

Paramagnetisch markierte Oligonukleotide

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Edith Wöltjen

aus

Braunschweig

Göttingen 2009

D 7

Referent:

Prof. Dr. Christian Griesinger,

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

Koreferent:

Prof. Dr. Ulf Diederichsen,

Georg-August-Universität, Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2009

meiner Familie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Griesinger für die interessante Themenstellung, sein reges Interesse an dieser Arbeit und die sehr gute Betreuung. Er hat mich stets zielführend unterstützt.

Herrn Prof. Diederichsen möchte ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Universität Göttingen danken. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Dr. Andrei Leonov bedanke ich mich herzlich für die Betreuung des experimentellen Teils und die aufmunternden Worte.

Herrn Fabian Peters, Frau Kerstin Overkamp, Dr. Volker Klaukien und Dr. Mate Erderlyi danke ich für die gemeinschaftliche Arbeit im Büro und die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen.

Dr. Jörg Fohrer danke ich für die Zusammenarbeit bei der TAR-RNA-Strukturanalyse und den NMR-spektroskopischen Messungen.

Bei Dr. Edward D'Auvergne bedanke ich mich für die zahlreichen Diskussionen über Pseudokontaktshifts und dipolare Kopplungen und die Erklärungen zum Programm Relax.

Mein Dank gilt Dr. Dirk Bockelmann, Dr. Jochen Junker und Herr Jürgen Arve für die Unterstützung beim Lösen von Computerproblemen.

Der gesamte Arbeitskreis sorgte für ein kreatives Arbeitsklima in äußerst freundlicher Atmosphäre.

Herrn Johannes Lehmann danke ich für die liebevolle Begleitung meines gesamten Studiums, wegen dem das Privatleben oft zurückstehen mußte.

Meine Familie und Freunde haben meine Arbeit immer mit Interesse und reger Anteilnahme verfolgt.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Fonds der Chemischen Industrie.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	9
2.1	Strukturbiologie	9
2.2	Nukleinsäurestruktur	11
2.3	Biologische Bedeutung von Nukleinsäuren	12
2.4	TAR-RNA	13
3	NMR-Spektroskopie	17
3.1	Strukturaufklärungsmethoden	17
3.2	2D-NMR-Spektroskopie	18
3.3	Zur NMR-Strukturaufklärung von Oligonukleotiden	20
3.4	Zuordnung der Resonanzen	21
3.5	Strukturrechnung	27
3.6	NMR-Spektroskopie an partiell ausgerichteten Molekülen	29
3.7	Paramagnetische NMR-Spektroskopie	30
3.8	Pseudokontaktverschiebung	32
3.9	Residuale dipolare Kopplungen	38
3.10	Relaxation durch Paramagnetismus	43
4	Tagging	47
4.1	Das Konzept des Taggings von Biomolekülen	47
4.2	Chelatisierende DNA-Tags in der Literatur	49
4.3	Anforderungen an paramagnetisch getaggte DNA	53
5	Synthese paramagnetisch markierter DNA	59
5.1	Festphasensynthese	60

5.2	Methoden zur Modifizierung von DNA-Basen	62
5.3	Synthese eines EDTA-funktionalisierten Phosphoramidits	63
5.4	Sonogashira-Reaktionen an DNA	67
5.5	Clickchemie	69
5.6	Tagging über eine Disulfidbrücke	81
6	Analyse der Oligonukleotide	87
6.1	Zur Auswahl der Sequenzen	88
6.2	HPLC von Oligonukleotiden	90
6.3	Die Beladung der getaggten DNA mit Lanthanoidionen	95
6.4	NMR-Messungen der Hairpin-DNA mit EPTE-Tag	98
6.5	Chimäre TAR-RNA	107
6.6	Chimäre TAR-RNA mit einem EPTE-Tag	111
6.7	Vergleich des paramagnetischen Alignments mit anderen Verfahren	118
7	Ausblick	121
8	Experimenteller Teil	123
8.1	Material und Methoden	123
8.2	Versuchsvorschriften	126
	Literaturverzeichnis	173
9	Anhang	183
9.1	Abkürzungsverzeichnis	183
9.2	Abbildungsverzeichnis	186
9.3	Macromodelparameter	190
9.4	Weitere Versuchsvorschriften	190
9.5	Pulssequenz des NOESY-Spektrums	193
9.6	Pulssequenz des COSY-Spektrums	194
9.7	Pulssequenz des TOCSY-Spektrums	196
9.8	NOESY-Pulssequenz mit watergate-Wasserunterdrückung	198
9.9	HSQC-Pulssequenz der C1'-H1'-Kreuzsignale	199
9.10	HSQC-Pulssequenz der C8-H8- und C2-H2-Kreuzsignale	203

9.11 HSQC-Pulssequenz der gekoppelten C1'-H1'-Kreuzsignale	207
9.12 HSQC-Pulssequenz der gekoppelten C8-H8- und C2-H2-Kreuzsignale	211
9.13 CNS-Skripte und Tabellen	215
9.14 Relax-Skript und die zugehörige PCS-Tabelle	244
9.15 Lebenslauf	246

Kapitel 1

Zusammenfassung

Die Strukturbiologie von Nukleinsäuren ist von großem Interesse in der modernen Biochemie. Die NMR-spektroskopische Analyse (*nuclear magnetic resonance*) von Oligonukleotiden mit konventionellen Methoden auf der Basis von NOE-Messungen (*nuclear Overhauser enhancement*) und skalaren Kopplungen führt aufgrund der geringen Protonendichte oft zu fehlerbehafteten Ergebnissen [1]. Neuere Methoden verbessern diese durch die partielle Ausrichtung der Nukleinsäuren im Magnetfeld, wodurch wertvolle zusätzliche Strukturparameter zugänglich werden [2,3]. Bisher erfolgte dies zumeist mit Hilfe externer Alignmentmedien [4]. Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden ermöglichen es, Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und auch Ribonukleinsäuren (RNA) durch eine paramagnetische Markierung im Magnetfeld auszurichten und somit zusätzliche Strukturinformationen zu generieren. Darüber hinaus lässt sich damit auch die Dynamik von Nukleinsäuren untersuchen [5].

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur paramagnetischen Markierung von Oligonukleotiden entwickelt. Dabei wurden ethinyl- und thiolhaltige Oligonukleotide per Festphasensynthese dargestellt und anschließend modifiziert. Die Markierung von Makromolekülen mit kleinen funktionalen Einheiten bezeichnet man als Tagging. Im Fokus stand die Verwendung

der paramagnetischen DNA für NMR-Studien, aber auch für MRI, künstliche DNAsen und molekulare Magnete sind paramagnetisch markierte Oligonukleotide von Interesse [6–10].

Um ein paramagnetisches Zentrum in einem Biomolekül zu erhalten, muss entweder ein Metallion oder ein Radikal eingeführt werden. Als stabile Radikale bieten sich Nitrosylradikale wie TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl) an. Neben einem TEMPO-basierten Radikal wurden in dieser Arbeit Lanthanoid(III)ionen (im Folgenden kurz Lanthanoidionen genannt) als paramagnetische Zentren genutzt. Lanthanoidionen werden sehr stark von EDTA (Ethyldiamintetraacetat) komplexiert ($K_B \approx 10^{18}$) [11]. Diese starke Wechselwirkung erlaubt eine selektive Bindung von Lanthanoidionen an die Chelatfunktion anstelle von unselektiven Wechselwirkungen mit Phosphatfunktionen des DNA-Rückgrats.

Die EDTA-Tags wurden auf zwei verschiedene Arten an die DNA gebunden. Die erste Methode basiert auf einer Anbindung über eine Disulfidbrücke. Dazu wurde ein *S*-Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin via Phosphoramiditchemie in eine DNA-Sequenz eingebaut. Anschließend wurde die Thiolfunktion entschützt und reagierte mit einem Thiosulfonat **36** zum gewünschten Oligonukleotid (Abb. 1.1).

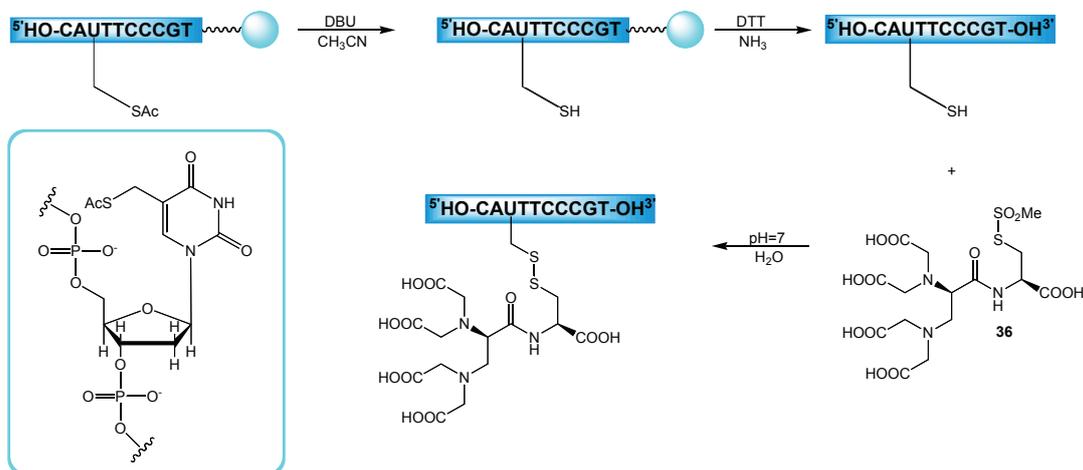


Abb. 1.1: Tagging über eine Disulfidbrücke. Die DNA-Sequenzen sind dunkelblau unterlegt. Die hellblauen Kugeln stellen die CPG-Festphase (*controlled pore glas*) dar.

Analog wurden ebenfalls Proteine und Peptide modifiziert. Mit dem gleichen Thiosulfonat wurden bereits Calmodulin, Triggerfaktor und Ubiquitin derivatisiert [12–14].

Die zweite Methode zur paramagnetischen Markierung basiert auf der Clickreaktion [15,16], einer Kupfer(I)-katalysierten Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition. Dabei reagieren ein Azid mit EDTA-Funktion und eine ethynylmodifizierte DNA. Clickreaktionen an DNA-Sequenzen haben ein breites Anwendungsspektrum, da sie unter milden, neutralen Bedingungen durchgeführt werden können und dabei diverse funktionelle Gruppen tolerieren. Die Clickreaktion an Oligonukleotiden mit 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin erwies sich als sterisch teilweise gehindert (Abb. 1.2). Das sehr flexible radikalische Azid reagierte mit diesem Oligonukleotid, aber das sterisch etwas anspruchsvollere Cyclohexylazid **32-S** lieferte nur eine Mischung aus Edukt- und Produktoligonukleotid. Eine Reaktion der Ethynylfunktion mit dem weniger reaktiven aromatischen Azid **26-S** fand nicht statt.

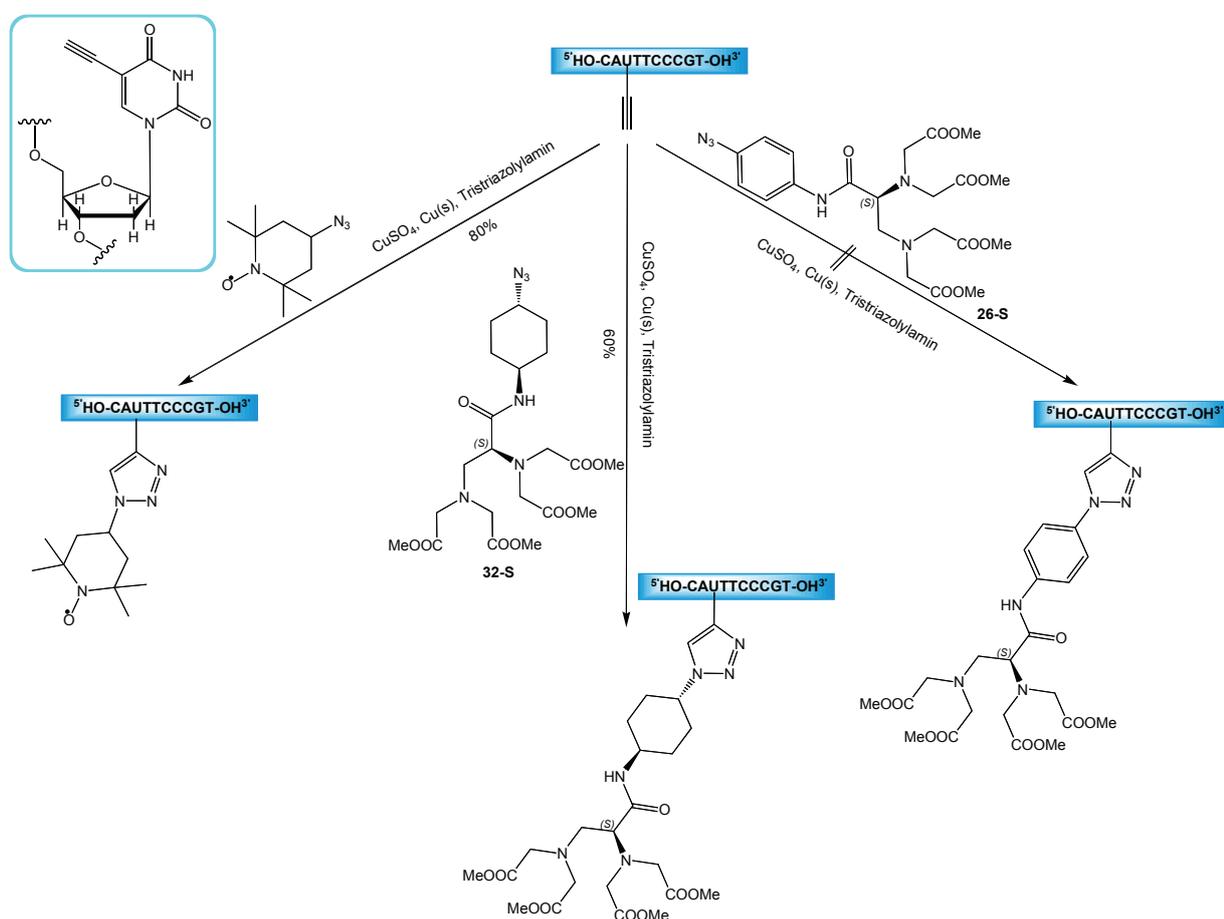


Abb. 1.2: Methodenübersicht: Clickreaktionen an ethynylmodifizierter DNA mit einem radikalischen TEMPO-Derivat (links), einem alkyischen Azid mit EDTA-Funktion (Mitte) und einem aromatischen Azid mit EDTA-Funktion (rechts).

Durch die Verwendung des verlängerten 5-[[[(4-Ethynyl)phenyl]ethynyl]-2'-desoxyuridin wurde dieses Problem gelöst. Auf diese Art konnte auch das aromatische Azid mit der DNA verbunden werden (EPTE-Tag). Die Clickreaktion an derart modifizierten Oligonukleotiden war dabei sowohl in Lösung als auch an festphasengebundenen Oligonukleotiden möglich (Abb. 1.3). Der Vorteil hierbei ist die einfachere Aufarbeitung, da die festphasengebundene DNA durch Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln von überschüssigem Azid, Ligand und Kupferionen gereinigt werden kann.

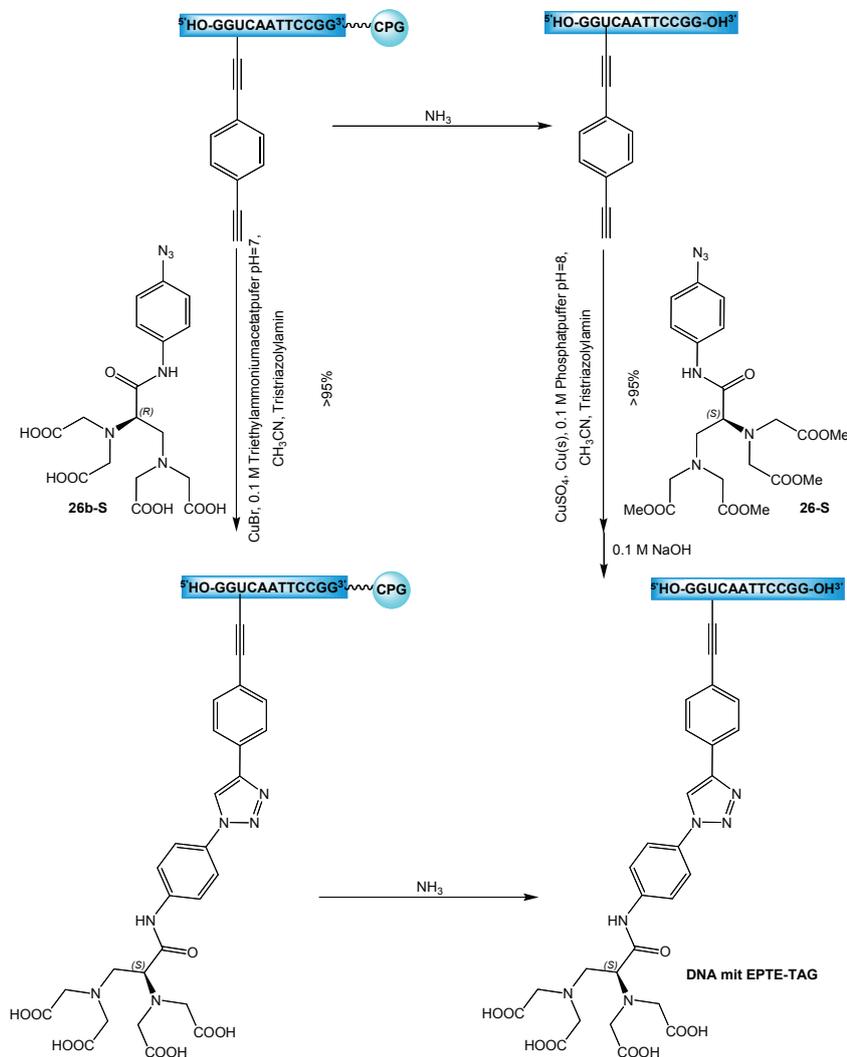


Abb. 1.3: Methodenübersicht: Clickreaktionen an verlängerter ethynylmodifizierter DNA. Synthese einer DNA mit EPTE-Tag durch eine Clickreaktion an der Festphase (links) und in Lösung (rechts).

Lanthanoidhaltige paramagnetische Tags sind für die NMR-Spektroskopie von großem Interesse, weil sie einerseits die Strukturberechnungen verfeinern können und andererseits auch Informationen über die Dynamik von Molekülen liefern. Dabei treten drei verschiedene Effekte in den Spektren auf: Paramagnetische Relaxationsverstärkung (PRE), Pseudokontaktverschiebungen (PCS) und residuale dipolare Kopplungen (rdc). Erstere ist abhängig von der Distanz des betrachteten Atomkerns zum paramagnetischen Zentrum und wird oft für Bindungsstudien von Proteinkomplexen genutzt. Pseudokontaktverschiebungen sind ebenfalls abstandsabhängig, unterliegen aber zudem noch einer Winkelabhängigkeit. Die meist genutzten Effekte sind residuale dipolare Kopplungen, die es erlauben die Orientierung des Vektors zweier benachbarter Atomkerne im Alignmenttensor zu bestimmen. Dies kann nur gelingen, wenn das getaggte Molekül durch die magnetische Anisotropie des Lanthanoidions eine Vorzugsausrichtung im Raum besitzt. Neben dem Tagging existieren auch andere Methoden, um eine Vorzugsausrichtung im Molekül zu generieren, z. B. durch die Nutzung von Phagen oder gestreckten Polyacrylamidgelen, welche allerdings nur rdc's und keine PCSs liefern [17].



Abb. 1.4: DNA-Hairpinsequenz. Das Sternchen markiert die Position des Tags.

In dieser Arbeit wurde die Struktur eines 24meren DNA-Hairpins durch NMR-spektroskopische Messungen ermittelt. Dazu wurden NOE-Daten und das Strukturberechnungsprogramm CNS (*Crystallography & NMR System*) genutzt [18,19]. Die Sequenz des Hairpins basiert dabei auf einem Ausschnitt einer STAT-Protein bindenden Sequenz (Abb. 1.4) [20–22]. An der dritten Position der DNA wurde ein paramagnetischer Tag mit Hilfe einer Clickreaktion angebracht, der anschließend mit Dysprosiumionen beladen wurde. Aus dem NOESY-Spektrum konnten dreiunddreißig Pseudokontaktshifts extrahiert werden. Mit dem Programm Macromodel [23] wurde ein Set von mehreren Tag-Konformationen an der Hairpinsequenz erstellt. Das Programm Relax [24, 25] benutzte diese als Basis zur Berechnung des Alignmenttensors aus den Pseudokontaktshifts.

Die erwarteten rdcs können damit maximal die Größe von 13.8 Hz bei 700 MHz erreichen. Der q-Faktor, der die Güte der Messwerte bestimmt, betrug 0.086. Die Größe des Tensors und damit auch der erwarteten rdcs entspricht in etwa den Werten der EDTA-Tags für Proteine [12, 14].

Des Weiteren wurde ein Konstrukt entwickelt, das das Alignment der HIV2-TAR-RNA ermöglicht. Dazu wurde eine TAR-RNA-Sequenz am 3'-Ende um einen Überhang von 11 Basen verlängert. Anschließend wurde ein komplementärer decamerer DNA-Gegenstrang zur RNA titriert (Abb. 1.5). Dabei wurde durch NMR-spektroskopische Messungen beobachtet, dass sich bei 25 °C ein stabiler chimärer Duplex bildet. Essentiell dabei ist, dass dadurch die Signale der ursprünglichen RNA nicht beeinflusst wurden und somit auch nicht deren Konformation.

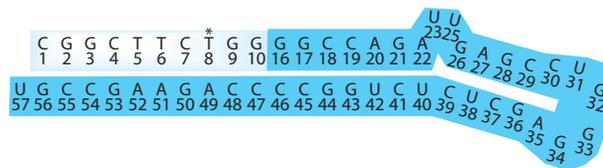


Abb. 1.5: Verlängerte TAR-Sequenz des HIV2.

dunkelblau: RNA, hellblau: DNA, Sternchen: getaggte Base.

Der DNA-Gegenstrang kann durch eine der oben genannten Methoden mit einem paramagnetischen Zentrum modifiziert werden. Dazu wurde ein EPTE-Tag verwendet. Die DNA wurde mit Dysprosium komplexiert und anschließend zur RNA titriert. Bei 900 MHz und 298 K wurden rdcs bis zu 10 Hz gemessen. Die Dy^{3+} -haltige DNA hydrolysierte dabei die RNA nicht, was durch eine Gelelektrophorese nachgewiesen wurde. Der EPTE-Tag bewirkte also eine Vorzugsausrichtung des gesamten Konstrukts im Magnetfeld.

Die NMR-Spektroskopie und auch die Röntgenstrukturanalyse setzen sehr saubere DNA-Proben voraus. Dies führt bei nicht palindronischen DNA-Duplexen zu der Anforderung, dass Strang und Gegenstrang genau im Verhältnis eins zu eins vorliegen müssen. Meist werden dazu UV-Absorptionsspektren der ssDNA-Lösungen gemessen, um deren Konzentrationen zu bestimmen. Diese Methode führt jedoch oft zu fehlerbehafteten Ergebnissen, besonders

falls modifizierte Oligonukleotide vorliegen, deren Modifikation das UV-Absorptionspektrum beeinflusst. Dies ist z. B. beim EPTE-Tag der Fall, deshalb wurde in dieser Arbeit nachfolgende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Methode (HPLC, *high performance liquid chromatography*) zur Behebung dieses Problems entwickelt.

Mit Hilfe der Anionenaustauscher-HPLC können ds- und ssDNA-Gemische untersucht werden, da bei dieser Chromatographie unter nativen Bedingungen in wässrigen Lösungen bei neutralem pH-Wert gearbeitet wird. Die Trennung basiert dabei auf der unterschiedlichen Anzahl an Phosphatresten im Rückgrat, die mit dem positivgeladenen Säulenmaterial wechselwirken. Dabei kann nicht nur das Verhältnis von ssDNA zu dsDNA ermittelt werden, sondern auch die Art des im Überschuss vorliegenden Einzelstranges. Proben mit ausschließlich gepaarter DNA lassen sich so einfach herstellen.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Strukturbiologie

Mit der Strukturbiologie werden die Prozesse des Lebens auf der molekularen oder atomaren Ebene verständlich. Die Eigenschaften biologischer Makromoleküle wie Proteine, DNA und RNA und deren Wechselwirkungen bestimmen die auf der makroskopischen Ebene phänomenologisch zugänglichen biologischen Prozesse.

Die Erkenntnisse der Strukturbiologie sind für die biotechnologische und pharmazeutische Industrie wichtig. Im menschlichen Organismus ist eine Vielzahl von Proteinen und Nucleinsäuren vorhanden, die potenzielle Wirkungsorte für Medikamente darstellen. Durch die Kenntnis der Struktur dieser Moleküle können Bindungsstellen und Bindungspartner analysiert werden. Mit Hilfe dieser Informationen können Computersimulationen potentielle Bindungspartner aus Moleküldatenbanken identifizieren und anschließend in einem *screening* deren Bindungsaffinität untersuchen. Dadurch werden potentielle Medikamente aus Moleküldatenbanken herausgefiltert, deren Wirksamkeit dann überprüft werden kann. Vor allem

seit der Einführung der ersten kommerziellen Biopharmazeutika erlebt die Strukturbiologie ein noch stärkeres Wachstum (Abb. 2.1).

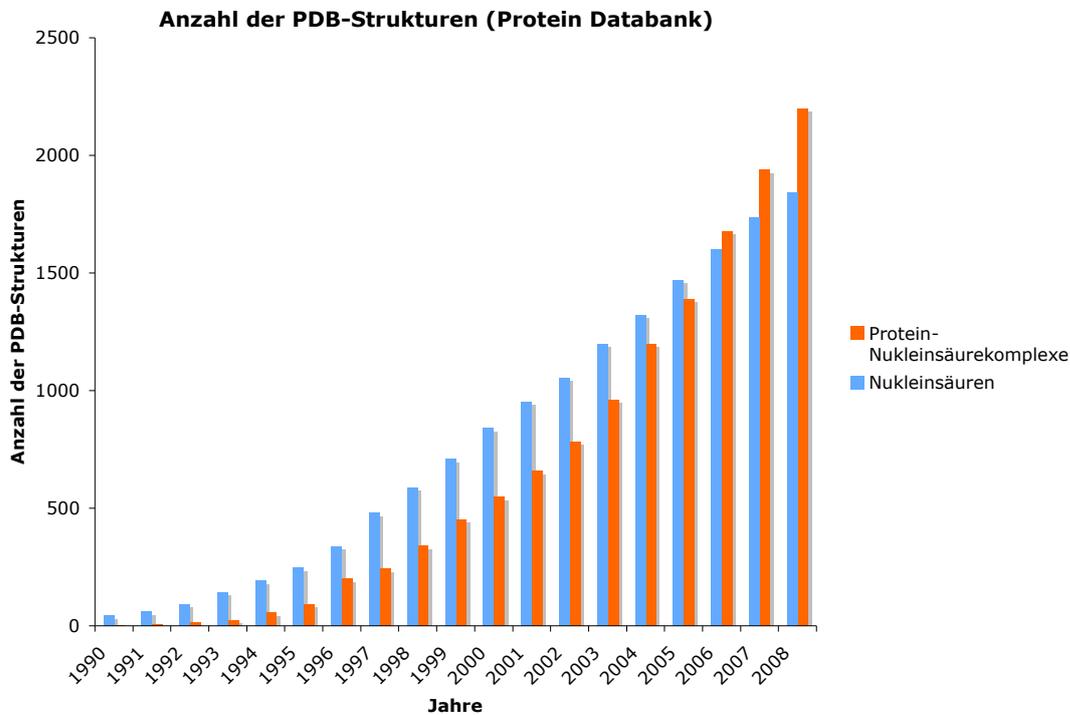


Abb. 2.1: Entwicklung der Nukleinsäurestrukturaufklärungen anhand der PDB-Daten.

Im letzten Jahrzehnt hat die Forschung auf dem Bereich der Nukleinsäuren stark zugenommen. Initialzündung war 1992 die Entdeckung, dass die Genexpression des LIN-14-Proteins durch kurze RNA-Stränge (20-25 Nukleotide lang) reguliert wird [26]. In den folgenden Jahren stellte sich heraus, dass diese kurzen RNA-Stränge, *short interfering RNA* (siRNA) oder *microRNA* (miRNA) genannt, die Expression vieler Gene (geschätzte 20-30%) regulieren [27,28]. Diese regulatorische Aktivität wurde von Tuschl *et al.* zum Knockdown spezieller Gene in Säugetierzellen genutzt [29]. Dabei wurde siRNA in die Zelle eingebracht, die gezielt die mRNA eines Proteins abbaut. Dadurch wurde das Gen nicht oder stark vermindert exprimiert und man konnte beobachten, welche biologischen Prozesse beeinflusst werden, also welche Funktion ein Gen hat.

2.2 Nukleinsäurestruktur

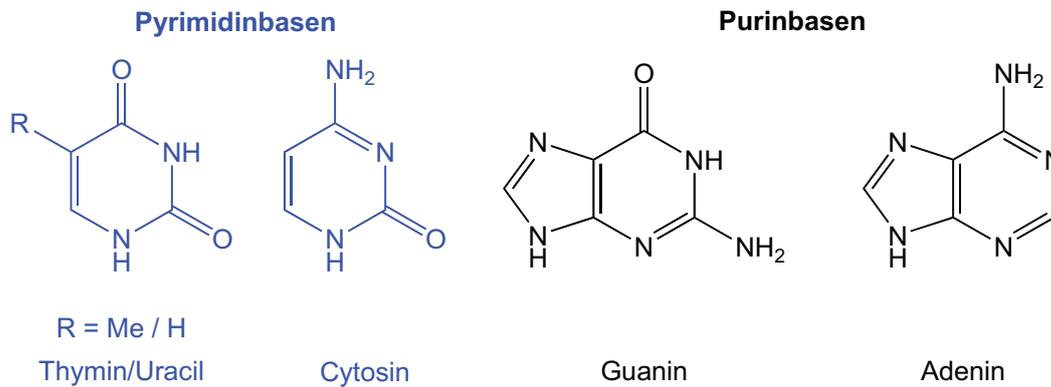


Abb. 2.2: Abbildung der Nukleobasen.

DNA und RNA bestehen aus den fünf Nukleosiden Adenosin, Guanosin, Cytidin und Thymin bzw. Uridin (Abb.2.2), die über Phosphatdiesterbindungen miteinander verknüpft sind. Jedes Nukleosid besteht aus einem Zuckerring, der am anomeren Zentrum glykosidisch mit einer Nukleobase verknüpft ist. RNA basiert auf dem Zucker Ribose, DNA auf 2'-Desoxyribose. In DNA nimmt die 2'-Desoxyribose mit C2'-endo meist eine andere Vorzugskonformation ein als die Ribose mit C3'-endo in RNA-Helices (Abb. 2.3).

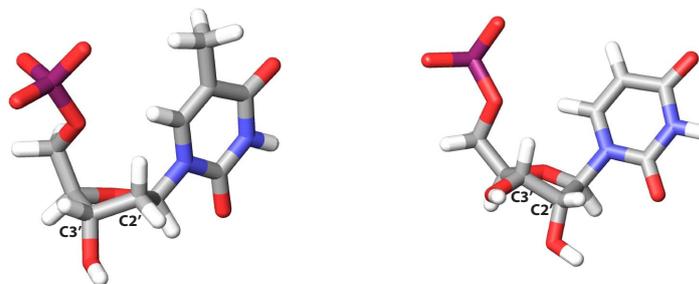


Abb. 2.3: Die beiden Zuckerkonformationen von DNA (links) und RNA (rechts).

Nukleinsäuren speichern die genetische Information eines Organismus, codiert in der Abfolge der einzelnen Nukleotidbausteine. Sie sind spiralförmig gewundene Ketten, die meist doppelsträngig vorliegen und über Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind [30]. Unter physiologischen Bedingungen liegt RNA in Form einer A-Helix, DNA in Form einer B-Helix vor (Abb. 2.4).

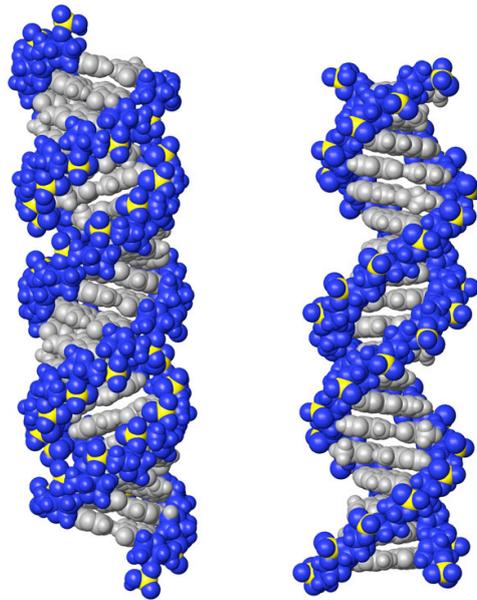


Abb. 2.4: Die verschiedenen Nukleinsäurehelices: A-Form (links), B-Form (rechts) [31].

2.3 Biologische Bedeutung von Nukleinsäuren

Neben der Funktion der genetischen Informationsspeicherung besitzen Nukleinsäuren noch weitere Funktionen, wie die Umwandlung dieser Informationen zu Proteinen. RNAs, die Enzymfunktionen besitzen, nennt man Ribozyme. 1989 bekamen Sidney Altman und Thomas R. Cech den Nobelpreis für Chemie für die Entdeckung des Enzympotentials der RNA, die heute zu dem Postulat der *RNA world* als Ursprung allen Lebens führte. Ein besonders bekanntes Ribozym ist die 23 S-RNA, die zuständig für die Knüpfung der Peptidbindung bei der Translation ist. Spliceosome katalysieren die Entfernung der Introns aus der pre-mRNA unter Erhalt der fertigen mRNA aus den Exonsequenzen. Auch als Energielieferanten und -speicher spielen Nukleinsäuren eine wichtige Rolle. Adenosintriphosphat (ATP) ist beispielsweise das Trinukleotid des Adenosins, das unter Energieabgabe zu Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt werden kann. Diese Energie wird vom Organismus für die verschiedensten zellulären Vorgänge genutzt, wie Transport durch Membranen und chemische Reaktionen. siRNAs sind Teil des RNA-Interferenz-Mechanismus (RNAi). Hierbei binden die siRNAs an ein Argonaute-Protein und an die komplementäre mRNA, die

dann durch das Protein abgebaut wird. Dies führt zur Regulation der Expression der in der mRNA kodierten Gene.

Die verschiedensten Funktionen der Nucleinsäuren beruhen dabei nicht nur auf der konstitutionellen Verknüpfung der jeweiligen unterschiedlichen Bausteine, sondern auch auf deren Anordnung im Raum (Konformation). So bilden sich Bindungsstellen, die sowohl spezifisch für bestimmte Molekülklassen als auch hochspezifisch für einzelne Moleküle sein können. DNA- und RNA-Moleküle besitzen per se meist eine helikale doppelsträngige Struktur, die aber durch kleine Unterschiede zu den verschiedenen Funktionen und Bindungsmotiven führt. Häufige Bindungsstellen sind die Furchen der Helices (Abb. 2.5), aber auch die Nucleobasen und Strukturelemente wie Schlaufen (*loops*) und Vorwölbungen (*bulges*) [33].

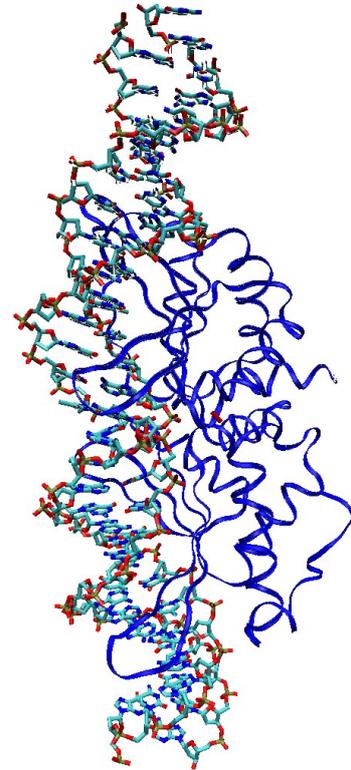


Abb. 2.5: Eine Endonuclease gebunden an die DNA-Zielsequenz [32].

2.4 TAR-RNA

Human immunodeficiency virus (HIV) ist ein Retrovirus, der die Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) auslöst (Abb. 2.6). Obwohl sich der Virus immer stärker verbreitet, ist seit seiner Entdeckung 1983 noch kein Heilmittel gefunden worden. Unter anderem besteht die Schwierigkeit der Medikamentenentwicklung darin, dass es verschiedene Formen von HI-Viren gibt, die relativ schnell mutieren. Retroviren speichern ihre Erbinformation in Form von RNA, die aufgrund der zusätzlichen 2'-Hydroxylgruppe schneller mutiert als DNA.

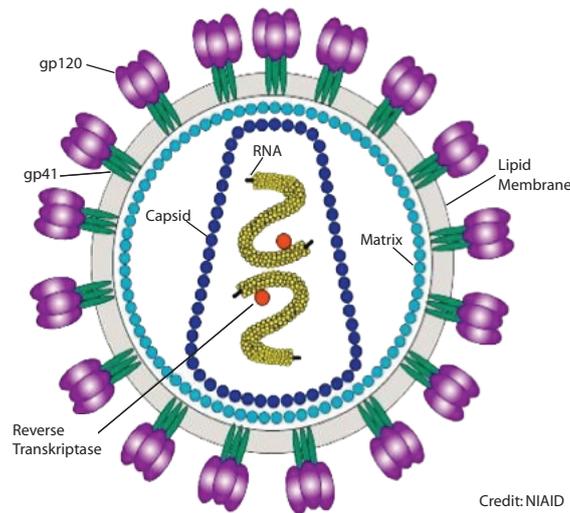


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des HI-Virus.

Das Genom der HI-Viren wird in verschiedene codierende Bereiche, die Gene, aufgeteilt. Das *tat*-Gen des HI-Virus codiert das 86 bis 101 aminosäurelange TAT-Protein (*transactivator of transcription*), das an die ursprüngliche Haarnadelstruktur (*hairpin*) der HIV-RNA bindet und in ssRNA entfaltet. Diese ssRNA wird wesentlich effizienter transkribiert. Durch die effizientere Transkription wird auch mehr TAT-Protein gebildet, das wiederum die Transkriptionsgeschwindigkeit noch weiter erhöht. Das TAT-Protein wird von infizierten Zellen abgegeben und im Blut von AIDS-Patienten gefunden. Es ist toxisch und führt deshalb zur Apoptose von noch uninfizierten T-Zellen.

Das TAT-Protein bindet zur Transkriptionsaktivierung an den *stem-loop* der TAR-RNA (TAR= *trans-activating response region*), bestehend aus 59 Nukleotiden beheimatet am 5'-Ende der HIV-Transkripte. Die *bulge*-Region des *stem-loops* ist wichtig für die TAT-Bindung und Transaktivierung, während die *loop*-Region nur für die Transaktivierung wichtig ist. NMR-Studien haben gezeigt, dass die zentrale Bindungsregion zwischen TAT und TAR aus dem *bulge* und den beiden benachbarten Basenpaaren besteht [34]. Durch Anbindung eines Arginins oder Argininanalogas wird eine Strukturänderung im *bulge* induziert [35,36]. In den meisten NMR-Studien verwendet man Konstrukte aus den vier funktionell wichtigen Domänen: *lower stem*, *bulge*, *upper stem*, *loop* (siehe Abb. 2.7).

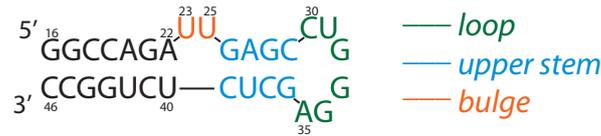


Abb. 2.7: Untersuchte TAR-Sequenz des HIV2.

Durch die Inhibition der TAT-TAR-Wechselwirkung lässt sich die Ausbreitung des Virus im Körper verlangsamen, weshalb verschiedene Inhibitoren auf ihre Medikamententauglichkeit überprüft werden, wie zum Beispiel TAT *peptid mimetics*, Argininaminoglykoside und RNA-Aptamere [37]. Beim Menschen wurden zwei verschiedene Typen von HI-Viren gefunden, Typ 1 und Typ 2, die auf Aminosäureebene nur knapp 50% Sequenzhomologie aufweisen. Die TAR-Sequenzen dieser beiden HIV-Typen unterscheiden sich nur geringfügig in der Bindungsregion [38]. Obwohl sich die Sequenzen des *bulges* durch die Substitution der zwei Nukleotide UU durch die drei Nukleotide UCU unterscheiden, binden beide in gleicher Weise an das TAT-Protein [36].

CyclinT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zusammen mit TAR und TAT einen Komplex bildet. Mutationsstudien haben dabei gezeigt, dass TAT an die *bulge*-Region von TAR bindet, während CycT1 an die *loop*-Region bindet. Designte Inhibitoren sollten also beide Wechselwirkungen gleichermaßen behindern und die gesamte Region von *bulge* bis *upper stem* blockieren, um die Transkription des Virus zu verhindern.

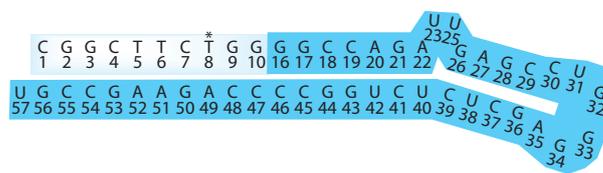


Abb. 2.8: Verlängerte TAR-Sequenz des HIV2.

dunkelblau: RNA, hellblau: DNA, Sternchen: getaggte Base

Obiger Ausschnitt der TAR-Sequenz des HIV-Typ 2 wurde in dieser Arbeit verwendet, um das Alignment von RNA durch paramagnetisch getaggte DNA zu überprüfen (Abb. 2.8).

Kapitel 3

NMR-Spektroskopie

3.1 Strukturaufklärungsmethoden

Die NMR-Spektroskopie stellt eine wichtige Strukturanalysemethode dar. Die zu untersuchenden Moleküle werden dazu in einem Lösungsmittel gelöst und einem starken externen, homogenen Magnetfeld ausgesetzt. Detektierbar sind dabei nur Atomkerne mit einem Kernspin ungleich null. ^1H -Wasserstoffatome haben einen Kernspin von $1/2$ und sind deshalb mit der NMR-Spektroskopie gut analysierbar, aber das häufigste Kohlenstoffisotop ^{12}C hat einen Kernspin von null und ist nicht detektierbar. In der Natur kommt das ^{13}C -Kohlenstoffisotop mit dem Kernspin $1/2$ nur zu 1,1% vor [39]. Die Sensitivität von Kohlenstoffspektren mit natürlicher Häufigkeit ist deshalb sehr gering. Um das zu umgehen verwendet man oft markierte Proben, d. h. Proben, die mit dem Kohlenstoffisotop ^{13}C angereichert sind.

Das Hauptstickstoffisotop ^{14}N ist mit einem Kernspin von 1 ein Quadrupolkern, der zwar detektierbar ist, aber sehr schnell relaxiert. Das zu 0,37% vorkommende Kernspin- $1/2$ - Isotop ^{15}N wird deshalb meist auf 95% angereichert um Stickstoffspektren aufzunehmen [39].

Neben der NMR-Spektroskopie spielt vor allem die Röntgenstrukturanalyse eine große Rolle innerhalb der Strukturbiologie. Hierbei wird ein kristallisiertes Molekül mit Hilfe von Röntgenbeugungsmustern analysiert, so dass eine dreidimensionale Elektronendichtekarte des Moleküls und damit seine Struktur errechnet werden kann. Je nach Kristallqualität bietet diese Methode eine Auflösung bis maximal 1 Å [40]. Strukturaufklärungen von größeren Systemen (>200 kDa) kann die moderne Elektronenmikroskopie leisten, aber die Auflösung beträgt meist maximal 4 Å [41].

Viele DNA- und RNA-Strukturen wurden durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Ihr Nachteil besteht darin, dass nur die starre Struktur in der Kristallform ermittelt werden kann, aber nicht die Struktur, die in der Lösung, also physiologisch, vorliegt. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie dagegen können Moleküle in Lösung und deren dynamische Eigenschaften untersucht werden [42].

3.2 2D-NMR-Spektroskopie

Die Entwicklung der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie in den 80er Jahren erlaubte die detaillierte Untersuchung von biomolekularen Systemen [43]. In eindimensionalen Spektren sind die Resonanzpeaks von Makromolekülen wie DNA oder Proteinen stark überlagert. Bei der 2D-NMR-Spektroskopie erfolgt die Auflösung in zwei Zeitdomänen, die durch Fourier-Transformation in die Frequenzdomänen überführt werden. Die eine Zeitdomäne, meist t_1 genannt, ist ein Zeitintervall zwischen zwei Pulsen, das inkrementiert wird. Das Signal der zweiten, direkten Zeitdomäne t_2 wird direkt am Ende der Pulssequenz detektiert. Ein Resonanzsignal in einem zweidimensionalen Spektrum besitzt also zwei Frequenzen ω_1 und ω_2 entsprechend t_1 und t_2 . Generell unterscheidet man zwischen homonuklearen und heteronuklearen NMR-Spektren, je nachdem ob sich in t_1 und t_2 dieselbe oder verschiedene Kernarten, beispielweise ^1H und ^{13}C , entwickeln [44].

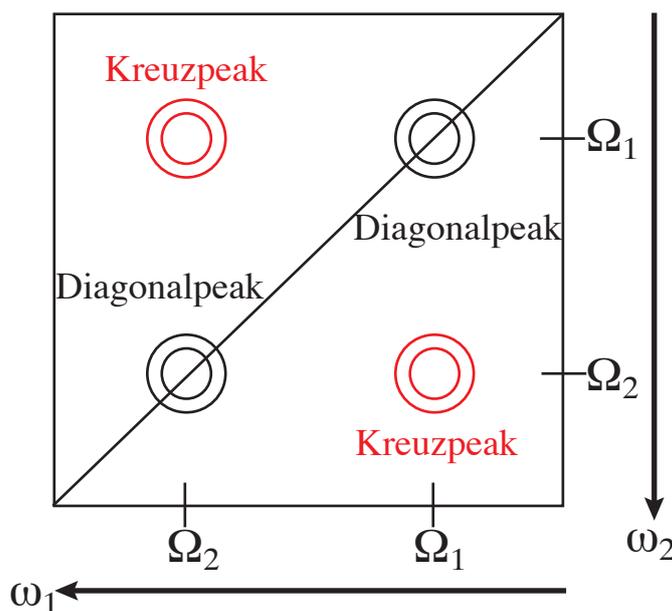


Abb. 3.1: Schematische Darstellung eines homonuklearen zweidimensionalen NMR-Spektrums.

Bei homonuklearen Experimenten ergibt sich schematisch folgendes Spektrum (Abb. 3.1), das aus Kreuz- und Diagonalpeaks besteht. Von einem Diagonalpeak spricht man immer dann, wenn das Signal in ω_1 und ω_2 die gleiche chemische Verschiebung Ω auftritt, also dem gleichen Atom zugeordnet ist. Kreuzpeaks haben in den beiden Frequenzdomänen eine unterschiedliche chemische Verschiebung. Sie korrelieren zwei Atome. Diese Korrelation beinhaltet je nach Pulssequenz Informationen über die Verknüpfung der Atome im Molekül oder deren räumliche Nähe zueinander. Eine Pulssequenz ist eine Abfolge radiofrequenter Einstrahlungen, die die Kernspins anregen.



Abb. 3.2: Schema zum Aufbau zweidimensionaler NMR-Pulsprogramme. Die roten Boxen symbolisieren verschiedene Abfolgen von Pulsen.

Eine Pulssequenz eines zweidimensionalen Spektrums ist wie folgt aufgebaut (Abb. 3.2). In einem ersten Schritt wird die longitudinale Boltzmannmagnetisierung in die gewünscht-

te transversale Magnetisierung transferiert (Präparation), die sich dann meist in Form der chemischen Verschiebung in t_1 entwickelt (Evolution). Anschließend wird diese codierte Magnetisierung auf einen anderen Kern übertragen, in die zu detektierende Form umgewandelt (Mischung) und in t_2 detektiert. Dabei ist anzumerken, dass auch während t_1 und t_2 Pulse beziehungsweise Pulssequenzen auftreten können, wie zum Beispiel die häufig verwendete Breitbandentkopplung in t_2 auf den nicht detektierten Kern.

3.3 Zur NMR-Strukturaufklärung von Oligonukleotiden

Um Strukturen eines Moleküls mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu bestimmen, werden zuerst eine Reihe verschiedener Spektren aufgenommen. Anschließend werden die detektierten Daten prozessiert: das beinhaltet in erster Linie eine Fourier-Transformation, aber auch die Minimierung von störenden Lösungsmittelsignalen und eine Basislinienkorrektur. Im folgenden Schritt werden die einzelnen Resonanzsignale den entsprechenden Kernen zugeordnet (*Assignment*). Aus NOESY-Spektren werden durch Integration der Kreuzsignale Abstandsinformationen gewonnen [45]. Zusätzlich können aus Kopplungskonstanten Bindungswinkel erhalten werden. Aus all diesen Bedingungen, im Folgenden *restraints* genannt, erstellt man eine Tabelle, die zur Strukturrechnung verwendet wird [46].



Abb. 3.3: Schema zum Ablauf einer NMR-Strukturaufklärung mit NOE-Daten.

3.4 Zuordnung der Resonanzen

Bei der Strukturbestimmung von DNA-Sequenzen spielt das NOESY-Spektrum eine essenzielle Rolle. NOESY-Spektren liefern Informationen über räumlich benachbarte Kerne mit einem Abstand von bis zu 6 Å [47–49]. Die Intensität des Integrals ist indirekt proportional zur sechsten Potenz des Protonenabstands. Um Distanzinformationen zu erhalten, müssen jedoch zuerst die verschiedenen Resonanzfrequenzen den entsprechenden Protonen der DNA zugeordnet werden. Zusätzlich zum NOESY-Spektrum werden COSY- und TOCSY-Spektren benötigt, um die Zuordnung zu vervollständigen. Im COSY-Spektrum werden Protonen korreliert, die eine skalare Kopplung über 1 bis 3 Bindungen miteinander aufweisen [50]. Idealerweise lassen sich alle Kerne eines Spinsystems aus TOCSY-Spektren extrahieren [51].

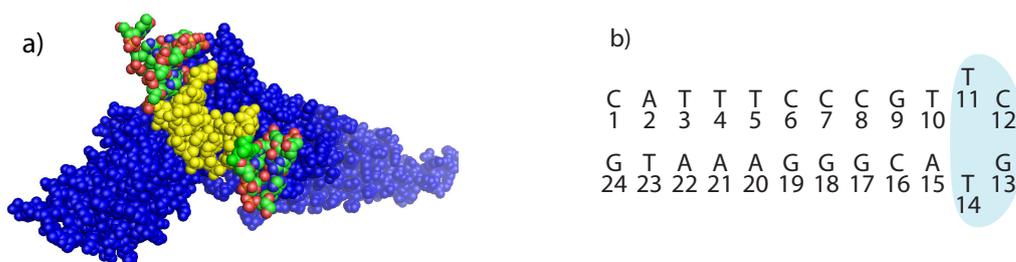
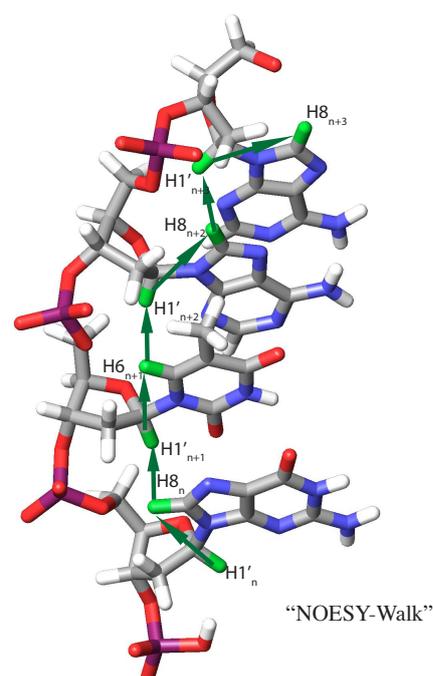


Abb. 3.4: a) STAT1 mit DNA-Doppelstrang, in gelb die untersuchte Sequenzregion.
b) DNA-Hairpin, der auf einer STAT bindenden Sequenz basiert. [20–22]

In Abb. 3.4 ist die Basenfolge des analysierten DNA-Hairpins dargestellt, der auf einer STAT-Proteinbindenden Sequenz basiert. Soweit als möglich erfolgte die Zuordnung der Basen durch einen sogenannten „NOESY-Walk“, d. h. die Kreuzpeaks zwischen den H1'-Resonanzen und den H6/H8-Resonanzfrequenzen der eigenen Base und der n+1 Base in 3'-Richtung werden identifiziert (Abb. 3.5) [52–55]. Von letzterer erfolgte die Zuordnung der H1'(n+1)-Resonanz. Bei stark überlagerten Bereichen wurde die Region der H2''/H2' und



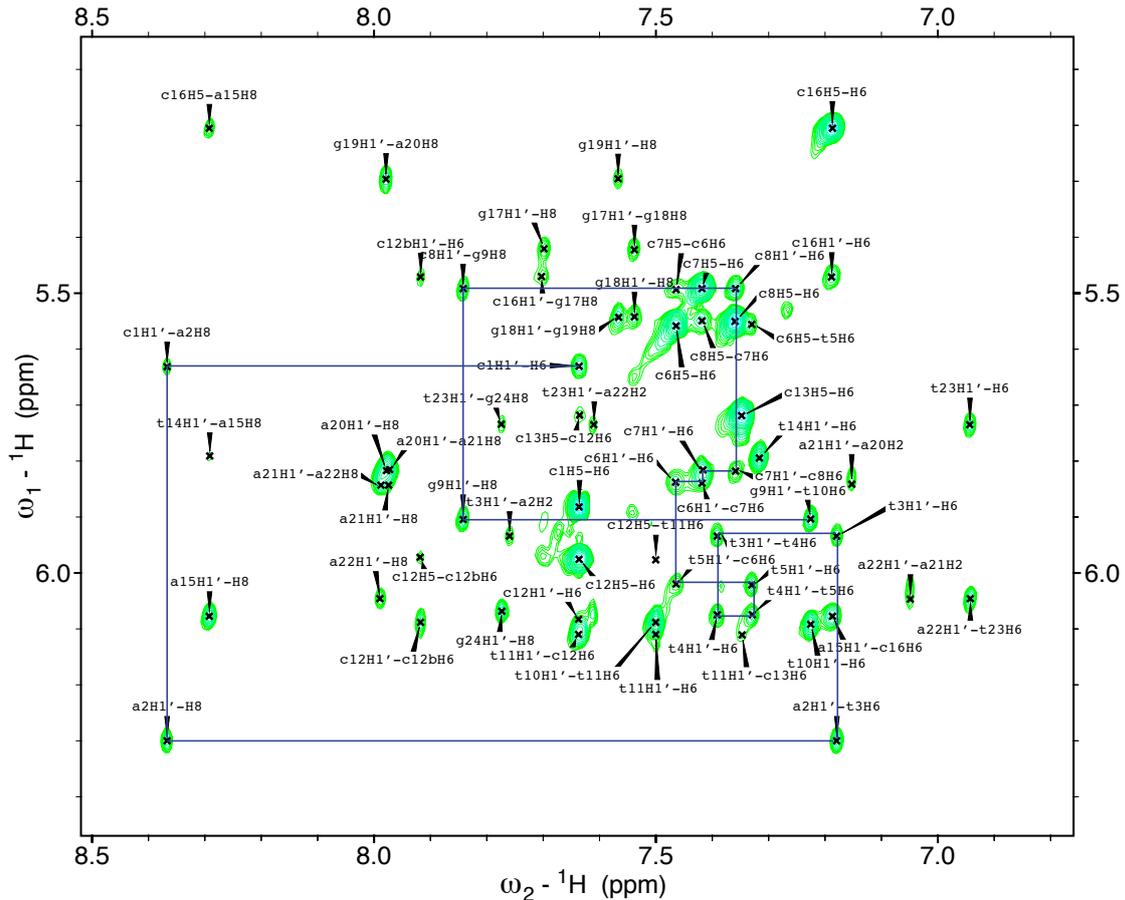


Abb. 3.5: „NOESY-Walk“ der ersten zehn Basen vom 5'- in Richtung 3'-Ende. NOESY-Spektrum mit einer Mischzeit von 250 ms bei 25 °C in D₂O mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7), 600 MHz.

H6/8 Kreuzpeaks hinzugenommen. Verifiziert wurde die Zuordnung soweit möglich durch Kreuzpeaks von H6/H8-Frequenzen aufeinander folgender Basen. Da diese Peaks jedoch nur eine sehr schwache Intensität aufweisen, wurde zudem die Region der Kreuzpeaks zwischen H2''/H2'- und H1'-Resonanzen analysiert.

Thymin und Cytosin, die Pyrimidinbasen, lassen sich leicht durch ergänzende Informationen des COSY- und TOCSY-Spektrums bestimmen. Thymin erkennt man an den Kreuzpeaks zwischen der Methylgruppe und dem H6 des Thymins. Obwohl diese Kreuzpeaks in den über skalare Kopplungen korrelierten Spektren sehr schwach sind, sind sie gut erkennbar, da in diesem Frequenzbereich von 1 bis 2 ppm keine anderen Signale auftreten. Dabei ist zu beachten, dass in den NOESY-Spektren auch Kreuzpeaks der Methylgruppen zu H6/H8 der

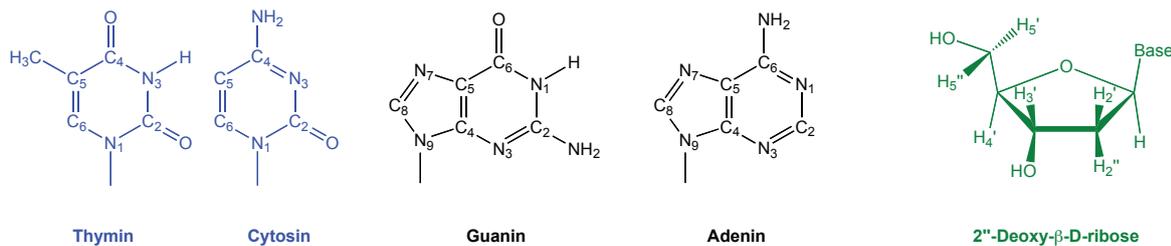


Abb. 3.6: Abbildung der Nucleobasen und der 2'Desoxyribose inklusive ihrer Nomenklatur [56].

benachbarten Base in 5'-Richtung existieren. Die Cytosine erkennt man im COSY-Spektrum an den starken Kreuzpeaks zwischen dem H5 und H6, während sie im NOESY-Spektrum in der Regel im gleichen Bereich wie die H1'-H6/H8-Signale liegen und dort nur schlecht extrahiert werden können.

Um zwischen internucleosiden und intranucleosiden Protonenkorrelationen zu unterscheiden, wurde zur Zuordnung der Zuckersignale innerhalb eines Nucleotids TOCSY- und COSY-Spektren zum Assignment hinzugezogen. Die Resonanzen von H4', H5' und H5'' konnten oft nicht eindeutig identifiziert werden, da dieser Frequenzbereich sehr stark überlagert war und somit nicht bestimmt werden konnte, ob die betreffende Frequenz einem H4', H5' oder einem H5'' Signal zuzuordnen war. 20 der 24 Zucker (nicht C8, A20-A22) konnten jedoch je drei Signale in diesem Bereich zugeordnet werden. Die Region der Adenoside A20 bis A22 war die am stärksten überlagerte Region. Unter anderem lagen die Resonanzen der H8-Protonen sehr nah beieinander. Eine Tabelle der chemischen Verschiebungen ist in Abb. 3.7 abgebildet.

Die NMR-Messungen der nicht austauschbaren Protonen erfolgte in deuteriertem Wasser, um aber die Signale der austauschbaren Imino- und Aminoprotonen aufnehmen zu können, erfolgte eine weitere Messung in nicht-deuteriertem Wasser (H₂O/D₂O: 9/1). Um das starke Wassersignal zu unterdrücken wurde eine watergate-Sequenz (*water suppression by gradient tailored excitation*) verwendet [57]. *Presaturation* als Wasserunterdrückung ist hier nicht geeignet, da mit Wasser austauschende Protonen ebenfalls unterdrückt werden. Sichtbar waren dabei alle Iminoprotonen im Stamm des Hairpins. Bei den Aminoprotonen waren nur die

	H1'	H2'	H2''	H3'
c1	5,63	1,91	2,38	4,64
a2	6,30	2,73	2,95	4,97
t3	5,93	2,03	2,55	4,78
t4	6,08	2,12	2,57	4,82
t5	6,02	2,10	2,52	4,82
c6	5,84	2,10	2,37	4,77
c7	5,82	2,05	2,35	4,76
c8	5,49	1,99	2,30	4,75
g9	5,90	2,55	2,64	4,89
t10	6,09	2,18	2,39	4,83
t11	6,11	2,08	2,35	4,75
c12	6,09	1,97	2,20	4,49
c13	5,74	1,80	2,30	4,54
t14	5,79	2,01	2,23	4,57
a15	6,08	2,67	2,78	4,89
c16	5,47	1,77	2,18	-
g17	5,42	2,51	2,61	4,87
g18	5,54	2,41	2,59	4,88
g19	5,30	2,42	2,55	4,88
a20	5,82	-	2,80	4,96
a21	5,84	2,53	2,80	4,96
a22	6,05	2,41	2,79	4,89
t23	5,74	1,76	2,25	4,75
g24	6,07	2,38	2,38	4,59

Abb. 3.7: Chemische Verschiebungen der 2'-Desoxyriboseprotonen in ppm. In blau unterlegt ist die Loopregion.

H41 und H42 Protonen der Cytosine sichtbar, allerdings mit Ausnahme des endständigen Cytosins C1. Dort befinden sich die Aminoprotonen wohl schon im schnellen Austausch mit dem Lösungsmittel, da die endständige Wasserstoffbrückenbindung nicht sehr stark ist. Das Vorliegen von Wasserstoffbrückenbindungen ist jedoch nicht nur an den sichtbaren Iminoprotonenresonanzen des NOESY erkennbar, sondern auch durch 1D-Spektren. Nicht über Wasserstoffbrücken gebundene Iminoprotonen können bei einer chemischen Verschiebung von etwa 10 ppm auftreten. Durch die Wasserstoffbrücke verschiebt sich die Resonanz ins Tieffeld auf bis zu 14 ppm [58]. Eine Tabelle der chemischen Verschiebungen der Basenprotonen ist in Abb. 3.8 abgebildet.

Die NOESY-Peaks wurden mit Hilfe der Software SPARKY integriert. Dabei wurden die zu integrierenden Signale mit einer Ellipse zur Deckungsgleichheit gebracht und über diese Fläche integriert. Es wurde zwischen drei verschiedenen Kategorien von NOE-Kreuzpeaks unterschieden: stark ($2.2 \text{ \AA} \pm 0.4 \text{ \AA}$), mittel ($2.6 \text{ \AA} \pm 0.8 \text{ \AA}$), schwach ($3.6 \text{ \AA} \pm 1.5 \text{ \AA}$).

	H6	H7*	H5	H41	H42	H3	H8	H2	H1
c1	7,64		5,89	Austausch	Austausch				
a2							8,37	7,77	
t3	7,18	1,35				13,64			
t4	7,39	1,51				13,91			
t5	7,33	1,55				13,68			
c6	7,47		5,56	6,68	8,22				
c7	7,42		5,49	6,58	8,34				
c8	7,36		5,55	6,74	8,49				
g9							7,84		12,8
t10	7,23	1,48				13,09			
t11	7,50	1,76				Austausch			
c12	7,64		5,97	Austausch	Austausch				
c13	7,35		5,72	Austausch	Austausch				
t14	7,32	1,65				Austausch			
a15							8,29	7,93	
c16	7,19		5,21	6,47	8,17				
g17							7,70		13,01
g18							7,54		12,92
g19							7,57		12,53
a20							7,98	7,16	
a21							7,97	7,06	
a22							7,99	7,62	
t23	6,94	1,25				13,66			
g24							7,77		13,53

Abb. 3.8: Chemische Verschiebungen der Basenprotonen in ppm. Die Loopregion ist blau unterlegt.

Die detaillierte NOE-Tabelle mit allen Abständen und Fehlergrenzen befindet sich im Anhang. Die NOE-Signale, die in Verbindung mit den Methylgruppen H7* der Thymidine stehen, wurden stets mit größeren Fehlergrenzen ($\pm 2 \text{ \AA}$) belegt und zudem das Integral auf ein Drittel skaliert. Einen weiteren Sonderfall stellen die Kreuzpeaks aus dem Imino- und Aminospektrum dar. Auch sie wurden mit einem größeren Fehler belegt, der auf der stärkeren Signalverbreiterung basiert. Des Weiteren wurden im Bereich von A20 bis A22 die Peaks des „NOE-Walks“ manuell hinzugefügt, da die Kreuzpeaks zwar sichtbar waren, aber aufgrund der starken Überlagerung nicht einzeln integriert werden konnten. Auf der folgenden Abbildung 3.9 sind die verwendeten internukleotidischen NOE-Kreuzpeaks schematisch dargestellt.

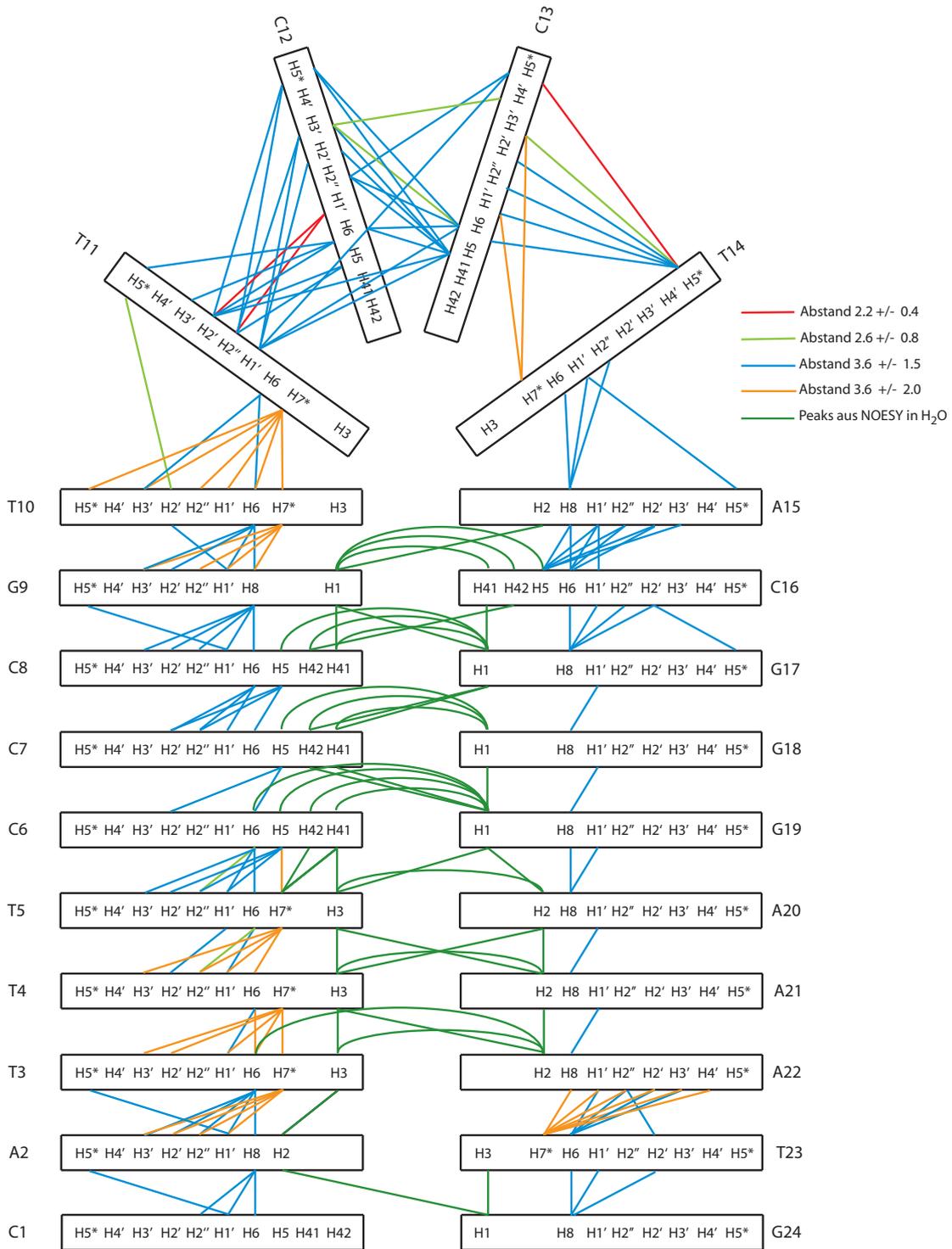


Abb. 3.9: Abbildung der Internucleotid-NOE-Restraints.

3.5 Strukturrechnung unter Berücksichtigung von Abstandsinformationen

Aus den Abstandsinformationen der NOESY-Spektren wurde mit Hilfe des Programms CNS (*Crystallography & NMR System*) der Yale Universität die DNA-Struktur berechnet [18,19]. Die *restraints* fungieren dabei als Energiebarrieren. Zudem verwendet das Programm ein Kraftfeld, eine analytische Funktion, die theoretische Energiebarrieren simuliert. In dieser Arbeit wurde ein Standard-Charmm-Kraftfeld für Nukleinsäuren verwendet, wie es in CNS implementiert ist [18,19]. Zusätzlich zu den NOE-Daten wurde eine Tabelle mit Wasserstoffbrückenbindungs*restraints* in die Rechnung mit einbezogen. Sie generiert Abstände zwischen Stickstoff- und Sauerstoffatomen, die dem Standardwasserstoffbrückenbindungsabstand entsprechen. Diese *restraints* wurden allerdings nur bei den Basen verwendet, bei denen Imino- und Amino-Resonanzen im WatergateNOESY gefunden wurden. Außerdem wurden sogenannte *planarity restraints* hinzugefügt, die das *pi stacking* der Basen simulieren. In dem Programmpaket CNS kann man all diesen *restraints* verschiedene Gewichtungen geben. Dabei sollten die Abstandsinformationen natürlich das höchste Gewicht haben, die Wasserstoffbrückenbindungen eine ebenfalls recht hohe Wichtung, während die Planaritätsbedingungen eine untergeordnete Rolle spielen.

Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur eines Biomoleküls erfolgte dabei in mehreren Schritten. Im ersten Schritt wurde eine Ausgangsstruktur generiert und die benötigten Topologie- und Parameterdateien ausgewählt. Diese enthalten Informationen über die Art und Verknüpfung der Atome, die Bindungsstärken, Bindungswinkel, stereochemische Konfiguration und deren Gewichtung über Kraftkonstanten. Für die in dieser Arbeit verwendete Hairpin-DNA wurde als Startstruktur der korrespondierende lineare Einzelstrang verwendet. Diese Startstruktur wurde in einem zweiten Schritt unter Berücksichtigung der oben erwähnten *restraints* dem Kraftfeld unterworfen. In dem hier verwendeten Skript „Anneal.inp“ wurde der Strang zunächst sehr hoch erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Daraus erhielt man eine Auswahl an Rohstrukturen, deren energetisch günstigsten dann verglichen wurden.

Eine Überlagerung der fünf energetisch günstigsten Strukturen ist in Abb. 3.10 dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur fünf Strukturen anstatt der gängigen zehn Strukturen abgebildet.

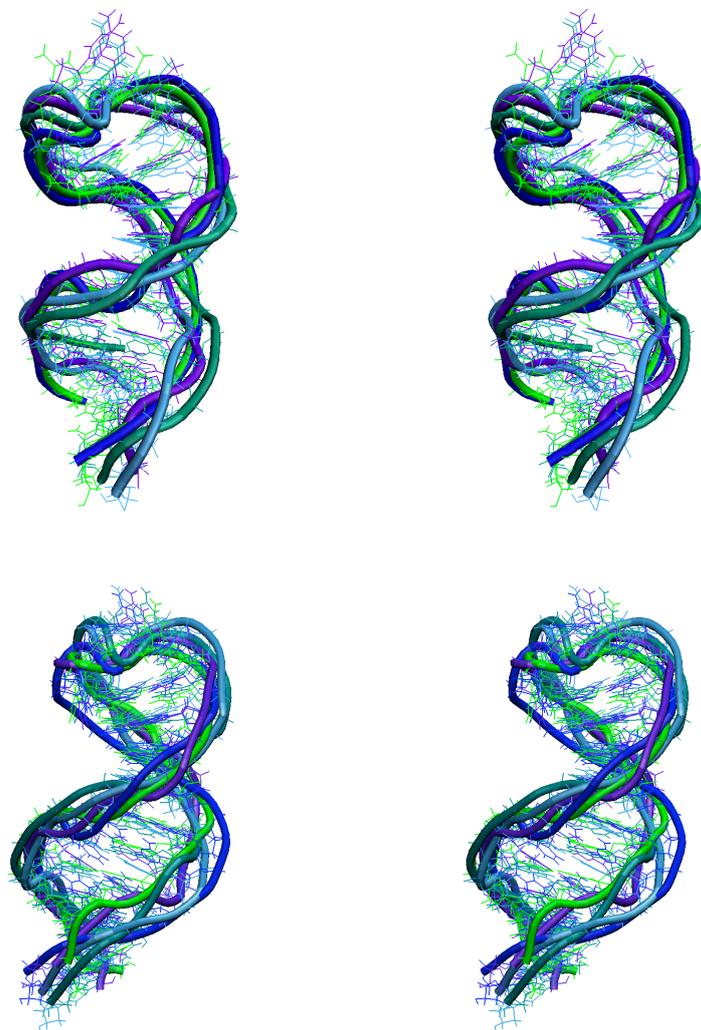


Abb. 3.10: Die fünf energieniedrigsten Strukturen (Stereobilder) nach der ersten (oben, RMSD: 2.31 Å) und der zweiten (unten, RMSD: 1.87 Å) Rechnung

Ausgehend von der Struktur mit der geringsten Energie wurde dann eine weitere Annealing-Berechnung vorgenommen und man erhält eines neues Strukturenensemble (Abb. 3.10).

Dies wurde einer letzten Rechnung unterworfen, bei der die Temperaturschritte wesentlich feiner gewählt sind als in den vorigen Schritten. Daraus erhält man fünf Endstrukturen (Abb. 3.11)



Abb. 3.11: Die fünf energieniedrigsten Strukturen, wie sie aus den verfeinerten Moleküldynamikrechnungen mit CNS erhalten wurden (RMSD: 0.97 Å).

Die verwendeten Tabellen und Protokolle finden sich im Anhang.

3.6 NMR-Spektroskopie an partiell ausgerichteten Molekülen

Herkömmliche NMR-Methoden korrelieren nur nah benachbarte Kerne, was zu relativ großen Unsicherheiten in der Gesamtstruktur führt. Besonders bei Systemen mit einer geringen Spindichte, wie Nukleinsäuren, addieren sich die Unsicherheiten im Abstand und Winkel zweier aufeinander folgender Nukleobasen zu fehlerhaften Gesamthelixkrümmungen auf. Dieser Effekt ist bei Proteinen oft weniger eklatant, da die Krümmung der α -Helices durch Abstandsinformationen zu rückgefalteten α -Helices oder β -Faltblättern verfeinert werden können. Eine Ausnahme stellen α -helical bundle Struktur motive dar, bei denen die Gesamtkrümmung ebenfalls nur sehr ungenau aus Abstandsinformationen gewonnen werden kann.

Neuere NMR-Techniken erlauben es, relative Richtungsinformationen zwischen weiter entfernten Kernen zu erhalten, was die Strukturbestimmung der Biomoleküle verfeinert. Hierbei muss die isotrope Rotation der Biomoleküle eingeschränkt werden, wodurch diese eine Vorzugsausrichtung zum Magnetfeld erreichen. Durch diese Vorzugsausrichtung werden dipolare Kopplungen initiiert, die Informationen über die geometrische Anordnung der betrachteten koppelnden Atomkerne im Raum beinhalten. Eine Vorzugsausrichtung des Biomoleküls im Magnetfeld kann durch Orientierungsmedien [17, 59–61] wie Phagen und gestreckte Polyacrylamidgele aber auch durch paramagnetische Zentren erreicht werden [17, 62, 63]. Bei letzteren werden beispielsweise die Bindungsstellen von Metalloproteinen mit Lanthanoid(III)ionen beladen. Lanthanoide besitzen besonders günstige magnetische Eigenschaften für die NMR-Spektroskopie, eine relativ hohe magnetische Anisotropie gepaart mit einer relativ geringen Relaxationsbeschleunigung im Vergleich zu den Übergangsmetallionen. Viele Biomoleküle besitzen aber keine starke oder spezifische Bindungsstelle für Metallionen, deshalb werden sie mit metallchelatisierenden Liganden modifiziert, z. B. über Cysteindisulfidbrückenbindungen. Diese Art der Modifizierung bezeichnet man in der NMR-Spektroskopie als Tagging [14].

3.7 Paramagnetische NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren paramagnetischer Proben weisen einige Unterschiede gegenüber diamagnetischen Spektren auf. Da das Elektronenspinmoment 658 mal stärker als das Kernspinmoment eines Protons ist, haben ungepaarte Elektronen einen sehr großen Einfluss auf die magnetischen Eigenschaften einer Probe. Bei gepaarten Elektronen hebt sich das Elektronenspinmoment genau auf, aber der Spin ungepaarter Elektronen (S ungleich 0) induziert ein zusätzliches Magnetfeld, das das Aussehen des NMR-Spektrums stark verändert (Abb. 3.12). Viele Übergangsmetallionen, aber auch Lanthanoidionen besitzen ungepaarte Elektronen, sowie radikalische Verbindungen [64].

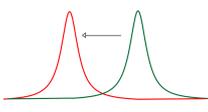
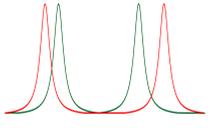
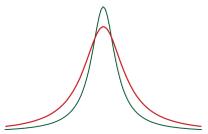
Effekt	Auswirkung	Anteile	Ursache
Paramagnetische Verschiebung		Kontaktverschiebung	Veränderte Elektronendichte am Ort des Kerns
		Pseudokontaktverschiebung „PCS“	Dipolare Wechselwirkung von Kern und Elektron
Dipolare Kopplung „rdc“		Dipolare Kopplung	Dipolare Wechselwirkung zweier Kerne bei anisotroper Orientierungsverteilung des Moleküls aufgrund der Wechselwirkung des Magnetfelds mit einem anisotropen Tensor der magnetischen Suszeptibilität
Paramagnetische Relaxation „PRE“		Dipolare Relaxation	Dipolare Wechselwirkung zwischen dem Kernspin und dem zeitlich gemittelten magnetischen Moment des Elektrons
		Curie-Relaxation	Wechselwirkung des magnetischen Moments des Elektrons und des Kernspins bei Rotation des Moleküls im Magnetfeld
		Kontaktrelaxation	Wechselwirkung des Kerns und des Elektrons über den Kontaktterm der Molekülorbitale

Abb. 3.12: Überblick über die paramagnetischen Effekte und ihre Ursachen. Die diamagnetischen Spektren sind grün, die paramagnetischen Spektren sind rot dargestellt.

Einige dieser Effekte sind bei der Untersuchung von lanthanoidhaltigen Proben von untergeordneter Bedeutung. Ursache dafür sind die teilgefüllten f-Orbitale der Lanthanoide, die sich von d-Orbitalen der Übergangsmetalle und auch den teilgefüllten Orbitalen der organischen Radikale unterscheiden. Lanthanoid(III)ionen besitzen folgende Elektronenkonfiguration: $[\text{Xe}]4f^{1-14}6s^0$. Dabei fällt auf, dass die ungepaarten Elektronen in der drittäußersten 4f-Schale liegen. Dies führt dazu, dass die f-Elektronen zu weit im Atominneren lokalisiert sind, als dass sie Bindungen zu den Ligandorbitalen aufweisen. Damit ist auch ihre Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Ort der nah benachbarten Kerne gering und sowohl die Kontaktverschiebung als auch die Kontaktrelaxation für Lanthanoide vernachlässigbar klein [65]. Daneben ist der Tensor der magnetischen Suszeptibilität für einige Lanthanoidionen sehr anisotrop, was im Vergleich zu Übergangsmetallionen zu einer stärkeren Ausrichtung im Magnetfeld und damit größeren dipolaren Effekten führt (Abb. 3.13) [66].

Im Folgenden wird näher auf einzelne wichtige Effekte eingegangen.

	f1	f2	f3	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12	f13
	Cerium	Praseodymium	Neodymium	Samarium	Europium	Gadolinium	Terbium	Dysprosium	Holmium	Erbium	Thulium	Ytterbium
J	Ce 5/2	Pr 4	Nd 9/2	Sm 5/2	Eu 0	Gd 7/2	Tb 6	Dy 15/2	Ho 8	Er 15/2	Tm 6	Yb 7/2
$\chi / 10^{-32} \text{m}^3$	5.6	11.2	11.4	0.6	-6	55.1	82.7	99.2	98.5	80.3	50.0	18.0
PRE												
$\Delta\chi_{ax} / 10^{-32} \text{m}^3$	2.1	3.4	1.7	0.2	-2.3	0	42.1	34.7	18.5	-11.6	-21.9	-8.3
$\Delta\chi_{rh} / 10^{-32} \text{m}^3$	0.7	2.1	0.4	-0.1	-1.6	0	11.2	20.3	5.8	-8.6	-20.1	-5.8
PCS												
τ_e / s		10^{-13}				10^{-7}		10^{-13}				

Abb. 3.13: Übersicht der NMR-Eigenschaften der Lanthanoide, J Spinquantenzahl, PRE: Die gelben Kugeln geben die Distanz zwischen Metallzentrum und Proton an, bei der das Signal bei 18.8 T und einer Korrelationszeit von 15 ns um 80 Hz verbreitert ist, $\Delta\chi_{ax}$ und $\Delta\chi_{rh}$: Axialer und rhombischer Anteil der magnetischen Anisotropie, PCS: Isoflächen mit einem PCS von ± 5 ppm, τ_e Elektronenrelaxationszeit [66].

3.8 Pseudokontaktverschiebung

3.8.1 Herleitung

Durch die Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität kommt es zu einer Veränderung der chemischen Verschiebung der benachbarten Kerne, da sich deren lokales, effektives Magnetfeld durch das magnetische Moment des paramagnetischen Zentrums verändert.

Die Herleitung der folgenden Formel lehnt sich soweit nicht anders angegeben an Bleaney *et al.* [67] und Bertini *et al.* [68] an. Betrachten wir nun einen Suszeptibilitätstensor χ mit den Hauptachsen x, y, z zentriert im Ursprung des Koordinatensystems. $\chi_{xx}, \chi_{yy}, \chi_{zz}$ sind die Komponenten der Suszeptibilität entlang der Achsen des Koordinatensystems in einer Probe mit N paramagnetischen Zentren. Die Richtung des äußeren Magnetfelds \vec{H}_0 in diesem

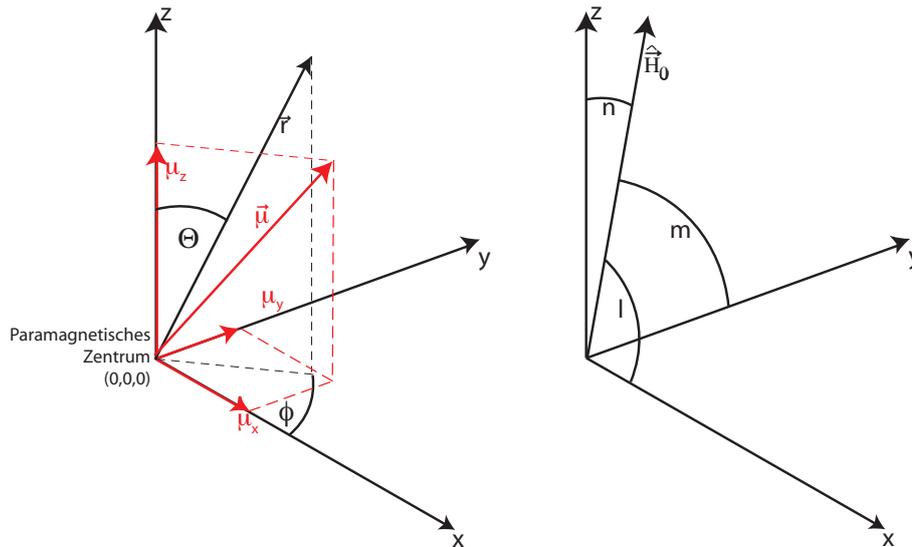


Abb. 3.14: Abbildung des Koordinatensystems des Anisotropietensor mit dem Vektor \vec{r} zwischen Kern und paramagnetischen Zentrum und dem magnetischen Moment $\vec{\mu}$

Koordinatensystem wird durch die Richtungskosinus l, m, n (\widehat{H}_0 ist der Einheitsvektor von \vec{H}_0 und $H_0 = |\vec{H}_0|$) beschrieben (Abb. 3.14). Das magnetische Moment ist dabei:

$$\vec{\mu}^T = (\mu_x, \mu_y, \mu_z) \quad (3.1)$$

Das magnetische Dipolfeld eines Elektronenspins im Raum lässt sich folgendermaßen beschreiben:

$$\Delta\vec{H} = \vec{H} - \vec{H}_0 = \begin{pmatrix} \Delta H_x \\ \Delta H_y \\ \Delta H_z \end{pmatrix} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left[\frac{3(\vec{r} \cdot \vec{\mu})\vec{r}}{r^5} - \frac{\vec{\mu}}{r^3} \right]. \quad (3.2)$$

Dabei ist \vec{r} der Vektor zwischen dem paramagnetischen Zentrum und dem Ort x, y, z . \vec{H} ist das effektive Magnetfeld an dem Ort. μ_0 ist die magnetische Feldkonstante. Die Veränderung des Magnetfeldes $\Delta\vec{H}$ lässt sich dabei auch beschreiben als:

$$\Delta\vec{H} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left[\frac{3\vec{r} \otimes \vec{r}\vec{\mu}}{r^5} - \frac{\vec{\mu}\mathbf{I}}{r^3} \right] \quad (3.3)$$

$$(3.4)$$

$$= \frac{\mu_0}{4\pi} \begin{pmatrix} (3x^2 - r^2) & (3xy) & (3xz) \\ (3xy) & (3y^2 - r^2) & (3yz) \\ (3xz) & (3yz) & (3z^2 - r^2) \end{pmatrix} \vec{\mu} \quad (3.5)$$

mit $\vec{r}^\top = (x, y, z)$. Im Koordinatensystem des Suszeptibilitätstensors ($\mu_0 \parallel \vec{H}_0$) gilt dabei :

$$\chi = \begin{pmatrix} \chi_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \chi_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \chi_{zz} \end{pmatrix} = \frac{N}{H_0} \begin{pmatrix} \mu_x & 0 & 0 \\ 0 & \mu_y & 0 \\ 0 & 0 & \mu_z \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

und damit

$$\Delta\mathbf{H} = \frac{\mu_0 H_0}{4\pi N} \begin{pmatrix} \chi_{xx}(3x^2 - r^2) & \chi_{yy}(3xy) & \chi_{zz}(3xz) \\ \chi_{xx}(3xy) & \chi_{yy}(3y^2 - r^2) & \chi_{zz}(3yz) \\ \chi_{xx}(3xz) & \chi_{yy}(3yz) & \chi_{zz}(3z^2 - r^2) \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

Da $H_0 \gg \Delta\mathbf{H}$, gibt nur der Anteil von $\Delta\mathbf{H}$ parallel zu H_0 den Ausschlag für die Pseudokontaktverschiebung:

$$\begin{aligned} \Delta H_{\parallel \vec{H}_0} &= \widehat{\vec{H}_0}^\top \cdot \Delta\mathbf{H} \cdot \widehat{\vec{H}_0} = l^2 \Delta H_{xx} + m^2 \Delta H_{yy} + n^2 \Delta H_{zz} \\ &= \frac{\mu_0 H_0}{4\pi 3Nr^3} \left[\chi_{xx}(3\frac{x^2}{r^2} - 1) + \chi_{yy}(3\frac{y^2}{r^2} - 1) + \chi_{zz}(3\frac{z^2}{r^2} - 1) \right]. \end{aligned} \quad (3.8)$$

Dabei gilt $\langle l^2 \rangle = \langle m^2 \rangle = \langle n^2 \rangle = 1/3$ und $\langle lm \rangle, \langle mn \rangle, \langle nl \rangle = 0$, angenommen wird, dass sich H_0 isotrop im Molekülkoordinatensystem bewegt. Diese Annahme ist eine Näherung. Die Erweiterung der Gleichung um einen anisotropen Term führt aber nur zu geringfügig unterschiedlichen Ergebnissen [69]. Die Pseudokontaktverschiebung ergibt sich somit zu:

$$\begin{aligned} \delta_{pc} = \frac{\Delta\nu}{\nu_0} &= \frac{\Delta H_{\parallel \vec{H}_0}}{H_0} = \frac{\mu_0}{4\pi N r^3} \left[\chi_{xx} \left(\frac{x^2}{r^2} - \frac{1}{3} \right) + \chi_{yy} \left(\frac{y^2}{r^2} - \frac{1}{3} \right) + \chi_{zz} \left(\frac{z^2}{r^2} - \frac{1}{3} \right) \right] \\ &= \frac{\mu_0}{4\pi 2Nr^3} \left[(\chi_{zz} - \bar{\chi})(3 \cos^2 \theta - 1) + (\chi_{xx} - \chi_{yy}) \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] \end{aligned} \quad (3.9)$$

mit $\bar{\chi} = 1/3(\chi_{xx} + \chi_{yy} + \chi_{zz})$, $x/r = \sin \theta \cos \phi$, $y/r = \sin \theta \sin \phi$, $z/r = \cos \theta$ und $\cos 2\phi = \cos^2 \phi - \sin^2 \phi$.

Die Suszeptibilität ist in erster Ordnung abhängig von der Spinquantenzahl S , vom g -Tensor, der die Anisotropie beschreibt, und ist indirekt proportional zur Temperatur T . Somit ist die Suszeptibilität gegeben durch:

$$\chi = \frac{N \mathbf{g}^2 \mu_B^2 S(S+1)}{3kT}. \quad (3.10)$$

Die Naturkonstanten dabei sind die Boltzmannkonstante k und das Bohrsche Magneton μ_B . Analog zur obigen Formel lassen sich die Suszeptibilität als Funktion der Spinquantenzahl darstellen. Damit ergibt sich für den Pseudokontaktshift folgende Abhängigkeit:

$$\delta_{pc} = \left[\frac{\mu_0 \mu_B^2 S(S+1)}{4\pi 6kT r^3} \right] [(g_{zz}^2 - \bar{g}^2)(3 \cos^2 \Theta - 1) + (g_{xx}^2 - g_{yy}^2)(\sin^2 \Theta \cos 2\phi)]. \quad (3.11)$$

Paramagnetische Zentren mit einer Spinquantenzahl $S > \frac{1}{2}$ weisen eine Entartung des Grundzustandes auf. Auch in Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes können diese Zustände aufspalten. Der Hamiltonoperator muss in solchen Fällen um den Term der Nullfeldaufspaltung D erweitert werden:

$$\hat{H} = \mu_B (g_{xx} H_x S_x + g_{yy} H_y S_y + g_{zz} H_z S_z + D_{xx} S_x^2 + D_{yy} S_y^2 + D_{zz} S_z^2). \quad (3.12)$$

Die Zeeman-Wechselwirkung wird durch den ersten Term beschrieben, dabei ist g der Tensor des Landé-Faktors. Der Tensor D beschreibt die Nullfeldaufspaltung.

Lanthanoide, als schwere Atome, besitzen eine starke Spin-Bahn-Kopplung (\sim Kernladungszahl⁴), also setzt sich ihr Gesamtdrehimpuls J nicht linear aus Spinquantenzahl S und Gesamtbahndrehimpuls L zusammen ($J \neq L + gS$). Lanthanoide besitzen einen Gesamtdrehimpuls $J > \frac{1}{2}$ (erfüllt für alle Lanthanoidionen außer Eu^{3+}), und somit eine Nullfeldaufspaltung. Da diese bei den Lanthanoiden wesentlich größer ist als ihre Ligandenfeldaufspaltung, überwiegt der Einfluss des Nullfeldterms, so dass man annäherungsweise folgenden Hamiltonoperator verwenden kann [65].

$$\hat{H} = \mu_B (D_{xx} J_x^2 + D_{yy} J_y^2 + D_{zz} J_z^2). \quad (3.13)$$

Dadurch ergibt sich eine Suszeptibilität χ_z^D als Funktion des Gesamtdrehimpulses J :

$$\chi^D = - \left[\frac{N g_j^2 \mu_B^2}{30(kT)^2} \right] DJ(J+1)(2J-1)(2J+3), \quad (3.14)$$

mit

$$g_j = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)}. \quad (3.15)$$

Neuere Untersuchungen [70] zeigten, dass bei Raumtemperatur auch Terme höherer Ordnung eine Rolle spielen, die an dieser Stelle nicht genauer behandelt werden.

Zudem untersuchten Mironov *et al.* [71, 72] den Einfluss des Koordinationspolyeders auf die Größe der magnetischen Anisotropie. Dabei ist zu beachten, dass die Geometrie der Komplexe im Kristall sowohl vom Lanthanoidion abhängt als auch von den Gegenionen [73]. Hervorzuheben ist der neunfach koordinierte kubische Fall, der unverzerrt zu einer Auslöschung der Anisotropie führt. Schon geringe Verzerrungen führen aber aufgrund der Symmetrieänderung zu erheblichen Anisotropien. Die Anisotropie der schweren Lanthanoide ist stets größer als die der leichten Lanthanoide. Die Anisotropie innerhalb der Seltenerdmetalle zeigt bei selber Geometrie meist etwa denselben Verlauf, der in Abbildung 3.15 gezeigt wird [74]. Lanthanoidkomplexe besitzen in der Regel eine große Nullfeldfeldaufspaltung mit $D > 100 \text{ cm}^{-1}$.

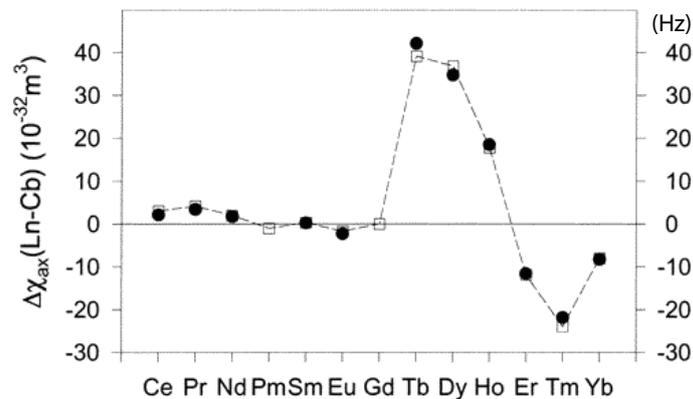


Abb. 3.15: Experimentelle und berechnete Werte der axialen Suszeptibilitätsanisotropie für eine Ligandenfeldaufspaltung von 169 cm^{-1} . Die rechte Skala repräsentiert die daraus resultierenden dipolaren Kopplungen bei 800 MHz und 298 K [74].

Die Formel für die Pseudokontaktverschiebung von Lanthanoiden ergibt sich demzufolge zu:

$$\delta_{pc} = -\frac{\mu_0 g_j^2 \mu_B^2 J(J+1)(2J-1)(2J+3)}{4\pi 60(kT)^2 r^3} [(D_{zz}-D)(3 \cos^2 \Theta - 1) + (D_{xx}-D_{yy})(\sin^2 \Theta \cos 2\phi)]. \quad (3.16)$$

Dabei wurde der Gesamtspin S durch den Gesamtdrehimpuls J ersetzt, da für schwere Atome die Spin-Bahn-Kopplung zwischen Gesamtbahndrehimpuls L und Gesamtspin S stark ist, d. h. größer als kT .

3.8.2 Praktische Auslegung der Formel

$$\delta_{pc} = -\frac{\mu_0 g_j^2 \mu_B^2 J(J+1)(2J-1)(2J+3)}{4\pi 60(kT)^2 r^3} [(D_{zz}-D)(3 \cos^2 \Theta - 1) + (D_{xx}-D_{yy})(\sin^2 \Theta \cos 2\phi)]. \quad (3.17)$$

Die Anisotropie der Suszeptibilität ist temperaturabhängig, da aufgespaltene Energieniveaus bei höherer Temperatur nach Boltzmann gleichmäßiger besetzt sind und die Anisotropie somit abnimmt [75]. Der Pseudokontaktshift der Lanthanoide ist damit proportional zu T^{-2} , nimmt also mit sinkender Temperatur zu, während der Effekt mit r^{-3} zum Abstand des paramagnetischen Zentrums abnimmt.

Eine besondere Rolle nimmt Eu^{3+} ein, das den Gesamtdrehimpuls $J = \frac{1}{2}$ als Grundzustand besitzt, aber dennoch bei Raumtemperatur eine Nullfeldaufspaltung zeigt. Ursache dafür ist der energetisch geringe Unterschied des Grundzustand zu den ersten beiden angeregten Zuständen (J gleich 1 bzw. 2), die somit teilweise besetzt sind und die Nullfeldaufspaltung verursachen [76].

3.9 Residuale dipolare Kopplungen

Der Hamiltonian der Kopplungen von Kernspins im externen Magnetfeld \hat{H}_{Kop} setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, der skalaren Kopplung \hat{H}_{sca} und der dipolaren Kopplung \hat{H}_{dip} .

$$\hat{H}_{Kop} = \hat{H}_{sca} + \hat{H}_{dip}. \quad (3.18)$$

Die skalare Kopplung J entsteht durch die Wechselwirkung der zwei Kernspins über die Fermikontaktwechselwirkung, damit ist sie von Molekülorbitalen abhängig. Sie ist nur bei Kernen messbar, die direkt oder über maximal drei weitere Kerne verbunden sind. Je mehr Bindungen dabei zwischen den betrachteten Kernspins $I_{1z}I_{2z}$ liegen, desto schwächer ist die Wechselwirkung. Die skalare Kopplung besitzt folgende Form:

$$\hat{H}_{sca} = 2\pi J \hat{I}_{1z} \hat{I}_{2z}. \quad (3.19)$$

Kopplungen führen zur Aufspaltung des Resonanzsignals eines Kerns in Multipletts, aus denen sich die Kopplungen extrahieren lassen.

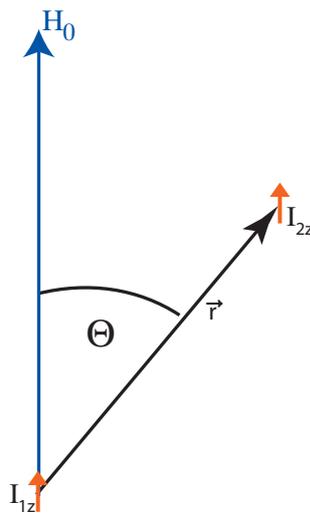


Abb. 3.16: Der Winkel Θ zwischen dem externen Magnetfeld und dem Kernverbindungsvektor.

Die dipolare Kopplung existiert unabhängig von Molekülorbitalen und beruht einzig und allein auf der dipolaren Wechselwirkung zweier Kernspinnomente im Raum. Die Größe der dipolaren Kopplung ist dabei abhängig von der Orientierung des internuklearen Vektors zum statischen Magnetfeld. Die dipolare Energie E_{dip} eines Kernspins I_1 mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_1 im Feld eines Kernspins I_2 mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ_2 ist wie folgt definiert:

$$E_{dip} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2}{r^3} \left[\vec{I}_1 \cdot \vec{I}_2 - 3 \frac{(\vec{I}_1 \cdot \vec{r})(\vec{I}_2 \cdot \vec{r})}{r^2} \right]. \quad (3.20)$$

Im heteronuklearen Fall ist die Differenz der Larmorfrequenzen groß im Vergleich zur Kopplung ($J+D$), so dass die transversalen Komponenten des Kernspins vernachlässigt werden dürfen. Es ergibt sich folgende Formel mit dem Winkel Θ (Abb. 3.16):

$$\begin{aligned} E_{dip}^{hetero} &= \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar^2}{r^3} \left[I_{1z} I_{2z} - 3(I_{1z} \cos \Theta)(I_{2z} \cos \Theta) \right] \\ &= -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar^2}{r^3} I_{1z} I_{2z} (3 \cos^2 \Theta - 1) \end{aligned} \quad (3.21)$$

Die dipolare Kopplung resultiert aus den Differenzen der Frequenzen ν zwischen den Energieniveaus zweier Spins.

$$\nu_{dip}^{hetero} = -\frac{1}{2\pi} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar}{r^3} I_{1z} I_{2z} (3 \cos^2 \Theta - 1) \quad (3.22)$$

Dadurch folgt für die dipolare Kopplung D :

$$D = D_{max} \left(\frac{3 \cos^2 \Theta - 1}{2} \right), \quad (3.23)$$

mit

$$D_{max} = -\frac{1}{\pi} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar}{r^3}. \quad (3.24)$$

D_{max} ist die maximale Größe der dipolaren Kopplung, die nur dann auftritt, wenn keine Beweglichkeit des Moleküls vorhanden ist. Im Festkörper beträgt sie für eine CH-Kopplung mit einer Bindungslänge von 1.1 Angström -45,4 kHz.

In isotroper Lösung rotieren die Moleküle so schnell, dass sich die messbare dipolare Kopplung über alle gleichmäßig populierte Orientierungen zu null mittelt. Dadurch verschwinden

die dipolaren Kopplungen. Sobald die Verteilung nicht mehr vollständig isotrop ist, mitteln sich die verschiedenen Orientierungen nicht mehr komplett und es entsteht eine Vorzugsausrichtung. Daraus resultieren kleine messbare dipolare Kopplungen. Bildet man den Durchschnitt über alle Orientierungen des Kernverbindungsvektors \vec{r} im Raum und über die Zeit, d. h. über Θ , und erhält somit:

$$D = D_{max} \left\langle \frac{3 \cos^2 \Theta - 1}{2} \right\rangle. \quad (3.25)$$

Weiterhin gilt:

$$D = D_{max} P_2(\langle \cos \Theta \rangle), \quad (3.26)$$

mit

$$P_2(\langle \cos \Theta \rangle) = \frac{3 \langle \cos^2 \Theta \rangle - 1}{2}. \quad (3.27)$$

Dabei ist $P_2(x)$ das zweite Legendrepolynom mit zwei Nullstellen.

Um den Winkel Θ zu berechnen, wird das Bezugssystem auf ein Koordinatensystem x', y', z' geändert, das dem Molekülkoordinatensystem entspricht (Abb. 3.17). Dabei ist $\cos \Theta = \widehat{H_0} \cdot \widehat{r}$, wobei \widehat{x} auf die Normierung der Vektorlänge hinweisen soll. Im Molekülkoordinatensystem lässt sich das Skalarprodukt umwandeln zu:

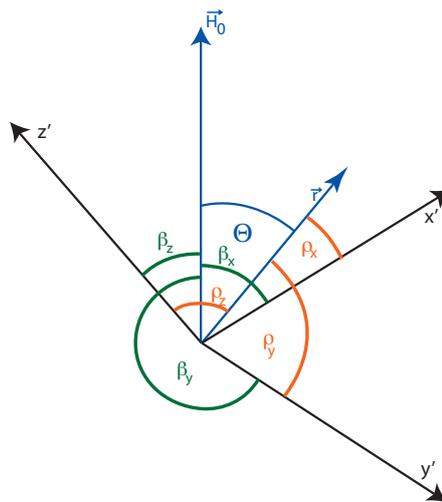


Abb. 3.17: Abbildung des Winkel Θ im Molekülkoordinatensystem (x', y', z') . \vec{H}_0 ist das externe Magnetfeld, \vec{r} der Kernverbindungsvektor der zwei koppelnden Kerne.

$$\cos \Theta = \widehat{H}_0 \cdot \widehat{r} = (\cos \beta_{x'} \quad \cos \beta_{y'} \quad \cos \beta_{z'}) \cdot \begin{pmatrix} \cos \rho_{x'} \\ \cos \rho_{y'} \\ \cos \rho_{z'} \end{pmatrix} = \sum_{i=x',y',z'} \cos \beta_i \cos \rho_i, \quad (3.28)$$

deshalb:

$$P_2(\langle \cos \Theta \rangle) = \frac{3}{2} \left(\sum_{i=x',y',z'} \cos \beta_i \cos \rho_i \right)^2 - \frac{1}{2} = \frac{3}{2} \sum_{i=x',y',z'} \cos \beta_i \cos \rho_i \sum_{j=x',y',z'} \cos \beta_j \cos \rho_j - \frac{1}{2}. \quad (3.29)$$

Da mit den normalisierten Vektoren gearbeitet wurde, gilt, dass die Summe der quadrierten Richtungskosinus 1 ergibt ($\cos^2 \rho_{x'} + \cos^2 \rho_{y'} + \cos^2 \rho_{z'} = 1$). Mit

$$\sum_{i=x',y',z'} \cos^2 \beta_i = 1 \quad (3.30)$$

und

$$\sum_{i,j=x',y',z'} \cos \beta_i \cos \beta_j = \delta_{ij}, \quad (3.31)$$

ergibt sich

$$P_2 \langle \cos \Theta \rangle = \frac{3}{2} \sum_{i,j=x',y',z'} \cos \beta_i \cos \rho_i \cos \beta_j \cos \rho_j - \frac{1}{2} \sum_{i,j=x',y',z'} \cos \rho_i \cos \rho_j \delta_{ij}. \quad (3.32)$$

Für die dipolare Kopplung gemittelt über die Zeit ($\cos \beta(t)$) ergibt sich nun folgende Gleichung im Molekülkoordinatensystem:

$$D = -\frac{1}{\pi} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar}{r^3} \sum_{i,j=l,m,n} A_{ij} \cos \rho_i \cos \rho_j, \quad (3.33)$$

mit dem Alignmenttensorelementen:

$$A_{ij} = \left\langle \frac{3}{2} \cos \beta_i \cos \beta_j - \frac{1}{2} \delta_{ij} \right\rangle. \quad (3.34)$$

Die Alignmentmatrix ist real, symmetrisch und spurlos, was dazu führt, dass sie nur fünf voneinander unabhängige Elemente besitzt. Demzufolge reicht es theoretisch aus, fünf dipolare Kopplungen einer bekannten Molekülstruktur zu messen, um die Alignmentmatrix zu bestimmen (falls die fünf Interspinvektoren der korrespondierenden Kerne eine hinreichend große Winkelstreuung besitzen). Eine weitere Folge dessen ist, dass die Alignmentmatrix durch Überführung in ein anderes Koordinatensystem (genannt Alignmentkoordinatensystem x, y, z) diagonalisiert werden kann. In einem solchen System ergibt sich:

$$\sum_{i,j=x,y,z} A_{ij} \cos \rho_i \cos \rho_j = A_{xx} \cos^2 \vartheta_x + A_{yy} \cos^2 \vartheta_y + A_{zz} \cos^2 \vartheta_z. \quad (3.35)$$

ϑ_i ist dabei der Winkel zwischen der Kernverbindungsachse r und den Koordinatensystemsachsen i . In Kugelkoordinaten ergibt sich damit:

$$\cos \vartheta_l = \sin \Theta \cos \Phi, \quad (3.36)$$

$$\cos \vartheta_m = \sin \Theta \sin \Phi, \quad (3.37)$$

$$\cos \vartheta_n = \cos \Theta. \quad (3.38)$$

Die residualen dipolaren Kopplungen hängen somit von r^{-3} und den Winkeln Θ und Φ in folgender Weise ab:

$$\sum_{i,j=x,y,z} A_{kl} \cos \rho_i \cos \rho_j = A_{xx} \sin^2 \Theta \cos^2 \Phi + A_{yy} \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi + A_{zz} \cos^2 \Theta, \quad (3.39)$$

und damit

$$D = -\frac{1}{\pi} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar}{r^3} [A_{xx} \sin^2 \Theta \cos^2 \Phi + A_{yy} \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi + A_{zz} \cos^2 \Theta] \quad (3.40)$$

$$= -\frac{1}{2\pi} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar}{r^3} [(A_{zz} - \bar{A})(3 \cos^2 \Theta - 1) + (A_{xx} - A_{yy}) \sin^2 \Theta \cos 2\Phi]. \quad (3.41)$$

Anmerkung:

Das Alignmenttensorkoordinatensystem und das Molekülkoordinatensystem hängen anschaulich folgendermaßen miteinander zusammen (Abb. 3.18) [77]. Außerdem lassen sich der Suszeptibilitätstensor χ , der Alignmenttensor \mathbf{A} und der Wahrscheinlichkeitstensor \mathbf{P} direkt ineinander überführen [68].

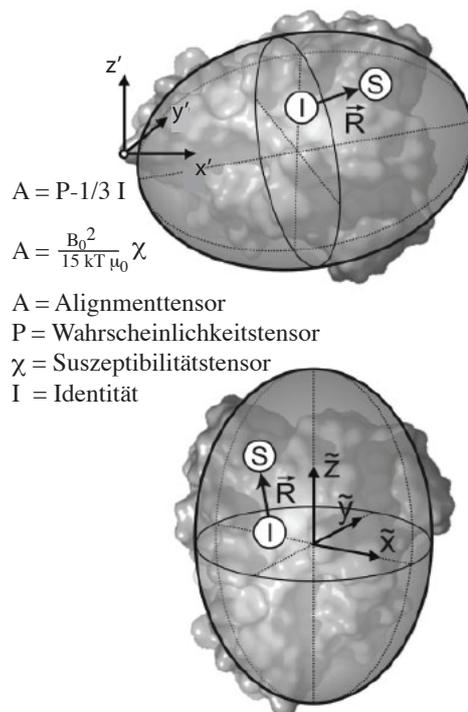


Abb. 3.18: Abbildung des Molekülkoordinatensystem x', y', z' im Vergleich zum Alignmenttensorkoordinatensystem x, y, z [77] und der Zusammenhang zwischen Alignmenttensor \mathbf{A} , Suszeptibilitätstensor χ und Wahrscheinlichkeitstensor \mathbf{P} .

3.10 Relaxation durch Paramagnetismus

Als Relaxation bezeichnet man den Prozess, der einen Nichtgleichgewichtszustand wieder in den Gleichgewichtszustand bringt. In der NMR-Spektroskopie bedeutet das einerseits, dass die x-, y-, bzw. -z-Magnetisierung nach Abschalten des rf-Pulses (*radio frequency*) wieder zu z-Magnetisierung relaxiert (longitudinale Relaxationszeit T_1) und andererseits, dass sich x,y-Magnetisierung abbaut (transversale Relaxationszeit T_2). Ein Mechanismus, der zu

beiden Arten der Relaxation führt, ist die sogenannte Spin-Gitter-Wechselwirkung. Dabei tauscht ein Spin Energie mit seiner Umgebung (Gitter) über einen Wechsel des Energieniveaus aus. Zur transversalen Relaxation trägt zusätzlich eine Spin-Spin-Wechselwirkung bei. Dabei wechselwirken zwei Spins benachbarter Kerne. Die transversale Relaxation hängt mit der Linienbreite $\Delta\nu_{1/2}$ der Resonanzfrequenz wie folgt zusammen:

$$\frac{1}{T_2} = \pi\Delta\nu_{1/2}. \quad (3.42)$$

Bei paramagnetischen Substanzen spüren sich Kern- und Elektronenspin, denn obwohl die makroskopische Magnetisierung der Probe konstant ist, wechseln die einzelnen Elektronenspins bzw. die Gesamtdrehmomente J ihre Zustände ständig unter Erhalt der Boltzmannverteilung (Elektronenspinrelaxation T_e). So sieht jeder Kern den Elektronenspin m_s in der Umgebung umklappen, womit sich auch das Magnetfeld der Umgebung ändert. Diese paramagnetische Relaxationsvergrößerung bezeichnet man mit PRE (*paramagnetic relaxation enhancement*). Die Länge der Elektronenrelaxation T_e nimmt bei abnehmender Temperatur und zunehmender Ligandenfeldaufspaltung zu. Die Ligandenfeldaufspaltung der Lanthanoidkomplexe ist sehr gering, da die f-Orbitale in der drittäußersten Schale nur geringe Wechselwirkungen mit der Ligandorbitalen aufweisen. Demzufolge sind die Elektronenrelaxationszeiten der Lanthanoide sehr kurz (Abb. 3.19). Bei NMR-spektroskopischen Messungen von Biomolekülen in Lösung wird meist bei Temperaturen um die 300 K gemessen.

Einzigste Ausnahme stellt Gd^{3+} dar. Gadolinium besitzt bei einem Gesamtbahndrehimpuls $L = 0$ einen Kernspin $S = 7/2$. Für derartige Ionen in kubischer Umgebung sollten alle anisotropen magnetischen Terme wie der g -Tensor und die Nullfeldaufspaltung verschwinden. Aber wie der Vergleich von Experimenten und theoretischen Berechnungen zeigt, fluktuiert die geometrische Anordnung der Komplexe durch Lösungsmittelleffekte, was zu einer verzerrten Symmetrie und somit zu Anisotropien führt [80]. Anschaulich betrachtet relaxiert ein Gd^{3+} -Ion so viel langsamer, weil jedes f-Orbital genau mit einem Elektron gefüllt ist. Bei allen anderen paramagnetischen Elektronen ist die Elektronenrelaxationszeit T_e so kurz im Vergleich zur Korrelationszeit τ_c des gesamten Moleküls, dass benachbarte Kerne nur ein gemittelt magnetisches Moment der Elektronen spüren, das sich aus der Boltzmann-

Metallion	Konfiguration	T_e in [s]
Cr^{3+}	d^3	10^{-9} - 10^{-10}
Cr^{2+}	d^4	10^{-11} - 10^{-12}
Cu^{2+}	d^9	10^{-9}
Ce^{3+}	f^1	$4 \cdot 10^{-13}$ - $1 \cdot 10^{-13}$
Pr^{3+}	f^2	$3 \cdot 10^{-16}$ - $6 \cdot 10^{-14}$
Nd^{3+}	f^3	$8 \cdot 10^{-13}$ - $2 \cdot 10^{-13}$
Sm^{3+}	f^5	$2 \cdot 10^{-12}$ - $5 \cdot 10^{-14}$
Eu^{3+}	f^6	$5 \cdot 10^{-14}$ - $1 \cdot 10^{-14}$
Gd^{3+}	f^7	10^{-8} - 10^{-9}
Tb^{3+}	f^8	$8 \cdot 10^{-13}$ - $2 \cdot 10^{-13}$
Dy^{3+}	f^9	$1 \cdot 10^{-12}$ - $4 \cdot 10^{-13}$
Ho^{3+}	f^{10}	$8 \cdot 10^{-13}$ - $2 \cdot 10^{-13}$
Er^{3+}	f^{11}	$8 \cdot 10^{-13}$ - $3 \cdot 10^{-13}$
Tm^{3+}	f^{12}	$2 \cdot 10^{-12}$ - $5 \cdot 10^{-13}$
Yb^{3+}	f^{13}	$5 \cdot 10^{-13}$ - $2 \cdot 10^{-13}$

Abb. 3.19: Die Elektronenrelaxationszeiten der Übergangsmetallionen und von Gadolinium stammen aus [78], die übrigen aus [79]. Die gelb unterlegten Felder stellen dabei Relaxationszeiten dar, die unpraktikabel für NMR-Messungen sind.

verteilung ergibt. Dieses Phänomen der Kernspinrelaxation wird als Curie-Spin-Relaxation bezeichnet. Dadurch ergeben sich schmalere Linien als bei höheren T_e im Bereich von τ_c [81].

Kapitel 4

Tagging

4.1 Das Konzept des Taggings von Biomolekülen

Als Tagging bezeichnet man die Modifizierung von Makromolekülen mit kleinen funktionalen Einheiten, den so genannten Tags. Tag bedeutet aus dem Englischen übersetzt Markierung. In der biomolekularen Chemie ist ein Tag also eine Markierung eines Biomoleküls. Für das Tagging ist es eine Voraussetzung, dass die eingeführte Markierung die Funktion der Proteine möglichst wenig beeinflusst und idealerweise klein im Vergleich zum Biomolekül ist. Der Tag birgt dabei neue spektroskopische Eigenschaften, die zur Analyse des Biomoleküls genutzt werden, beispielsweise zur Bestimmung des Aufenthaltsortes des Proteins in der Zelle. Eine Strukturaufklärung kann nur funktionieren, wenn durch die Modifizierung die native Struktur des Biomoleküls nicht zerstört wird. Der Ort der Modifizierung muss demnach so gewählt sein, dass der Tag vom Biomolekül weg zeigt. Zudem darf er nicht mit Funktionen des Biomoleküls reagieren oder starke Wechselwirkungen eingehen, beispielsweise über Wasserstoffbrückenbindungen. Häufig werden fluoreszenzaktive Proteine eingefügt, z. B. das *Green Fluorescent Protein* (GFP), dessen Entwicklung im Jahr 2008 mit dem Nobelpreis für

Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien ausgezeichnet wurde [82]. Mit Hilfe des GFPs können die getaggten Proteine in der Zelle durch Fluoreszenz detektiert werden.

Es existieren verschiedene Taggingkonzepte: Einerseits das globale Tagging, d. h. das Modifizieren von verbreiteten Funktionen in Biomolekülen, u. a. von Aminogruppen in Peptiden; andererseits das selektive Labeling, beispielsweise die Reaktion an Cysteinen in Peptiden.

Tagging hat einen hohen Stellenwert für verschiedene biochemische Methoden. In der Massenspektroskopie von Peptiden verwendet man das iTRAQ-Tagging (*isobaric tag for relative and absolute quantification*), eine Modifizierung, die zur quantitativen MS/MS-Analyse verwendet wird [83].

Um die Aufreinigung von Proteinen zu erleichtern, werden im Rahmen der Expression His-Tags an das Protein gehängt. His-Tags sind Peptidtags, die aus mindestens sechs Histidinresten bestehen. Polyhistidine besitzen eine Affinität gegenüber Nickel²⁺-NTA-modifiziertem Chromatographiematerial, welches diese mit einer Bindungskonstante von $K_d = 10^{-13}$ bindet (siehe Abb. 4.1). Erst durch Elution mit Imidazol wird das getaggte Protein wieder abgegeben. So erreicht man, dass Proteine mit His-Tag von allen anderen getrennt werden [84].

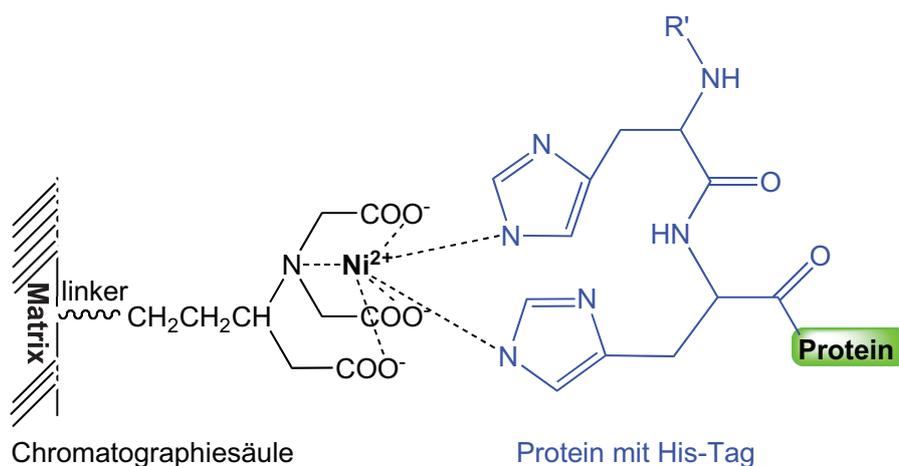


Abb. 4.1: Die schematische Darstellung der His-Tag-Affinitätschromatographie an einer Nickel²⁺-NTA-Säule.

In der ESR- und NMR- Spektroskopie sind *spin labels* als Tags für Proteine sehr verbreitet. *Spin labels* sind Moleküle mit ungepaarten Elektronen, die in NMR-Spektren zu einer lokalen Signalverbreiterung (PRE) führen (siehe Kapitel 3.10). Häufig genutzt wird beispielsweise der MTSSL-Tag ((1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methan^uthio^usulfonat *spin label*), ein stabiles zyklisches Nitroxyl-Radikal. Der MTSSL-Tag ist sehr selektiv und reagiert nur mit Thiolen, also z. B. den Cysteinen eines Proteins (Abb. 4.2) [85,86].

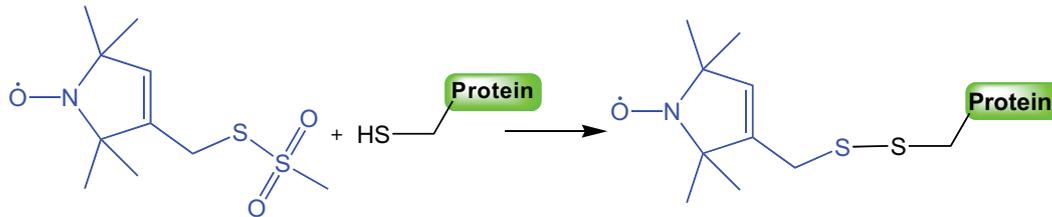


Abb. 4.2: Die schematische Darstellung der Einführung eines MTSSL-Tags in ein Protein mit oberflächenexponiertem Cystein.

In der ESR-Spektroskopie sind *spin labels* essentiell, da nur ungepaarte Elektronen detektiert werden können. Demzufolge kann man allein solche Proteine untersuchen, die ein paramagnetisches Zentrum in Form eines Metallions oder eines Radikals aufweisen.

4.2 Chelatisierende DNA-Tags in der Literatur

In der Literatur wurden bereits einige metallionenchelatisierende Tags für Nukleinsäuren beschrieben. Dabei lag anfangs der Schwerpunkt auf der ortsspezifischen Hydrolyse der Oligonukleotide, also auf künstlichen, ortsspezifischen Nukleasen [7]. Mit der Zeit wurden diese chelatisierenden Oligonukleotide zunehmend auch für NMR-Studien genutzt, um paramagnetische Zentren in DNA einzubauen [87–89]. Zudem verwendet man Lanthanoid(III)-EDTA-Komplexe für Fluoreszenzstudien [90]. Im Folgenden werden einige chelatisierende Nukleinsäuretags und ihre Anwendungen kurz vorgestellt.

4.2.1 Der BABE-Tag

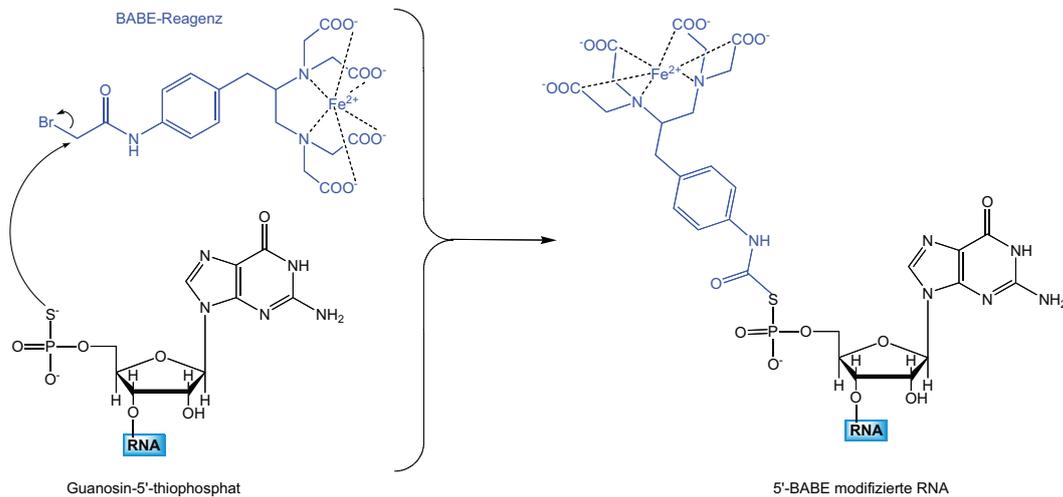


Abb. 4.3: Die Einführung eines endständigen Fe-BABE-Tags in RNA (1-(p-Bromacetamidbenzyl)-EDTA) [7].

Eisen(II)-EDTA-Komplexe bilden in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion). Diese Eigenschaft nutzt man in der Biochemie, um Peptide aber auch RNA ortsspezifisch zu hydrolysieren. Dazu wird ein Eisen(II)-EDTA-Komplex kovalent an ein Biomolekül gebunden (BABE-Tag), indem man eine Thiolfunktion modifiziert (siehe Abb. 4.3). Anschließend wird Wasserstoffperoxid zugegeben, wodurch sich v. a. in der Nähe des Eisenzentrums Hydroxylradikale bilden, die im Fall von RNA die Ribose angreifen und dabei die Phosphodiesterbindung spalten. Durch die Analyse der entstanden Bruchstücke können dann Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur der RNA gezogen werden. Normalerweise erfolgt die Modifizierung am 5'-Ende der RNA. Neuere Methoden ermöglichen zudem die Einbringung einer BABE-Modifizierung an nichtendständigen Basen (Abb. 4.4), was das Anwendungsspektrum des Tags stark erweitert hat [8].

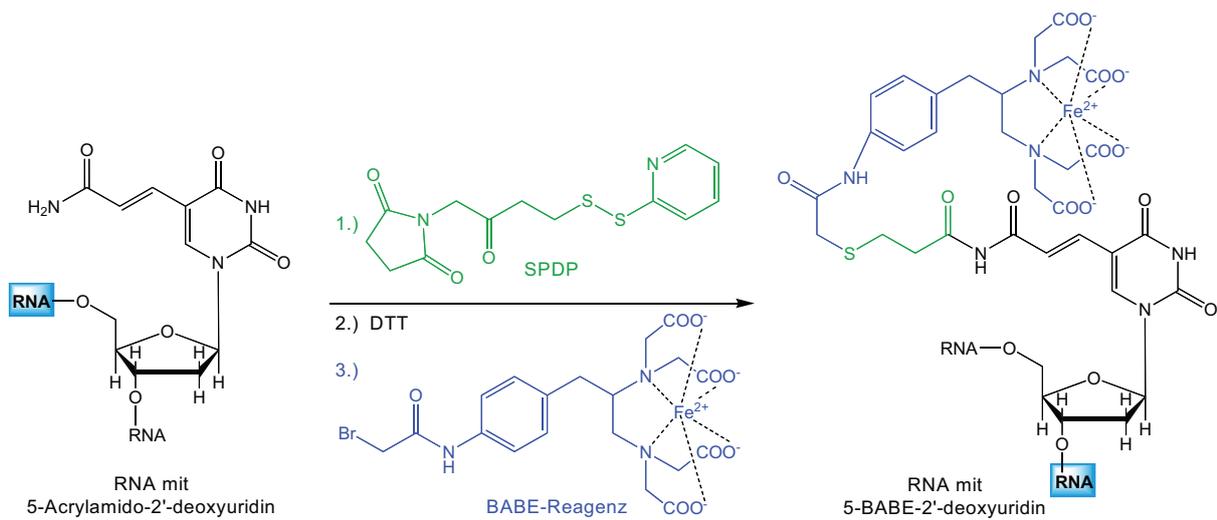


Abb. 4.4: Alternative nichttemplandige BABE-Modifizierung von RNA.

4.2.2 Fluoreszenztags

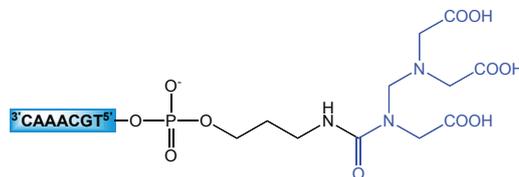


Abb. 4.5: 5'-EDTA modifizierte DNA mit Aminoalkyllinker. Durch Terbium(III)ionen-Komplexierung entsteht ein Fluoreszenztags.

Wie in Abb. 4.5 dargestellt kann DNA am 5'-Ende über einen Aminoalkyllinker mit EDTA modifiziert werden [91,92]. Neben EDTA kann so auch DTPA als funktionelle Gruppe eingeführt werden (Abb. 4.8). Anfangs erfolgte diese Derivatisierung zum Komplexieren von Eisen(II)-Ionen, die zusammen mit Wasserstoffperoxid eine ortsspezifische Spaltung von DNA ermöglichten, später wurde der Tag zur Komplexierung mit Terbium(III)-ionen genutzt, um sich die Fluoreszenzeigenschaften des Lanthanoidkomplexes in Hybridisierungsstudien zunutze zu machen.

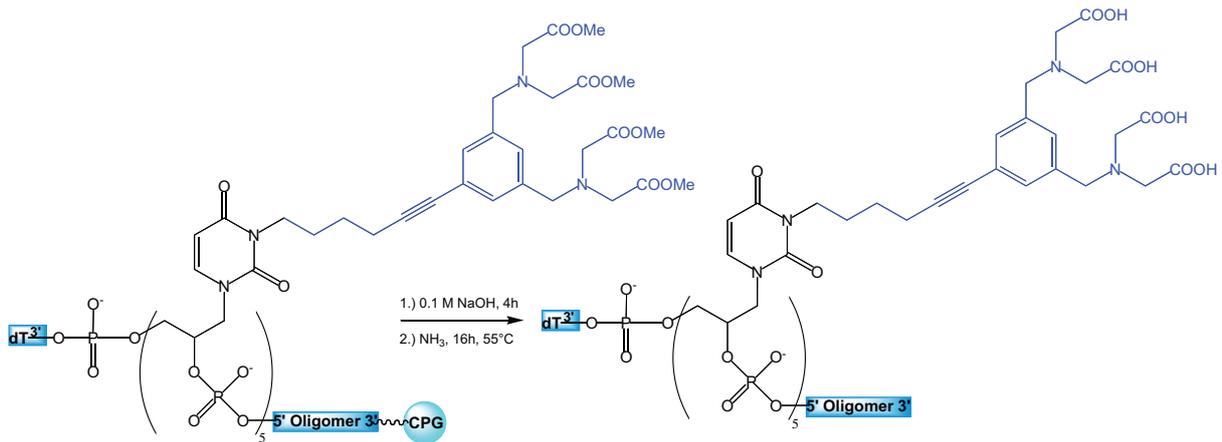


Abb. 4.6: Einbau des Hovinen-Tags via Festphasensynthese mit dem entsprechenden Phosphoramidit und anschließender Vorentscheidung mit Natronlauge [90].

Ein weiterer chelatisierender DNA-Tag, der nicht auf der Struktur von EDTA beruht, wurde von Hovinen *et al.* synthetisiert und analog zu obigem Tag zu fluoreszenzbasierten Hybridisierungsassays verwendet (Abb. 4.6) [90].

4.2.3 PRE-Tags

1985 wurde von Dervan *et al.* ein EDTA-modifiziertes Phosphoramidit synthetisiert, das per Festphasensynthese in DNA eingebaut werden konnte [93].

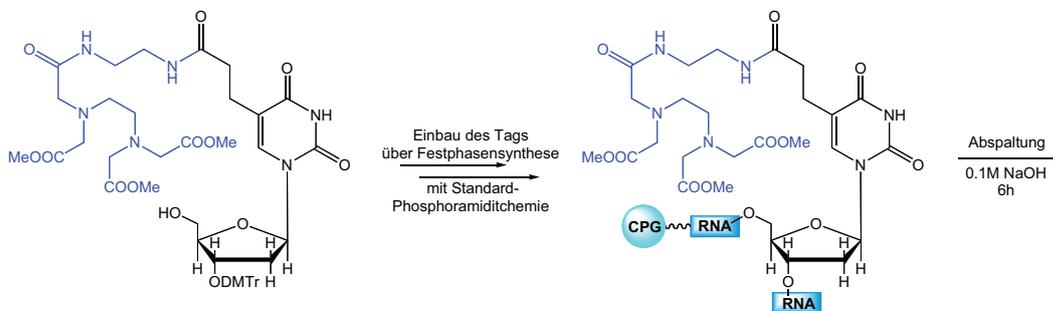


Abb. 4.7: Kommerziell erhältlicher EDTA-Tag für DNA (dT-EDTA).

Dieses Phosphoramidit ist mittlerweile kommerziell erhältlich und wird von Clore *et al.* zu NMR-Studien genutzt. Dabei werden PRE-Raten gemessen, um Bindungsstellen zwischen DNA und Proteinen zu bestimmen [87–89].

4.2.4 PRE-Tags für Magnetresonanz-Imaging

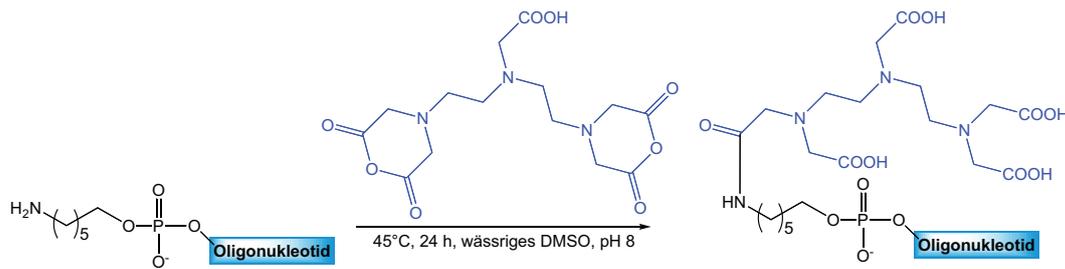


Abb. 4.8: DTPA-Derivatisierung eines Oligonukleotids für MRI-Studien.

Paramagnetische Komplexe werden auch in der Medizin für bestimmte Magnetresonanz-Imaging-Verfahren (MRI) genutzt. Ein gängiges MRI-Kontrastreagenz ist der Gadolinium-DTPA-Komplex. Neben der Verwendung des reinen Komplexes wurden auch Derivate für Spezialanwendungen entwickelt. Beispielsweise wird der Komplex kovalent über einen Aminolinker an ein DNA-Hexamer gebunden, das mit dem Loop C der 5S-rRNA wechselwirkt. Durch die gemessene paramagnetische Relaxationverstärkung werden 5S-rRNA-reiche Bereiche im Körper visualisiert [6].

4.3 Anforderungen an paramagnetisch getaggte DNA für rdc-Messungen

Die im Abschnitt 4.2 vorgestellten EDTA- und DPTA-Tags sind zu flexibel für rdc-Messungen, einerseits da die Verknüpfung über Alkylketten erfolgt, andererseits weil sie an endständigen Phosphatresten der DNA gebunden sind. Zudem sind sie auch stereochemisch ungeeignet, da

das getaggte Biomolekül ein eindeutiges Diastereomer sein muss [94]. EDTA-basierte Modifizierungen, die an einem Stickstoffatom angebracht sind, führen zu zwei verschiedenen diastereomeren Komplexen und somit zu zwei verschiedenen Alignments. Bei Modifizierungen, die über die CH_2 -Gruppen des Diethylamin des EDTA verknüpft sind, ist es wichtig, dass selektiv nur ein Enantiomer vorliegt, das anschließend mit dem Biomolekül verbrückt wird.

Natürlich darf die Modifizierung auch keine reaktiven Komponenten besitzen, die chemische Reaktionen mit Funktionen des Biomoleküls eingehen können. Diese Einschränkung spielte beim Design der Tags jedoch keine große Rolle, da Biomoleküle recht inert sind und mit vielen funktionellen Gruppen wie z. B. Säuren, Aziden, Alkinen keine Reaktion eingehen. Bei den Modifizierungsreaktionen muss auf den pH-Wert geachtet werden, da im stark alkalischen Bereich RNA hydrolysiert [95] und es in sehr saurem Milieu zu Nebenreaktionen wie Deadenolysierungen kommen kann [96].

Sehr wichtig ist auch die Tatsache, dass die Bindungsaffinität des Lanthanoidions zum Tag wesentlich höher sein muss als die zum Biomolekül. Bei der DNA bedeutet dies, dass die Bindungskonstante zwischen EDTA und Lanthanoid viel größer als die Bindungskonstante zu den Phosphatresten des DNA-Rückgrats sein muss. Die Komplexbildungskonstante des Gadolinium-EDTA-Komplexes beträgt $K_B = 10^{17.7}$ [97], während Phosphate in der Regel ein unlösliches Salz mit Lanthanoiden formen. Burai *et al.* haben die Bildung von ternären Komplexen aus Gd^{3+} , EDTA und kleinen Liganden untersucht [98]. Die Komplexbildungskonstante des $[\text{Gd}(\text{EDTA})(\text{HPO}_4)]^{3-}$ -Komplexes betrug $10^{2.84}$, die von $[\text{Gd}(\text{EDTA})(\text{Citrat})]^{4-}$ -Komplexes sogar $10^{3.56}$. Die kleinen Liganden sollten jedoch nicht in der Lage sein einzelne Arme oder das gesamte EDTA-Molekül aus dem Komplex zu verdrängen.

Das Tagging von Biomolekülen zur Strukturaufklärung kann nur funktionieren, wenn durch die Modifizierung die native Struktur des Biomoleküls nicht zerstört wird. Wie in Kapitel 4.1. erwähnt müssen dazu zusammenfassend folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Der Tag muss wesentlich kleiner als die DNA sein.
- Der Tag reagiert nicht mit DNA.
- Der Tag wechselwirkt nicht mit DNA.
- Der Tag zeigt vom Biomolekül weg.
- Der Tag erzeugt keine neuen Stereozentren.

Diese Kriterien wurden mit Hilfe des Programms Macromodel untersucht [23]. Dazu wurde eine B-DNA-Doppelhelix energieminiert und anschließend modifiziert, um danach eine erneute Energieoptimierung durchzuführen. Dabei wurde ersichtlich, dass Modifizierungen an der 5-Position von Thyminen in Richtung der großen Furche zeigen und damit das Grundgerüst der DNA nicht verändern. Untersuchungen an 5-Ethynyl-2'-desoxyuridinhaltiger DNA haben gezeigt, dass diese Modifizierung sogar zu einer Stabilisierung der Doppelhelix führt [99].

In Abb. 4.9 sind die in der Arbeit erfolgreich synthetisierten Tags mit ihren Abkürzungen dargestellt. Vor seiner Synthese wurde die Struktur des EPTE-Tags (Ethynylphenyltriazolyl-EDTA) mit Hilfe des Programms Macromodel untersucht. Die gesamte Modifizierung bestehend aus zwei Phenylringen, einer Dreifachbindung, einem 1,2,3-Triazol, einer Amidbindung und der EDTA-Funktion liegt in Richtung der großen Furche. Vergleicht man aber das Rückgrat der getaggtten und der unmodifizierten DNA, so sind nur marginale Unterschiede zwischen den beiden Strukturen feststellbar (Abb. 4.10). Auch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der modifizierten Base und ihrem Adenosinbindungspartner bleiben erhalten.

Die B-helikale Struktur der DNA bleibt auch bei DSE (Disulfid-EDTA)- und TE (Triazolyl-EDTA)-Modifizierungen erhalten (Abb. 4.11). Ein Grund für die nur minimalen Strukturunterschiede liegt im Erhalt der Wasserstoffbrückenbindungen der veränderten Basen.

Zusätzlich zu den Tagginganforderungen müssen noch spezielle Bedingungen erfüllt werden, um residuale dipolare Kopplungen im NMR-Spektrum messen zu können. Die EDTA-

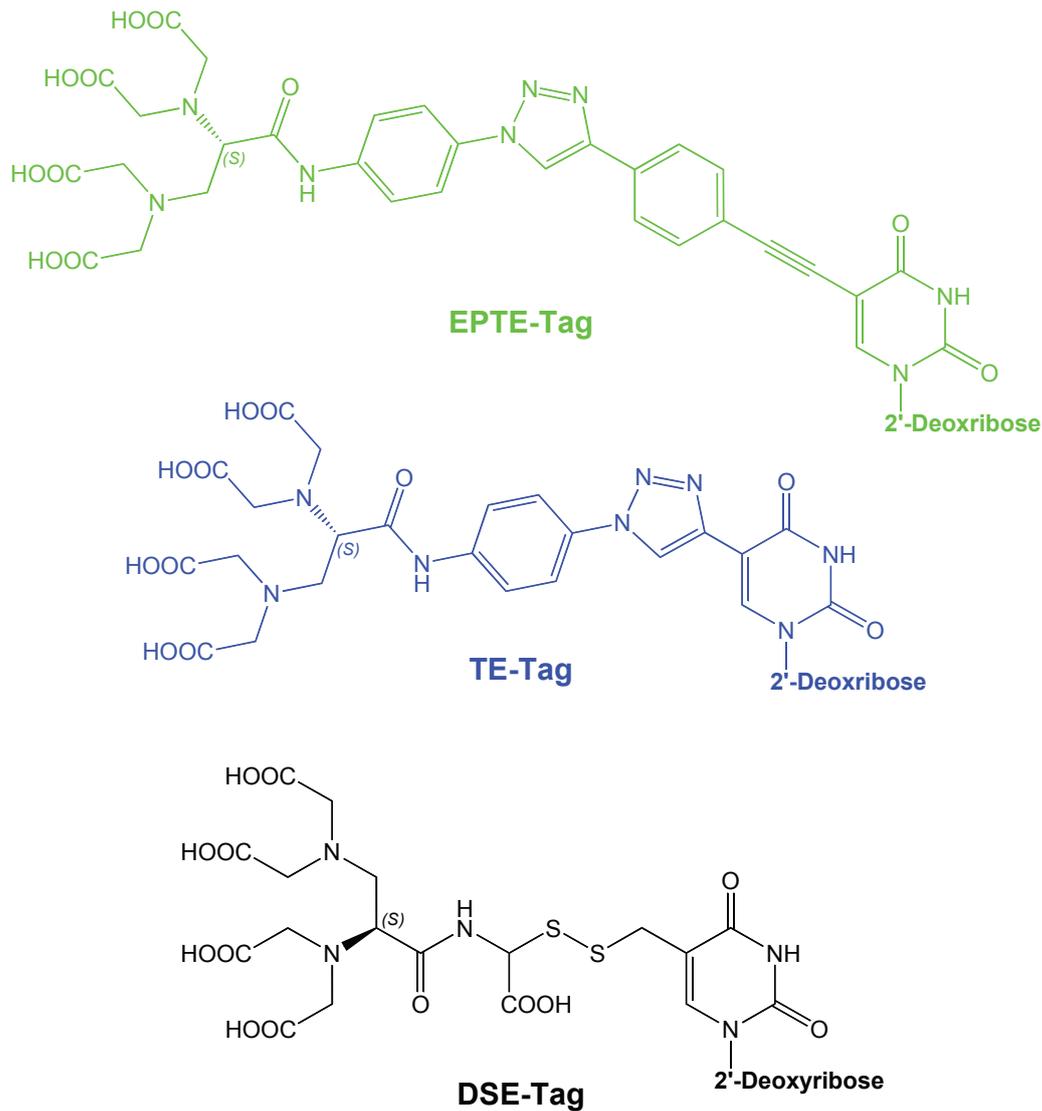


Abb. 4.9: Strukturformeln und Abkürzungen der drei verschiedenen Tags.

Funktion muss möglichst starr mit dem Biomolekül verbunden sein, da nur so eine ausreichende Übertragung des Alignments vom Lanthanoid auf die DNA erreicht werden kann. Beim EPTE-Tag wird dies durch ein mehrgliedriges aromatisches System realisiert, das mit einer Amidbindung endet, die durch ihren planaren Charakter gut als Verbindung zur EDTA-Funktion geeignet ist. Bezüglich der Rigidität ist auch ein kürzerer Tag sehr geeignet, wie der TE-Tag. Bei ihm ist jedoch die sterische Hinderung etwas größer. Dies garantiert zwar eine gute Stabilität, aber die Taggingreaktion ist teilweise gehindert (siehe Abschnitt 5.5).

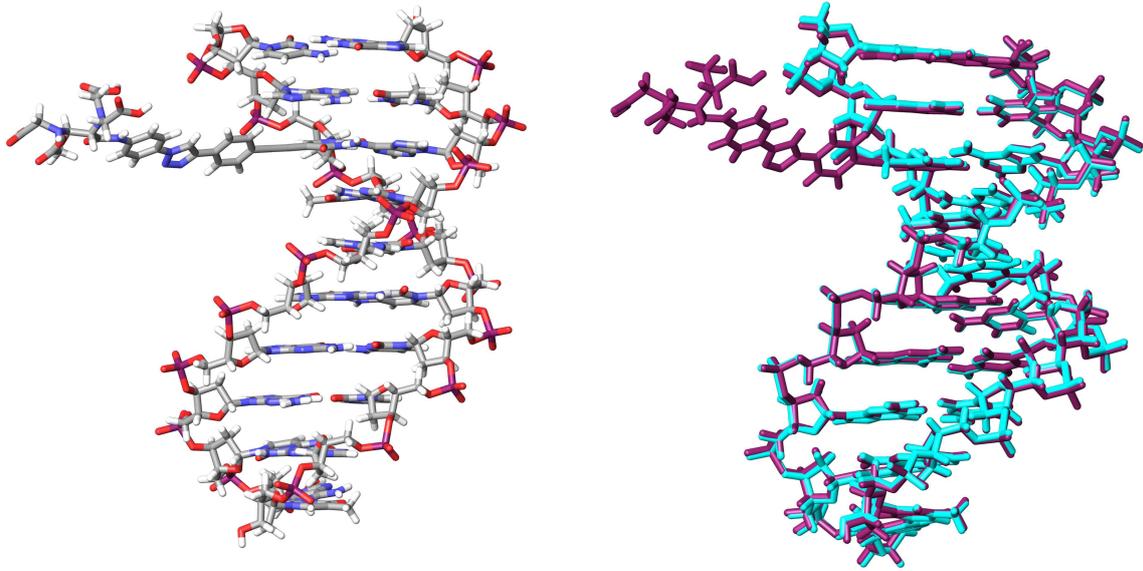


Abb. 4.10: links: Die energieoptimierte Struktur der EPTE-modifizierten DNA und rechts der Vergleich zur unmodifizierten Sequenz (türkis). Die verwendeten Macromodelparameter finden sich im Anhang.

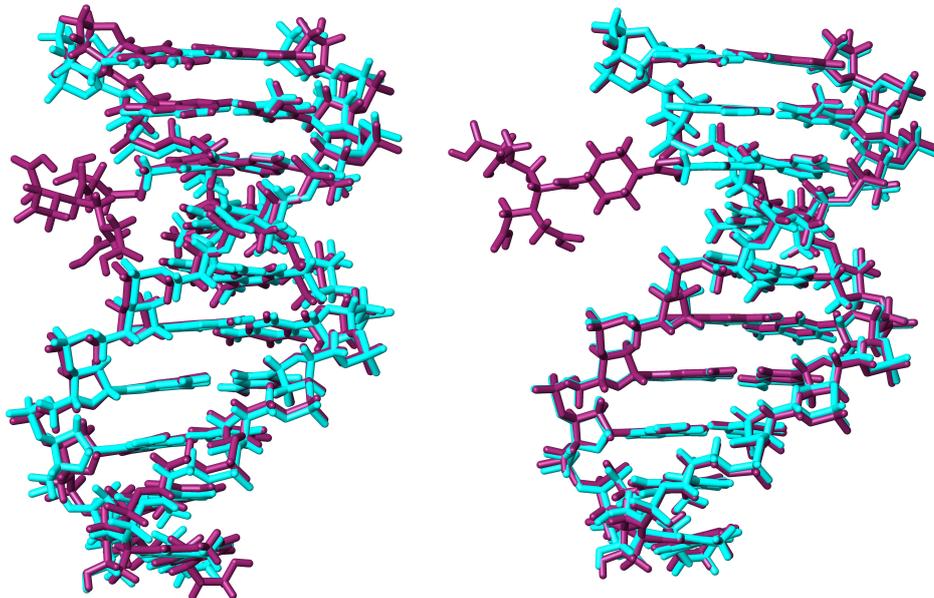


Abb. 4.11: Vergleich der energieoptimierten Struktur modifizierter DNAs (violett) mit der unmodifizierten Sequenz (türkis). Links ist die eine DNA mit DSE-Tag, rechts eine DNA mit TE-Tag dargestellt. Die verwendeten Macromodelparameter finden sich im Anhang.

Eine etwas weniger starre Struktur, aber eine sehr effiziente Taggingreaktion bietet der DSE-Tag. Besonders die Disulfidbrücke und die beiden benachbarten Methylengruppen sorgen für ein partielles Rotationspotential. Allerdings wird dies durch die kleine Struktur der Modifikation teilweise wieder ausgeglichen, denn die gesamte Modifizierung befindet sich innerhalb der großen Furche, was dazu führt, dass die Mobilitätsgrade vermindert werden (Abb. 4.11). Zudem existiert eine zusätzliche Säurefunktion, die potentiell als Ligand agieren kann und somit die Struktur des komplexierten Tags noch kompakter und starrer werden lässt. Leider ist es mit dem Programm Macromodel nicht möglich Lanthanoidionen (oder auch Übergangsmetallionen) in der Strukturberechnung zu berücksichtigen.

Den letzten Aspekt des Tagdesigns stellt das variable Anwendungspotential dar. Prinzipiell ist es möglich, sowohl die Clickreaktion als auch die Disulfidbindungsbildung an den unterschiedlichsten DNA-Sequenzen sowie an RNA durchzuführen. Letztere findet bereits Anwendung in der Modifizierung von Proteinen. Aber auch mit Hilfe der Clickchemie sollte das Tagging von Peptiden möglich werden. Des Weiteren bietet die Festphasensynthese von DNA die Möglichkeit bei einer Stranglänge von bis zu 60 Basen die modifizierte Base an jeder erdenklichen Stelle im Strang zu positionieren. Essentiell für die breite Verwendung sind die milden Reaktionsbedingungen der beiden Taggingreaktionen, die bei Raumtemperatur und in wässrigen Lösungen bei neutralem pH-Wert durchgeführt werden können. Zudem sind sie sehr spezifisch, so dass nur die modifizierten Basen mit dem entsprechenden Tag reagieren. Durch die zwei verschiedenen Taggingmethoden ist es möglich zwei verschiedene Tags sequenzspezifisch in ein Oligonukleotid einzubauen.

Kapitel 5

Synthese paramagnetisch markierter DNA

Nukleinsäuren können auf biologischem und auf chemischem Wege synthetisiert werden. Beide Verfahren sind etabliert und finden Anwendung auf verschiedenen Gebieten. Die biologische Synthese findet mit Hilfe von Enzymen und einem sog. Templatstrang statt, der die komplementäre Basensequenz besitzt. Dabei bezeichnet man die Synthese von DNA mit Hilfe von DNA-Polymerasen als Replikation, die Synthese von RNA mit RNA-Polymerasen ausgehend von einem DNA-Template als Transkription. Durch biologische Synthese können besonders gut sehr lange Nukleinsäuresequenzen erhalten werden. Dazu wird eine Promotorregion am 5'-Ende des Stranges benötigt, die nach der Synthese noch entfernt werden muss [100, 101]. Die verwendeten Enzyme tolerieren jedoch nicht jede Art der Nukleotidmodifizierung, somit ist der Einbau von nicht natürlichen Nukleotidtriphosphaten (NTPs) nicht immer möglich. Dabei gilt: je größer die Modifizierung, desto schwieriger ist der Einbau [102].

Die chemische Synthese hingegen erlaubt meist den Einbau von modifizierten Phosphoramiditen gegebenenfalls mit entsprechenden Schutzgruppen, aber die Länge der zu synthetisierenden Nukleinsäuren ist begrenzt. Mit Standardmethoden sind DNAs mit bis zu 100 Nukleotiden

und RNAs mit bis zu 60 Nukleotiden kommerziell erhältlich. Die häufigsten Isotope ^{12}C und ^{14}N sind keine Spin-1/2-Kerne, und somit nicht bzw. nicht gut geeignet für NMR-Messungen. Um eine bessere Sensitivität zu erhalten werden deshalb häufig gelabelte Proben zu NMR-Untersuchungen verwendet. Gelabelte NTPs können aus Bakterienkulturen isoliert werden, die in gelabelten Medien gezüchtet werden. Der Einbau gelabelter NTPs via Transkription wird deshalb häufig angewandt [103]. Die gelabelten Phosphoramidite sind nicht so leicht zugänglich. Prinzipiell können sie aus den gelabelten NTPs, NDPs und NMPs synthetisiert werden. Diese Methode ist aber sehr ineffizient, v. a. auch weil bei jeder Festphasenkopplung ein großer Überschuss an Phosphoramidit benötigt wird (etwa 20 Äquivalente).

5.1 Festphasensynthese

Die einfachste Methode basenmodifizierte DNA zu erhalten besteht in der Synthese entsprechender Phosphoramidite und ihrem anschließenden Einbau in die DNA. Die Festphasensynthese ist eine sehr effiziente Art kettenförmige Biomoleküle zu produzieren. Dabei wird der erste Molekülbaustein über einen Linker mit dem Feststoffträger verbunden. Anschließend wird je ein weiterer Baustein an den Grundbaustein gekuppelt, dabei wird mit Überschuss an löslichen Reagenzien gearbeitet, die nach vollendeter Reaktion durch Waschen mit Lösungsmitteln entfernt werden. Durch optimierte Verfahren erreicht man sehr hohe Kupplungsausbeuten ($> 98\%$) bei sehr kurzen Kupplungszeiten (wenige Minuten). Eventuelle Reste unverlängerter Moleküle werden durch das *capping* aus dem Zyklus entfernt. Dabei wird die freie reaktive Gruppe mit einer Schutzgruppe versehen, bevor eine weitere Kupplung erfolgt. Nach dem Ablauf der Synthese wird das kettenförmige Molekül vom Träger abgespalten und anschließend noch chromatographisch gereinigt. Nach diesem Prinzip erfolgt die Synthese kettenförmiger Moleküle wie DNA, RNA und Peptide. Dabei ist zu beachten, dass die einzelnen Kupplungsausbeuten sehr hoch sein müssen, um eine hohe Gesamtausbeute zu erhalten. Bei einer Synthese von einem Decamer macht eine Kupplungsausbeutenreduzierung von 98 auf 97% bereits einen Unterschied in der Gesamtausbeute von 82 auf 74% aus.

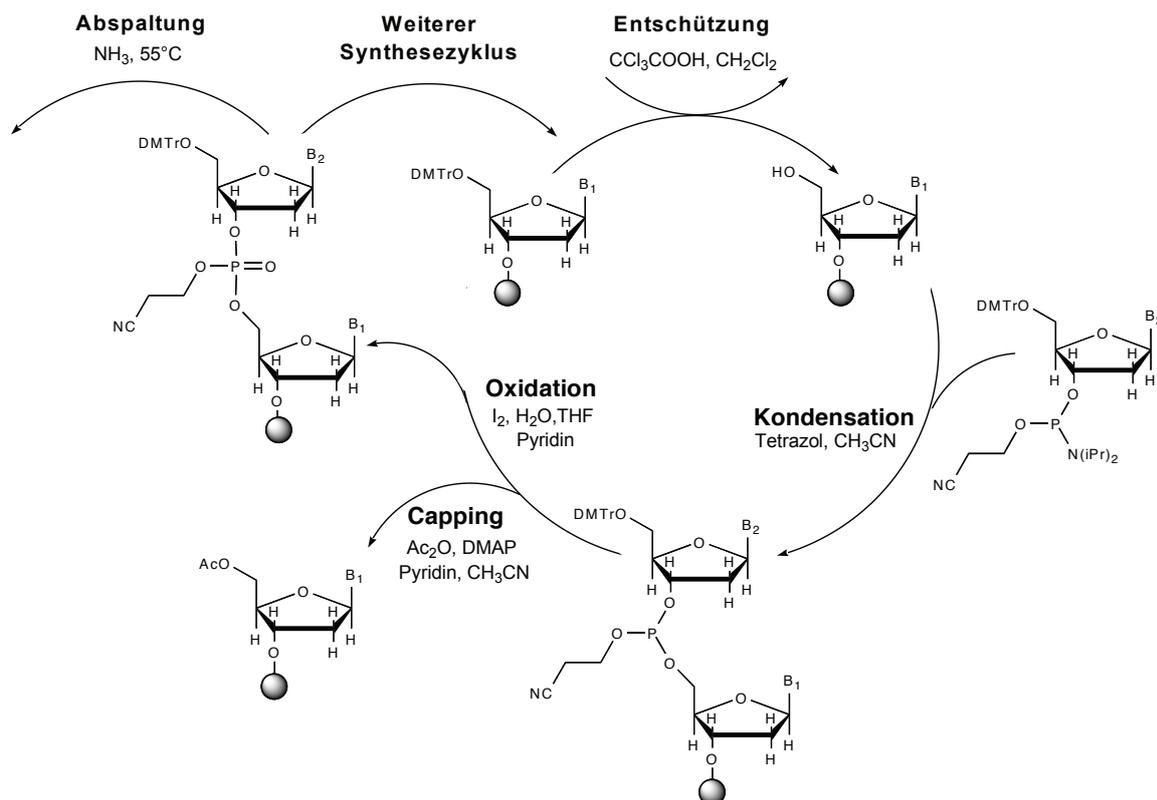


Abb. 5.1: Der Synthesezyklus der sogenannten Phosphoramiditmethode entworfen von R. Letsinger und M. Caruthers

Der Synthesezyklus der DNA ist in Abb. 5.1 dargestellt. Im ersten Schritt wird die 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) der wachsenden Oligonukleotidkette sauer abgespalten. Anschließend kann die freigewordene 5'-Hydroxylgruppe an das 3'-Phosphoramidit des nächsten Bausteins kuppeln. Tetrazol protoniert dabei die Isopropylgruppe des Phosphoramidits und greift dann das Phosphoramidit unter Abspaltung von Diisopropylamin an. Das intermediär entstandene Tetrazolid reagiert dann mit der 5'-Hydroxylgruppe zum Phosphittriestere. Beim *capping*, dem dritten Schritt, werden alle 5'-Hydroxylgruppen, die bei der Kupplung nicht reagiert haben, durch Acetylierung inaktiviert und so aus dem Synthesezyklus entfernt. Der bei der Kupplungsreaktion entstandene Phosphittriestere wird im vierten Schritt zum Phosphotriester oxidiert, dazu wird als mildes Oxidationsmittel Iod genutzt. Dabei entsteht das um einen Baustein verlängerte Oligonukleotid, das erneut den Synthesezyklus durchlaufen kann.

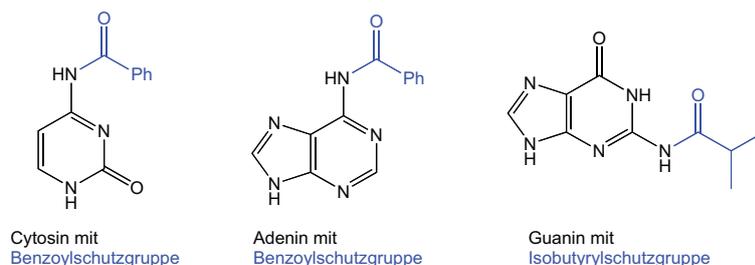


Abb. 5.2: Basenlabile Aminoschutzgruppen.

Ist die gewünschte Kettenlänge erreicht, spaltet man das Oligonukleotid mit konzentriertem Ammoniak (55 °C, 16 h) von der Festphase ab. Dabei werden auch die Aminoschutzgruppen der Basen (Abb. 5.2) entfernt und man erhält die so genannte DMTr-on DNA, die sich per *reversed phase* HPLC leicht aufarbeiten lässt. In einem letzten Schritt wird die DMTr-Schutzgruppe noch sauer abgespalten und beispielsweise durch Waschen der wässrigen Phase mit Diethylether entfernt. Der Verlauf der Festphasensynthese kann auf der Stufe der sauren Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe kontrolliert werden. Die Effizienz der Kopplung korreliert dabei mit der Menge des freiwerdenden DMTr-Kations, die mittels UV-Absorption bei 494 nm bestimmt wird.

5.2 Methoden zur Modifizierung von DNA-Basen

Die Modifizierung von DNA kann auf zwei prinzipiell verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits kann die gewünschte Modifizierung direkt an das entsprechende Phosphoramidit gekuppelt sein, das anschließend in einer Festphasensynthese als ein Baustein verwendet wird. Andererseits kann ein Linker an ein Phosphoramidit angebracht werden, der nach der Festphasensynthese zur Anbringung der eigentlichen Modifizierung verwendet werden kann.

In dieser Arbeit wurde anfangs die erste Methode verwendet, die jedoch nicht das gewünschte Ergebnis lieferte. Anschließend wurde deshalb die zweite postsynthetische Modifizierungsmethode angewandt, darunter verschiedene Konzepte, wie Sonogashira-Reaktion, Click-Reaktion

und Disulfidbrücken. Die beiden letzteren Herangehensweisen lieferten die gewünschten chelatisierenden Oligonukleotide. Im Folgenden wird auf die verschiedenen Ansätze näher eingegangen.

5.3 Synthese eines EDTA-funktionalisierten Phosphoramidits

Ein EDTA-funktionalisiertes Phosphoramidit besteht aus drei Bausteinen, dem Nucleosid, dem Linker und der EDTA-Funktion. Die EDTA-Funktion wurde in diesem Teil der Arbeit sequenziell auf den Linker aufgebaut und anschließend mit dem Nucleosid verbunden.

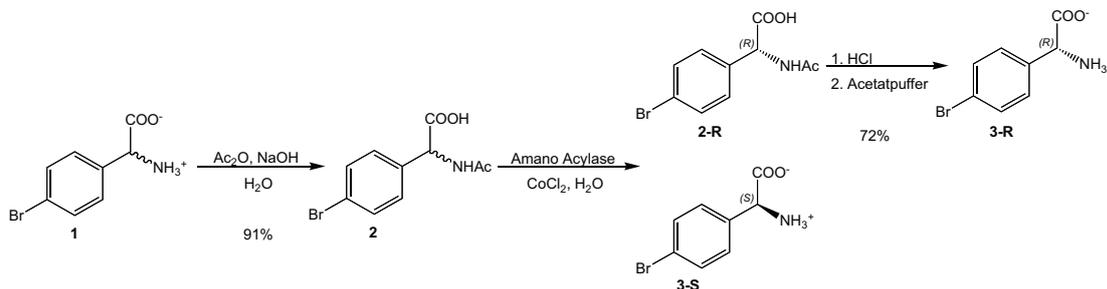


Abb. 5.3: Enantiomeren selektive Synthese von (*R/S*)-(4-Bromphenyl)-glycin.

Ausgegangen wurde dabei von racemischen (4-Bromphenyl)-glycin, das acetyliert wurde, um es danach mit Hilfe des Enzyms *Amano Acylase* in (*R*)-*N*-Acetyl-(4-bromphenyl)-glycin und (*S*)-(4-Bromphenyl)-glycin enzymatisch zu spalten. Um *ee*-Werte von > 98% für beide Enantiomere zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Reaktionsbedingungen zur Synthese des *S*- und des *R*-Enantiomers entwickelt. Details zu diesen Synthesen finden sich in [31,104].

Die Synthese des *S*- und des *R*-Enantiomers verläuft ab Verbindung **3** analog. In Abb. 5.4 ist exemplarisch die Synthese der *S*-EDTA-Verbindung dargestellt. Dabei wurde das

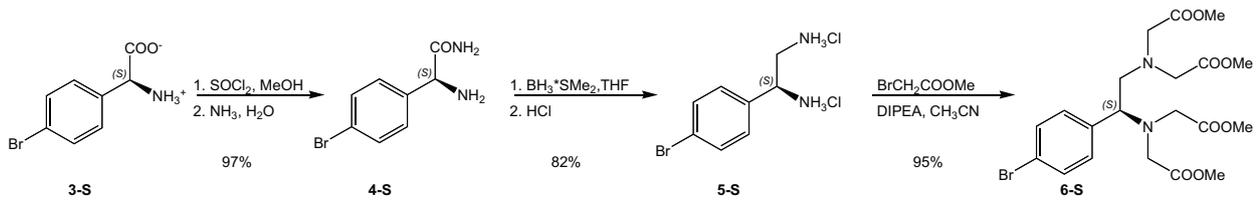


Abb. 5.4: Aufbau der EDTA-Funktion.

(4-Bromphenyl)-glycin erst als Methylester aktiviert, um dann mit Ammoniak zum Amid umgewandelt zu werden. Anschließend wurde das Amid unter milden Bedingungen mit Boran zum Amin reduziert unter Erhalt des Bromids am Phenylring. Eine Alkylierung mit Bromessigsäuremethylester ergab die gewünschte EDTA-Funktion als Tetramethylester. Die Methylesterschutzgruppen werden sowohl für die folgende Sonogashira-Reaktion als auch bei der DNA-Festphasensynthese benötigt und erst beim Abspalten der DNA von der Festphase mit Natronlauge entfernt.

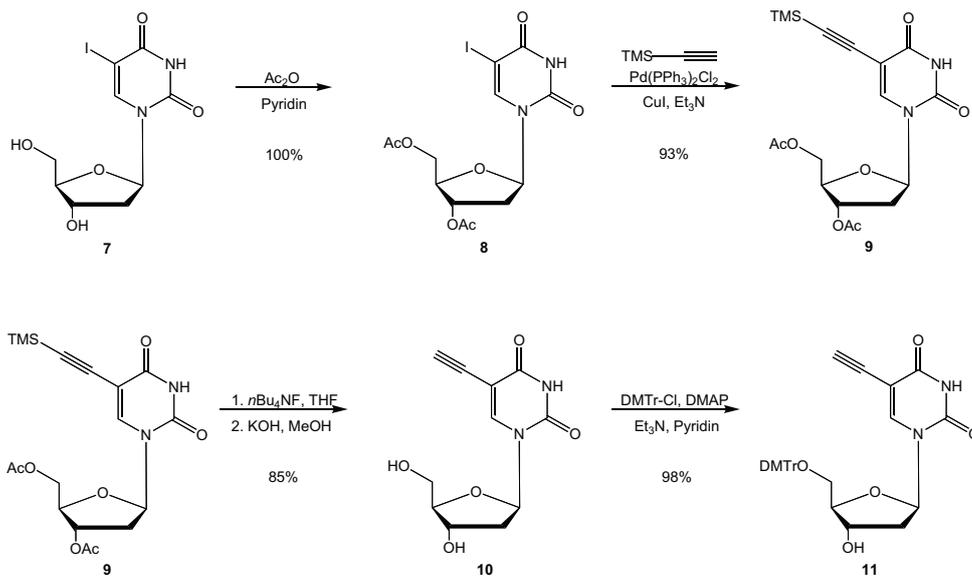


Abb. 5.5: Aufbau des 5-Ethynyl-2'-desoxyuridins.

Der Nucleosidbaustein wurde anhand der folgenden fünfstufigen Synthese mit 77% Ausbeute hergestellt, dabei wurde das 5-Iod-2'-desoxyuridin erst an 3'- und 5'-Position acetyliert und danach über eine Sonogashira-Reaktion zum diacetylierten 5-Trimethylsilylethynyl-2'-

desoxyuridin umgewandelt. Anschließend wurde das Ethin mit Fluorid entschützt und die Acetylschutzgruppen abgespalten (Abb. 5.5). Zuletzt wurde das 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin an der 5'-Position mit der Dimethoxytritylgruppe geschützt, die für die DNA-Festphasensynthese benötigt wird.

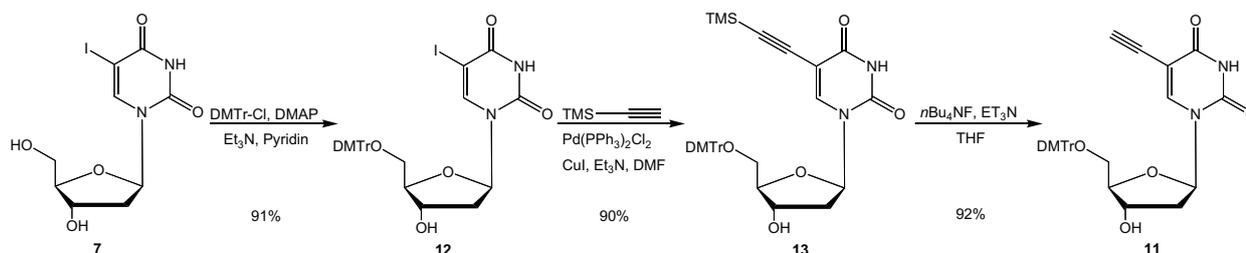


Abb. 5.6: Verkürzte Synthese des 5-Ethynyl-2'-desoxyuridins.

Die Synthese des 5-Ethynyl-3'-dimethoxytrityl-2'-desoxyuridins wurde im Laufe der Arbeit umgestellt auf eine nur dreistufige Synthese (Abb. 5.6). Das 5-Iodo-2'-desoxyuridin wurde dabei sofort mit Dimethoxytrityl geschützt und anschließend in einer Sonogashira-Reaktion umgesetzt, dann wurde die Trimethylsilylschutzgruppe mit Fluorid in Anwesenheit von Triethylamin abgespalten. Die Ausbeute betrug dabei 75%.

Im letzten Teil der Synthese wurden der EDTA-Baustein und das Nucleosid über eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung verbunden. Für diese Sonogashira-Reaktion am Bromid benötigte man einen speziellen, sehr reaktiven Palladiumkatalysator, der sich *in situ* aus dem Palladiumsalz und Tri-*tert*-butylphosphoniumtetrafluoroborat bildet. Anschließend wird mit Hilfe von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit das Phosphoramidit gebildet (Abb. 5.7). Dies wurde bei verschiedenen Firmen (Biospring, IBA) und am MPI für experimentelle Medizin bei der Festphasensynthese eingesetzt, erzielte aber nur sehr geringe Kupplungsausbeuten (< 15% DMTr-Assay). Dabei war zu beachten, dass unter Standardbedingungen die Abspaltung mit konzentriertem Ammoniak zu Ethylendiamintetraethylamid führt, und somit statt dessen als Abspaltungsbedingung 0.4 M NaOH in Methanol/Wasser = 5/1 genutzt wurde.

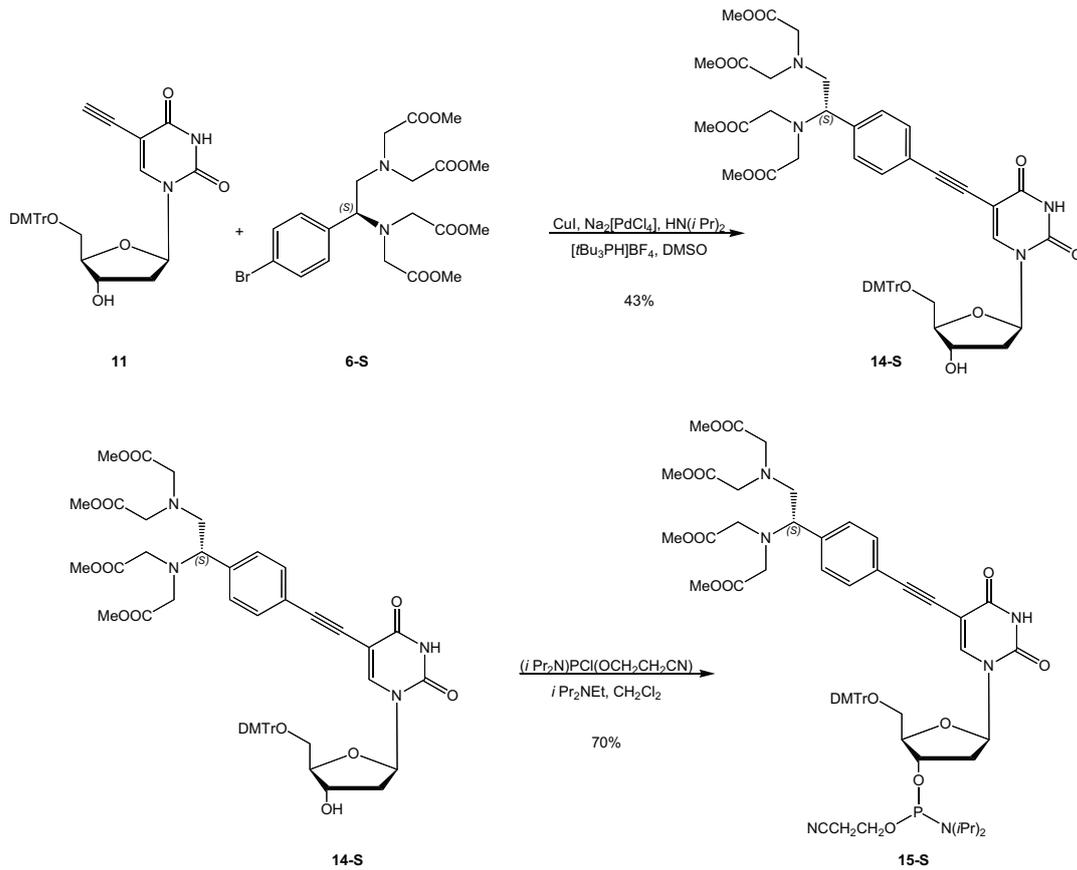


Abb. 5.7: Synthese des Phosphoramidits.

Da auch die Kupplungsausbeuten der Phosphoramidite im Anschluss an das modifizierte Nukleotid stark abgesunken waren, stellte sich diese Methode zur Synthese getaggtter DNA als unpraktikabel heraus, besonders weil für die NMR-Spektroskopie sehr reine Proben aus mindestens 100 nmol Oligomer benötigt werden.

5.4 Sonogashira-Reaktionen an DNA

In den letzten Jahren wurden verstärkt Reaktionen an festphasengebundenen Molekülen durchgeführt, da sie eine leichtere Trennung von den Reaktanden und Lösungsmitteln ermöglichen als herkömmliche Ein-Phasen-Reaktionen. Besonders zur Synthese von Biomolekülen wie Peptiden oder DNA wird eine solche Synthesetaktik bevorzugt, da nur so sehr hohe Ausbeuten erreicht werden können. Darüber hinaus können durch Festphasenreaktionen postsynthetische Modifikationen der Biomoleküle erreicht werden. 1999 entwickelten Grinstaff *et al.* eine Palladium(0)-katalysierte Sonogashira-Reaktion an festphasengebundener DNA [105]. Das Schema ist in Abb. 5.8 dargestellt. Diese Reaktion wurde in den folgenden Jahren weiter entwickelt und u. a. von Prof.

Liebscher und Prof. Wagenknecht zur Synthese lipidmodifizierter und photoaktiver Oligonukleotide genutzt [106, 107]. Um eine mögliche Nebenreaktion auszuschließen, die Glaser-Kupplung (Abb. 5.9) - eine Kupfer(I)-katalysierte, oxidative Dimerisierung von terminalen Alkinen zu Bisacetylenen - müssen die Reaktionen unter Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt werden [108].

Zur EDTA-Modifizierung von DNA per Sonogashira-Reaktion an der Festphase wurden zwei Strategien getestet. Zum ersten wurde 5-Iod-2'-desoxyuridin in die DNA-Sequenz einge-

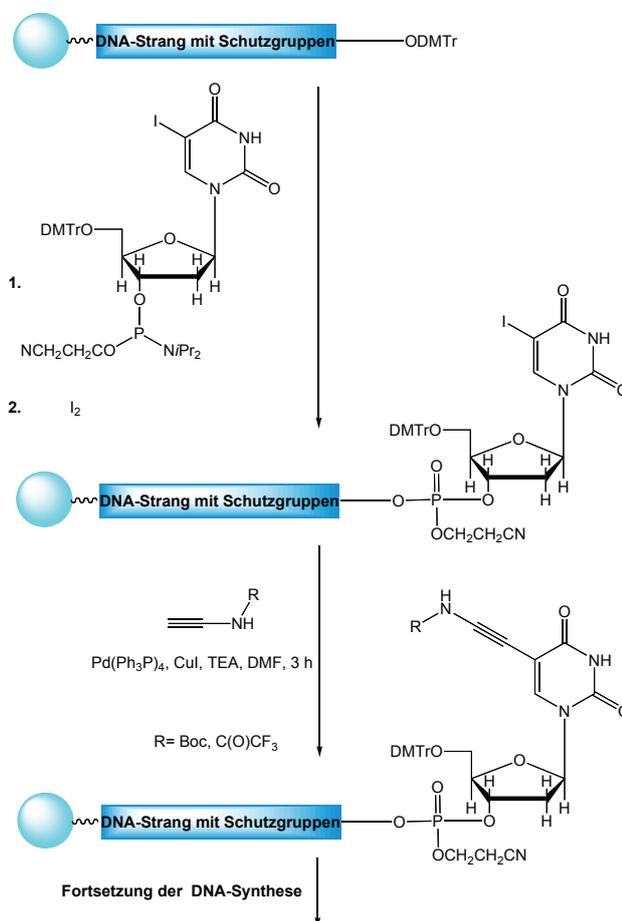


Abb. 5.8: Übersicht zur Pd(0)-katalysierten Reaktion nach Grinstaff.

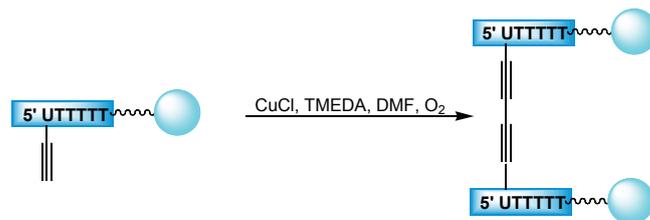


Abb. 5.9: Übersicht zur Glaser-Kupplung.

baut, um es mit chelatisierenden Ethinderivaten zu koppeln. Zum zweiten wurde 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin in die DNA eingebaut, um es mit chelatisierenden Bromiden zu koppeln (Abb. 5.11). Für ersteren Ansatz wurden das oben erwähnten Bromid **6** per Sonogashira-Reaktion mit dem speziellen Katalysator, der sich in situ aus dem Palladiumsalz und Tri-*tert*-butylphosphoniumtetrafluoroborat bildet, und Trimethylsilylethin in das entsprechende Ethinderivat **16** überführt (Abb. 5.10). Anschließend wurde **16** mit Tetra-*n*-Butylammoniumfluorid in Acetonitril entschützt.

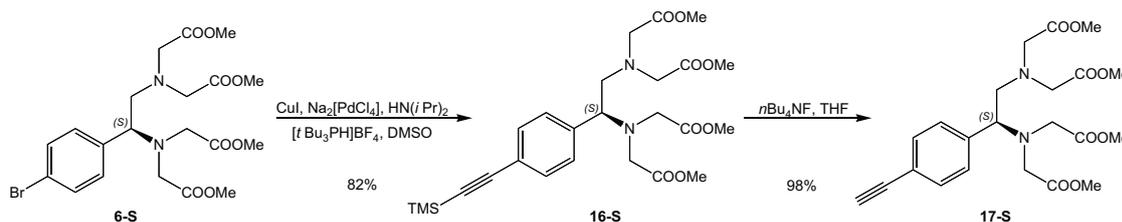


Abb. 5.10: Synthese der chelatisierenden Bausteine mit Ethinfunktion.

Die Sonogashira-Kreuzkupplung wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Palladiumkatalysatoren gewählt, unterschiedliche Lösungsmittel, Reaktionstemperaturen und Reaktionszeiten getestet, auch mit Mehrfachkupplungen wurde gearbeitet, aber die Reaktion lieferte keinen Umsatz. Sowohl die Reaktion an dem iodierten Dodecamer als auch an dem ethinylierten Dodecamer waren wohl sterisch zu anspruchsvoll. In der Literatur werden meist flexiblere Modifizierungen durch Sonogashira-Reaktionen an Oligonukleotide geknüpft [106,109]. Das Phosphoramidit des 5-Iod-2'-desoxyuridins und des 5-Ethin-2'-desoxyuridins wurde analog zu den anderen Phosphoramiditen hergestellt.

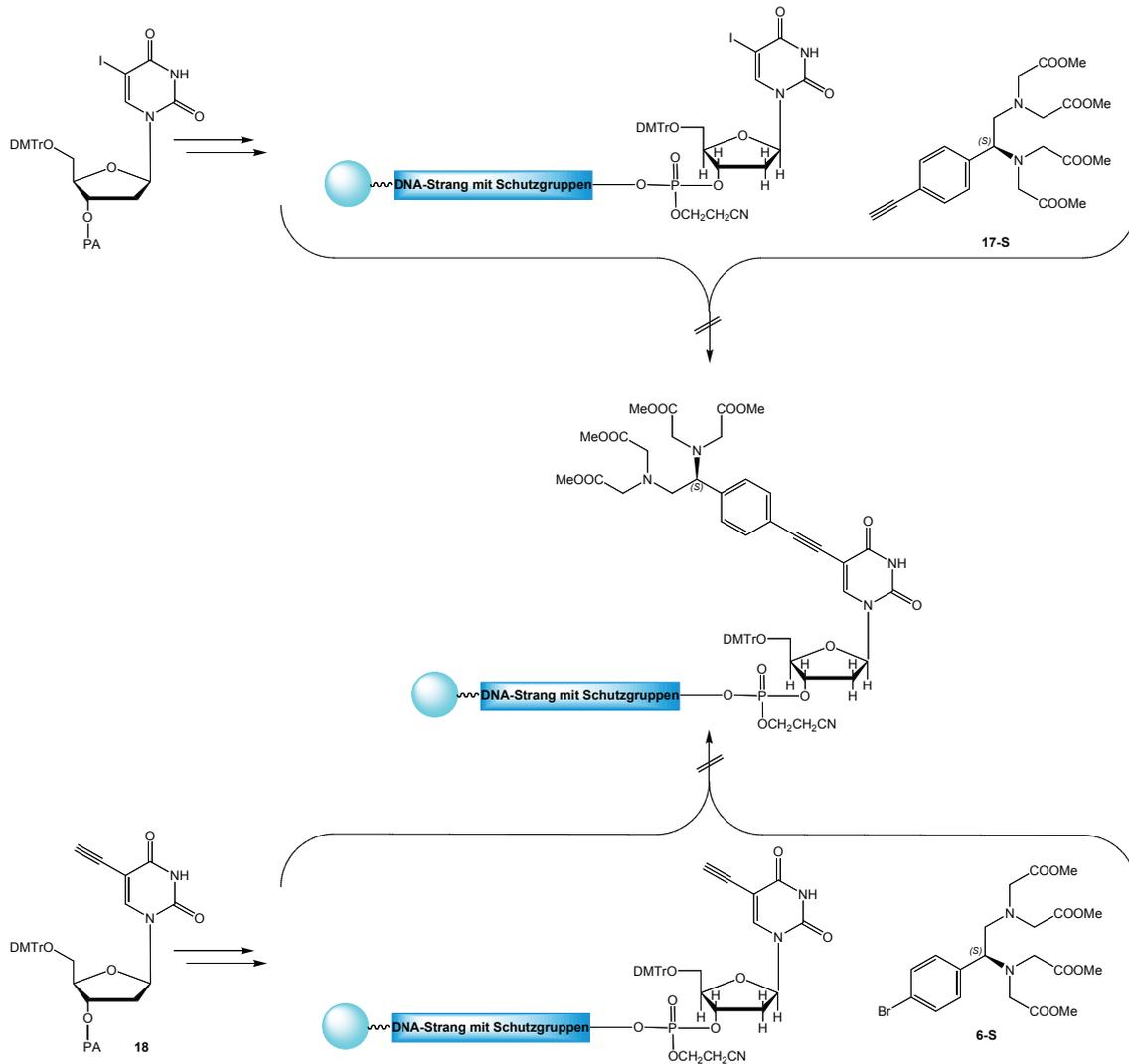


Abb. 5.11: Sonogashira-Reaktionen an festphasengebundener DNA.

5.5 Clickchemie

5.5.1 Allgemeines

Die Clickreaktionen sind nahezu perfekt ablaufende chemische Reaktionen. Entwickelt wurden sie von Sharpless, um eine große Vielfalt an chemischen Verbindungen möglichst einfach zugänglich zu machen [15]. In Abb. 5.12 sind einige dieser in wässriger Lösung ablaufenden exothermen Reaktionen dargestellt. Ungesättigte Kohlenstoffverbindungen stellen dabei

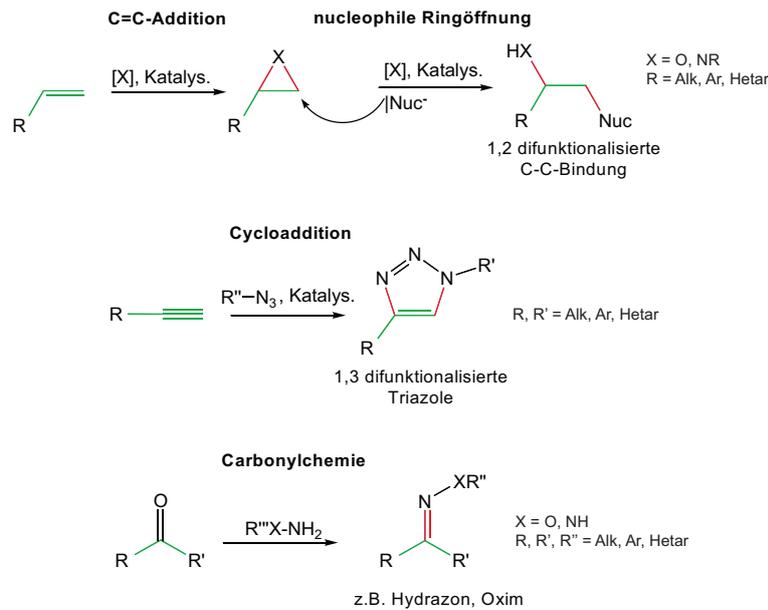


Abb. 5.12: Übersicht zu verschiedenen Clickreaktionen nach Sharpless.

rot: neu geknüpfte Bindungen, grün: Kohlenstoffgrundgerüst.

das Kohlenstoffgrundgerüst dar, das durch neu geknüpfte Kohlenstoff-Heteroatombindungen verändert wird.

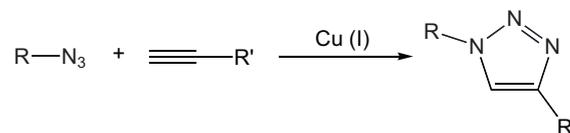


Abb. 5.13: Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition.

Die gängigste Clickreaktion ist eine Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition, die von Kupfer (I) katalysiert wird. Dabei reagiert ein organisches Azid mit einem Ethin zu einem Triazol (Abb. 5.13). Dies ist die zurzeit effektivste Clickreaktion [15, 16]. Diese Cycloaddition hat in den letzten Jahren eine weite Verbreitung erreicht, da sie kaum Nebenreaktionen aufweist und damit hohe Ausbeuten liefert. Zudem ist sie mit vielen funktionellen Gruppen kompatibel und verläuft unter sehr milden Bedingungen. Des Weiteren ist sie in wässrigen Lösungen durchführbar, die auch besonders gut die große freiwerdende Reaktionswärme dieser stark exothermen Reaktion aufnehmen können. Diese verschiedenen Aspekte haben sie besonders für die Biochemie interessant gemacht. Es sind bereits viele Clickreaktionen an Peptiden und an Oligonukleotiden bekannt. Darüber hinaus findet die Clickchemie Verwendung in der

Organometallchemie, so lassen sich Ethin-Rutheniumkomplexe beispielsweise mit Benzylazid modifizieren, ohne dass der Komplex zerstört wird [110].

Der von Fokin *et al.* vorgeschlagene Katalysezyklus der Clickreaktion ist in Abb. 5.14 dargestellt [111]. Die Aktivierung des Ethins erfolgt durch Angriff des Kupfer(I)ions am endständigen

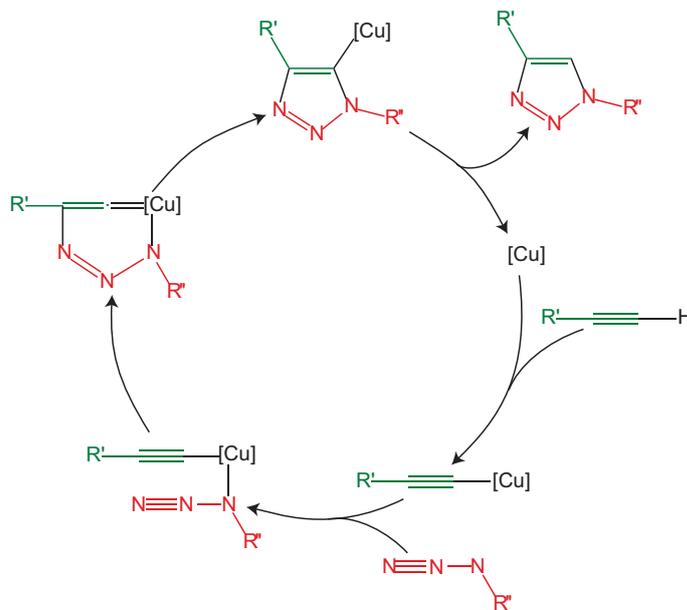


Abb. 5.14: Katalysezyklus der Huisgen 1,3- dipolaren Cycloaddition.

[Cu] = mono oder dinukleare Kupfer(I)komplexfragmente.

gen Ethin, das durch Basenzugabe deprotoniert ist. Der zweite Schritt des Katalysezyklus ist dabei der Ligandenaustausch des Kupfer(I)-Komplexes zu einem Kupferazidkomplex. Theoretisch ist dies ein schwach exothermer Vorgang, falls der Ligand Wasser oder Acetonitril ist. Im nächsten Schritt wird ein Kupfer(III)-Metallzyklus gebildet. Diese endotherme Reaktion besitzt eine sehr viel geringere Übergangsbarriere als die unkatalysierte Huisgen-Cycloaddition (ca. 15 kcal/mol statt 25 kcal/mol) und bildet die Basis der Reaktionsbeschleunigung durch Cu(I)-Zugabe. Im vierten Schritt wird der Ring zu einem Triazololyl-Kupferderivat kontrahiert, das im letzten Schritt durch Protolyse und Freisetzung des Katalysators zum gewünschten Triazol wird. In der Literatur wird diskutiert, ob die katalytisch aktive Spezies ein mononuklearer oder Dinuklearer-Kupfer(I)-Komplex ist [112]. Der neueste Artikel von Straub *et al.* 2007 liefert jedoch Indizien für einen mononuklearen Kupferkomplex.

5.5.2 Clickreaktionen an DNA

In den letzten Jahren wurden verschiedene Azide an ethinylmodifizierte DNA gekuppelt [113–116]. Beispielsweise erfolgte die Reaktion eines azidmodifizierten Farbstoffes an den *Cowpea Mosaicvirus* [116]. Dabei wurde Tristriazolylamin als Katalysatorzusatz eingesetzt, der die Reaktion beschleunigt und die Nebenreaktionen einschränkt. Von Carell *et al.* [114] wird die Reaktion von verschiedenen Aziden mit 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin und 5-Octyldi-1",7"-in-2'-desoxyuridin beschrieben.

In der Literatur werden auch Clickreaktionen an Peptiden beschrieben. Besonders hervorzuheben sind dabei Clickreaktionen an Aminosäuren, die am Harz der Peptidfestphasensynthese gebunden sind [117, 118] und somit einen geringeren Aufwand bei der Aufarbeitung erfordern. Auch Clickreaktionen an der festphasengebundenen DNA sind wegen der leichteren Aufarbeitung wünschenswert. In dieser Arbeit bietet dies zudem den Vorteil, dass das freie EDTA-Derivat (ohne Methylesterschutzgruppen) als Clickedukt verwendet werden kann und die gebundenen Kupferionen anschließend mit wässriger EDTA-Lösung aus dem festphasengebundenen Komplex gewaschen werden können. Dadurch wird die spezielle Aufarbeitung mit Natronlauge anstelle von Ammoniak überflüssig und auch die Trennung von überschüssigem Azid und DNA kann durch Waschen der festphasengebundenen DNA mit Acetonitril eingespart werden.

5.5.3 Darstellung von DNA mit einem *spin label*

Nachdem die Clickreaktionen an Monomeren 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin mit verschiedenen Aziden gut verliefen, wurde als erstes DNA mit einem *spin label* als Modifizierung synthetisiert (Abb. 5.15). *Spin label* sind stabile radikalische Verbindungen, meist basierend auf dem Radikal TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy), die an Biomoleküle gebunden werden. Ihr ungepaartes Elektron sorgt für die paramagnetische Relaxationsbeschleunigung (PRE). Die Einführung eines *spin label* stellte eine gute Testreaktion dar, da das zugehörige

Azid relativ klein und flexibel ist und somit den bereits bekannten DNA-Clickreagenzien ähnelt.

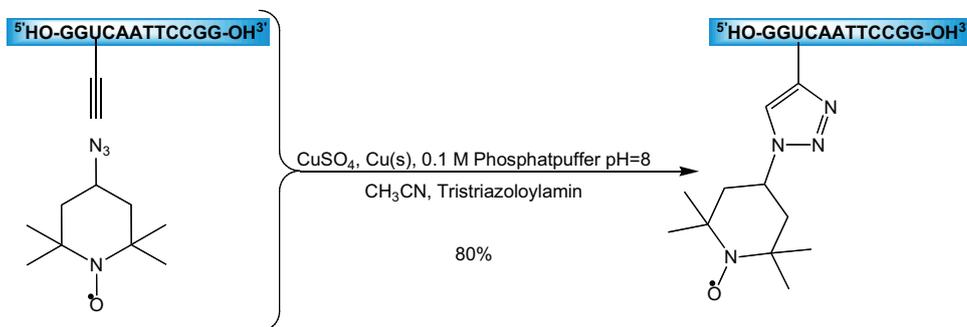


Abb. 5.15: *Spin label*-Einführung in DNA mittels Clickchemie.

Die Synthese dieser *spin labeled* DNA ist sehr effektiv und einfach. Bereits bekannte *spin labeled* DNAs wurden meist durch Festphasensynthese mit dem korrespondierenden Phosphoramidit synthetisiert. NMR-spektroskopisch werden derartige Oligonukleotide meist zur Untersuchung von Protein-DNA-Komplexen genutzt, insbesondere zur Lokalisierung von Bindungsstellen. Die Synthese des radikalischen Azides ist in Bushmakina *et al.* [119] beschrieben. In dieser Arbeit wurde ein *spin label* derart an die DNA gebunden, dass die Struktur der dsDNA kaum beeinflusst war. Damit ist es hervorragend für PRE-Messungen oder auch ESR-Messungen geeignet.

5.5.4 Darstellung von DNA mit einem TE-Tag

Eigentliches Ziel der Arbeit ist die Synthese von chelatisierenden Oligonukleotiden. Um die in Abschnitt 6.3 bereits hergestellten Verbindungen weiter nutzen zu können, wurde die Synthese von 5-Azidomethyl-2'-desoxyuridin geplant, allerdings stellte sich diese als nicht durchführbar heraus, da die Azidfunktion durch das Phosphoramidit reduziert wurde und somit diese beiden Gruppen nicht miteinander kompatibel sind.

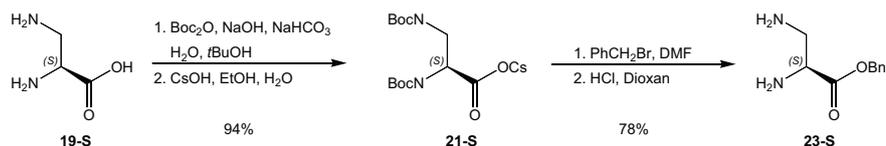


Abb. 5.16: Schema zur Synthese von Diaminopropionsäurebenzylester.

Im weiteren Verlauf dieses Projektes wurde deshalb ein EDTA-modifiziertes enantiomerenreines Azid synthetisiert, das eine Clickreaktion mit einer ethinfunktionalisierten DNA eingehen soll. Die Synthese wurde auf Basis von [120] entwickelt. Ausgegangen wurde dabei von *D*- oder *L*-Diaminopropionsäure **19**. Die Synthese der beiden Enantiomere erfolgte dabei analog. Nach einer Boc(*tert*-Butyloxycarbonyl)-Schützung der Aminogruppen wurde anschließend die Hydroxylfunktion über ein Cäsiumcarboxylat zum Benzylester geschützt. Dann wurden die Boc-Gruppen sauer abgespalten (Abb. 5.16).

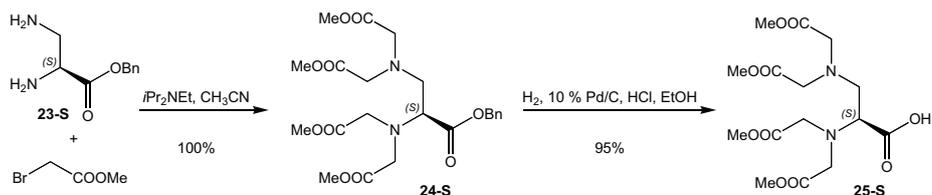


Abb. 5.17: Synthese des (S)-1- Carboxylethylendiamintetraessigsäuretetramethylesters

Danach wurde die Aminofunktion mit Bromessigsäuremethylester alkyliert (Abb. 5.17). Um **25-S** zu erhalten wurde dann der Benzylester durch eine Hydrogenolyse unter Palladium-Katalyse entfernt. Die freie Carboxylgruppe wurde nun mit HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat) aktiviert und mit 4-Azidoanillin zum Amid **26-S** umgesetzt (Abb. 5.18). So erhielt man ein EDTA-modifiziertes Azid, das in Clickreaktionen eingesetzt werden kann.

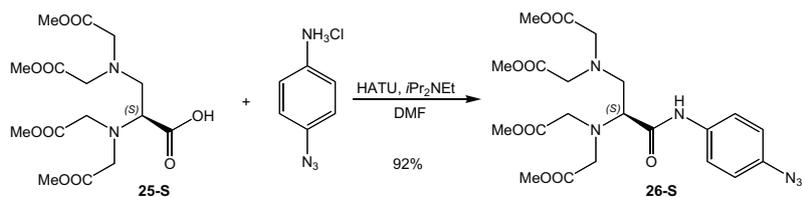


Abb. 5.18: Synthese des EDTA-modifizierten Azids.

Die Reaktion von **26-S** mit diacetyliertem 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin verlief quantitativ zum gewünschten Clickprodukt, einem Thyminderivat mit TE-Tag. Aber die Reaktion an ethinmodifizierter DNA lieferte trotz mehrfacher Umsetzung und längeren Reaktionszeiten nur bis zu 10% Ausbeute. Dabei waren die Retentionszeiten an HPLC-C18 Säulen identisch und Edukt- und Produkt-DNA konnten nur analytisch über eine Anionenaustauschersäule getrennt werden. Neben den in Abbildung 5.19 genannten Reaktionsbedingungen wurden noch viele weitere getestet, z. B. Temperaturen von 0 bis 50 °C, die Nutzung von anderen Lösungsmitteln wie DMSO und *tert*-Butanol anstelle von Acetonitril, die Nutzung von Triethylammoniumacetatpuffer (0.1 M, pH = 7) anstatt des Phosphatpuffers und verschiedene Kupfer(I)katalysatorsysteme wie Cu(I)Br, CuSO₄/Cu(nanosize).

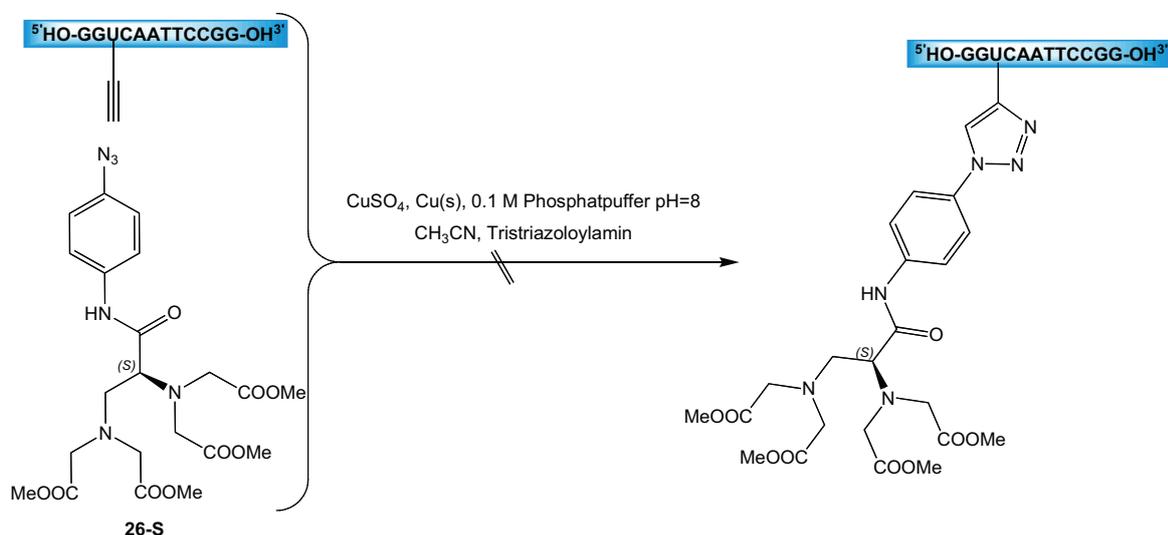


Abb. 5.19: Synthese einer DNA mit TE-Tag.

5.5.5 Darstellung von EDTA-modifizierten DNA mit einem zyklischen Alkylazid

Azide, die an ein aromatisches System gebunden sind, werden mesomeriestabilisiert und sind demzufolge weniger reaktiv als Alkylazide. Aus diesem Grund wurde ein EDTA-modifiziertes Azid synthetisiert, das anstelle des Phenylringes einen *trans*-substituierten Cyclohexanring aufweist. Die *trans*-Substitution ist wichtig für die Rigidität der Ausgangsverbindung. *Trans*-1,4-substituierte Cyclohexanringe bilden stets eine stabile Sesselkonformation aus, mit beiden

Substituenten in äquatorialer Stellung. Bei *cis*-substituierten Cyclohexanen muss ein Substituent in äquatorialer und der andere in axialer Position liegen. Dies führt energetisch zu einer nicht so stabilen Konformation.

cis-4-Aminocyclohexanol wurde in einem ersten Schritt Boc geschützt und dann als Mesylat aktiviert. Durch Umsetzung mit Natriumazid erfolgte eine S_N2 -Reaktion, deren Stereospezifität chromatographisch kontrolliert wurde. Dazu wurde analog zur *trans*-Verbindung die *cis*-Verbindung aus *trans*-4-Aminocyclohexanol hergestellt (Abb. 5.20).

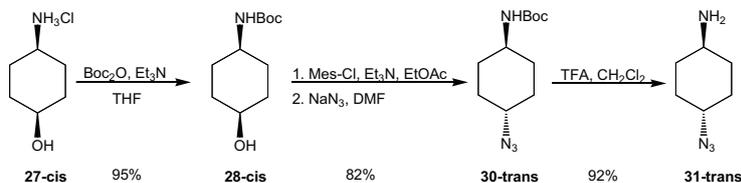


Abb. 5.20: Synthese des *trans*-4-Aminocyclohexylazid.

31-trans und **31-cis** haben als Diastereomere verschiedene Retentionszeiten an HPLC-C18-Säulen. In Abb. 5.21 sind die LC-MS-Chromatogramme der *cis*- und *trans*-Verbindung und eines Gemisches der beiden abgebildet. Analog zum Azidoanilin, kann **31-trans** an die Carboxylfunktion von **25-S** gekuppelt werden (Abb. 5.22).

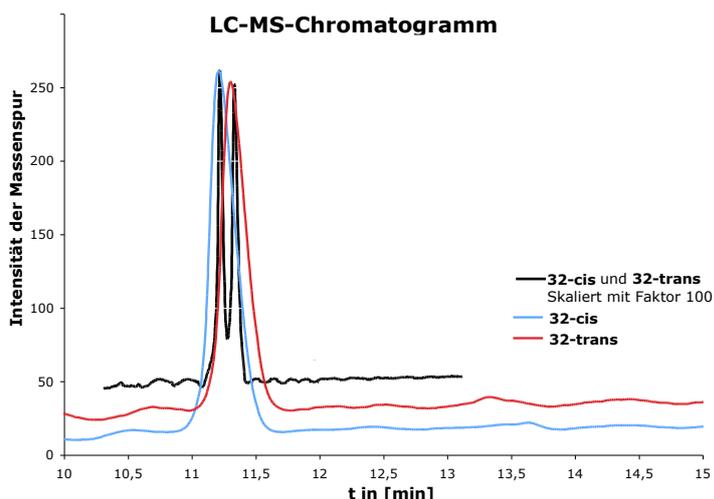


Abb. 5.21: LC-MS-Chromatogramm zur Untersuchung der Stereoselektivität der S_N2 -Reaktion (Gradient: 0-25% in 25 min mit 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH = 7 gegen Acetonitril).

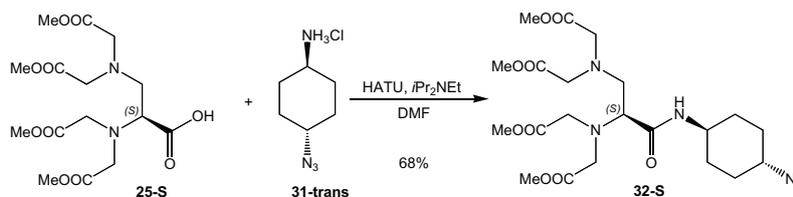


Abb. 5.22: Synthese des EDTA-modifizierten Alkylazides.

Clickreaktionen an ein DNA-Dodecamer mit einem eingebauten Ethindesoxyuridin an dritt-letzter Position wurde mit bis zu 60% Ausbeute durchgeführt. Die anschließende HPLC-Aufreinigung an einer *reversed phase*-C18-Säule stellte sich aber erneut als unmöglich heraus, da oligomeres Edukt und Produkt identische Retentionszeiten aufwiesen. Im ESI-Massenspektrum des aufgefundenen Peaks wurde sowohl Edukt als auch Produkt detektiert.

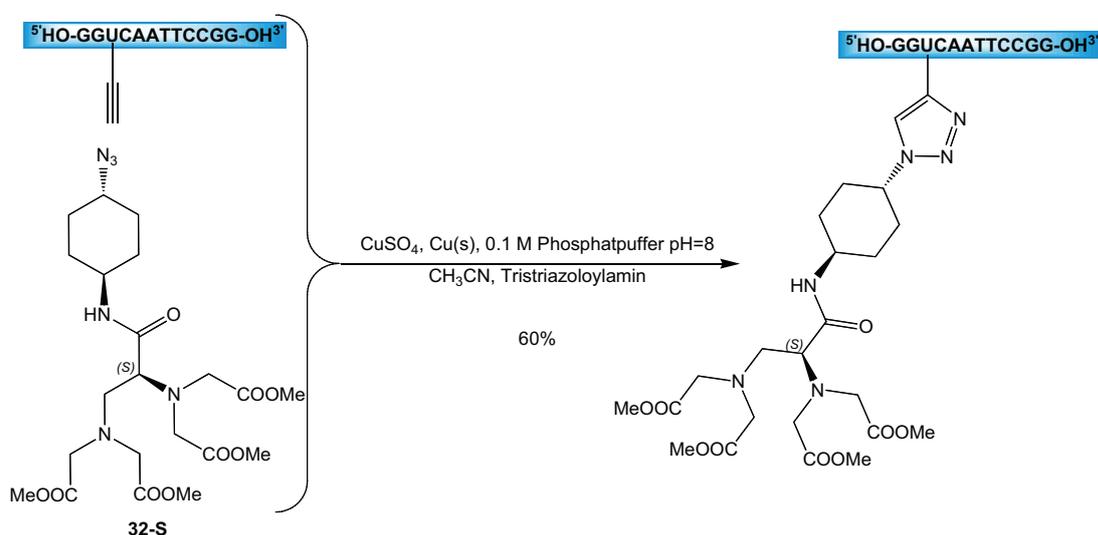


Abb. 5.23: Clickreaktion mit eines zyklischen Alkylazid.

5.5.6 Darstellung von DNA mit EPTE-Tag

Prinzipiell ist die Clickreaktion eine so populäre Reaktion aufgrund ihres vollständigen Ablaufs. Vermutlich wurde dies im obigem Fall aufgrund sterischer Einschränkungen nicht erreicht. Sehr rigide aber sterisch wesentlich leichter zugänglich sollte die endständige Dreifachbindung eines 5-(4-Ethynylphenylethynyl)-2'-desoxyuridin sein. Ein ähnliches Prinzip ver-

wenden auch Chittepu *et al.*, die eine Octa-1,7-diinylgruppe als Modifizierung an 5-Position verwenden [99]. Mit Hilfe einer zusätzlichen Sonogashira-Kupplung konnte das gewünschte Phosphoramidit leicht aus **11** gewonnen werden (Abb. 5.24). Bei der anschließenden Entschützung in Tetra-*n*-butylammoniumfluoridlösung wurde mit Triethylamin als zusätzlichem basischen Reagenz gearbeitet, um die DMTr-Schutzgruppe zu stabilisieren.

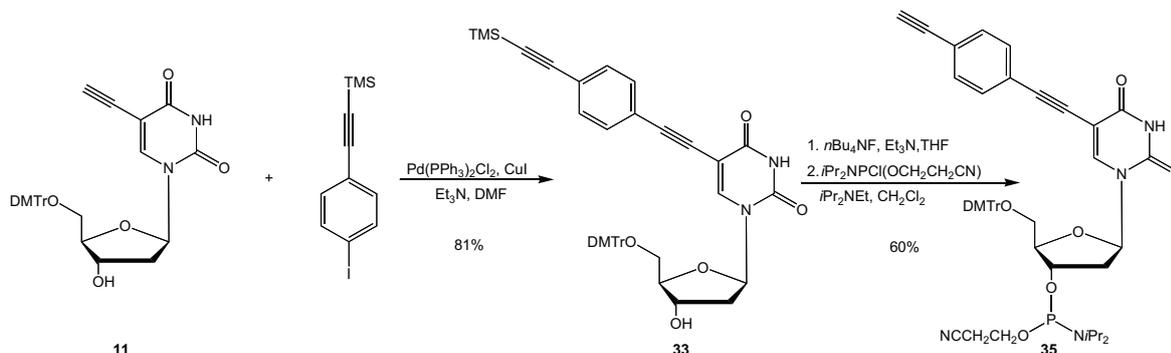


Abb. 5.24: Synthese des verlängerten ethinylfunktionalisierten Desoxyuridins und dessen Phosphoramidits.

Sterische Hinderung der Alkinfunktion des Desoxyuridins konnte durch Verwendung eines 5-[(4-Ethinyl)phenylethinyl]-2'-desoxyuridins vermindert werden. Die Clickreaktion an derart modifizierter DNA mit dem zyklischen Alkylazid verlief quantitativ (Abb. 5.25). Danach wurde die DNA noch alkalisch aufgearbeitet, um die Methylesterfunktion zu entschützen. Würde man mit der freien EDTA-Funktion eine Clickreaktion vornehmen, so befänden sich Kupferionen in der EDTA-Tasche, die sowohl das NMR-Spektrum stark verbreitern, als auch eine Beladung mit Lanthanoidionen behindern würden.

Um die Aufarbeitung der getaggtten DNA zu verkürzen wurde die Clickreaktion an den festphasengebundenen Oligonukleotiden entwickelt. Vorteil hierbei ist, dass ungeschützte EDTA-Azide **26b** verwendet werden können (Abb. 5.26). Während der Clickreaktion sind auch geringe Konzentrationen von Kupfer(II)-Ionen in Lösung, die einen Komplex mit der EDTA-Funktion bilden. Diese Kupferionen konnten bei einer Reaktion an der Festphase einfach durch Waschen mit einer 0.1 M EDTA-Lösung bei pH 7 entfernt werden. Das überschüssige Azid und das Tristriazolylamin wurden durch mehrfaches Waschen mit einem 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer-Acetonitrilgemisch (1:1) entfernt. Anschließend konnten die

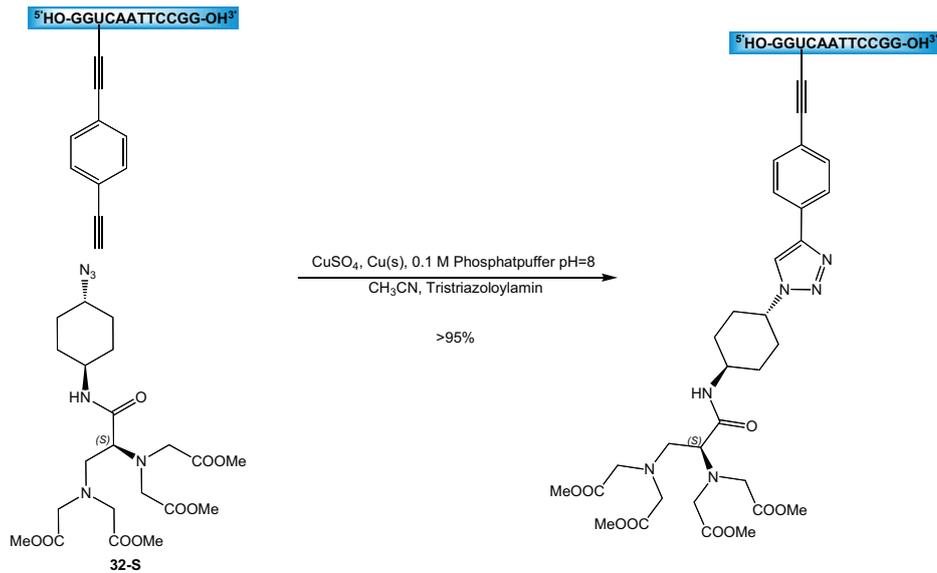


Abb. 5.25: Clickreaktion des verlängerten ethinfunktionalisierten Desoxyuridins mit dem Alkylazid **32-S**.

Oligonukleotide unter Standardbedingungen (konz. Ammoniak, 55 °C) abgespalten werden. Die erhaltene DNA musste nur einmal über HPLC-gereinigt werden, da nur die Trennung von gewünschter DNA und ihren Abbruchsegmenten nötig war (Abb. 5.27). Hierbei gelang auch die Clickreaktion mit dem aromatischen Azid **26b-S**.

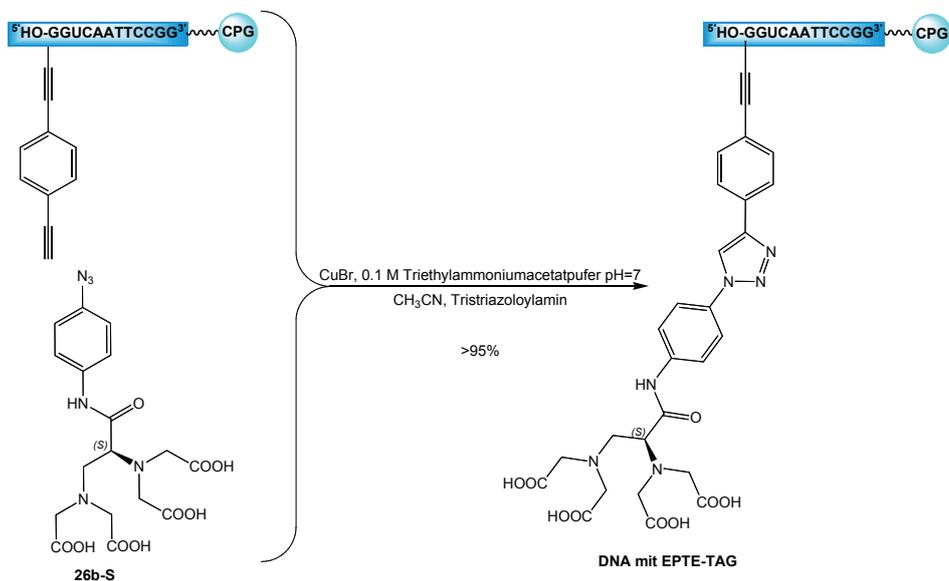


Abb. 5.26: Clickreaktion des verlängerten ethinfunktionalisierten Desoxyuridins mit dem aromatischen Azid **26b-S** an der Festphase.

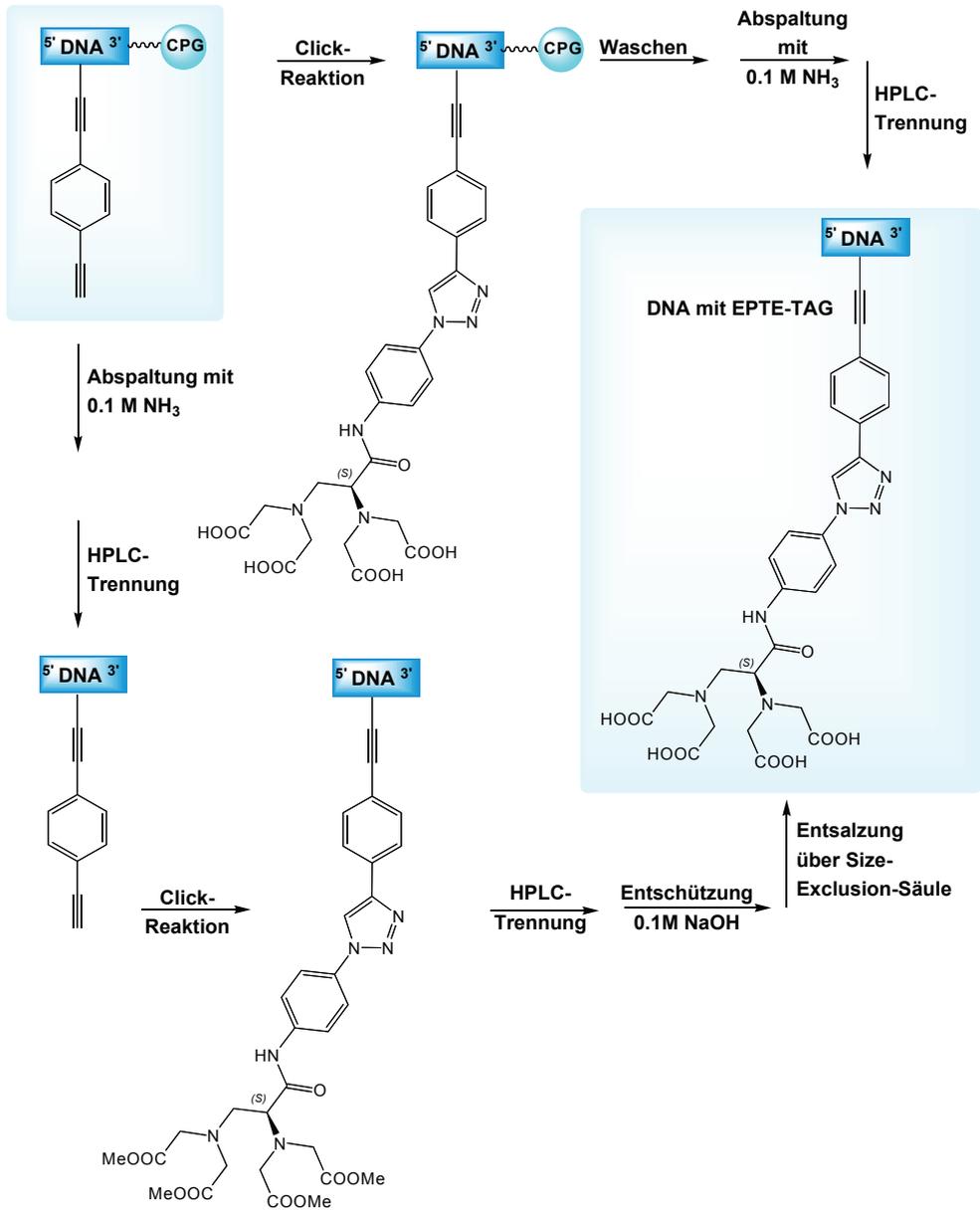


Abb. 5.27: Überblick der Aufarbeitung der EPTE-getaggen DNA.

5.6 Tagging über eine Disulfidbrücke

Bereits seit 1975 setzt man Thiosulfonate zur Modifizierung von Cysteinresten ein, um asymmetrische Disulfide zu erhalten. Methylmethanthiosulfonat (MMTS) ist dabei ein gängiges Sulfonierungsmittel [121,122]. Diese Derivatisierungsmethode wird zunehmend auch für Proteine eingesetzt, wobei zu beachten ist, dass nur solche Cysteine modifiziert werden, die gut für Lösungsmittel zugänglich sind. Cysteine, die im Inneren der Proteine liegen, sind inert. Ein Vorteil dieser Modifizierungsmethode ist die Unempfindlichkeit gegenüber funktionellen Gruppen wie Säuren, Radikalen etc.. Durch die spezifische Reaktion ist die Einführung von Schutzgruppen nicht nötig. Beispiele für NMR-technisch interessante Modifizierungen sind in Abb. 5.28 dargestellt. Die ersten beiden Modifizierungen [12, 123, 124] stellen Derivate von chelatisierenden Verbindungen dar, nämlich EDTA und DTPA. Sie werden in das Protein eingebracht, um eine stark metallionenaffine Stelle im Protein zu schaffen.

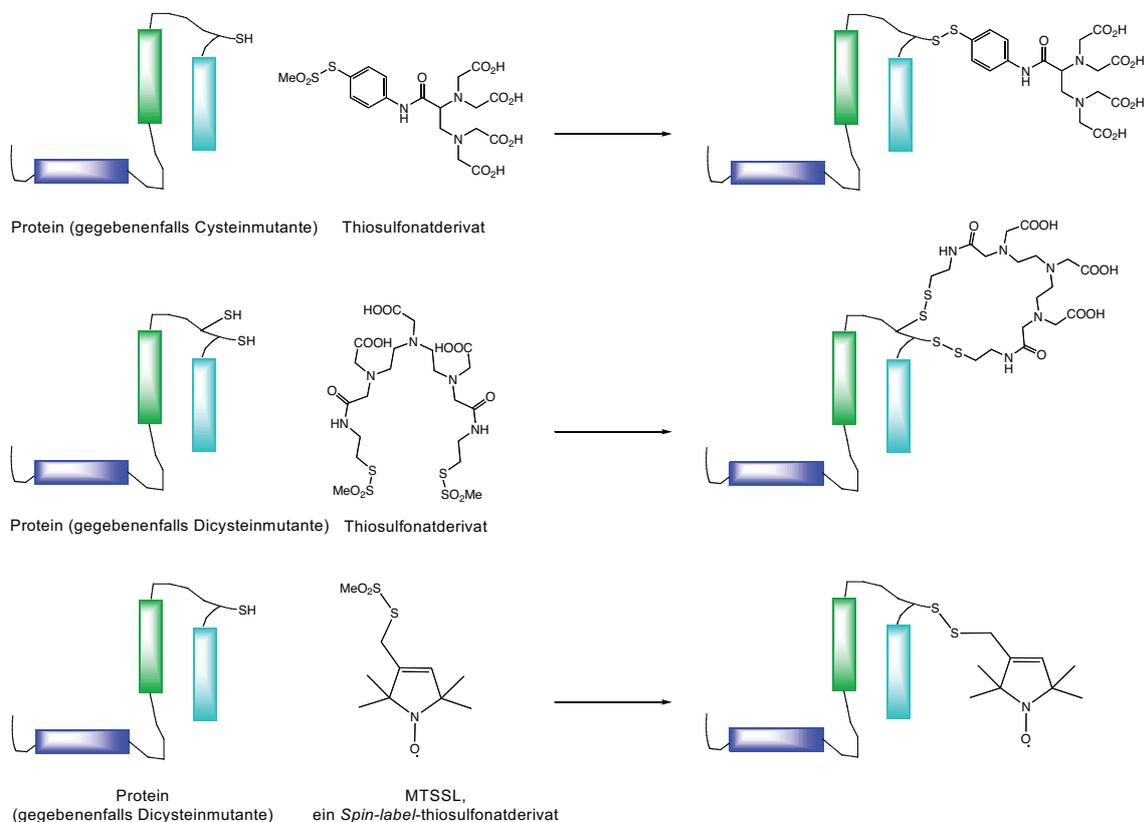


Abb. 5.28: Beispiele zur Modifizierung von Cysteinen [12, 123, 124].

Disulfidbrücken werden aber auch genutzt, um andere Biomoleküle zu modifizieren [125,126]. So werden beispielsweise Zucker mit Hilfe von Disulfidbrücken modifiziert, aber auch an DNA-Bausteinen wurden derartige Modifizierungen schon vorgenommen. Ein Beispiel ist die Bildung des TT-Pyridin(6-4)-pyrimidon-Photoaddukts aus dem 4-Thiotymidinanaloga (Abb. 5.29) [127].

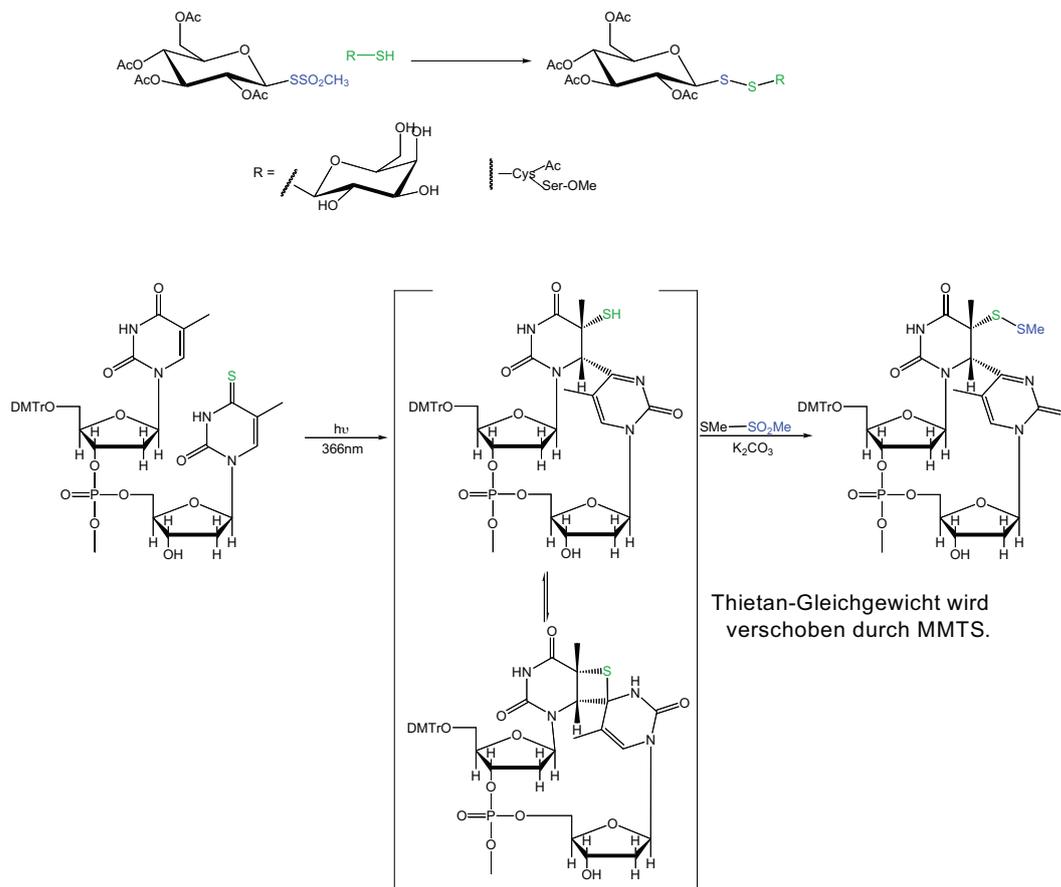


Abb. 5.29: Reaktionsbeispiele an Zuckern und Nucleosiden.

Das 4-Thio-2'-desoxythymidinphosphoramidit ist kommerziell erhältlich und durch die Thio-keto-thioenol-Tautomerie sollte es für Reaktionen mit Methanthiosulfonaten zugänglich sein. Ein Beispiel für die Reaktion findet sich in [128]. Abb 5.30 zeigt, dass die Sulfonierung am Mononucleotid ThiodT bei 50°C mit zufriedenstellender Ausbeute abläuft. Bei Modifizierungsversuchen an Dodecameren mit eingebautem ThiodT stellte sich aber heraus, dass die Reaktion an Oligonucleotiden sehr schleppend verläuft und nur Ausbeuten von etwa 30% ergibt.

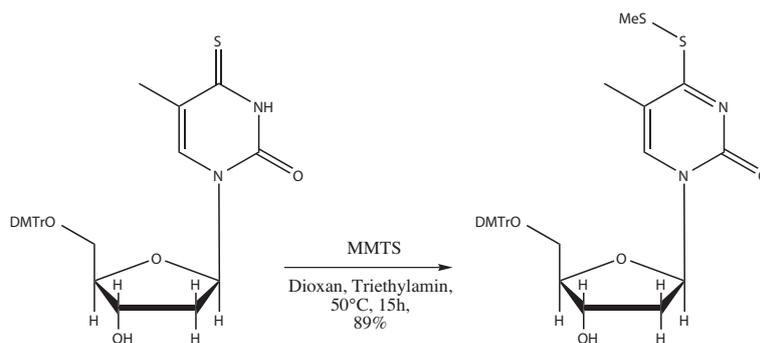


Abb. 5.30: Taggingreaktion an 4-Thio-2'-desoxythymidin.

Zudem beeinflusst eine derartige Modifizierung die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren. In Abb. 5.31 ist dargestellt, zu welcher Struktur eine einfache Konformations-simulation mit Macromodel führt. Die Basen-Paarung zwischen den Nukleotiden ist dabei geschwächt, einerseits durch die fehlende Wasserstoffbrückenbindung, andererseits durch die erhöhte sterische Hinderung gegenüber Modifizierungen an der 5-Position des Thymidins. Um diese Destabilisierung des DNA-Doppelstranges zu verhindern, kann man ein Thymin-derivat mit einer Thiofunktion an der 5-Position der Pyrimidin verwenden. Eine Struktur-simulation der mit Macromodel energieminierten Strukturen ist ebenfalls in Abbildung 5.31 dargestellt.

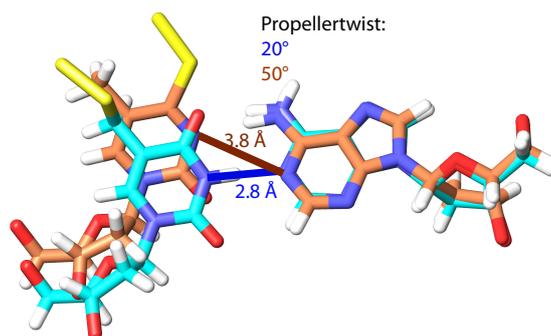


Abb. 5.31: Macromodelsimulation der an 4(orange)- und 5(blau)-Position getaggten DNA. Die Modifizierung befand sich dabei flankiert von je drei unmodifizierten Basenpaaren in 3'- und in 5'-Richtung der DNA. Nur der für die Basenpaarung relevante Bildausschnitt ist dargestellt.

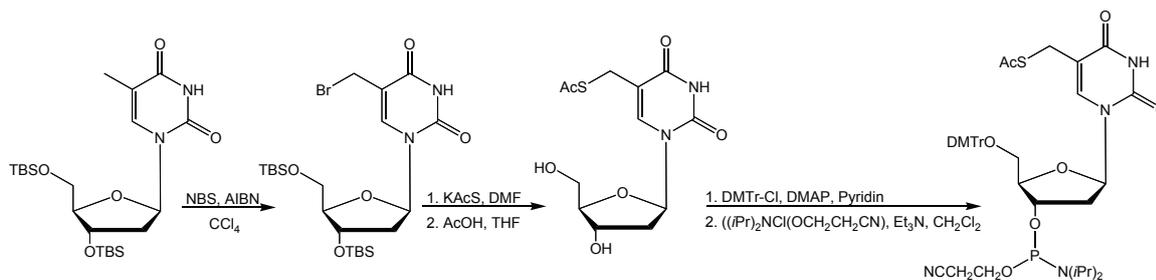


Abb. 5.32: Synthese von *S*-Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin.

Das entsprechende *S*-Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin wurde bereits von Bornemann *et al.* synthetisiert [129]. In Abb. 5.32 ist die Syntheseroute dargestellt. Um *S*-Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin schneller und effizienter zu synthetisieren, wurde die Reaktionsroute verändert. Die alternative Syntheseroute ist in Abb. 5.33 dargestellt [130]. Ausgehend vom 2'-Desoxyuridin wurde 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin in einer Prins-Reaktion synthetisiert. Anschließend erfolgte eine nukleophile Substitution zum *S*-Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin, das analog zu Bornemann *et al.* mit den benötigten Schutzgruppen zum korrespondierenden Phosphoramidit umgewandelt werden konnte. Zu beachten ist dabei, dass eine komplette Aufreinigung von **36** und **37** nicht stattfand und erst das DMTr-Derivat **38** chromatographisch gereinigt wurde. Die Ausbeute über drei Stufen betrug dabei nur 6%.

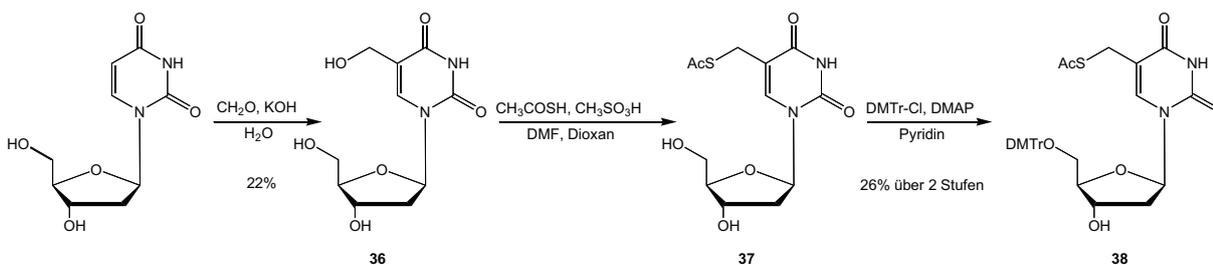


Abb. 5.33: Dreistufige Synthese von *S*-Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin.

Das *S*-Acetyl-5-mercaptomethyl-dU-Phosphoramidit ließ sich per Festphasensynthese mit guten Ausbeuten einbauen und besaß eine ähnliche Kupplungseffizienz wie unmodifizierte Basen. Die Abspaltung verlief unter speziellen Bedingungen. In einem ersten Schritt wurde die DNA mit 0.1 M DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en)-Lösung in Acetonitril für 30 min bei Raumtemperatur behandelt, um die Thiolgruppe zu deacetylieren. Anschließend

erfolgte die Abspaltung von der Festphase unter reduktiven Bedingungen mit 1 M Dithiothreitol (DTT)-Lösung in konzentriertem Ammoniak (Abb. 5.34). Nach chromatographischer Aufreinigung erfolgte die Modifizierung der 5-Thiolgruppe an der drittletzten Position des Oligomers mit **36** in neutraler wässriger Lösung innerhalb von 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die Umsetzung erfolgte quantitativ. **36** ist bereits durch das Tagging von Proteinen bekannt [13].

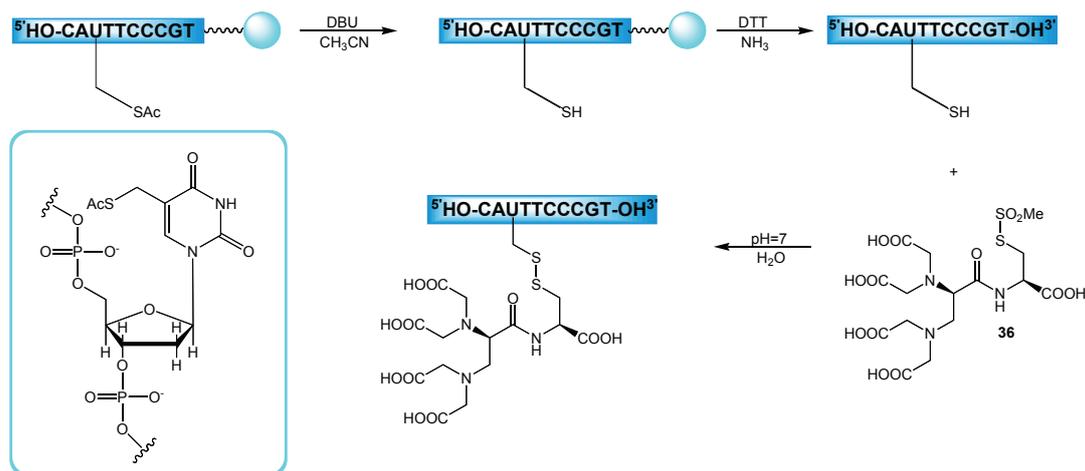


Abb. 5.34: Schematische Darstellung der Synthese von DNA mit einem DSE-Tag.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Einführung einer EDTA-Funktion in Oligonucleotide über eine Disulfidbrücke in Lösung sehr gut funktioniert. Prinzipiell sollte es auch möglich sein **36** mit Lanthanoidionen zu beladen und anschließend mit der DNA zu verbinden. So kann die Titration von Lanthanoidionen zu DNA umgangen werden. Auch andere Modifizierungen sollten so einfach an Oligonucleotide gebunden werden können. Diese Taggingreaktion ist aufgrund der milden Reaktionsbedingungen auch zur Modifizierung von labilerer RNA geeignet.

Die korrespondierende Tagging-Reaktion an der festphasengebundenen DNA verlief erfolglos. Dabei wurde nach der Behandlung mit DBU das Thioacetat zugegeben. Anschließend wurde sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von DTT die Abspaltung mit konz. Ammoniak durchgeführt. Das gewünschte Produkt konnte nicht nachgewiesen werden.

Kapitel 6

Analyse der Oligonukleotide

6.0.1 Massenspektroskopie getaggtter Oligonukleotide

Mit Hilfe von Massenspektrometern lässt sich das Verhältnis von Masse zu Ladung messen. Dazu wird im ersten Schritt eine elektrische Ladung auf das zu untersuchende Molekül übertragen (Ionisation), anschließend wird dieses geladene Teilchen im Detektor analysiert. Bei Makromolekülen ist eine besonders schonende Ionisation von Nöten, damit das Biomolekül nicht zu großen, zerstörerischen Kräften ausgesetzt ist. Die Elektronensprayionisation ist eine milde Ionisationsmethode, die für Makromoleküle gut geeignet ist.

Bei der Massenspektroskopie von Oligonukleotiden mit ihrem Phosphatrückgrat ist die Ionisierung mit Hilfe negativer Ladung gegenüber der mit positiver Ladung von Vorteil. Bei Messung im Positiv-Modus bilden sich verschiedene Natriumaddukte, die zu einem schwer analysierbaren Massenspektrum mit diversen Signalen führen. Im Negativ-Modus dagegen wurden meist die Oligonukleotidmassen ohne oder mit nur ein bis zwei koordinierten Natriumionen detektiert. Dabei waren sie meist mehrfach negativ geladen (Abb. 6.1).

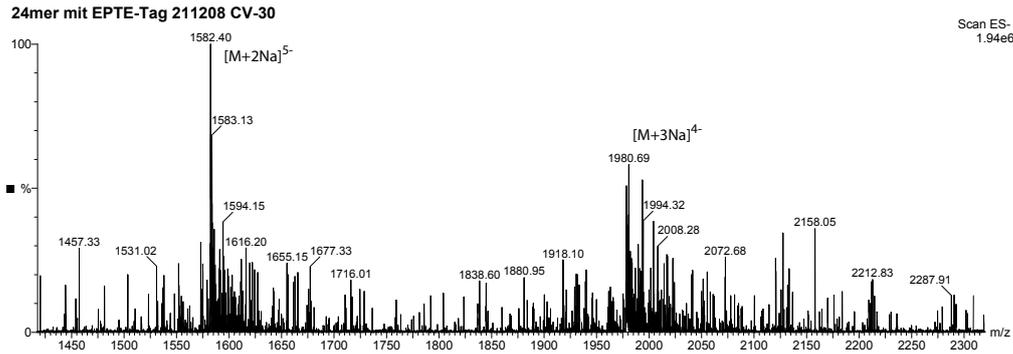


Abb. 6.1: ESI-Massenspektrum der 24meren DNA mit EPTE-Tag im Negativ-Modus. Die Lösung lag in 100 mM Triethylammoniumacetatpuffer vor (pH=7).

Komplexiert man die getaggte DNA mit Lanthanoidionen, so lässt sich die Masse des Komplexes im Negativ-Modus detektieren (Abb. 6.2).

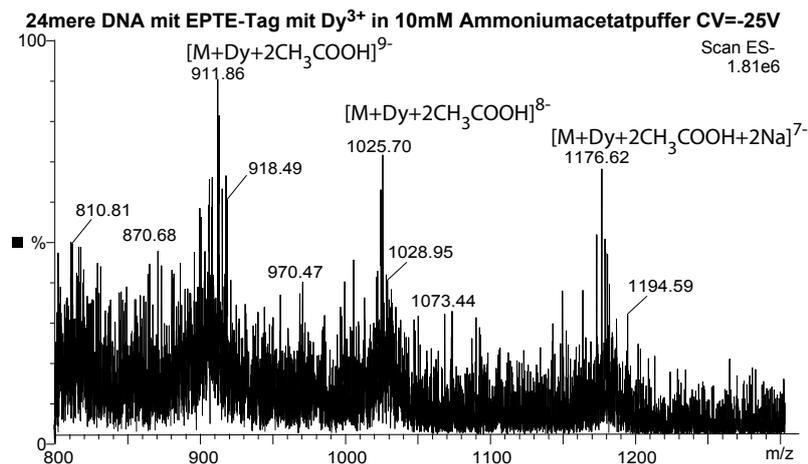


Abb. 6.2: ESI-Massenspektrum der 24meren DNA mit EPTE-Tag mit Dy^{3+} im Negativ-Modus. Die Lösung lag in 10 mM Ammoniumacetatpuffer vor (pH=7).

6.1 Zur Auswahl der Sequenzen

In den ersten Experimenten zur Modifizierung von Oligonukleotiden wurde eine dodecamere DNA-Sequenz verwendet, die eine ähnliche Basenabfolge wie die Dickerson-DNA besitzt [131]. Im Gegensatz zu dieser ist sie jedoch nicht palindronisch, damit nur eine Modifi-

zierung pro Duplex vorhanden ist (Abb. 6.3 links). Im Verlauf der Arbeit wurde später ein kürzeres Decamer verwendet (Abb. 6.3 rechts), welches einen Ausschnitt aus einer STAT-bindenden Sequenz darstellt (siehe Kapitel 3) [20–22]. Dabei wird ein Strang des Oligonukleotids modifiziert und anschließend mit dem Gegenstrang versetzt und hybridisiert.



Abb. 6.3: Dodecamere DNA und die decamere DNA. Mit einem Sternchen markiert ist das Thymin, das durch die getaggte Base ersetzt wurde.

Die Schwierigkeit dabei stellt die genaue Konzentrationsbestimmung der beiden Stränge dar, um ein genau äquimolares Verhältnis und damit das Vorliegen eines reinen Doppelstranges zu gewährleisten. Normalerweise verwendet man zur Konzentrationsbestimmung die UV-Absorption bei 260 nm, um die Menge an Oligonukleotid in Lösung zu bestimmen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der Probe [132].

Durch den Tag kann es zu einer veränderten UV-Absorption kommen, die die gängige Konzentrationsbestimmung verfälscht. Besonders deutlich zu erkennen ist diese Veränderung bei dem Vergleich des Absorptionsspektrums von DNA ohne Modifizierung und DNA mit EPTE-Tag. Durch das große aromatische System des Tags bildet sich ein zweites lokales Absorptionsmaximum bei 320 nm (Abb. 6.4).

Um einen reinen Doppelstrang zu erhalten, wurde deshalb eine HPLC-Methode entwickelt, mit Hilfe derer man gepaarte und ungepaarte DNA trennen kann. Dabei konnte auch das Verhältnis von dsDNA zu ssDNA ermittelt werden, sowie welcher Strang im Überschuss vorlag (siehe Abschnitt 6.2.2).

Um die Titration von Strang zu Gegenstrang zu vermeiden wurde an die STAT-Sequenz ein Tetraloop angebracht (Abb. 6.5). Dieser hat den weiteren Vorteil, dass er die Stabilität

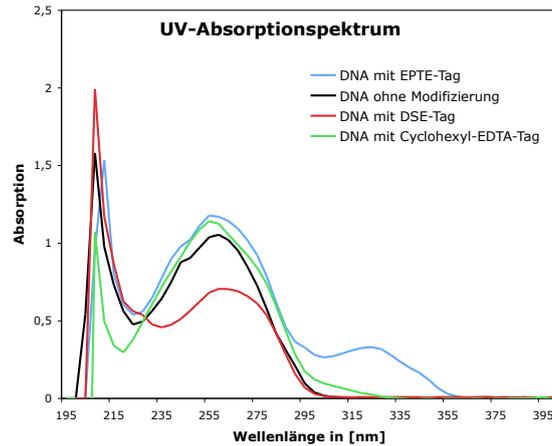


Abb. 6.4: Veränderte UV-Absorption durch den EPTE-Tag.

des Doppelstranges erhöht. Von zusätzlichem Interesse ist, dass die Clickreaktion auch an dieser potentiell als Duplex vorliegenden DNA stattfindet, was die Robustheit der Methode untermauert. In Abschnitt 3.4 und 3.5 ist die Strukturaufklärung dieser Sequenz beschrieben.



Abb. 6.5: 24mer Hairpin-DNA basierend auf einer STAT-bindenden Sequenz.

6.2 HPLC von Oligonukleotiden

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem ein Laufmittelgemisch durch eine stationäre Phase mit erhöhtem Druck gepumpt wird. Das Trennvermögen der HPLC-Chromatographie ist circa 100 mal größer als das der Säulenchromatographie. Zur Analyse der Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene HPLC-Methoden verwendet, einerseits die *reversed phase*-HPLC (RP-HPLC) und andererseits die Anionenaustauscher-HPLC. Letztere liefert ähnliche Trenneigenschaften wie die Gelelektrophorese.

6.2.1 Reversed phase-HPLC

Bei der RP-Chromatographie wird eine unpolare stationäre Phase und ein polares Laufmittel verwendet. Die unpolare Phase besteht dabei aus Silicagel, das mit langkettigen Alkanen (z. B. Octadecyl) modifiziert ist. Als polare Phase werden Wasser, Acetonitril oder Methanol verwendet. Diese Methode ist besonders gut geeignet zur Trennung polarer Stoffgemische. Je nach Anwendungszweck wird bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen gearbeitet. Zur Analyse von Oligonukleotiden arbeitet man bei neutralem pH-Wert. Als Puffersystem wird häufig Triethylammoniumacetat verwendet. Dieses hat zum einen den Vorteil, dass es ein flüchtiger Puffer ist, der durch mehrfache Lyophilisation entfernt werden kann und eine anschließende Elektronenspray-Massenspektroskopie somit nicht beeinflusst, und zum anderen lagert sich das Triethylammoniumion an das negative Rückgrat des Oligonukleotides, erniedrigt damit seine Polarität und verbessert so die Trenneigenschaften [133]. Als Trenntemperatur wurde in der Regel 40 °C gewählt, da bei dieser Temperatur noch keine thermische Zersetzung von Oligonukleotiden stattfindet.

6.2.2 Anionenaustauscher-HPLC

Anionenaustauschersäulen trennen DNA verschiedener Längen basierend auf der unterschiedlichen Anzahl negativ geladener Phosphatgruppen am Oligonukleotidrückgrat. Das verwendete Laufmittelgemisch ist dabei auf rein wässriger Basis. Genutzt wird ein Gemisch aus drei Komponenten: Wasser, Salzlösung (1 M NaCl) und ein Puffersystem (0.25 mM Tris-HCl, pH=8). Diese milden Bedingungen erlauben es Oligonukleotide in ihrer nativen Form aufzureinigen.

Folgende Konstrukte wurden zur Entwicklung einer Trennmethode sehr kurzer ssDNA von dsDNA verwendet :



Die Anionenaustauschersäule kann auf Temperaturen von bis zu 85 °C temperiert werden. Durch die Einstellung der Temperatur lassen sich die Signalformen von Einzelstrang und Doppelstrang beeinflussen, aber auch die Retentionszeit ändert sich. Bei ansteigender Temperatur verlängert sich die Retentionszeit. Je höher die Temperatur gewählt wird, desto breiter wird der Peak des Doppelstranges (Abb. 6.6), anschaulich lässt sich dies durch das partielle Aufschmelzen erklären, das zu inhomogenen Wechselwirkungen des Konstrukts mit der stationären Phase führt. Bei den Einzelsträngen ist die Situation genau umgekehrt, je höher die Temperatur, desto schärfer ist der Peak (Abb. 6.7). Ein mögliche Erklärung ist, dass bei sehr niedrigen Temperaturen Wechselwirkungen zwischen kurzen komplementären Sequenzabschnitten existieren. Der decamere Einzelstrang bildet bei 15 °C sogar einen stabilen Duplex.

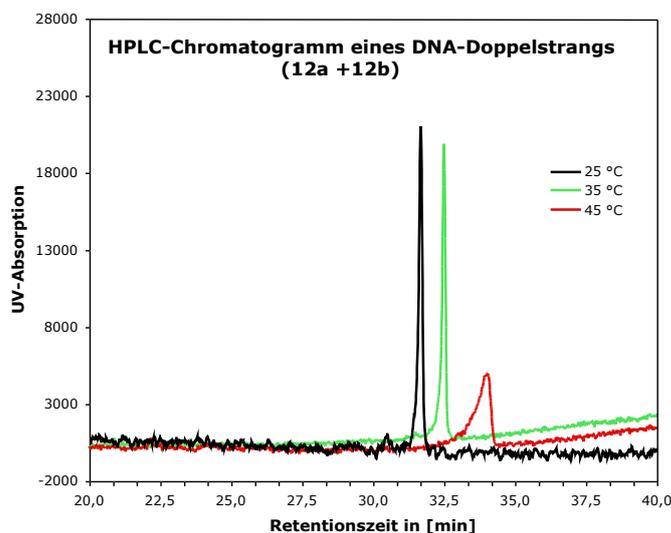


Abb. 6.6: Temperaturabhängige HPLC-Chromatogramme der dodecamereren DNA-Doppelstränge an einer Anionenaustauschersäule.

Um ein Gemisch aus doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA zu analysieren, muss die Temperatur so gewählt werden, dass der Peak des überschüssigen Einzelstranges gut definiert ist. Nur in diesem Fall kann man bestimmen, welcher DNA-Strang im Überschuss vorliegt. Dabei darf die Temperatur nicht zu hoch gewählt sein, um die nativen Bedingungen nicht zu gefährden. In Abb. 6.8 ist die Trennung von ds- und ssDNA bei 35 °C abgebildet. Dabei ist klar erkennbar, welcher Strang im Überschuss vorliegt.

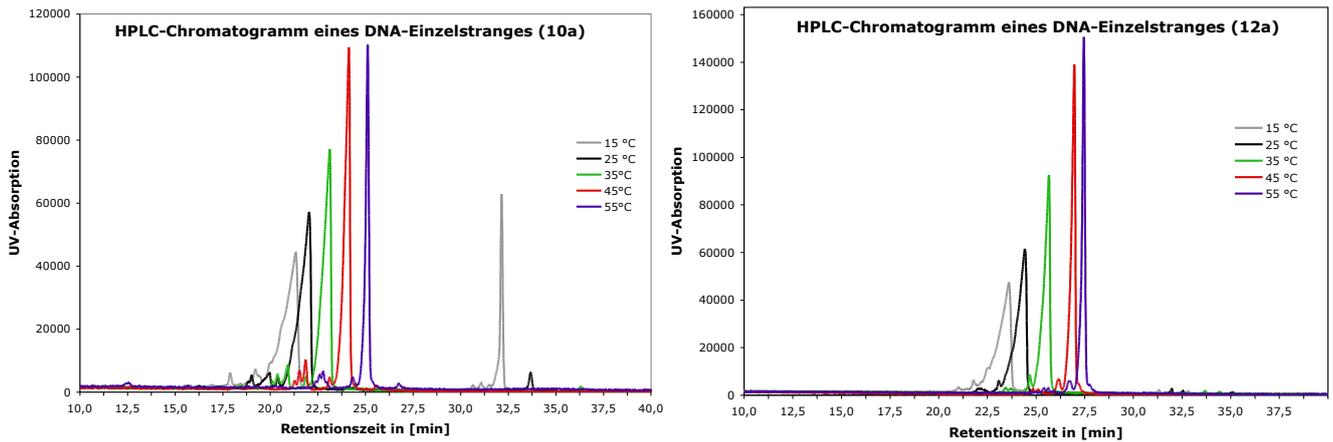


Abb. 6.7: Temperaturabhängige HPLC-Chromatogramme der DNA-Einzelstränge an einer Anionenaustauschersäule.

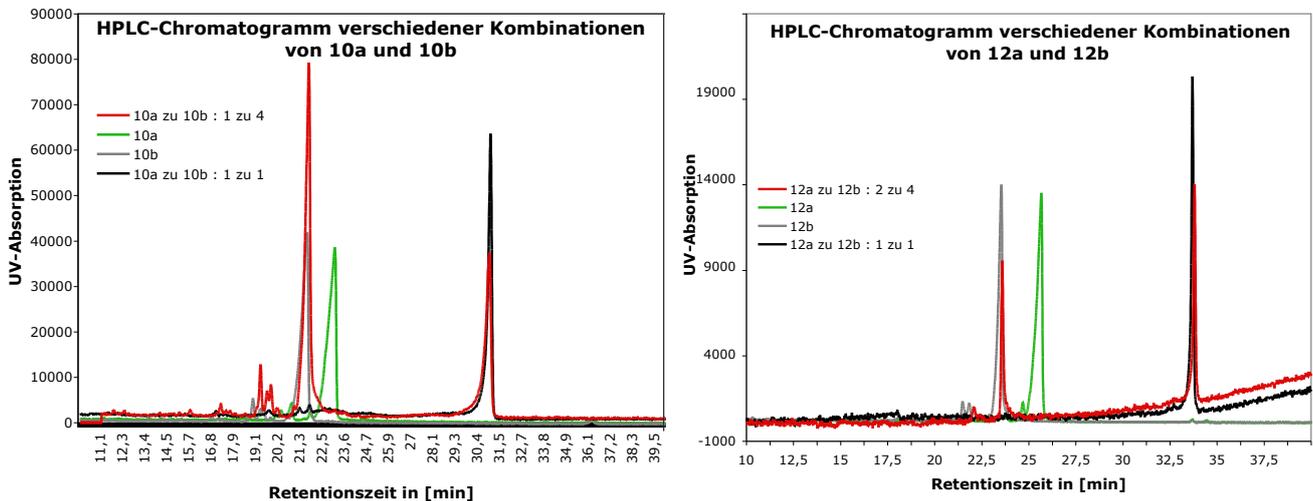


Abb. 6.8: HPLC-Chromatogramme der dsDNA- und ssDNA-Mischungen bei 35 °C.

Durch die Kapillargelelektrophorese (CGE) mit UV-Detektor lassen sich unter nativen Bedingungen auch ssDNA und dsDNA voneinander trennen. Die Identifizierung des überschüssigen Einzelstranges gelingt bei der CGE jedoch nicht [134, 135]. Es existieren noch weitere Methoden, um das Verhältnis von dsDNA und ssDNA zu analysieren, z. B. durch Fluoreszenzmessung mit interkalierenden Farbstoffen [136].

Bei der hier entwickelten Methode lässt sich durch Integration über das Doppel- und das Einzelstrangsignal der unmodifizierten Oligonukleotide das Verhältnis von Einzelstrang zu

Doppelstrang bestimmen. Wenn die Konzentration des Einzelstranges a (c_a) größer als die Konzentration des Stranges b (c_b) ist, gilt für das Verhältnis der Integrale I_a/I_{ds} :

$$\frac{I_a}{I_{ds}} = 0.6 \frac{(c_a - c_b)}{2c_b} \quad (6.1)$$

Der Faktor 0.6 resultiert aus der erniedrigten Absorption der dsDNA im Vergleich zu ssDNA bei 260 nm [137].

Für NMR-Messungen und zur Kristallisation benötigt man sehr reine Oligonukleotidproben. Dazu wurden die Konzentrationen zweier komplementärer DNAs durch UV-Absorptionsmessungen ermittelt und anschließend im erwarteten Verhältnis 1 zu 1 vermischt. Die Lösung wurde hybridisiert und danach wurde eine Probe für die HPLC-Analyse entnommen. Anhand des ermittelten Verhältnisses dsDNA zu ssDNA konnte nun exakt die noch fehlende Menge des benötigten Stranges zugegeben werden. Bei der Analyse von getaggtter DNA kann es bei der Konzentrationsverhältnisbestimmung zu geringen Fehlern kommen. Mit einem weiteren HPLC-Lauf der verbesserten Probe kann nachfolgend kontrolliert werden, ob ausschließlich gepaarte DNA vorliegt.

Prinzipiell ist es auch möglich eine präparative HPLC-Trennung von gepaarten und ungepaarten Oligonukleotiden durchzuführen. Nachteil dieser Methode ist, dass die gewonnene Probe stark salzhaltig ist und somit nicht direkt weiter verarbeitet werden kann. Eine anschließenden Dialyse, Entsalzung durch *size exclusion*-Chromatographie oder Ausfällung mit Isopropanol ist notwendig. Insgesamt betrachtet sind deshalb durch eine präparative HPLC-Trennung höhere Verluste zu erwarten als bei der Entnahme einer Probemenge zur Analyse. Dies ist natürlich abhängig von den verwendeten Mengen. Es gilt für Oligonukleotid-Maßstäbe von etwa 200 nmol und HPLC-Testläufe von 2 nmol.

6.3 Die Beladung der getaggtten DNA mit Lanthanoiden

6.3.1 EDTA-Komplexe mit Lanthoidionen

Die chemischen Eigenschaften der Lanthanoid(III)ionen sind untereinander sehr ähnlich. Die unterschiedlich besetzte f-Schale hat nur einen sehr schwachen Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Lanthanoide. Diese haben mit zunehmender Ordnungszahl einen abnehmenden Ionenradius (Lanthoidkontraktion) und sind dabei reduktions- und oxidationsstabil. Einzige Ausnahmen stellen Europium und Cer dar, ersteres kann in wässriger Lösung auch in Oxidationsstufe +2 vorliegen, letzteres auch in Oxidationsstufe +4 [39].

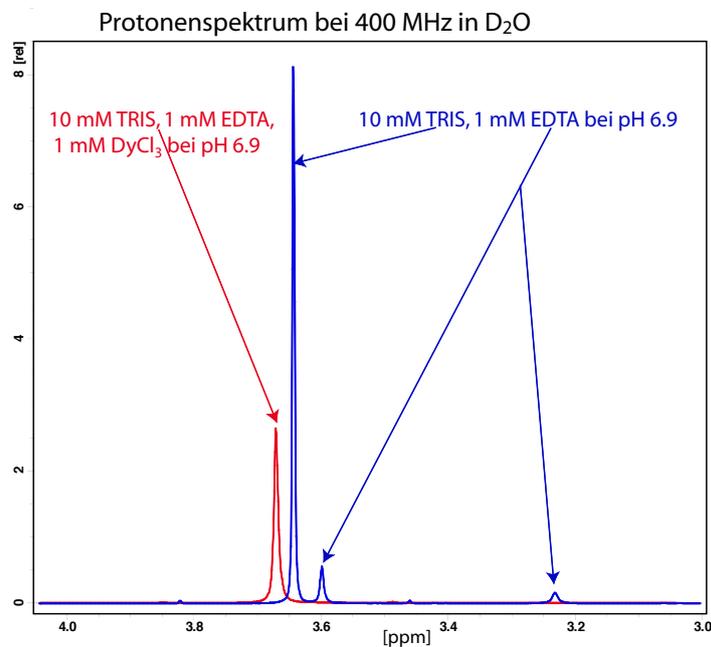


Abb. 6.9: Abgebildet sind die NMR-Spektren von 1 mM EDTA und 10 mM TRIS in D₂O mit (rot) und ohne (blau) 1 mM DyCl₃.

Die Komplexbindungskonstanten der Lanthanoid(III)ionen zu EDTA sind sehr ähnlich. Da Lanthanoidionen bis zu 9 Koordinationsstellen in Komplexen besitzen, bilden sich in Wasser $[\text{Ln}^{3+}\text{EDTA}^{4-}(\text{H}_2\text{O})_n]^-$ -Komplexe aus. Wird jedoch in Puffersystemen gearbeitet, agiert das Anion oft als zusätzlicher Ligand neben EDTA. So fungiert der in biologischen Systemen häufig verwendete TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Puffer, aber auch Acetat-Puffer als zusätzlicher Ligand von Lanthanoidkomplexen. Aus den NMR-Spektren von 1 mM EDTA und 10 mM TRIS in D_2O mit (rot) und ohne (blau) 1 mM DyCl_3 ist ersichtlich, dass durch Zugabe von Dysprosiumionen nicht nur die Signale des EDTAs durch die PRE so stark verbreitert werden, dass sie nicht mehr im Spektrum zu erkennen sind, sondern auch der TRIS-Peak in Form von Signalverminderung und Signalverschiebung beeinflusst wird (Abb. 6.9).

EDTA weist bei neutralem pH Wert eine sehr hohe Komplexbindungskonstante zu Lanthanoiden auf. Dies ermöglichte eine HPLC-Trennung des Lanthanoidsalzes vom Natriumsalz des EDTAs. Die Chromatographie erfolgte mit Hilfe eines Triethylammoniumacetatpuffers bei pH 7 an einer C18-Kieselgelsäule. EDTA als Chelatmolekül erwies sich als ungeeignet, da es nur sehr schwach UV-aktiv ist. Um eine hinreichende UV-Detektionssensitivität zu erlangen, werden große Mengen EDTA benötigt, die zu einer Überladung der Säule führen und somit die Peakform verbreitern (Abb. 6.10).

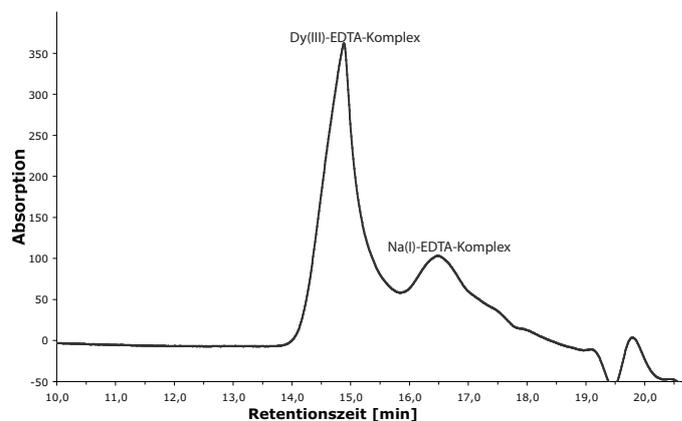


Abb. 6.10: HPLC-Chromatogramm einer Mischung aus EDTA und DyCl_3 (3:2).

Deshalb wurde ein racemisches EDTA-Derivat eingesetzt (Abb.6.11), das wesentlich stärker UV-aktiv ist [138]. Die lanthanoidfreie Form wurde mit einem Überschuss Natriumchlorid an der HPLC injiziert. Der Überschuss an Natriumchlorid bewirkt aufgrund des einheitlichen Gegenions der Carboxylgruppen der EDTA-Derivats eine eindeutige Retentionszeit. Ohne Überschuss an Natriumchlorid traten mehrere Peaks auf, resultierend aus den unterschiedlichen Gegenionen (Abb. 6.12).

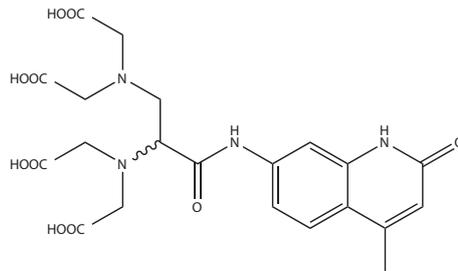


Abb. 6.11: UV-aktives EDTA-Derivat.

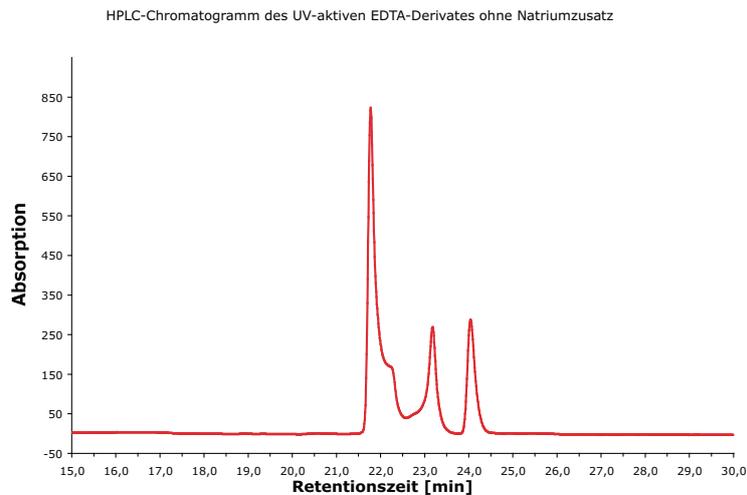


Abb. 6.12: HPLC-Chromatogramm des UV-aktiven EDTA-Derivates ohne Natriumchloridzusatz.

Die Retentionszeit des Natriumsalzes war etwa 1 min kürzer als die des mit Dysprosium(III) beladenen EDTA-Derivates, das ein scharfes Signal aufwies (Abb. 6.13). Mit der in dieser Arbeit implementierten Methode ist es möglich, lanthanoidionenkomplexierte und freie Form voneinander zu trennen. Dies kann auch zur Aufreinigung der mit EDTA getaggtten DNA genutzt werden, um die mit Lanthanoidionen beladene DNA zu isolieren.

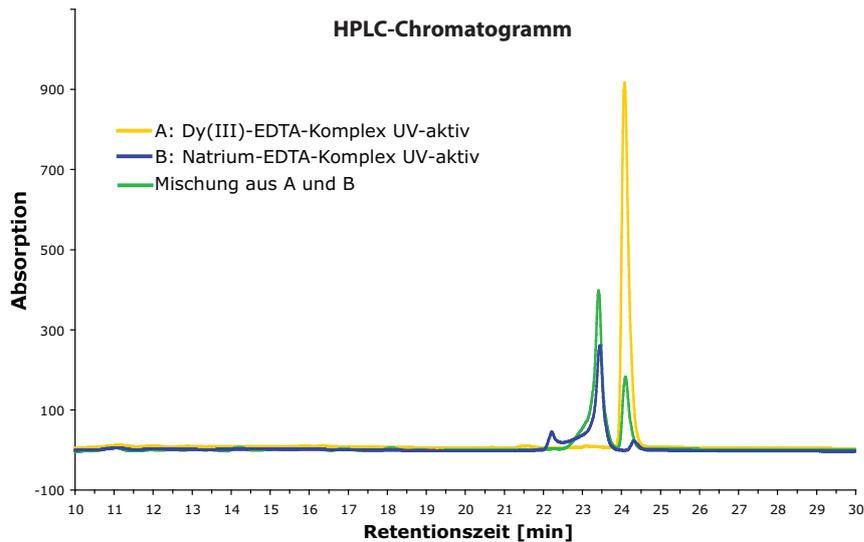


Abb. 6.13: HPLC-Chromatogramm des UV-aktiven EDTA-Derivates mit Natriumüberschuss, mit Dysprosium und deren Mischform.

6.4 NMR-Messungen der Hairpin-DNA mit EPTE-Tag

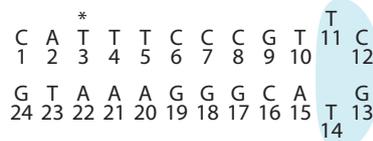


Abb. 6.14: 24mer Hairpin-DNA mit EPTE-Tag an der Position T*.

Die STAT-bindende Hairpin-Sequenz, deren Struktur wie in Kapitel 3 beschrieben gelöst wurde, kann durch eine Clickreaktion mit einem EPTE-Tag versehen werden (Abb. 6.14). Dazu wurde eine modifizierte Uridinbase an der dritten Position der Sequenz eingebaut und anschließend eine Clickreaktion an der festphasengebundenen DNA durchgeführt. Das in Kapitel 4 gemachte Postulat, dass die Struktur der DNA durch die Bindung eines Tags nicht verändert wird, wurde als erstes überprüft. Dazu wurden ein NOESY, COSY und TOCSY-Spektrum aufgenommen. Das NMR-Spektrum der DNA ist dem der unmodifizierten Sequenz sehr ähnlich. Nur die chemischen Verschiebungen der tagbenachbarten Nukleotide A2 und T4 unterscheiden sich, sowie die Signale des modifizierten Nukleotids (Abb. 6.15 und 6.17).

DNA-Hairpin mit EPTE-Tag						DNA-Hairpin ohne EPTE-Tag					
	H1'	H2'	H2''	H6/H8	H5/7*		H1'	H2'	H2''	H6/H8	H5/7*
c1	5,63	1,62	2,20	7,46	5,77	c1	5,63	1,91	2,38	7,64	5,89
a2	6,26	2,69	3,16	8,07		a2	6,30	2,73	2,95	8,37	
x3	6,15	2,26	2,67	7,92		t3	5,93	2,03	2,55	7,18	1,35
t4	6,17	2,21	2,61	7,50	1,61	t4	6,08	2,12	2,57	7,39	1,51
t5	6,02	2,13	2,49	7,38	1,60	t5	6,02	2,10	2,52	7,33	1,55
c6	5,85	2,15	2,38	7,51	5,60	c6	5,84	2,10	2,37	7,47	5,56
c7	5,83	2,09	2,37	7,45	5,52	c7	5,82	2,05	2,35	7,42	5,49
c8	5,51	1,99	2,30	7,38	5,56	c8	5,49	1,99	2,30	7,36	5,55
g9	5,92	2,56	2,65	7,87		g9	5,90	2,55	2,64	7,84	
t10	6,11	2,18	2,39	7,25	1,49	t10	6,09	2,18	2,39	7,23	1,48
t11	6,10	2,09	2,35	7,52	1,78	t11	6,11	2,08	2,35	7,50	1,76
c12	6,11	1,98	2,20	7,63	5,99	c12	6,09	1,97	2,20	7,64	5,97
c13	5,74	1,80	2,31	7,31	5,73	c13	5,74	1,80	2,30	7,35	5,72
t14	5,87	2,05	2,26	7,38	1,69	t14	5,79	2,01	2,23	7,32	1,65
a15	6,09	2,68	2,79	8,31		a15	6,08	2,67	2,78	8,29	
c16	5,45	1,82	2,20	7,22	5,21	c16	5,47	1,77	2,18	7,19	5,21
g17	5,47	2,52	2,63	7,73		g17	5,42	2,51	2,61	7,70	
g18	5,53	-	-	7,56		g18	5,54	2,41	2,59	7,54	
g19	5,24	2,38	2,51	7,56		g19	5,30	2,42	2,55	7,57	
a20	5,74	2,55	2,77	8,00		a20	5,82	-	2,80	7,98	
a21	5,85	2,55	2,82	8,01		a21	5,84	2,53	2,80	7,97	
a22	6,06	2,42	2,80	8,02		a22	6,05	2,41	2,79	7,99	
t23	5,70	1,72	2,20	6,90	1,32	t23	5,74	1,76	2,25	6,94	1,25
g24	6,03	2,50	2,28	7,75		g24	6,07	2,38	2,38	7,77	

Abb. 6.15: Tabelle der chemischen Verschiebungen der DNA mit und ohne EPTE-Tag in ppm.

Zusätzlich finden sich einige gut aufgelöste Signale des Tags: Das Triazol-Proton bei 8.91 ppm, sowie die Signale der benachbarten Phenylprotonen bei 7.94 (Ph1a), 7.67 (Ph1b) und 7.81 (Ph2a) ppm. Die Zuordnung der Signale erfolgte dabei durch ein ¹H-NOESY-Spektrum unter Zuhilfenahme eines COSY- und eines TOCSY-Spektrums. Der „NOESY-Walk“ ist in Abb. 6.17 oben abgebildet, die Region der H2''/H2'-H6/H8-NOE-Kreuzpeaks ist in Abb. 6.17 unten abgebildet. Eine Tabelle der gemessenen Resonanzfrequenzen befindet sich in Abb. 6.15.

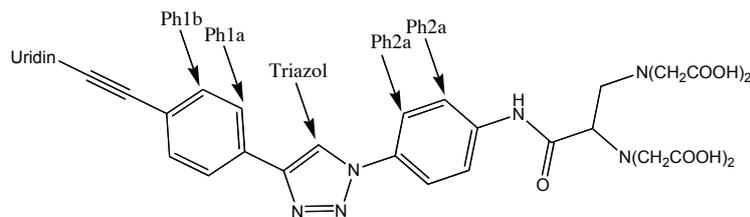


Abb. 6.16: EPTE-Tag, der durch eine Clickreaktion an der festen Phase die DNA modifiziert.

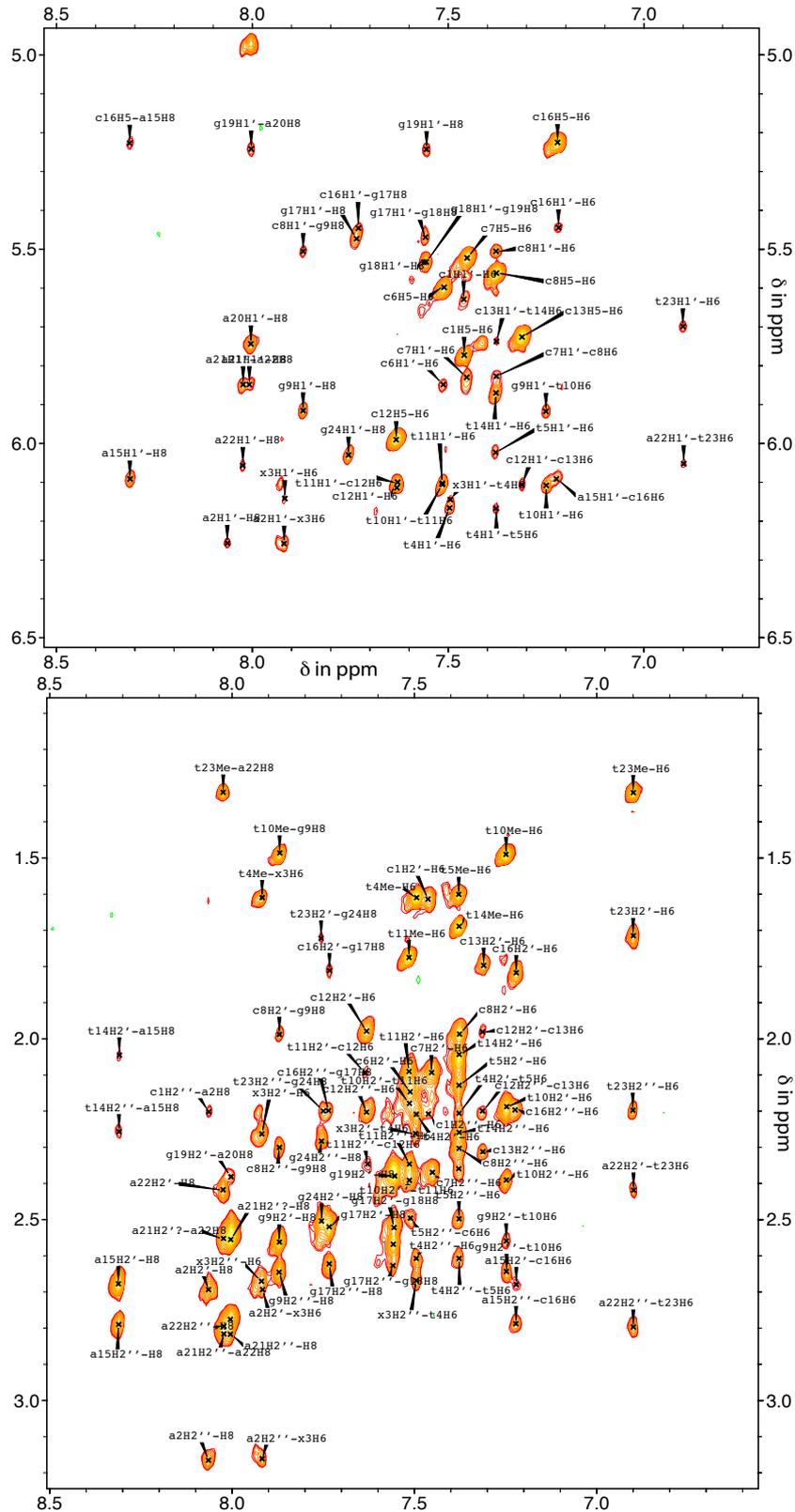


Abb. 6.17: Ausschnitte aus dem ^1H -NOESY-Spektrum, 1 mM DNA mit EPTE-Tag in D_2O bei 25 °C, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH=7), 250 ms Mischzeit, 600 MHz.

Aus der geringen Veränderung der NMR-Spektren (Abb. 6.15) lässt sich der Schluss ziehen, dass sich die Struktur des Hairpins durch die EPTE-Markierung kaum veränderte. Dies ist essentiell für die Funktionalität der Taggingmethode, damit die native Struktur des Biomoleküls erhalten bleibt. Die EPTE-modifizierte DNA wurde anschließend mit einer Dysprosiumchloridlösung (17 mM, pH = 6.8) versetzt. NMR-Spektren von unmarkierten Oligonukleotiden werden meist in Natriumphosphatpuffersystemen gemessen, da dadurch keine zusätzlichen ^1H - und ^{13}C -Signale auftreten. Dieses Puffersystem ist jedoch nicht für Ln^{3+} -haltige Systeme geeignet, da diese in Anwesenheit von Phosphationen ausfallen. Auch die Nutzung anderer Puffersysteme, wie beispielsweise TRIS-HCl birgt die Gefahr, dass der Ln^{3+} -EDTA-Komplex durch die konkurrierenden TRIS-Liganden geschwächt wird. Bei einer Titration von Dysprosiumchlorid zu einer 1 mM Oligonukleotidlösung in 10 mM Tris-HCl (pH=7) zeigte das NOESY-Spektrums keine Pseudokontaktshifts.

In Anwesenheit von 10 mM Ammoniumacetat (pH=7) bildete sich durch Titration mit Dysprosiumchlorid ein zweiter Satz von Signalen aus. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch die NOE-Kreuzpeaks, wie auch in Kapitel 3 beschrieben. Durch die Komplexität des teilweise verdoppelten Signalsatzes wurden zudem die bekannten chemischen Verschiebungen des unbeladenen Hairpins mit EPTE-Tag zu Hilfe genommen. Dabei müssen das diamagnetische und paramagnetische Signal, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, in etwa diagonal (45° Winkel) zueinander verschoben sein, da der Vektor zwischen Kern und paramagnetischem Zentrum für zwei benachbarte Kerne in etwa die gleiche Orientierung und die gleiche Länge besitzt (Abb. 6.19). Ausschnitte des paramagnetischen Spektrums finden sich in Abb. 6.18.

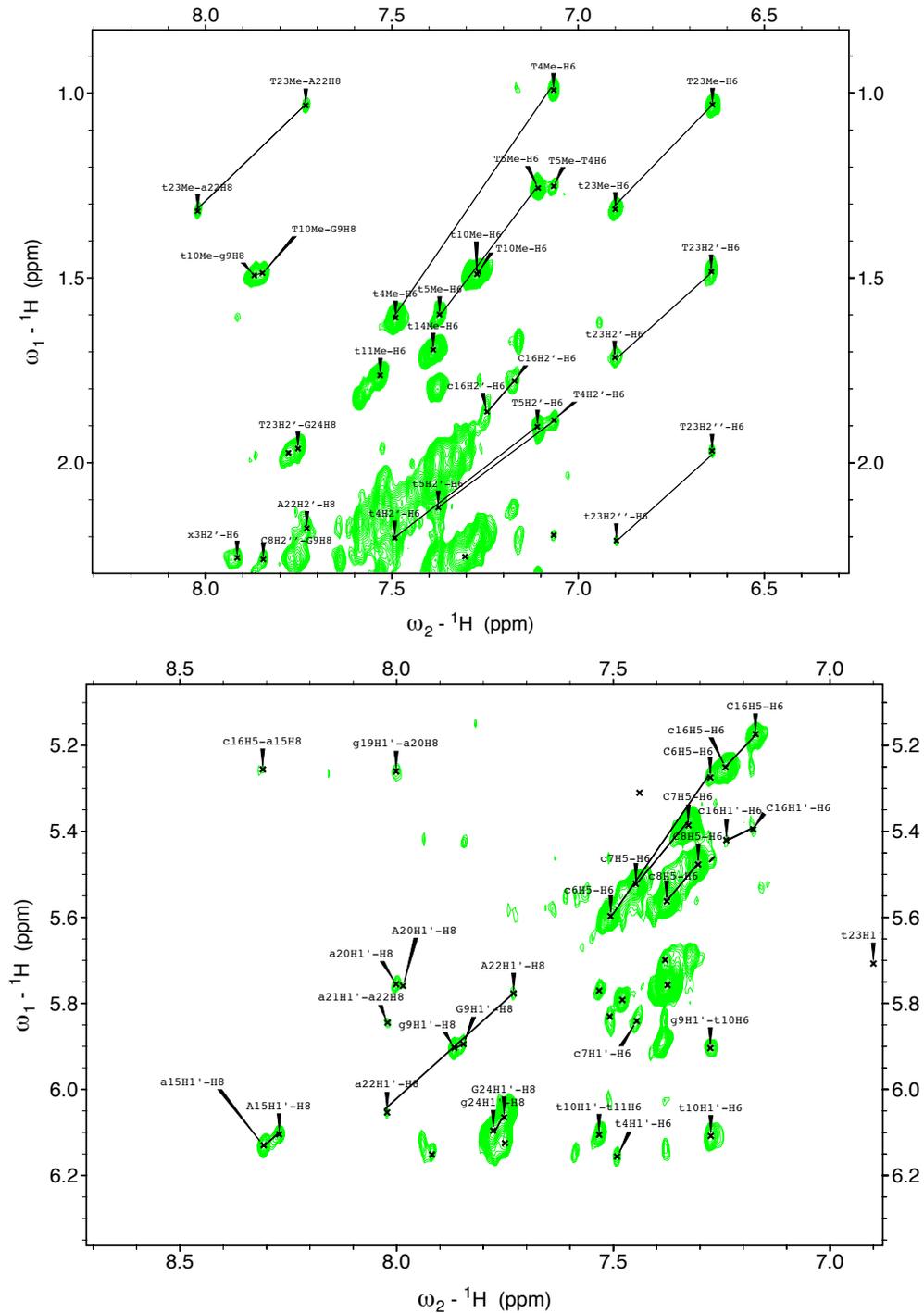


Abb. 6.18: Ausschnitte des NOESY-Spektrums des DNA-Hairpins mit EPTE-Tag und Dy^{3+} in D_2O bei 25°C und 700 MHz, 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH=7), 250 ms Mischzeit. Großbuchstaben bezeichnen die paramagnetischen Signale, Kleinbuchstaben die diamagnetischen Signale.

Einige Signale verschwanden dabei vollständig durch die PRE. Neben allen Signalen des modifizierten Nukleotids verschwanden auch die Signale von A2, G19 und G18. Im Gegensatz dazu veränderten sich die Signale der Thyminbasen im Loop kaum. Die Signale von C12 und C13 im Loop waren generell an einer anderen Position als im Spektrum der getaggtten DNA in Phosphatpuffer, besitzen jedoch nur einen Satz an Signalen. Die flexible Loopregion ist in ihrer Struktur also eventuell durch den Wechsel des Puffersystems von Natriumphosphat zu Ammoniumacetat verändert. Wie zu erwarten treten die größten PCS im Bereich von T4 und T5 auf (Abb. 6.19). Diese Nukleotide befinden sich in unmittelbarer Nähe des Metallzentrums.

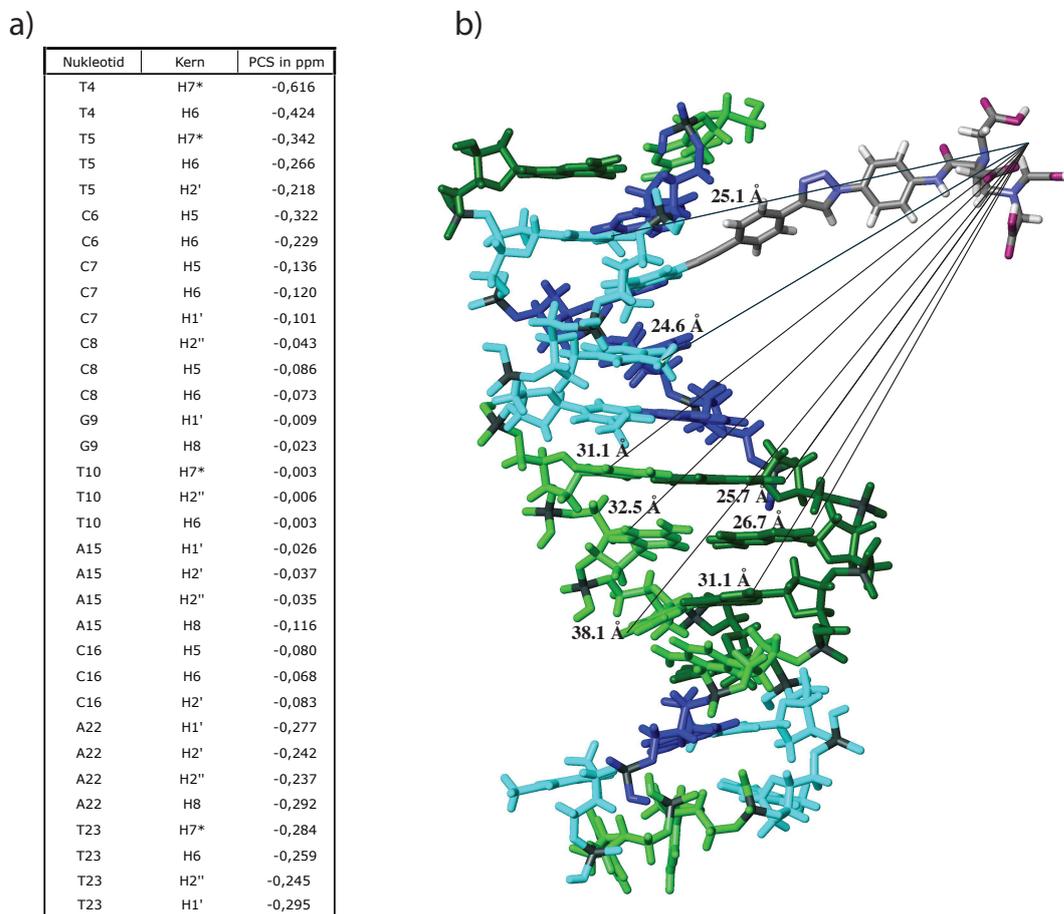


Abb. 6.19: a) Tabelle der Pseudokontaktshifts des EPTE-DNA-Hairpins mit Dy^{3+} .

b) Abstandsinformationen des DNA-Hairpin mit EPTE-Tag (hellblau: Thyminidin, dunkelblau: Adenosin, hellgrün: Cytidin, dunkelgrün: Guanosin).

Aus der NMR-Struktur des unmodifizierten Hairpins (Abschnitt 3.5) wurde mit dem Programm Macromodel eine Struktur des Oligonukleotids mit EPTE-Tag simuliert. Dazu wurde der Tag an die Grundstruktur gebunden, eine Konformationssuche für den Tag durchgeführt und die am häufigsten vorhandene Struktur anschließend energieminimiert. Die resultierende Struktur inklusive einiger repräsentativer Abstandsinformationen ist in Abbildung 6.19 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Nukleotide G18 und G19 aufgrund der helikalen Struktur näher am Metallzentrum liegen als A21. Dies erklärt die Beobachtung, dass neben A2 auch die Signale von G18 und G19 so stark verbreitert waren, dass sie nicht mehr gut zu erkennen waren.

Aus den Pseudokontaktverschiebungen wurde mit Hilfe des Programms RELAX der Alignmenttensor berechnet. Dazu wurden die mit Macromodel generierten DNA-Strukturen mit den unterschiedlichen Tag-Konformationen (77 Stück) in pdb-Dateien umgewandelt. In jede Struktur wurde ein Lanthanoidion als Pseudoatom eingefügt, das durch einen linearen Mittelwert aller Sauerstoffatome der EDTA-Funktion berechnet wurde. Zudem wurden alle Methylgruppen der Thyminbasen mittels linearer Mittelung durch ein Pseudoatom H7* ersetzt. Nun wurde der Anisotropietensor durch Iteration ermittelt. Dabei wurden für verschiedene Tensoren die theoretischen PCS berechnet und jeweils mit den gemessenen PCS verglichen. Die beste Übereinstimmung liefert das Ergebnis für den Alignmenttensor. Dabei ergab sich bei 298 K und 700 MHz ein Tensor von:

$$A = \begin{pmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{xy} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{xz} & A_{yz} & A_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,4504 & 1,7050 & 1,5210 \\ 1,7050 & -0,7248 & -1,2655 \\ 1,5210 & -1,2655 & 0,2744 \end{pmatrix} * 10^{-4} \quad (6.2)$$

Der q-Faktor betrug 0.086. Der diagonalisierte Alignmenttensor entspricht (Abb. 6.20):

$$A = \begin{pmatrix} 1.0677 & 0 & 00 \\ 0 & 1.9898 & 0 \\ 0 & 0 & -3.0575 \end{pmatrix} * 10^{-4} \quad (6.3)$$

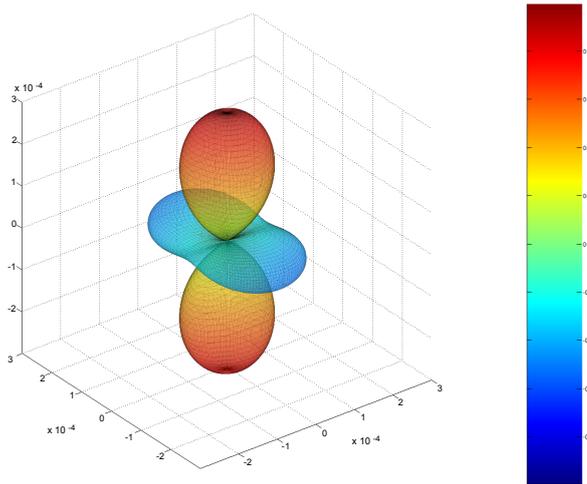


Abb. 6.20: Der diagonalisierte Alignmenttensor.

Der Alignmenttensor wird in der Regel in seiner diagonalisierten Form angegeben. Die Diagonalisierung entspricht dabei der Transformation des Koordinatensystem vom Molekül- zum Alignmentkoordinatensystem. Vorteilhaft ist dabei, dass die Größen verschiedener Tensoren einfacherer miteinander verglichen werden können. Zudem werden auch die Winkelinformationen der rdc's in diesem Koordinatensystem bestimmt. Die aus dem Alignmenttensor berechneten PCS korrelieren gut mit den gemessenen PCS, wie in Abbildung 6.21 ersichtlich. Auffällig ist vor allem die Abweichung von A15 H8, einer loopbenachbarten Base. Ursache dafür könnte eine veränderte Loopstruktur sein, die aus der Messung in einem anderen Puffersystem resultiert. Der maximal zu erwartende rdc bei 700 MHz mit $\cos \Theta = 1$ entspricht $A_{zz} * D_{max,C-H}$ und ist damit 13.8 Hz groß.

Bildet man DNA-Struktur und Tensor im selben Koordinatensystem ab, so ist erkennbar, dass der Tensor in Richtung der DNA die maximale Ausdehnung erreicht (Abb. 6.22). Dadurch lassen sich die relativ hohen gemessenen PCS-Werte erklären. Außerdem zeigt sich, dass der Anisotropietensor des paramagnetischen Zentrums im Vergleich zur Oligonukleotidachse gedreht vorliegt. Die Achsen unmodifizierter DNAs richten sich in einem externen Magnetfeld durch Ringströme in den Basen aus. Dies führt zu der *self alignment*-Fähigkeit von Nukleinsäuren [139, 140]. Dieses diamagnetische *self alignment* ist jedoch viel schwächer als paramagnetisches Alignment. Die Größe des Tensors und damit auch der erwarteten rdc's

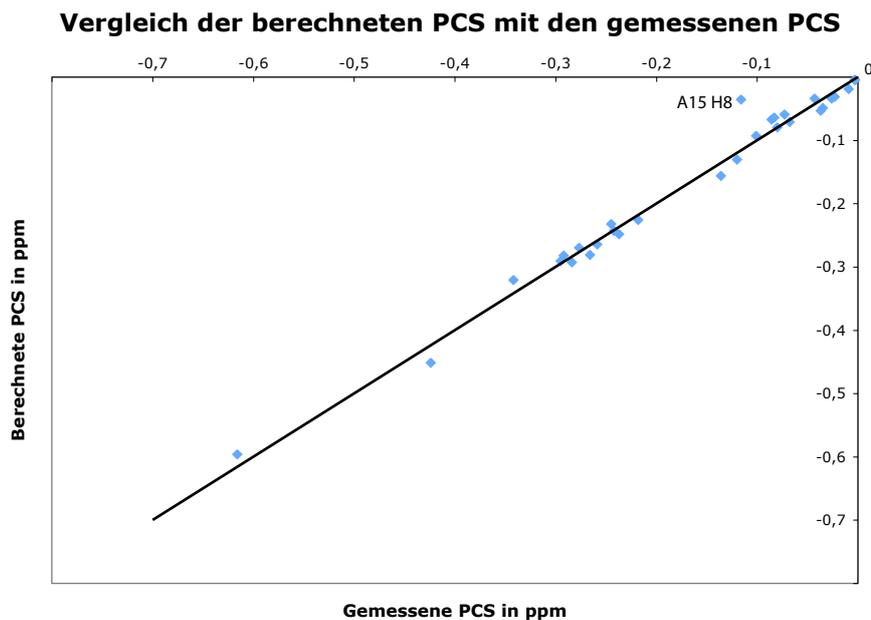


Abb. 6.21: Auftragung der gemessenen PCS gegen die berechneten PCS. Die gute Korrelation besitzt einen q-Faktor von 0.086.

entspricht in etwa den Werten der mit EDTA-Tag modifizierten Proteinen [12,14]. Dies war zu erwarten, da die Größe des Alignments sowohl von der Koordinationssphäre des Lanthanoids, dem Element und der Flexibilität des Tags in Bezug auf das Biomolekül abhängt. Bei den Proteinmessungen findet nun im Wesentlichen die gleiche Koordinationssphäre aufgrund der Verwendung von EDTA. Zudem wurden Terbiumionen komplexiert, die eine ähnlich große magnetische Anisotropie wie Dysprosiumionen besitzen. Auch die Flexibilität der Tags sollte vergleichbar sein.

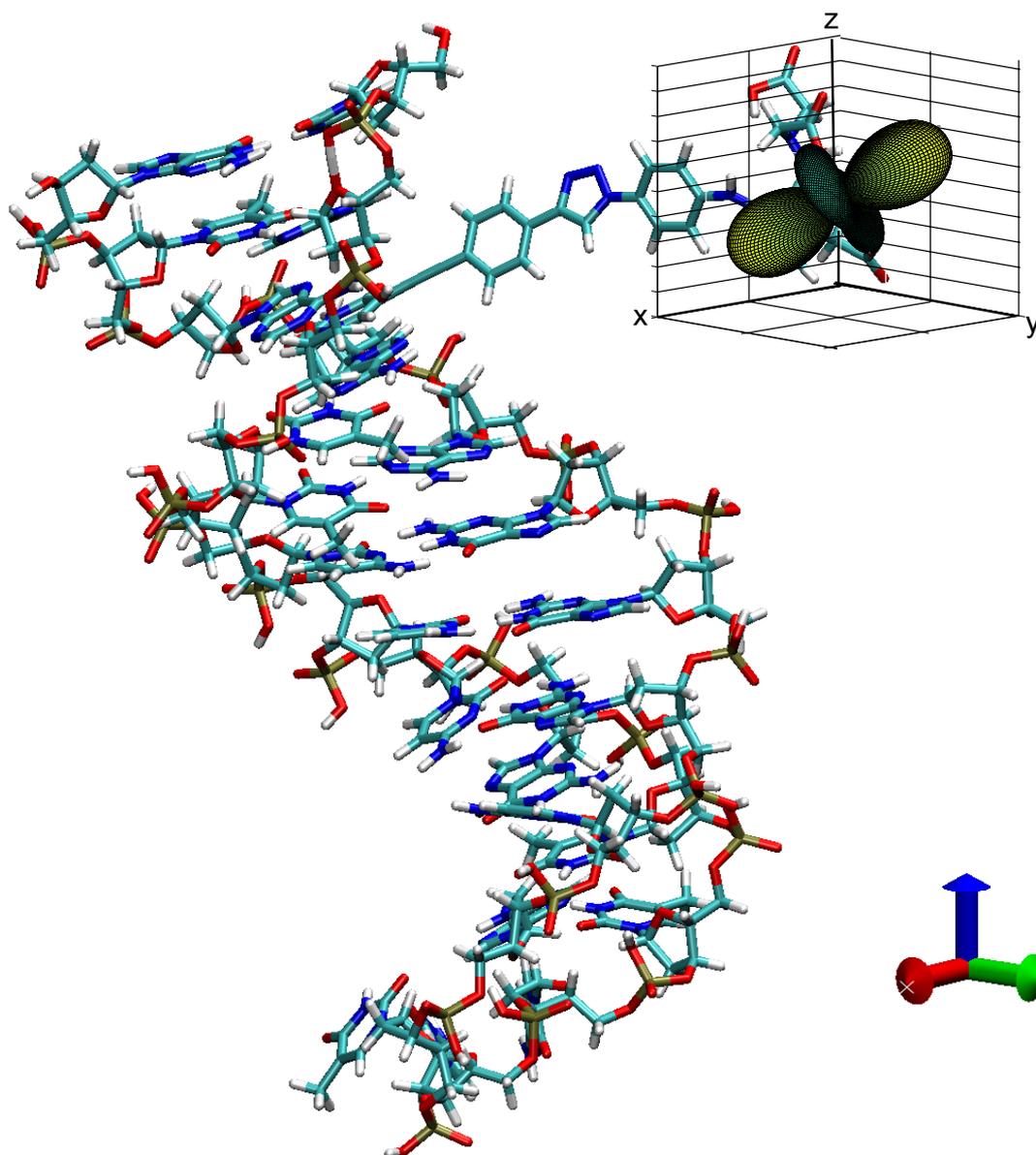


Abb. 6.22: DNA-Struktur und Tensor im Molekülkoordinatensystem.

6.5 Chimäre TAR-RNA

Die biologische Bedeutung der TAR-RNA ist bereits in Kapitel 2.4 dargestellt. In dieser Arbeit wurde ein TAR-RNA-Konstrukt entwickelt, das ein Alignment der RNA ermöglicht. Die TAR-RNA aus HIV-2 ist eine strukturell in Lösung, insbesondere mit Liganden, sehr

gut charakterisierte RNA [35, 36]. Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der RNA ist bekannt (*personal communication*: Teresa Carlomagno).

Um RNA mit Hilfe eines EPTE-Tags in einem externen Magnetfeld auszurichten, muss eine ethinylmodifizierte Base in den Strang eingebaut werden. Dies ist bisher nicht durch den Einbau des entsprechenden Monomers möglich, da zur chemischen RNA-Synthese eine andere Schutzgruppenchemie verwendet wird als bei der DNA-Synthese. Außerdem soll die RNA durch Transkription synthetisiert werden, damit es möglich ist ^{13}C und ^{15}N gelabelte Nukleotide zu verwenden. Um trotzdem einen EPTE-Tag nutzen zu können, wird ein chimäres Konstrukt verwendet, bestehend aus der gewünschten RNA-Sequenz, verlängert durch zusätzliche Nukleotide am 3'-Ende. Durch Zugabe des komplementären DNA-Stranges mit EPTE-Tag kann der gesamte Komplex im Magnetfeld ausgerichtet werden.

Eine TAR-RNA-Sequenz wurde zunächst am 3' Ende um acht Basen verlängert und anschließend ein komplementärer DNA-Gegenstrang zur RNA titriert. Dabei stellte sich heraus, dass sich kein stabiler chimärer Duplex ausbildete. Ein Überhang von elf Basen mit einem komplementären DNA-Decamer mit einem Uridincap bildete dagegen einen stabilen Doppelstrang bei 25 °C. (Abb. 6.23). Die Sequenzabfolge der zusätzlichen Basen wurde dabei so gewählt, dass keine fünf aufeinanderfolgenden Basen komplementär zu einem Abschnitt der TAR-RNA sind, um eine Veränderung der nativen TAR-RNA-Struktur zu vermeiden. Des Weiteren wurden der DNA-Strang so entworfen, dass er möglichst viele Thyminidine enthält und somit die Möglichkeit mehrerer Modifikationsstellen bietet. Das Uridincap U57 wurde als zusätzlicher Stabilisator des chimären Doppelstranges gewählt [141].

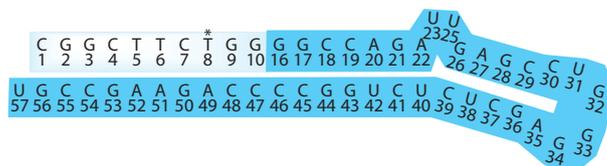


Abb. 6.23: Verlängerte TAR-Sequenz des HIV2. In dunkelblau ist die TAR-RNA mit elf zusätzlichen Basen, in hellblau der decamere DNA-Gegenstrang dargestellt. Das Sternchen kennzeichnet die Position der getageten Base.

Die Duplexbildung wurde durch ^{13}C -HSQC-Spektren der verlängerten TAR-RNA mit ^{13}C -markierten Adenosinen verifiziert. Dazu wurden die HSQC-Spektren ohne und mit DNA-Gegenstrang verglichen. Bei 25 °C bildet sich ein stabiler chimärer Duplex (Abb. 6.24, Abb. 6.25 und Abb. 6.26).

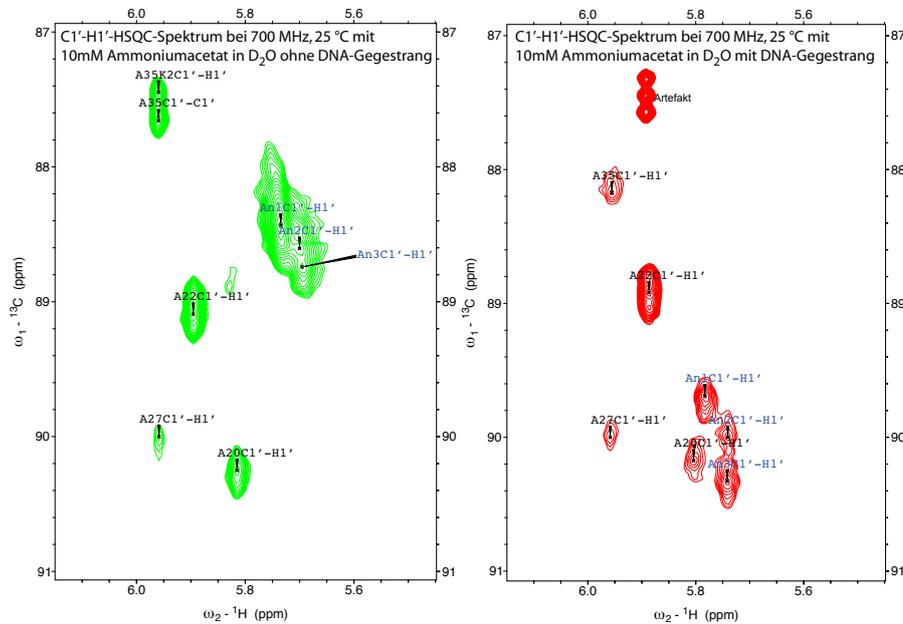


Abb. 6.24: C1'-H1'-HSQC-Spektrum der verlängerten TAR-RNA ohne (grün) und mit DNA-Decamer (rot). A49, A51 und A52 sind nicht zugeordnet und willkürlich mit An1, An2 und An3 bezeichnet. Sie verändern ihre Position im Spektrum stark. Es finden sich die erwarteten sieben Signale.

Durch die Modifikation der RNA darf die Struktur und Dynamik der TAR-RNA nur gering beeinflusst werden. Das dies der Fall ist, zeigte sich an der geringen Modulation der Signale der verlängerten und Wildtyp-RNA (Abb. 6.24, 6.25 und 6.26). Die Signale der Adenosine A20, A22, A27 und A35 werden durch die Zugabe der DNA nur schwach verschoben. A35 nimmt unter den Adenosinen eine besondere Stellung ein, es kann im Loop in zwei Konformationen (A35 und A35K2) vorliegen. Diese Dynamik wurde in der unverlängerten wie in der verlängerten RNA beobachtet. Auch A22 hat keine starre Konformation, da nur eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zu U40 existiert. Das Basenpaar A22-U40 liegt benachbart zum *bulge*. Die Adenosine A49, A51 und A52 liefern in der ungepaarten RNA relativ breite diffuse Signale, da der Einzelstrang eine hohe Flexibilität aufweist. Die chemischen Verschiebungen liegen eher im Bereich des Loop-Adenosins A35. Durch Zugabe der DNA

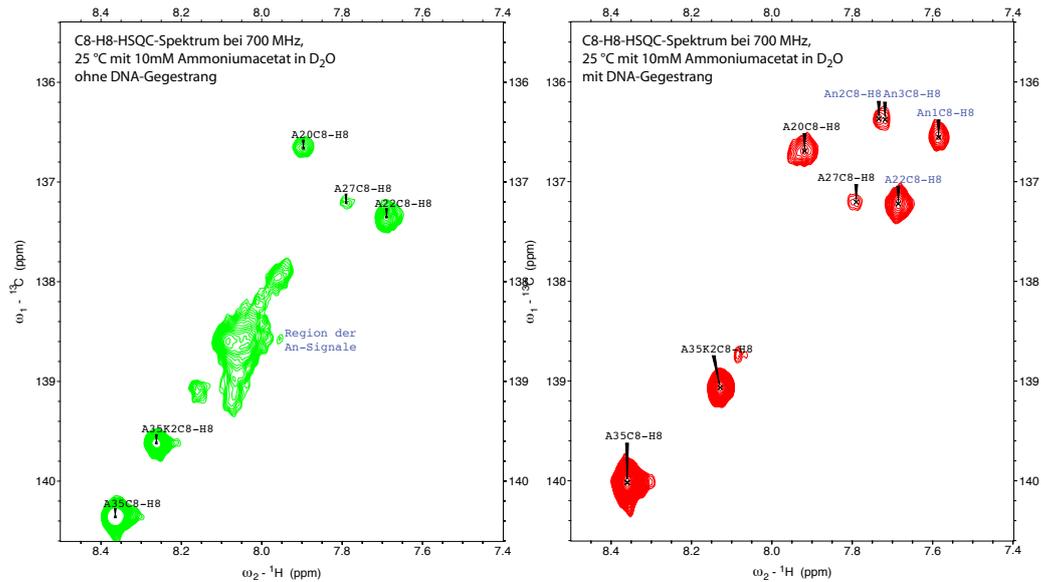


Abb. 6.25: C8-H8-HSQC-Spektrum der verlängerten TAR-RNA ohne (grün) und mit DNA-Decamer (rot). A49, A51 und A52 sind nicht zugeordnet und willkürlich mit An1, An2 und An3 bezeichnet. Die Position ihrer Signale wandert von einer loopartigen zu einer duplexartigen Region. Es finden sich die erwarteten sieben Signale und das Signal der zweiten A35-Konformation.

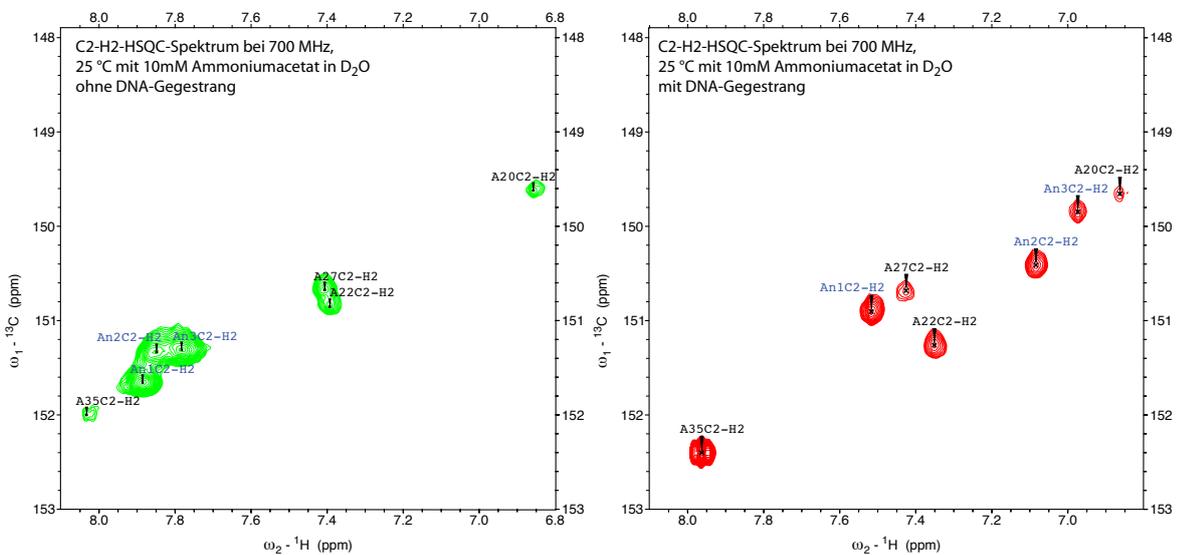


Abb. 6.26: C2-H2-HSQC-Spektrum der verlängerten TAR-RNA ohne (grün) und mit DNA-Decamer (rot). Es finden sich die erwarteten sieben Signale, von denen die drei Adenosine des Überhangs stark verschoben werden, während die anderen vier Signale in etwa an der gleichen Stelle liegen.

bildet sich eine Doppelhelix, die zu schärferen Signalen der Basen im Überhang führt, deren chemische Verschiebungen nun im Bereich der mit Uridin gepaarten Adenosine A20, A22 und A27 liegen. Die Spektren wurden bei 700 MHz und 298 K aufgenommen. Details zu den verwendeten Parametern und Pulsprogrammen finden sich im Anhang.

6.6 Chimäre TAR-RNA mit einem EPTE-Tag

Lanthanoide besitzen eine geringe Hydrolyseaktivität, die ebenfalls beim Design von künstlichen Nukleasen [142–144] genutzt wird. Da RNA stärker hydrolyseempfindlich ist als DNA, wurde die DNA mit EPTE-Tag zuerst mit Dysprosiumionen beladen und anschließend zur TAR-RNA titriert. So kommt die RNA nicht mit den freien Lanthanoidionen in Kontakt. Als Puffersystem wurde 10 mM Ammoniumacetat verwendet ($\text{pH} = 6.8$). Die Beladung der DNA mit Dy^{3+} wurde NMR-spektroskopisch visualisiert, dabei wurden nach jedem Titrations-schritt ein 1D-Protonenspektren und ein NOESY-Spektrum aufgenommen. Es wurde bei einer Temperatur von 35 °C gearbeitet. Bei der sonst verwendeten Temperatur von 25 °C waren die Signale zu breit, da der Einzelstrang keine eindeutige Konformation hat. Das NOESY-Spektrum wurde partiell zugeordnet. Die internukleosidischen Kreuzsignale sind dabei im Einzelstrang viel schwächer als in Duplexen, da der ungepaarte Strang eine viel höherer Flexibilität besitzt. Die Veränderung der Signalintensität durch Zugabe von Dysprosiumchloridlösung ist Abb. 6.27 dargestellt.

Der NOESY-Kreuzpeak zwischen dem H1' und dem H6 des getaggten Nukleotids weist nur noch eine sehr geringe Signalintensität auf (Abb. 6.28). Bemerkenswert ist auch, dass das Kreuzsignal des EDTA-benachbarten Phenylrings mit dem Triazol-Proton fast vollständig verschwindet, während das Kreuzsignal des ethinylbenachbarten Phenylrings Ph1 mit dem Triazol-Proton wesentlich weniger beeinflusst wird. Dysprosium besitzt einen Signalauslöschungsradius von etwa 17 Å, Ph2 ist nur etwa 15 Å von Metallzentrum entfernt, während Ph1 in etwa 20 Å Distanz liegt. C4, T6, und T7 sind stärker beeinflusst als Ph1. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die ssDNA sehr flexibel ist und zwischen dem Metall-EDTA-

Tag und dem DNA-Rückgrat Wechselwirkungen vorliegen. Deutlich zu erkennen ist jedoch, dass das Metallion mit dem Tag einen stabilen Komplex bildet und die benachbarten Basen stärker beeinflusst als die weiter entfernten Basen.

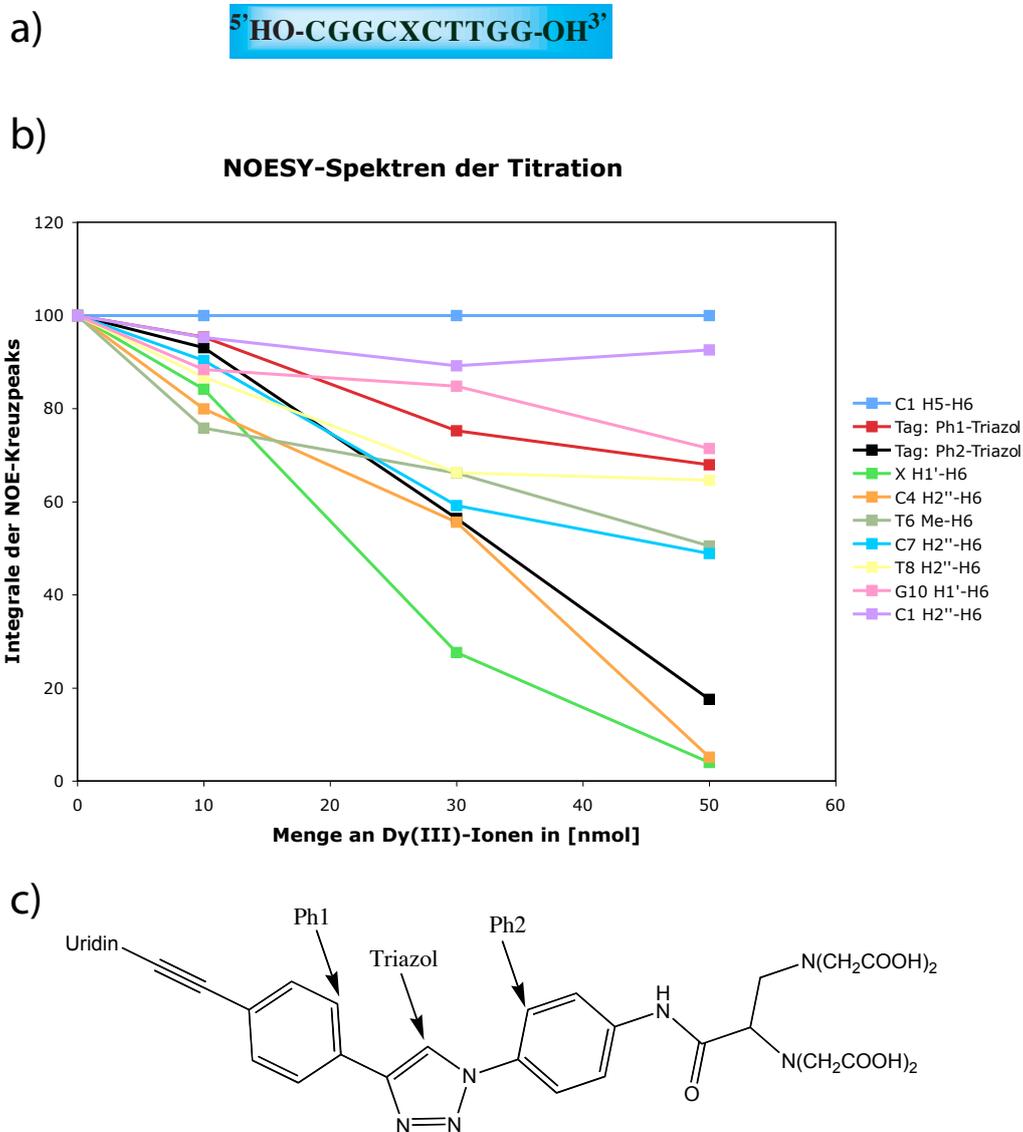


Abb. 6.27: a) Eine Abbildung der DNA-Sequenz mit EPTE-TAG X.

b) Die Veränderung der NOESY-Kreuzsignalintensität durch Zugabe von Dysprosi-umchlorid. Die Spektren wurden auf die Signalintensität der C1 H5-H6-Kreuzsignale geeicht und die maximale Integral stets auf 100 gesetzt.

c) Die zugehörigen Protonen des EPTE-Tags.

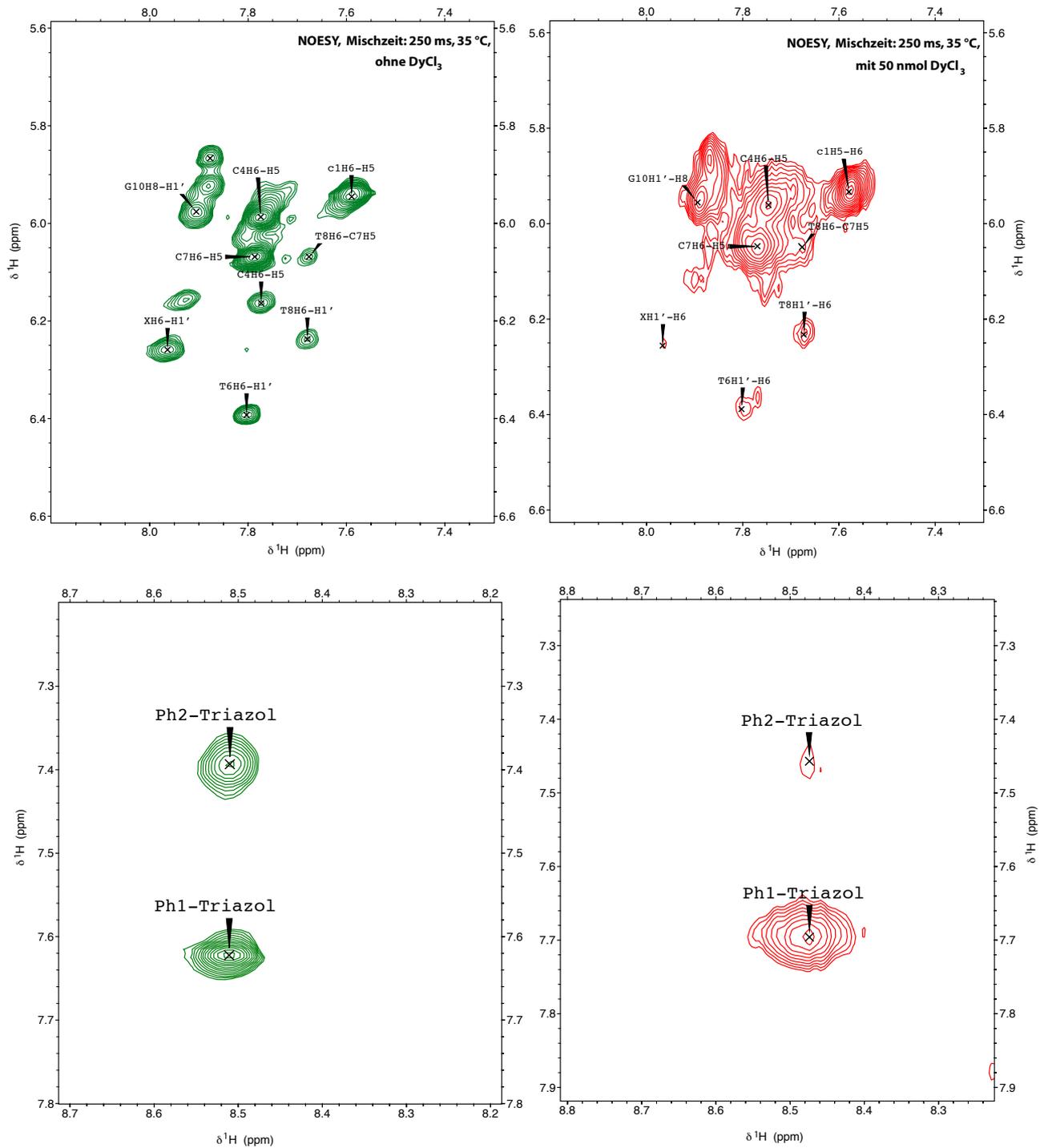


Abb. 6.28: NOESY-Spektrenausschnitte des DNA-Gegenstranges ohne (grün) und mit DyCl_3 (rot) bei 35 °C und 600 MHz mit einer Mischzeit von 250 ms.

Der mit Dysprosium versetzte modifizierte decamere DNA-Einzelstrang wurde zur verlängerten TAR-RNA mit ^{13}C -markierten Adenosinen titriert, bis die C8-H8 und C2-H2-Kreuzpeaks der ungepaarten Adenosine im HSQC nicht mehr sichtbar waren (Abb. 6.29). Aus den Spektren ist ersichtlich, dass die Basenpaarung zwischen getaggtter DNA und komplementärer RNA stabil ist. Die Signale der ungepaarten Adenosine verschwinden, stattdessen bilden sich drei neue Kreuzpeaks, die den chimär gepaarten Adenosinen entsprechen. Es finden sich die erwarteten acht Signale, davon zwei Kreuzsignale der zwei A35 Konformationen. Die Intensität der Kreuzsignale ist mit Ausnahme von A35 gesunken. PRE-Effekte wirken sich vor allem auf die chimär gepaarten Adenosine aus.

Um zu überprüfen, ob EPTE-markierte DNA die TAR-RNA im Magnetfeld ausrichten kann, wurden Spektren ohne und mit Dy^{3+} -beladenem EPTE-Tag aufgenommen. In gekoppelten HSQC-Spektren ist ohne Dysprosium nur die skalare CH-Kopplung sichtbar, während in Spektren mit Dysprosium die residuale dipolare Kopplung mit auftritt. Die Kopplung wurde in den Spektren in der direkten t_2 -Dimension visualisiert, indem während der Detektion die HC-Kopplung evolvierte. Dazu wurde statt der Breitbandentkopplung in t_2 nur ein 90° Puls auf den Protonenkanal eingestrahlt, bevor das Signal detektiert wurde. Zur Auswertung der rdc's wurden nur C8-H8 und C2-H2-Kreuzpeaks herangezogen (Abb. 6.31), da die C1'-H1'-Kreuzpeaks aufgrund der zusätzlichen ^1H - ^1H -Kopplungen komplexere Signalformen aufwiesen. Da rdc's proportional zum Quadrat des Magnetfeldes sind, wurden die gekoppelten Spektren an einem 900 MHz Spektrometer aufgenommen.

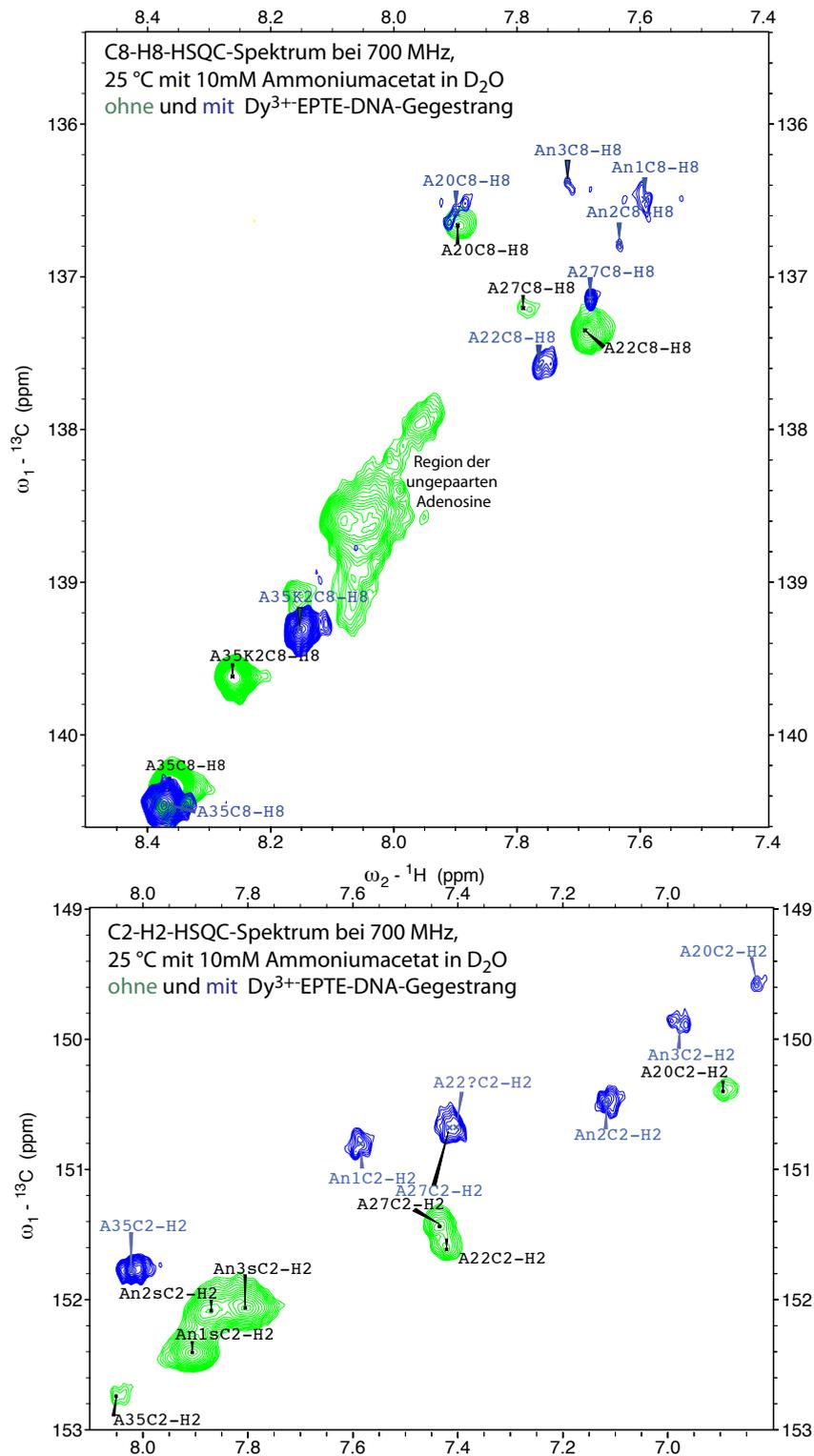


Abb. 6.29: HSQC-Spektren der A-gelabelten verlängerten TAR-RNA ohne (grün) und mit Dy-EPTE-DNA (blau) bei 700 MHz und 25 °C. Die Signale der ungepaarten Adenosine sind nicht mehr sichtbar. Es findet sich die erwartete Anzahl an Signalen, deren Intensität mit Ausnahme von A35 geringer ist.

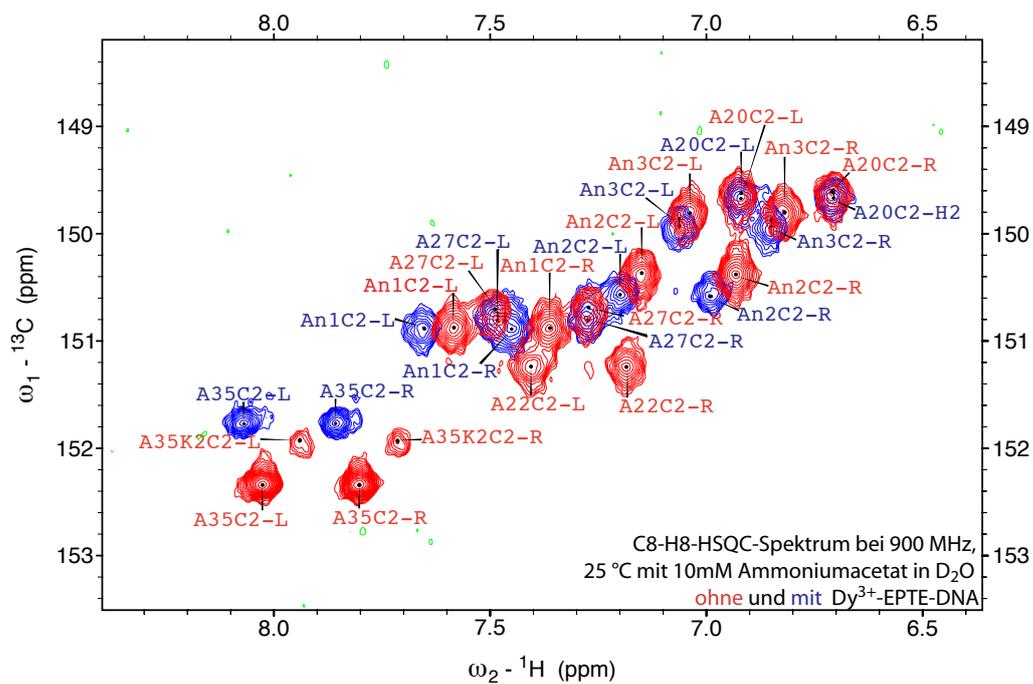


Abb. 6.30: Gekoppeltes C2-H2-HSQC-Spektrum der paramagnetischen Probe (blau) und der diamagnetischen Probe (rot) bei 25 °C und 900 MHz.

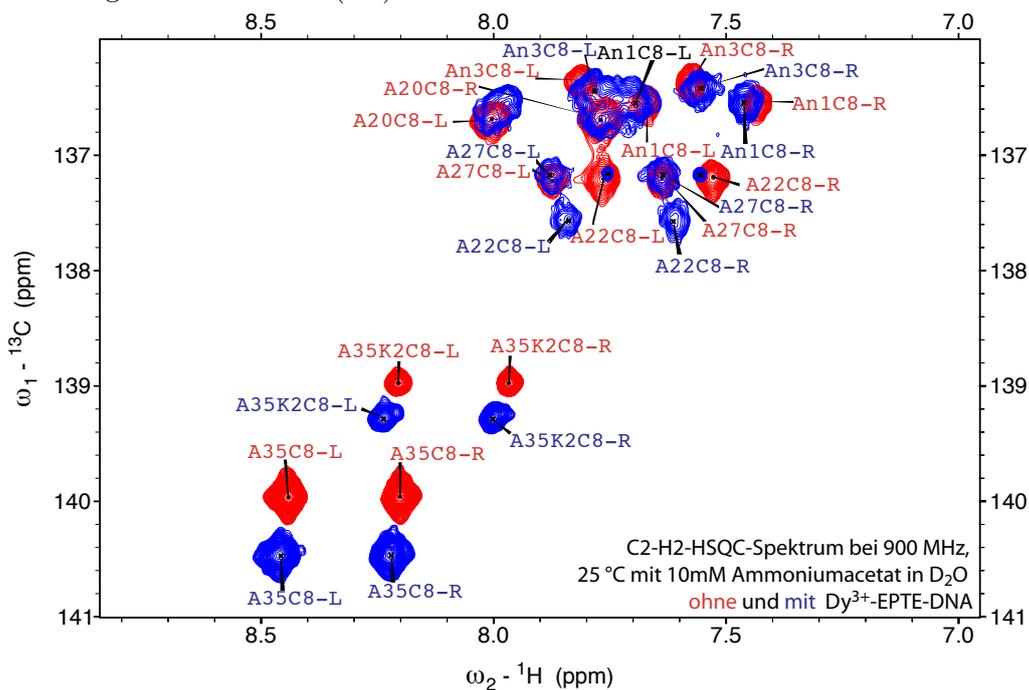


Abb. 6.31: Gekoppeltes C8-H8-HSQC-Spektrum der paramagnetischen Probe (blau) und der diamagnetischen Probe (rot) bei 25 °C und 900 MHz

Die rdcs sind in Tabelle 6.32 aufgelistet. Sie betragen zwischen -7 und 11 Hz. Die Signale des A35 sind im paramagnetischen und im diamagnetischen Spektrum sehr gut aufgelöst und diese rdcs konnten sehr gut extrahiert werden (Fehlergrenze etwa 0.5 Hz). Die übrigen Signale sind bereits stärker überlagert. Im paramagnetischen Spektrum tritt zusätzlich eine Verbreiterung der Linien auf. Dies liegt an PRE-Effekten des Dysprosiums. Diese rdcs besitzen Fehlergrenzen von mindestens 2 Hz.

Assignment	Diamagnetische Kopplung in Hz	Paramagnetische Kopplung in Hz	Dipolare Kopplung in Hz
An1 C2-H2	199,6	192,50	7,1
An2 C2-H2	195,6	194,3	1,3
An3 C2-H2	197,2	198,9	-1,7
A20 C2-H2	195,1	193,0	2,1
A22 C2-H2	199,1		
A27 C2-H2	195,4	194,1	1,3
A35 C2-H2	201,6	199,6	2,0

Assignment	Diamagnetische Kopplung in Hz	Paramagnetische Kopplung in Hz	Dipolare Kopplung in Hz
An1 C8-H8	214,1	209,8	4,3
An3 C8-H8	212,7	205,7	7,0
A20 C8-H8	211,7		
A22 C8-H8	213,3	201,9	11,4
A27 C8-H8	212,0	218,7	-6,7
A35 C8-H8	216,4	213,8	2,6

Abb. 6.32: Tabelle der extrahierten rdcs bei 900 MHz und 25 °C.

Die erhaltenen rdcs stimmen mit den erwarteten rdcs aus dem Alignmenttensor des DNA-Hairpins überein. Der Tensor sollte für RNA und DNA in etwa gleich groß sein, da dessen Größe vom Metallion und der Ligandengeometrie abhängt, die bei der Hairpin-DNA und dem TAR-RNA-Konstrukt gleich geblieben ist. Differenzen ergeben sich durch das unterschiedliche zusätzliche diamagnetische Alignment der Nucleinsäure, das aus den Ringströmen der gestapelten Basenpaaren resultiert. Dieses sollte jedoch vernachlässigbar klein gegenüber dem paramagnetischen Alignment sein.

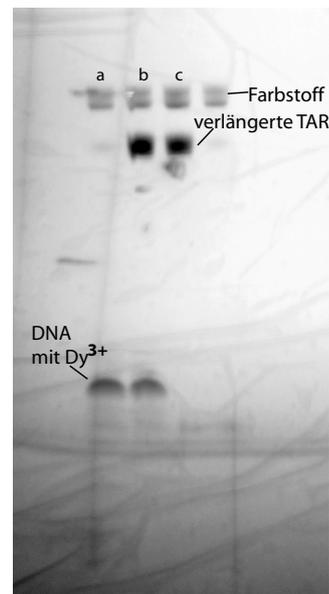


Abb. 6.33: Gelelektrophorese zur Untersuchung auf Abbauprodukte.

Die RNA wurde zudem in Gegenwart der lanthanoidhaltigen DNA nicht hydrolysiert, was mit einer Gelelektrophorese nach einer Woche Lagerung überprüft wurde (Abb. 6.33). Diese Taggingmethode ist also auf chimäre DNA-RNA-Konstrukte anwendbar.

6.7 Vergleich des paramagnetischen Alignments mit anderen Verfahren für Nukleinsäuren

6.7.1 Der GAAA-Loop

Zweiwertige Ionen sind für RNA-Strukturen essentiell, sowohl durch spezifische Bindungen, als auch durch unspezifische Bindungen. Anstelle von Magnesiumionen können RNAs im Falle des GAAA-RNA-Tetraloops auch dreiwertige Europiumionen binden [145, 146] mit einem K_d von 12 μmol . Diese Affinität wird von Schwalbe *et al.* genutzt um rdcs von RNAs zu messen. Dazu wird die zu untersuchende RNA- Sequenz um einen Hairpin mit GAAA-Loop verlängert und mit Europiumionen versetzt. Dabei treten rdcs bis zu 8 Hz (^{13}C - ^1H bei 950 MHz) auf (*personal communication* D. Mathieu und H. Schwalbe).

Eine Schwierigkeit dieser Methode ist, dass die RNA ab einer Temperatur von 25 °C hydrolysiert wird, da die Europiumionen nicht stabil genug an den Loop gebunden sind. Bei der Messung von RNA-Protein-Komplexen ist es bei dieser Methode sehr wichtig, dass das Protein keine Affinität gegenüber Europium besitzt, da sonst der Eu^{3+} -Loop-Komplex zerstört werden könnte.

Der korrespondierende GAAA-DNA-Loop ist strukturell wesentlich flexibler und bindet aufgrund der fehlenden 2'-Hydroxylgruppen keine Europiumionen. Die Methode ist also nur auf RNAs beschränkt.

6.7.2 Externes Alignment

Es existieren verschiedene Alignmentmedien um Nukleinsäuren in einem Magnetfeld auszurichten. Häufig genutzt werden beispielsweise DMPC:DHPC-Bicellen, Pf1-Phagen und TMV [4]. Das externe Alignment der genannten Beispiele beruht auf der Tatsache, dass sich die Medien im Magnetfeld ausrichten und somit eine anisotrope Umgebung für die darin gelöste Nukleinsäure schaffen. Diese kann nicht mehr frei rotieren und bekommt somit eine Vorzugsausrichtung. Die gemessenen rdc's werden in der Regel zur Strukturverfeinerung der Nukleinsäuren verwendet.

Al-Hashimi *et al.* entwickelte 2006 eine Methode, um Rückschlüsse auf die Dynamik der untersuchten RNA-Strukturen zu gewinnen [147, 148]. Eine HIV1-TAR-RNA, die wie die HIV2-TAR-RNA aus zwei doppelhelikalen Bereichen verbunden über einen *bulge* besteht, wird dabei modifiziert. Dabei werden nacheinander die beiden Doppelstränge um je 20 Basenpaare verlängert. Der verlängerte Strang bildet dann jeweils die Hauptachse der RNA, die durch die anisotrope Umgebung des Alignmentmediums parallel im Magnetfeld ausgerichtet wird. Ein Vergleich, der so gewonnenen rdc's, liefert Informationen zur Dynamik der beiden Helices. Inwieweit die Verlängerung der einzelnen Bereiche die Dynamik der RNA verändert, ist noch nicht eindeutig geklärt.

6.7.3 Dynamikuntersuchungen mit paramagnetischen Tags

Paramagnetisches Alignment ist außerordentlich gut geeignet, um die Domänenorientierung und die Domänedynamik von Proteinen zu untersuchen. Bertini *et al.* untersuchten die Domänedynamik von Calmodulin, indem sie eine mutierte Calciumbindungstelle mit Terbium- und Thuliumionen komplexierten [5]. Der Alignmenttensor, erzeugt durch den Tag, wird dabei skaliert mit der Beweglichkeit des Tags gegenüber der jeweiligen Proteindomäne. Analog kann die Dynamik von Nukleinsäuren ermittelt werden. Für detaillierte Dynamikuntersuchungen ist es jedoch notwendig das Biomolekül durch mindestens fünf verschiedene

Alignmenttensoren im Magnetfeld partiell auszurichten. Dies wird möglich durch die Verwendung verschiedener Lanthanoidionen und der *R*- und *S*-Enantiomere der EDTA-Tags [149].

Kapitel 7

Ausblick

Durch die Entwicklung dieser neuen Methode zur paramagnetischen Markierung von DNA, ist es nun möglich rdcs und PCS für diverse DNA-Sequenzen zu messen und dadurch ihre Struktur und Dynamik genauer zu studieren. Einen interessanten Anwendungsbereich stellen zudem DNA-Komplexe mit Proteinen dar. Dabei kann das Protein bei genügend fester Bindung durch den Tag im Magnetfeld ausgerichtet werden. Ein möglicher Komplex wäre beispielweise ein DNA-STAT-Komplex. Die erhaltenen rdcs geben Aufschluss über die Bindungsstärke zwischen DNA und Protein, sowie über die Struktur des Komplexes. Dabei ist die Synthese ^{13}C oder ^{15}N gelabelter Proteine von Vorteil. Die getaggte DNA muss dabei nicht gelabelt vorliegen. Will man ^1H - ^{13}C -rdcs direkt aus den ungelabelten DNA-Spektren ermitteln, sind hohe Konzentration von mindestens 1 mmolar nötig.

Die entwickelten Verfahren basierend auf Click- und Disulfidchemie können auf verschiedene biologische Systeme angewendet werden. Dabei liegt ein Fokus zunächst auf der TAR-RNA, die komplexiert mit unterschiedlichen Metallionen tiefergehend untersucht werden soll. Außerdem kann Zuordnung der verlängerten TAR vervollständigt werden. Untersuchungen der Dynamik von RNA sind mit Hilfe dieser neuartigen paramagnetischen Tags geplant.

Um die Clickreaktion an Oligonukleotiden zur paramagnetischen Markierung noch weiter zu verbessern, ist es geplant sie an gelöster, verlängerter, ethinylmodifizierter DNA und mit Lanthanoidionen beladenen EDTA-Aziden durchzuführen. Die Beladung mit Lanthanoidionen ist dadurch erleichtert, da das Azid mit einem Überschuss an Lanthanoidionen versetzt werden kann, ohne dass die überzähligen Lanthanoidionen von Phosphatresten abgefangen werden. Anschließend kann das Gemisch bei neutralem pH-Wert HPLC-chromatografisch gereinigt werden (Kapitel 6.3).

Die korrespondierenden RNA-Phosphoramidite können ebenfalls mit Thiol- bzw. Ethinylgruppe synthetisiert und per Festphasensynthese in kürzere RNA-Sequenzen inkoooperiert werden. Die Verwendung chimärer DNA-RNA-Konstrukte zur Strukturanalyse kann so vermieden werden (Abb. 7.1). Konstrukte, die nur aus RNA bestehen, haben gegenüber chimären den Vorteil, dass ihre native Struktur weniger stark beeinflusst wird. Zudem liegt die Schmelztemperatur von RNA-RNA- höher als die der korrespondierenden DNA-RNA-Doppelstränge [150], dadurch kann die Verlängerung der zu untersuchenden RNA minimal gehalten werden.

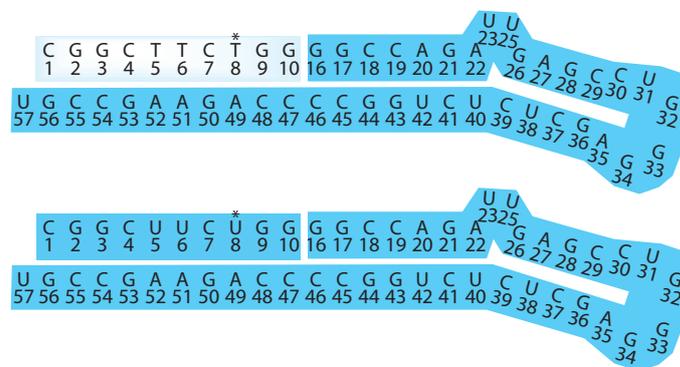


Abb. 7.1: Verlängerte TAR-RNA oben mit getagtem DNA-Gegenstrang (hellblau) und unten mit getagtem RNA-Gegenstrang.

Da EDTA nur sechs der neun Koordinationsstellen der Lanthanoidionen komplexiert, ist es wünschenswert, Tags basierend auf neunfach chelatisierenden Liganden zu entwickeln. Dazu können Proteintaggingmethoden für die Clickchemie an Oligonukleotiden angepasst werden [123, 151].

Kapitel 8

Experimenteller Teil

8.1 Material und Methoden

NMR-Spektren:

Alle NMR-Spektren wurden, soweit nicht anders beschrieben, an einem Bruker 400 MHz-Ultrashield-Spektrometer bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen. Informationen zum Probenkopf und den verwendeten Pulsprogrammen finden sich im Anhang. Die ^1H chemischen Verschiebungen δ wurden in *parts per million* (ppm) relativ zu CDCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ($\delta = 2.49$ ppm) und dem Natriumsalz der 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure ($\delta = 0.00$ ppm in D_2O) als interne Standards angegeben. Die ^{13}C chemischen Verschiebungen wurden ebenfalls in ppm angegeben und auf CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm), $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ($\delta = 39.7$ ppm) referenziert. Die Daten wurden wie folgt angegeben: Chemische Verschiebung, Multiplizität (s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = verbreitert), Kopplungskonstanten J in Hertz und Integral. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von 2D- ^{13}C , ^1H -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)-Spektren und 2D- ^{13}C , ^1H -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)-Spektren.

Reagenzien:

Alle Lösungsmittel wurden bei Merck und Fluka in p.a. Qualität gekauft, gegebenenfalls auch getrocknete Lösungsmittel, die über Molsieb lagerten. Die benötigten Chemikalien wurden bei Merck, Fluka, Aldrich, Acros und Lancaster bestellt. Für Reaktionen unter Feuchtigkeits- oder Sauerstoffabschluss diente Argon als Inertgas. Das Gas wurde mittels eines Trockenturms aus P_2O_5 /Bimsstein getrocknet.

Oligonukleotide:

Oligonukleotide wurden bei der IBA GmbH in Göttingen bestellt. Um ethinyl- und thiolmodifizierte Oligonukleotide zu erhalten wurden die entsprechenden Phosphoramidite zu IBA gesandt, die diese dann mit normaler Phosphoramiditchemie und normalen Kopplungszeiten in die entsprechende Zielsequenz einbaute.

Massenspektren:

Für die Messungen wurde das ESI-Massenspektrometer Micromass ZQ von Waters mit Quadrupoldetektor verwendet. Diese Proben wurden soweit nicht anders angegeben in Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure: 50/50/0.1 gemessen. Die Angaben erfolgen in m/z .

HPLC-Trennungen:

Die genutzten HPLC-Anlagen von JASCO mit DAD-Detektor besaßen *reversed phase* Säulen (Europher C18), deren Größe abhängig von der zu trennenden Substanzmenge gewählt wurde. Bei analytischen Trennungen wurde eine Säule mit den Maßen 4.6 x 250 mm gewählt. Als Eluent wurde Wasser und Acetonitril mit 0.1% TFA genutzt. Starteluent war stets 100% Wasser, das zunehmend mit Acetonitril versetzt wurde. Der jeweilige Gradient findet sich bei den Versuchsbeschreibungen. Neben den Trennungen bei saurem pH-Wert wurden auch

Trennungen bei $\text{pH} = 7$ durchgeführt. Dazu wurde ein System aus 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer und Acetonitril verwendet, das den Vorteil besitzt, dass der flüchtige Puffer durch mehrfache Lyophilisation entfernt werden kann und bei anschließenden massenspektroskopischen Analysen nicht stört. Die 2 M Triethylammoniumacetatstammlösung wurde in p.a. Qualität von Fluka erworben.

Die Anionenaustauschersäule DNAPac PA-100 (4 x 250 mm) der Firma Dionex mit einer 4 x 50 mm Vorsäule. Als Gradientengemisch wurde Wasser, 1 M Natriumchloridlösung und 0.25 mM Tris-HCl-Puffer ($\text{pH} = 8$) verwendet. Von der Startbedingung mit 80% Wasser, 10% Natriumchloridlösung und 10% Pufferlösung wurde in 45 min der Salzanteil auf 45% zu 45% zu 10% erhöht. Soweit nicht anders angegeben betrug die Temperatur 40 °C.

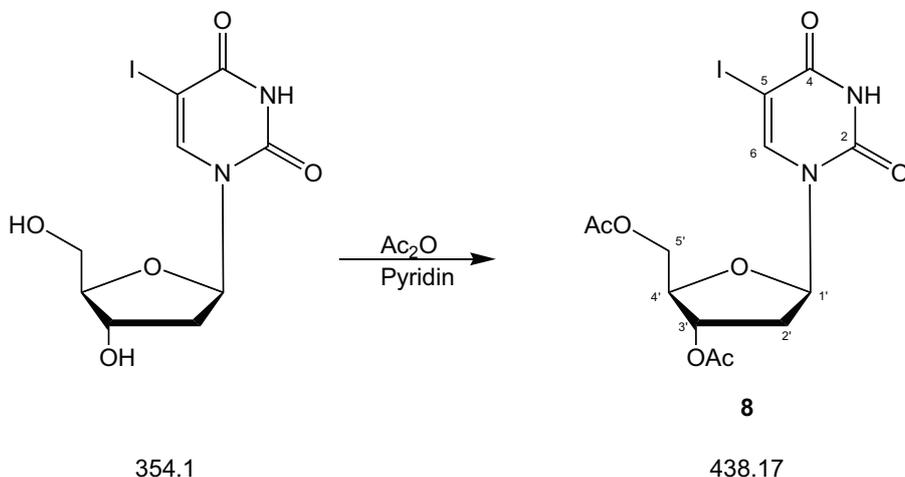
Die wässrigen Lösungen wurden mit flüssigen Stickstoff eingefroren und an einem Christ alpha 1-4 Lyophilisator gefriergetrocknet.

8.1.1 NMR-Probenvorbereitung

Die Oligonukleotidlösungen der HPLC-Trennungen wurden lyophilisiert und anschließend mit 10 mM Phosphatpuffer ($\text{pH}=7$) aufgenommen und über eine PD-10 Säule entsalzt. Die rein wässrigen Lösungen wurden mit dem jeweiligen für die NMR-Messung benötigten Puffer versetzt und erneut lyophilisiert. Danach wurden die Lösungen in 250 μl deuteriertem Wasser gelöst und für 5 min auf 70 °C erhitzt und dann langsam abgekühlt. Die NMR-Messungen erfolgten in Shigemi-NMR-Röhrchen.

8.2 Versuchsvorschriften

8.2.1 5-Iod-2'-desoxyuridin-3',5'-di-*O*-acetat [152]

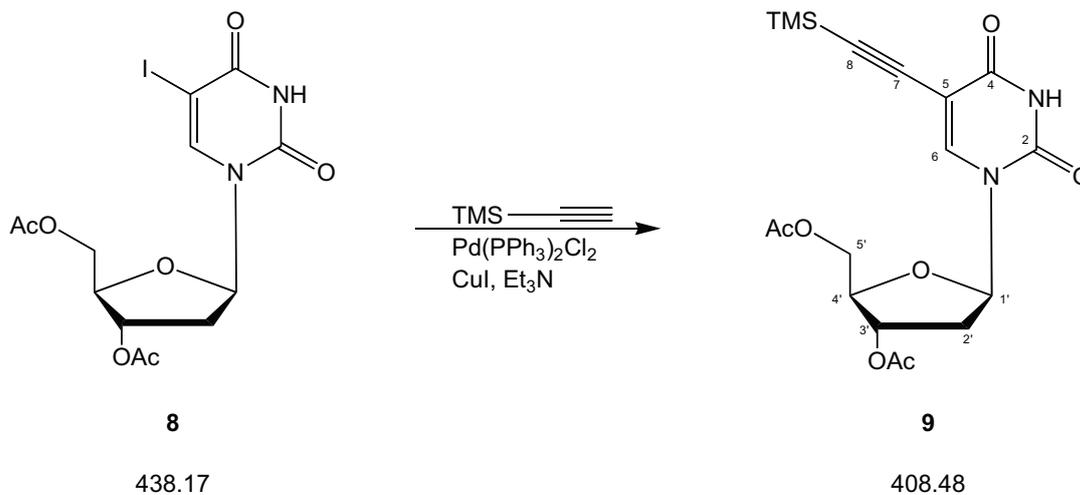


Zu 1.00 g 5-Iod-2'-desoxyuridin (2.82 mmol) in 8 mL Pyridin wurden langsam 2.67 mL Essigsäureanhydrid (2.89 g, 28.2 mmol, 10 Äq.) getropft und 4 h gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum aufkonzentriert, zweimal mit Ethanol (10 mL) versetzt und eingengt. **8** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und direkt weiter verarbeitet.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 9.23 (s, br, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, H6), 6.28 (dd, J = 8.4, 5.7 Hz, 1H, H1'), 5.23 (m, 1H, H3'), 4.38 (m, 1H, H5'), 4.30 (m, 1H, H5''), 4.29 (m, 1H, H4'), 2.54 (ddd, J = 14.2, 5.6, 2.0 Hz, 1H, H2'a), 2.20 (s, 3H, Ac), 2.17 (m, 1H, H2'b), 2.11 (s, 3H, Ac) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 170.32 (1C, 3'CO), 170.12 (1C, 5'CO), 159.65 (1C, C4), 149.89 (1C, C2), 143.79 (1C, C6), 85.52 (1C, C1'), 82.67 (1C, C4'), 73.74 (1C, C3'), 68.91 (1C, C5), 63.48 (1C, C5'), 38.29 (1C, C2'), 21.10 (1C, 5'CH₃), 20.84 (1C, 3'CH₃) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für C₁₃H₁₆IN₂O₇ [M+H]⁺: 439.18, gef.: 439.07.

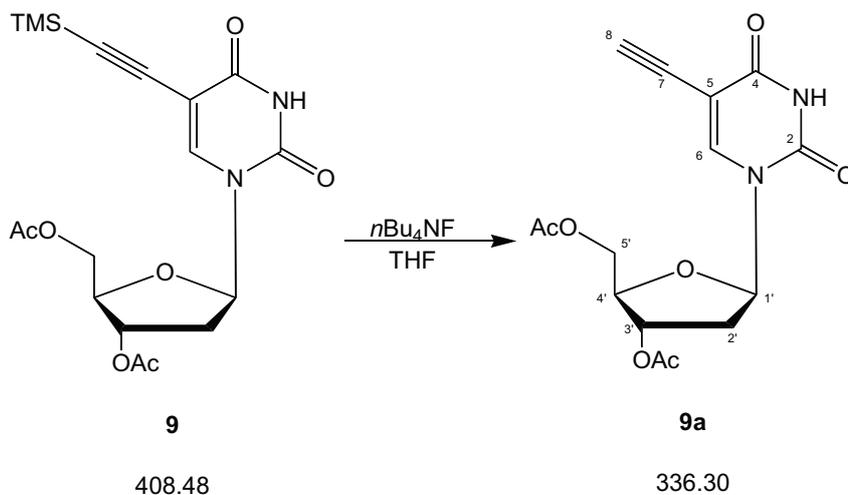
8.2.2 5-Trimethylsilylethynyl-2'-desoxyuridin-3',5'-di-*O*-acetat [153]

1.00 g 5-Iod-2'-desoxyuridin-3',5'-di-*O*-acetat **8** (2.28 mmol), 34.8 mg Kupfer(I)iodid (0.18 mmol, 0.08 Äq.) und 48 mg Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)chlorid (68.5 μmol , 0.03 Äq.) wurden in 30 mL Triethylamin suspendiert und 949 μL Trimethylsilylethin (0.67 g, 6.85 mmol, $\rho = 0.709$, 3.0 Äq.) langsam zugetropft. Nach 3 h Rühren bei 50 °C wurde das Gemisch im Vakuum eingengt, in Chloroform (250 mL) aufgenommen und mit 5%iger EDTA-Lösung (100 mL) gewaschen. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit den Eluenten Chloroform/Methanol: 100/1 gereinigt. Man erhielt 869 mg **9** (2.13 mmol, 93%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.82$ (s, 1H, H6), 6.31 (m, 1H, H1'), 5.24 (m, 1H, H3'), 4.36 (m, 2 H, H5'), 4.28 (m, 2H, H4'), 2.53 (m, 1H, H2'a), 2.21 (m, 1H, H2'b), 2.18 (s, 3H, 5'Ac), 2.11 (s, 3H, 3'Ac), 0.21 (s, 9H, TMS) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 170.41$ (1C, 3'CO), 170.03 (1C, 5'CO), 160.75 (1C, C4), 149.11 (1C, C2), 142.11 (1C, C6), 100.99 (1C, C5), 95.48 (1C, C7), 99.92 (1C, C8), 85.32 (1C, C1'), 82.62 (1C, C4'), 73.97 (1C, C3'), 63.82 (1C, C5'), 38.24 (1C, C2'), 20.88 (1C, 3'CH₃), 20.83 (1C, 5'CH₃), -0.37 (3C, TMS) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 409.49, gef.: 409.27.

8.2.3 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin-3',5'-di-*O*-acetat [152]

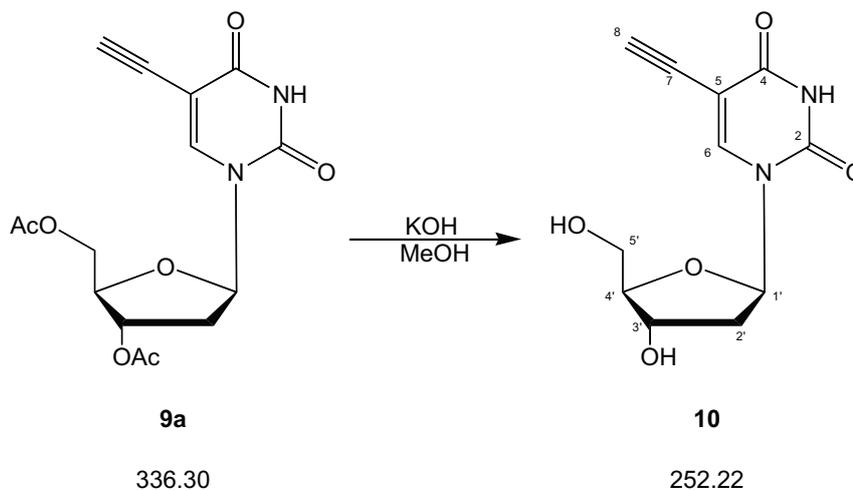
800 mg 5-Trimethylsilylethynyl-2'-desoxyuridin-3',5'-di-*O*-acetat **9** (1.96 mmol) wurden in 10 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 4.11 mL Tetra-*n*-butylammoniumfluorid-Lösung (1 M in Tetrahydrofuran, 4.11 mmol, 2.1 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluenten Chloroform/Methanol: 100/1 aufgereinigt. Man erhielt 561 mg eines weißes Pulvers **9a** (1.67 mmol, 85%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.94 (s, 1H, H6), 6.32 (m, 1H, H1'), 5.24 (m, 1H, H3'), 4.37 (m, 2H, H5'), 4.32 (m, 2H, H4'), 3.21 (s, 1H, H8), 2.23 (m, 1H, H2'a), 2.58 (m, 1H, H2'b), 2.17 (s, 3H, 5'Ac), 2.12 (s, 3H, 3'Ac) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 170.14 (1C, 5'CO), 170.11 (1C, 3'CO), 161.81 (1C, C4), 148.95 (1C, C2), 142.71 (1C, C6), 99.65 (1C, C5), 85.94 (1C, C1'), 82.81 (1C, C4'), 82.21 (1C, C7), 74.46 (1C, C8), 73.88 (1C, C3'), 63.72 (1C, C5'), 38.34 (1C, C2'), 20.85 (2C, 2 x CH₃) ppm.

ESI-MS *m/z* (Acetonitril, positive mode): ber. für C₁₅H₁₇N₂O₇ [M+H]⁺: 337.10, gef.: 337.08.

8.2.4 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin [152]

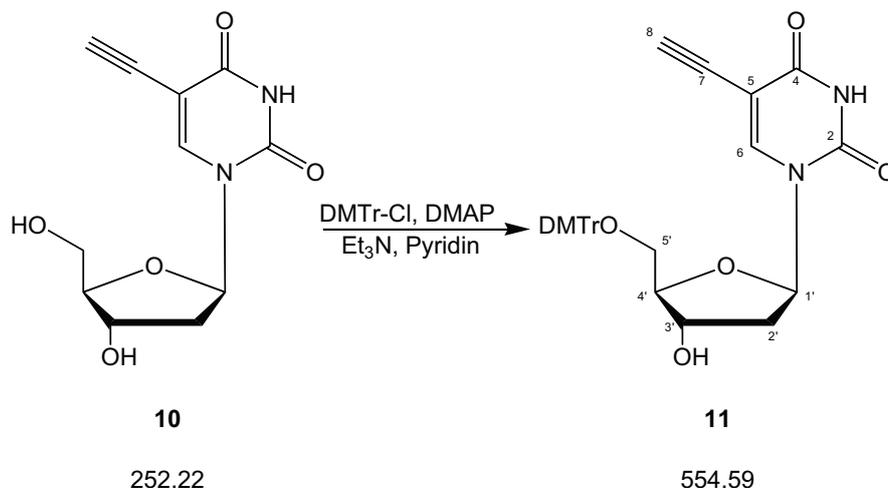


428 mg Kaliumhydroxid (7.62 mol, 4 Äq) wurden in 40 mL Methanol gelöst und mit 641 mg 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin-3',5'-di-*O*-acetat **9a** (1.91 mmol) versetzt. Die Lösung wurde zuerst 2 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit 30 mL Wasser verdünnt. Durch Zugabe von Kationenaustauscher Amberlite IR-120 H⁺-Form wurde ein pH-Wert von 6.5 eingestellt und anschließend der Kationenaustauscher abfiltriert. Das Methanol wurde im Vakuum dem Filtrat entzogen und die wässrige Lösung anschließend lyophilisiert. Quantitativ wurde das Produkt **10** als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 8.23 (s, 1H, H6), 6.11 (m, 1H, H1'), 4.25 (m, 1H, H3'), 3.97 (s, 1H, H8), 3.78 (m, 2H, H4'), 3.58 (m, 2H, H5'), 2.50–2.53 (m, 2H, H2') ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 162.59 (1C, C4), 150.29 (1C, C2), 144.64 (1C, C6), 97.66 (1C, C5), 87.96 (1C, C4'), 85.08 (1C, C1'), 83.33 (1C, C7), 77.44 (1C, C8), 70.37 (1C, C3'), 61.15 (1C, C5'), 40.57 (1C, C2') ppm.

ESI-MS *m/z* (Acetonitril, positive mode): ber. für C₁₁H₁₂NaN₂O₅ [M+Na]⁺: 275.21, gef.: 275.11.

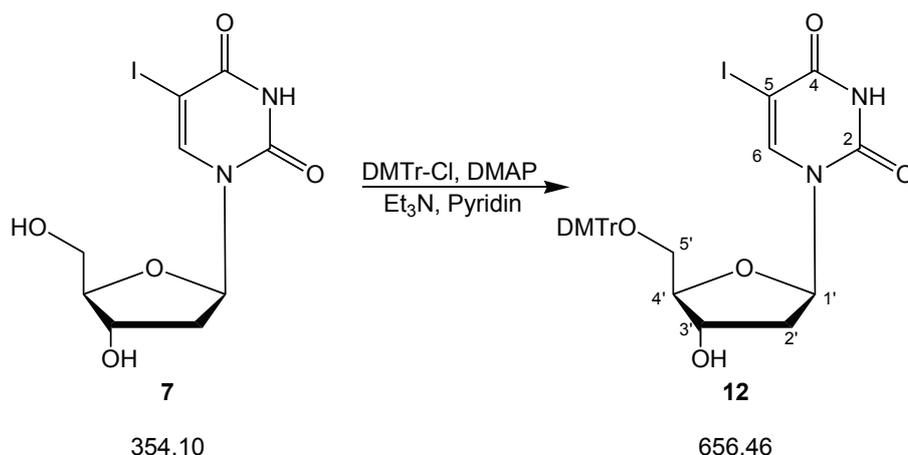
8.2.5 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-ethinyl-2'-desoxyuridin [152]

In 8.5 mL Pyridin wurden 481 mg 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin **10** (1.91 mmol) gelöst und mit 18.6 mg DMAP (0.15 mmol, 0.08 Äq.), 237 μ L Triethylamin (174 mg, 1.72 mmol, $\rho = 0.709$, 0.9 Äq.) und 775 mg Dimethoxytritylchlorid (2.29 mmol, 1.2 Äq) versetzt. Die Lösung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gelbe Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Chloroform/Methanol/Triethylamin: 100/1/1 bis 100/10/1 aufgereinigt. Man erhielt **11** als einen weißen Schaum (1.04 g, 1.87 mmol, 98%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 8.06$ (s, 1H, H6), 7.18–7.43 (m, 9H, DMTr), 6.90–7.08 (m, 4H, DMTr), 6.85 (dd, $J = 8.8, 1.1$ Hz, 1H, H1'), 4.50–4.57 (m, 1H, H3'), 4.05–4.09 (m, 2H, H4'), 3.79 (s, 6H, 2 x OMe), 3.35–3.43 (m, 2H, H5'), 2.91 (s, 1H, H8), 2.45–2.53 (m, 2H, H2') ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): $\delta = 160.92$ (1C, C4), 149.19 (1C, C2), 142.92 (1C, C6), 135–113 (18C, DMTr), 97.13 (1C, C5), 86.71 (1C, DMTr), 86.68 (1C, C4'), 86.00 (1C, C1'), 82.87 (1C, C7), 77.12 (1C, C8), 71.25 (1C, C3'), 63.14 (1C, C5'), 54.99 (2C, 2 x OMe), 41.82 (1C, C2') ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für C₃₂H₃₀N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 577.58, gef.: 577.26.

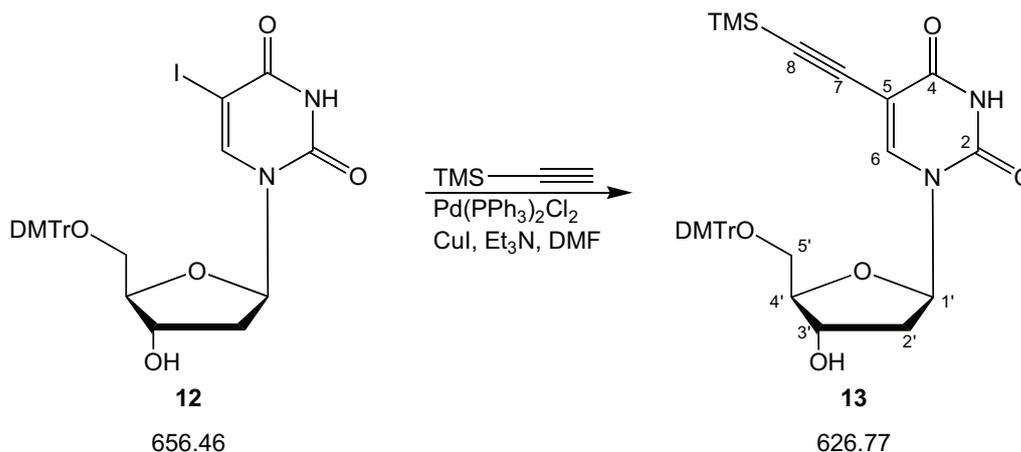
8.2.6 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-iod-2'-desoxyuridin [154]

Zu 1.00 g 5-Iod-2'-desoxyuridin (2.82 mmol) in 10 mL Pyridin wurden 401 μL Triethylamin (285 mg, $\rho = 0.709$, 1.0 Äq.), 34.5 mg DMAP (0.28 μmol , 0.1 Äq.) und 1.15 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (3.41 mmol, 1.2 Äq.) gegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 2 mL Methanol versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2.41 g Rohprodukt wurden durch Kieselgelsäulenchromatographie mit den Eluenten Chloroform/Methanol/Triethylamin: 100/1/1 dann 100/2/1 gereinigt. Man erhielt 1.68 g weißen Schaums **12** (2.56 mmol, 91%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 8.13$ (s, 1H, H6), 7.17–7.47 (m, 9H, DMTr), 6.88–7.10 (m, 4H, DMTr), 6.35 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H1'), 4.55 (m, 1H, H3'), 4.10 (m, 1H, H4'), 3.80 (s, 6H, 2 x OMe), 3.39 (m, 2H, H5'), 2.50 (m, 1H, H2'a), 2.30 (m, 1H, H2'b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 160.57$ (1C, C4), 150.28 (1C, C6), 135–113 (18C, DMTr), 86.41 (1C, C4'), 85.45 (1C, C1'), 72.31 (1C, C3'), 68.66 (1C, C5), 63.95 (1C, C5'), 55.11 (2C, 2 x OMe), 41.46 (1C, C2') ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{IN}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{Et}_3\text{N}+\text{H}]^+$: 758.23, gef.: 758.22.

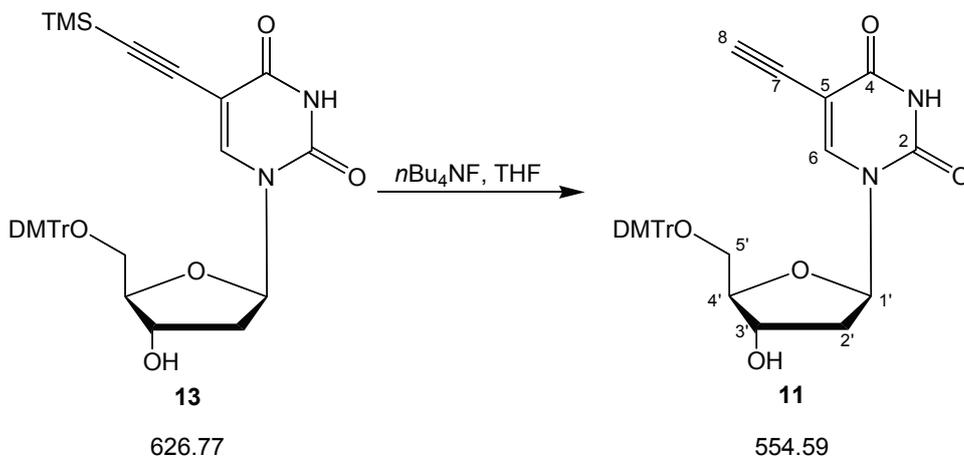
8.2.7 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-iod-2'-desoxyuridin

1.5 g 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-iod-2'-desoxyuridin **12** (2.28 mmol) wurden in 20 mL Triethylamin suspendiert und mit Argon belüftet. 34 mg Kupfer(I)iodid (183 μ mol, 0.08 Äq.), 48 mg Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)chlorid (68.5 μ mol, 0.03 Äq) und 949 μ L Trimethylsilylethin (0.67 g, 6.85 mmol, $\rho = 0.709$, 3 Äq.) wurden hinzugegeben und 2 h bei 50 °C gerührt. Nach Zugabe von 5 mL Dimethylformamid wurde die schwarze Lösung weitere 2 h bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Dichlormethan koevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit den Eluenten Chloroform/Methanol/Triethylamin: 100/1/1 gereinigt. Man erhielt 1.28 g eines gelblichen Schaums **13** (2.04 mmol, 90%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.98$ (s, 1H, H6), 7.46–7.18 (m, 9H, DMTr), 7.10–6.88 (m, 4H, DMTr), 6.26 (dd, $J = 7.6, 6.0$ Hz, 1H, H1'), 4.43 (ddd, $J = 5.9, 3.0, 2.9$ Hz, 1H, H3'), 4.05 (dt, $J = 3.7, 3.0$ Hz, 1H, H4'), 3.78 (s, 6 H, 2 x OMe), 3.42 (dd, $J = 10.6, 3.7$ Hz, 1H, H5''), 3.31 (dd, $J = 10.6, 3.7$ Hz, 1H, H5'), 2.45 (ddd, $J = 13.7, 6.0, 2.9$ Hz, 1H, H2''), 2.21 (ddd, $J = 13.7, 7.6, 5.9$ Hz, 1H, H2'), 0.00 (s, 9H, TMS) ppm.

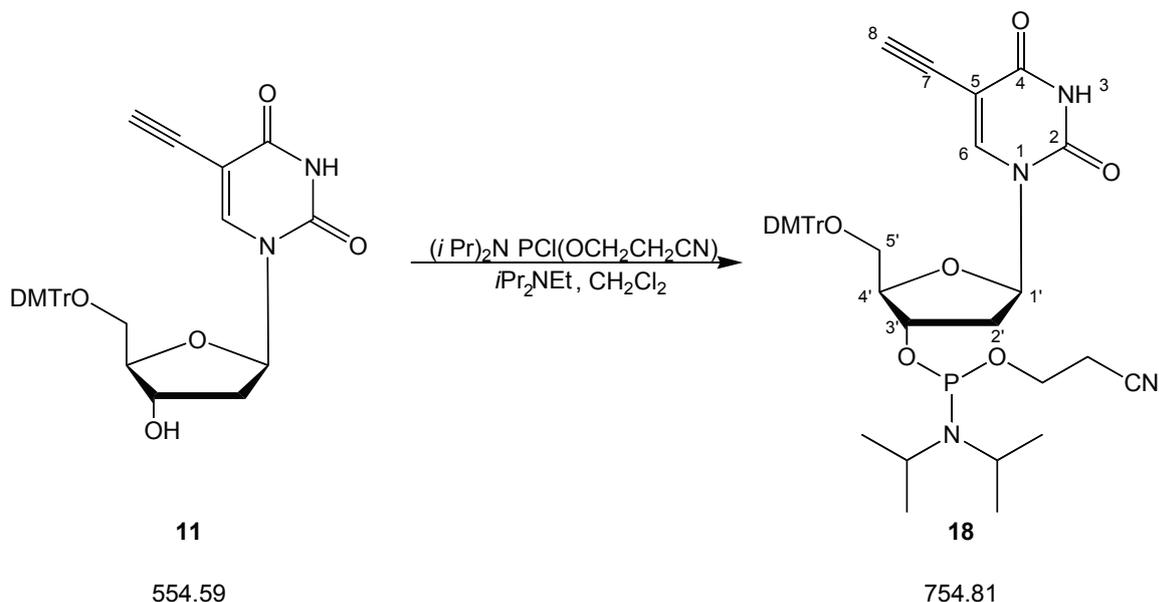
¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): $\delta = 158.64$ (1C, C4), 149.14 (1C, C2), 142.99 (1C, C6), 135–113 (18C, DMTr), 99.37 (1C, C8), 94.54 (1C, C5), 86.69 (1C, DMTr), 86.36 (1C, C4'), 85.72 (1C, C1'), 75.23 (1C, C7), 72.31 (1C, C3'), 63.45 (1C, C5'), 55.31 (2C, 2 x OMe), 41.30 (1C, C2'), -0.37 (3C, TMS) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril + 1% Triethylamin, positive mode): ber. für C₄₁H₅₄N₃O₇Si [M+Et₃N+H]⁺: 728.37, gef.: 728.40.

8.2.8 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-ethinyl-2'-desoxyuridin

1.09 g 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-trimethylsilyl-2'-desoxyuridin **13** (1.74 mmol) wurden in 30 mL Tetrahydrofuran und 247 μL Triethylamin (175 g, 1.74 mmol, $\rho = 0.709$, 1.0 Äq.) gelöst. Zum Reaktionsgemisch wurden 3.48 mL 1M Tetra-*n*-butylammoniumfluoridlösung in Tetrahydrofuran (3.48 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie mit dem Laufmittel Chloroform/Triethylamin/Methanol: 100/1/0 dann 100/1/10 gereinigt. Man erhielt 797 mg eines gräulichen Schaums **11** (1.44 mmol, 82%).

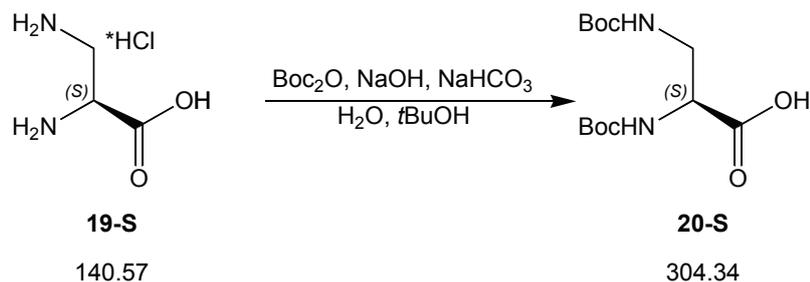
Analysen siehe Abschnitt 8.2.5.

8.2.9 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-ethynyl-2'-desoxyuridin-phosphoramidit

200 mg **11** (0.36 mmol) wurden in 2 mL Dichlormethan gelöst und mit 92 μL *N*-Ethyldiisopropylamin (69 mg, 0.54 mmol, $\rho = 0.755$, 1.5 Äq.) und 96.5 μL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchloro-phosphoramidit (102 mg, 0.43 mmol, $\rho = 1.061$, 1.2 Äq.) versetzt. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Chloroform/Methanol/Triethylamin: 100/1/1 gereinigt. Man erhielt 244 mg eines weißen Schaums **18** (0.32 mmol, 90%).

^{31}P -NMR (243 MHz, CDCl_3 mit 0.5% Triethylamin): $\delta = 149.56$ (d, $J = 50$ Hz).

ESI-MS m/z (Acetonitril mit 1% Triethylamin, positive mode): ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{Et}_3\text{N}+\text{H}]^+$: 856.44, gef.: 856.53.

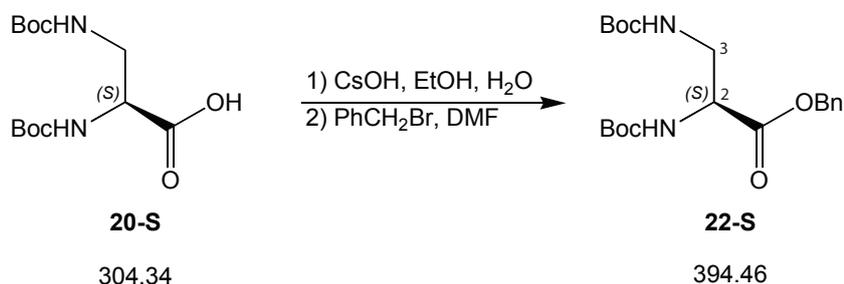
8.2.10 (*S*)-*N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonyl-2,3-diaminopropionsäure

5.14 g (*S*)-2,3-Diaminopropionsäure-monohydrochlorid **19-S** (36.5 mmol) wurde in 36.6 mL Wasser und 36.6 mL 1 M Natronlauge gelöst. 35 mL *tert*-Butanol, 9.22 g Natriumhydrogencarbonat (110 mmol, 3.0 Äq.) und 16.0 g Di-*tert*-butyldicarbonat (73 mmol, 2.0 Äq.) wurden zugegeben und bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Das *tert*-Butanol wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Chloroform (3 x 50 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde bei 4 °C mit 1 M Salzsäure auf pH = 2 eingestellt und erneut mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt 10.5 g eines weißen Schaums **20-S** (34.5 mmol, 95%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 4.26 (m, 1H, CH), 3.60 (m, 1H, CH₂a), 3.53 (m, 1H, CH₂b), 1.45 (s, 18H, 2 x Boc) ppm.

ESI-MS *m/z* (Acetonitril, positive mode): ber. für C₁₃H₂₄N₂NaO₆ [M+Na]⁺: 327.15, gef.: 327.19.

8.2.11 (*S*)-*N,N'*-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-2,3-Diaminopropionsäurebenzylester

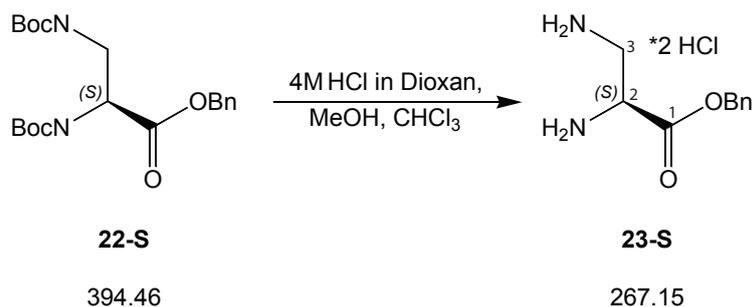


9.95 g (*S*)-*N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonyl-2,3-diaminopropionsäure **20-S** (32.7 mmol) wurde in 70 mL Ethanol und 35 mL Wasser gelöst. Danach wurde ein 10%ige Cäsiumhydroxidhydrat-Lösung (etwa 40 mL) zugetropft bis pH 7 erreicht war. Das Gemisch wurde im Vakuum (0.1 mbar) getrocknet und man erhielt 12.9 g des entsprechenden Cäsiumsalzes **21-S**. Dieses wurde in Dimethylformamid gelöst und mit 9.66 mL Benzylbromid (6.71 g, 39 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Nach 15 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeeengt und in Cyclohexan umkristallisiert. Man erhielt 10.5 g einer weißen Substanz **22-S** (26.5 mmol, 81%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.39\text{--}7.29$ (m, 5H, Ph), 5.18 (s, 2H, CH_2Ph), 4.38 (m, 1H, H2), 3.51 (m, 2H, H3), 1.43 (s, 18H, 2 x Boc) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 395.22, gef.: 395.29.

8.2.12 2,3-Diaminopropionsäurebenzylester Dihydrochlorid

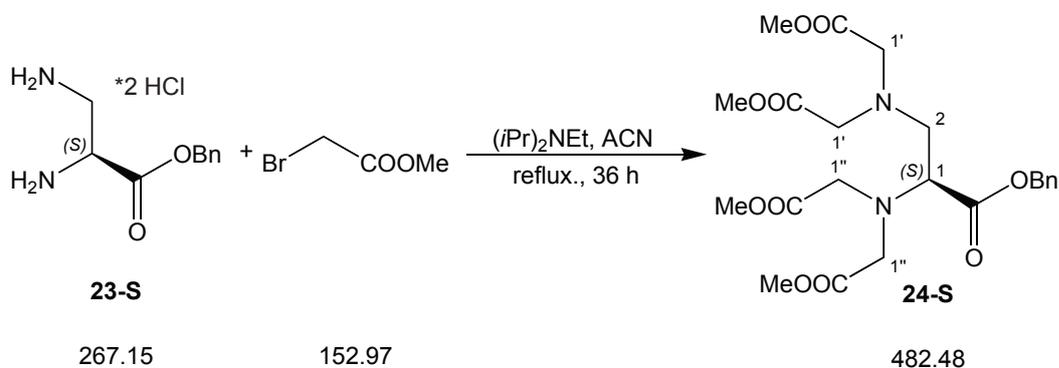


9.86 g **22-S** (25.0 mmol) wurden in 70 mL Chloroform gelöst und mit 35 mL Methanol und 35 mL 4 M HCl-Lösung in Dioxan (5.6 Äq.) versetzt. Das Gemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Das Gemisch wurde im Vakuum eingedunstet und der Rückstand mit Aceton (30 mL) und Ether (30 mL) gewaschen. Man erhielt 6.52 g eines weißen Schaums **23-S** (24.4 mmol, 97%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.51\text{--}7.34$ (m, 5H, Ph), 5.28 (AB, $J = 15$ Hz, 2H, CH_2Ph), 4.48 (t, $J = 7$ Hz, 1H, H2), 3.38 (m, 2H, H3) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 195.11, gef.: 195.22.

8.2.13 (*S*)-(1-Benzoyloxycarbonyl)-ethylendiamintetraessigsäuretetramethylester

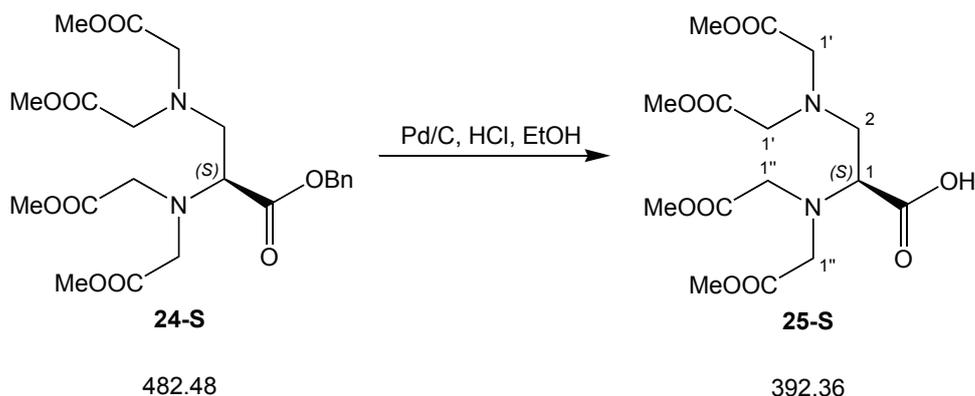


6.38 g (*S*)-2,3-Diaminopropionsäurebenzylester Dihydrochlorid **23-S** (23.9 mmol) wurde in 300 mL Acetonitril gelöst und mit 32.7 mL *N*-Ethyl-diisopropylamin (24.7 g, 191 mmol, 8.0 Äq.) versetzt. Anschließend wurden 21.9 mL Bromoessigsäuremethylester (36.4 g, 238 mmol, $\rho = 1.664$, 10.0 Äq) zugetropft und die Lösung 36 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und man erhielt ein orangenes Pulver, das in Dichlormethan aufgenommen und mit Phosphatpuffer (pH = 2, 0.1 M) gewaschen wurde. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene braune Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Eluent: Heptan/Essigester: 2/1). Man erhielt 12.6 g eines gelbes Öls **24-S** (>100%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.39\text{--}7.28$ (m, 5H, Ph), 5.12 (s, 2H, CH_2Ph), 3.71 (m, 1H, H1), 3.67 (m, 4H, H1''), 3.65 (s, 6H, Me'), 3.64 (s, 6H, Me''), 3.61 (s, 4H, H1'), 3.18 (dd, $J = 13.8$ Hz, 6.4 Hz, 1H, H2a), 3.08 (dd, $J = 13.8$ Hz, 8.4 Hz, 1H, H2b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 171.43$ (2C, 2 x COOMe'), 171.34 (2C, 2 x COOMe''), 171.22 (1C, COOBn), 135.50 (1C, $\text{Ph}_{\text{quart.}}$), 128.22 (2C, 2 x Ph_{meta}), 127.99 (2C, 2 x Ph_{ortho}), 127.90 (1C, Ph_{para}), 66.24 (1C, CH_2Ph), 63.88 (1C, C1), 54.83 (2C, 2 x C1''), 54.53 (1C, C2), 52.30 (2C, 2 x C1'), 51.29 (2C, 2 x Me'), 51.14 (2C, 2 x Me'') ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NaN}_2\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 505.18, gef.: 505.23.

8.2.14 (*S*)-1-Carboxyethylendiamintetraessigsäuretetramethylester

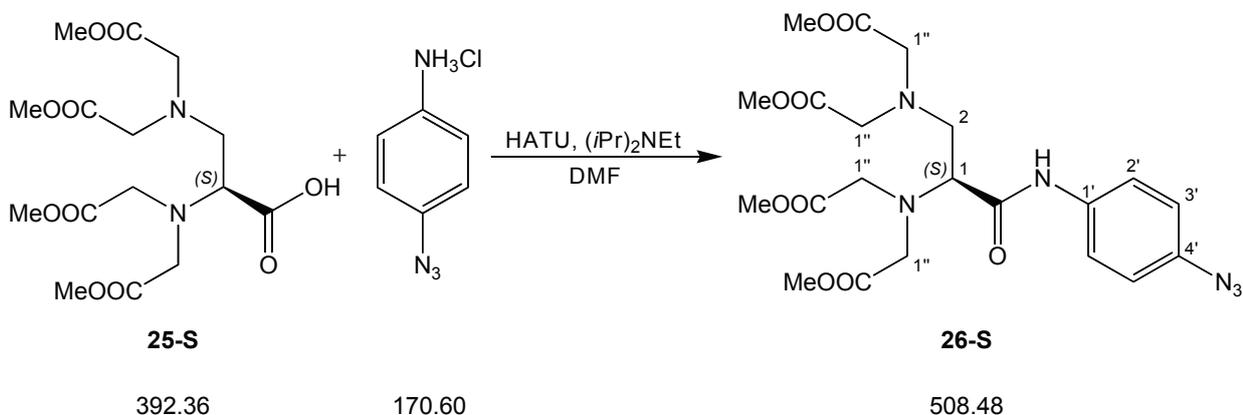
490 mg (*S*)-(1-Benzyloxycarbonyl)-ethyldiamintetraessigsäuretetramethylester **24-S** (1.02 mmol) und 80 μL konzentrierte Salzsäure (1.0 Äq.) wurden in 3 mL Ethanol gelöst und unter Argonatmosphäre gebracht. 10%wt Pd/C-Katalysator (34.5 mg) wurde abwechselnd mit Argon belüftet und evakuiert (dreimal). Danach wurden 3 mL Ethanol zugegeben. Die Suspension wurde erneut dreimal mit Argon belüftet und evakuiert und dann unter Wasserstoffatmosphäre gebracht. Die Suspension wurde 2 min gerührt und anschließend die Lösung von **24-S** zugegeben. Nach fünfstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Katalysator durch eine Natriumsulfatschicht (1 cm) abfiltriert und der Rückstand mit Ethanol gewaschen. Die Lösung wurde im Vakuum eingedunstet und zweimal mit Toluol koevaporiert. Man erhielt 380 mg gelbliches Glas **25-S** (0.91 mmol, 95%).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz): $\delta = 3.74$ (m, 1H, H1), 3.71 (m, 4H, H1''), 3.67 (s, 6H, 2 x Me), 3.65 (m, 4H, H1'), 3.59 (s, 6H, 2 x Me), 3.23 (dd, $J = 13.8$ Hz, 6.4 Hz, 1H, H2a), 3.12 (dd, $J = 13.8$ Hz, 8.0 Hz, 1H, H2b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 100.6 MHz): $\delta = 173.81$ (1C, COOH), 168.45 (2C, 2 x COOMe), 167.18 (2C, 2 x COOMe), 63.94 (1C, C1), 55.21 (2C, 2 x C1'), 54.23 (1C, C2), 52.12 (2C, 2 x C1''), 51.77 (4C, 4 x Me) ppm.

ESI-MS m/z (Wasser + 10% Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 393.15, gef.: 393.22.

8.2.15 (S)-1-(4-Azidophenylcarbamoyl)-ethylendiamintetraessigsäuretetramethylester

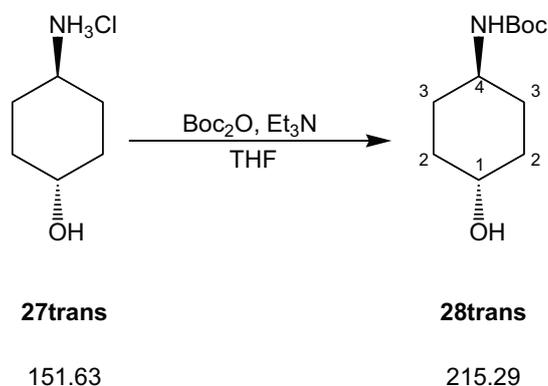


100 mg **25-S** (255 μmol) und 174 mg HATU (459 μmol , 3.0 Äq.) wurden in 131 μL *N*-Ethyldiisopropylamin (99 mg, $\rho = 0.755$, 765 μmol , 3.0 Äq.) und 5 mL Dimethylformamid gelöst und 2 h unter Argon gerührt. Dann gab man eine Lösung aus 52 mg Azidoanilinhydrochlorid (306 μmol , 1.2 Äq.) und 52 μL *N*-Ethyldiisopropylamin (40 mg, $\rho = 0.755$, 306 μmol , 1.2 Äq.) in 5 mL Dimethylformamid hinzu und rührte 16 h bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Phosphatpuffer (0.1 M, pH = 2) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluenten Chloroform/Methanol: 100/1 gereinigt. Man erhielt 119 mg eines gelben Öls **26-S** (234 μmol , 92%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz): $\delta = 10.36$ (br, 1H, NH), 7.68 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2 x H2'), 6.97 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2 x H3'), 3.77 (AB, 4H, 4 x H1''), 3.73 (s, 6H, 2 x Me), 3.70 (m, 1H, H1), 3.69 (s, 6H, 2 x Me), 3.62 (AB, 4H, 4 x H1''), 3.35 (dd, $J = 13.9$ Hz, 6.9 Hz, 1H, H2a), 3.09 (dd, $J = 13.9$ Hz, 7.1 Hz, 1H, H2b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100.6 MHz): $\delta = 173.14$ (2C, 2 x COOMe), 171.99 (2C, 2 x COOMe), 170.86 (1C, CONH), 136.01 (1C, C4'), 135.39 (1C, C1'), 120.86 (2C, 2 x C2'), 119.67 (2C, 2 x C3'), 65.28 (1C, C1), 55.67 (2C, 2 x C1''), 55.15 (1C, C2), 53.85 (2C, 2 x C1''), 52.47 (2C, 2 x Me), 51.95 (2C, 2 x Me) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 509.20, gef.: 509.20.

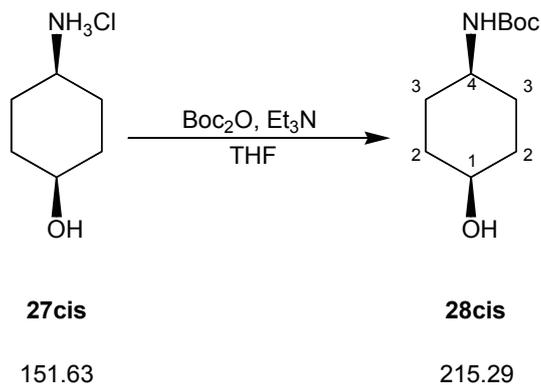
8.2.16 *trans*-4-*tert*-Butoxycarbonylamino-cyclohexanol

Zu 1.00 g *trans*-4-Aminocyclohexanol Hydrochlorid **27trans** (6.60 mmol) in 1.84 mL Triethylamin (1.34 g, 13.2 mmol, 2.0 Äq.) und 10 mL Tetrahydrofuran wurden 2.88 g Di-*tert*-butyldicarbonat (13.2 mmol, 2.0 Äq.) in 5 mL Tetrahydrofuran bei 0 °C langsam zutropft. Anschließend wurde 5 min bei 0 °C und nochmals 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Diethylether verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die etherische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde aus Essigester/Heptan umkristallisiert. Im Vakuum (0.1 mbar) wurden die *tert*-Butanolreste entfernt. Die Ausbeute betrug 1.35 g (6.27 mmol, 95%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 4.35 (s, br, 1H, NH), 3.59 (m, 1H, H1), 3.42 (s, br, 1H, H4), 2.04 (m, 2H, 2 x H2_{eq}), 1.95 (m, 2H, 2 x H3_{eq}), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.38 (m, 2H, 2 x H2_{ax}), 1.17 (m, 2H, 2 x H3_{ax}) ppm (Zuordnung der axialen und äquatorialen Protonen aus E.COSY).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 155.30 (1C, CO), 79.20 (1C, C(CH₃)₃), 69.78 (1C, C1), 48.73 (1C, C4), 33.91 (2C, 2 x C2), 31.09 (2C, 2 x C3), 28.48 (3C, 3 x CH₃) ppm.

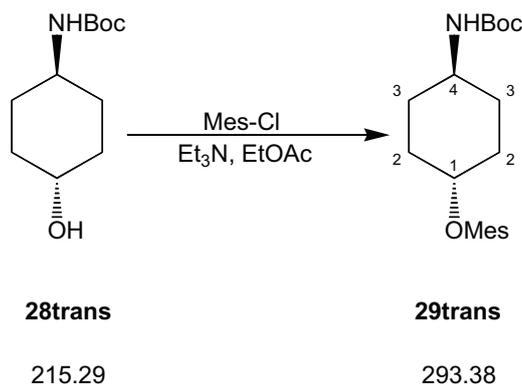
ESI-MS *m/z* (Acetonitril, positive mode): ber. für C₁₁H₂₂NO₃ [M+H]⁺: 216.16, gef.: 216.08.

8.2.17 *cis*-4-*tert*-Butoxycarbonylamincyclohexanol

Die Synthese der *cis*-Verbindung erfolgt analog zur *trans*-Verbindung.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.53$ (s, br, 1H, NH), 3.89 (m, 1H, H1), 3.53 (s, br, 1H, H4), 1.72 (m, 2H, 2 x H3), 1.67-1.64 (m, 4H, 4 x H2), 1.60 (m, 2H, 2 x H3), 1.45 (s, 9H, Boc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 155.30$ (1C, CO), 79.20 (1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.23 (1C, C1), 47.42 (1C, C4), 30.38 (2C, 2 x C2), 28.16 (3C, 3 x CH_3), 27.52 (2C, 2 x C3) ppm.

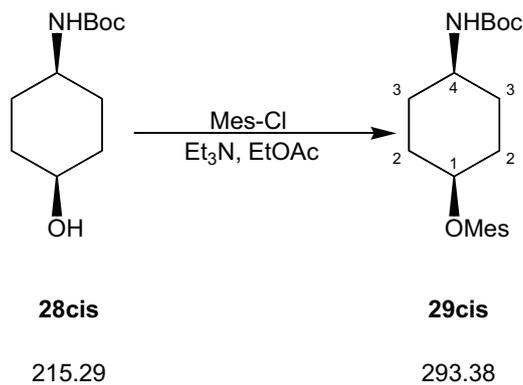
8.2.18 *trans*-4-*tert*-Butoxycarbonylamino-cyclohexylmesylat

0.90 g *trans*-4-*tert*-Butoxycarbonylamino-cyclohexanol **28trans** (4.18 mmol) wurden in 20 mL Essigester und 2.33 mL Triethylamin (1.69 g, 16.7 mmol, 2 Äq.) gelöst und auf -10 °C gekühlt. Anschließend wurde eine -10 °C kalte Lösung aus 0.46 mL Mesylchlorid (0.67 g, 5.85 mmol, 1.4 Äq.) in 5 mL Essigester langsam zugetropft und 1 h bei -10 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Essigester verdünnt und mit 0 °C kalter 0.1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Man erhielt **29trans** als weißes Pulver in quantitativer Ausbeute.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 4.62 (m, 1H, H1), 4.38 (s, br, 1H, NH), 3.47 (sbr, 1H, H4), 3.02 (s, 3H, Mes), 2.12 (m, 2H, 2 x H3), 2.06 (m, 2H, 2 x H2), 1.68 (m, 2H, 2 x H3), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.25 (m, 2H, 2 x H2) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 154.53 (1C, CO), 79.57 (1C, C1), 79.14 (1C, C(CH₃)₃), 47.83 (1C, C4), 38.78 (1C, Mes), 30.91 (2C, 2 x C3), 30.44 (2C, 2 x C2), 28.44 (3C, 3 x CH₃) ppm.

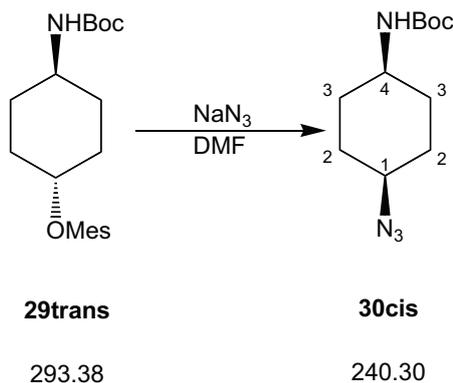
ESI-MS *m/z* (Acetonitril + 1% Ameisensäure, positive mode): ber. für C₁₂H₂₃NNaO₃S [M+Na]⁺: 316.12, gef.: 316.07.

8.2.19 *cis*-4-*tert*-Butoxycarbonylaminocyclohexylmesylat

Die Synthese der *cis*-Verbindung erfolgt analog zur *trans*-Verbindung.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.88$ (m, 1H, H1), 4.46 (sbr, 1H, NH), 3.52 (sbr, 1H, H4), 3.01 (s, 3H, Mes), 2.06 (m, 2H, 2 x H3), 1.84 (m, 2H, 2 x H2), 1.74 (m, 2H, 2 x H3), 1.58 (m, 2H, 2 x H2), 1.44 (s, 9H, Boc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 154.53$ (1C, CO), 79.14 (1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 77.63 (1C, C1), 47.38 (1C, C4), 38.43 (1C, Mes), 29.78 (2C, 2 x C3), 28.44 (3C, 3 x CH_3), 27.44 (2C, 2 x C2) ppm.

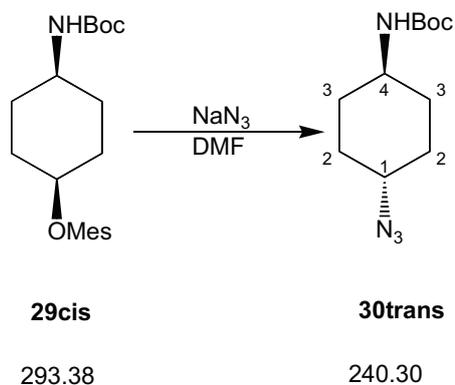
8.2.20 *cis*-4-*tert*-Butoxycarbonylaminocyclohexylazid

1.00 g *trans*-4-*tert*-Butoxycarbonylaminocyclohexylmesylat **29trans** (3.41 mmol) und 2.22 g Natriumazid (34.08 mmol, 10 Äq.) in 50 mL Dimethylformamid wurden 4 d bei 50 °C gerührt. Die Suspension wurde mit Dichlormethan versetzt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das gelbliche Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt mit Hexan/Essigester: 4 / 1 dann 1/1. Die Ausbeute betrug 82% (2.79 mmol, 0.67 g).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 4.46 (sbr, 1H, NH), 3.69 (m, 1H, H1), 3.51 (sbr, 1H, H4), 1.88 (m, 2H, 2 x H3), 1.75 (m, 2H, 2 x H2), 1.65 (m, 2H, 2 x H2), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.42 (m, 2H, 2 x H3) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 154.51 (1C, CO), 79.02 (1C, C(CH₃)₃), 57.01 (1C, C1), 47.67 (1C, C4), 28.67 (2C, 2 x C3), 28.39 (3C, 3 x CH₃), 28.04 (2C, 2 x C2) ppm.

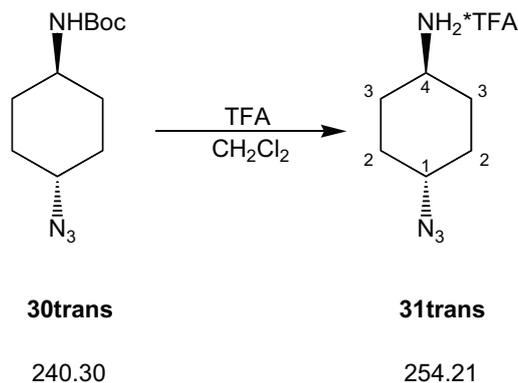
ESI-MS *m/z* (Acetonitril+ 1% Triethylamin, positive mode): ber. für C₁₁H₂₁N₄O₂ [M+H]⁺: 241.17, gef.: 241.11.

8.2.21 *trans*-4-*tert*-Butoxycarbonylamino-cyclohexylazid

Die Synthese der *trans*-Verbindung erfolgt analog zur *cis*-Verbindung in nur 24 h Reaktionszeit.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.34$ (sbr, 1H, NH), 3.43 (sbr, 1H, H4), 3.26 (m, 1H, H1), 2.05 (m, 2H, 2 x H3), 1.99 (m, 2H, 2 x H2), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.43 (m, 2H, 2 x H2), 1.19 (m, 2H, 2 x H3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 154.52$ (1C, CO), 79.02 (1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.12 (1C, C1), 48.63 (1C, C4), 31.30 (2C, 2 x C3), 30.08 (2C, 2 x C2), 28.41 (3C, 3 x CH_3) ppm.

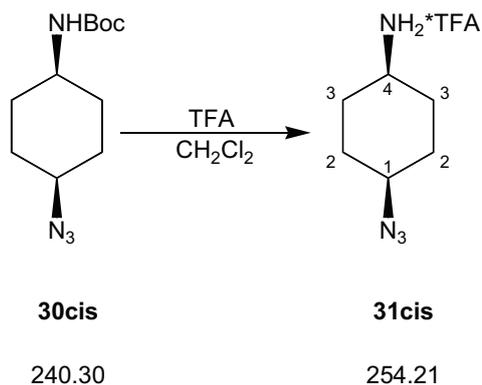
8.2.22 *trans*-4-Aminocyclohexylazid

100 mg 4-*tert*-Butoxycarbonylamino-cyclohexylazid **30trans** (0.42 mmol) wurde in 2 mL Dichlormethan und 2 mL Trifluoressigsäure gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand wurde aus Essigester/Hexan umkristallisiert. Das Produkt fiel als Trifluoracetat **31trans** (97 mg, 0.38 mmol, 92%) aus.

¹H-NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ = 3.38 (m, 1H, H1), 3.13 (m, 1H, H4), 2.06 (m, 2H, 2 x H2), 2.02 (m, 2H, 2 x H3), 1.50 (m, 2H, 2 x H2), 1.37 (m, 2H, 2 x H3) ppm.

¹³C-NMR (CD₃CN, 100.6 MHz): δ = 59.01 (1C, C1), 50.44 (1C, C4), 30.06 (2C, 2 x C3), 29.22 (2C, 2 x C2) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für C₆H₁₃N₄ [M+H]⁺: 141.11, gef.: 140.90.

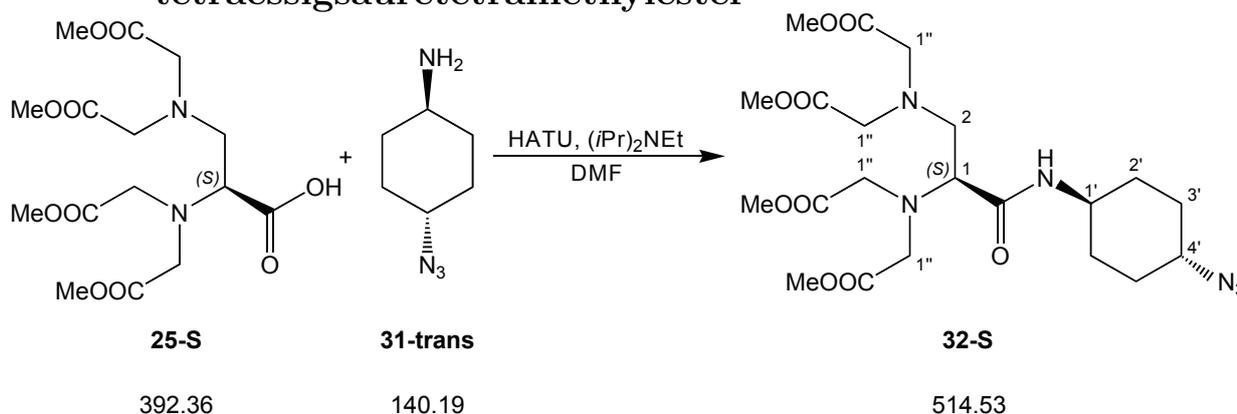
8.2.23 *cis*-4-Aminocyclohexylazid

Die Synthese der *cis*-Verbindung erfolgt analog zur *trans*-Verbindung.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3CN , 400 MHz): $\delta = 7.44$ (sbr, 2H, NH₂), 3.88 (m, 1H, H₁), 3.21 (m, 1H, H₄), 1.87 (m, 2H, 2 x H₃), 1.85 (m, 2H, 2 x H₂), 1.68 (m, 2H, 2 x H₃), 1.66 (m, 2H, 2 x H₂) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3CN , 100.6 MHz): $\delta = 55.77$ (1C, C₁), 49.13 (1C, C₄), 24.71 (2C, 2 x C₃), 26.95 (2C, 2 x C₂) ppm.

8.2.24 (S)-1-(*trans*-4-Azidocyclohexylcarbamoyl)ethylendiamin-tetraessigsäuretetramethylester



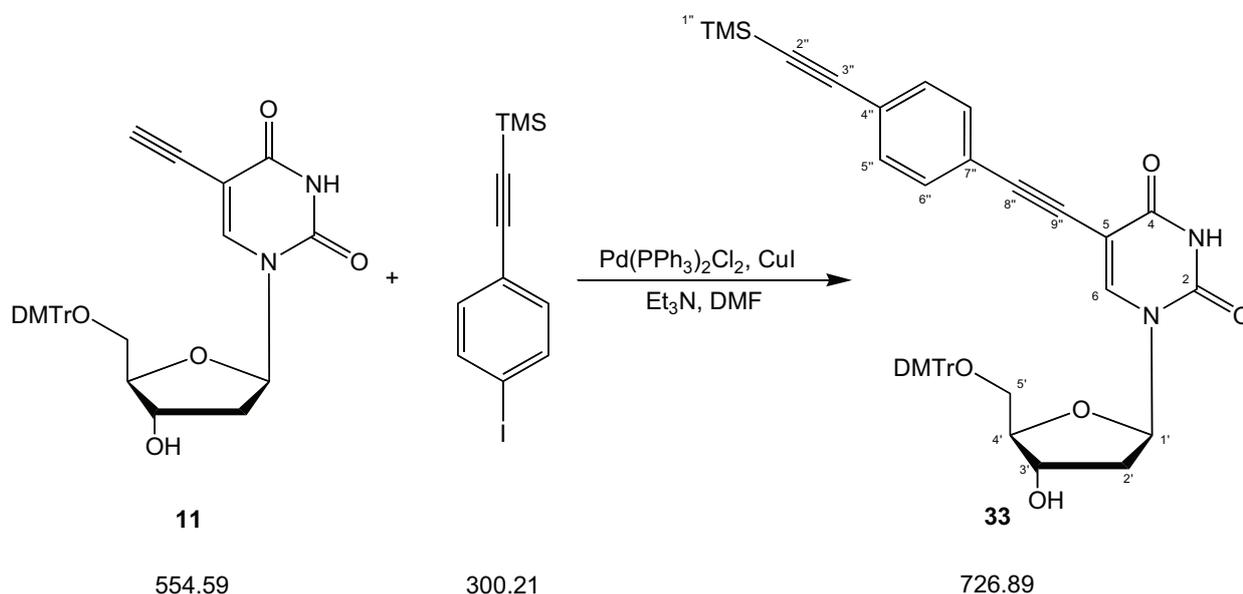
200 mg **25-S** (510 μmol) und 349 mg HATU (918 μmol , 3.0 Äq.) wurde mit 262 μL *N*-Ethyl-diisopropylamin (198 mg, $\rho = 0.755$, 1.53 mmol, 3.0 Äq.) in 8 mL Dimethylformamid gelöst und 2 Stunden unter Argon gerührt. Anschließend gab man eine Lösung aus 108 mg *trans*-4-Aminocyclohexylazid **31trans** (612 μmol , 1.2 Äq.) und 105 μL *N*-Ethyl-diisopropylamin (79 mg, $\rho = 0.755$, 612 μmol , 1.2 Äq.) in 8 mL Dimethylformamid hinzu und rührte 24 h bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Phosphatpuffer (0.1 M, pH = 2) und gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Das braune Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Chloroform/Methanol: 100/1 gereinigt. Man erhielt 180 mg eines gelben Öls **32-S** (350 μmol , 68%).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz): $\delta = 8.84$ (sbr, 1H, NH), 4.06 (m, 1H, H4'), 3.91 (m, 1H, H1'), 3.76 (m, 1H, H1), 3.72 (s, 12H, 4 x Me), 3.7–3.6 (m, 8H, 8 x H1''), 3.47 (m, 1H, H2a), 3.28 (m, 1H, H2b), 2.04 (m, 2H, 2 x H2'a), 1.91 (m, 2H, 2 x H3'a), 1.72 (m, 2H, 2 x H3'b), 1.45 (m, 2H, 2 x H2'b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 100.6 MHz): $\delta = 172.16$ (4C, 4 x COOMe), 170.14 (1C, CONH), 63.61 (1C, C1), 55.08 (1C, C2), 53.13 (4C, 4 x C1''), 51.78 (4C, 4 x Me), 50.65 (1C, C1'), 48.69 (1C, C4'), 30.52 (2C, 2 x C2'), 25.98 (2C, 2 x C3') ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{NaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 537.23, gef.: 537.44.

8.2.25 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-[[[4-(trimethylsilyl)ethynyl]-phenyl]-ethynyl]-2'-desoxyuridin

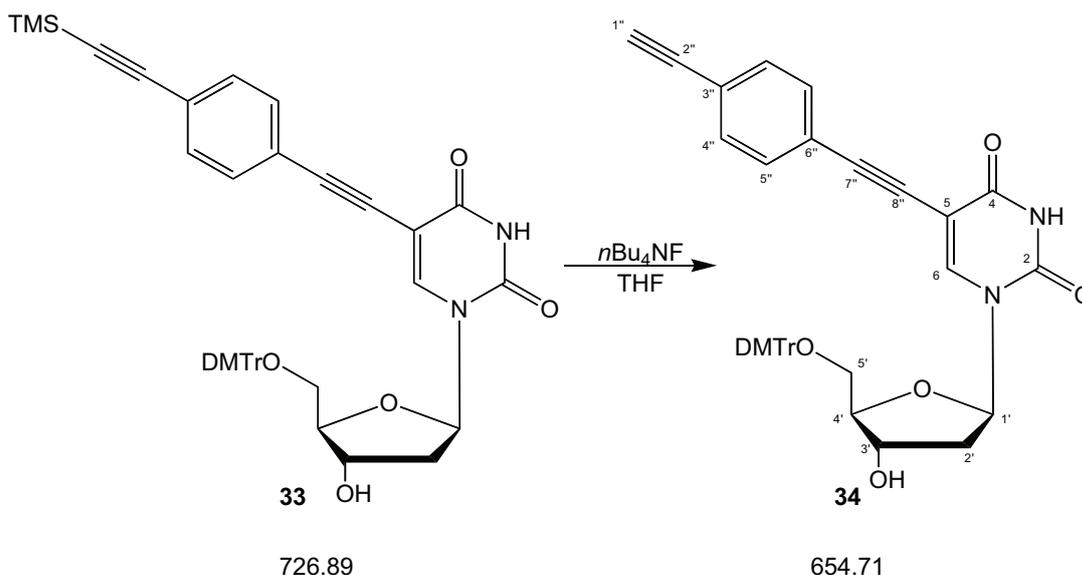


400 mg 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-ethynyl-2'-desoxyuridin **11** (0.72 mmol), 11.0 mg Kupfer(I)iodid (57.7 μmol , 0.08 Äq.), 282 mg [(4-Iodphenyl)ethynyl]trimethylsilan (0.94 mmol, 1.3 Äq.) und 15.2 mg Bis-(triphenylphosphin)-palladium(II)chlorid (21.6 μmol , 0.03 Äq.) wurden in 4 mL sauerstofffreiem, trockenem Triethylamin und 4 mL sauerstofffreiem, trockenem Dimethylformamid gelöst und 3 h bei 40 °C gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit den Eluenten Chloroform/Methanol/Triethylamin: 100/0/1 bis 100/4/1 gereinigt. Man erhielt 423 mg eines gelblichen Schaums (0.58 mmol, 81%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 8.18 (s, 1H, H6), 7.46–7.17 (m, 9H, DMTr), 7.05–6.75 (m, 4H, DMTr), 7.22 (d, J = 8.19 Hz, 2H, 2 x H5''), 6.90 (d, J = 8.19 Hz, 2H, 2 x H6''), 6.37 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H1'), 4.58 (m, 1H, H3'), 4.11 (m, 1H, H4'), 3.70 (s, 6H, OMe), 3.52–3.29 (m, 2H, 2 x H5'), 2.56–2.48 (m, 2H, 2 x H2'), 0.23 (s, 9H, TMS) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz): $\delta = 159.92$ (1C, C4), 148.99 (1C, C2), 142.13 (1C, C6), 135–113 (18C, DMTr), 131.13 (2C, 2 x C6''), 131.31 (2C, 2 x C5''), 120.88 (1C, C4''), 120.46 (1C, C7''), 106.46 (1C, C3''), 99.72 (1C, C5), 96.11 (1C, C2''), 93.48 (1C, C8''), 86.17 (1C, C4'), 86.12 (1C, C1'), 82.88 (1C, C9''), 72.15 (1C, C3'), 63.14 (1C, C5'), 54.92 (2C, 2 x OMe), 41.89 (1C, C2'), -0.12 (3C, TMS) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril mit 1% Triethylamin, positive mode): ber. für $\text{C}_{49}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}$ $[\text{M}+\text{NEt}_3+\text{H}]^+$: 828.40, gef.: 828.31.

8.2.26 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-[[[4-(trimethylsilyl)ethynyl]phenyl]ethynyl]-2'-desoxyuridin

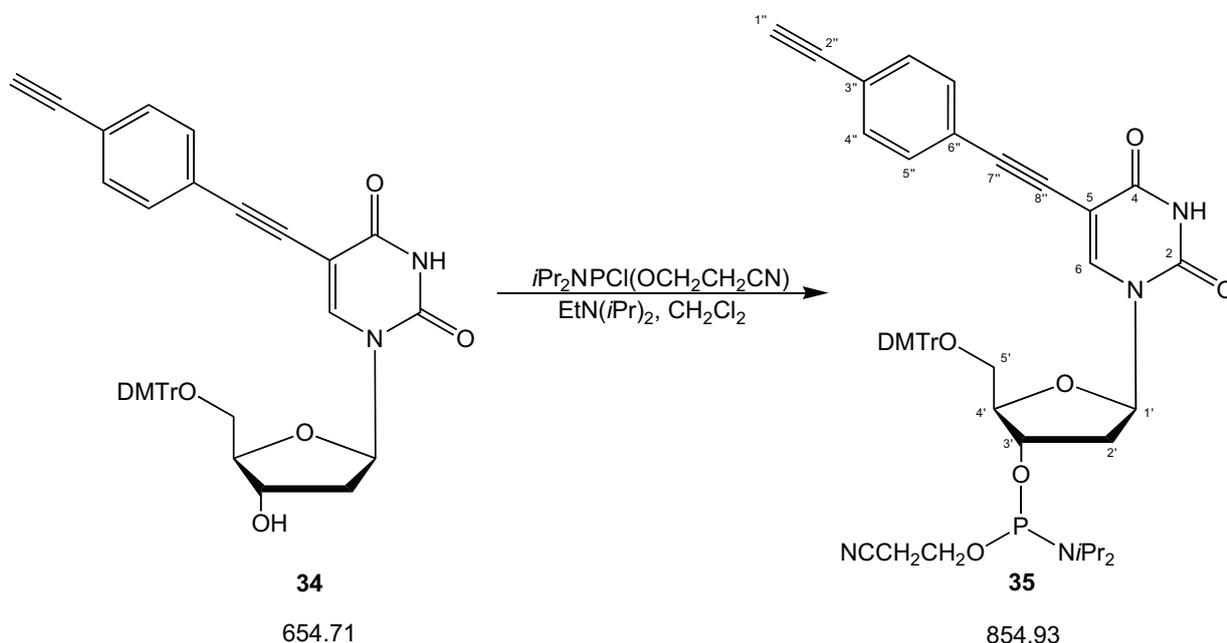
100 mg 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-[[[4-(trimethylsilyl)ethynyl]phenyl]ethynyl]-2'-desoxyuridin **33** (138 μmol) wurden in 3.6 mL Tetrahydrofuran und 400 μL Triethylamin gelöst und mit 360 μL Tetra-*n*-butylammoniumfluorid-Lösung (1M in Tetrahydrofuran, 360.0 μmol , 2.6 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Eluenten Chloroform/Methanol/Triethylamin: 100/1/1 gereinigt. Man erhielt 63 mg **34** (96 μmol , 70%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 8.23 (s, 1H, H6), 7.46–6.75 (m, 13H, DMTr), 7.24 (d, J = 8.19 Hz, 2H, 2 x H5''), 6.91 (d, J = 8.19 Hz, 2H, 2 x H6''), 6.35 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H1'), 4.57 (m, 1H, H3'), 4.10 (m, 1H, H4'), 3.69 (s, 6H, 2 x OMe), 3.55–3.29 (m, 2H, 2 x H5'), 3.13 (s, 1H, H1''), 2.53–2.33 (m, 2H, 2 x H2') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ = 158.54 (1C, C4), 148.58 (1C, C2), 142.84 (1C, C6), 135–113 (18C, DMTr), 131.42 (2C, 2 x C5''), 131.52 (2C, 2 x C4''), 122.75 (1C, C3''), 121.28 (1C, C6''), 99.98 (1C, C5), 92.76 (1C, C7''), 86.91 (1C, C4'), 86.62 (1C, DMTr), 85.46 (1C, C1'), 83.24 (1C, C2''), 81.56 (1C, C8''), 78.7 (1C, C1''), 72.00 (1C, C3'), 63.20 (1C, C5'), 55.12 (2C, 2 x OMe), 41.83 (1C, C2') ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril mit 1% Triethylamin, positive mode): ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{NEt}_3+\text{H}]^+$: 756.36, gef.: 756.37.

8.2.27 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-[[[(4-ethynyl)phenyl]-ethynyl]-2'-desoxyuridin-3'-[2-cyanoethyl-*N,N*-bis(diisopropyl)]phosphoramidit

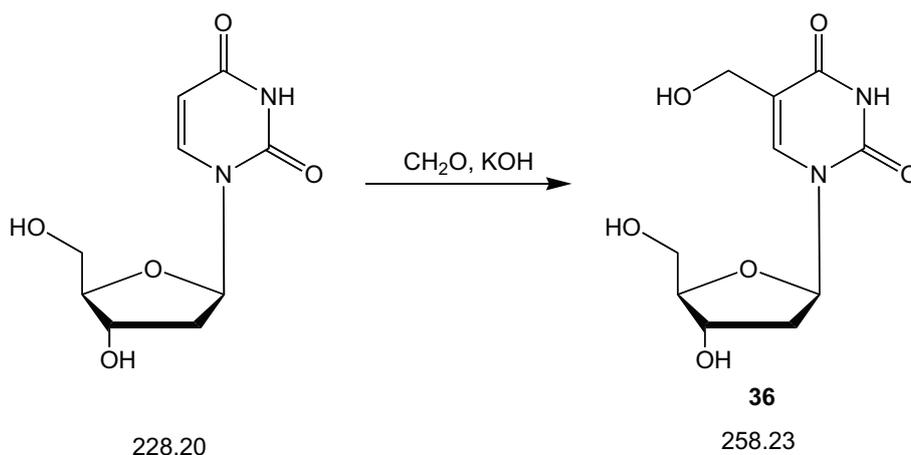


63 mg 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-[[[(4-ethynyl)phenyl]ethynyl]-2'-desoxyuridin **34** (96 μmol) wurden in 24.7 μL *N*-Ethyldiisopropylamin (18.6 mg, 144 μmol , $\rho = 0.755$, 1.5 Äq.) und 1 mL Dichlormethan gelöst. Danach wurden 25.8 μL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (27.3 mg, 115 μmol , $\rho = 1.061$, 1.2 Äq.) langsam zugetropft und die Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit den Eluentem Chloroform/Methanol/Triethylamin: 100/1/1 gereinigt. Man erhielt 70 mg eines gelblichen Schaums **35** (81.8 μmol , 85%).

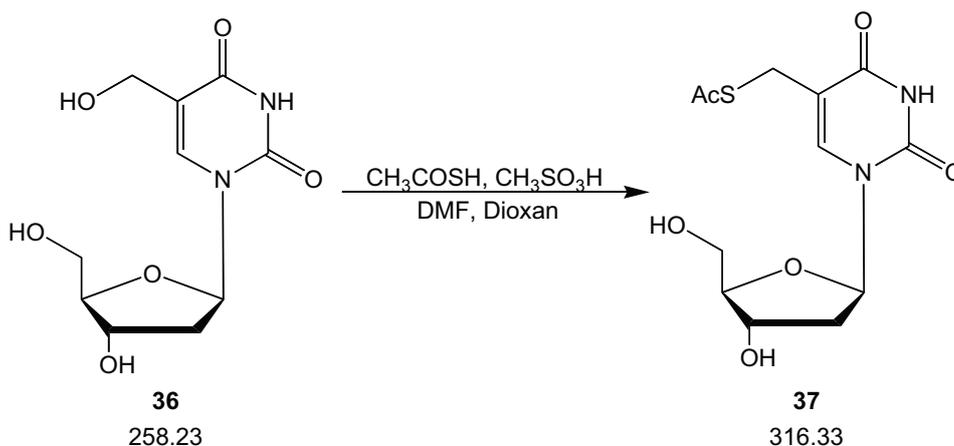
^{31}P -NMR (243 MHz, CDCl_3 mit 0.5% Triethylamin): $\delta = 152.05$ (d, $J = 50$ Hz) ppm.

ESI-MS m/z (Acetonitril mit 1% TEA, positive mode): ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M} + \text{NEt}_3 + \text{H}]^+$: 956.47, gef.: 956.41.

8.2.28 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin [130]



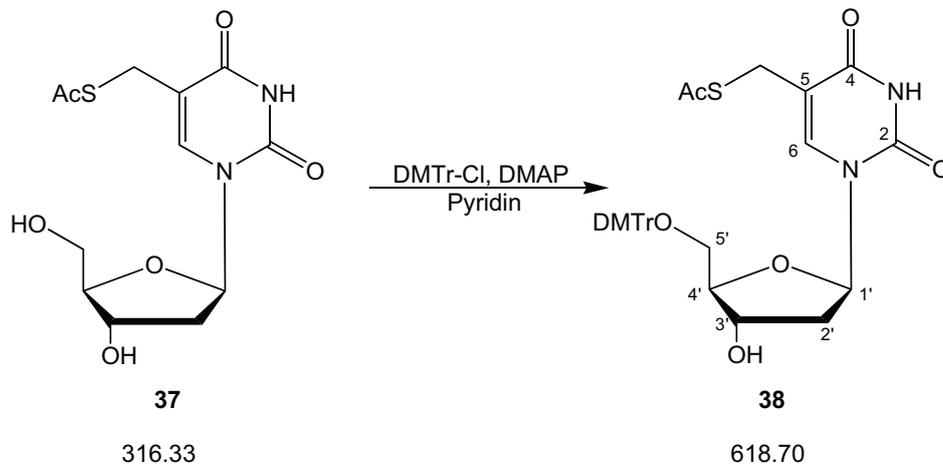
Zu 5.0 g 2'-Desoxyuridin (21.9 mmol) wurden 16 mL 37% wässriges Formaldehyd (212 mmol) und 16 mL 1 M Kalilauge (16 mmol) gegeben und 18 h bei 65 °C unter Argon gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wurden 6 mL Kalilauge (6 mmol) zugegeben, so dass der pH-Wert von 9.5 auf 10.5 anstieg und anschließend wurde bei 65 °C für weitere 34 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Abkühlung auf Raumtemperatur erneut mit 6 mL Kalilauge (6 mmol) versetzt, so dass der pH-Wert wieder auf 10.5 anstieg, anschließend wurde die Temperatur wieder auf 65 °C erhöht. Genauso wurde nach weiteren 66 h und 45 h verfahren. Nach insgesamt 210 h wurde das abgekühlte Gemisch mit 60 mL Wasser und 15 g Kationenaustauscher 1 h im Eisbad gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und mit 140 mL Wasser gespült. Das Wasser wurde bei Raumtemperatur im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 100 mL Acetonitril koevaporiert. Der entstandene Schaum wurde in 10 mL Methanol gelöst und mit 160 mL Essigester versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde dekantiert und unter Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde erneut in 10 mL Methanol gelöst und unter schnellem Rühren mit 300 mL Essigester versetzt. Nach 15 h bei -26 °C wurde die Suspension auf Raumtemperatur gebracht und dekantiert. Der Rückstand wurde mit Methanol koevaporiert und im Vakuum getrocknet. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel mit dem Eluenten Chloroform/Methanol: 3/1 erhielt man 1.3 g weiße Kristalle **36** (5.0 mmol, 22%).

8.2.29 *S*-Acetyl-5-(mercaptomethyl)-2'-desoxyuridin [130]

1.10 g 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin **36** (4.26 mmol) wurde in 3 mL Dimethylformamid gelöst, anschließend wurden 15 mL Dioxan, 1.52 mL Thioessigsäure (21.3 mmol, 1.62 g, $\rho = 1.065$, 5.0 Äq) und 69.1 μL Methansulfonsäure (1.06 mmol, 0.10 g, $\rho = 1.481$, 0.25 Äq) zugegeben. Nach Lösung aller Reaktanden im Ultraschallbad wurde die Reaktion 4 h bei 82 °C unter Argon gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1.08 g Anionenaustauscher versetzt und 1 h gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit 5 mL Diethylether zerrieben und der Überstand jeweils abdekantiert. Der Rückstand wurde in 25 mL Tetrahydrofuran aufgenommen, die unlöslichen Reste abfiltriert und mit 25 mL Tetrahydrofuran gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedunstet und in 2 mL Tetrahydrofuran aufgenommen. Nacheinander wurden 16 mL Diethylether, 16 mL Hexan und nach 15 min erneut 15 mL Hexan zugegeben und 16 h bei -20 °C gelagert. Die Lösungsmittel wurden abdekantiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Man erhielt 0.63 g eines zähen Öls **37** (2.0 mmol, 47%). Das Rohprodukt wurde direkt weiterverarbeitet zu **38**.

ESI-MS m/z (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 339.06, gef.: 339.07.

8.2.30 *S*-Acetyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-5-(mercaptomethyl)-2'-desoxyuridin [129]



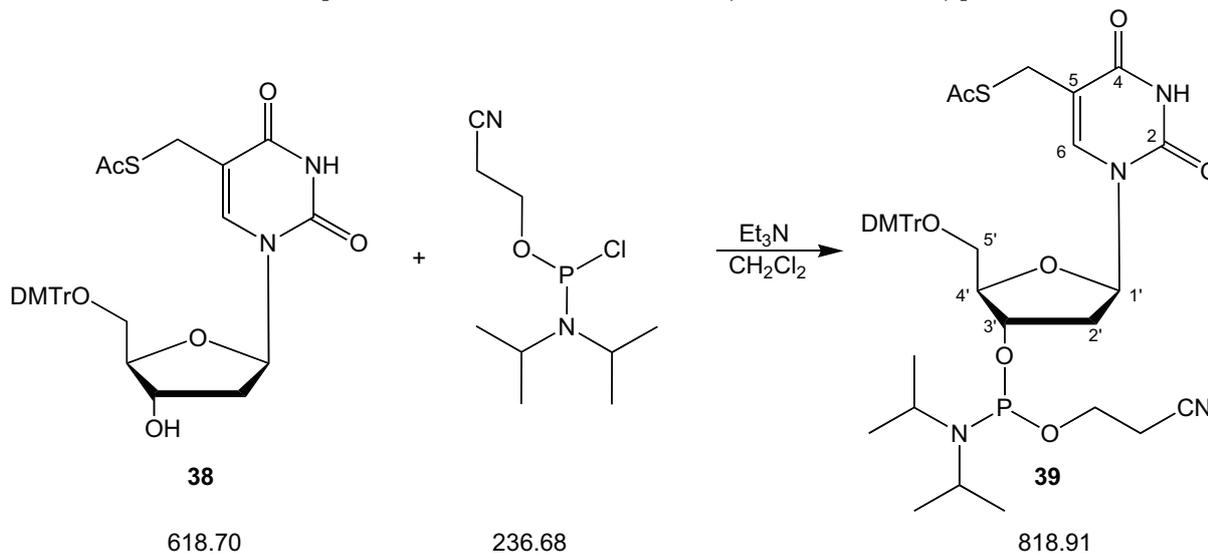
520 mg *S*-Acetyl-5-(mercaptomethyl)-2'-desoxyuridin **37** (1.64 mmol) wurden bei 0 °C unter Argon in 40 mL Pyridin gelöst und mit 668 mg Dimethoxytritylchlorid (1.97 mmol, 1.2 Äq.) und 20 mg DMAP (0.16 mmol, 0.1 Äq) versetzt. Nach 21 h im Kühlschrank (4 °C) gab man 5 mL Methanol zu und entfernte die Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Essigester/Hexan/Triethylamin: 200/100/1, dann Essigester/Triethylamin: 200/1). Man erhielt 550 mg Produkt **38** (0.89 mmol, 54%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.73$ (s, 1H, H6), 7.44–7.16 (m, 9H, DMTr), 7.08–7.80 (m, 4H, DMTr), 6.29 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H1'), 4.52 (m, 1H, H3'), 4.00 (m, 1H, H4'), 3.79 (s, 6H, 2 x OMe), 3.55–3.40 (m, 4H, 2 x H5' und CH_2S), 2.20–2.44 (m, 2H, 2 x H2'), 2.21 (s, 3H, $(\text{CO})\text{CH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 195.03$ (1C, S(CO)), 161.75 (1C, C4), 149.26 (1C, C2), 138.31 (1C, C6), 135–113 (18C, DMTr), 110.32 (1C, C5), 86.59 (1C, DMTr), 85.54 (1C, C4'), 84.87 (1C, C1'), 72.03 (1C, C3'), 63.49 (1C, C5'), 40.27 (1C, C2'), 30.30 (1C, $(\text{CO})\text{CH}_3$), 25.58 (1C, CH_2S) ppm.

ESI-MS (Acetonitril, positive mode): ber. für $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$: $[\text{M} + \text{Et}_3\text{N} + \text{H}]^+$: 720.33, gef. 720.32.

8.2.31 *S*-Acetyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-5-(mercaptomethyl)-2'-desoxyuridin-3'-[2-cyanoethyl-*N,N*-bis(diisopropyl)]-phosphoramidit



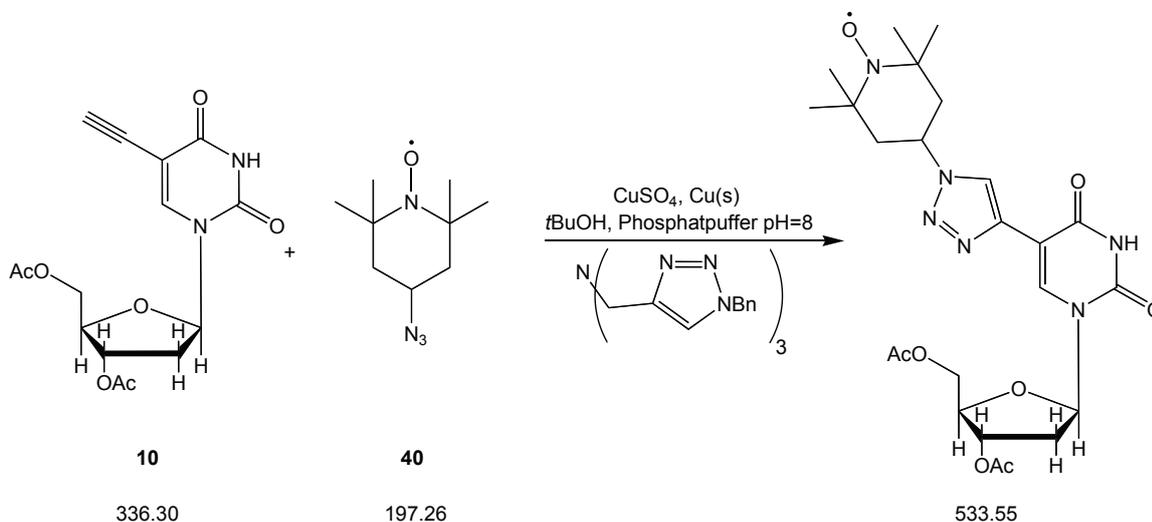
Zu einer Lösung aus 50 mg *S*-Acetyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-5-(mercaptomethyl)-2'-desoxyuridin **38** (81 μmol) in 1 mL Dichlormethan gab man unter Argon 21 μL *N*-Ethyldiisopropylamin (16 mg, 121 μmol , $\rho = 0.755$, 1.5 \AA q.) und 23 μL Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (25 mg, 105 μmol , $\rho = 1.100$, 1.3 \AA q.). Die Lösung wurde 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 10 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach einer Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent: Chlorform/Methanol/Triethylamin: 100/1/1) erhielt man 48 mg eines gelblichen Produkt **39** (59 μmol , 73%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 mit 0.5% Triethylamin): $\delta = 7.73$ (s, 1H, H6), 7.44–7.16 (m, 9H, DMTr), 7.06–6.86 (m, 4H, DMTr), 6.29 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H1'), 4.69 (m, 1H, H3'), 4.19 (m, 1H, H4'), 3.95 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2O), 3.79 (s, 6H, 2 x OMe), 3.70–3.76 (m, 2H, 2 x N(CH)), 3.58–3.40 (m, 4H, 2 x H5' und CH_2S), 2.63 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2CN), 2.36–2.44 (m, 2H, 2 x H2'), 2.23 (s, 3H, $(\text{CO})\text{CH}_3$), 1.23 (d, $J = 7.5$ Hz, 12H, 2 x $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, CDCl_3 mit 0.5 % Triethylamin): $\delta = 149.21$ (d, $J = 50$ Hz) ppm.

ESI-MS (Acetonitril, 1% Triethylamin, positive mode): ber. für $\text{C}_{48}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_9\text{PS}$ $[\text{M}+\text{Et}_3\text{NH}]^+$: 920.44 gef. 920.46.

8.2.32 5-[1-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]-3',5'-diacetyl-2'-desoxyuridin

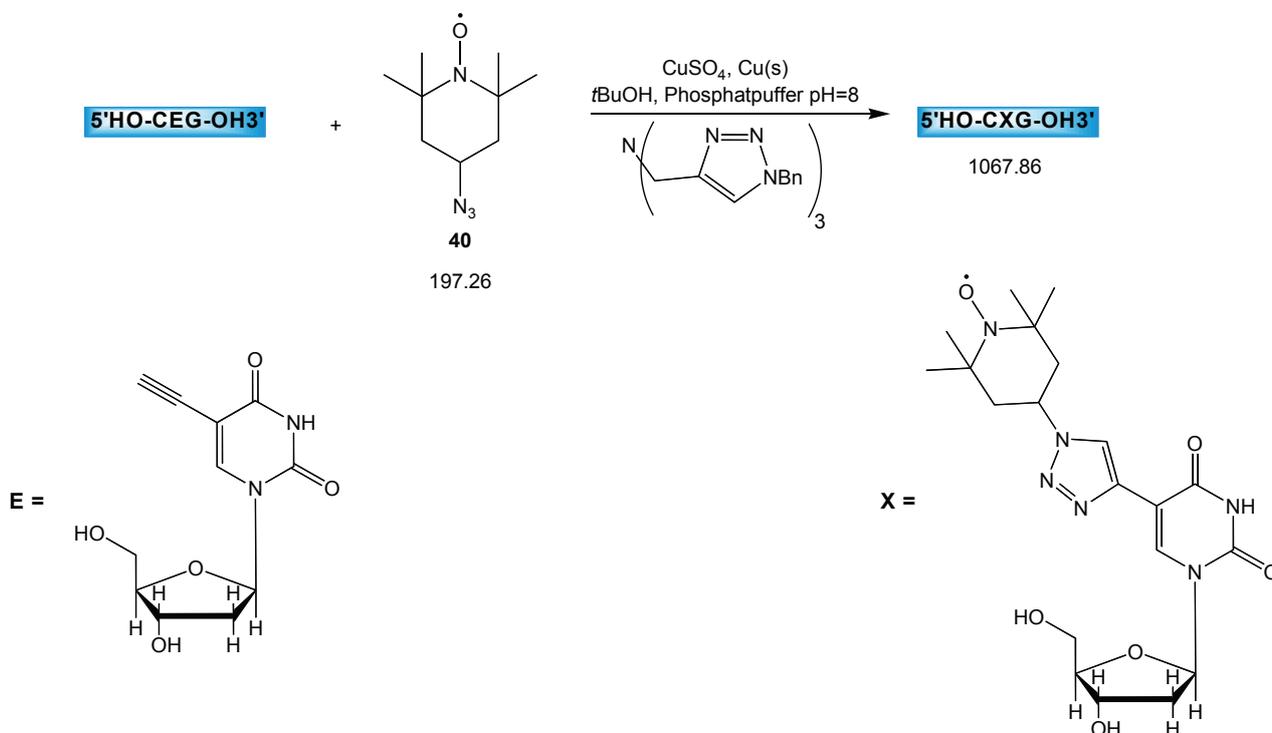


50 mg 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin-3',5'-diacetat **10** (149 μmol), 58 mg radikalisches Azid **40** (298 μmol , 2 Äq.) und 2 mg *N,N,N*-Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methylamin (4 μmol , 2.5% Äq.) wurden in 1 mL *tert*-Butanol und 1 mL Natriumphosphatpuffer (pH = 8, 0.1 M) gelöst. 0.3 mg Kupfer(II)sulfat (2 μmol , 1.2% Äq.) und 10 mg Kupfer (Drahtstücke) wurden zugegeben und die Lösung anschließend für 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 6 mL Wasser fällt ein weißer Niederschlag aus, der abzentrifugiert wird. Im HPLC-Chromatogramm (0-100% in 50 min, 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer (pH = 7) gegen Acetonitril) findet sich nur ein Peak bei einer Retentionszeit von 23.2 min, in dessen Massenspektrum sich nur die Produktmasse findet.

Das NMR-Spektrum des Produkts war nicht analysierbar, da das Radikal zu einer starken Signalverbreiterung führt.

ESI-MS (Wasser/Acetonitril, negativ mode): ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{NaO}_8$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 556.23, gef.: 556.27.

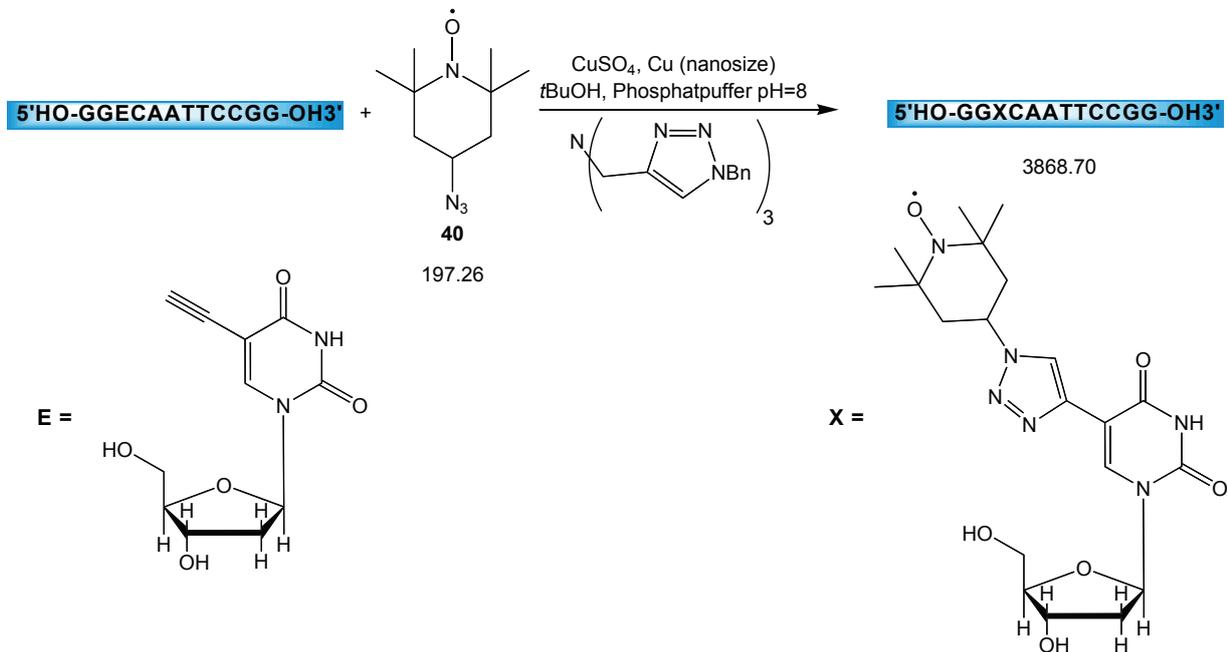
8.2.33 Synthese von einem DNA-Trimer mit 5-[1-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]-2'-desoxyuridin



100 nmol DNA-Trimer wurden in 190 μL Natriumphosphatpuffer (0.1 M, pH = 8) und 10 μL *tert*-Butanol gelöst. Nach Zugabe von 4.9 mg radikalischem Azid **40** (25 μmol , 250 Äq.), 0.5 mg *N,N,N*-Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methylamin] (0.9 μmol , 9.0 Äq.), 2 μL einer 0.1 M Kupfer(II)sulfatlösung und 2 mg Kupfer (Drahtstück) wurde die Suspension 21 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Ein HPLC-Chromatogramm des Überstands (0-100% in 50 min, 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer (pH= 7) gegen Acetonitril) ergab nur einen Peak bei einer Retentionszeit von 22.9 min, in dessen Massenspektrum sich nur die Produktmasse findet.

ESI-MS (Wasser/Acetonitril, negativmode): ber. $[\text{M-H}]^-$: 1066.86, gef.: 1067.63.

8.2.34 Synthese eines DNA-Dodecamers mit 5-[1-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]-2'-desoxyuridin



140 nmol DNA-Trimer wurden in 95 μL Natriumphosphatpuffer (0.1 M, pH = 8) und 5 μL *tert*-Butanol gelöst. Nach Zugabe von 0.7 mg radikalischem Azid **40** (3.5 μmol , 25 Äq.), 2 μL *N,N,N*-Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methylamin]-Lösung (50 mmolar, 100 nmol, 0.7 Äq.), 1 μL einer 0.1 M Kupfer(II)sulfatlösung und 2 mg Kupfer (nanosize) wurde die grüne Reaktionslösung 15 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch an der HPLC gereinigt. Im HPLC-Chromatogramm (0-25% in 30 min, 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH = 7 gegen Acetonitril) findet sich ein DNA-Peak bei einer Retentionszeit von 25.2 min, in dessen Massenspektrum sich nur die Produktmasse findet. .

ESI-MS (Wasser/Acetonitril, negativ mode): ber. $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$: 1284.53, gef.: 1284.51.

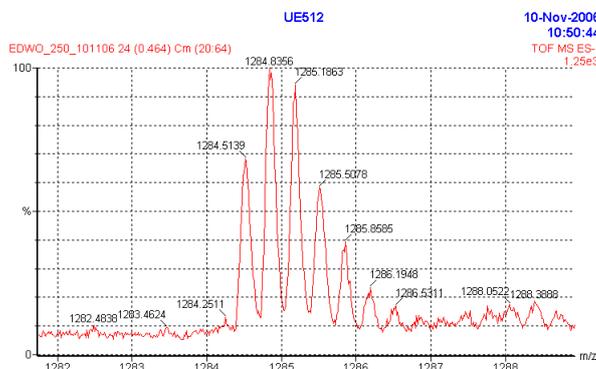
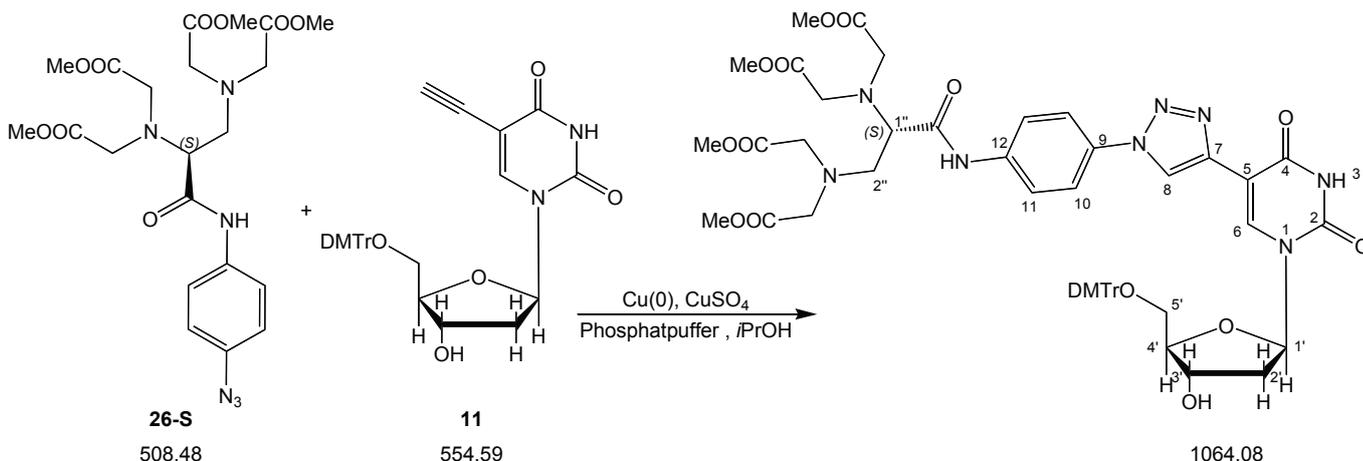


Abb. 8.1: ESI-Massenspektrum mit TOF-Detektion

8.2.35 Clickreaktion an einem 5-Ethynyl-2'-desoxyuridinmonomer



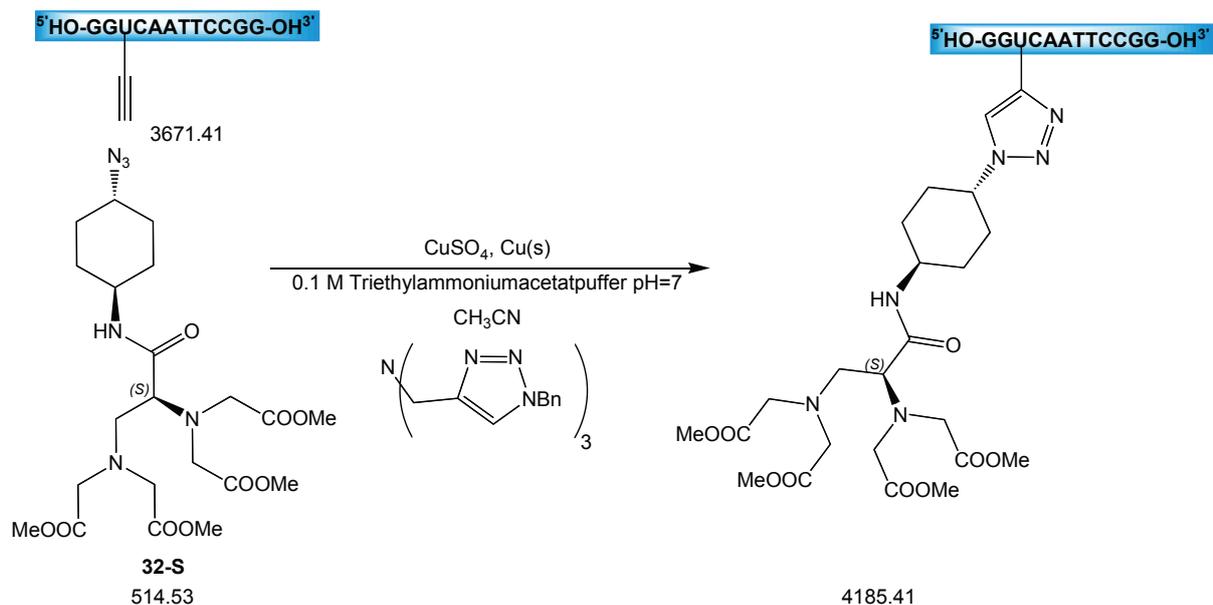
44 mg **11** (79 μmol) und 40 mg **26-S** (79 μmol , 1.0 Äq.) wurden in 1 mL Natriumphosphatpuffer (0.1 M, pH = 8) und 2 mL Isopropanol gelöst und mit 0.2 mg Kupfer (nanosize), 10 μL Kupfer(II)sulfatlösung (0.1 M) und 1.4 mg *N,N,N*-Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methylamin] (2.4 μmol , 3.0% Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit 4 mL Wasser verdünnt. Das Produkt wurde mit Diethylether extrahiert und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, erhielt man 80 mg Produkt (75 μmol , 95%). Im HPLC-Chromatogramm (0-100% in 30 min, 0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH = 7 gegen Acetonitril) findet sich ein Peak bei einer Retentionszeit von 32 min.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.66 (s, 1H, H8), 8.57 (s, 1H, H6), 7.44–7.16 (m, 9H, DMTr), 6.95–6.75 (m, 4H, DMTr), 6.35 (t, J = 6.8 Hz, 1H, H1'), 4.50 (m, 1H, H3'), 4.15 (m, 1H, H4'), 3.82 (m, 1H, H1''), 3.79 (s, 6H, 2 x COOMe), 3.73 (s, 6H, 2 x OMe), 3.69 (s, 6H, 2 x COOMe), 3.47 (m, 4H, CH_2), 3.43–3.07 (m, 2H, H5'), 3.15 (m, 4H, 2 x CH_2), 3.00 (m, 2H, 2 x H2''), 2.52 (m, 1H, H2'a), 2.35 (m, 1H, H2'b) ppm.

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.90$ (2C, 2 x COOMe), 172.84 (1C, CONH), 171.14 (2C, 2 x COOMe), 150.81 (1C, C4), 149.23 (1C, C2), 139.06 (1C, C12), 138.89 (1C, C7), 135.48 (1C, C6), 135–113 (18C, DMTr), 132.44 (1C, C9), 121.99 (2C, 2 x C11), 120.31 (1C, C8), 119.55 (2C, 2 x C10), 119.06 (1C, C5), 88.31 (1C, C4'), 87.37 (1C, DMTr), 85.88 (1C, C1'), 72.31 (1C, C3'), 65.68 (1C, C1), 63.49 (1C, C5'), 55.00 (1C, C2''), 54.95 (2C, 2 x CH₂), 53.85 (2C, 2 x CH₂), 52.45 (2C, 2 x Me), 51.92 (2C, 2 x Me), 40.99 (1C, C2') ppm.

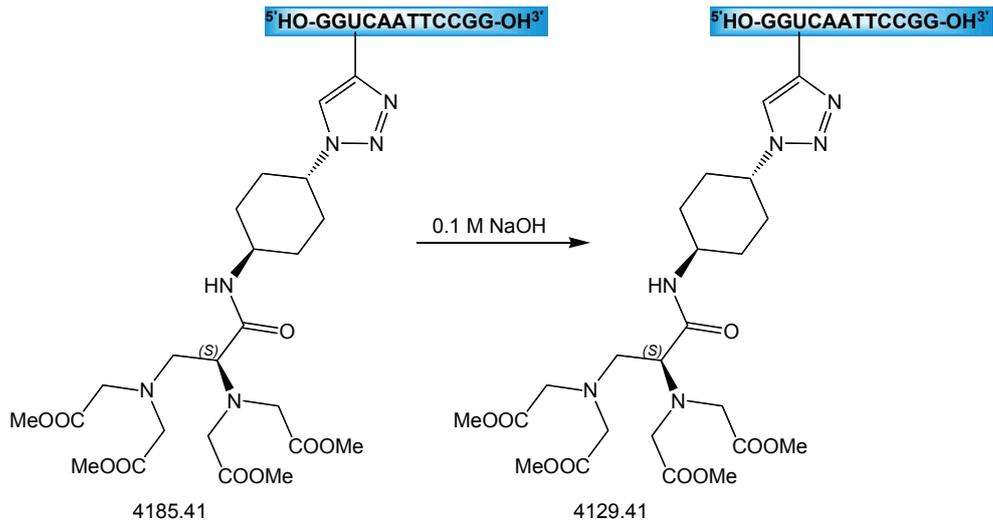
ESI-MS (Wasser/Acetonitril, positive mode): ber. für C₅₃H₆₉N₈O₁₆ [M+H]⁺: 1064.41, gef.: 1064.44.

8.2.36 Clickreaktion an einer ethinyl-modifizierten DNA in Lösung



140 nmol DNA-Dodecamer wurden in 95 μL Triethylammoniumacetatpuffer (0.1 M, pH = 7) und 5 μL Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 0.7 mg EDTA-Azid **32-S** (3.5 μmol , 25 Äq.), 2 μL *N,N,N*-Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methylamin]-Lösung (50 mmolar, 100 nmol, 0.7 Äq.), 1 μL einer 0.1 M Kupfer(II)sulfatlösung und 2 mg Kupfer (nanosize) wurde die grüne Reaktionslösung 24 h bei 50°C geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch an der HPLC gereinigt. Im HPLC-Chromatogramm (0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer pH = 7 gegen Acetonitril, in 0-5 min 100% Puffer, 0-25% in 5-30 min) findet sich ein DNA-Peak (enthält Edukt- und Produkt-DNA) bei einer Retentionszeit von 24.0 min und weitere Peaks von Abbauprodukten.

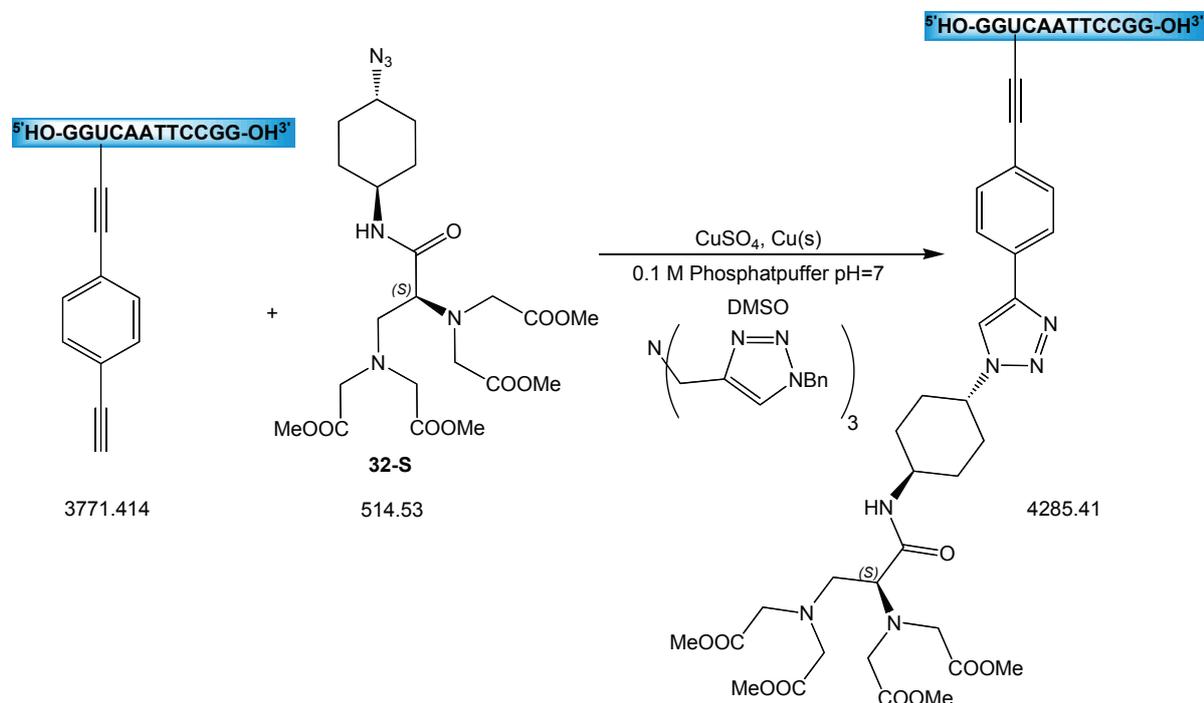
ESI-MS (Wasser/Acetonitril, negativ mode): ber. für $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$ 1393.53 gef. 1393.64 und ber. für $[\text{M}-5\text{H}+\text{Na}]^{4-}$: 1050.39, gef. 1051.01.



Die HPLC-Fraktion wurde lyophilisiert und in 1 mL 0.1 M Natronlauge gelöst und 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Zugabe von 1.5 mL 1 M Triethylammoniumacetatpuffer (pH = 7) wurde die Lösung manuell an einer PD-10-Säule entsalzt.

ESI-MS (Wasser/Acetonitril, negativ mode): ber. für $[M-3H^+]^{3-}$: 1374.87, gef. 1374.97 und ber. für $[M-2H]^{2-}$: 2062.81, gef. 2062.87.

8.2.37 Clickreaktion einer [(4-ethinyl)phenyl]ethinyl-modifizierten DNA in Lösung



140 nmol DNA-Dodecamer wurden in 200 μL Phosphatpuffer (0.1 M, pH = 7) und 200 μL DMSO gelöst. Nach Zugabe von 2 mg EDTA-Azid **32-S** (3.89 μmol , 25 Äq.), 2 μL *N,N,N*-Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methylamin]-Lösung (50 mM, 100 nmol, 0.7 Äq.), 1 μL einer 0.1 M Kupfer(II)sulfatlösung und 2 mg Kupfer (nanosize) wurde die grüne Reaktionslösung 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch an der HPLC gereinigt. Im HPLC-Chromatogramm (0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer (pH = 7) gegen Acetonitril, in 0-5 min 100% Puffer, 0-25% in 5-30 min) findet sich ein DNA-Peak (enthält nur Produkt-DNA) bei einer Retentionszeit von 31.1 min.

ESI-MS (Wasser/Acetonitril, negativ mode): ber. für $[\text{M}-3\text{H}^+]^{3-}$: 1426.87, gef. 1426.98 und ber. für $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$: 2140.81, gef. 2140.49.

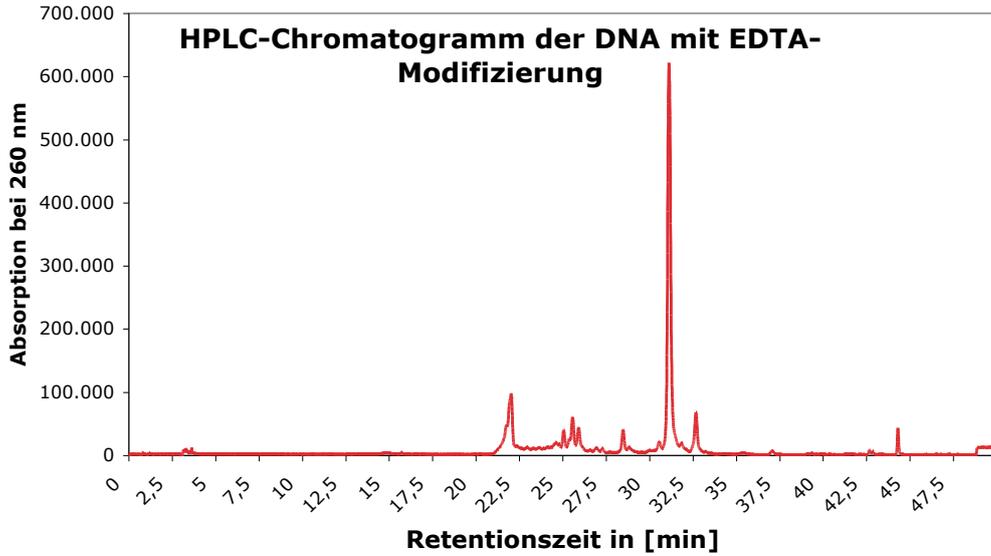


Abb. 8.2: HPLC-Chromatogramm der DNA mit EPTE-Tag (Abschnitt 8.2.37)

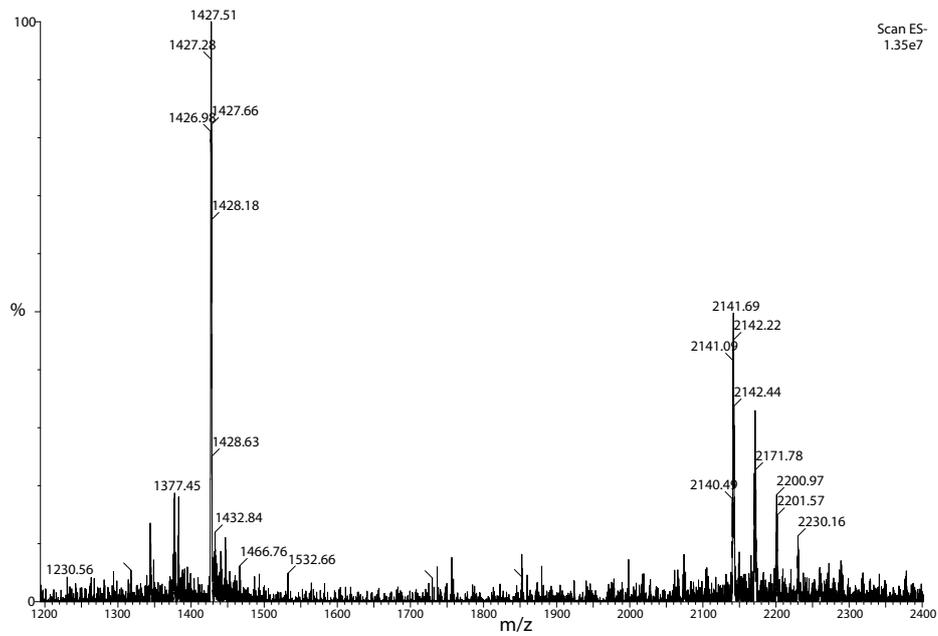
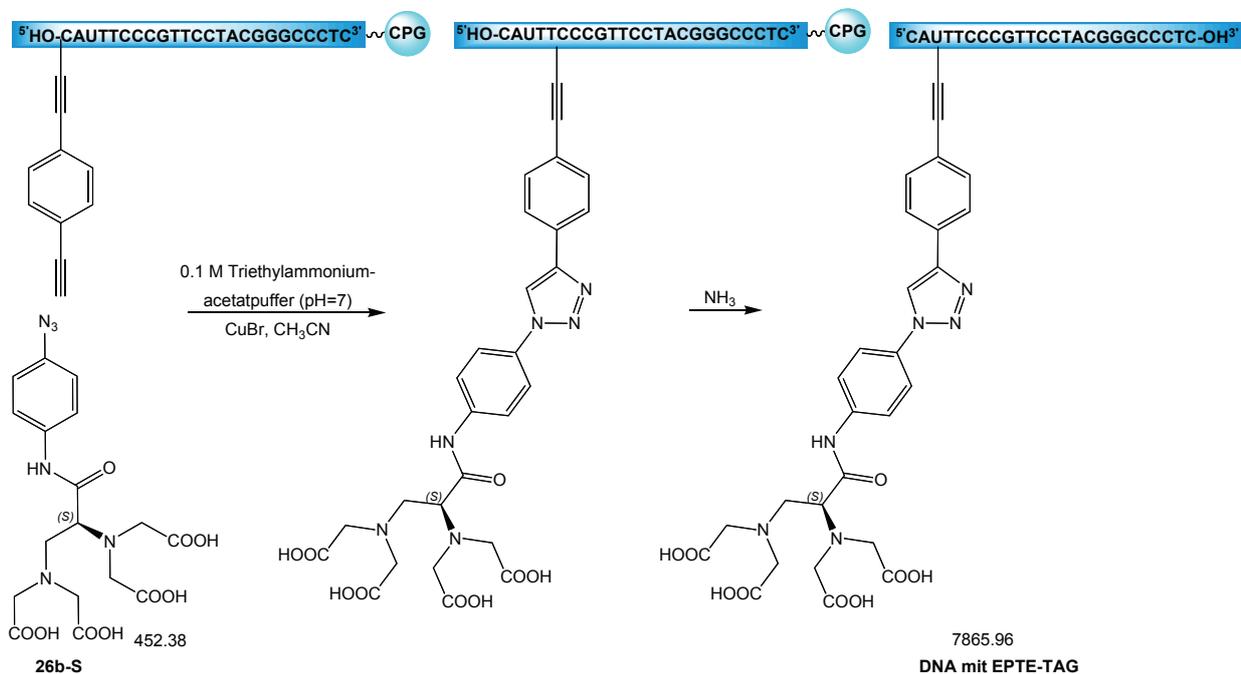


Abb. 8.3: ESI-Massenspektrum der DNA mit EPTE-Tag (Abschnitt 8.2.37)

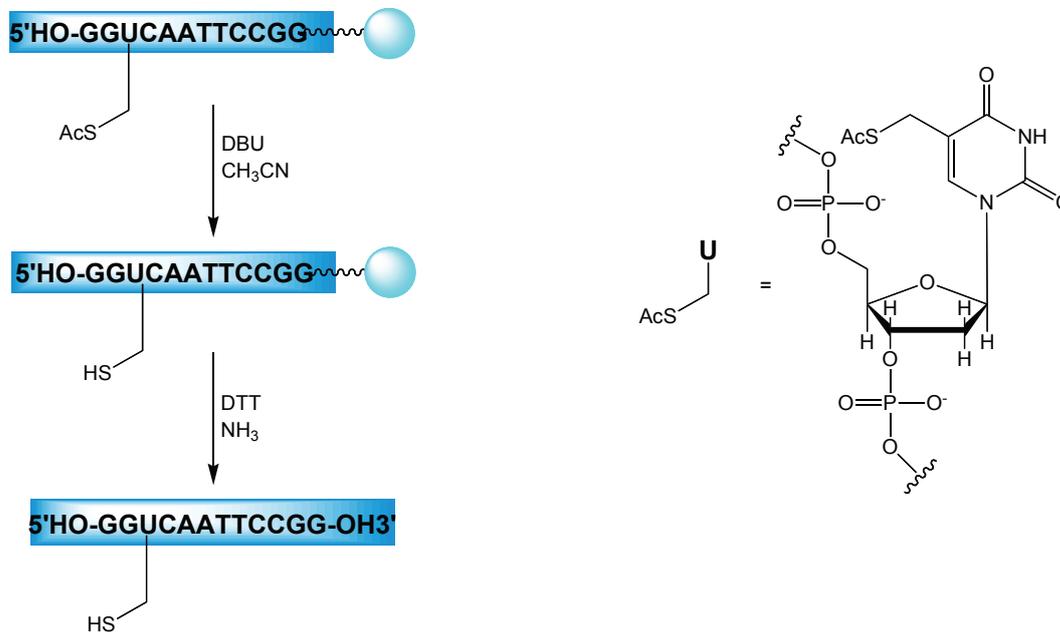
8.2.38 Clickreaktion einer [(4-ethinyl)phenyl]ethinyl-modifizierten DNA an der Festphase



An der Festphase gebundenes DNA-24mer (Syntheseansatz 1 μ mol) wurde in 100 μ L Triethylammoniumacetatpuffer (0.1 M, pH = 7) und 400 μ L DMSO gelöst. Nach Zugabe von 5 mg EDTA-Azid **26b-S** (3.89 μ mol, 25 Äq.), 3 mg *N,N,N*-Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methylamin]-Lösung (50 mmol, 0.7 Äq.), 1 μ L einer 2.5 mg Kupfer(I)bromid wurde die grüne Suspension 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die festphasengebundene DNA mit 1 ml Triethylammoniumacetatpuffer (0.1 M, pH = 7), 1 ml Acetonitril, 5 ml EDTA-Lösung (0.1 M, pH=7) und nochmals 5 ml Acetonitril gewaschen und anschließend mit 5 ml konz. Ammoniak bei 55°C für 16 h geschüttelt. Die Lösung wurde abfiltriert und lyophilisiert. Anschließend wurde der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen und präparativ an der *reversed phase* HPLC aufgereinigt. Im HPLC-Chromatogramm (0.1 M Triethylammoniumacetatpuffer (pH = 7) gegen Acetonitril, in 0-5 min 100% Puffer, 0-25% in 5-30 min) findet sich ein DNA-Peak (enthält nur Produkt-DNA) bei einer Retentionszeit von 23.5 min und mehrere Abbauprodukte.

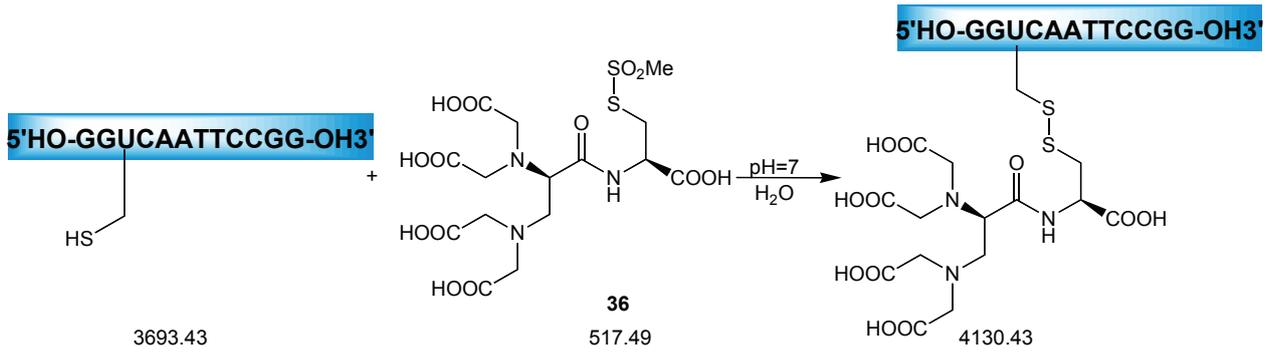
ESI-MS (Wasser/Acetonitril, negativ mode): ber. für $[M+2Na-6H]^{4-}$: 1975.54, gef. 1975.14 und ber. für $[M+3Na-8H]^{5-}$: 1584.63, gef. 1583.93.

8.2.39 Modifizierung von einem DNA-Dodecamer mit einer Disulfidbrücke



1 μ mol festphasengebundener DNA mit einem *S*-Acetyl-5-(mercaptomethyl)-2'-desoxyuridin wurde bei Raumtemperatur 30 min mit 5 mL 10%iger DBU-Lösung in Acetonitril geschüttelt. Nach Waschen der Festphase mit 25 mL Acetonitril wurden 5 mL konz. Ammoniak mit 0.2 M DTT zugegeben und die Suspension für 16 h auf 55 °C erhitzt. Die Lösung wurde dekantiert und der Rückstand mit Wasser gewaschen. Die vereinigte Lösung wurde anschließend lyophilisiert und an einer *reversed phase* HPLC-Säule präparativ getrennt (Triethylammoniumacetat (0.1 M, pH = 7) gegen Acetonitril, in 0-5 min 100% Puffer, in 5-30 min von 0 auf 25% Acetonitril, 40 °C, Rt = 22.9 min).

ESI-MS (Triethylammoniumacetat/Acetonitril: 80/20, negative mode): ber. für [M-3H]³⁻: 1230.14, gef.: 1230.09.



Die gesammelten Produktfraktionen wurden sofort vereinigt und 2 mg **36** ($3.8 \mu\text{mol}$) zugegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei 5°C gerührt und anschließend erneut per HPLC untersucht (gleiche Methode wie oben, $R_t = 22.5 \text{ min}$).

ESI-MS (Triethylammoniumacetat/ Acetonitril : 80/20, negative mode): ber. für $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$: 1375.80, gef. 1375.65.

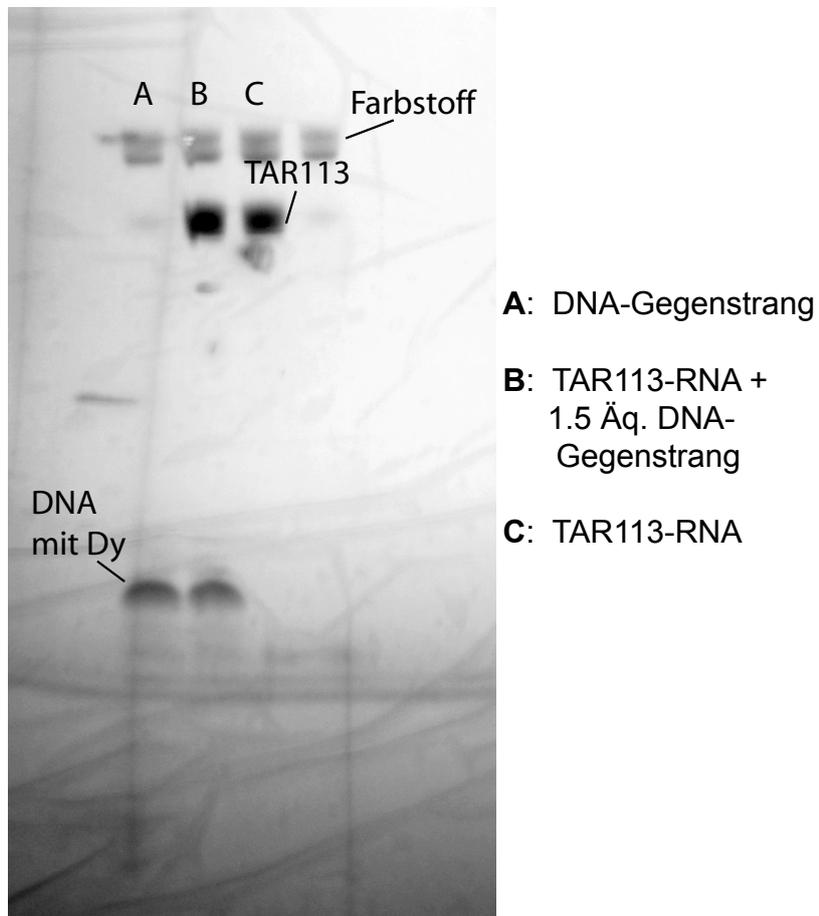
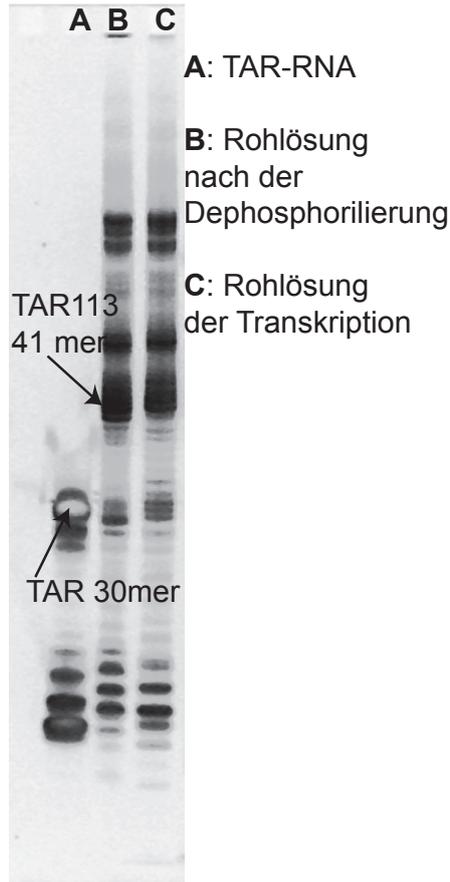
8.2.40 Präparation der verlängerten TAR-RNA

4.55 mL ATP-Lösung (22 mM, ^{13}C und ^{15}N gelabelt), 291 μL CTP-Lösung (344 mM), 201 μL GTP-Lösung (498 mM), 331 μL UTP-Lösung (302 mM), 32 μL PEG8000, 80 μL IPP (*inorganic pyrophosphate*), 7.20 ml T7-Polymerase-Lösung, 400 μL Magnesiumdichlorid-Lösung (1 M), 100 μL DTT-Lösung (1 M), 2000 μL Transkriptionspuffer (400mM Tris-HCl, 10 mM Spermidine, 50 mM DTT, 0.1% Triton X-100, pH = 8) und 1.6 mL DNA-Duplex-Lösung (je 100 mM 5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC CAG ATT GAG CCT GGG AGC TCT CTG GCC CCA GAA GCC GT 3' und 5' AC GGC TTC TGGGGC CAG AGA GCT CCC AGG CTC AAT CTG GCC TAT AGT GAG TCG TAT TA 3') und 3.22 mL Wasser wurden 6 h bei 37°C inkubiert. Die Transkription wurde dann durch Zugabe von 2 ml EDTA-Lösung (0.5 M, pH = 8) gestoppt. Die Rohtranskription wurde über einen DEAE-Anionenaustauscher mit Natriumacetatlösung (0.6 bis 2 M, pH = 5.5) aufgereinigt.

Die erhaltenen RNA-Lösung wurde mit Isopropanol (1:1, 16 h bei -20 °C) ausgefällt und zur Dephosphorylierung mit 3 mL Puffer (50 mM-Tris -HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, pH = 7.9) und 100 μL alkalische Phosphatase-Stammlösung (10000 Einheiten/mL) von der Firma Biolab versetzt. Nach 4.5 h bei 37°C wurde zur die Lösung das gleichen Volumen Harnstofflösung (8 M) gegeben und die erhaltene Lösung über eine Gelelektrophorese (15% PAGE in 1 M TBE-Puffer und 4 M Harnstofflösung, 55 W, 16 h) aufgereinigt. Man erhielt 3.7 mg der gewünschten RNA.

Die RNA wurde dialysiert in einem Tube-o-dialyzer (1 kDa Cut-off von Chemicon, 3 x 2 h bei 6 °C) gegen 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH = 6.9). Die Lösung wurde lyophilisiert und in 250 μL deuterierter Ammoniumacetat-Lösung (10 mM, pH = 6.9) aufgenommen und NMR-spektroskopisch untersucht.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1.5 Äq. der mit Dysprosium(III)ionen beladenen DNA und die Lösung wurde 5 min auf 50 °C erhitzt und langsam abgekühlt, bevor die NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Nach 1 d war kein Abbau der RNA sichtbar.



Literaturverzeichnis

- [1] M. Latham, D. Brown, S. McCallum, A. Pardi, *ChemBiochem.* **2005**, *6*, 1492–1505.
- [2] J. Tolman, J. Flanagan, M. Kennedy, J. Prestegard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9279–9283.
- [3] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278*, 1111–1113.
- [4] M. Bailor, C. Musselmann, A. Hansen, K. Gulati, D. Patel, H. Al-Hashimi, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 1563–1546.
- [5] I. Bertini, C. D. Bianco, I. Gelis, N. Katsaros, C. Luchinat, G. Parigi, M. Peana, A. Provenzani, M. Zoroddu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6841–6848.
- [6] J. Hines, G. Ammar, J. Buss, P. Schmalbrock, *Bioconj. Chem.* **1999**, *10*, 155–158.
- [7] S. Joseph, H. Noller, *Methods in Enzymology* **2000**, *318*, 175–190.
- [8] B. Rhode, K. Hartmuth, E. Westhof, R. Lührmann, *The EMBO Journal* **2006**, *25*, 2475–2486.
- [9] C. Wirges, J. Timper, M. Fischler, A. Sologubenko, J. Mayer, U. Simon, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 219–223.
- [10] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, *21*, 1212–1213.
- [11] A. Sigl, H. Sigl, *Metal Ions in Biological Systems*, 40, Marcel Dekker, Inc, Basel, 1. Auflage, **2003**.

- [12] P. Haberz, F. Rodriguez-Castaneda, J. Junker, S. Becker, A. Leonov, C. Griesinger, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1275–1278.
- [13] A. Leonov, B. Voigt, F. Rodriguez-Castaneda, P. Sakhaii, C. Griesinger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3342–3348.
- [14] A. L. F. Rodriguez-Castaneda, P. Haberz, C. Griesinger, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 10–16.
- [15] H. Kolb, K. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [16] H. Kolb, M. Finn, K. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2008.
- [17] J. Prestegard, H. Al-Hashimi, J. Tolman, *Q. Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 371–424.
- [18] A. Brunger, P. Adams, G. Clore, P. Gros, R. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, N. Nilges, N. Pannu, R. Read, L. Rice, T. Simonson, G. Warren, *Acta Cryst.* **1998**, *D54*, 905–921.
- [19] A. Brunger, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 2728–2733.
- [20] D. Neculai, A. Neculai, S. Verrier, K. Straub, K. Klumpp, E. Pfitzner, S. Becker, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40782–40787.
- [21] X. Mao, Z. Ren, G. Parker, H. Sondermann, M. Pastorello, W. Wang, J. McMurray, B. Demeler, J. Darnell, X. Chen, *Molecular Cell* **2005**, *17*, 761–771.
- [22] X. Chen, U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, J. Darnell, J. Kuriyan, *Cell* **1998**, *93*, 827–839.
- [23] C. Guimaraes, M. Cardozo, *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 958–970.
- [24] E. d’Auvergne, P. Gooley, *J. Biomol. NMR* **2008**, *40*, 107–119.
- [25] E. d’Auvergne, P. Gooley, *J. Biomol. NMR* **2008**, *40*, 121–133.
- [26] R. Lee, R. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, *75*, 843–854.
- [27] M. Jinek, J. Doudna, *Nature* **2009**, *457*, 405–412.
- [28] R. Carthew, E. Sontheimer, *Cell* **2009**, *136*, 642–655.

- [29] S. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [30] J. Watson, F. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [31] F. Peters, *Synthese eines EDTA-basierten Thyminderivats, dessen Einbau in DNA und spektroskopische Charakterisierung*, Diplomarbeit, Göttingen, **2006**.
- [32] M. Scalley-Kim, A. McConnell-Smith, B. Stoddard, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 1305–1319.
- [33] R. D. Guzman, Z. Wu, C. Stalling, L. Pappalardo, P. Borer, M. Summers, *Science* **1998**, *279*, 384–388.
- [34] M. Yang, *Current Drug Targets – Infectious Disorders*. **2005**, *5*, 433–444.
- [35] A. Brodsky, J. Williamson, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 624–639.
- [36] D. Raghunathan, V. Sánchez-Pedregal, C. S. J. Junker, M. Kalesse, A. Kirschning, T. Carlomagno, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 3599–3608.
- [37] M. Stevens, E. D. Clercq, J. Balzarini, *Medicinal Research Rev.* **2006**, *26*, 595–625.
- [38] K. Pachulska-Wieczorek, K. Purzycka, R. Adamiak, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 2984–2997.
- [39] A. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, 101. Auflage, **1995**.
- [40] E. Carpenter, K. Beis, A. Cameron, S. Iwata, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 581–586.
- [41] R. Henderson, *Q. Rev. Biophys.* **2004**, *37*, 3–13.
- [42] B. Fürtig, C. Richter, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 936–962.
- [43] A. Kumar, G. Wagner, R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 1156–1163.
- [44] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554.

- [45] K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 311–319.
- [46] G. Clore, A. Gronenborn, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, *24*, 479–564.
- [47] A. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *89*, 689–700.
- [48] A. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *93*, 411–415.
- [49] H. Al-Hashimi, A. Gorin, A. Majumdar, D. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3179–3180.
- [50] W. Aue, E. Bartholdi, R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.
- [51] L. Braunschweiler, R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528.
- [52] D. Reid, S. Salisbury, S. Bellard, Z. Shakked, D. Williams, *Biochemistry* **1983**, *22*, 2019.
- [53] J. Feigon, J. Wright, W. Leupin, W. Denny, D. Kearns, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5540.
- [54] J. Feigon, W. Leupin, W. Denny, D. Kearns, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5943.
- [55] S. Wijmenga, B. van Buuren, *Prog. Nucl. Magn. Res. Sp.* **1983**, *53*, 521–528.
- [56] C. Roberts, *NMR of Macromolecules*, Oxford University Press, Oxford, 1. Auflage, **1993**.
- [57] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–666.
- [58] C. Altona, D. Fabry, A. W. Hoekzem, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 95–107.
- [59] M. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1065–1074.
- [60] C. Sanders, B. Hare, K. Howard, J. Prestegard, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1994**, *26*, 421–444.
- [61] Y. Dong, *Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals*, Springer-Verlag, New York, 2. Auflage, **1997**.

- [62] I. Bertini, C. Luchinat, *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, 1. Auflage, **1986**.
- [63] I. Bertini, C. Luchinat, S. Aime, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 1–28.
- [64] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, R. Pieratelli, *Dalton Trans.* **2008**, *29*, 3782–3790.
- [65] I. Bertini, C. Luchinat, S. Aime, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 29–75.
- [66] G. Otting, *J. Biomol. NMR* **2008**, *42*, 1–9.
- [67] B. Bleaney, *J. Magn. Res.* **1972**, *8*, 91–100.
- [68] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, *Progr. Nuc. Magn. Res.* **2002**, *40*, 249–273.
- [69] I. Bertini, J. Kowalewski, C. Luchinat, G. Parigi, *J. Mag. Res.* **2001**, *152*, 103–108.
- [70] V. Mironov, Y. Galyametdinov, A. Ceulemans, C. Görller-Walrand, K. Binnemans, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 4673–4685.
- [71] R. Golding, P. Pyykkö, *Molecular Physics* **1973**, *26*, 1389–1396.
- [72] B. McGarvey, *J. Mag. Reson.* **1979**, *33*, 445–455.
- [73] N. Sakagami, Y. Yamada, T. Konno, K. Okamoto, *Inorganica Chimica Acta* **1999**, *288*, 7–16.
- [74] I. Bertini, M. Janik, Y. Lee, C. Luchinat, A. Rosato, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4181–4188.
- [75] R. Golding, P. Pyykkö, *Molecular Physics* **1973**, *26*, 1389–1396.
- [76] B. Bleaney, C. M. Dobson, B. A. Levine, R. B. Martin, R. J. Williams, A. V. Xavier, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1972**, 791–793.
- [77] F. Kramer, M. Deshmukh, H. Kessler, S. Glaser, *Concepts in Mag. Reson.* **2004**, *21A*, 10–21.
- [78] I. Bertini, C. Luchinat, S. Aime, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 77–110.

- [79] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, *Solution NMR of Paramagnetic Molecules*, Elsevier, Amsterdam, 1. Auflage, **2001**.
- [80] A. Hudson, J. Lewis, *Trans. Faraday Soc.* **1970**, *66*, 1297–1301.
- [81] I. Bertini, C. Luchinat, S. Aime, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 77–110.
- [82] R. Tsien, *Ann. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [83] A. Leitner, W. Lindner, *Proteomics* **2006**, *6*, 5418–5434.
- [84] J. Schmitt, H. Hess, H. Stunnenberg, *Mol. Biol. Rep.* **1993**, *18*, 223–230.
- [85] O. Schiemann, T. Prisner, *Quart. Rev. Biophys.* **2007**, *40*, 1–53.
- [86] B. Liang, J. Bushweller, L. Tamm, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4389–4397.
- [87] J. Iwahara, D. Anderson, E. Murphy, G. Clore, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6634–6635.
- [88] J. Iwahara, G. Clore, *Nature* **2006**, *440*, 1227–1230.
- [89] G. Clore, *Mol. BioSyst.* **2008**, *4*, 1058–1069.
- [90] H. Hakala, P. Ollikka, J. Degerholm, J. Hovinen, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8771–8777.
- [91] M. Bidot-Forget, M. Chassignol, M. Takasugi, N. Thuong, C. Helen, *Gene* **1988**, *72*, 361–371.
- [92] Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, M. Tazaki, A. Jyo, *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 1606–1607.
- [93] G. Dreyer, P. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 968–972.
- [94] T. Ikegami, L. Verdier, P. Sakhaii, S. Grimme, B. Pescatore, K. Saxena, M. Vogtherr, K. M. Fiebig, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **2004**, *29*, 339–349
- [95] F. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173–1178.
- [96] M. Septak, *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 3053–3058.

- [97] M. Mato-Iglesias, E. Balogh, C. Platas-Iglesias, E. Toth, A. de Blas, T. Rodriguez-Blas, *Dalton Trans.* **2006**, *45*, 5404–5415.
- [98] L. Burai, V. Hietapelto, R. Kiraly, E. Toth, E. Brucher, *Magn. Res. Med.* **1997**, *38*, 146–150.
- [99] F. Seela, V. Sirivolu, P. Chittepu, *Bioconj. Chem* **2007**, *19*, 211–224.
- [100] J. Milligan, O. Uhlenbeck, *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 51–62.
- [101] J. Milligan, D. Groebe, G. Witherell, O. Uhlenbeck, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 8783–8798.
- [102] P. Capek, H. Cahova, R. Pohl, M. Hocek, C. Gloeckner, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6196.
- [103] L. Scott, M. Hennig, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *452*, 29–61.
- [104] E. Wöltjen, *Synthese eines paramagnetischen Tags zur NMR-spektroskopischen Untersuchung von Oligonukleotiden*, Diplomarbeit, Göttingen, **2005**.
- [105] S. Khan, M. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4704–4705.
- [106] W. Flasche, C. Cismas, A. Herrmann, J. Liebscher, *Synthesis* **2004**, 2335 – 2341.
- [107] M. Rist, N. Amann, H. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *13*, 2498–2504.
- [108] N. Minakawa, Y. Ono, A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11545–11552.
- [109] T. Kottysch, C. Ahlborn, F. Brotzel, C. Richert, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4017–4028.
- [110] L. Pachòn, J. van Maarseveen, G. Rothenberg, *Add. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 811–815.
- [111] V. Bock, H. Hiemstra, J. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *1*, 51–68.
- [112] C. Nolte, P. Mayer, B. Straub, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2101–2103.
- [113] G. Burley, J. Gierlich, M. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. E. und T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398–1399.

- [114] J. Gierlich, G. Burley, P. Gramlich, D. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [115] T. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609–612.
- [116] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. Fokin, K. Sharpless, M. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- [117] R. Franke, C. Doll, J. Eichler, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 4479–4482.
- [118] C. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [119] N. Bushmakina, A. Misharin, *Synthesis* **1986**, *11*, 966–967.
- [120] F. Chiu, R. Brownlee, K. Mitchell, D. Phillips, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2891–2899.
- [121] T. Kirley, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 231–236.
- [122] D. Smith, E. Maggio, G. Kenyon, *Biochemistry* **1975**, *14*, 766–771.
- [123] M. Prudencio, J. Rohovec, J. Peters, E. Tocheva, M. Boulanger, M. Murphy, H. Hupkes, W. Koster, A. Impagliazzo, M. Ubbink, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3252–3260.
- [124] B. Liang, J. Bushweller, L. Tamm, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4389–4397.
- [125] B. Davis, S. Ward, P. Rendle, *Chem. Commun.* **2001**, *2*, 189–190.
- [126] S. Matus, J. Fourrey, P. Clivio, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3316–3320.
- [127] V. Guerineau, S. Matus, F. Halgand, O. Laprevote, P. Clivio, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 899–907.
- [128] B. Connolly, P. Newman, *Nuc. Acids Res.* **1989**, *17*, 4957–4974.
- [129] B. Bornemann, A. Marx, *Bioorg. Med. Chem* **2006**, *14*, 6235–6238.
- [130] N. Bischofberger, C. Buhr, J. Dougherty, B. Froehler, A. Gutierrez, H. Gong-Xin, R. Shea, S. Swaminathan, M. Williams, WO9910365, *Gilead Sciences Inc., USA* **1999**
- [131] H. Drew, R. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 2179–2183.

- [132] J. Heptinstall, R. Rapley, *The Nucleic Acid Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, 1. Auflage, **2000**.
- [133] S. Eriksson, G. Glad, P. Pernemalm, E. Westman, *J. Chromatogr.* **1986**, *359*, 265–274.
- [134] P. Oefner, G. Bonn, C. Huber, S. Nathakarnkitkool, *J. Chromatogr.* **1992**, *625*, 331–340.
- [135] A. von Brocke, T. Freudemann, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **2003**, *991*, 129–141.
- [136] L. Beach, C. Schweitzer, J. Scaiano, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 450–451.
- [137] V. Bloomfield, D. Crothers, I. Tinoco, *Nucleic Acids*, University Science Books, Sausalito, 10. Auflage, **2000**.
- [138] A. Leonov, F. Rodriguez-Castaneda, P. Sakhaii, L. Verdier, C. Griesinger, *Chem. Eur. J.* **2005**, 3342–3348.
- [139] J. Ying, A. Grishaev, M. Latham, A. Pardi, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2007**, *39*, 91–96.
- [140] D. Bryce, J. Boisbouvier, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10820–10821.
- [141] A. O’Toole, S. Miller, N. Haines, C. Zink, M. Serra, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 3338–3344.
- [142] S. Franklin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 201–208.
- [143] M. Komiyama, H. Arishima, M. Yokoyama, Y. Kitamura, Y. Yamamoto, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 192–196.
- [144] J. Rammo, R. Hettich, A. Roigk, H. Schneider, *Chem. Commun.* **1996**, *1*, 105–107.
- [145] C. Mundoma, N. Greenbaum, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3525–3532.
- [146] C. Mundoma, N. Greenbaum, *Biopolymers* **2003**, *69*, 100–109.
- [147] Q. Zhang, X. Sun, E. Watt, H. Al-Hashimi, *Science* **2006**, *311*, 653–656.
- [148] Q. Zhang, A. Stelzer, C. Fisher, H. Al-Hashimi, *Nature* **2007**, *450*, 1263–1267.

- [149] P. Haberz, F. Rodriguez-Castaneda, J. Junker, S. Becker, A. Leonov, C. Griesinger, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1275–1278.
- [150] E. Lesnik, S. Freier, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10807–10815.
- [151] P. Keizers, M. O. A. Saragliadis, Y. Hiruma, M. Ubbink, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14802–14812.
- [152] M. Robins, P. Barr, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1854–1862.
- [153] Y. Shealy, C. O'Dell, G. Arnett, W. Shannon, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 79–84.
- [154] A. Pike, L. Ryder, B. Horrocks, W. Clegg, M. Elsegood, B. Connolly, A. Houlton, *Bioorg. Medicinal. Chem. Letters* **1995**, *5*, 1689–1694.

Kapitel 9

Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ac	Acetat
ACN	Acetonitril
äq.	äquivalente
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bn	Benzyl
C	Cytosin
CE	capillary electrophoresis
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPG	<i>controlled pore glas</i>
DAD	Dioden-Array-Detektor

DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DQF-COSY	<i>Double Quantum Filtered-COSY</i>
dsDNA	double-stranded DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridine
ee	<i>enantiomeric excess</i>
ESI	Elektronensprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
G	Guanin
HATU	(<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation Experiment</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation Experiment</i>
Hz	Hertz
IR	Infrarot
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectroscopy
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight
Mes	Mesylat
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
MTPA	α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetylchlorid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>

NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
ODN	Oligodesoxynukleotid
ON	Oligonukleotid
p.a.	<i>pro analysis</i>
PA	Phosphoramidit
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCS	<i>Pseudocontact shifts</i>
PRE	<i>Paramagnetic relaxation enhancement</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RDC	residual dipolar couplings
RNA	Ribonukleinsäure
ssDNA	single-stranded DNA
T	Thymin
TAR	<i>Trans-activating response region</i>
TAT	<i>Transactivator of transcription</i>
TBE	1,1,2,2-Tetrabromethan
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamine
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
U	Uracil
UV	Ultraviolett

9.2 Abbildungsverzeichnis

1.1	Tagging über eine Disulfidbrücke.	2
1.2	Methodenübersicht: Clickreaktionen an ethinylmodifizierter DNA.	3
1.3	Methodenübersicht: Clickreaktionen an verlängerter ethinylmodifizierter DNA.	4
1.4	DNA-Hairpinsequenz. Das Sternchen markiert die Position des Tags.	5
1.5	Verlängerte TAR-Sequenz des HIV2.	6
2.1	Entwicklung der Nukleinsäurestrukturaufklärungen anhand der PDB-Daten.	10
2.2	Abbildung der Nukleobasen.	11
2.3	Die beiden Zuckerkonformationen von DNA (links) und RNA (rechts).	11
2.4	Die verschiedenen Nukleinsäurehelices: A-Form (links), B-Form (rechts) [31].	12
2.5	Eine Endonuclease gebunden an die DNA-Zielsequenz [32].	13
2.6	Schematische Darstellung des HI-Virus.	14
2.7	Untersuchte TAR-Sequenz des HIV2.	15
2.8	Verlängerte TAR-Sequenz	15
3.1	Schematische Darstellung eines zweidimensionalen NMR-Spektrums.	19
3.2	Schema zum Aufbau zweidimensionaler NMR-Pulsprogramme.	19
3.3	Schema zum Ablauf einer NMR-Strukturaufklärung mit NOE-Daten.	20
3.4	STAT1 mit DNA-Doppelstrang	21
3.5	„NOESY-Walk“ der ersten zehn Basen vom 5'- in Richtung 3'-Ende.	22
3.6	Abbildung der Nukleobasen und der 2'-Desoxyribose inklusive ihrer Nomenklatur [56].	23
3.7	Chemische Verschiebungen der 2'-Desoxyriboseprotonen in ppm	24
3.8	Chemische Verschiebungen der Basenprotonen in ppm.	25
3.9	Abbildung der Internukleotid-NOE-Restraints.	26
3.10	Die energieniedrigsten Strukturen nach der ersten und der zweiten Rechnung	28

3.11	Die energieniedrigsten Strukturen aus der verfeinerten Moleküldynamikrechnung	29
3.12	Tabelle der paramagnetischen Effekte.	31
3.13	Übersicht der NMR-Eigenschaften der Lanthanoide.	32
3.14	Abbildung des Koordinatensystems des Anisotropietensor.	33
3.15	Die axialen Suszeptibilitätsanisotropiewerte der Lanthanoide.	36
3.16	Der Winkel Θ zwischen dem externen Magnetfeld und dem Kernverbindungs- vektor.	38
3.17	Abbildung des für Winkel Θ im Molekülkoordinatensystem.	40
3.18	Zusammenhang zwischen Alignmenttensor und Suszeptibilitätstensor	43
3.19	Beispiele für Elektronenrelaxationszeiten.	45
4.1	Die schematische Darstellung der His-Tag-Affinitätschromatographie.	48
4.2	Einführung eines MTSSL-Tags in ein Protein	49
4.3	Die Einführung eines endständigen Fe-BABE-Tags in RNA	50
4.4	Alternative nichtendständige BABE-Modifizierung von RNA.	51
4.5	5'-EDTA-Fluoreszenztag.	51
4.6	Einbau des Hovinen-Tags.	52
4.7	Kommerziell erhältlicher EDTA-Tag für DNA (dT-EDTA).	52
4.8	DTPA-Derivatisierung eines Oligonukleotids für MRI-Studien.	53
4.9	Strukturformeln und Abkürzungen der drei verschiedenen Tags.	56
4.10	Vergleich der Struktur der EPTE-modifizierten und der nativen DNA	57
4.11	Vergleich der Struktur der DSE-modifizierten und der nativen DNA	57
5.1	Der Syntheszyklus der Phosphoramiditmethode.	61
5.2	Basenlabile Aminoschutzgruppen.	62
5.3	Enantiomeren selektive Synthese von (<i>R/S</i>)-(4-Bromphenyl)-glycin.	63
5.4	Aufbau der EDTA-Funktion.	64
5.5	Aufbau des 5-Ethynyl-2'-desoxyuridins.	64
5.6	Verkürzte Synthese des 5-Ethynyl-2'-desoxyuridins.	65
5.7	Synthese des Phosphoramidits.	66
5.8	Übersicht zur Pd(0)-katalysierten Reaktion nach Grinstaff.	67
5.9	Übersicht zur Glaser-Kupplung.	68
5.10	Synthese der chelatisierenden Bausteine mit Ethinfunktion.	68

5.11	Sonogashira-Reaktionen an festphasengebundener DNA.	69
5.12	Übersicht zu verschiedenen Clickreaktionen nach Sharpless.	70
5.13	Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition.	70
5.14	Katalysezyklus der Huisgen 1,3- dipolaren Cycloaddition.	71
5.15	<i>Spin label</i> -Einführung in DNA mittels Clickchemie.	73
5.16	Schema zur Synthese von Diaminopropionsäurebenzylester.	74
5.17	Synthese des (S)-1- Carboxylethylendiamintetraessigsäuretetramethylesters .	74
5.18	Synthese des EDTA-modifizierten Azids.	74
5.19	Synthese einer DNA mit TE-Tag.	75
5.20	Synthese des <i>trans</i> -4-Aminocyclohexylazid.	76
5.21	LC-MS-Chromatogramm zur Stereoselektivität der S _N 2 -Reaktion.	76
5.22	Synthese des EDTA-modifizierten Alkylazides.	77
5.23	Clickreaktion mit eines zyklischen Alkylazid.	77
5.24	Synthese des verlängerten ethinylfunktionalisierten Desoxyuridins	78
5.25	Clickreaktion des verlängerten Ethindesoxyuridins mit 32-S	79
5.26	Clickreaktion des verlängerten Ethindesoxyuridins mit 26b-S an der Festphase.	79
5.27	Überblick der Aufarbeitung der EPTE-getaggtten DNA.	80
5.28	Beispiele zur Modifizierung von Cysteinen [12, 123, 124].	81
5.29	Reaktionsbeispiele an Zuckern und Nukleosiden.	82
5.30	Taggingreaktion an 4-Thio-2'-desoxythymidin.	83
5.31	Macromodelsimulation der an 4(orange)- und 5(blau)-Position getaggtten DNA.	83
5.32	Synthese von <i>S</i> -Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin.	84
5.33	Dreistufige Synthese von <i>S</i> -Acetyl-5-mercaptomethyl-2'-desoxyuridin.	84
5.34	Schematische Darstellung der Synthese von DNA mit einem DSE-Tag.	85
6.1	ESI-Massenspektrum der 24meren DNA mit EPTE-Tag.	88
6.2	ESI-Massenspektrum der 24meren DNA mit EPTE-Tag mit Dy ³⁺	88
6.3	Verwendete DNA-Sewuenzen.	89
6.4	Veränderte UV-Absorption durch den EPTE-Tag.	90
6.5	24mer Hairpin-DNA basierend auf einer STAT-bindenden Sequenz.	90
6.6	HPLC-Chromatogramme der dodecamerer DNA-Doppelstränge.	92
6.7	HPLC-Chromatogramme der DNA-Einzelstränge.	93

6.8	HPLC-Chromatogramme der dsDNA- und ssDNA-Mischungen bei 35 °C.	93
6.9	NMR-Spektren von EDTA und TRIS mit und ohne DyCl ₃	95
6.10	HPLC-Chromatogramm einer Mischung aus EDTA und DyCl ₃ (3:2).	96
6.11	UV-aktives EDTA-Derivat.	97
6.12	HPLC-Chromatogramm des UV-aktiven EDTA-Derivates ohne NaCl.	97
6.13	HPLC-Chromatogramm des UV-aktiven EDTA-Derivates mit DyCl ₃	98
6.14	24mer Hairpin-DNA mit EPTE-Tag an der Position T*.	98
6.15	Tabelle der chemischen Verschiebungen der DNA mit und ohne EPTE-Tag.	99
6.16	EPTE-Tag	99
6.17	¹ H-NOESY-Spektrum, 1mM DNA mit EPTE-Tag (ohne Dysprosiumionen).	100
6.18	¹ H-NOESY-Spektrum 1mM DNA mit EPTE-Tag und Dy ³⁺	102
6.19	Tabelle der Pseudokontaktshifts.	103
6.20	Der diagonalisierte Alignmenttensor.	105
6.21	Auftragung der gemessenen PCS gegen die berechneten PCS. Die gute Korrelation besitzt einen q-Faktor von 0.086.	106
6.22	DNA-Struktur und Tensor im Molkülkoordinatensystem.	107
6.23	Verlängerte TAR-Sequenz des HIV2.	108
6.24	C1'-H1'-HSQC-Spektrum der verlängerten TAR-RNA ohne und mit DNA-Decamer.	109
6.25	C8-H8-HSQC-Spektrum der verlängerten TAR-RNA ohne und mit DNA-Decamer.	110
6.26	C2-H2-HSQC-Spektrum der verlängerten TAR-RNA ohne und mit DNA-Decamer.	110
6.27	Veränderung der NOESY-Kreuzsignalintensität durch Zugabe von Dysprosiumchlorid	112
6.28	NOESY-Spektrum des DNA-Gegenstranges ohne und mit DyCl ₃	113
6.29	HSQC-Spektren der verlängerten TAR-RNA ohne und mit Dy-EPTE-DNA	115
6.30	Gekoppeltes C2-H2-HSQC-Spektrum der paramagnetischen Probe (blau) und der diamagnetischen Probe (rot) bei 25 °C und 900 MHz.	116
6.31	Gekoppeltes C8-H8-HSQC-Spektrum der paramagnetischen Probe (blau) und der diamagnetischen Probe (rot) bei 25 °C und 900 MHz	116
6.32	Tabelle der extrahierten rdcs bei 900 MHz und 25 °C.	117

6.33 Gelelektrophorese zur Untersuchung auf Abbauprodukte.	117
7.1 Verlängerte TAR-RNA mit DNA-Gegenstrang und mit RNA-Gegenstrang. .	122
8.1 ESI-Massenspektrum mit TOF-Detektion	160
8.2 HPLC-Chromatogramm der DNA mit EPTE-Tag (Abschnitt 8.2.37)	166
8.3 ESI-Massenspektrum der DNA mit EPTE-Tag (Abschnitt 8.2.37)	166

9.3 Macromodelparameter

Force field: OPLS_2005

Solvent: Water

Constant dielectric with dielectric constant 1.0

Extended cutoff

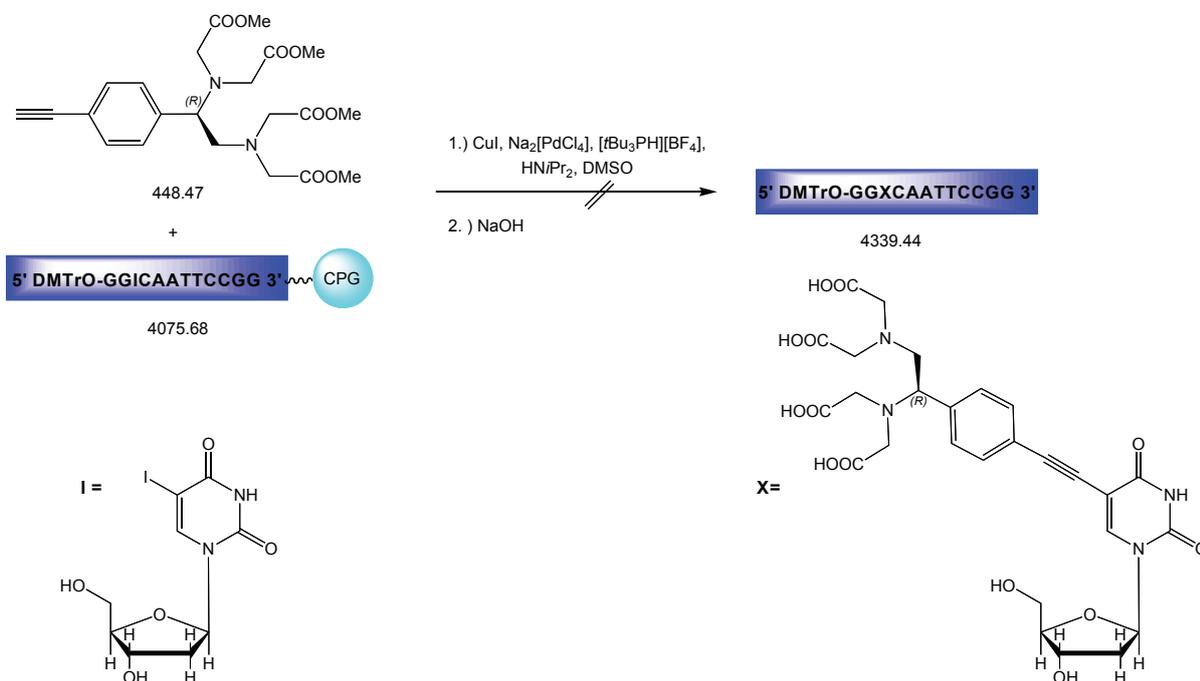
Optimisation of the whole structure with no constraints

Energy minimization via the PRG-Method until convergence threshold is less than 0.05 (Energy).

9.4 Weitere Versuchsvorschriften

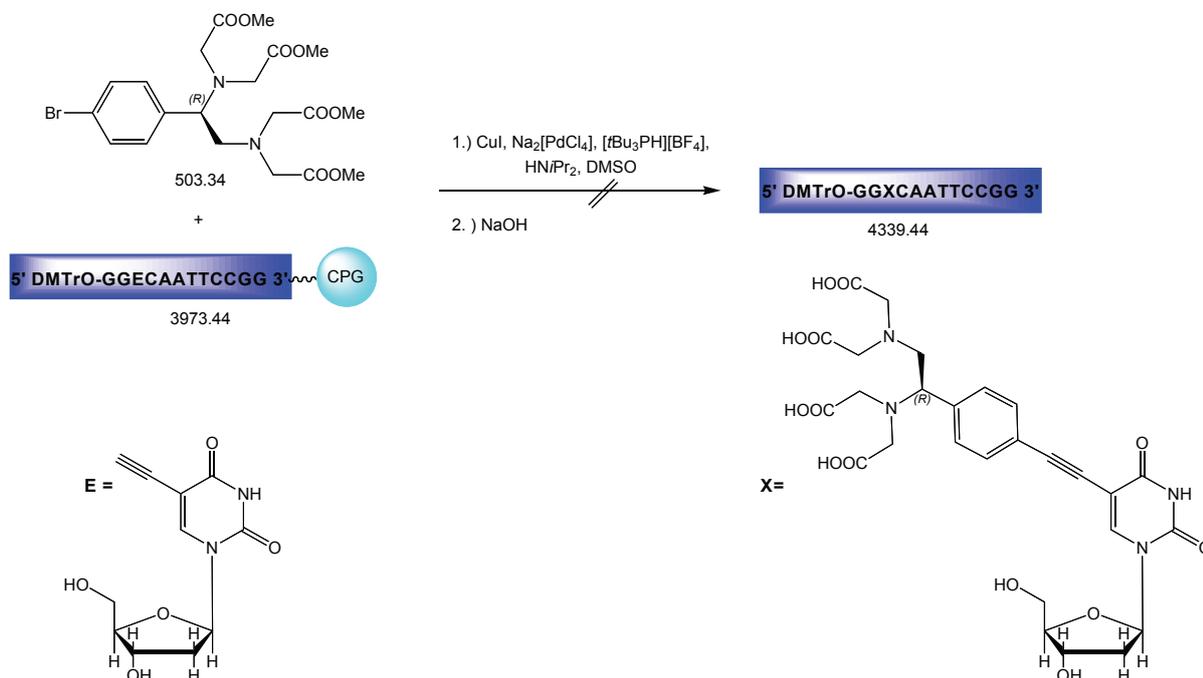
Im Folgenden sind einige ausgewählte Reaktionsvorschriften, die nicht zur erfolgreichen Synthese von paramagnetisch markierter DNA verwendet wurden, aufgeführt. Darunter je ein repräsentatives Beispiel für Sonogashira-Kupplungen an der Festphase. Andere getestete DNA-Sequenzen waren beispielsweise CXG und XCAATTCCGG (X entspricht dem modifizierten Uridinbausteinen).

9.4.1 Beispiel einer Sonogashira-Reaktion an der festphasengebundenen DNA mit 5-Iod-2'-desoxyuridin



1 μmol festphasengebundenene, DMTr-geschützte DNA (35 mg) wurde unter Argonatmosphäre mit 4.4 mg Natriumtetrachloropalladat(II) (15 μmol , 15 Äq.), 2.8 mg Kupferiodid (15 μmol , 15 Äq.), 5.8 mg Tri-(*tert*-butyl)phosphonium)-tetrafluoroborat (20 μmol , 20 Äq.) und 20 mg des Ethins (44 μmol , 44 Äq.) versetzt. Nach Zugabe einer Mischung aus von 78 μl Diisopropylamin und 400 μl Dimethylsulfoxids wurde die Suspension 3 h bei 50 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand je dreimal mit 100 μl Dimethylsulfoxid und Wasser gewaschen. Die festphasengebundene DNA wurde anschließend mit einer Lösung aus 0.4 M Natronlauge in Wasser/Methanol: 1/4 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die DNA-haltige Lösung wurde anschließend mit HPLC und **ESI-MS** analysiert. Die Retentionszeit entsprach dabei der ioddesoxyuridinhaltigen DNA und im Massenspektrum wurde auch nur dessen Masse detektiert.

9.4.2 Sonogashira-Reaktion an der festphasengebundenen DNA mit 5-Ethin-2'-desoxyuridin



1 μmol festphasengebundenene, DMTr-geschützte DNA (35 mg) wurde unter Argonatmosphäre mit 8.1 mg Natriumtetrachloropalladat(II) (28 μmol , 28 Äq.), 4.19 mg Kupferiodid (22 μmol , 22 Äq.), 12.7 mg Tri-(*tert*-butyl)phosphonium)-tetrafluoroborat (44 μmol , 44 Äq.) und 25 mg des Ethins (50 μmol , 50 Äq.) versetzt. Nach Zugabe einer Mischung aus von 100 μl Diisopropylamin 200 μl Acetonitril und 200 μl Dimethylsulfoxids wurde die Suspension 16 h bei 60 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand je dreimal mit 100 μl Dimethylsulfoxid, Dichlormethan und Wasser gewaschen. Die festphasengebundene DNA wurde anschließend mit einer Lösung aus 0.4 M Natronlauge in Wasser/Methanol: 1/4 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die DNA-haltige Lösung wurde anschließend mit HPLC und **ESI-MS** analysiert. Die Retentionszeit entsprach dabei der ethindesoxyuridinhaltigen DNA und im Massenspektrum wurde auch nur dessen Masse detektiert.

9.5 Pulssequenz des NOESY-Spektrums für die Messung der DNAs in D₂O

ppNOESY

Page 1 of 1

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 18:49:18 Uhr

```
noesyetgp
;avance-version (00/04/28)
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
```

```
"DELTA=p16+d16+d0"
"DELTA1=p16+d16+8u"
"TAU=d8-p16-d16"
```

```
1 ze
2 d11
3 d1
  50u UNBLKGRAD
  p1 ph1
  DELTA
  p2 ph2
  d0
  p16:gp1*EA
  d16
  p1 ph3
  TAU
  p16:gp2
  d16
  p1 ph4
  DELTA1
  p2 ph5
  4u
  p16:gp3
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  d11 mc #0 to 2 F1EA(igrad EA, id0 & ip1*2 & ip31*2)
exit
```

```
ph1=0 2
ph2=0
ph3=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 0 2 2 3 3 1 1
ph5=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
```

9.6 Pulssequenz des COSY-Spektrums für die Messung der DNAs in D₂O

ppCOSY

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 18:56:08 Uhr

Page 1 of 2

```
;cosydfesgpph
;avance-version (02/03/07)
;2D homonuclear shift correlation
;with double quantum filter
;phase sensitive
;water suppression using excitation sculpting with gradients
;allowing for presaturation during relaxation delay in cases
;  of radiation damping
;phasecycle: A. Derome & M. Williamson, J. Magn. Reson. 88,177 - 185 (1990)
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson.,
  Series A 112 275-279 (1995)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"p2=p1*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d0=in0/2-p1*4/3.1416"

1 ze
2 d11
3 d12 p19:f1
  d1 cw:f1 ph29
  d13 do:f1
  d12 p11:f1
  p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  d13
  p1 ph3
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 p10:f1
  (p12:sp1 ph4:r):f1
  4u
  d12 p11:f1
  p2 ph5
  4u
  p16:gp1
  d16
  50u
  p16:gp2
  d16 p10:f1
  (p12:sp1 ph6:r):f1
  4u
  d12 p11:f1
  p2 ph7
  4u
  p16:gp2
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1 & ip29, id0)
exit
```

ppCOSY

Page 2 of 2

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 18:56:08 Uhr

```
ph1=1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0
ph2=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1
ph3=1 2 3 0 1 2 3 0 2 3 0 1 2 3 0 1
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 0 0 0 0
ph6=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph7=2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3
ph29=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph31=0 3 2 1 2 1 0 3 3 2 1 0 1 0 3 2
```

9.7 Pulssequenz des TOCSY-Spektrums für die DNA-Proben in D₂O

ppTOCSY
Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 16:52:18 Uhr

Page 1 of 2

```
;mlevesgp  
;avance-version (05/10/27)  
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence  
;   for mixing  
;using two power levels for excitation and spinlock  
;phase sensitive  
;  
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)  
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson.,  
;   Series A 112 275-279 (1995)  
;  
;$CLASS=HighRes  
;$DIM=2D  
;$TYPE=  
;$SUBTYPE=  
;$COMMENT=
```

```
prosol relations=<triple>
```

```
\#include <Avance.incl>  
\#include <Delay.incl>  
\#include <Grad.incl>
```

```
"p2=p1*2"  
"p5=p6*.667"  
"p7=p6*2"  
"d12=20u"
```

```
"SCALEF=p7*2/p5+0.5"  
"FACTOR1=((d9-p17*2)/(p6*64+p5))/SCALEF+0.5"  
"l1=FACTOR1*SCALEF"
```

```
"d0=in0/2-p1*2/3.1416-d12"
```

```
1 ze  
2 d1  
3 d12 p11:f1  
  p1 ph1  
  d0  
  d12 p110:f1  
  (p17 ph26)  
                               ;begin MLEV17  
4 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)  
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)  
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)  
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)  
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)  
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)  
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)  
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
```

ppTOCSY

Page 2 of 2

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 16:52:18 Uhr

```
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p5 ph23)
lo to 4 times l1          ;end MLEV17
(p17 ph26)

50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 p10:f1
(p12:sp1 ph2:r):f1
4u
d12 p11:f1

p2 ph3

4u
p16:gp1
d16
50u
p16:gp2
d16 p10:f1
(p12:sp1 ph4:r):f1
4u
d12 p11:f1

p2 ph5

4u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD

go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 1 1
ph3=2 2 3 3
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3
ph22=3
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
```

9.8 NOESY-Pulssequenz mit watergate-Wasserunterdrückung für die Messung der Proben in H₂O mit 10 % D₂O

ppNOESYwg

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 16:19:23 Uhr

Page 1 of 1

```
# tcnoesywg.txt
;basiert auf noesygpph19
;avance-version (00/02/07)
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
"d12=20u"
```

```
1 ze
2 d1
3 d12 p11:f1
  d12 UNBLKGRAD
  p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  d8
  p16:gp2
  d16
  p1 ph3
  d12 p118:f1
  50u
  p16:gp1
  d16
  p27*0.231 ph4
  d19*2
  p27*0.692 ph4
  d19*2
  p27*1.462 ph4
  d19*2
  p27*1.462 ph5
  d19*2
  p27*0.692 ph5
  d19*2
  p0*0.231 ph5
  46u
  p16:gp1
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit
```

```
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 3 3 1 1
ph4=0
ph5=2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
```

9.9 Pulssequenz zur Messung der entkoppelten HSQCs der C1'-H1'-Kreuzsignale der gelabelten RNAs

zuckerentkoppelt.txt

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:57:40 Uhr

Page 1 of 4

```
# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdec1dec.txt"

;hsqc to measure rdc on RNA, c1' + c5 resonances
# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/Avance.incl" 1
;Avance2.incl
;  for 1
;
;
;avance-version (07/08/21)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

;$Id: Avance2.incl,v 1.17.2.1 2007/09/14 16:17:35 ber Exp $
# 10 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdec1dec.txt" 2

# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/Grad.incl" 1
;Grad2.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;  for 1
;
;
;avance-version (07/01/17)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

define list<gradient> EA=<EA>

;$Id: Grad2.incl,v 1.12 2007/01/22 14:22:35 ber Exp $
# 11 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdec1dec.txt" 2

# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/Delay.incl" 1
;Delay.incl - include file for commonly used delays
;
;
;version 00/02/07
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

;general delays

define delay DELTA
define delay DELTA1
define delay DELTA2
define delay DELTA3
define delay DELTA4
define delay DELTA5
define delay DELTA6
define delay DELTA7
define delay DELTA8

define delay TAU
define delay TAU1
define delay TAU2
define delay TAU3
define delay TAU4
define delay TAU5

;delays for centering pulses

define delay CEN_HN1
define delay CEN_HN2
```

zuckerentkoppelt.txt

Page 2 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:57:40 Uhr

```

define delay CEN_HN3
define delay CEN_HC1
define delay CEN_HC2
define delay CEN_HC3
define delay CEN_HC4
define delay CEN_HP1
define delay CEN_HP2
define delay CEN_CN1
define delay CEN_CN2
define delay CEN_CN3
define delay CEN_CN4
define delay CEN_CP1
define delay CEN_CP2

;loop counters

define loopcounter COUNTER
define loopcounter SCALEF
define loopcounter FACTOR1
define loopcounter FACTOR2
define loopcounter FACTOR3

;$Id: Delay.incl,v 1.12 2005/11/10 12:16:58 ber Exp $
# 12 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc1dec.txt" 2

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"d11=30ms"
"d12=20u"

"d0=4u" ;a shorter d0 gives too short a delay between consecutive sp
"d20=d0*2-4u"

"d4=1s/(cnst2*4)" ;172 Hz is fine for C1r and C5
"d14=d4-p16-d16-50u"

"in0=inf1/2"

"CEN_HC1=p3-p1"
"CEN_CN2=(p12-p22)/2"
"CEN_HC2=(p12-p2)/2" ;specific for decoupled version

# 1 "mc_line 34 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc1dec.txt expanding definition p
define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / (2)"
"MCWRK = 0.333333*d1"
"MCREST = d1 - d1"
dcorr
# 34 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc1dec.txt"
1 ze
# 1 "mc_line 34 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc1dec.txt expanding definition c
# 35 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc1dec.txt"
20u p13:f3 p12:f2
# 1 "mc_line 36 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc1dec.txt expanding start label

```

zuckerentkoppelt.txt

Page 3 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:57:40 Uhr

```

2 MCWRK do:f3 do:f2
LBLSTS1, MCWRK
LBLF1, MCWRK
MCREST
# 37 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdec.txt"
50u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 0
4u p11:f1
(p1 ph11)
d14 p12:f2
50u
p16:gp2
d16
(CEN_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph6):f2
50u
p16:gp2
d16
d14
(p1 ph2)
50u
p16:gp1
d16
(p3 ph3):f2
d0
d12 p120:f2
(CEN_HC2 p2 ph1):f1 (CEN_CN2 p22 ph1):f3 (p12:sp12 ph1):f2 ;inversion on c6c8
4u
(p14:sp14 ph1):f2 ;inversion on c2r
d0
(p13:sp13 ph9):f2 ;refocus on c1r + c5, on-resonance
d20
(p12:sp12 ph1):f2 ;inversion on c6c8, B-S compensation
4u
(p14:sp14 ph1):f2 ;inversion on c2r, B-S compensation
4u
d12 p12:f2
(p3 ph4):f2
50u
p16:gp3
d16
(p1 ph1)
d14 p12:f2
50u
p16:gp4
d16
(CEN_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph6):f2
46u
p16:gp4
d16
4u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 7
d14 p112:f2

go=2 ph31 cpd2:f2
# 1 "mc_line 85 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdec.txt expanding mc command i
MCWRK do:f3 do:f2 wr #0 if #0 zd ip3
lo to LBLSTS1 times 2
MCWRK id0
lo to LBLF1 times ST1CNT
MCWRK
# 86 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdec.txt"
exit

ph1=0
ph2=1

```

zuckerentkoppelt.txt

Page 4 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:57:40 Uhr

```
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph6=0
ph9=0 ;0 0 0 2 2 2 2
ph11=0 0 0 0 2 2 2 2
ph12=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
```

```
;pl12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;pl20: f2 channel - power level (dummy) for shaped pulse
;cnst2 : J(CH) = 160-180 Hz for base C6/C8, 150Hz for c1r
;d4 : 1/(4J)XH
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;States-TPPI
;cpd2: GARP for this HSQC
```

```
;gradient: SINE.100
```

```
;gpz1: 45%
```

```
;gpz2: 12%
```

```
;gpz3: 57%
```

```
;gpz4: 10%
```

```
;most of the gpz can be altered because they are not related among them
```

```
;The shaped pulses allow the refocusing of the Jcc.
```

```
;The third sp hits C5 but does not do anything. It simply compensates the
```

```
; Bloch-Siegert phase shifts. Possibly, it inverts the M on C5, but this M will not
```

```
; become detectable.
```

9.10 Pulssequenz zur Messung der entkoppelten HSQCs der C8-H8- und C2-H2-Kreuzsignale der gelabelten RNAs

baseentkoppelt.txt

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:42:42 Uhr

Page 1 of 4

```
# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt"
;hsqc with watergate
# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/Avance.incl" 1
;Avance2.incl
;   for 1
;
;
;avance-version (07/08/21)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=
;$Id: Avance2.incl,v 1.17.2.1 2007/09/14 16:17:35 ber Exp $
# 7 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt" 2

# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/Grad.incl" 1
;Grad2.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;   for 1
;
;
;avance-version (07/01/17)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

define list<gradient> EA=<EA>

;$Id: Grad2.incl,v 1.12 2007/01/22 14:22:35 ber Exp $
# 8 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt" 2

# 1 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/Delay.incl" 1
;Delay.incl - include file for commonly used delays
;
;
;version 00/02/07
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

;general delays

define delay DELTA
define delay DELTA1
define delay DELTA2
define delay DELTA3
define delay DELTA4
define delay DELTA5
define delay DELTA6
define delay DELTA7
define delay DELTA8

define delay TAU
define delay TAU1
define delay TAU2
define delay TAU3
define delay TAU4
define delay TAU5

;delays for centering pulses

define delay CEN_HN1
define delay CEN_HN2
define delay CEN_HN3
define delay CEN_HC1
define delay CEN_HC2
```

baseentkoppelt.txt

Page 2 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:42:42 Uhr

```

define delay CEN_HC3
define delay CEN_HC4
define delay CEN_HP1
define delay CEN_HP2
define delay CEN_CN1
define delay CEN_CN2
define delay CEN_CN3
define delay CEN_CN4
define delay CEN_CP1
define delay CEN_CP2

;loop counters

define loopcounter COUNTER
define loopcounter SCALEF
define loopcounter FACTOR1
define loopcounter FACTOR2
define loopcounter FACTOR3

;$Id: Delay.incl,v 1.12 2005/11/10 12:16:58 ber Exp $
# 9 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt" 2

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"d0=4u"
;a shorter d0 gives too short a delay between consecutive sp
"d4=1s/(cnst2*4)" ;180 Hz for base in RNA
"d11=30ms"
"d13=20u"
"d20=d0*2-4u"
"d23=p3-p1"
"d14=d4-p16-d16-50u"

"in0=inf1/2"

"CEN_HC1=(p12-p2)/2"
"CEN_CN1=(p12-p22)/2"

# 1 "mc_line 30 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt expanding definition part
define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / (2)"
"MCWRK = 0.333333*d11"
"MCREST = d11 - d11"
  dccorr
# 30 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt"
1 ze
# 1 "mc_line 30 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt expanding definition of n
# 31 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt"
20u p12:f2 ;p13:f3
# 1 "mc_line 32 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2.txt expanding start label for
2 MCWRK do:f2
LBLSTS1, MCWRK
LBLF1, MCWRK
MCREST

```

baseentkoppelt.txt

Page 3 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:42:42 Uhr

```
# 33 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqcrdc2.txt"
4u p19:f1
d1 cw:f1
20u do:f1
  50u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 0
4u p11:f1
4u p12:f2
(p1 ph1)
d14 p12:f2
  50u
  p16:gp3
  d16
(d23 p2 ph0):f1 (p4 ph6):f2
  50u
  p16:gp3
  d16
d14
(p1 ph2)
  50u
  p16:gp1
  d16
(p3 ph3):f2

d0
d12 p120:f2
;(CEN_CN1 p22 ph1):f3
(p12:sp2 ph0):f2 (CEN_HC1 p2 ph0) (CEN_CN1 p22 ph0):f3
d0
(p13:sp3 ph4):f2
d20
(p12:sp2 ph0):f2
4u
d12 p12:f2

(p3 ph4):f2
  50u
  p16:gp4
  d16
(p1 ph0)

d14 p12:f2
  50u
  p16:gp2
  d16
(d23 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 7
  d14 p112:f2
(p1 ph13):f1
go=2 ph31 cpd2:f2
# 1 "mc_line 84 file /opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqcrdc2.txt expanding mc command in 1
MCWRK do:f2 wr #0 if #0 zd ip3
lo to LBLSTS1 times 2
MCWRK id0
lo to LBLF1 times ST1CNT
MCWRK
# 85 "/opt/topspin_2.1/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqcrdc2.txt"
exit
```

baseentkoppelt.txt

Page 4 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:42:42 Uhr

```
ph0=0
ph1=0 0 0 0 2 2 2 2
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph6=0
ph12=0
ph13=2
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;cnst2 : J(CH) = 160 Hz for base C6/C8
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I / 0 [30 ms]
;d13: short delay (e.g. to compensate delay line) [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d24: 1/(4J)XH for XH
; 1/(6J)XH for all multiplicities
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; [GARP for this HSQC]

;gradient: sin.100
;gpz1: 50%
;gpz2: 20%
;gpz3: 15%
;gpz4: 40%
;most of the gpz can be altered because they are not related among them
```

9.11 Pulssequenz zur Messung der in t_2 -gekoppelten HSQCs der C1'-H1'-Kreuzsignale der gelabelten RNAs

zuckergekoppelt.txt

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:22 Uhr

Page 1 of 4

```
# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo"
;J(C5-C6) refocused with inversion shaped pulse.
; with 90 degree pulse on f2 before acquisition

# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/Avance.incl" 1
;Avance2.incl
; for 1
;
;
;avance-version (07/08/21)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

;$Id: Avance2.incl,v 1.17.2.1 2007/09/14 16:17:35 ber Exp $
# 8 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo" 2

# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/Grad.incl" 1
;Grad2.incl - include file for Gradient Spectroscopy
; for 1
;
;
;avance-version (07/01/17)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

define list<gradient> EA=<EA>

;$Id: Grad2.incl,v 1.12 2007/01/22 14:22:35 ber Exp $
# 9 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo" 2

# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/Delay.incl" 1
;Delay.incl - include file for commonly used delays
;
;
;version 00/02/07
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

;general delays

define delay DELTA
define delay DELTA1
define delay DELTA2
define delay DELTA3
define delay DELTA4
define delay DELTA5
define delay DELTA6
define delay DELTA7
define delay DELTA8

define delay TAU
define delay TAU1
define delay TAU2
define delay TAU3
define delay TAU4
define delay TAU5

;delays for centering pulses
```

zuckergekoppelt.txt

Page 2 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:22 Uhr

```

define delay CEN_HN1
define delay CEN_HN2
define delay CEN_HN3
define delay CEN_HC1
define delay CEN_HC2
define delay CEN_HC3
define delay CEN_HC4
define delay CEN_HP1
define delay CEN_HP2
define delay CEN_CN1
define delay CEN_CN2
define delay CEN_CN3
define delay CEN_CN4
define delay CEN_CP1
define delay CEN_CP2

;loop counters

define loopcounter COUNTER
define loopcounter SCALEF
define loopcounter FACTOR1
define loopcounter FACTOR2
define loopcounter FACTOR3

;$Id: Delay.incl,v 1.12 2005/11/10 12:16:58 ber Exp $
# 10 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo" 2

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"in0=inf1/2"
"d0=4u"

"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30ms"
"d12=20u"
"d20=d0*2-4u"
"d23=p3-p1"
"d14=d4-p16-d16-50u"

"CEN_CN1=(p12-p22)/2"
"CEN_HC1=(p12-p2)/2" ;specific for decoupled version

# 1 "mc_line 31 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo expanding definition of
define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / (2)"
"MCWRK = 0.333333*d11"
"MCREST = d11 - d11"
dcorr
# 31 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo"
1 ze
# 1 "mc_line 31 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo expanding definition of
# 32 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo"
20u pl3:f3 ;pl12:f2
# 1 "mc_line 33 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc1decpr_edwo expanding start label f
2 MCWRK do:f3 do:f2
LBLSTS1, MCWRK
LBLF1, MCWRK

```

zuckergekoppelt.txt

Page 3 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:22 Uhr

```
MCREST
# 34 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrddc1decpr_edwo"

20u p19:f1
d1 cw:f1
20u do:f1

50u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 0
4u p11:f1
(p1 ph1)
d14 p12:f2
50u
p16:gp3
d16
(d23 p2 ph1):f1 (p4 ph6):f2
50u
p16:gp3
d16
d14
(p1 ph2)
50u
p16:gp1
d16
(p3 ph3):f2

d0
d12 p120:f2
(CEN_HC1 p2 ph1):f1 (CEN_CN1 p22 ph1):f3 (p12:sp2 ph1):f2
4u
(p14:sp4 ph1):f2
d0
(p13:sp3 ph4):f2
d20
(p12:sp2 ph1):f2
4u
(p14:sp4 ph1):f2
4u
d12 p12:f2

(p3 ph4):f2
50u
p16:gp4
d16
(p1 ph1)
d14 p12:f2
50u
p16:gp2
d16
(d23 p2 ph1):f1 (p4 ph6):f2
46u
p16:gp2
d16
4u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 7
d14 ;p12:f2
(p3 ph1):f2
go=2 ph31 ;cpd2:f2
# 1 "mc_line 89 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrddc1decpr_edwo expanding mc command ir
MCWRK do:f3 do:f2 wr #0 if #0 zd ip3
lo to LBLSTS1 times 2
MCWRK id0
lo to LBLF1 times ST1CNT
MCWRK
# 90 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrddc1decpr_edwo"
```

zuckergekoppelt.txt

Page 4 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:22 Uhr

```
exit
```

```
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph6=0
ph12=0
ph31=0 2 2 0
```

```
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;pl12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;cnst2 : J(CH) = 160 Hz for base C6/C8
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I / 0 [30 ms]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d24: 1/(4J)XH for XH
; 1/(6J)XH for all multiplicities
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; [GARP for this HSQC]

;gradient: sin.100
;gpz1: 40%
;gpz2: 30%
;gpz3: 25%
;gpz4: 50%
;most of the gpz can be altered because they are not related among them
```

9.12 Pulssequenz zur Messung der in t_2 -gekoppelten HSQCs der C8-H8- und C2-H2-Kreuzsignale der gelabelten RNAs

basegekoppelt.txt

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:35 Uhr

Page 1 of 4

```
# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc2decwg_edwo"
;J(C5-C6) refocused with inversion shaped pulse.

;For the determination of evolution of coupling to C
; during watergate (3.37*d19), see
; V.Sklenar et col, J.Magnet.Res.Ser.A, 1993, 102, 241-245.
; with 90 degree pulse on f2 before acquisition
# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/Avance.incl" 1
;Avance2.incl
;   for 1
;
;
;avance-version (07/08/21)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

;$Id: Avance2.incl,v 1.17.2.1 2007/09/14 16:17:35 ber Exp $
# 11 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc2decwg_edwo" 2

# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/Grad.incl" 1
;Grad2.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;   for 1
;
;
;avance-version (07/01/17)
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

define list<gradient> EA=<EA>

;$Id: Grad2.incl,v 1.12 2007/01/22 14:22:35 ber Exp $
# 12 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc2decwg_edwo" 2

# 1 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/Delay.incl" 1
;Delay.incl - include file for commonly used delays
;
;
;version 00/02/07
;
;
;$CLASS=HighRes Incl
;$COMMENT=

;general delays

define delay DELTA
define delay DELTA1
define delay DELTA2
define delay DELTA3
define delay DELTA4
define delay DELTA5
define delay DELTA6
define delay DELTA7
define delay DELTA8

define delay TAU
define delay TAU1
define delay TAU2
define delay TAU3
define delay TAU4
define delay TAU5

;delays for centering pulses
```

basegekoppelt.txt

Page 2 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:35 Uhr

```

define delay CEN_HN1
define delay CEN_HN2
define delay CEN_HN3
define delay CEN_HC1
define delay CEN_HC2
define delay CEN_HC3
define delay CEN_HC4
define delay CEN_HP1
define delay CEN_HP2
define delay CEN_CN1
define delay CEN_CN2
define delay CEN_CN3
define delay CEN_CN4
define delay CEN_CP1
define delay CEN_CP2

;loop counters

define loopcounter COUNTER
define loopcounter SCALEF
define loopcounter FACTOR1
define loopcounter FACTOR2
define loopcounter FACTOR3

;$Id: Delay.incl,v 1.12 2005/11/10 12:16:58 ber Exp $
# 13 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2decwg_edwo" 2

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"i0=inf1/2"
"d0=4u"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30ms"
"d12=20u"
"d20=d0*2-4u"
"d23=p3-p1"
"d14=d4-p16-d16-50u"

"DELTA=d19-p4/2"
"DELTA1=d4-p16-d16-d19*3.37"
"DELTA2=DELTA1-46u-4u"

"CEN_CN1=(p12-p22)/2"
"CEN_HC1=(p12-p2)/2" ;specific for decoupled version

# 1 "mc_line 37 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2decwg_edwo expanding definition of
define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / (2)"
"MCWRK = 0.333333*d11"
"MCREST = d11 - d11"
    dccorr
# 37 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2decwg_edwo"
1 ze
# 1 "mc_line 37 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2decwg_edwo expanding definition of
# 38 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2decwg_edwo"
20u pl3:f3 ;pl12:f2
# 1 "mc_line 39 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2decwg_edwo expanding start label f
2 MCWRK do:f3 do:f2

```

basegekoppelt.txt

Page 3 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:35 Uhr

```

LBLSTS1, MCWRK
LBLF1, MCWRK
MCREST
# 40 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc2decwg_edwo"
d1
  50u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 0
4u p1:f1
(p1 ph1)
d14 p12:f2
  50u
  p16:gp3
  d16
(p2 ph1):f1 (d23 p4 ph6):f2 ;should it be adiabatic? or shaped?
  50u
  p16:gp3
  d16
d14
(p1 ph2)
  50u
  p16:gp1
  d16
(p3 ph3):f2
d0
d12 p120:f2
(CEN_HC1 p2 ph1):f1 (CEN_CN1 p22 ph1):f3 (p12:sp2 ph1):f2
d0
(p13:sp3 ph4):f2
d20
(p12:sp2 ph1):f2
4u
d12 p12:f2
(p3 ph5):f2
  50u
  p16:gp4
  d16
(p1 ph1)

DELTA1
  p16:gp2
  d16
p1*0.231 ph7
d19*2
p1*0.692 ph7
d19*2
p1*1.462 ph7
DELTA
(p4 ph6):f2
DELTA
p1*1.462 ph8
d19*2
p1*0.692 ph8
d19*2
p1*0.231 ph8
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u setnmr310 setnmr0134132133 ctrlgrad 7
DELTA2 ;p12:f2
  (p3 ph1):f2
go=2 ph31 ;cpd2:f2
# 1 "mc_line 97 file /opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdc2decwg_edwo expanding mc command ir
MCWRK do:f3 do:f2 wr #0 if #0 zd ip3
lo to LBLSTS1 times 2

```

basegekoppelt.txt

Page 4 of 4

Saved: Dienstag, 19. Mai 2009 15:58:35 Uhr

```

MCWRK id0
  lo to LBLF1 times ST1CNT
MCWRK
# 98 "/opt/topspin/exp/stan/nmr/lists/pp/user/vshchsqrdrdc2decwg_edwo"
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph8=2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0 1 1 1 1
ph12=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;cnst2 : J(CH) = 180 Hz for base C6/C8
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I / 0 [30 ms]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d24: 1/(4J)XH for XH
; 1/(6J)XH for all multiplicities
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
; [GARP for this HSQC]

;gradient: sin.100
;gpz1: 50%
;gpz2: (20%) 60% for watergate version - try lower values
;gpz3: 15%
;gpz4: 40%
;most of the gpz can be altered because they are not related among them

;The shaped pulses allow the refocusing of the J-CC.
;The third sp hits C5 but does not do anything.
;Simply compensates the Bloch-Siegert phase shifts. Possibly, it inverts
; the M on C5, but this M will not become detectable.

```



```

[=====>] nd.cool.noep=100;
[*] scale factor for dihedral angle energy term *)
[=====>] nd.cool.cdih=250;
[*] molecular dynamics timestep (cartesian: 0.005, torsion: 0.015) *)
[=====>] nd.cool.ss=0.002;
[*] slowcool annealing temperature step (Cartesian: 25, torsion: 250) *)
[=====>] nd.cool.timesteps=250;
[=====>] parameters for a second slowcool annealing stage [=====>]

[*] cartesian slowcooling annealing stage to be used only with torsion slowcool annealing stage *)
[*] this stage is only necessary when the macromolecule is a protein greater than 100 residues or in some cr

[=====>] use cartesian cooling stage? *)
[+ choice: true false +]
[=====>] nd.cart.flag=true;
[*] temperature *)
[=====>] nd.cart.temp=2000;
[*] number of steps *)
[=====>] nd.cart.steps=2000;
[*] scale factor for initial van der Waals (repel) energy term *)
[=====>] nd.cart.vdw.init=1.0;
[*] scale factor for final van der Waals (repel) energy term *)
[=====>] nd.cart.vdw.fin=4.0;
[*] scale factor for NOE energy term *)
[=====>] nd.cart.noep=200;
[*] scale factor for dihedral angle energy term *)
[=====>] nd.cart.cdih=500;
[*] molecular dynamics timestep *)
[=====>] nd.cart.ss=0.0035;
[*] slowcool annealing temperature step *)
[=====>] nd.cart.timestep=25;
[=====>] parameters for final minimization stage [=====>]

[*] scale factor for NOE energy term *)
[=====>] nd.pow.noep=300;
[*] scale factor for dihedral angle energy term *)
[=====>] nd.pow.cdih=200;
[*] number of minimization steps *)
[=====>] nd.pow.steps=800;
[*] number of cycles of minimization *)
[=====>] nd.pow.cycl=10;
[=====>] noe data [=====>]

[- Important - if you do not have a particular data set then
set the file name to null ("") -]

[*] NOE distance restraints files. *)
[=====>] restraint set 1 file *)
[=====>] mmr.noe.file.1="noe10808.tbl";
[*] restraint set 2 file *)
[=====>] mmr.noe.file.2="";
[*] restraint set 3 file *)
[=====>] mmr.noe.file.3="";
[*] restraint set 4 file *)
[=====>] mmr.noe.file.4="";
[*] restraint set 5 file *)
[=====>] mmr.noe.file.5="";
[*] NOE averaging modes *)

```

```

[*] are the number of structures to be trials or accepted? *)
[+ choice: "trial" "accept" +]
[=====>] fig.trial.struc="trial";
[*] number of trial or accepted structures *)
[=====>] pdb.end.count=100;

[*] print accepted structures *)
[+ choice: true false +]
[=====>] fig.print.accept=false;
[*] print trial structures *)
[+ choice: true false +]
[=====>] fig.print.trial=true;

[*] calculate an average structure for either the trial or
accepted structure. If calculate accepted average is false then
an average for the trial structures will be calculated. *)

[+ choice: true false +]
[=====>] fig.calc.ave.accept=false;
[*] calculate an average structure for the accepted structures? *)
[+ choice: true false +]
[=====>] fig.calc.ave.accept=false;
[*] minimize average coordinates? *)
[+ choice: true false +]
[=====>] fig.min.ave.coord=false;

[=====>] torsion dynamics parameters [=====>]

[*] maximum unbranched chain length *)
[=====>] nd.torsion.maxlength=50;
[*] increase for long stretches of polyalanine or for nucleic acids *)
[=====>] nd.torsion.maxlength=50;

[*] maximum number of distinct bodies *)
[=====>] nd.torsion.maxtree=4;

[*] maximum number of bonds to an atom *)
[=====>] nd.torsion.maxbond=6;

[=====>] parameters for high temperature annealing stage [=====>]

[*] temperature (proteins: 50000, dna/rna: 20000) *)
[=====>] nd.hot.temp=20000;
[*] number of steps (proteins: 1000, dna/rna: 4000) *)
[=====>] nd.hot.steps=4000;
[*] scale factor for initial van der Waals (repel) energy term *)
[=====>] nd.hot.vdw.init=1.0;
[*] scale factor for final van der Waals (repel) energy term *)
[=====>] nd.hot.vdw.fin=4.0;
[*] scale factor for NOE energy term *)
[=====>] nd.hot.noep=50;
[*] scale factor for dihedral angle energy term (proteins: 100, dna/rna: 5) *)
[=====>] nd.hot.cdih=150;
[*] molecular dynamics timestep *)
[=====>] nd.hot.steps=100;

[=====>] parameters for the first slowcool annealing stage [=====>]

[*] temperature (cartesian: 1000, torsion: [proteins: 50000, dna/rna: 20000]) *)
[=====>] nd.cool.temp=20000;
[*] scale factor for initial van der Waals (repel) energy term *)
[=====>] nd.cool.vdw.init=1.0;
[*] scale factor for final van der Waals (repel) energy term (cartesian: 4.0, torsion: 1.0) *)
[=====>] nd.cool.vdw.fin=4.0;
[*] scale factor for NOE energy term *)

```



```

parameter
nbonds
  repel=0.80
  repz=2 irexp=2 rcon=1.
  nbond=3
  cutrb=0.1
  cutrb=0 ctomb=2.99 ctofnb=3.
  tolerance=1.5
end
end
[- Read experimental data -]
@CNS_NMRMODULE:readdata ( nm=$nmr; Flags=$flg; output=$nmr; )
[- Read and store the number of NMR restraints -]
@CNS_NMRMODULE:restraintnumber ( num=$num; )
[- Set mass values -]
do (fbeta=10) (all)
do (mass=100) (all)
evaluate ($nmr.trial.count = 0) [- Initialize current structure number -]
evaluate ($nmr.counter = 0) [- Initialize number accepted -]
evaluate ($nmr.prev.counter = -1)
@CNS_NMRMODULE:ititave ( ave=$ave;
ave2=$ave2;
ener1=$ener1;
ener2=$ener2;
Flag=$flg;
nmrprot=$nmr.prot; )
[- Zero the force constant of disulfide bonds. -]
parameters ( name SG ) ( name SG ) 0. TOKEN
end
[- Define a distance restraints for each disulfide bond, i.e.,
treat it as if it were an NDE. -]
for $$_m_id.2 in id ( name SG and
for $$_m_id.2 in id ( name SG and
bondedto ( id $$_m_id.1 ) ) loop STR2
if ($$_m_id.1 > $$_m_id.2) then
pick bond ( id $$_m_id.1 ) ( id $$_m_id.2 ) equil
evaluate ($$_bond$result)
noassignment ( id $$_m_id.1 ) ( id $$_m_id.2 ) $$_bond 0.1 0.1
end if
end loop STR2
end loop STRM
[- Count the number of residues and determine molecule type -]
identify (store) (tag)
evaluate ($nmr.res.num = $SELECT
identify (store) ( tag and ( resn THY or resn QUA or
resn ADE or resn URI ))

```

```

evaluate ($nmr.nucl.num = $SELECT)
[- Improve geometry for torsion angle molecular dynamics -]
evaluate ($flag.tdd=false)
if ($&md.type.tdd="torston") then
if ($nmr.nucl.num > 0) then
tag $nmr.nucl.num and angl impr dthid vdx end
minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
else
flag exclude * include bond angl impr vdx end
minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
end if
evaluate ($flag.tdd=true)
if ($&md.type.cool="torston") then
end if
evaluate ($flag.tdd=true)
if ($nmr.dont.avis = "ham") then
do (hamontc=20.0) (resid 500 and name O)
do (hamontc=0.0) (resid 500 and name Z)
do (hamontc=0.0) (resid 500 and name X)
do (hamontc=0.0) (resid 500 and name Y)
do (hamontc=0.0) (not (resid 500))
else restraints harmonic exponent=1 and
restraints harmonic exponent=2
do (hamontc=20.0) (resid 500 and name O)
do (hamontc=0.0) (resid 500 and name Z)
do (hamontc=0.0) (resid 500 and name X)
do (hamontc=0.0) (not (resid 500))
end if
restraints harmonic exponent=2 end
do (refx=x) ( all )
do (refy=y) ( all )
do (refz=z) ( all )
set seed=and.seed end
[- Begin protocol to generate structures -- loop until done -]
while ($gdb.end.count > $nmr.counter) loop main
[- Set parameter values -]
parameters
  repel=0.80
  repz=2 irexp=2 rcon=1.
  nbond=3
  wth=0.01
  ctomb=0.99 ctofnb=3.
  tolerance=1.5
end
end
evaluate ($nmr.trial.count = $nmr.trial.count + 1)
if ($&md.type.initial = "copy") then
if ($nmr.trial.count < $gdb.end.count) then
evaluate ($nmr.counter = $nmr.trial.count)
evaluate ($nmr.counter.int=0)
else

```



```

parameter
brands ( name $G ) ( name $G ) 1000. TOKEN
end

evaluate ($finalL = 0)
evaluate ($ncycle = int($end_cool_step/$finL_t)/$end_cool_tmptstp)
evaluate ($nstep = int($end_cool_step/$ncycle))
evaluate ($ini_vdw = $end_hot_vdw)
evaluate ($fin_vdw = $end_cool_vdw)
evaluate ($vdw_step = ($fin_vdw-$ini_vdw)/$ncycle)

if ($end_type_cool = "cartesian") then
  evaluate ($vdw_step = ($end_cool_vdw/$end_hot_vdw)^(1/$ncycle))
  evaluate ($ini_rad = 0.9)
  evaluate ($fin_rad = 0.8)
  evaluate ($rad_step = ($ini_rad-$fin_rad)/$ncycle)
  evaluate ($radius = $ini_rad)
  do (Vx=maxwell($end_cool_temp)) ( all )
  do (Vy=maxwell($end_cool_temp)) ( all )
  do (Vz=maxwell($end_cool_temp)) ( all )
end if

{-- set up nmr restraint scaling --}
evaluate ($kdani.inter.Flag=false)
evaluate ($ksani.inter.Flag=false)
evaluate ($kdani.cart.Flag=false)
evaluate ($ksani.cart.Flag=false)
if ($end_cart.Flag=true) then
  evaluate ($kdani.inter.Flag=true)
  evaluate ($ksani.inter.Flag=true)
@ONS_MODULE:scalecoolsetup ( kdani=$kdani;
ksani=$ksani;
nmr=$nmr;
scale=$end_cool_noe;
input_cath.scale=$end_cool_cath;
input_ncycle=$ncycle; )
else
@ONS_MODULE:scalecoolsetup ( kdani=$kdani;
ksani=$ksani;
nmr=$nmr;
input_noe.scale=$end_cool_noe;
input_cath.scale=$end_cool_cath;
input_ncycle=$ncycle; )
end if

evaluate ($both = $end_cool_temp)
evaluate ($k_vdw = $ini_vdw)
evaluate ($L_cool = 0)
while ($L_cool <= $ncycle) loop cool
  evaluate ($L_cool = $L_cool + 1)
  igroup
    interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
    interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw $k_vdw end
  endgroup
endwhile
end

```

```

end
if ($end_type_cool = "torsion") then
  dynamics torsion
  cmmove=true
  vscaling = true
  tcoup = false
  timestep = $end_cool_ss
  nstep = $nstep
  nprint = $nstep
  temperature = $both
end
else
  dynamics cartesian
  cmmove=true
  vscaling = true
  tcoup = false
  timestep = $end_cool_ss
  nstep = $nstep
  nprint = $nstep
  temperature = $both
end if

if ($end_type_cool = "cartesian") then
  evaluate ($radius_max($fin_rad,$radius-$rad_step))
  parameter ($k_vdwmin($fin_vdw,$k_vdw*$vdw_step))
  else
  evaluate ($k_vdw = $k_vdw + $vdw_step)
  end if
evaluate ($both = $both - $end_cool_tmptstp)
@ONS_MODULE:scalecool ( kdani=$kdani;
ksani=$ksani;
nmr=$nmr; )

end loop cool

{-- A second slow-cooling with cartesian dynamics --}
evaluate ($flag_cart=false)
if ($end_cart.Flag=true) then
  if ($end_type_cool = "torsion") then
    evaluate ($flag_cart=true)
  dynamics torsion
  topology
  reset
  end
  evaluate ($kart_nucl.Flag=false)
  if ($nmr_nucl.num > 0) then
    evaluate ($kart_nucl.Flag=true)
  parameter
  ribonds
    nsteps=0
    nribonds=5
    width=0.01
    tolerance=0.5
    cutnb=11.5 ctoomb=9.5 ctofnb=10.5
  end
end

```

```

end
end
Flags include elec end
end if
evaluate $nsteps=int(&nd.cart.temp/ffin_t)/&nd.cart.timestep)
evaluate $nsteps=int(&nd.cart.step/$ncycle)
evaluate $vdw_step=&nd.cart.vdw.fini/&nd.cart.vdw.init*(1/$ncycle)
evaluate $(in_rad=0.9)
evaluate $(fin_rad=0.8)
evaluate $(rad_step=$(in_rad-ffin_rad)/$ncycle)
evaluate $(radius=$in_rad)

@CNS_INRMODULE:scalecoolsetup ( kdanti-$kdanti;
rnr-$rnr;
input.no.scale=&nd.cart.no;
input.radius=&nd.cart.cdih;
input.ncycle=$ncycle; )

do (v= Maxwell(&nd.cart.temp) ) ( all )
do (v= Maxwell(&nd.cart.temp) ) ( all )
do (v= Maxwell(&nd.cart.temp) ) ( all )
evaluate $(both=&nd.cart.temp)
evaluate $(k_val=&nd.cart.vdw.init)
evaluate $(l_cool = 0)
while $(l_cool <= $ncycle) loop cart
evaluate $(l_cool = $l_cool + 1)
igroup
interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw $k_valdw
end
end

dynamics cartesion
scaling = true
tcoup = false
timestep = &nd.cart.ss
nstep = $nstep
nprint = $nstep
temperature = $both

if ($cart_nucl_flag=false) then
evaluate ($radius_max=$(fin_rad.$radius-$rad_step))
parameter rbonid repel=$radius end end
end if
evaluate $(k_val=&nd.cart.vdw.fini.$k_valdw*$vdw_step)

@CNS_INRMODULE:scalecool ( kdanti-$kdanti;
rnr=$rnr;
input.no.scale=&nd.cart.no;
input.radius=&nd.cart.cdih;
input.ncycle=$ncycle; )

end loop cart
end if
end if

```

```

{- reset torsion angle topology -}
if ($flag_bad=true) then
if ($flag_cart=false) then
dynamics torsion
topology
reset
end
end if
end if
end if

{- Final minimization -}
{- turn on proton chemical shifts -}
Flags include prot end
noe
scale * &nd.pov.noe
end
restraints dihedral
scale = &nd.pov.cdih
end
igroup interaction ( all ) ( all ) weights * 1 end end
evaluate $(count=0)
evaluate $(rnr.min.num=0.)
while (&nd.pov.cycl > $count) loop pmini
evaluate $(count=count + 1)
minimize powell nstep=&nd.pov.step drop=10.0 nprint=25 end
evaluate $(rnr.min.num=&rnr.min.num + $nini_cycles)
end loop pmini

{- translate the geometric center of the structure to the origin -}
if ($sum.danti > 0.) then
elseif ($sum.santi > 0.) then
show ave ( x ) ( all )
evaluate $(geom_x=$result)
show ave ( y ) ( all )
evaluate $(geom_y=$result)
show ave ( z ) ( all )
evaluate $(geom_z=$result)
coord translate vector=( $geom_x $geom_y $geom_z ) selection=( all ) end
end if

@CNS_INRMODULE:printaccept ( ave=$ave;
ave2=$ave2;
cv=$cv;
ener1=$ener1;
ener2=$ener2;
flag=$flag;
input.no.scale=&nd.cart.no;
input.radius=&nd.cart.cdih;
input.ncycle=$ncycle;
num=$num;
output=$nrm;
pdb=$pdb; )

```

```
end loop main
@CNS_MODULE:cal.cave ( ave=$ave;
                       ave2=$ave2;
                       cvs=$v;
                       end=$end;
                       file2=$file2;
                       flag=$flg;
                       mid=$mid;
                       num=$num;
                       output=$num;
                       param($, )
)

stop
```

```

{- Guidelines for using this file:
- all strings must be quoted by double-quotes
- logical variables (true/false) are not quoted
- do not remove any evaluate statements from the file -}

{- begin block parameter definition -} defineC

{===== molecular structure =====}

{* parameter files(*)}
{====> par.1="dna-rna-dilation-param";}
{====> par.2="";}
{====> par.3="";}
{====> par.4="";}
{====> par.5="";}

{* structure files(*)}
{====> struct.1="input.mf";}
{====> struct.2="";}
{====> struct.3="";}
{====> struct.4="";}
{====> struct.5="";}

! dna.out10 IE.dna6 aus EndrechnungTeil1

{* input coordinate files(*)}
{====> pbb.in.file.1="input.pdb";}
{====> pbb.in.file.2="";}
{====> pbb.in.file.3="";}

{===== atom selection =====}

{* input "backbone" selection criteria for average structure generation *}
{* for protein (name n or name ca or name C)}
{* for nucleic acid (name O5' or name C5' or name C4' or name C3'
or name O3' or name P')}
{====> pbb.atom.select=(name O5' or name C5' or name C4' or name C3'
or name O3' or name P);}

{===== refinement parameters =====}

{* type of molecular dynamics for hot phase *}
{+choice: "torsion", "cartesian" +}
{====> md.type.hot="torsion";}

{* type of molecular dynamics for cool phase *}
{+choice: "torsion", "cartesian" +}
{====> md.type.cool="torsion";}

{* refine using different initial velocities or coordinates
(center base name in input coordinate files field) *}
{+choice: "center", "corner", "veloc";}
{====> md.type.initial="veloc";}

{* seed for random number generator *}
{====> rd.seed42364;}

{* select whether the number of structures will be either trial or
accepted structures and whether to print only the trial, accepted,
both sets of structures. *}
{====> list: The printing format is as follows:}

```

```

{- file: anneal.inp +}
{- directory: mrc.calc +}
{- description: dynamical annealing with NOEs, coupling constants,
chemical shift restraints starting from extended
strands or pre-folded structures. -}
{- authors: Gregory Warren, Michael Nilges, John Kuszewski,
Michael Brünger +}
{- copyright: Yale University +}

{- reference: Clore GM, Gronenborn AM, Tjandra N, Direct structure refinement
against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity
of unknown magnitude., J. Magn. Reson., 131, In press, (1998) +}
{- reference: Clore GM, Gronenborn AM, Bax A, A robust method for determining
the conformation of flexible domains in the presence of
oriented macromolecules in the absence of structural
information., J. Magn. Reson., In press (1998) +}
{- reference: Garrett DS, Kuszewski J, Hancock TJ, Lodi PJ, Valster GM,
Gronenborn AM, Clore GM, The impact of direct refinement against
three-bond Hk-C alpha H coupling constants on protein structure
determination by NMR., J. Magn. Reson. Ser. B, 104(1),
99-103, (1994) May +}
{- reference: Kuszewski J, Qin J, Gronenborn AM, Clore GM, The impact of direct
refinement against 13C alpha and 13C beta chemical shifts on
protein structure determination by NMR., J. Magn. Reson. Ser. B,
106(1), 92-6, (1995) Jan +}
{- reference: Kuszewski J, Gronenborn AM, Clore GM, The impact of direct
refinement against 13C chemical shifts
determination by NMR., J. Magn. Reson. Ser. B, 107(3), 293-7,
(1995) Jun +}
{- reference: Kuszewski J, Gronenborn AM, Clore GM, A potential involving
multiple proton chemical-shift restraints for
nonstereospectrally assigned methyl and methylene protons.
Application to the structure determination of a protein
fragment., J. Magn. Reson. Ser. B, 107(3), 283-7,
(1995) Jun +}
{- reference: Nilges M, Gronenborn AM, Brünger AT, Clore GM, Determination
of three-dimensional structures of proteins by simulated
annealing with interproton distance restraints: application
to crambin, potato carboxypeptidase inhibitor and barley
serine proteinase inhibitor 2., Protein Engineering 2,
1-38, (1988) +}
{- reference: Nilges M, Clore GM, Gronenborn AM, Determination of
three-dimensional structures of proteins from interproton
distance data by dynamical simulated annealing from a random
array of atoms., FEBS LETT. 239, 129-136. (1988) +}
{- reference: Rice LM, Brünger AT, Torsion Angle Dynamics: Reduced Variable
Conformational Sampling Enhances Crystallographic Structure
Determination., Nature Struct. Biol., 7, 129-136, (1999)
+}
{- reference: Stein EG, Rice LM, Brünger AT, Torsion angle molecular
dynamics: a new efficient tool for NMR structure calculation.,
J. Mag. Res. Ser. B 124, 154-164 (1997) +}
{- reference: Tjandra N, Garrett DS, Gronenborn AM, Bax A, Clore GM, Defining
long range order in NMR structure determination from the
dependence of heteronuclear relaxation times on rotational
correlation anisotropy., Nature Struct. Biol., 4(6), 449-53,
(1997) June +}
{- reference: Tjandra N, Omichinski JG, Gronenborn AM, Clore GM, Bax A, Use of
dipolar 1H-15N and 1H-13C couplings in the structure
determination of magnetically oriented macromolecules in
solution., Nature Struct. Biol., 4(9), 732-8, (1997) Sept +}

! Data taken from: Qin J, Clore GM, Kennedy WP, Kuszewski J, Gronenborn AM
! The solution structure of human thionexin complexed with
! its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal...
! Structure, 4(5), 613-620, 1996 May 15.

```



```

set message=off echo=off end
end if
parameter
  nrbonds
  repel=0.80
  repz=2 irexp=2 rcon=1
  nrbonds=3
  wmi=0.01
  cutb=6.0 ctomb=2.99 ctofnb=3
  tolerance=1.5
end
end
{- Read experimental data -}
@CNS_MMRMODULE:readdata ( rmi=$mmr; Flag=&Flag; output=$mmr; )
{- Read and store the number of NMR restraints -}
@CNS_MMRMODULE:restraintnumber ( num=$num; )
{- Set mass values -}
do (beta=10) (all)
do (mass=100) (all)
evaluate ($mmr.trial.count = 0) {- Initialize current structure number -}
evaluate ($mmr.accept.count = 0) {- Initialize number accepted -}
evaluate ($mmr.counter = 0)
evaluate ($mmr.prev.counter = -1)
@CNS_MMRMODULE:initialize ( cov=$cov;
  cov2=$cov2;
  ener1=$ener1;
  ener2=$ener2;
  Flag=&Flag;
  rmi=prot-$mmr.prot; )
{- Zero the force constant of disulfide bonds. -}
parameter
  bonds ( name $G ) ( name $G ) 0. TOKEN
end
{- define a distance restraints for each disulfide bond, i.e.,
  treat it as if it were an NOE -}
for $ss_rn_id.1 in id ( name $G ) loop STRM
  for $ss_rn_id.2 in id ( name $G ) loop STRM
    bondedto ( id $ss_rn_id.1 ) ) loop STR2
      if ($ss_rn_id.1 > $ss_rn_id.2) then
        pickr bond ( id $ss_rn_id.1 ) ( id $ss_rn_id.2 ) equil
        noe evaluate ($ss_bond=$result)
        noe assign ( id $ss_rn_id.1 ) ( id $ss_rn_id.2 ) $ss_bond 0.1 0.1
      end if
    end loop STR2
  end loop STRM
end
{- Count the number of residues and determine molecule type -}
identify (store) (tag)
evaluate ($mmr.rsn.num = $SELECT)

```

```

identify (store) ( tag and ( resn THY or resn CYT or resn GUA or
  resn ADE or resn URI ) )
evaluate ($mmr.nucl.num = $SELECT)
{- Improve geometry for torsion angle molecular dynamics -}
evaluate ($Flag.tdd=raise)
if ($mmr.type="tdd") then
  if ($mmr.nucl.num > 0) then
    flag exclude * include bond angl impr dined vdw end
    minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
  else
    flag exclude * include bond angl impr vdw end
    end minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
  end if
  evaluate ($Flag.tdd=true)
end if
if ( &ind.type.cool="torston") then
  evaluate ($Flag.tdd=true)
end if
if ($mmr.dmi.axis = "ham") then
  do (hamontc=20.0) (resid 500 and name O0)
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name Z )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name X )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name Y )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name I )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name O )
  restraints harmonic exponent=2 end
elseif ($mmr.smi.axis = "ham") then
  do (hamontc=20.0) (resid 500 and name O0)
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name Z )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name X )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name Y )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name I )
  do (hamontc=0.0) (resid 500 and name O )
  restraints harmonic exponent=2 end
end if
do (refx=x) ( all )
do (refy=y) ( all )
do (refz=z) ( all )
set seed=&ind.seed end
{- Begin protocol to generate structures -- loop until done -}
while ($job.end.count > $mmr.counter) loop matn
  parameter
    nrbonds
    repel=0.80
    repz=2 irexp=2 rcon=1.
    nrbonds=3
    wmi=0.01
    cutb=6.0 ctomb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=1.5
  end
  end
  evaluate ($mmr.trial.count = $mmr.trial.count + 1)
  if ($ind.type.initial = "coord") then
    if ($mmr.trial.count < $job.end.count) then
      evaluate ($mmr.counter = $mmr.trial.count)
    end
  end
end

```

```

end if
{- High temperature dynamics -}
if ( &md.type.hot = "torsion" ) then
  igroup
  interaction (Chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
  interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw &md.hot.vdw
end
end

dyna torsion
  ampertodic=500
  vscaling = false
  tcoupling = true
  timestep=&md.hot.ss
  nstep = &md.hot.step
  rprint = 50
  temperature = &md.hot.temp
end
else
  evaluate (&md.hot.nstep1=int(&md.hot.step* 2. / 3. ))
  evaluate (&md.hot.nstep2=int(&md.hot.step* 1. / 3. ))
  noe asymptote * 0.1 end
  parameter nbonds repeti.. end end
  interaction (Chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
  interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 angl 0.4 tmpr 0.1
  vdw &md.hot.vdw end
end

dynamics cartesian
  ampertodic=500
  vscaling = true
  tcoupling=false
  timestep=&md.hot.ss
  nstep=&md.hot.nstep1
  rprint=50
  temperature=&md.hot.temp
end

noe asymptote * 1.0 end
igroup
interaction (Chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw &md.hot.vdw end
end

dynamics cartesian
  ampertodic=500
  vscaling = true
  tcoupling=false
  timestep=&md.hot.ss
  nstep=&md.hot.nstep2
  rprint=50
  temperature=&md.hot.temp
end
end if
{- The first slow-cooling with torsion angle dynamics -}
Flags include plan end

```

```

evaluate ($coord_count_init=0.)
else
  evaluate ($coord_count_init=$coord_count_init+1)
  evaluate ($coord_count = $coord_count_init)
  if ($coord_count_init > &pbp.end.count) then
    evaluate ($coord_count = J)
  end if
end if
set renmarks=reset end
evaluate ($in_file = &pbp.in.name + "." + encode($coord_count) + ".pdb")
coord @$$in_file
else
  do ($=refz) ( all )
  do ($=refz) ( all )
  do ($=refz) ( all )
end if
if ($nmr.dani.axis = "fixed") then
  fix select=(resname ANI)
end
elseif ($nmr.sami.axis = "fixed") then
  fix
  select=(resname ANI)
end
end if
do ( vx = maxwell(0.5) ) ( all )
do ( vy = maxwell(0.5) ) ( all )
do ( vz = maxwell(0.5) ) ( all )
Flags exclude *
include bond angle dtho tmpr vdw
noe cdth coup onb carb ncs dani
sami hnm end
{- scaling of nmr restraint data during hot dynamics -}
@CNS_MODULE:scalehot ( md=&md;
  input.noe.scale=&md.hot.noe;
  input.cdth.scale=&md.hot.cdth; )
{- Zero the force constant of disulfide bonds. -}
parameter
  bonds ( name SG ) ( name SG ) 0. TOKEN
end
if ($flag.tad=true) then
  {- initialize torsion dynamics topology for this iteration -}
  dyna torsion
  topology
  maxlength=&md.torsion.maxlength
  maxtree=&md.torsion.maxtree
  maxbond=&md.torsion.maxbond
  {- All dihedrals w/ (force constant > 23) will be locked -}
  kdihedr > 23
  kdihedr 23
  @CNS_TOPPAR:torstonmdms
end
end

```

```

interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0 else 0 end
interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw $k_vdw end
end

if (&md.type.cool = "torston") then
dynamics torston
scaling = true
vcoupling = true
tcoolp = false
timestep = &md.cool.ss
nstep = $nstep
nprint = $nstep
temperature = $bath
else
dynamics cartestian
cmmove=true
vscaling = true
tcoolp = false
timestep = &md.cool.ss
nstep = $nstep
nprint = $nstep
temperature = $bath
end if

if (&md.type.cool = "cartestian") then
evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius-$rad_step))
parameter nbonds repele=$radius end end
evaluate ($k_vdw=min($fin_vdw,$k_vdw*$vdw_step))
else
evaluate ($k_vdw=$k_vdw + $vdw_step)
end if
evaluate ($bath = $bath - &md.cool.tmpstp)
@ONS_MRMODULE:scalecool ( k_dani=$k_dani;
ksant=$ksant;
nm=$nm; )
end loop cool

{- A second slow-cooling with cartestian dynamics -}
evaluate ($flag_cart=false)
if (&md.cart_flag=true) then
if (&md.type.cool = "torston") then
evaluate ($flag_cart=true)
dynamics torston
topology
reset
end
end if
evaluate ($cart_nucl_flag=false)
if ($nm.nucl.num > 0) then
evaluate ($cart_nucl_flag=true)
parameter
nbonds
repele=0
nbxmod=5
writn=0.01
end if

```

```

{- increase the disulfide bond force constants to their full strength -}
parameter
bonds ( name $c ) ( name $c ) 1000. TOKEN
end

evaluate ($final_t = 0)
evaluate ($nstep = int((&md.cool.temp-$final_t)/&md.cool.tmpstp))
evaluate ($nstep = int(&md.cool_step/$ncycle))

evaluate ($fin_vdw = &md.hot.vdw)
evaluate ($fin_vdw = &md.cool.vdw)
evaluate ($vdw_step = ($fin_vdw-$fin_vdw)/$ncycle)

if (&md.type.cool = "cartestian") then
evaluate ($vdw_step = (&md.cool.vdw/&md.hot.vdw)/(1/$ncycle))
evaluate ($fin_rad = 0.9)
evaluate ($fin_rad = &md.hot.rad)
evaluate ($rad_step = ($fin_rad-$fin_rad)/$ncycle)
evaluate ($radius= $fin_rad)

do (v=maxwei1(&md.cool.temp)) ( all )
do (v=maxwei1(&md.cool.temp)) ( all )
do (v=maxwei1(&md.cool.temp)) ( all )
end if

{- set up nmr restraint scaling -}
evaluate ($k_dani.inter_flag=false)
evaluate ($k_dani.cart_flag=false)
evaluate ($ksant.cart_flag=false)
if (&md.cart_flag=true) then
evaluate ($k_dani.inter_flag=true)
evaluate ($ksant.inter_flag=true)
@ONS_MRMODULE:scalecoolsetup ( k_dani=$k_dani;
ksant=$ksant;
nm=$nm;
input_noe.scale=&md.cool.noe;
input_cdih.scale=&md.cool.cdih;
input_nocycle=$ncycle; )
end if

evaluate ($k_dani.cart_flag=true)
evaluate ($ksant.cart_flag=true)
@ONS_MRMODULE:scalecoolsetup ( k_dani=$k_dani;
ksant=$ksant;
nm=$nm;
input_noe.scale=&md.cool.noe;
input_cdih.scale=&md.cool.cdih;
input_nocycle=$ncycle; )
end if

evaluate ($bath = &md.cool.temp)
evaluate ($k_vdw = $fin_vdw)
evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool <= $ncycle) loop cool
evaluate ($i_cool = $i_cool + 1)
ignoup

```

gamed12.inp
 Saved: Mittwoch, 13. Mai 2009 17:16:29 Uhr

gamed12.inp
 Saved: Mittwoch, 13. Mai 2009 17:16:29 Uhr

Page 13 of 15

Page 14 of 15

```

tolerance=0.5
cutb=11.5 ctomb=9.5 ctofrnb=10.5
end
rdie vswitch switch
end
Flags include elec end
end if
evaluate ($ncycle=int(($ind.cart.temp-$final_t)/$nd.cart.tmpstp))
evaluate ($nstep=int($nd.cart.step/$ncycle))
evaluate ($vdw_step=$nd.cart.vdw.finl/$nd.cart.vdw.intb*(1/$ncycle))
evaluate ($rnl_rad=0)
evaluate ($f_rad=0)
evaluate ($f_rad_step=$f_rad/$ncycle)
evaluate ($radius=$rnl_rad)
@CNS_INRMODULE:scalcoolsetup ( kdati-$kdati;
  ksant-$ksant;
  input.noe;
  input.noe.scale=$nd.cart.noe;
  input.cdih.scale=$nd.cart.cdih;
  input.ncycle=$ncycle; )
do (x=maxwell($nd.cart.temp)) ( all )
do (y=maxwell($nd.cart.temp)) ( all )
do (z=maxwell($nd.cart.temp)) ( all )
evaluate ($both=$nd.cart.temp)
evaluate ($k_vdw=$nd.cart.vdw.int)
evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool = $i_cool) loop cart
  evaluate ($i_cool = $i_cool + 1)
end
igroup
  interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
  interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw $k_vdw
end
dynamics cartesion
  vsclng = true
  tcoup = false
  timestep = $nd.cart.ss
  nprint = $nstep
  nprint = $nstep
  temperature = $both
end
if ($cart.nucl_flag=false) then
  evaluate ($radius_max=$f_rad_rad,$radius=$rad_step))
  ncenter -radius repel=$radius end end
end if
evaluate ($k_vdw_min($nd.cart.vdw.finl,$k_vdw*$vdw_step))
evaluate ($both=$both-$nd.cart.tmpstp)
@CNS_INRMODULE:scalcool ( kdati-$kdati;
  ksant-$ksant;
  input.noe;
  input.cdih; )
end loop cart

```

```

end if
end if
{- reset torsion angle topology -}
if ($flag_tor=true) then
  dynamics torsion
  topology
  reset
end
end if
end if
{- Final minimization -}
{- turn on proton chemical shifts -}
Flags include prot end
noe
scale * $nd.pow.noe
end
restraints dihedral
  cste = $nd.pow.cdih
end
igroup interaction ( all ) ( all ) weights * 1 end end
evaluate ($count=0)
while ($num.cart > $count) loop pmini
  evaluate ($num=$count + 1)
  minimize pmin1 nstep=$nd.pow.step drop=10.0 nprint=$25 end
  evaluate ($min_min_num=$minr.min_num + $mini_cycles)
end loop pmini
{- translate the geometric center of the structure to the origin -}
if ($num.dani > 0. ) then
  elseif ($num.sant > 0. ) then
  else
    show ave ( x ) ( all )
    evaluate ($geom_x=$result)
    show ave ( y ) ( all )
    evaluate ($geom_y=$result)
    show ave ( z ) ( all )
    evaluate ($geom_z=$result)
    copy translate vector=( $geom_x $geom_y $geom_z ) selection=( all ) end
  end if
@CNS_INRMODULE:printaccept ( ave=$ave;
  ave2=$ave2;
  cv=$cv;
  ener1=$ener1;
  ener2=$ener2;
  flag=$flag;
  md=$md;
  min=$minr;
  num=$num;

```

```
output=$nm;  
pdb=&pdb; )
```

```
end loop main
```

```
@CNS_MKMODULE: cat cave ( ave=$ave;  
ave=$ave;  
ene1=$ene1;  
ene2=$ene2;  
flag=&flag;  
nd=&nd;  
nm=$nm;  
outpu=$nm;  
pdb=&pdb; )
```

```
stop
```



```

{* use cartesian cooling stage? *}
{+ choice: true false +}
{==>} md.cart.flap=false;
{==>} md.cart.steps=2000;
{* number of steps *}
{==>} md.cart.steps=10000;
{* scale factor for initial van der Waals (repel) energy term *}
{==>} md.cart.vdw.inl=4.0;
{* scale factor for final van der Waals (repel) energy term *}
{==>} md.cart.vdw.finl=4.0;
{* scale factor for NOE energy term *}
{==>} md.cart.noe=200;
{* scale factor for dihedral angle energy term *}
{==>} md.cart.cdih=400;
{* molecular dynamics timestep *}
{==>} md.cart.ss=0.0035;
{==>} md.cart.steps=25;
{==>} md.cart.tmsst=25;
{=====} parameters for final minimization stage {=====}
{* scale factor for NOE energy term *}
{==>} md.pow.cdih=500;
{* scale factor for dihedral angle energy term *}
{==>} md.pow.steps=800;
{* number of minimization steps *}
{==>} md.pow.cycl=10;
{=====} noe data {=====}
[important
if do not have a particular data set then
set the file name to null ("")
{* NOE distance restraints files. *}
{* restraint set 1 file *}
{==>} mr.noe.file.1="1.0008.tbl";
{* restraint set 2 file *}
{==>} mr.noe.file.2="";
{* restraint set 3 file *}
{==>} mr.noe.file.3="";
{* restraint set 4 file *}
{==>} mr.noe.file.4="";
{* restraint set 5 file *}
{==>} mr.noe.file.5="";
{* NOE overriding masks *}
{* choice: "sum" "cent" "R6" "R3"
"Symm" +}
{==>} mr.noe.ovm.made.1="sum";
{* restraint set 2 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R6" "R3"
"Symm" +}
{==>} mr.noe.ovm.made.2="sum";
{* restraint set 3 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R6" "R3"
"Symm" +}
{==>} mr.noe.ovm.made.3="R6";
{* restraint set 4 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R6"

```

```

"R3"
"Symm" +}
{==>} mr.noe.ovm.made.4="sum";
{* restraint set 5 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R6" "R3"
"Symm" +}
{==>} mr.noe.ovm.made.5="sum";
{=====} hydrogen bond data {=====}
{* hydrogenbond distance restraints file. *}
{==>} mr.noe.hbond.file="hbond.tbl";
{* distance overriding mode *}
{+ choice: "sum" "cent" "R6" "R3"
"Symm" +}
{==>} mr.noe.ovm.made.hbond="sum";
{=====} other restraint data {=====}
{* dihedral angle restraints file *}
{* dihedral restraint file MUST NOT contain restraints
dihedral or end *}
{==>} mr.cdih.file="";
{* DMARNA
base planarity restraints file *}
{==>} mr.plan.file="planarity-var.tbl";
{* input planarity scale factor this
will be written into $pscale *}
{==>} mr.plan.scale=25;
{* NCS restraints
file *}
{+ example is in inputs/xtal_data/egl_ncs_restrain.dat *}
{==>} mr.ncs.file="";
{* base name for input coordinate files
{==>} pab.in.name="";
{* base name for output coordinate files *}
{==>} pab.out.name="dna.out3.";
{=====}
{ things below this line do not normally need to be changed }
{ except for the torsion angle topology setup if you have }
{ molecules other than protein or nucleic acid }
{=====}
fig.cv.flap=false;
fig.cv.noe=false;
fig.cv.comp=false;
fig.cv.cdih=false;
fig.egdr.flap=false;
mr.tmsst=20;
mr.tmsst=10;
) {end
block parameter definition }
checkversion 1.1
evaluate ($log_level-quiet)
structure
if { $struct.1 # "" } then
  @struct.1
end if

```

```

@NSM1_00116.in.p2, August 2008 17:59:23 Uhr Page 6 of 14
Saved: Mittwoch, 27. August 2008 17:59:23 Uhr
{- Read and store the number of NMR restraints -}
@CNS_MRMODULE:restraintnumber ( num=$num; )
{- Set mass values -}
do ( fbeta=10 ) (all)
evaluate ($nmr-trial-count = 0) {- Initialize current structure number -}
evaluate ($nmr-accept-count = 0) {- Initialize number accepted -}
evaluate ($nmr-counter = 0)
evaluate ($nmr-prev-counter = -1)
@CNS_MRMODULE:in_tov ( ave=$ave;
ave2=$ave2;
cv=$cv;
end=$end;
nmr=$nmr;
flag=$flag;
nmr-prot=$nmr-prot; )
{- Zero the force constant of disulfide bonds. -}
parameter
bonds ( name $G ) ( name $G ) 0. TOKEN
end
{- define a distance restraints for each disulfide bond, i.e.,
treat it as if it were an NOE -}
for $ss_m_id_1 in id ( name $G ) loop STRM
for $ss_m_id_2 in id ( name $G and
bondedto $ss_m_id_1 ) loop STRZ
if ($ss_m_id_1 == $ss_m_id_2 ) then
pick bond ( id $ss_m_id_1 ) ( id $ss_m_id_2 ) equil
evaluate ($ss_bond=$result)
noe
assign ( id $ss_m_id_1 ) ( id $ss_m_id_2 ) $ss_bond 0.1 0.1
end if
end loop STRZ
end loop STRM
{- Count the number of residues and determine molecule type -}
identify (storef) (tag)
evaluate ($nmr-rsn:num = $SELECT)
identify (storef) ( tag and ( rsn
MDE or rsn URL ) )
evaluate ($nmr-nucl:num = $SELECT)
{- Improve geometry for torsion angle molecular dynamics -}
if ( flag.type == "torion" ) then
if ($nmr-nucl:num > 0) then
flag exclude * include bond angl.inpr.dihed.vdw end
minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
else
flag exclude * include bond angl.inpr.vdw end
minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
end if
evaluate ($flag.tad=true)
end if
if ( &end.type.cool="torion" ) then
@NSM1_00116.in.p2, August 2008 17:59:23 Uhr Page 5 of 14
Saved: Mittwoch, 27. August 2008 17:59:23 Uhr
if ( $struct.2 # "" ) then
end if
if ( $struct.3 # "" ) then
end if
if ( $struct.4 # "" ) then
end
if ( $struct.5 # "" ) then
end if
end
if ( &BLANK%db.in.file.1 = false ) then
coor @db.in.file.1
end if
if ( &BLANK%db.in.file.2 = false ) then
end if
if ( &BLANK%db.in.file.3 = false ) then
coor @db.in.file.3
end if
parameter
if ($par.1 # "") then
end
if ($par.2 # "") then
end if
if ($par.3 # "") then
end if
if ($par.4 # "") then
end
if ($par.5 # "") then
end if
end
if ( $log.level = verbose ) then
set message=normal echo-on end
else
set message=off echo=off end
end if
parameter
nband=0
nband=3
whit=0.01
cut=6.0 cto=2.95 ctofb=3.
tolerance=1.5
end
end
{- Read experimental data -}
@CNS_MRMODULE:readdata ( min=$nmr; flag=$flag; output=$nmr; )

```

CPM01_001016_1.inp 27. August 2008 17:59:23 Uhr Page 7 of 14
 Saved: Mittwoch, 27. August 2008 17:59:23 Uhr

```

evaluate ($flag_tod=true)
end if
if ($mmr.dmi.axis = "harm") then
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Z)
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name X)
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Y)
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Z)
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name X)
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Y)
restraints harmonic exponent=2 end
elseif ($mmr.smi.axis = "harm") then
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name Z)
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name X)
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name Y)
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name Z)
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name X)
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name Y)
restraints harmonic exponent=2 end
end if
do (refxx) ( all )
do (refyy) ( all )
do (refzz) ( all )
set seeds=and.seed end
{- Begin protocol to generate structures -- loop until done -}
while ($pdb.end.count > $mmr.counter) loop main
{- Set parameter values -}
parameter
nbonds
  repa=0.80
  rbp2=exp=2 rcon=1.
  nbond=3
  wlin=0.01
  cutnb=6.0 ctomb=2.99 ctofrb=3.
  tolerance=1.5
end
evaluate ($mmr.trial.count = $mmr.trial.count + 1)
if (&md.type.initial = "coord") then
if ($mmr.trial.count < $pdb.end.count) then
evaluate ($coor.count = $mmr.trial.count)
else
evaluate ($coor.count_init=$coor.count_init+1)
evaluate ($coor.count = $coor.count_init)
if ($coor.count_init > $pdb.end.count ) then
end if
evaluate ($coor.count = 1)
end if
set remarks=reset end
evaluate ($in_file = $pdb.in.name + "_" + encode($coor.count) + ".pdb")
coor @=$in_file
else
do (x=refx) ( all )
do (y=refy) ( all )
do (z=refz) ( all )
end if
if ($mmr.dmi.axis = "Fixed" ) then

```

CPM01_001016_1.inp 27. August 2008 17:59:23 Uhr Page 8 of 14
 Saved: Mittwoch, 27. August 2008 17:59:23 Uhr

```

fix
select=(resname ANI)
end
elseif ($mmr.smi.axis = "Fixed" ) then
fix
select=(resname ANI)
end
do ( vx = maxwell(0.5) ) ( all )
do ( vy = maxwell(0.5) ) ( all )
do ( vz = maxwell(0.5) ) ( all )
Flags include *
include bond angle dih1e impr vdw
noe cdh1 coup oneb carb ncs dmi
sant harm end
{- scaling of mmr restraint data during hot dynamics -}
@KNS_MMRODULE:scalehot ( md=&md;
mm=&mmr;
input: res.scale=and.hot.noe;
input: cdh1.scale=&md.hot.cdh1; )
parameter
bonus ( name SG ) ( name SG ) 0. TOKEN
end
if ($flag_tod=true) then
{- initialize torsion dynamics topology for this iteration -}
dyna torsion
topology
maxbond=&md.torsion.maxlength
maxbond=&md.torsion.maxtree
maxbond=&md.torsion.maxbond
{- All dihedrals w/ (force constant > 23) will be locked -}
{- This keeps planar groups planar -}
@KNS_TORPAK:torsionmods
end
end if
{- High temperature dynamics -}
if ( &md.type.hot = "torsion" ) then
igroup
interaction (Chemical H*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
interaction (not chemical H*) (not chemical H*) weights * 1 vdw &md.hot.vdw
end
dyna torsion
ampertodic=900
vscaling = false
vscap = &md.hot.vdw
timesstep = &md.hot.ss
nstep = &md.hot.step

```

Current: **skript1_1.inp**, 27. August 2008 17:59:23 Uhr Page 9 of 14
 Saved: **skriptechn_27**, August 2008 17:59:23 Uhr Page 10 of 14

Current: **skript1_1.inp**, 27. August 2008 17:59:23 Uhr Page 9 of 14
 Saved: **skriptechn_27**, August 2008 17:59:23 Uhr Page 10 of 14

```

    print = 50
    temperature = &md.hot.temp
  end
end
else
  evaluate ($nd.hot.nstep=int(&md.hot.step* 2./ 3. ))
  evaluate ($nd.hot.nstep2=int(&md.hot.step* 1./ 3. ))
  noe asymptote * 0.1 end
  parameter nbonds repe1=1. end end
  interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
  interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 angl 0.4 impr 0.1
  vdw &md.hot.vdw end
end
dynamics cartesian
  emperiod=500
  vscaling = true
  coupling=0.1
  timestep=&md.hot.ss
  nstep=&md.hot.nstep1
  print=50
  temperature=&md.hot.temp
end
noe asymptote * 1.0 end
igroup
  interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
  interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw &md.hot.vdw end
end
dynamics cartesian
  emperiod=500
  coupling=false
  timestep=&md.hot.ss
  nstep=&md.hot.nstep2
  print=50
  temperature=&md.hot.temp
end
end if
{- The first slow-cooling with torsion angle dynamics -}
flags include plan end
{- Increase the disulfide bond force constants to their full strength -}
parameter
  bonds ( name S6 ) ( name S6 ) 10000. TOKEN
end
evaluate ($final_t = 0)
evaluate ($ncycle = int(&md.cool.temp-$final_t)/&md.cool.tmpstep)
evaluate ($nstep = int(&md.cool.step/$ncycle))
evaluate ($ini_vdw = &md.hot.vdw)
evaluate ($fin_vdw = &md.cool.vdw)
evaluate ($vbw_step = ($fin_vdw-$ini_vdw)/$ncycle)
if (&md.type.cool = "cartesian") then
  evaluate ($vbw_step = (&md.cool.vbw/&md.hot.vdw)*(1/$ncycle))

```

```

  evaluate ($ini_rad = 0.9)
  evaluate ($fin_rad = 0.8)
  evaluate ($rad_step = ($ini_rad-$fin_rad)/$ncycle)
  evaluate ($radius= $ini_rad)
  do (vz=mxwv1(&md.cool.temp)) ( all )
  do (vy=mxwv1(&md.cool.temp)) ( all )
  do (vx=mxwv1(&md.cool.temp)) ( all )
end if
{- set up nmr restraint scaling -}
evaluate ($kdmi.inter.flag=false)
evaluate ($ksam.inter.flag=false)
evaluate ($kdmi.cart.flag=false)
evaluate ($ksam.cart.flag=false)
if (&md.type.cool="cartesian") then
  evaluate ($kdmi.inter.flag=true)
  evaluate ($ksam.inter.flag=true)
else
  @CNS_NMRMODULE:scalecoolsetup ( kdami=$kdmi;
  ksam=$ksam;
  impr=$impr;
  input.noe.scale=&md.cool.noe;
  input.cdih.scale=&md.cool.cdih;
  input.ncycle=$ncycle; )
end if
else
  @CNS_NMRMODULE:scalecoolsetup ( kdami=$kdmi;
  ksam=$ksam;
  impr=$impr;
  input.noe.scale=&md.cool.noe;
  input.cdih.scale=&md.cool.cdih;
  input.ncycle=$ncycle; )
end if
evaluate ($both = &md.cool.temp)
evaluate ($k_vbw = $ini_vbw)
evaluate ($l_cool = 0)
while ($l_cool < $l_cool + 1) loop cool
  evaluate ($l_cool = $l_cool + 1)
end
igroup
  interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
  interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw $k_vbw end
end
if (&md.type.cool = "torsion") then
  dynamics cartesian
  vscaling = true
  tcoup = false
  timestep = &md.cool.ss
  print = $nstep
  temperature = $both
end
else
  dynamics cartesian
  emperiod=true
  vscaling = true
end

```

Current: **gentle.inp**, 27. August 2008 17:59:23 Uhr
 Saved: **gentle.inp**, 27. August 2008 17:59:23 Uhr

Current: **gentle.inp**, 27. August 2008 17:59:23 Uhr
 Saved: **gentle.inp**, 27. August 2008 17:59:23 Uhr

```

tcool = false
timestep = &md.cool.ss
nstep = $nstep
input.noe = $nstep
input.cdm = $both
temperature = $both
end if

if (&md.type.cool = "cartesian") then
  evaluate ($radius=($fin_rad*$radius-$rad_step))
  parameter nbonds repel=$radius end end
else
  evaluate ($k_vdw=$k_vdw + $vdw_step)
end if
evaluate ($both = $both - &md.cool.tmpstp)

@ONS_MODULE: scalecool ( kdam1=$kdam1;
                      km1=$km1;
                      mm=$mmr; )

end loop cool

{- A second slow-cooling with cartesian dynamics -}
evaluate ($flag_cart=false)
if (&md.cart.flag=true) then
  if (&md.type.cool = "torsion") then
    evaluate ($flag_cart=true)
  end if
end if

dynamics torsion
  torsion
  reset
end
end

evaluate ($cart_nucl_flag=false)
if ($mmr.nucl.num > 0) then
  evaluate ($cart_nucl_flag=true)
  parameter
    nbonds repel=0
    nbnmod=5
    width=0.01
    tolerance=0.5
    tolerance_cornub=0.5 ctofnb=10.5
    rdtie vswitch switch
end
end
flags include elec end

evaluate ($cycle=int(&md.cart.temp-$fin_b)/&md.cart.tmpstp)
evaluate ($nstep=int(&md.cart.step/$ncycle))
evaluate ($vow_step=&md.cart.vow.*fin/&md.cart.vow.int)/(C/$ncycle)
evaluate ($fin_rad=0.9)
evaluate ($fin_rad=0.8)
evaluate ($rad_step=($int_rad-$fin_rad)/$ncycle)
evaluate ($radius=$int_rad)

@ONS_MODULE: scalecool ( kdam1=$kdam1;

```

```

                      km1=$km1;
                      mm=$mmr; )

input.noe.scale=&md.cart.noe;
input.cdm.scale=&md.cart.cdm;
input.nystep=$nystep;

do (v= Maxwell(&md.cart.temp)) ( all )
evaluate ($both=&md.cart.vow.init)
evaluate ($k_vdw=&md.cart.vow)
while ($!cool <= $cycle) loop cart
  evaluate ($!cool = $!cool + 1)
end while

input
  interaction (chemical h*) (all weights * 1 vdw 0 elec 0 end
end
end

dynamics cartesian
  vscaling = true
  tcoup = false
  timestep = &md.cart.ss
  parfit = $nstep
  temperature = $both
end

if ($cart_nucl_flag=false) then
  evaluate ($radius=($fin_rad*$radius-$rad_step))
  parameter nbonds repel=$radius end end
end if
evaluate ($k_vdw=$k_vdw + $vdw_step)
evaluate ($both=$both - &md.cart.tmpstp)

@ONS_MODULE: scalecool ( kdam1=$kdam1;
                      km1=$km1;
                      mm=$mmr; )

end loop cart
end if

{- reset torsion angle topology -}
if ($flag_cart=true) then
  if ($flag_torsion=true) then
    dynamics torsion
    reset
  end
end if

{- Final minimization -}
{- turn on proton chemical shifts -}

```

stop

```

Flags include prot end
noe scale * &nd.pov.noe
end
restraints d1heiral
state = &nr.pov.cdlh
end
igroup interaction ( all ) ( all ) weights * 1 end end
evaluate ($count=0)
evaluate ($mir.min.num=0)
while (&nd.pov.cycl > $count) loop pmini
  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($mir.min.num=&nd.pov.step.drops*0.0 nprint=25 end
  evaluate ($mir.min.num=$mir.min.num + $mir.min.cycles)
end loop pmini
{- translate the geometric center of the structure to the origin -}
if ($num.dani > 0. ) then
  elseif ($num.sami > 0. ) then
  else
    show ave ( x ) ( all )
    evaluate ($geom.x=$result)
    show ave ( y ) ( all )
    evaluate ($geom.y=$result)
    show ave ( z ) ( all )
    evaluate ($geom.z=$result)
    coor translate vector=( $geom.x $geom.y $geom.z ) selection=( all ) end
  end if
@OVS_MODULE:prntaccept ( ave.$ave;
  ave2.$ave2;
  ave.$cv;
  ener1.$ener1;
  ener2.$ener2;
  fct.$fct;
  nids.$nids;
  nmi.$nmi;
  num.$num;
  output.$nmr;
  pds.$pds; )
end loop main
@OVS_MODULE:calcave ( non.$ave;
  ave2.$ave2;
  ave.$cv;
  ener1.$ener1;
  ener2.$ener2;
  fct.$fct;
  nids.$nids;
  nmi.$nmi;
  num.$num;
  output.$nmr;
  pds.$pds; )

```

```

Planarity restraints for bases
! C1-C24
-----
group
selection= ((resid 1 and name N3) or (resid 1 and name C5) or
            (resid 1 and name N1) or (resid 24 and name C5) or
            (resid 24 and name N1) or (resid 24 and name N3))
weight = $pscale end
! A2-T23
-----
group
selection= ((resid 23 and name N1) or (resid 23 and name N3) or
            (resid 23 and name C5) or (resid 2 and name N1) or
            (resid 2 and name N3) or (resid 2 and name C5))
weight = $pscale end
! T3-A22
-----
group
selection= ((resid 3 and name N1) or (resid 3 and name N3) or
            (resid 3 and name C5) or (resid 22 and name N1) or
            (resid 22 and name N3) or (resid 22 and name C5))
weight = $pscale end
! T4-A21
-----
group
selection= ((resid 4 and name N1) or (resid 4 and name N3) or
            (resid 4 and name C5) or (resid 21 and name N1) or
            (resid 21 and name N3) or (resid 21 and name C5))
weight = $pscale end
! T5-A20
-----
group
selection= ((resid 5 and name N1) or (resid 5 and name N3) or
            (resid 5 and name C5) or (resid 20 and name N1) or
            (resid 20 and name N3) or (resid 20 and name C5))
weight = $pscale end
! C6-G19
-----
group
selection= ((resid 6 and name N3) or (resid 6 and name C5) or
            (resid 6 and name N1) or (resid 19 and name C5) or
            (resid 19 and name N1) or (resid 19 and name N3))
weight = $pscale end
! C7-G18
-----
group
selection= ((resid 7 and name N3) or (resid 7 and name C5) or
            (resid 7 and name N1) or (resid 18 and name C5) or
            (resid 18 and name N1) or (resid 18 and name N3))
weight = $pscale end
! C8-G17
-----
group
selection= ((resid 8 and name N3) or (resid 8 and name C5) or
  
```

```

weight = $pscale end
! G9-C16
-----
group
selection= ((resid 9 and name N1) or (resid 9 and name N3) or
            (resid 9 and name C5) or (resid 16 and name N1) or
            (resid 16 and name N3) or (resid 16 and name C5))
weight = $pscale end
! T10-A15
-----
group
selection= ((resid 10 and name N1) or (resid 10 and name N3) or
            (resid 10 and name C5) or (resid 15 and name N1) or
            (resid 15 and name N3) or (resid 15 and name C5))
weight = $pscale end
  
```


9.14 Relax-Skript und die zugehörige PCS-Tabelle

PCShpEPTEAnhang.txt

Page 1 of 1

Saved: Sonntag, 17. Mai 2009 19:49:09 Uhr

#Pseudokontaktverschiebungen in ppm für die DY-EPTE-24mer-DNA											
HETATM	305	Q7	THY	4	6.095	3.590	8.262	1.00	0.00	H	-0.616
HETATM	310	H6	THY	4	8.474	1.597	6.758	1.00	0.00	H	-0.424
HETATM	338	Q7	THY	5	8.263	1.020	2.854	1.00	0.00	H	-0.342
HETATM	343	H6	THY	5	7.916	-1.279	3.352	1.00	0.00	H	-0.266
ATOM	339	H2'	THY	5	7.305	-3.492	2.259	1.00	0	H	-0.218
ATOM	58	H5	CYT	6	4.809	-0.800	1.133	1.00	0.00	H	-0.322
ATOM	59	H6	CYT	6	4.629	-3.194	1.082	1.00	0.00	H	-0.229
ATOM	89	H5	CYT	7	1.756	-1.051	-1.922	1.00	0.00	H	-0.136
ATOM	90	H6	CYT	7	0.475	-3.024	-2.301	1.00	0.00	H	-0.120
ATOM	82	H1'	CYT	7	-3.277	-3.031	-2.64	1.00	0	H	-0.101
ATOM	117	H2''	CYT	8	-7.308	-3.194	-6.397	1.00	0.00	H	-0.043
ATOM	120	H5	CYT	8	-1.730	-2.905	-7.461	1.00	0.00	H	-0.086
ATOM	121	H6	CYT	8	-3.681	-4.025	-6.664	1.00	0.00	H	-0.073
HETATM	369	H1'	GUA	9	-8.199	1.094	-6.902	1.00	0.00	H	-0.009
HETATM	377	H8	GUA	9	-6.787	-2.196	-8.477	1.00	0.00	H	-0.023
HETATM	405	Q7	THY	10	-9.124	-1.358	-11.485	1.00	0.00	H	-0.003
HETATM	407	H2''	THY	10	-10.816	3.952	-12.583	1.00	0.00	H	-0.006
HETATM	410	H6	THY	10	-9.711	0.899	-11.061	1.00	0.00	H	-0.003
HETATM	501	H1'	ADE	15	0.146	6.610	-13.194	1.00	0.00	H	-0.026
HETATM	505	H2''	ADE	15	0.681	5.925	-10.929	1.00	0.00	H	-0.035
ATOM	504	H2'	ADE	15	1.784	4.65	-11.51	1.00	0	H	-0.037
HETATM	508	H8	ADE	15	1.597	3.294	-14.342	1.00	0.00	H	-0.0354
ATOM	209	H2'	CYT	16	-0,267	8,176	-6,889	1.00	0	H	-0.083
ATOM	213	H5	CYT	16	1.623	4.136	-8.071	1.00	0.00	H	-0.080
ATOM	214	H6	CYT	16	1.206	6.500	-8.063	1.00	0.00	H	-0.068
HETATM	705	H2'	ADE	22	2.362	-8.692	11.635	1.00	0.00	H	-0.2425
HETATM	706	H2''	ADE	22	4.120	-8.790	11.465	1.00	0.00	H	-0.237
ATOM	702	H1'	ADE	22	4.084	-7.326	9.501	1.00	0	H	-0.277
HETATM	709	H8	ADE	22	0.773	-6.852	11.492	1.00	0.00	H	-0.2915
HETATM	738	Q7	THY	23	1.130	-7.015	15.945	1.00	0.00	H	-0.284
HETATM	743	H6	THY	23	3.562	-8.683	14.312	1.00	0.00	H	-0.259
ATOM	740	H2''	THY	23	5.88	-9.973	15.148	1.00	0	H	-0.245
ATOM	734	H1'	THY	23	7.108	-7.895	14.572	1.00	0	H	-0.295

analysis77neu4-a20g24.py

Page 1 of 1

Saved: Samstag, 9. Mai 2009 16:33:50 Uhr

```
# Script for determining populations for lactose conformations using RDCs and PCSs.

from random import uniform

# relax imports.
from data import Relax_data_store; ds = Relax_data_store()
from generic_fns.mol_res_spin import spin_loop
from specific_fns.setup import n_state_model_obj

# Create the data pipe.
pipe.create('dna', 'N-state')

# Load the structures.
NUM_STR = 77
for i in range(NUM_STR):
    structure.read_pdb(file='HPEPTEconf_Hpepte-CS2-out.'+'i'+1, set_mol_name='DNA', set_model_num=i+1, pars

# Load the sequence information.
atom_list = ["H1", "H2", "H2'", "H5", "H6", "H71", "H72", "H73", "H8"]
for atom in atom_list:
    structure.load_spins(spin_id="@"+atom, ave_pos=False)

# Create the pseudo-atoms.
for i in [4, 5, 23, 10]:
    id = ':' + i + '@H7'
    spin.create_pseudo(spin_name='Q7', res_id=':'+i, members=[id+'1', id+'2', id+'3'], averaging='linear'
sequence.display()

# The PCS.
pcs.read(id='pcs1', file='PCShpEPTETneu4-a20g24.txt', mol_name_col=None, res_num_col=4, res_name_col=3, spi

# The temperature.
temperature(id='pcs1', temp=298)

# The frequency.
frq.set(id='pcs1', frq=700 * 1e6)

# Calculate the paramagnetic centre, using a pseudoatom (from the structures in the 'tag' data pipe).
structure.load_spins(spin_id=':34@01', ave_pos=False)
structure.load_spins(spin_id=':36@01', ave_pos=False)
structure.load_spins(spin_id=':39@01', ave_pos=False)
structure.load_spins(spin_id=':41@01', ave_pos=False)
residue.create(100)
spin.create_pseudo(spin_name='Ln', res_id=':100', members=[':34@01', ':36@01', ':39@01', ':41@01'], averagi
sequence.display()

pcs.centre(atom_id=':100@Ln')

# Set up the model.
n_state_model.select_model(model='fixed')

# Minimisation.
minimise('simplex', constraints=True)

# Write out a results file.
results.write('results77neu4-a20g24', dir=None, force=True)

# Show the tensors.
align_tensor.display()
```

9.15 Lebenslauf

Name: Edith Wöltjen
 Geburtsdatum: 07.12.1980
 Geburtsort: Braunschweig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

seit Okt. 2005	Dissertation am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie bei Prof. Griesinger gefördert durch ein Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie zum Thema „Paramagnetisch markierte Oligonukleotide“
Mai 2005	Diplomprüfung mit Auszeichnung (Note 1,0)
Jul. 2004 - Jan. 2005	Externe Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie zum Thema „Synthese eines paramagnetischen Tags zur NMR-spektroskopischen Untersuchung von Oligonukleotiden“ Betreuer: Prof. Griesinger und Prof. Diederichsen
Okt. 2003 - Jan. 2004	Forschungsaufenthalt bei Prof. Malacria an der „Université Pierre et Marie Curie“ in Paris
Okt. 2000 - Mai 2005	Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen unterstützt durch ein Stipendium nach Bayerischem Begabtenförderungsgesetz
Okt. 2002	Vordiplomprüfung (Note 1,1)
Aug. 2000	Praktikum bei der Schwan-STABILO Cosmetics GmbH & Co. KG in Heroldsberg im Bereich Qualitätsentwicklung
Jun. 2000	Allgemeine Hochschulreife am Albert-Schweitzer Gymnasium Erlangen (Note 1,3)
Aug. 1997 - Dez. 1997	Dreimonatiger Schulbesuch in Calgary (Kanada) im Rahmen eines Austauschprogramms des Bayerischen Jugendrings