

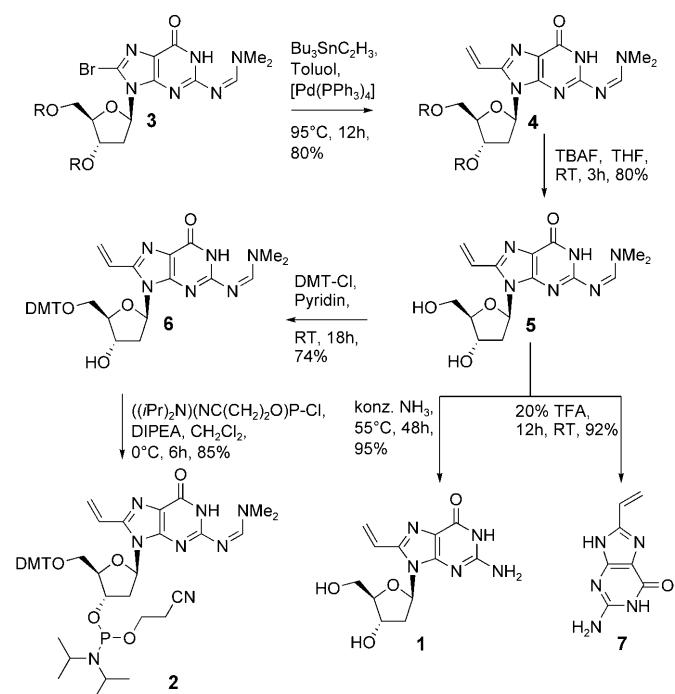
8-Vinyl-2'-desoxyguanosin als fluoreszierendes 2'-Desoxyguanosin-Analogon zur Untersuchung von DNA-Hybridisierung und Topologie**

André Nadler, Julian Strohmeier und Ulf Diederichsen*

Fluoreszierende Analoga der natürlichen Nucleobasen finden breite Anwendung als molekulare Sonden, unter anderem zur Untersuchung von Oligonucleotidkonformationen sowie der Detektion von DNA-Hybridisierung oder Einzelnucleotidpolymorphismen.^[1] Eingesetzt werden typischerweise Fluorophor-Basen-Konjugate,^[2] bei denen Fluorophore mit Nucleobasen verknüpft sind, sowie erweiterte Nucleobasen^[3] oder Nucleotide, die anstelle einer natürlichen Nucleobase ein fluoreszierendes Aren enthalten.^[4] Die Verwendung von Nucleobasenanaloga als molekulare Sonden zur Untersuchung der Oligonucleotidkonformation und -dynamik erfordert eine möglichst nahe an den natürlichen Nucleobasen orientierte Imitierung der Molekülform und des Wasserstoffbrückenmusters.^[5] In diesem Zusammenhang ist 2-Aminopurin (AP) am längsten bekannt und wird häufig als Adeninanalogon verwendet.^[6] Beispiele für die Verwendung von AP sind die Untersuchung von Basenstapelung,^[7] extrudierten Nucleobasen,^[8] Metallionenkoordination^[9] und proteininduzierten Konformationsänderungen der DNA-Sekundärstruktur.^[10] Weitere bekannte Nucleobasenanaloga ähneln stark den natürlichen Nucleobasen und leiten sich in erster Linie von den Pyrimidinen und von Adenin ab. In diesem Zusammenhang ist auch 8-Vinyladenin als das Adeninanalogon der Titelverbindung zu nennen.^[11] Es gibt nur wenige Beispiele für Guaninanalogona, die den Anforderungen an eine Fluoreszenzsonde entsprechen. Im Wesentlichen handelt es sich um Isoxanthopterine, 8-Azaguanin (dessen Anion bei höheren pH-Werten fluoreszierend ist), 8-Furylguanin (das bislang noch nicht in Oligonucleotide eingebaut wurde) und seit kurzem 8-(2-Pyridinyl)guanin.^[11d, 12] Unser Ziel war die Synthese eines Guaninanalogons, das durch minimale Substitution fluoreszierend wird, dabei aber weiterhin die natürliche Kernstruktur der Nucleobase aufweist. Zudem sollte das fluoreszierende Nucleosid außer der *anti*- auch die *syn*-Kon-

formation einnehmen können, da dies eine Voraussetzung für die Bildung von verschiedenen G-Quadruplexstrukturen und der linksgängigen Z-DNA-Helix ist.

Das hier vorgestellte 8-Vinyl-2'-desoxyguanosin (VdG, **1**) als fluoreszierendes 2'-Desoxyguanosinanalogen erfüllt die Anforderung einer Strukturähnlichkeit mit dem natürlichen Nucleosid; zudem sind die Emissionseigenschaften sehr empfindlich für Änderungen in der Mikroumgebung, wie am Beispiel der Unterscheidung von Quadruplexstrukturen deutlich wird. Für die Synthese des VdG-Phosphoramiditbausteins **2** wurde 2'-Desoxyguanosin als Ausgangsmaterial verwendet. Durch Bromierung an Position C8 und anschließendes Schützen der exocyclischen Aminogruppe sowie der freien Hydroxygruppen wurde das Nucleosid **3** erhalten (Schema 1).^[13] Dieses wurde unter Stille-Bedingungen mit Tributylvinylstannan in guter Ausbeute zum Vinyl-substituierten 2'-Desoxyguanosinderivat **4** gekuppelt. Entschißtzen der TBDMS-Gruppen mit TBAF ergab das Nucleosid **5**, das in das 5'-DMT-geschützte Zwischenprodukt **6** überführt



Schema 1. Synthese des VdG-Phosphoramiditbausteins **2**, des Nucleosids **1** und der Nucleobase **7**; R = TBDMS. DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, DMT = Dimethoxytrityl, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TFA = Trifluoressigsäure.

[*] Dr. A. Nadler,^[1] J. Strohmeier,^[1] Prof. Dr. U. Diederichsen
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-39-22944
E-Mail: udieder@gwdg.de

[†] Diese Autoren haben in gleichem Maße zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Heinrich Prinzhorn für die Messung von ESI-MS-Spektren der telomeren DNA-Sequenzen sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (IRTG 1422) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201100078> zu finden.

wurde.^[14] Der VdG-Phosphoramiditbaustein **2** wurde nach einem zuvor entwickelten Verfahren synthetisiert.^[15] Zusätzlich wurden das Nucleosid **1** und die zugehörige Nucleobase **7** ausgehend vom geschützten Nucleosid **5** synthetisiert.

Für VdG (**1**) wurde ein Extinktionskoeffizient von $(7.2 \pm 0.03) \text{ Lmmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 260 nm bestimmt. Dieser Wert ist infolge einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums deutlich niedriger als der entsprechende Wert von 2'-Desoxyguanosin ($12.18 \text{ Lmmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).^[16] VdG (**1**) zeigt die stärkste Emission, wenn bei 277 nm angeregt wird, allerdings ist eine Anregung bis zu einer Wellenlänge von 325 nm möglich, was eine ortsspezifische Untersuchung von größeren Oligonucleotiden erlaubt. Die Quantenausbeute von VdG wurde unter Verwendung des AP-Nucleosids als Referenzfluorophor zu 0.72 ± 0.03 bestimmt (siehe Hintergrundinformationen).

Die Fluoreszenzeigenschaften von Nucleosid **1** wurden bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. pH-Wertänderungen im physiologisch relevanten Bereich von pH 5–9 beeinflussten die Fluoreszenzintensität nicht, während bei niedrigeren oder höheren pH-Werten vermutlich die Protonierung oder Deprotonierung des Vinylguanins Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität hat (siehe Hintergrundinformationen). Eine partielle Depurinierung wurde beobachtet, wenn VdG drei Tage einem sauren Lösungsmittel (pH 3) ausgesetzt wurde.

Das Potenzial von VdG zur Basenpaarung nach dem Einbau in dsDNA wurde mithilfe von temperaturabhängiger UV-Spektroskopie untersucht. Wir verglichen die Duplexstabilität von 5'-d(GATCGCTAG) + 5'-d(CTAGCGATC) (Schmelzpunkt $T_m = 32^\circ\text{C}$) mit den Stabilitäten von Doppelsträngen aus einem Oligomer, das VdG in zentraler Position enthält (5'-d(GATCVdGCTAG), **01**), zusammen mit einem an der gegenüberliegenden Nucleobasenposition variierenden, komplementären Strang 5'-d(CTAGXGATC) ($X = \text{dC, dT, dG, dA}$, abasische Stelle; Abbildung 1). Es stellte sich heraus, dass der T_m -Wert für den Doppelstrang mit dem VdG-dC-Basenpaar lediglich um 4°C abnimmt, während Fehlpaarungen mit dG oder dT zu einer Verringerung des Schmelzpunkts um etwa 14°C führen. Für Fehlpaarungen mit

dA oder einer abasischen Stelle wurden keine stabilen Doppelstränge beobachtet.

Um die Abhängigkeit der VdG-Fluoreszenz von der Art der benachbarten Nucleobasen zu untersuchen, wurde eine Serie von Oligonucleotiden mit der Sequenz 5'-d(GAT-XVdGXATC) ($X = \text{dC (O1, dT (O2, dA (O3, dG (O4)}$) hergestellt. Eine deutliche Verringerung der Emissionsintensität um das 9–12-Fache wurde für VdG-haltige Oligomere beobachtet, die als unstrukturierte Einzelstränge vorliegen (siehe Hintergrundinformationen). Die VdG-Fluoreszenz wurde durch benachbarte Guanin- oder Thyminbasen am effektivsten gelöscht, wogegen benachbarte Cytosin- und Adeninbasen zu höherer verbleibender Emissionsintensität führten (siehe Hintergrundinformationen). Da eine Fluoreszenzlösung durch Nachbarbasen sinnvollerweise innerhalb einer definierten einheitlichen DNA-Topologie untersucht wird, wurden B-DNA-Doppelstränge durch Zugabe der jeweils komplementären Stränge 5'-d(CTAXCXATC) ($X = \text{dG (O5, dA (O6, dT (O7, dC (O8)}$) gebildet und auf ihre VdG-Fluoreszenz untersucht. Die beobachtete Fluoreszenzlösung in dsDNA war ausgeprägter als bei Einzelsträngen, hinsichtlich des Einflusses benachbarter Nucleobasen jedoch vergleichbar. Guanin und Thymin führten zu höherer Fluoreszenzlösung, wogegen Cytosin und insbesondere Adenin nur einen geringeren Einfluss ausübten (Abbildung 2).

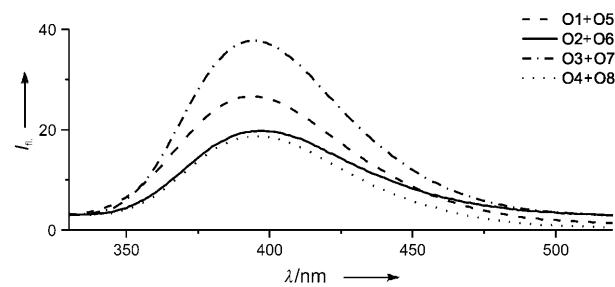


Abbildung 2. Emissionsspektren der Doppelstränge **O1+O5**, **O2+O6**, **O3+O7** und **O4+O8** (Doppelstrangkonzentration: 500 nm; 5 °C, 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 100 mM NaCl; Anregungswellenlänge: 277 nm).

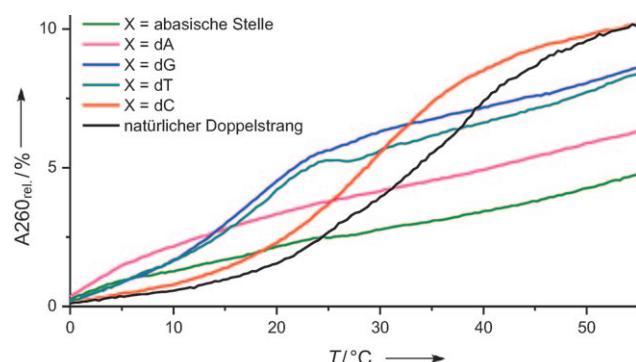


Abbildung 1. UV-Schmelzkurven der aus 5'-d(GATCVdGCTAG) (**01**) und den komplementären Strängen 5'-d(CTAGXGATC) gebildeten Doppelstränge ($X = \text{dC, dA, dG, dT, abasische Stelle}$); Vergleich mit der dsDNA 5'-d(GATCGCTAG) + 5'-d(CTAGCGATC) (2.5 μM; 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 100 mM NaCl; 260 nm).

Die Bildung von DNA-Doppelsträngen kann durch eingebautes VdG über die Emissionsabnahme während der Entstehung von B-DNA-Helices verfolgt werden, wie durch Vergleich der Fluoreszenzspektren der Oligomere **O1+O5**, **O2+O6**, **O3+O7** und **O4+O8** in ihrer einzelsträngigen Form bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes (40–50 °C) und ihrer doppelsträngigen Form bei 5 °C belegt wurde. Die VdG-Emissionsintensität war bei höheren Temperaturen fast identisch mit derjenigen von Proben, die nur die einzelsträngigen Oligomere **O1–O4** enthielten, wogegen bei Temperaturen unterhalb der Schmelzpunkte der untersuchten Doppelstränge eine signifikante Fluoreszenzlösung beobachtet wurde (Abbildung 3a,b und Hintergrundinformationen).

Die Bildung von B-DNA-Doppelsträngen wurde durch Vergleich der CD-Spektren und UV-Schmelzkurven der VdG-funktionalisierten Doppelstränge (**O1+O5**, **O2+O6**,

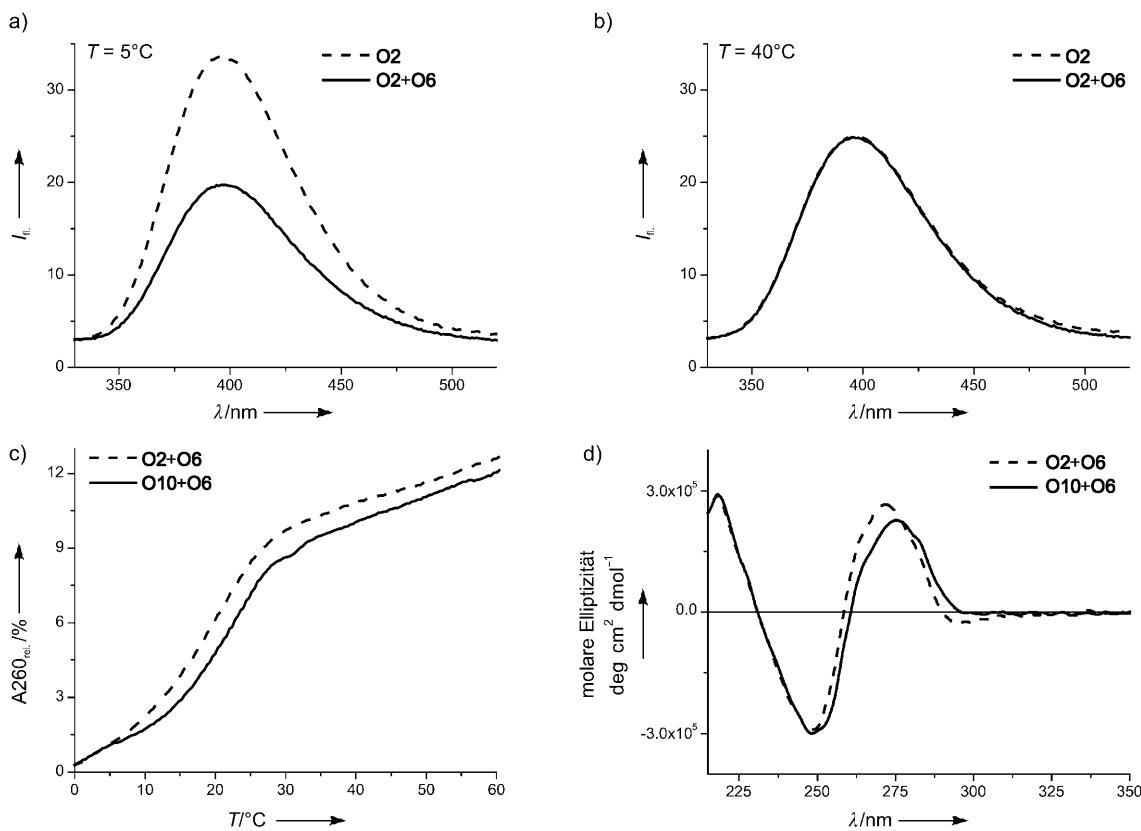


Abbildung 3. Fluoreszenzlösung durch Doppelhelixbildung, exemplarisch gezeigt für **O2** und **O2+O6**. Emissionsspektrum von **O2** und **O2+O6** bei a) 5°C und b) 40°C (500 nm; 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 100 mM NaCl; Anregungswellenlänge: 277 nm). c) Schmelzkurven des VdG-modifizierten Doppelstrangs **O2+O6** und des Guanin-haltigen Doppelstrangs **O10+O6**. (2.5 μM ; 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 100 mM NaCl; 260 nm). d) CD-Spektren des VdG-modifizierten Doppelstrangs **O2+O6** und des Guanin-haltigen Doppelstrangs **O10+O6** (5 μM ; 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 100 mM NaCl).

O3+O7, O4+O8) mit den entsprechenden Guanin-haltigen Doppelsträngen **O9+O5, O10+O6, O11+O7, O12+O8** (5'-d(GATXGXTAG); X=dC (**O9**), dT (**O10**), dA (**O11**), dG (**O12**)) bestätigt. Der Einbau von VdG in dsDNA hat vernachlässigbare Auswirkungen auf die Entstehung der B-DNA-Helix und die Doppelstrangstabilität ($\Delta T_m = 1\text{--}5^\circ\text{C}$; Abbildung 3c,d und Hintergrundinformationen).

In einer zweiten Anwendung wurde der VdG-Fluorophor als Sonde für verschiedene DNA-G-Quadruplexstrukturen eingesetzt. Dabei wurde VdG in das menschliche telomere DNA-Oligonukleotid 5'-d[AGGG(TTAGGG)₃T] (**O13**) eingebaut. Telomere DNA bildet in Gegenwart von komplementärer DNA reguläre B-DNA-Doppelstränge, wogegen einzelsträngige telomere DNA Quadruplexstrukturen bildet, deren Topologie von der Temperatur, dem pH-Wert und den vorhandenen Metallionen abhängt.^[17] Die in wässriger NaCl-Lösung hauptsächlich entstehende Quadruplexstruktur enthält zwischen den jeweiligen G₃-Abschnitten zwei TTA-Schleifen, die benachbarte Ecken einer terminalen G-Tetrade verbinden, sowie eine TTA-Schleife, die diagonal gegenüberliegende Ecken einer terminalen G-Tetrade verknüpft (Abbildung 4).^[17a-c] In wässriger KCl-Lösung liegen hauptsächlich Quadruplexstrukturen vor, die durch eine TTA-Schleife charakterisiert sind, die eine doppelte Umkehr der Strangorientierung aufweist und eine Flanke der Quadru-

plexkernstruktur überspannt (Abbildung 4b).^[17c] Um VdG als Fluoreszenzsonde mit unterschiedlichen Rollen im G-Quadruplex (zentrale/terminale Position und *syn/anti*-Konformation) zu untersuchen, wurde die telomere DNA-Sequenz 5'-d[AGGG(TTAGGG)₃T] (**O13**) mit dem VdG-Nukleotid an den Positionen G3, G4 und G15 modifiziert. Die Emissionseigenschaften der VdG-funktionalisierten Oligonukleotide 5'-d[AGVdGG(TTAGGG)₃T] (**O14**), 5'-d[AGGVdG(TTAGGG)₃T] (**O15**) und 5'-d[A(GGGTTA)₂-GVdGGTTAGGGT] (**O16**) wurden in wässriger KCl- und NaCl-Lösung untersucht.

Der Einfluss des VdG-Einbaus auf die thermische Stabilität der jeweiligen Quadruplexstrukturen und der von den Oligomeren **O14–O16** mit ihrem komplementären Strang 5'-d[A(CCCTAA)₄T] (**O17**) gebildeten B-DNA-Doppelstränge wurde mithilfe temperaturabhängiger UV-Spektroskopie untersucht. Dabei wurde lediglich ein leichter Anstieg der Doppelstrangstabilitäten ($\Delta T_m = + (1\text{--}2)^\circ\text{C}$) und der Stabilität der Quadruplexstrukturen ($\Delta T_m = + (0\text{--}5)^\circ\text{C}$) beobachtet (siehe Hintergrundinformationen), was bedeutet, dass die Stabilität verschiedener Topologien telomerer DNA durch eine VdG-Modifikation kaum beeinflusst wird.

Weiterhin wurden die CD-Spektren der Oligomere **O14–O16** mit denen des nicht modifizierten Oligomers **O13** in NaCl- und KCl-Lösung verglichen. Für die mit **O17** gebilde-

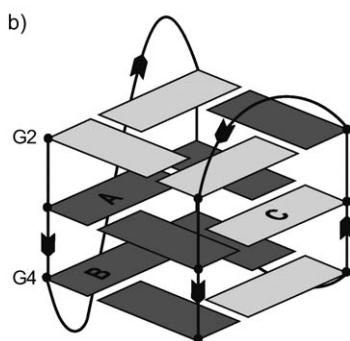
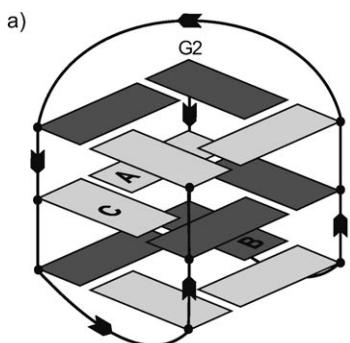


Abbildung 4. Quadruplexstrukturen, die von menschlicher telomerer DNA in Lösung eingenommen werden. a) NaCl- und b) KCl-Form.^[19] syn-dG-Reste sind hellgrau dargestellt und anti-dG-Reste dunkelgrau; die Strangorientierung ist durch Pfeile angezeigt (5' nach 3'). Die entsprechenden Positionen der VdG-Modifikation sind durch A (**O14**), B (**O15**) und C (**O16**) markiert.

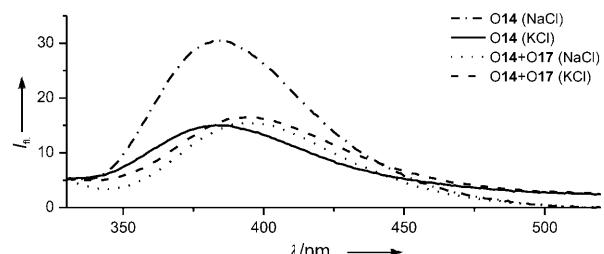


Abbildung 6. Emissionsspektren des einzelsträngigen, VdG-modifizierten, menschlichen telomeren Oligonukleotids **O14** und des Doppelstrangs **O14+O17** in Gegenwart von NaCl und KCl (500 nm; 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 135 mM NaCl oder 100 mM KCl; Anregungswellenlänge: 277 nm).

bildung 5 und Hintergrundinformationen).^[18] Beim Vergleich des CD-Spektrums von **O13** mit denen der Oligomere **O14–O16** wurden lediglich geringfügige Abweichungen in der Intensität der Cotton-Effekte beobachtet (Abbildung 5 und Hintergrundinformationen). Drei der diskutierten Quadruplexstrukturen erfordern ein VdG-Nucleotid in *syn*- und drei eines in *anti*-Konformation. Die Bildung intakter Topologien lässt darauf schließen, dass sich das VdG-Nucleotid nahezu gleichermaßen als Mimetikum für *anti*-dG und *syn*-dG eignet.

Für die Fluoreszeigenschaften der VdG-modifizierten Oligomere **O14–O16** ergab sich eine enge Korrelation mit der jeweiligen Quadruplextopologie. Die Emissionsspektren der Doppelstränge **O14–O16+O17** wiesen, analog zu den mit **O1–O4** gebildeten Doppelsträngen (Abbildung 2), Emissionsmaxima bei 398 nm auf (Abbildung 6 und Hintergrundinformationen); es wurde keine Salzabhängigkeit beobachtet. Die Emissionsmaxima der Quadruplex bildenden Oligomere **O14–O16** waren um etwa 4–8 nm zu tieferen Wellenlängen gegenüber denjenigen der doppelsträngigen Oligomere verschoben (Abbildung 6 und Hintergrundinformationen). Damit kann für die VdG-markierten DNA-Oligomere zwischen der Bildung von Doppelhelices und der von Quadruplexstrukturen unterschieden werden.

Die Unterscheidbarkeit zwischen NaCl- und KCl-Quadruplexformen über die VdG-Emission wurde durch eine nahezu dreimal höhere Emissionsintensität von **O14** und **O16** in der jeweiligen NaCl-Form demonstriert (Abbildung 6 und Hintergrundinformationen). Für eine topologische Differenzierbarkeit ist allerdings das Vorliegen der VdG-Markierung in der mittleren G-Tetradenlage erforderlich, da sich die Emissionsspektren der beiden Quadruplexformen des Oligomers **O15** mit einer VdG-Positionierung in einer terminalen Lage nicht unterscheiden ließen. Die Tatsache, dass sich Quadruplexstrukturen von **O15** gebildet hatten, war dennoch anhand der Emissionsintensität nachweisbar, die doppelt so hoch war wie jene der entsprechenden Doppelstränge. Das fluoreszierende Nucleotid VdG kann in verschiedene DNA-Topologien eingebracht werden. Beobachtete Änderungen der VdG-Fluoreszenz sind ein Indikator für monomere, doppelhelicale und Quadruplex-Sekundärstrukturen sowie Quadruplextopologien und die Positionierung des VdG-Nucleosids der jeweiligen G-Tetraden.

Mit 8-Vinyl-2'-desoxyguanosin (VdG) wurde ein neuartiges fluoreszierendes 2'-Desoxyguanosinanalogon entwi-

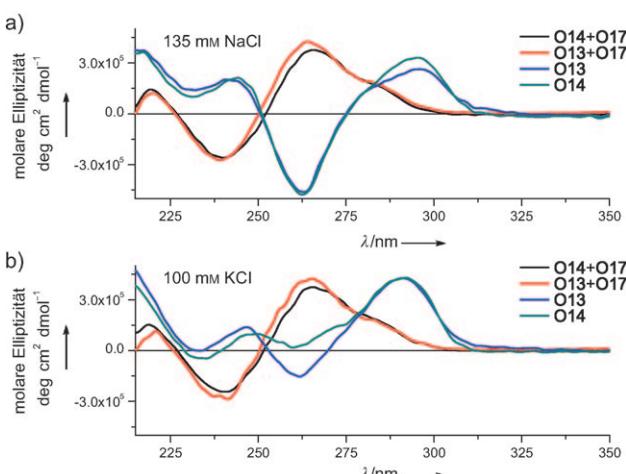


Abbildung 5. CD-Spektren der einzelsträngigen, menschlichen telomeren Oligonukleotide **O13** und **O14** sowie der entsprechenden Doppelstränge mit der komplementären DNA **O17** unter a) NaCl-Bedingungen (4 μM; 5°C, 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 135 mM NaCl) und b) KCl-Bedingungen (4 μM; 5°C, 10 mM Phosphatpuffer (pH 7), 100 mM KCl).

ten Doppelstränge wurden nahezu identische Spektren erhalten (Abbildung 5 und Hintergrundinformationen). Die CD-Spektren aller einzelsträngigen Oligomere **O13–O16** zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur jeweils die Bildung von NaCl- und KCl-Quadruplextopologien, unabhängig davon, ob die VdG-Modifikation enthalten war (Ab-

ckelt, das Guaninbasenpaarungen in Doppelstrang- und Quadruplexstrukturen in Bezug auf die Wasserstoffbrücken und geometrischen Erfordernisse aufrechterhält. VdG ist eine robuste und empfindliche Fluoreszenzsonde für Untersuchungen der Mikroumgebung. Das Potenzial des neuen, fluoreszierenden VdG-Nucleosids dürfte demjenigen des 2-Aminopurinnucleosids vergleichbar sein, das breite Anwendung als fluoreszierendes Adenosinanalogon findet. Wir haben hier eine einfache Synthese des VdG-Phosphoramiditbausteins für die DNA-Festphasensynthese sowie eine exemplarische Verwendung von VdG als Fluoreszenzsonde für die DNA-Basenpaarung und die Bildung verschiedener Topologien demonstriert. Für VdG-modifizierte Doppelstränge wurde nachgewiesen, dass die Fluoreszenzeigenschaften von VdG mit der Art der benachbarten Basen, den Monomer-Doppelstrang-Übergängen und der jeweiligen Oligomerkonformation korrelieren. Weiterhin wurde VdG verwendet, um zwischen unterschiedlichen G-Quadruplex-topologien zu unterscheiden. Es wurde gezeigt, dass VdG sowohl die Nucleotid-*syn*- als auch die Nucleotid-*anti*-Konformation annehmen kann, die für die Bildung individueller Quadruplexstrukturen notwendig sind. Mit VdG steht nun eine empfindliche Fluoreszenzsonde in der Nucleinsäurechemie zur Verfügung.

Eingegangen am 5. Januar 2011

Online veröffentlicht am 3. Mai 2011

Stichwörter: DNA-Strukturen · Fluoreszenzsonden · G-Tetraden · Nucleobasen · Oligonucleotide

-
- [1] a) J. N. Wilson, E. T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4265–4274; b) E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 936–943.
 - [2] a) U. Förster, N. Gildenhoff, C. Grünwald, J. W. Engels, J. Wachtveitl, *J. Lumin.* **2009**, *129*, 1454–1458; b) E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3451–3453; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3372–3375; c) D. J. Hurley, S. E. Seaman, J. C. Mazura, Y. Tor, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2305–2308; d) T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119–9128.
 - [3] a) A. T. Krueger, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3989–3999, zit. Lit.; b) F. Godde, J.-J. Toulmé, S. Moreau, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13765–13775; c) J. Michel, J.-J. Toulmé, J. Vercauteren, S. Moreau, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1127–1135.
 - [4] a) S. Hainke, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8399–8402; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8250–8253; b) N. A. Grigorienko, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 639–645; c) J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12748–12749; d) J. N. Wilson, Y. N. Teo, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15426–15427; e) M. M. Somoza, D. Andreatta, C. J. Murphy, R. S. Coleman, M. A. Berg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2494–2507; f) Y. L. Jiang, F. Song, J. T. Stivers, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11248–11254; g) P. Rao, S. A. Benner, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5012–5015; h) J. Lehbauer, W. Pfleiderer, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2330–2342; i) R. S. Coleman, M. L. Madaras, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5700–5703; j) R. X.-F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. Rumney IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671–7678.
 - [5] N. J. Greco, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10784–10785.
 - [6] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228–1237.
 - [7] J. T. Stivers, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3837–3844.
 - [8] D. Kim, S. Reddy, D. Y. Kim, A. Rich, S. Lee, K. K. Kim, Y.-G. Kim, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4353–4359.
 - [9] a) E. L. Rachofsky, E. Seibert, J. T. Stivers, R. Osman, J. B. A. Ross, *Biochemistry* **2001**, *40*, 957–967; b) M. Menger, T. Tuschl, F. Eckstein, D. Porschke, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14710–14716.
 - [10] a) R. K. Neely, D. Daujotyte, S. Grazulis, S. W. Magennis, D. T. F. Dryden, S. Klimaškauskas, A. C. Jones, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6953–6960; b) T.-J. Su, M. R. Tock, S. U. Egelhaaf, W. C. K. Poon, D. T. F. Dryden, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3235–3244; c) B. W. Allan, N. O. Reich, J. M. Beechem, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5308–5314.
 - [11] a) R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 706–709; b) M. J. Rist, J. P. Marino, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 775–793; c) N. Ben Gaied, N. Glasser, N. Ramalanjaona, H. Beltz, P. Wolff, R. Marquet, A. Burger, Y. Mély, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1031–1039; d) R. Charubala, J. Maurinsh, A. Rösler, M. Melguizo, O. Jungmann, M. Gottlieb, J. Lehbauer, M. Hawkins, W. Pfleiderer, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1369–1378.
 - [12] a) F. Seela, D. Jiang, K. Xu, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3463–3473; b) N. J. Greco, Y. Tor, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3515–3527; c) A. Dumas, N. W. Luedtke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18004–18007.
 - [13] J. L. Sessler, R. Wang, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4079–4091.
 - [14] Alternative Synthese von 4: a) S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8971–8974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8839–8842; S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8971–8974. Es gibt bereits eine Reihe von Vorschriften für die Funktionalisierung der C8-Position des Guanins durch Kreuzkupplungen: b) S. Lena, P. Neviani, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3739–3742; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3657–3660; c) K. Hirota, Y. Kitade, Y. Kanbe, Y. Maki, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5268–5270; d) J. L. Sessler, J. Jayawickramarajah, A. Gouloumis, T. Torres, D. M. Guldi, S. Maldonado, K. J. Stevenson, *Chem. Commun.* **2005**, 1892–1894.
 - [15] A. Nadler, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1544–1549.
 - [16] M. J. Cavaluzzi, P. N. Borer, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 13e.
 - [17] a) A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2723–2735; b) J. Li, J. J. Correia, L. Wang, J. O. Trent, J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4649–4659; c) A. T. Phan, V. Kuryavyi, K. N. Luu, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6517–6525; d) A. T. Phan, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4618–4625; e) D. J. Patel, A. T. Phan, V. Kuryavyi, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7429–7455.
 - [18] P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21858–21869.
 - [19] J. Dai, M. Carver, C. Punchihewa, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4927–4940.