

# SYNTHESE UND UNTERSUCHUNG VON NUKLEOBASEN-FUNKTIONALISIERTEN PEPTIDEN

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
**Nadine Jede**  
aus Neumünster

Göttingen 2006

D7

Referent: Prof. Dr. U. Diederichsen

Korreferent: Prof. Dr. A. de Meijere

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis Februar 2006 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. U. Diederichsen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. U. Diederichsen, für die interessante Themenstellung, die fortlaufende Unterstützung, begleitet von einer stetigen Diskussionsbereitschaft und die gewährte wissenschaftliche Freiheit.

Ich danke allen Mitarbeitern der Serviceabteilungen, der Massen-Abteilung mit H. Frauendorf und der NMR-Abteilung unter R. Machinek.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises möchte ich für ihre Kollegialität, Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken.

Insbesondere danke ich herzlich meinen Laborkollegen Ružica Ranevski und dem „Nichtschwimmer“ Marian Pitulescu für das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima - Marian, danke für die zahlreichen Tipps & Tricks und ansteckende Heiterkeit.

Brigitte Worbs sowie meinen Praktikanten Germund Glatz und Susanne Hesse danke ich für ihre wertvolle Mitarbeit.

Angelina Weiß gilt mein Dank für das Anfertigen der Massenspektren.

Andrea Küsel danke ich für motivierende Gespräche, Zuversicht und Hilfe beim Modelling.

Für etliches Korrekturlesen möchte ich mich bei Nicola Diezemann, Angelina Weiß, Andrea Küsel, Katja Bensmann und Stephan Heermann ganz besonders bedanken.

Danke an Andrea, Angelina, Nicola und Olli für die netten mittäglichen Stunden.

Ganz dickes Dankeschön an Nicola - für Dein unermüdliches Engagement und Hilfe in jeglicher Lebenslage & für Spaß und Freude in der Zimmermannstrasse & für Deine Freundschaft.

Ali, Philipp, Hansfrieder und Dirk - Euch danke ich für die schöne und lustige Zeit neben der Chemie.

Vielen lieben Dank an Babse - für die letzten 22 Jahre und Deine Einzigartigkeit.

Für immerwährende, liebevolle Unterstützung bedanke ich mich bei meiner Mutter.

Zu guter Letzt Danke Stephan - für Liebe, Verständnis, Geduld & den Eifer mich jeden Tag aufs Neue zu motivieren und zu unterstützen...und natürlich dafür, dass es Dich gibt.

## INHALTSVERZEICHNIS

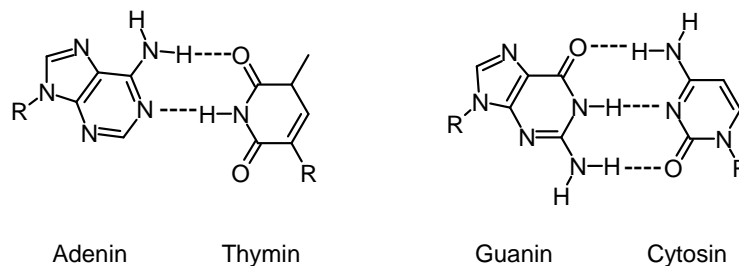
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL</b>	<b>5</b>
	<b>2.1 PEPTIDNUKLEINSÄUREN (PNAs)</b>	<b>5</b>
	<b>2.2 PAARUNG MITTELS KOVALENTER VERBRÜCKUNG</b>	<b>13</b>
	<b>2.3 <math>\alpha</math>-PEPTID-HELICES</b>	<b>18</b>
	2.3.1 ALLGEMEINES ZU $\alpha$ -HELICES	18
	2.3.2 <i>HELICAL WHEEL</i> (HELIXRAD)	22
	2.3.3 ASSOZIATION DER $\alpha$ -HELICES BÜNDEL ( <i>COILED COIL</i> -MOTIV)	23
	2.3.4 HELIX-VORHERSAGE	25
	2.3.5 LEUCIN-ZIPPER-MOTIV	27
	2.3.6 EINBAU VON NUKLEOAMINOSÄUREN IN $\alpha$ -HELICES	28
	<b>2.4 TRYPSIN-INHIBITOR MCoTI-II</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>KOVALENTE VERBRÜCKUNG ZWEIER ALANYL-PNA STRÄNGE</b>	<b>33</b>
	<b>3.1 SYNTHESE DER BOC-ALANYL/HOMOALANYL NUKLEOAMINOSÄUREN</b>	<b>41</b>
	<b>3.2 DER STILBEN-LINKER</b>	<b>44</b>
	<b>3.3 SYNTHESE VON PNA-DOPPELSTRÄNGEN MIT VERBRÜCKENDEM HEGAS-LINKER</b>	<b>46</b>
	<b>3.4 SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>HELIKALE <math>\alpha</math>-PEPTIDE MIT NUKLEOBASEN ALS ERKENNUNGSEINHEIT IN DER SEITENKETTE</b>	<b>52</b>
	<b>4.1 SYNTHESE <math>\alpha</math>-HELIKALER PEPTIDE NACH BOC-FESTPHASEN-STRATEGIE</b>	<b>56</b>
	<b>4.2 SYNTHESE <math>\alpha</math>-HELIKALER PEPTIDE NACH FMOC-FESTPHASEN-STRATEGIE</b>	<b>58</b>
	4.2.1 SYNTHESE DER FMOC-HOMOALANYL-NUKLEOAMINOSÄUREN	59
	<b>4.3 SYNTHESE <math>\alpha</math>-HELIKALER PEPTIDE MITTELS BOC-THIOESTER LIGATION</b>	<b>61</b>
	<b>4.4 ERGEBNISSE DER SPEKTROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>INKORPORATION VON NUKLEOAMINOSÄUREN IN DAS LINEARE MIKROPEPTID-GERÜST MCoTI-29</b>	<b>69</b>
	<b>5.1 SYNTHESE DER FMOC-ALANYL-NUKLEOAMINOSÄUREN UND DEREN EINBAU IN DAS LINEARE MIKROPEPTID</b>	<b>70</b>
	<b>5.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT</b>	<b>71</b>

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY AND OUTLOOK</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>80</b>
	<b>8.1 ALLGEMEINE ARBEITSTECHNIKEN</b>	<b>80</b>
	<b>8.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN (AAV)</b>	<b>84</b>
	<b>8.3 SYNTHETISIERTE VERBINDUNGEN</b>	<b>89</b>
	<b>8.4 SYNTHESE DER NUKLEAMINOSÄUREN</b>	<b>93</b>
	<b>8.5 SYNTHESE DES STILBEN-LINKERS</b>	<b>113</b>
	<b>8.6 SYNTHESE DER GEMISCHTEN PEPTIDNUKLEINSÄUREN</b>	<b>118</b>
	<b>8.7 SYNTHESE DER GEMISCHTEN PEPTIDNUKLEINSÄUREN MIT LINKER</b>	<b>127</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>130</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>132</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>136</b>

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die molekulare Struktur der DNA erkannte 1920 zunächst P. A. Levene, der die grundlegende Zusammensetzung aus heterozyklischen Nucleobasen, Zucker und Phosphorsäure nachwies.<sup>[1,2]</sup> J. Watson und F. Crick entschlüsselten 1953 die räumliche Struktur der DNA und erhielten 1962 dafür den Nobelpreis.<sup>[3,4]</sup>

Die Konformation der DNA, die Doppelhelix, wird ausgebildet, indem Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nucleobasen zweier, antiparallel angeordneter Stränge gebildet werden.<sup>[5]</sup> Da die Speicherung und Weitergabe genetischer Information im Allgemeinen von der sequenziellen Abfolge der Nucleobasen gesteuert wird, ist es wesentlich, deren Erkennung untereinander zu untersuchen.<sup>[6]</sup> Aufgrund der Wasserstoff-Donor- und Akzeptorfolge sowie der Größe und Orientierung der Basenpaare können in der B-DNA nur die Nucleobasen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin miteinander paaren (Abb. 1.1).<sup>[7]</sup> Bereits kleinste Modifikationen können die Eigenschaften der B-DNA stark beeinflussen.<sup>[6,8,9]</sup>

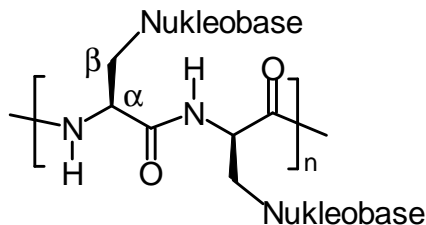


**Abb. 1.1:** Wechselseitige Erkennung der kanonischen Nucleobasen durch Wasserstoffbrücken in der DNA; R = Desoxyribose

Neben der Nucleobasenpaarung ist es ebenso wichtig, Untersuchungen der Rückgratkonstitution und der gesamten Sekundärstruktur der DNA durchzuführen. Das modifizierte Design der DNA ist für das Verständnis und für die Aufklärung biochemischer Wechselwirkungen sowie für die Diagnostik und Pharmakologie von entscheidender Bedeutung und somit eine große Herausforderung.<sup>[10,11]</sup> Daher ist es notwendig, Modellsysteme zu entwerfen, an denen die Grundprinzipien der Prozesse untersucht werden können.

Als DNA-Mimetikum wurden Peptidnucleinsäuren (PNAs), wie die Alanyl-PNA, entworfen.<sup>[12]</sup> Sie besteht aus alternierend konfigurierten Alanyl-Nucleoaminosäure-Monomerbausteinen. Die Nucleobasen sind dabei kovalent über die  $\beta$ -Position mit

der Aminosäure Alanin verknüpft (Abb. 1.2).<sup>[12]</sup> Die Alanyl-PNA unterliegt im Unterschied zur DNA keinen topologischen Zwängen durch die Helikalisierung, da sie in einer linearen  $\beta$ -Faltblattstruktur mit einem Basenabstand von 3.6 Å in der Lage ist, Doppelstränge auszubilden.

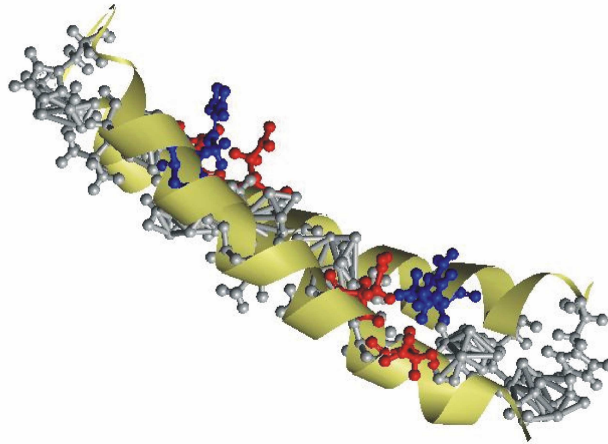


**Abb. 1.2:** Alanyl-PNA, die statt des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA ein Peptidrückgrat aufweist, das an den Seitenketten mit Nucleobasen substituiert ist. Nucleobase = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin

Vorteilhaft an dem Modellsystem der Alanyl-PNA ist, dass die einzelnen stabilisierenden Effekte, wie van-der-Waals und hydrophobe Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen wegen der vorliegenden linearen Doppelstrangstruktur getrennt voneinander betrachtet werden können, was in natürlichen Systemen nahezu unmöglich ist.<sup>[13,14,15]</sup> Ausgehend von Alanyl-PNAs können auch seitenkettenhomologe PNAs untersucht werden. Alanyl-PNAs mit zusätzlicher Methyleinheit in der Seitenkette werden als Homoalanyl-PNAs<sup>[16,17]</sup> bezeichnet, mit zwei zusätzlichen Methyleinheiten als Norvalyl-PNAs.<sup>[14a,18]</sup>

$\alpha$ -Helikale Peptide werden in vielen natürlichen Proteinen in der Strukturform des *coiled coil* gefunden (Abb. 1.3). Das *coiled coil*-Motiv ist eine der häufigsten und wichtigsten Protein-Interaktionsdomänen und wird hinsichtlich des Verständnisses der Sequenz/Struktur-Beziehung in Proteinen untersucht.<sup>[19,20]</sup> Wesentlich hierbei sind Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren und die des  $\alpha$ -helikalen Peptidgerüsts.<sup>[21]</sup> Insbesondere sind eingebaute Erkennungseinheiten essentiell für diverse chemische und biologische Prozesse in lebenden Systemen. Natürliche Proteine verwenden für die komplementäre Erkennung Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe sowie elektrostatische Wechselwirkungen.<sup>[22]</sup>





**Abb. 1.3:** NMR-Struktur des antiparallelen *coiled coils* aus dem Protein ProP (Osmosensor aus *E. coli*); die antiparallele Struktur wird stabilisiert durch die Wechselwirkungen der Aminosäure (blau) des einen Stranges mit den Aminosäuren (rot) des anderen; grau = hydrophobe Reste<sup>[23,24]</sup>

Zwei grundlegenden Zielen sollen in dieser Arbeit nachgegangen werden: zum einen der intramolekularen Paarung zweier Alanyl PNA-Stränge und zum anderen der Entwicklung von Methoden zur Inkorporation von Nukleoaminosäuren in bestimmte peptidische Strukturen. Es sollen Alanyl- und Homoalanyl-Nukleoaminosäuren jeweils Fmoc- und Boc-geschützt synthetisiert und in drei Bereichen eingesetzt werden.

Der erste Bereich befasst sich mit Synthesen von alternierend aufgebauten Peptidnukleinsäuren, die kovalent über einen Linker verbunden werden. Diese kovalente Verbrückung imitiert die Watson-Crick Basenpaarung und kann zusätzlich das planare rigide Doppelstrang-Gerüst der PNA stabilisieren. Für das Ziel, eine rein kovalente Verknüpfung aufzubauen, wird als Linker ein Ethylenglycol-Derivat verwendet. Des Weiteren soll als rigide Einheit ein Stilben-Linker synthetisiert werden. Untersuchungen der Doppelstrangstabilität erfolgen mittels temperaturabhängiger UV-Spektroskopie.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen Homoalanyl-Nukleoaminosäure-Monomere in ein  $\alpha$ -helikales Peptid mit proteinogenen Aminosäuren eingebaut und die Wechselwirkungen hinsichtlich der Nukleobasenpaarung untersucht werden. Zwei der mit Nukleobasen inkorporierten  $\alpha$ -Peptide werden über die Basenpaarung der Homoalanyl-Nukleoaminosäuren verknüpft. Um die Selbstpaarung der  $\alpha$ -Helices zu gewährleisten, sollen die Homoalanyl-Bausteine über *heptade repeats*<sup>[25,26]</sup> so

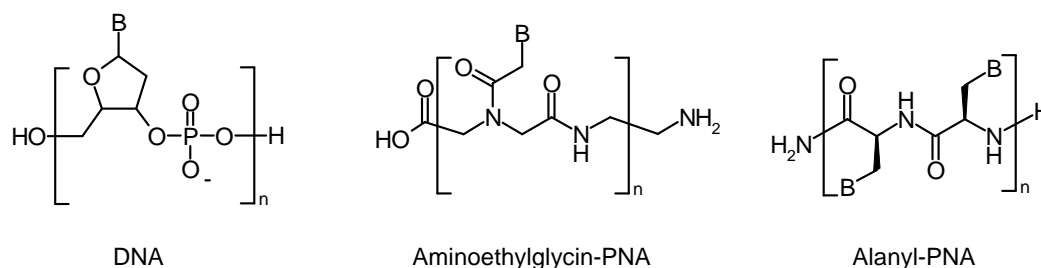
eingebaut werden, dass die Nukleoaminosäuren im hydrophoben Kern lokalisiert sind und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Um Stabilisierung aufgrund anderer Aminosäuren zu verhindern, werden in dieser Arbeit lediglich die natürlichen Aminosäuren Alanin und Lysin verwendet. Eine Glutaminsäure soll als helixbildende Komponente eingebaut werden, die eine Stabilisierung über eine Salzbrücke mit Lysin hervorbringt. Die Peptidsynthese erfolgt nach Boc- sowie nach Fmoc-Strategie. Da für eine Ausbildung stabiler Helices eine Mindestlänge von 15-20 Aminosäuren notwendig ist, sollen 15 und 21mere hergestellt werden.<sup>[27]</sup> Die Paarungseigenschaften werden UV-spektroskopisch mit Testpeptiden verglichen, die ausschließlich natürliche Aminosäuren enthalten.

Der dritte Teil dieser Arbeit soll sich mit dem Einbau der synthetisierten Fmoc-geschützten Alanyl-Nukleoaminosäure als Arginin-Mimetikum in das lineare Mikropeptid MCoTI-29 beschäftigen, um Veränderungen biologischer Aktivitäten zu zeigen.

## 2 Allgemeiner Teil

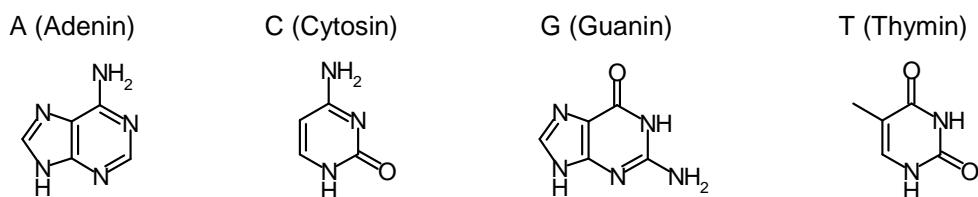
### 2.1 Peptidnukleinsäuren (PNAs)

Peptidnukleinsäuren (*peptide nucleic acids*) sind DNA-Analoga, die 1991 erstmals von P. E. Nielsen beschrieben wurden.<sup>[28,29]</sup> Das Rückgrat einer PNA besteht im Gegensatz zum Desoxyribose-Phosphodiester-Rückgrat der DNA aus einer Aminoethylglycin-Polyamidstruktur (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung von DNA, Aminoethylglycin- und Alanyl-PNA, B = Nucleobase

Das tertiäre Amid ist über einen Essigsäure-Linker mit den kanonischen Nucleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin verknüpft (Abb. 2.2). Eine weitere PNA, die Alanyl-PNA, wird erhalten, wenn das Rückgrat der Aminoethylglycin-Einheit verkürzt wird. Alanyl-PNA-Oligomere bestehen aus einem regulären Peptidstrang, dessen Seitenketten an den  $\beta$ -Positionen mit Nucleobasen substituiert sind (Abb. 2.1, rechts).<sup>[13,14,15,30]</sup>



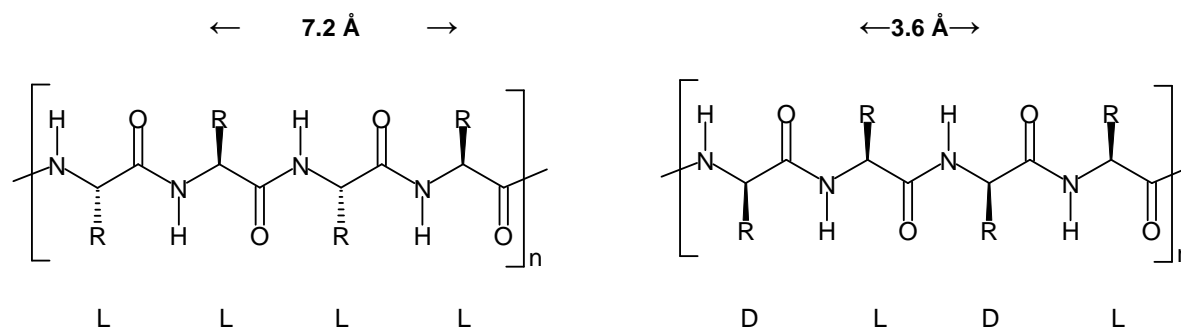
**Abb. 2.2:** Kanonische Nucleobasen der DNA

Die Ausbildung eines linearen Alanyl-PNA-Doppelstranges wird durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Solvenseffekte, Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelungswechselwirkungen der Nucleobasen stabilisiert.<sup>[31]</sup>

Wesentliche Unterschiede zwischen DNA- und PNA-Molekülen sind zum einen die starke Enzymstabilität der PNA, so dass ein Abbau durch Nukleasen sowie Proteasen kaum erfolgt, was die Anwendung in der Analytik ermöglicht.<sup>[32]</sup> Zum anderen weist PNA ein flexibles, ungeladenes Peptid-Rückgrat auf, welches die Aminoethylglycin-PNA befähigt, nahezu unabhängig von der Salzkonzentration, an eine komplementäre Sequenz der DNA-Doppelhelix unter Verdrängung eines DNA-Stranges zu hybridisieren. Diese PNA/DNA-Komplexe weisen eine wesentlich höhere Stabilität als die DNA/DNA-Komplexe auf. Die Alanyl-PNA bindet dagegen nicht an DNA oder RNA. Mögliche Gründe hierfür sind, dass am C $\alpha$ -Atom der Nucleoaminosäuren ein Chiralitätszentrum vorliegt und die konformationelle Flexibilität durch die zwei Amidbindungen pro Repetitionseinheit gehindert ist.

Konfiguration der Alanyl-PNA:

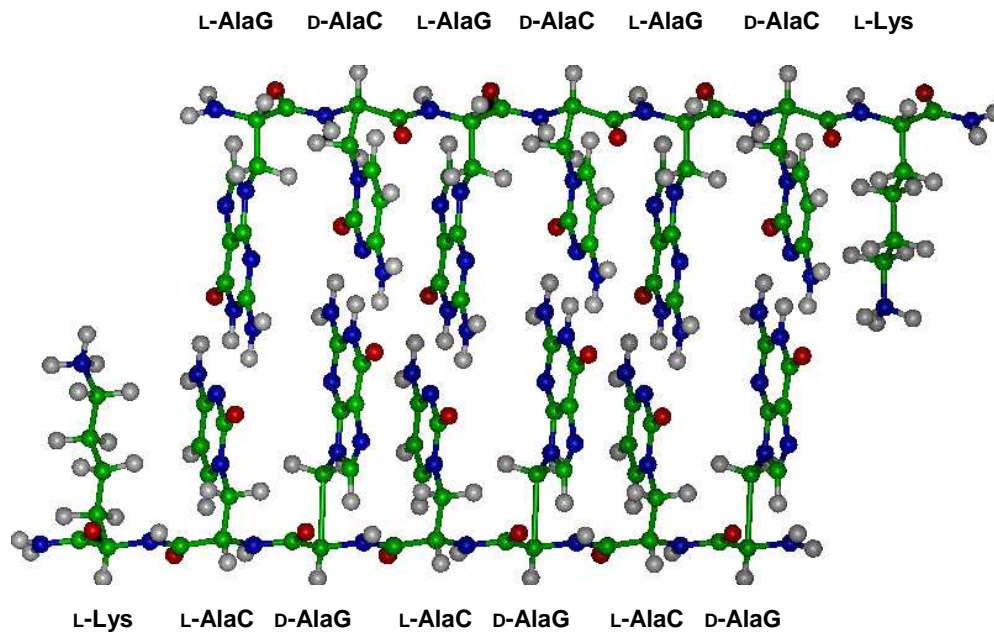
Im linearen Alanyl-PNA-Strang weisen die Nucleobasen entweder in die gleiche oder in die entgegengesetzte Richtung, je nachdem in welcher Konfiguration die PNA vorliegt. Bei alternierender Konfiguration der Nucleoaminosäure-Einheiten in linearer  $\beta$ -Faltblatt Konformation zeigen alle Basen in die gleiche Richtung (Abb. 2.3).<sup>[13,14,15,30,33]</sup>



**Abb. 2.3:** Gleiche (L,L,L,L) und alternierende Konfiguration (D,L,D,L) des Alanyl-Peptidstranges, R = CH<sub>2</sub>-Nucleobase

Bei gleicher Konfiguration zeigen benachbarte Nucleobasen eines PNA-Stranges in die entgegengesetzte Richtung.<sup>[13a]</sup> Der Abstand benachbarter Basen beträgt hier 7.2 Å, wohingegen der Basenabstand bei alternierender Konfiguration bei 3.6 Å liegt, was in etwa dem Abstand der Nucleobasen in der B-DNA mit 3.4 Å entspricht (Abb. 2.3).<sup>[2]</sup>

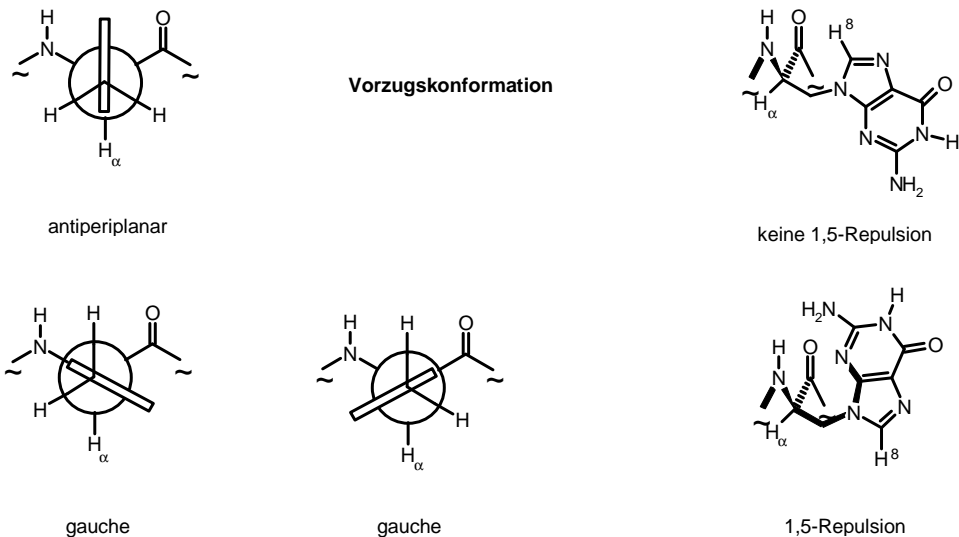
Abb. 2.4 zeigt ein PNA-Alanyl-Doppelstrang Modell mit Guanin-Cytosin paarenden Hexameren.



**Abb. 2.4:** Modell eines linearen, alternierend konfigurierten Alanyl-PNA-Doppelstranges mit paarenden G-C Hexameren; AlaG =  $\beta$ -(9-Guaninyl)alanin; AlaC =  $\beta$ -(1-Cytosinyl)alanin

Konformation der Alanyl-PNA:

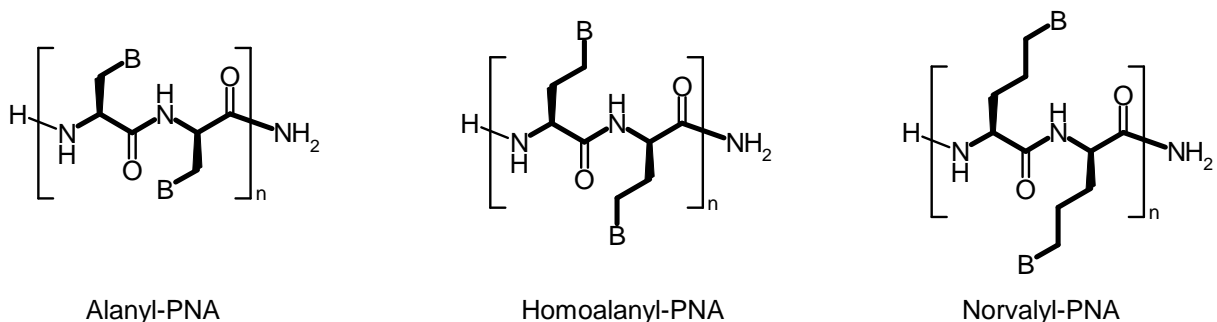
Bei der Ausbildung von PNA-Doppelsträngen steht die Basenpaar-Ebene idealisiert betrachtet orthogonal auf dem Peptidrückgrat. In Abb. 2.5 ist die Vorzugskonformation der Alanyl-Nukleoaminosäure in der Newman-Projektion dargestellt. Die *antiperiplanare* Konformation ist hier bezüglich des  $H_{\alpha}$ -Atoms energetisch am günstigsten. Die *gauche* Konformation ist aufgrund sterischer Wechselwirkungen weniger begünstigt, da das Puringerüst so ausgerichtet ist, dass es zur 1,5-Repulsion zwischen der Nukleobase und der Methyleneinheit kommt. Wenn das H-8 Atom des Purin-Ringes allerdings in die Richtung des Rückgrates orientiert ist, kommt es zu keiner Spannung durch 1,5-Repulsion. Analoges gilt für die Ausrichtung des H-6 Atoms der Pyrimidinbasen zum Rückgrat.<sup>[14a,34]</sup>



**Abb. 2.5:** Antiperiplanare und gauche Konformationen der Alanyl-Nukleoaminosäureeinheit,  $\square$  = Nukleobase

Homologe der Alanyl-PNA:

Homoalanyl-Peptidnukleinsäuren (Homoalanyl-PNAs) werden durch Einbau einer Methyleinheit in die Seitenkette der Alanyl-PNA erhalten.<sup>[16,17]</sup> Verlängerung um zwei Methyleinheiten ergibt die seitenkettenhomologe Norvalyl-Peptidnukleinsäure (Norvalyl-PNA).<sup>[18]</sup> Untersuchungen der Paarungseigenschaften von Alanyl-PNA und seinen Homologen können grundlegende Kenntnisse über Paarungsaffinitäten der Nukleobasen und deren Stapelungseigenschaften in Abhängigkeit der Orientierung der Nachbarbase geben (Abb. 2.6).<sup>[16,17,18]</sup>



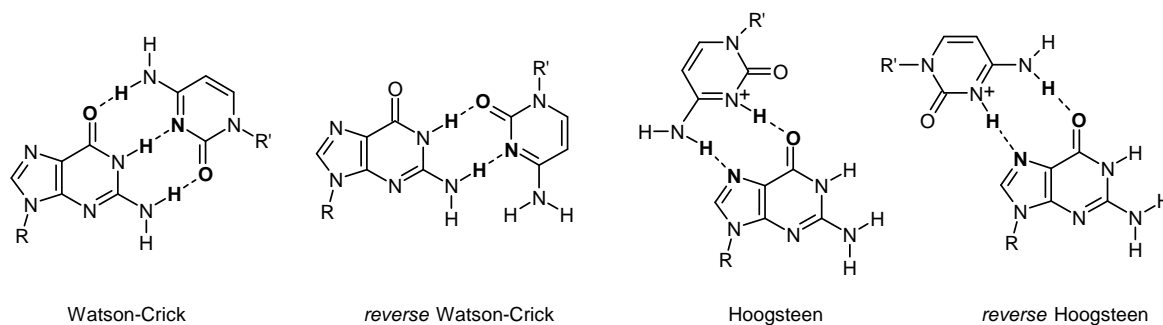
**Abb. 2.6:** Seitenkettenhomologe der Alanyl-PNA; B = Nukleobase

Paarungsmodi:

Die helikale Rückgrattopologie der DNA ermöglicht ausschließlich eine Paarung im Watson-Crick Modus.<sup>[16,17]</sup> Lineare Alanyl-PNAs können dagegen auch andere

Paarungsmodi verwirklichen, so dass die Basenpaarkomplementarität nicht eindeutig ist. Somit können neben Purin-Pyrimidin Basenpaarungen auch Purin-Purin wie Pyrimidin-Pyrimidin Basenpaarungen ausgebildet werden. Pyrimidin-Pyrimidin Paarungen werden allerdings kaum beobachtet, da die Stapelungswechselwirkungen sehr viel weniger ausgeprägt sind als bei den Purin-Purin Paarungen.<sup>[16,17]</sup>

Es sind bis zu vier Paarungsmodi möglich: der Watson-Crick und der Hoogsteen Paarungsmodus sowie die durch Spiegelung erhaltenen *reverse* Watson-Crick und *reverse* Hoogsteen Paarungsmodi. Ein Wechsel vom Watson-Crick bzw. *reverse* Watson-Crick Paarungsmodus in den Hoogsteen bzw. *reverse* Hoogsteen Paarungsmodus erfolgt durch Verschiebung einer Nukleobase in der Basenpaarebene (Abb. 2.7).<sup>[35]</sup> Dabei kommt es zur Änderung der Lage des Rückgrates und der Ausrichtung der Nukleobasen. Die Paarungselektivität ist somit abhängig von der Rückgrattopologie und den Donor-Akzeptor-Funktionalitäten der Basen. Die in Abb. 2.7 gezeigte Hoogsteen und *reverse* Hoogsteen Paarung von Guanin und Cytosin ist nur im sauren protonierten Zustand möglich. Ferner ist zu erkennen, dass die Watson-Crick Paarung als einzige zu drei Wasserstoffbrückenbindungen führt. In anderen Paarungsmodi werden lediglich zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet.

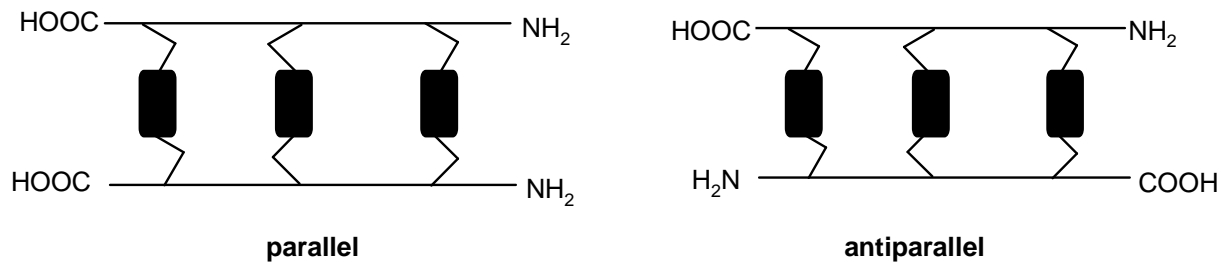


**Abb. 2.7:** Mögliche Paarungsmodi der Guanin-Cytosin-Paarung, R,R' = CH<sub>2</sub>-Peptidstrang

#### Strangorientierung:

Peptide sowie PNAs werden vom N- zum C-Terminus angegeben, so dass ihnen eine Strangrichtung zugeschrieben werden kann. Doppelstränge können entweder parallel oder antiparallel orientiert sein. Um parallele Strangorientierung handelt es sich, wenn der N- bzw. der C-Terminus der Stränge in die gleiche Richtung zeigt. Weisen die Termini der Stränge im Paarungskomplex hingegen in entgegengesetzte Richtung, spricht man von antiparalleler Strangorientierung (Abb. 2.8). Der Einbau

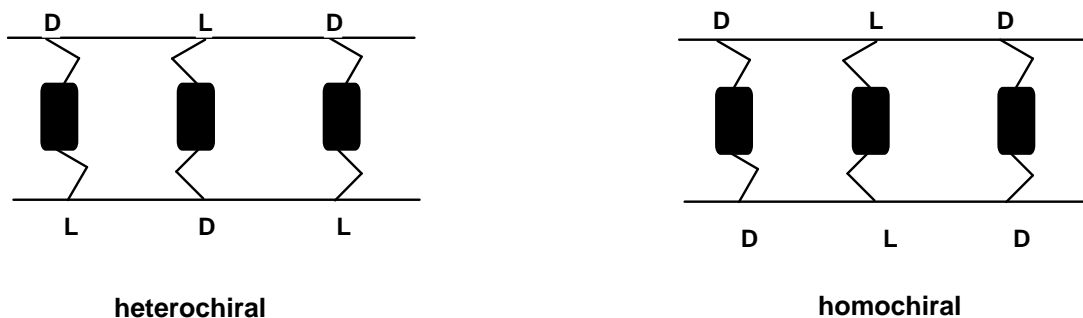
von Lysinamid am C-Terminus führt möglicherweise zu einer Begünstigung der antiparallelen Strangorientierung aufgrund der Repulsion positiver Ladungen.<sup>[16,17]</sup>



**Abb. 2.8:** Schematische Darstellung von parallel und antiparallel orientierten Doppelsträngen

Konfiguration:

Ein weiterer Parameter ist die Konfiguration der Peptidnucleinsäuren. Die Alanyl-PNA-Stränge weisen eine alternierende Konfiguration auf. Die Paarung der Basen erfolgt, indem sich entgegengesetzte oder gleich konfigurierte Nucleoaminosäuren paaren (hetero- bzw. homochirale Paarung) (Abb. 2.9).<sup>[16,17]</sup>



**Abb. 2.9:** Schematische Darstellung von homochiralen und heterochiralen Paarungskomplexen

Das *Retro-Inverso*-Prinzip<sup>[36]</sup> beschreibt, dass es bei gleichzeitiger Umkehr von Strangorientierung (parallel zu antiparallel) und Konfiguration (homo- zu heterochiraler Paarung) zu keiner Änderung der Seitenketten-Topologie im Doppelstrang kommt. Tab. 2.1 zeigt einen Überblick über mögliche Paarungsmodi bei strukturellen Veränderungen. Es erfolgt eine Änderung des Paarungsmodus, wenn ein Gemisch aus alternierender Homoalanyl- und Alanyl-PNA vorliegt. Bei Betrachtung von reiner Alanyl- bzw. reiner Homoalanyl-PNA sind vier Kombinationen möglich (antiparallel/homochiral, antiparallel/heterochiral, parallel/homochiral und parallel/heterochiral), aber nach dem *Retro-Inverso*-Prinzip paaren jeweils zwei Paarungskomplexe im sel-



ben Paarungsmodus. Das gleiche gilt bei einem Gemisch von Alanyl- und Homoalanyl-Peptidnukleinosäuren.<sup>[16,17]</sup>

<b>PNA</b>	<b>antiparallel</b>	<b>parallel</b>
(AlaB) <sub>n</sub> bzw. (HalB) <sub>n</sub>	homochiral: Watson-Crick Hoogsteen	heterochiral: Watson-Crick Hoogsteen
(AlaB-HalB) <sub>n</sub>	heterochiral: Watson-Crick Hoogsteen	homochiral: Watson-Crick Hoogsteen

**Tab. 2.1:** Strukturelle Merkmale für die Paarung der Alanyl(Ala)/Homoalanyl(Hal)-, Alanyl- und Homoalanyl-PNA im Watson-Crick- bzw. Hoogsteen-Modus; B = Nukleobase

Mögliche Paarungskomplexe:

Als Maß für die Stabilität des gesamten Paarungskomplexes wird die UV-Schmelztemperatur  $T_m$  angegeben. Es können Selbstpaarungen und Enantiomerenpaarungen erfolgen. Um die Löslichkeit der PNA, die mit zunehmender Länge abnimmt, zu verbessern wird sie z.B. mit Lysin, modifiziert.

<b>Selbstpaarung</b>	antiparallel
heterochiral	C-C-G-C-G-G-Lys Lys-G-G-C-G-C-C
homochiral	C-C-G-C-G-G-Lys Lys-G-G-C-G-C-C

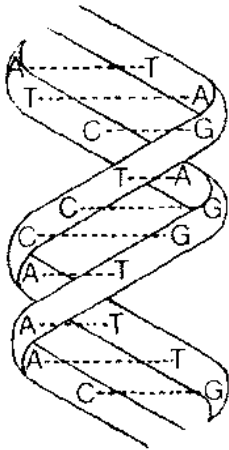
<b>Enantiomerenpaarung</b>	antiparallel
heterochiral	C-C-G-C-G-G-Lys Lys-G-G-C-G-C-C
homochiral	C-C-G-C-G-G-Lys Lys-G-G-C-G-C-C

**Tab. 2.2:** Möglichkeiten der Selbstpaarung (oben) und der Enantiomerenpaarung (unten) des Oligomers H-(AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG)-Lys-NH<sub>2</sub> bzw. H-(HalC-HalC-HalG-HalC-HalG-HalG)-Lys-NH<sub>2</sub>; C =  $\beta$ -(1-Cytosinyl)-alanin (AlaC) bzw.  $\beta$ -(1-Cytosinyl)-homoalanin (HalC); G =  $\beta$ -(9-Guaninyl)-alanin (AlaG) bzw.  $\beta$ -(9-Guaninyl)-homoalanin (HalG); D-konfigurierte Nukleoaminosäuren sind unterstrichen.

Hexamere besitzen ausreichend viele Nucleobasen zur Ausbildung stabiler Komplexe mit  $T_m = 21-58\text{ °C}$ .<sup>[16]</sup> In Tab. 2.2 sind Oligomere zusammengefasst, die aus drei  $\beta$ -(9-Guaninyl)-alanin (AlaG) und drei komplementären  $\beta$ -(1-Cytosinyl)-alanin (AlaC) Nucleoaminosäuren mit alternierender Konfiguration bestehen. Neben der Guanin-Cytosin Paarung kann auch eine Guanin-Guanin Paarung zur Stabilisierung verwirklicht werden. Cytosin-Cytosin Paarung hat keinen positiven Effekt auf die Stabilität.

## 2.2 Paarung mittels kovalenter Verbrückung

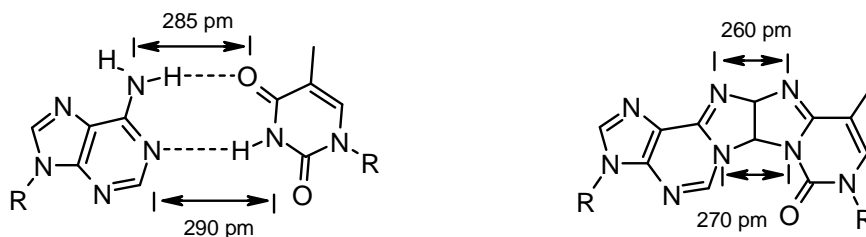
Das klassische Watson-Crick Modell der DNA zeigt den komplementären Zusammenhalt der Doppelstränge über eindeutig definierte Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 2.10).<sup>[2]</sup> Eine kovalente Verknüpfung über ein molekulares Gerüst, das dem



wasserstoffbindenden Basenpaar ähnelt, stellt eine gute Nachahmung der Watson-Crick Basenpaarung dar, die in diverse biologische Systeme inkorporiert werden kann. Unterschiedliche Möglichkeiten der kovalent verknüpften Verbrückung wurden entwickelt, wobei es sich entweder um nukleotide oder um nicht-nukleotide Verknüpfungen handelt.

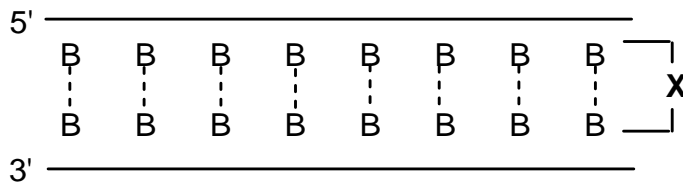
**Abb. 2.10:** Doppelstrang-Helix aus komplementären Guanin-Cytosin (C,G) und Adenin-Thymin (A,T) Paarungen über Wasserstoffbrückenbindungen

Mitte der achtziger Jahre stellte N. Leonard das Prinzip der nukleotiden Verbrückung, die die Wasserstoffbrückenbindung der Watson-Crick-Basenpaare kovalent imitieren soll, vor.<sup>[37]</sup> Das erste aufgestellte Modell ist in Abb. 2.11 (rechts) gezeigt.



**Abb. 2.11:** Adenin-Thymin Basenpaarung (links); im Vergleich dazu die Imitation der Wasserstoffbrückenbindung (rechts); R = 2'-Desoxyribose

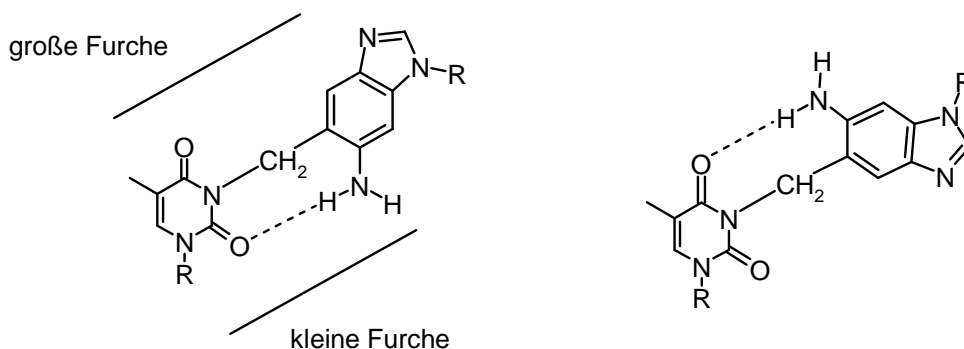
In den darauf folgenden Jahren entwickelten zahlreiche Gruppen nicht-nukleotide Brücken, die auf Oligo(ethylenglycol)-<sup>[38]</sup>, Terephthalamid-<sup>[39]</sup> und Disulfid-Verbindungen<sup>[40]</sup> beruhen. Diese Brücken fungieren anstelle eines Oligonukleotid-Segementes als sogenannte „Kappe“. Kurze helikale Konformationen von Doppel- sowie Triplestrang-Oligonukleotiden können so stabilisiert werden (Abb. 2.12).



**Abb. 2.12:** Schema eines Oligonukleotid-Doppelstranges mit überbrücktem Linker (X);  
B---B = komplementäres Basenpaar

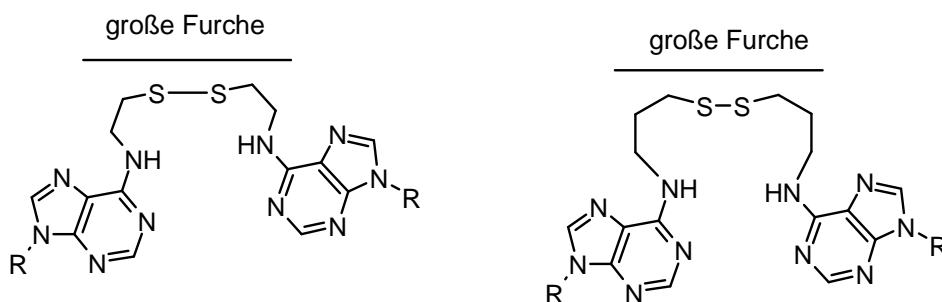
Oligonukleotide, die auf diese Weise verbrückt sind, können als Ersatz für Polyoligonukleotide in DNA- und RNA-gebundenen Proteinen, in oligonukleotidbasierten Katalysen und in selbstorganisierten Systemen eingesetzt werden.<sup>[38,39,40]</sup>

Ein anderes Modell stellt die Verknüpfung komplementärer Nucleobasen, wie z.B. über eine Methylenbrücke dar (Modell in Abb. 2.13 von Y. Kishi).<sup>[41,42]</sup> Die so verknüpften Doppelstränge weisen neue chemische Eigenschaften auf.



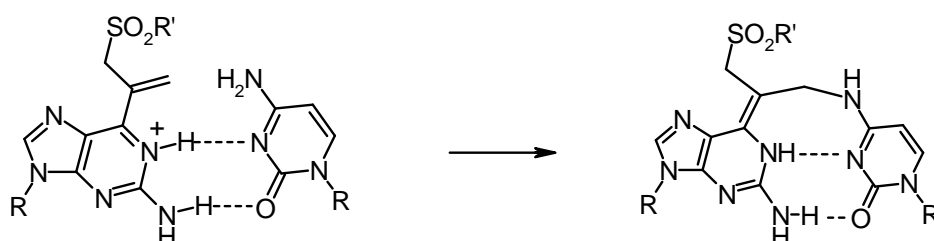
**Abb. 2.13:** Modell für kovalent-verknüpfte Watson-Crick (links) und *reverse* Watson-Crick Basenpaarung (rechts), R = 2'-Desoxyribose

G. Verdine und A. Ferentz beschäftigten sich mit Disulfidbrücken, wie die in Abb. 2.14 gezeigten Dithiobisethan- und Dithiobispropan-Linker.<sup>[40]</sup>



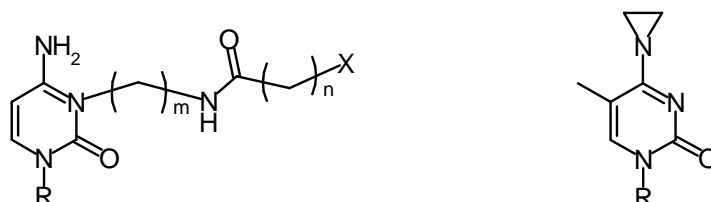
**Abb. 2.14:** Disulfid-Linker Dithiobisethan und Dithiobispropan; R = Desoxyribose

Es wurden 2-Amino-6-(1-ethylsulfoxy)vinylpurin-Derivate entwickelt, die in einer hochselektiven Alkylierung mit Cytidin zu einer imitierten Watson-Crick Verbrückung führten. Diese Verknüpfung mittels reaktiver Spezies könnte die Inhibierung der Genexpression in der *Antisense* und *Antigene* Strategie beeinflussen (Abb. 2.15).<sup>[43]</sup>



**Abb. 2.15:** Verknüpfung des 2-Amino-6-(1-ethylsulfoxy)vinylpurin-Derivates mit Cytidin; R = Desoxyribose; R' = Me,H

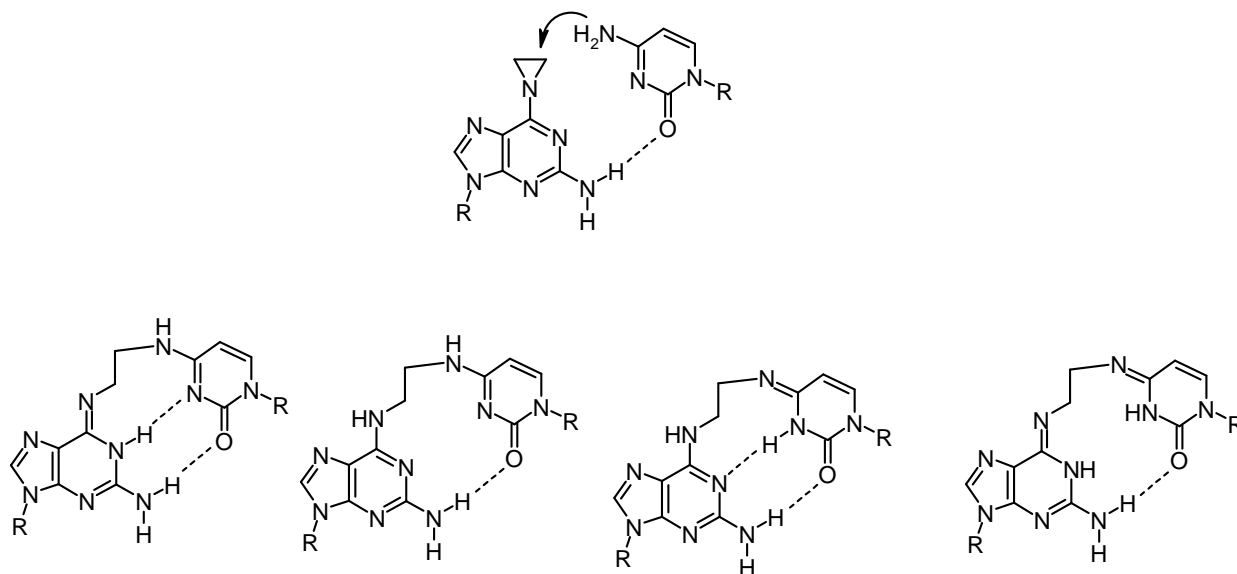
Andere synthetisierte Verbindungen, die eine solche Alkylierung eingehen sind Haloacetylamid-<sup>[44]</sup> und Aziridin-Derivate<sup>[45]</sup> (Abb. 2.16).



**Abb. 2.16:** 15-( $\omega$ -( $\omega$ -Haloacetyl-amido)-alkyl)-2'-desoxyuridin (links); 5-Methyl-N4,N4-ethanocytosin (rechts); R = Desoxyribose; m = 1,3,4; n = 1,3; X = Br,Cl,I

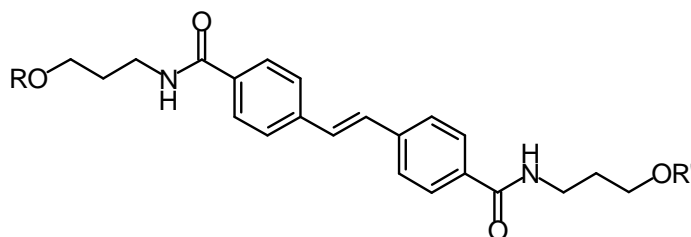
Die Aziridin-Variante ermöglicht die Einbringung der kovalenten Verknüpfung an spezifischen Orten des Oligomers, wobei jedoch eine Cytosin-Cytosin bzw. Cytosin-

Adenosin Fehlstelle an der Verknüpfungsstelle erforderlich ist. Ebenso ist es nicht möglich, alle vier kanonischen Basen einzubauen. S. J. Benkovic und M. Cowart entwickelten daher einen ethylenverbrückenden Linker, der im Doppelstrang alle vier möglichen Basen enthalten kann.<sup>[46]</sup> Das *N,N*-Ethano-2,6-diaminopurin-Derivat reagiert mit der Aminogruppe des Cytidins kovalent zu der ethylenverknüpften Einheit. Mögliche Paarungsmodi sind in Abb. 2.17 gezeigt.



**Abb. 2.17:** Möglicher Mechanismus zur Bildung kovalenter Verknüpfung der *N,N*-Ethano-2,6-diaminopurin-Einheit mit der Aminofunktion des Cytosins; R = Desoxyribose

R. L. Letsinger beschäftigte sich mit Haarnadel-Strukturen von Oligonukleotiden und zeigte, dass eine Stilbendicarboxamid-Brücke (Abb. 2.18) ein effektives Strukturelement zur Stabilisierung und Charakterisierung kurzer Oligonukleotid-Doppel- sowie Triplestrangbereiche darstellt.<sup>[47,48]</sup>



**Abb. 2.18:** Stilbendicarboxamid-Linker mit R = R' = -OP(O)(O<sup>-</sup>)

Diese Einheit besitzt einen langen, relativ rigiden Kern, der die Entropie der gesamten Brücke reduzieren soll. Es wurde ein Linker mit Propyleneinheit verwendet, der die Enden der Oligonukleotide an das Amid des Stilbendicarboxamid verknüpft, so dass die gesamte Länge dem Abstand der Rückgratstränge in der DNA-Helix entspricht.

Das Molekül Stilben besteht im Prinzip aus einem Ethenmolekül, das an beiden Enden statt eines Wasserstoffatoms je einen Phenylring trägt. Es existieren vom Stilben beide isomeren Formen (Abb. 2.19). *cis*- und *trans*-Stilben sind beide bei Raumtemperatur stabil.



**Abb. 2.19:** *trans*- sowie *cis*-Stilben

*trans*-Stilben ist thermodynamisch stabiler als sein Isomer, wie von disubstituierten Doppelbindungen zu erwarten. Derivate des Stilbens werden häufig als Blankophore in Textilien aus Polymerfarbstoffen eingesetzt.<sup>[49]</sup>

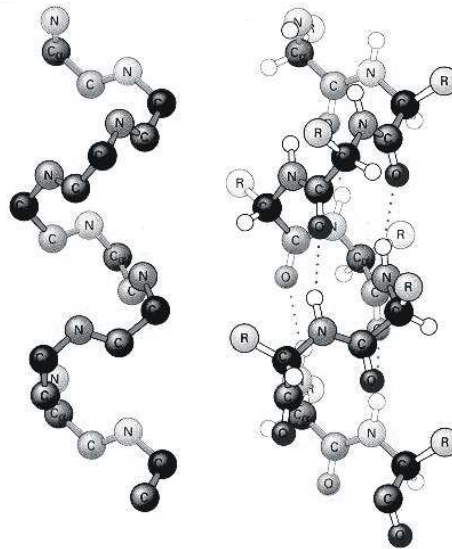
## 2.3 $\alpha$ -Peptid-Helices

### 2.3.1 Allgemeines zu $\alpha$ -Helices

Die Funktionsweise eines Proteins wird durch dessen Struktur bestimmt, die sich über die Primär-, Sekundär-, Tertiär- sowie Quartärstruktur beschreiben lässt. Die Primärstruktur eines Proteins stellt die Aminosäuresequenz dar und die räumliche Anordnung einer Aminosäuresequenz gibt die Sekundärstruktur wieder.<sup>[2]</sup> Die Tertiärstruktur beschreibt die gesamte räumliche Struktur der Proteine, d.h. die Faltung der Sekundärstrukturelemente. Von der Quartärstruktur spricht man, wenn Einzelproteine zu einem Gesamtkomplex vereint werden.<sup>[2]</sup> Die drei häufigsten Sekundärstruktur-Elemente von Polypeptiden bzw. Proteinen sind die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt und der *Turn*.<sup>[50,51,52,53]</sup> Die  $\alpha$ -Helix wurde 1951 von L. Pauling als erste regelmäßige Proteinstruktur postuliert.<sup>[54,55,56,57]</sup> 1958 wurde sie erstmals mittels Röntgenstrukturanalyse an Myoglobin von J. C. Kendrew nachgewiesen.<sup>[58]</sup> Das Motiv des  $\beta$ -Faltblattes und drei verschiedene Arten von  $\beta$ -Turns wurden von L. Pauling und R. Corey im selben Jahr entdeckt.<sup>[56]</sup> Nicht zu einem Motiv gehörende Teile der Aminosäureketten eines Proteins nennt man *random coil*.<sup>[2]</sup>

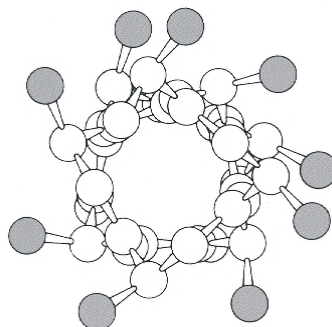
In einer  $\alpha$ -Helix erfolgt die Stabilisierung innerhalb eines Polypeptidabschnittes über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der CO-Gruppe der Aminosäure  $n$  und der NH-Gruppe der Aminosäure  $n+4$ , die vier Aminosäuren entfernt lokalisiert ist. Damit es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen kommen kann, müssen die CO- und NH-Gruppen dicht beieinander liegen. Diese Voraussetzung wird bei einem aufgewickelten Strang verwirklicht, bei dem die beiden betreffenden Gruppen übereinander zu liegen kommen. Die Seitenketten ragen nach außen, wobei sich die  $\beta$ -Kohlenstoffatome nicht radial erstrecken, sondern wie Spiralarme (*pinwheel*) gebogen sind. (Abb. 2.20).<sup>[2]</sup>





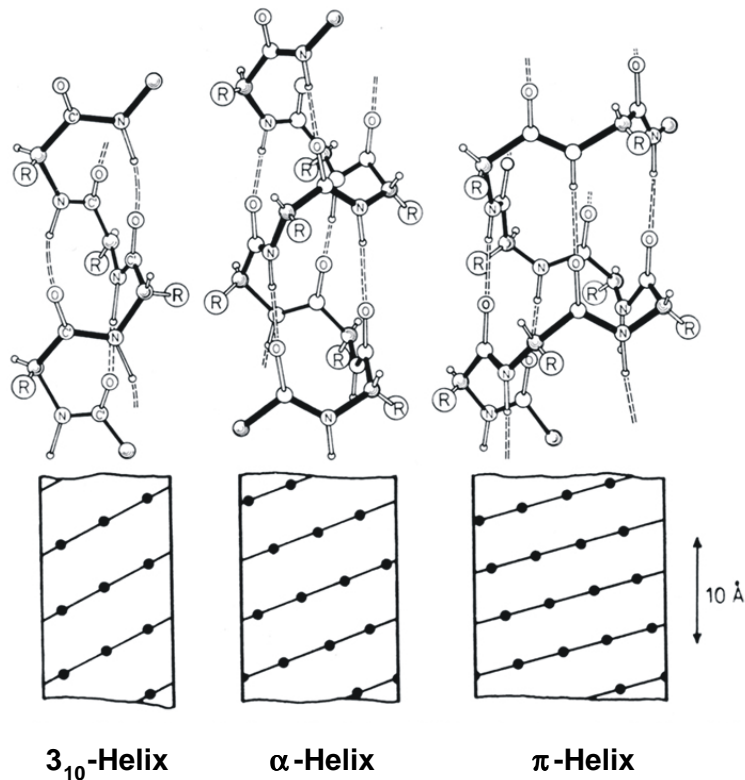
**Abb. 2.20:** Seitenansicht der  $\alpha$ -Helix; links: Modell mit markierten N(H)-,  $C_{\alpha}$ - und CO-Atomen; rechts: Modell mit zusätzlichen Wasserstoffbrücken Bindungen und Aminosäureresten (R)

Jede Aminosäure ist gegenüber der vorigen um  $1.5 \text{ \AA}$  versetzt und um  $109.5^\circ$  verdreht.<sup>[2]</sup> Da um die Amidbindung keine Drehung möglich ist, wird die Kette ab der dritten Bindung in eine regelmäßige helikale Struktur gezwungen und durch die erwähnten Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Nach vier Aminosäuren ist die erste Windung geschlossen, wobei die erste und vierte Aminosäure sich überlappen. Pro Windung der Helix sind rechnerisch 3.6 Aminosäuren nötig. Somit ist die  $\alpha$ -Helix eine  $3.6_{13}$ -Helix. Die sich ausbildenden Wasserstoffbrückenbindungen tragen dazu bei, dass sich ein 13-gliedriger Ring bildet (Abb. 2.21).



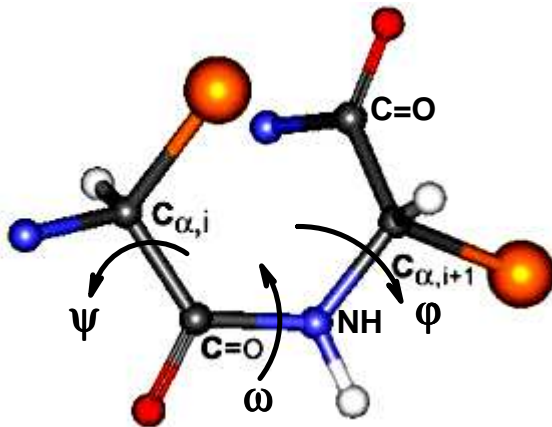
**Abb. 2.21:** Aufsicht einer  $3.6_{13}$ -Helix: 3.6 Aminosäuren pro Windung führen zu der 13-gliedrigeren Struktur.

Da eine volle Umdrehung der Helix 3.6 Aminosäureresten entspricht, beträgt der Abstand zweier Windungen  $p$ , die so genannte Ganghöhe, 5.4 Å ( $3.6 \times 1.5$  Å).<sup>[2]</sup> Bei einer idealen Helixstruktur müssten die  $C_\alpha$ -Atome theoretisch nach 5 Windungen ( $5 \times 3.6 = 18$  Aminosäuren) wieder zur Deckung kommen, was bei vielen natürlichen Proteinen nicht exakt der Fall ist. Die Distanz zwischen den übereinander liegenden Aminosäuren sollte 27 Å ( $18 \times 1.5$  Å) betragen. Die durch die Helix gebildete sogenannte Röhre besitzt einen Durchmesser von etwa 5 Å und wird von den Atomen des Peptid-Rückgrates gefüllt, was in den van-der-Waals-Darstellungen deutlich wird.<sup>[59]</sup> Neben der  $\alpha$ -Helix kommen in der Natur noch andere Arten von Helices vor, wie die  $3_{10}$ -Helix und die  $\pi$ -Helix (Abb. 2.22).<sup>[2]</sup>  $3_{10}$ -Helices treten selten auf, sind kurz und häufig am Beginn oder Ende einer regulären  $3.6_{13}$ -Helix lokalisiert. Der Anstieg pro Aminosäure beträgt hier 2.0 Å ( $\alpha$ -Helix: 1.5 Å) und pro Umdrehung sind drei Aminosäuren nötig ( $\alpha$ -Helix: 3.6). Die  $3_{10}$ -Helix ist insgesamt weniger stabil als die  $\alpha$ -Helix, da die CO-NH-Dipole nicht ideal entlang der Helix-Achse verlaufen, sondern mit einer Abweichung von 30°. <sup>[2]</sup>  $\pi$ -Helices ( $4.4_{16}$ -Helices) werden noch seltener ausgebildet, meist als Schleife am Ende einer  $\alpha$ -Helix. Pro Windung liegen 4.4 Aminosäuren vor, wobei der Anstieg pro Aminosäure 1.1 Å beträgt.<sup>[2]</sup> Hinsichtlich des Vorkommens von  $\alpha$ -Helices in Proteinen gibt es große Unterschiede: In Myoglobin und Hämoglobin z.B. ist die  $\alpha$ -Helix das häufigste Strukturelement, im Verdauungsenzym Chymotrypsin fehlt sie z.B. aber fast gänzlich.<sup>[60,61,62]</sup>



**Abb. 2.22:** oben: Helices der Polypeptidkette mit intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen: 3<sub>10</sub>-Helix (links), α-Helix (3.6<sub>13</sub>-Helix) (mitte), π-Helix (4.4<sub>16</sub>-Helix) (rechts); unten: Punkt-Zylinder Modell, wobei die C<sub>α</sub>-Positionen markiert sind

In Abb. 2.23 ist eine Peptideinheit der Helix so dargestellt, dass sich alle Gruppen coplanar in der CO-C<sub>α</sub>-NH-Ebene befinden. In dieser Konformation bilden die Atome CO, C<sub>α</sub> und NH einen Tetraederwinkel von 109.5°.<sup>[63,64]</sup> Der Torsionswinkel  $\varphi$  beschreibt die Drehung um die NH-C<sub>α</sub>-Achse. Wenn sich die NH-Bindung *trans* zur C<sub>α</sub>-CO-Bindung befindet, wird  $\varphi$  gleich 0°.<sup>[63,64]</sup> Der Winkel  $\psi$  beschreibt die Drehung um die CO-C<sub>α</sub>-Achse. Befindet sich die CO-Bindung *trans* zur C<sub>α</sub>-NH-Bindung ist  $\psi$  gleich 0°. Zur Charakterisierung einer möglichen Verdrillung der Bindungsebene der Peptidbindung wird der Winkel  $\omega$  definiert. Er ist gleich Null, wenn die C<sub>α</sub>-CO-Bindung *cis* zur nächstfolgenden C<sub>α</sub>-NH-Bindung steht.<sup>[63,64]</sup> Typische Werte der Torsionswinkel  $\varphi/\psi$  für eine rechtsgängige α-Helix liegen bei -57°/-47°, die einer 3<sub>10</sub>-Helix bei -49°/-26° und die einer π-Helix bei -57°/-70°. Der Torsionswinkel  $\omega$  ist definitionsgemäß konstant, da sich dieser Winkel innerhalb der planaren Peptidbindung befindet.<sup>[63,64]</sup>



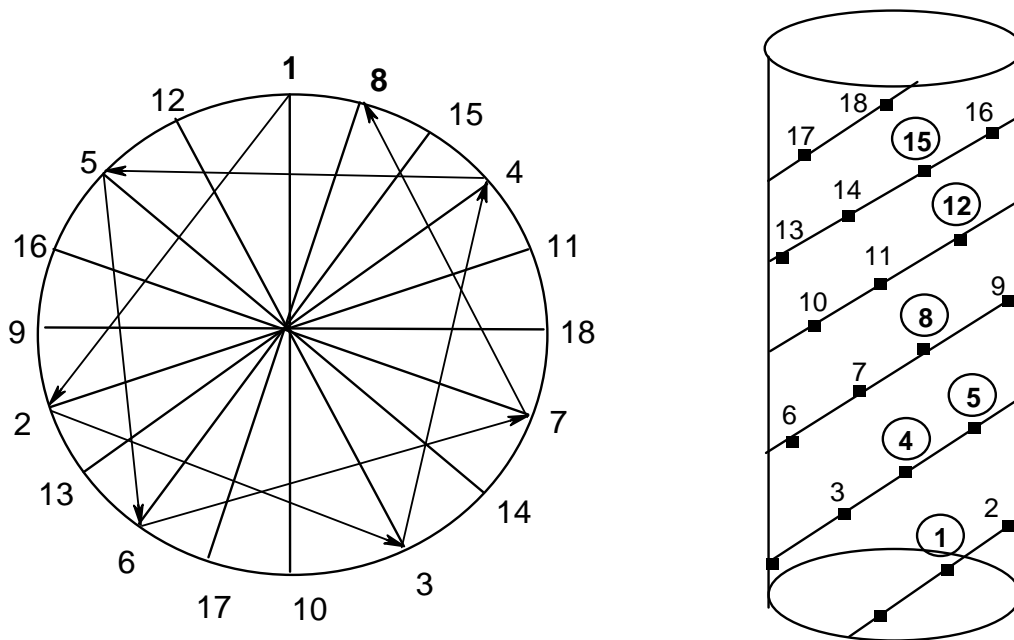
**Abb. 2.23:** Röntgenkristallstruktur einer *trans*-ständigen Peptidgruppe mit den Rotationswinkeln  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\omega$ <sup>[65]</sup>

Der Schraubensinn der Helix kann nach rechts, d.h. im Uhrzeigersinn, oder nach links weisen.  $\alpha$ -Helices in natürlichen Peptiden und Proteinen sind grundsätzlich rechtsgängig, da dies sterisch und energetisch günstiger ist. Die einsträngige  $\alpha$ -Helix ist ein kurzes, stabförmiges Molekül von meist weniger als 4 nm.

Häufig lässt sich eine Helix-Population an der vorliegenden Aminosäure-Sequenz abschätzen; Aminosäuren, wie Alanin, Arginin, Glutaminsäure, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin und Tryptophan treten bevorzugt in Helices auf, während Prolin, Glycin, Threonin und Serin seltener in Helices zu finden sind.

### 2.3.2 Helical wheel (Helixrad)<sup>[26,66]</sup>

Die Darstellung einer Helix in Richtung der Längsachse wird *helical wheel* (Helixrad) genannt. Das *helical wheel* stellt eine Projektion der Positionen der C<sub>α</sub>-Atome auf einer Ebene senkrecht zur Helixachse dar (Abb. 2.24).



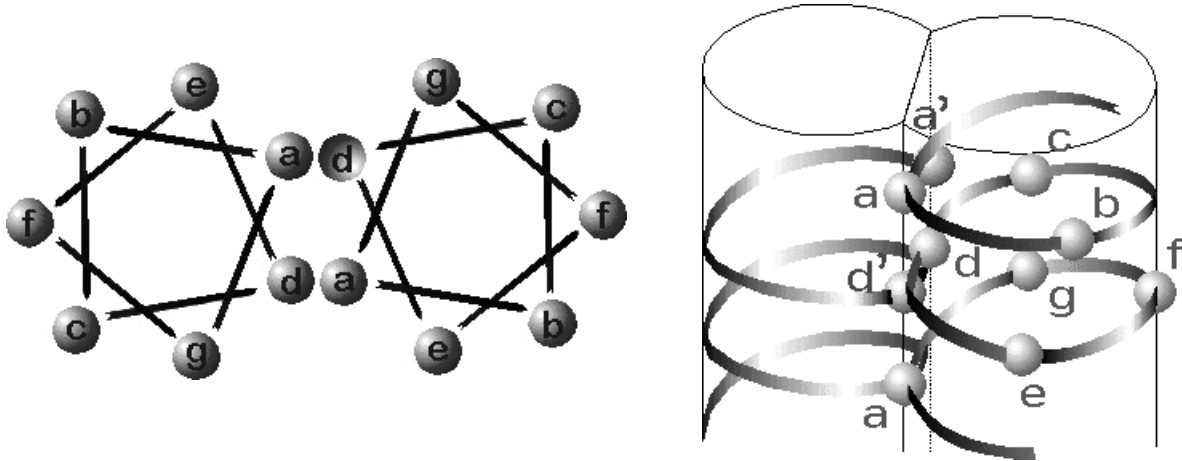
**Abb. 2.24:** *Helical wheel*; als Helixrad mit Aminosäureresten 1-18 (links); in der Punkt-Zylinder-Form (rechts)

Mit Hilfe des Helixrades können die Anordnung und die Wechselbeziehungen der Aminosäuren in einer  $\alpha$ -Helix veranschaulicht werden. Helices, deren eine Seite dem Lösungsmittel zugewandt ist, weisen oft eine charakteristische Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren auf; sie sind amphipatisch. Wie in Abb. 2.24 dargestellt, überdeckt jede Aminosäure einen Sektor von  $100^\circ$ . Die wasserstoffverbundenen Reste 1 und 5 sind sich als Teile aufeinander folgender Windungen räumlich nahe. Ähnliches gilt für die Reste 1 und 4. Während erst der Rest der 19. Aminosäure ekliptisch über der Seitenkette der 1. Aminosäure zu liegen kommt, gilt dies angenähert bereits für den zwei Windungen entfernten Rest der 8. Aminosäure. Man spricht hier von einer repetitiven Heptatabfolge (*heptade repeat*) der Form  $abcdefga'b'c'd'e'f'g'$ , wobei  $a$  dem Rest 1 und  $a'$  dem Rest 8 entspricht. Sind  $a$  und  $a'$  bzw.  $d$  und  $d'$  hydrophobe Reste, so entsteht ein linksgewundenes hydrophobes Band um den Zylinder der rechtsgängigen  $\alpha$ -Helix herum. Hierdurch werden Überstrukturen wie *coiled coils* ermöglicht.

### 2.3.3 Assoziation der $\alpha$ -Helices Bündel (*coiled coil*-Motiv)<sup>[67,68]</sup>

Kurz nach Entdeckung der Helix konnte F. H. C. Crick zeigen, dass sich  $\alpha$ -Helices gegenseitig stabilisieren, indem sich mehrere Helices in Bündeln organisieren.<sup>[69]</sup>

Lange Helix-Bündel von 100 nm und mehr sind aus vielen kurzen Einzelhelices aufgebaut, die miteinander verflochten sind und somit lange Seile bilden können, welche zur sogenannten Superspirale (*coiled coil*) führen (Abb. 2.25).



**Abb. 2.25:** Aminosäurereste in der *coiled coil*-Struktur an sieben unterschiedlichen Positionen auf der Spirale (*heptad repeat*); das *coiled coil*-Protein enthält zwei identische antiparallele Stränge von Aminosäuresequenzen.

Innerhalb jeder Spirale zeigt jede siebte Aminosäure in die gleiche Richtung, da der Basenabstand von  $3.6 \text{ \AA}$  auf  $3.5 \text{ \AA}$  verkürzt ist, wodurch es zur Heptatabfolge *abcdefg* kommt. Jeder Strang des *coiled coil*-Motivs wird als *heptade repeat* gesehen, wobei sich *abcdefg* an sieben unterschiedlichen Positionen auf der Spirale befinden. Wenn sich zwei Stränge umeinander winden, befinden sich die Aminosäurereste der Position *a* und *d* im Inneren und stabilisieren die Struktur mittels hydrophober Kräfte und van-der-Waals Wechselwirkungen der Seitenketten. Dagegen befinden sich die Aminosäurereste *b, c, e, f* und *g* auf der Außenseite des Proteins. Position *e* und *g* sind meist polar geladen und können die Bildung von Homodimeren über elektrostatische Wechselwirkungen steuern.<sup>[70]</sup>

*Coiled coil*-Strukturen aus  $\alpha$ -Helices sind die Grundlage typischer Faserproteine, wie  $\alpha$ -Keratin, der Grundsubstanz der Haare oder Myosin, einer Komponente der Muskelfasern. Sie sind aber auch, wie z.B. beim Myoglobin, strukturgebundene Komponenten von löslichen, globulären Proteinen. Einzelne Helices können diese Aufgabe im Allgemeinen nicht übernehmen, wohl aber geordnete Aggregate aus zwei, drei, vier oder mehr Individualhelices.<sup>[68]</sup>

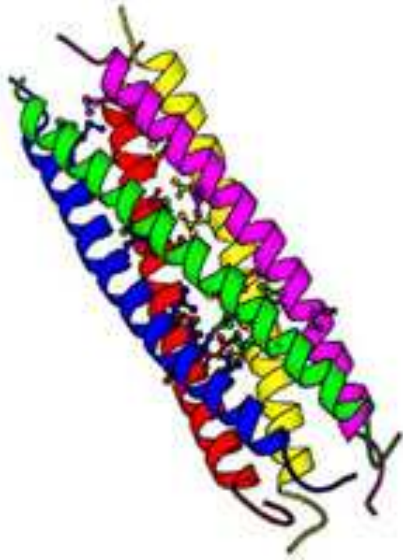


Abb. 2.26 veranschaulicht, wie sich bis zu fünf  $\alpha$ -Helices aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zu einem *coiled coil*-Motiv zusammenlagern können. Bedingung hierfür ist das Vorliegen amphipatischer Helices, die zu Wechselwirkungen befähigt sind, da die Helices an einer Seite hydrophil und an der anderen hydrophob sind. Die in Abb. 2.26 gezeigte Geometrie bewirkt dabei, dass das hydrophobe Band nicht parallel zur Helixachse verläuft, sondern die Helix in Form einer gedehnten, linksgängigen Spirale umgibt.

**Abb. 2.26:** Helix-Bündel aus vier  $\alpha$ -Helices

### 2.3.4 Helix-Vorhersage

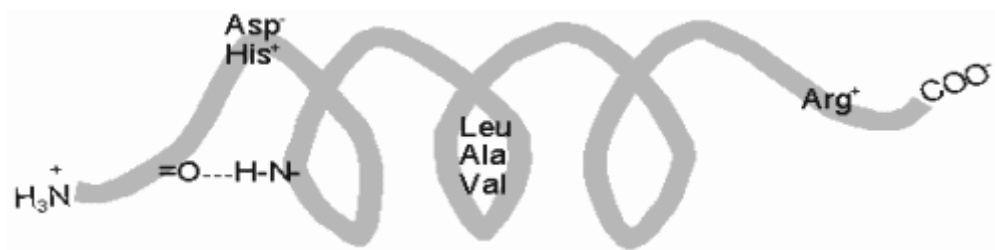
Mit der Veröffentlichung weiterer Röntgenstrukturanalysen wich der *helical wheel*-Ansatz zunehmend statistischen Verfahren. Ein früherer Ansatz dieser Art geht auf P. Y. Chou und G. D. Fasman (1974, 1978) zurück.<sup>[71,72,73]</sup> Die nachfolgende Tabelle gibt die Helixpotentiale von Aminosäuren wieder (Tab. 2.3).

Aminosäure	$P_{\alpha}$	$P_{ai}$	Aminosäure	$P_{\alpha}$	$P_{ai}$
Glu	1.53	1.45	Ile	1.00	1.22
Ala	1.45	1.59	Asp	0.98	0.53
Leu	1.34	1.91	Thr	0.82	0.75
His	1.24	0.87	Ser	0.79	0.70
Met	1.20	1.25	Arg	0.79	0.67
Gln	1.17	0.98	Cys	0.77	0.33
Trp	1.14	1.33	Asn	0.73	0.53
Val	1.14	1.42	Tyr	0.61	0.58
Phe	1.12	1.12	Pro	0.59	0
Lys	1.07	1.13	Gly	0.53	0.53

**Tab. 2.3:** Helixpotentiale ( $P_{\alpha}$  und  $P_{ai}$ ) der Aminosäuren;  $P_{\alpha}$  = Wahrscheinlichkeit, mit der ein Rest in der Helix vertreten ist;  $P_{ai}$  = Wahrscheinlichkeit, mit der ein Rest im Inneren der Helix vorkommt

Dabei spricht man von Helixbildnern, wenn das Potential ( $P_\alpha$ ) deutlich über 1 liegt und von Helixbrechern, wenn es deutlich kleiner ist. Das Potential  $P_{\alpha i}$  gibt die Wahrscheinlichkeit der Helixstruktur im Inneren wieder. Bemerkenswert ist, dass Prolin einen realen Wert für  $P_\alpha$  aufweist, im Zentrum einer Helix jedoch nicht existieren kann ( $P_{\alpha i} = 0$ ).<sup>[74]</sup>

Abb. 2.27 verdeutlicht, dass die Bildung einer  $\alpha$ -Helix dort beginnt, wo die Reste mehrerer Helixbildner zusammenkommen, darunter insbesondere Leucin, Alanin und Valin. Von diesem Nukleationszentrum ausgehend breitet sich die Struktur aus, bis ein Abbruchsignal erreicht wird. Das zwingende Abbruchsignal am N-Terminus ist hier ein Prolinrest.<sup>[68]</sup>

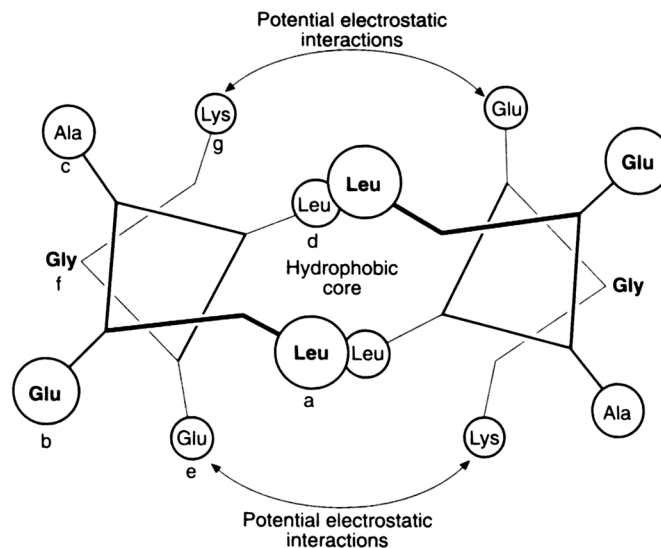


**Abb. 2.27:** Bildung einer Helix durch Nukleation



### 2.3.5 Leucin-Zipper-Motiv<sup>[75,76]</sup>

Beim Leucin-Zipper Motiv bilden zwei parallele  $\alpha$ -Helices Dimere, die die Transkription der DNA regulieren.<sup>[76]</sup> Die  $\alpha$ -Helices ordnen sich in einem Winkel von ca.  $18^\circ$  zueinander an, wobei sie sich umeinander winden. In einer  $\alpha$ -Helix befindet sich die Seitenkette an jeder 3.5ten und somit auch an jeder siebten Aminosäure auf der gleichen Seite. Sollen sich zwei Helices verzahnen, wird an jeder siebten Stelle der  $\alpha$ -Helix die hydrophobe Aminosäure Leucin eingebaut. Bei Zusammenlagerung der Helices ordnen sich die hydrophoben Leucine wie die Zähne eines Reißverschlusses an (Abb. 2.28). Es bildet sich ein Leucin-Zipper Motiv aus, das parallel oder antiparallel ausgerichtet sein kann. Der Abstand zwischen jeder siebten Aminosäure beträgt hier ca.  $10 \text{ \AA}$  und man spricht ebenfalls von *heptade repeats*.



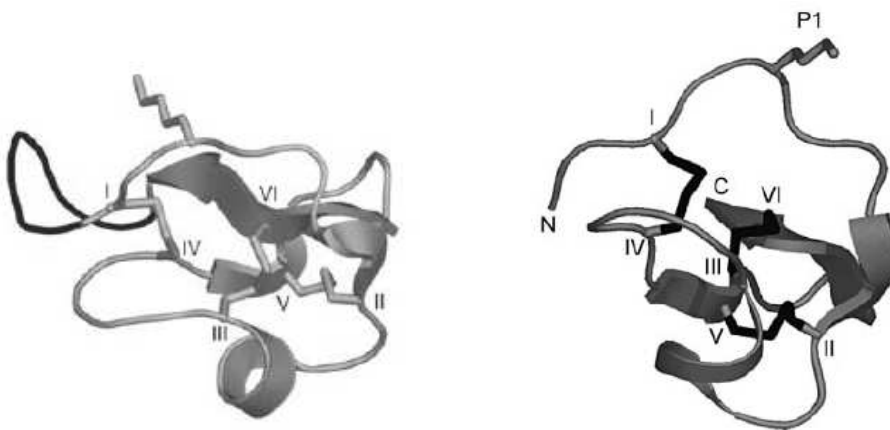
**Abb. 2.28:** Schematische Darstellung des Leucin-Zipper-Motivs; an Position *a* und *d* befindet sich jeweils das hydrophobe Leucin, an *g* und *e* die hydrophilen Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure



In Abb. 2.29 (unten) ist zu erkennen, dass die Positionen  $g$  und  $g'$  zueinander orientiert sind. In diesen Positionen wurden die Nukleoaminosäuren anstelle von Glutamin eingeführt. Die Gruppe von H. Mihara untersuchte hier unterschiedliche Sequenzvariationen und kommt zu dem Ergebnis, dass eingebaute Homoalanyl-Adenin- und Homoalanyl-Thymin-Monomere einen höheren Helixanteil induzieren und zu höherer Stabilität der Doppelstränge führen als eingebautes Glutamin. Somit tragen zusätzliche Wechselwirkungen wie hydrophobe Basenstapelungen und Wasserstoffbrückenbindungen effizient zur Bildung stabiler  $\alpha$ -Helices bei. Weitere Untersuchungen zeigen, dass Basenpaare in den Positionen  $g$  und  $g'$  effektiver die *coiled-coil*-Struktur stabilisieren als Basenpaare in den Positionen  $e$  und  $e'$ . Ebenso wurden Versuche ohne Disulfidverbrückung durchgeführt, die ebenfalls erhöhte Stabilitäten ergeben.

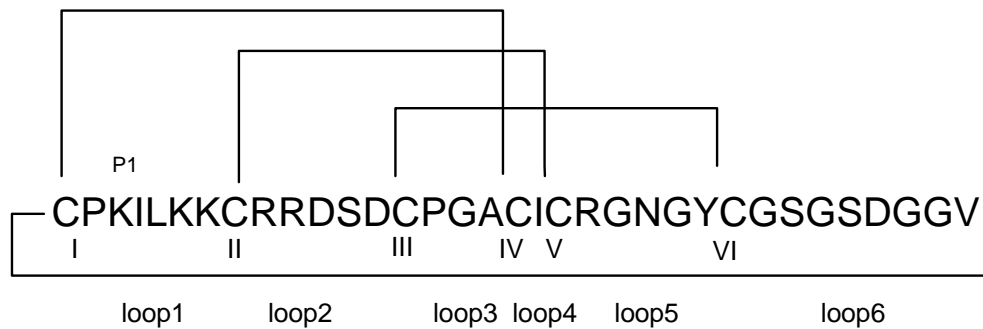
## 2.4 Trypsin-Inhibitor MCoTI-II

Zyklotide gehören zu der außergewöhnlichen Familie zyklischer Peptide mit dem Motiv des Cystinknotens.<sup>[79,80,81]</sup> Zyklotide sind kleine Proteine, die ein ungewöhnliches zyklisches Rückgrat aufweisen. Der *Momordica Cochinchensis* Trypsin Inhibitor-II (MCoTI-II) ist ein typischer Vertreter der Proteinfamilie der Inhibitor-Cystinknoten (Abb. 2.30). MCoTI-II wurde erstmals aus Samen des Kürbisgewächses *Momordica Cochinchensis* isoliert und hemmt Trypsin mit einer nanomolaren Dissoziationskonstante.<sup>[82,83]</sup> Das Peptidrückgrat des Mikroproteins MCoTI-II besteht aus 34 Aminosäureresten und bildet mit sechs Cysteinen das für Zyklotide charakteristische Strukturmotiv des Cystinknotens aus, indem zwei Disulfidbindungen mit ihren Rückgratsegmenten einen geschlossenen Ring bilden. Dieser wird von der dritten Disulfidbindung durchdrungen, was zu einem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt führt (Abb. 2.30).<sup>[79,80,81]</sup>



**Abb. 2.30:** 3D-Model des Zyklotids MCoTI-II (links) und des offenkettigen-Analogons MCoTI-29, I-VI = Disulfidbrücken<sup>[79,80,84]</sup>

Hierbei ist das erste Cystein mit dem vierten, das zweite mit dem fünften und das dritte mit dem sechsten Cysteinrest der Polypeptidsequenz verknüpft. Aus Abb. 2.30 und Abb. 2.31 ist ersichtlich, dass die zwei intramolekularen Disulfidbrücken CysI-CysIV und CysII-CysV dazu führen, dass sich aus der linearen Sequenz eine Ringstruktur bildet, in der sich die dritte Disulfidbindung CysIII-CysVI befindet. Die gesamte Struktur enthält sechs Rückgratschleifen (*loop*1-6) an den Disulfidbindungen und bildet zusätzlich eine  $3_{10}$ -Helix aus (Abb. 2.30, 2.31).<sup>[79,80]</sup>



**Abb. 2.31:** Aminosäuresequenz des Trypsin-Inhibitors MCoTI-II, Disulfidbrücken-Bindungen und Schleifen (loops) des natürlichen Zyklopeptids MCoTI-II

Der Cystinknoten bildet damit ein kompaktes und stabiles Faltungsmotiv und ersetzt den hydrophoben Kern größerer Proteine. Die dadurch resultierende chemische und biologische Stabilität, die geringe Größe und die Zugänglichkeit für Strukturanalysen machen die Cystinknoten-Mikroproteine zu geeigneten Molekülen für die Erforschung biomolekularer Wechselwirkungen.<sup>[85]</sup>

Durch die thermische und proteolytische Stabilität dieses Motivs wird ein großes Spektrum an biologischer Aktivität geboten.<sup>[79,86]</sup> Es wurden bisher diverse biologische Funktionen der Zyklotide untersucht, wie die uterotische Aktivität<sup>[87]</sup>, Inhibierung der Neurotensinbindung an Zellmembranen,<sup>[88]</sup> hämolytische,<sup>[89,90]</sup> anti-HIV,<sup>[91]</sup> antimikrobielle,<sup>[90]</sup> insektizide sowie die Trypsin-Inhibitor Aktivität.<sup>[83]</sup> Zusammenfassend ist das Hauptmerkmal des Motivs das zyklische Rückgrat, ein verdrehtes Triple-Strang  $\beta$ -Faltblatt und der Cystinknoten aus drei Disulfidbindungen.

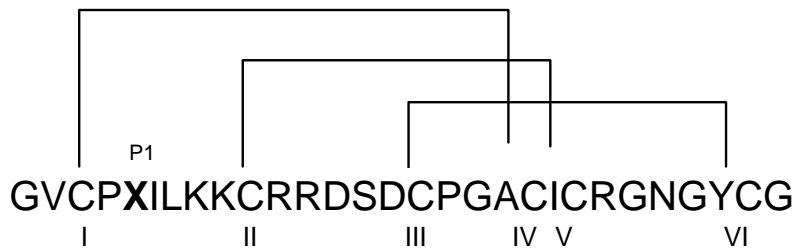
Das Reaktionszentrum bezüglich der Trypsin-Proteasen befindet sich in der ersten Schleife zwischen Cystein I und IV in der P1-Position (Abb. 2.30, 2.31). Durch den Arginin-Rest in der P1-Position wird das aktive Zentrum des Trypsins inhibiert. Die hohe strukturelle Toleranz des Inhibitor-Cystinknoten Motivs gegenüber nicht-Cystein Substitutionen macht MCoTI-II zu einem idealen Rahmenwerk für die Generierung von konformationell eingeschränkten Peptid-Bibliotheken, aus denen Varianten mit neuen Eigenschaften isoliert werden können. Die Cystinknoten gehören zu den kleinsten inhibitorischen Proteinen mit geordneter Struktur.

Da offenkettige MCoTI-II-Analoga dem zyklischen sehr ähnlich sind, wurden diese synthetisiert, um ihre biologische Aktivität zu untersuchen.<sup>[82]</sup>

Die chemische Synthese der macrozyklischen Mikroproteine wurde bislang mittels Festphasen Peptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) nach Boc-Strategie durchgeführt.<sup>[92,93]</sup> Der Wechsel von Boc- nach Fmoc-geschützter Synthese

sollte die Effizienz erhöhen. Ferner konnte dadurch auf die bei Boc-Strategie nötigen sauren Abspaltungsbedingungen verzichtet und auf mildere Reagenzien zurückgegriffen werden. Ein 14mer, welches eine Disulfidbindung aufweist, wurde im Jahr 2001 mittels Fmoc-OAI-Festphasen Strategie synthetisiert.<sup>[94]</sup>

In weiteren Arbeiten wurde die Position Lys10 gegen Arginin und nichtnatürliche Aminosäuren ausgetauscht (Abb. 2.32).



**Abb. 2.32:** Aminosäuresequenz der offenkettigen Variante MCoTI-29 und Disulfidbindungen; X = Lys, Arg

Die Inkorporation nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine wurde durch *in vitro* Translation beschrieben.<sup>[95]</sup> Andere Möglichkeiten zur Synthese des Proteins bietet neben dem enzymatischem Aufbau<sup>[96]</sup> die chemische Totalsynthese.<sup>[97]</sup>

### 3 Kovalente Verbrückung zweier Alanyl-PNA Stränge

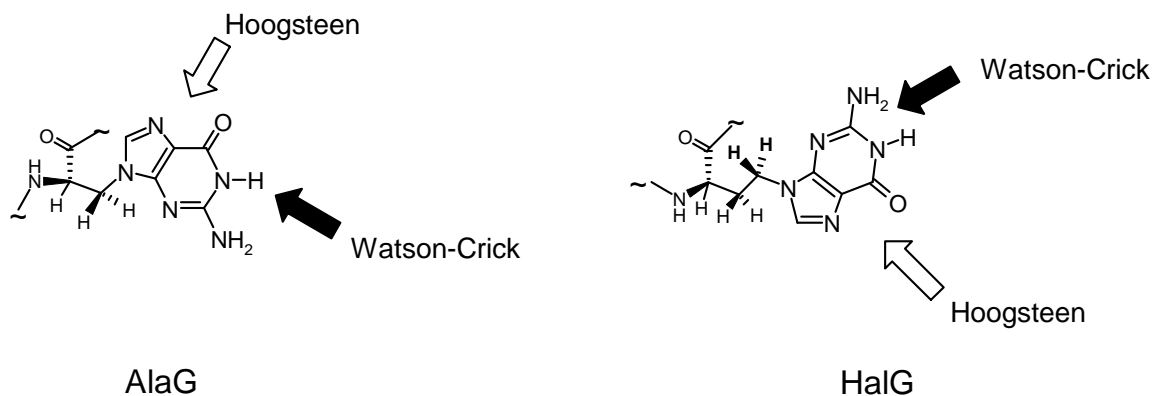
Die Imitation der Watson-Crick Paarung mittels kovalenter Verbrückung wurde in Kap. 2.2 anhand von DNA-Oligomeren erläutert. In dieser Arbeit sollte die kovalente Verknüpfung zweier komplementär gemischter Alanyl/Homoalanyl-Peptidnukleinsäure-Stränge, die aufgrund ihrer Orientierung eine Watson-Crick Basenpaarung ausbilden, untersucht werden. Der Anspruch an das eingeführte, kovalent gebundene Linker-Molekül bestand darin, durch seine Größe den idealen Abstand vorzugeben, um die Basenpaarung zu stabilisieren (siehe Kap. 2.2). Gleichzeitig sollte die lineare Peptidnukleinsäure-Duplexstruktur erhalten bleiben.

Zum Aufbau des Systems wurden zunächst zwei wesentliche strukturelle Aspekte diskutiert. Zum einen musste der Aufbau der jeweiligen PNA-Stränge in Basenwahl, Sequenzabfolge, Konfiguration und Strangorientierung so gewählt werden, dass der für das Modell stabilste Basenpaarmodus, der Watson-Crick Modus, sicher gestellt war. Zum anderen musste eine adäquate Verknüpfungseinheit für die Oligomere gefunden werden. Für den Peptidstrang wurden als komplementäre Nukleobasen ausschließlich Guanin und Cytosin gewählt, da diese im Watson-Crick Modus über drei Wasserstoffbrückenbindungen in Verbindung stehen und stabilere Komplexe ausbilden als die Adenin-Thymin Paarung mit nur zwei Wasserstoffbrücken.<sup>[17]</sup> Als Nukleoaminosäuren wurden Alanyl- und Homoalanyl-Nukleoaminosäuren verwendet, um alternierende Alanyl-/Homoalanyl-PNA Oligomere aufzubauen. Da gemischte Nukleoaminosäuren eingesetzt wurden, ist für die Watson-Crick Basenpaarung, nach Erkenntnissen vorheriger Arbeiten<sup>[17]</sup> (temperaturabhängige UV-Schmelzpunkt-messungen; Tab. 3.1), eine antiparallele Strangorientierung sowie eine alternierende Konfiguration der Nukleoaminosäure erforderlich (siehe Kap. 2.1, Tab. 2.1).

<u>GGCGCC</u>	Selbstpaarung	Enantiomerenpaarung
Ala-PNA	40 °C	58 °C (WC)
Ala/Hal-PNA	<b>52 °C (WC)</b>	<51 °C
Hal-PNA	33 °C	37 °C (WC)

**Tab. 3.1:** Vergleich der Seitenkettenhomologie bei Guanin-Cytosin Paarung; Hal = Homoalanyl; Ala = Alanyl; WC = Watson-Crick; D-konfiguriert = unterstrichen. Je höher die Schmelztemperatur  $T_m$  ist, desto stärker sind die Basenstapelungen benachbarter Basenpaare innerhalb eines Paarungsmodus.

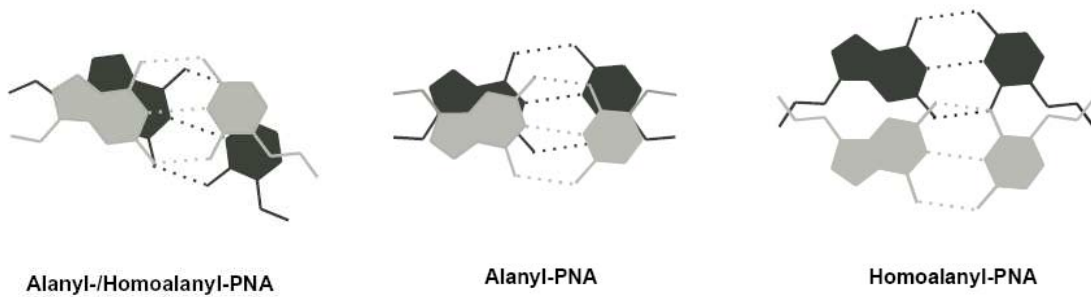
Ein wesentlicher Unterschied zwischen Alanyl- und Homoalanyl-PNA ist, dass die Basenpaare der Homoalanyl-PNA fast vollständig entstapelt vorliegen. Bei Peptidsträngen aus Homoalanyl-Monomeren werden die Nukleobasen aus der Ebene herausgedreht (Abb. 3.1, 3.2).



**Abb. 3.1:** Vergleich der Vorzugskonformationen der Alanyl(Ala)- und Homoalanyl(Hal)-PNA

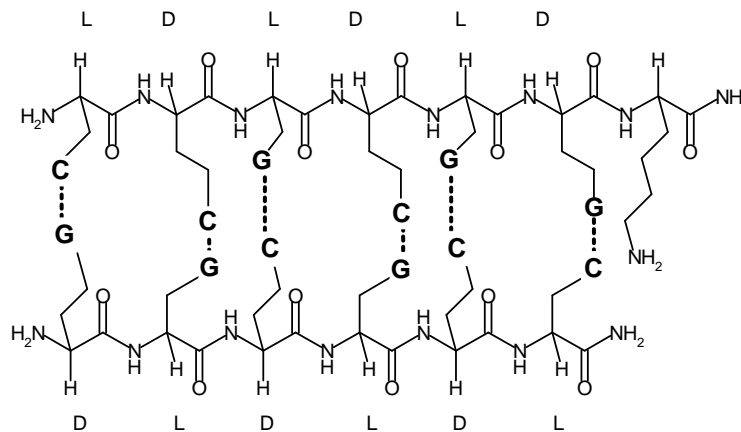
Die Ausrichtung des Stranges wird verändert, wenn in einem Alanyl-PNA Strang jede zweite Alanyl-Einheit gegen eine Homoalanyl-Einheit ausgetauscht wird, da die Nukleobase sich umorientiert. Die reine Alanyl-PNA unterscheidet sich somit von der gemischten Alanyl/Homoalanyl-PNA im veränderten Basenstapel. Der Alanyl-PNA Basenstapel weist eine größtmögliche Überlappung und entgegengesetzte Orientierung der Dipole auf, während sich der Basenstapel der alternierenden Alanyl/Homoalanyl-PNA hinsichtlich der Dipole einheitlich orientiert (Abb. 3.2). Letztere Orientierung gleicht der der B-DNA.<sup>[17]</sup>





**Abb. 3.2:** Vergleich der Alanyl/Homoalanyl-PNA mit der Alanyl-PNA und der Homoalanyl-PNA mittels Basenstapel Modellen der Guanin-Cytosin Paarung

Alternierende Alanyl/Homoalanyl-Peptidnucleinsäuren sind geometrisch so orientiert, dass eine parallele Strangorientierung gegenüber der antiparallelen benachteiligt ist. Der Abstand der Nucleobasen ändert sich im Vergleich zu den reinen Peptidnucleinsäuren hierbei nicht. Somit beträgt der ideale Abstand für die Basenstapelung der alternierenden Konfiguration auch  $3.6 \text{ \AA}$  und es können ebenfalls stabile lineare Duplexe gebildet werden.

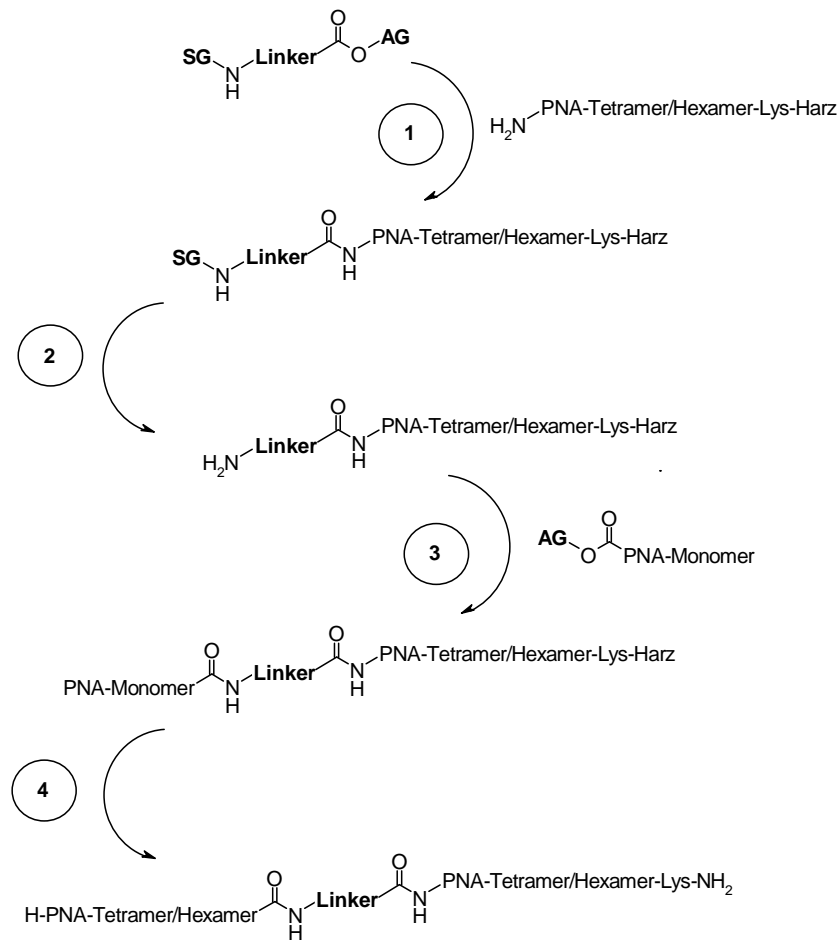


**Abb. 3.3:** Strukturmodell des verwendeten linearen, antiparallelen, heterochiralen Paarungskomplexes H-AlaC-HaIC-AlaG-HaIC-AlaG-HaIG-(Lys)-NH<sub>2</sub>

Es wurden zunächst PNA-Stränge (Tetramer- wie Hexamer-Oligomere) an fester Phase synthetisiert, die über einen Linker kovalent miteinander verbunden werden sollten (Abb. 3.4, Schritt 3 und 4; Abb. 3.5). Um die Löslichkeit der PNA zu erhöhen wurde am C-Terminus des ersten Peptidstranges Lysin eingebaut.<sup>[98]</sup>

Das Verknüpfungsmolekül soll im Idealfall eine Carbonsäurefunktion aufweisen, die mittels Aktivierungsreagenzien in eine reaktivere Spezies überführt wird, die nukleo-

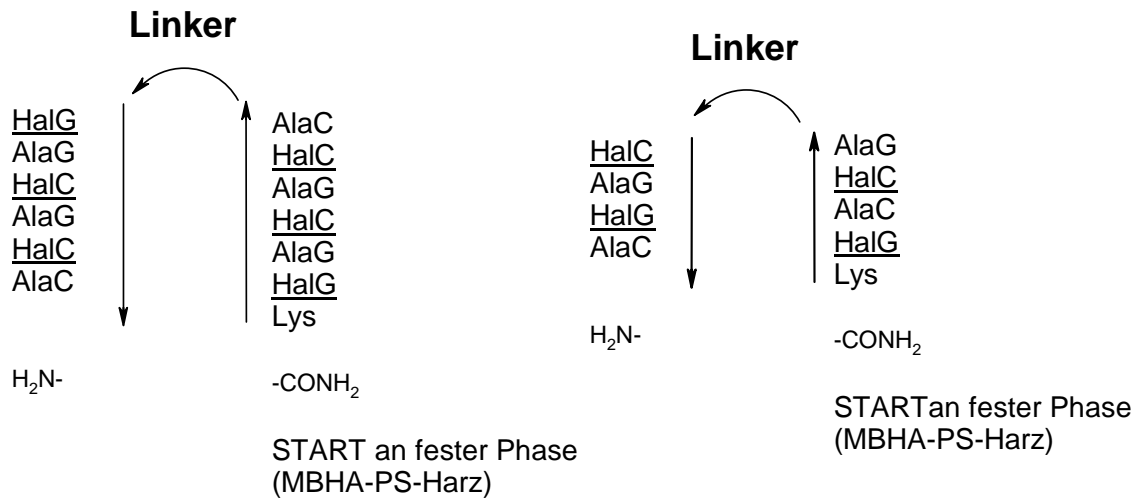
phil von der freien Aminofunktion des PNA-Stranges angegriffen und so gebunden werden kann (Abb. 3.4, Schritt 1).



**Abb. 3.4:** Schematische Darstellung der PNA-Strang-Linker-PNA-Strang Peptidfestphasen Synthese; Harz = MBHA-PS; SG = Schutzgruppe (Fmoc oder Boc); AG = Aktivierungsgruppe (HATU, HOAt); Schritte 1-4 siehe Text

Gleichzeitig muss gesichert sein, dass sich an der anderen Seite des Verbindungsmoleküls eine Aminofunktion befindet, welche allerdings bei Kupplung an den ersten PNA-Strang geschützt vorliegen muss. Als Schutzgruppe erweist sich die *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Gruppe als geeignet, da die Peptid Festphasensynthese des PNA-Stranges nach der Boc-Schutzgruppen Strategie durchgeführt wird. Ebenso möglich wäre auch eine Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe, die unter milderer Bedingungen basisch abgespalten werden kann. Nach Entschützung der Boc- bzw. der Fmoc-Schutzgruppe, sauer mit 5 % *m*-Kresol in TFA bzw. basisch mit 20 %iger Piperidinlösung in DMF oder NMP (Abb. 3.4, Schritt 2), wird eine Nukleo-

amino-säure an die freie Aminofunktion gekuppelt, die zur letzten Nukleoamino-säure des bereits kovalent gebundenen PNA-Stranges komplementär ist (Abb. 3.4, Schritt 3). Nach weiteren Kupplungsschritten bis zum vollständigen komplementären zweiten Strang kann der Komplex vom Harz abgespalten werden (Abb. 3.4, Schritt 4).

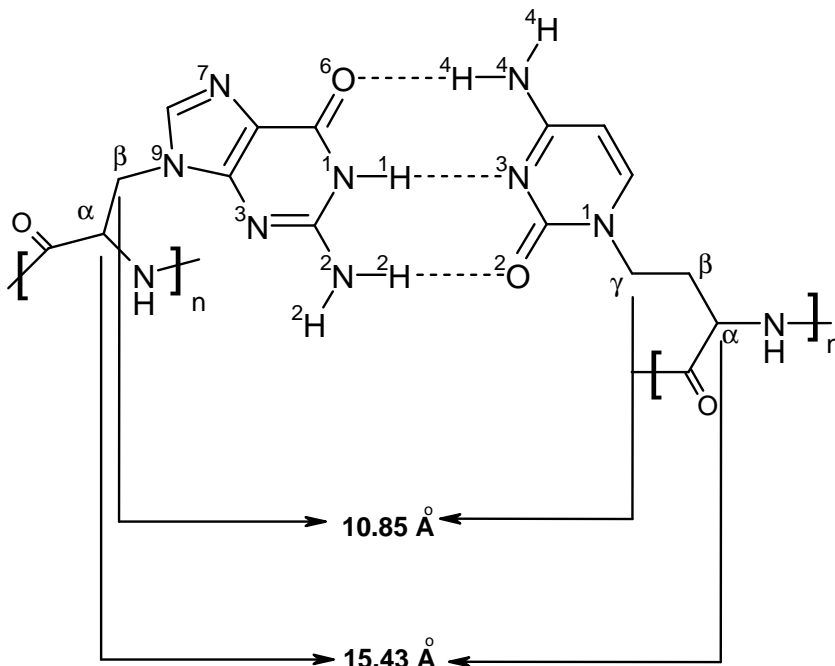


**Abb. 3.5:** Modell der kovalent verknüpften Peptidnukleinsäure-Stränge; links: als Hexamer-Oligomerstrang H-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-**Linker**-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-Lys-NH<sub>2</sub>; rechts: als Tetramer-Oligomerstrang H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-**Linker**-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub>; D-konfigurierte Nukleoamino-säuren sind unterstrichen.

Auf der Suche nach einem geeigneten Linker-Molekül muss bedacht werden, dass es nur eine geringe Flexibilität aufweisen darf, damit die beiden PNA-Stränge räumlich nicht allzu stark voneinander getrennt werden und die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen gewährleistet ist. Allerdings darf das Linker-Molekül auch nicht zu kurz sein, da dies das Auseinanderdriften der Basenpaare forcieren würde. Die Verbindung sollte die planare gestapelte Anordnung der Basenpaare so verbrücken und stabilisieren, dass die Anordnung des  $\beta$ -Faltblattes im Peptidstrang nicht verloren geht.

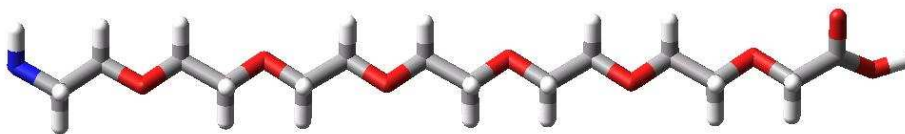
Um die Nukleobasen und ihre Wasserstoffbrückenbindungen imitieren zu können, muss der Linker eine Länge besitzen, die genau dem Abstand zweier sich gegenüberliegender C <sub>$\alpha$</sub> -Atome am Peptidrückgrat entspricht (Abb. 3.6). Die Bindungslänge von C <sub>$\beta$</sub>  des AlaG-Monomers bis zum C <sub>$\gamma$</sub>  des HalC-Monomers beträgt 10.85 Å (Abb. 3.6).<sup>[2]</sup> Für die zusätzlichen Methyleneinheiten werden jeweils 1.54 Å be-

rechnet, was zu einer Gesamtbindungslänge von 15.43 Å führt. In diesem Größenlängen-Bereich sollte sich der einzubauende Linker befinden.<sup>[99,100,101]</sup>



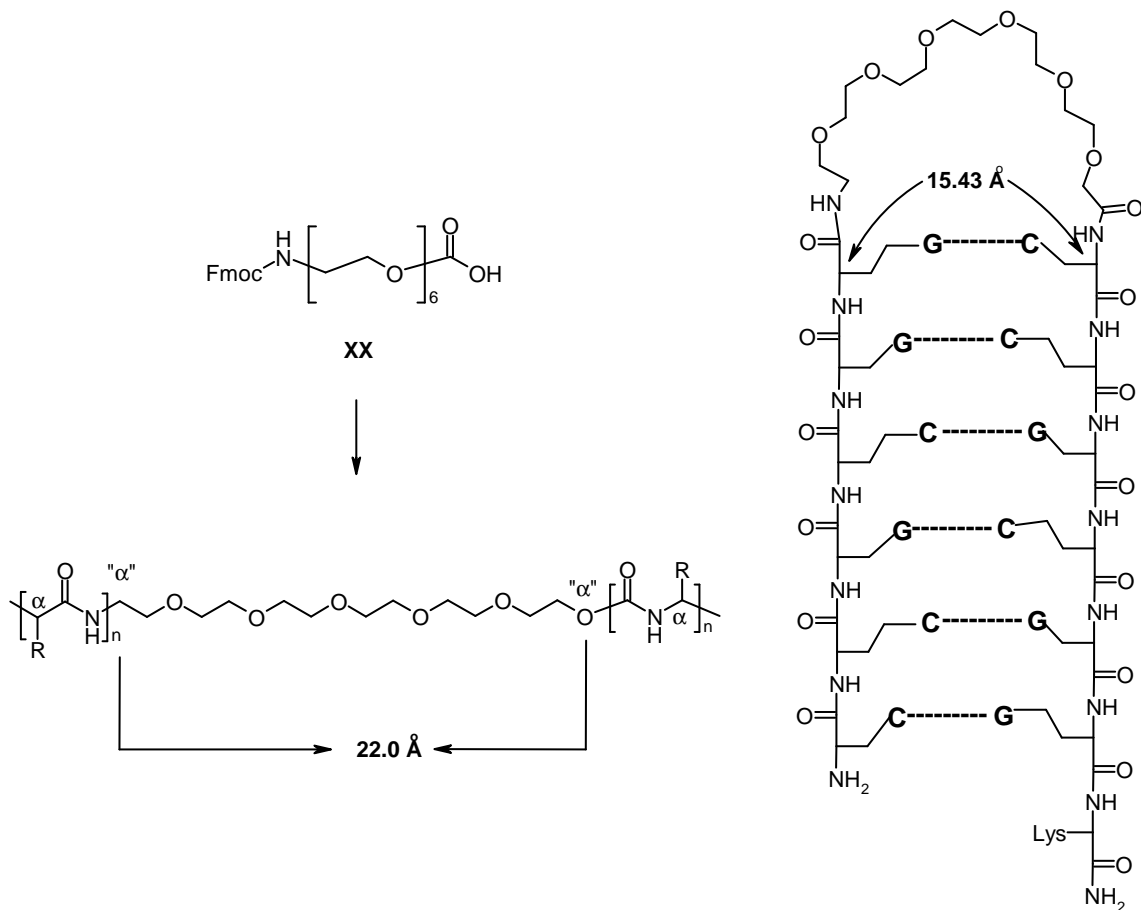
**Abb. 3.6:** AlaG-HaIC Paarung mit Bindungslängen in Å

Um eine kovalente Bindungsverknüpfung zu erreichen, wurde zunächst der aus der Literatur als *spacer* eingesetzte Fmoc-Hexaethylenglycolaminosäure (Fmoc-Hegas)-Linker **1** (Abb. 3.7) als verbrückendes Molekül gewählt und eingebaut.<sup>[102,103,]</sup>



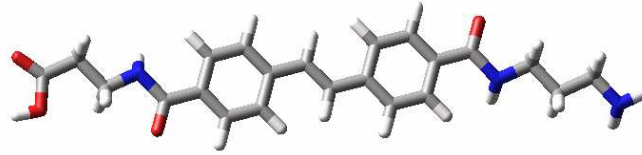
**Abb. 3.7:** Hegas-Linker **1** ohne Fmoc-Schutzgruppe

Dieser besitzt eine Fmoc-Schutzgruppe und eine Säurefunktion. Die Bindungslänge von 22.0 Å liegt um 6.57 Å höher als erwünscht (Abb. 3.8). Der Glycollinker weist jedoch wegen der Ethylenglycol-Einheiten eine Flexibilität auf, die dazu führt, dass sich die Basenpaare dennoch erkennen können.

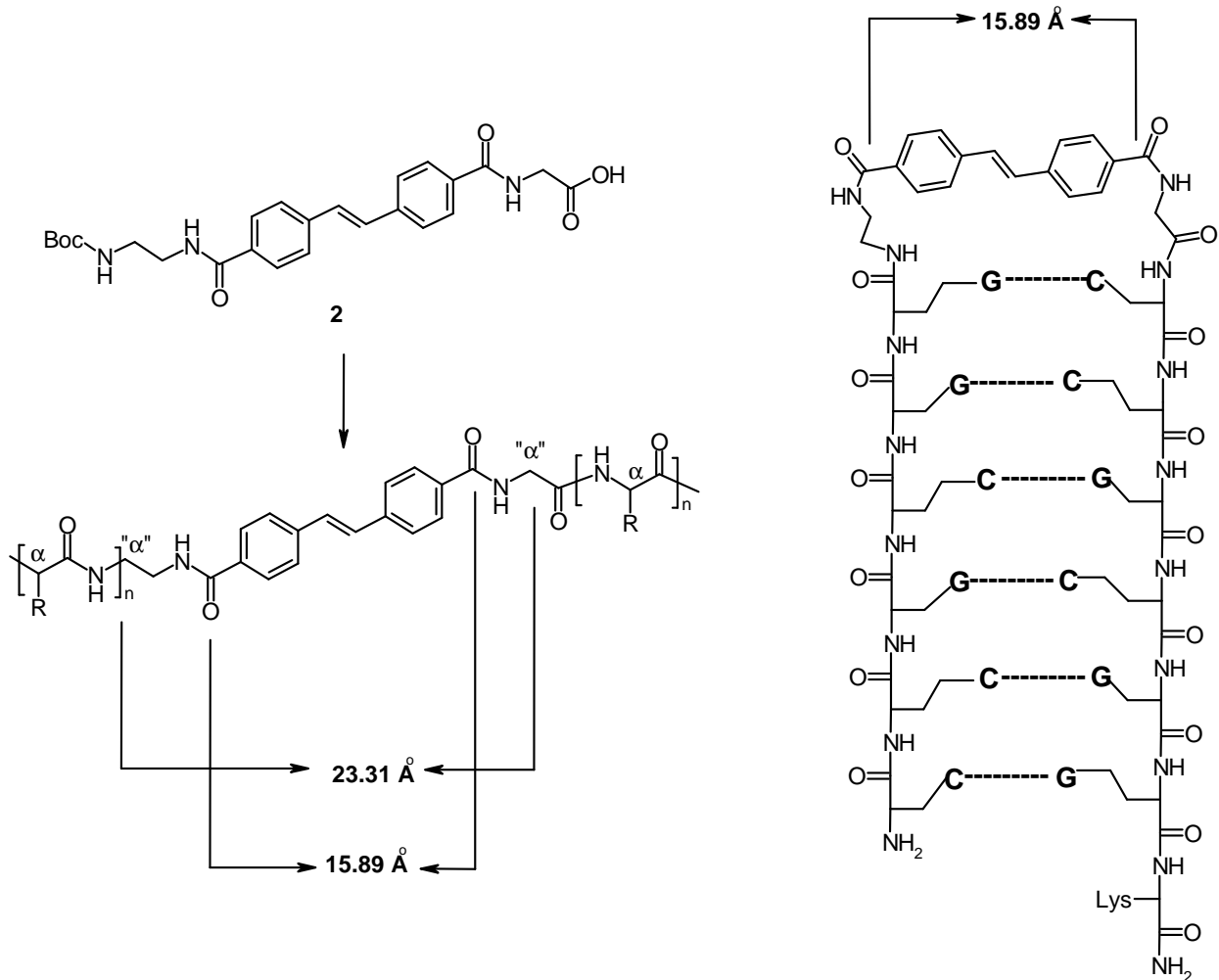


**Abb. 3.8:** Fmoc-Hegas-Linker (Fluorenylmethyloxycarbonyl-Hexaethylenglycolaminosäure) **1** und Abstand der imitierten Basenpaarung als eingebauter Linker: in gestreckter (links) und gefalteter Form (rechts) <sup>[99]</sup>

Aufgrund der mittels MacroModel<sup>®</sup> ermittelten Bindungslängen konnte als weiterer Linker ein Stilben-Derivat **2** (Abb. 3.9) modelliert werden, das den Ansprüchen der Bindungslänge weitgehend gerecht wird. Es entspricht in seiner Größe der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Purin und Pyrimidin. Die Bindungslänge vom  $C_{\alpha}$  zum  $C_{\alpha}$  beträgt in diesem Derivat zwar 23.31 Å, da der Stilben-Linker aber flexibel drehbare Methylen- bzw. Ethyleneinheiten aufweist, kann sich der Linker so ein-drehen, dass die Bindungslänge nahezu der der Basenpaarung in Abb. 3.6 gleicht (Abb. 3.10). Das Stilben-Derivat besitzt außerdem im Vergleich zum Glycol-Linker einen langen, rigiden Kern, der die Entropie der gesamten Brücke reduzieren sollte.



**Abb. 3.9:** Modell des Stilben-Derivat-Linker *trans*-Stilben-4-(carbonsäure-methylcarbamoyl)-4'-aminoethylcarbamoyl) **2** ohne Boc-Schutzgruppe



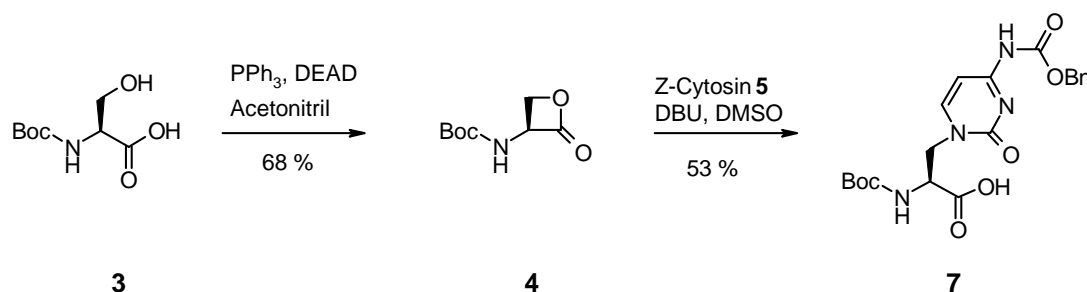
**Abb. 3.10:** Stilben-Derivat-Linker: *trans*-Stilben-4-(carbonsäure-methylcarbamoyl)-4'-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyl) **2** und Abstand der imitierten Basenpaarung als eingebauter Linker<sup>[99]</sup>

Das Stilben-Modell fungierend als Linker wurde bereits in DNA-Doppelstrang Oligomeren eingebaut und untersucht (siehe dazu Kap. 2.2). Stilben (Kap. 2.2, Abb. 2.19) ist ein starres Gerüst und sollte in der *trans*-Form vorliegen. Der Wechsel in die *cis*-Konfiguration erfolgt erst bei sehr hohen Temperaturen oder mittels photochemischer Bestrahlung.<sup>[49]</sup> Beide Aromaten sind *para*-substituiert, was eine vorteilhafte

Symmetrie ergibt. Als Substituenten wurden Carbamoylgruppen gewählt. An der einen Seite schließt sich an das Amid eine Methylencarbonsäure an, die nach Aktivierung mit bestimmten Kupplungsreagenzien, wie HATU und HOAt (genaueres siehe Kap. 3.3), an das freie Amin der Nukleoaminosäure des PNA-Stranges gebunden werden kann. Am anderen Ende ist eine Aminoethyleinheit lokalisiert, die Boc-geschützt ist. Diese kann bei der Peptid Festphasensynthese sauer abgespalten werden und im nächsten Schritt mit dem Aktivester einer neuen Nukleoaminosäure reagieren.

### 3.1 Synthese der Boc-Alanyl/Homoalanyl Nukleoaminosäuren

Ausgehend von *N*-Boc-L-Serin **3** und *N*-Boc-D-Serin **ent-3** beschreibt P. Lohse<sup>[104,105]</sup> die Synthese von Alanyl-Nukleoaminosäuren unter Erhalt des Stereozentrums. *N*-Boc-L-Serinlacton **4** bzw. *N*-Boc-D-Serinlacton **ent-4** wurde aus Boc-L-Serin **3** bzw. Boc-D-Serin **ent-3** nach J. C. Vederas unter Mitsunobu-Bedingungen<sup>[106,107,108]</sup> dargestellt. Das Boc-Serinlacton **4** reagiert mittels nukleophiler Ringöffnung durch das Benzyloxycarbonyl-geschützte Cytosin ( $C_Z$ ) **5** und dem Guanin-Vorläufer 2-Amino-6-chlorpurin zu Boc-L-AlaG-OH **6** bzw. Boc-D-AlaG-OH **ent-6** und Boc-Ala $C_Z$ -OH **7** bzw. seinem Enantiomer **ent-7** (Abb. 3.11).<sup>[13a,17]</sup> Die Schutzgruppe Benzyloxycarbonyl an der exozyklischen Aminofunktion des Cytosins ist für die nachfolgende Peptid Festphasensynthese notwendig. Das Guanin benötigt keine Schützung, da die exozyklische Aminogruppe eine äußerst geringe Nukleophilie aufweist.<sup>[13a]</sup>



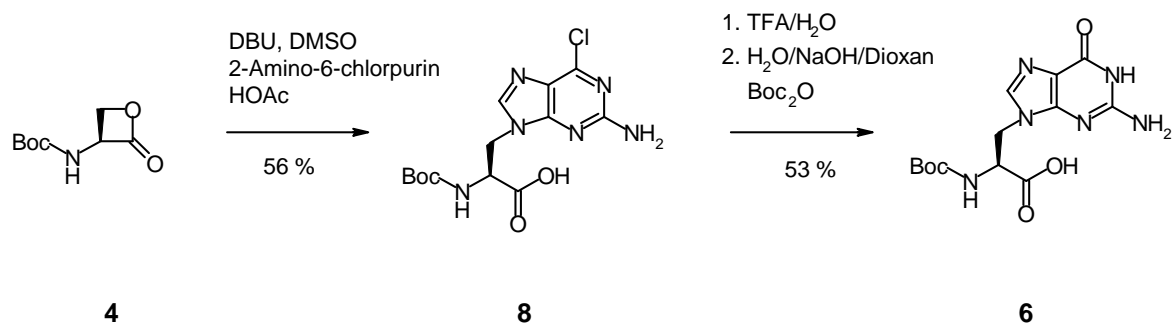


Abb. 3.11: Synthese der Alanyl-Nukleoaminosäuren

Als Ausgangsverbindung zur Synthese der Homoalanyl-Nukleoaminosäuren diente *N*-Boc-L-Asparaginsäurebenzylester **9** bzw. Boc-D-Asparaginsäurebenzylester **ent-9**.<sup>[109,110]</sup> Nach J. M. Bland<sup>[111]</sup> wurden deren Seitenketten mit BH<sub>3</sub>·THF zum Alkohol **10/ent-10** reduziert und über eine Appel-Reaktion<sup>[112,113]</sup> zum *N*-Boc-L-γ-Brom-homoalanylbenzylester **11** bzw. *N*-Boc-D-γ-Brom-homoalanylbenzylester **ent-11** bromiert (Abb. 3.12).<sup>[15]</sup>

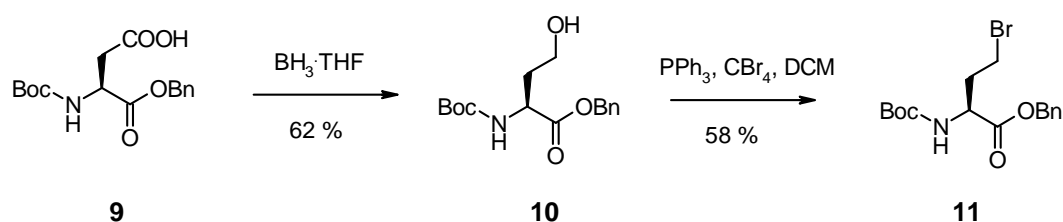
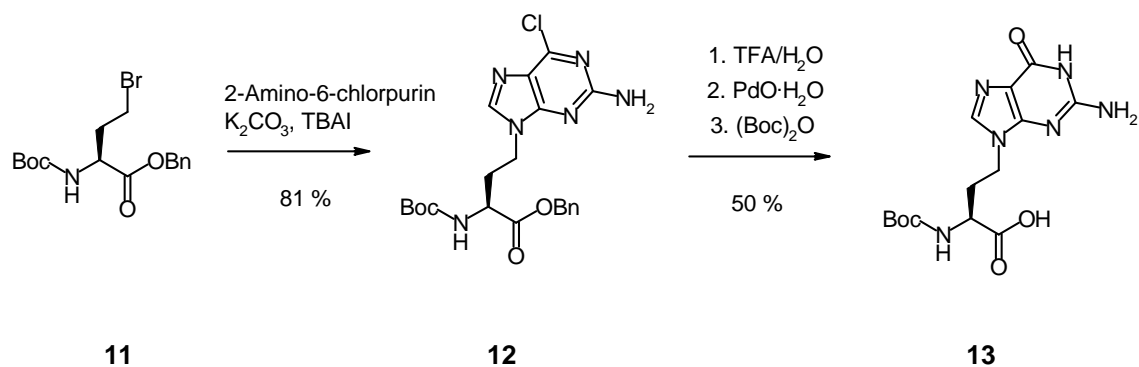


Abb. 3.12: Darstellung des *N*-Boc-γ-brom-homoalanylbenzylesters **11**

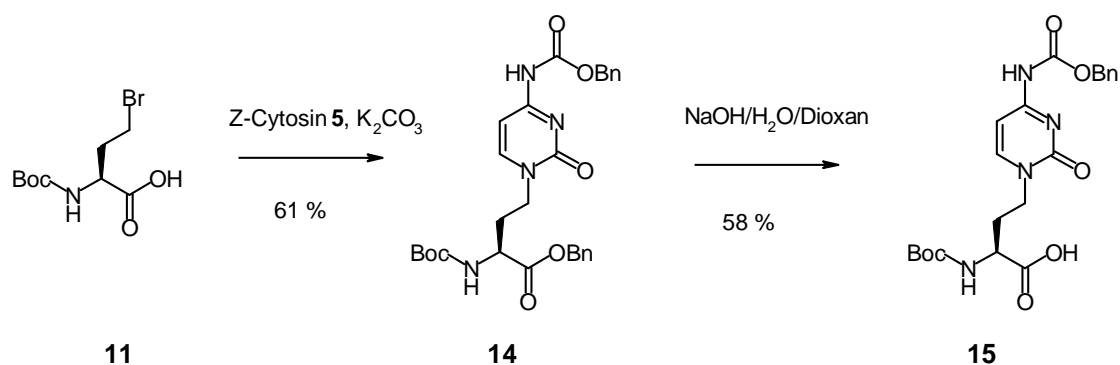
Nukleophile Substitution des Bromids mit Benzyloxycarbonyl-geschütztem Cytosin (C<sub>Z</sub>) **5** und 2-Amino-6-chlorpurin wurde in Anwesenheit von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bei Raumtemperatur durchgeführt. 2-Amino-6-chlorpurin-Derivat **12** wurde im nächsten Schritt mittels TFA/H<sub>2</sub>O hydrolysiert, wobei gleichzeitig die Boc-Schutzgruppe entfernt wurde. Der darauf folgende Schritt wurde hydrogenolytisch mit PdO·H<sub>2</sub>O durchgeführt. Schließlich wurde mit Boc-Anhydrid zum Boc-L-HaIG-OH **13** bzw. Boc-D-HaIG-OH **ent-13** geschützt (Abb. 3.13).





**Abb. 3.13:** Schematische Synthese von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyl)-homoalanin **13**

Die Schützung des Cytosins sowie das Nichtschützen des Guanins wurden bei der Synthese der Alanyl-Nukleoaminosäuren erläutert. Da der Erhalt der Benzylloxycarbonyl-Schutzgruppe der Cytosinbase erwünscht war, konnte hier keine hydrogenolytische Spaltung der Benzylgruppe erfolgen. Es wurde daher eine basische Verseifung mit NaOH/Dioxan/H<sub>2</sub>O durchgeführt (Abb. 3.14).

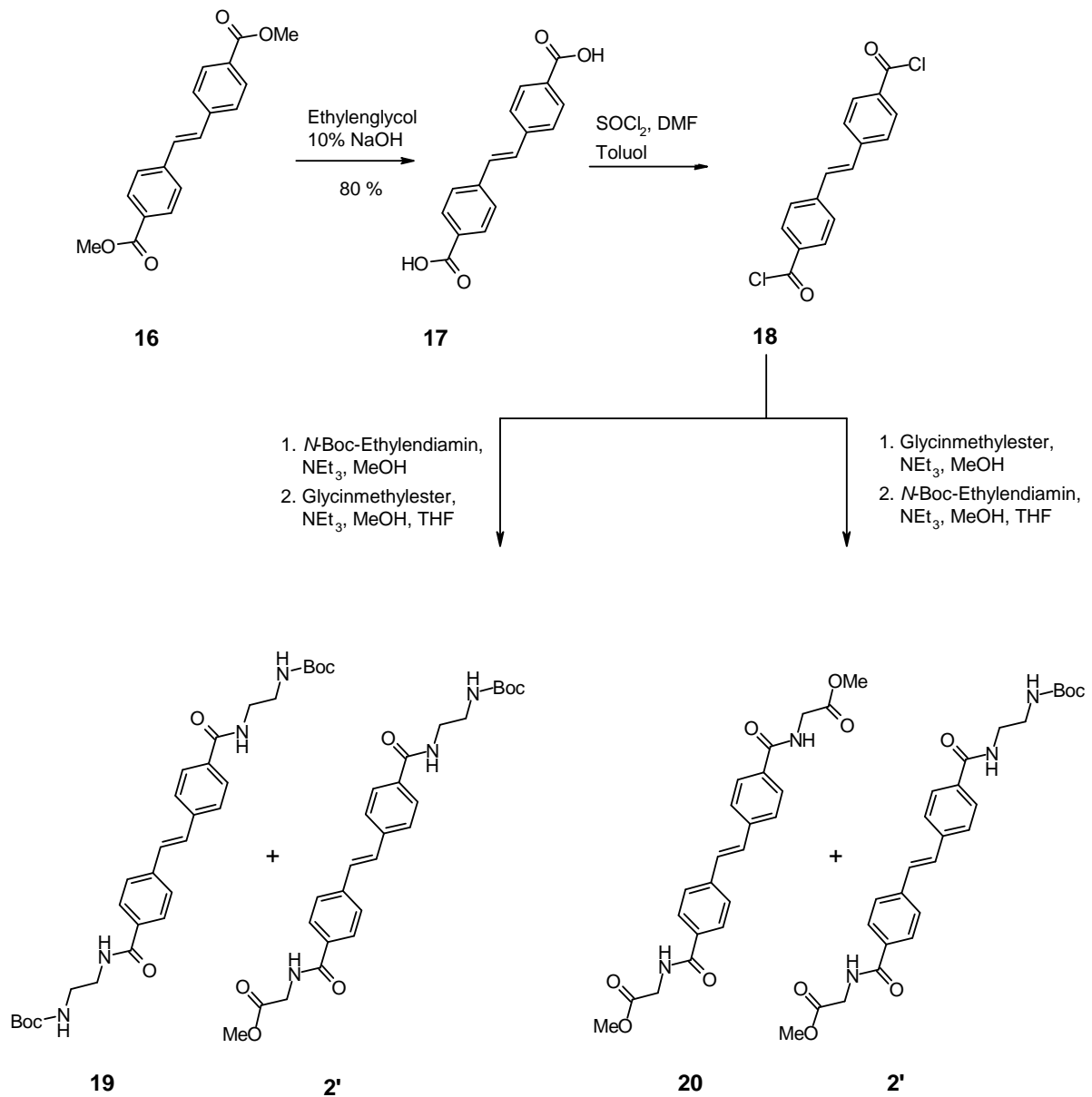


**Abb. 3.14:** Darstellung von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanylbenzylester **15**

### 3.2 Der Stilben-Linker

Die Synthese des Stilben-Linkers **2** wurde ausgehend von Dimethyl-*trans*-stilben-4,4'-dicarboxylat **16** (Abb. 3.15) gestartet. Nach dem ersten Reaktionsschritt wurde das Verseifungsprodukt 4,4'-*trans*-Stilbendicarboxylat **17** erhalten. Nachfolgende Chlorierung mittels Thionylchlorid und DMF führte quantitativ zum Säurechlorid und wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt. Im nächsten Reaktionsschritt wurde das aktivierte Säurechlorid-Derivat **18** mit *N*-Boc-Ethylendiamin und Glycinmethylester versetzt (Abb. 3.15). Abhängig von der Reihenfolge der Zugabe kam es zu Produkt-Gemischen. Wurde das *N*-Boc-Ethylendiamin zuerst zur Reaktionsmischung gegeben, konnte als Nebenprodukt ein Stilben-Derivat **19** identifiziert werden, das an beiden *para*-Enden die Boc-geschützte Diaminoethyleneinheit aufwies. Im umgekehrten Fall, d.h. bei Zugabe von Glycinmethylester als erstes Reagenz, wurde neben dem gewünschten ein weiteres Produkt **20** erhalten, das an beiden *para*-Enden einen Diaminmethylester aufwies. Trotz zusätzlicher Methylen-einheit im 4,4'-*trans*-Stilben-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyl **19** könnte diese Verbindung als Linker fungieren, da der Abstand von 15.89 Å für die imitierte Basenpaarung auf jeden Fall eingehalten wird (siehe Abb. 3.10). Nach erfolgter Trennung der Stilbenderivate würde eine Verseifung zum gewünschten *trans*-Stilben-4-(carbonsäure-methylcarbamoyl)-4'-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyl **2** erfolgen. Die Synthese erwies sich als schwierig, da es zu starken Löslichkeitsproblemen kam. Die Reaktionen wurden alle in Suspensionen durchgeführt, was die Ausbeute beträchtlich beeinträchtigte. Außerdem konnte keine Trennung der einzelnen Derivate erreicht werden.

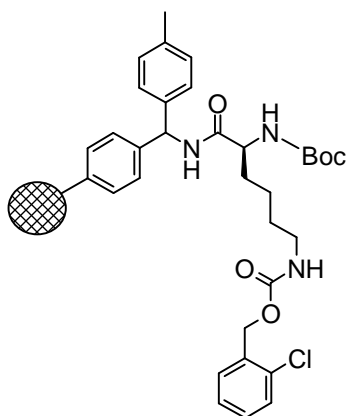
### 3 Kovalente Verbrückung zweier Alanyl-PNA Stränge



**Abb. 3.15:** Synthese der Stilben-Linker *trans*-Stilben-4-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyl)-4'-(tert-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyl) **2'**, 4,4'-*trans*-Stilben-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyl) **19** und 4,4'-*trans*-Stilben-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyl)-aminoethylcarbamoyl) **20**

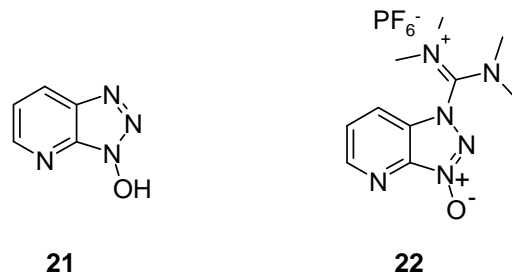
### 3.3 Synthese von PNA-Doppelsträngen mit verbrückendem Hegas-Linker

Alternierend konfigurierte gemischte PNA-Sequenzen aus Alanyl- und Homoalanyl-Nukleoaminosäuren wurden an fester Phase synthetisiert. Die Darstellung der Oligomere erfolgte manuell gemäß Peptid Festphasensynthese von *Merrifield* nach Boc-Strategie.<sup>[114,115]</sup> Diese Strategie wurde gewählt, da Boc-geschützte Nukleoaminosäuren eine bessere Löslichkeit als Fmoc-geschützte aufweisen. Als feste Phase diente das mit Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH belegte kommerziell erhältliche MBHA-PS-Harz (4-Methylbenzylhydramin-Polystyrol-Harz) mit 1 % Divinylbenzol-Quervernetzung des Polystyrols (Abb. 3.16).



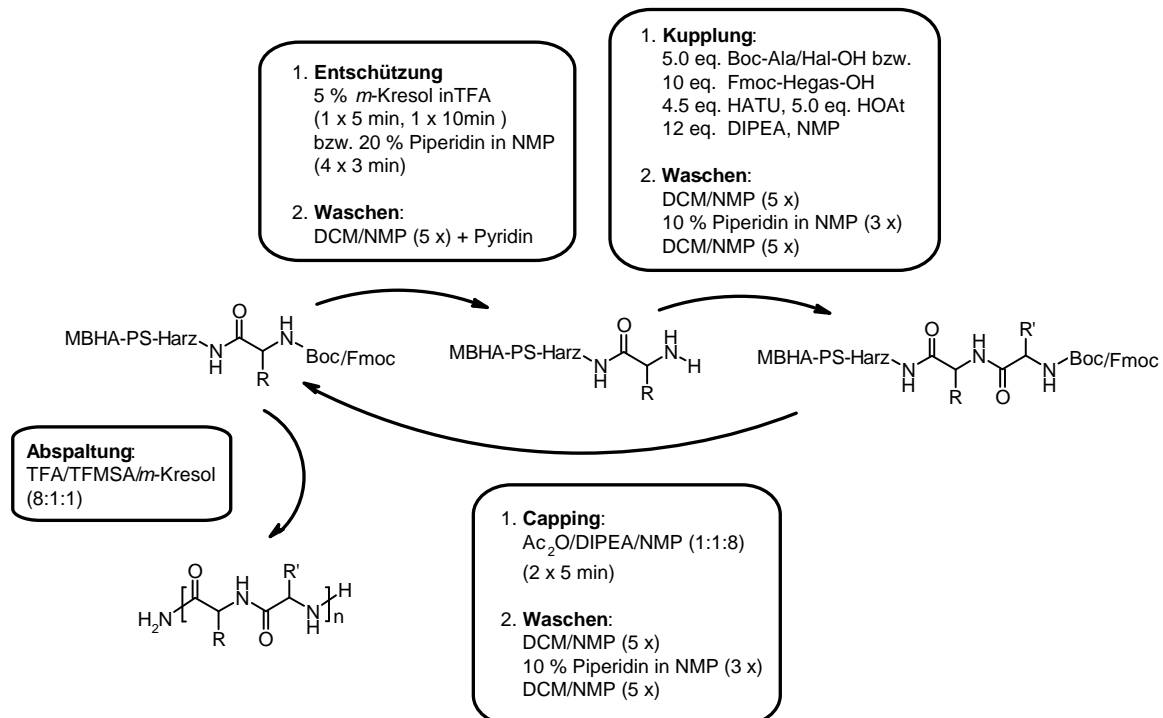
**Abb. 3.16:** MBHA-PS-Harz belegt mit Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH

Das endständige Lysinamid diente hier der Erhöhung der Oligomer-Löslichkeit.<sup>[98]</sup> Zur Aktivierung der Nukleoaminosäuren wurden HATU (*N*-(7-Aza-1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) **21** und HOAt (7-Aza-1-hydroxybenzotriazol) **22** gewählt (Abb. 3.17). Als Aktivierungsreagenz bietet HATU die Vorteile einer hohen Kupplungsgeschwindigkeit, sehr guter Ausbeute und geringer Racemisierung bei sterisch anspruchsvollen Synthesen.<sup>[116,117,118]</sup>



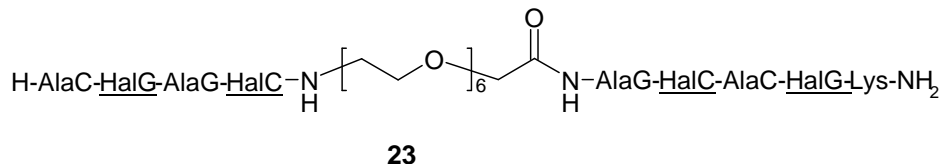
**Abb. 3.17:** Aktivierungsreagenzien; links: HOAt (7-Aza-1-hydroxybenzotriazol) **21**; rechts: HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorosphat) **22**

Vor Beginn der Synthese (Abb. 3.18) musste das Harz mindestens zwei Stunden in DCM/NMP quellen. Im ersten Schritt wurde jeweils die temporäre N-terminale Boc-Schutzgruppe durch Zugabe von TFA/*m*-Kresol (95:5) entfernt. *m*-Kresol diente als *scavenger* und fing das *tert*-Butylkation ab. Nach der Entschützung wurde mit DCM/NMP gewaschen und mit Pyridin gespült. Das Spülen mit Pyridin ist zum einen wichtig, um die Säurereste der Entschützung zu neutralisieren, die bei der Kupplung stören. Zum anderen werden die Basenpaare entstapelt, um deren Aggregationen zu verhindern.



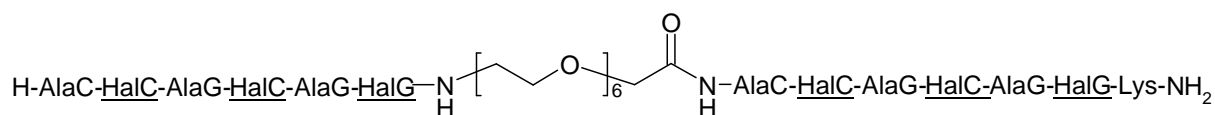
**Abb. 3.18:** Syntheseprotokoll für die Festphasensynthese der Alanyl- bzw. Homoalanyl-PNAs sowie Einführung des Linkers; R, R' = Nukleoaminosäurerest

Im nächsten Schritt wurden die Kupplungsreagenzien HATU **22** und HOAt **21** (Abb. 3.18) sowie die einzuführende Boc-geschützte Aminosäure im fünffachen Überschuss trocken zu dem Harz gegeben. Nach Lösen in NMP wurde nach drei Minuten die Base DIPEA zugegeben. Die Alanyl- und Homoalanyl-Nukleoaminosäuren mit der Nukleobase Guanin wurden zwei Stunden der Kupplungsreaktion unterzogen, die der Nukleobase Cytosin eine Stunde. Die Bildung des Aktivesters mit HATU **22** und HOAt **21** konnte anhand einer Farbveränderung der Lösung zu gelb beobachtet werden. Bei Zugabe des Aktivierungsreagenzes HATU **22** musste darauf geachtet werden, dass es nicht im Überschuss eingesetzt wurde, damit die Uroniumgruppe die Aminofunktion nicht deaktiviert. Nach der Kupplung wurde mit DCM/NMP, 10 %iger Piperidin-Lösung in NMP und DCM/NMP gewaschen, um weitere Verunreinigungen vom Harz zu spülen. Der letzte Schritt des Synthesesyklus ist der *Capping*-Schritt. Um die Bildung nicht erwünschter Peptide vorzubeugen, wurden die freien Aminogruppen mit einer Lösung von Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/NMP (1:1:8) acetyliert. Der Synthesesyklus (Abb. 3.18) wurde bis zur gewünschten Kettenlänge wiederholt.



**Abb. 3.19:** H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **23**; D-konfigurierte Nukleoaminosäuren sind unterstrichen dargestellt.

Im Falle des zu synthetisierenden Tetramer-Doppelstranges H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-**Linker**-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **23** (Abb. 3.19) wurde bis zur Nukleoaminosäure AlaG gekuppelt, im Fall des Hexamer-Oligomers H-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-**Linker**-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **24** (Abb. 3.20) bis zur Nukleoaminosäure AlaC.



24

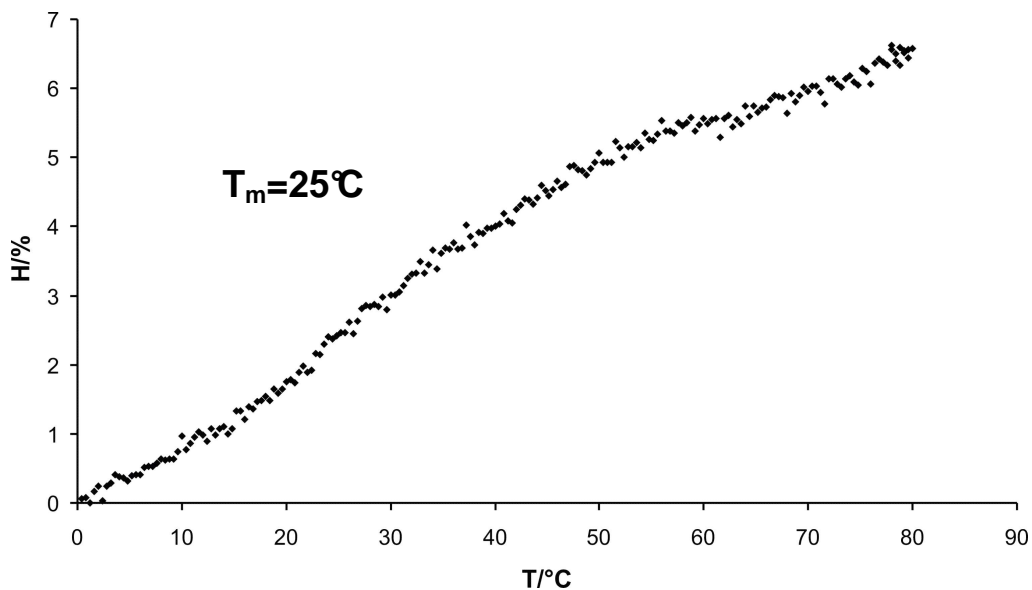
**Abb. 3.20:** H-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-[20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosäure]-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **24**; D-konfigurierte Nukleoaminosäuren sind unterstrichen dargestellt.

Der einzuführende Linker Fmoc-Hexaethylenglycolaminosäure **1** (Abb. 3.7)<sup>[119]</sup>, nachfolgend als Fmoc-Hegas-OH abgekürzt, wurde im zehnfachen Überschuss in das System eingeführt (Abb. 3.4, Schritte 1 bis 3). HATU **22** und HOAt **21** wurden hier ebenfalls zur Bildung des Aktivesters verwendet. Nach zwei Stunden Kupplung wurde gewaschen und die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 %iger Piperidin-Lösung in NMP abgespalten. Weitere Schritte wurden durchgeführt (Abb. 3.18). Nachdem alle erforderlichen Nukleoaminosäuren gekuppelt waren, wurde das fertige Peptid mit einer Mischung aus TFMSA/*m*-Kresol/TFA (1:1:8) vom Harz abgespalten. Die Oligomere wurden mit eisgekühltem *tert*-Butylmethylether ausgefällt, mittels HPLC-Chromatographie gereinigt und durch Elektrospray Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) charakterisiert. Bei der Reinigung per HPLC zeigte sich kein scharfes Elutionsprofil. Die Produktpeaks waren stark verbreitet.

### 3.4 Spektroskopische Untersuchungen

Mittels temperaturabhängiger UV-Spektroskopie wurden die Paarungskomplexe linkerverbrückter Alanyl/Homoalanyl-PNA Stränge untersucht. Die UV-Messungen geben Auskunft über die Stabilität der zu untersuchenden Komplexe und wurden im Bereich von 250 bis 280 nm durchgeführt. Dieser Wellenlängenbereich ist typisch für die elektronischen Übergänge der Pyrimidin- und Purinbasen, wobei das Absorptionsmaximum etwa bei 260 nm liegt. Das Rückgrat absorbiert in dieser Region nicht. Mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{\text{mol}}$  kann über das Lambert-Beer'sche Gesetz ( $\Delta E = \epsilon_{\text{mol}} \cdot c \cdot d$ ) die Konzentration ( $c$ ) der Oligopeptide ermittelt werden. Während der temperaturabhängigen Messung kommt es mit steigender Temperatur zum Schmelzen des Paarungskomplexes, was aufgrund der Entstapelung der Basenpaare mit einem Anstieg der Absorption einhergeht. Die nor-

mierte Absorptionzunahme  $H\%$  wird gegen die Temperatur  $T$  aufgetragen. Der sigmoide Verlauf, die Schmelztemperatur  $T_m$ , d.h. 50 % der maximalen Absorptionzunahme, und die Höhe der Hyperchromizität der resultierenden Schmelzkurve werden als Maß für die Paarungsstabilität und den Aggregationsgrad herangezogen. Vorteil dieser Spektroskopie ist die einfache und schnelle Handhabung sowie die Verwendung von nur geringen Substanzmengen. Temperaturabhängige UV-Messungen wurden in dieser Arbeit in folgenden Lösungen gemessen: 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7, 10 mM Phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )-Puffer pH 7 und MeOH. Die besten Ergebnisse wurden in Phosphat-Puffer erhalten. Die UV-Messung von H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[Hegas]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **23** ergab eine Schmelztemperatur von  $T_m = 18^\circ\text{C}$  (Anhang, Abb. 8.1), wohingegen das Hexamer H-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-[Hegas]-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **24** eine Schmelztemperatur von  $T_m = 25^\circ\text{C}$  aufwies (Abb. 3.21). Die niedrige Stabilität des Tetramers rührt daher, dass Tetramere instabiler als Hexamere sind, da sie weniger Wasserstoffbrücken ausbilden können und aufgrund der geringeren Nucleobasenanzahl der Stapelungsbeitrag reduziert ist.<sup>[17]</sup>



**Abb. 3.21:** UV-Spektrum von H-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-[Hegas]-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **24**;  $c = 12 \mu\text{M}$ , 10 mM Phosphatpuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 7;  $\lambda = 260 \text{ nm}$



Messungen der Hexamere ohne kovalente Verknüpfung, d.h. Selbstpaarungen von H-AlaG-HalG-AlaC-HalG-AlaC-HalC-Lys-NH<sub>2</sub> **25**, zeigen eine wesentlich höhere Schmelztemperatur von 52 °C. <sup>[120,121]</sup>

Auch das Tetramer H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[Hegas]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **23** zeigt eine niedrigere Stabilität im Vergleich zur Selbstpaarung eines Alanyl-Oligomers ohne kovalente Verknüpfung. H-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-Lys-NH<sub>2</sub> (c = 12 µM) **26** weist eine Schmelztemperatur von T<sub>m</sub> = 12°C auf. <sup>[13a]</sup> Die Schmelztemperatur von H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[Hegas]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **23** (T<sub>m</sub> = 18°C) ist zwar höher, aber bei dem Vergleichspeptid H-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-Lys-NH<sub>2</sub> **26** erfolgt die Paarung im *reverse* Watson-Crick Modus (siehe Kap. 2.1). Im Allgemeinen weist die Paarung reiner Alanyl-PNA eine höhere Stabilität auf, als die der Homoalanyl/Alanyl-PNA, da die Nukleobasen aufgrund der Seitenkettenlänge (Methylen statt Ethylen) geringere konformationelle Freiheit aufweisen (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.2).

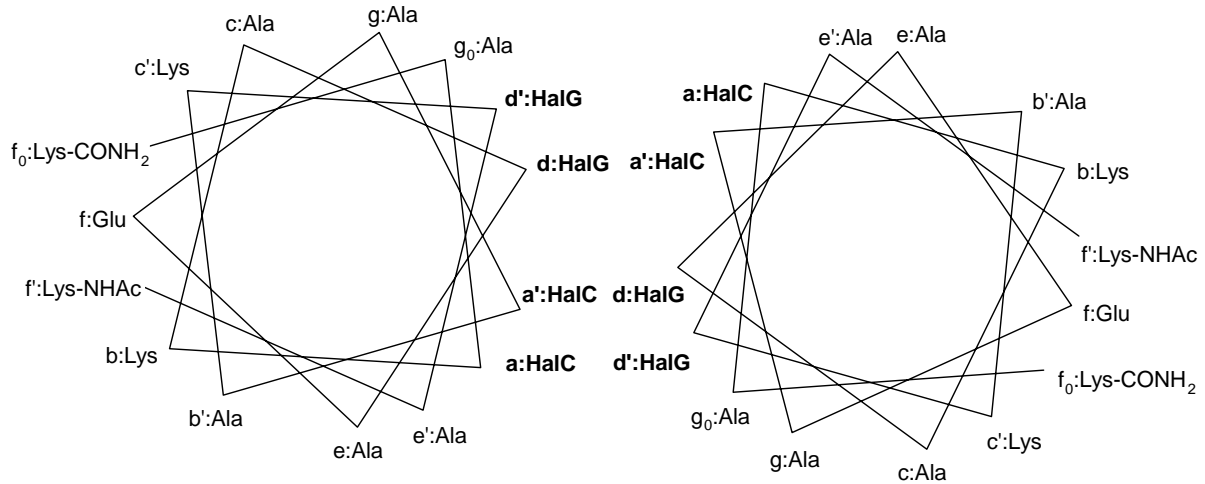
Bei beiden Oligomeren mit Linkern (Tetramer **23** wie Hexamer **24**) wurden nach UV-spektroskopischen Messungen geringere Stabilitäten bestimmt als erwartet. Der PNA-Doppelstrang wird somit durch den Glycol-Linker nicht stabilisiert, da dieser offensichtlich geometrisch einen ungünstigen Einfluß induziert.

## 4 Helikale $\alpha$ -Peptide mit Nukleobasen als Erkennungseinheit in der Seitenkette

Ein weiteres Arbeitsgebiet stellt die Untersuchung von Wechselwirkungen proteino-gener Aminosäuren mit Homoalanyl-Nukleobasen sowie von Nukleobasenpaarungen dar. Die Stabilität von  $\alpha$ -Helices gehört zu einer der wichtigsten Voraussetzungen für definierte Strukturen in Proteinen.<sup>[2,54]</sup> Diese Stabilität ist wesentlich für die Ausbildung von *coiled coil*-Strukturen (siehe Kap. 2.3.3).<sup>[67,68]</sup> Bisherige Arbeiten von H. Mihara (siehe Kap. 2.3.6) beschäftigten sich mit dem Einbau von Nukleoaminosäuren in  $\alpha$ -Helices. Hierbei wurden die Nukleobasen in Position *g* und *e* des *helical wheels* (Kap. 2.3.2) eingebaut.<sup>[77,78]</sup>

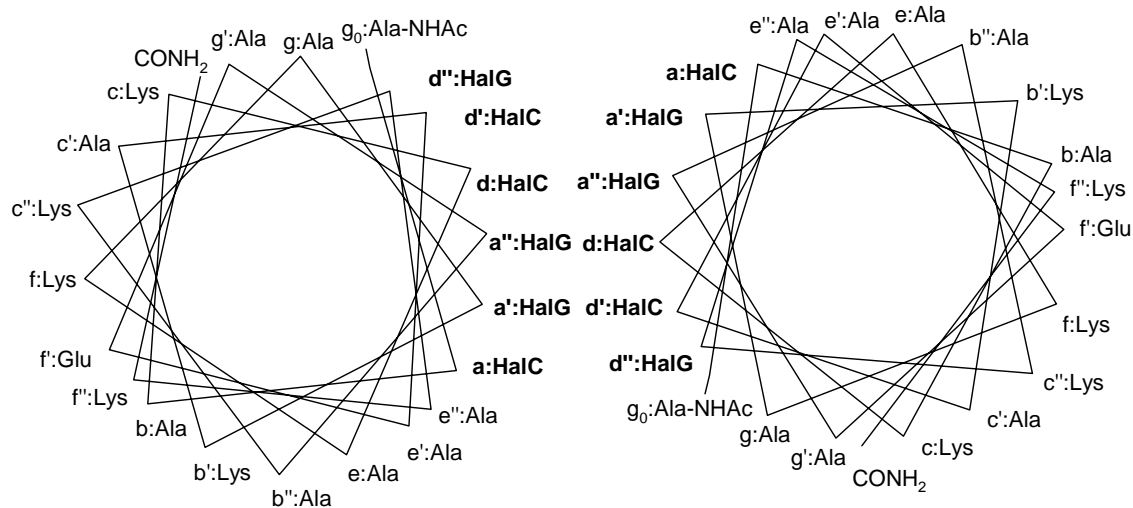
In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob der Einbau von Nukleoaminosäuren in Position *a* und *d* durch komplementäre Basenpaar-Wechselwirkungen zur Erkennung von  $\alpha$ -Helices führt. Die Nukleoaminosäuren wurden als Erkennungseinheit in  $\alpha$ -Peptidhelices inkorporiert und sollten der intermolekularen Erkennung zwischen den Peptidsträngen dienen. Die proteinogenen Aminosäuren und Nukleoaminosäuren wurden so gewählt, dass sich eine  $\alpha$ -Helix-Struktur aufbauen konnte.

Es wurden ausschließlich die Nukleobasen Guanin und Cytosin verwendet, da diese im Watson-Crick Modus drei Wasserstoffbrückenbindungen bilden und somit zu stabileren Komplexen führen als ihre Adenin/Thymin-Analoga (siehe Kap. 2.1). Die L-konfigurierten Nukleoaminosäuren  $\gamma$ -(9-Guaninyl)-homoalanin (HalG) **13** und  $\gamma$ -(1-Cytosinyl)-homoalanin (HalC) **15** wurden in Position *a* und *d* der 21mer-Sequenz Ac-A-HalC-AK-HalC-AKA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **27** und der 15mer-Sequenzen Ac-KA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalC-AK-NH<sub>2</sub> **28** und Ac-KA-HalC-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **29** eingebaut (Abb. 4.1, 4.2, 4.3; Theorie siehe Kap. 2.3.2).



**Abb. 4.1:** *Helical wheel*-Darstellung der 15mer-Sequenz Ac-KA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-KA-HalC-AK-NH<sub>2</sub> **28**; a,a' = HalC; b,b' = Lys,Ala; c,c' = Ala,Lys; d,d' = HalG; e,e' = Ala; f<sub>0</sub>,f,f' = Lys,Glu,Lys; g<sub>0</sub>,g = Ala; Ac = Acetylgruppe

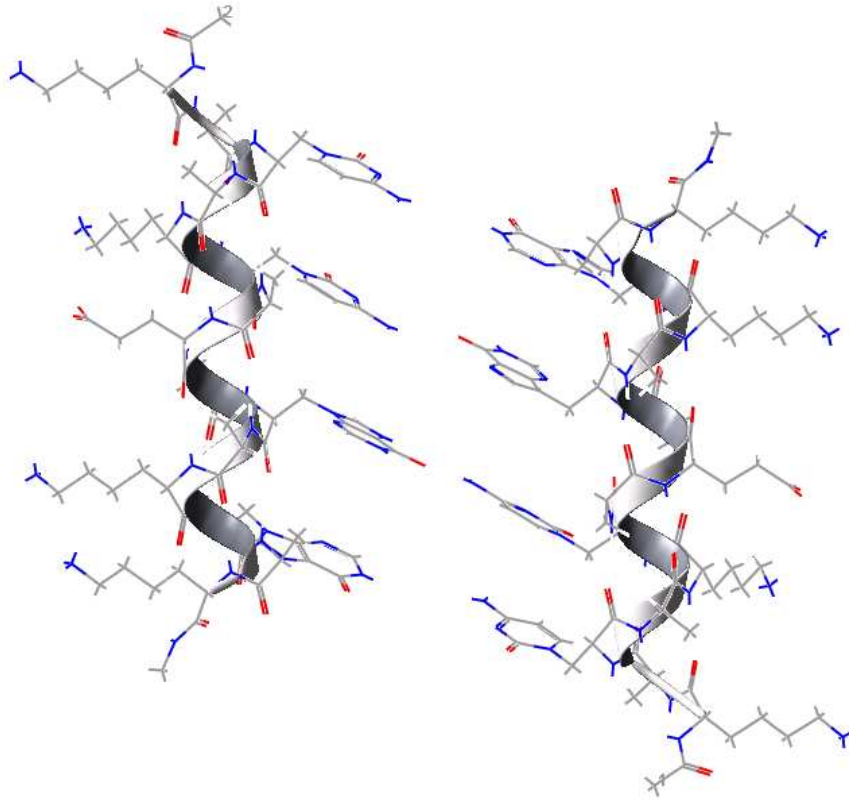
In den Positionen *a* und *d* befinden sich vorwiegend apolare Aminosäuren, wie Leucin, die hydrophobe Wechselwirkungen hervorrufen. Durch die hier eingesetzten Nucleoaminosäuren werden die Helix-Helix-Wechselwirkungen verstärkt. Werden geladene Aminosäuren in den interhelikalen Positionen *e* und *g* eingebaut, können inter- oder intrahelikale elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Um diese zu verhindern, wurden in den hier synthetisierten Peptiden an den Positionen *e* und *g* ausschließlich Alanine verwendet. An die Position *b* und *c* wurden ebenfalls Alanine inkorporiert. In den Positionen *b*, *c* und *f* wurden Lysine verwendet, während für Position *f'* Glutaminsäure gewählt wurde.



**Abb. 4.2:** *Helical wheel*-Darstellung der 21mer-Sequenz Ac-A-HalC-AK-HalC-AKA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **27**; a,a',a'' = HalC,HalG,HalG, b,b',b'' = Ala,Lys,Ala; c,c',c'' = Lys,Ala, Lys; d,d',d'' = HalC,HalC,HalG; e,e',e'' =Ala; f,f',f'' = Lys,Glu,Lys; g<sub>0</sub>,g,g' = Ala; Ac = Acetylgruppe

Die Verwendung von Lysin diente einerseits zur Verbesserung der Löslichkeit und andererseits, um eine gewisse Stabilität durch das Ausbilden einer Lysin-Glutaminsäure-Lysin-Salzbrücke hervorzurufen. Die saure Aminosäure Glutaminsäure (Position *f*) hat im Vergleich zur Asparaginsäure den Vorteil, dass sie ein stärkerer Helixbildner ist.

Die Peptidsynthese wurde an fester Phase an einem Amid-Harz durchgeführt und am Ende der Synthese wurde das Oligomer acetyliert, so dass nach Abspaltung der C-Terminus als Amid und der N-Terminus acyliert vorlag. Auf diese Weise konnten Helix-Dipol-Wechselwirkungen reduziert werden und eine ausschließliche Erkennung über die Nucleobasenpaarung untersucht werden. Es wurden 15mer- und 21mer-Sequenzen dargestellt, wobei die größere Bedeutung dem 21mer-Peptid zukommt, da nach dem *helical wheel* erst die 18. Aminosäure mit der ersten ekliptisch übereinander zu liegen kommt (Kap. 2.3.2).



**Abb. 4.3:** Modell des 15mer-Oligomers Ac-KA-HalC-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **29** (MacroModel<sup>®</sup>)

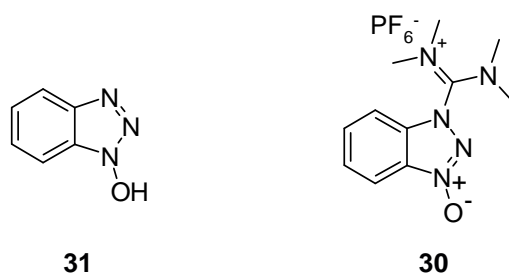
Für die Peptidsynthesen der Oligomere mit Homoalanyl-Nucleoaminosäuren sowie die der Testpeptide wurden vier unterschiedliche Methoden angewandt:

1. manuelle Boc-Peptidfestphasen-Strategie,
2. manuelle Fmoc-Peptidfestphasen-Strategie,
3. automatisierte Fmoc-Peptidfestphasen-Strategie
4. manuelle Boc-Thioligations-Strategie.

In Vorversuchen wurden zunächst Testpeptide mit ausschließlich natürlichen Aminosäuren hergestellt. Statt  $\gamma$ -(9-Guaninyl)-homoalanin (HalG) **13** wurde Tryptophan und anstelle von  $\gamma$ -(1-Cytosinyl)-homoalanin (HalC) **15** Tyrosin verwendet, da diese den Nucleoaminosäuren strukturell am ähnlichsten sind.

#### 4.1 Synthese $\alpha$ -helikaler Peptide nach Boc-Festphasen-Strategie

Das Prinzip der Boc-Festphasensynthese wurde im Wesentlichen in Kap. 3.3 erläutert. Doch im Unterschied zum vorherigen Kapitel sollen nicht nur Kupplungen unnatürlicher Aminosäuren behandelt werden. Natürliche Aminosäuren haben den Vorteil, dass sie sich besser lösen und dass die hier verwendeten Aminosäuren leichter aktivierbar sind, weshalb andere Kupplungsreagenzien verwendet werden konnten. Als Kupplungsreagenzien wurden für die Aminosäuren HBTU (*N*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) **30** und HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) **31** eingesetzt (Abb. 4.4). Die Homoalanyl-Nucleoaminosäuren wurden mit HATU und HOAt aktiviert. Als feste Phase wurde das ebenfalls in Kap. 3.3 erwähnte MBHA-PS-Harz, belegt mit Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH, verwendet.



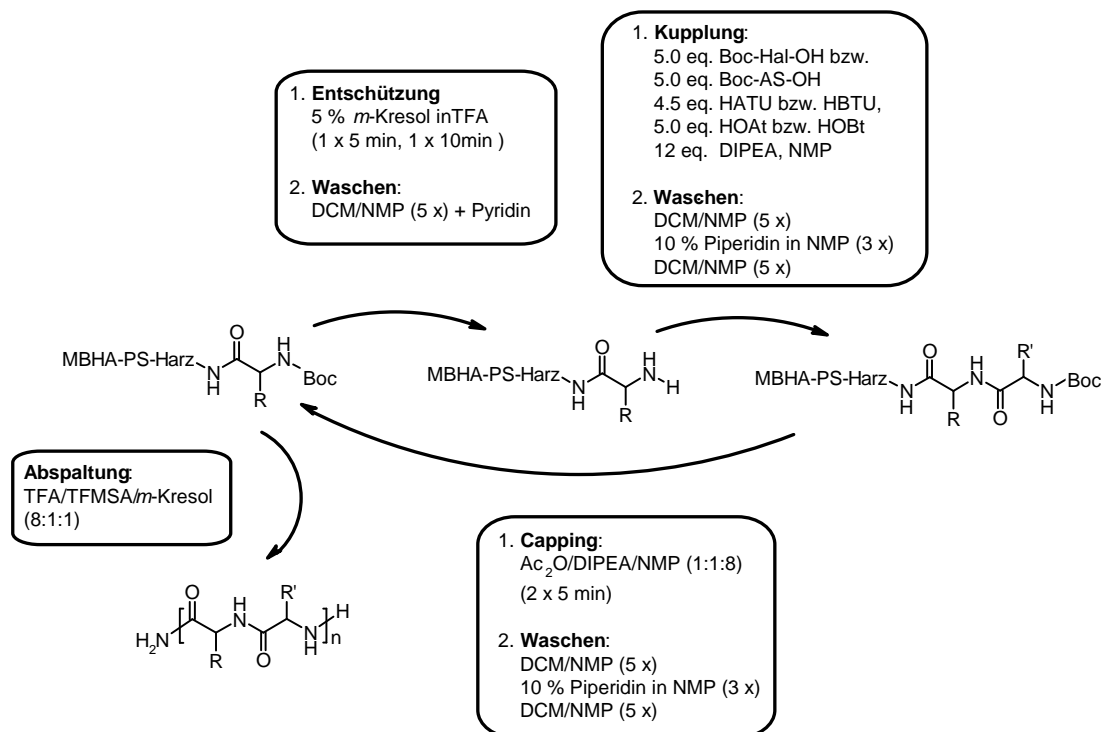
**Abb. 4.4:** Aktivierungsreagenzien; links: HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) **31**; rechts: HBTU (*N*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) **30**

In ersten Versuchen wurden die Aminosäuren sowie Nucleoaminosäuren in der Peptidfestphasen Synthese wie folgt behandelt:<sup>[122]</sup>

Entschützung:	5 % <i>m</i> -Kresol in TFA (1 x 5 min, 1 x 10 min)
Waschen:	DCM (5 x), <i>i</i> -PrOH (5 x), DCM/DMF (5 x)
Neutralisation:	80 % Triethylamin in DCM (2 x 5 min)
Waschen:	DCM (3 x), <i>i</i> -PrOH (3 x), DCM/DMF (3 x), DMF (1 x)
Voraktivierung:	Aminosäure(AS)/Nucleoaminosäure (5.0 eq.) + DMF + HBTU (4.5 eq.) + HOBt (5.0 eq.) + DIPEA (12 eq.)
Kupplung:	35 min-1.5 h (Doppelkupplung bei Trp ,Tyr und 1. AS)
Waschen:	DMF (3 x), <i>i</i> -PrOH (3 x), DCM (3 x),DCM/DMF (3 x)
Capping:	Ac <sub>2</sub> O/DIPEA/DMF (1:1:8) (2 x 10 min)
Waschen:	DCM (5 x), <i>i</i> -PrOH (5 x), DCM/DMF (5 x)

Die Synthesen nach diesem Protokoll führten zu keinem Erfolg. Dagegen hat sich die Kupplungs-Methode der Nukleoaminosäuren, wie in Kap. 3.3 beschrieben (Abb. 4.5), bewährt. Wichtig war die Verwendung von NMP als Lösungsmittel sowie die Reaktionsdurchführung in einer kleinen Säule. Wurde nicht mit Pyridin gespült, gelang die Synthese weniger effektiv. Doppelkupplungen der ersten Aminosäure sowie die von Tryptophan und Tyrosin erwiesen sich als sinnvoll. Je nach Aminosäure wurde zwischen 35 Minuten und zwei Stunden gekuppelt.

Nach dieser Methode wurde zunächst das 15mer-Testpeptid Ac-KAWKAYAEAWAKYAK-NH<sub>2</sub> **32** und anschließend die Nukleoaminosäuren-inkorporierten 15mer-Peptide Ac-KA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalC-AK-NH<sub>2</sub> **28** und Ac-KA-HalC-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **29** sowie das 21mer-Peptid Ac-A-HalC-AK-HalC-AKA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **27** hergestellt. Die Schutzgruppen der Seitenketten wurden so gewählt, dass sie gleichzeitig mit der sauren Abspaltung vom Harz entfernt werden konnten. Für Lysin wurde die Seitenkette mit (2-Cl-Z), für Glutaminsäure mit (OBn) und für Tyrosin mit (2-Br-Z)-Gruppe geschützt.



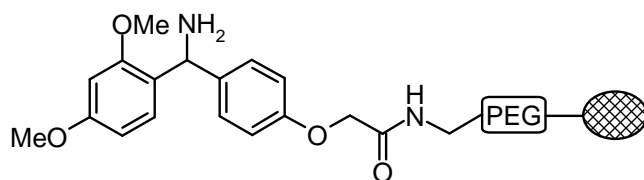
**Abb. 4.5:** Syntheseprotokoll für die Boc-Peptidfestphasen Synthese der gemischten Oligomere aus Homoalanyl-Nukleoaminosäuren und Aminosäuren; AS = Aminosäure; R,R' = Aminosäurerest

## 4.2 Synthese $\alpha$ -helikaler Peptide nach Fmoc-Festphasen-Strategie

Da die Boc-Peptidfestphasen Synthese anfänglich Probleme bereitete, wurden die Boc-Nucleoaminosäuren zu Fmoc-Nucleoaminosäuren umgeschützt, da die Fmoc-Strategie generell zu leichteren Kupplungen und höheren Kupplungsausbeuten führt. Außerdem erfolgte die HPLC-Aufreinigung der Peptide einfacher und die Testpeptide konnten ebenfalls automatisiert hergestellt werden. Dafür wurde die schlechtere Löslichkeit der Fmoc-Nucleoaminosäuren in Kauf genommen.

Nach der Fmoc-Methode wurden manuell das 15mer-Testpeptid Ac-KAWKAYAEAWAKYAK-NH<sub>2</sub> **32**, das modifizierte 15mer-Peptide Ac-KA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIC-AK-NH<sub>2</sub> **28** sowie automatisiert das 21mer-Testpeptid Ac-AYAKYAKAWKAYAEAWAKWAK-NH<sub>2</sub> **33** dargestellt.

Als feste Phase wurde für die manuelle sowie für die automatisierte Methode das Amidharz *NovaSynTGR*-Harz verwendet (Abb. 4.6). Als Seitenschutzgruppe wurde für Lysin (Boc), für Tryptophan (Boc) und für Glutaminsäure und Tyrosin (OtBu) verwendet, die mit der sauren Abspaltung vom Harz entfernt werden konnten. Die Synthese der Fmoc-geschützten Nucleoaminosäuren wird in Kap. 4.2.1 beschrieben.

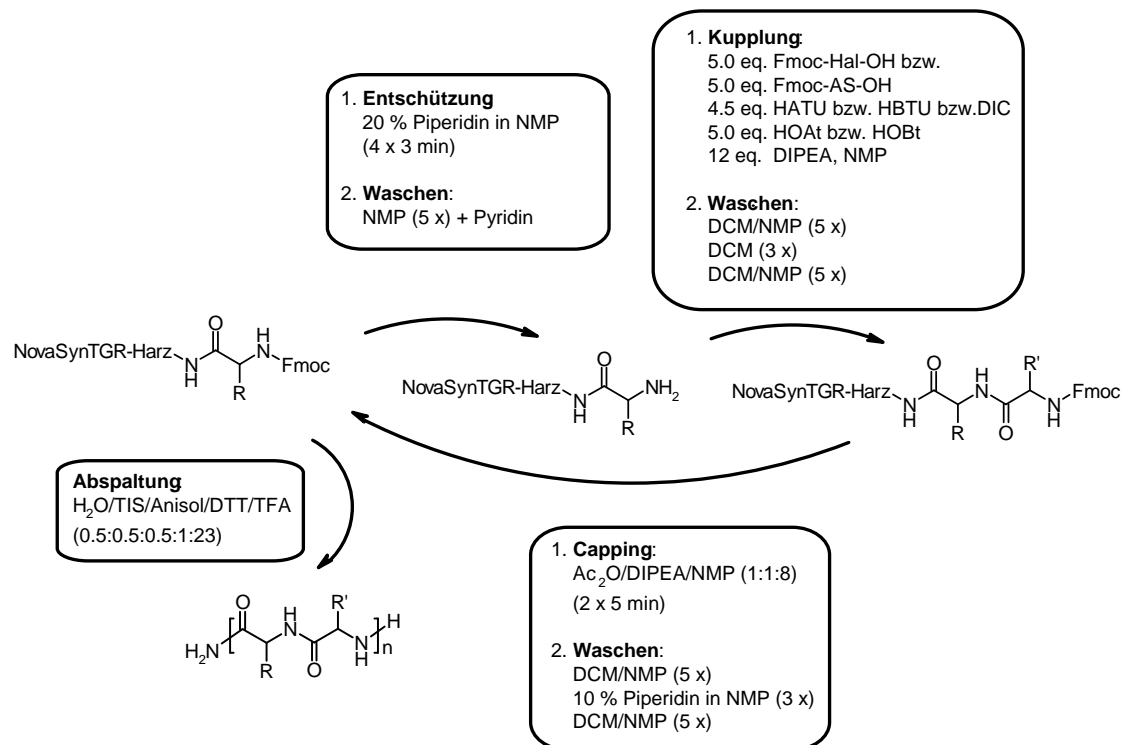


**Abb. 4.6:** Amidharz *NovaSynTGR*-Harz für die Fmoc-Peptidfestphasen Synthese

Nach zwei Stunden Quellen des Harzes in DCM/NMP wurden die Nucleoamino- bzw. Aminosäuren manuell nach dem Schema in Abb. 4.7 gekuppelt. Die Kupplungsreagenzien entsprachen bis auf einige Ausnahmen den der Boc-Strategie in Kap. 3.3. Die Doppelkupplung der ersten Aminosäure wurde mit DIC und HOBt **31** als Aktivierungsreagenzien für die erste Kupplung durchgeführt. Die zweite Kupplung erfolgte wie beschrieben mit HBTU **30** und HOBt **31**. Für Tryptophan wurde eine Doppelkupplung durchgeführt. Die Entschützung verlief basisch mit 20 %iger Piperidin-Lösung in NMP und die Kupplungszeiten variierten von 35 Minuten bis zu zwei Stunden. Die Kupplungszeiten der Fmoc-Nucleoaminosäuren waren analog zu



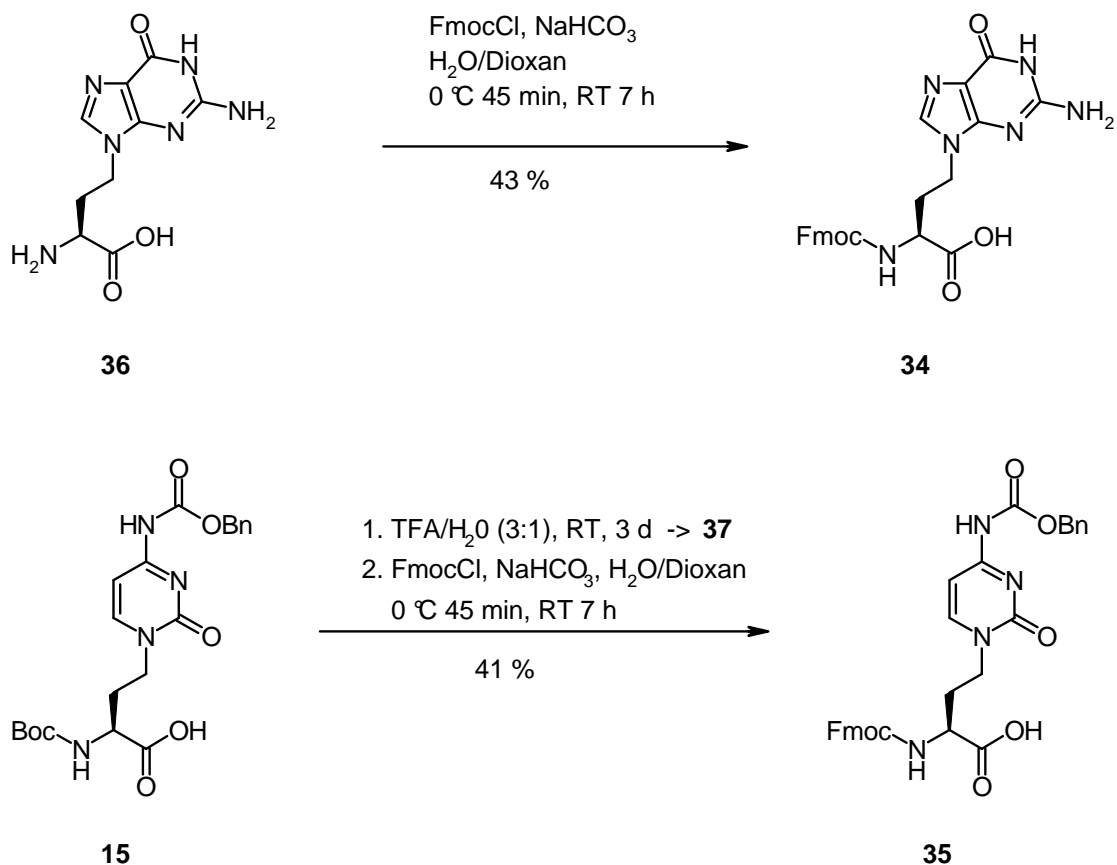
denen der Boc-Nucleoamino-säuren (Kap. 3.3). Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit einer Lösung von H<sub>2</sub>O/TIS/Anisol/DTT/TFA (0.5:0.5:0.5:1:23).



**Abb. 4.7:** Syntheseprotokoll für die manuelle Fmoc-Peptidfestphasen Synthese der gemischten Oligomere aus Homoalanyl-Nucleoamino-säuren und Aminosäuren; AS = Aminosäure; R,R' = Aminosäurerest

#### 4.2.1 Synthese der Fmoc-Homoalanyl-Nucleoamino-säuren

Die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe ermöglicht im Vergleich zur bisher etablierten Boc-Chemie<sup>[13a,16]</sup> mildere und schnellere Entschützungs- und Kupplungsbedingungen. Die Synthese der Fmoc-geschützten Nucleoamino-säuren *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyl)-L-homoalanin (Fmoc-L-HalG-OH) **34** und *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-L-homoalanin (Fmoc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH) **35** erfolgte analog der Darstellung der entsprechenden Boc-geschützten Nucleoamino-säuren (Kap. 3.1). **12** wurde mit TFA/H<sub>2</sub>O sauer hydrolysiert und nach Reduktion mittels PdO·H<sub>2</sub>O konnte L-HalG-OH **36** erhalten werden.



**Abb. 4.8:** Darstellung von Fmoc-geschützten Homoalanyl-Nucleoamino-säuren; oben: *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyl)-L-homoalanin (Fmoc-L-HalG-OH) **34**; unten: *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-L-homoalanin (Fmoc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH) **35**

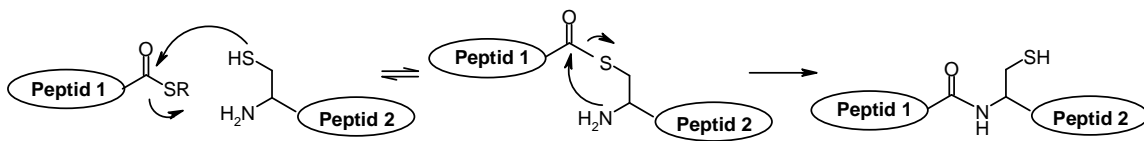
Unter Bedingungen nach Schotten-Baumann wurde L-HalG-OH **36** bzw. L-HalC<sub>Z</sub>-OH **37** mit Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FmocCl) und NaHCO<sub>3</sub> als Base zu den Fmoc-geschützten Verbindungen **34** sowie **35** umgesetzt.<sup>[123]</sup> Der Synthese von *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-L-homoalanin (Fmoc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH) **35** ging eine Entschützung von **15** mittels TFA/H<sub>2</sub>O voraus (Abb. 4.8).

Es musste darauf geachtet werden, dass der pH-Wert nicht unter pH 7 sank, da durch Protonierung der freien Aminofunktion die Nucleophilie nicht mehr für die Reaktion mit dem Carbonylchlorid ausgereicht hätte. Der pH-Wert durfte auch nicht zu basisch sein, da es unter diesen Bedingungen zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gekommen wäre.

Durch die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe besteht unter den gewählten Bedingungen die Gefahr der Dipeptidbildung. Diese kann durch hohe Verdünnung und einem nur geringen Überschuss an FmocCl vermindert werden.

### 4.3 Synthese $\alpha$ -helikaler Peptide mittels Boc-Thioester Ligation

Eine andere Methode, die gewünschten Oligomere aufzubauen, stellt die native chemische Ligation dar. Diese basiert auf der Reaktion zwischen einem Thioester und einem Cystein in der Seitenkette eines Peptides zu einer Amidbindung.<sup>[124,125,126]</sup> Der erste Schritt ist die chemoselektive *trans*-Thioveresterung eines ungeschützten C $_{\alpha}$ -Thioester-Peptides mit einem N-terminalen Cystein eines zweiten Peptides. Der gebildete Thioester unterliegt einem spontanen S $\rightarrow$ N-Acyltransfer, der zur nativen chemischen Peptidbindung führt (Abb. 4.9).<sup>[127]</sup>



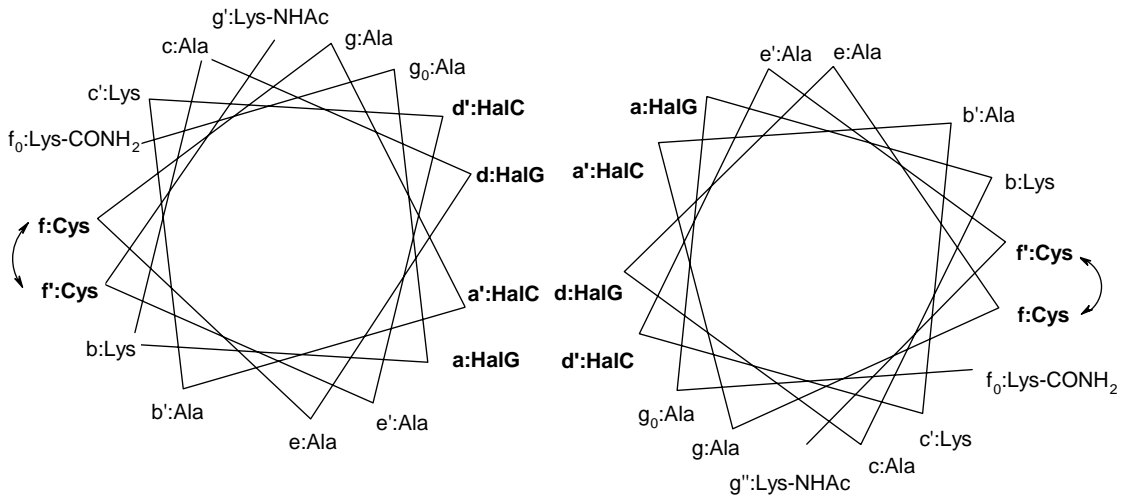
**Abb. 4.9:** Schematische Darstellung der nativen chemischen Ligation

Zusätzliche Cysteingruppen in den Peptiden können Disulfidbrücken bilden und zur Stabilisierung helikaler Peptide führen. Dafür sollten sich die Cysteingruppen in den Positionen  $f$  und  $f'$  befinden (*helical wheel* in Abb. 4.10).

Das ursprüngliche 15mer-Peptid Ac-KA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIC-AK-NH<sub>2</sub> **28** bzw. das Testpeptid Ac-KAWKAYAEAWAKYAK-NH<sub>2</sub> **32** wurden daher wie folgt modifiziert: Statt der Glutaminsäure wurde ein Cystein eingesetzt und zwischen dem Lysin und dem Alanin am N-Terminus zusätzlich ein Cystein eingebaut, so dass sich die nun 16mer-Zielsequenz ergab:

Ac-KCA-HaIC-KA-HaIG-ACA-HaIC-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **38** (Abb. 4.10) bzw.

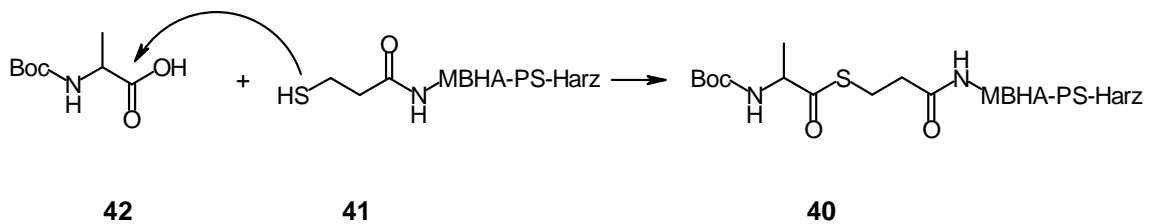
Ac-KCAYKAWACAYAKWAK-NH<sub>2</sub> **39**



**Abb. 4.10:** Helical wheel-Darstellung der 16mer-Sequenz Ac-KCA-HaIC-KA-HaIG-ACA-HaIC-KA-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **38**

Die Darstellung erfolgte nach folgendem Schema:

1. Herstellung des Boc-Ala-Thioester-MBHA-PS-Harz **40**: Nach der Synthesevorschrift von J. P. Tam und Y.-A. Lu wurde zuerst **41** am MBHA-PS-Harz mit Mercaptopropionsäure hergestellt.<sup>[128]</sup> Anschließend wurden Boc-Ala-OH **42** und Kupplungsreagenzien dazugegeben (Abb. 4.11).

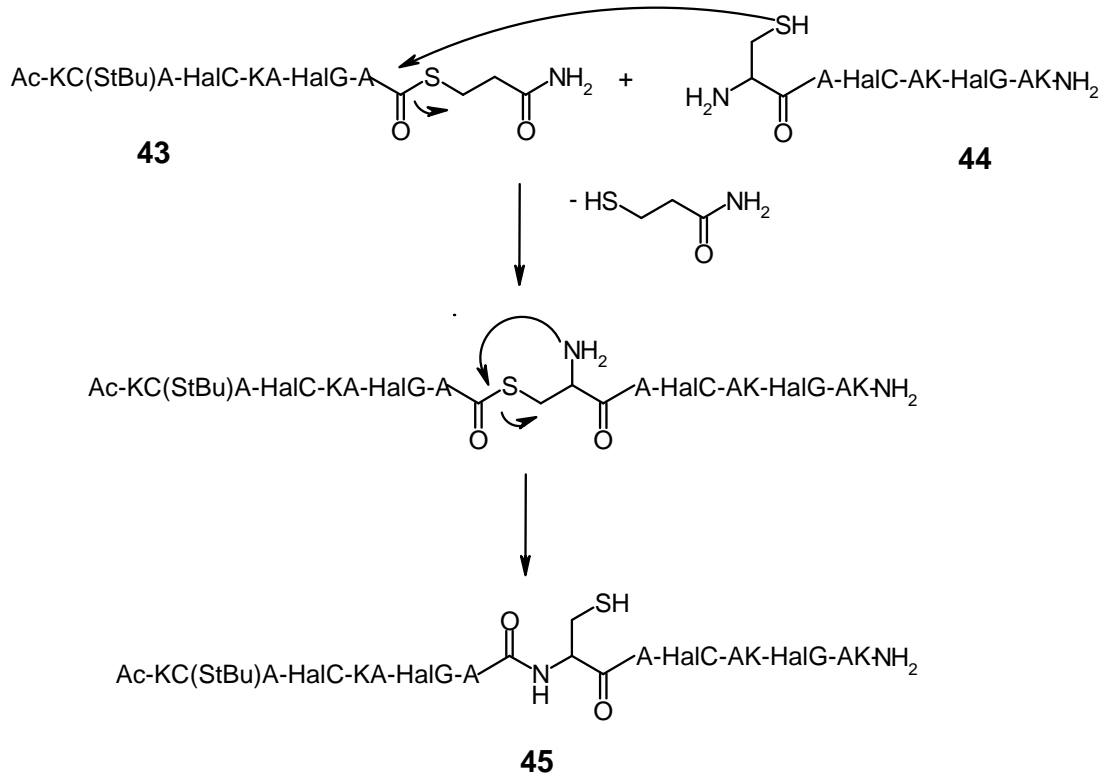


**Abb. 4.11:** Synthese des Thioesters **40**

2. Via Peptidfestphasen Synthese wurde das Fragment Ac-KC(S $\bar{t}$ Bu)A-HaIC-KA-HaIG-A-Thio-NH<sub>2</sub>-MBHA-PS-Harz **43** synthetisiert und sauer vom Harz abgespalten. Die Cystein-Schutzgruppe (S $\bar{t}$ Bu) sollte nicht sauer abgespalten werden, so dass es zu keinen Konkurrenzreaktionen während der folgenden Ligation kommen konnte.
3. Gleichzeitig wurde das folgende zweite Peptid ebenfalls am MBHA-PS-Harz hergestellt und abgespalten: H<sub>2</sub>N-CA-HaIC-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **44**. Das Cystein wurde

mit *p*-Methoxybenzyl (*p*MeOBn) geschützt, das durch die saure Abspaltung entfernt werden konnte.

4. Die Ligation der beiden Peptide Ac-KC(StBu)A-HalC-KA-HalG-A-Thio-NH<sub>2</sub> **43** und H-CA-HalC-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **44** in Lösung (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer) sollte zu Ac-KC(StBu)A-HalC-KA-HalG-ACA-HalC-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **45** führen (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12:** Darstellung der *trans*-Thioveresterung und dem spontanen S → N-Acyltransfer zum Ac-KC(StBu)A-HalC-KA-HalG-ACA-HalC-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **45**

Die einzelnen Fragmente konnten mit schlechten Ausbeuten hergestellt werden. Die Ligation verlief allerdings ohne Erfolg. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass die Fragmente sich nicht mehr an fester Phase befinden und somit die Ligation in Lösung erschwert ist.

## 4.4 Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen

Die Oligomere wurden in folgenden Lösungen UV- und CD-spektroskopisch untersucht:

10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7

10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA-Puffer, pH 7

10 mM Phosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)-Puffer, pH 7

Tris-HCl + 30% TFE, pH 7

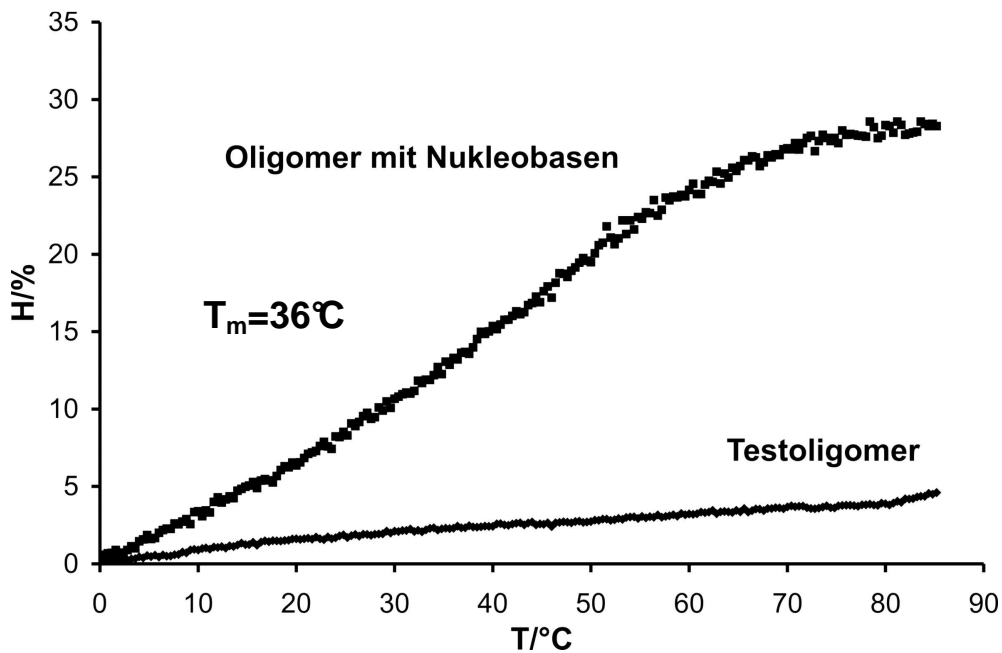
TFE

H<sub>2</sub>O

MeOH

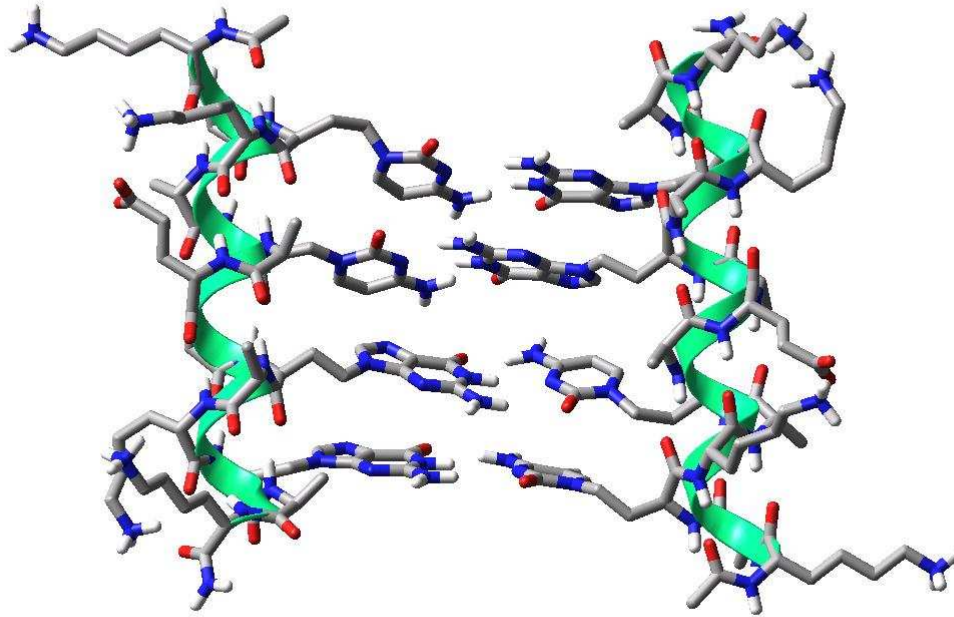
Es wurde ein Vergleich zwischen dem 15mer-Test-Oligomer Ac-KAWKAYAEAWAKYAK-NH<sub>2</sub> **32** und dem nucleobasen-modifizierten 15mer-Oligomer Ac-KA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIC-AK-NH<sub>2</sub> **28** aufgestellt. Nach UV-spektroskopischen Messungen zeigte sich eine höhere Stabilität des Peptides mit den Nucleobasen. Die Hyperchromizität bei gleichen Konzentrationen und gleichem Lösungsmittel ist hier um mehr als das fünffache erhöht. Außerdem weist das Oligomer mit den Homoalanyl-Nucleoaminosäuren eine Schmelztemperatur von  $T_m = 36\text{ °C}$  auf (Abb. 4.13), während sich beim Testpeptid **32** keine Schmelztemperatur bestimmen lässt.

Dieses Ergebnis weist auf die Interaktion zweier Helices hin, die auf Basenpaarung basieren könnte. Durch den Einbau der Nucleobasen in den Seitenketten wird den Helices untereinander eine Aggregationsmöglichkeit gegeben, die eine struktur-stabilisierende Wirkung hervorbringt. Die Tatsache, dass die Schmelzkurve des Test-oligomers keinerlei sigmoiden Übergang aufweist, zeigt, dass die Stabilisierung auf Nucleobaseninteraktionen zurückzuführen ist.

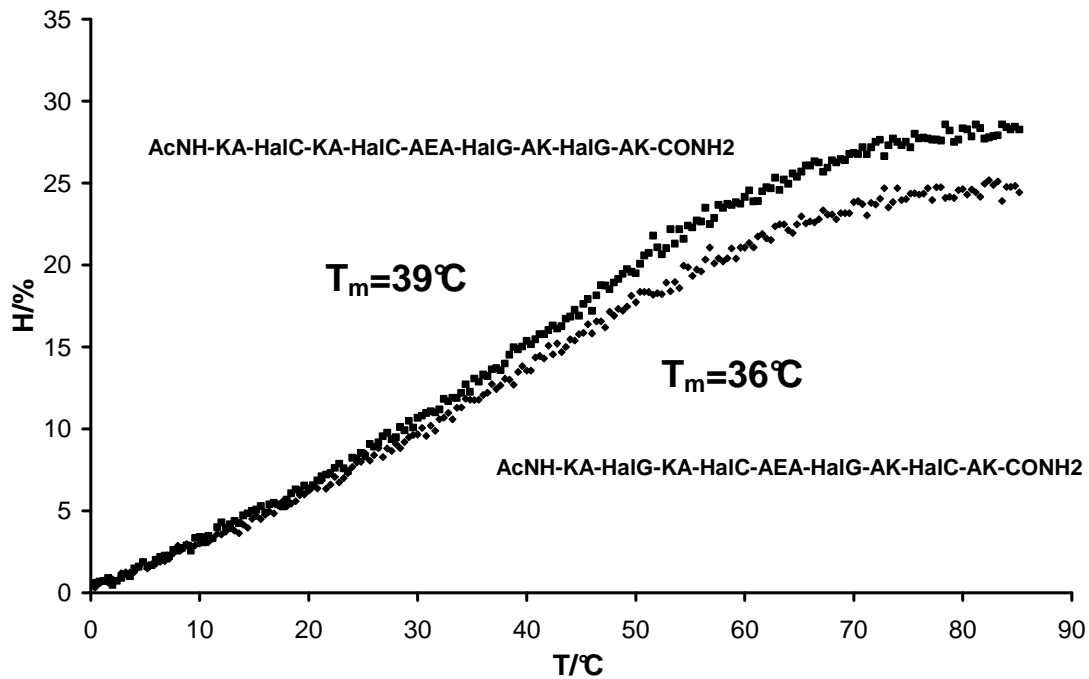


**Abb. 4.13:** UV-Spektrum des 15mer-Test-Oligomers Ac-KAWKAYAEAWAKYAK-NH<sub>2</sub> **32** im Vergleich zum 15mer-Oligomer Ac-KA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalC-AK-NH<sub>2</sub> **28**;  $c = 10 \mu\text{M}$ ; 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, pH 7;  $\lambda = 260 \text{ nm}$

Die Spektren der 15mer-Oligomere Ac-KA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalC-AK-NH<sub>2</sub> **28** und Ac-KA-HalC-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **29** unterscheiden sich hinsichtlich der Schmelztemperatur unwesentlich. Das Oligomer **29** mit der Sequenzabfolge HalG-HalG-HalC-HalC ist 3 °C stabiler, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die benachbarten Guanine aufgrund der besseren Überlappung zusätzliche Stapelungswechselwirkungen hervorrufen (Abb. 4.14, 4.15).



**Abb. 4.14:** Modell für Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **29** nach Energieminimierung (*MacroModel*<sup>®</sup>, Amber\*, H<sub>2</sub>O)

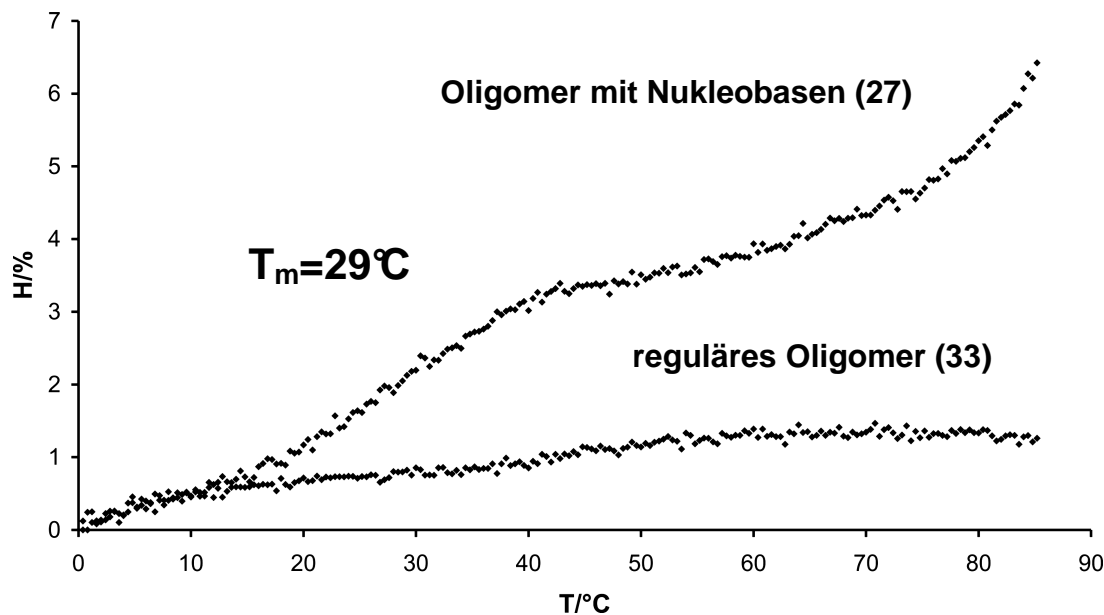


**Abb. 4.15:** UV-Spektrum des 15mer-Oligomers Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **29** im Vergleich zu dem 15mer-Oligomer Ac-KA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIC-AK-NH<sub>2</sub> **28**; c = 10  $\mu$ M; 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, pH 7;  $\lambda$  = 260 nm,

Das 21mer Oligomer Ac-A-HaIC-AK-HaIC-AKA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **27** zeigte im Vergleich zum 21mer Testpeptid Ac-AYAKYAKAWKAYAEAW-



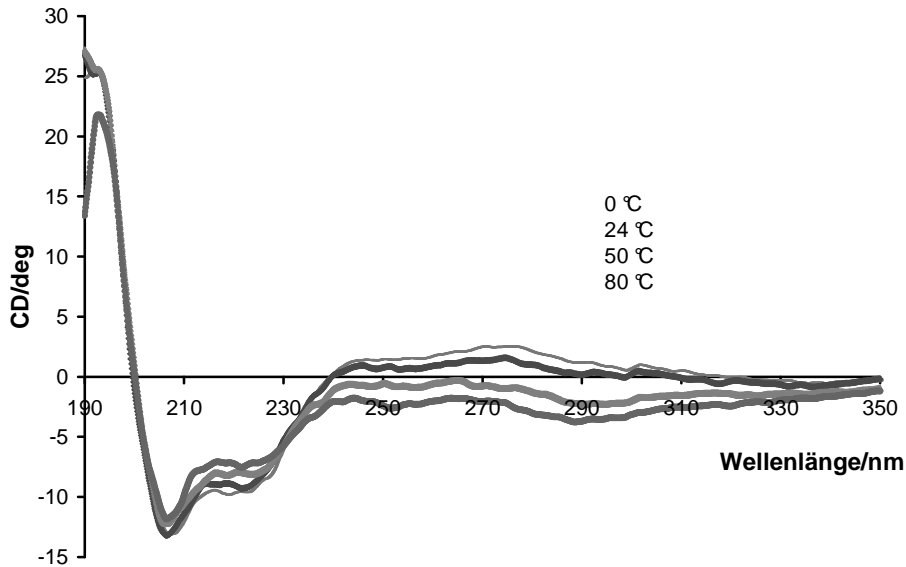
AKWAK-NH<sub>2</sub> **33**, wie bei den 15mer-Oligomeren, einen sigmoiden Übergang und somit eine höhere Stabilität (Abb. 4.16).



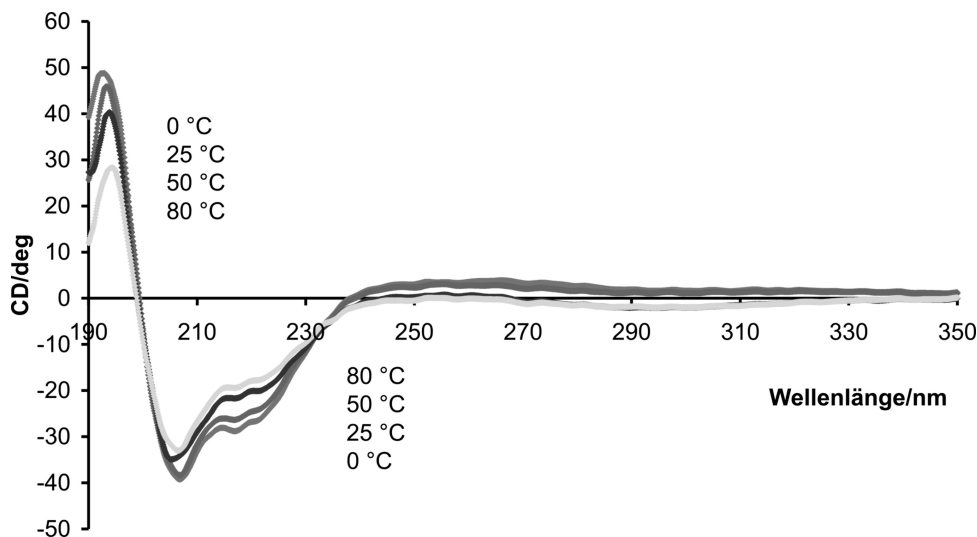
**Abb. 4.16:** UV-Spektrum des 21mer-Test-Oligomers Ac-AYAKYAKAWKAYAEAWAKWAK-NH<sub>2</sub> **33** im Vergleich zu dem 21mer Oligomer Ac-A-HalC-AK-HalC-AKA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **27**; c = 10  $\mu$ M; 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, pH 7;  $\lambda$  = 260 nm; der Anstieg der Absorption bei **27** oberhalb 70 °C ist auf ein Abdampfen des Lösungsmittels zurück zuführen.

Die 15mere **28** und **29** weisen mit  $T_m = 39$  °C bzw. 36 °C eine höhere Schmelztemperatur auf als das 21mer **27** mit  $T_m = 29$  °C. Diese Stabilitätsunterschiede sind wahrscheinlich auf verschiedene Sekundärstrukturen zurück zuführen.

CD-spektroskopische Untersuchungen des 21mer-Oligomers Ac-A-HalC-AK-HalC-AKA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **27** (Abb. 4.17) und des 15mer-Oligomers Ac-KA-HalC-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> **29** (Abb. 4.18) zeigen zum einen die typischen  $\alpha$ -Helix Effekte, einen positiven Cotton-Effekt bei 191 nm und negative Cotton-Effekte bei 206 nm und 222 nm, wobei stärkere Cotton-Effekte und damit höhere Helixanteile beim 15mer-Oligomer **29** zu erkennen sind. Zum anderen ist bei beiden Oligomeren eine schwache Temperaturabhängigkeit im Bereich der Nucleobasenabsorption im Wellenlängenbereich von 240 -280 nm zu erkennen. Die Ausprägung des positiven Effektes verringert sich bei steigender Temperatur.



**Abb. 4.17:** CD-Spektrum des 21mer-Oligomers Ac-A-HaIC-AK-HaIC-AKA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **27**; c = 10  $\mu$ M; TFE; bei 0, 24, 50 und 80  $^{\circ}$ C

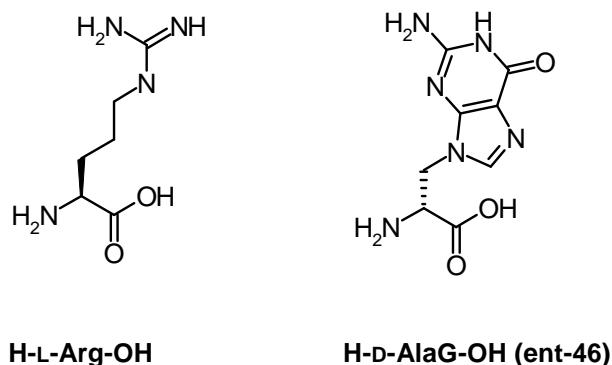


**Abb. 4.18:** CD-Spektrum des 15mer-Oligomers Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **29**; c = 10  $\mu$ M; TFE; bei 0, 24, 50 und 80  $^{\circ}$ C

UV- und CD-spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass das 15mer-Oligomer Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **29** im Vergleich zum 21mer-Oligomer **27** höhere Stabilitäten und ausgeprägtere  $\alpha$ -Helixanteile aufweist. Ebenfalls konnte eine stärkere Stabilisierung der 15mer-Oligomere **28** und **29** und des 21mer-Oligomers **27** im Vergleich zu den regulären Peptiden **32**, **33** ohne Nucleobasen gezeigt werden.

## 5 Inkorporation von Nukleoaminosäuren in das lineare Mikropeptid-Gerüst MCoTI-29

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der Modifizierung des linearen Mikroproteins MCoTI-29 (Kap. 2.4). Unnatürliche Aminosäuren wurden in die reaktive Inhibitorschleife des Cystinknotens in Position P1 eingebaut, wobei die offenkettige Form verwendet wurde.<sup>[129]</sup> Dieser Bereich der Schleife ist bekannt als potenter  $\alpha$ -Helixbildner. Es wurden chemisch synthetisierte Verbindungen eingebaut, die zu einer hohen biologischen Aktivität und Stabilität führten. Bei diesen Verbindungen handelte es sich um Alanyl-Nukleoaminosäuren (Kap. 2.1, Kap. 3), die als Mimetika für Aminosäuren, wie Phenylalanin, Tryptophan und Arginin eingesetzt werden können (Abb. 5.1).<sup>[130]</sup>



**Abb. 5.1:** L-Arginin (links) und dessen isostere Nukleoaminosäure D-AlaG **ent-46** (rechts), eingebaut in Position P1 des linearen Mikroproteins MCoTI-29<sup>[130]</sup>

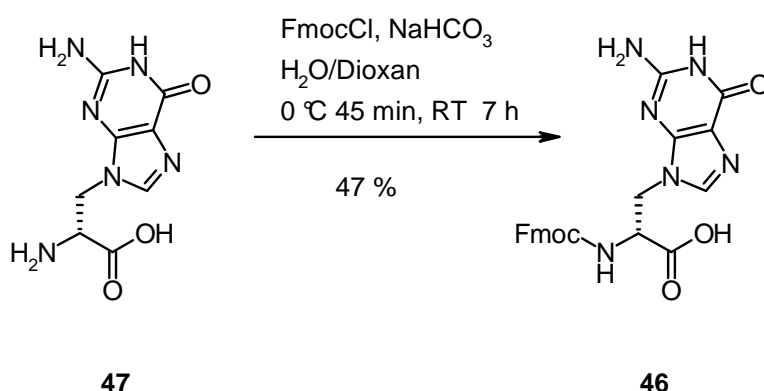
Heterozyklische Arginin-Mimetika wurden wegen der hohen Selektivität und der ausgeprägten Thrombin-Inhibierung als Aminosäuren für die Darstellung von trypsin-ähnlichen Serin-Protease Inhibitoren verwendet.<sup>[131,132]</sup>

Die Nukleobasen können Änderungen hinsichtlich der konformationellen Flexibilität, der Ladungsverteilung und des Protonierung-Verhaltens hervorrufen. Zudem sind sie in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Diese Veränderungen können zu einer besseren Bioverfügbarkeit, höheren Bindungsaffinitäten und zu einer Erhöhung der Rezeptor-Selektivität führen.<sup>[133]</sup>

Als Nukleobasen wurden Purin-Gerüste als konformationell starre Arginin-Mimetika in die Synthese von zyklischen Pentapeptiden eingeführt, die auf der Struktur des zyklischen RGD(Arg-Gly-Asp)-Peptides basieren.<sup>[134]</sup>

Im Weiteren ist die Synthese der Nukleoaminosäuren Fmoc-D-AlaG-OH **ent-46** und Fmoc-L-AlaG-OH **46** dargestellt sowie deren Inkorporation in das lineare Mikropeptid MCoTI-29.

## 5.1 Synthese der Fmoc-Alanyl-Nukleoaminosäuren und deren Einbau in das lineare Mikropeptid



**Abb. 5.2:** Synthese der Fmoc-geschützten Nukleoaminosäuren Fmoc-D-AlaG-OH **ent-46** und Fmoc-L-AlaG-OH **46**

Die Synthese der Fmoc-geschützten Nukleoaminosäuren verlief analog zu der der Boc-geschützten Nukleoaminosäuren (Kap. 3.1).<sup>[133]</sup> Ausgehend von **47** wurde wie bei den Homoalanyl-Nukleoaminosäuren dargestellt (Kap. 4.2.1) mit FmocCl und NaHCO<sub>3</sub> die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt und Fmoc-L-AlaG-OH **46** bzw. Fmoc-D-AlaG-OH **ent-46** erhalten (Abb. 5.2).



**Abb. 5.3:** Sequenz des linearen Mikropeptids **48**

Das lineare Mikropeptid **48** (Abb. 5.3) wurde automatisiert sowie manuell nach der Fmoc-Strategie an fester Phase (Kap. 4.2) synthetisiert. Der Einbau der Nukleoaminosäure Fmoc-D-AlaG-OH **ent-46** sowie der der Aminosäure Fmoc-L-Ile-OH, direkt im Anschluss an die Nukleoaminosäure, wurden manuell durchgeführt. Ebenso erfolgte die Kupplung der Fmoc-L-Cys(Trt)-OH manuell.<sup>[129]</sup> Als Seitenschutzgruppe

wurde für Asparagin (Trt), für Lysin (Boc), für Asparaginsäure (OtBu), für Serin (tBu) und für Arginin (Pbf) verwendet, die nach saurer Abspaltung vom Harz ebenfalls entfernt wurden. Die Guaninbase der Alanyl-Nukleoaminosäure wurde nicht geschützt (Kap. 3.1). Der Syntheszyklus entspricht dem in Kap. 4.2 beschriebenen.<sup>[133]</sup>

## 5.2 Ergebnisse und Diskussion der biologischen Aktivität

Wegen der relativ geringen Löslichkeit und des erhöhten Aggregationspotentials der Fmoc-geschützten Alanyl-Nukleoaminosäuren wurde die Inkorporation dieses Bausteines manuell durchgeführt.

Es wurde zum einen gezeigt, dass es möglich ist, Nukleoaminosäuren in die P1-Position des linearen MCoTI-29 einzubauen. Zum anderen zeigten die Trypsin-Inhibitor Untersuchungen, jeweils mit den inkorporierten Nukleoaminosäuren, D-AlaG bzw. L-AlaG, eine messbare Trypsin-Inhibitor Aktivität (Tab. 5.1).<sup>[129]</sup>

MCoTI-29 mit <u>AlaG</u> /AlaG in der Inhibitorschleife	Trypsin $K_{iapp}$ , [nM]	Tryptase $K_{iapp}$ , [nM]
-P <u>AlaG</u> ILKK- ( <b>48</b> )	1000	4000
-P <u>AlaG</u> ILKK- ( <b>ent-48</b> )	1000	10000
-P R ILKK-	0.8	20

**Tab. 5.1:** Analytik des linearen Mikroproteins MCoTI-29 mit D-AlaG (AlaG) und L-AlaG (AlaG) im Vergleich zu Arginin; Geschwindigkeitskonstante  $K_{iapp}$  (*inhibition apparently*) wurde jeweils gegen Trypsin und *human*  $\beta$ -III Tryptase gemessen.<sup>[84]</sup>

Beide Mikroproteine zeigen eine schwache Inhibierung der menschlichen Tryptase. Interessanterweise zeigt die D-AlaG-Nukleoaminosäure an der Position P1 eine leicht bessere Inhibierungskonstante.

Somit sind neben Arginin auch andere basische Aminosäure-Analoga in der P1-Position in der Lage an die enzymatisch aktiven Seiten zu binden. Die heterozyklischen Verbindungen als Thrombin-Inhibitoren sind interessant, weil im Vergleich zu der Guanidinoalkyl-Seitengruppe von Arginin die Basizität herabgesetzt ist und der heteroaromatische Ring starke Rigidität aufweist.<sup>[133,135]</sup> Außerdem sind die Nukleoaminosäuren mit einer zusätzlichen Protonen-Donor-Akzeptor-Funktionalität ausge-

stattet. Eine geringere Selektivität der eingebauten Nukleoaminosäuren wird im Vergleich zu den Arginin-Analoga gemessen, da wahrscheinlich die Nukleobasen aus sterischen Gründen benachteiligt sind.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Möglichkeit, Nukleoaminosäuren als Nukleotid- bzw. Aminosäure-Mimetika zu verwenden, macht ihren Einbau in verschiedenste natürliche und synthetische Protein- und Peptidstrukturen interessant. Wegen ausgebildeter Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophober und elektrostatischer Kräfte kann diese Substitution zu vielversprechenden neuen Eigenschaften führen und Wechselwirkungen mit DNA und RNA ermöglichen.

Ausgehend von enantiomerenreinen Aminosäuren sowie Aminosäurederivaten wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Boc-geschützte Alanyl- und Homoalanyl-Nukleoaminosäuren sowie Fmoc-geschützte Alanyl- und Homoalanyl-Nukleoaminosäuren synthetisiert. Aufgrund der für die Nukleobasen-Paarung erforderlichen alternierend konfigurierten PNA-Stränge wurden die Nukleoaminosäuren in beiden enantiomeren Formen hergestellt. Die Darstellung der Peptidnukleinsäuren aus den Nukleoaminosäuren erfolgte mittels Peptidfestphasen Synthese nach der Boc- bzw. Fmoc-Strategie.

Zur Imitation der Watson-Crick Basenpaarung wurde eine kovalente Verknüpfung von antiparallelen PNA-Strängen über den Hexaethylenglycolaminosäure (Hegas)-Linker **1** geschaffen. Dazu wurde einerseits die Stabilisierung auf Tetramer-Doppelstränge und andererseits die Wirkung auf Hexamer-Doppelstränge untersucht.

Der Aufbau der PNA-Stränge sowie die Einführung des Hegas-Linkers **1** erfolgten durch Festphasen Synthese. Mittels temperaturabhängiger UV-Spektroskopie wurden die Stabilitäten der Doppelstränge des Tetramers **23** und des Hexamers **24** ermittelt und mit den Stabilitäten der rein selbstpaarenden Oligomeren verglichen (Tab. 6.1).

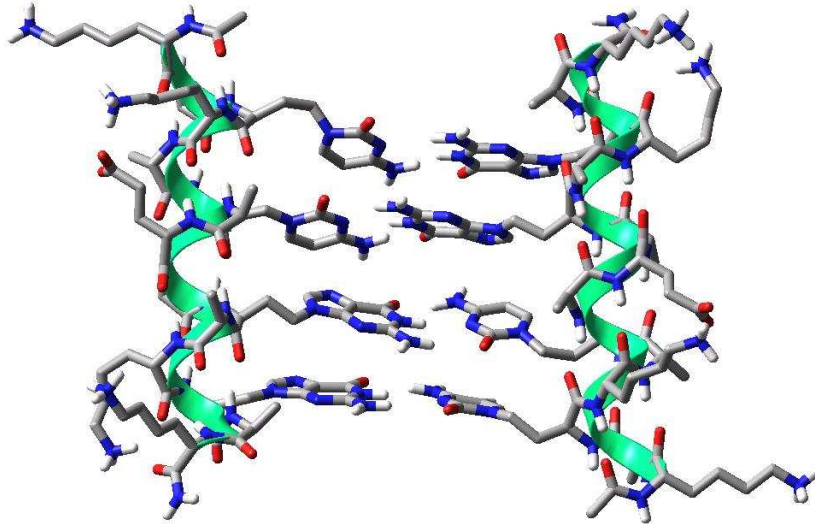
PNA-Oligomere	T <sub>m</sub>	Paarungsmodus
H-AlaC- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalG</u> -[hegas]- AlaC- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalG</u> -Lys-NH <sub>2</sub> <b>24</b>	25 °C	Watson-Crick
H-AlaC- <u>HalG</u> -AlaG- <u>HalC</u> -[hegas]- AlaG- <u>HalC</u> -AlaC- <u>HalG</u> -Lys-NH <sub>2</sub> <b>23</b>	18 °C	Watson-Crick
H-AlaG- <u>HalG</u> -AlaC- <u>HalG</u> -AlaC- <u>HalC</u> -Lys-NH <sub>2</sub> <b>25</b>	52 °C	Watson-Crick
H- <u>AlaG</u> -AlaC- <u>AlaG</u> -AlaC- <u>Lys</u> -NH <sub>2</sub> <b>26</b>	12 °C	reverse Watson-Crick

**Tab. 6.1:** Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) und Paarungsmodi der PNA-Oligomere mit und ohne Verknüpfungseinheit hegas **1**

Das Hexamer weist eine höhere Paarungsstabilität auf als das Tetramer, was den Erwartungen entspricht, da mehr Basenpaarungen im Hexamer möglich sind (Tab. 6.1). Im Vergleich zu den selbstpaarenden Oligomeren **25** und **26** ohne kovalente Verknüpfung wurde eine unerwartete Destabilisierung des Systems beobachtet (Tab. 6.1), die eine Störung der idealen Paarungsgeometrie oder eine alternierende Erkennungsmöglichkeit nahe legt. Durch die Einführung eines starren Gerüsts als Verknüpfungseinheit sollten höhere Stabilitäten erhalten werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Synthesen verschiedener Stilbenderivate durchgeführt. Dazu wurde, ausgehend von 4,4'-*trans*-Stilbendicarboxylat **16** über eine Säureaktivierung mit SOCl<sub>2</sub> drei verschiedene Derivate dargestellt. Die Darstellung des orthogonal-funktionalisierten Stilbens **2** erwies sich als äußerst schwierig, da zwischen den Säurechlorid-Gruppen keinerlei Differenzierung gelang.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war der Einbau von Nukleaminsäuren in  $\alpha$ -helikale Peptide. Hierbei wurden Nukleaminsäuren in eine Peptid-Sequenz inkorporiert, so dass aufgrund der Organisation und Erkennung der Nukleobasen eine Selbstpaarung zweier  $\alpha$ -Helix-Stränge ermöglicht wurde.





**Abb. 6.1:** Modell des 15mer-Oligomers Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **29** nach Energieminimierung (*MacroModel*<sup>®</sup>, Amber\*, H<sub>2</sub>O)

Die 21mer- und 15mer-Oligomere **27**, **28** und **29** (Abb. 6.1) wurden hinsichtlich ihrer Paarungseigenschaften untersucht und mit nicht nukleobasen-modifizierten Peptiden verglichen. Die durch UV-Spektroskopie untersuchten Oligomere zeigten eine eindeutige Stabilisierung durch den Einbau von Nukleobasen, da reguläre Peptide keinen sigmoiden Übergang aufwiesen (Tab. 6.2).

Oligomere	T <sub>m</sub>
Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH <sub>2</sub> <b>29</b>	39 °C
Ac-KA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIC-AK-NH <sub>2</sub> <b>28</b>	36 °C
Ac-KAWKAYAEAWAKYAK-NH <sub>2</sub> <b>32</b>	-
Ac-A-HaIC-AK-HaIC-AKA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH <sub>2</sub> <b>27</b>	29 °C
Ac-AYAKYAKAWKAYAEAWAKWAK-NH <sub>2</sub> <b>33</b>	-

**Tab. 6.2:** Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) der synthetisierten helikalen 15mer- und 21mer-Oligomere mit und ohne Nukleobasen-Inkorporation

Die Wechselwirkungen durch Nukleobasen-Erkennung des  $\alpha$ -helikalen Doppelstranges von Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **29** führten zu einer stärkeren Stabilisierung als die des Oligomers Ac-KA-HaIG-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIC-AK-NH<sub>2</sub> **28**. Obwohl das 21mer sechs Basenpaare aufweist, zeigt das 15mer mit vier Basenpaaren eine um ca. 10 °C höhere Stabilität.

In weiteren Arbeiten soll die Stabilisierung anhand von kürzeren und längeren Sequenzen untersucht werden. Durch den Einbau des Basenpaares Adenin/Thymin können andere Paarungsmodi verwendet werden, um Unterscheidungen hinsichtlich der Stabilität des Paarungsverhaltens der Erkennungsregion genauer zu untersuchen.

Eine weitere Inkorporation der Nukleobasen wurde an dem linearen Mikropeptid MCoTI-29 **48** durchgeführt. Der Austausch einer Arginineinheit gegen eine Nukleobase führte zu biologischer Aktivität und zeigte, dass bityklische Heteroaromaten wegen der zusätzlichen Protonen-Donor-Akzeptor-Funktionalität eine interessante Alternative zur Modifikation natürlicher Peptide und Proteine darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eigenschaften Nukleobasen-funktionalisierter Peptide dargestellt. Es konnte gezeigt werden, welche Einflüsse aromatische Seitenketten mit der Möglichkeit der wasserstoffbrückenbildenden Basenpaarung auf die Struktur und Aggregation von Peptiden haben.

## 7 Summary and Outlook

The knowledge about nucleoamino acids, nucleotides and amino acid mimetics gives the opportunity to implement them in various natural and synthetic protein and peptide structures. The substitution by these elements leads to new and promising properties which might allow interactions with DNA and RNA, since various forces like hydrogen bondings, hydrophobic, and electrostatic interactions are involved.

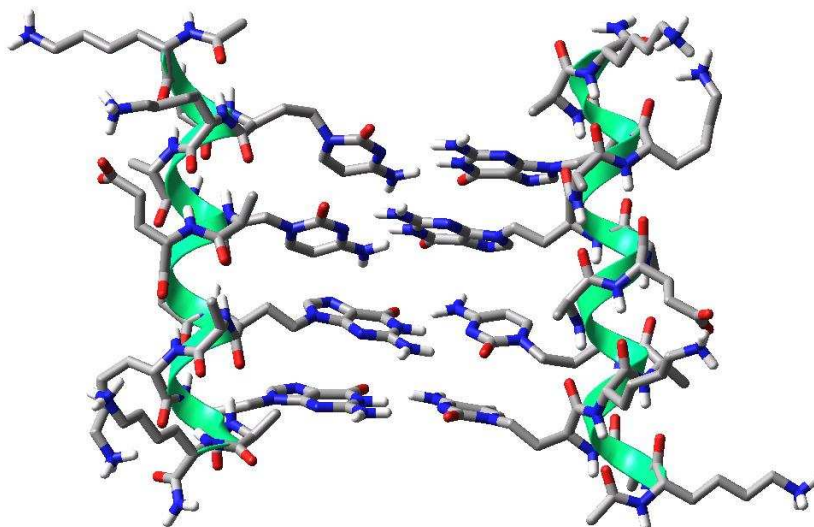
Different Boc-protected Alanyl- and Homoalanyl-nucleoamino acids and Fmoc-protected Alanyl- and Homoalanyl-nucleoamino acids were synthesized from enantiomerically pure amino acids and amino acid derivatives. The nucleoamino acids were made in both enantiomeric forms due to the necessity of alternating configuration for nucleobase pairings. Oligomerization of the peptide nucleic acids (PNA) from the nucleoamino acids was done by Boc- and Fmoc-solid phase peptide synthesis.

Antiparallel PNA double strands were accomplished via covalent binding with hexaethylene glycol amino acid (hegas)-linker **1** for imitation of the Watson-Crick base pairing. Therefore double strand stabilities of tetramer **23** and hexamer **24** were investigated. Oligomerization and the incorporation of hegas-linker **1** were performed by solid phase peptide synthesis. Stabilities of the tetrameric and hexameric double strands of **23** and **24** were investigated by temperature-dependent UV spectroscopy and compared to selfpairing oligomers **25** and **26** (table 6.1).

PNA-oligomers	T <sub>m</sub>	pairing mode
H-AlaC- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalG</u> -[hegas]- AlaC- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalC</u> -AlaG- <u>HalG</u> -Lys-NH <sub>2</sub> <b>24</b>	25 °C	Watson-Crick
H-AlaC- <u>HalG</u> -AlaG- <u>HalC</u> -[hegas]- AlaG- <u>HalC</u> -AlaC- <u>HalG</u> -Lys-NH <sub>2</sub> <b>23</b>	18 °C	Watson-Crick
H-AlaG- <u>HalG</u> -AlaC- <u>HalG</u> -AlaC- <u>HalC</u> -Lys-NH <sub>2</sub> <b>25</b>	52 °C	Watson-Crick
H- <u>AlaG</u> -AlaC- <u>AlaG</u> -AlaC- <u>Lys</u> -NH <sub>2</sub> <b>26</b>	12 °C	reverse Watson-Crick

**Table 6.1:** Melting temperatures (T<sub>m</sub>) and pairing mode of the PNA-oligomers with and without hegas-linker **1**

According to the prospect the hexameric oligomer showed higher pairing stability than the tetrameric oligomer due to the fact the hexameric oligomer can form more base pairs (table 6.1). These linked systems showed less stability compared to the self pairing oligomers **25** and **26** that are not additionally stabilized by covalent binding (table 6.1). Reasons for that might be their pairing geometry or alternated recognition possibilities. Higher stabilities could be achieved with more rigid linkers. Therefore various stilben derivates were synthesized starting with 4,4'-*trans*-stilbendicarboxylate **16**. Activation of **16** with  $\text{SOCl}_2$  leads to three different derivates. Differentiation between both acid chlorid groups turned out to be difficult so that orthogonal functionalized stilbene **2** could not be isolated. Another part of this dissertation dealt with the incorporation of nucleoamino acids in  $\alpha$ -helical peptides. Organization and recognition of the nucleobases should lead to a selfpairig of two  $\alpha$ -helical strands.



**Figure 6.1:** Model of the 15-residue system Ac-KA-HaIC-KA-HaIC-AEA-HaIG-AK-HaIG-AK-NH<sub>2</sub> **29** after energy minimization (*MacroModel*<sup>®</sup>, Amber\*, H<sub>2</sub>O)

The 21-residue and 15-residue system **27**, **28** and **29** (figure 6.1) were analyzed regarding their pairing properties and compared to the nucleobase-modified peptides **32** and **33**. Stabilization of the oligomers was accomplished by nucleobase pairing since regular peptides did not show any sigmoidal transition (table 6.2).

oligomers	T <sub>m</sub>
Ac-KA-HalC-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH <sub>2</sub> <b>29</b>	39 °C
Ac-KA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalC-AK-NH <sub>2</sub> <b>28</b>	36 °C
Ac-KAWKAYAEAWAKYAK-NH <sub>2</sub> <b>32</b>	-
Ac-A-HalC-AK-HalC-AKA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH <sub>2</sub> <b>27</b>	29 °C
Ac-AYAKYAKAWKAYAEAWAKWAK-NH <sub>2</sub> <b>33</b>	-

**Table 6.2:** Melting temperatures (T<sub>m</sub>) of the synthesized helical 15-residue and 21-residue systems with and without nucleobase-incorporation

Nucleobase-incorporation led to a higher stability for **29** than for oligomer **28**. The 15-residue system gave 10 °C higher stability even though the 21-residue system has two additional basepairs. In further studies the stability should be investigated by analyzing longer and shorter sequences. Using the basepair adenine/thymine instead of guanine/cytosine different stabilities regarding pairing behaviour of the recognition unit might be shown.

Another nucleobase-incorporation was performed into the linear micropeptide MCoTi-29 **48**. Replacing the arginine unit by the nucleobase guanine gave remaining biological activity meaning that bicyclic heteroaromatics with its additional proton-donor-acceptor-functionalities might be an interesting alternative for native peptide- and protein-modifications.

In conclusion, this thesis dealt with the properties of nucleobase-functionalized peptides. Influences of aromatic sidechains on the structure and aggregation of peptides could be shown.

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Allgemeine Arbeitstechniken

#### Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Dünnschichtfertigplatten mit Aluminiumfolie als Trägermaterial der Firma *Merck* verwendet (Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0.25 mm). Zum Nachweis der Substanzen diente Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie die Tauchfärbung mit Ninhydrin-Lösung (500 mL Ethanol, 3.00 mL Essigsäure, 1.00 g Ninhydrin) unter anschließendem Erhitzen mit einem Heißluftgebläse.

#### Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als Säulenmaterial wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40 - 62  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Säulen wurden nass mit 50 - 100fachem Überschuss an Kieselgel befüllt und das Substanzgemisch entweder als konzentrierte Lösung (im Laufmittel) oder adsorbiert an Kieselgel aufgetragen. Die Länge und der Durchmesser der verwendeten Säulen sowie die Laufmittel sind jeweils angegeben.

#### Reverse Phase Chromatographie (RP)

Es wurde RP-Kieselgel der Firma *YMC* (ODS-A, AA06S50, 60 Å, S-50  $\mu\text{m}$ , C-18) verwendet. Die Substanzen wurden in wenig Wasser suspendiert und auf die mit Wasser äquilibrierte Säulenpackung gegeben. Der Gehalt an Methanol wurde schrittweise erhöht.

#### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische und präparative HPLC wurden an Geräten der Firma *Pharmacia* (Äkta Basic, P900, UV 900) durchgeführt. Die Analytik wurde mittels *YMC*-Säulen (*J'sphere* ODS-H80, 250 x 4.6 mm, 4  $\mu\text{m}$ , 80 Å, C-18, Fluss: 1 mL/min und *J'sphere* ODS - AM, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 120 Å, C-18, Fluss: 1 mL/min) durchgeführt. Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurde eine *Sephasil Peptide* Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, C-18, Fluss: 1 mL/min) verwendet. Die präparative Trennung erfolgte mit einer *YMC*-Säule (*J'sphere* ODS-H80, 250 x 20 mm, 4  $\mu\text{m}$ , 80 Å, C-18, Fluss: 10 mL/min).

Die Gradienten der Laufmittel **A** (H<sub>2</sub>O, 0.1 % TFA) und **B** (ACN/H<sub>2</sub>O (8:2), 0.1 % TFA) bzw. **B'** (Acetonitril/H<sub>2</sub>O (9:1), 0.1 % TFA) sind jeweils angegeben. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 215 nm, 254 nm, 260 nm und 280 nm.

### **Circulardichroismus-Spektroskopie (CD)**

Die Messungen wurden an einem *JASCO J-810A* Spektropolarimeter, ausgerüstet mit einer *JASCO PTC423S* Temperiereinheit, durchgeführt. Der Probenraum wurde permanent mit Stickstoff (3 - 5 L/min) gespült. Die Temperatur wurde im Temperierblock direkt neben der Küvette gemessen. Alle Messungen wurden mit fünf Akkomodationen, 1.00 nm *bandwidth*, 1.00 s *response* und mit einem *scan speed* von 100 nm/min durchgeführt. Messungen in Lösung wurden in Quarzglasküvetten (*l* = 1.00 cm) vorgenommen.

### **UV-Spektroskopie**

Die Schmelzkurven wurden mit einem *JASCO V-550* Spektrometer, ausgerüstet mit einer programmierbaren *JASCO ETC-505S/ETC-505T* Peltier-Temperiereinheit, aufgenommen. Die Spektren wurden in einer Quarzglasküvette (*l* = 1.00 cm) bei den Wellenlängen 250 nm, 255 nm, 260 nm und 280 nm aufgenommen. Der Probenraum wurde permanent mit Stickstoff (3 - 5 L/min) gespült. Die Temperaturen wurden im Temperierblock direkt neben der Küvette gemessen.

Es wurde folgendes Temperaturprogramm für die temperaturabhängigen UV-Messungen verwendet:

20 °C → 80 °C (10 min) → 80 °C (3 min) → -2 °C (26 min) → -2 °C (180 min)  
→ 80 °C (180 min) → -2 °C (180 min) → -2 °C (180 min) → 80 °C (180 min)  
→ -2 °C (180 min) → 28°C (5 min)

Die Hyperchromizität (*H*%) ist definiert als

$$H\% = \frac{(A_T - A_0) \cdot 100}{A_0}$$

wobei *A<sub>T</sub>* die Absorption bei der Messtemperatur *T* und *A<sub>0</sub>* der kleinste Absorptionswert eines Entpaarungsexperimentes ist. Die Konzentrationen (*c*) der Oligomer-Lösungen wurden über die Absorption (*A*) der Nukleobasen durch das Lambert Beer'sche Gesetz bestimmt.

Lambert Beer'sches Gesetz:  $c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$

Gemessen wurde in einer Quarzküvette ( $l = 1.00$  cm). Unter Annahme, dass die Extinktion der Nukleoaminosäuren durch die Heterobasen erfolgt, wurden die Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{254\text{ nm}}$ ) der Peptidnukleinsäuren in erster Näherung durch Addition der Extinktionskoeffizienten der Nukleoaminosäuren berechnet.<sup>[136]</sup>

### Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* (Typ LCQ oder TSQ 7000) aufgenommen. Die Aufnahme der EI-Massenspektren erfolgte an einem Instrument der Firma *Varian* (Typ MAT 731). Die Aufnahme der hochaufgelösten ESI-Massenspektren (HR-MS) erfolgte an einem APEX-Q IV 7T-Spektrometer der Firma *Bruker*.

### Infrarot-Spektroskopie (IR)

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte an einem Gerät der Firma *Perkin Elmer* Typ 1600 Series FT-IR unter Benutzung von KBr-Presslingen.

### Optische Drehung

Die Drehwerte wurden mit einem Polarimeter 241 der Firma *Perkin Elmer* gemessen.

Der spezifische Drehwert  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  ergibt sich aus

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}.$$

Hierbei stellt  $\alpha$  den gemessenen Drehwert bei 20 °C und der Wellenlänge 589 nm,  $c$  die Konzentration (in g/100 mL) und  $l$  die Küvettenlänge (hier 1.00 dm) dar.

### Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an *Varian Unity 300* oder *Varian INOVA 600* Spektrometern aufgenommen. Die Proben temperatur betrug im Fall von  $\text{CDCl}_3$  27 °C und für  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , falls nicht anders angegeben, 35 °C. Die chemische Verschiebung der Signale ist in Einheiten der  $\delta$ -Skala registriert (TMS = 0 ppm). Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel;  $\text{CDCl}_3$ : 7.24 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR) und 77.0 ppm ( $^{13}\text{C}$ -NMR),  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ : 2.49 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR), 39.5 ppm ( $^{13}\text{C}$ -NMR). Die Multiplizitäten der Signale



werden durch die Abkürzungen s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, s br = breites Singulett charakterisiert. Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden als  $^1\text{H}$ -Breitbandentkoppelte oder als ATP-Spektren aufgenommen. Die Signalzuordnung erfolgte mit Hilfe von [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-COSY- und HSQC-Experimenten.

### **Automatisierte Festphasensynthese**

Die automatisierte Synthese einiger Peptide erfolgte an einem *ABI 433A Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems*. Als Synthese-Protokoll wurde ein *FastMoc 0.1* Modus verwendet. Die genaue Beschreibung des angewendeten Protokolls erfolgt in **AAV4**.

### **Reagenzien**

Die verwendeten Harze wurden von der Firma *Novabiochem* bezogen. Die Peptidkupplungsreagenzien wurden von *Applied Biosystems*, *IRIS Biotech* und *Novabiochem* erhalten. Die Aminosäurederivate wurden von *Novabiochem*, *Fluka*, *MultiSyntech* und *Bachem* bezogen. Alle anderen Reagenzien stammen von *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Lancaster* und *Acros* und entsprachen der Qualität zur Synthese.

### **Lösungsmittel**

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. DMF abs., NMP abs. und THF abs. wurden von *Fluka* in der Qualität *puriss. absolut* bezogen. Pyridin und Dichlormethan wurden über  $\text{CaH}_2$  getrocknet und destilliert. Lösungsmittel für die HPLC wurden vor Verwendung durch Röhren im Vakuum entgast. Acetonitril (*HPLC-Qualität*) wurde von *Acros Organics* bezogen und Wasser wurde mittels einer Wasseraufbereitungsanlage *Simplicity* der Firma *Milipore* aufbereitet.

### **Reaktionen**

Für luft- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen diente Argon (99.996 %) als Inertgas. Die Glasgeräte wurden zuvor mittels Heißluftgebläse im Vakuum ausgeheizt und mit Argon gespült.

## 8.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

### AAV1: Bestimmung der Enantiomerenreinheit<sup>[104,105]</sup>

Zu der jeweiligen Alanyl-Nukleoaminosäure (5.00  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq.) wurde TFA (120  $\mu\text{L}$ ) gegeben und die Lösung für 10 min bei RT geschüttelt. Nachdem TFA im Hochvakuum entfernt wurde, wurde der Rückstand in Wasser (175  $\mu\text{L}$ ) sowie  $\text{NaHCO}_3$ -Puffer (pH 9,  $c = 1.20 \text{ mol/L}$ , 175  $\mu\text{L}$ ) aufgenommen und hierzu eine Lösung von *N*-Boc-L-Ala-OSu (8.68 mg, 30.0  $\mu\text{mol}$ , 6.00 eq.) in THF (350  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei RT geschüttelt. Nachdem mit 10 %iger TFA auf pH 2.5 angesäuert wurde, wurde der Feststoff filtriert, 5.00  $\mu\text{L}$  für HPLC-Analytik entnommen und die Diastereomere an einer RP-C-18 Säule getrennt. Die Integration der Absorptionsbanden bei 254 nm ergab das jeweilige Enantiomerenverhältnis.

### AAV2: Manuelle Synthese der PNA-Oligomere nach Boc-Festphasenstrategie

Die gemischten PNA-Oligomere wurden über Boc-Festphasensynthese nach folgendem Synthesezyklus an *N*-Boc-L-Lys(2-CI-Z)-MBHA-Harz (Belegungsdichte  $n = 0.590 - 0.660 \text{ mmol/g}$ ) aufgebaut. Die Festphasensynthese fand in einer kleinen Säule statt, welche zur Reaktion langsam rotiert wurde.

### Quellen

Das Harz wurde 2 h in DCM/NMP (1:1) gequollen.

### Entschützen

Das harzgebundene Peptid wurde mit einer Lösung von 5 % *m*-Kresol in TFA (1 x 5 min, 1 x 10 min, jeweils 2 mL) bei RT umgesetzt. Anschließend wurde mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL) gewaschen.

### Entstapeln

Zum Neutralisieren wie auch zum Entstapeln wurde mit Pyridin (5 x 2 mL) gewaschen. Nachfolgend wurde das Harz mittels Druckluft für 3 min trockengeblasen.

### Kupplung

Boc-geschützte Nukleoaminosäure (5.00 eq.) wurde jeweils mit HATU (4.50 eq.) und HOAt (5.00 eq.) zu dem Harz gegeben und in NMP gelöst. Nach 5 min wurde DIPEA

(12.0 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für die jeweils angegebene Zeit rotiert. Boc-geschützte Aminosäure (5.00 eq.) wurde jeweils mit HBTU (4.50 eq.), HOBt (5.00 eq.) und DIPEA (12.0 eq.) in NMP gelöst zu dem Harz gegeben und die Reaktionsmischung für die jeweils angegebene Zeit rotiert. Die Kupplung von Boc-Trp(Boc)-OH und von Boc-Tyr(OtBu)-OH sowie die Kupplung der ersten Aminosäure wurde als Doppelkupplung (2 x 45 min) durchgeführt.

### Waschen

Die überschüssigen Kupplungsreagenzien wurden nach der Kupplung vom Harz gewaschen. Dazu wurde zunächst mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL), danach mit Piperidin/NMP (1:9, 3 x 2 mL) und erneut mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL) gespült.

### Capping

Um die Bildung unerwünschter Peptidsequenzen zu vermeiden, wurden mögliche freie Aminofunktionen des harzgebundenen Peptides mit einer Lösung aus Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/NMP (1:1:8, 2 x 5 min, 2 mL) acetyliert. Anschließend wurde mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL), Piperidin/NMP (1:9, 3 x 2 mL) und DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL) gespült.

Die Schritte *Entschützen* bis *Capping* wurden unter Verwendung der jeweiligen Nukleoaminosäure bzw. Aminosäure bis zum Ende der gewünschten Sequenz wiederholt. Nach der letzten Kupplung wurde der *Capping*-Schritt ausgelassen. Stattdessen wurde das Harz mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL), DCM (5 x 2 mL) und mit MeOH (5 x 2 mL) gewaschen. Nachdem das Harz im Vakuum über KOH für wenigstens vier Stunden getrocknet wurde, wurde das Harz der Abspaltung (TFMSA/*m*-Kresol/TFA (1:1:8, 2 mL)) für 2 h bei 0 °C und danach für 2 h bei RT ausgesetzt. Das erhaltene Filtrat wurde evaporiert und der Rückstand mit kaltem Et<sub>2</sub>O bzw. *tert*-Butylmethylether präzipitiert. Der so erhaltene Feststoff wurde zentrifugiert und der Ether abpipettiert. Zur Reinigung wurde dieser Vorgang 2-3 mal wiederholt und der erhaltene Feststoff aus Wasser lyophilisiert.

### **AAV3: Manuelle Synthese der linearen Peptide nach Fmoc-Festphasenstrategie**

Die Peptide wurden mittels Festphasensynthese nach dem nachfolgenden Synthesekyklus an *NovaSyn*TGR-Harz (Belegungsdichte  $n = 0.200$  mmol/g) aufgebaut. Die Festphasensynthese fand in einer Spritze mit eingelegter Fritte statt, welche zur Reaktion geschüttelt wurde.

#### **Quellen**

Das Harz wurde 2 h in DCM/NMP (1:1) gequollen.

#### **Entschützen**

Das harzgebundene Peptid wurde mit einer Lösung von 20 % Piperidin in NMP (4 x 3 min, 2 mL) geschüttelt. Anschließend wurde mit NMP gespült.

#### **Kupplung**

Die Fmoc-geschützte Nukleoaminosäure (5.00 eq.) wurde jeweils mit HATU (4.50 eq.) und HOAt (5.00 eq.) zu dem Harz gegeben und in NMP gelöst. Nach 5 min wurde DIPEA (10.0 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für die jeweils angegebene Zeit geschüttelt.

Fmoc-geschützte Aminosäure (5.00 eq. bzw. 4.00 eq.) wurde jeweils mit HBTU (4.50 eq.) und HOBt (5.00 eq.) in NMP gelöst und DIPEA (10.0 eq.) zugegeben.

Die Kupplung der ersten Aminosäure wurde folgendermaßen als Doppelkupplung (2 x 1 h) durchgeführt: Die erste Kupplung erfolgte mit DIC (10.0 eq.) und HOBt (5.00 eq.) in NMP, die zweite mit HBTU (4.50 eq.), HOBt (5.00 eq.) und DIPEA (10.0 eq.) in NMP. Die Lösung der übrigen Aminosäuren wurde für die jeweils angegebene Zeit geschüttelt. Die Kupplung von Fmoc-Trp-OH und Fmoc-Pro-OH wurden als Doppelkupplung (2 x 45 min) durchgeführt.

#### **Waschen**

Die überschüssigen Kupplungsreagenzien wurden nach der Kupplung vom Harz gewaschen. Dazu wurde zunächst mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL), danach mit DCM (3 x 2 mL) und erneut mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL) gespült.

## Capping

Um die Bildung unerwünschter Peptidsequenzen zu vermeiden, wurden mögliche freie Aminofunktionen des harzgebundenen Peptides mit einer Lösung aus Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/NMP (1:1:8, 2 x 5 min, 2 mL) acetyliert. Anschließend wurde mit DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL), Piperidin/NMP (1:9, 3 x 2 mL) und DCM/NMP (1:1, 5 x 2 mL) gespült.

Die Schritte *Entschützen* bis *Capping* wurden unter Verwendung der jeweiligen Aminosäure bis zum Ende der gewünschten Sequenz wiederholt. Nach der letzten Kupplung wurde der Entschützungsschritt wiederholt und nach dem Waschen zusätzlich mit DCM (5 x 2 mL) und mit MeOH (5 x 2 mL) gewaschen. Nachdem das Harz im Vakuum über KOH für 24 h getrocknet wurde, wurde das Harz mit der jeweiligen Abspaltlösung für 2 h versetzt. Die Standardlösung H<sub>2</sub>O/TIS/Anisol/DTT/TFA (0.5:0.5:0.5:1:23) wurde für alle Peptide eingesetzt. Das erhaltene Filtrat wurde evaporiert und der Rückstand mit kaltem Et<sub>2</sub>O bzw. *tert*-Butylmethylether präzipitiert. Die Mischung wurde zentrifugiert, der Et<sub>2</sub>O abpipettiert und dieser Vorgang 2-3 mal wiederholt. Der Feststoff wurde aus H<sub>2</sub>O/Dioxan (1:2) lyophilisiert.

## AAV4: Automatische Synthese der linearen Peptide nach Fmoc-Festphasenstrategie

Die automatische Festphasensynthese wurde an *NovaSynTGR*-Harz (Belegungsdichte  $n = 0.200$  mmol/g) durchgeführt. Das Volumen der Spülreagenzien betrug je nach aktueller Durchflussgeschwindigkeit 2-3 mL. Der sequenzielle Aufbau des Peptids erfolgte nach folgendem Schema:

1. Für die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz zuerst mit 22 % Piperidin in NMP (2 min, 1 mL) versetzt. Nach Filtration wurde erneut 22 % Piperidin in NMP (8 min, 1 mL) zugegeben.
2. Zur Reinigung des Harzes wurde es mit NMP (4 x) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3. Für die Kupplung der Aminosäuren, wurden diese (10.0 eq.) in NMP (2 mL) gelöst und mit einer Lösung von HBTU/HOBt (0.450 M, 2.00 mL, 9.00 eq.) in NMP präaktiviert (6 min). Nach dem Zusatz einer DIPEA-Lösung (2.00 M, 2.00 mL, 20.0 eq.) in DMF wurde die Mischung zum Harz gegeben und geschüttelt (45 min).
4. Nach Spülen des Harzes mit NMP (2 x) wurde mit einer Lösung aus Ac<sub>2</sub>O/DMF (1:9) gecappt.

Die Schritte 1-4 wurden bis zum Erreichen der gewünschten Oligomerlänge wiederholt. Nachdem Schritt 1 zum terminalen Entschützen durchgeführt wurde, wurde mit NMP (4 x) und DCM (2 x) gespült. Das Harz wurde für mindestens 3 h über KOH im Vakuum getrocknet. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte entsprechend **AAV3**.

### 8.3 Synthetisierte Verbindungen

#### Boc-Alanyl-Nukleoaminosäuren

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(2-amino-6-chlor-9-purinyI)-alanin (**8**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(2-amino-6-chlor-9-purinyI)-alanin (**ent-8**)

(S)- $\beta$ -(9-GuaninyI)-alanin (**47**)

(R)- $\beta$ -(9-GuaninyI)-alanin (**ent-47**)

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyI)-alanin (Boc-L-AlaG-OH) (**6**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyI)-alanin (Boc-D-AlaG-OH) (**ent-6**)

*N*-4-Benzyloxycarbonyl-1-cytosin (**5**)

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyI)-alanin  
(Boc-L-AlaC<sub>2</sub>-OH) (**7**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyI)-alanin  
(Boc-D-AlaC<sub>2</sub>-OH) (**ent-7**)

#### Boc-Homoalanyl-Nukleoaminosäuren

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -hydroxy-homoalanylbenzylester (**10**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -hydroxy-homoalanylbenzylester (**ent-10**)

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -brom-homoalanylbenzylester (**11**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -brom-homoalanylbenzylester (**ent-11**)

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(2-amino-6-chlor-9-purinyI)-homoalanylbenzylester (**12**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(2-amino-6-chlor-9-purinyI)-homoalanylbenzylester  
(**ent-12**)

(S)- $\gamma$ -(9-GuaninyI)-homoalanylbenzylester (**49**)

(R)- $\gamma$ -(9-GuaninyI)-homoalanylbenzylester (**ent-49**)

(S)- $\gamma$ -(9-GuaninyI)-homoalanin (**36**)

(R)- $\gamma$ -(9-GuaninyI)-homoalanin (**ent-36**)

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyI)-homoalanin (Boc-L-HaIG-OH) (**13**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyI)-homoalanin (Boc-D-HaIG-OH) (**ent-13**)

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyI)-homoalanylbenzyl-  
ester (**14**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyI)-homoalanylbenzyl-  
ester (**ent-14**)

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanylbenzylester (Boc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH) (**15**)

(R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanylbenzylester (Boc-D-HalC<sub>Z</sub>-OH) (**ent-15**)

### Fmoc-Alanyl-Nukleoaminosäuren

(S)-*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyl)-alanin  
(Fmoc-L-AlaG-OH) (**46**)

(R)-*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyl)-alanin  
(Fmoc-D-AlaG-OH) (**ent-46**)

### Fmoc-Homoalanyl-Nukleoaminosäuren

(S)-*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyl)-homoalanin  
(Fmoc-L-HalG-OH) (**34**)

(S)- $\gamma$ -(4-Benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanin (**37**)

(S)-*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanin  
(Fmoc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH) (**35**)

### Stilben-Linker

4,4'-*trans*-Stilbendicarboxylat (**17**)

4,4'-*trans*-Stilbendicarbonsäuredichlorid (**18**)

*trans*-Stilben-4-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyle)-4'-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyle (**2'**) + 4,4'-*trans*-Stilben-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyle (**19**)

*trans*-Stilben-4-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyle)-4'-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyle (**2'**) + 4,4'-*trans*-Stilben-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyle)-aminoethylcarbamoyle (**20**)



### Synthese der gemischten Peptidnucleinsäuren

H-Gly-Val-Cys-Pro-AlaG-Ile-Leu-Lys-Lys-Cys-Arg-Arg-Asp-Ser-Asp-Cys-Pro-Gly-Ala-Cys-Ile-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Tyr-Cys-Gly-NH<sub>2</sub> (**47**)

nach Fmoc-Festphasenstrategie

H-Gly-Val-Cys-Pro-AlaG-Ile-Leu-Lys-Lys-Cys-Arg-Arg-Asp-Ser-Asp-Cys-Pro-Gly-Ala-Cys-Ile-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Tyr-Cys-Gly-NH<sub>2</sub> (**ent-47**)

nach Fmoc-Festphasenstrategie

Ac-Lys-Ala-Tyr-Lys-Ala-Trp-Ala-Glu-Ala-Tyr-Ala-Lys-Trp-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (**32**)

nach Boc-Festphasenstrategie

Ac-Lys-Ala-Tyr-Lys-Ala-Trp-Ala-Glu-Ala-Tyr-Ala-Lys-Trp-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (**32**)

nach Fmoc-Festphasenstrategie

Ac-Lys-Ala-HalC-Lys-Ala-HalG-Ala-Glu-Ala-HalC-Ala-Lys-HalG-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (**28**)

nach Fmoc-Festphasenstrategie

Ac-Lys-Ala-HalC-Lys-Ala-HalC-Ala-Glu-Ala-HalG-Ala-Lys-HalG-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (**29**)

nach Boc-Festphasenstrategie

Ac-Lys-Ala-HalG-Lys-Ala-HalC-Ala-Glu-Ala-HalG-Ala-Lys-HalC-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (**28**)

nach Boc-Festphasenstrategie

Ac-Lys-Ala-Trp-Lys-Ala-Trp-Ala-Glu-Ala-Tyr-Ala-Lys-Trp-Ala-Lys-Ala-Tyr-Lys-Ala-Tyr-Ala-NH<sub>2</sub> (**33**) nach Fmoc-Festphasenstrategie

Ac-Lys-Ala-HalG-Lys-Ala-HalG-Ala-Glu-Ala-HalC-Ala-Lys-HalG-Ala-Lys-Ala-HalC-Lys-Ala-HalC-Ala-NH<sub>2</sub> (**27**) nach Boc-Festphasenstrategie

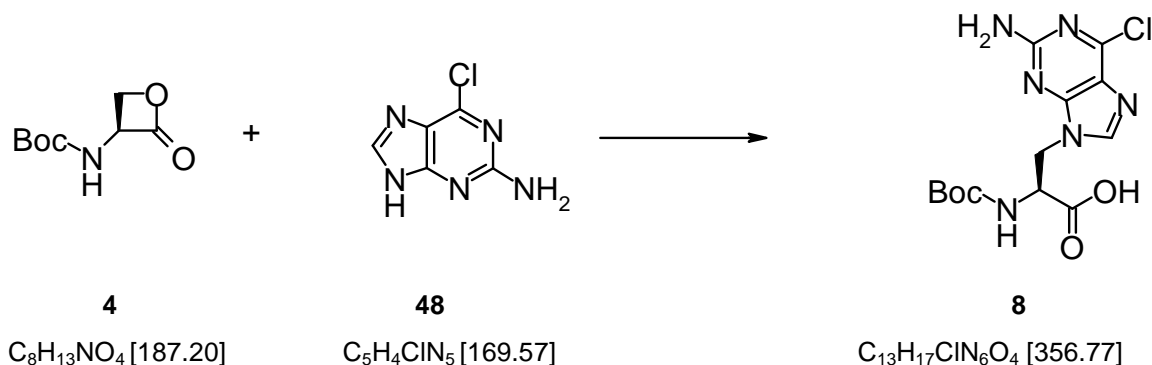
### Synthese der gemischten Peptidnucleinsäuren mit Linker

H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure)]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> (**23**)

H-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-[20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure)]-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> (**24**)

## 8.4 Synthese der Nukleoaminosäuren

### (S)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(2-amino-6-chlor-9-puriny)-alanin (**8**)<sup>[17]</sup>



Unter Argon wurde zu einer Suspension von 2-Amino-6-chlorpurin (**48**, 1.76 g, 10.4 mmol, 1.30 eq.) in DMSO (5.00 mL) innerhalb von 15 min DBU (1.36 mL, 1.39 g, 9.15 mmol, 1.15 eq.) zugetropft und anschließend 15 min bei RT gerührt. Innerhalb weiterer 15 min wurde eine Lösung von (S)-N-tert-Butoxycarbonyl-Serinlacton (**4**, 1.49 g, 7.96 mmol, 1.00 eq.) in DMSO (5.00 mL) zugetropft. Nach 5 h Rühren bei RT wurde die Reaktion mittels Zugabe von HOAc (0.501 mL, 8.76 mmol, 1.10 eq.) zum Abschluss gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand mittels FC an Kieselgel (l = 12 cm, Ø = 7 cm, EE/MeOH 8:2, Gradient 1 % HOAc pro 1000 mL) aufgereinigt. Es wurden 1.53 g (4.29 mmol, 54 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff isoliert.

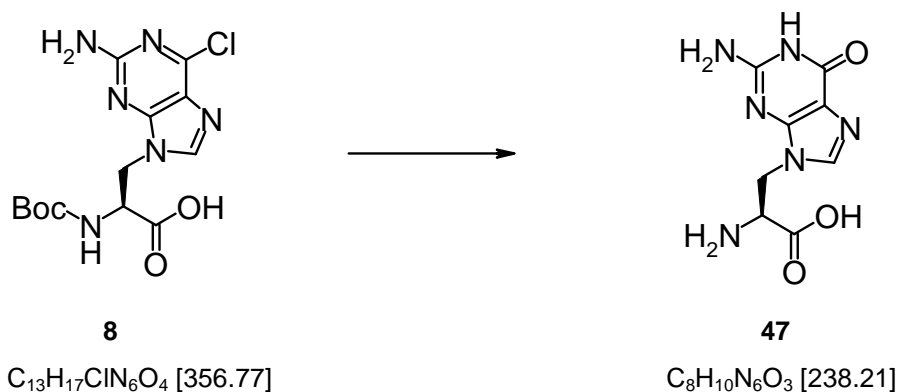
**DC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/HOAc 70:30:3:0.3): R<sub>f</sub> = 0.25.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ = 1.05 (s, 1.5H, *t*-Bu-Rotamer), 1.25 (s, 7.5H, *t*-Bu), 4.15 (dd, *J* = 14 Hz, *J* = 10 Hz, 1H, H-β), 4.24-4.27 (m, 1H, H-α), 4.46 (m, 1H; H-β), 6.90 (s br, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.00 (d, *J* = 8 Hz, 1H, NHBoc), 7.92 (s, 1H, H-8) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ = 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 44.2 (C-β), 53.2 (C-α), 78.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 123.4 (C-5), 143.6 (C-8), 149.3 (C-4), 154.4 (C-2), 155.3 (CONH), 159.9 (C-4), 171.4 (COOH) ppm.

**(R)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-alanin (ent-8)**

Es wurde eine dem (*S*)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

**(S)- $\beta$ -(9-Guaninyl)-alanin (47)<sup>[17]</sup>**

Eine Lösung von (*S*)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-alanin (**8**, 1.06 g, 2.97 mmol, 1.00 eq.) in TFA/H<sub>2</sub>O (3:1, 12.2 mL) wurde für 4 d bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde evaporiert und unter Zugabe von 1 N HCl bis zur Trockene eingedampft.

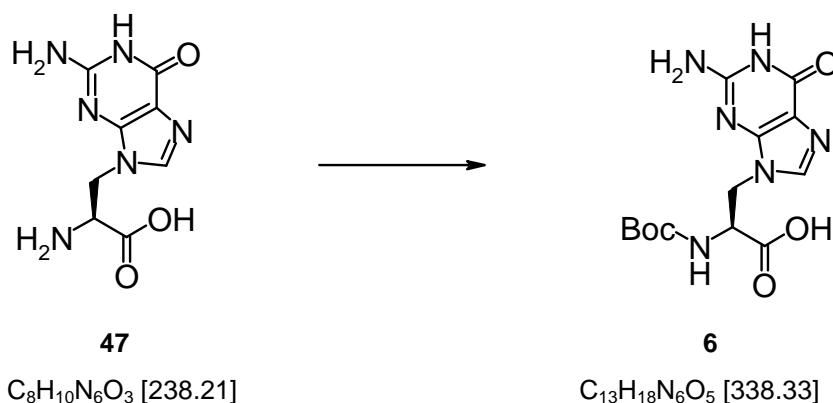
**DC** (*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O/HOAc/NaCl 5:2:1: ges.):  $R_f = 0.17$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta = 4.49$ -4.53 (m, 2H, H- $\alpha$ , H- $\beta$ ), 4.62-4.64 (m, 1H, H- $\beta$ ), 7.45 (s br, 2H, NH<sub>2</sub>Purin), 8.89 (s, 1H, H-8), 9.01 (s br, 2H, NH<sub>2</sub>), 11.89 (s, 1H, NHPurin) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta = 44.2$  (C- $\beta$ ), 51.1 (C- $\alpha$ ), 108.9 (C-5), 138.0 (C-8), 150.5 (C-4), 153.9 (C-2), 155.9 (C-6), 168.0 (COOH) ppm.

**(R)- $\beta$ -(9-Guaninyl)-alanin (ent-47)**

Es wurde eine dem Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

**(S)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyl)-alanin (Boc-L-AlaG-OH) (6)<sup>[17]</sup>**

Das Rohprodukt (S)- $\beta$ -(9-Guaninyl)-alanin (**47**, 70.7 g, 2.97 mmol, 1.00 eq.) wurde in Dioxan/H<sub>2</sub>O/1 N NaOH (2:1:1, 20.0 mL) aufgenommen, auf 0 °C gekühlt und mit *N*-Di-*tert*-butyldicarboxylat (0.710 g, 3.27 mmol, 1.10 eq.) versetzt. Nach 45 min wurde die Reaktionsmischung auf RT erwärmt. Der pH-Wert wurde mittels 1 N NaOH auf pH 9.0-9.5 eingestellt und die Mischung unter Kontrolle des pH-Wertes für 70 h bei RT weitergerührt. Daraufhin wurde die Lösung unter Zugabe von 1 N HCl auf pH 6.5 angesäuert und bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels FC an RP-Kieselgel (l = 10 cm, Ø = 2 cm, H<sub>2</sub>O, Gradient 10 % MeOH pro 500 mL) gereinigt. Es wurden 0.512 g (1.49 mmol, 50 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff isoliert.

**DC** (*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O/HOAc/NaCl 5:2:1: ges.):  $R_f = 0.60$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta = 0.97$  (s, 1.5H, *t*-Bu-Rotamer), 1.24 (s, 7.5H, *t*-Bu), 4.07-4.18 (m, 2H, H- $\alpha$ , H- $\beta$ ), 4.50 (d,  $J = 10$  Hz, 1H, H- $\beta$ ), 6.49 (s br, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.68 (d,  $J = 7$  Hz, 1H, NHBoc), 7.88 (s, 1H, H-8), 8.51 (s, 1H, H-6) ppm.

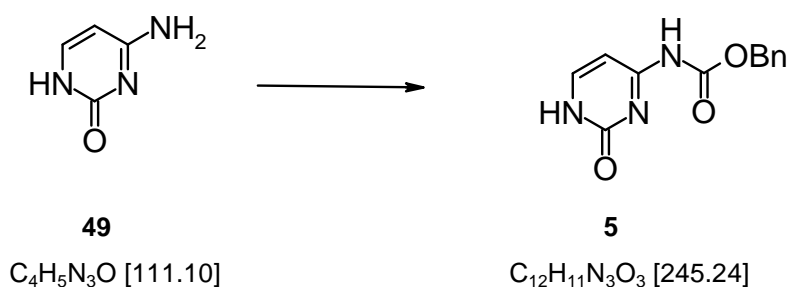
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta = 28.2$  (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 44.3 (C- $\beta$ ), 54.3 (C- $\alpha$ ), 78.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.0 (C-5), 143.3 (C-6), 148.5 (C-8), 153.4 (C-4), 155.2 (CONH), 160.6 (C-2), 172.2 (COOH) ppm.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **6** nach **AAV1** mit *N*-Boc-L-Ala-OSu umgesetzt: > 96 % ee. **HPLC**: (Gradient: 5 - 18 % B' in 30 min, *like* Diastereomer)  $t_r = 17.4$  min.

**(R)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyl)-alanin (Boc-D-AlaG-OH) (ent-6)**

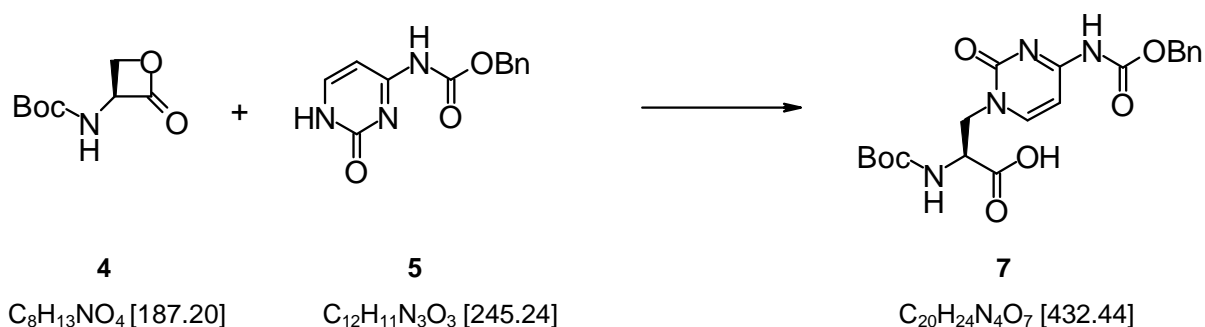
Es wurde eine dem Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten. Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **ent-6** nach **AAV1** mit *N*-Boc-L-Ala-OSu umgesetzt: > 97 % ee. **HPLC**: (Gradient: 5 - 18 % B' in 30 min, *unlike* Diastereomer)  $t_r = 18.8$  min.

***N*-4-Benzoyloxycarbonyl-1-cytosin (**5**)**<sup>[17,137]</sup>



Zu einer Lösung von Cytosin (**49**, 15.0 g, 135 mmol, 1.00 eq.) in trockenem Pyridin (240 mL) wurde bei 0 °C DMAP (3.30 g, 27.0 mmol, 0.200 eq.) zugegeben. Nach langsamen Zutropfen von Chlorameisensäurebenzylester (84.0 mL, 297 mmol, 50 %ige Lösung Toluol, 2.20 eq.) wurde auf RT aufgetaut und für 72 h gerührt. Die Lösung wurde mit Eiswasser (150 mL) hydrolisiert, der Niederschlag abfiltriert und mit Et<sub>2</sub>O (5 x 80 mL) gewaschen. Es wurden 22.2 g (90.5 mmol, 67 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta = 5.10$  (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.95 (d,  $J = 7$  Hz, 1H, H-5), 7.27-7.38 (m, 5H, Ph), 7.52 (d,  $J = 7$  Hz, 1H, H-6), 7.81 (s br, 2H, NH) ppm.

**(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(N-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (Boc-L-AlaC<sub>z</sub>-OH)(7)**<sup>[17,137]</sup>

Zu einer Suspension von *N*-4-Benzyloxycarbonyl-1-cytosin (**5**, 6.00 g, 24.5 mmol, 2.00 eq.) in DMSO (12.0 mL) wurde DBU (2.70 mL, 2.79 g, 18.4 mmol, 1.50 eq.) gegeben. Innerhalb von 15 min wurde eine Lösung von (*S*)-*N*-tert-Butoxycarbonyl-serinlacton (**4**, 2.29 g, 12.2 mmol, 1.00 eq.) in DMSO (5.00 mL) zugetropft und weitere 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HOAc (1.10 mL, 18.3 mmol, 1.50 eq.) beendet. Das Produkt wurde mittels FC an Kieselgel (l = 10 cm, Ø = 6 cm, EE/MeOH 9:1, Gradient 1 % HOAc auf 500 mL) gereinigt. Nachfolgend wurde das Produkt aus Nitromethan umkristallisiert. Es wurden 2.59 g (5.99 mmol, 49 %) der gewünschten Substanz als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (EE/MeOH/H<sub>2</sub>O/HOAc/NaCl 10:1:1:0.5: ges.):  $R_f = 0.32$ .

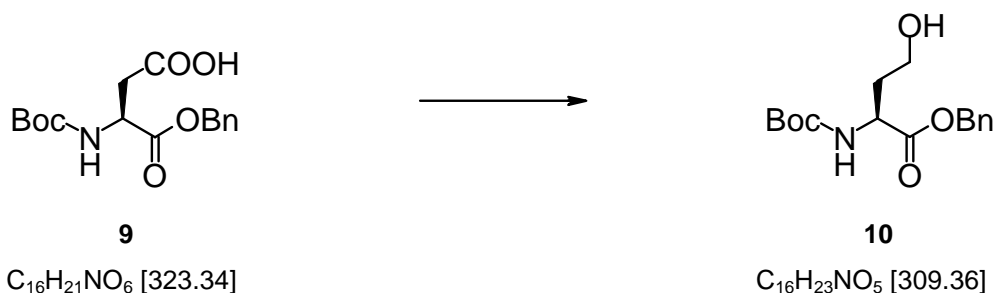
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta = 1.26$  (s, 9H, *t*-Bu), 3.39 (m, 1H, H-β), 4.01-4.13 (m, 1H, H-α), 4.45 (dd,  $J = 12.7$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-β), 5.17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.21 (s, 1H, *NH*Boc), 6.86 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-5), 7.34-7.41 (m, 5H, Ph), 7.86 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-6), 10.58 (s br, 1H, COOH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta = 28.0$  (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 52.5 (C-β), 53.2 (C-α), 66.2 (CH<sub>2</sub>Ph), 77.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 93.2 (C-5), 127.7 (*m*-Ph), 127.9 (*p*-Ph), 128.3 (*o*-Ph), 135.9 (C-4), 150.1 (C-6), 153.2 (C-2), 162.4 (COOBn), 171.2 (COOH) ppm.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **7** nach **AAV1** mit *N*-Boc-L-Ala-OSu umgesetzt: > 96 % ee. **HPLC**: (Gradient: 10 - 50 % B' in 30 min, *like* Diastereomer)  $t_r = 26.0$  min.

**(R)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\beta$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (Boc-D-AlaC<sub>2</sub>-OH) (ent-7)**

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten. Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **ent-7** nach **AAV1** mit *N*-Boc-L-Ala-OSu umgesetzt: > 96 % ee. **HPLC**: (Gradient: 10 - 50 % B' in 30 min, *unlike* Diastereomer)  $t_r$  = 26.7 min.

**(S)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -hydroxy-homoalanylbenzylester (10)<sup>[111]</sup>**

Bei 0 °C wurde zu einer  $\text{BH}_3$ :THF-Lösung (31.0 mL, 31.0 mmol, 2.00 eq.) unter Argon eine Lösung von (S)-Benzyl-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-asparaginsäure (**9**, 5.00 g, 15.5 mmol, 1.00 eq.) in trockenem THF (20.0 mL) langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 6 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung 24 h bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, bevor die Reaktion durch Zugabe von HOAc (10 %) in Methanol (20.0 mL) beendet wurde. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand unter Eiskühlung in EE aufgenommen. Die Lösung wurde mit jeweils eisgekühlter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (3 x 35.0 mL), halbges.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung (3 x 35.0 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 35.0 mL) gewaschen sowie die wässrige Phase mit EE (35.0 ml) rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels FC an Kieselgel (l = 25 cm,  $\varnothing$  = 5 cm, Hexan/EE 3:2) aufgereinigt. Es wurden 2.98 g (9.63 mmol, 62 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff isoliert.

**DC** (Hexan/EE 3:2):  $R_f$  = 0.47.



**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.42 (s, 9H, *t*-Bu), 1.52-1.68 (m, 1H, H- $\beta$ ), 2.09-2.21 (m, 1H, H- $\beta$ ), 3.58-3.73 (m, 2H, H- $\gamma$ ), 4.51 (m, 1H, H- $\alpha$ ), 5.18 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.39 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, *N*H*Boc*), 7.33 (s, 5H, Ph) ppm.

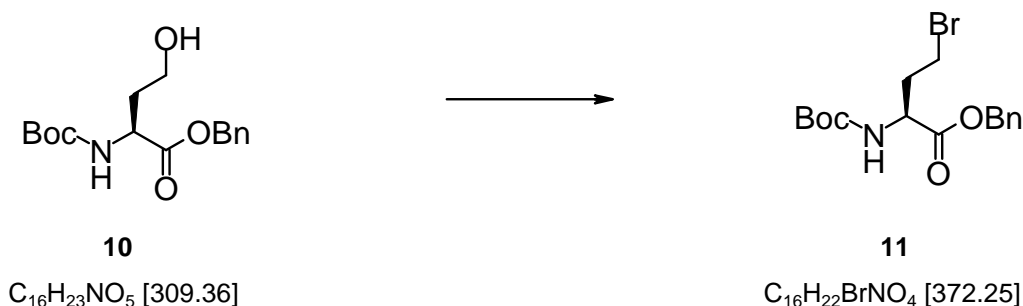
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 28.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 36.1 (C- $\beta$ ), 50.0 (C- $\alpha$ ), 58.2 (C- $\gamma$ ), 67.3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 80.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 128.0, (*m*-Ph), 128.5 (*p*-Ph), 128.6 (*o*-Ph), 135.2 (*i*-Ph), 155.5 (CONH), 172.4 (COOBn) ppm.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 332.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### (*R*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -hydroxy-homoalanylbenzylester (**ent-10**)

Es wurde eine dem (*S*)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

### (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -brom-homoalanylbenzylester (**11**)<sup>[113]</sup>



(*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -hydroxy-homoalanylbenzylester (**10**, 1.40 g, 4.53 mmol, 1.00 eq.) wurde unter Argon in trockenem DCM (30.0 mL) gelöst und auf -5 °C gekühlt. Unter Lichtausschluß wurde  $\text{CBr}_4$  (300 g, 9.06 mmol, 2.00 eq.) zugegeben.  $\text{PPh}_3$  (2.38 g, 9.06 mmol, 2.00 eq.) wurde in trockenem DCM (15.0 mL) gelöst, auf -5 °C gekühlt, zur Reaktionsmischung gegeben und bei RT 2 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels FC an Kieselgel ( $l$  = 25 cm,  $\varnothing$  = 5 cm, Hexan/EE 5:1, Gradient 1 % HOAc pro 500 mL) aufgereinigt. Es wurden 979 mg (2.63 mmol, 58 %) der gewünschten Verbindung als farbloses Öl isoliert, das bei 4 °C auskristallisierte.

**DC** (Hexan/EE 5:1):  $R_f$  = 0.68.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.42 (s, 9H, *t*-Bu), 2.13-2.23 (m, 1H, H- $\beta$ ), 2.33-2.48 (m, 1H, H- $\beta$ ), 3.38 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H, H- $\gamma$ ), 4.45 (m, 1H, H- $\alpha$ ), 5.07-5.17 (m, 3H, *NHBoc*, CH<sub>2</sub>Ph), 7.34 (m, 5H, Ph) ppm.

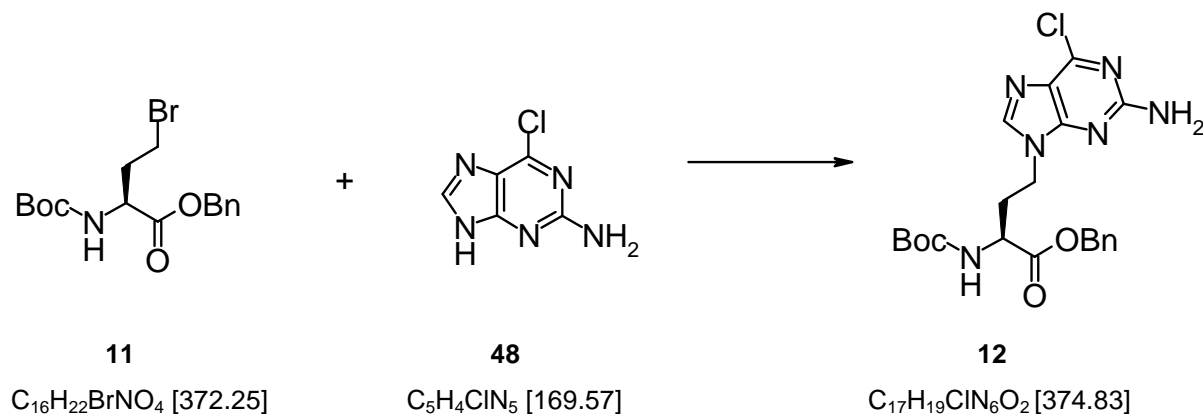
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 28.3 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), C- $\gamma$ ), 35.8 (C- $\beta$ ), 52.6 (C- $\alpha$ ), 67.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 80.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.3 (*m*-Ph), 128.6 (*p*-Ph, *o*-Ph), 135.2 (*i*-Ph), 155.3 (CONH), 171.6 (COOBn) ppm.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 396.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 766.7 [2M+Na]<sup>+</sup>.

### (R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -brom-homoalanylbenzylester (ent-11)

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

### (S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-homoalanylbenzylester (12)<sup>[17]</sup>



(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -brom-homoalanylbenzylester (**11**, 357 mg, 959  $\mu$ mol, 1.00 eq.), 2-Amino-6-chlorpurin (**48**, 0.244 g, 1.44 mmol, 1.50 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.199 g, 1.44 mmol, 1.50 eq.) und TBAI (35.0 mg, 96.0  $\mu$ mol, 0.100 eq.) wurden bei RT 93 h in DMF (50.0 mL) gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HOAc (80.0  $\mu$ L, 144  $\mu$ mol, 1.50 eq.) beendet und das Lösungsmittel mittels Codestillation mit Toluol im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels FC an Kieselgel (l = 25 cm,  $\varnothing$  = 5 cm, Hexan/EE 1:3) aufgereinigt. Es wurden 291 mg (777  $\mu$ mol, 81 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff isoliert.

**DC** (Hexan/EE 1:3):  $R_f = 0.52$ .

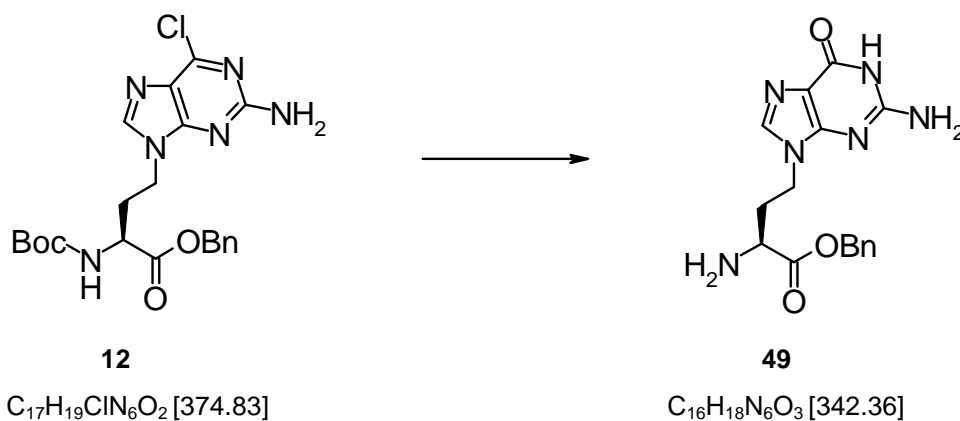
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.42$  (s, 9H, *t*-Bu), 2.15-2.24 (m, 1H, H- $\beta$ ), 2.32-2.46 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H- $\gamma$ ), 4.38 (m, 1H, H- $\alpha$ ), 5.07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.17 (s br, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5.53 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 7.22-7.35 (m, 5H, Ph), 7.75 (s, 1H, H-8) ppm.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 483.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**(R)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-homoalanylbenzylester (ent-12)**

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

**(S)- $\gamma$ -(9-Guaninyl)-homoalanylbenzylester (49)**<sup>[17,137]</sup>



Bei RT wurde eine Lösung von (S)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-homoalanylbenzylester (**12**, 382 mg, 1.02 mmol, 1.00 eq.) in TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (3:1, 12.0 mL) für 4 d zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt nach AufschlÄmmen in  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x) und anschließendem Evaporieren im Hochvakuum getrocknet.

**DC** (*i*-PrOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /HOAc/NaCl 5:2:1: ges.):  $R_f = 0.58$ .

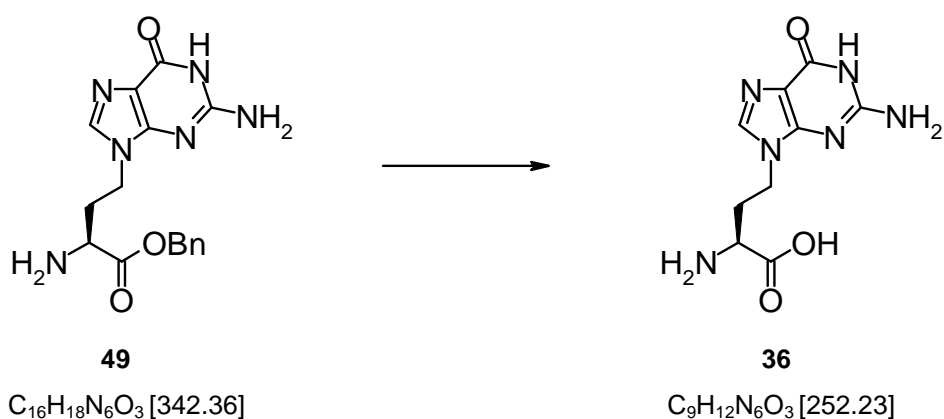
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta$  = 2.25-2.45 (m, 2H, H- $\beta$ ), 4.21 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, H- $\gamma$ ), 5.15 (q,  $J$  = 12 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6.87 (s br, 2H;  $\text{NH}_2$ ), 7.37 (s, 5H; Ph), 8.32 (s, 1H; H-8), 8.67 (s br, 2H;  $\text{NH}_2\text{Purin}$ ) ppm.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 343.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 365.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 685.1  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 707.2  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### (R)- $\gamma$ -(9-Guaninyl)-homoalanylbenzylester (ent-49)

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

### (S)- $\gamma$ -(9-Guaninyl)-homoalanin (36)<sup>[17,137]</sup>



Zu einer Lösung von (S)-*N-tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyl)-homoalanylbenzylester (**49**, 726 mg, 2.12 mmol, 1.00 eq.) in MeOH/HOAc (19:1, 60.0 mL) wurde unter Argon PdO·H<sub>2</sub>O (328 mg, 2.33 mmol, 1.10 eq.) gegeben. Nach Spülen mit Wasserstoff wurde unter Wasserstoffatmosphäre mittels Ultraschall aktiviert und bei RT 2 h gerührt. Nach Spülen der Reaktionsmischung mit Argon wurde über Celite filtriert und mit warmen MeOH (3 x 40 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels mit Toluol als Azeotrop wurden 482 mg (1.91 mmol, 91 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O/HOAc/NaCl 5:2:1: ges.):  $R_f$  = 0.16.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 2.15-2.40 (m, 2H, H- $\beta$ ), 3.77 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H; H- $\alpha$ ), 4.15 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, H- $\gamma$ ), 6.60 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.89 (s, 1H, H-8), 8.40 (s br, 2H, NH<sub>2</sub>Purin) ppm.

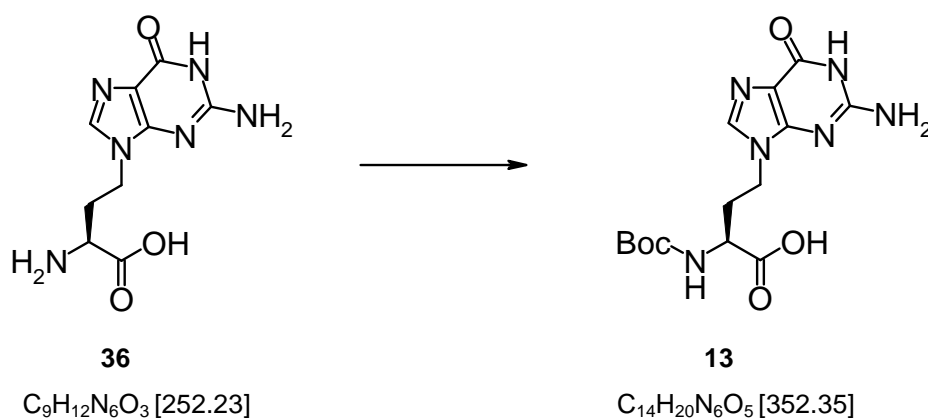
**ESI-MS** ( $m/z$ ): 253.1 [M+H]<sup>+</sup>.

### (R)- $\gamma$ -(9-Guaninyl)-homoalanin (ent-36)

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

### (S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(9-guaninyl)-homoalanin

#### (Boc-L-HaIG-OH) (13)<sup>[17,137]</sup>



Das Rohprodukt (S)- $\gamma$ -(9-Guaninyl)-homoalaninbenzylester (**36**, 146 mg, 579  $\mu$ mol, 1.00 eq.) wurde in H<sub>2</sub>O/1 N NaOH/Dioxan (1:1:2, 4 mL) aufgenommen, auf 0 °C gekühlt und mit *N*-Di-*tert*-butyldicarboxylat (183 mg, 840  $\mu$ mol, 1.45 eq.) versetzt. Es wurde 45 min bei 0 °C und 24 h bei RT gerührt, wobei mittels 1 N NaOH der pH-Wert auf 9.0-9.5 nachreguliert wurde. Nach Abkühlung auf 0 °C wurde die Reaktionslösung nochmals mit *N*-Di-*tert*-Butyldicarboxylat (63.0 mg, 290  $\mu$ mol, 0.500 eq.) versetzt, 1 h bei 0 °C und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde beendet, indem mit 1 N HCl auf pH 6.5 angesäuert wurde und das Lösungsmittel entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde mittels FC an RP-Kieselgel (l = 10 cm,  $\varnothing$  = 2 cm, H<sub>2</sub>O, Gradient 10 % MeOH pro 500 mL) gereinigt. Es wurden 102 mg (0.290 mmol, 50 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff isoliert.

**DC** (*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O/HOAc/NaCl 5:2:1: ges.): R<sub>f</sub> = 0.50.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ = 1.40 (s, 9H, *t*-Bu), 1.95 (m, 1H, H-β), 2.22 (m, 1H, H-β), 3.80 (m, 1H, H-α), 4.00 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-β), 6.40 (s br, 2H, NH<sub>2</sub>Purin), 7.18 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NHBoc), 7.58 (s, 1H, Ph), 10.53 (s br, 1H, NHPurin), 11.60 (s br, 1H, COOH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) δ = 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.1 (C-β), 40.7 (C-γ), 53.3 (C-α), 77.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 116.7 (C-5), 137.4 (C-8), 151.3 (C-6), 154.4 (C-2), 155.5 (CONH), 157.6 (C-4), 174.3 (COOH) ppm.

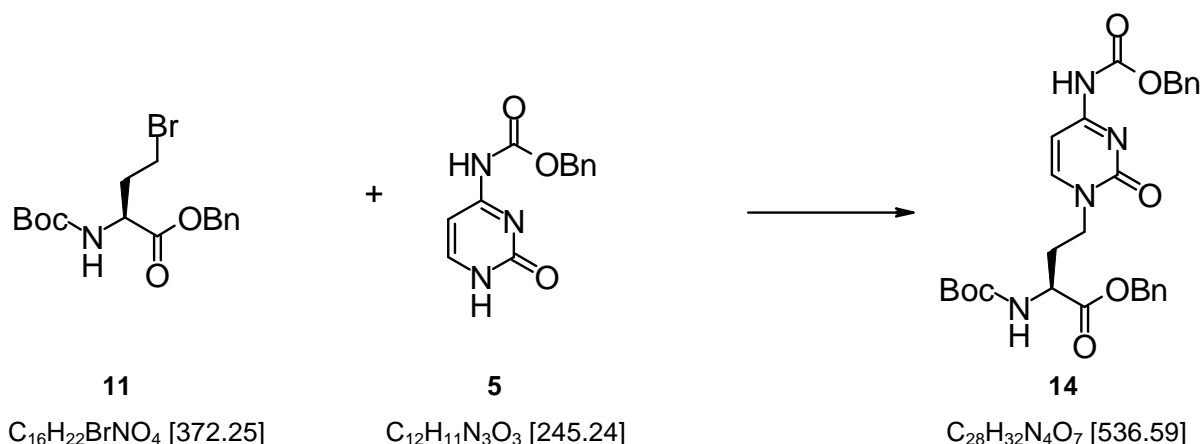
**ESI-MS** (*m/z*): 397.1 [M+2Na]<sup>+</sup>, 351.1 [M-H]<sup>-</sup>.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **13** nach **AAV1** mit *N*-Boc-D-Phe-OSu umgesetzt: > 96 % ee. **HPLC**: (Gradient: 10 - 15 % B' in 30 min, *like* Diastereomer) t<sub>r</sub> = 25.5 min.

#### **(R)-*N*-tert-Butoxycarbonyl-γ-(9-guaninyl)-homoalanin (Boc-D-HaIG-OH) (ent-13)**

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **ent-13** nach **AAV1** mit *N*-Boc-D-Phe-OSu umgesetzt: > 96 % ee. **HPLC**: (Gradient: 10 - 15 % B' in 30 min, *unlike* Diastereomer) t<sub>r</sub> = 28.0 min.

**(S)-N-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(N-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanylbenzylester (14)**<sup>[17,137]</sup>

Zu einer Lösung von (S)-N-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -brom-homoalanylbenzylester (**11**, 454 mg, 1.20 mmol, 1.00 eq.) in absolutem DMF (35 mL) wurden K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (252 mg, 1.80 mmol, 1.50 eq.) und N-4-Benzyloxycarbonyl-1-cytosin (**5**, 449 mg, 1.80 mmol, 1.50 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung für 87 h bei RT unter Argon gerührt. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von HOAc (212  $\mu$ L, 1.80 mmol 1.50 eq.) wurde das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand mittels FC an Kieselgel (l = 25 cm,  $\varnothing$  = 5 cm, Hexan/EE 1:3) aufgereinigt. Es wurden 393 mg (732  $\mu$ mol, 61 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (Hexan/EE 1:3): R<sub>f</sub> = 0.32.

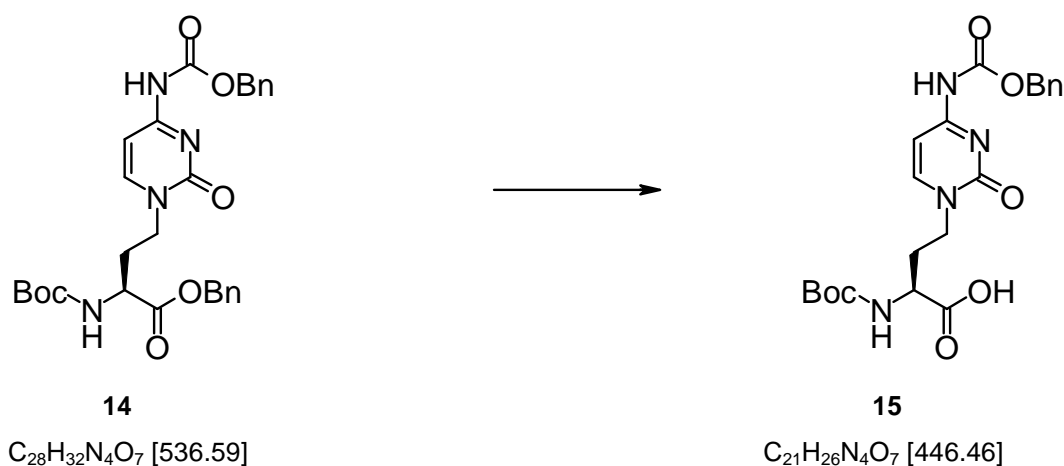
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 1.34 (s, 9H, *t*-Bu), 2.18-2.32 (m, 2H, H- $\beta$ ), 3.75-4.10 (m, 2H, H- $\gamma$ ), 4.28 (s, 1H, H- $\alpha$ ), 5.05 (s, 2H, (C $\alpha$ CO<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>Ph), 5.17 (s, 2H, (NHCO<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>Ph), 5.57 (d, 1H, H-5), 7.24-7.30 (m, 10H, Ph), 7.59 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-6) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 33.6 (C- $\beta$ ), 37.2 (C- $\alpha$ ), 53.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 53.9 ((NHCO)CH<sub>2</sub>Bn), 66.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80.7 (C-5), 114.2 (Ph), 135.2 (C-6), 138.2 (C $\alpha$ COBn), 148.3 (C-4), 157.4 ((NH)COOBn), 163.9 (CONH) ppm.

**ESI-MS** (*m/z*): 559.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**(R)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanylbenzylester (ent-14)**

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

**(S)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanin (Boc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH) (15)<sup>[17,137]</sup>**

(S)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanylbenzylester (**14**, 328 mg, 610  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq.) wurde mit  $\text{H}_2\text{O}/1 \text{ N NaOH}/\text{Dioxan}$  (1:1:2, 50.0 mL) aufgenommen und bei RT 1 d gerührt. Die Reaktion wurde beendet, indem mit 1 N HCl auf pH 6 angesäuert wurde und das Lösungsmittel mit Toluol als Azeotrop coevaporiert wurde. Nach Reinigung mittels FC an Kieselgel ( $l = 20 \text{ cm}$ ,  $\varnothing = 5 \text{ cm}$ , Hexan/EE 1:3) und an RP-Kieselgel ( $l = 10 \text{ cm}$ ,  $\varnothing = 2 \text{ cm}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , Gradient 10 % MeOH pro 500 mL) wurden 158 mg (354  $\mu\text{mol}$ , 58 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (EE/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /HOAc 10:1:1:0.5):  $R_f = 0.43$ ; (MeOH):  $R_f = 0.73$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [ $\text{D}_6$ ]DMSO):  $\delta = 1.36$  (s, 9H, *t*-Bu), 1.72-2.00 (m, 2H, H- $\beta$ ), 3.45-3.56 (m, 1H, H- $\alpha$ ), 3.79 (t, 2H, H- $\gamma$ ), 5.17 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.97 (d, 1H, *NH*Boc), 6.91 (d, 1H, H-5), 7.26-7.43 (m, 5H, Ph), 8.07 (d,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , 1H, H-6), 10.62 (s br, 1H, *NH*) ppm.



**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta = 28.3$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 32.4 (C- $\beta$ ), 47.6 (C- $\gamma$ ), 53.2 (C- $\alpha$ ), 66.5 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 77.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 93.8 (C-5), 128.0 (*m*-Ph), 128.3 (*p*-Ph), 128.6 (*o*-Ph), 135 (*i*-Ph), 136.2 ( $\text{COOBn}$ ), 150.3 (C-6), 153.4 (C-4), 155.0 (C-2), 162.7 ( $\text{CONHBoc}$ ), 173.3 ( $\text{COOH}$ ) ppm.

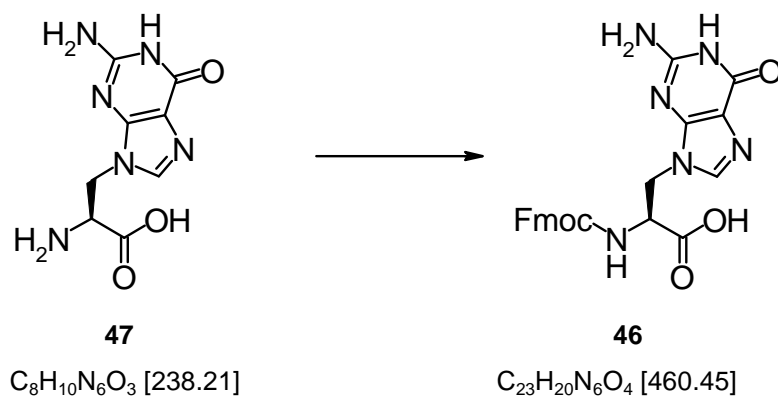
**ESI-MS** ( $m/z$ ): 469.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **15** nach **AAV1** mit *N*-Boc-D-Phe-OSu umgesetzt: > 99 % ee. **HPLC**: (Gradient: 30 % B' in 30 min, *like* Diastereomer)  $t_r = 28.4$  min.

**(R)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanin  
(Boc-D-HalC<sub>Z</sub>-OH) (ent-15)**

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten. Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde **ent-15** nach **AAV1** mit *N*-Boc-D-Phe-OSu umgesetzt: > 99 % ee. **HPLC**: (Gradient: 30 % B' in 30 min, *unlike* Diastereomer)  $t_r = 29.5$  min.

**(S)-*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyl)-L-alanin (Fmoc-L-AlaG-OH)  
(46)<sup>[138]</sup>**



Das Rohprodukt (S)- $\beta$ -(9-Guaninyl)-alanin (**47**, 1.04 g, 4.37 mmol, 1.00 eq.) wurde in ein Gemisch aus  $\text{H}_2\text{O}$ /Dioxan (2.5:1, 35.0 mL) suspendiert und die Suspension mit

ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung auf pH 8.5-9.0 eingestellt. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und unter Rühren 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (1.47 g, 5.68 mmol, 1.30 eq.) in Dioxan (20.0 mL) innerhalb von 10 min zugetropft. Der pH-Wert wurde auf pH 8.5-9.0 nachreguliert. Nach 45 min wurde die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch weitere 7 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Dioxans wurde die wässrige Lösung mit  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 4 mL) gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels FC an Kieselgel (l = 20 cm,  $\varnothing$  = 5 cm, EE/MeOH 8:2, Gradient 0.5 % HOAc pro 500 mL) gereinigt. Nach Codestillation mit Toluol wurden mittels FC an RP-Kieselgel (l = 10 cm,  $\varnothing$  = 2 cm,  $\text{H}_2\text{O}$ , Gradient 10 % MeOH pro 500 mL) 643 mg (2.05 mmol, 47 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (*i*-PrOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /HOAc/NaCl 5:2:1: ges.):  $R_f = 0.61$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta = 4.01\text{-}4.15$  (m, 3H, H- $\alpha$ , H- $\beta$ , CHFmoc), 4.25-4.46 (m, 3H, H- $\beta$ ,  $\text{CH}_2\text{Fmoc}$ ), 6.60 (s br, 3H, NHFmoc,  $\text{NH}_2$ ), 7.29-7.39 (m, 4H, H-3 $\text{Fmoc}$ , H-4 $\text{Fmoc}$ ), 7.53 (s, 1H, H-8), 7.58-7.65 (m, 2H, H-2 $\text{Fmoc}$ ), 7.87 (m, 2H, H-5 $\text{Fmoc}$ ), 10.75 (s, 1H, NHPurin) ppm.

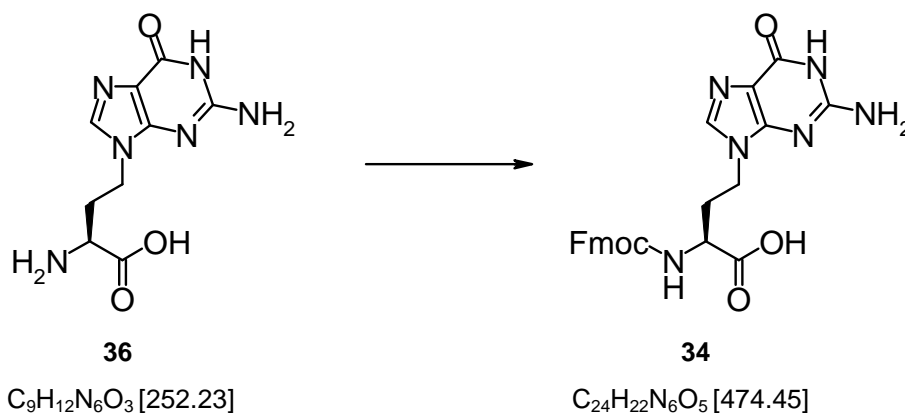
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta = 43.6$  (C- $\beta$ ), 46.7 (CHFmoc), 54.3 (C- $\alpha$ ), 65.9 ( $\text{CH}_2\text{Fmoc}$ ), 116.6 (C-5), 120.1, 120.2 (C-5 $\text{Fmoc}$ ), 125.3, 125.4 (C-2 $\text{Fmoc}$ ), 127.2, 127.3 (C-3 $\text{Fmoc}$ ), 127.4, 127.7 (C-4 $\text{Fmoc}$ ), 137.9 (C-8), 143.9, 144.0 (C-1 $\text{Fmoc}$ ), 151.4 (C-4), 153.8 (C-2), 155.9 (CONH), 157.0 (C-6), 171.5 (COOH) ppm.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 483.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 943.2  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### **(R)-N-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\beta$ -(9-guaninyl)-D-alanin (Fmoc-D-AlaG-OH) (ent-46)**

Es wurde eine dem (S)-Enantiomer analoge Synthese durchgeführt. Die Charakterisierung über NMR-Spektroskopie ergab entsprechende Daten.

**(S)-N-Fluorenylmethyloxycarbonyl-γ-(9-guaninyl)-homoalanin  
(Fmoc-L-HaIG-OH) (34)**



Das Rohprodukt (S)-γ-(9-Guaninyl)-alanin (**36**, 227 mg, 900 μmol, 1.00 eq.) wurde in ein Gemisch aus H<sub>2</sub>O/Dioxan (2.5:1, 9.00 mL) suspendiert und die Suspension mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 8.5-9.0 eingestellt. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und unter Rühren 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (303 mg, 1.17 mmol, 1.30 eq.) in Dioxan (5.00 mL) innerhalb von 10 min zugetropft. Der pH-Wert wurde auf pH 8.5-9.0 nachreguliert. Nach 45 min wurde die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch weitere 7 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Dioxans wurde die wässrige Lösung mit Et<sub>2</sub>O (2 x 2 mL) gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels FC an Kieselgel (l = 25 cm, Ø = 5 cm, EE/MeOH 8:2, Gradient 0.5 % HOAc pro 500 ml) gereinigt. Nach Codestillation mit Toluol wurden mittels FC an RP-Kieselgel (l = 20 cm, Ø = 4 cm, H<sub>2</sub>O, Gradient 10 % MeOH pro 500 mL) 183 mg (385 μmol, 43 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (EE/MeOH/H<sub>2</sub>O/HOAc/NaCl 10:1:1:0.5: ges.): R<sub>f</sub> = 0.56.

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: + 10.0 (c = 1.0, DMSO).

**UV** (Methanol): λ<sub>max</sub> = 261.0 nm.

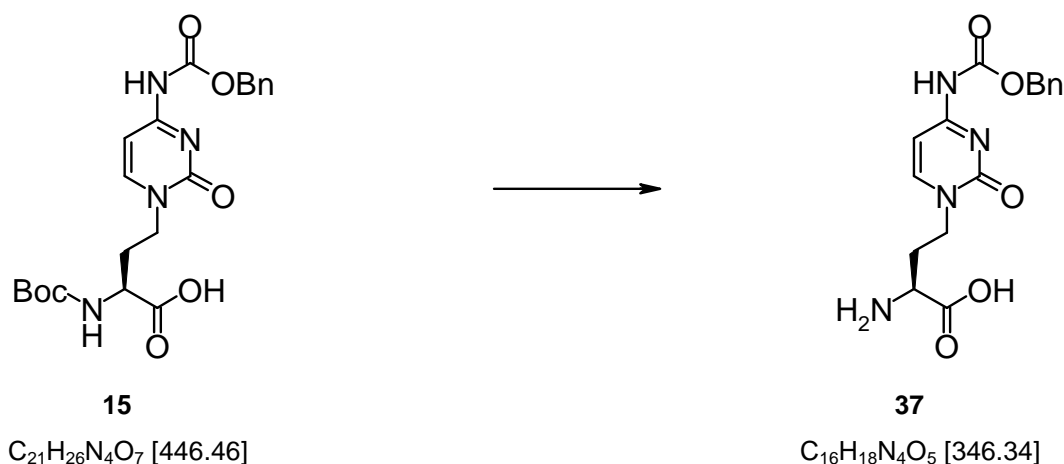
**IR** (Film): ν = 3399, 3125, 1682, 1630, 1603, 1409, 1359, 1250, 1079, 741 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ = 2.00 (m, 1H, H-β), 2.23 (m, 1H, H-β), 3.78 (m, 1H, H-α), 3.98 (t, J = 3.5 Hz, 2H, H-γ), 4.25 (m, 1H, CHFmoc), 4.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Fmoc), 6.42 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.28-7.42 (m, 4H, H-3<sub>Fmoc</sub>, H-4<sub>Fmoc</sub>), 7.58 (s, 1H, H-8), 7.72 (d, 2H, H-2<sub>Fmoc</sub>), 7.88 (d, 2H, H-5<sub>Fmoc</sub>), 10.58 (s br, 1H, COOH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta = 46.7$  (C- $\beta$ ), 65.4 (C- $\alpha$ ), 82.2 (CHFmoc), 109.5 (C- $\gamma$ ), 119.9 ( $\text{CH}_2\text{Fmoc}$ ), 121.5, 128.8 (C-3 $_{\text{Fmoc}}$ , C-4 $_{\text{Fmoc}}$ , C-5 $_{\text{Fmoc}}$ , C-2 $_{\text{Fmoc}}$ ), 139.3 (C-8), 140.6 (C-1 $_{\text{Fmoc}}$ ), 143.8 (C-6 $_{\text{Fmoc}}$ ), 151.1 (C-3), 153.5 (C-4), 155.7 (CONH), 156.8 (C-6), 161.6 (COOH) ppm.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 497.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

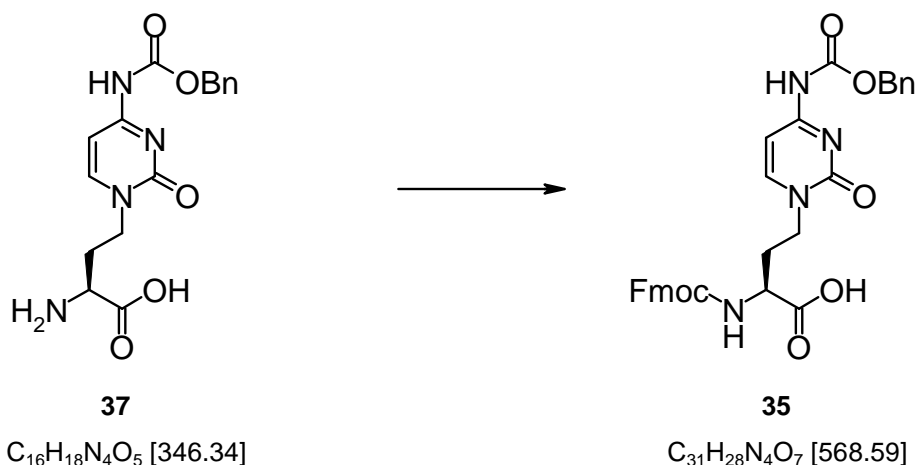
**(S)- $\gamma$ -(4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanin (37)**



Bei RT wurde eine Lösung von (S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- $\gamma$ -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanin (**15**, 300 mg, 559  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq.) in TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (3:1, 8.00 mL) für 4 d zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt nach Aufschlänmen in  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x) und anschließendem Evaporieren im Hochvakuum getrocknet.

**DC** (*i*-PrOH/Wasser/HOAc/NaCl 5:2:1: ges.):  $R_f = 0.48$ .

**(S)-N-Fluorenylmethyloxycarbonyl- $\gamma$ -(4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl) homoalanin (Fmoc-L-HalC<sub>2</sub>-OH) (35)**



(S)- $\gamma$ -(4-Benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-homoalanin (**37**, 251 mg, 725  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq.) wurde in einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O/Dioxan (2.5:1, 6.00 mL) suspendiert und mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 8.5-9.0 eingestellt. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und unter Rühren 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (244 mg, 943  $\mu\text{mol}$ , 1.30 eq.) in Dioxan (3.00 mL) innerhalb von 10 min zugetropft. Der pH-Wert wurde auf pH 8.5-9.0 nachreguliert. Nach 45 min wurde die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch weitere 7 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Dioxans wurde die wässrige Lösung mit Et<sub>2</sub>O (2 x 1 mL) gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels FC an Kieselgel (l = 15 cm, Ø = 3 cm, EE/MeOH 8:2, Gradient 0.5 % HOAc pro 500 ml) gereinigt. Nach Codestillation mit Toluol wurden mittels FC an RP-Kieselgel (l = 15 cm, Ø = 3 cm, H<sub>2</sub>O, Gradient 10 % MeOH pro 500 mL) 170 mg (299  $\mu\text{mol}$ , 41 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O/HOAc/NaCl 5:2:1: ges.): R<sub>f</sub> = 0.68.

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: + 3.4 (*c* = 1.0, DMSO).

**UV** (Methanol):  $\lambda_{\text{max}}$  = 264.5 nm.

**IR** (Film):  $\nu$  = 3275, 3093, 3038, 2941, 1648, 1626, 1501, 1448, 1025, 756, 740 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 1.85-2.17 (m, 2H, H- $\beta$ ), 3.80 (m, 2H, H- $\gamma$ ), 4.02 (m, 2H, H- $\alpha$ ), 4.26 (m, 1H, CHFmoc), 4.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Fmoc), 5.98 (d, *J* = 4.7 Hz,

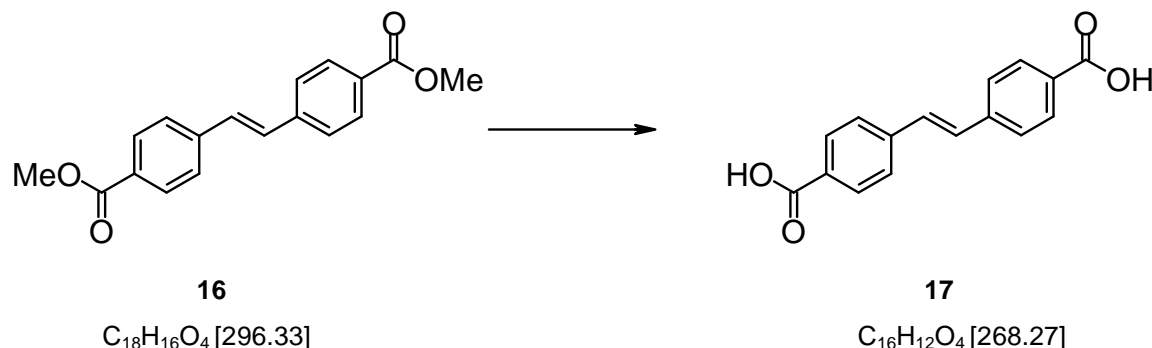
2H,  $CH_2Bn$ ), 6.98 (m, 3H,  $NHFmoc$ , H-6, H-5), 7.20-4.48 (m, 9H, Ph, H-3 $Fmoc$ , H-4 $Fmoc$ ), 7.50 (m, 4H, H-2 $Fmoc$ , H-5 $Fmoc$ ), 8.05 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $NHCOOBn$ ) ppm.

**$^{13}C$ -NMR** (75 MHz,  $[D_6]DMSO$ ):  $\delta = 31.2$  (C- $\beta$ ), 46.2 ( $CHFmoc$ ), 50.1 (C- $\alpha$ ), 46.6, 63.7 (C- $\gamma$ ), 66.3 ( $CH_2Fmoc$ ), 94.0 (C-6), 120.1 (C-5), 125.1-128.8 (Ph,  $Fmoc$ ) ppm.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 569.9  $[M+H]^+$ , 481.1  $[M+Na]^+$ .

## 8.5 Synthese des Stilben-Linkers

### 4,4'-*trans*-Stilbendicarboxylat (**17**)



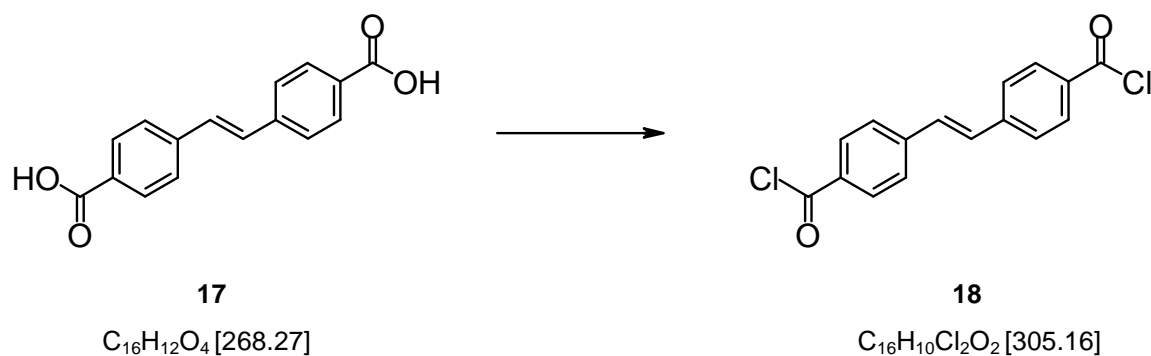
Eine Suspension von Dimethyl-*trans*-stilben-4,4'-dicarboxylat (**16**, 100 mg, 338  $\mu$ mol, 1.00 eq.) in einer Lösung aus Ethylenglycol (1.67 mL), H<sub>2</sub>O (0.420 mL) und NaOH (210 mg, 5.25 mmol, 15.0 eq.) wurde 5 h unter Rückfluss erhitzt. Die Mischung wurde mit H<sub>2</sub>O (17.0 mL) versetzt und mit Aktivkohle (83.0 g) 15 min bis zum Sieden erhitzt. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle wurde die freie Säure mit konz. HCl ausgefällt. Der gallertartige Niederschlag wurde erhitzt, abfiltriert und mit H<sub>2</sub>O, EtOH und MeOH gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum wurden 72.2 mg (270  $\mu$ mol, 80 %) der gewünschten Verbindung als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/HOAc 70:30:3:0.3): R<sub>f</sub> = 0.51.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 7.45 (s, 2H, Ph-*HC=CH*-Ph), 7.73-7.98 (m, 8H, Ph), 12.85 (s br, 2H, COOH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 126.7 (*m*-Ph), 129.7 (*o*-Ph), 129.8 (Ph-*HC=CH*-Ph), 129.9 (*i*-Ph) 140.9 (*p*-Ph), 166.9 (COOH) ppm.

**ESI-MS** (*m/z*): 269.8 [M+H]<sup>+</sup>.

**4,4'-*trans*-Stilbendicarbonsäuredichlorid (18)**<sup>[139]</sup>

Eine Suspension von 4,4'-*trans*-Stilbendicarboxylat (**17**, 210 mg, 784  $\mu$ mol, 1.00 eq.) in Toluol (4.00 mL), DMF (9.00  $\mu$ L, 117  $\mu$ mol, 0.150 eq.) und Thionylchlorid (127  $\mu$ L, 1.74 mol, 2.20 eq.) wurde 20 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde im Hochvakuum getrocknet und die gewünschte Verbindung **18** in quantitativer Ausbeute erhalten.

**DC** (MeOH): R<sub>f</sub> = 0.46.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 7.42 (m, 2H, Ph-*HC=CH*-Ph), 7.65-7.95 (m, 8H, Ph) ppm.

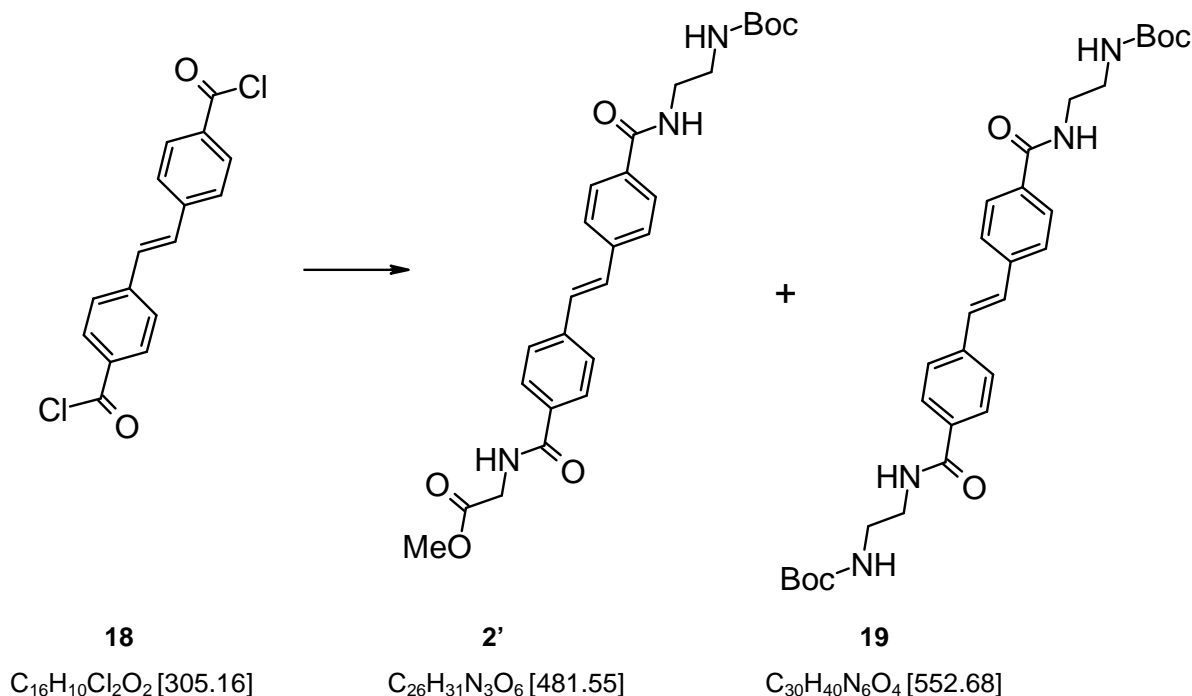
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 126.7 (*m*-Ph), 128.0 (*o*-Ph), 128.9 (Ph-*HC=CH*-Ph), 129.7 (*i*-Ph) 142.3 (*p*-Ph) ppm.

**ESI-MS** (*m/z*): 506.3 [M+H]<sup>+</sup>.



***trans*-Stilben-4-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyl)-4'-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyl (2') +**

4,4'-*trans*-Stilben-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyl (**19**)



4,4'-*trans*-Stilbendicarbonsäuredichlorid (**18**, 300 mg, 983  $\mu$ mol, 1.00 eq.) wurde in THF (5.00 ml) bei 0 °C langsam zu einer kräftig gerührten Lösung aus *N*-Boc-Ethylendiamin (93.3  $\mu$ L, 590  $\mu$ mol, 0.600 eq.) und NEt<sub>3</sub> (408  $\mu$ l, 2.95 mmol, 3.00 eq.) in MeOH (3.00 mL) getropft. Nach 30 min wurde eine Lösung aus Glycinmethylester (124 mg, 983  $\mu$ mol, 1.00 eq.) und NEt<sub>3</sub> (408  $\mu$ l, 2.95 mmol, 3.00 eq.) in MeOH (3.00 mL) bei 0 °C zu gegeben. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurde auf RT erwärmt und weitere 5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde auf die Hälfte reduziert und in H<sub>2</sub>O (10.0 mL) gegeben. Nach Abfiltrieren, Waschen mit MeOH und Trocknen im Hochvakuum wurden die Verbindungen **2'** und **19** im Verhältnis 1:5 erhalten.

**DC** (EE/Pentan 1:3): R<sub>f</sub> = 0.35.

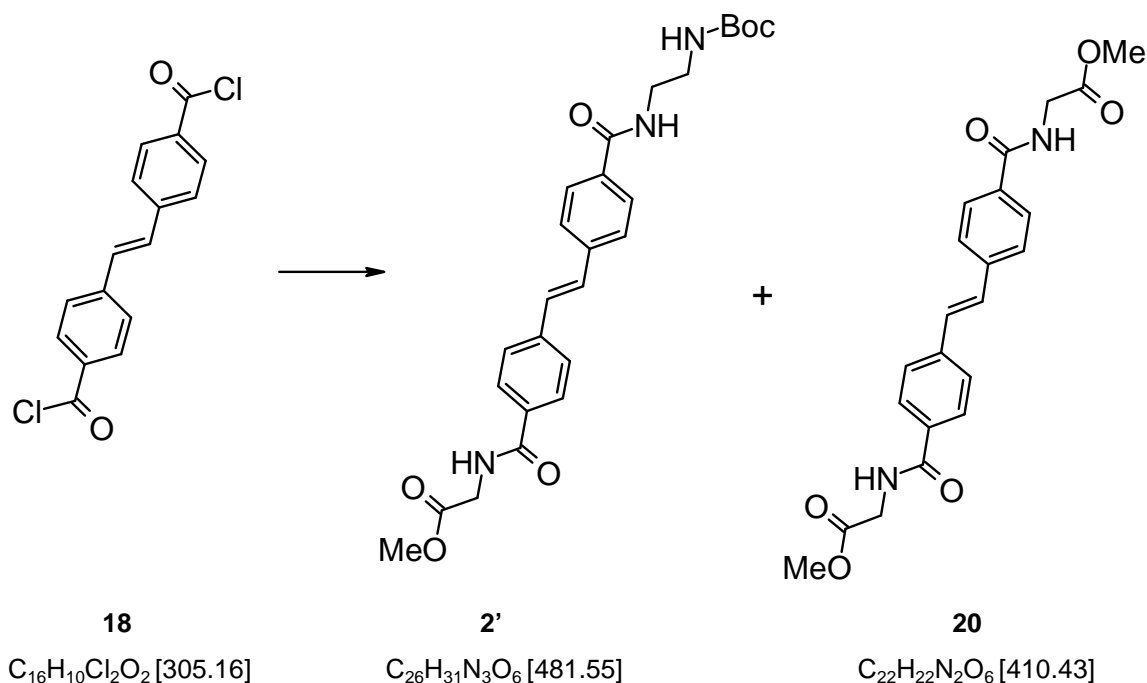
**<sup>1</sup>H-NMR (2')** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 100 °C):  $\delta$  = 1.35 (s, 9H, *t*-Bu), 3.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc), 3.37 (m, 2H, CONH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (m, 1H, NH-CH-CO), 4.08 (m, 1H, NH-CH-CO), 5.85 (s, 1H, PhCO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 6.50 (s br, NHBoc), 7.46 (m, 2H, Ph-*HC=CH*-Ph), 7.75-8.05 (m, 8H, Ph), 8.62 (m, 1H, COCH<sub>2</sub>-NH-COPh) ppm.

**<sup>1</sup>H-NMR (19)** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 100 °C):  $\delta$  = 1.40 (s, 18H, *t*-Bu), 3.81-3.96 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 5.62 (s, 2H, NHBoc), 7.54 (m, 2H, Ph-*HC=CH*-Ph), 7.75-8.05 (m, 8H, Ph) ppm.

**ESI-MS** (*m/z*): 504.1 [M(2')+Na]<sup>+</sup>, 575.2 [M(19)+Na]<sup>+</sup>.

***trans*-Stilben-4-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyle)-4'-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminoethylcarbamoyle (2') +**

**4,4'-*trans*-Stilben-(methylcarbonsäure-methylcarbamoyle)-aminoethylcarbamoyle (20)**



4,4'-*trans*-Stilbendicarbonsäuredichlorid (**18**, 230 mg, 754  $\mu$ mol, 1.00 eq.) wurde in THF (3.00 mL) bei 0 °C langsam zu einer kräftig rührenden Lösung aus Glycinmethylester (57.0 mg, 452  $\mu$ mol, 0.600 eq.) und NEt<sub>3</sub> (312  $\mu$ L, 2.26 mmol, 3.00 eq.) in MeOH (2.00 ml) getropft. Nach 30 min wurde eine Lösung aus *N*-Boc-Ethylendiamin (119.2  $\mu$ l, 754  $\mu$ mol, 1.00 eq.) und NEt<sub>3</sub> (312  $\mu$ L, 2.26 mmol, 3.00 eq.) in MeOH (3.00 mL) bei 0 °C zu gegeben. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurde auf RT erwärmt und weitere 5 h gerührt, Das Lösungsmittel wurde auf die Hälfte reduziert und in H<sub>2</sub>O (8.00 mL) gegeben. Nach Abfiltrieren, Waschen mit MeOH und Trocknen im Hochvakuum wurden die Verbindungen **2'** und **20** im Verhältnis 1:7 erhalten.

**DC** (EE/Pentan 1:3): R<sub>f</sub> = 0.29.

**<sup>1</sup>H-NMR (2')** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 100 °C):  $\delta$  = 1.42 (s, 9H, *t*-Bu), 3.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc), 3.44 (m, 2H, CONH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.14 (m, 1H, NH-CH-CO), 5.92 (s, 1H, PhCO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 6.60 (s br, NHBoc), 7.49 (m, 2H, Ph-HC=CH-Ph), 7.70-8.11 (m, 8H, Ph) ppm.

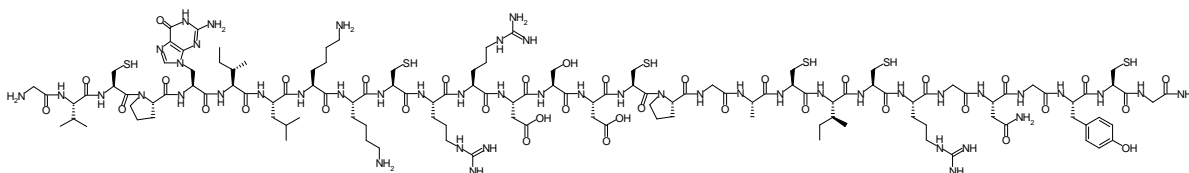
**<sup>1</sup>H-NMR (20)** (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 100 °C):  $\delta$  = 3.00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 7.42 (m, 2H, Ph-HC=CH-Ph), 7.75-8.00 (m, 8H, Ph) ppm.

**ESI-MS** (*m/z*): 412.5 [M(20)+H]<sup>+</sup>, 575.6 [M(2')+Na]<sup>+</sup>.

## 8.6 Synthese der gemischten Peptidnucleinsäuren

### H-GVCP-AlaG-ILKKCRRDSDCPGACICRNGNGYCG-NH<sub>2</sub> (47)

### H-Gly-Val-Cys-Pro-AlaG-Ile-Leu-Lys-Lys-Cys-Arg-Arg-Asp-Ser-Asp-Cys-Pro-Gly-Ala-Cys-Ile-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Tyr-Cys-Gly-NH<sub>2</sub> (47)



47

C<sub>126</sub>H<sub>207</sub>N<sub>47</sub>O<sub>37</sub>S<sub>6</sub> [3164.73]

Das Peptid **47** wurde an *NovoSynTGR*-Harz (81.5 mg, 16.3  $\mu$ mol, 1.00 eq., 200  $\mu$ mol/g) nach **AAV3** und **AAV4** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Fmoc-L-Asn(Trt)-OH (34.9 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Ile-OH (23.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (30.5 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Leu-OH (23.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Val-OH (22.1 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Ala-OH (20.3 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) betrug 30 min, die von Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH (30.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Pro-OH (23.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) 40 min, die von Fmoc-L-Asp(O*t*Bu)-OH (26.8 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Ser(*t*Bu)-OH (25.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) 50 min, die für Fmoc-L-Gly-OH (19.4 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (42.3 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (95.5 mg, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) 1 h und die von Fmoc-L-AlaG-OH (**46**, 22.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) 3 h.

Als Kupplungsreagenzien wurden für die Nucleoaminosäure Fmoc-L-AlaG-OH (**46**) HATU (24.7 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), HOAt (9.91 mg, 73.4  $\mu$ mol, 4.50 eq.) sowie DIPEA (22.1  $\mu$ L, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) verwendet. Für die restlichen Aminosäuren wurde HBTU (24.7 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), HOBt (9.91 mg, 73.4  $\mu$ mol, 4.50 eq.) sowie DIPEA (22.1  $\mu$ L, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) verwendet. Für die Aminosäure Fmoc-L-Cys(Trt)-OH wurde DIC (25.2  $\mu$ L, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) und HOBt (9.91 mg, 73.4  $\mu$ mol, 4.50 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (600  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 26.0 mg (8.22  $\mu$ mol, 50 %) des reinen Peptides erhalten.

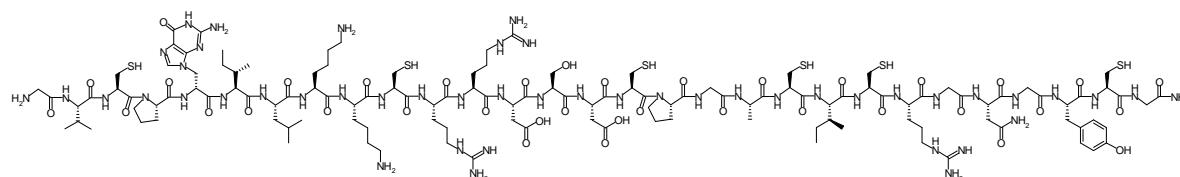
**HPLC** (Gradient: 5 - 60 % B in 30 min):  $t_R = 12.6$  min.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 1583.3  $[M+H]^{2+}$ .

**HR-MS**  $C_{126}H_{207}N_{47}O_{37}S_6$   $[M+4H]^{4+}$  berechnet 791.60941, gefunden 791.60887.

### H-GVCP-AlaG-ILKKCRRDSDCPGACICRGNGYCG-NH<sub>2</sub> (ent-47)

### H-Gly-Val-Cys-Pro-AlaG-Ile-Leu-Lys-Lys-Cys-Arg-Arg-Asp-Ser-Asp-Cys-Pro-Gly-Ala-Cys-Ile-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Tyr-Cys-Gly-NH<sub>2</sub>(ent-47)



**47**

$C_{126}H_{207}N_{47}O_{37}S_6$  [3164.73]

Das Peptid **47** wurde an *NovoSynTGR*-Harz (81.5 mg, 163  $\mu$ mol, 1.00 eq., 200  $\mu$ mol/g) nach **AAV3** und **AAV4** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Fmoc-L-Asn(Trt)-OH (34.9 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Ile-OH (23.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (30.5 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Leu-OH (23.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Val-OH (22.1 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Ala-OH (20.3 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) betrug 30 min, die von Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH (30.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Pro-OH (23.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) 40 min, die von Fmoc-L-Asp(O*t*Bu)-OH (26.8 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Ser(*t*Bu) (25.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) 50 min, die für Fmoc-L-Gly-OH (19.4 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (42.3 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) und Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (95.5 mg, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) 1 h, die von Fmoc-D-AlaG-OH (**ent-46**, 22.0 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.) 3 h.

Als Kupplungsreagenzien wurden für die Peptidnukleinsäure Fmoc-D-AlaG-OH (**ent-46**) HATU (24.7 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), HOAt (9.91 mg, 73.4  $\mu$ mol, 4.50 eq.) sowie DIPEA (22.1  $\mu$ L, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) verwendet. Für die restlichen Aminosäuren wurde HBTU (24.7 mg, 65.2  $\mu$ mol, 4.00 eq.), HOBt (9.91 mg, 73.4  $\mu$ mol, 4.50 eq.) sowie DIPEA (22.1  $\mu$ L, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) verwendet. Für die Aminosäure Fmoc-L-Cys(Trt)-OH wurde DIC (25.2  $\mu$ L, 163  $\mu$ mol, 10.0 eq.) und HOBt (9.91 mg, 73.4  $\mu$ mol,

4.50 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (600  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 32.2 mg (10.2  $\mu$ mol, 62 %) des reinen Peptides erhalten.

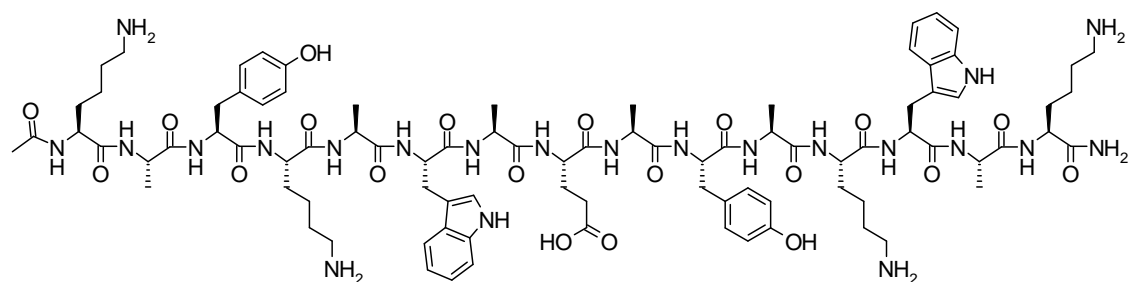
**HPLC** (Gradient: 5 - 60 % B in 30 min)  $t_R$  = 13.6 min.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 791.8  $[M+4H]^{4+}$ , 1054.9  $[M+3H]^{3+}$ , 1582.5  $[M+2H]^{2+}$ .

**HR-MS**  $C_{126}H_{207}N_{47}O_{37}S_6$   $[M+4H]^{4+}$  berechnet 791.60941, gefunden 791.60056.

### Ac-KAYKAWAEAYAKWAK-NH<sub>2</sub> (32)

### Ac-Lys-Ala-Tyr-Lys-Ala-Trp-Ala-Glu-Ala-Tyr-Ala-Lys-Trp-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (32)



**32**

$C_{89}H_{128}N_{22}O_{20}$  [1826.15]

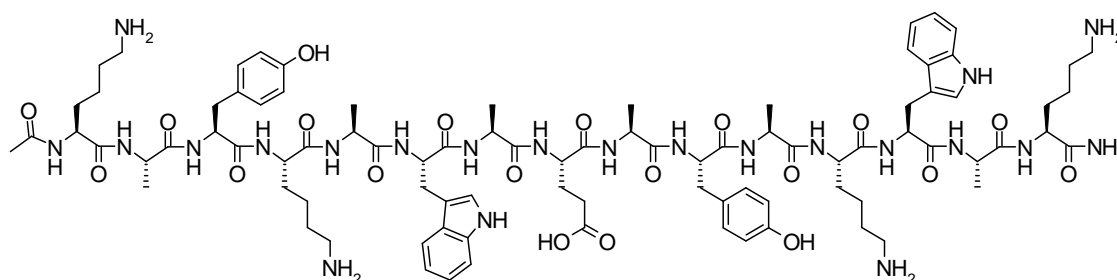
Das Peptid **32** wurde an Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz (100 mg, 43.0  $\mu$ mol, 1.00 eq., 430  $\mu$ mol/g) nach **AAV2** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Boc-L-Ala-OH (40.7 mg, 215  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie für Boc-L-Tyr(2-Br-Z)-OH (106.3 mg, 215  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 45 min und für Boc-L-Trp-OH (71.5 mg, 215  $\mu$ mol, 5.00 eq.) 2 x 45 min. Die Kupplungszeit für Boc-L-Glu(OBn)-OH (50.6 mg, 215  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie für Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH (89.2 mg, 215  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug jeweils 35 min. Als Kupplungsreagenzien wurden HBTU (73.4 mg, 194  $\mu$ mol, 4.50 eq.) und HOBt (29.0 mg, 215  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (87.6  $\mu$ L, 516  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (600  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.01 mg (1.10  $\mu$ mol, 3 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 60 % B in 30 min):  $t_R$  = 21.6 min.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 1849.9  $[M+Na]^+$ , 935.8  $[M+2Na]^{2+}$

**Ac-KAYKAWAEAYAKWAK-NH<sub>2</sub> (32)**

**Ac-Lys-Ala-Tyr-Lys-Ala-Trp-Ala-Glu-Ala-Tyr-Ala-Lys-Trp-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (32)**



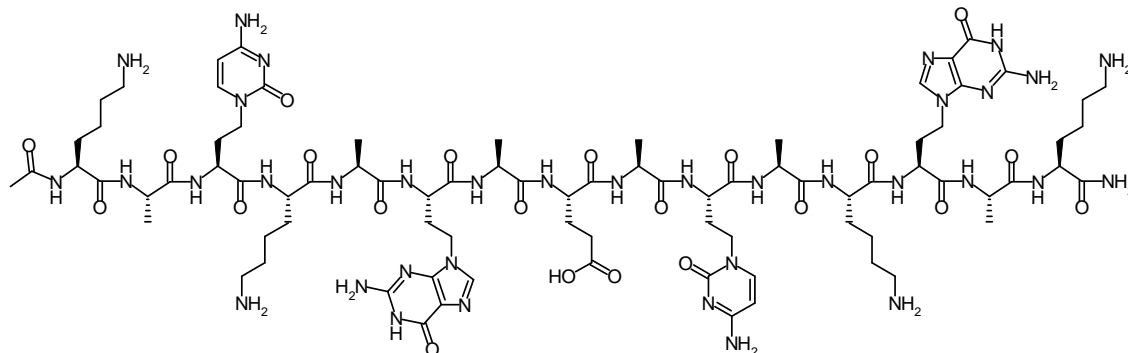
**32**

$C_{89}H_{128}N_{22}O_{20}$  [1826.15]

Das Peptid **32** wurde an *NovoSyn*TGR-Harz (50 mg, 12.5  $\mu$ mol, 1.00 eq., 250  $\mu$ mol/g) nach **AAV3** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Fmoc-L-Ala-OH (19.5 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) und Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (26.6 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 40 min und die von Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (29.3 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) 35 min Die Kupplungszeit für Fmoc-L-Trp(Boc)-OH (32.9 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie für Fmoc-L-Tyr(OtBu)-OH (28.7 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug jeweils 2 x 30 min Als Kupplungsreagenzien wurden HBTU (21.4 mg, 56.3  $\mu$ mol, 4.50 eq.), HOBt (8.44 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (21.2  $\mu$ L, 150  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (600  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 13.1 mg (7.17  $\mu$ mol, 57 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 60 % B in 30 min):  $t_R$ = 23.6 min.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 1828.0  $[M+H]^+$ .

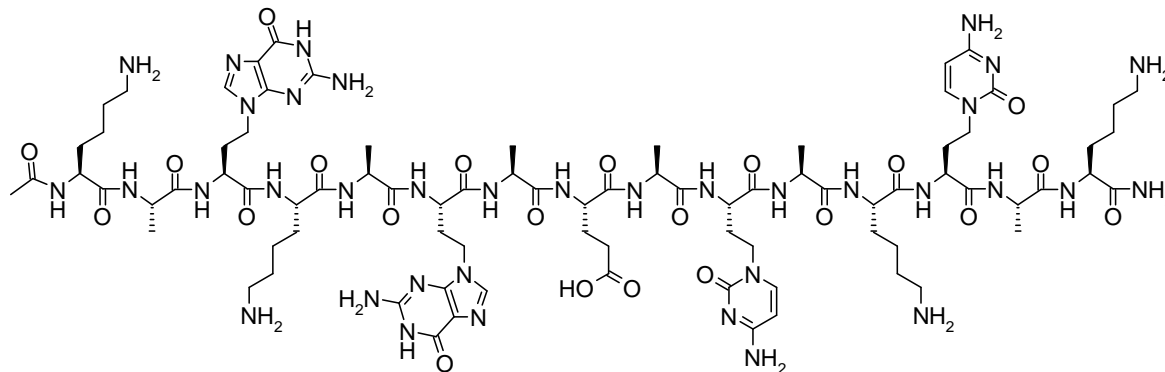
**Ac-KA-HalC-KA-HalG-AEA-HalC-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> (28)****Ac-Lys-Ala-HalC-Lys-Ala-HalG-Ala-Glu-Ala-HalC-Ala-Lys-HalG-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (28)****28**C<sub>83</sub>H<sub>130</sub>N<sub>36</sub>O<sub>22</sub> [1984.19]

Das Peptid **28** wurde an *NovoSyn*TGR-Harz (50 mg, 12.5  $\mu$ mol, 1.00 eq., 25.0  $\mu$ mol/g) nach **AAV3** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Fmoc-L-Ala-OH (19.5 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) und Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (26.6 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 40 min und die von Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (29.3 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) 35 min. Die Kupplungszeit von Fmoc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH (34.8 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 1 h und die von Fmoc-L-HalG-OH (29.7 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) 2 h. Als Kupplungsreagenzien wurden für die Peptidnucleinsäuren Fmoc-L-HalG-OH und Fmoc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH HATU (21.4 mg, 56.3  $\mu$ mol, 4.50 eq.), HOAt (8.44 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (21.2  $\mu$ L, 150  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Für die Aminosäuren wurden HBTU (21.3 mg, 56.3  $\mu$ mol, 4.50 eq.), HOBt (8.34 mg, 62.5  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (21.2  $\mu$ L, 150  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (600  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 7.55 mg (3.81  $\mu$ mol, 31 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 40 % B in 30 min): t<sub>R</sub>= 10.5 min.

**ESI-MS** (*m/z*): 1012 [M+K+H]<sup>2+</sup>, 675.9 [M+K+2H]<sup>3+</sup>.



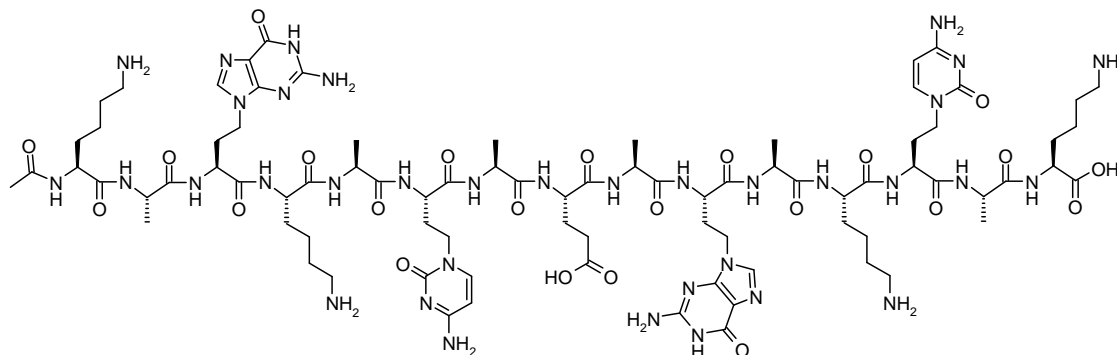
**Ac-KA-HalC-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> (29)****Ac-Lys-Ala-HalC-Lys-Ala-HalC-Ala-Glu-Ala-HalG-Ala-Lys-HalG-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (29)****29**C<sub>83</sub>H<sub>130</sub>N<sub>36</sub>O<sub>22</sub> [1984.19]

Das Peptid **29** wurde an Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz (50.0 mg, 21.5  $\mu$ mol, 1.00 eq., 43.0  $\mu$ mol/g) nach **AAV2** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Boc-L-Ala-OH (20.4 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 45 min und für Boc-L-Glu(OBn)-OH (36.3 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie für Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH (44.6 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) jeweils 35 min. Die Kupplungszeit von Boc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH (48.0 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 1 h und die von Boc-L-HalG-OH (37.9 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) 2 h. Als Kupplungsreagenzien wurden für die Peptidnucleinsäuren Fmoc-L-HalG-OH und Fmoc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH HATU (36.8 mg, 96.8  $\mu$ mol, 4.50 eq.), HOAt (14.6 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu$ L, 285  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Für die Aminosäuren wurden HBTU (36.7 mg, 96.8  $\mu$ mol, 4.50 eq.) und HOBt (14.5 mg, 0.108 mmol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu$ L, 285  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (500  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 1.61 mg (811 nmol, 4 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 40 % B in 30 min)  $t_R$  = 19.2 min.

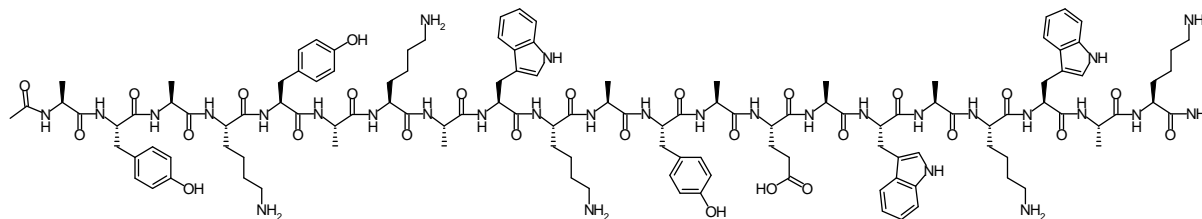
**ESI-MS** ( $m/z$ ): 662.4 [M+3H]<sup>3+</sup>, 992.7 [M+2H]<sup>2+</sup>.

**HR-MS** C<sub>83</sub>H<sub>130</sub>N<sub>36</sub>O<sub>22</sub> [M+4H]<sup>4+</sup> berechnet 496.76129, gefunden 496.76117.

**Ac-KA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalC-AK-NH<sub>2</sub> (28)****Ac-Lys-Ala-HalG-Lys-Ala-HalC-Ala-Glu-Ala-HalG-Ala-Lys-HalC-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (28)****28**C<sub>83</sub>H<sub>130</sub>N<sub>36</sub>O<sub>22</sub> [1984.19]

Das Peptid **28** wurde an Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz (50 mg, 21.5  $\mu$ mol, 1.00 eq., 430  $\mu$ mol/g) nach **AAV2** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Boc-L-Ala-OH (20.4 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 45 min und für Boc-L-Glu(OBn)-OH (36.3 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie für Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH (44.6 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) jeweils 35 min. Die Kupplungszeit von Boc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH (48.0 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 1 h und die von Boc-L-HalG-OH (37.9 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) 2 h. Als Kupplungsreagenzien wurden für die Peptidnucleinsäuren Boc-L-HalG-OH und Boc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH HATU (36.8 mg, 96.8  $\mu$ mol, 4.50 eq.), HOAt (14.6 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu$ L, 285  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Für die Aminosäuren wurden HBTU (36.7 mg, 96.8  $\mu$ mol, 4.50 eq.) und HOBt (14.5 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu$ L, 285  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (500  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.61 mg (1.32  $\mu$ mol, 6 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 40 % B in 30 min): t<sub>R</sub>= 11.8 min.**ESI-MS** (*m/z*): 1012 [M+K+H]<sup>2+</sup>, 675.9 [M+K+2H]<sup>3+</sup>.

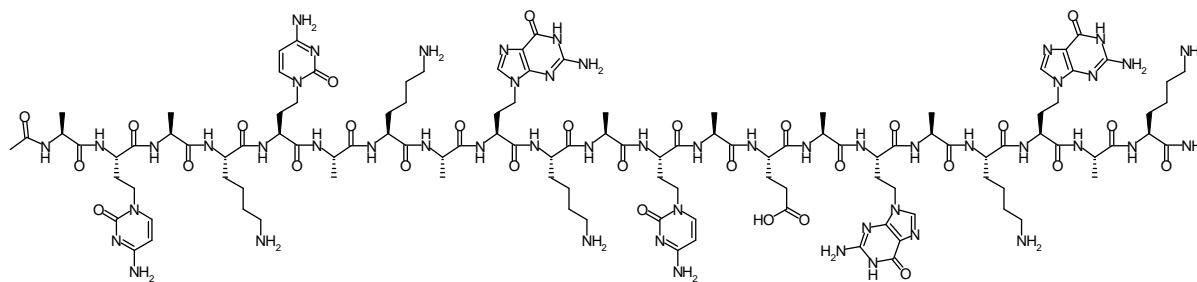
**Ac-AYAKYAKAWKAYAEAWAKWAK-NH<sub>2</sub> (33)****Ac-Ala-Tyr-Ala-Lys-Tyr-Ala-Lys-Ala-Trp-Lys-Ala-Tyr-Ala-Glu-Ala-Trp-Ala-Lys-Trp-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (33)****33**C<sub>124</sub>H<sub>174</sub>N<sub>30</sub>O<sub>27</sub> [2516.95]

Das Peptid **33** wurde nach **AAV4** automatisiert an NovaSynTGA-Harz (400 mg, 100  $\mu$ mol, 1.00 eq., 250  $\mu$ mol/g) aufgebaut. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-L-Ala-OH (19.5 mg, 500  $\mu$ mol, 5.00 eq.), Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (234 mg, 500  $\mu$ mol, 5.00 eq.), Fmoc-L-Trp-OH (263 mg, 500  $\mu$ mol, 5.00 eq.), Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (213 mg, 500  $\mu$ mol, 5.00 eq.) und Fmoc-L-Tyr(OtBu)-OH (230 mg, 500  $\mu$ mol, 5.00 eq.). Nach Abspaltung vom Harz und Reinigung mittels HPLC-Chromatographie wurden 83.3 mg (33.1  $\mu$ mol, 33 %) des gewünschten Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 30 - 80 % B in 30 min):  $t_R$  = 10.6 min.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 1258.8 [M+2H]<sup>2+</sup>, 839.8 [M+3H]<sup>3+</sup>.

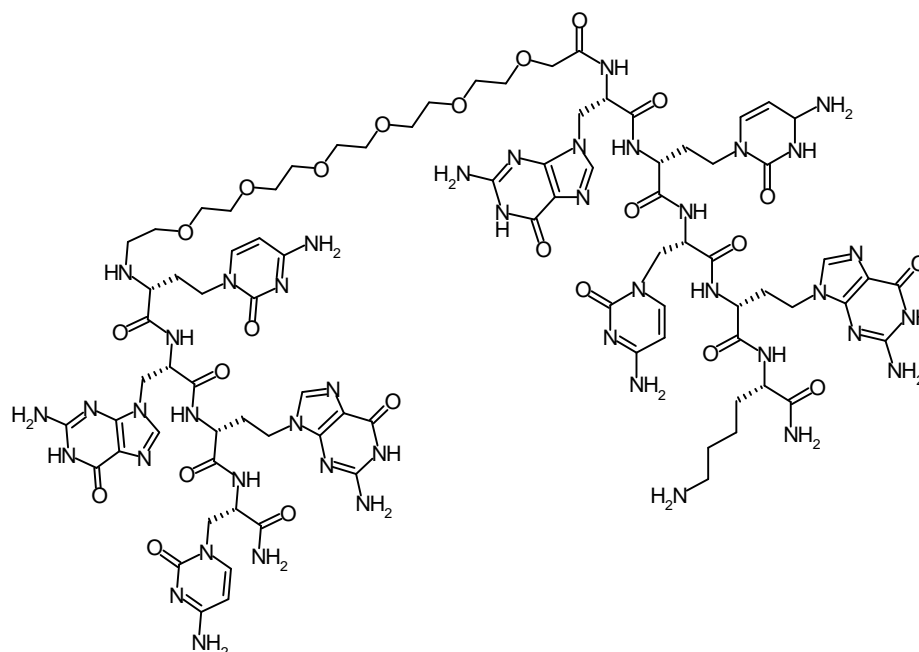
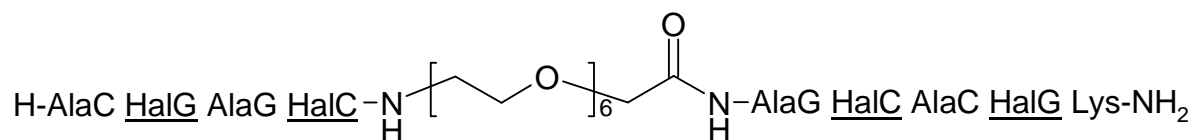
**HR-MS** C<sub>124</sub>H<sub>174</sub>N<sub>30</sub>O<sub>27</sub> [M+4H]<sup>2+</sup> berechnet 630.29384, gefunden 630.27641.

**Ac-A-HalC-AK-HalC-AKA-HalG-KA-HalC-AEA-HalG-AK-HalG-AK-NH<sub>2</sub> (33)****Ac-Ala-HalC-Ala-Lys-HalC-Ala-Lys-Ala-HalG-Lys-Ala-HalC-Ala-Glu-Ala-HalG-Ala-Lys-HalG-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (33)****33**C<sub>115</sub>H<sub>177</sub>N<sub>51</sub>O<sub>30</sub> [2754.02]

Das Peptid **33** wurde an Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz (50 mg, 21.5  $\mu$ mol, 1.00 eq., 430  $\mu$ mol/g) nach **AAV2** aufgebaut. Die Kupplungszeit für Boc-L-Ala-OH (20.4 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 45 min und für Boc-L-Glu(OBn)-OH (36.3 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie für Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH (44.6 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) jeweils 35 min. Die Kupplungszeit von Boc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH (48.0 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) betrug 1 h und die von Boc-L-HalG-OH (37.9 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) 2 h. Als Kupplungsreagenzien wurden für die Peptidnucleinsäuren Boc-L-HalG-OH und Boc-L-HalC<sub>Z</sub>-OH HATU (36.8 mg, 96.8  $\mu$ mol, 4.50 eq.), HOAt (14.6 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu$ L, 28.5  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Für die Aminosäuren wurden HBTU (36.7 mg, 96.8  $\mu$ mol, 4.50 eq.) und HOBt (14.5 mg, 108  $\mu$ mol, 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu$ L, 285  $\mu$ mol, 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (500  $\mu$ L) durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 3.61 mg (1.31  $\mu$ mol, 6 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 55 % B in 30 min):  $t_R$  = 15.5 min.**ESI-MS** ( $m/z$ ): 1377.5 [M+2H]<sup>2+</sup>, 918.8 [M+3H]<sup>3+</sup>, 689.4 [M+4H]<sup>4+</sup>.**HR-MS** C<sub>115</sub>H<sub>177</sub>N<sub>51</sub>O<sub>30</sub> [M+H]<sup>+</sup> berechnet 2752.38924, gefunden 2752.38926.

## 8.7 Synthese der gemischten Peptidnucleinsäuren mit Linker

H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure)]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> (23)

23

C<sub>84</sub>H<sub>116</sub>N<sub>44</sub>O<sub>24</sub> [2126.14]

Das Peptid **23** wurde an Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz (50 mg, 21.5  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq., 430  $\mu\text{mol/g}$ ) nach **AAV2** aufgebaut. Die Kupplungszeit von Boc-D-HalC<sub>Z</sub>-OH (48.0 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) und Boc-L-AlaC<sub>Z</sub>-OH (46.5 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) betrug jeweils 1 h und die von Boc-D-HalG-OH (37.9 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.), Boc-L-AlaG-OH (36.2 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) und die von 20-(*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure) (**1**, 121 mg, 215  $\mu\text{mol}$ , 10.0 eq.) 2 h. Als Kupplungsreagenzien wurden HATU (36.8 mg, 96.8  $\mu\text{mol}$ , 4.50 eq.), HOAt (14.6 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu\text{L}$ , 285  $\mu\text{mol}$ , 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (500  $\mu\text{L}$ ) durchgeführt. Nach der Kupplung des Glycolinkers **1** erfolgte die Entschützung der Fmoc-Gruppe mittels 20 % Piperidin in NMP (4 x 3 min, 2 mL). Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus

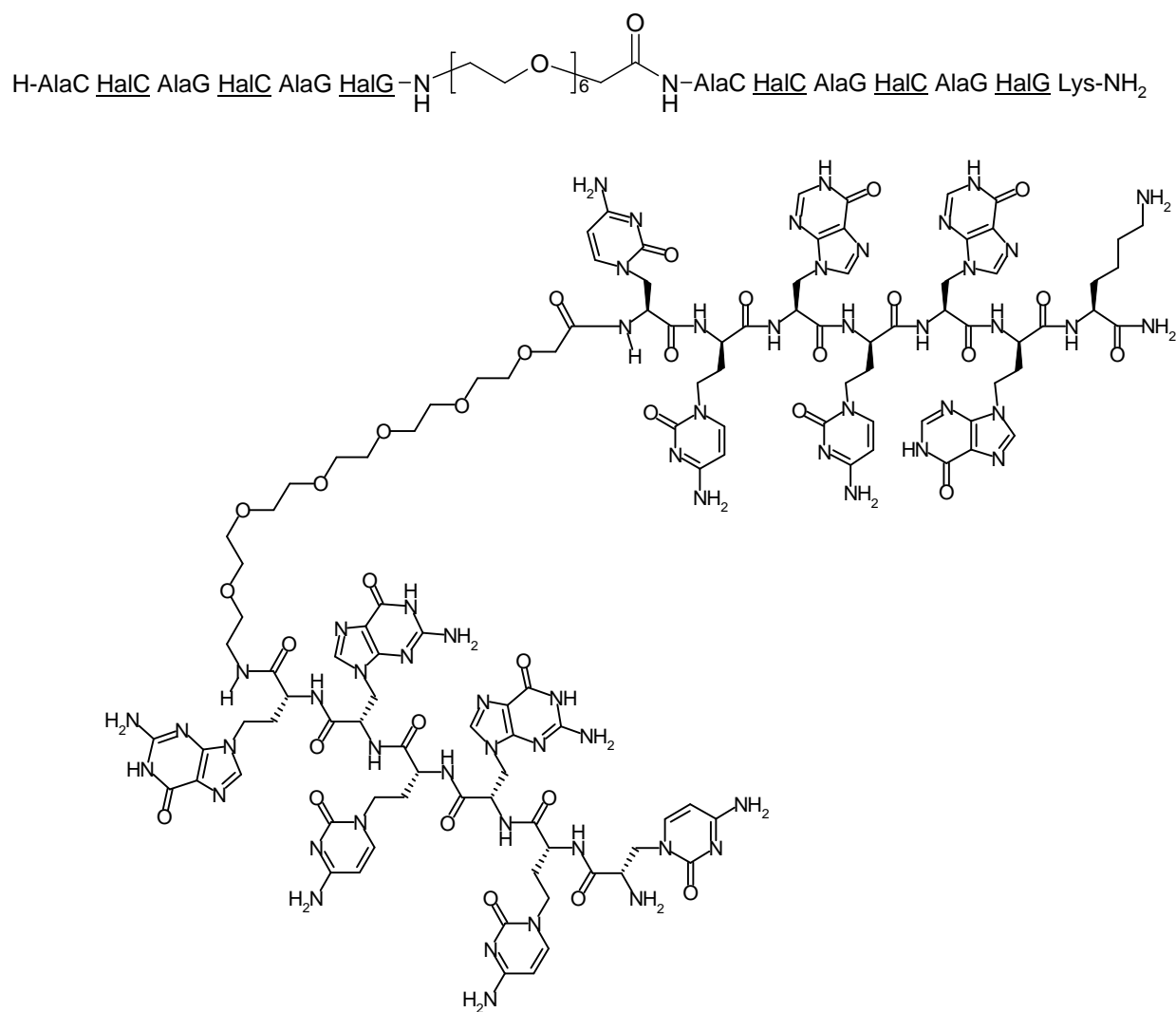
Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.24 mg (1.05  $\mu\text{mol}$ , 5 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 45 % B in 30 min):  $t_R = 21.6$  min.

**ESI-MS** ( $m/z$ ): 1086.5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**HR-MS**  $\text{C}_{84}\text{H}_{116}\text{N}_{44}\text{O}_{120}$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  berechnet 2165.148914, gefunden 2165.15834.

**H-AlaC-HaIC-AlaG-HaIC-AlaG-HaIG-[20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosan-säure)]-AlaC-HaIC-AlaG-HaIC-AlaG-HaIG-Lys-NH<sub>2</sub> (24)**



**24**

$\text{C}_{116}\text{H}_{147}\text{N}_{61}\text{O}_{32}$  [2907.85]

Das Peptid **24** wurde an Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz (50 mg, 215  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq., 430  $\mu\text{mol/g}$ ) nach **AAV2** aufgebaut. Die Kupplungszeit von Boc-D-HaIC<sub>Z</sub>-OH

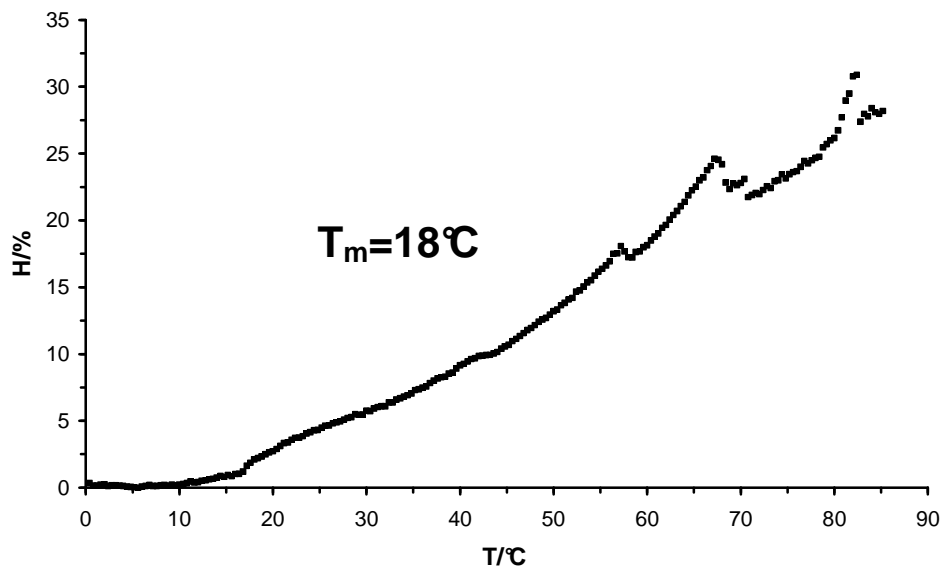
(48.0 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) und Boc-L-AlaC<sub>Z</sub>-OH (46.5 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) betrug jeweils 1 h und die von Boc-D-HalG-OH (37.9 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.), Boc-L-AlaG-OH (36.2 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) und von 20-(*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure) (**1**, 66.9 mg, 215  $\mu\text{mol}$ , 10.0 eq.) 2 h. Als Kupplungsreagenzien wurden HATU (36.8 mg, 96.8  $\mu\text{mol}$ , 4.50 eq.), HOAt (14.6 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 5.00 eq.) sowie DIPEA (43.8  $\mu\text{L}$ , 285  $\mu\text{mol}$ , 12.0 eq.) verwendet. Die Kupplungen wurden in NMP (500  $\mu\text{L}$ ) durchgeführt. Nach der Kupplung des Glycolinkers **1** erfolgte die Entschützung der Fmoc-Gruppe mittels 20 % Piperidin in NMP (4 x 3 min, 2 mL). Nach der Abspaltung wurde das Peptid aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.15 mg (740 nmol, 3 %) des reinen Peptides erhalten.

**HPLC** (Gradient: 5 - 100 % B in 30 min):  $t_{\text{R}} = 9.45$  min.

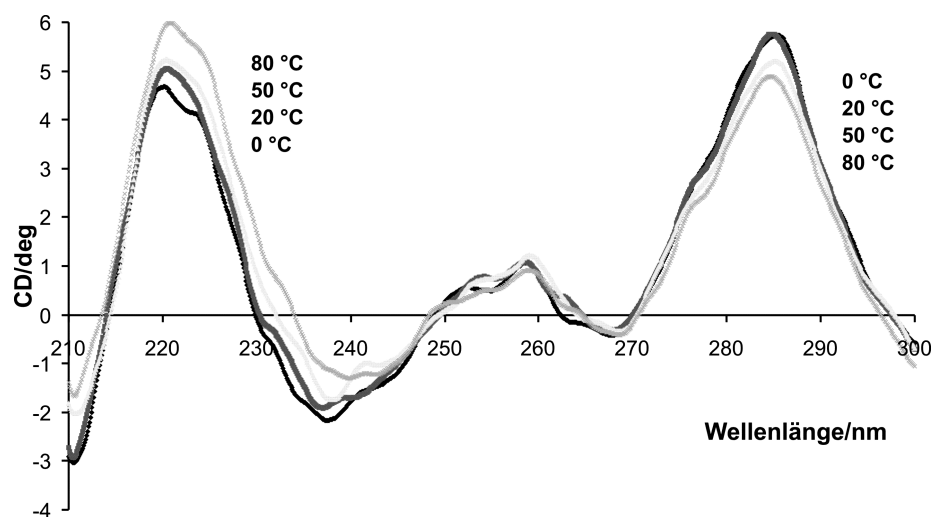
**ESI-MS** ( $m/z$ ): 2930.22  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1485.65  $[\text{M}+2\text{Na}+\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ .

**HR-MS** C<sub>116</sub>H<sub>147</sub>N<sub>61</sub>O<sub>32</sub>  $[\text{M}+\text{H}]^+$  berechnet 2907.82685, gefunden 2907.43258.

## 9 Anhang

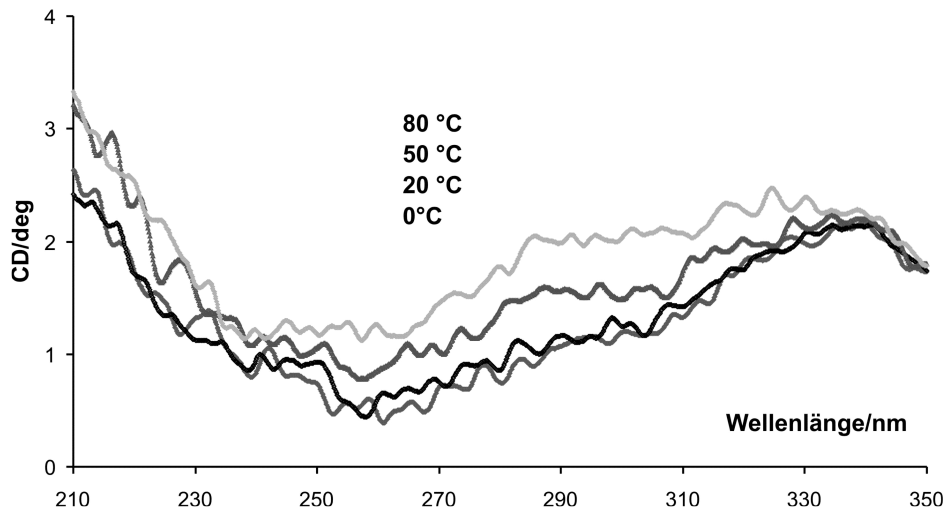


**Abb. 8.1:** UV-Spektrum des Oligomers H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **23**;  $c = 12 \mu\text{M}$ , 10 mM Phosphatpuffer pH7;  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ; D-konfigurierte Nukleoaminosäuren sind unterstrichen dargestellt.



**Abb. 8.2:** CD-Spektrum des Oligomers H-AlaC-HalG-AlaG-HalC-[20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure]-AlaG-HalC-AlaC-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **23**;  $c = 12 \mu\text{M}$ , 10 mM Phosphatpuffer pH7;  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ; D-konfigurierte Nukleoaminosäuren sind unterstrichen dargestellt.





**Abb. 8.3:** CD-Spektrum des H-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-[20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure)]-AlaC-HalC-AlaG-HalC-AlaG-HalG-Lys-NH<sub>2</sub> **24**; c = 12  $\mu$ M, 10 mM Phosphatpuffer pH 7;  $\lambda$  = 260 nm; D-konfigurierte Nukleoaminosäuren sind unterstrichen dargestellt.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A	Adenin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
HOAc	Essigsäure
Ala	Alanin
AlaC	Cytosinylalanin
AlaG	Guaninylalanin
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
br	breit
Bn	benzyl
C <sub>z</sub>	<i>N</i> -4-Benzoxycarbonylcytosin
<i>c</i>	Konzentration
C	Cytosin
CD	Circular Dichroismus
COSY	Correlated Spectroscopy
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en
DC	Dünnschicht Chromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
[D <sub>6</sub> ]DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithioerythrit
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EDC	1-(3-Methylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
EE	Essigsäureethylester
ee	enantiomeric excess
EI	Elektronenstoß Ionisation
ent	Enantiomer
ESI	Elektrospray Ionisation
eq.	Äquivalent
FC	Flashchromatographie
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
G	Guanin
H%	prozentuale Hyperchromizität
HaIC	Cytosinylhomoalanin
HaIG	Guaninylhomoalanin
HATU	Hydroxypyridiniumtriazolyltetramethyluroniumhexafluorophosphat ( <i>N</i> -(7-Aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat)
HBTU	Hydroxybenzotriazolyltetramethyluroniumhexafluorophosphat ( <i>N</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
HR	High Resolution
I	Intensität
IR	Infrarot
<i>i</i> -PrOH	<i>iso</i> -Propanol
konz.	konzentriert
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
$k_{iapp}$	Geschwindigkeitskonstante (inhibition apparently)
$\lambda_{max}$	Absorptionsmaximum

M	molar
<i>m</i>	<i>meta</i>
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
M	Molmasse
McoTi-II	<i>Momordica Cochinchinensis Trypsin Inhibitor-II</i>
MBHA	4-Methylbenzylhydrolamin
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MS	Massenspektrometrie
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
N	normal
<i>n</i>	Beladungsdichte
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>o</i>	ortho
OAc	Acetat
OSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidester einer Carbonsäure
<i>p</i>	para
pH	negativer dekadischer Logarithmus
Ph	Phenyl
PNA	Peptidnucleinsäure
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
q	Quartett
R	Rest
RP	Reverse Phase
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonucleinsäure
s	Singulett
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
t	Triplett
T	Tesla

T	Thymin
T	Temperatur
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
$T_m$	Schmelztemperatur
$t_r$	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VIS	visible
WC	Watson-Crick
Z	Benzoyloxycarbonyl

## 11 Literaturverzeichnis

- [1] P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **1920**, 483-495.
- [2] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [3] F. J. Schmidt, S. Hecht (Ed.), *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Oxford University Press, New York, **1996**, 375.
- [4] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, **1996**.
- [5] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer Verlag, New York, **1984**.
- [6] C. M. Blackburn, M. J. Gait, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [7] A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 218.
- [8] D. R. Duckett, A. I. H. Murchie, R. M. Clegg, G. S. Bassi, M.-J. E. Giraud-Panis, D. M. J. David, *Biophys. Chem.* **1997**, 68, 53.
- [9] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2830-2848.
- [10] H. J. C. Berendsen, *Science* **1998**, 282, 642-643.
- [11] C. M. Dobson, M. Karplus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 92-101.
- [12] U. Diederichsen, T. K. Lindhorst, B. Westermann, L. A. Wessjohann, *Bioorganic Chemistry Highlights and New Aspects*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, 255-256.
- [13] a) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 458; b) U. Diederichsen, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1997**, 13, 1743; c) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 475; d) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 302.
- [14] a) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 475-478; b) U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1886; c) U. Diederichsen, D. Weicherding, *Synlett* **1999**, S1, 917-920; d) U. Diederichsen, D. Weicherding, E. Vockelmann, *Chimia* **1998**, 9, 467.
- [15] a) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Eur. J. Org. Chem.* **1996**, 827; b) U. Diederichsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 165; c) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2411; d) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 312. e) U. Diederichsen, C. M. Biro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1417.

- [16] U. Diederichsen, *Lineare Nukleinsäure-Analoga mit peptidischem Rückgrat*, Habilitationsschrift, TU München **1999**.
- [17] D. P. Weicherding, *Synthese von Alanyl- und Homoalanyl-Peptidnucleinsäuren - Untersuchung der Homologie, der Wechselwirkungen mit Aminosäuren und des photoinduzierten Elektronentransfers*, Dissertation, TU München **2000**.
- [18] E. Vockelmann, *Synthese und Untersuchung der Dimerisierung von Alanyl-/Norvalyl-Peptidnucleinsäuren und Peptiden*, Dissertation, TU München **2000**.
- [19] P. H. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **1993**, 262, 1401.
- [20] C. Micklatcher, J. Chmielewski, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 724.
- [21] N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **1994**, 237, 500.
- [22] S. Matsumura, T. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4829-4837.
- [23] D. L. Zoetewey, B. P. Tripet, T. G. Kutateladze, M. J. Overduin, J. M. Wood, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* 2003, 334(5), 1063-1076.
- [24] Reste 468-497 des Proteins ProP; blau = R488; rot = D475, D478
- [25] M. Schiffer, A. B. Edmundson, *Biophys. J.*, 1967, 7, 121-135.
- [26] L. Stryer, *Biochemie*, 4.Ed, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, **1991**.
- [27] D. H. Apella, J. J. Barchi Jr., S. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2309-2310.
- [28] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497.
- [29] B. Hyrup, P. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 5.
- [30] M. R. Ghadrari, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 76.
- [31] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Nordén, *Nature* **1994**, 368, 561.
- [32] A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3277.
- [33] A. Lenzi, G. Reginato, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1717.
- [34] M. Chatteraj, B. King, G. Bublitz, S. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 8362.
- [35] G. Quinkert, E. Egert, C. Griesinger, *Aspekte der organischen Chemie*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, **1995**.
- [36] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Angew. Chem.* **1969**, 81, 523-529.
- [37] B. Devadas, N. Leonard, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5012.

- [38] M. Durand, K. Chevie, M. Chassignol, N. T. Thuong, J. C. Maurizot, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6353-6359.
- [39] M. Salunke, T. Wu, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8768-8772.
- [40] A. E. Ferentz, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4000-4002.
- [41] H. Li, Y. Qiu, E. Moyroud, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1519.
- [42] X. Qiao, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 977.
- [43] F. Nagatsugi, N. Tokuda, M. Maeda, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2577-2579.
- [44] J. C. Tabone, M. R. Stamm, H. B. Gamper, R. B. Meyer, *Biochemistry* **1994**, *33*, 375-383.
- [45] T. R. Webb, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2764-2765.
- [46] M. Cowart, S. Benkovic, *Biochemistry* **1991**, *30*, 788.
- [47] R. L. Letsinger, T. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 811-812.
- [48] R. L. Letsinger, T. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7323-7328.
- [49] R. Argauer, M. Shapiro, *J. Econ. Entomol.* **1997**, *90*, 416-420.
- [50] L. Pauling, R. B. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5349.
- [51] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *PNAS* **1951**, *37*, 235-240.
- [52] L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS* **1951**, *37*, 282-285.
- [53] L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS* **1951**, *37*, 272-281.
- [54] L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS* **1951**, *37*, 235-2410.
- [55] L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS* **1951**, *37*, 241-250.
- [56] L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS* **1951**, *37*, 251-256.
- [57] a) L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS* **1951**, *37*, 256-261; b) L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS* **1951**, *37*, 261-271.
- [58] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips, *Nature* **1958**, *181*, 662.
- [59] S. Richardson, *Advances in Protein Chemistry* **1981**, *14*, 167-339.
- [60] J. Kendrew, R. Dickerson, B. Strandberg, R. Hart, D. Davies, D. Phillips, V. Shore, *Nature* **1960**, *185*, 422.
- [61] M. Perutz, M. Rossmann, A. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. North, *Nature* **1960**, *85*, 416-422.
- [62] H. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. Bhat, H. Weissig, I. Shindyalov, P. Bourne, *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, 235-42.



- [63] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry* **1970**, *9*, 3471-3479.
- [64] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 283-438.
- [65] Standard-Bindungslängen: C $\alpha$ -CO:1.52 Å ; C=O:1.23 Å; CO-N:1.33 Å; N-C $\alpha$ :1.45 Å.
- [66] M. Schiffer, A. B. Edmundson, *Biophys. J.* **1967**, *7*, 121-135.
- [67] H. A. Kramers, G. H. Wannier, *Phys. Rev.* **1941**, *60*, 252-262.
- [68] C. Cohen, D. A. D. Parry, *Trends in Biochem. Sci.* **1986**, *11*, 245-248.
- [69] F. H. C. Crick, *Acta Crystallogr.* **1953**, *6*, 689-697.
- [70] O. D. Monera, C. M. Kay, R. S. Hodges, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3862-3871.
- [71] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1974**, *13*, 211-222.
- [72] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1974**, *13*, 222-245.
- [73] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 251-276.
- [74] T. Jordan, I. Muker Jr., Y. Wang, T. G. Spiro, *J. Mol. Struct.* **1996**, *379*, 51-64.
- [75] J. D. Rieker, J. C. Hu, *Methods Enzymol.* **2000**, *328*, 282-296.
- [76] W. H. Landschultz, P. F. Johnson, S. L. McKnight, *Science* **1988**, *240*, 1759-1764.
- [77] S. Matsumara, A. Ueno, H. Mihara, *Chem. Commun.* **2000**, 1615-1616.
- [78] T. Takahashi, K. Hamasaki, I. Kumagai, A. Ueno, H. Mihara, *Chem. Commun.* **2000**, 349.
- [79] D. Craik, N. L. Daly, C. Waive, *Toxicon* **2001**, *39*, 43.
- [80] N. W. Isaacs, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 391.
- [81] P. K. Pallaghy, K. J. Nielsen, D. J. Craik, R. S. Norton, *Protein Science* **1994**, *3*, 1833.
- [82] M. E. Felizmenio-Quimio, N. L. Daly, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22875-22882.
- [83] J. F. Hernandez, J. Gagnon, L. Chiche, T. M. Nguyen, J. P. Andrieu, A. Heitz, T. Trinh Hong, T. T. Pham, D. Le Nguyen, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5722-5730.
- [84] O. Avrutina, *Cystine-Knot Microproteins: Total Synthesis, Modifications and Application to Drug Design*, Dissertation, Göttingen **2006**.
- [85] J. P. Tam, Y-A Lu, J.-L. Yang, K.-W. Chiu, *J. Biol. Chem* **1999**, *96*, 8913.
- [86] D. J. Craik, N. L. Daly, T. Bond, C. Waive, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1327-1336.
- [87] L. Gran, *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1973**, *33*, 400-408.

- [88] K. M. Witherup, M. J. Bogusky, P. S. Anderson, H. Ramjit, R. W. Ransom, T. Wood, M. Sardana, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1619-1625.
- [89] N. L. Daly, S. Love, P. F. Alewood, D. J. Craik, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10606-10614.
- [90] J. P. Tam, Y. A. Lu, J. L. Yang, K. W. Chiu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 8913-8918.
- [91] K. R. Gustafson, R. C. Sowder II, L. E. Henderson, I. C. Parsons, Y. Kashman, J. H. Cardellina II, J. B. McMahon, R. W. Buckheit Jr, L. K. Pannell, M. R. Boyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9337-9338.
- [92] J. P. Tam, Y. A. Lu, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5599-5602.
- [93] J. P. Tam, Y. A. Lu, Q. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4316-4324.
- [94] M. L. J. Korsinczky, H. J. Schirra, K. J. Rosengren, J. West, B. A. Condie, L. Otvos, M. Anderson, D. J. Craik, *J. Med. Biol.* **2001**, *311*, 579-591.
- [95] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182.
- [96] P. E. Dawson, T. W. Muir, J. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1989**, *266*, 182.
- [97] S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957.
- [98] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [99] Bindungslängen: C-C:1.54, C-N:1.47, (=)N-C(=):1.47, N=C:1.25, C-NH<sub>2</sub>:1.34, N-H:1.21, C=O:1.22, C<sub>arom</sub>=C<sub>arom</sub>:1.39, C=C:1.33 Å.
- [100] C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, J. G. Smijders, E. J. Baerends, *Chemistry-A European Journal* **1999**, *5*, 3581-3594.
- [101] V. Khavimon, L. Shataeva, A. Chernova, *Neuroendocrinology Lett.* **2005**, *26*, 237-241.
- [102] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717-2725.
- [103] D. Boumrah, M. M. Campbell, S. Fenner, R. G. Kinsman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977-6992.
- [104] P. Lohse, B. Oberhauser, B. Oberhauser-Hofbauer, G. Baschang, A. Eschenmoser, *Croatica Chim. Acta* **1996**, *69*, 535-562.
- [105] P. Lohse, *Synthese und Eigenschaften von oligomeren Nucleodipeptamindinium-Salzen*, Dissertation ETH 9937, Zürich **1992**.
- [106] L. D. Arnold, R. G. May, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7105.

- [107] L. D. Arnold, R. G. May, J. C. Vederas *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2237.
- [108] I. Collins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 1869.
- [109] A. Lenzi, G. Reginato, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1713-1716.
- [110] P. Ciapetti, F. Soccolini, M. Taddei, *Tetrahedron* **1997**, 53, 1167-1176.
- [111] J. M. Bland, *Synthetic Communications* **1995**, 25, 467-477.
- [112] R. Appel, *Angew. Chem.* **1975**, 24, 863.
- [113] G. M. Salituro, C. A. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 760-770.
- [114] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [115] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 801-812.
- [116] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1994**, 201-203.
- [117] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2279-2282.
- [118] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- [119] Freundlicherweise von E. Liebler zur Verfügung gestellt.
- [120] U. Diederichsen, D. Weicherding, N. Diezemann, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1058-1066.
- [121] A. Küsel, J. Zhang, M. Alvarino Gil, C. A. Stückl, W. Meyer-Klaucke, F. Meyer, U. Diederichsen, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2005**, 4317-4324.
- [122] M. Mergler, J. P. Durieux, *The Bachem Practise of SPPS*, Bachem AG, Bubendorf, Schweiz, **2000**.
- [123] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3409.
- [124] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779.
- [125] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923-960.
- [126] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Annalen Chemie* **1953**, 583, 129-149.
- [127] R. David, M. P. O. Richter, A. G. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 663-677.
- [128] J. P. Tam, Y.-A. Lu, C. F. Liu, J. Shao, L. Zhang, C. Rao, *In Peptides: Chemistry, Structure and Biology-Proceedings of the 14th American Peptide Symposium* **1995**.
- [129] O. Avrutina, H.-U. Schmoldt, H. Kolmar, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4931.

- [130] O. Avrutina, H.-U. Schmoldt, D. Gabrijelcic-Geiger, D. Le Nguyen, C. P. Sommerhoff, U. Diederichsen, H. Kolmar, *Biol. Chem.* **2005**, 386, 1301-1306.
- [131] L. Peterlin-Mašič, D. Kikelj, *Tetrahedron* **2001**, 57, 7073.
- [132] L. Peterlin-Mašič, A. Kranjc, P. Marinko, G. Mlinšek, T. Šolmajer, M. Stegnar, D Kikelj, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 13, 3171.
- [133] K. Lorenz, U. Diederichsen, *Lett. Pept. Sci.* **2003**, 10, 111-117.
- [134] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440-1456.
- [135] P. Marinko, J. Kastelic, A. Krbavčič, D. Kikelj, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 8911.
- [136] Extinktionskoeffizienten der Nukleoaminosäuren: AlaC  $\epsilon_{250\text{ nm}} = 13800\text{ dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ , AlaG  $\epsilon_{259\text{ nm}} = 11700\text{ dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ , HalG  $\epsilon_{259\text{ nm}} = 12500\text{ dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ , HalC  $\epsilon_{266\text{ nm}} = 15\ 000\text{ dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})$  (aus D. Weicherding, *Synthese von Alanyl- und Homoalanyl-Peptidnukleinsäuren Untersuchungen der Homologie, der Wechselwirkungen mit Aminosäuren und des photoinduzierten Elektronentransfers* Dissertation, TU München **2000**).
- [137] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. White, S. A. Noble, *Tetrahedron* **1995**, 51, 6179-6194.
- [138] K. B. Lorenz, Nucleoaminosäuren als Aminosäure-Isostere in potentiellen Pharmaka, Diplomarbeit, Würzburg **2000**.
- [139] R. L. Letzinger, T. Wu, *J. Am. Chem.Soc.* **1995**, 117, 7327-7328.

## LEBENS LAUF

Name:	Nadine Jede
Geboren am:	24.06.1978
Geboren in:	Neumünster
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Aug. 1984 – Juni 1988	Besuch der Dr. Gerlich Schule, Trappenkamp
Aug. 1988 – Mai 1997	Besuch des Städtischen Gymnasiums, Bad Segeberg abgeschlossen mit der Allgemeinen Hochschulreife
Okt. 1997 – Feb. 2003	Aufnahme des Studiums der Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
April 2000	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Okt. 2001 – Feb. 2002	Fortgeschrittenes Praktikum der Organischen Chemie an der chemischen Fakultät der Universidad de La Coruña (Spanien) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. J. González und Prof. Dr. J. R. Gonzáles
April 2002 – Feb. 2003	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. U. Diederichsen zu dem Thema: Oligomerisierung von Guaninyl-Derivaten aufgrund der Organisation in Tetraden
Feb. 2003	Diplom-Chemiker Hauptprüfung
April 2002 – Feb. 2006	Dissertation bei Prof. Dr. U. Diederichsen am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August Universität zu Göttingen, Synthese und Untersuchung von Nukleobasen-funktionalisierten Peptiden.
April 2002 – März 2003	Assistentin im chemischen Praktikum für Mediziner und Zahnmediziner an der Universität Göttingen
April 2003 – Sept. 2003	Assistentin im organisch chemischen Praktikum für Biologen und Lehramtskandidaten an der Universität Göttingen
April 2003 – Sept. 2005	Assistentin im organisch chemischen Grundpraktikum Teil B für Chemiker an der Universität Göttingen
Okt. 2005	Assistentin im organisch chemischen Grundpraktikum Teil A für Chemiker an der Universität Göttingen