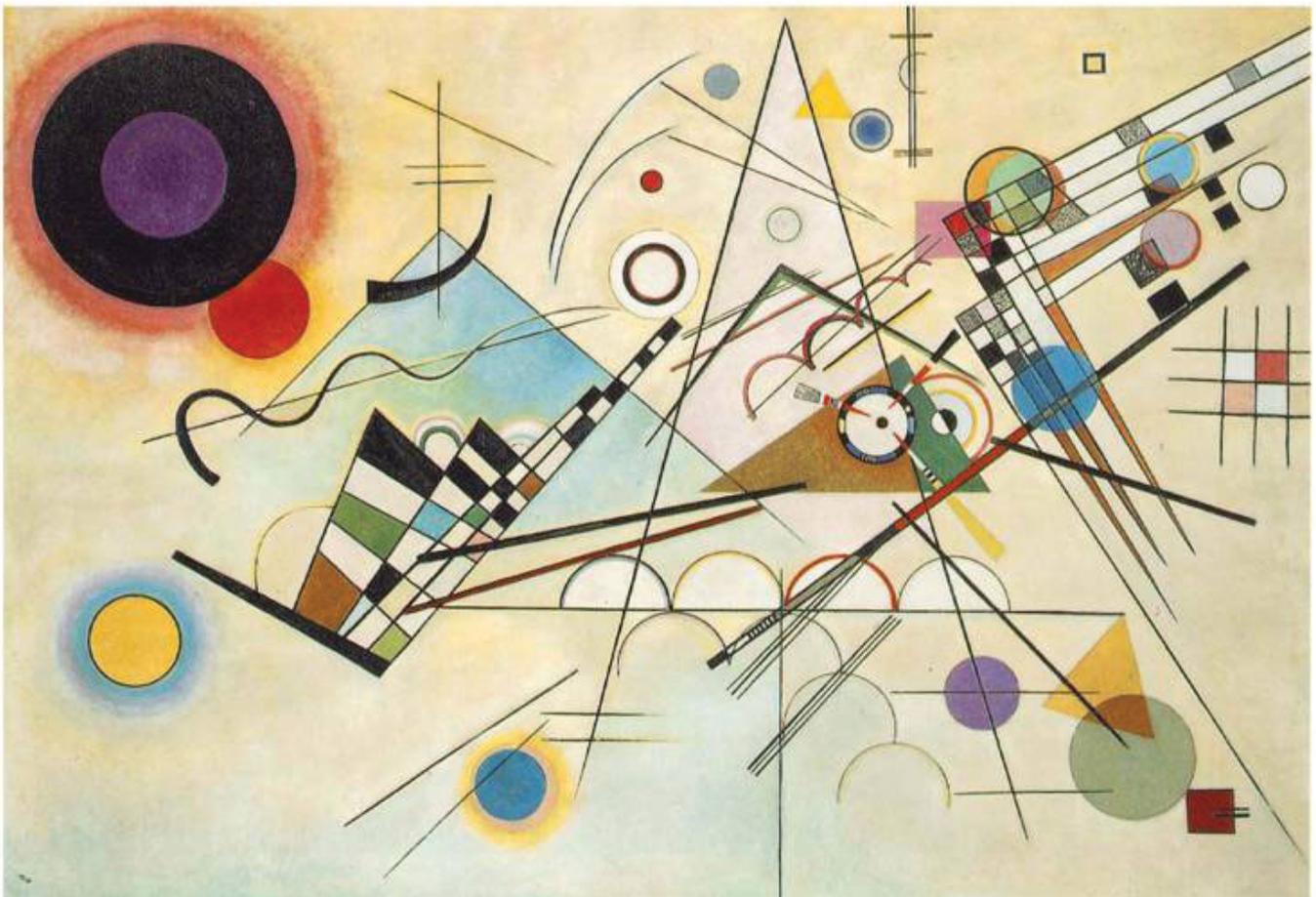


Stefan Gröschel

---

**Synthese von  $N_{\alpha}$ -(Monomethoxytrityl)-Alanyl-  
Nukleaminsäuren sowie deren PNA/DNA-  
Hybride als Vorläufermoleküle strukturell  
neuartiger *Molecular Beacons***

---



Cuvillier Verlag Göttingen

**Synthese von  $N_{\alpha}$ -(Monomethoxytrityl)-Alanyl-  
Nukleaminsäuren sowie deren PNA/DNA-Hybride als  
Vorläufermoleküle strukturell neuartiger *Molecular Beacons***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrads  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Stefan Gröschel  
aus München

Göttingen 2003

### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003  
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2003  
ISBN 3-89873-928-7

D 7

Referent: Prof. Dr. U. Diederichsen

Korreferent: Prof. Dr. A. Zeeck

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2003

By courtesy of the Solomon R. Guggenheim Museum (New York)

Vasily Kandinsky

"Composition VIII" (July 1923)

Oil on canvas

140 x 201 cm

Gift, Solomon R. Guggenheim, 1937

© The Solomon R. Guggenheim Foundation, New York

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

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

1. Auflage, 2003

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-928-7

meiner lieben Karin, meinen Eltern sowie Annemie und Manfred



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2000 bis März 2001 am Institut für Organische Chemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg sowie von April 2001 bis September 2003 am Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Diederichsen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Diederichsen für die interessante Themenstellung, die Freiheit des wissenschaftlichen Arbeitens sowie die mir gewährte Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Mein weiterer Dank gilt:

- Olga Avrutina, Matthias Decke, Nicola Diezemann, Thorsten Stafforst sowie Jinhua Zhang für das angenehme Klima sowie den gut funktionierenden Laborkommunismus,
- Matthias Decke im Insbesondere für seine Mitarbeit sowie sein großes fachliches wie auch persönliches Engagement,
- Arndt Brückner, Markus Hoffmann, Eduard Liebler, Katrin Lorenz, Roberto Roda Bravo, Thomas Wagner und Jinhua Zhang für die hervorragende Zusammenarbeit in Würzburg bzw. Göttingen sowie den steten Gedankenaustausch in fachlichen und sonstigen Dingen,
- Andrea Küsel für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit, Ansgar Stoll für seine organisatorisch-logistischen Leistungen, ohne die so manche Spätschicht nicht möglich gewesen wäre und Juliane Gräfe für das "t".
- bei allen namentlich nicht genannten Mitgliedern des Arbeitskreises sowohl in Göttingen als auch Würzburg für das gute kollegiale Klima, die Diskussionsbereitschaft sowie die stets reichlich vorhandene Hilfsbereitschaft.

Für die stets prompte Aufnahme der NMR-Spektren möchte ich mich bei Christiane Siebert, Martin Weitemeyer und Carola bedanken.

Herr Dr. H. Frauendorf sowie Frau G. Udvarnoki haben sich um die Aufnahme der MS-Spektren, die sie mit großem Einsatz vollführten, verdient gemacht.

Meinen Praktikantinnen Tanja König und Christiane Schlicker möchte ich für die hilfreiche Mitarbeit im Labor herzlich danken.

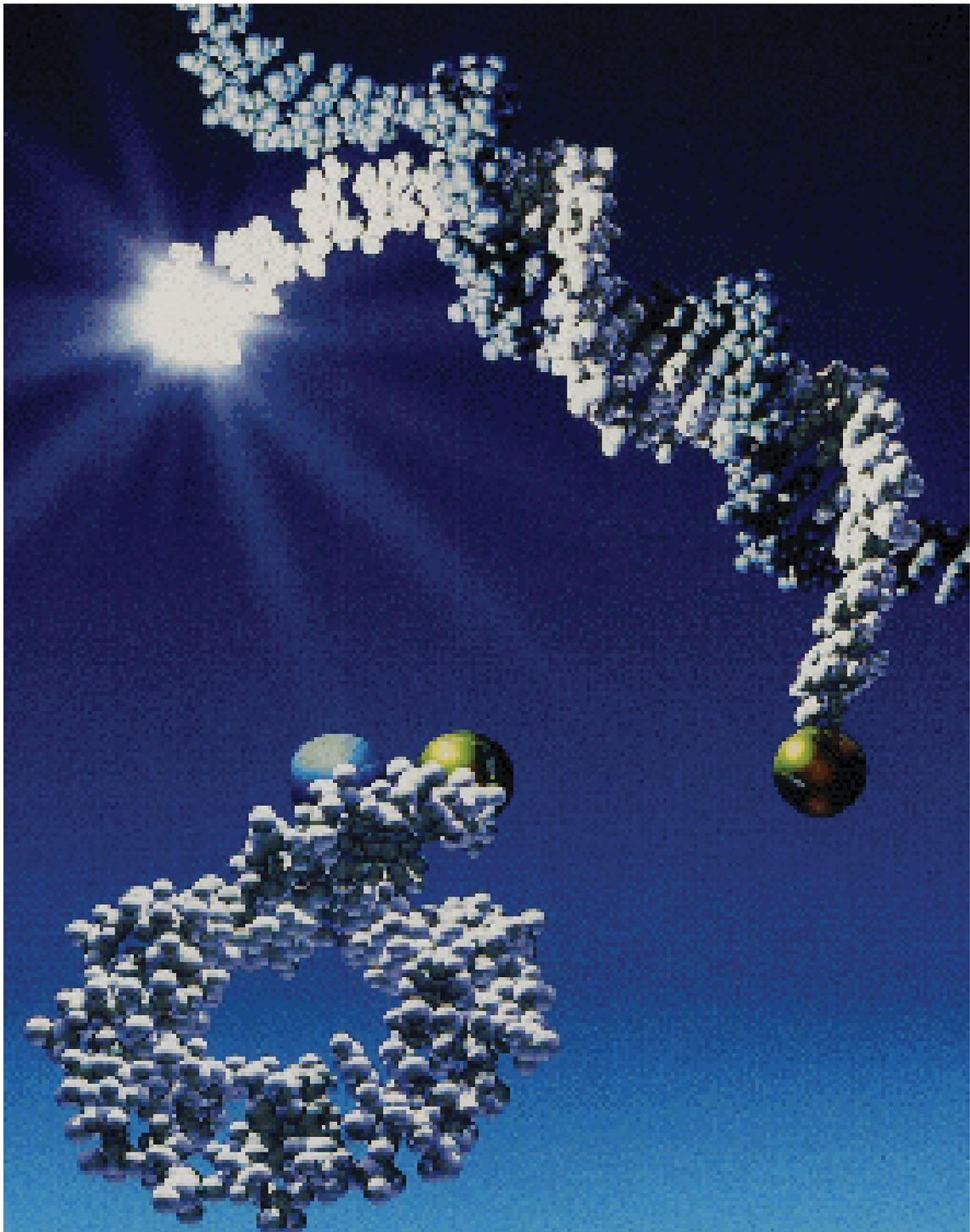
Für die Unterhaltungen zwischen Tür und Angel sowie die zahlreichen Skatturniere möchte ich den Mitarbeitern des Arbeitskreises Langer – insbesondere Joachim Anders – meinen besonderen Dank aussprechen.

Marco Walter, Wiebke Wesche und Nadine Pfannenschmidt danke ich für viele angenehme Stunden, die kulinarischen Genüsse sowie die gemeinschaftliche Heiterkeit in freundschaftlicher Runde.

Für gelegentliche Pick-me-ups möchte ich Hetty Zimmer meine persönliche Anerkennung aussprechen.

Des weiteren möchte ich die von meinen Eltern sowie Annemie, Manfred und Alfred Zimmer großzügig gewährten Hilfen erwähnen, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Last but not least möchte ich mich bei meiner lieben Karin für ihre Geduld in der Zeit des Zusammenschreibens, die sie trotz eigener Prüfungen aufgebracht hat, sowie für den von ihr gegebenen selbstlosen Rückhalt bedanken.



“... Burning like a beacon in the night...”

(aus dem Lied “Heartlight” von Kenny Loggins)



---

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Molecular Beacons</i></b>	<b>4</b>
2.1	Funktionsprinzip	4
2.2	Stammregion	5
2.3	Schleifenregion	10
2.4	Fluorophor und Quencher	11
2.5	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	12
2.6	Molecular-Beacon-Design	14
2.7	Anwendungsgebiete für <i>Molecular Beacons</i>	17
2.8	Einzelmolekülspektroskopie mit <i>Molecular Beacons</i>	22
<b>3</b>	<b>Struktur und Eigenschaften der Alanyl-PNA</b>	<b>25</b>
3.1	Strukturprinzip der Alanyl-PNA	25
3.2	Paarungsselektivitäten der Nukleobasen	28
3.3	Einbau Interkalator-Farbstoff-haltiger $\alpha$ -Aminocarbonsäuren	30
<b>4</b>	<b>PNA/DNA-Chimäre</b>	<b>33</b>
4.1	Eigenschaften der PNA/DNA-Chimäre	33
4.2	Stufenweise Synthese der PNA/DNA-Chimäre	35
4.2.1	Schutzgruppenstrategien und Kupplungsbedingungen	35
4.2.2	PNA/DNA-Linker	39
4.3	Ligation (Blockkondensation)	40
<b>5</b>	<b>Nukleoaminosäure- und Oligomersynthesen</b>	<b>45</b>
5.1	Darstellung der $N_{\alpha}$ -Boc-Alanyl-Nukleoaminosäuren	45
5.2	Darstellung der $N_{\alpha}$ -Mmt-Alanyl-Nukleoaminosäuren	53
5.3	Darstellung von $N,N$ -Diethylammonium-(L)- $N_{\alpha}$ -Mmt- $N_{\epsilon}$ -Fmoc-Lysinat	56

---

5.4	Darstellung des PNA/DNA-Linker-Moleküls	58
5.5	Synthese der Alanyl-PNA-Oligomere nach der Merrifield-Methode und Untersuchung ihres Entpaarungsverhaltens	60
5.6	Alanyl-PNA-Oligomersynthese nach der Mmt-/Acyl-Strategie	64
5.7	Alanyl-PNA/DNA-Chimärensynthese	68
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>78</b>
	<b>Literatur</b>	<b>127</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
Ac <sub>2</sub> O	Acetanhydrid
AlaA	β-(Adenin-9-yl)alanin
AlaC	β-(Cytosin-1-yl)alanin
AlaG	β-(Guanin-9-yl)alanin
AlaG(iBu)	β-[N <sup>2</sup> -(Isobutyryl)guanin-9-yl]alanin
AlaP(2A6Cl)	β-(2-Amino-6-chloropurin-9-yl)alanin
AlaP(2iBuA6Cl)	β-(N <sup>2</sup> -Isobutyryl-6-chloropurin-9-yl)alanin
AlaT	β-(Thymin-1-yl)alanin
Anis.	Anisoyl
Äq.	Äquivalente
Ar	Aryl
Bn	Benzyl
Boc	Tertiär Butyloxycarbonyl
BODIPY <sup>®</sup>	4,4-Difluoro-3a,4a-diaza-indazen
bp	Basenpaar(e)
br.	breit
Bz	Benzoyl
°C	Grad Celsius
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDCl <sub>3</sub>	monodeutertes Chloroform
CPG	Controlled Pore Glass
C <sub>q</sub>	Quartäres Kohlenstoffatom
d	Dublett
δ	Chemische Verschiebung
DABCYL	4-(4'-Dimethylaminophenylazo)-benzoesäure
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin

---

DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
[D <sub>6</sub> ]DMSO	hexadeutertes Dimethylsulfoxid
Dmt	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
E°	Standard-Reduktionspotential
EDANS	5-(2'-Aminoethyl)-aminonaphthalin-1-sulfonsäure
ee	Enantiomerenüberschuß
ESI-MS	Elektronen-Spray-Ionisations-Massenspektrometrie
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Fmoc	Fluoren-9-yl-methyloxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
φ <sub>D</sub>	Quantenausbeute
h	Stunde(n)
% H	prozentuale Hyperchromizität
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HMBA	<i>4-hydroxymethyl benzoic acid</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOAC	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
iBu	<i>iso</i> -Butyryl
K	Kelvin
KG <sub>60</sub>	Kieselgel ( <i>mesh</i> 60)
m-Kresol	<i>meta</i> -Kresol
l	Liter
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
λ <sub>max</sub>	Wellenlänge maximaler Absorption
λ <sub>Em,max</sub>	Wellenlänge maximaler Emission

---

m	Multiplett
MB	<i>Molecular Beacon</i>
MBHA	Methylbenzhydrylamin
MeOH	Methanol
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mmt	4-Monomethoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NEM	<i>N</i> -Ethylmorpholin
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
(2D-) NMR	(zweidimensionale) Kernresonanzspektroskopie
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
p.a	<i>pro analysi</i> (dt.: zur Analyse)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Schutzgruppe
ppm	<i>parts per million</i>
PNA	Peptidnukleinsäure
PyBop	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
Ret.	Retentionszeit (in Minuten)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
Rot.	Rotamer(e)
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
rWC	<i>reversed Watson-Crick</i> Paarungsmodus
S	Singulett
S <sub>n</sub>	Singulettzustand des n-ten angeregten Niveaus
Sept	Septett
Smp.	Schmelzpunkt
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>

$T_m$	Schmelz- bzw. Entpaarungstemperatur
$T_n$	Triplettzustand des n-ten angeregten Niveaus
TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl(en)
WC	Watson-Crick Paarungsmodus
WS	<i>wavelength shifting</i>
Z	Benzyloxycarbonyl (Zervas)
Zers.	Zersetzung

(D)-konfigurierte Alanyl-Nukleaminsäuren sind in der Sequenzschreibweise AlaX durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben.

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Dem heutigen Verständnis des molekularen und strukturellen Aufbaus der DNA liegt die Arbeit von *Watson* und *Crick* zu Grunde.<sup>[1]</sup> Sie zeigten, dass sich der Informationsträger unseres Erbguts, die DNA, aus phosphodiesterverbrückten Biopolymeren zusammensetzt, die aus den 2'-Desoxyribonukleinsäuren der vier kanonischen Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) sowie Thymin (T) bestehen. Die daraus resultierenden DNA-Doppelstränge entstehen aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweiligen Basenpaaren A und T bzw. C und G. Durch Ladungsrepulsion der Phosphodiesterbrücken kommt es zur Ausbildung helikaler Strukturen der Doppelstrang-DNA (dsDNA). Um die Basensequenz des menschlichen Erbguts aufzuklären, wurde 1985 das *Human Genome Project* (HPG) gegründet, dem im Jahr 2001 dessen lückenlose Aufklärung gelang.<sup>[2]</sup> Im Laufe dieser Forschungsarbeiten wurden durch DNA-Sequenzabgleich zahlreicher Individuen Abweichungen einzelner Basenpaare, so genannte '*Single nucleotide polymorphisms*' (SNPs), in kodierenden Bereichen des Genoms entdeckt.<sup>[3]</sup> Weitere Untersuchungen zeigten, dass insgesamt 93 % aller menschlichen Gene SNPs aufweisen<sup>[4]</sup> und ihre statistische Verteilung ca. 1 SNP pro 1000 bp beträgt, so dass sich mehr als  $10^7$  SNPs im gesamten menschlichen Genom befinden.<sup>[5]</sup> Dies wiederum führt zu einer potentiellen individuellen Variationsbreite von ca.  $10^5$  verschiedenen Aminosäure-Insertionen im menschlichen Proteom,<sup>[3]</sup> so dass das Auffinden und Kartieren der SNPs sowie ihrer Interaktionen in der Markierung krankheitsrelevanter Abschnitte des Genoms Anwendung findet.<sup>[6]</sup> Die in der Fachliteratur aufgeführten, durch SNPs verursachten Krankheiten sind mannigfaltig: *M. Alzheimer*,<sup>[7]</sup> Mukoviszidose,<sup>[8]</sup> *Chorea Huntington*,<sup>[9]</sup> *M. Crohn*,<sup>[10]</sup> tiefe Beinvenenthrombose<sup>[11]</sup> sowie durch *diastrophe Dysplasie*<sup>[12]</sup> hervorgerufene Fehlentwicklungen der Organe oder Körpergewebe. Daher sind derartige Studien in Bezug auf die Entwicklung neuartiger Pharmaka, der Gerichtsmedizin sowie der Untersuchung von Krebs und Erbkrankheiten von großem Interesse.<sup>[3]</sup>

Da die Anzahl der im menschlichen Genom befindlichen SNPs sehr groß ist (s.o.), mussten analytische *High-Throughput*-Methoden entwickelt werden. Deren Signalerfassung beruht auf den Prinzipien der Radioaktivität, Chemilumineszenz, Enzymatik, Analytgröße, -masse oder -ladung.<sup>[13]</sup> Zu den gängigen Verfahren zählen '*Single strand conformation polymorphism analysis*',<sup>[14]</sup> '*Allele-specific oligonucleotide hybridization*' (ASO),<sup>[15]</sup> '*Oligonucleotide ligation assay*' (OLA),<sup>[16]</sup> '*Primer-extension*'-/'*Mini-sequencing*'-Assays<sup>[17]</sup> sowie '*Nuclease technology*'<sup>[18]</sup> und '*Structure-specific nuclease invader technology*'.<sup>[19]</sup> Zur Abtrennung der einzelnen Analyten aus Analytgemengen werden Gel- und Kapillar-Elektrophorese,<sup>[13]</sup>