt DNA unter dem Ansatz der ‚*green chemistry*‘ einen idealen Reaktionspartner dar. Abgesehen von der CPD-Bildung in DNA, ist bislang kein photokatalytisches System bekannt, das in der Lage ist, die Enantioselektivität einer Reaktion gezielt durch Verwendung von DNA zu steuern.

Um die Kombination photoinduzierter Reaktionen und DNA-basierter Katalyse zu realisieren und ein besseres Verständnis für induzierte CPD-Schäden zu erlangen, beschäftigt sich diese Arbeit mit den folgenden Themen.

## DNA-gestützte, enantioselektive [2+2]-Cycloaddition

Dabei soll unter Verwendung der [2+2]-Cycloaddition des Chinolinonsubstrats **8** das Potential der in Abbildung 1 dargestellten Photosensibilisatoren untersucht werden. Im nächsten Schritt sollen die C-Nukleoside synthetisch in DNA eingebracht und mit Hilfe der chiralen Struktur der DNA enantiomerenangereicherte Produkte erhalten werden.

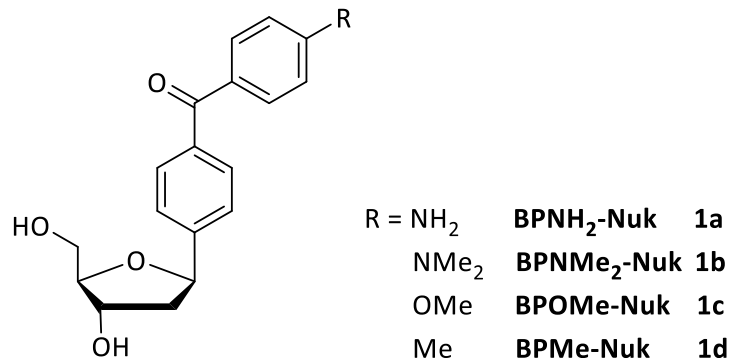


Abbildung 1: Benzophenon-C-Nukleoside.

## Distanzabhängigkeit der photoinduzierten T-T-Dimerbildung in DNA

Im zweiten Teil soll die [2+2]-Cycloadditionen zwischen Thyminen in DNA selbst untersucht werden. Dabei soll der Photosensibilisator 2'-Methoxyacetophenon (**APOMe**) als Nukleosid (Abbildung 2) in verschiedenen Abständen zu zwei unverbrückten Thyminen in DNA eingebracht werden. Dies soll Aufschluss über die Distanzabhängigkeit des Energietransfers geben, welcher zur CPD-Bildung führt.

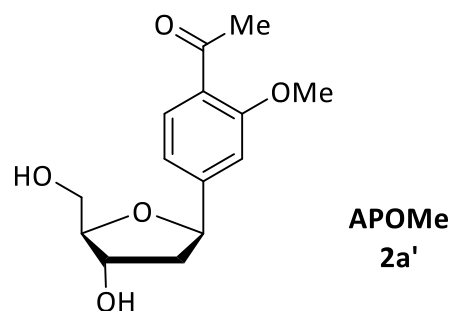


Abbildung 2: 2'-Methoxyacetophenon-C-Nukleosid.

## 2. Theoretischer Hintergrund

Die ersten dokumentierten, photochemischen Reaktionen wurden 1790 von *Joseph Priestley* durchgeführt. Durch Bestrahlung von Salpetersäure mit Sonnenlicht konnte er Stickstoffdioxid erzeugen.<sup>[15]</sup> *Giacomo Ciamician* beobachtete 1886 die Entstehung von Hydrochinon und Acetaldehyd aus Benzochinon und Ethanol durch Lichteinfluss.<sup>[16]</sup> Im Jahre 1907 verglich er die Vorgänge und Bedingungen in der organischen Chemie mit denen in Pflanzen und stellte fest, dass Pflanzen nur geringe Mengen Kohlenstoffdioxid aus der Luft, Salze aus der Erde und Wasser benötigen, um daraus unter Verwendung von Sonnenlicht verschiedene Stoffe herzustellen, die der Mensch zu der Zeit synthetisch mehr schlecht als recht reproduzieren konnte.<sup>[17, 18]</sup> Die frühe Photochemie hat sich bis heute so weiterentwickelt, dass photochemische Reaktionen nicht mehr nur durch direkte Anregung der Edukte ablaufen<sup>[19, 20]</sup> sondern auch durch indirekte Anregung mittels Photosensibilisatoren<sup>[21]</sup> oder Photoredoxkatalysatoren<sup>[22, 23]</sup> initiiert werden können.

### 2.1. Benzophenon und Acetophenon als Photosensibilisatoren

Ein Photosensibilisator ist ein Molekül, das die von ihm absorbierte Lichtenergie auf solche Moleküle übertragen kann, welche das eingestrahlte Licht nicht oder nur ungenügend selbst absorbieren können. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass der erste Triplettzustand ( $T_1$ ) des Photosensibilisators (Donor) energetisch höher liegt als der des Empfänger-moleküls (Akzeptor).<sup>[24, 25]</sup> In der präparativen Photochemie werden hierfür häufig Ketone wie Xanthon, Aceton, Acetophenon oder Benzophenon verwendet.<sup>[7, 26-28]</sup> Durch ihre hohe photochemische Stabilität, dem effizienten *Intersystem Crossing* (ISC) und der langen Lebensdauer des Triplettzustands spielen besonders Benzophenon (**BP**) und Acetophenon (**AP**) seit Jahrzehnten eine essentielle Rolle in der organischen Photochemie.<sup>[26-31]</sup> Sie finden Anwendung als Energieüberträgersysteme, da sie Licht im UV-Bereich absorbieren, durch ISC in den Triplettzustand übergehen und daraufhin die Anregungsenergie durch Triplett-Triplett-Energietransfer (TTET) auf ein Akzeptormolekül übertragen, das die eigentliche Reaktion eingeht. Werden Oligonukleotide als Templat genutzt, müssen Photosensibilisatoren verwendet werden, die in einem Wellenlängenbereich  $\lambda > 300$  nm absorbieren, da sonst die Nukleobasen direkt angeregt werden.<sup>[26]</sup> Sensibilisatoren sind sehr

bedeutend bei der Untersuchung von photoinduzierten DNA-Schäden.<sup>[9, 26, 32, 33]</sup> Dabei wird bevorzugt Benzophenon verwendet, da sein Triplettzustand bei 77 K eine Lebensdauer von rund 6 ms hat und die ISC-Quantenausbeute nach Anregung nahezu 100 % erreicht. Das in Abbildung 3 dargestellte *Jablonski*-Diagramm von Benzophenon zeigt, dass bei Anregung mit Licht im UV-Bereich aus dem Grundzustand  $S_0$  die beiden Singulettzustände  $S_1$  ( $n\pi^*$ ) und  $S_2$  ( $\pi\pi^*$ ) erreicht werden können. Von dort aus geht **BP** durch ISC in den zweiten Triplettzustand ( $T_2$ ) über, da der ISC-Prozess gegenüber der Fluoreszenz (FI) eine viel höhere Geschwindigkeitskonstante aufweist. Aufgrund der Tatsache, dass die Geschwindigkeitskonstante der Phosphoreszenz (P) gegenüber allen anderen Geschwindigkeitskonstanten klein ist, baut sich unter konstanter Belichtung eine stationäre Konzentration von Molekülen im ersten Triplettzustand auf. Aus diesem Zustand kann ein Energietransfer auf Akzeptormoleküle stattfinden, deren Triplettenergie im Vergleich zu der des Benzophenons geringer ist.<sup>[34-37]</sup>

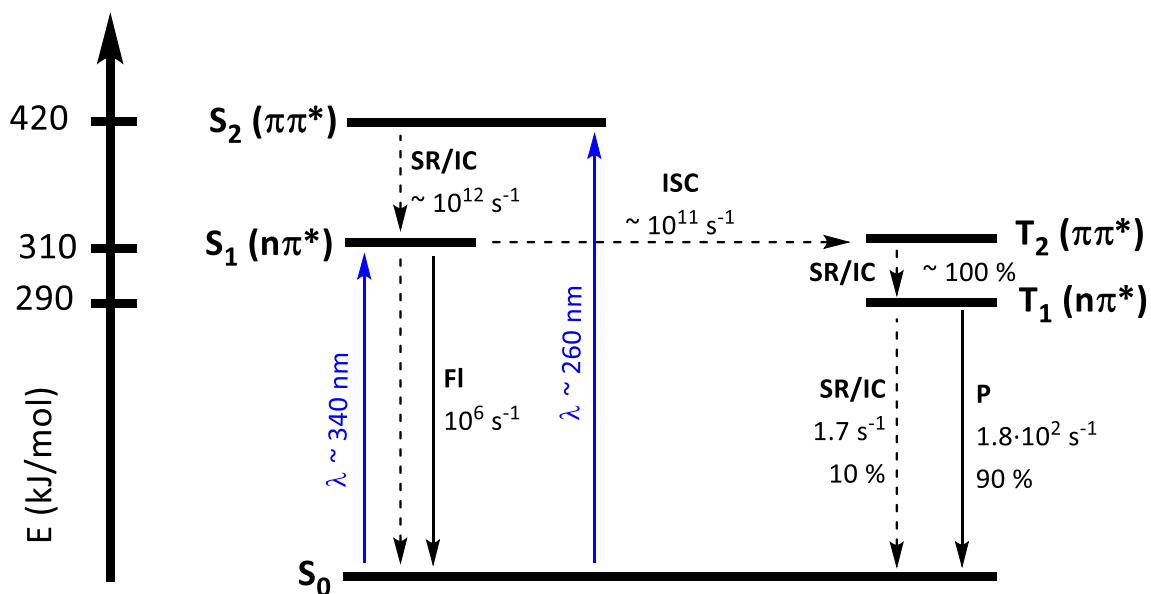


Abbildung 3: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm von Benzophenon bei 77 K; gestrichelte Pfeile stellen strahlungslose (SR = Schwingungsrelaxation, IC = Internal Converting, ISC = Intersystem Crossing) und durchgezogene Pfeile strahlende Übergänge (FI = Fluoreszenz, P = Phosphoreszenz) dar, wobei die blauen Pfeile mit Aufnahme von elektromagnetischer Strahlung (Absorption) verbunden sind.<sup>[35-37]</sup>

Die Arbeitsgruppe von *Zinth* berichtet explizit über 2'-Methoxyacetophenon (**APOMe**) als besonders geeigneten Photosensibilisator für die durch TTET induzierte CPD-Bildung. Aufgrund der langen Fluoreszenzlebenszeit (660 ps), dem effizienten ISC (97 %) und der langen Lebenszeit des Triplettzustands (400 ns) bei Raumtemperatur und Gegenwart von Luftsauerstoff in  $D_2O$ , eignet sich **APOMe** bestens zur Untersuchung von Triplettzuständen in



Thyminstapeln in DNA. Im Vergleich zu unsubstituiertem **AP**, weist **APOMe** durch die elektronenschiebende Methoxyfunktion eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf. Dies erlaubt eine Verwendung von Lichtquellen im längerwelligen Bereich. Außerdem weist **APOMe** im Bereich von 320 nm einen um zwei Größenordnungen höheren Extinktionskoeffizienten als das Thymidin-Thymidin-Dinukleotid (TpT) auf, wodurch die selektive Anregung des Sensibilisators, auch in Kombination mit TpT begünstigt ist.<sup>[26]</sup>

*Miranda et al.* untersuchten benzophenoninduzierte DNA-Schäden.<sup>[9]</sup> Wird Benzophenon in Anwesenheit von TpT und Sauerstoff bei 350 nm belichtet, überwiegt der Energietransfermechanismus gegenüber einer Oxidation von Thymidin. Die Autoren erreichten damit eine Ausbeute an CPD von bis zu 47 %.<sup>[9, 38]</sup>

## 2.2. Photochemische [2+2]-Cycloaddition

Bei der photochemischen [2+2]-Cycloaddition entsteht aus den  $\pi$ -Bindungen zweier Alkene Cyclobutan unter Bildung von zwei neuen  $\sigma$ -Bindungen. Diese Reaktion kann sowohl inter- als auch intramolekular verlaufen. Bei der intermolekularen [2+2]-Cycloaddition unterscheidet man weiterhin zwischen einer Reaktion zwischen zwei identischen Alkenen (Photodimerisierung) oder zwischen zwei unterschiedlichen Alkenen (Cycloaddition).<sup>[39, 40]</sup> Während die [2+2]-Cycloaddition nach den *Woodward-Hoffmann-Regeln* thermisch verboten ist, ist sie photochemisch erlaubt und verläuft suprafacial  $[2\pi_s+2\pi_s]$ .<sup>[40]</sup> Da die Anregung von isolierten Doppelbindungen sehr energiereiches UV-Licht erfordert und in der Regel nicht selektiv möglich ist, werden entweder Photosensibilisatoren eingesetzt (siehe Kapitel 2.1.) oder zusätzlich konjugierte Doppelbindungen verwendet. Hierfür eignen sich Moleküle, die in Nachbarschaft zur C-C-Doppelbindung eine Carbonylfunktion aufweisen (sogenannte Enone), da sie reaktiver sind und ihr Triplettzustand besser zugänglich ist.<sup>[21]</sup> [2+2]-Cycloadditionen von Enonen wurden zuerst 1908 von *Ciamician* und *Silver* beschrieben. Die Reaktion findet über den ersten angeregten Triplettzustand ( $\pi\pi^*$ ) statt. Zusätzlich bietet sich die Verwendung von cyclischen Enonen an, da hier keine E/Z-Isomerisierung möglich ist. Durch nähere Betrachtung der Substituenten ist die Regioselektivität des Reaktionsverlaufs vorhersagbar (Abbildung 4). Dabei wird zwischen *head-to-head* (HH) und *head-to-tail* (HT) unterschieden. Handelt es sich bei dem Substituent um eine elektronenziehende Gruppe (**A**) wird bevorzugt das HH-Regioisomer gebildet. Bei elektronenschiebenden Resten (**D**) beobachtet man bevorzugt die Bildung des HT-Regioisomers.<sup>[40-42]</sup>

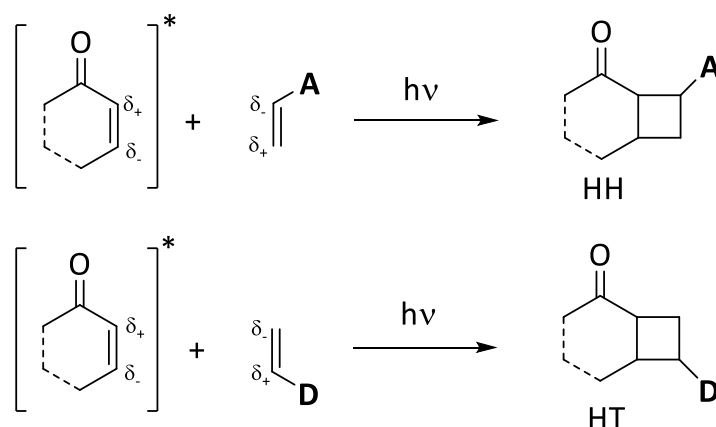


Abbildung 4: Regioselektivität bei einer [2+2]-Cycloaddition mit Enonen; unterschieden wird zwischen *head-to-head*- (HH) (A = elektronenziehende Gruppe) und *head-to-tail* (HT)-Regioisomeren (D = elektronenschiebende Gruppe).<sup>[41]</sup>

Als Konkurrenzreaktion kann es zu einer *Paterno-Büchi*-Reaktion kommen.<sup>[43, 44]</sup> Dabei handelt es sich um eine [2+2]-Cycloadditionen zwischen einer Carbonylfunktionalität und einem Alken unter Ausbildung von Oxetanen (Abbildung 5). Bei aliphatischen Carbonylverbindungen ist der reaktive Zustand ein Singulett-, für aromatische Verbindungen ein Triplettzustand. Die *Paterno-Büchi*-Reaktion wird dann bevorzugt, wenn der Triplettzustand des Alkens energetisch gleich oder höher liegt als der des Ketons und wenn der Triplettzustand des Ketons  $n\pi^*$ -Charakter aufweist. Dabei wird die Konformation des Produkts gebildet, die das radikalische Intermediat besser stabilisiert.<sup>[40]</sup>

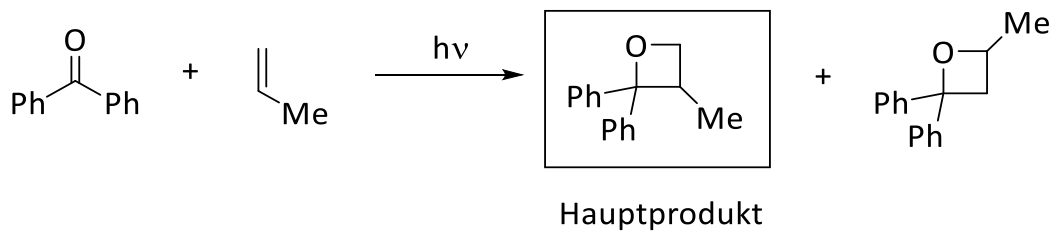


Abbildung 5: *Paterno-Büchi*-Reaktion; markiert ist das bevorzugt gebildete Produkt.<sup>[40]</sup>

### 2.3. Photoinduzierte DNA-Schäden und Reparaturmechanismen

Sowohl [2+2]-Cycloadditionen zwischen zwei Alkenen als auch *Paterno-Büchi*-Reaktionen können inter- oder intramolekular zwischen Nukleotiden der DNA ablaufen. Die beiden Pyrimidin-Basen, Cytidin und Thymin, enthalten jeweils eine C-C-Doppelbindung, die trotz vorhandener Aromatizität der Heterocyclen die Reaktivität einer isolierten Doppelbindung aufweist. Zusätzlich enthält Thymin ein Enon und hat somit die besten Voraussetzungen für eine Photodimerisierung zwischen zwei Thyminen unter Entstehung von CPD.<sup>[45]</sup>

DNA selbst absorbiert elektromagnetische Strahlung in einem Bereich von 240-300 nm, wobei ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Die  $\pi$ -Stapelung der Nucleobasen im Inneren der B-Helix stellt ein gutes Gerüst zur Übertragung von sowohl Energie als auch Elektronen dar.<sup>[46]</sup> Durch Absorption von UV-Strahlung können DNA-Schäden (Abbildung 6) hervorgerufen werden.<sup>[4]</sup>

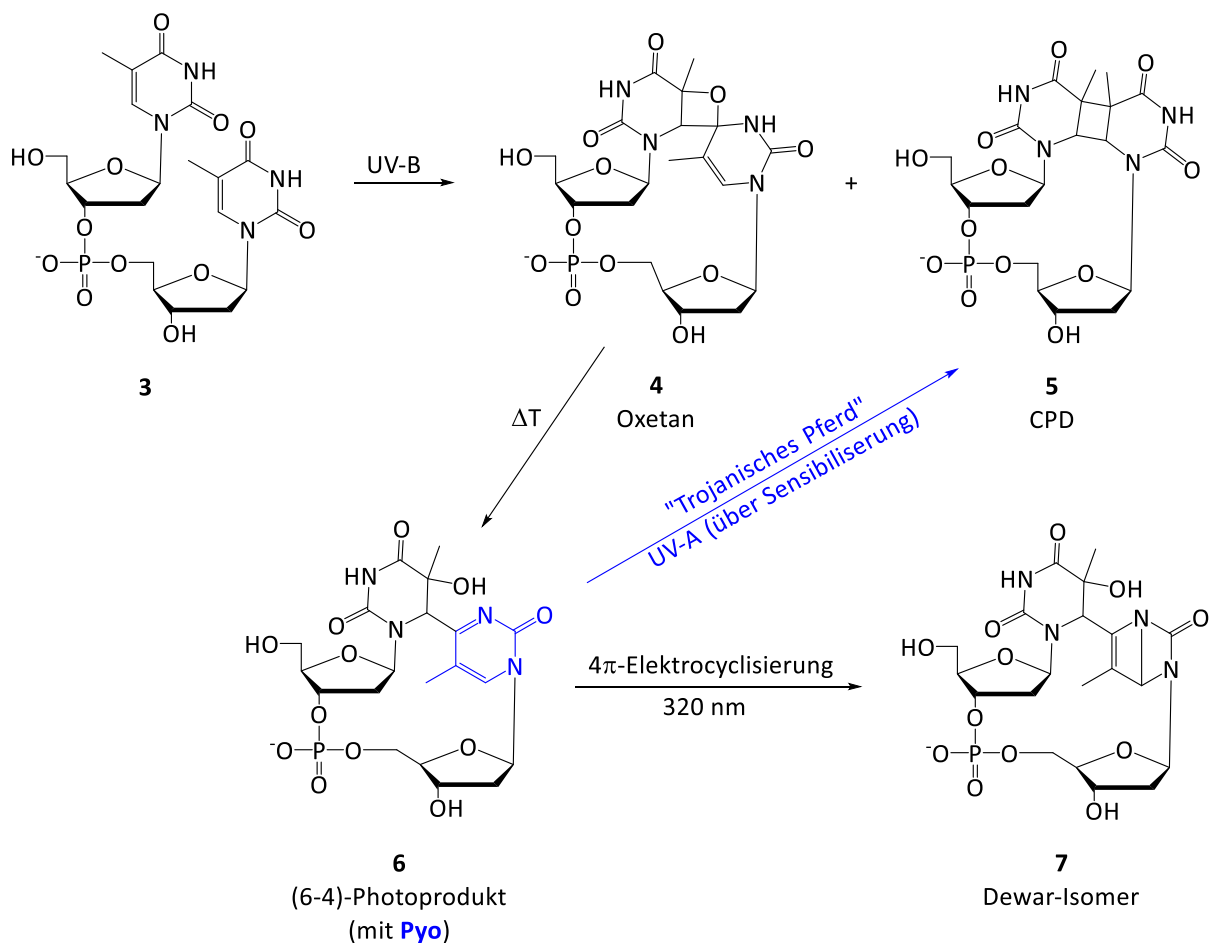


Abbildung 6: Übersicht über mögliche Photoreaktionen der DNA mit UV-A- und UV-B-Strahlung.<sup>[4]</sup>

Durch Dimerisierung der Pyrimidin-Basen können zwischen zwei Thyminen **3** oder zwischen Thymin und Cytidin *cis-syn*-CPDs **5** (*head-to-head*) oder durch *Paterno-Büchi*-Reaktionen Oxetane **4** gebildet werden. Letzteres reagiert über eine thermische Ringöffnung zum (6-4)-PP (**6**) weiter, welches durch Belichtung bei 320 nm über eine Elektrocyclisierungsreaktion zum sogenannten Dewar-Isomer **7** umgesetzt wird.<sup>[9, 46-48]</sup> Da CPDs bei 254 nm absorbieren, ist eine photochemische Reversion in die ursprünglichen Pyrimidin-Basen möglich.<sup>[45]</sup> *Markovitsi et al.* fanden heraus, dass DNA-Duplexe mit Thymin-Abschnitten fähig sind, UV-A-Strahlung zu absorbieren und durch direkte Anregung CPDs ausbilden.<sup>[49]</sup>

Photoinduzierte DNA-Schäden können außerdem über Photosensibilisatoren ausgelöst werden. Dabei werden Moleküle, wie verschiedene Benzophenon-Derivate, 4-Thiouridin, Riboflavin oder Tryptophan bei längeren Wellenlängen ( $\lambda > 300$  nm) angeregt und übertragen die aufgenommene Energie an DNA, wodurch ebenfalls die oben genannten DNA-Schäden ausgelöst werden können.<sup>[9, 50, 51]</sup> Der in (6-4)-PP enthaltene strukturelle Bestandteil 4-Methylpyrimidon (**Pyo**), welcher in Abbildung 6 blau dargestellt ist, wird auch als „Trojanisches Pferd“ bezeichnet, da er photosensibilisierende Wirkung aufweist und dadurch fähig ist, CPD-Schäden zu initiieren.<sup>[4, 52-54]</sup> Neben den bereits beschriebenen Schäden, die zwischen direkt benachbarten DNA-Basen hervorgerufen werden können, stellen *Crosslinks* einen weiteren Bereich der photoinduzierten DNA-Schäden dar. Es handelt sich dabei um kovalente Bindungen zwischen Nucleobasen, die sowohl innerhalb eines DNA-Strangs (*intrastrand crosslinking*) als auch zwischen verschiedenen DNA-Strängen (*interstrand crosslinking*) auftreten und über H-Abstraktion oder Oxetanbildung entstehen.<sup>[55, 56]</sup>

Weiter wird unter Absorption von Strahlung im UV-Bereich aus zellulärem Triplett-Sauerstoff Singulett-Sauerstoff generiert, welcher wegen seiner schädlichen Wirkung auf den Organismus zur Gruppe der *ROS* (*reactive oxygen species*) gezählt wird. Die schädliche Wirkung von Singulett-Sauerstoff ist darauf zurückzuführen, dass dieser in DNA über Elektronentransfer-Prozesse oxidative Schäden, 8-Oxoguanin oder Strangbrüche verursacht. Da Guanin die Nucleobase mit dem geringsten Oxidationspotential ist, erweist es sich als bevorzugter Angriffsort für Oxidationsmittel jeglicher Art.<sup>[9, 57]</sup>

Durch verschiedene Reparaturmechanismen können molekulare Veränderungen der DNA behoben werden, welche andernfalls die Replikation und Transkription verhindern und

somit zu Krebs oder zum Zelltod führen.<sup>[56]</sup> Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER)<sup>[58]</sup> beispielsweise verursacht wenige Basen vom CPD entfernt einen Strangbruch und schneidet die betroffene Sequenz heraus. Nach Neusynthese des fehlenden Abschnitts mittels PCR und anschließender Ligation am 3'- und 5'-Ende ist das Oligonukleotid wieder vollständig hergestellt.<sup>[59]</sup>

*Zinth et al.* berichtet über einen UV-induzierten Eigenreparaturmechanismus mittels photoinduzierten Ladungstransfer-Zuständen innerhalb der DNA. Dabei kommt es nach Anregung einer Guanin-Adenin-Sequenz (**G-A**-Sequenz) in direkter Nachbarschaft zum CPD-Schaden zur Reparatur unter Bildung der intakten Thymin. Dies geschieht aufgrund eines langlebigen, ladungstrennten Zustands zwischen **G** und **A**. Das negativ geladene **A**-Radikalanion überträgt ein Elektron auf das CPD, welches anschließend durch Ringöffnung repariert wird. Durch Rückelektroentransfer wird der photokatalytische Zyklus geschlossen. Allerdings ist dieser Vorgang nur mit genau dieser Sequenzabfolge möglich. Eine **T-A**-Sequenz beispielsweise, welche eine invertierte Ladungsverteilung aufweist (**T**: Radikalanion, **A**: Radikalkation) ist nicht in der Lage, das CPD zu reparieren. Das bedeutet, dass ein einzelnes Radikalanion in direkter Nachbarschaft zum CPD nicht ausreichend ist. Die Antriebskraft für die Reparatur bildet hier das Oxidationspotential des Radikalions, daher ist die Reparaturleistung sehr stark sequenzabhängig.<sup>[60]</sup>

## 2.4. Templatgestützte, enantioselektive Photokatalyse

Die gezielte Darstellung von enantiomerenreinen Verbindungen hat in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung gewonnen. Unter Berücksichtigung der teilweise unterschiedlichen Wirkungsweise der Enantiomere einer chiralen Verbindung ist gerade für die Pharmazie die Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen von äußerster Wichtigkeit.<sup>[10, 11]</sup> Eine spezielle Herausforderung stellt der Bereich der enantioselektiven Photokatalyse dar. Dabei werden prochirale Edukte photokatalytisch in enantiomerenreine oder enantiomerenangereicherte Produkte überführt. Die chirale Information wird durch eine chirale Umgebung des Substrats vermittelt.<sup>[61]</sup>

Die Arbeitsgruppe von *Ramamurthy* erzielte beispielsweise sehr gute Ergebnisse unter Verwendung von chiralen Auxiliaren, die kovalent an eines der Substrate gebunden sind. Nach der Synthese von verschiedenen  $\alpha$ -Oxoamiden wurde durch Belichtung  $\gamma$ -Wasserstoff abstrahiert und es konnten Lactame mit neuem Chiralitätszentrum erhalten werden.<sup>[62]</sup> Da jedoch der synthetische Aufwand durch Einführung und Abspaltung von kovalent gebundenen, chiralen Auxiliaren sehr groß ist, bietet es sich an, die chirale Information über nichtkovalente Wechselwirkungen auf das Substrat zu übertragen. Hierbei haben sich Wasserstoffbrückenbindungen als geeignet erwiesen.<sup>[61]</sup> Das Templat, welches eine sterisch hindernde Gruppe enthält, bildet dabei ein starres Gerüst und ist über zwei Wasserstoffbrückenbindungen an das Substrat gebunden (Abbildung 7). Durch die Abschirmung einer Seite des Substrats, wird eine faciale Selektivität bewirkt.<sup>[63]</sup>

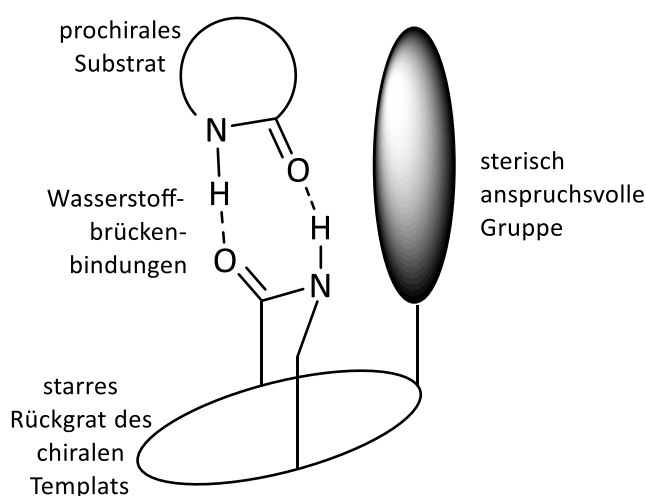


Abbildung 7: Darstellung eines über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen Substrats an ein chirales Templat.<sup>[63]</sup>

Von der Arbeitsgruppe *Bach* wurden verschiedene Systeme genutzt, um die intramolekulare [2+2]-Cycloaddition des Chinolinons **8** (zuerst beschrieben von *Kaneko et al.*)<sup>[64]</sup> enantioselektiv zu katalysieren. Bei diesem Substrat handelt es sich um 4-Butyl-3'-enyloxy-1*H*-chinolin-2-on (**8**), welches in einer photochemischen [2+2]-Cycloaddition zu den Regioisomeren **9** und **10** reagiert, die jeweils aus den Enantiomerenpaaren **9a&b** und **10a&b** bestehen (Abbildung 8).<sup>[64-66]</sup> Bei direkter Anregung ( $\lambda < 350$  nm) oder Verwendung eines photosensibilisierenden Systems ( $\lambda > 350$  nm), das keine chirale Information enthält, entspricht das Verhältnis der jeweiligen Enantiomerenpaare **a/b** 1/1, es entstehen die Racemate. Generell wird Regioisomer **9** bevorzugt gebildet, da dies sterisch begünstigt ist. Außerdem ist die Bildung des Fünfrings von **9** thermodynamisch begünstigt gegenüber dem Sechsring von **10**.<sup>[67-69]</sup>

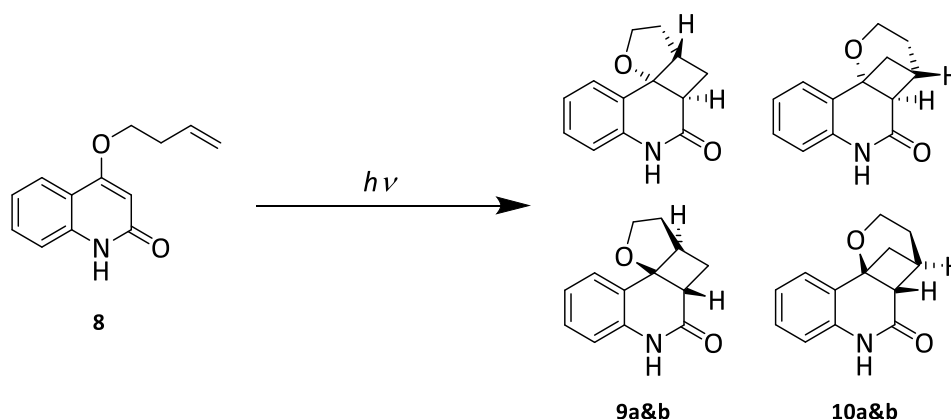


Abbildung 8: Photochemische [2+2]-Cycloaddition von **8** zu den Regioisomeren **9a&b** und **10a&b**.

Durch Kombination eines Photosensibilisators mit einem geeigneten, chiralen Templat ist es möglich, die chirale Umgebung des Substrats zu nutzen und dadurch enantiomerenangereicherte Produkte zu erhalten. Die sensibilisierende Einheit wirkt dabei als Lichtantenne und überträgt die Anregungsenergie an das Substrat in seiner räumlichen Umgebung. Da der Energieübertrag nur in unmittelbarer Nähe zum Templat stattfinden kann, wird dadurch auch ein effektiver Chiralitätstransfer gewährleistet. Um zu verhindern, dass die Reaktion in Abwesenheit der chiralen Information stattfindet, werden niedrige Temperaturen verwendet, da somit die vorzeitige Abspaltung des angeregten Substrats von



der chiralen Umgebung minimiert wird.<sup>[61]</sup> 2003 publizierte die Arbeitsgruppe von *Krische* ein chirales Templat, das kovalent an den Photosensibilisator Benzophenon gebunden ist (Abbildung 9). Unter Verwendung von substöchiometrischen Mengen **11** (0.25 eq), konnte lediglich ein Enantiomerenüberschuss von 19 % erreicht werden. Die Differenzierung der Seiten ist anscheinend nicht ausreichend, um einen höheren Enantiomerenüberschuss zu erhalten.<sup>[63, 70]</sup>

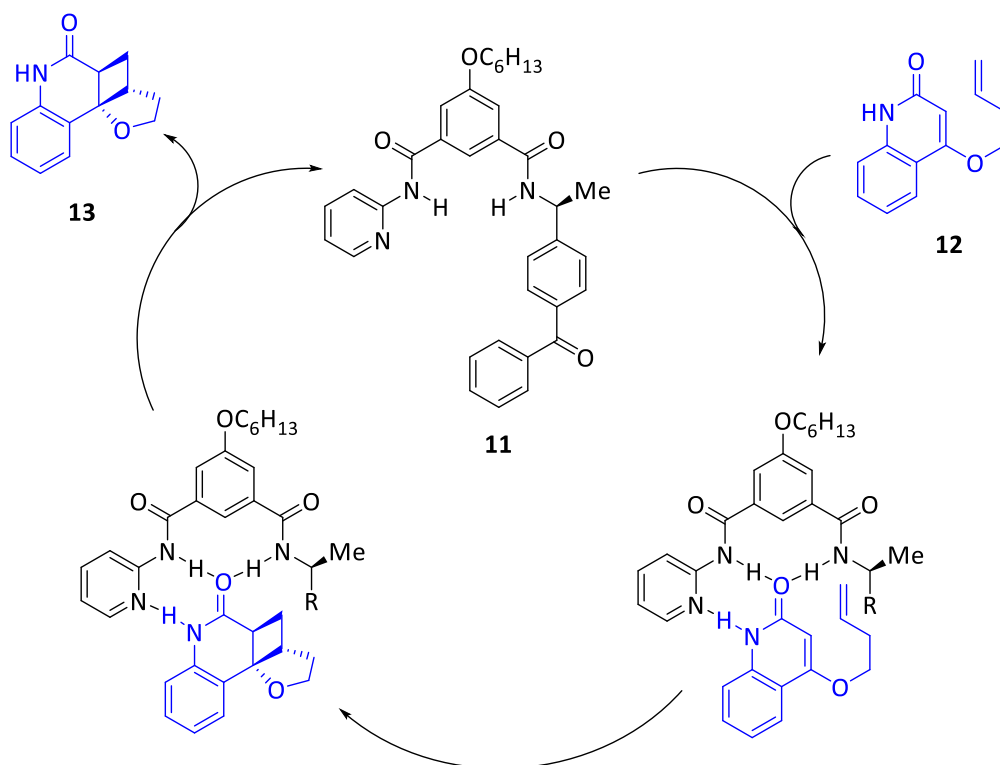


Abbildung 9: Katalysezyklus der templatgestützten, enantioselektiven Photokatalyse mit dem Templat nach *Krische*.<sup>[71]</sup>

*Bach et al.* berichten über das auf der *Kemp'schen* Trisäure beruhende Templat **15** (Abbildung 10).<sup>[63]</sup> Dabei bindet **14** mittels Wasserstoffbrückenbindungen an Templat **15**, welches während der Reaktion den Angriff der Seitenkette von der sterisch abgeschirmten Seite durch ein Tetrahydronaphthalin-Schild verhindert. Somit wurden Ausbeuten von 87 % und Enantiomerenüberschüsse von > 90 % erreicht.<sup>[70]</sup>

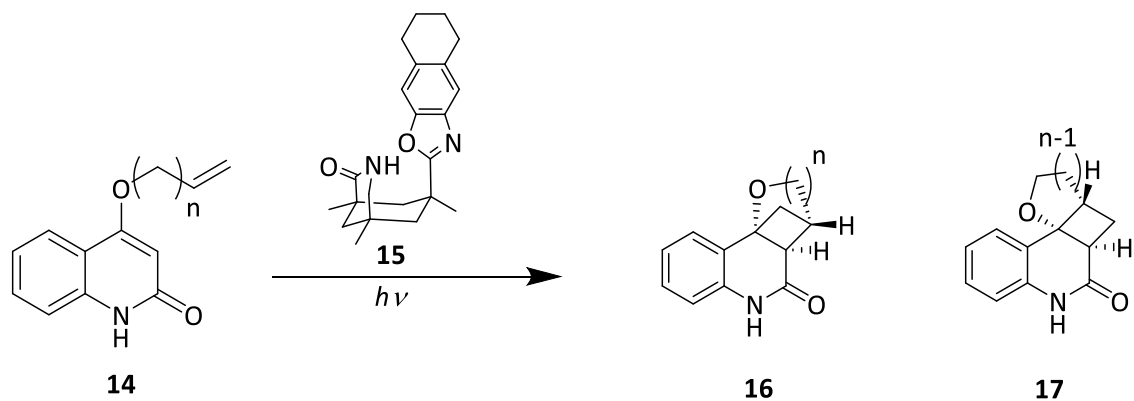


Abbildung 10: Intramolekulare [2+2]-Cycloaddition von **14** in Anwesenheit des Templats **15**.<sup>[70]</sup>

2005 publizierte die Arbeitsgruppe von *Bach* eine Weiterentwicklung des Templats **15**. Dabei wurde das Tetrahydronaphthalin-Schild durch eine Benzophenon- (**18**), bzw. eine Xanthon-Einheit (**19**) ersetzt (Abbildung 11, links und Mitte). Der Vorteil dieser Reste ist, dass sie, abgesehen von ihrer abschirmenden Wirkung, zusätzlich eine sensibilisierende Funktion haben und somit als Triplett-Triplett-Energieüberträger oder Elektronenüberträger wirken können.<sup>[61]</sup>

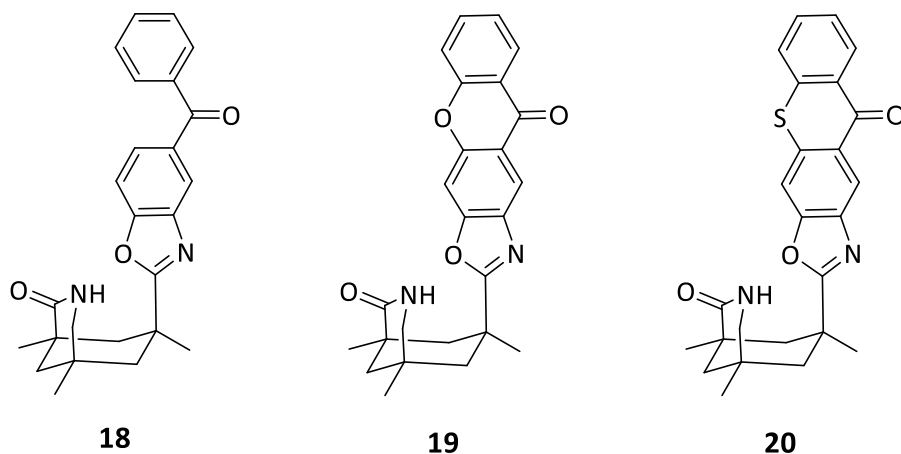


Abbildung 11: Strukturen der chiralen Template basierend auf Benzophenon (**18**), Xanthon (**19**) und Thioxanthon (**20**).<sup>[72, 73]</sup>

Bei der untersuchten Reaktion wird durch UV-Strahlung ein Elektronentransfer von Amin **21** auf den angeregten Katalysator induziert (Abbildung 12). Nach Deprotonierung entsteht das  $\alpha$ -Aminoalkylradikal **22**, welches intramolekular am C-4 des Chinolinons **23** angreift.

Abschließend bilden sich durch Rückelektrotransfer und Protonierung die Produkte **24** und **25**.<sup>[74]</sup> Unter Verwendung von **19** wurden höhere Enantioselektivitäten erhalten als mit **18**.<sup>[61]</sup>

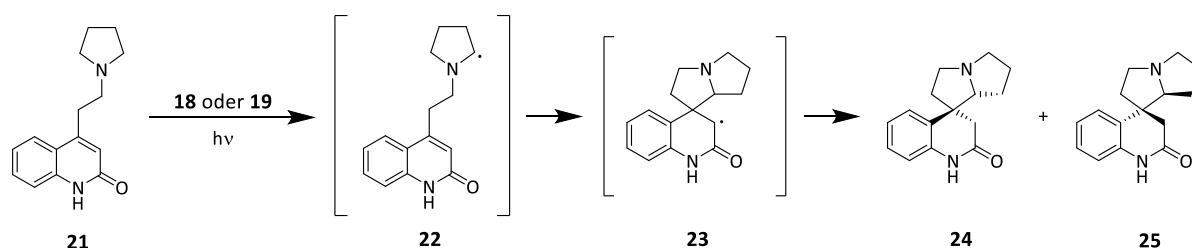


Abbildung 12: Photokatalysierte Elektronentransferreaktion von **21** in Anwesenheit der Template **18** oder **19**.<sup>[61]</sup>

Auch die Reaktion aus Abbildung 8 wurde von *Bach et al.* mit den Photosensibilisator-Templaten **18**, **19** und **20** (Abbildung 11) durchgeführt. Das Prinzip des dabei entstehenden Katalysator-Templat-Substrat-Komplexes ist in Abbildung 13 ersichtlich. Der Sensibilisator wird durch UV-Licht angeregt und gibt seine Energie, vermutlich durch Triplett-Energie-Transfer, an das Substrat **8** weiter.<sup>[75]</sup> Durch die räumliche Nähe zwischen Substrat und Templat hat der Sensibilisator zusätzlich abschirmende Wirkung und es werden enantiomerenangereicherte Produkte erhalten. Unter Verwendung von 10 mol% des Benzophenon-Templats **18** wurden 90 % Ausbeute, jedoch lediglich 39 % ee erhalten. Die Autoren erklären dies durch die vergleichsweise niedrige Triplett-Energie von **18**. Mit **19** konnten Ausbeuten von 78 % und Enantiomerenüberschüsse von bis zu 94 % erreicht werden. Das Absorptionsspektrum von Xanthon weist im Vergleich zu Benzophenon eine Rotverschiebung auf, wodurch eine selektive Anregung erreicht wird, außerdem hat das Xanthon-Templat eine höhere Triplettenergie als **18**. Dies erlaubt einen schnellen Energietransfer auch bei niedrigen Temperaturen.<sup>[72]</sup> Im Vergleich zu Xanthon weist das Thioxanthon-Templat **20** (Abbildung 11, rechts) eine bathochrome Absorptionsverschiebung auf und kann deshalb im sichtbaren Bereich ( $\lambda > 400$  nm) angeregt werden. Unter Verwendung von 10 mol% **20** konnten bei  $-25$  °C in Trifluortoluol Enantiomerenüberschüsse von bis zu 91 % erhalten werden.<sup>[73]</sup>

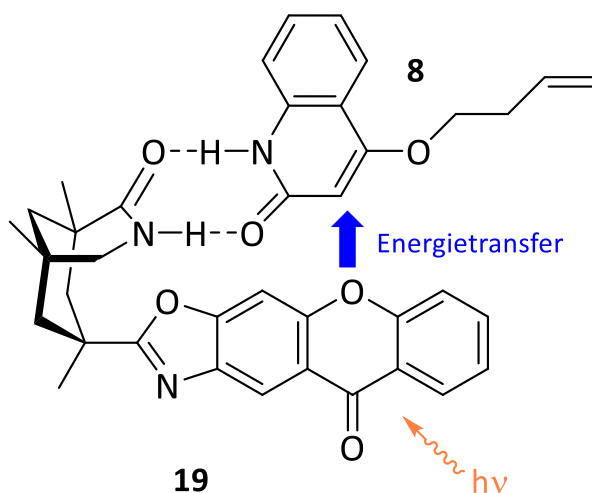


Abbildung 13: Prinzip des von *Bach* verwendeten Templates 19 mit gebundenem Substrat 8.<sup>[72]</sup>

Von der Arbeitsgruppe *Bach* wurde zudem gezeigt, dass sich chirale Lewissäuren als Zusatz zur enantioselektiven [2+2]-Cycloaddition eignen (Abbildung 14). Dies ist darauf zurückzuführen, dass beim 5,6-Dihydro-4-pyridon-Substrat **26** durch Koordination an die Lewissäure **27** eine Seite effektiv abgeschirmt wird. Außerdem erfährt **26** durch die Koordination eine bathochrome Verschiebung von  $\lambda > 50$  nm und kann somit bei 366 nm effektiv angeregt werden. Unter Verwendung von 50 mol% **27** in DCM bei  $-70$  °C konnte **28** nach Belichtung in Ausbeuten von 84 % und Enantiomerenüberschüssen von 88 % erhalten werden.<sup>[76]</sup>

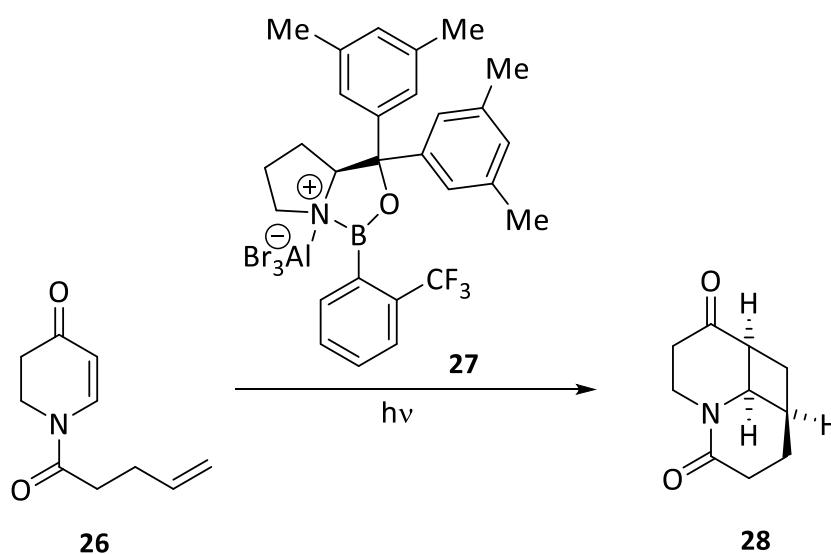


Abbildung 14: Enantioselektive [2+2]-Cycloaddition von **26** unter Verwendung des Lewissäure-Katalysators **27**.<sup>[76]</sup>

## 2.5. Asymmetrische Katalyse basierend auf DNA

Seitdem *Roelfes* 2005 erfolgreich gezeigt hat, dass chemische Reaktionen durch Zusatz von RNA oder DNA asymmetrisch katalysiert werden können<sup>[14]</sup>, wurden mehrere Ansätze veröffentlicht, um sich deren Fähigkeiten in organischen Reaktionen zu Nutze zu machen.<sup>[13, 14, 77-83]</sup> Diverse Eigenschaften machen DNA als Chiralitätsquelle in asymmetrischen, organischen Reaktionen interessant: Die Stabilität von DNA spricht für ihre bevorzugte Anwendung gegenüber RNA oder Proteinen. Unter dem Aspekt ‚*green chemistry*‘ ist DNA ein vorbildlicher Reaktionspartner, da sie sehr gut in Wasser löslich ist. Wichtig für technische Anwendungen sind auch die gute kommerzielle Verfügbarkeit und der niedrige Preis von DNA im Vergleich zu anderen Biomolekülen. Da sie zusätzlich in großen Mengen, verschiedenen Sequenzen und Längen, über unterschiedliche Synthesewege oder aus natürlichen Quellen erhältlich ist, ist DNA aus der bioorganischen Chemie nicht mehr wegzudenken.<sup>[12]</sup> Die Enantiomerenüberschüsse werden durch den direkten Transfer der chiralen Informationen der DNA-Helix auf chemische Reaktionen hervorgerufen. Wie in Abbildung 15 dargestellt, wird ein prochirales Substrat in ein chirales Produkt überführt.<sup>[14]</sup>

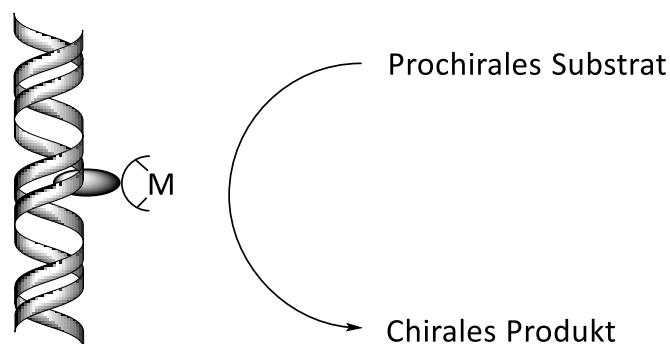


Abbildung 15: Prinzip der asymmetrischen Katalyse basierend auf DNA.

Der erste Pionier auf dem Gebiet der DNA-unterstützten, enantioselektiven Katalyse ist *Roelfes*.<sup>[14]</sup> Er publizierte eine *Diels-Alder*-Reaktion zwischen Azachalkon (**30**) und Cyclobutadien (**29**) mittels Katalyse eines Cu(II)-Ligand-DNA-Komplexes in Wasser (Abbildung 16).<sup>[14]</sup>

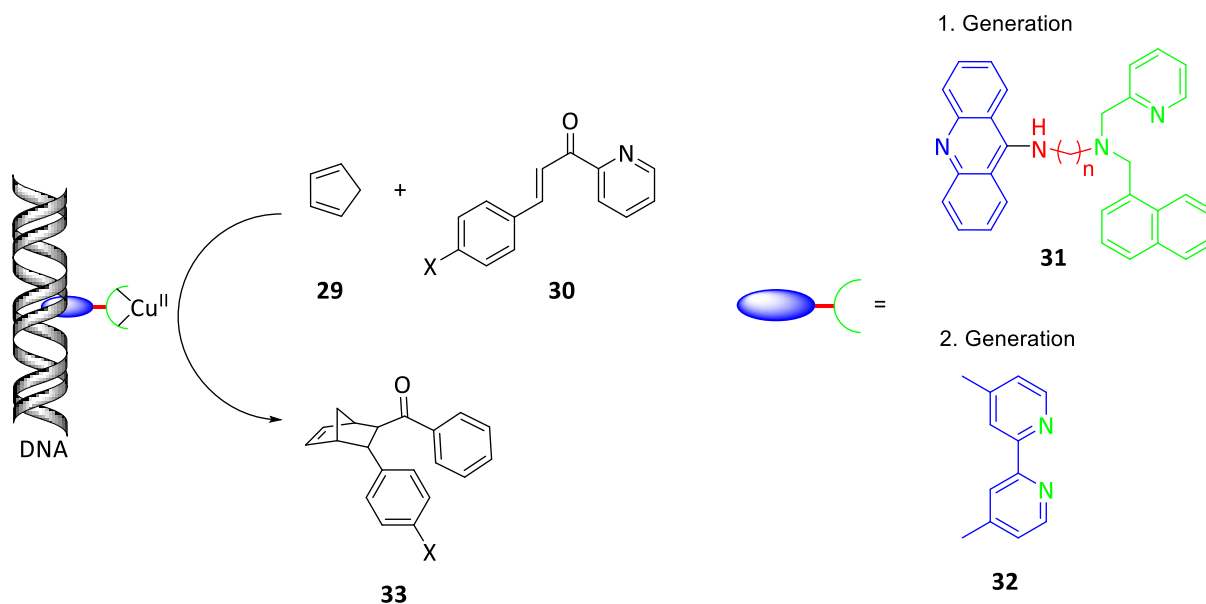


Abbildung 16: links: *Diels-Alder*-Reaktion zwischen 29 und 30 katalysiert von einem DNA-Cu(II)-Ligand-Komplex; rechts: Liganden der ersten und zweiten Generation.<sup>[12, 14, 79]</sup>

Dabei wird die Chiralität der DNA-Doppelhelix direkt auf die metallkatalysierte Reaktion übertragen. Befindet sich ein achiraler oder racemischer Katalysator in räumlicher Nähe zur DNA, können somit enantiomerenangereicherte Produkte erzeugt werden.<sup>[14]</sup> Der Katalysator wird *in situ* aus Kupfer und Ligand gebildet und besteht aus drei Komponenten: ein System, das in DNA interkalieren kann (blau), ein Spacer (rot), der als variabler Abstandshalter dient, und ein metallbindender Ligand (grün). Bei Verwendung des Liganden der ersten Generation wurden Enantiomerenüberschüsse von bis zu 48 % des *endo*-Produkts erhalten. Bei Variation des Liganden stellte sich heraus, dass die Enantioselectivität stark von dessen Aufbau abhängt. Es konnte jedoch keine generelle Gesetzmäßigkeit festgestellt werden. Eine Verlängerung des Spacers ergab jedoch, wie zu erwarten, eine Abnahme des Enantiomerenüberschusses.<sup>[14]</sup> Daher wurde bei der Weiterentwicklung des Liganden der Spacer komplett weggelassen. Die besten Ergebnisse wurden hierbei mit dem Liganden 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin **32** (2. Generation) erhalten, welcher zu Regio- und Enantioselectivitäten von bis zu 99 % führte.<sup>[12]</sup>

In weiteren Versuchen konnte das Prinzip auch auf *Michael*-Additionen und *Friedel-Crafts*-Alkylierungen übertragen werden.<sup>[12, 82]</sup> Bei Verwendung von  $\alpha,\beta$ -ungesättigtem 2-Acylimidazol **34** und Dimethylmalon als Nukleophil (NuH) wurde das *Michael*-Produkt **36**

mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % erhalten (Abbildung 17). Bei Nitromethan als Nukleophil konnte ein Enantiomerenüberschuss von 94 % erreicht werden.<sup>[12]</sup>

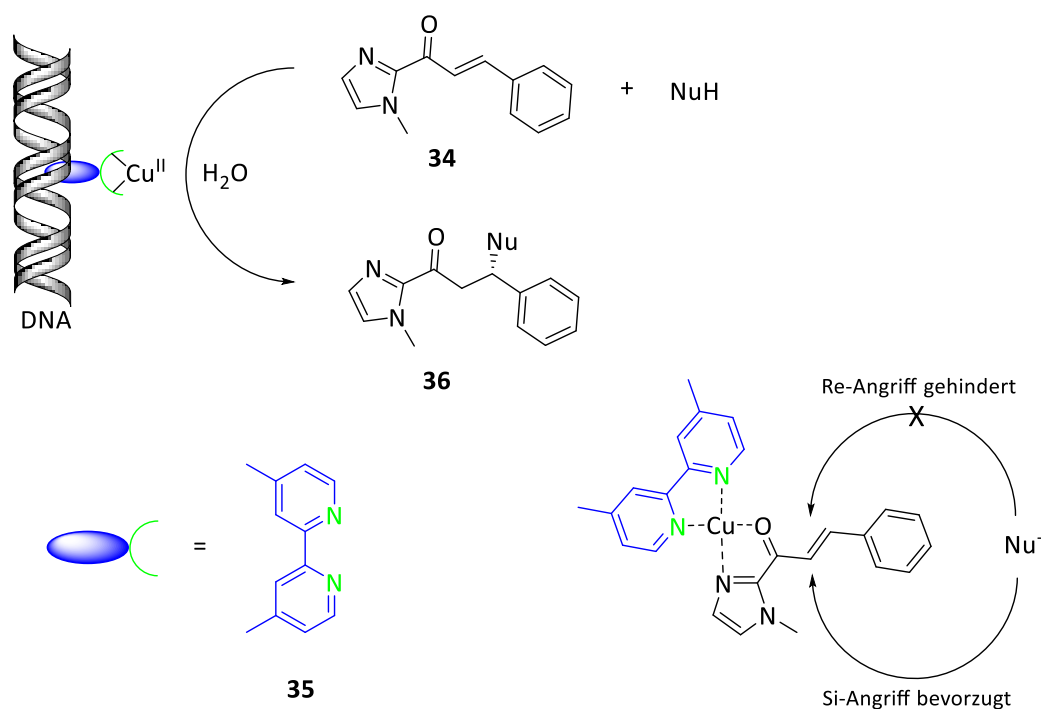


Abbildung 17: Asymmetrische *Michael*-Addition katalysiert von einem Komplex aus Cu<sup>II</sup>-Ion und Ligand in Anwesenheit von DNA.<sup>[12]</sup>

Auch asymmetrische Organometallkatalysen sind bereits DNA-basiert umsetzbar. Kupferkomplexe mit interkalierenden Liganden konnten für die Cyclopropan-Bildung von  $\alpha$ -Diazoketosulfonen unter Verwendung von Lachshoden-DNA genutzt werden. Unter Verwendung von Dipyridophenazin-Derivaten als Liganden wurden Ausbeuten von bis zu 46 % bei maximal 84 % ee erreicht.<sup>[84]</sup>

Diese Ergebnisse belegen die weitreichende Verwendbarkeit der DNA-basierten, asymmetrischen Katalyse. Allerdings setzt die Einsetzbarkeit der Katalysen mit DNA als chiralem Templat eine gewisse Wasserlöslichkeit und Wasserverträglichkeit der verwendeten Chemikalien voraus.

## 2.6. Three-way junctions als Aptamere

Eine weitere Möglichkeit, Moleküle nicht-kovalent in die chirale Umgebung eines Oligonukleotids einzubringen, abgesehen von Interkalation in einen DNA-Doppelstrang, ist die Bindung über Aptamere. DNA-Aptamere sind einzelsträngige Oligonukleotide, die fähig sind ein spezifisches Molekül über ihre 3D-Struktur zu binden.<sup>[85]</sup> *Stojanovic et al.* benutzen DNA-Aptamere, um kleine Moleküle, wie Kokain **38**, spezifisch in der hydrophoben Tasche sogenannter *three-way junctions (3wj)* zu binden (Abbildung 18). Dabei bildet sich an der Verbindungsstelle der drei Oligonukleotidabschnitte ein hydrophober Hohlraum aus, in dem kleine Moleküle angelagert werden können. Der DNA-Strang **37** liegt zunächst in offenkettiger Form vor und bildet erst bei Zugabe von Kokain **38** die *three-way junction*-Konformation **39** aus. Um diese Strukturänderung nachzuweisen, wurden die Enden des DNA-Stranges mit einem Fluorophor **F** (Fluorescein, **41**) und einem Quencher **Q** (Dabcyl, **40**) versehen, sodass Fluoreszenzlöschung auftritt, sobald sich das Substrat in der hydrophoben Tasche befindet und dadurch die Sekundärstruktur ausgebildet wird. Somit dient die Bildung der *three-way junction*-Struktur **39** und die dadurch hervorgerufene Fluoreszenzlöschung als Nachweis für das Vorhandensein von Kokain in der Lösung. Auf diese Weise konnten auch geringste Substratkonzentrationen an **38** nachgewiesen werden.<sup>[86, 87]</sup>

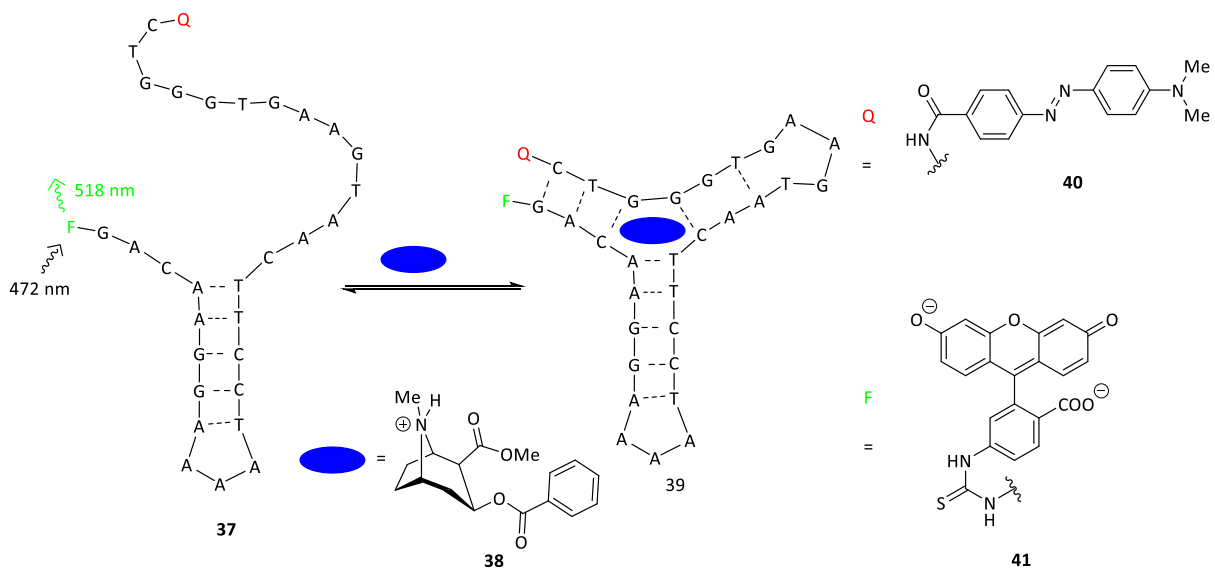


Abbildung 18: **37** zeigt das Vorhandensein von Kokain (**38**) an; durch strukturelle Änderung nähern sich Fluorophor (**F**, Fluorescein, **41**) und Quencher (**Q**, Dabcyl, **40**) räumlich an, wobei **39** gebildet und die Fluoreszenz gequenchet wird.<sup>[86]</sup>



Des Weiteren konnten durch *In-vitro*-Selektion DNA-Aptamere gefunden werden, die Cholsäure spezifisch binden und in ihrer Bindungssequenz eine *three-way junction*-Struktur aufweisen. Dabei wurde das sogenannte SELEX-Verfahren<sup>[85, 88]</sup> (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**xponential **E**nrichment) angewendet, um aus einer Bibliothek von  $9 \cdot 10^{14}$  DNA-Strängen solche Oligonukleotidsequenzen herauszufiltern, die eine hohe Bindungsaffinität an Cholsäure aufweisen. Die Autoren vermuten, dass sich das Targetmolekül dabei in der hydrophoben Tasche an der Verbindungstelle der drei verbundenen DNA-Stränge befindet und mit den drei dort befindlichen Basenpaaren interagiert.<sup>[89]</sup>

## 2.7. Kombination der Konzepte

Kombiniert man nun die Konzepte von asymmetrischer, DNA-basierter Katalyse (siehe Kapitel 2.5.) und templatgestützter, enantioselektiver Photokatalyse (siehe Kapitel 2.4.) unter Berücksichtigung der Vorteile von *three-way junctions* als Aptamere für kleine Moleküle (siehe Kapitel 2.6.), müsste man vielversprechende *PhotoDNAzyme* erhalten. Bei *PhotoDNAzymen* handelt es sich um modifizierte, katalytisch aktive Oligonukleotide, welche mit Licht geeigneter Wellenlänge selektiv angeregt werden können.<sup>[25]</sup>



### 3. Auswahl des photokatalytischen Systems

Diese Arbeit behandelt ausschließlich Reaktionen, welche durch photoinduzierten Energietransfer ablaufen. Dabei absorbiert der Sensibilisator ( $n\pi^*$ ) UV-A-Strahlung und gibt seine Anregungsenergie nach ISC in den Triplettzustand mittels TTET an ein Substrat ( $\pi\pi^*$ ) ab. Die Wahl eines geeigneten, sensibilisierenden Systems erfordert die Erfüllung von bestimmten Kriterien. Zunächst sollte die selektive Anregung des Photosensibilisators gewährleistet sein. Seine Triplettenergie muss höher sein als die des Substrats, um eine bestmögliche Energieübertragung zu gewährleisten. Für biologische Anwendungen wird zusätzlich eine gute Wasserlöslichkeit benötigt. Außerdem erfordert die Verwendung in Kombination mit Nukleotiden eine Absorption im UV-A-Bereich, um die Anregung des Sensibilisators außerhalb der DNA-Absorption zu gewährleisten.<sup>[26]</sup> Benzophenon (**BP**) spielt eine große Rolle in photokatalytischen Reaktionen, da es eine hohe chemische und photochemische Stabilität aufweist, nahezu mit 100 % durch ISC in den Triplettzustand übergeht und eine lange Lebensdauer des Triplettzustands ( $E(T_1) = 69 \text{ kcal/mol}$ ,  $\tau = 6 \text{ ms}$  bei 77 K) aufweist. Außerdem erlaubt seine Absorption im UV-A-Bereich den Einsatz von leistungsfähigen LEDs mit einer Wellenlänge von 369 nm.<sup>[27-31]</sup> *Michael Weinberger* aus dem Arbeitskreis *Wagenknecht* hat bereits in mehreren Untersuchungen Benzophenon auf seine Katalysatorauglichkeit untersucht.<sup>[90, 91]</sup> Um den Einfluss der verschiedenen Nukleinbasen der DNA auf das katalytische Verhalten von Benzophenon zu untersuchen, synthetisierte *Michael Weinberger* die in Abbildung 19 gezeigten Dinukleotide (**BP-A**, **BP-G**, **BP-T**, und **BP-C**).

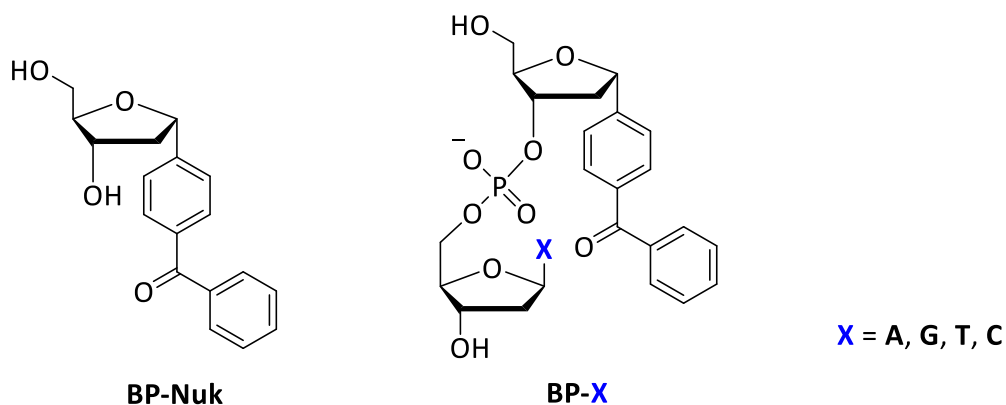


Abbildung 19: Dinukleotide aufgebaut aus Benzophenon und natürlichem Nukleosid A, G, T oder C.

## Auswahl des photokatalytischen Systems

Sie sind aufgebaut aus Benzophenon-C-Nukleosid, welches über eine Phosphodiesterbindung mit einem der natürlichen Nukleoside Adenosin (**A**), Guanosin (**G**), Thymidin (**T**), oder Cytidin (**C**) verbunden ist.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, stellte sich heraus, dass Benzophenon in Verbindung mit DNA als Photosensibilisator nicht genutzt werden kann. Nach  $n\pi^*$ -Anregung von **BP** in den Singulettzustand ( $^1\text{BP}^*$ ) kann es zu zwei konkurrierenden Prozessen kommen. Zum einen findet ein ISC vom Singulett- ( $^1\text{BP}^*$ ) zum Triplettzustand ( $^3\text{BP}$ ) des Benzophenons statt und zum anderen kommt es zum Elektronentransfer in den Singulettzustand ( $\text{BP}^{\cdot-}$ ). Obwohl beide Prozesse in der gleichen Zeitskala ablaufen ( $^1k_{\text{ET}} = 9.0 \text{ ps}^{-1} \approx k_{\text{ISC}} = 9.4 \text{ ps}^{-1}$ ) handelt es sich bei dem Hauptprozess um den Triplett-Elektronentransfer. Das bedeutet, dass **G** von **BP** oxidiert werden kann und **BP** somit seine photokatalytische Funktion in Bezug auf andere Reaktionen in DNA verliert. Die Ladungsrekombinationen (CR) verlaufen schneller als der ET-Prozess. Diese Ladungstransferprozesse finden in Abhängigkeit von der Konformation der Benzophenon-Dinukleotide statt und damit auch in Abhängigkeit des Lösemittels. In Wasser scheint bevorzugt eine gestapelte Konformation vorzuliegen, während in Methanol eine offene Konformation vorhanden ist. Durch den daraus entstehenden großen Abstand zwischen Benzophenon und Guanin wird ein Ladungstransfer in Methanol unwahrscheinlich.<sup>[91, 92]</sup>

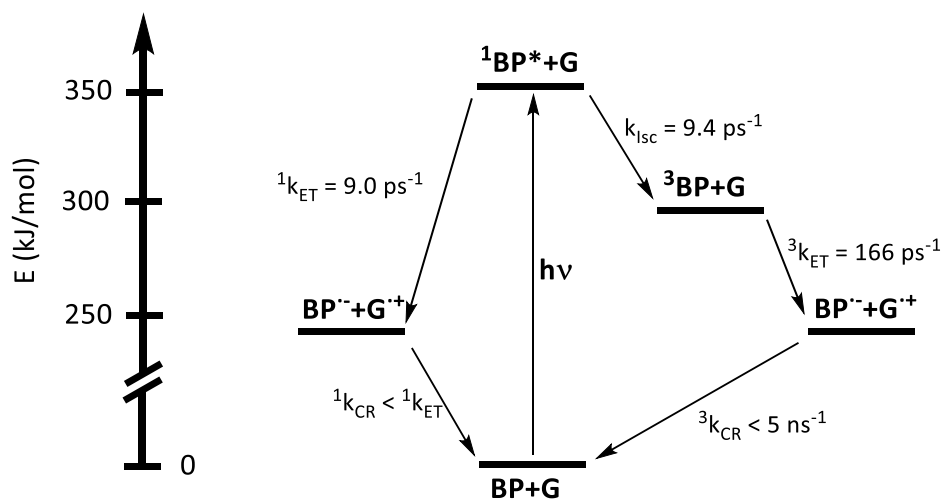


Abbildung 20: Angeregte Zustände und Kinetiken des BP-G-Dinukleotids in  $\text{H}_2\text{O}$ .

Daher wurde für diese Arbeit nach einem ähnlichen System gesucht, das ein negativeres Reduktionspotential aufweist als **BP** ( $E_0(A/A^-) = -1.83 \text{ V}$ )<sup>[93]</sup>, sodass **G** nicht oxidiert wird. Die Triplettenergie des Katalysators sollte dennoch ausreichend sein, um die [2+2]-Cycloaddition des Chinolinonedukts **8** ( $E_T = 2.86 \text{ eV}$ )<sup>[94]</sup> katalysieren zu können.

Es wurden Benzophenon-Derivate in Erwägung gezogen, welche eine elektronenschiebende Gruppe an einem der Phenylringe in *para*-Position zur Carbonylgruppe aufweisen. Der Substituent sollte die Verschiebung der Triplettenergie und des Reduktionspotential in die gewünschte Richtung bewirken. Hierfür wurden die in Abbildung 21 dargestellten substituierten Benzophenon-Derivate **BPNH<sub>2</sub>**, **BPNMe<sub>2</sub>**, **BPOMe** und **BPMe** näher betrachtet. Unter Betrachtung der Triplettenergien aus Tabelle 1 ist zu sehen, dass ein TTET von den Photosensibilisatoren **BPNH<sub>2</sub>**, **BPOMe** und **BPMe** auf das Substrat ( $E_T = 2.86 \text{ eV}$ )<sup>[94]</sup> grundsätzlich möglich ist ( $E_T = 2.91 - 3.00 \text{ eV} > 2.86 \text{ eV}$ ). Die Ausnahme bildet **BPNMe<sub>2</sub>**, dessen Triplettenergie geringer ist als die des Chinolinon-Substrats **8** ( $E_T = 2.75 \text{ eV} < 2.86 \text{ eV}$ ).<sup>[93-95]</sup>

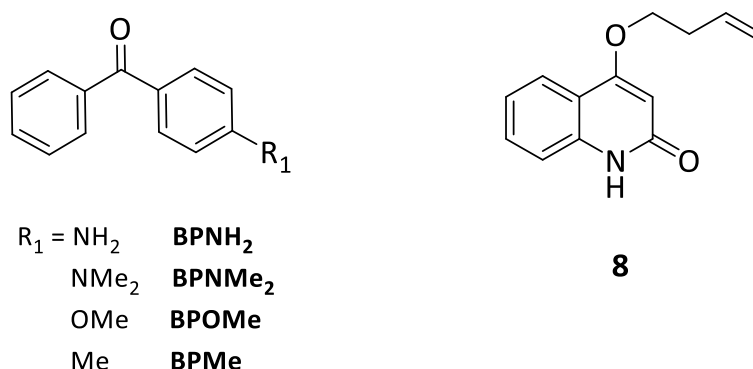


Abbildung 21: Substituierte Benzophenon-Derivate **BPNH<sub>2</sub>**, **BPNMe<sub>2</sub>**, **BPOMe** und **BPMe** (links) und Substrat **8** (rechts).

Um abschätzen zu können, ob ein photoinduzierter Ladungstransfer von den oben genannten Photosensibilisatoren auf Guanin möglich ist, muss die Triebkraft des Ladungstransfers betrachtet werden. Dafür wird die *Rehm-Weller-Gleichung*<sup>[96]</sup> herangezogen (Gleichung 1).

$$\Delta G_{CT} = n \cdot e [E^0(D^+/D) - E^0(A/A^-)] - E_{00} + C \quad (1)$$

$\Delta G_{CT}$	=	Freie Enthalpie des Ladungstransfers (CT)
$n$	=	Anzahl der beteiligten Elektronen
$e$	=	Elementarladung
$E^0(D^+/D)$	=	Grundzustandspotential der Oxidation
$E^0(A/A^-)$	=	Grundzustandspotential der Reduktion
$E_{00}$	=	Singulettenergie des HOMO-LUMO-Übergangs
$C$	=	Änderung der Coulombenergie, hier näherungsweise: $C = 0$

Um die Energie des HOMO-LUMO-Übergangs ( $E_{00}$ ) zu ermitteln, kann  $\lambda_{00}$  beispielsweise am Schnittpunkt der normierten Absorptions- und Emissionsspektren bestimmt werden.  $E_{00}$  gibt die Energiedifferenz zwischen dem untersten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustands und dem untersten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands wieder. In diesem Fall findet jedoch der Ladungstransfer aus dem Triplettzustand statt. Das Potential des angeregten Zustands des Elektronendonors kann mit Gleichung 2 berechnet werden.

$$E^0(D^+/D^*) = e \cdot E^0(D^+/D) - E_T \quad (2)$$

Aus Gleichung 3 ist das Potential des angeregten Akzeptors ersichtlich.

$$E^0(A^*/A^-) = e \cdot E^0(A/A^-) + E_T \quad (3)$$

Ist  $\Delta G_{CT}$  negativ, ist ein Ladungstransfer vom Donor- auf das Akzeptormolekül thermodynamisch begünstigt.<sup>[96, 97]</sup>

Wie in Tabelle 1 dargestellt, ist  $\Delta G_{CT}$  für **BPNMe<sub>2</sub>** ( $\Delta G_{CT} = 0.46$  eV) und **BPOMe** ( $\Delta G_{CT} = 0.04$  eV) positiv, wobei der Wert für **BP** ( $\Delta G_{CT} = -0.10$  eV), **BPNH<sub>2</sub>** ( $\Delta G_{CT} = -0.06$  eV), und **BPMe** ( $\Delta G_{CT} = -0.03$  eV) negativ ist. Daher ist bei den zuletzt genannten die Oxidation von Guanin theoretisch möglich. Wichtig zu erwähnen ist, dass  $\Delta G_{CT}$  für alle betrachteten Sensibilisatoren größer ist, als von **BP** ( $\Delta G_{CT} = -0.08 - 0.46$  eV >  $-0.10$  V). Das bedeutet, dass bei dessen Verwendung die Oxidation von Guanin weniger wahrscheinlich ist als bei **BP**.

Diese Werte sind allerdings nur eine thermodynamische Abschätzung und dienen der groben Orientierung.

Tabelle 1: Übersicht über die Grundzustandspotentiale ( $E^0$ ), Triplettenergien ( $E_T$ ) und Potentiale des angeregten Zustands ( $E^0(A^*/A^-)$ ) und der freien Enthalpie des Ladungstransfers ( $\Delta G_{CT}$ ) in Bezug auf die Oxidation von Guanin ( $E^0(G^+/G) = 1.07\text{ V}$ )<sup>[98]</sup> der Photosensibilisatoren in MeCN.<sup>[93, 95, 99-101]</sup>

Akzeptor	$E^0(A/A^-)$ [V] vs. SCE	$E_T$ [eV]	$E^0(A^*/A^-)$	$\Delta G_{CT}$ [eV]
<b>BP</b>	-1.83	3.00	1.17	<b>-0.10</b>
<b>BPNH<sub>2</sub></b>	-1.78	2.91	1.13	<b>-0.06</b>
<b>BPNMe<sub>2</sub></b>	-2.14	2.75	0.61	<b>0.46</b>
<b>BPOMe</b>	-1.96	2.99	1.03	<b>0.04</b>
<b>BPMe</b>	-1.90	3.00	1.10	<b>-0.03</b>

Aus Abbildung 22 wird deutlich, dass durch Substituenten mit +M- ( $-NH_2$ ,  $-NMe_2$ ,  $-OMe$ ) oder +I-Effekt ( $-Me$ ) eine starke bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zu unsubstituiertem **BP** ausgelöst wird. Dadurch werden der Einsatz von Lichtquellen im längerwelligen Bereich und die ausschließliche Anregung des Sensibilisators begünstigt. Wodurch eine Differenzierung von Prozessen, ausgelöst durch direkte Anregung der Nukleotide, und Prozessen, ausgelöst durch die Sensibilisierung, besser möglich ist.

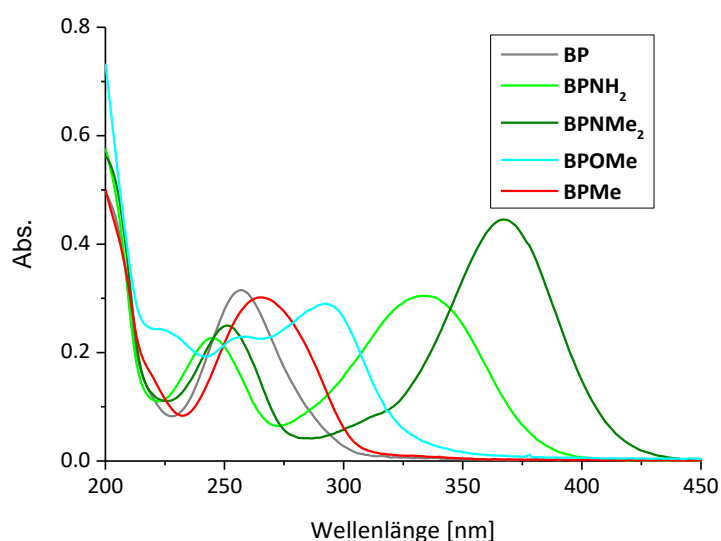
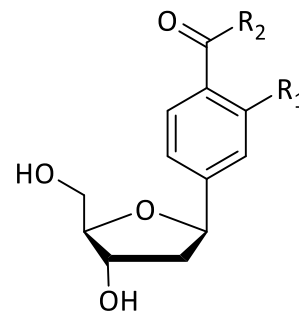


Abbildung 22: UV/Vis-Absorptionsspektrum der freien Benzophenon-Derivate BP, BPNH<sub>2</sub>, BPNMe<sub>2</sub>, BPOMe und BPMe in H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1 (20 µM).

## Auswahl des photokatalytischen Systems

Zusätzlich zu den Benzophenon-C-Nucleosiden, 4-Aminobenzophenon (**BPNH<sub>2</sub>-Nuk**), 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzophenon (**BPNMe<sub>2</sub>-Nuk**), 4-Methoxybenzophenon (**BPOMe-Nuk**) und 4-Methylbenzophenon (**BPMe-Nuk**), wurde das 2'-Methoxyacetophenon-C-Nucleosid (**APOMe-Nuk**) synthetisiert (Abbildung 23). Nachfolgend wurden diese Moleküle in DNA eingebracht und auf ihr Potential als mögliche Photosensibilisatoren untersucht.

$R_1 = \text{H},$	$R_2 = \text{Ph-NH}_2$	<b>1a BPNH<sub>2</sub>-Nuk</b>
	Ph-NMe <sub>2</sub>	<b>1b BPNMe<sub>2</sub>-Nuk</b>
	Ph-OMe	<b>1c BPOMe-Nuk</b>
	Ph-Me	<b>1d BPMe-Nuk</b>
$R_1 = \text{OMe},$	$R_2 = \text{Me}$	<b>2a' APOMe-Nuk</b>



**1a-d, 2a'**

Abbildung 23:  $\beta$ ,C-Nucleoside der verschiedenen Photosensibilisatoren.



## 4. Synthese

Im folgenden Kapitel wird auf die Synthese der verschiedenen modifizierten DNA-Bausteine eingegangen.

### 4.1. Syntheseziele

Die synthetische Herausforderung dieser Arbeit bestand in der Herstellung der  $\beta$ , C-Nukleoside **BPNH<sub>2</sub>-Nuk (1a)**, **BPNMe<sub>2</sub>-Nuk (2b)**, **BPOMe-Nuk (3c)**, **BPMe-Nuk (4d)** und **APOMe-Nuk (2a')**, welche die verschiedenen Photosensibilisatoren enthalten (Abbildung 24). Als Photosensibilisatoren wurden die substituierten Benzophenone 4-Aminobenzophenon (**BPNH<sub>2</sub>**), 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzophenon (**BPNMe<sub>2</sub>**), 4-Methoxybenzophenon (**BPOMe**) und 4-Methylbenzophenon (**BPMe**) und 2'-Methoxyacetophenon (**APOMe**) gewählt. Hierfür mussten zunächst 2-Desoxyribose und der jeweilige Photosensibilisator so funktionalisiert werden, dass diese in einer palladiumkatalysierten *Heck*-Reaktion gekuppelt werden können. Diese Nukleoside sollten anschließend auf ihre photokatalytische Aktivität bei verschiedenen Bedingungen untersucht werden und nach DMTr-Schätzung der 5'-OH-Gruppe und Herstellung der Phosphoramidite mittels DNA-Festphasensynthese in verschiedene Oligonukleotid-Sequenzen eingebracht werden.

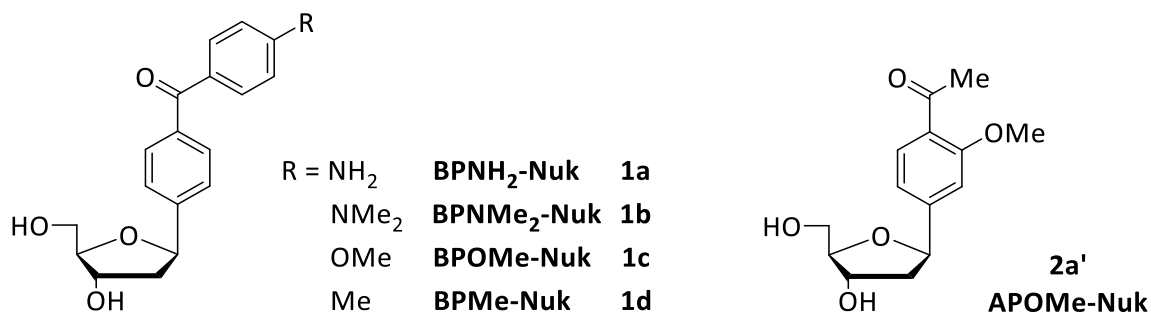


Abbildung 24:  $\beta$ , C-Nukleoside der verschiedenen Photosensibilisatoren.

## 4.2. Synthese der Phosphoramidite

Die C-Nukleoside **1a-d**, **2a'** konnten über den in Abbildung 25 allgemein dargestellten Syntheseweg hergestellt werden.<sup>[102]</sup> Auf die verschiedenen Synthesebedingungen und Ausbeuten der einzelnen Schritte wird im Folgenden genauer eingegangen.

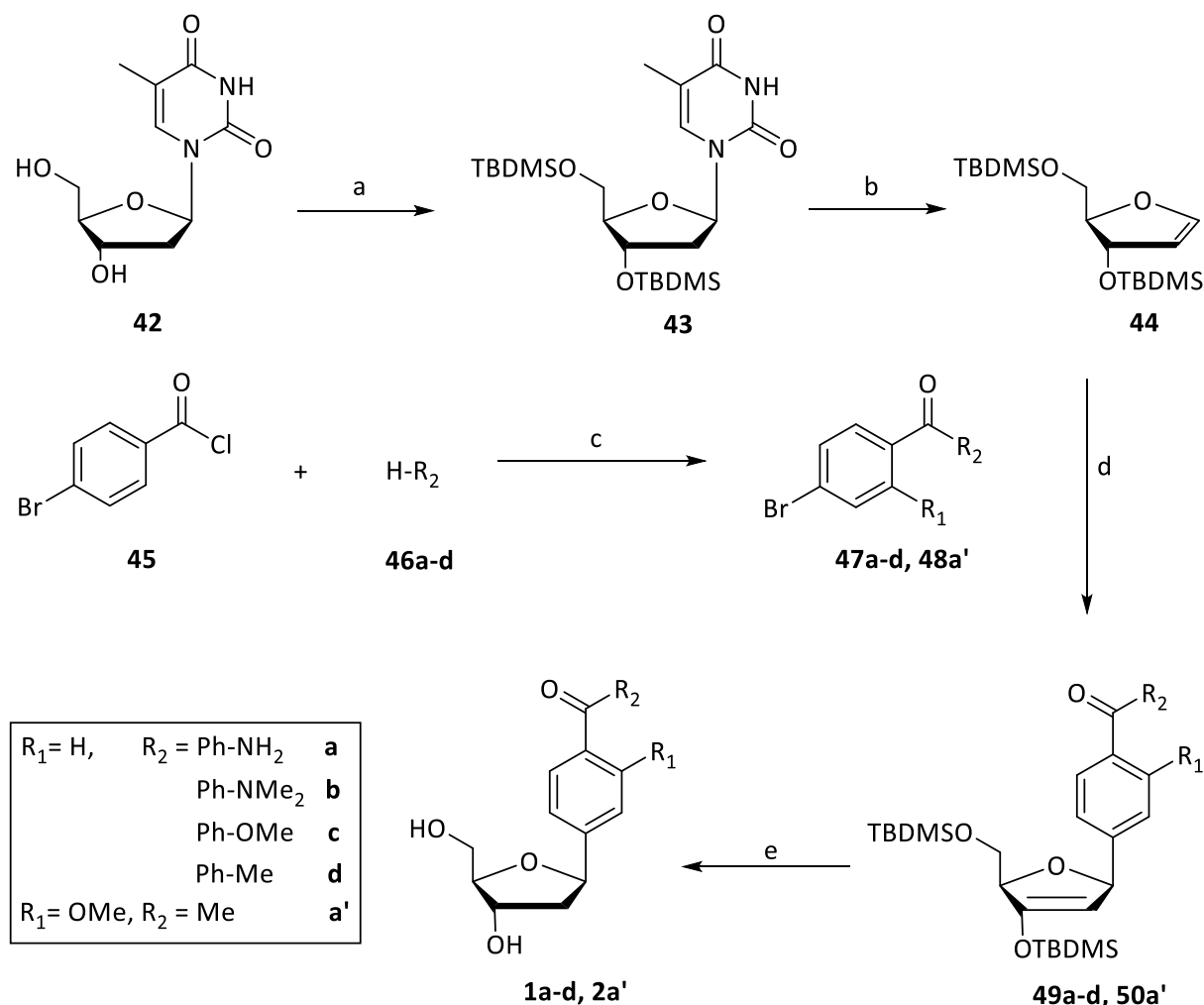


Abbildung 25: Synthesestrategie der C-Nukleoside **1a-d**, **2a'**; a) Imidazol, TBDMS-Cl, DMF, RT, 16 h, 99 %; b) HMDS,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 130 °C, 4 h, 58 %; c)  $\text{AlCl}_3$ ; d)  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeCN, 28-59 %; e) 1)  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ , THF 2)  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , MeCN/AcOH 1/1, 61-78 %.<sup>[102]</sup>

Um den Zucker (auch Glykal, **44**) und das Aglykon **47a-d** oder **48a'** in einer Heck-Reaktion zu verknüpfen, musste zunächst die 2-Desoxyribose funktionalisiert werden (Abbildung 26). Dies geschah nach den Synthesevorschriften von *Hammer et al.* und *Engels et al.*<sup>[103, 104]</sup> **44** konnte hierdurch über zwei Stufen synthetisiert werden. Ausgegangen wurde von

kommerziell erhältlichem 2'-Desoxythymidin (**42**), dessen Hydroxygruppen an 3'- und 5'-Position durch Umsetzung mit TBDMS-Cl und Imidazol geschützt wurden. Die Reaktion verlief nahezu quantitativ (99 %). Dies ist vergleichbar mit der von *Engels* publizierte Ausbeute von 96 %.<sup>[103]</sup> Anschließend wurde die Thymin-Gruppe von **43** als Abgangsgruppe durch Silylierung mit Hexamethyldisilazan und Ammoniumsulfat bei 130 °C eliminiert. Bei diesem Reaktionsschritt wurden 58 % **44** erhalten. In der Literatur wurde hierfür eine Ausbeute von 79 % gefunden.<sup>[104]</sup>

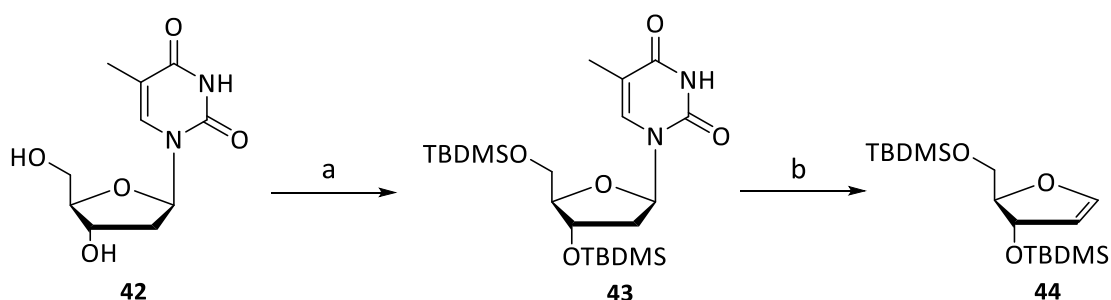


Abbildung 26: Synthese des Glykals **44**; a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, 16 h, 99 %; b) HMDS,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 130 °C, 4 h, 58 %.

Mit Ausnahme des kommerziell erhältlichen 4'-Brom-2'-methoxyacetophenons (**48a'**), mussten auch die restlichen Aglykone für die *Heck*-Reaktion funktionalisiert werden. Im Falle des aminosubstituierten Benzophenons **47a** wurde der Syntheseweg über die Nitroverbindung gewählt. Hierfür wurden 4-Nitrobenzoylchlorid (**51**), Brombenzol (**46a**) und Aluminiumchlorid in DCM für 14 h bei RT in einer *Friedel-Crafts*-Acylierung umgesetzt. Die Ausbeute betrug für diesen Syntheseschritt 27 %. Nachdem die Nitrogruppe mit konzentrierter Salzsäure in Anwesenheit von Eisen im Ultraschallbad zum Amin reduziert wurde (Abbildung 27), konnten 59 % **47a** erhalten werden.

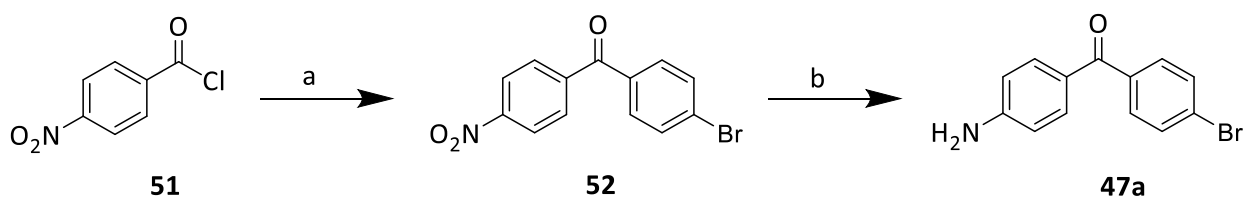


Abbildung 27: Synthese des Aglykons **47a**; a) H-Ph-Br,  $\text{AlCl}_3$ , DCM, 14 h, RT, 27 %; b)  $\text{HCl}_{\text{aq}}$ , Fe, EtOH (40 %), 14 h, 85 °C, 59 %.

Die anderen funktionalisierten Benzophenone **47b-d** wurden auch durch *Friedel-Crafts*-Acylierung erhalten, es wurde jedoch von 4-Brombenzoesäure **53** und der korrespondierenden Aryl-Komponente **46b-d** ausgegangen (Abbildung 28).

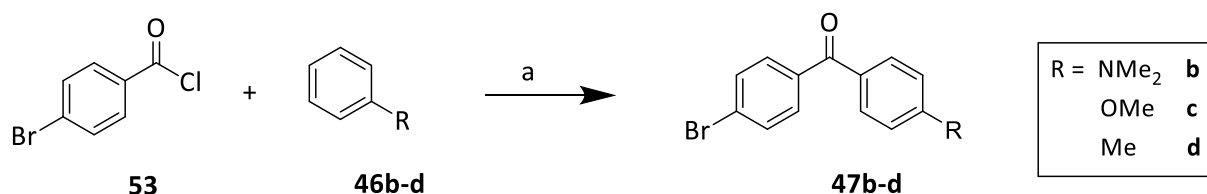


Abbildung 28: Synthese der funktionalisierten Bausteine **47b-d**; a) AlCl<sub>3</sub>; Bedingungen und Ausbeuten sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Die jeweiligen Ausbeuten und Bedingungen der Synthesen von **47b-d** sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei Synthese von **47c** konnte dabei die beste Ausbeute mit 96 % erreicht werden. Dies lässt sich durch den Einfluss des Restes R auf die Reaktivität der Zweitsubstitution erklären. Durch den positiven mesomeren Effekt der Methoxygruppe ist der Aromat aktiviert und geht die elektrophile, aromatische Substitution bevorzugt ein. Erstaunlich ist hierbei, dass die Synthese von **47b** mit *N,N*-Dimethylanilin nur mit einer mittelmäßigen Ausbeute von 38 % abläuft, da auch R = NMe<sub>2</sub> aktivierend auf die Reaktion wirken müsste. Eine Änderung des Lösemittels könnte in diesem Fall höhere Ausbeuten liefern.<sup>[102]</sup>

Tabelle 2: Übersicht über die Reaktionsparameter und Ausbeuten der Synthesen von **47b-d**.

Produkt	R	Lösemittel	Reaktions- temperatur	Reaktions- zeit	Ausbeute
<b>47b</b>	NMe <sub>2</sub>	Et <sub>2</sub> O	35 °C	16 h	38 %
<b>47c</b>	OMe	Ph-NO <sub>2</sub>	RT	12 h	96 %
<b>47d</b>	Me	Ph-Me	110 °C	3.5 h	80 %

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die C-C-Knüpfung zwischen Zucker und Aglykon zu bilden.<sup>[105-107]</sup> Die vielversprechendste Methode wurde von *Hocek et al.* veröffentlicht.<sup>[108]</sup>

Dabei wird eine Glykal-Spezies (**44**) und das halogenierte Aglykon **54** in einer palladiumkatalysierten *Heck*-Reaktion umgesetzt. Wie in Abbildung 29 ersichtlich, verläuft die Kupplung über fünf Schritte. Bei der oxidativen Addition entsteht das Organopalladiumreagenz. Anschließend bildet sich ein  $\pi$ -Komplex aus der Enolether-Doppelbindung des Glykals und dem Palladium aus. Im dritten Schritt kommt es zur *syn*-Insertion der olefinischen  $\pi$ -Bindung in die Palladium-Glykal-Bindung unter Ausbildung einer  $\sigma$ -Bindung. Bei der folgenden  $\beta$ -H-Eliminierung entsteht das Produkt **55** und abschließend wird der Katalysator mit Hilfe einer Base regeneriert.

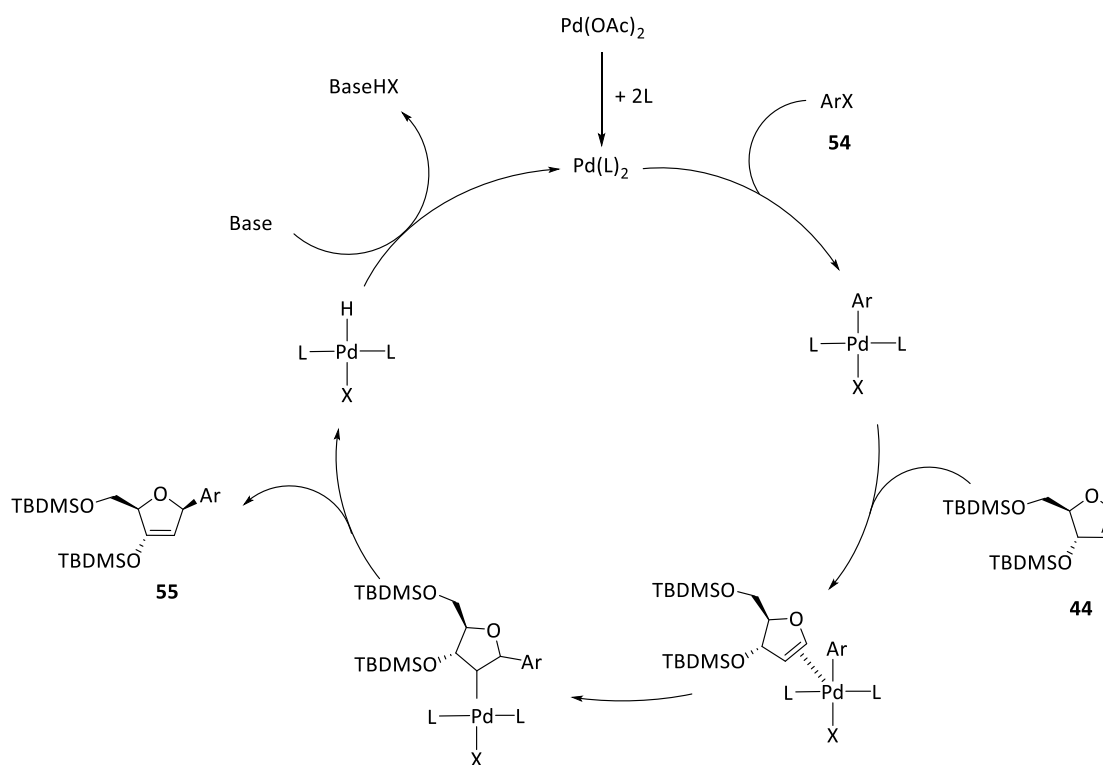


Abbildung 29: C-C-Knüpfungen nach Hocek *et al.*; L = Ligand.<sup>[109]</sup>

Für diesen zentralen Reaktionsschritt (Abbildung 30) zwischen den bromierten Aglykonen **47a-d** oder **48a'** und dem Glykal **44** wurden verschiedene Palladiumkatalysatoren getestet. Es stellte sich heraus, dass  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  den Katalysator der Wahl darstellt. Erwähnenswert ist hier, dass die Reaktionsmischung, bestehend aus **47a-d** oder **48a'**, **44**, Triethylamin und dem Lösemittel Acetonitril, zunächst ohne Katalysator zusammen gegeben und für 10 min im

Ultraschallbad mit Argon durchspült wurde, um vorhandenen Luftsauerstoff aus der Lösung zu entfernen.

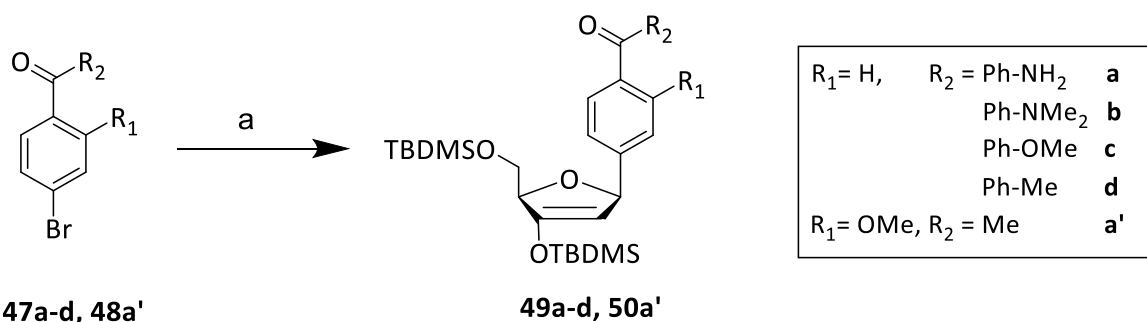


Abbildung 30: Heck-Reaktion von 49a-d, 50a'; a) 44, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, MeCN; Bedingungen und Ausbeuten sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Ausbeuten für diese Reaktion liegen zwischen 45 % und 65 % (Tabelle 3). Die vergleichsweise niedrige Ausbeute von 28 % bei der Synthese von **49b** lässt sich dadurch erklären, dass bei dieser Synthese die Reaktionslösung vor Zugabe des Katalysators nicht wie bei den anderen Heck-Reaktionen im Ultraschallbad entgast wurde, sondern nur mit Argon durchspült wurde.<sup>[102]</sup>

Tabelle 3: Übersicht über die Reaktionsparameter und Ausbeuten der Synthesen von 49a-d, 50a' mittels Heck-Reaktion.

Produkt	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Reaktionszeit	Ausbeute
<b>49a</b>	H	Ph-NH <sub>2</sub>	16 h	65 %
<b>49b</b>	H	Ph-NMe <sub>2</sub>	20 h	28 %
<b>49c</b>	H	Ph-OMe	60 h	46 %
<b>49d</b>	H	Ph-Me	70 h	59 %
<b>50a'</b>	OMe	Me	38 h	45 %

Die Stereoselektivität der Heck-Reaktion kann anhand der relativen Erreichbarkeit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position durch die sterische Abschirmung der TBDMS-Schutzgruppen erklärt werden. Im dargestellten Fall greift das Organopalladiumreagenz von der oberen Seite des

Glykals an, da die Organopalladiumspezies von dem näheren 3'-C-Substituent sterisch effektiver abgeschirmt wird, als von dem 4'-C-Substituenten, welcher weiter von der Enolether-Doppelbindung entfernt ist (Abbildung 31).<sup>[110]</sup>

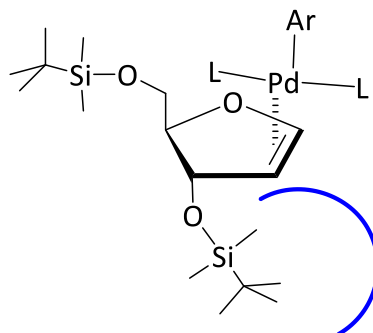


Abbildung 31: Stereoselektivität der Heck-Reaktion an Glykal 44.

Die Regioselektivität lässt sich, wie in Abbildung 32 dargestellt, anhand der Molekülorbitale erläutern. Bei der Reaktion wechselwirkt das HOMO des  $\pi$ -Systems des Enolethers mit dem antibindenden Palladium-Aglykon-Komplex-Orbital. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer  $\sigma$ -Bindung zwischen dem elektronenarmen Palladium-Zentrum und dem elektronenreichen 2'-Kohlenstoffatom und es entsteht das  $\beta$ -Anomer am 1'-C der Ribose.<sup>[110]</sup>

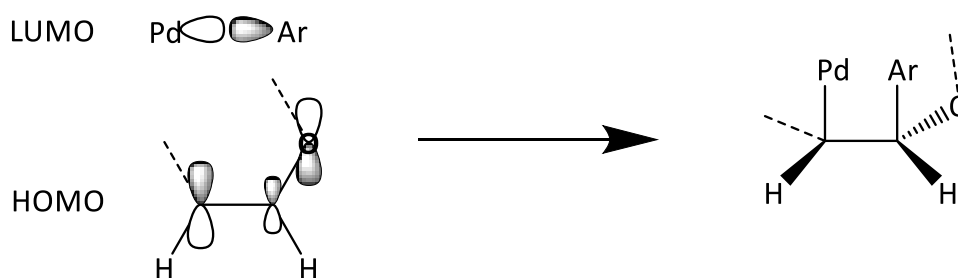


Abbildung 32: Regioselektivität der Heck-Reaktion.<sup>[110]</sup>

Um die ungeschützten C-Nukleoside **1a-d**, **2a'** zu erhalten, wurden zunächst die Hydroxygruppen in 3'- und 5'-Position der Ribose **49a-d**, **50a'** entschützt. Wie aus der Literatur bekannt, geschah dies mit  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$  (Abbildung 33). Die Reduktion der Carbonylfunktion an der 3'-Position erfolgte hierbei aus dem Rohprodukt von **56a-d** oder **57a'** mit Natriumacetoxyborhydrid in einem Essigsäure-Acetonitril-Gemisch (1/1).<sup>[108]</sup>

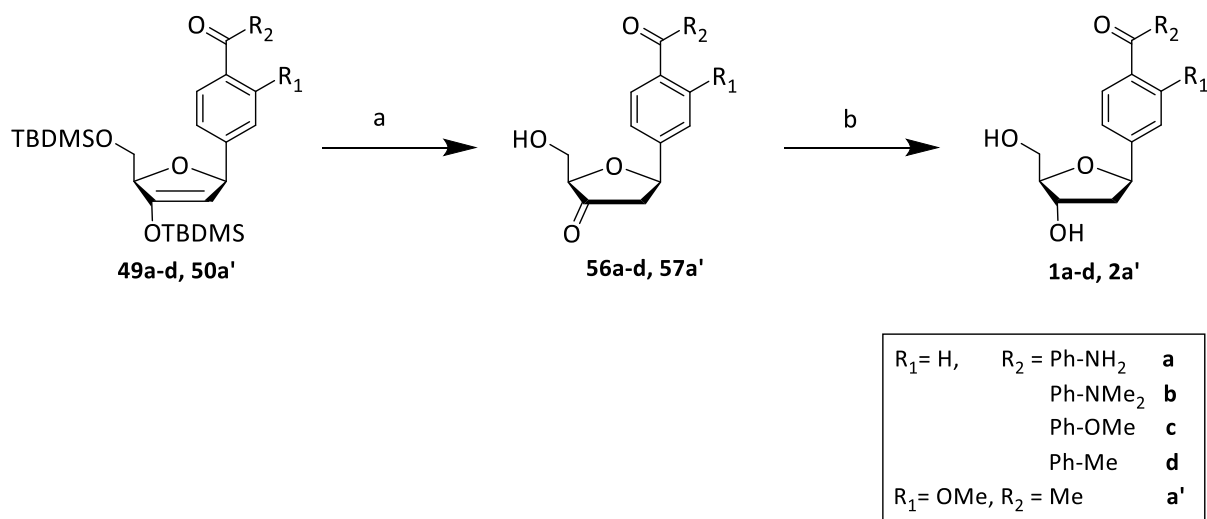


Abbildung 33: Entschützung und Reduktion zur Darstellung von 1a (BPNH<sub>2</sub>-Nuk), 1b (BPNMe<sub>2</sub>-Nuk), 1c (BPOMe-Nuk), 1d (BPMe-Nuk) und 2a' (APOMe-Nuk); a) Et<sub>3</sub>N·3HF, THF, 0 °C – RT; b) NaBH(OAc)<sub>3</sub>, MeCN/AcOH 1/1, 0 °C – RT; Bedingungen und Ausbeuten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Die Ausbeuten für diese beiden Syntheseschritte reichen von 61 % bis 78 % (Tabelle 4).<sup>[102]</sup>

Tabelle 4: Übersicht über die Reaktionsparameter und Ausbeuten der Synthesen von 1a-d, 2a'.

Produkt	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Reaktionszeit der Entschützung	Reaktionszeit der Reduktion	Ausbeute
<b>1a</b>	H	Ph-NH <sub>2</sub>	16 h	120 min	65 %
<b>1b</b>	H	Ph-NMe <sub>2</sub>	16 h	120 min	75 %
<b>1c</b>	H	Ph-OMe	16 h	40 min	75 %
<b>1d</b>	H	Ph-Me	16 h	90 min	61 %
<b>2a'</b>	OMe	Me	16 h	40 min	78 %

Wie aus Abbildung 34 ersichtlich, verläuft auch die Reduktion der Ketofunktion an der 3'-Position stereospezifisch. Da das Boratom an die 5'-Hydroxyfunktion der Ribose koordiniert, kann das Hydrid den Carbonylkohlenstoff nur von einer Seite angreifen.<sup>[111]</sup>



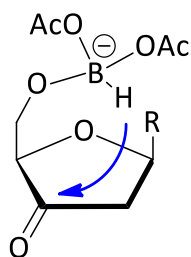


Abbildung 34: Stereoselektive Reduktion der 3'-Carbonylgruppe an 56a-d, 57a'.

Über diese Syntheseroute konnten die verschiedenen C-Nukleoside mit den in Tabelle 5 dargestellten Gesamtausbeuten dargestellt werden.

Tabelle 5: Übersicht über die Gesamtausbeuten der Synthesen von 1a-d, 2a'.

Produkt	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Gesamtausbeute
<b>1a</b>	H	Ph-NH <sub>2</sub>	5 %
<b>1b</b>	H	Ph-NMe <sub>2</sub>	8 %
<b>1c</b>	H	Ph-OMe	33 %
<b>1d</b>	H	Ph-Me	29 %
<b>2a'</b>	OMe	Me	35 %

Diese Nukleoside wurden anschließend auf ihre photokatalytische Aktivität in einer [2+2]-Cycloaddition unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

Für den Einbau der Nukleoside in verschiedene Oligonukleotid-Sequenzen mussten diese weiter modifiziert werden. Im nächsten Reaktionsschritt wurde zunächst die 5'-Hydroxygruppe der Riboseeinheit DMTr-geschützt. Hierfür wurden die Nukleoside **1b-d**, **2a'** mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) in abs. Pyridin über Nacht bei Raumtemperatur umgesetzt. Die anschließende Phosphoramidit-Reaktion wurde in abs. DCM mit DIPEA (Diisopropylethylamin) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (PA-Cl) bei Raumtemperatur durchgeführt (Abbildung 35).

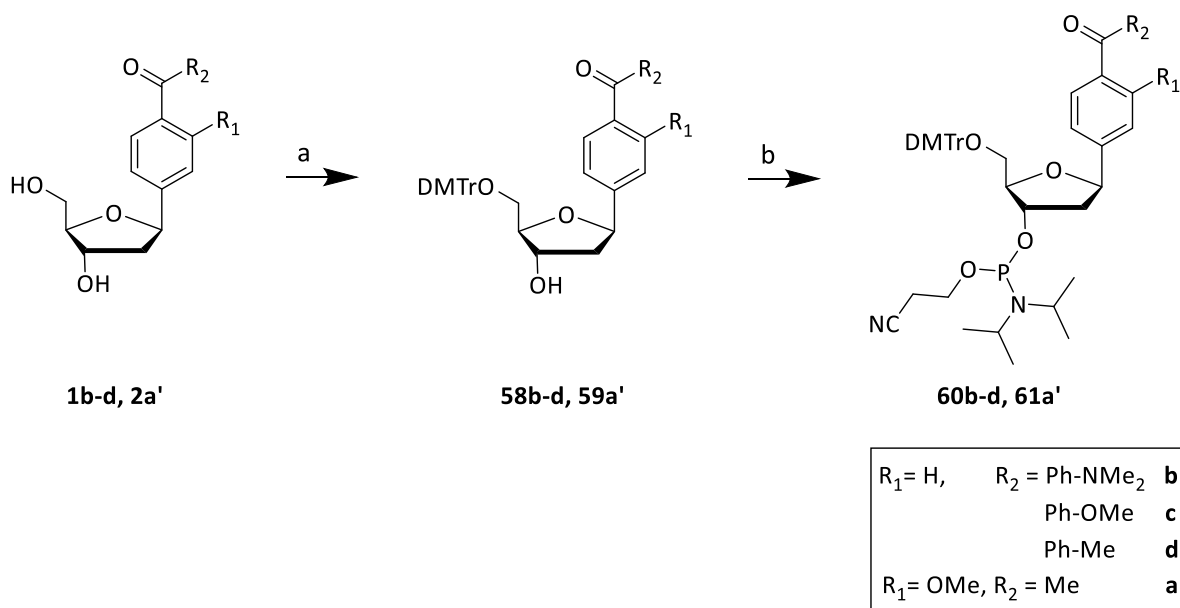


Abbildung 35: DMTr-Schätzung und Phosphoramiditsynthese zur Herstellung von 60b-d, 61a'; a) DMTr-Cl, Pyridin, RT; PA-Cl, DIPEA, DCM, RT; Ausbeuten sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Wie in Tabelle 6 gezeigt, liegen die Ausbeuten der DMTr-Schätzung zwischen 46 % und 68 %, während bei der Phosphoramiditsynthese 65 % bis 97 % erreicht werden konnten.

Tabelle 6: Übersicht über die Ausbeuten der Synthesen von 60b-d, 61a'.

Produkt	$R_1 =$	$R_2 =$	Ausbeute der DMTr-Schätzung	Ausbeute der Phosphoramiditsynthese
<b>60b</b>	H	Ph-NMe <sub>2</sub>	59 %	73 %
<b>60c</b>	H	Ph-OMe	68 %	89 %
<b>60d</b>	H	Ph-Me	60 %	65 %
<b>61a'</b>	OMe	Me	46 %	97 %

## 4.1. Syntheseübersicht

In Abbildung 36 ist eine Übersicht über die komplette Synthese der Zielverbindungen **60b-d** und **61a'** zu sehen.

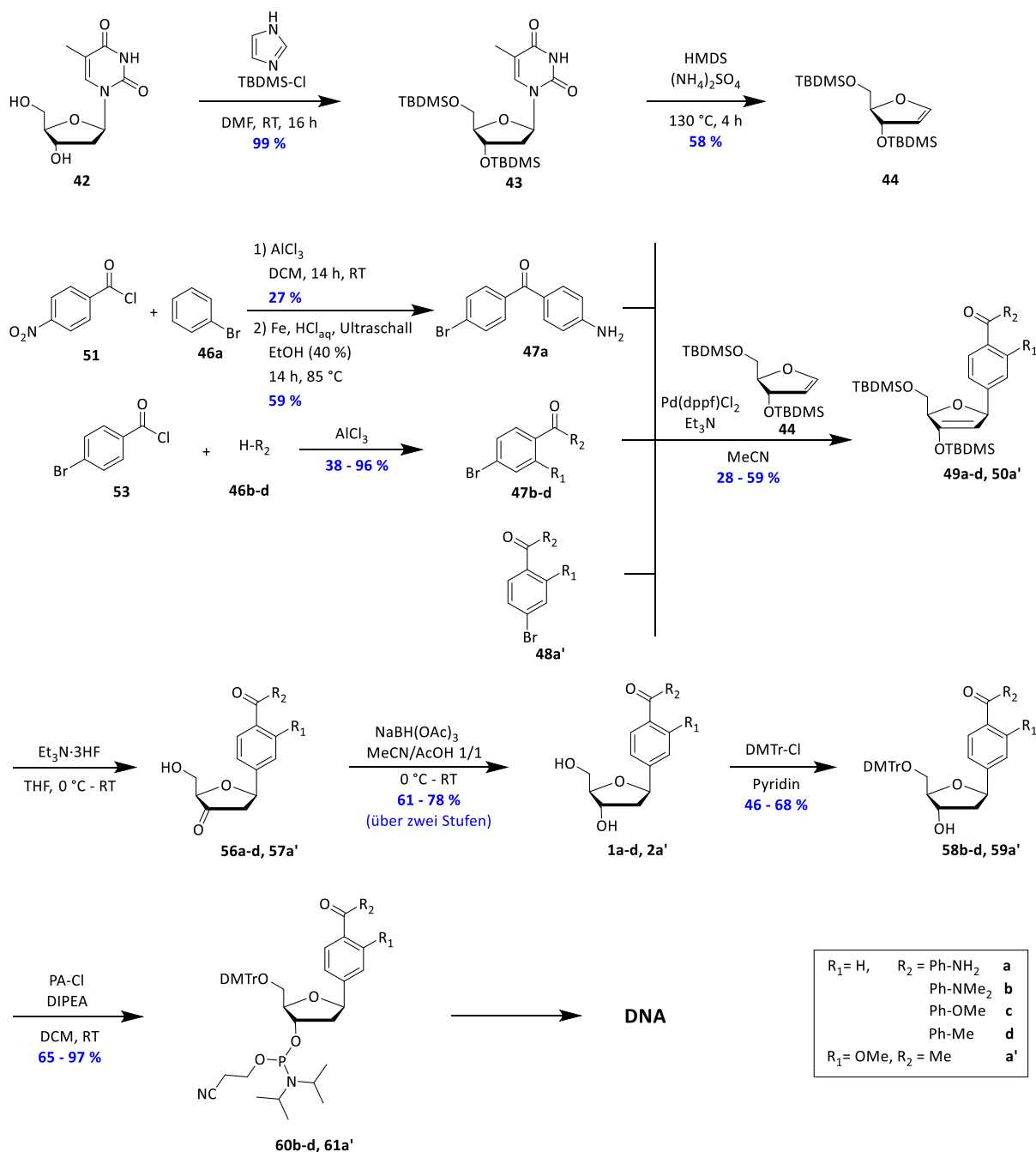
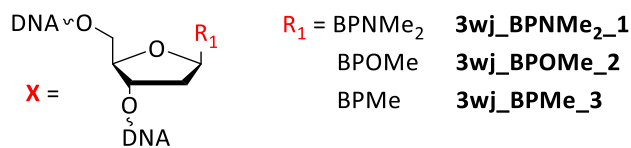


Abbildung 36: Syntheseübersicht von **60b-d** und **61a'**.

## 4.2. Oligonukleotidsynthese und Strangdesign

Die zuvor synthetisierten Phosphoramidite **60b-d**, **61a'** konnten anschließend in verschiedene Oligonukleotid-Sequenzen eingebracht werden. Dafür wurden sie als 0.1 M Lösung in Acetonitril in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt. Kupplungszeit und Menge an Phosphoramidit wurden dabei im Vergleich zu dem Standardprotokoll der natürlichen Basen erhöht, um einen möglichst effizienten Einbau zu erreichen. So konnten die in Abbildung 37 dargestellten DNA-Stränge synthetisiert werden.

3' G-G-A-G-A-C-A-A-G-G-A-A-A-T-C-C-T-T- **X**-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G-G-T-C-T-C-C 5'

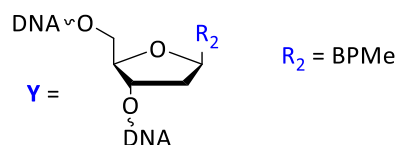


**3wj\_BPMe\_4** 3' G-G-A-G-A-C-A-A-G-G-A-A-A-T-C-C-T-T- **Y**-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G- **Y**-G-T-C-T-C-C 5'

**3wj\_BPMe\_5** 3' G-G-A-G-A-C- **Y**-A-A-G-G-A-A-A-T-C-C-T-T- **Y**-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G- **Y**-G-T-C-T-C-C 5'

**3wj\_BPMe\_6** 3' C-T-G-A-C-A-G-C-A-G-G-G-A-A-A-T-C-C-C-T-A-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G-G-C- **Y**-G-T-C-A-G 5'

**3wj\_BPMe\_7** 3' C-T-G-A-C-A-G-C-A-G-G-G-A-A-A-T-C-C-C-T-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G-G-C- **Y**-G-T-C-A-G 5'



**DNA\_APOMe\_0** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-()A-A-T-A-C-A-G 5'

**DNA\_APOMe\_1** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'

**DNA\_APOMe\_2** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'

**DNA\_APOMe\_3** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'

**DNA\_APOMe\_4** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T-A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'

**DNA\_APOMe\_5** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T-A-T-A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'

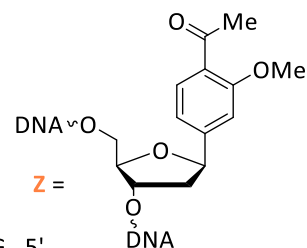


Abbildung 37: Sequenzen der modifizierten *three-way junctions* **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**, **3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3-7** und Strangdesign von **DNA\_APOMe\_0-5**.

Nach Abspaltung von der festen Phase und Reinigung durch *Reversed-Phase*-HPLC wurden die *three-way junction*-Oligonukleotide (**3wj**) mit sich selbst und **DNA\_APOMe\_0-5** mit jeweils den dazugehörigen, kommerziell erworbenen, unmodifizierten (**DNA\_T**) und fluoresceinmodifizierten Oligonukleotiden (**DNA-F\_0-5**) hybridisiert (Abbildung 38).

**DNA\_T** 5' T-A-T-G-T-C 3'  
**DNA\_F\_0** F-5' C-G-C-A-T-A-T-A-( )T 3'  
**DNA\_F\_1** F-5' C-G-C-A-T-A-T-A-(T-A-)T 3'  
**DNA\_F\_2** F-5' C-G-C-A-T-A-T-A-(T-A-T-A-)T 3'  
**DNA\_F\_3** F-5' C-G-C-A-T-A-T-A-(T-A-T-A-T-A-)T 3'  
**DNA\_F\_4** F-5' C-G-C-A-T-A-T-A-(T-A-T-A-T-A-T-A-)T 3'  
**DNA\_F\_5** F-5' C-G-C-A-T-A-T-A-(T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-)T 3'

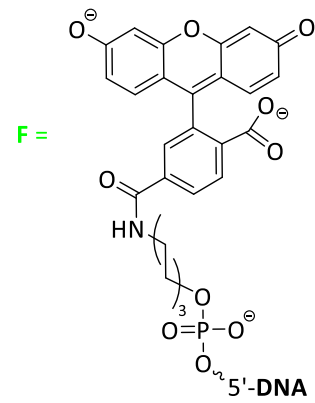


Abbildung 38: Sequenzen der kommerziell erworbenen, unmodifizierten (DNA\_T) und Fluorescein-(F) markierten (DNA\_F\_0-5) DNA-Sequenzen.



## 5. DNA-gestützte, enantioselektive [2+2]-Cycloaddition

Im folgenden Kapitel werden die Anwendbarkeit der benzophenonmodifizierten C-Nukleoside **BPNH<sub>2</sub>-Nuk (1a)**, **BPNMe<sub>2</sub>-Nuk (1b)**, **BPOMe-Nuk (1c)** und **BPMe-Nuk (1d)** sowie die damit modifizierten Oligonukleotide als Sensibilisatoren in der Photokatalyse behandelt. Dabei wird auch auf die Besonderheiten und Schwierigkeiten der DNA-basierten Photokatalyse eingegangen.

### 5.1. [2+2]-Cycloaddition von **8**

Die photokatalytische Aktivität der Sensibilisatoren wurde an dem allgemein gebräuchlichen Substrat 4-Butyl-3'-enyl-1H-chinolin-2-on (**8**) getestet.<sup>[64, 66]</sup> Wie bereits in Kapitel 2.4. erwähnt, reagiert **8** nach Anregung in einer intramolekularen [2+2]-Cycloaddition unter Bildung der Regioisomere **9** und **10**, die jeweils aus den Enantiomerenpaaren **9a&b** und **10a&b** bestehen (Abbildung 39).

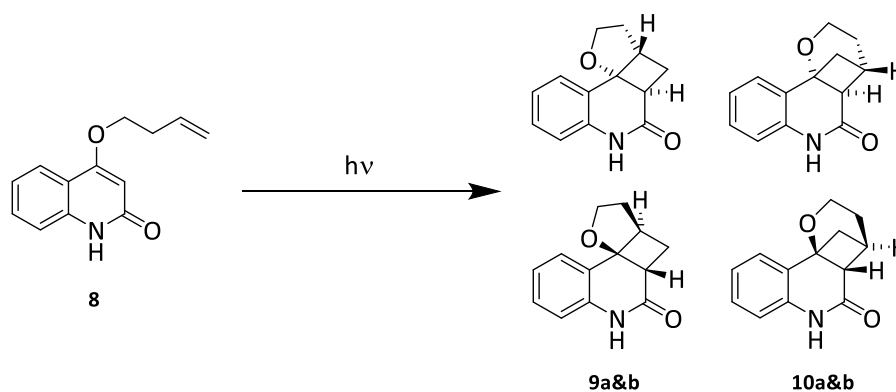


Abbildung 39: Photokatalytische [2+2]-Cycloaddition von **8** zu den Enantiomerenpaaren **9a&b** und **10a&b**.

Die Wahl einer geeigneten Lichtquelle ist abhängig vom Absorptionbereich des Substrats und des Sensibilisators. Der Sensibilisator soll selektiv in einem Wellenlängenbereich angeregt werden, indem das Substrat keine Absorption aufweist. Geeignet ist in diesem Fall eine Belichtungswellenlänge oberhalb von 350 nm, da das Substrat in diesem Bereich nicht

absorbiert (Abbildung 40). Als Lichtquelle dienen Hochleistungs-UV-LEDs deren Emissionsmaximum bei 369 nm liegt.

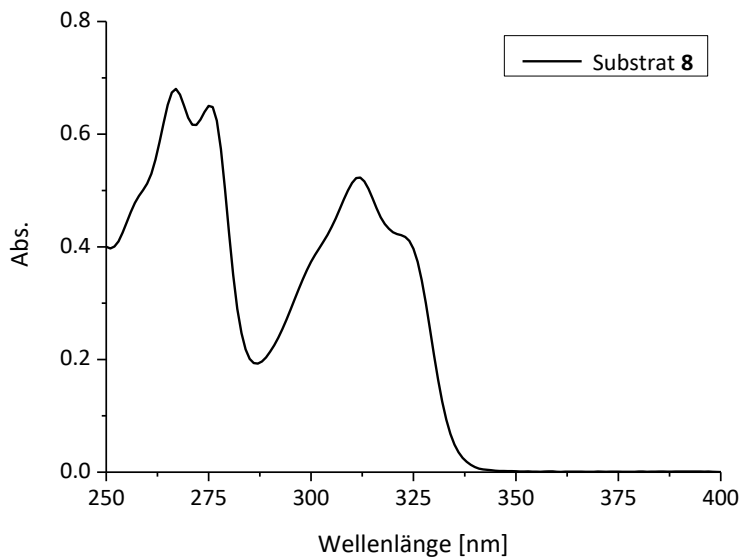


Abbildung 40: UV/Vis-Absorptionsspektrum von Substrat 8 (100 µM).

Der Verlauf der Reaktion wurde mittels HPLC-Analytik verfolgt. Unter Verwendung einer *Chiralpak IB*-Säule mit *n*-Heptan/*i*-Propanol 9/1 als Laufmittel und UV-Detektion bei 242 nm konnte im Chromatogramm über die unterschiedlichen Retentionszeiten zwischen dem Edukt **8** und den vier verschiedenen Produkten **9a&b**, **10a&b** unterschieden werden. Durch Integration der HPLC-Spektren wurden anschließend der Umsatz des Edukts, die Ausbeute und das Regioisomerenverhältnis (rr), sowie der Enantiomerenüberschuss (ee) der Produkte bestimmt. Zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs wurde zu Beginn und während der Belichtung je eine Probe von 250 µL entnommen, vom Lösemittel befreit, im Laufmittel aufgenommen und anschließend mittels HPLC-Analytik charakterisiert. In Abbildung 41 ist zu sehen, dass das Substrat **8** ( $t_R = 13.5$  min) während der Reaktion abnimmt, während sich vier neue *Peaks* bilden. Dabei handelt es sich um die vier Produkte der [2+2]-Cycloaddition. Die Retentionszeiten des Enantiomerenpaares **10** betragen 11.3 min und 12.6 min und die des Enantiomerenpaares **9** 16.0 min und 27.5 min.<sup>[72]</sup>



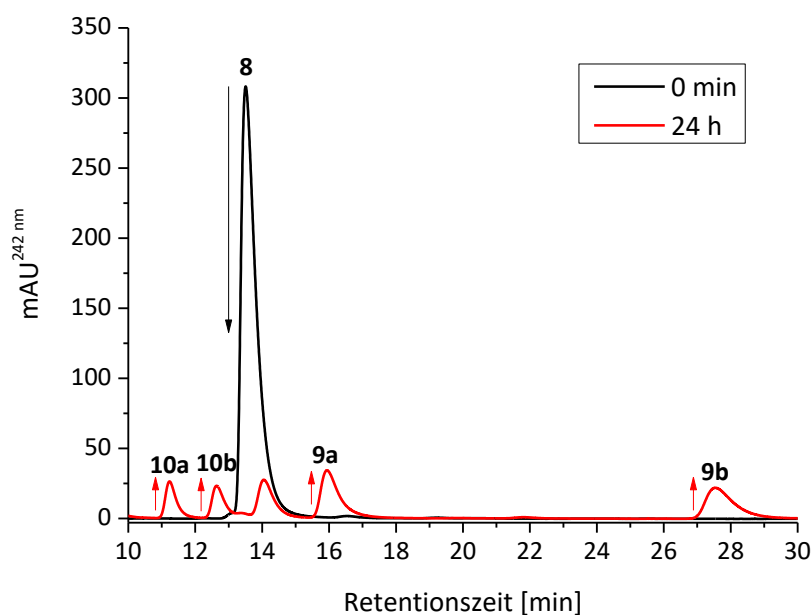


Abbildung 41: Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der [2+2]-Cycloaddition von **8** mittels HPLC-Analytik auf einer *Chiralpak IB*-Säule bei isokratischen Bedingungen; *n*-Heptan/*iso*-Propanol 9/1.

## 5.2. Nicht-nukleosidische Benzophenon-Derivate und C-Nukleoside

Zunächst wurde der Einfluss der elektronenschiebenden Substituenten auf die optischen Eigenschaften der Nukleoside analysiert. Die Messungen wurden in H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1 durchgeführt, welches auch das Lösemittelgemisch für die später durchgeführten Photokatalysen darstellt. Die typische Absorption von unsubstituiertem Benzophenon (**BP**) kann auf die  $\pi\pi^*$ - und  $n\pi^*$ -Übergänge der Carbonylfunktion zurückgeführt werden.<sup>[112]</sup> Mit einer zusätzlichen, elektronenschiebenden Gruppe wird das Absorptionsspektrum des Benzophenons um einen *Charge-Transfer*-Zustand (CT) erweitert<sup>[95]</sup>, welcher in den Absorptionsspektren der synthetisierten Nukleoside **BPNH<sub>2</sub>-Nuk**, **BPNMe<sub>2</sub>-Nuk** und **BPOMe-Nuk** klar ersichtlich ist (Abbildung 42). Das am weitesten bathochrom verschobene **BPNMe<sub>2</sub>-Nuk** hat sein Absorptionsmaximum bei 370 nm, während **BPNH<sub>2</sub>-Nuk** und **BPOMe-Nuk** bei 335 nm und 295 nm maximal absorbieren. Das Chromatogramm des methylsubstituierten Nukleosids **BPMe-Nuk** ( $\lambda_{\text{max}} = 270$  nm) ist dem von Benzophenon ( $\lambda_{\text{max}} = 257$  nm) sehr ähnlich. Die unsymmetrische Form des Chromatogramms und die breite Schulter bei ca. 290 nm lassen auch hier auf das Vorliegen einer CT-Bande schließen. Zu sehen ist auch, dass mit zunehmendem elektronenschiebendem Charakter der

Substituenten die bathochrome Verschiebung der CT-Bande der jeweiligen Nukleoside zunimmt.

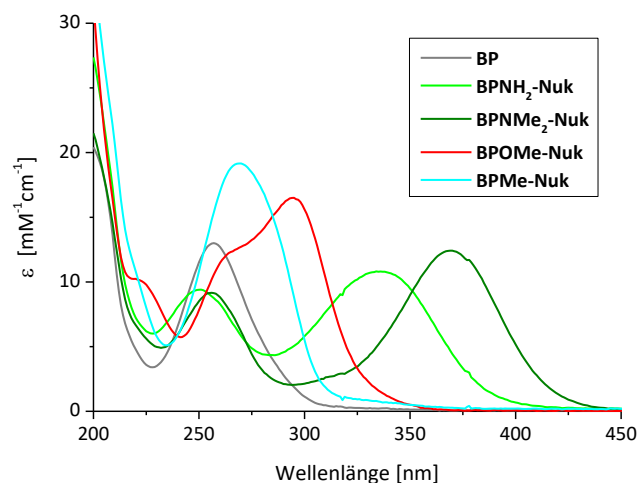


Abbildung 42: UV/Vis-Absorptionsspektrum von BPNH<sub>2</sub>-Nuk, BPNMe<sub>2</sub>-Nuk und BPOMe-Nuk in H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1 (20 µM).<sup>[102]</sup>

Im Vergleich zum Absorptionsspektrum der freien, nicht-nukleosidischen Benzophenon-Derivate<sup>[93, 95, 113]</sup> (Abbildung 22), ist das Maximum bei allen Nukleosiden um 1-4 nm bathochrom verschoben. Außerdem wird durch die Verknüpfung mit dem Zucker der Extinktionskoeffizient leicht herabgesenkt.<sup>[102]</sup>

*Suppan et al.* haben gezeigt, dass sich die CT-Bande von **BP** in polaren Lösemitteln wie *iso*-Propanol energetisch unterhalb der  $n\pi^*$ -Bande befindet, während es in unpolaren Lösemitteln wie Cyclohexan umgekehrt der Fall ist.<sup>[95]</sup> Daher wird angenommen, dass der für die photokatalytische Reaktion von Substrat **8** nötige TTET in wässrigen Lösungen hauptsächlich aus dem CT-Zustand der Nukleoside hervorgeht. Diese Annahme wird außerdem durch den Solvatochromie-Effekt bestätigt, der am Beispiel des substituierten Benzophenon-Nukleosids mit dem stärksten Elektronendonator (**BPNMe<sub>2</sub>-Nuk**), am deutlichsten zu sehen ist. Wie in Abbildung 43 erkenntlich, verschiebt sich das Absorptionsmaximum der CT-Bande hin zu geringeren Wellenlängen bei Abnahme der Polarität des Lösemittels. Die größte bathochrome Verschiebung ist in Wasser/MeCN 4/1 (+ 10 mM NaP<sub>i</sub>) zu sehen, wobei das Absorptionsmaximum von **BPNMe<sub>2</sub>-Nuk** bei 370 nm liegt, gefolgt von Methanol mit 356 nm und Acetonitril bei 346 nm.<sup>[102]</sup> Diese Beobachtungen passen gut zu den von *Reichardt et al.* aufgestellten  $E_T(30)$ -Werten für die Polarität der

Lösemittel. Dabei wurde anhand der längstwelligen Absorptionsbande von 2,6-Diphenyl-4-(2,4,6-triphenylpyridinio)phenolat verschiedenen Lösemitteln ein empirischer Parameter zugeordnet. Wasser hat ein  $E_T(30)$ -Wert von 63.1 kcal/mol, Methanol liegt bei 55.5 kcal/mol und Acetonitril bei 46.0 kcal/mol.<sup>[114]</sup>

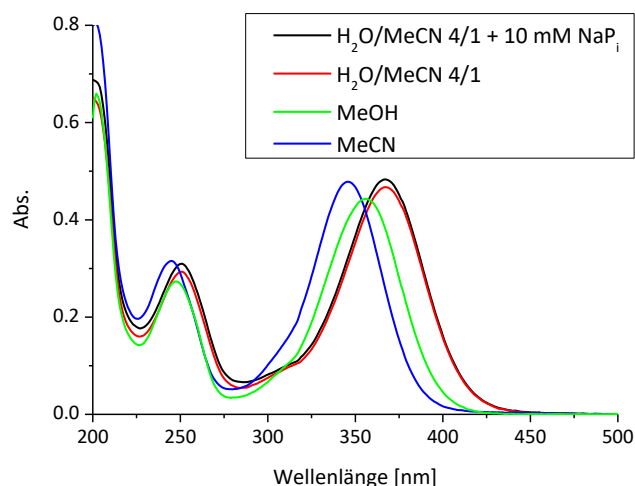


Abbildung 43: UV/Vis-Absorptionsspektrum von 20  $\mu\text{M}$  BPNMe<sub>2</sub>-Nuk in verschiedenen Lösemitteln.<sup>[102]</sup>

Aus Tabelle 7 sind die Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Nukleoside an den Absorptionsmaxima ( $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$ ) und am Emissionsmaximum der verwendeten LED ( $\epsilon_{369 \text{ nm}}$ ) ersichtlich. Für alle Photokatalysen wurde als Energiequelle eine LED mit einem Emissionsmaximum bei 369 nm (Emissionsbereich: 350-420 nm; siehe Kapitel 8.4.1.) verwendet. Obwohl die jeweiligen Extinktionskoeffizienten der Nukleoside bei 369 nm ziemlich gering ( $0.3 - 9.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) im Vergleich zu den Extinktionskoeffizienten ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima ( $13.0 - 22.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) sind, ist diese Anregungswellenlänge erforderlich, um eine direkte Anregung des Substrats **8** zu vermeiden.<sup>[102]</sup>

Tabelle 7: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der substituierten BP-Nukleoside in Wasser und MeCN.<sup>[102]</sup>

Nukleosid	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$ [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	$\epsilon_{369 \text{ nm}}$ [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]
	in Wasser	in MeCN	in MeCN	in MeCN
BPNH <sub>2</sub> -Nuk	335	321	13.0	1.1
BPNMe <sub>2</sub> -Nuk	370	345	14.3	7.6
BPOMe-Nuk	293	285	15.4	0.6
BPMMe-Nuk	270	262	22.4	0.1

Um die Katalysator-tauglichkeit der synthetisierten Benzophenon-C-Nukleoside mit den nicht-nukleosidischen Benzophenon-Derivaten vergleichen zu können, wurden zunächst die in Tabelle 8 aufgeführten Katalysen durchgeführt. Dabei wurden die nicht-nukleosidischen Benzophenon-Derivate **BP**, **BPNH<sub>2</sub>**, **BPNMe<sub>2</sub>**, **BPOMe** und **BPMe** und die synthetisierten C-Nukleoside **BPNH<sub>2</sub>-Nuk**, **BPNMe<sub>2</sub>-Nuk**, **BPOMe-Nuk** und **BPMe-Nuk** als Katalysatoren verwendet. Bei allen Ansätzen wurde ein stöchiometrischer Ansatz mit jeweils 100 µM Katalysator und 100 µM Substrat **8** gewählt. Die Katalysen wurden bei 10 °C in reinem Acetonitril unter Argonatmosphäre durchgeführt. Vor den Belichtungen bei 369 nm wurden die Lösungen zusätzlich 10 min mit Argon durchspült, um unerwünschte Nebenreaktionen durch Luftsauerstoff auszuschließen. Durch Probenentnahmen zu Beginn und während der Reaktion konnten der Reaktionsverlauf und damit die Zeit der maximalen Ausbeute nachvollzogen werden.

Tabelle 8: Übersicht über die durchgeführten Belichtungsexperimente mit BP, BPNH<sub>2</sub>, BPNMe<sub>2</sub>, BPOMe, BPMe, BPNH<sub>2</sub>-Nuk, BPNMe<sub>2</sub>-Nuk, BPOMe-Nuk und BPMe-Nuk; 100 µM Katalysator, 100 µM Substrat **8**, Lösemittel: MeCN, 369 nm, 10 °C.

Ansatz	Katalysator	Belichtungszeit zur maximalen Ausbeute [min]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	Belichtungszeit [min]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
1	<b>BP</b>	7	98	65	360	98	28
2	<b>BPNH<sub>2</sub></b>	240	64	24	360	85	24
3	<b>BPNMe<sub>2</sub></b>	120	78	41	360	94	27
4	<b>BPOMe</b>	5	63	61	360	100	0
5	<b>BPMe</b>	10	90	83	360	52	23
6	<b>BPNH<sub>2</sub>-Nuk</b>	240	68	32	360	84	27
7	<b>BPNMe<sub>2</sub>-Nuk</b>	180	81	50	360	87	48
8	<b>BPOMe-Nuk</b>	5	97	75	360	99	35
9	<b>BPMe-Nuk</b>	5	95	99	360	39	1

Zu erwähnen ist auch, dass durch ein Kontrollexperiment die ablaufende Hintergrundreaktion quantifiziert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die [2+2]-Cycloaddition ohne Katalysator in MeCN nach 6 h Belichtung 16 % Ausbeute bei 38 % Umsatz des Edukts erzielt. Durch Wiederholung einiger Experimente konnten die Ergebnisse mit  $\pm 5$  % reproduziert werden. In Tabelle 8 sind die Werte für die jeweilige Belichtungszeit zur maximalen Ausbeute und zusätzlich die Werte nach 360 min Belichtungszeit als Vergleichswert aufgeführt. Sowohl bei den nicht-nukleosidischen Benzophenon-Derivaten, als auch bei den korrespondierenden C-Nukleosiden ist zu sehen, dass die aminosubstituierten-Benzophenone trotz der vielversprechenden optischen Eigenschaften, aufgrund ihrer hohen Extinktionskoeffizienten bei 369 nm, mit 24-50 % Ausbeute die schlechtesten Ergebnisse liefern und zusätzlich eine längere Belichtungszeit benötigen (Tabelle 8, Ansatz 2-3 und 6-7). Wohingegen die methoxy- und methylsubstituierten Benzophenone Ausbeuten über 61 % (**BPOMe**; Tabelle 8, Ansatz 4) erzielen. Mit **BPOMe-Nuk** konnten 75 % Ausbeute bei 97 % Umsatz des Edukts erreicht werden (Tabelle 8, Ansatz 8), gefolgt von den methylsubstituierten Benzophenonen mit 83 % Ausbeute (**BPMe**, 90 % Umsatz; Tabelle 8, Ansatz 5) und 99 % Ausbeute (**BPMe-Nuk**, 95 % Umsatz; Tabelle 8, Ansatz 9). Erwähnenswert ist dabei, dass sich der Zuckerrest positiv auf die Reaktion auswirkt, da mit den Nukleosiden in allen Fällen eine höhere Ausbeute erzielt werden konnte, als mit den korrespondierenden nicht-nukleosidischen Benzophenon-Derivaten. Bei allen Experimenten wurde das Enantiomerenpaar **9** bevorzugt gebildet. Aus Tabelle 8 ist außerdem zu erkennen, dass die Ausbeuten der Produkte **9** und **10** besonders nach längeren Belichtungszeiten nicht mit dem Umsatz des Edukts **8** übereinstimmen. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Produkte durch die Belichtung wieder abgebaut werden, möglicherweise durch H-Abstraktion der angeregten Benzophenon-Derivate.<sup>[55]</sup>

Um Katalysen mit DNA als Templat zu realisieren, war es für die nachfolgenden Experimente nötig, ein wässriges Lösemittelgemisch zu finden, in dem alle Reaktionspartner löslich sind und in dem eine bestmögliche Ausbeute gewährleistet ist. Es ergab sich, dass eine Mischung aus H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8.5) dafür geeignet ist. Der Anteil an Acetonitril wird benötigt, um das wasserunlösliche Substrat **8** in Lösung zu bringen, wohingegen das wässrige Milieu für die Löslichkeit der DNA sorgt. Im nächsten Schritt wurden unter diesen geänderten Bedingungen die Katalysatortauglichkeiten der C-Nukleoside erneut geprüft. Dabei wurde bei allen Ansätzen sowohl ein stöchiometrischer Ansatz (100  $\mu$ M Katalysator,

100 mol%) als auch ein substöchiometrischer Ansatz (25  $\mu\text{M}$  Katalysator, 25 mol%) bei Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  Substrat **8** getestet. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse für die jeweilige Belichtungszeit zur maximalen Ausbeute und zusätzlich die Werte nach 30 min Belichtungszeit als Vergleichswert einzusehen.

Tabelle 9: Übersicht über die durchgeführten Belichtungsexperimente; 100  $\mu\text{M}$  Substrat **8**, Lösemittel:  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  4/1 + 10 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 8.5), 369 nm, 10 °C.<sup>[102]</sup>

Ansatz	Katalysator	c (Kat) [ $\mu\text{M}$ ]	Belichtungszeit zur maximalen Ausbeute [min]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	Belichtungszeit [min]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
1	<b>BPNH<sub>2</sub>-Nuk</b>	100	nur Hintergrundreaktion					
2	<b>BPNMe<sub>2</sub>-Nuk</b>	100						
5	<b>BPOMe-Nuk</b>	100	25	79	48	30	85	47
6	<b>BPMe-Nuk</b>	100	15	88	77	30	89	64
3	<b>BPNH<sub>2</sub>-Nuk</b>	25	nur Hintergrundreaktion					
4	<b>BPNMe<sub>2</sub>-Nuk</b>	25						
7	<b>BPOMe-Nuk</b>	25	120	85	51	30	33	14
8	<b>BPMe-Nuk</b>	25	60	88	53	30	66	46

Das Kontrollexperiment ohne Photosensibilisator ergab unter diesen Bedingungen, dass die Hintergrundreaktion nach 6 h Belichtung mit 5 % Ausbeute und 15 % Umsatz des Edukts abläuft. Selbst durch Variation der Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Puffer-System usw.) konnte unter Verwendung der aminosubstituierten Benzophenon-Nukleoside **BPNH<sub>2</sub>-Nuk** und **BPNMe<sub>2</sub>-Nuk** in wässrigem Lösemittel lediglich das Auftreten der Hintergrundreaktion beobachtet werden (Tabelle 9, Ansatz 1-2 und 3-4). Dies könnte durch den Wechsel zu einem polareren, protischen Lösemittelgemischs und dem damit einhergehenden Solvatochromie-Effekt (bathochrome Verschiebung) bei den besonders elektronenreichen, aminosubstituierten Nukleosiden zu erklären sein. Aufgrund des wässrigen Mediums ist die Energie des CT-Zustandes nicht mehr ausreichend, um die [2+2]-Cycloaddition zu katalysieren. Ein weiterer Grund könnte ein Protonentransfer auf Benzophenon sein,

welcher aufgrund des angeregten Zustands mit dem protonenreichen Lösemittel stattfinden kann. Es wird vermutet, dass dieser Protonentransfer mit dem notwendigen Energietransfer des photokatalytischen Experiments konkurriert.<sup>[102]</sup>

Im Vergleich dazu waren die Katalysen mit **BPOMe-Nuk** und **BPMMe-Nuk** im wässrigen Lösemittelgemisch erfolgreich (Tabelle 9, Ansatz 5-6 und 7-8). Die CT-Zustände beider Nukleoside scheinen auch unter wässrigen Bedingungen genügend Energie aufzuweisen, um diese auf das Substrat zu übertragen. Außerdem ist die Basizität der methoxy- und methylsubstituierten Nukleoside, im Vergleich zu den aminosubstituierten Nukleosiden, aufgrund der fehlenden Amino-Funktionalität wesentlich geringer, wodurch der konkurrierende Protonentransfer vermindert oder ausgeschlossen werden kann. Bei Verwendung von **BPOMe-Nuk** als Sensibilisator in stöchiometrischen Mengen (100 µM) wurden die besten Ergebnisse von 48 % Ausbeute und 79 % Umsatz nach 25 min Belichtungszeit erreicht (Tabelle 9, Ansatz 5). Ein substöchiometrischer Versuch (25 µM) lieferte nach 120 min Belichtungszeit eine Ausbeute von 51 % bei 85 % Umsatz (Tabelle 9, Ansatz 7). Mit **BPMMe-Nuk** konnte bereits nach 15 min eine Ausbeute von 77 % und 88 % Umsatz bei stöchiometrischen Katalysatormengen (100 µM) erreicht werden (Tabelle 9, Ansatz 6). Der substöchiometrische Ansatz (25 µM) ergab nach 60 min Belichtung 53 % Ausbeute und 88 % Umsatz. Alle zuletzt genannten Katalysen lieferten eine Mischung der Regioisomere **9/10** in einem Verhältnis von 2.2/1. Auch bei den Katalysen unter wässrigen Bedingungen ist der Abbau der Produkte bei andauernder Belichtung sichtbar. Ein Verlust an Ausbeute wurde besonders zwischen 15 min und 30 min Belichtungszeit festgestellt. Dabei fand der Abbau der Produkte **9** und **10** in Anwesenheit von **BPOMe-Nuk** schneller als mit **BPMMe-Nuk** als Katalysator statt (Abbildung 44).<sup>[102]</sup> Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die Nukleoside **BPOMe-Nuk** und **BPMMe-Nuk** zur Entwicklung von photokatalytisch-aktiven *DNAzymen* zur Anwendung in der enantioselektiven Photokatalyse in wässrigen Systemen eignen.

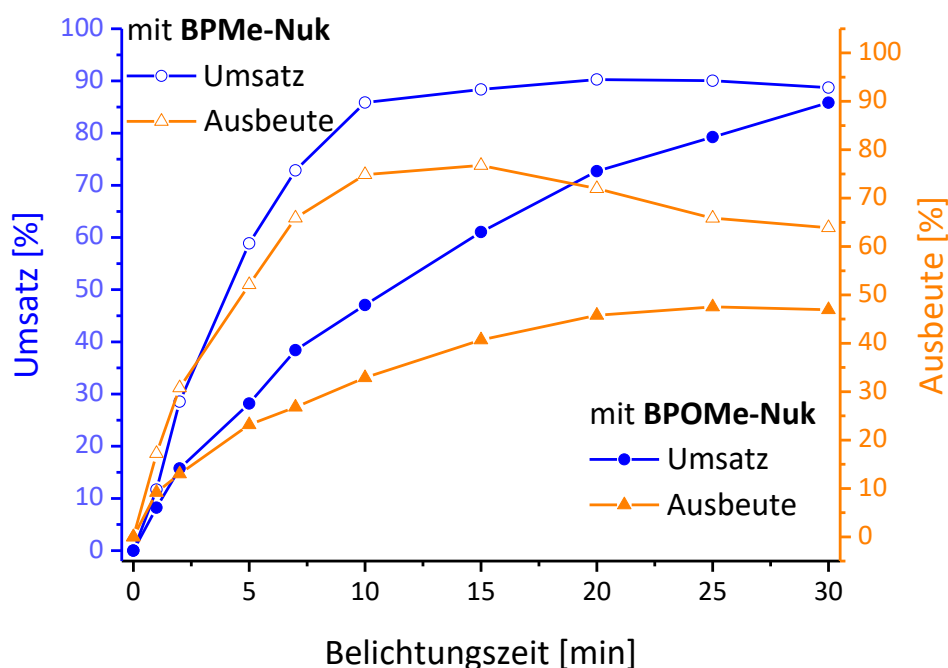


Abbildung 44: Zeitabhängiger Umsatz von **8** und Ausbeute von **9** und **10** in Anwesenheit von BPOMe-Nuk und BPMe-Nuk. Bedingungen: 100  $\mu\text{M}$  BPOMe-Nuk oder BPMe-Nuk, 100  $\mu\text{M}$  **8**,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  4/1 +  $\text{NaP}_i$  (10 mM, pH 8.5), 369 nm LED, 10  $^\circ\text{C}$ .<sup>[102]</sup>

Mittels DNA-Festphasensynthese wurden verschiedene, modifizierte Oligonukleotidsequenzen hergestellt, die **BPMe-Nuk** anstelle einer natürlichen Base beinhalten. Auch nach Variation der Nachbarbasen, Gegenbase, Einbau von abasischen Stellen oder mehrere Basen umfassende Linker im komplementären Gegenstrang konnte keine katalytische Aktivität der modifizierten Oligonukleotide in Bezug auf die [2+2]-Cycloaddition festgestellt werden. Es wurde gefolgert, dass Voraussetzung für eine katalytische Aktivität die räumliche Nähe darstellt, die für den Energietransfer vom Photosensibilisator auf das Substrat benötigt wird. Durch eine Interkalation des Benzophenon-Derivats in den Basenstapel der DNA ist diese Nähe vermutlich nicht gegeben, wodurch das katalytische Zentrum nicht erreicht wird. Daher wurden nachfolgend verschiedene Ansätze getestet um die räumliche Nähe zwischen Katalysator und Substrat **8** zu gewährleisten.



### 5.3. Nicht-kovalenter Ansatz

Entsprechend dem Ansatz von *Roelfes* (siehe Kapitel 2.5.) wurde ein modifiziertes 4-Methylbenzophenon-System synthetisiert, bei welchem der Katalysator an eine DNA-interkalierende Einheit gebunden ist. Die Idee ist, dass sich der Katalysator durch die Anknüpfung an das interkalierende System zwar in unmittelbarer Nähe zur DNA-Doppelhelix befindet, um den notwendigen Chiralitätstransfer zu gewährleisten, sich jedoch nicht in den Basenstapel einlagert. Dadurch soll die sterische Abschirmung gegenüber dem Substrat verhindert werden. Die Schwierigkeit hierbei stellte die Wahl eines geeigneten Interkalators dar. Es muss ein System verwendet werden, das bei geringeren Wellenlängen als 350 nm absorbiert, um eine direkte Anregung des Substrats zu vermeiden. Dieses Kriterium schließt sämtliche aromatische und konjugierte Moleküle aus. Für diese Arbeit wurde getestet, ob der Zuckerrest von **BPMe-Nuk** ausreichende Interkalator-Fähigkeiten aufweist. Außerdem wurde in einer zweistufigen Synthese **BPMe-Cyclohex** hergestellt, bei welchem 4-Methylbenzophenon über die 4'-Position an Cyclohexan bindet (Abbildung 45).

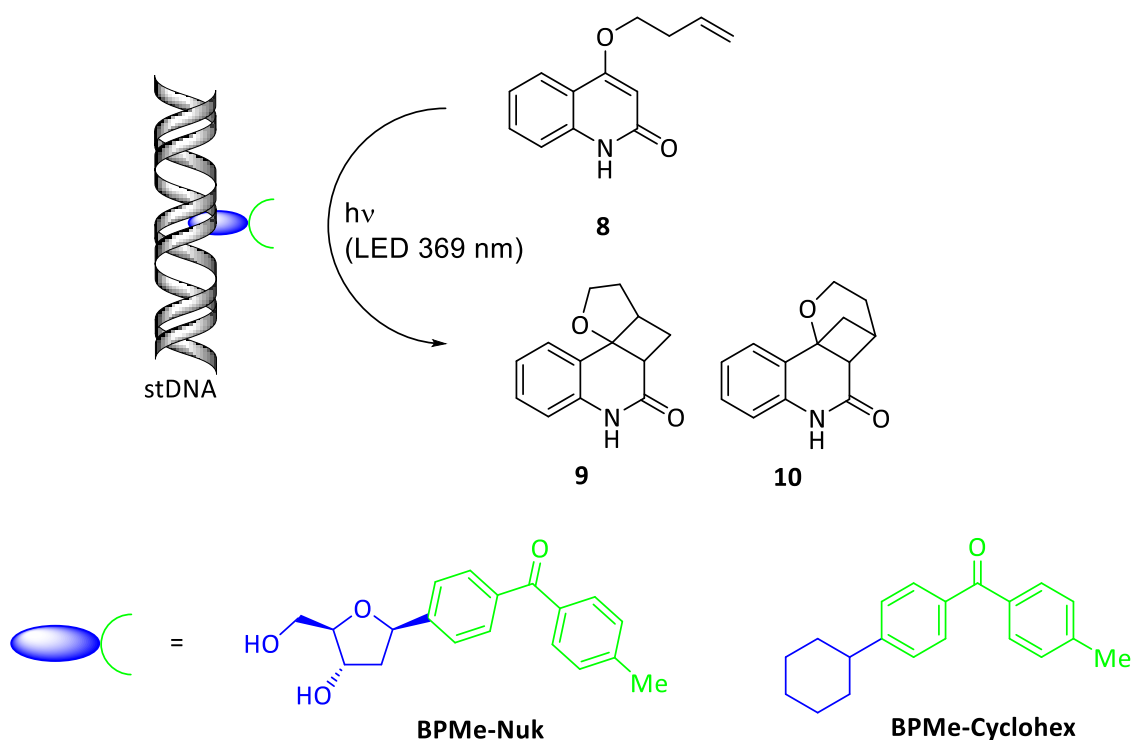


Abbildung 45: Prinzip der asymmetrischen [2+2]-Cycloaddition nach dem Vorbild von *Roelfe*, katalysiert durch **BPMe-Nuk** oder **BPMe-Cyclohex** in Anwesenheit von Lachshoden-DNA.

Es wurden 100  $\mu\text{M}$  Substrat **8** und jeweils 20  $\mu\text{M}$  Katalysator (**BPMe-Nuk** oder **BPMe-Cyclohex**) verwendet. Die Katalysen wurden im Lösemittelsystem  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  4/1,

## DNA-gestützte, enantioselektive [2+2]-Cycloaddition

10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8.5), 250 mM NaCl bei 10 °C und 369 nm durchgeführt. Als chiraler Zusatz zur Reaktionslösung dienten jeweils 1.3 mg/mL Lachshoden-DNA. Diese Menge an DNA hat sich bei den Experimenten von *Roelfes et al.* als bewährt erwiesen.<sup>[82]</sup> In Tabelle 10 sind die Ergebnisse für die jeweilige Belichtungszeit zur maximalen Ausbeute aufgeführt. Ansatz 1 mit **BPMe-Nuk** als Katalysator lieferte nach 4 h Reaktionszeit eine Ausbeute von 33 % bei 96 % Umsatz, während bei Verwendung von **BPCyclohex** (Ansatz 2, Tabelle 10) lediglich 21 % Ausbeute bei 33 % Umsatz nach 5 h erreicht wurden. Bei beiden Ansätzen konnte keine Enantioselektivität und somit kein asymmetrischer Einfluss der DNA festgestellt werden. Es wird vermutet, dass weder der Zuckerrest in **BPMe-Nuk** noch Cyclohexan in **BPCyclohex** ausreichend gute Interkalatoren darstellen und somit die chirale Struktur der DNA keine Auswirkung auf die Reaktion hat. Außerdem scheint der Zusatz von DNA die Produktbildung zu verlangsamen, wodurch die Zersetzung der Produkte durch die benötigte längere Belichtungszeit größeren Einfluss auf die Ausbeute zeigt.

**Tabelle 10:** Übersicht über die nach dem Beispiel von *Roelfes* durchgeführten Belichtungsexperimente; 100  $\mu$ M Substrat 8, 20  $\mu$ M Katalysator, 1.3 mg/mL Lachshoden-DNA (stDNA), Lösemittel: H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8.5), 250 mM NaCl, 369 nm, 10 °C.

Ansatz	Katalysator	Belichtungszeit zur maximalen Ausbeute [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	rr (9/10)	ee
1	<b>BPMe-Nuk</b>	4	96	33	76/24	-
2	<b>BPMe-Cyclohex</b>	5	33	21	65/35	-

#### 5.4. Spezifische Aptamere: SELEX-Verfahren

Eine weitere Möglichkeit, ein Substrat in die helikale DNA-Struktur einzubringen, ist die Verwendung von Aptameren. Ein Aptamer ist fähig, ein spezifisches Molekül zu erkennen und über seine Sekundärstruktur zu binden. Um solche DNA-Sequenzen zu selektieren, wurde 1990 von *Ellington* und *Gold* zeitgleich die SELEX-Methode entwickelt.<sup>[85, 88]</sup> Beim klassischen SELEX-Prozess wird zu einer DNA-Bibliothek mit einem Zufalls-Sequenz-Bereich das auf einer festen Phase immobilisierte Targetmolekül gegeben. Anschließend werden durch Waschschriffe die Sequenzen aus dem DNA-Pool entfernt, die keine Bindungsaffinität an das Targetmolekül aufweisen. Durch die folgende Elution werden die bindenden Sequenzen gesammelt und mittels PCR vervielfältigt. Nach Aufreinigung durchlaufen die erhaltenen Sequenzen den Zyklus erneut. Erst nach 10-20 Wiederholungen ist der DNA-Pool mit den Sequenzen angereichert, die eine Bindungseigenschaft aufweisen. Diese werden zum Schluss voneinander getrennt und analysiert.<sup>[88, 115]</sup>

Im Rahmen eines Auslandsaufenthalts in Kanada wurde mit der Arbeitsgruppe *Sen* im *Department of Molecular Biology and Biochemistry* der *Simon Fraser University* in Vancouver (British Columbia) unter Verwendung des SELEX-Verfahrens nach Oligonukleotiden gesucht, die Bindungsaffinität gegenüber dem Targetmolekül **62** aufweisen. Ein gutes Targetmolekül zeichnet sich unter anderem durch die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aus, darum wurde Substrat **8** leicht modifiziert und somit Targetmolekül **62** entwickelt (Abbildung 46). Zusätzlich zu den verbesserten Selektionseigenschaften ist es immer noch fähig, eine lichtinduzierte [2+2]-Cycloaddition einzugehen.

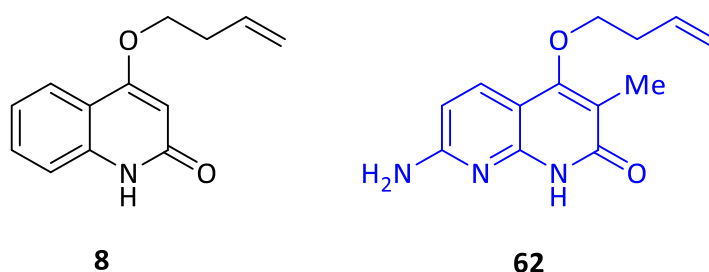


Abbildung 46: Links: Herkömmliches Substrat **8** (schwarz); rechts: leicht abgeändertes Targetmolekül **62** für das SELEX-Verfahren (blau).

Dabei wurde das SELEX-Verfahren nach *Li et al.* verwendet, welches für kleine Moleküle gut geeignet ist. Es unterscheidet sich vom herkömmlichen SELEX-Prozess darin, dass nicht das Targetmolekül an einer festen Phase immobilisiert ist, sondern die DNA-Bibliothek immobilisiert vorliegt.

Wie in Abbildung 47 zu sehen, wurde eine spezielle DNA-Bibliothek verwendet. Diese ist aufgebaut aus einer zentralen, unveränderlichen Sequenz bestehend aus 15 Nukleotiden (rot), welche an beiden Enden jeweils an eine Zufallssequenz von 10 und 20 Nukleotiden grenzt (grün), die wiederum mit Primerbindungssequenzen verbunden sind (schwarz). Die blaumarkierte Einheit wird benötigt, um einen flexiblen, einzelsträngigen Sequenzbereich zu bilden, der die beiden Zufallssequenzen unterstützen soll, sich gegenseitig zu finden. Die zentrale, unveränderliche Sequenz wurde so gewählt, dass sie komplementär zu einem Gegenstrang ist, der am 5'-Ende an Biotin (orange) gebunden ist. Dadurch kann die DNA-Bibliothek an eine mit Streptavidin überzogene, feste Phase mittels Hybridisierung gebunden werden. P1 und P2 sollen die Beteiligung der Primerbindungssequenzen in der 3D-Struktur von eventuellen Aptameren verhindern. P2 und P3 werden für die PCR benötigt, wobei P2 ein Ribonukleotid am 3'-Ende (rA, pink) enthält und dadurch eine Sollbruchstelle bei Behandlung mit NaOH aufweist.<sup>[116]</sup>

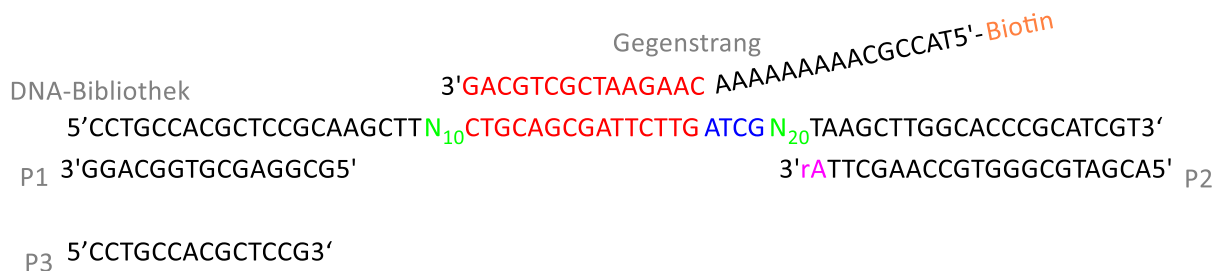


Abbildung 47: Aufbau der DNA-Bibliothek, des Gegenstrangs, P1, P2 und P3.<sup>[116]</sup>

Das in Abbildung 48 dargestellte SELEX-Verfahren wurde für die Selektion von Targetmolekül **62** angewendet und wird im Folgenden näher erklärt. Im ersten Schritt wird die DNA-Bibliothek mittels Hybridisierung mit dem Gegenstrang in Anwesenheit der Streptavidin-beschichteten, festen Phase immobilisiert. Anschließend wird die gebundene DNA mit Selektionspuffer (SB) gewaschen, um die DNA-Sequenzen zu entfernen, die schon ohne Zugabe des Targets eluiert werden. Durch Zugabe des Targetmoleküls **62**, gelöst in SB,

gehen die Sequenzen in Lösung, welche fähig sind, einen DNA-Target-Komplex zu bilden (Schritt 2). Diese Oligonukleotide werden gesammelt und in Schritt 3 durch PCR vervielfältigt. Durch das Ribonukleotid (rA, pink) in P2, wird nach Behandlung mit NaOH ein Strangbruch an dieser Stelle hervorgerufen. Dies erlaubt in der anschließenden PAGE eine saubere Trennung der Oligonukleotide über ihre unterschiedlichen Stranglängen (Schritt 4). Die zurückgewonnenen DNA-Stränge werden durch Hybridisierung mit P1, P2 und dem Gegenstrang für die nächste Selektionsrunde vorbereitet (Schritt 5).<sup>[116]</sup> Durch dieses Verfahren wird der DNA-Pool durch jede Runde immer weiter mit den Sequenzen angereichert, die fähig sind, das Targetmolekül **62** selektiv zu binden. Zeigt sich nach einigen Wiederholungen eine erhöhte Bindungsaffinität, werden die erhaltenen Sequenzen abschließend voneinander getrennt und analysiert.

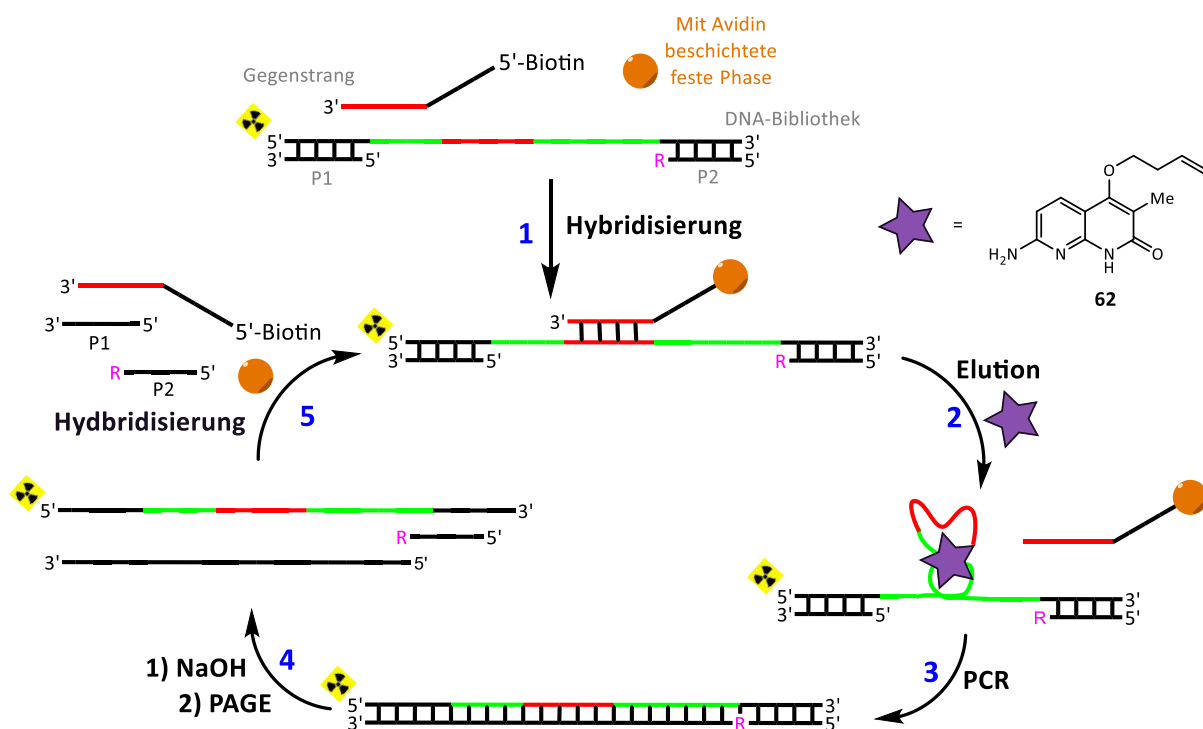


Abbildung 48: Schematische Darstellung des von Li et al. entwickelten SELEX-Prozesses.<sup>[116]</sup>

Zu Beginn jeder Selektionsrunde muss der DNA-Pool radioaktiv markiert werden, um die Bindungsaffinität der selektierten DNA-Stränge an das Targetmolekül in jeder Runde zu überprüfen. Dies geschieht mittels enzymatischer Phosphorylierung mit dem  $\beta$ -Strahler  $^{32}\text{P}$  ( $\beta^-$ ,  $t_{1/2} = 14.3$  d, 1.71 MeV). Dabei wird das Enzym *T4 Polynukleotid-Kinase* verwendet, um den Transfer eines  $\gamma$ -Phosphats von ATP zur freien Hydroxylgruppe am 5'-Ende der DNA zu katalysieren (Abbildung 49).<sup>[117]</sup>

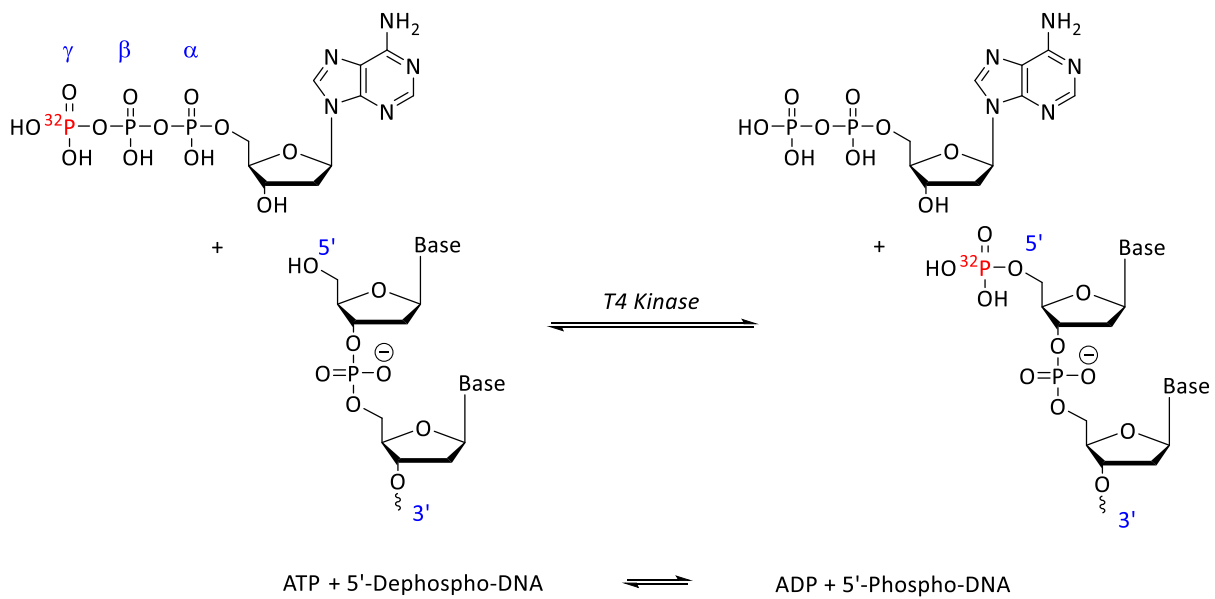


Abbildung 49: Enzymatische  $^{32}\text{P}$ -Markierung eines Oligonukleotids mit  $\gamma$ -ATP und dem Enzym *T4 Kinase*.<sup>[117]</sup>

Durch Messung der Zerfälle des  $^{32}\text{P}$  mittels Geiger-Zähler im Elutionsschritt kann die sogenannte *Switching*-Aktivität bestimmt werden. Diese ist definiert als das Verhältnis aus DNA, die vom Targetmolekül eluiert wird, zu DNA, die im Waschschrift durch Selektionspuffer (SB) eluiert wird (Gleichung 4).<sup>[116]</sup>

$$\text{Switching} - \text{Aktivität} = \frac{\text{DNA, eluiert vom Target}}{\text{DNA, eluiert vom SB}} \quad (4)$$

Ist nach einigen Runden ein plötzlicher Anstieg der *Switching*-Aktivität auf Werte zwischen 2 und 8 zu verzeichnen, ist der DNA-Pool mit Sequenzen angereichert, die fähig sind, das Target zu binden und der SELEX-Prozess war erfolgreich.

Bei der Selektion mit Substrat **62** als Targetmolekül war nach 19 Runden kein signifikanter Anstieg der *Switching*-Aktivität detektierbar. Wie aus Abbildung 50 ersichtlich, ist zwar zwischen Runde 10 und 14 ein kontinuierlicher Anstieg der *Switching*-Aktivität zu erkennen, nach Runde 15 fällt der Wert jedoch wieder ab. Mit dem nach Runde 19 erhaltenen DNA-Pool wurde außerdem eine Negativselektion durchgeführt. Dafür wurde in einem Experiment das Targetmolekül, gelöst in SB, und in einem zweiten Experiment nur SB für die Selektion verwendet. Da bei beiden Experimenten der gleiche Wert für die *Switching*-Aktivität erhalten wurde, kann davon ausgegangen werden, dass unter

Verwendung des von *Li et al.* publizierten SELEX-Prozesses mit der gegebenen DNA-Bibliothek kein Aptamer für das Targetmolekül **62** generiert werden konnte.

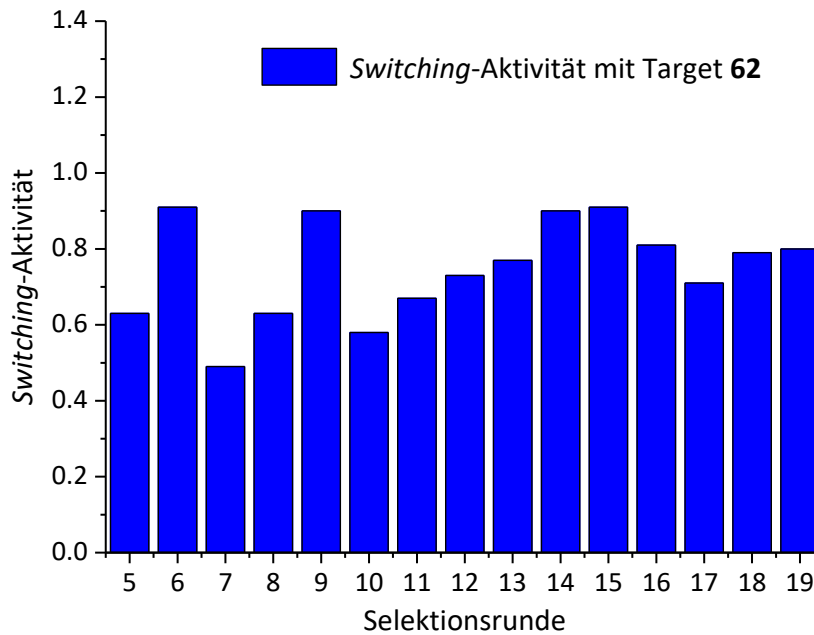


Abbildung 50: Switching-Aktivität für SELEX-Prozess mit Target 62.

Ein Grund hierfür könnte sein, dass die DNA-Bibliothek nicht geeignet war für das gegebene Targetmolekül **62**. Außerdem könnte die schlechte Löslichkeit von **62** im SB ein Problem darstellen. Abhängig davon, wie hoch die Bindungsenthalpie des DNA-Substrat-Komplexes gegenüber der Streptavidin-Biotin-Bindungsenthalpie ist, könnte es auch sein, dass sich trotz gebundenem Substrat die Streptavidin-Biotin-Bindung nicht gelöst hat und deshalb die Aptamere nicht von der festen Phase eluiert werden konnten.

### 5.5. Unspezifische Aptamere: *Three-way junctions*

Neben spezifischen Aptameren, die, wie bereits beschrieben (Kapitel 5.4.), durch das SELEX-Verfahren generiert werden können, gibt es auch unspezifische Aptamere, welche in der Lage sind verschiedene, kleine Moleküle zu binden. Als Beispiel sind in Kapitel 2.6. die *three-way junction*-Oligonukleotide von *Stojanovic et al.* dargestellt. Nach dem Vorbild von *Stojanovic* wurde die in Abbildung 51 gezeigte DNA-Sequenz synthetisiert und an Position **X** (rot) mit den Sensibilisatoren **BPNMe<sub>2</sub>** (**3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**), **BPOMe** (**3wj\_BPOMe\_2**) oder **BPMe** (**3wj\_BPMe\_3**) versehen. Nach Zugabe des Substrats **8**, sollte sich dieses in der hydrophoben Tasche der *three-way junction* anlagern und durch die räumliche Nähe zum Photosensibilisator lichtinduziert in einer [2+2]-Cycloaddition reagieren. Die chirale Umgebung sollte außerdem eine Enantioselektivität der Reaktionsführung bewirken.

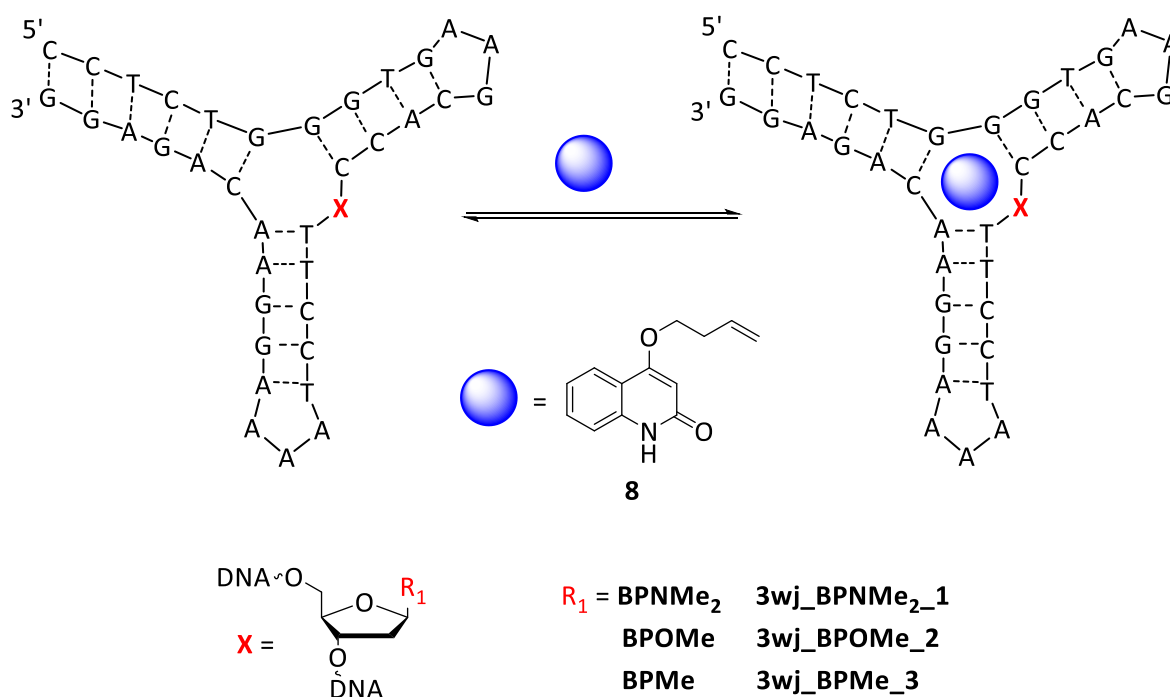


Abbildung 51: Synthetisierte *three-way junction* Sequenz mit X = BPNMe<sub>2</sub>-Nuk (**3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**), BPOMe-Nuk (**3wj\_BPOMe\_2**) oder BPMe-Nuk (**3wj\_BPMe\_3**); die blaue Kugel kennzeichnet das Substrat **8** in der hydrophoben Tasche der *three-way junction*.

In Abbildung 52 sind die Absorptionsspektren der hybridisierten *three-way junctions* **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**, **3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3** dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1** in Bezug auf die Anregungswellenlänge von 369 nm die besten Absorptionseigenschaften aufweist. Die Absorptionen der Sensibilisatoren von



**3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3** sind zum Großteil von der charakteristischen Absorption der DNA ( $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ ) überlagert.

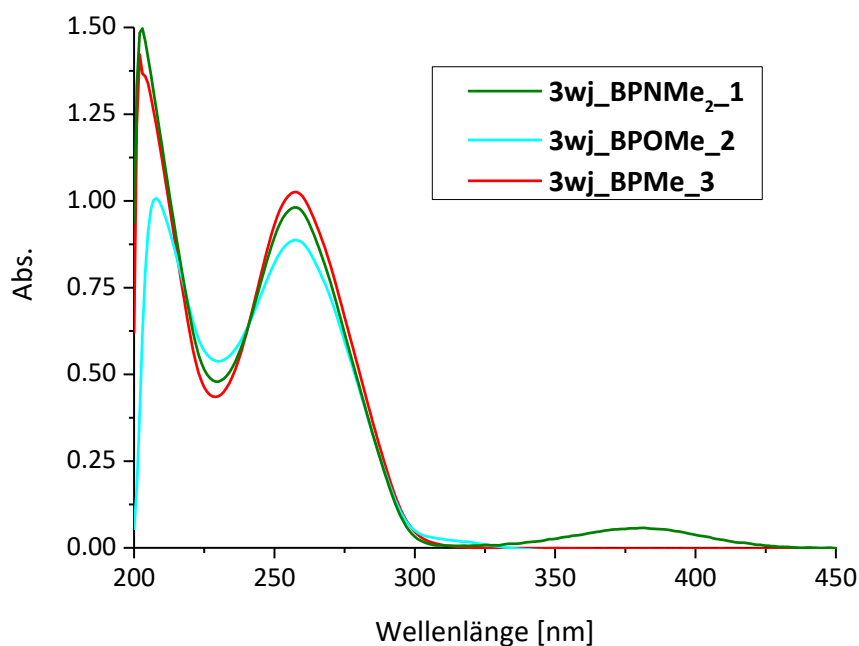


Abbildung 52: UV/Vis-Absorptionsspektrum von **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**, **3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3** in H<sub>2</sub>O, 10 mM NaPi, 250 mM NaCl, (2,5 µM).

Zunächst wurde der Einfluss der verschiedenen Sensibilisatoren getestet. Dafür wurden die DNA-Sequenzen **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**, **3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3** als Katalysatoren verwendet. Für die in Tabelle 11 aufgeführten Katalysen wurden jeweils 20 mol% Katalysator (100 µM Substrat **8** und 20 µM Katalysator) verwendet.

Tabelle 11: Übersicht über die durchgeführten Belichtungsexperimente mit **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**, **3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3**; 100 µM Substrat **8**, 20 µM Katalysator (20 mol%), Lösemittel: H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1, 10 mM NaPi (pH 8.5), 250 mM NaCl, 369 nm, 5 °C; aufgeführt ist sowohl die Belichtungszeit bei maximalem Enantiomerenüberschuss (ee) (weiß hinterlegt) als auch die Belichtungszeit bei maximaler Ausbeute (grau hinterlegt).

Ansatz	Katalysator	Belichtungszeit [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	rr (9/10)	ee (9b/9a) [%]
1	<b>3wj_BPNMe<sub>2</sub>_1</b>	24	51	12	68/32	-
2	<b>3wj_BPOMe_2</b>	8	60	44	68/32	20
		24	85	50	71/29	16
3	<b>3wj_BPMe_3</b>	10	69	58	74/26	28
		24	93	68	73/27	15

Bei Betrachtung von Ansatz 1 (Tabelle 11) zeigt sich, dass **BPNMe<sub>2</sub>** auch in DNA integriert (**3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**), keine katalytische Wirkung aufgrund des wässrigen Systems aufweist. Die Ausbeute von 12 % nach 24 h Belichtungszeit ist auf die ablaufende Hintergrundreaktion ohne Katalysator-Einwirkung zurückzuführen. Das erklärt auch den ausbleibenden Enantiomerenüberschuss. Ansatz 2 und 3 hingegen zeigen, dass unter Verwendung von **3wj\_BPOMe<sub>2</sub>\_2** und **3wj\_BPMe<sub>3</sub>\_3** die [2+2]-Cycloaddition von **8** asymmetrisch katalysiert werden kann. Die zeitlichen Verläufe der Reaktionen sind in Abbildung 53 gezeigt.

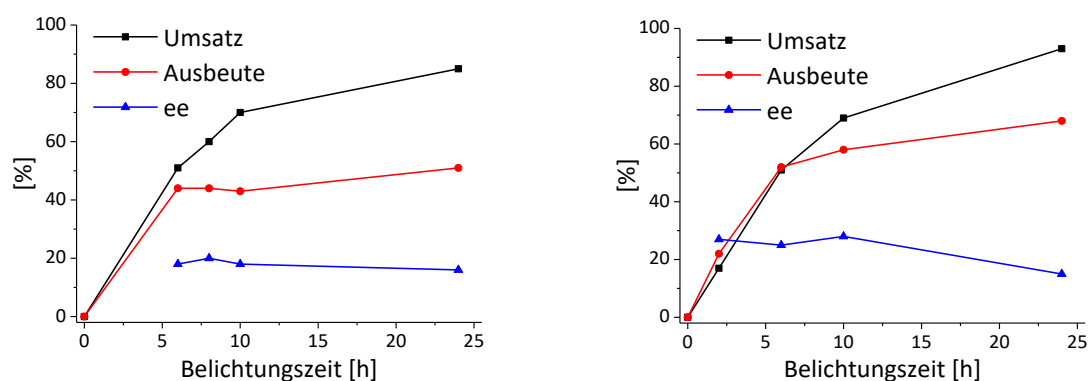


Abbildung 53: Zeitabhängiger Umsatz von **8**, Ausbeute von **9** und **10** und ee des Enantiomerenpaares **9** in Anwesenheit von **3wj\_BPOMe<sub>2</sub>\_2** (links) und **3wj\_BPMe<sub>3</sub>\_3** (rechts). Bedingungen: 20  $\mu$ M **3wj\_BPOMe<sub>2</sub>\_2** oder **3wj\_BPMe<sub>3</sub>\_3**, 100  $\mu$ M **8**, H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1 + NaP<sub>i</sub> (10 mM, pH 8.5), 369 nm LED, 5 °C

Bei Verwendung von 20 mol% **3wj\_BPOMe<sub>2</sub>\_2** wurde eine maximale Ausbeute von 50 % nach 24 h erreicht, wohingegen der maximale Enantiomerenüberschuss von 20 % schon nach 8 h erreicht ist. Die Verwendung von **3wj\_BPMe<sub>3</sub>\_3** zeigt sogar noch bessere Ergebnisse. Die maximale Ausbeute von 68 % konnte nach 24 h Belichtung erreicht werden. Der höchste ee von 28 % ist bereits nach 10 h erreicht.

Anhand der in Tabelle 12 aufgelisteten Schmelztemperaturen lässt sich die Stabilität der unterschiedlich modifizierten *three-way junctions* erklären. Zu sehen ist, dass **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1** ab 55.6 °C seine doppelhelikale Struktur verliert, **3wj\_BPOMe<sub>2</sub>\_2** bei 58.1 °C und **3wj\_BPMe<sub>3</sub>\_3** bei 56.3 °C schmilzt. Durch die Zugabe von 20 % Acetonitril zu den DNA-Lösungen wird die Struktur um etwa 13 °C destabilisiert. Interessant ist, dass die Zugabe des gleichen Verhältnis an Substrat **8**, wie es auch in den zuvor beschriebenen Katalysen verwendet wurde, bei **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1** eine Schmelztemperaturerhöhung um 0.1 °C bewirkt und bei **3wj\_BPOMe<sub>2</sub>\_2** eine Destabilisierung um 0.9 °C auslöst, während bei **3wj\_BPMe<sub>3</sub>\_3** die Schmelztemperatur um 1.7 °C angehoben wird. Daraus lässt sich schließen,

Das **3wj\_BPMe\_3** das Substrat **8** besser binden kann als **3wj\_BPOMe\_2**, wodurch die Stabilisierung dieser *three-way junction* zustande kommt. Durch die besseren Bindungseigenschaften von **3wj\_BPMe\_3** findet die [2+2]-Cycloaddition von **8** nach Energieübertrag noch in räumlicher Nähe zur DNA statt und die 3D-Struktur der DNA kann sich somit auf den asymmetrischen Verlauf der Reaktion auswirken.

Tabelle 12: Schmelztemperaturen der *three-way junctions* **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**, **3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3** jeweils 2.5  $\mu$ M in 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7.0), 250 mM NaCl; vermerkt sind der Zusatz von Acetonitril und/oder Substrat **8**.

Oligonukleotid	Zusatz von MeCN [%]	Zusatz von Substrat <b>8</b> [ $\mu$ M]	T <sub>M</sub> [°C]	$\Delta$ T <sub>M</sub> durch Zusatz von <b>8</b> [°C]
<b>3wj_BPNMe<sub>2</sub>_1</b>	-	-	<b>55.6</b>	0.1
	20	-	43.2	
	20	12.5	43.3	
<b>3wj_BPOMe_2</b>	-	-	<b>58.1</b>	-0.9
	20	-	44.1	
	20	12.5	43.2	
<b>3wj_BPMe_3</b>	-	-	<b>56.3</b>	1.7
	20	-	42.7	
	20	12.5	44.4	

Da **3wj\_BPMe\_3** die höchsten Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse liefert, wurden die nachfolgenden Experimente mit dieser Sequenz durchgeführt. Um die Enantioselektivität weiter zu erhöhen, wurde die ursprüngliche Struktur von **3wj\_BPMe\_3** leicht modifiziert und die in Abbildung 54 dargestellten Sequenzen zur Katalyse der [2+2]-Cycloaddition verwendet. **3wj\_BPMe\_4** und **3wj\_BPMe\_5** beinhalten im Bereich der hydrophoben Tasche zwei, bzw. drei **BPMe**-Einheiten. Dadurch wird die hydrophobe Tasche größer und hat eine höhere Katalysator-Dichte. Bei **3wj\_BPMe\_6** und **3wj\_BPMe\_7** wurde die sensibilisierende Einheit drei Basen entfernt zur hydrophoben Tasche eingebaut. Hier soll der Energieübertrag über die Basen bis in die Tasche erfolgen. Außerdem wurde bei **3wj\_BPMe\_6** zusätzlich ein ungepaartes Adenin (**A**, rot) im Bereich der hydrophoben Tasche eingebaut, um eine Anbindung des Substrats **8** über Wasserstoffbrückenbindungen an Adenin zu ermöglichen.

DNA-gestützte, enantioselektive [2+2]-Cycloaddition

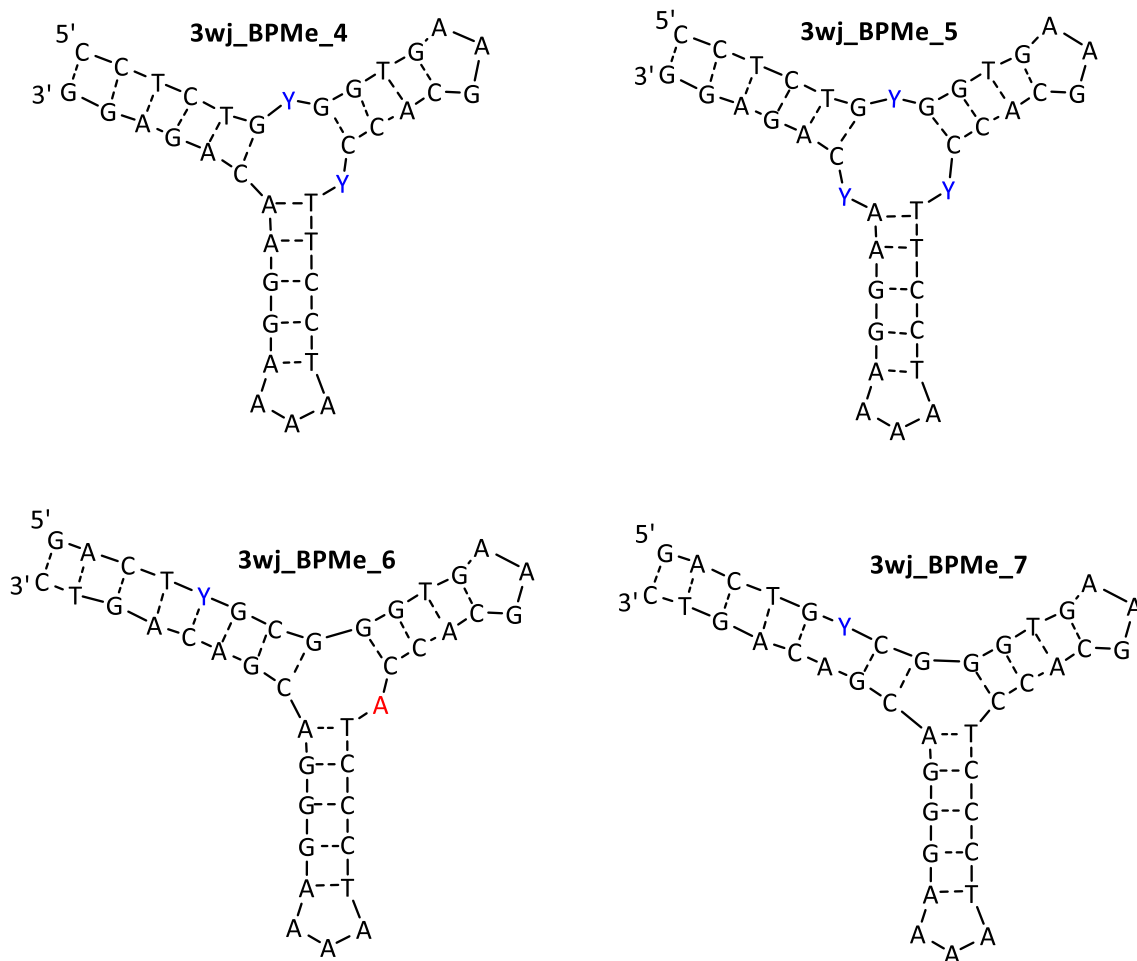


Abbildung 54: Modifizierte *three-way junctions* 3wj\_BPMe\_4-7; Y = BPMe-Nuk.

Mit den zuvor beschriebenen, verschiedenen *three-way junctions* wurden die in Tabelle 13 dargestellten Reaktionen katalysiert.

Tabelle 13: Übersicht über die durchgeführten Belichtungsexperimente mit 3wj\_BPMe\_4-7; 100  $\mu\text{M}$  Substrat 8, 20  $\mu\text{M}$  Katalysator (20 mol%), Lösemittel:  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  4/1, 10 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 8.5), 250 mM NaCl, 369 nm, 5  $^\circ\text{C}$ ; aufgeführt ist sowohl die Belichtungszeit bei maximalem Enantiomerenüberschuss (weiß hinterlegt) als auch die Belichtungszeit bei maximaler Ausbeute (grau hinterlegt).

Ansatz	Katalysator	Belichtungszeit [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	rr (9/10)	ee (9a/9b) [%]
1	3wj_BPMe_4	6	42	14	65/35	15
		10	59	24	74/26	7
2	3wj_BPMe_5	6	34	10	66/34	22
		10	51	29	75/25	9
3	3wj_BPMe_6	24	nur Hintergrundreaktion			
4	3wj_BPMe_7	24				

Alle in Tabelle 13 aufgeführten Experimente, mit den abgeänderten *three-way junctions* **3wj\_BPMe\_4-7** als Katalysatoren, verliefen sowohl mit geringeren Ausbeuten als auch mit schlechteren Enantiomerenüberschüssen, als die [2+2]-Cycloaddition von **8** unter Verwendung von **3wj\_BPMe\_3** (Tabelle 11, Ansatz 3). Unter Berücksichtigung der Kinetiken lieferte **3wj\_BPMe\_4** (Tabelle 13, Ansatz 1) nach 10 h Belichtungszeit eine maximale Ausbeute von 24 %, während der maximale ee von 15 % nach 6 h erreicht wurde. Mit **3wj\_BPMe\_5** (Tabelle 13, Ansatz 2) konnte nach 10 h eine Ausbeute von 29 % erhalten werden, wobei nach 6 h 22 % ee erreicht wurden. Erwähnenswert ist hierbei, dass sowohl unter Verwendung von **3wj\_BPMe\_4** als auch von **3wj\_BPMe\_5** die Enantiomere **9a** und **10a** bevorzugt gebildet wurden. Wohingegen bei allen anderen Katalysen die Enantiomere **9b** und **10b** bevorzugt entstanden. Nach 24 h Belichtungszeit wurde sowohl unter Verwendung von **3wj\_BPMe\_6** als auch von **3wj\_BPMe\_7** (Tabelle 13, Ansatz 3 und 4) nur die Hintergrundreaktion detektiert, die das Substrat **8** durch direkte Anregung eingeht. Es wird vermutet, dass kleinste Veränderungen an der Struktur der hydrophoben Tasche großen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Substrats haben. Wird sie kleiner, wie es bei **3wj\_BPMe\_7** der Fall ist, passt das Substrat **8** nicht rein und befindet sich somit nicht in räumlicher Nähe des katalytischen Zentrums. Außerdem müsste der Energieübertrag bei **3wj\_BPMe\_6-7** vom katalytischen Zentrum auf das Substrat über zwei bzw. drei Basen ablaufen, um die Reaktion erfolgreich zu katalysieren. Wird die hydrophobe Tasche größer, wie es bei **3wj\_BPMe\_4-5** der Fall ist, diffundiert das Substrat so schnell durch die Tasche, dass die DNA keinen stereospezifischen Einfluss auf die Reaktion ausüben kann. Auch bei Betrachtung der in Tabelle 14 aufgeführten Schmelztemperaturen von **3wj\_BPMe\_4-7** ist zu sehen, dass der Zusatz von Acetonitril eine drastische Destabilisierung hervorruft, was sich in einer bis zu 17.5 °C abgesenkten Schmelztemperatur der Oligonukleotide zeigt. Der weitere Zusatz von Substrat **8** bewirkt in keinem der aufgeführten Oligonukleotide eine ähnlich starke Stabilisierung wie bei **3wj\_BPMe\_3** ( $\Delta T_M = 1.7$  °C, Tabelle 12). Die größte Schmelztemperaturerhöhung erfährt **3wj\_BPMe\_4** ( $\Delta T_M = 0.2$  °C), während bei **3wj\_BPMe\_6** die Schmelztemperatur um 0.2 °C abgesenkt wird.

Tabelle 14: Schmelztemperaturen der *three-way junctions* 3wj\_BPMe4-7 jeweils 2.5  $\mu\text{M}$  in 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7.0), 250 mM NaCl; vermerkt sind der Zusatz von Acetonitril und/oder Substrat 8.

Oligonukleotid	Zusatz von MeCN [%]	Zusatz von Substrat 8 [ $\mu\text{M}$ ]	T <sub>M</sub> [°C]	$\Delta T_M$ durch Zusatz von 8 [°C]
3wj_BPMe_4	-	-	<b>58.2</b>	0.2
	20	-	46.9	
	20	12.5	47.1	
3wj_BPMe_5	-	-	<b>62.6</b>	0.0
	20	-	50.6	
	20	12.5	50.6	
3wj_BPMe_6	-	-	<b>56.8</b>	-0.2
	20	-	39.7	
	20	12.5	39.5	
3wj_BPMe_7	-	-	<b>58.4</b>	0.1
	20	-	40.9	
	20	12.5	41.0	

Weiterführend wurde geprüft, welchen Einfluss die Temperatur auf die Katalysen hat. Für die in Tabelle 15 aufgeführten Reaktionen wurden jeweils 100  $\mu\text{M}$  Substrat **8** und 20  $\mu\text{M}$  **3wj\_BPMe\_3** verwendet. Die Katalysen wurden bei 10, 5, 0 und -5 °C durchgeführt. Interessanterweise steigen beim Absenken der Belichtungstemperatur von 10 °C auf 5 °C sowohl der Enantiomerenüberschuss von 11 % auf 28 % als auch die Ausbeute von 55 % auf 68 % an (Tabelle 15, Ansatz 1-2). Daraufhin sinken Enantiomerenüberschuss und Ausbeute bei weiterer Temperaturerniedrigung auf bis zu 20 % ee (nach 8 h) und 32 % Ausbeute (nach 24 h) bei -5 °C (Tabelle 15, Ansatz 4).

Tabelle 15: Übersicht über die durchgeführten Belichtungsexperimente mit **3wj\_BPMe\_3** bei unterschiedlichen Temperaturen; 100  $\mu$ M Substrat **8**, 20  $\mu$ M **3wj\_BPMe\_3** (20 mol%), Lösemittel: H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8.5), 250 mM NaCl, 369 nm; aufgeführt ist sowohl die Belichtungszeit bei maximalem Enantiomerenüberschuss (weiß hinterlegt) als auch die Belichtungszeit bei maximaler Ausbeute (grau hinterlegt).

Ansatz	Katalysator	T [°C]	Belichtungszeit [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	rr (9/10)	ee (9b/9a) [%]
1	<b>3wj_BPMe_3</b>	10	6	89	55	74/26	11
2		5	10	69	58	74/26	28
			24	93	68	73/27	15
3		0	24	92	42	74/26	21
4		-5	8	85	12	74/26	20
			24	97	32	73/27	12

Hier muss beachtet werden, dass das Substrat bei zu hoher Temperatur vermutlich zu schnell wieder aus der hydrophoben Tasche diffundiert, so dass die Reaktion ohne strukturellen Einfluss der *three-way junction* abläuft. Bei zu niedrigen Temperaturen verlangsamt sich die Reaktion jedoch aufgrund langsamerer Diffusion. Das ideale Mittelmaß stellt hier Ansatz 2 bei 5 °C dar. Die Reaktionszeit ist schnell genug, um nach 10 h Belichtungszeit 68 % Ausbeute zu erreichen, die Temperatur ist jedoch nicht zu hoch, so dass durch die langsame Diffusion 28 % ee erreicht werden.

In der nächsten Versuchsreihe wurde der Einfluss des Verhältnisses zwischen Substrat und Katalysator untersucht. Dafür wurden die in Tabelle 16 aufgelisteten Experimente durchgeführt. In den verschiedenen Ansätzen wurden 5, 10, 20 und 100 mol% **3wj\_BPMe\_3** verwendet. Um den Einfluss des Verhältnisses zwischen Substrat und Katalysator zu analysieren, werden unter Berücksichtigung der Kinetiken jeweils die grau hinterlegten Belichtungszeiten bei maximaler Ausbeute betrachtet. Hier ist selbsterklärend, dass die Ausbeute von 38 % bei 5 mol% Katalysator (Tabelle 16, Ansatz 1) über 62 % (10 mol% Katalysator, Tabelle 16, Ansatz 2), 68 % (20 mol% Katalysator, Tabelle 16, Ansatz 3) bis hin zu 100 % Ausbeute bei Verwendung von 10 mol% Katalysator (Tabelle 16, Ansatz 4) ansteigt. Außerdem wird beim zuletzt genannten Ansatz durch die stöchiometrische Katalysatormenge die maximale Ausbeute bereits nach 8 h erreicht und nicht wie bei den Ansätzen 1-3 erst nach 24 h. Bei der Analyse der Belichtungszeiten für maximalen Enantiomerenüberschuss (weiß hinterlegte Felder) ist auffällig, dass bei allen Experimenten

mit substöchiometrischem Ansatz (Tabelle 16, Ansatz 1-3) der ee zwischen 28 % und 30 % beträgt, wobei sich mit steigendem Katalysatoranteil die Belichtungszeit erhöht (5 mol%: 5 h; 10 mol%: 8 h, 20 mol%: 10 h), um den maximalen Enantiomerenüberschuss zu erreichen. Bei stöchiometrischem Ansatz sinkt der ee auf 19 % ab (Tabelle 16, Ansatz 4).

Tabelle 16: Übersicht über die durchgeführten Belichtungsexperimente mit 3wj\_BPMe\_3 bei unterschiedlichen mol% an Katalysator; Lösemittel: H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8.5), 250 mM NaCl, 369 nm; 5 °C; aufgeführt ist sowohl die Belichtungszeit bei maximalem Enantiomerenüberschuss (weiß hinterlegt) als auch die Belichtungszeit bei maximaler Ausbeute (grau hinterlegt).

Ansatz	Katalysator	c (Kat.) [μM]	c (1) [μM]	mol% (Kat.)	Belichtungszeit [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	rr (9/10)	ee (9b/9a) [%]
1	3wj_BPMe_3	5	100	5	6	36	17	71/29	30
					24	60	38	68/32	24
2		7	70	10	8	70	29	72/28	28
					24	85	62	72/28	26
3		20	100	20	10	69	58	74/26	28
					24	93	68	73/27	15
4		20	20	100	6	64	91	73/27	19
					8	75	100	71/29	18

Stehen nur substöchiometrische Mengen an Katalysator zur Verfügung, muss das Substrat **8** in der hydrophoben Tasche der *three-way junction* gebunden werden, um dort angeregt zu werden, woraufhin die [2+2]-Cycloaddition auch in dieser Umgebung abläuft. Bei stöchiometrischer Katalysatormenge befinden sich so viele sensibilisierende Einheiten in der Reaktionslösung, dass die Substratmoleküle von allen Seiten von einem energieübertragenden System angeregt werden können, wodurch die stereoselektive Differenzierung verloren geht.



## 5.6. Zusammenfassung

Durch Kombination von asymmetrischer, DNA-basierter Katalyse und templatgestützter, enantioselektiver Photokatalyse konnte die [2+2]-Cycloaddition von Substrat **8** mit Enantiomerenüberschüssen von bis zu 30 % realisiert werden. Dies stellt damit das erste, bekannte Beispiel einer photokatalytischen Reaktion unter Verwendung von DNA als chiralem Templat dar. Nach erfolgreicher Nukleosid- und DNA-Synthese konnte gezeigt werden, dass 4-Methoxybenzophenon und 4-Methylbenzophenon sowohl als C-Nukleoside als auch eingebaut in DNA gute Photosensibilisatoren in wässriger Umgebung darstellen. Ihre angeregten Zustände sind energiereich genug, um die Triplettenergie nach Anregung an das Substrat **8** zu übertragen. Außerdem ermöglichen ihre Reduktionspotentiale eine Verwendung in DNA, da Guanin, die Base mit dem niedrigsten Oxidationspotential<sup>[98]</sup>, nicht oxidiert wird. Dabei liefern die synthetisierten C-Nukleoside sogar bessere Ausbeuten als ihre nicht-nukleosidischen Pendants. Trotz der vielversprechenden, optischen Eigenschaften stellte sich heraus, dass sowohl 4-Aminobenzophenon als auch 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzophenon unter wässrigen Bedingungen keine katalytischen Fähigkeiten aufweisen. Leider konnte unter Anwendung des SELEX-Verfahrens kein spezifisches Aptamer für das Targetmolekül generiert werden. Auch der nicht-kovalente Versuch sowohl Katalysator als auch Substrat in die räumliche Nähe der DNA zu bringen, konnte mit dem vorliegenden System nicht realisiert werden. Hier könnte der Einsatz eines besseren Interkalators zum Erfolg führen. Beispielsweise würden sich planare, konjugierte Moleküle eignen, welche unterhalb von 350 nm absorbieren. Diese Ausgangsbedingungen erfüllen sowohl Naphthalin als auch das positiv geladene Chinolinium. Zweiteres dürfte sich aufgrund der positiven Ladung als guter DNA-Interkalator eignen. Beide müssten jedoch über einen Linker an das Benzophenon-Derivat angebracht werden, der die Konjugation der  $\pi$ -Elektronen unterbricht, da sonst die Absorption zu weit bathochrom verschoben werden würde. Letztendlich konnte unter Verwendung eines unspezifischen Aptamers, in diesem Fall eine *three-way junction*-DNA Struktur, der asymmetrische Reaktionsverlauf realisiert werden. Die besten Ergebnisse wurden dabei durch Verwendung von 20 mol% **3wj\_BPMe\_3** bei 5 °C in einem Lösemittelgemisch aus H<sub>2</sub>O/MeCN 4/1, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8.5) und 250 mM NaCl bei einer Anregungswellenlänge von 369 nm erzielt. Dieses System lieferte nach 24 h eine Ausbeute von 68 %, wobei nach 10 h ein Enantiomerenüberschuss von 28 % erreicht werden konnten. Selbst kleinste strukturelle Änderungen der *three-way junction* bewirken

drastische Einbußen sowohl in Ausbeute als auch im Enantiomerenüberschuss. Über Schmelztemperaturanalysen wurde herausgefunden, dass sich die Bindung des Substrats **8** in der hydrophoben Tasche nur im Falle von **3wj\_BPMe\_3** deutlich stabilisierend auswirkt.

Fraglich hierbei ist, ob wirklich der Chiralitätstransfer der DNA auf die Reaktion die enantioselektive Reaktionsführung bewirkt, so wie es von *Roelfes* beschrieben wurde,<sup>[79]</sup> oder ob die DNA nur eine abschirmende Rolle einnimmt und somit eine Seite des Substrats während der Reaktion abgeschirmt wird. Um dies zu untersuchen, könnte für DNA-basierte Katalysen linksgängige Z-DNA verwendet werden, um diese mit den Ergebnissen der rechtsgängigen B-DNA zu vergleichen. Wird tatsächlich die Chiralität übertragen, sollten sich die Enantiomerenüberschüsse der beiden Experimente signifikant unterscheiden.

## 6. Distanzabhängigkeit der photoinduzierten T-T-Dimerbildung in DNA

Der Mechanismus der CPD-Bildung wurde seit 1960 intensiv untersucht.<sup>[118]</sup> *Kohler et al.* zeigten, dass die T-T-Dimer-(**T<>T**) Bildung durch direkte Anregung der Nukleotide im UV-C und UV-B-Bereich vorrangig über einen Singulett-Prozess in einer ultraschnellen Reaktion (< 1 ps) abläuft.<sup>[119]</sup> 2010 berichteten *Markovitsi et al.* über die Ausbildung von CPDs durch direkte Anregung mit UV-A-Strahlung in DNA-Doppelsträngen mit Thymidin-reichen Abschnitten. Die Autoren verwendeten für die Experimente ein dA<sub>20</sub>:dT<sub>20</sub>-Oligomer.<sup>[49]</sup> Im Vergleich zur Triplettenergie von 310 kJ/mol<sup>[120]</sup> für einzelne Thymidin-5'-Monophosphate, wird durch Stapelung der Basen und damit einhergehender excitonischer Wechselwirkungen der Triplettzustand um 40 kJ/mol auf 270 kJ/mol<sup>[32]</sup> abgesenkt. Damit sind T-T-reiche Oligonukleotide fähig, UV-A-Photonen zu absorbieren und stellen gute Akzeptoren für Energietransferprozesse dar.<sup>[9, 49, 121]</sup>

Zur Untersuchung von Prozessen, die nicht durch direkte Anregung der Nukleotide ausgelöst werden, kommen Triplettensensibilisatoren zum Einsatz. Diese können energieärmere Strahlung im UV-A-Bereich absorbieren und die aufgenommene Energie auf die Nukleotide übertragen. Da UV-A-Strahlung den überwiegenden Teil des solaren UV-Lichts darstellt, der die Oberfläche der Erde erreicht<sup>[26, 122]</sup> und in Anbetracht dessen, dass einige Photosensibilisatoren in Sonnencremes als UV-A-absorbierende Komponente eingesetzt werden, ist ein verbessertes Verständnis der sensibilisierten CPD-Bildung von enormer Relevanz.<sup>[6]</sup>

Im folgenden Kapitel wird die durch **APOMe** induzierte **T<>T**-Bildung näher untersucht. **APOMe** kann bei 369 nm unabhängig von DNA angeregt werden.

## 6.1. Das Prinzip des DNA-Assays

Um die Distanzabhängigkeit der photoinduzierten  $T \leftrightarrow T$ -Bildung zu untersuchen, wurde der in Abbildung 55 dargestellte Versuchsaufbau angewendet. Der DNA-Duplex besteht dabei aus einem mit Photosensibilisator (**Z**) modifizierten Strang und zwei komplementären, unverbrückten Gegensträngen. Die kommerziell erworbenen Gegenstränge wurden so gewählt, dass zwei benachbarte Thymidine (**T T**) ohne Phosphodiesterbindung in verschiedenen Abständen ( $n = 0-5$ ) zur sensibilisierenden Einheit positioniert sind. Nach Anregung des Sensibilisators bei 369 nm wird die Anregungsenergie durch TTET durch die DNA-Helix zu den unverbrückten Thymidinen transportiert. Dort können sich durch intermolekulare [2+2]-Cycloaddition  $T \leftrightarrow T$  ausbilden (Abbildung 55, unten). Die Abstände zwischen Sensibilisator und den unverbrückten Thymidinen betragen 0 (AT)-Paare ( $n = 0$ , direkte Nachbarschaft) bis 5 (AT)-Paare ( $n = 5$ , 10 Basenpaare). Zur Visualisierung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist einer der Gegenstränge am 5'-Ende fluoresceinmarkiert (**F**). Bildet sich das Cycloadditionsprodukt aus, wird eine verlängerte, fluoresceinmarkierte Sequenz erhalten, welche durch die höhere negative Ladung eine längere Retentionszeit auf dem Gel aufweist. Dadurch kann der Verlauf der  $T \leftrightarrow T$ -Bildung beobachtet und quantifiziert werden.

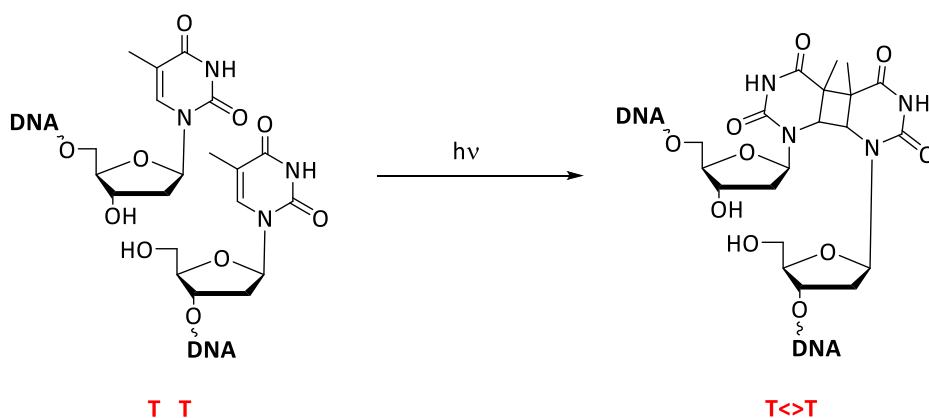
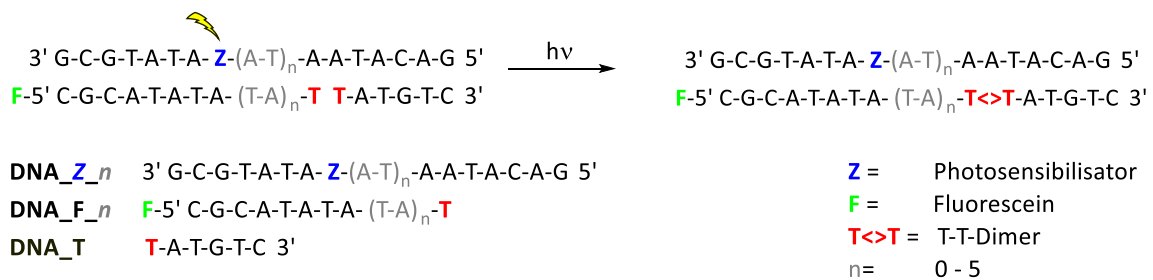


Abbildung 55: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit der sensibilisierten  $T \leftrightarrow T$ -Bildung (oben); [2+2]-Cycloadditionsreaktion der photoinduzierten  $T \leftrightarrow T$ -Bildung (unten).

## 6.2. 2'-Methoxyacetophenon als Photosensibilisator

Da *Zinth et al.* explizit auf 2'-Methoxyacetophenon (**APOMe**) als besonders geeigneten Photosensibilisator für die TTET-induzierte T<>T-Bildung hinweisen,<sup>[26]</sup> wurden die in Abbildung 56 gezeigten Oligonukleotide **DNA\_APOMe\_0-5** synthetisiert. Anschließend wurde das im vorherigen Kapitel dargestellte Prinzip angewendet, um die Effizienz von **APOMe** als Photosensibilisator und die Distanzabhängigkeit des TTET in DNA zu untersuchen.

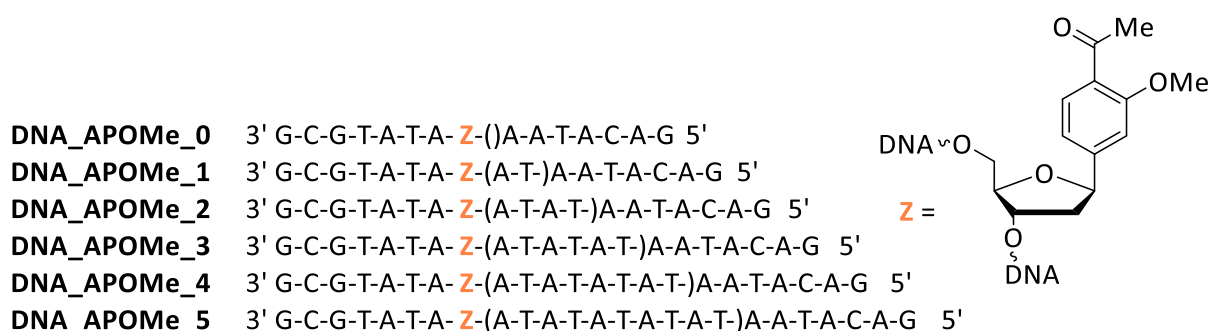


Abbildung 56: Synthetisierte Oligonukleotide modifiziert mit APOMe-Nuk (Z), DNA\_APOMe\_0-5.

In Abbildung 57 ist das Absorptionsspektrum eines **APOMe**-modifizierten Oligonukleotids zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Absorptionen des Sensibilisators von der charakteristischen Absorption der DNA ( $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ ) weitgehend überlagert ist. Dennoch zeigte sich, dass **APOMe** bei 369 nm selektiv angeregt werden kann.

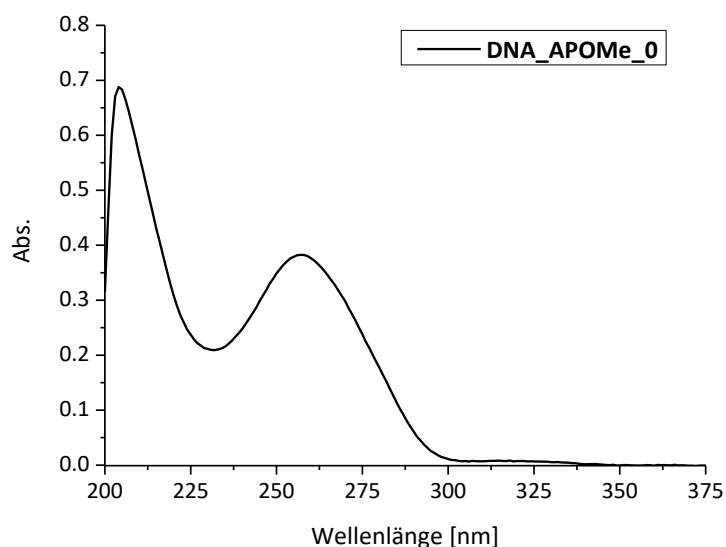


Abbildung 57: UV/Vis-Absorptionsspektrum von 2.5  $\mu\text{M}$  DNA\_APOMe\_0 in  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM NaP, 250 mM NaCl.

## Distanzabhängigkeit der photoinduzierten T-T-Dimerbildung in DNA

Die Belichtungsexperimente wurden mit einer LED bei 369 nm durchgeführt. Als Reaktionstemperatur wurden 10 °C gewählt, da Schmelztemperaturmessungen (siehe Kapitel 8.3.4.) ergaben, dass die DNA-Doppelstränge nur unterhalb von 12 °C vollständig hybridisiert vorliegen. Zur Bestimmung von Ausbeuten und Umsatz wurden die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Banden des Gels ins Verhältnis zur Eduktmenge vor der Belichtung gesetzt. In Abbildung 58 ist die PAGE-Analyse des zeitlichen Verlaufs der Belichtung von **DNA\_APOMe\_1**, **DNA\_F\_1** und **DNA\_T** bei 369 nm dargestellt. R1 (17mer) in der ersten Gelspur diente als Referenz für das Additionsprodukt von **DNA\_F\_1** und **DNA-T** nach erfolgreicher **T<>T**-Bildung. Der geringe Unterschied in der Mobilität zwischen R1 und dem ausgebildeten Additionsprodukt ist auf die fehlende Phosphodiesterbrücke des Produkts zurückzuführen. Die Intensität der Emission der **T<>T**-Bande steigt bis 3 h an und sinkt anschließend wieder ab. Die Emission der Eduktbande lässt eine kontinuierliche Abnahme der Intensität erkennen. Außerdem entsteht eine Emissionsbande bei höherer Retentionszeit mit sehr schwacher Intensität, welche vermutlich die Ausbildung von *Interstrand Crosslinks* anzeigt. Die zusätzliche Bande unterhalb des Edukts, ist auf eine n-1 Verunreinigung der kommerziell erworbenen DNA zurückzuführen.

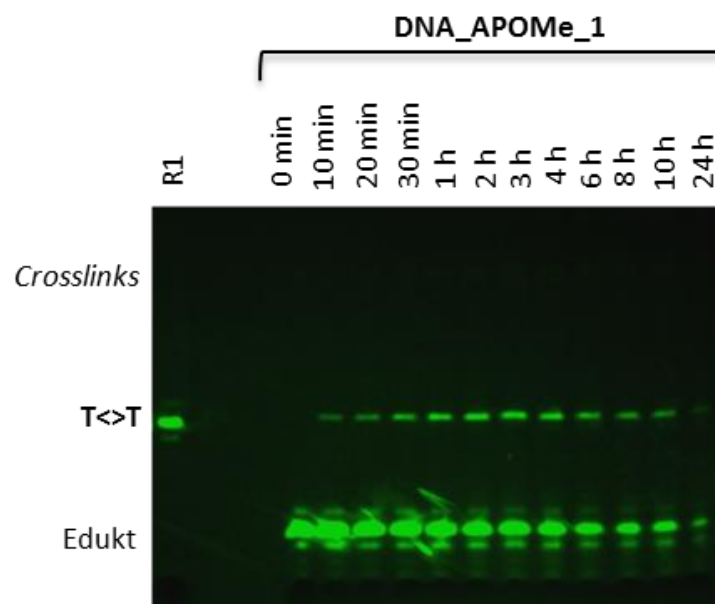


Abbildung 58: PAGE-Analyse: Zeitlicher Verlauf der Belichtung von **DNA\_APOMe\_1**, **DNA\_F\_1**, **DNA\_T**; Bedingungen: 2.5  $\mu$ M **DNA\_APOMe\_1**, 2.5  $\mu$ M **DNA\_F\_1**, 2.5  $\mu$ M **DNA\_T**, H<sub>2</sub>O, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7.0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

In Abbildung 59 ist der zeitliche Verlauf der Reaktion von **DNA\_APOMe\_1**, **DNA\_F\_1** und **DNA\_T** quantifiziert zu sehen. Aufgetragen wurde der Umsatz des Edukts **DNA\_F\_1** und die

Ausbeute an **T<>T** zu verschiedenen Belichtungszeiten. Die Reaktion lieferte nach 3 h eine maximale Ausbeute an **T<>T** von 5 %. Anschließend ist ein rascher Abfall zu erkennen. Die Ausbeute an *Crosslinks* nach 3 h beträgt lediglich 0.3 %.

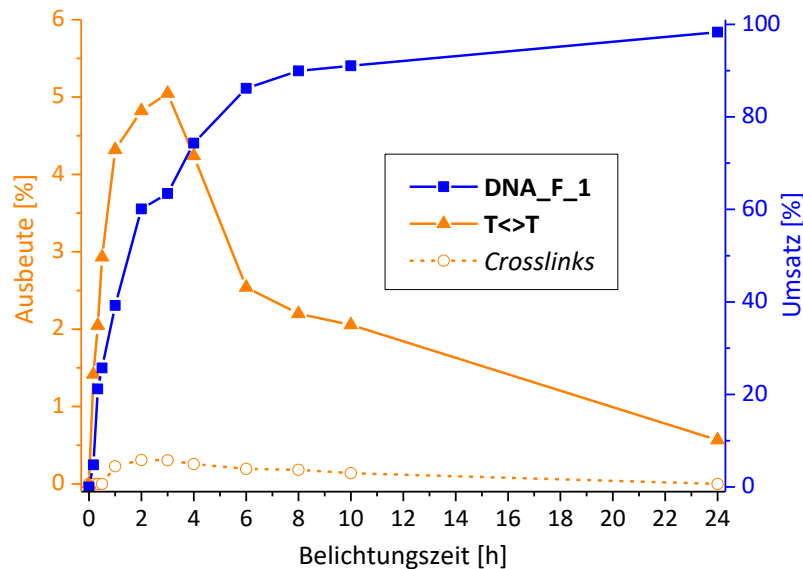


Abbildung 59: Zeitabhängiger Umsatz von DNA\_F\_1 und Ausbeute an T<>T und Crosslinks in Anwesenheit von DNA\_APOMe\_1; Bedingungen: 2.5  $\mu$ M DNA\_APOMe\_1, 2.5  $\mu$ M DNA\_F\_1, 2.5  $\mu$ M DNA\_T, H<sub>2</sub>O, 10 mM NaPi (pH 7.0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

Als Produkt wird nicht ausschließlich das **T<>T** gebildet, zusätzlich entstehen aus dem fluoresceinmarkierten Strang (**DNA\_F\_1**) und dem sensibilisator-modifizierten Strang (**DNA\_APOMe\_1**) sogenannte *Interstrand Crosslinks* mit höheren Retentionszeiten.<sup>[55]</sup> Dies konnte durch zusätzliche Experimente bestätigt werden, indem ausschließlich **DNA\_APOMe\_1** und **DNA\_F\_1** belichtet wurden. Eine Referenz auf dem Gel mit entsprechender Basenzahl (27) bestätigte das Auftreten von *Interstrand Crosslinks*. Weitere Kontrollexperimente zeigten, dass es bei Verwendung von unmodifizierten Oligonukleotiden, die keinen Photosensibilisator enthalten, weder zur **T<>T**-Bildung noch zur Ausbildung von *Crosslinks* kommt. Bei Verwendung von analogen, fluoresceinmarkierten Gegensträngen, welche anstelle des Thyminidins am 3'-Ende ein **C** oder **A** enthalten, wurden *Interstrand Crosslinks*, jedoch keine **T<>T** ausgebildet.

Der Unterschied zwischen Umsatz des Edukts und Ausbeute an **T<>T**, besonders bei längeren Belichtungszeiten (> 3 h), ist auf verschiedene Effekte zurückzuführen. Prinzipiell wäre es möglich, dass sich die unverbrückten Thyminidine zurückbilden, da die Dimere in der Lage sind

UV-Licht zu absorbieren.<sup>[123]</sup> Da jedoch nicht nur die Intensität der **T<>T**-Bande abnimmt, sondern auch die der Edukte und *Crosslinks*, weist dies auf eine photolytische Zersetzung von Fluorescein und von DNA hin. Dies wurde durch Fluoreszenzmessungen und PAGE-Analysen bei Belichtung (369 nm) eines fluoresceinmarkierten Oligonukleotids ohne photosensibilisierende Einheit bestätigt. Die in Abbildung 60 dargestellten Kontrollexperimente zeigen, dass bei andauernder Belichtung sowohl die Fluoresceinmarkierung mit einer Halbwertszeit von 4.0 h zerstört wird, als auch die DNA selbst fragmentiert wird<sup>[55, 124]</sup> ( $t_{1/2} = 2.9$  h).

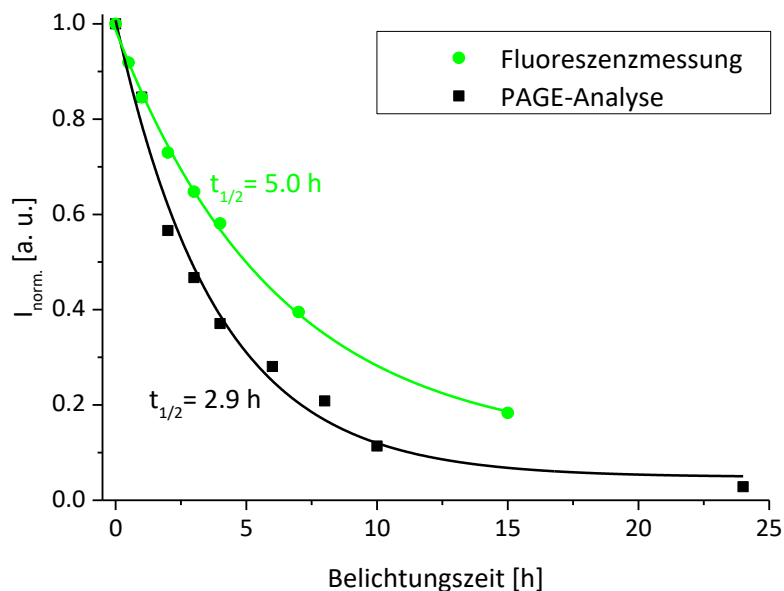


Abbildung 60: Zersetzung von Fluorescein von DNA\_F\_0, Bestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie (grüne Kurve); Zersetzung von Fluorescein und DNA von DNA\_F\_0, Bestimmung durch Fluoreszenzimaging nach PAGE; Bedingungen der Belichtung: 2.5  $\mu$ M DNA\_F\_0, H<sub>2</sub>O, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7.0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 20 °C.

Befindet sich ein Sensibilisator in der Reaktionsmischung, wird die DNA zusätzlich durch Prozesse wie H-Abstraktion des angeregten Sensibilisators abgebaut. Die Halbwertszeit der Zersetzung von **T<>T** in Gegenwart von **APOMe** beträgt 4.0 h (Abbildung 61). Es wäre zu erwarten, dass die Zersetzung in Gegenwart eines Sensibilisators schneller verläuft als ohne. Da jedoch die Zeit zur maximalen Ausbildung der **T<>T** 3 h beträgt, und die Halbwertszeit somit erst ab einer Belichtungszeit von 3 h berechnet wurde, lassen sich die Werte in diesem Fall nur schlecht in Relation setzen.



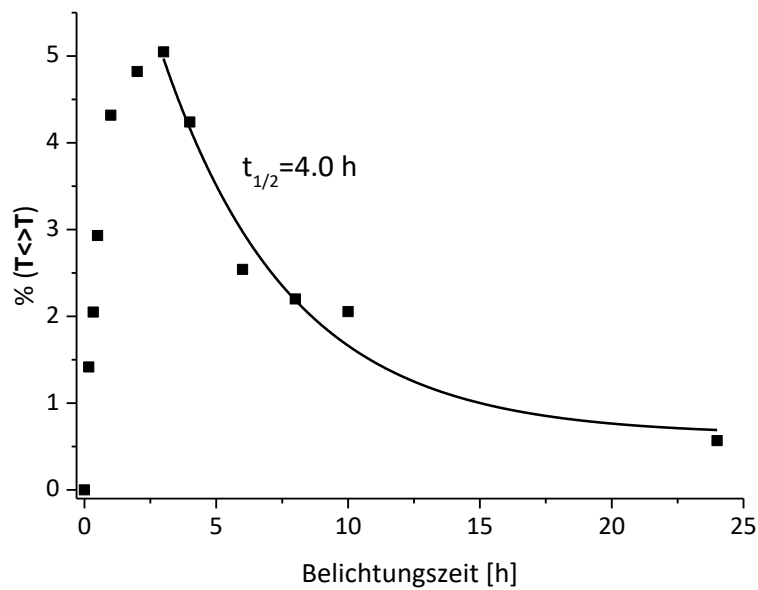


Abbildung 61: Zersetzung von T<>T bei Belichtung von DNA\_APOMe\_1, DNA\_F\_1 und DNA\_T; Bedingungen: 2.5  $\mu$ M DNA\_APOMe\_1, 2.5  $\mu$ M DNA\_F\_0, 2.5  $\mu$ M DNA\_T, H<sub>2</sub>O, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7.0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C; die schwarze Linie stellt den exponentiellen Fit dar.

Haben Donor und Akzeptor direkten Kontakt im DNA-Duplex ( $n = 0$ ), konnte nach 3 h Belichtungszeit sogar eine Ausbeute an T<>T von 17 % erreicht werden. Es wurde festgestellt, dass der TTET des Sensibilisators durch die DNA-Doppelhelix auf die benachbarten Thymin eine exponentielle Distanzabhängigkeit aufweist. Zur Quantifizierung der Distanzabhängigkeit wurde der monoexponentielle Zerfall (Gleichung 5) verwendet.<sup>[75, 125]</sup>

$$y = c \cdot \exp(-\beta \cdot r_{DA}) \quad (5)$$

- $y$  = Ausbeute an T<>T
- $c$  = Konstante
- $r_{DA}$  = Abstand zwischen Donor und Akzeptor
- $\beta$  = Systemspezifischer Abschwächungsfaktor

Die Ausbeute an T<>T lässt sich über das Verhältnis der Fluoresceinintensität der T<>T-Bande und der des Edukts vor der Belichtung ermitteln. Da es sich bei der T<>T-Bildung um eine ultraschnelle Reaktion im fs-Bereich handelt,<sup>[119]</sup> ist der Energietransfer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die T<>T-Bildung, welche somit als kinetische Falle

für die Triplettenenergie wirkt. Auf dem in Abbildung 62 dargestellten Gel wurde die Anzahl der (AT)-Paare ( $n = 0-4$ ) zwischen **APOMe** und den unverbrückten Thyminen variiert. Zu sehen ist, dass die Intensität der **T<>T**-Bande mit zunehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor abnimmt.

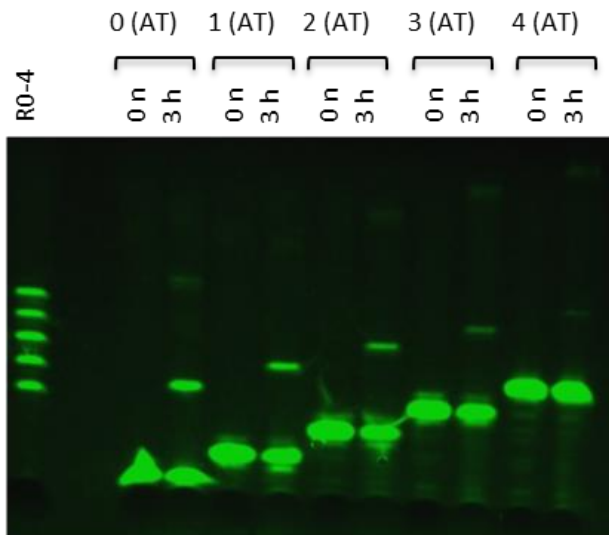


Abbildung 62: PAGE-Analyse: Distanzabhängige T<>T-Bildung; Bedingungen: 2.5  $\mu\text{M}$  DNA\_APOMe\_0-4, 2.5  $\mu\text{M}$  DNA\_F\_0-4, 2.5  $\mu\text{M}$  DNA\_T, H<sub>2</sub>O, 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7.0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

Gemäß Gleichung 5 konnte die Abstandsabhängigkeit des TTET durch Auftragung der Ausbeute  $\gamma$  an **T<>T** gegen den Abstand zwischen Donor und Akzeptor  $r_{\text{DA}}$  in DNA bestimmt werden. Für den Abstand zwischen einem Basenpaar und dem nächsten entlang der helikalen Achse wurde ein Standardwert von 3.4 Å angenommen.<sup>[126]</sup> Im Falle von **APOMe** als Triplettenenergie-Donor konnte aus Abbildung 63 der systemspezifische Abschwächungsfaktor zu  $\beta = 0.17 \pm 0.027 \text{ \AA}^{-1}$  bestimmt werden. Die exponentielle Distanzabhängigkeit stimmt gut mit dem typischen Dexter-TTET überein.<sup>[75]</sup> Auf den  $\beta$ -Wert wird in Kapitel 6.3. näher eingegangen.

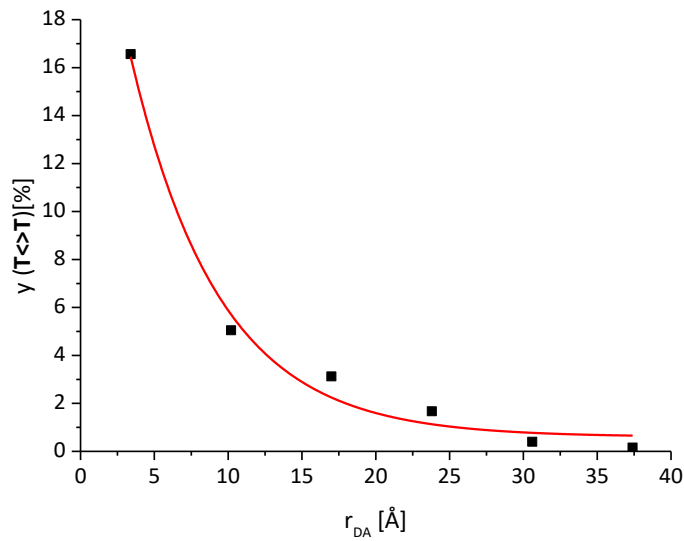


Abbildung 63: Distanzabhängigkeit der T-<>T-Bildung;  $r_{DA}$  = Donor-Akzeptor-Distanz,  $y$  = Ausbeute an T-<>T, die rote Linie stellt den exponentiellen Fit dar.

Die Ausbeute an T-<>T ist somit zum einen abhängig von der Donor-Akzeptor-Distanz, zum anderen muss jedoch auch die Konformation der Thymin-Basen zueinander berücksichtigt werden. Die Ausbeute ist limitiert durch den geringen Anteil an benachbarten Thyminen, welche zum Zeitpunkt der Anregung die optimale Orientierung zueinander aufweisen. Ein flexibleres Rückgrat der DNA würde zwar den Anteil an reaktiven Konformationen zum Zeitpunkt der Lichtabsorption erhöhen, da die Dimerbildung allerdings eine ultraschnelle Reaktion darstellt, kann keine Konformationsänderung innerhalb der Lebenszeit des angeregten Zustands stattfinden.<sup>[119]</sup>

### 6.3. Vergleich mit benzophenoninduzierter T-T-Dimerbildung

Dasselbe System wurde von *Linda Antusch* (Arbeitskreis *Wagenknecht*) mit den Photosensibilisatoren **BPOMe** und **BPMe** erfolgreich getestet. Sowohl die Belichtungen mit **BPOMe**- als auch mit **BPMe**-modifizierter DNA lieferten bereits nach 30 min die maximale Ausbeute an **T<>T**. Unter Verwendung von **BPMe** wurde nach 30 min eine Ausbeute von 25 % erhalten. **BPOMe** lieferte sogar 26 % **T<>T** bei 369 nm. Diese Ausbeuten wurden für das System mit direktem Kontakt zwischen Donor und Akzeptor ( $n = 0$ ) ermittelt. Wird zwischen Donor und Akzeptor ein (AT)-Basenpaar ( $n = 1$ ) eingefügt, fällt die Ausbeute rasch ab. Für **BPOMe** wurden nach 30 min 10 % **T<>T** und für das System mit **BPMe** lediglich 3 % **T<>T** erhalten. In Abbildung 64 ist der zeitliche Verlauf der Reaktion von **DNA\_BPOMe\_1** (analog zu **DNA\_APOMe\_1**), **DNA\_F\_1** und **DNA\_T** zu sehen. Aufgetragen wurde der Umsatz des Edukts **DNA\_F\_1** und die Ausbeuten an **T<>T** und *Crosslinks* zu verschiedenen Reaktionszeiten. Im Gegensatz zur **APOMe**-induzierten Reaktion, überwiegt bei Verwendung von **BPOMe** und **BPMe** die Bildung an *Crosslinks* gegenüber der **T<>T**-Bildung. In beiden Fällen beträgt diese Ausbeute 14-15 % nach 30 min (für  $n = 1$ ). *Interstrand Crosslinks* stellen typische Photoprodukte für Benzophenone in Kombination mit DNA dar.<sup>[9, 55]</sup>

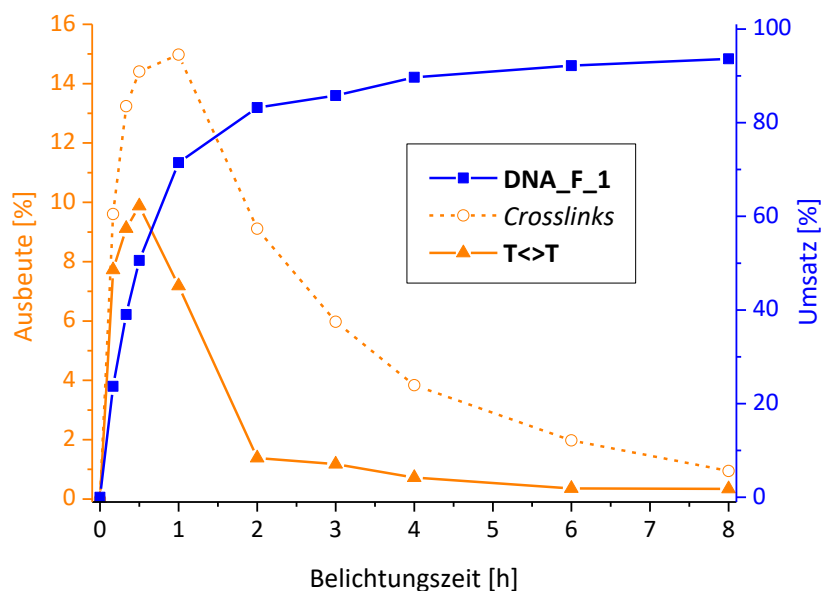


Abbildung 64: Zeitabhängiger Umsatz von **DNA\_F\_1** und Ausbeute der **T<>T**-Bildung in Anwesenheit von **DNA\_BPOMe\_1**; Bedingungen: 2.5  $\mu\text{M}$  **DNA\_BPOMe\_1**, 2.5  $\mu\text{M}$  **DNA\_F\_1**, 2.5  $\mu\text{M}$  **DNA\_T**,  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 7.0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

Auch für die benzophenoninduzierte **T<>T**-Bildung ist zu erwähnen, dass nach längeren Belichtungszeiten (> 30 min) die Ausbeute an **T<>T** wieder abnimmt, obwohl das Edukt noch nicht vollständig umgesetzt ist. Die Halbwertszeit der Zersetzung von **T<>T** beträgt unter Verwendung von **BPMe** 1 h 44 min und bei Einsatz von **BPOMe**-modifizierten Oligonukleotiden sogar nur 44 min. Im Vergleich zu den Experimenten mit **APOMe** als Sensibilisator ist auffällig, dass der Abbau früher einsetzt und wesentlich schneller verläuft. Auch die Bildung von *Crosslinks* zwischen **BP**-modifizierten und fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden tritt stark verstärkt ein im Vergleich zu den Experimenten mit **APOMe**. Bei Verwendung von **APOMe** ist die **T<>T**-Bildung besser in der Lage, die Triplettenergie abzufangen als bei **BPOMe** und **BPMe**.

Die Abnahme der Ausbeute lässt sich hier analog unter anderem auf die Zersetzung von Fluorescein und Fragmentierung der DNA bei andauernder Bestrahlung zurückführen. Der Zersetzungseffekt durch den Sensibilisator hat jedoch bei Verwendung von **BPMe** und besonders mit **BPOMe** eine stärkere Auswirkung als mit **APOMe**. Daraus ist zu schließen, dass der Einfluss der verschiedenen Photosensibilisatoren nicht nur ungleich auf die Produktbildung wirkt, sondern auch unterschiedlich stark Einfluss auf die Zersetzung der Produkte nimmt. Dies kann auf die schlechtere Extinktion von **APOMe** bei der gewählten Belichtungswellenlänge zurückgeführt werden.

Nach Auftragung der Ausbeute an **T<>T** gegen den Donor-Akzeptor-Abstand erhält man im Falle der **BPOMe**-Oligonukleotide  $\beta = 0.13 \pm 0.0091 \text{ \AA}^{-1}$  und mit **BPMe**  $\beta = 0.34 \pm 0.054 \text{ \AA}^{-1}$ . Die exponentielle Distanzabhängigkeit über 0-10 Basenpaare weist auch hier auf einen typischen Dexter-TTET-Mechanismus hin. Werden die Ausbeuten normiert und vergleicht man die Abstandsabhängigkeit der **T<>T**-Bildung der drei Sensibilisatoren direkt (Abbildung 65), ist auffällig, dass die  $\beta$ -Werte der Oligonukleotide mit **APOMe** und **BPOMe** sehr ähnlich sind ( $0.17 \text{ \AA}^{-1} \approx 0.13 \text{ \AA}^{-1}$ ). Auf den ersten Blick stimmen diese Ergebnisse gut überein mit der schwachen Distanzabhängigkeit für TTET zwischen interkalierenden Metallkomplexen ( $\beta = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ ).<sup>[127]</sup> Die Photosensibilisatoren sollten als C-Nukleoside in der Lage sein, in den Basenstapel der DNA zu interkalieren. Somit unterstützen diese Ergebnisse auch die theoretische Voraussage, dass für gut interkalierende Systeme der effiziente Transfer aus dem  $T_1$ -Zustand ungehindert stattfinden kann.<sup>[128]</sup> Der  $\beta$ -Wert weist jedoch für **BPMe**-modifizierte Oligonukleotide auf eine stärkere Abstandsabhängigkeit hin ( $0.34 \text{ \AA}^{-1}$ ).

## Distanzabhängigkeit der photoinduzierten T-T-Dimerbildung in DNA

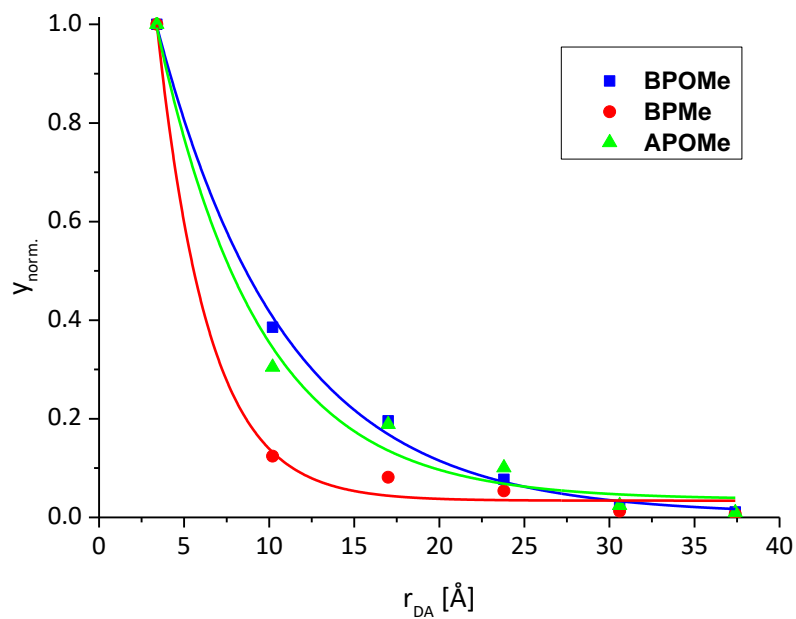


Abbildung 65: Normierte Distanzabhängigkeit der T<>T-Bildung mit BPOMe (blau), BPMe (rot) und APOMe (grün);  $r_{\text{DA}}$  = Donor-Akzeptor-Distanz,  $y_{\text{norm.}}$  = normierte Ausbeute an T<>T, die Linien stellen den jeweiligen exponentiellen Fit dar.

Aufgrund der Ähnlichkeit der  $T_1$ -Energien von **BPOMe** ( $E_T = 290 \text{ kJ/mol}$ )<sup>[129]</sup> und **BPMe** ( $E_T = 290 \text{ kJ/mol}$ )<sup>[129]</sup>, muss diesem beobachteten Unterschied eine photophysikalische Erklärung zu Grunde liegen. Der  $T_1$ -Zustand ( $n\pi^*$ ) von **BP** (und **BPMe**) wird aus dem  $S_1$ -Zustand durch ISC über den  $T_2$ -Zustand erreicht<sup>[25]</sup> (siehe Kapitel 2.1.), während der  $T_1$ -Zustand von **BPOMe** (und **APOMe**) direkt aus dem  $S_1$ -Zustand gebildet wird.<sup>[37, 113]</sup> Dadurch wird die Zeit des ISC von 6 ps für **BPOMe** und **APOMe** auf 18 ps für **BP** und **BPMe** erhöht.<sup>[37]</sup> Unter der Annahme, dass der Triplettenergie transfer über kurze Distanzen in der gleichen Zeitskala stattfindet, benötigt die Rückkehr in den  $T_2$ -Zustand mehr Zeit und wirkt sich in einer erhöhten Distanzabhängigkeit für die T<>T-Bildung bei **BPMe** aus.

#### 6.4. Zusammenfassung

Auch in DNA selbst lassen sich [2+2]-Cycloadditionsprodukte photosensibilisieren. Zur quantitativen Untersuchung von **T<>T** und *Crosslinks* wurde der Sensibilisator **APOMe** in DNA eingebracht. Außerdem wurde die Distanzabhängigkeit der **T<>T**-Bildung mittels PAGE-Analysen quantifiziert und mit dem benzophenonmodifizierten System verglichen. Dieser neue strukturelle Ansatz erlaubte die distanzabhängige Untersuchung der **T<>T**-Bildung, da der Entstehungsort des Triplettenergietransfers durch die Photosensibilisatoren als artifizielle C-Nukleoside genau definiert ist.

Mit **APOMe** konnte eine Ausbeute an **T<>T** von bis zu 17 % bei  $n = 0$  erreicht werden. Es stellte sich heraus, dass die verschiedenen Photosensibilisatoren nicht nur ungleich stark Einfluss auf die Produktbildung nehmen, sondern auch unterschiedlich stark auf die Zersetzung der fluoresceinmarkierten DNA wirken. Die benzophenonmodifizierten Oligonukleotide benötigen eine wesentlich kürzere Reaktionszeit um die maximale Ausbeute an **T<>T** zu generieren (30 min < 3 h), die Produkte werden aber auch rascher wieder zersetzt. Eine Erklärung hierfür könnte die höhere Extinktion der Benzophenone bei 369 nm sein. Auch wenn **BPOMe** und **BPMe** eine höhere Ausbeute an **T<>T** liefern, ist **APOMe** zur Untersuchung der **T<>T**-Bildung besser geeignet, da hier so gut wie keine *Crosslinks*, sondern ausschließlich **T<>T** gebildet werden. Es wurde eine Distanzabhängigkeit der **T<>T**-Bildung über bis zu 10 Basenpaare beobachtet. In allen Fällen lässt die exponentielle Distanzabhängigkeit auf einen Dexter-TTET-Mechanismus schließen. Die unterschiedlichen Werte für die Distanzabhängigkeit der **T<>T**-Bildung können auf photophysikalische Prozesse zurückgeführt werden. Im Vergleich zur Abstandsabhängigkeit von photoinduziertem Elektronentransfer in DNA mit  $\beta = 0.7 \text{ \AA}^{-1}$ ,<sup>[130]</sup> oder in Proteinen mit  $\beta = 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ ,<sup>[131]</sup> ergab die **T<>T**-Bildung der betrachteten Sensibilisatoren über TTET nur eine schwache Distanzabhängigkeit mit  $\beta = 0.13\text{-}0.37 \text{ \AA}^{-1}$ . Diese Ergebnisse stimmen dabei gut überein mit den Werten für TTET zwischen interkalierenden Metallkomplexen in DNA ( $\beta = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ ).<sup>[127]</sup>





## 7. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die Photosensibilisatoren **BPNMe<sub>2</sub>**, **BPOMe**, **BPMe** und **APOMe** als C-Nukleoside erfolgreich synthetisiert und nach DMTr-Schützung und Phosphoramiditsynthese mittels DNA-Festphasensynthese in verschiedene Oligonukleotidsequenzen eingebracht werden. Diese wurden anschließend zur Photosensibilisierung von verschiedenen [2+2]-Cycloadditionen verwendet. Zum einen diente das doppelhelikale Gerüst der DNA als chirales Templat, um enantiomerenangereicherte Additionsprodukte eines Chinolinonsubstrats zu erhalten. Zum anderen wurde die Reaktion zwischen den Thymidinen der DNA selbst initiiert. Hier konnte die sensibilisierte T<>T-Bildung näher analysiert und die Distanzabhängigkeit des TTET in DNA bestimmt werden.

### Distanzabhängigkeit der photoinduzierten T-T-Dimerbildung in DNA

**APOMe** wurde verwendet, um eine [2+2]-Cycloaddition direkt an Pyrimidin-Basen der DNA photokatalytisch zu induzieren. Dabei wurde die Sensibilisatoreffizienz von **APOMe** und die Distanzabhängigkeit der T<>T-Bildung mit den analogen **BPMe**- und **BPOMe**-substituierten Systemen verglichen. Über das in Abbildung 66 dargestellte Prinzip wurde durch Belichtung bei 369 nm **APOMe** energetisch angeregt.

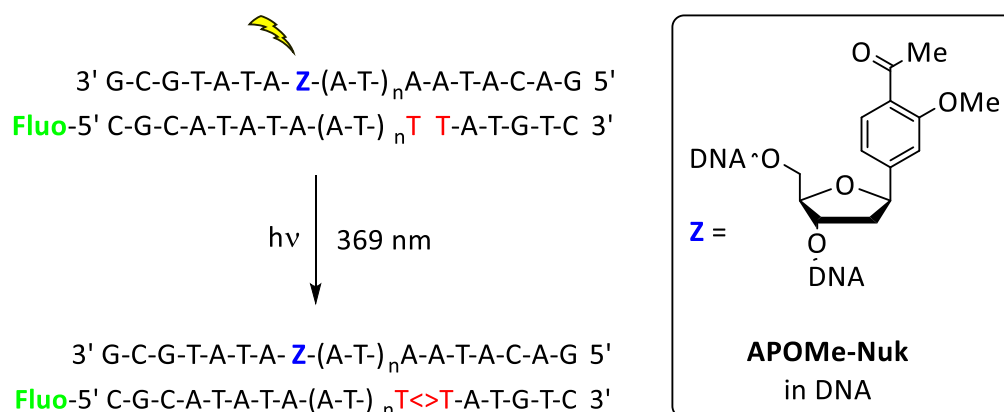


Abbildung 66: Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit der T<>T-Bildung mit APOMe-Nuk als Sensibilisator.

Dieses kann seine Anregungsenergie mittels Energietransfer durch die DNA-Helix an die unverbrückten Thymidine abgeben, woraufhin durch [2+2]-Cycloaddition das Dimer

ausgebildet wird. Über PAGE-Analysen wurde festgestellt, dass bei direkter Nachbarschaft ( $n = 0$ ) eine Ausbeute an  $T\langle\rangle T$  von 16 % erreicht wird, wobei die Ausbeute an *Interstrand Crosslinks* lediglich 1 % betrug. Die  $T\langle\rangle T$ -Bildung weist eine Distanzabhängigkeit auf und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich mechanistisch um einen Dexter-TTET handelt, welcher eine exponentielle Distanzabhängigkeit aufweist. Beim Vergleich mit den benzophenonsubstituierten Oligonukleotiden wurde deutlich, dass diese zwar eine höhere Ausbeute an  $T\langle\rangle T$  erreichen (26 % bei  $n = 0$ ), jedoch auch die *Crosslink*-Bildung verstärkt auftritt (27 % *Crosslinks* bei  $n = 0$ ).

In Anbetracht dieser Ergebnisse, sollte der Einsatz von methoxysubstituierten Benzophenonen als UV-Filter in Sonnencremes überdacht werden. Abhängig vom sensibilisierenden System müssen Faktoren wie Konzentration, Distanzabhängigkeit zur DNA und Eindringtiefe des Sensibilisators in die Hautschichten berücksichtigt werden, um das Gefährdungspotential von Sensibilisatoren in Sonnencreme zu beurteilen. Da die Sensibilisatoren so unterschiedliche Ergebnisse liefern, wäre es sinnvoll die analogen Bestandteile von Sonnencreme (z.B. 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon oder 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenon)<sup>[6]</sup> in DNA einzubringen oder durch Zugabe zur Reaktionslösung den externen Einfluss auf die  $T\langle\rangle T$ -Bildung konzentrationsabhängig zu untersuchen.

### **DNA-gestützte, enantioselektive [2+2]-Cycloaddition**

Nach der Erkenntnis, dass die synthetisierten C-Nukleoside **BPOMe-Nuk** und **BPMe-Nuk** geeignete Photosensibilisatoren für die intramolekulare [2+2]-Cycloaddition von Chinolinon **8** in wässrigem Medium mit Ausbeuten bis zu 99 % darstellen, wurde ein DNA-basiertes System gesucht, das den asymmetrischen Verlauf der Reaktion ermöglicht. Letztendlich konnte dies durch Verwendung von sogenannten *three-way junction*-Oligonukleotiden realisiert werden, die im Bereich der hydrophoben Tasche die sensibilisierende Einheit tragen (Abbildung 67). Diese unspezifischen Aptamere sind in der Lage kleine Moleküle wie Substrat **8** im Bereich des hydrophoben Hohlraums zu binden. Nach Optimierung der Bedingungen konnte unter Verwendung von 20 mol% **3wj\_BPMe\_3** bei 5 °C in wässrigem Medium bei einer Anregungswellenlänge von 369 nm nach 24 h eine Ausbeute von 68 % erreicht werden. Durch die komplexe Struktur der DNA erfährt das

Substrat **8** eine faciale Abschirmung und es konnte ein Enantiomerenüberschuss von 28 % erreicht werden.

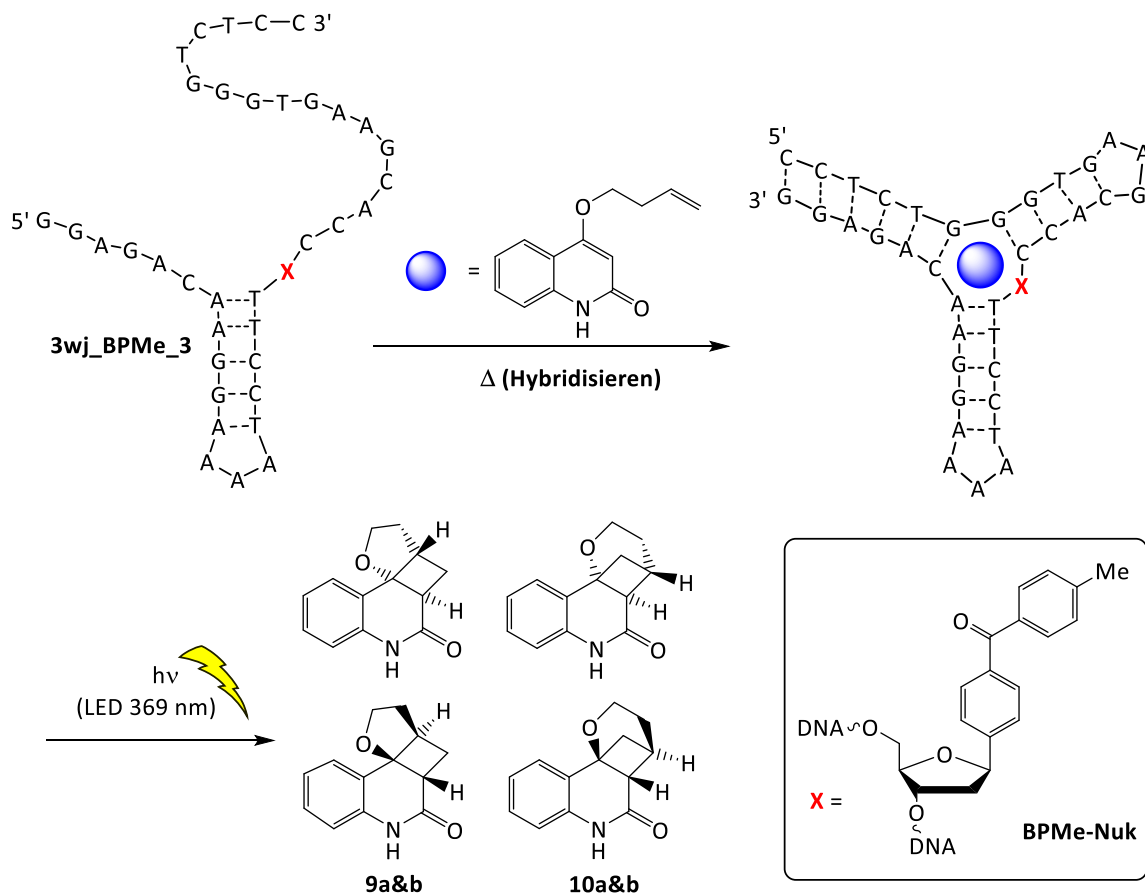


Abbildung 67: Asymmetrische [2+2]-Cycloaddition von **8** mit **3wj\_BPMe\_3**; die blaue Kugel kennzeichnet das Substrat **8** in der hydrophoben Tasche der *three-way junction*.

Als weiterführendes Experiment bietet sich die Verwendung der  $\alpha$ -Anomere der C-Nucleoside an, um deren Ergebnisse mit denen der  $\beta$ -Anomere zu vergleichen. Durch die strukturelle Änderung wäre es denkbar, dass der Abschirmungseffekt der DNA erhöht wird, was sich in einer verbesserten Enantioselektivität der [2+2]-Cycloaddition von Substrat **8** auswirken würde. Außerdem muss unter Berücksichtigung der Ergebnisse des zweiten Teils erwähnt werden, dass die Thyminidine in direkter Nachbarschaft zur sensibilisierenden Einheit (**X**) in der Lage sind  $T \leftrightarrow T$  auszubilden. Da die  $T \leftrightarrow T$ -Bildung als ultraschnelle Reaktion die Energie des Sensibilisators abfängt, kann die eigentliche [2+2]-Cycloaddition des Substrats **8** vermutlich erst anschließend stattfinden.

Zusammenfassend kann der Schluss gezogen werden, dass sich die Photosensibilisatoren **BPOMe**, **BPMMe** und **APOMe** als C-Nucleoside in DNA bestens eignen, um TTET-Prozesse zu initiieren und zu untersuchen.



## 8. Experimenteller Teil

Im Folgenden werden die experimentellen Methoden erläutert, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

### 8.1. Materialien und Geräte

#### Reagenzien

Die bei der Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck*, *Sigma Aldrich*, *Carl Roth* und *ABCR* bezogen.

#### Lösemittel

Die zur Synthese verwendeten Lösemittel wurden mindestens in der Reinheitsstufe p.a. (*pro analysi*) verwendet. Für Aufarbeitungen und säulenchromatische Trennverfahren wurden, falls nicht anders angegeben, technische Lösemittel verwendet.

#### Inertgas

Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden unter Argonatmosphäre (Argon 4.6) durchgeführt. Glasgeräte für Reaktionen unter Feuchtigkeitsausschluss wurden im Hochvakuum mit dem Heißluftfön ausgeheizt.

#### Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0.25 mm verwendet. Die optische Auswertung erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei  $\lambda = 254$  nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei  $\lambda = 366$  nm. Die chemische Auswertung erfolgte entweder mit einer Lösung von Schwefelsäure in Methanol (3 %), oder mit Anisaldehyd Reagenz (0.5 mL Anisaldehyd, 10 mL konz. Essigsäure, 5 mL

konz. Schwefelsäure und 85 mL Methanol) und anschließendem Erhitzen mit dem Heißluftfön.

### **Flash-Chromatografie**

Für säulenchromatographische Aufreinigungen wurde Kieselgel Typ 60 der Firma *Sigma Aldrich* mit einer Porengröße von 60 Å und einer Partikelgröße von 40 - 63 µm verwendet. Die zu reinigende Substanz wurde entweder in der mobilen Phase gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert aufgetragen. Der nötige Überdruck wurde mit einer Handpumpe erzeugt.

### **Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Aufreinigung der Oligonukleotide**

HPLC-Trennungen wurden an einem *Shimadzu 10* System (online-Entgaser, Pumpe LC-10AT, Injektor SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP) durchgeführt. Zur Herstellung der Laufmittel wurde Acetonitril (*LiChrosolv, Merck*) und entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage *Direct-Q 5* verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B).

#### Analytische-Trennung:

Eine analytische Trennung wurde durchgeführt, um die Retentionszeit zu prüfen. Verwendet wurde eine analytische *Supercosil LC 318* Säule (25 cm x 4.6 mm) bei einer Laufmittelgeschwindigkeit von 1 mL/min.

#### Präparative-Trennung:

Verwendet wurde eine präparative *Supercosil LC 318* Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm Porengröße) bei einer Laufmittelgeschwindigkeit von 2.5 mL/min.

### Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Analyse der Photokatalysen

HPLC-Trennungen wurden an einem *Varian* ProStar System (Autosampler 410, zwei Pumpeneinheiten 210, UV/Vis Detektor 325, Steuersoftware Galaxy) durchgeführt. Es wurde eine *Chiralpak* IB-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min. Die Detektion erfolgte bei 242 nm.

### NMR-Messungen

Kernspinresonanz-Analysen wurden in deuterierten Lösemitteln der Firma *euriso top* an folgenden Geräten durchgeführt.

- $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (75 MHz): *Bruker B-ACS 60*
- $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (101 MHz),  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (162 MHz): *Bruker Avance DRX 500*
- $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (126 MHz),  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (202 MHz): *Bruker Ascend 500*

Die chemische Verschiebung der Signale wurde in ppm angegeben. Als Referenz diente Tetramethylsilan. Die Kalibrierung erfolgte dabei über das Signal der unvollständig deuterierten Lösemittel. Die angegebenen Kopplungskonstanten *J* wurden als Betrag in Hertz (Hz) angegeben und je nach Multiplizität wie folgt abgekürzt:

s (Singulett), br (breites Signal), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multiplet)

### Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden von der Analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie am Gerät *Finnigan* Modell MAT 95 aufgenommen. Bei den dabei verwendeten Ionisationstechniken handelte es sich um Elektronenstoßionisation (EI) und Fast Atom

Bombardment (FAB). Außerdem wurde ein *Expression CMS* der Firma *Advion* mit chemischer Ionisation als Ionisationsmethode bei Atmosphärendruck (APCI) verwendet.

### **Absorptionsspektroskopie**

Die UV-Vis-Absorptionsspektren wurden in Quarzglasküvetten der Firma *Starna* durchgeführt. Diese hatten einen Durchmesser von 1 cm sowie ein Volumen von 1 mL.

Gemessen wurde an einem *Lambda 750* der Firma *Perkin Elmer* mit Peltierelement *PTP 6+6 Peltier System* und einem Thermostat *F4391* der Firma *Haake*.

### **Schmelztemperaturmessungen**

Schmelztemperaturmessungen der Oligonukleotide wurden an einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit Temperatureinheit gemessen. Sie erfolgten über einen Temperaturbereich von 10 – 90 °C. Die Temperatur am Start- bzw. Endpunkt wurde jeweils 10 min konstant gehalten. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min.

### **Fluoreszenzspektroskopie**

Die Fluoreszenzspektren wurden bei 20 °C an einem *Fluoromax-4* von *Jobin-Yvon* mit Peltier-Element aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte über die Steuersoftware *FluorEssence*. Es wurde eine Korrektur der Spektren gegen die Ramanstreuung des reinen Lösemittels durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Increment: 0.1 nm; Increment time: 0.2 s; Slits 3 nm.

### **Belichtungsexperimente**

Die Belichtungsexperimente wurden mit Hilfe einer Hochleistungs-UV-LED (NVSU233AT) der Firma *Nichia* bei 369 nm (Emissionsbereich: 350-420 nm, 1030 mW) durchgeführt. Der Belichtungsreaktor wurde durch die zentrale feinmechanische und elektronische Abteilung



der Universität Regensburg gefertigt. Außerdem beinhaltet das System einen Thermostat (RA 8) der Firma *Lauda*. Die Experimente wurden durch einen externen Magnetrührer gerührt.

### Emissionsbestimmung der LEDs

Die Bestimmung des Emissionsmaximums, der vom Hersteller als 365 nm angegebenen LEDs, erfolgte mit Hilfe eines *OceanOptics* Modell: *HR2000* mit optischer Faser von *Thorlabs* (Durchmesser: 200  $\mu\text{m}$ , NA: 0.22, SMA-SMA), dem Detektor *DET2* und einer Bandweite von 200-1100 nm unter Verwendung der Software *OceanView*. Die Messeung erfolgte mit einem Gitter *#HC1* und einer Slitweite von 25 nm.

### DNA-Festphasensynthese

Die Synthese der DNA-Stränge erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909* Syntheseautomat der Firma *Applied Biosystems* mittels Phosphoramidit-Methode.

### Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamid-Gele wurden in einer *Sequi-Gen DT Sequencing Cell* (21  $\times$  40 cm) mit einem *PowerPac HV* von *Bio-Rad* unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 12.5 %iges Gel
- T = 50 °C
- t = 1 h
- U = 3000 V
- P = 45 W

Des Weiteren wurden kleinere Polyacrylamid-Gele in einer *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (10  $\times$  10 cm) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

## Experimenteller Teil

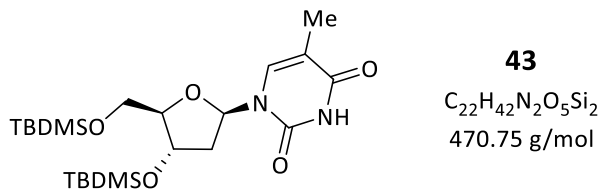
- 12.5 %iges Gel
- T = RT
- t = 30 min
- U = 150 V
- I = 40 mA

### **Fluorescein-Markierung**

Die Fluorescein-markierten DNA-Stränge auf den Polyacrylamid-Gelen wurden mit einem Fluoreszenzimager *Stella 830* von *Raytest* ausgelesen. Mit einer LED der Wellenlänge  $470 \pm 20$  nm wurde Fluorescein angeregt. Die Detektion der Emission erfolgte durch eine CCD-Kamera, welche auf  $-20$  °C gekühlt wurde. Alle Polyacrylamid-Gele wurden mit einer Belichtungszeit von 1 min aufgenommen. Die Auswertung erfolgte auch durch das Programm *Image Analyzer v.450* von *Raytest*.

## 8.2. Synthesevorschriften

### Synthese von **43**



In einem Kolben wurden 10.0 g 2'-Desoxythymidin (41.3 mmol, 1.00 eq) und 11.8 g Imidazol (173 mmol, 4.20 eq) in 100 mL abs. DMF 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 13.1 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (86.7 mmol, 2.10 eq) wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Reaktionslösung wurden 100 mL Wasser gegeben und das Produkt mit Hexan aus der Lösung extrahiert. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und 19.3 g **43** (41.0 mmol) wurden als weißer Feststoff erhalten (99 %).

**DC** (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 19/1)

$R_f = 0.81$

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  (ppm) = 8.30 (s, 1H, NH), 7.47 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, Thy-H), 6.33 (dd,  $J = 7.9, 5.8$  Hz, 1H, 1'-H), 4.40 (dt,  $J = 5.5, 2.6$  Hz, 1H, 3'-H), 3.97 – 3.82 (m, 1H, 4'-H), 3.76 (dd,  $J = 11.4, 2.4$  Hz, 1H, 5'-H), 2.25 (ddd,  $J = 13.1, 5.8, 2.6$  Hz, 1H, 2'-H), 2.00 (ddd,  $J = 13.1, 8.0, 6.0$  Hz, 1H, 2'-H), 1.92 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, Thy-Me), 0.93 (s, 9H, Si-tBu), 0.89 (s, 9H, Si-tBu), 0.11 (d,  $J = 0.8$  Hz, 6H, Si-Me), 0.08 (d,  $J = 2.1$  Hz, 6H, Si-Me).

**2D-NMR** (CDCl<sub>3</sub>)

COSY

NOESY

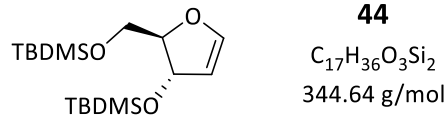
## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  (ppm) = -5.3, -5.2, -4.7, -4.5, 12.7, 18.1, 18.5, 25.9, 26.0, 41.5, 63.1, 72.4, 85.0, 88.2, 111.0, 135.6, 150.5, 164.1.

### FAB-MS

$m/z$  (%): 471.4 (52) [(M+H)<sup>+</sup>].

Synthese von **44**

Eine Mischung aus 3.00 g **43** (6.40 mmol, 1.00 eq) und 337 mg Ammoniumsulfat (2.55 mmol, 0.400 eq) wurden in einem trockenen Kolben in 15.0 mL HMDS (11.7 g, 72.5 mmol, 11.4 eq) gelöst und unter Argonatmosphäre für 4 h unter Rückfluss erhitzt. HMDS wurde im Vakuum entfernt, der braune Rückstand in DCM gelöst, mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung, Wasser und NaCl-Lösung gewaschen und über  $NaSO_4$  getrocknet. Nach Entfernung des Lösemittels wurde das Rohprodukt durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/EE 19/1) gereinigt und 1.27 g **44** (3.69 mmol) wurden als leicht gelbes Öl erhalten (58 %).

DC ( $SiO_2$ , Hexan/EE 19/1)

$$R_f = 0.70$$

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 6.4 (dd,  $J = 2.7, 1.0$  Hz, 1H, 1'-H), 5.01 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H, 2'-H), 4.86 (td,  $J = 2.7, 1.1$  Hz, 1H, 3'-H), 4.29 (td,  $J = 6.0, 2.7$  Hz, 1H, 4'-H), 3.69 (dd,  $J = 10.7, 5.7$  Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.51 (dd,  $J = 10.7, 6.4$  Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 0.89 (d,  $J = 2.0$  Hz, 18H, Si-tBu), 0.07 (d,  $J = 2.8$  Hz, 12H, Si-Me).

2D-NMR ( $CDCl_3$ )

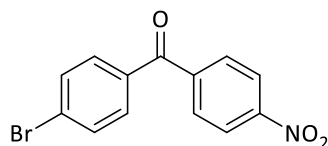
COSY

NOESY

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = -5.2, -5.1, -4.3, -4.1, 18.3, 18.4, 26.0, 26.0, 63.0, 76.1, 89.1, 103.6, 149.1.

## Synthese von 52



**52**  
 $C_{13}H_8BrNO_3$   
 306.12 g/mol

In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argonatmosphäre 2.00 g 4-Nitrobenzoylchlorid (10.7 mmol, 1.00 eq) und 1.50 mL Brombenzol (1.69 g, 10.7 mmol, 1.00 eq) in 60 mL abs. DCM gelöst und 5 min gerührt. Es wurden 2.85 g  $AlCl_3$  (21.4 mmol, 2.00 eq) bei 0 °C hinzugegeben und die Mischung wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in ein Eisbad (300 mL Eis) geschüttet, mit EE extrahiert, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/EE 40/1) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 0.873 g **52** (2.85 mmol) als gelber Feststoff gewonnen (27 %).

**DC** ( $SiO_2$ , Hexan/EE 10/1)

$R_f = 0.41$

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $[d_6]$ -DMSO):

$\delta$  (ppm) = 8.40-8.34 (m, 2H, Aryl-H), 7.99-7.93 (m, 2H, Aryl-H) 7.84-7.78 (m, 2H, Aryl-H), 7.74-7.68 (m, 2H, Aryl-H).

**2D-NMR** ( $[d_6]$ -DMSO)

COSY

NOESY

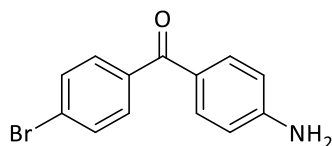
**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz,  $[d_6]$ -DMSO):

$\delta$  (ppm) = 193.7, 149.5, 142.1, 135.0, 131.9, 130.8, 127.7, 123.7.

**EI-MS**

$m/z$  (%) = 307.1 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].

## Synthese von **47a**



**47a**  
 $C_{13}H_{10}BrNO$   
 276.13 g/mol

Zu einer Mischung aus 0.203 g **52** (0.660 mmol, 1.00 eq) und 0.160 mL konz. HCl (0.070 g, 1.92 mmol, 2.90 eq) in 80 %igem EtOH wurden 0.174 g Eisen-Pulver (3.12 mmol, 4.70 eq) gegeben. Diese Mischung wurde 14 h bei 85 °C ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde das Eisenoxid abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in EE gelöst, mit 10 %iger  $Na_2CO_3$ -Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/EE 5/1) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 0.106 g **47a** (0.384 mmol) als orange-gelber Feststoff gewonnen (59 %).

**DC** ( $SiO_2$ , Hexan/EE 5/1)

$$R_f = 0.20$$

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $[d_6]$ -DMSO):

$\delta$  (ppm) = 7.73-7.68 (m, 2H, Aryl-H), 7.57-7.48 (m, 4H, Aryl-H), 6.63-6.56 (m, 2H, Aryl-H), 6.23 (s, 2H,  $NH_2$ ).

**2D-NMR** ( $[d_6]$ -DMSO)

COSY

NOESY

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz,  $[d_6]$ -DMSO):

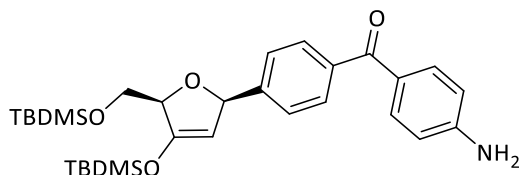
$\delta$  (ppm) = 192.2, 154.0, 138.1, 132.7, 131.1, 130.8, 124.7, 123.2, 112.5.



**FAB-MS**

$m/z$  (%) = 276.0 (98) [M].

## Synthese von 49a



**49a**

$C_{30}H_{45}NO_4Si_2$   
539.86 g/mol

In einem trockenem Vial wurden 252 mg **47a** (0.917 mmol, 1.00 eq), 321 mg **44** (0.917 mmol, 1.00 eq) und 270  $\mu$ L  $Et_3N$  (197 mg, 1.95 mmol, 2.12 eq) in 6 mL MeCN gelöst und 10 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend im Ultraschallbad 10 min mit Argon gespült und entgast. Dann wurden 111 mg  $Pd(dppf)Cl_2$  (0.154 mmol, 0.168 eq) hinzugegeben und die Mischung wurde 20 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/Essigester 5/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 251 mg **49a** (0.465 mmol) als gelbliches Öl erhalten (52 %).

DC ( $SiO_2$ , Hexan/EE 5/1)

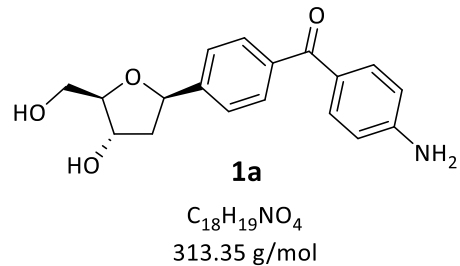
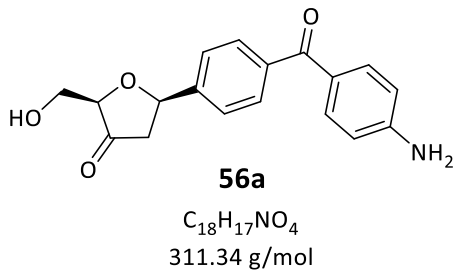
$$R_f = 0.54$$

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $[d_6]$ -DMSO):

$\delta$  (ppm) = 7.61-7.44 (m, 6H, Aryl-H), 6.77 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, Aryl-H), 6.60 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, Aryl-H), 6.16 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $NH_2$ ), 5.11 (dd,  $J = 10.8, 5.3$  Hz, 1H, 2'-H), 4.34 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, 1'-H), 3.85 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, 4'-H), 3.68 (dd,  $J = 10.7, 4.5$  Hz, 1H, 5'-H\_a), 3.54 (dd,  $J = 10.7, 6.8$  Hz, 1H, 5'-H\_b), 0.14, 0.11 (d,  $J = 0.8$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, 18H, Si-tBu), 0.06, 0.01 (d,  $J = 0.8$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, 12H, Si-Me).

**$^{13}C$ -NMR** (101 MHz,  $[d_6]$ -DMSO):

$\delta$  (ppm) = 193.1, 153.7, 145.5, 138.0, 132.6, 128.8, 125.7, 123.8, 112.5, 88.1, 79.1, 73.9, 43.5, 1.8, 0.2, -0.5.

Synthese von **1a** über die Synthese von **56a**

In einem trockenen Kolben wurden 123 mg **49a** (0.230 mmol, 1.00 eq) in 6 mL abs. THF gelöst. Unter Argon wurden 306.0  $\mu$ L Triethylamintrihydrofluorid (309 mg, 1.92 mmol, 8.40 eq) bei 0 °C zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 30 °C gerührt. Dann wurde die Mischung über eine kurze Kieselgelsäule (1.5 cm) gegeben und mehrmals mit Aceton gespült. Anschließend wurden die Lösemittel entfernt. Ohne weitere Aufreinigung wurde **56a** in 8 mL eines Gemisches aus Essigsäure und Acetonitril (1/1) gelöst und unter Argon bei 0 °C wurden 109 mg Natriumtriacetoxyborhydrid (0.510 mmol, 1.50 eq) zugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1/1) versetzt. Nach dem Entfernen der Lösemittel wurden 46.1 mg des reinen Produkts **1a** (0.149 mmol) mittels FC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 20/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) als rot-oranger Feststoff erhalten (65 %).

DC ( $SiO_2$ , DCM)

**56a**  $R_f = 0.13$

DC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 20/1)

**1a**  $R_f = 0.18$

## Experimenteller Teil

### <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO):

δ (ppm) = 7.70-7.39 (m, 6H, Aryl-H), 6.60 (d, J=8.40 Hz, 2H, Aryl-H), 6.15 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.09 (dd, J=10.3, 5.4 Hz, 1H, 1'-H), 4.22 (d, J=5.3 Hz, 1H, 3'-H), 3.83 (s, 1H, 4'-H), 3.48 (dd, J=11.9, 5.2 Hz, 1H, 5'-H), 3.48 (dd, J=11.9, 5.2 Hz, 1H, 5'-OH), 2.14 (dd, J=12.1, 5.4 Hz, 1H, 2'-H), 1.90-1.76 (m, 2H, 2'-H, 3'-OH).

### 2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

### <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO):

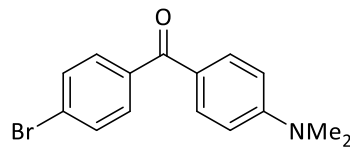
δ (ppm) = 193.2, 153.7, 146.0, 137.9, 132.6, 128.9, 125.7, 123.8, 112.5, 90.0, 78.9, 72.5, 62.5, 43.6.

### FAB-MS

$m/z$  (%) = 314.2 (70.5) [(M+H)<sup>+</sup>].

### HR-MS (FAB)

Gefunden:  $m/z$ : 314.1386 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 314.1387.

**Synthese von 47b**

**47b**  
 $C_{15}H_{14}BrNO$   
 304.18 g/mol

In einem trockenen Kolben wurden unter Argonatmosphäre 5.00 g 4-Brombenzoylchlorid (22.8 mmol, 1.00 eq) in 100 mL absolutem Ether gelöst und 4.3 mL *N,N*-Dimethylanilin (4.31 g, 34.2 mmol, 1.50 eq) zugegeben. Dann wurde die Lösung für 10 min mit Argon gespült. Anschließend wurden 8.81 g  $AlCl_3$  (66.1 mmol, 2.90 eq) bei 0 °C hinzugegeben und die Mischung wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde in ein Eisbad mit HCl-Lösung (500 mL Eis mit 45 mL konz. HCl) geschüttet. Dann wurde die wässrige Mischung mit Chloroform extrahiert, nacheinander mit 1 N HCl-Lösung, Wasser und Salzlösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und vom Lösemittel befreit. Das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/Essigester 10/1) gereinigt, im HV getrocknet und 2.62 g **47b** (8.61 mmol) wurden als gelber Feststoff erhalten (38 %).

**DC** ( $SiO_2$ , Hexan/EE 10/1)

$$R_f = 0.24$$

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 7.76 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, Aryl-H), 7.59 (s, 4H, Aryl-H), 6.69 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, Aryl-H), 3.08 (s, 6H, N-Me).

**2D-NMR** ( $CDCl_3$ )

COSY

NOESY

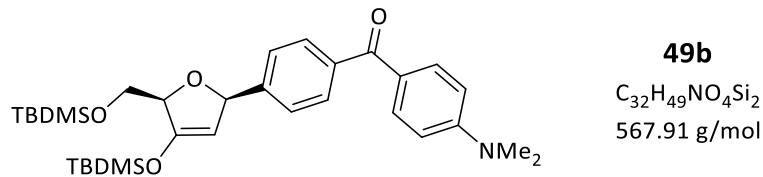
## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  (ppm) = 194.0, 153.5, 138.2, 132.8, 131.3, 126.0, 124.6, 110.8, 40.2.

### EI-MS

$m/z$  (%): 303.0 (100) [M<sup>+</sup>].

Synthese von **49b**

In einem trockenem Vial wurden 250 mg **47b** (0.821 mmol, 1.00 eq), 283 mg **44** (0.821 mmol, 1.00 eq) und 191  $\mu$ L  $Et_3N$  (178 mg, 1.77 mmol, 2.15 eq) in 20 mL MeCN gelöst und 10 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend 10 min mit Argon gespült und entgast. Dann wurden 101 mg  $Pd(dppf)Cl_2$  (0.123 mmol, 0.150 eq) hinzugegeben und die Mischung wurde 20 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/Essigester 20/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 335 mg **49b** (0.590 mmol) als gelbliches Öl erhalten (28 %).

DC ( $SiO_2$ , Hexan/EE 20/1)

$$R_f = 0.14$$

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $[d_6]$ -DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.71 – 7.52 (m, 6H, Aryl-H), 6.76 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, Aryl-H), 5.73 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, 2'-H), 5.03 (s, 1H, 1'-H), 4.54 (s, 1H, 4'-H), 3.86 – 3.61 (m, 2H, 5'-H), 3.03 (s, 6H, N-Me), 0.92 (s, 9H, Si-tBu), 0.85 (s, 9H, Si-tBu), 0.23 (s, 3H, Si-Me), 0.20 (s, 3H, Si-Me), 0.01 (s, 6H, Si-Me).

2D-NMR ( $[d_6]$ -DMSO)

COSY

NOESY

## Experimenteller Teil

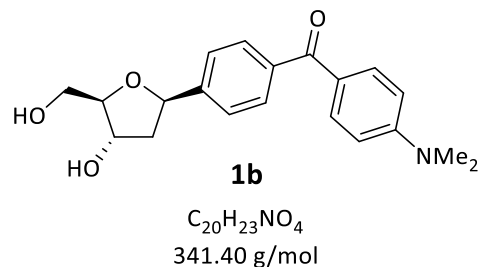
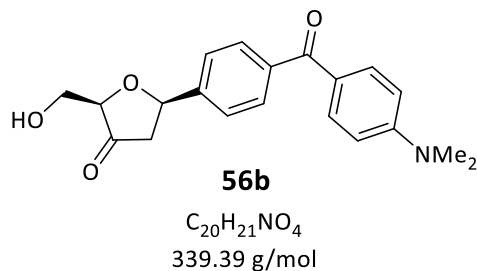
### <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 193.3, 153.2, 150.2, 146.5, 138.1, 132.1, 128.7, 126.8, 123.6, 110.7, 102.1, 83.4, 63.5, 59.8, 39.6, 25.8, 18.2, 17.7, -5.2, -5.4.

### FAB-MS

$m/z$  (%): 568.4 (76) [(M+H)<sup>+</sup>].



Synthese von **1b** über die Synthese von **56b**

In einem trockenen Kolben wurden 74.0 mg **49b** (0.130 mmol, 1.00 eq) in 5 mL abs. THF gelöst. Unter Argon wurden 58.0  $\mu$ L Triethylamintrihydrofluorid (59.0 mg, 0.360 mmol, 2.80 eq) bei 0 °C zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Mischung über eine kurze Kieselgelsäule (1.5 cm) gegeben und mehrmals mit Aceton gespült. Anschließend wurden die Lösemittel entfernt. Ohne weitere Aufreinigung wurde **56b** in 3 mL eines Gemisches aus Essigsäure und Acetonitril (1/1) gelöst und unter Argon bei 0 °C wurden 42.0 mg Natriumtriacetoxyborhydrid (0.200 mmol, 1.00 eq) zugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) versetzt. Nach dem Entfernen der Lösemittel wurden 33.0 mg des reinen Produkts **1b** (0.0967 mmol) mittels FC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 40/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) als gelbes Öl erhalten (75 %).

DC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 20/1)

**56b**  $R_f = 0.39$

**1b**  $R_f = 0.12$

## Experimenteller Teil

### <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.70 – 7.54 (m, 4H, Aryl-H), 7.50 (d, J = 7.9 Hz, 2H, Aryl-H), 6.76 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Aryl-H), 5.10 (dd, J = 10.3, 5.4 Hz, 1H, 1'-H), 4.82 (br, 1H, 3'-OH), 4.22 (d, J = 5.2 Hz, 1H, 3'-H), 3.88 – 3.76 (m, 1H, 4'-H), 3.58 – 3.26 (m, 3H, 5'-H & 5'-OH), 3.03 (s, 6H, N-Me), 2.21 – 2.09 (m, 1H, 2'-H), 1.88 – 1.72 (m, 1H, 2'-H).

### 2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

### <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

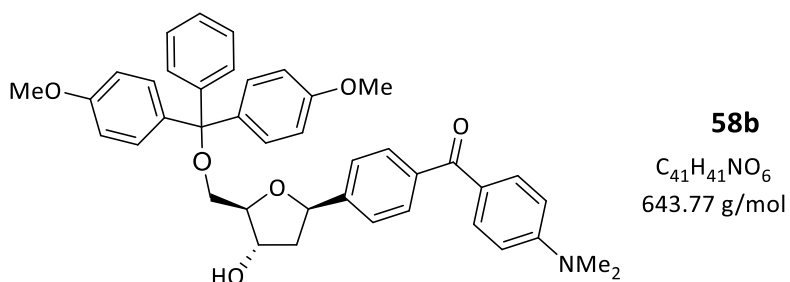
δ (ppm) = 193.3, 153.2, 146.2, 137.7, 132.1, 128.9, 125.7, 123.7, 110.7, 87.8, 78.8, 72.4, 64.4, 43.6, 39.6.

### FAB-MS

*m/z* (%): 342.2 (28) [(M+H)<sup>+</sup>].

### HR-MS (FAB)

Gefunden: *m/z*: 342.1703 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 342.1700.

Synthese von **58b**

In einem trockenen Kolben wurden 199 mg **1b** (0.583 mmol, 1.00 eq) in 15 mL abs. Pyridin gelöst. Unter Argon wurden 217 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.641 mmol, 1.10 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurden 215 mg des reinen Produkts **58b** (0.334 mmol) mittels FC (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 40/1 + 0.1 % Et<sub>3</sub>N) als gelber Feststoff erhalten (59 %).

**DC** (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 20/1)

$$R_f = 0.21$$

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.78 - 6.76 (m, 21 H, Aryl-H), 5.17 (m, 2H, 1'-H & 3'-OH), 4.17 (m, 1H, 3'-H), 3.97 (m, 1H, 4'-H), 3.72 (s, 6H, O-Me), 3.13 (s, 1H, 5'-H), 3.03 (m, 6H, N-Me<sub>2</sub>), 2.22 (m, 1H, 2'-H), 1.88 (m, 1H, 2'-H).

**2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

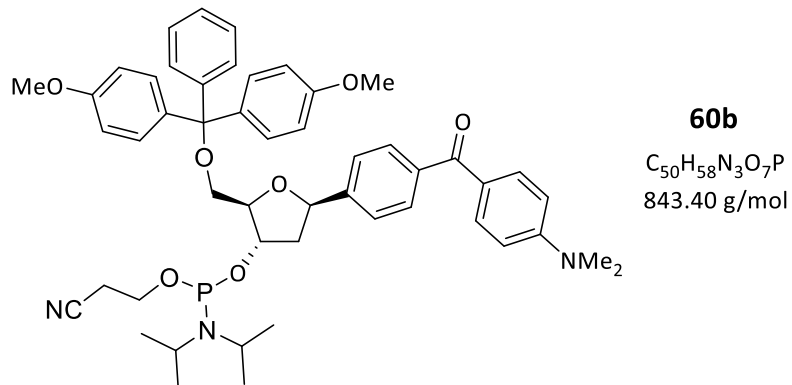
## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) =193.2, 158.0, 153.2, 146.0, 144.9, 137.7, 135.6, 132.1, 129.7, 129.0, 127.8  
127.7, 126.6, 125.5, 123.7, 113.1, 110.7, 86.2, 85.4, 78.9, 72.5, 64.4, 59.7, 55.0, 43.7.

### FAB-MS

*m/z* (%): 644.3 (6) [(M+H)<sup>+</sup>].

Synthese von **60b**

In einem trockenen Kolben wurden 84.0 mg **58b** (0.130 mmol, 1.00 eq) in 8 mL abs. DCM gelöst. Unter Argon wurden 77.7  $\mu$ L Diisopropylethylamin (60.0 mg, 0.457 mmol, 3.50 eq) zugegeben und die Lösung wurde 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 43.7  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (46.0 mg, 0.196 mmol, 1.50 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Diisopropylethylamin-2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramiditdem Entfernen des Lösemittels wurden 81.0 mg des reinen Produkts **60b** (0.960 mmol) mittels FC ( $SiO_2$ , DCM/Aceton 50/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) als gelber Feststoff erhalten (73 %).

DC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 20/1)

$R_f = 0.23$

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.68 – 7.59 (m, 4H, Aryl-H), 7.53 (dd, J = 8.3, 1.7 Hz, 2H, Aryl-H), 7.46 – 7.38 (m, 2H, Aryl-H), 7.31 – 7.19 (m, 7H, Aryl-H), 6.91 – 6.85 (m, 4H, Aryl-H), 6.79 – 6.72 (m, 2H, Aryl-H), 5.18 (dd, J = 10.2, 5.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.45 (dd, J = 10.7, 5.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.21 – 4.07 (m, 2H, 4'-H), 3.80 – 3.64 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>), 3.72 (s, 6H, 2·OMe), 3.56 (m, 2H, 2·NCH), 3.19 (m, 2H, 5'-H), 3.03 (s, 6H, NMe<sub>2</sub>), 2.77 - 2.67 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.37 (m, 1H, 2'-H), 2.08 – 1.94 (m, 1H, 2'-H), 1.16 – 1.09 (m, 9H, 3·NCHCH<sub>3</sub>), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 1·NCHCH<sub>3</sub>).

**2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 193.2, 158.1, 153.2, 145.2, 144.8, 138.0, 135.5, 132.1, 129.7, 129.0, 127.8, 126.7, 125.6, 123.6, 119.0, 118.9, 113.2, 110.7, 85.5, 79.1, 63.9, 58.4, 55.0, 42.6, 42.5, 40.2, 40.0, 39.6, 24.3, 22.5, 19.8.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

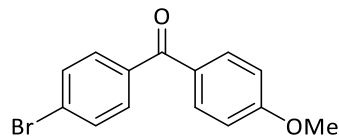
δ (ppm) = 147.1, 146.6.

**FAB-MS**

*m/z* (%): 844.3 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].

**HR-MS (FAB)**

Gefunden: *m/z*: 844.4085 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 844.4085.

Synthese von **47c**

**47c**  
 $C_{14}H_{11}BrO_2$   
 291.14 g/mol

In einem trockenen Kolben wurden unter Argonatmosphäre 5.00 g 4-Brombenzoylchlorid (22.8 mmol, 1.00 eq) in 25 mL wasserfreiem Nitrobenzol bei 0 °C gelöst und 3.34 g  $AlCl_3$  (25.1 mmol, 1.10 eq) hinzugefügt. Nachdem die Mischung 10 min gerührt wurde, wurden 7.57 mL Anisol (7.50 g, 34.2 mmol, 1.50 eq) langsam zugegeben. Dann wurde die Lösung für 30 min bei 0 °C und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Lösung in 200 mL Eis geschüttet, mit DCM extrahiert, mit 1 N HCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/Essigester 20/1) gereinigt, im HV getrocknet und 6.39 g **47c** (21.9 mmol) wurden als weißer Feststoff erhalten (96 %).

**DC** ( $SiO_2$ , Hexan/EE 20/1)

$$R_f = 0.22$$

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 7.79 (dd,  $J = 8.9, 1.2$  Hz, 2H, Aryl-H), 7.62 (7,  $J = 1.0$  Hz, 4H, Aryl-H), 7.03 - 6.89 (m, 2H, Aryl-H), 3.89 (s, 3H, O-Me).

**2D-NMR** ( $CDCl_3$ )

COSY

NOESY

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ )

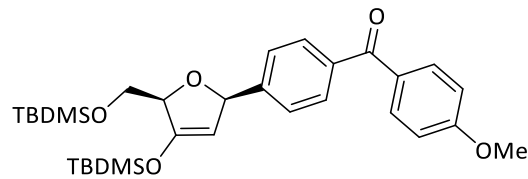
$\delta$  (ppm) = 194.5, 163.6, 137.2, 132.6, 131.6, 131.4, 129.9, 127.0, 113.8, 55.7.

Experimenteller Teil

**EI-MS**

*m/z* (%): 291.0 (100) [M<sup>+</sup>].



Synthese von **49c****49c**C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

554.87 g/mol

In einem trockenem Vial wurden 500 mg **47c** (1.71 mmol, 1.00 eq), 591 mg **44** (1.71 mmol, 1.00 eq) und 541  $\mu$ L Et<sub>3</sub>N (373 mg, 3.69 mmol, 2.20 eq) in 15 mL MeCN gelöst und 20 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend im Ultraschallbad 5 min mit Argon gespült und entgast. Dann wurden 210 mg Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0.258 mmol, 0.100 eq) hinzugegeben und die Mischung wurde 60 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde durch FC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester 20/1) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 435 mg **49c** (0.590 mmol) als gelbliches Öl erhalten (46 %).

DC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EE 20/1)

R<sub>f</sub> = 0.20

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.77 – 7.68 (m, 2H, Aryl-H), 7.62 (s, 4H, Aryl-H), 7.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Aryl-H), 5.78-5.69 (m, 1H, 2'-H), 5.02 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.57-4.48 (m, 1H, 4'-H), 3.83 (s, 1H, O-Me), 3.80 – 3.72 (m, 2H, 5'-H), 0.92 (s, 9H, Si-tBu), 0.84 (s, 9H, Si-tBu), 0.21 (d, *J* = 10.1 Hz, 6H, Si-Me), 0.01 (s, 6H, Si-Me).

2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

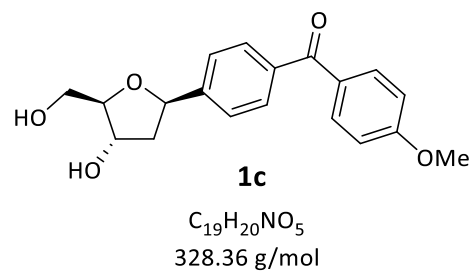
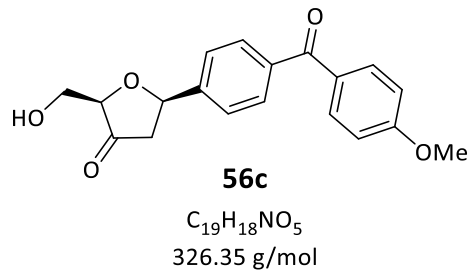
## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 162.9, 150.2, 147.4, 136.9, 132.1, 129.4, 129.1, 126.9, 113.9, 83.3, 63.5, 55.6, 25.7, 25.4, 22.1, 18.1, 17.7, -5.4.

### FAB-MS

*m/z* (%): 555.3 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].

Synthese von **1c** über die Synthese von **56c**

In einen trockenen Rundkolben wurden 1.50 g **49c** (2.71 mmol, 1.00 eq) in 30 mL abs. THF gelöst und unter Argon-Atmosphäre bei 0 °C mit 1.21 mL  $Et_3N \cdot 3HF$  (1.22 g, 7.58 mmol, 2.80 eq) versetzt. Die Lösung wurde 15 min bei 0 °C und anschließend über Nacht bei 30 °C gerührt. Danach wurde das Gemisch auf eine kurze Kieselgelsäule gegeben und mit Aceton eluiert. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ohne weitere Aufreinigung wurde **56c** anschließend in 40 mL AcOH/MeCN (1/1) gelöst und bei 0 °C mit 1.45 g  $NaBH(OAc)_3$  (6.86 mmol, 1.50 eq) versetzt. Das Gemisch wurde 40 min gerührt und anschließend mit 40 mL EtOH/H<sub>2</sub>O (1/1) neutralisiert. Nach dem Entfernen der Lösemittel wurden 667 mg des reinen Produkts **1c** (2.04 mmol) mittels FC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 20/1) als gelbes Öl erhalten (75 %).

**DC** ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 40/1)

**56c**  $R_f = 0.30$

**1c**  $R_f = 0.09$

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.74 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, Aryl-H), 7.65 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, Aryl-H), 7.53 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, Aryl-H), 7.09 (d,  $J = 8.8$  Hz, 3H, Aryl-H), 5.11 (q,  $J = 5.8$  Hz, 2H, 1'-H, 3'-OH), 4.79 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H, 5'-OH), 4.22 (s, 1H, 3'-H), 3.86 (d, 1.8 Hz, 3H, O-Me, ), 3.83, dd,  $J = 5.55, 2.2$  Hz, 1H, 4'-H), 3.56 – 3.39 (m, 2H, 5'-H), 2.16 (ddd,  $J = 12.6, 5.5, 1.6$  Hz, 1H, 2'-H), 1.80 (ddd,  $J = 12.8, 10.5, 5.5$  Hz, 1H, 2'-H).

## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 162.88, 147.20, 132.13, 129.43, 125.85, 113.88, 88.00, 78.81.

### 2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

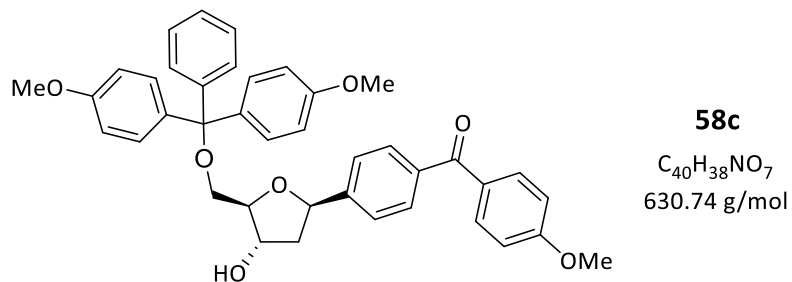
NOESY

### FAB-MS

$m/z$  (%): 329.1 (42) [(M+H)<sup>+</sup>].

### HR-MS (FAB)

Gefunden:  $m/z$ : 329.1382 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 329.1384.

Synthese von **58c**

In einem trockenen Kolben wurden 257 mg **1c** (0.780 mmol, 1.00 eq) in 20 mL abs. Pyridin gelöst. Unter Argon wurden 292 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.862 mmol, 1.10 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurden 336 mg des reinen Produkts **58c** (0.533 mmol) mittels FC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EE 2/1 + 0.1 % Et<sub>3</sub>N) als gelber Feststoff erhalten (68 %).

**DC** (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EE 2/1)

$$R_f = 0.15$$

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.74 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Aryl-H), 7.66 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Aryl-H), 7.53 (d, J = 7.9 Hz, 2H, Aryl-H), 7.42 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Aryl-H), 7.34 - 7.18 (m, 7H, Aryl-H), 7.08 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Aryl-H), 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 4H, Aryl-H), 5.20 - 5.15 (m, 2H, 1'-H, 3'-OH), 4.18 (s, 1H, 3'-H), 4.03 (s, 1H, 4'-H), 3.86 (s, 3H, O-Me), 3.72 (s, 6H, O-Me), 3.13 (s, 2H, 5'-H), 2.26 - 2.18 (m, 1H, 2'-H), 1.91 - 1.82 (m, 1H, 2'-H).

**2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

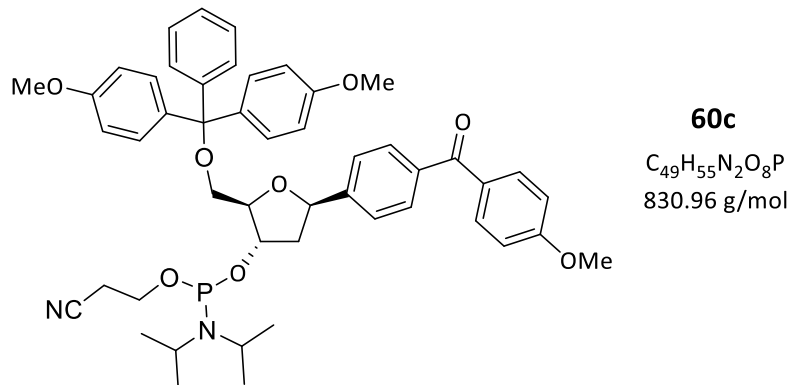
## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 132.1, 129.8, 129.5, 127.8, 126.7, 125.7, 113.9, 132.1, 129.8, 127.8, 126.7, 125.7, 113.9, 113.2, 85.4, 78.9, 72.4, 64.4, 59.8, 55.6, 43.7.

### FAB-MS

$m/z$  (%): 631.3 (9) [(M+H)<sup>+</sup>].

Synthese von **60c**

In einem trockenen Kolben wurden 120 mg **58c** (0.190 mmol, 1.00 eq) in 10 mL abs. DCM gelöst. Unter Argon wurden 113  $\mu$ L Diisopropylethylamin (860 mg, 0.666 mmol, 3.50 eq) zugegeben und die Lösung wurde 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 44.7  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (47.0 mg, 0.285 mmol, 1.50 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels wurden 140 mg des reinen Produkts **60c** (0.168 mmol) mittels FC ( $SiO_2$ , DCM/Aceton 25/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) als weißer Feststoff erhalten (89 %).

**DC** ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 25/1)

$R_f = 0.75$

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Aryl-H), 7.70 – 7.65 (m, 2H, Aryl-H), 7.56 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 2H, Aryl-H), 7.43 – 7.39 (m, 2H, Aryl-H), 7.32 – 7.25 (m, 6H, Aryl-H), 7.23 (dd, J = 7.3, 1.9 Hz, 1H, Aryl-H), 7.11 – 7.05 (m, 2H, Aryl-H), 6.93 – 6.79 (m, 4H, Aryl-H), 5.19 (dd, J = 10.2, 5.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.49 – 4.41 (m, 1H, 3'-H), 4.17 - 4.10 (m, 2H, 4'-H), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.80 – 3.74 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 6H, 2·OMe), 3.67 (m, 1H, POCH<sub>2</sub>), 3.56 (m, 2H, 2·NCH), 3.23 - 3.16 (m, 2H, 5'-H), 2.78 - 2.67 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.01 (m, 2H, 2'-H), 1.13 (m, 9H, 3·NCHCH<sub>3</sub>), 1.03 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 1·NCHCH<sub>3</sub>).

**2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 194.0, 162.9, 158.1, 146.2, 146.1, 144.7, 132.1, 129.7, 129.4, 128.3, 127.8, 125.8, 119.0, 118.8, 113.9, 113.1, 85.5, 85.5, 79.1, 79.0, 63.9, 58.4, 58.3, 55.6, 55.0, 42.5, 42.5, 24.4, 24.3, 24.2, 24.1, 19.9, 19.8.

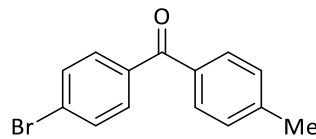
**<sup>31</sup>P-NMR** (102 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 147.1, 146.5.

**FAB-MS**

*m/z* (%): 831.4 (37) [(M+H)<sup>+</sup>].



**Synthese von 47d**

**47d**  
 $C_{14}H_{11}BrO$   
 275.16 g/mol

In einem trockenen Kolben wurden unter Argonatmosphäre 3.00 g 4-Brombenzoylchlorid (13.7 mmol, 1.00 eq) in 30 mL absolutem Toluol (28.8 g, 312 mmol, 22.9 eq) gelöst und 2.73 g  $AlCl_3$  (20.5 mmol, 1.50 eq) zugegeben. Dann wurde die Lösung für 3.5 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde auf die Reaktionsmischung in ein Eisbad mit konzentrierter HCl-Lösung (100 mL Eis mit 9 mL konz. HCl) geschüttet. Die wässrige Mischung wurde mit EE extrahiert, nacheinander mit 1 N wässriger HCl-Lösung, Wasser und Salzlösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisieren aus Hexan gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 3.02 g **47d** (11.0 mmol) als lachsfarbener Feststoff erhalten (80 %).

**DC** ( $SiO_2$ , Hexan/EE 20/1)

$R_f = 0.51$

**$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 7.71 – 7.47 (m, 6H, Aryl-H), 2.40 (s, 3H, Aryl-Me).

**2D-NMR** ( $CDCl_3$ )

COSY

NOESY

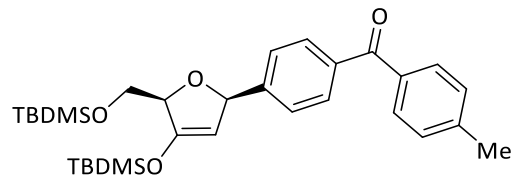
**$^{13}C$  NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 195.4, 143.6, 136.7, 131.5, 130.2, 129.1, 127.2, 21.7.

Experimenteller Teil

**EI-MS**

*m/z* (%): 274.1 (33) [M<sup>+</sup>].

Synthese von **49d****49d**C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>

538.88 g/mol

In einem trockenem Vial wurden 500 mg **47d** (1.82 mmol, 1.00 eq), 626 mg **44** (1.82 mmol, 1.00 eq) und 542  $\mu$ L Et<sub>3</sub>N (395 mg, 4.43 mmol, 2.43 eq) in 12 mL MeCN gelöst und 10 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend im Ultraschallbad 5 min mit Argon gespült und entgast. Dann wurden 223 mg Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0.312 mmol, 0.171 eq) hinzugegeben und die Mischung wurde 70 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde durch FC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester 20/1) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 580 mg **49d** (1.08 mmol) als orangenes Öl erhalten (59 %).

DC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EE 20/1)

$R_f = 0.19$

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.63 (d,  $J = 7.3$  Hz, 6H, Aryl-H), 7.36 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, Aryl-H), 5.74 (dd,  $J = 3.8, 1.7$  Hz, 1H, 2'-H), 5.03 (t,  $J = 1.7$  Hz, 1H, 4'-H), 4.54 (tt,  $J = 4.2, 2.0$  Hz, 1H, 1'H), 3.89 – 3.59 (m, 2H, 5'-H), 2.40 (s, 3H, Aryl-Me), 0.92 (s, 9H, Si-tBu), 0.84 (s, 9H, Si-tBu), 0.27 – 0.14 (m, 6H, Si-Me<sub>2</sub>), 0.08 – -0.08 (m, 6H, Si-Me<sub>2</sub>).

2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

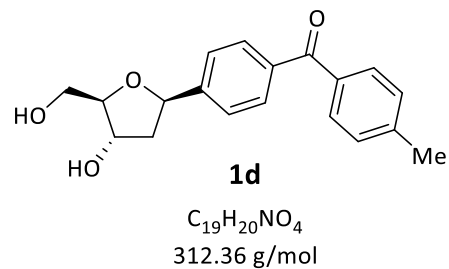
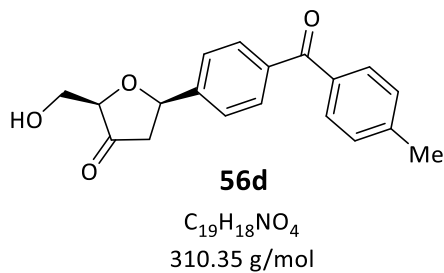
## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 195.1, 150.9, 150.2, 147.7, 143.1, 136.4, 134.4, 131.5, 129.8, 129.3, 129.1, 126.9, 101.9, 84.0, 83.4, 63.4, 25.8, 25.4, 21.2, 18.2, 17.8, -5.2, -5.4.

### FAB-MS

$m/z$  (%): 538.0 (100) [M<sup>+</sup>].

Synthese von **1d** über die Synthese von **56d**

In einem trockenen Kolben wurden 2.54 g **49d** (4.73 mmol, 1.00 eq) in 30 mL abs. THF gelöst. Unter Argon wurden 2.11 mL Triethylamintrihydrofluorid (2.13 g, 13.2 mmol, 2.80 eq) bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 min bei 0 °C und anschließend über Nacht bei 30 °C gerührt. Dann wurde die Mischung über ein 1.0 cm hohes Kieselgelpad gefiltert, welches mit Aceton gespült wurde. Anschließend wurden die Lösemittel entfernt und ohne weitere Aufreinigung wurde **56d** in 40 mL eines Gemisches aus Essigsäure und Acetonitril (1/1) gelöst und unter Argonatmosphäre wurden bei 0 °C 2.03 g Natriumtriacetoxyborhydrid (9.56 mmol, 1.50 eq) zugegeben. Die Mischung wurde 90 min gerührt und die Reaktion anschließend mit 40 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1/1) versetzt. Nach dem Entfernen der Lösemittel wurden 0.950 g des reinen Produkts **1d** (3.03 mmol) mittels FC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 20/1) als farbloses Öl erhalten (61 %).

DC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 20/1)

$$R_f = 0.45$$

$^1H$  NMR (300 MHz,  $[d_6]$ -DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.66 (t,  $J = 8.6$  Hz, 4H, Aryl-H), 7.54 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, Aryl-H), 7.37 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, Aryl-H), 5.11 (dd,  $J = 10.3, 5.2$  Hz, 1H, 1'-H), 4.85 – 4.74 (m, 1H, 3'-OH), 4.25 – 4.17 (m, 1H, 3'-H), 3.83 (td,  $J = 5.1, 2.0$  Hz, 1H, 4'-H), 3.47 (ddt,  $J = 21.4, 10.8, 6.2$  Hz, 2H, 5'-H & 5'-OH), 2.41 (s, 3H, Aryl-Me), 2.15 (ddd,  $J = 12.6, 5.5, 1.6$  Hz, 1H, 2'-H), 1.79 (ddd,  $J = 12.8, 10.5, 5.5$  Hz, 1H, 2'-H).

## Experimenteller Teil

### **2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

### **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

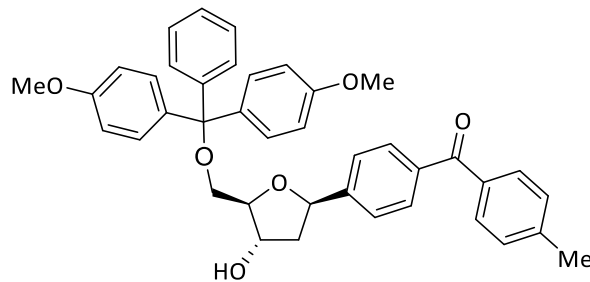
$\delta$  (ppm) = 195.0, 156.5, 147.5, 143.0, 136.1, 134.4, 129.8, 129.5, 129.1, 125.8, 113.4, 88.0, 78.8, 72.4, 62.4, 45.4, 43.5, 21.1.

### **FAB-MS**

*m/z* (%): 313.2 (73) [(M+H)<sup>+</sup>].

### **HR-MS (FAB)**

Gefunden: *m/z*: 313.1436 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 313.1434.

Synthese von **58d****58d**

$C_{40}H_{38}NO_7$   
614.74 g/mol

In einem trockenen Kolben wurden 477 mg **1d** (1.53 mmol, 1.00 eq) in 15 mL abs. Pyridin gelöst. Es wurden 570 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (1.68 mmol, 1.10 eq) zugegeben und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde durch FC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester 2/1 + 0.1 % Et<sub>3</sub>N) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 566 mg **58d** (0.921 mmol) als weiß-gelblicher Feststoff erhalten (60 %).

DC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EE 2/1)

$$R_f = 0.15$$

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.66 (dd, 4H, J = 19.8, 8.1 Hz, Aryl-H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Aryl-H), 7.45 – 7.34 (m, 4H, Aryl-H), 7.34 – 7.17 (m, 7H, Aryl-H), 6.88 (dd, J = 8.9, 1.2 Hz, 4H, Aryl-H), 5.22 – 5.15 (m, 2H, 1'-H & 3'-OH), 4.20 – 6.16 (m, 1H, 3'-H), 3.99 (td, J = 4.8, 2.8 Hz 1H, 4'-H), 3.72 (s, 6H, 2-OMe), 3.14 (t, J = 4.3 Hz, 2H, 5'-H), 2.41 (s, 3H, Aryl-Me), 2.23 (ddd, J = 12.6, 5.8, 2.0 Hz, 1H, 2'-H), 1.87 (ddd, J = 12.6, 10.0, 5.9 Hz, 1H, 2'-H).

2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

## Experimenteller Teil

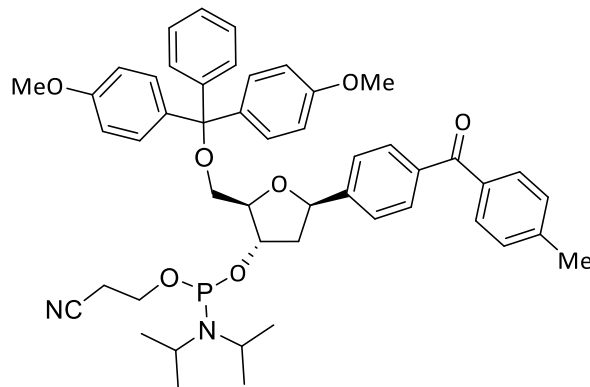
### <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 195.1, 158.0, 147.4, 144.9, 143.0, 136.2, 134.4, 129.8, 129.7, 129.6, 129.1, 127.8, 127.7, 126.6, 125.7, 113.1, 86.2, 85.4, 78.8, 72.4, 64.4, 55.0, 43.6, 21.1.

### FAB-MS

$m/z$  (%): 614.4 (83) [M<sup>+</sup>].



Synthese von **60d****60d**

$C_{49}H_{55}N_3O_8P$   
814.96 g/mol

In einem trockenen Kolben wurden 0.550 g **58d** (0.890 mmol, 1.00 eq) in einem trockenen Kolben in 10 mL absolutem DCM gelöst. Es wurden 532  $\mu$ L Diisopropylethylamin (0.405 g, 3.13 mmol, 3.50 eq) zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Dann wurden 299  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (0.318 g, 1.34 mmol, 1.50 eq) zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung schnellstmöglich durch FC (trockenes  $SiO_2$ , DCM/Aceton 50/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 476 mg **60d** (0.584 mmol) als gelbes Öl erhalten (65 %).

DC ( $SiO_2$ , DCM/Aceton 50/1)

$$R_f = 0.55$$

$^1H$  NMR (500 MHz,  $[d_6]$ -DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.80 – 7.50 (m, 6H, Aryl-H), 7.46 – 7.10 (m, 11H, Aryl-H), 6.97 – 6.78 (m, 4H, Aryl-H), 5.19 (dd,  $J = 10.2, 5.5$  Hz, 1H, 1'-H), 4.45 (ddd,  $J = 10.7, 5.9, 2.4$  Hz, 1H, 3'-H), 4.21 – 4.05 (m, 1H, 4'-H), 3.81 - 3.62 (m, 8H, 2·OMe & POCH<sub>2</sub>), 3.55 (dddd,  $J = 20.1, 13.5, 9.9, 6.7$  Hz, 2H, 2·NCH), 3.27 - 3.09 (m, 2H, 5'-H), 2.76 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.67 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.55 - 2.43 (m, 1H, 2'-H), 2.40 (m, 3H, Aryl-Me), 2.00 (tdd,  $J = 13.1, 10.2, 5.9$  Hz, 1H, 2'-H), 1.20 - 1.07 (m, 9H, 3·NCHCH<sub>3</sub>), 1.02 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, 1·NCHCH<sub>3</sub>).

Experimenteller Teil

**2D-NMR** ( $[d_6]$ -DMSO)

COSY

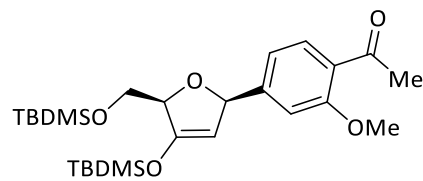
**$^{31}\text{P}$ -NMR** (500 MHz,  $[d_6]$ -DMSO)

$\delta$  (ppm) = 147.0, 146.5.

**MS (APCI)**

$m/z$  (%): 815.3 (90)  $[(\text{M}+\text{H})^+]$ .

## Synthese von 50a'

**50a'**C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

492.80 g/mol

In einem trockenem Vial wurden 500 mg 1-(4-Brom-2-methoxyphenyl)ethanon (2.18 mmol, 1.00 eq), 903 mg **44** (2.62 mmol, 1.20 eq) und 650  $\mu$ L Et<sub>3</sub>N (475 mg, 4.69 mmol, 2.15 eq) in 12 mL MeCN gelöst und 10 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend im Ultraschallbad 10 min mit Argon gespült und entgast. Dann wurden 267 mg Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0.332 mmol, 0.150 eq) hinzugegeben und die Mischung wurde 38 h bei 70 °C gerührt. Zwischendurch wurden nochmals Et<sub>3</sub>N und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> hinzugegeben. Dann wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde durch FC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester 20/1) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 483 mg **50a'** (0.981 mmol) als leicht gelbliches Öl erhalten (45 %).

DC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EE 10/1)

$$R_f = 0.19$$

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Aryl-H), 7.20 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, Aryl-H), 7.10 (d, J = 1.4 Hz, 1H, Aryl-H), 5.69 (dd, J = 3.8, 1.6 Hz, 1H, 2'-H), 5.03 (t, J = 1.7 Hz, 1H, 4'-H), 4.52 (dt, J = 3.9, 2.0 Hz, 1H, 1'-H), 3.88 (s, 3H, Aryl-OMe), 3.82-3.68 (m, 2H, 5'-H), 2.49 (s, 3H, Aryl-COMe), 0.91 (s, 9H, Si-tBu), 0.82 (s, 9H, Si-tBu), 0.21 (d, J = 10.3 Hz, 6H, Si-Me<sub>2</sub>), -0.01 (s, 6H, Si-Me<sub>2</sub>).

2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

## Experimenteller Teil

### $^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, $[\text{d}_6]$ -DMSO)

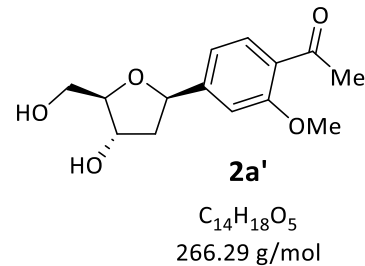
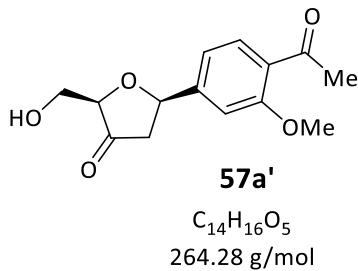
$\delta$  (ppm) =198.3, 158.4, 150.2, 149.5, 129.3, 126.7, 118.8, 110.6, 101.8, 83.5, 83.2, 63.9, 55.6, 31.4, 25.8, 25.4, 18.1, 17.7, -5.2, -5.2, -5.5.

### FAB-MS

$m/z$  (%): 493.3 (27)  $[(\text{M}+\text{H})^+]$ .

### HR-MS (FAB)

Gefunden:  $m/z$ : 493.2799  $[(\text{M}+\text{H})^+]$ , berechnet: 493.2800.

Synthese von **2a'** über die Synthese von **57a'**

In einem trockenen Kolben wurden 500 mg **50a'** (1.01 mmol, 1.00 eq) in 18 mL abs. THF gelöst. Unter Argon wurden 453  $\mu$ L Triethylamintrihydrofluorid (458 mg, 2.84 mmol, 2.80 eq) bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 min bei 0 °C und anschließend über Nacht bei 30 °C gerührt. Dann wurde die Mischung über ein 1.0 cm hohes Kieselgelpad gefiltert, welches mit Aceton gespült wurde. Anschließend wurden die Lösemittel entfernt und ohne weitere Aufreinigung wurde das Zwischenprodukt in 20 mL eines Gemisches aus Essigsäure und Acetonitril (1/1) gelöst und unter Argonatmosphäre wurden bei 0 °C 339 mg Natriumtriacetoxyborhydrid (1.60 mmol, 1.50 eq) zugegeben. Die Mischung wurde 40 min bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion wurde anschließend mit 20 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1/1) versetzt. Nach dem Entfernen der Lösemittel wurden 210 mg des reinen Produkts **2a'** (0.788 mmol) mittels FC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 50/1) als gelbliches Öl erhalten (78 %).

DC ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 10/1)

$R_f = 0.33$

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.56 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Aryl-H), 7.19 (d, J = 1.5 Hz, 1H, Aryl-H), 7.02 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H, Aryl-H), 5.12 (s, 1H, 3'-OH), 5.07 (dd, J = 10.2, 5.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.82 (s, 1H, 5'-OH), 4.21 (d, J = 5.2 Hz, 1H, 3'-H), 3.90 (s, 3H, Aryl-OMe), 3.83 (td, J = 5.2, 2.1 Hz, 1H, 4'-H), 3.56 – 3.42 (m, 2H, 5'), 3.36 (s, 3H, Aryl-COMe), 2.15 (ddd, J = 12.7, 5.7, 1.8 Hz, 1H, 2'-H), 1.79 (ddd, J = 12.7, 10.2, 5.6 Hz, 1H, 2'H).

**2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

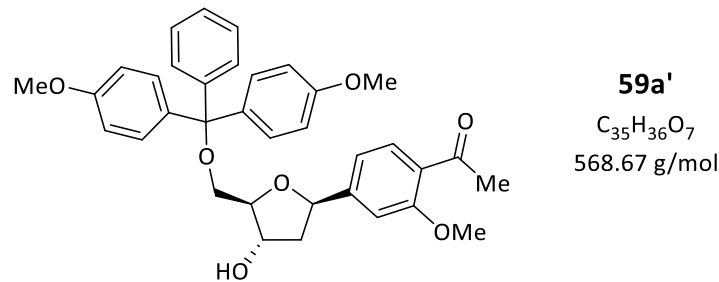
δ (ppm) = 198.3, 158.6, 149.7, 129.6, 126.5, 117.6, 109.8, 87.9, 78.8, 72.2, 62.3, 55.7, 43.5, 31.6.

**FAB-MS**

*m/z* (%): 267.1 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].

**HR-MS (FAB)**

Gefunden: *m/z*: 267.1228 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 267.1227.

Synthese von **59a'**

In einem trockenen Kolben wurden 190 mg **2a'** (0.714 mmol, 1.00 eq) in 15 mL abs. Pyridin gelöst. Es wurden 266 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.785 mmol, 1.10 eq) zugegeben und 70 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde durch FC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester 2/1 + 0.1 % Et<sub>3</sub>N) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 186 mg **59a'** (0.328 mmol) als weiß-gelblicher Feststoff erhalten (46 %).

DC (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EE 1/1)

$$R_f = 0.28$$

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.55 (d, J = 7.9 Hz, 1H Aryl-H), 7.44 – 7.39 (m, 2H, Aryl-H), 7.33 – 7.24 (m, 6H, Aryl-H), 7.24 – 7.18 (m, 1H, Aryl-H), 7.15 (d, J = 1.5 Hz, 1H, Aryl-H), 7.04 – 6.99 (m, 1H, Aryl-H), 6.87 (dd, J = 8.9, 3.0 Hz, 4H, Aryl-H), 5.15 (d, J = 3.9 Hz, 1H, 3'-OH), 5.11 (dd, J = 10.0, 5.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.18 (dq, J = 4.0, 2.1 Hz, 1H, 3'-H), 3.96 (dt, J = 4.4, 2.5 Hz, 1H, 4'-H), 3.74 (s, 3H, Aryl-OMe), 3.73 (s, 6H, 2·OMe), 3.21 – 3.16 (m, 1H, 5'H), 3.09 (dd, J = 10.0, 4.9 Hz, 1H, 5'H), 2.49 (s, 3H, Aryl-COMe), 2.20 (ddd, J = 12.7, 5.6, 1.9 Hz, 1H, 2'-H), 1.86 (ddd, J = 12.6, 10.0, 5.9 Hz, 1H, 2'-H).

## Experimenteller Teil

### **2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

### **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

$\delta$  (ppm) = 198.3, 158.6, 159.0, 149.2, 144.9, 135.7, 129.7, 127.8, 126.7, 117.7, 113.1, 109.5, 86.2, 85.3, 78.9, 72.4, 64.2, 55.5, 55.0, 43.8, 31.5.

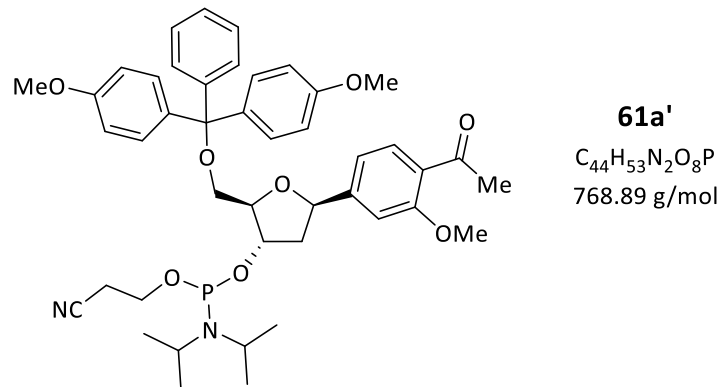
### **FAB-MS**

*m/z* (%): 569.3 (17) [(M+H)<sup>+</sup>].

### **HR-MS (FAB)**

Gefunden: *m/z*: 569.2534 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 569.2534.



Synthese von **61a'**

In einem trockenen Kolben wurden 180 mg **59a'** (0.317 mmol, 1.00 eq) in 4 mL abs. DCM gelöst. Es wurden 188  $\mu$ L Diisopropylethylamin (143 mg, 1.11 mmol, 3.50 eq) zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Dann wurden 106  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (0.112 mg, 0.473 mmol, 1.50 eq) zugegeben und insgesamt 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 h wurde nochmals die gleiche Menge Diisopropylethylamin und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung schnellstmöglich durch FC (trockenes SiO<sub>2</sub>, DCM/Aceton 50/1 + 0.1 % Et<sub>3</sub>N) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 235 mg **61a'** (0.306 mmol) als farbloses Öl erhalten (97 %).

DC (SiO<sub>2</sub>, DCM/Aceton 50/1)

$R_f = 0.64$

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.55 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Aryl-H), 7.42 – 7.36 (m, 2H, Aryl-H), 7.30 – 7.12 (m, 8H, Aryl-H), 7.03 (dt, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H, Aryl-H), 6.85 (dt, J = 9.0, 2.2 Hz, 4H, Aryl-H), 5.11 (dd, J = 10.2, 5.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.42 (dd, J = 10.1, 5.1 Hz, 1H, 3'-H), 4.16 – 4.03 (m, 1H, 4'-H), 3.74 (d, J = 4.0 Hz, 3H, Aryl-OMe), 3.70 (d, J = 1.2 Hz, 6H, 2'OMe), 3.63 (dd, J = 7.4, 5.8 Hz, 2H, 2·NCH), 3.52 (ddd, J = 16.3, 6.9, 3.2 Hz, 2H, 2·NCH), 3.27 – 3.19 (m, 1H, 5'-H), 3.09 (dt, J = 10.0, 4.0 Hz, 1H, 5'-H), 2.74 (t, J = 5.9 Hz, 1H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.63 (td, J = 5.8, 1.4 Hz, 1H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.47 (d, J = 1.8 Hz, 3H, Aryl-COMe), 2.43 – 2.26 (m, 1H, 2'-H), 1.98 (dt, J = 10.3, 3.2 Hz, 1H, 2'-H), 1.12 – 1.02 (m, 9H, 3·NCHCH<sub>3</sub>), 0.98 (d, J = 6.8 Hz, 3H, 1·NCHCH<sub>3</sub>).

**2D-NMR** ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 198.4, 158.6, 158.1, 148.4, 148.3, 144.8, 135.4, 129.7, 128.3, 127.8, 127.7, 127.6, 118.9, 118.8, 117.7, 113.2, 109.6, 85.5, 55.7, 55.0, 42.6, 31.6, 22.6, 19.8.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

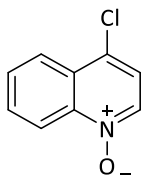
δ (ppm) = 147.1, 146.5.

**MS (FAB)**

*m/z* (%): 769.3 (45) [(M+H)<sup>+</sup>].

**HR-MS (FAB)**

Gefunden: *m/z*: 769.3813 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 769.3812.

Synthese von **63**

**63**  
 $C_9H_6ClNO$   
 179.60 g/mol

Eine Mischung aus 1.10 g 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (5.78 mmol, 1.00 eq) und 2.89 g  $AlCl_3$  (2.89 mmol, 0.500 eq) in wurden in 7 mL abs. Acetonitril über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit 5 mL gesättigter  $Na_2CO_3$ -Lösung versetzt. Anschließend wurde das Produkt mit DCM extrahiert, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , DCM/Methanol 100/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) gereinigt, im HV getrocknet und 759 mg **63** (4.22 mmol) wurden als weißer Feststoff erhalten (73 %).

**DC** ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 40/1)

$R_f = 0.29$

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 8.76 (dd,  $J = 8.6, 1.6$  Hz, 1H, Aryl-H), 8.42 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, Aryl-H), 8.20 (dd,  $J = 8.3, 1.5$  Hz, 1H, Aryl-H), 7.78 (dddd,  $J = 22.2, 8.2, 7.0, 1.4$  Hz, 2H, Aryl-H), 7.36 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, Aryl-H).

**2D-NMR** ( $CDCl_3$ )

COSY

NOESY

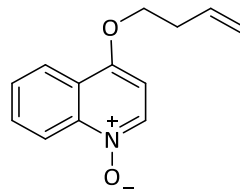
**$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 142.3, 135.3, 131.3, 130.2, 129.8, 128.1, 125.3, 121.1, 120.5.

Experimenteller Teil

**FAB-MS**

*m/z* (%): 180.1 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].

Synthese von **64****64**
 $C_{13}H_{13}NO_2$   
 215.25 g/mol

Zu einer Mischung aus 474 mg KOH-Pulver (8.45 mmol, 2.00 eq) in 10 mL THF wurden 759 mg **63** (4.23 mmol, 1.00 eq) und 1.45 mL But-3-en-1-ol (1.22 mg, 19.9 mmol, 4.00 eq) gegeben und die Mischung wurde 15 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 5 mL DCM aufgenommen, mit Wasser gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , DCM/Aceton 4/1 + 0.1 %  $Et_3N$ , dann DCM/MeOH 40/1 + 0.1 %  $Et_3N$ ) gereinigt, im HV getrocknet und 607 mg **64** (2.82 mmol) wurden als weißer Feststoff erhalten (67 %).

**DC** ( $SiO_2$ , DCM/MeOH 40/1)

$R_f = 0.11$

**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$  (ppm) = 8.76 – 8.68 (m, 1H, Arly-H), 8.44 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H, Arly-H), 8.21 (dd,  $J = 8.3$ , 1.4 Hz, 1H, Arly-H), 7.79 (ddd,  $J = 8.7$ , 6.9, 1.5 Hz, 1H, Arly-H), 7.63 (ddd,  $J = 8.3$ , 6.9, 1.2 Hz, 1H, Arly-H), 6.61 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H, Arly-H), 5.94 (ddt,  $J = 17.0$ , 10.3, 6.7 Hz, 1H, Alkenyl-H), 5.30 – 5.11 (m, 2H, Alkenyl-H), 4.23 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, Alkyl-H), 2.78 – 2.63 (m, 2H, Alkyl-H).

**2D-NMR** ( $CDCl_3$ )

COSY

NOESY

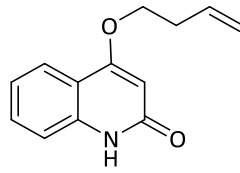
## Experimenteller Teil

### <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  (ppm) = 155.9, 141.3, 136.3, 133.6, 131.1, 128.0, 122.9, 120.0, 118.1, 110.2, 68.4, 33.4.

### EI-MS

$m/z$  (%): 216.1 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].

Synthese von **8**

**8**  
 $C_{13}H_{13}NO_2$   
 215.25 g/mol

Eine Lösung aus 440 mg (2.04 mmol, 1.00 eq) **64** in 5 mL MeOH wurde 3 h min unter Argonatmosphäre belichtet ( $\lambda = 369$  nm). Ausfallendes Produkt wurde zwischendurch ständig abgesaugt. Das Produkt wurde im HV getrocknet und 99.0 mg **8** (0.460 mmol) wurden als weißer Feststoff erhalten (23 %).

DC (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 40/1)

$$R_f = 0.25$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  (ppm) = 11.94 (s, 1H, N-H), 7.91 (dd,  $J = 8.1, 1.5$  Hz, 1H, Aryl-H), 7.51 (ddd,  $J = 8.4, 7.1, 1.5$  Hz, 1H Aryl-H), 7.38 (dd,  $J = 8.2, 1.4$  Hz, 1H Aryl-H), 7.19 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H Aryl-H), 6.00 (s, 1H, Aryl-H), 5.91 (dt,  $J = 10.3, 6.8$  Hz, 1H, Alkenyl-H), 5.28 – 5.10 (m, 2H, Alkenyl-H), 4.18 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, Alkyl-H), 2.76 – 2.58 (m, 2H, Alkyl-H).

2D-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

COSY

NOESY

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  (ppm) = 166.2, 164.2, 138.5, 134.0, 131.4, 123.0, 122.2, 117.8, 116.1, 115.8, 96.6, 67.9, 33.2.

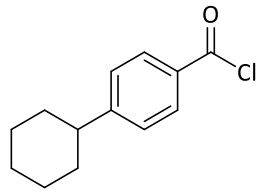
Experimenteller Teil

**EI-MS**

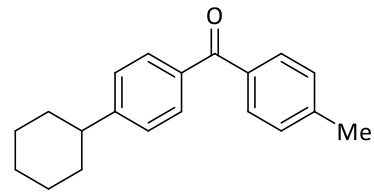
*m/z* (%): 216.1 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].



## Synthese von BPCyclohex über die Synthese von 65

**BPCyclohex**

$C_{13}H_{15}ClO$   
222.71 g/mol

**65**

$C_{20}H_{22}O$   
278.40 g/mol

In einem trockenen Kolben wurden unter Argonatmosphäre 3.00 g 4-Cyclohexylbenzoesäure (14.7 mmol, 1.00 eq) in 10 mL abs. 10 mL DCM gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 2.52 mL Oxalylchlorid (3.73 g, 29.4 mmol, 2.00 eq) und 3 Tropfen DMF hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und **65** wurde im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 3.27 g **65** (14.7 mmol) als gelbes Öl erhalten (100 %). Ohne weitere Aufarbeitung wurde **65** in 20 mL abs. Toluol gelöst und es wurden 2.94 g  $AlCl_3$  (22.0 mmol, 1.5 eq) zugegeben. Dann wurde die Lösung für 2 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und in ein Eisbad (100 mL Eis) mit konzentrierter HCl-Lösung (9 mL) geschüttet. Die Mischung wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und mit 1N HCl-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organischen Extrakte wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch FC ( $SiO_2$ , Hexan/Essigester 40/1) gereinigt und im HV getrocknet. Es wurden 2.83 g **BPCyclohex** (10.2 mmol) als hellroter Feststoff erhalten (69 %).

DC ( $SiO_2$ , Hexan/EE 40/1)

$R_f = 0.19$

## Experimenteller Teil

### <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 7.64 (dd, J = 9.2, 8.1 Hz, 4H, Aryl-H), 7.38 (dd, J = 20.0, 8.0 Hz, 4H, Aryl-H), 2.61 (tt, J = 11.7, 3.1 Hz, 1H, Alkyl-H), 2.40 (s, 3H, Aryl-Me), 1.87 – 1.68 (m, 5H, Alkyl-H), 1.49 – 1.22 (m, 5H, Alkyl-H).

### 2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

### <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

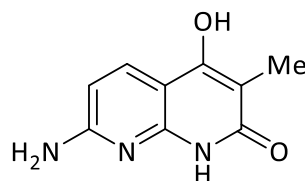
δ (ppm) = 195.1, 152.5, 142.8, 135.0, 134.6, 129.8, 129.7, 129.0, 126.8, 43.8, 33.6, 26.2, 25.5, 21.2.

### FAB-MS

*m/z* (%): 279.2 (100) [(M+H)<sup>+</sup>].

### HR-MS (FAB)

Gefunden: *m/z*: 279.1742 [(M+H)<sup>+</sup>], berechnet: 279.1742.

Synthese von **66**

**66**  
 $C_9H_9N_3O_2$   
 191.19 g/mol

Eine Mischung aus 2.00 g 2,6-Diaminopyridin (18.3 mmol, 1.00 eq) und 4.69 mL Diethylmethylmalonat (4.79 g, 27.49 mmol, 1.5 eq) in 25 mL  $Ph_2O$  wurden am Wasserabscheider 30 min lang auf 230 °C erhitzt. Anschließend wurde das Produkt abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 1.20 g **66** (6.30 mmol) als leicht rosafarbener Feststoff erhalten (34 %).

 **$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $[d_6]$ -DMSO)

$\delta$  (ppm) = 12.03 (s, 1H, OH), 10.06 (br, 1H, NH), 7.88 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, Aryl-H), 7.31 (s, 2H,  $NH_2$ ), 6.35 (d,  $J = 8.7$ , 1H, Aryl-H), 1.92, s, 3H,  $CH_3$ )

**2D-NMR** ( $CDCl_3$ )

COSY

NOESY

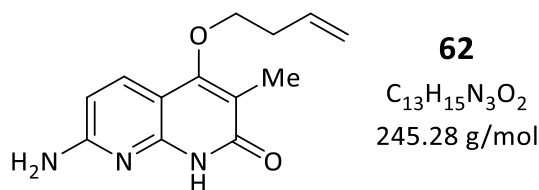
 **$^{13}C$  NMR** (75 MHz,  $[d_6]$ -DMSO)

$\delta$  (ppm) = 165.1, 160.6, 158.4, 148.6, 133.6, 104.7, 101.4, 100.4, 8.9.

**HR-MS (EI)**

Gefunden:  $m/z$ : 191.0688 [ $M^+$ ], berechnet: 191.0689.

## Synthese von **62**



Zu einer Suspension aus 2.00 g **66** (12.5 mmol, 1.00 eq) und 2.70 g wasserfreiem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15.7 mmol, 1.5 eq) in 60 mL abs. DMF wurden 1.59 mL 4-Brom-1-buten (2.12 g, 15.7 mmol, 1.5 eq) tropfenweise bei 30 °C hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde 12 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung heiß filtriert. Der Feststoff wurde mit Wasser und DCM gewaschen und das Produkt im HV getrocknet. Es wurden 951 mg **62** (2.75 mmol) als leicht rosafarbener Feststoff erhalten (26 %).

### <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [d<sub>6</sub>]-DMSO)

δ (ppm) = 11.53 (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Aryl-H), 6.71 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.34 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Aryl-H), 6.02 – 5.86 (m, 1H, H<sub>2</sub>C=CH), 5.25 – 5.07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.98 (t, J = 6.5 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 2.50 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### 2D-NMR ([d<sub>6</sub>]-DMSO)

COSY

NOESY

### <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, d-TFA)

δ (ppm) = 168.6, 168.2, 157.4, 142.5, 140.2, 135.1, 122.8, 115.7, 111.5, 108.3, 78.1, 36.6, 11.3.

### HR-MS (EI)

Gefunden: *m/z*: 245.1159 [M<sup>+</sup>], berechnet: 245.1159.

### 8.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit erwähnten Oligonukleotide wurden wie folgt synthetisiert und charakterisiert. Unmodifizierte Oligonukleotide wurden ausschließlich von *Metabion* bezogen und waren bereits HPLC gereinigt und lyophilisiert.

#### 8.3.1. Synthese der modifizierten Oligonukleotide (DMTr-off)

Zur Synthese der modifizierten Oligonukleotide nach der Phosphoramidit-Methode wurde ein *PerSeptive Expedite 8909* Syntheseautomat der Firma *Applied Biosystems* verwendet. Die kommerziell erhältlichen, natürlichen DNA-Bausteine wurden in Acetonitril (*amidit diluent*) aufgenommen und als 0.067 M Lösung verwendet. Die benötigten Reagenzien, CPG-Säulen und Phosphoramidite wurden von *Glen Research* und *Proligo* bezogen.

Die artifiziellen Nukleoside wurden in Acetonitril (*amidite diluent*) gelöst und als 0.1 M Lösung in den Syntheseautomaten eingebracht. Je nach Modifikation wurden unterschiedliche Syntheseprotokolle genutzt, welche die Pulsung (1 Puls = 16 µL) der unterschiedlichen Reagenzien, sowie deren Verweildauer auf den CPG-Säulen steuert. Das Standardprotokoll wurde nur in den unten genannten Zeilen geändert. Bei allen synthetisierten Oligonukleotiden wurde am Ende der Synthese die 5'-terminale DMTr-Schutzgruppe an der Hydroxygruppe abgespalten (*DMTr-off*).

Reagenzien für die automatisierte DNA-Synthese sind:

Dblk:	3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan
Wsh:	Acetonitril
Act:	0.45 M Tetrazol in Acetonitril
Caps:	Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A); N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B)
Ox:	Iod in Wasser/THF/Pyridin

#### Direkter Einbau von artifiziellen Bausteinen

Für den Einbau der synthetisch hergestellten, modifizierten Nukleotide wurde ein für den Einbau von natürlichen Nukleotiden geschriebenes Protokoll verändert. Durch Verlängerung der Kupplungszeiten oder Erhöhen der Menge der zu kuppelnden Substanzen, konnten bessere Ausbeuten an modifiziertem Oligonukleotid erreicht werden. Das in Tabelle 17

abgebildete Standardprotokoll wird zum Beispiel beim Einbau von 2'-Desoxyadenosin (dA) befolgt.

Tabelle 17: Standardprotokoll für den Einbau von dA in ein Oligonukleotid, der in blau hervorgehobene Bereich wurde für den Einbau der unterschiedlichen, artifiziellen Nukleoside verändert.

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit [s]
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Die DMTr-geschützten Phosphoramidite der Bausteine **BPNMe<sub>2</sub>** (60b), **BPOMe** (60c), **BPMe** (60d) und **APOMe** (61a') wurden synthetisch für diese Arbeit hergestellt. Die

Kupplungsprotokolle wurden für die in Abbildung 68 dargestellten, artifiziellen Nukleoside wie in

Tabelle 18 dargestellt im Kupplungsschritt geändert.

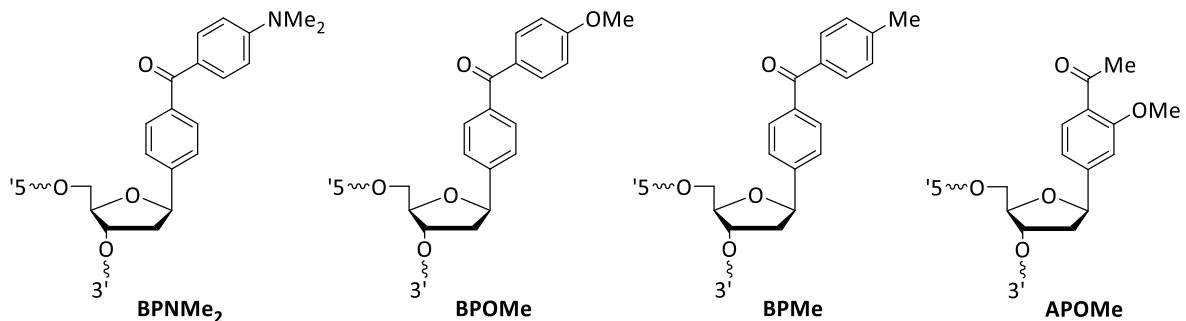


Abbildung 68: Synthetisch dargestellte Bausteine: BPNMe<sub>2</sub> (1b), BPOMe (1c) BPMe (1d) und APOMe (2a').

Tabelle 18: Änderung des Kupplungsschritts für die Phosphoramidit-Bausteine BPNMe<sub>2</sub> (60b), BPOMe (60c) BPMe (60d) und APOMe (61a').

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit [s]
§ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
24	6 + Act	PULSE	6	0
24	6 + Act	PULSE	2	200
2	Act	PULSE	3	200
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	8	0

Nachdem die Oligonukleotidsynthese beendet wurde, wurden die CPG-Säule für 16 h im Hochvakuum getrocknet. Danach wurde das CPG mit 700 µL konzentrierter Ammoniak-Lösung (>25 % in Wasser, *trace select* von *Fluka*) versetzt. Die Suspension wurde bei 40 °C, 16 h erhitzt. Dadurch konnte die DNA vom CPG abgetrennt und die Schutzgruppen abgespalten werden. Die Suspensionen wurden zentrifugiert, der Überstand separiert und das Granulat mit 2-mal 300 µL und 1-mal 200 µL HPLC-Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden lyophilisiert und entweder in 200 µL HPLC-Wasser gelöst und in ein HPLC-Vial für die präparative Trennung überführt, oder getrocknet für die postsynthetische Modifizierung weiterverwendet.

### 8.3.2. Reinigung der modifizierten Oligonukleotide

Nach oben beschriebener Aufarbeitung, bzw. weiterer Funktionalisierung wurden die Oligonukleotide wie folgt über HPLC gereinigt.

#### HPLC

Vor der präparativen Trennung der Oligonukleotide [*Supercosil LC 318* Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm Porengröße), Gradient: 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B), 2.5 mL/min] wurde, um den Laufmittelgradienten zu überprüfen und die Retentionszeit abzuschätzen, eine analytische Trennung [*Supercosil LC 318* Säule (25 cm x 4.6 mm), Gradient: 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B), 1 mL/min] vorangestellt. Dabei wurden 20 µL der in 200 µL Wasser gelösten Oligonukleotide auf die Säule gegeben.

War diese Trennung zufriedenstellend, wurden die restlichen 180 µL der verunreinigten DNA-Lösungen wie in Tabelle 19 dargestellt getrennt.

Tabelle 19: Laufmittelgradienten, Trennungszeiten und detektierte Wellenlängen der Trennungen der Oligonukleotide mittels HPLC.

Oligonukleotid	Laufmittel B (MeCN) in A (50 mM NH <sub>4</sub> OAc-Puffer, pH 6.5) [%]	Zeit [min]	Detektierte Wellenlängen [nm]
3wj_BPNMe <sub>2</sub> _1	0-15	65	260, 290, 350
3wj_BPOMe_2	0-15	65	260, 345, 310
3wj_BPMe_3	0-15	65	260, 345, 310
3wj_BPMe_4	0-15	65	260, 345, 310
3wj_BPMe_5	0-15	65	260, 345, 310
DNA_APOMe_0	0-10	55	260, 345, 310
DNA_APOMe_1	0-10	55	260, 345, 310
DNA_APOMe_2	0-10	55	260, 345, 310
DNA_APOMe_3	0-10	55	260, 345, 310
DNA_APOMe_4	0-10	55	260, 345, 310
DNA_APOMe_5	0-10	55	260, 345, 310



### 8.3.3. Abspaltung und Aufreinigung der DMTr-on synthetisierten Oligonukleotide

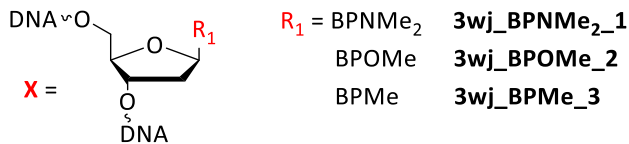
Die Abspaltung der *DMTr-on* synthetisierten DNA-Stränge von der festen Phase erfolgte nach der Standardmethode mit konz. Ammoniak. Der trockene Rückstand wurde in 2.0 mL einer 50 mg/mL NaCl-Lösung aufgenommen. Die *Glen-Pak<sup>TM</sup> Purification Cartridges* wurden zuerst mit 0.5 mL Acetonitril gewaschen und mit 1.0 mL TEAA (2.0 M, pH 7.0) equilibriert. Die Säule wurde mit je 1.0 mL Aliquoten der DNA/NaCl-Lösung beladen. Anschließend wurde zwei Mal mit je 1.0 mL Salzlösung (5 % MeCN in 100 mg/mL NaCl-Lösung) gewaschen. Die Abspaltung der DMTr-Gruppe erfolgte durch zweifaches Spülen mit je 1.0 mL einer 2 % TFA-Lösung. Die TFA-Reste wurden anschließend zwei Mal mit je 1.0 mL entionisiertem Wasser entfernt. Zuletzt wurde das Oligonukleotid in zwei Fraktionen zu je 1.0 mL mit 0.5 % Ammoniak in 50 % MeCN/Wasser eluiert. Die beiden Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff ausgefroren, lyophilisiert und über MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert.

Über diese Methode wurden die Oligonukleotide **3wj\_BPMe\_6-7** aufgereinigt.

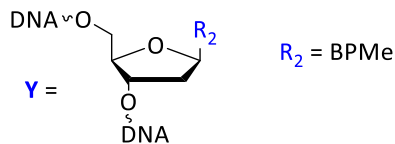
### 8.3.4. Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide

Mit den zuvor beschriebenen Methoden wurden die folgenden DNA-Sequenzen hergestellt (Abbildung 69).

3' G-G-A-G-A-C-A-A-G-G-A-A-A-T-C-C-T-T- **X**-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G-G-T-C-T-C-C 5'



**3wj\_BPMe\_4** 3' G-G-A-G-A-C-A-A-G-G-A-A-A-T-C-C-T-T- **Y**-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G- **Y**-G-T-C-T-C-C 5'  
**3wj\_BPMe\_5** 3' G-G-A-G-A-C- **Y**-A-A-G-G-A-A-A-T-C-C-T-T- **Y**-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G- **Y**-G-T-C-T-C-C 5'  
**3wj\_BPMe\_6** 3' C-T-G-A-C-A-G-C-A-G-G-G-A-A-A-T-C-C-C-T-A-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G-G-C- **Y**-G-T-C-A-G 5'  
**3wj\_BPMe\_7** 3' C-T-G-A-C-A-G-C-A-G-G-G-A-A-A-T-C-C-C-T-C-C-A-C-G-A-A-G-T-G-G-G-C- **Y**-G-T-C-A-G 5'



**DNA\_APOMe\_0** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-()A-A-T-A-C-A-G 5'  
**DNA\_APOMe\_1** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'  
**DNA\_APOMe\_2** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'  
**DNA\_APOMe\_3** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'  
**DNA\_APOMe\_4** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T-A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'  
**DNA\_APOMe\_5** 3' G-C-G-T-A-T-A- **Z**-(A-T-A-T-A-T-A-T-A-T)A-A-T-A-C-A-G 5'

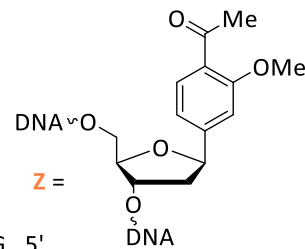


Abbildung 69: Sequenzen der modifizierten *three-way junctions* (3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1, 3wj\_BPOMe\_2 und 3wj\_BPMe\_3-7 und Strangdesign von DNA\_APOMe\_0-5).

Nach der Trennung der Oligonukleotide über HPLC, wurden die Massen der synthetisierten Oligonukleotide mittels MALDI-TOF gemessen (Tabelle 20).

Tabelle 20: Oligonukleotide: Massen und Extinktionskoeffizienten.

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gefundene Masse [Da]	ε <sub>260</sub> [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
<b>3wj_BPNMe<sub>2</sub>_1</b>	11501.3	11498.5	372.9
<b>3wj_BPOMe_2</b>	11488.2	11484.2	376.0
<b>3wj_BPMe_3</b>	11472.2	11472.1	381.2
<b>3wj_BPMe_4</b>	11846.6	11848.3	398.0
<b>3wj_BPMe_5</b>	12220.9	12219.9	414.9
<b>3wj_BPMe_6</b>	12717.4	12719.3	421.4

<b>3wj_BPMe_7</b>	12404.4	12408.2	407.5
<b>DNA_APOMe_0</b>	4622.0	4622.2	152.4
<b>DNA_APOMe_1</b>	5239.1	5241.1	174.2
<b>DNA_APOMe_2</b>	5856.2	5857.7	196.0
<b>DNA_APOMe_3</b>	6473.3	6474.7	217.7
<b>DNA_APOMe_4</b>	7090.5	7087.9	239.5
<b>DNA_APOMe_5</b>	7707.6	7707.5	261.3

Zur Bestimmung der Konzentration der synthetisierten Oligonukleotide wurde die Absorption mit Hilfe des Spektrometers der Firma *NanoDrop* bestimmt. Die Ermittlung der Konzentration erfolgte über das *Lambert-Beersche-Gesetz* über die optische Dichte bei  $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ . Der Extinktionskoeffizient eines unmodifizierten Oligonukleotids in Wasser kann wie folgt berechnet werden:

$$\epsilon_{260} = (A \cdot \epsilon_A + G \cdot \epsilon_G + C \cdot \epsilon_C + T \cdot \epsilon_T) \cdot 0.9$$

- A,G,C,T: Anzahl der natürlichen Basen
- $\epsilon_{A,G,C,T}$ : molarer Extinktionskoeffizient bei 260 nm
- 0.9: Korrekturfaktor, der die Hypochromizität der DNA berücksichtigt

Die molaren Extinktionskoeffizienten der vier natürlichen DNA-Basen sind in Tabelle 21 aufgelistet.

**Tabelle 21: Extinktionskoeffizienten der vier natürlichen DNA-Basen.**

<b>Base</b>	<b><math>\epsilon_{260 \text{ nm}} [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]</math></b>
<b>A</b>	15.4
<b>G</b>	11.7
<b>C</b>	7.3
<b>T</b>	8.8

Die molaren Extinktionskoeffizienten der synthetisierten DNA-Bausteine sind in Tabelle 22 einzusehen.

**Tabelle 22: Extinktionskoeffizienten der synthetisierten DNA-Bausteine.**

Bausteine	$\epsilon_{260\text{ nm}}$ [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]
<b>BPNMe<sub>2</sub></b>	8.5
<b>BPOMe</b>	11.6
<b>BPMe</b>	16.8
<b>APOMe</b>	0.96

Die synthetisierten und gereinigten DNA-Einzelstränge wurden mit den jeweiligen, kommerziell erhaltenen Gegensträngen in NaP<sub>i</sub>-Puffer, NaCl-Lösung und deionisiertem Wasser für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend für 4-6 h auf RT abgekühlt. In Tabelle 23 ist die Zusammensetzungen der Lösung und des Puffersystems aufgelistet:

**Tabelle 23: Zusammensetzung des Puffersystems.**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<b>NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7)</b>	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>NaCl-Lösung</b>	250 mM NaCl

In Tabelle 24 sind die Schmelztemperaturen  $T_m$  für die hybridisierten Oligonukleotide bei einer Konzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  in 10 mM NaP<sub>i</sub> und 250 mM NaCl aufgelistet. Dabei wurden **3wj\_BPNMe<sub>2</sub>\_1**, **3wj\_BPOMe\_2** und **3wj\_BPMe\_3-7** mit sich selbst und **DNA\_APOMe\_0-5** mit den korrespondierenden fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden **DNA\_F\_0-5** hybridisiert. Die Schmelztemperatur von **DNA\_APOMe\_0-5** mit **DNA\_T** beträgt in allen Fällen 12 °C.

Tabelle 24: Schmelztemperaturen.

Oligonukleotid	$T_M$ [°C]
3wj_BPNMe <sub>2</sub> _1	56
3wj_BPOMe_2	58
3wj_BPMe_3	56
3wj_BPMe_4	58
3wj_BPMe_5	62
3wj_BPMe_6	57
3wj_BPMe_7	58
DNA_APOMe_0	20
DNA_APOMe_1	27
DNA_APOMe_2	32
DNA_APOMe_3	37
DNA_APOMe_4	41
DNA_APOMe_5	44

## 8.4. Belichtungen

Die Katalysen wurden mit der in Kapitel 8.1. beschriebenen Belichtungsapparatur belichtet und einer Belichtungsreihe unterworfen. Dabei wurde nach gewissen Zeitpunkten jeweils eine Probe von 250  $\mu\text{L}$  entnommen. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand im Laufmittelgemisch (Heptan/*iso*-Propanol 9/1) für die analytische HPLC mit chiraler Säule aufgenommen.

### 8.4.1. Lichtquelle

Die Wahl einer geeigneten Lichtquelle ist abhängig vom Absorptionsbereich des Substrats und des Sensibilisators. Ziel ist es, selektiv den Sensibilisator in einem Wellenlängenbereich anzuregen, indem das Substrat keine Absorption aufweist. Da bei der asymmetrischen Katalyse der Sensibilisator die chirale Information enthält, kann die Reaktion ohne den Katalysator nicht stereochemisch gesteuert ablaufen. Wie aus Abbildung 70 ersichtlich, ist eine Belichtungswellenlänge zwischen 350 nm und 400 nm geeignet, da in diesem Bereich das Substrat keine Absorption zeigt.

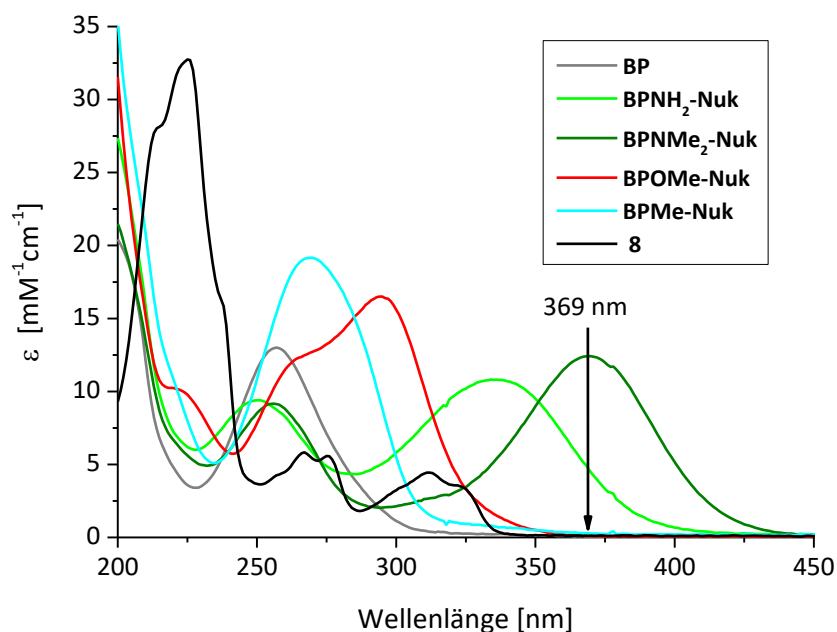


Abbildung 70: Absorptionsspektrum der verwendeten Photosensibilisatoren (20  $\mu\text{M}$ ) und des Substrats 8 (20  $\mu\text{M}$ ) in MeCN bei 20 °C. Dargestellt ist auch das Emissionsmaximum der verwendeten LEDs (369 nm).

Von der zentralen, feinmechanischen und elektronischen Abteilung der Universität Regensburg wurde ein Belichtungsreaktor entwickelt und angefertigt, welcher, kombiniert mit Hochleistungs-UV-LEDs ( $\lambda_{\text{max}} = 369 \text{ nm}$ ) der Firma *Nichia*, eine geeignete Apparatur für die gewünschten Belichtungen gewährleistet. Außerdem beinhaltet das System ein Thermostat (RA 8) der Firma *Lauda*. Die Experimente wurden durch einen externen Magnetrührer gerührt. Vor der Belichtung wurden alle Proben mit Argon durchspült, um Luftsauerstoff aus der Lösung zu entfernen.

Außerdem wurde das Emissionsmaximum der verwendeten LEDs mit Hilfe eines *OceanOptics*-Spektrometers vermessen. Dabei stellte sich heraus, dass das Emissionsmaximum, der vom Hersteller als 365 nm bezeichneten LEDs, tatsächlich bei 369 nm liegt. Der Emissionsbereich beträgt dabei 350-420 nm mit einer Halbwertsbreite von 10.6 nm. (Abbildung 71).

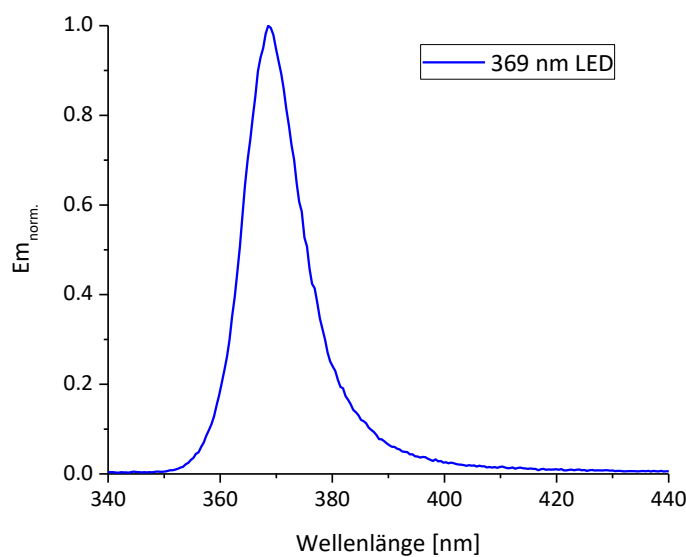


Abbildung 71: Emissionsspektrum der verwendeten LEDs mit Emissionsmaximum bei 369 nm.

### 8.4.2. Verfolgung und Auswertung der Reaktion

Als Analysemethode wurde die HPLC-Analytik herangezogen (Abbildung 72). Dafür wurde eine *Chiralpak IB*-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) mit *n*-Heptan/*i*-Propanol 9/1 als Laufmittel und UV-Detektion bei 242 nm und bei 20 °C verwendet. Da über eine chirale Säule die unterschiedlichen Produkte sowie das Substrat über die verschiedenen Retentionszeiten aufgetrennt und zugeordnet werden können, ermöglicht diese Methode eine genaue Analyse der Reaktionsmischung. Durch Integration der HPLC-Spektren konnte anschließend der Umsatz des Edukts, sowie die Ausbeute, das Regioisomerenverhältnis (rr) und der Enantiomerenüberschuss (ee) der Produkte bestimmt werden.

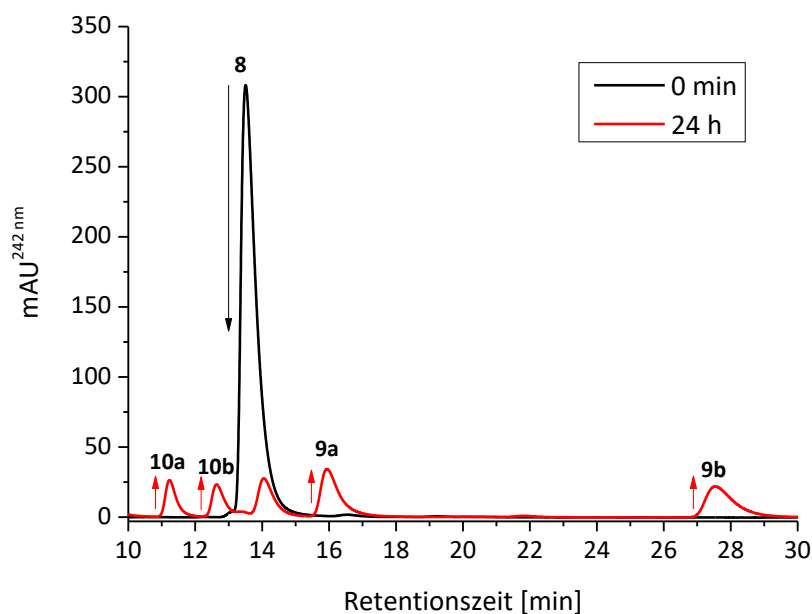


Abbildung 72: Analytik der Photoreaktion auf einer *Chiralpak IB*-Säule bei isokratischen Bedingungen *n*-Heptan/*iso*-Propanol 9/1. Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der [2+2]-Cycloaddition von 8.



## 8.5. PAGE

Die Chemikalien, Puffer-Systeme und Lösungen, welche bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet wurden, sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Lösungen, die bei der PAGE verwendet wurden.

Lösung	Zusammensetzung
<b>Lade-Puffer</b>	20 mM EDTA
	89 mM Tris-Base
	89 mM Borsäure
	3.9 % Ficoll
	0.1 % Bromphenolblau
	0.02 % Xylencyano FF
<b>10-facher TBE-Puffer</b>	7 M Harnstoff
	89 mM TRIS-Base
	89 mM Borsäure
<b>1x TBE-Lauf-Puffer (1 L Ansatz)</b>	20 mM EDTA
	100 mL 10-facher TBE-Puffer 900 mL Wasser
<b>APS-Lösung</b>	10 % Ammoniumperoxodisulfat
<b>12.5 %iges Polyacrylamid-Gel (50 mL Ansatz)</b>	15.6 mL Acrylamid/Bisacrylamid 19/1 (Rotiphoresegel 40)
	25 g Harnstoff
	5 mL Wasser
	5 mL 10-facher TBE-Puffer
	20 µL TEMED 425 µL APS

Die hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamid-Gele wurden in einer *Sequi-Gen DT Sequencing Cell* (21 × 40 cm) mit einem *PowerPac HV* von *Bio-Rad* unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

## Experimenteller Teil

- 12.5 %iges Gel
- $T = 50\text{ °C}$
- $t = 1\text{ h}$
- $U = 3000\text{ V}$
- $P = 45\text{ W}$

Des Weiteren wurden kleinere Polyacrylamid-Gele in einer *Mini-PROTEAN Tetra Cell* ( $10 \times 10\text{ cm}$ ) folgendermaßen durchgeführt:

- 12.5 %iges Gel
- $T = \text{RT}$
- $t = 30\text{ min}$
- $U = 150\text{ V}$
- $I = 40\text{ mA}$

Die Fluorescein-markierten DNA-Stränge auf den Polyacrylamid-Gelen wurden mit einem Fluoreszenzimager *Stella 830* von *Raytest* ausgelesen. Mit einer LED der Wellenlänge  $470 \pm 20\text{ nm}$  wurde das Fluorescein angeregt. Die Detektion der Emission erfolgte durch eine CCD-Kamera, welche auf  $-20\text{ °C}$  gekühlt wurde. Alle Polyacrylamid-Gele wurden mit einer Belichtungszeit von 1 min aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Image Analyzer v.450* von *Raytest*.

## 8.6. SELEX-Verfahren

Alle für das SELEX-Verfahren verwendeten DNA-Stränge wurden vom *University Core DNA Service* der *University of Calgary* synthetisiert. In Tabelle 26 sind die verwendeten Chemikalien, Puffer-Systeme und Lösungen aufgeführt.

Tabelle 26: Zusammensetzung der Lösungen, die beim SELEX-Verfahren verwendet wurden.

Lösung	Beschreibung/Zusammensetzung	Hersteller
<b>10x RX-Puffer</b>	10x OptiKinase Reaction Buffer	<i>Thermo Fischer</i>
<b>T4 Enzym</b>	OptiKinase	<i>Thermo Fischer</i>
<b>10x PCR-Puffer</b>	10x Taq Buffer (MgCl <sub>2</sub> )	<i>BioBasic</i>
<b>PCR-Enzym</b>	Taq DNA Polymerase 5 U/μL	<i>BioBasic</i>
<b>dNTPs</b>	100 mM ATP	<i>BioBasic</i>
	100 mM TTP	
	100 mM GTP	
	100 mM CTP	
<b>1xSB</b>	300 mM NaCl	
	50 mM KCl	
	10 mM MgCl <sub>2</sub>	
	50 mM Tris (pH 8.3)	
	0.05 % Triton X-100	
	1 % DMF	

### <sup>32</sup>P-Markierung

Für die radioaktive Markierung der DNA-Bibliothek wurden zu Beginn jeder neuen SELEX-Runde 20 pmol DNA mit 2 μL 10x RX-Puffer, γ-ATP (Menge je nach Aktivität) und 1 μL T4 Enzym versetzt und mit Wasser auf 20 μL aufgefüllt. Nach 30 min im Wasserbad bei 37 °C wurde die <sup>32</sup>P-markierte DNA durch Ethanol-Fällung erhalten.

## Hybridisierung

Für die erste Runde wurden insgesamt 2 nmol der DNA-Bibliothek verwendet. Dafür wurden die zuvor markierten 20 pmol DNA mit 1980 pmol der unmarkierten DNA, 10 nmol des Gegenstrangs und je 2.5 nmol P1 und P2 versetzt und in 200 µL 1xSB gelöst. Zum Hybridisieren wurde die Lösung für 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt und innerhalb von 15 min auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Für alle folgenden Runden wurden 100 pmol unmarkierte DNA mit 20 pmol markierter DNA, 600 pmol Gegenstrang und jeweils 180 pmol P1 und P2 in 200 µL 1xSB hybridisiert.

## Immobilisierung und Selektion

Für die Immobilisierung auf der festen Phase wurden zu Beginn 400 µL *Pierce™ Streptavidin Agarose Beads (Thermo Fischer)* auf eine Säule gegeben und fünfmal mit je 200 µL 1xSB gewaschen. Anschließend wurde die hybridisierte DNA-Bibliothek auf die Säule gegeben und 30 min inkubiert. Die überstehende Lösung wurde abtropfen gelassen und die *Beads* wurden 10-mal mit 1xSB gewaschen, wobei der letzte Waschschrift 1 h dauerte (gleiche Zeit wie für die Target-Inkubation). Dann wurden 200 µL des Targetmoleküls gelöst in 1xSB (300 µM) auf die Säule gegeben und für 1 h inkubiert. Die Selektion wurde durch Messung der Radioaktivität mittels Geiger-Zähler überprüft. Dafür wurde das Verhältnis der Counts der inkubierten Target-Lösung und der Lösung des letzten Waschschrifts berechnet (*Switching-Aktivität*).

## PCR

Die, durch das Targetmolekül von der festen Phase gewaschene DNA wurde unter Verwendung von P2 (enthält ein Ribonukleotid am 3'-Ende) mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde die DNA mit 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 1 mM dNTPs, je 0.8 µM P2 und P3 und 5 µL Taq Polymerase (5 U/µL) in 1 mL 1xPCR-Puffer gelöst und in 100 µL Aliquoten durch die in Tabelle 27 dargestellte Methode vervielfältigt.

Tabelle 27: Verwendete PCR-Methode.

Schritt	T [°C]	Dauer [s]	Beschreibung
1	95	180	Vor-Denaturierung
2	95	45	Denaturierung
3	60	45	Hybridisierung
4	72	45	Verlängerung
5	72	180	finale Verlängerung
Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 18-mal wiederholt			

Anschließend wurde die vervielfältigte, doppelsträngige DNA in 100 mL 0.25 M NaOH-Lösung gelöst und 10 min auf 90 °C erhitzt, um einen Strangbruch am Ribonukleotid des Gegenstrangs zu bewirken. Nach Ethanol-Fällung wurden die Oligonukleotide mittels PAGE aufgereinigt.

## PAGE

Unter Verwendung von PAGE wurden die Oligonukleotide über ihre verschiedenen Stranglängen unter folgenden Bedingungen getrennt:

- 8 %iges Gel
- T = 50 °C
- t = 30 min
- P = 45 W
- U = 3000 V

Die erhaltene DNA wurde anschließend für die nächste Selektionsrunde vorbereitet.



## 9. Abkürzungen

A	Akzeptor (elektronenziehende Gruppe) oder Adenosin
Abs.	Absorbanz
abs.	absolut
AcOH	Essigsäure
AP	Acetophenon
APCI	<i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i>
APOMe	2'-Methoxyacetophenon
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ar	Argon
ATP	Adenosintriphosphat
a. u.	<i>arbitrary units</i>
BP	Benzophenon
BPMe	4-Methybenzophenon
BPNH <sub>2</sub>	4-Aminobenzophenon
BPNMe <sub>2</sub>	4-(Dimethylamino)benzophenon
BPOMe	4-Methoxybenzophenon
c	Konzentration
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
C	Cytidin
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CT	<i>Charge Transfer</i>
CTP	Cytidintriphosphat

## Abkürzungen

Cyclohex	Cyclohexan
D	Donor (elektronenschiebende Gruppe)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
Dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
EE	Ethylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstoßionisation
eq	Äquivalent
ET	Elektronentransfer
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Fluorescein
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FC	Flash-Säulenchromatographie
Fl	Fluoreszenz
g	Gramm



G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hex	Hexan
HH	<i>head-to-head</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie (HR = <i>high resolution</i> )
HT	<i>head-to-tail</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
Kat.	Katalysator
L	Liter
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
m	milli
mAU	<i>milli Absorption Units</i>
MHz	Megahertz
min	Minute
M	Molar
MeCN	Acetonitril

## Abkürzungen

MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphat-Puffer
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
Nuk	Nukleosid
P	Phosphoreszenz oder Primer
PA-Cl	Cyano- <i>N,N</i> -diisopropylchlorphosphoramidit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ppm	<i>parts per million</i>
Pyo	4-Methylpyrimidon
Q	Quencher
R	Rest
rA	Riboadenosin
RNA	Ribonukleinsäure
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rr	Regioisomerenverhältnis
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SB	Selektionspuffer
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>

stDNA	Lachshoden-DNA
T	Triplettzustand oder Thymidin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TOF	<i>Time of Flight</i>
$t_R$	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T<>T	T-T-Dimer
TTET	Triplett-Triplett-Energietransfer
TTP	Thymidintriphosphat
UV	Ultraviolett
Vis	<i>visible</i>
3wj	<i>three-way junction</i>
(6-4)-PP	(6-4)-Photoprodukt



## 10. Literaturverzeichnis

- [1] T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, E. Sage, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9221-9226.
- [2] J. Zhang, G. T. Bowden, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 54-61.
- [3] F. R. de Gruijl, in *Methods Enzymol., Vol. Volume 319*, Academic Press, **2000**, pp. 359-366.
- [4] H.-A. Wagenknecht, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 3197-3198.
- [5] A. Fourtanier, D. Moyal, S. Seite, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 81-89.
- [6] S. Kim, K. Choi, *Environ. Int.* **2014**, *70*, 143-157.
- [7] I. G. Gut, P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2366-2373.
- [8] B. Epe, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 98-106.
- [9] M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, J. Cadet, M. A. Miranda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1558-1570.
- [10] W. H. De Camp, *Chirality* **1989**, *1*, 2-6.
- [11] K. Muñiz, *ChiuZ* **2006**, *40*, 112-124.
- [12] S. Park, H. Sugiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3870-3878.
- [13] S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180-7201.
- [14] G. Roelfes, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3230-3232.
- [15] J. Priestley, *Experiments and Observations on Different Kinds of Air, Vol. II,* John Adams Library, London, **1970**.
- [16] G. L. Ciamician, *Gazz. Chim. Ital.* **1886**, *16*, 111-112.
- [17] G. L. Ciamician, *Scientia* **1907**, *44*, 1.
- [18] G. Ciamician, *Science* **1912**, *36*, 385-394.
- [19] H. Remane, W. Girnus, *Nachr. Chem.* **2012**, *60*, 11-21.
- [20] H. D. Roth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 1193-1207.
- [21] S. Poplata, A. Tröster, Y.-Q. Zou, T. Bach, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9748-9815.
- [22] C. K. Prier, D. A. Rankic, D. W. C. MacMillan, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5322-5363.
- [23] K. Zeitler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9785-9789.
- [24] V. Balzani, P. Ceroni, A. Juris, *Photochemistry and Photophysics*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**.
- [25] H.-A. Wagenknecht, M. Weinberger, A. Penner, (Ed.: B. König), de Gruyter, Berlin, **2013**, pp. 91-107.
- [26] L. Liu, B. M. Pillés, A. M. Reiner, J. Gontcharov, W. Zinth, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 3483-3487.
- [27] J. Svoboda, B. König, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 5413-5430.
- [28] P. Wessig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2168-2171.
- [29] P. Wessig, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2224-2227.
- [30] N. Vallavoju, J. Sivaguru, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4084-4101.
- [31] C. Yang, Y. Inoue, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4123-4143.
- [32] F. Bosca, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318-6319.

- [33] M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1219-1232.
- [34] A. Griesbeck, M. Oelgemöller, F. Ghetti, *Organic Photochemistry and Photobiology, Vol. 1*, CRC Press, **2012**.
- [35] N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano, *Principles of Molecular Photochemistry - An Introduction*, University Science Books, Sausalito, **2009**.
- [36] N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, **1991**.
- [37] P. F. McGarry, C. E. Doubleday, C.-H. Wu, H. A. Staab, N. J. Turro, *J. Photochem. Photobiol. A* **1994**, *77*, 109-117.
- [38] T. Delatour, T. Douki, C. D'Ham, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, *44*, 191-198.
- [39] M. T. Crimmins, T. L. Reinhold, in *Org. React.*, John Wiley & Sons, Inc., **2004**.
- [40] T. Bach, *Synthesis* **1998**, *5*, 683.
- [41] J. A. Erickson, S. D. Kahn, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9699-9712.
- [42] G. Ciamician, P. Silber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 1928-1935.
- [43] E. Paternó, G. Chieffi, *Gazz. Chim. Ital.* **1909**, *39*.
- [44] G. Büchi, C. G. Inman, E. S. J. Lipinsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 43274.
- [45] J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *63*, 88-102.
- [46] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *12*, 320-329.
- [47] K. Haiser, B. P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 408-411.
- [48] J. Cadet, S. Mouret, J.-L. Ravanat, T. Douki, *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 1048-1065.
- [49] S. Mouret, C. Philippe, J. Gracia-Chantegrel, A. Banyasz, S. Karpati, D. Markovitsi, T. Douki, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1706-1711.
- [50] J. G. Peak, M. J. Peak, M. Maccoss, *Photochem. Photobiol.* **1984**, *39*, 713-716.
- [51] J. McCormick, Fischer, J. Pachlatko, A. Eisenstark, *Science* **1976**, *191*, 468-469.
- [52] V. Vendrell-Criado, G. M. Rodríguez-Muñiz, M. Yamaji, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16714-16719.
- [53] V. Vendrell-Criado, G. M. Rodríguez-Muñiz, M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6476-6479.
- [54] V. Vendrell-Criado, G. M. Rodríguez-Muñiz, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, M. A. Miranda, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 1943-1943.
- [55] K. Nakatani, T. Yoshida, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2118-2119.
- [56] D. M. Noll, T. M. Mason, P. S. Miller, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 277-301.
- [57] J. Cadet, C. Anselmino, T. Douki, L. Voituriez, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, *15*, 277-298.
- [58] J. O. Fuss, P. K. Cooper, *PLOS Biol.* **2006**, *4*, 899-903.
- [59] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974.
- [60] D. B. Bucher, C. L. Kufner, A. Schlueter, T. Carell, W. Zinth, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 186-190.

- [61] A. Bauer, R. A. Ruiz, (Ed.: B. König), de Gruyter, Berlin, **2013**, pp. 67-86.
- [62] A. Natarajan, J. T. Mague, V. Ramamurthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3568-3576.
- [63] T. Bach, H. Bergmann, B. Grosch, K. Harms, E. Herdtweck, *Synthesis* **2001**, *2001*, 1395-1405.
- [64] C. Kaneko, T. Suzuki, M. Sato, T. Naito, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 112-123.
- [65] C. Kaneko, T. Naito, M. Somei, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 804-805.
- [66] F. D. Lewis, G. D. Reddy, J. E. Elbert, B. E. Tillberg, J. A. Meltzer, M. Kojima, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5311-5318.
- [67] R. S. H. Liu, G. S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4936-4944.
- [68] R. Srinivasan, K. H. Carlough, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4932-4936.
- [69] D. J. Maradyn, A. C. Weedon, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5359-5360.
- [70] C. Müller, T. Bach, *Aust. J. Chem.* **2008**, *61*, 557-564.
- [71] D. F. Cauble, V. Lynch, M. J. Krische, *J. Org. Chem.* **2002**, *68*, 15-21.
- [72] C. Müller, A. Bauer, T. Bach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6640-6642.
- [73] R. Alonso, T. Bach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4368-4371.
- [74] A. Bauer, F. Westkamper, S. Grimme, T. Bach, *Nature* **2005**, *436*, 1139-1140.
- [75] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
- [76] R. Brimiouille, T. Bach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12921-12924.
- [77] R. P. Megens, G. Roelfes, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6366-6368.
- [78] R. P. Megens, G. Roelfes, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1387-1393.
- [79] A. J. Boersma, R. P. Megens, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2083-2092.
- [80] A. J. Boersma, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3346-3348.
- [81] A. J. Boersma, J. E. Klijn, B. L. Feringa, G. Roelfes, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11783-11790.
- [82] D. Coquière, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9308-9311.
- [83] G. Roelfes, A. J. Boersma, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2006**, 635-637.
- [84] J. Oelerich, G. Roelfes, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2013-2017.
- [85] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
- [86] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928-4931.
- [87] R. Pei, A. Shen, M. J. Olah, D. Stefanovic, T. Worgall, M. N. Stojanovic, *Chem. Commun.* **2009**, 3193-3195.
- [88] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-510.
- [89] T. Kato, T. Takemura, K. Yano, K. Ikebukuro, I. Karube, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1493*, 12-18.
- [90] M. Weinberger, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2012**, *44*, 648-652.
- [91] T. Merz, M. Wenninger, M. Weinberger, E. Riedle, H.-A. Wagenknecht, M. Schütz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 18607-18619.
- [92] M. Weinberger, A. Penner, H.-A. Wagenknecht, *Chemical Photocatalysis*, de Gruyter, Berlin, **2013**.
- [93] E. C. Lathioor, W. J. Leigh, *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 291-300.
- [94] M. Wenninger, LMU (München), **2014**.

- [95] P. Aspari, N. Ghoneim, E. Haselbach, M. von Raumer, P. Suppan, E. Vauthey, *Trans. Faraday Soc.* **1996**, *92*, 1689-1691.
- [96] A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93.
- [97] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5529-5541.
- [98] S. Fukuzumi, H. Miyao, K. Ohkubo, T. Suenobu, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 3285-3294.
- [99] M. Montaliti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, **2006**.
- [100] K. Bhattacharyya, P. K. Das, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 3987-3993.
- [101] P. J. Wagner, R. J. Truman, A. E. Puchalski, R. Wake, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7727-7738.
- [102] N. Gaß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6661-6668.
- [103] J. Krim, C. Grünewald, M. Taourirte, J. W. Engels, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 480-486.
- [104] M. A. Cameron, S. B. Cush, R. P. Hammer, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065-9069.
- [105] A. Zahn, C. J. Leumann, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6174-6188.
- [106] M. Stoop, A. Zahn, C. J. Leumann, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3440-3449.
- [107] S. Hainke, S. Arndt, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4233-4238.
- [108] N. Joubert, R. Pohl, B. Klepetářová, M. Hocek, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6797-6805.
- [109] K. W. Wellington, S. A. Benner, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *25*, 1309-1333.
- [110] G. D. Daves, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 201-206.
- [111] R. N. Farr, G. D. Daves, *J. Carbohyd. Chem.* **1990**, *9*, 653-660.
- [112] G. Porter, P. Suppan, *Trans. Faraday Soc.* **1965**, *61*, 1664-1673.
- [113] D. Jornet, R. Tormos, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10768-10774.
- [114] C. Reichardt, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 119-131.
- [115] Y. Yu, Y. Li, S. Chen, T. Liu, Z. Qin, H. Liu, Y. Li, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4287-4292.
- [116] R. Nutiu, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1061-1065.
- [117] A. Novogrodsky, J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 2923-2932.
- [118] R. Beukers, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41*, 550-551.
- [119] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernández, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625-629.
- [120] P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256-4263.
- [121] S. Encinas, N. Belmadoui, M. J. Climent, S. Gil, M. A. Miranda, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 857-862.
- [122] F. P. Gasparro, *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 71-78.
- [123] A. A. Lamola, in *Pure Appl. Chem., Vol. 24*, **1970**, p. 599.
- [124] C. Hélène, M. Charlier, *Biochimie* **1971**, *53*, 1175-1180.
- [125] B. Albinsson, M. P. Eng, K. Pettersson, M. U. Winters, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 5847-5864.
- [126] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.



- [127] R. E. Holmlin, R. T. Tong, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9724-9725.
- [128] E. Dumont, M. Wibowo, D. Roca-Sanjuán, M. Garavelli, X. Assfeld, A. Monari, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 576-580.
- [129] C. Schweitzer, Z. Mehrdad, A. Noll, E.-W. Grabner, R. Schmidt, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2493-2507.
- [130] H.-A. Wagenknecht, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 974-1006.
- [131] J. R. W. H. B. Gray, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 537-561.



## 11. Appendix

### 11.1. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

N. Gaß, H.-A. Wagenknecht, "Synthesis of Benzophenone Nucleosides and Their Photocatalytic Evaluation for [2+2] Cycloaddition in Aqueous Media", *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 2015, 6661-6668.

L. Antusch, N. Gaß, H.-A. Wagenknecht, "Elucidation of the Dexter-type energy transfer in DNA by thymine-thymine dimer formation using photosensitizers as artificial nucleosides", *Angewandte Chemie*, DOI: 10.1002/anie.201610065R1.

N. Gaß, J. Gebhard, H.-A. Wagenknecht, "Photocatalysis of an intramolecular [2+2]-cycloaddition using DNA three-way junction as photoDNAzyme", *ChemPhotoChem*, DOI: 10.1002/cptc.201600034.

### 11.2. Poster, Vorträge und Konferenzen

09/2013: Greifswald (Deutschland), VI. *Nukleinsäurechemie-Treffen*, Posterpräsentation: "Photocatalytic study on 4-(dimethylamino)benzophenone and preparation of the C-nucleoside for incorporation into DNA".

08/2014: Posen (Polen), *XXI International Round Table on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, Posterpräsentation: "Photocatalytic efficiency of 4-(Dimethylamino)benzophenone – Incorporation of the 4-(Dimethylamino)-benzophenone-C-Nucleoside into DNA".

03/2015: Regensburg (Deutschland), *21th seminar day of the GRK 1626: Chemical Photocatalysis*, Vortrag: "Exploration of benzophenone-nucleosides for photocatalytic DNA".

## Appendix

- 07/2015: Singapur (Singapur), *7th Pacific Symposium on Radical Chemistry*, Posterpräsentation: "Photocatalytic evaluation of benzophenone nucleosides for [2+2] cycloaddition in aqueous media".
- 04/2016: Regensburg (Deutschland), *25th seminar day of the GRK 1626: Chemical Photocatalysis*, Vortrag: "SELEX - Selecting an Aptamer for Photocatalytic Applications".
- 07/2016: Sydney (Australien), *23rd IUPAC Conference on Physical Organic Chemistry*, Posterpräsentation: "4-Methylbenzophenon-modified DNA three-way junction for asymmetric photocatalysis" (Posterpreis).

### **11.3. Auslandsaufenthalt**

September 2015 – Dezember 2015

Aufenthalt in Vancouver, Kanada in der Arbeitsgruppe von *Dipankar Sen* an der *Simon Fraser University*.