

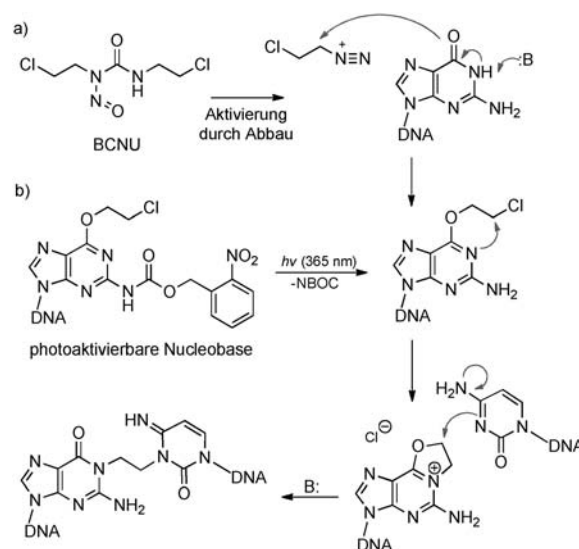
## DNA-Crosslinking

## Synthese von DNA-Interstrang-Crosslinks unter Verwendung einer photoaktivierbaren Nucleobase\*\*

Sarah Hentschel, Jawad Alzeer, Todor Angelov, Orlando D. Schärer und Nathan W. Luedtke\*

Difunktionelle alkylierende Verbindungen verursachen eine Vielzahl an Schäden in zellulärer DNA. Davon gehören DNA-DNA-Interstrang-Crosslinks (ICLs) zu den zytotoxischsten, da sie wichtige biologische Prozesse wie Transkription und Replikation blockieren können.<sup>[1]</sup> ICLs, die von endogenen (z.B. Malondialdehyd) und exogenen Verbindungen (z.B. Formaldehyd) verursacht werden, sind eine Gefahr für die menschliche Gesundheit.<sup>[2–4]</sup> ICLs werden aber auch von Tumortheraeutika wie Cisplatin, Bis(chlorethyl)stickstoff-Verbindungen und Chlorethylnitrosoharnstoffen generiert.<sup>[5]</sup>

1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (BCNU oder „Carmustine“) ist ein weitverbreiteter chemotherapeutischer Wirkstoff, der in einer mehrstufigen Reaktion eine Ethylbrücke zwischen N<sup>1</sup> von dG und N<sup>3</sup> von dC bildet. Der vorgeschlagene Mechanismus umfasst eine Chlorethylierung an der O<sup>6</sup>-Position von dG, gefolgt von der Cyclisierung zum N<sup>1</sup>,O<sup>6</sup>-Ethylguanin-Zwischenprodukt, das wiederum von N<sup>3</sup> von dC angegriffen werden kann und den N<sup>1</sup>(dG)-Ethyl-N<sup>3</sup>(dC)-Crosslink bildet (Schema 1).<sup>[6,7]</sup> Zelluläre Resistenzmechanismen, die durch DNA-Reparaturenzyme vermittelt werden, beschränken jedoch den Einsatz von BCNU und anderen Nitrosoharnstoffen als Chemotherapeutika.<sup>[8]</sup> Ein Verständnis dieser Reparaturpfade würde zu einer Verbesserung des therapeutischen Erfolges beitragen. Mangels gut definierter ICLs, die als Reparatursubstrate fungieren können, gibt es jedoch nur wenige Studien, die auf die Entschlüsselung von ICL-Reparaturmechanismen abzielen.<sup>[9]</sup> Verschiedene Ansätze wurden entwickelt, um ICL enthaltende DNA zu gewinnen. In früheren Studien wurde dop-



**Schema 1.** a) Reaktionsweg für die BCNU-vermittelte ICL-Bildung in DNA; b) unsere Strategie für die Synthese von DNA-DNA-ICLs unter Nutzung eines photoaktivierbaren O<sup>6</sup>-(2-Chlorethyl)-2'-desoxyguanosins. B: repräsentiert eine allgemeine Base.

pelsträngige DNA einem großen Überschuss an BCNU ausgesetzt. Dies führte jedoch nur zu Ausbeuten von 1–5 % an ICL-Produkten, die darüber hinaus wegen zusätzlich auftretender, starker Monoalkylierung unzugänglich für biochemische und hochauflösende biophysikalische Studien waren.<sup>[6,7]</sup> Ein verbesserter Ansatz ist die bidirektionale DNA-Synthese, die auf über einen Crosslink verknüpften Dinucleotiden beruht.<sup>[10–17]</sup> Mithilfe dieser Methode wurde von Noronha et al. ein N<sup>1</sup>-Desoxyinosin(dI)-Ethyl-N<sup>3</sup>-Thymidin(dT)-Interstrang-Crosslink hergestellt, der als Strukturmimetikum für den dG-dC-Crosslink aus der Reaktion mit BCNU wirkt.<sup>[16]</sup> Nachteile dieser Methode sind zum einen, dass ein Vorwissen über die exakte Struktur des gewünschten ICLs erforderlich ist, und zum anderen, dass eine komplexe Schutzgruppenstrategie für die Synthese notwendig ist. Eine alternative Methode für die ICL-Synthese umfasst die Einfügung stabiler ICL-Vorstufen in einzelsträngige Oligonucleotide unter Verwendung standardisierter DNA-Synthese.<sup>[18–26]</sup> Nach erfolgreicher Hybridisierung zur komplementären Sequenz kann die ICL-Bildung im modifizierten Duplex initiiert werden. Alzeer und Schärer nutzten dieses Verfahren, um einen O<sup>6</sup>(dG)-Ethyl-N<sup>3</sup>(dT)-ICL zu generieren, indem sie N<sup>3</sup>-(2-Chlorethyl)thymidin in Oligonucleotide einfügten. Ungeachtet dieses beträchtlichen Fortschritts wurde bisher nichts über die Synthese eines Oligonucleotids berichtet, das den biologisch relevanten N<sup>1</sup>(dG)-Ethyl-N<sup>3</sup>(dC)-Crosslink als Resultat der

[\*] S. Hentschel, Prof. Dr. N. W. Luedtke  
Organisch-chemisches Institut, Universität Zürich  
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: luedtke@oci.uzh.ch  
Homepage: <http://www.bioorganic-chemistry.com/>

Dr. J. Alzeer  
Applied Chemistry Department,  
Palestine Polytechnic University, Hebron (Palästina)

Dr. T. Angelov  
Institut für Lebensmittelwissenschaften, Ernährung und Gesundheit, ETH Zürich (Schweiz)

Prof. Dr. O. D. Schärer  
Department of Pharmacological Sciences and Chemistry,  
Stony Brook University, New York (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (Nr. 130074), der Europäischen Kommission (Nr. 005204) und der Dr. Helmut Legerlotz-Stiftung unterstützt.

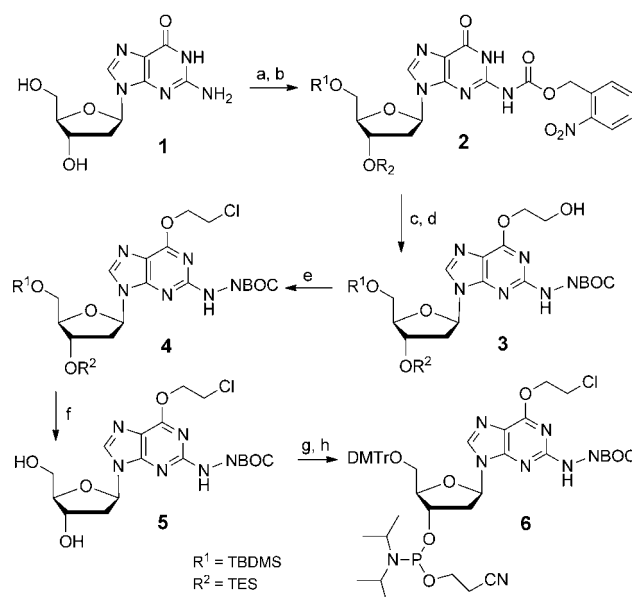
☉ Zusätzliche Details der Synthese und Analyse sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108018> zu finden.

Behandlung mit BCNU enthält. Solche Oligonucleotide würden echte Substrate für biochemische, zellbiologische und biophysikalische Studien bereitstellen, und die neue Methodik für ihre Synthese könnte für andere Anwendungen in der Biotechnologie genutzt werden.

Hier berichten wir über eine neue Strategie zur ICL-Synthese unter Nutzung einer photoaktivierbaren Nucleobase als ICL-Vorstufe. Unser Verfahren nutzt einen *O*<sup>6</sup>-(2-Chlorethyl)guaninrest mit einer photolabilen *ortho*-Nitrobenzyloxycarbonyl(NBOC)-Gruppe an der N<sup>2</sup>-Position. NBOC stabilisiert das normalerweise reaktive *O*<sup>6</sup>-Chlorethylguanin, da es als elektronenziehende Gruppe bezüglich der N<sup>1</sup>-Position agiert. Diese ICL-Vorstufe bleibt während und nach der präparativen Einfügung in doppelsträngige DNA stabil, bis NBOC durch Bestrahlung bei 365 nm selektiv entfernt wird. Das daraus resultierende freie Amin an der N<sup>2</sup>-Position aktiviert die Bildung des cyclischen N<sup>1</sup>,*O*<sup>6</sup>-Ethylen-guanin-Zwischenprodukts, indem es Elektronendichte auf die N<sup>1</sup>-Position überträgt, die wiederum das Chlorid in einer intramolekularen S<sub>N</sub>2-Reaktion angreifen kann. Das resultierende N<sup>1</sup>,*O*<sup>6</sup>-Ethylen-guaninkation ist ein hochreaktives Zwischenprodukt, das einen Cytosinrest im gegenüberliegenden Strang alkylieren kann und in analoger Weise wie bei BCNU selbst zur Bildung eines ICL führt (Schema 1 b).

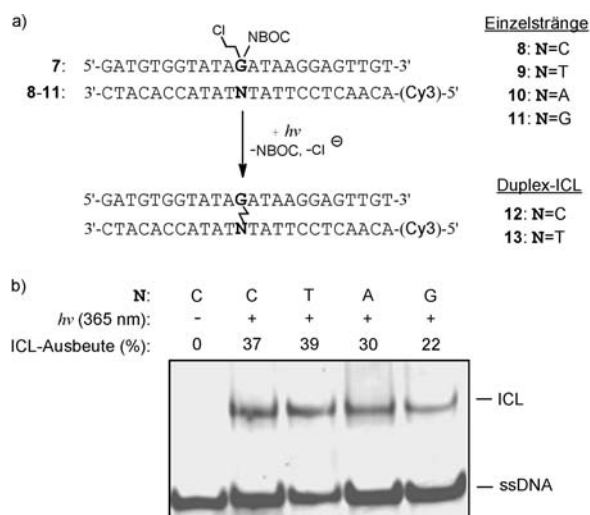
Die Synthese des Phosphoramidits **6** begann mit der unterschiedlichen Silylierung der 3'-OH- und 5'-OH-Gruppen von dG (**1**; Schema 2). Die TES-Gruppe wurde zum Schützen von 3'-OH genutzt, TBDMS für 5'-OH. Diese Strategie umgeht eine problematische Entschützung, die zum 3'-O-TBDMS-Zwischenprodukt und nicht zum gewünschten Nucleosid **5** führt. Die exocyclische N<sup>2</sup>-Aminogruppe wurde in moderater Ausbeute durch Addition von 2-Nitrobenzyloxycarbonylimidazol (NBOC-Im) geschützt.<sup>[27]</sup> Die *O*<sup>6</sup>-Position wurde mit 2,4,6-Triisopropylbenzylsulfonylechlorid aktiviert und unter Verwendung von Chinuclidin als Base in das *O*<sup>6</sup>-(2-Hydroxyethyl)-2'-desoxyguanosin **3** überführt. Nach vielen erfolglosen Versuchen gelang die Chlorierung mit der Methode von Wanchai und Warinthorn<sup>[28]</sup> und ergab das gewünschte *O*<sup>6</sup>-(2-Chlorethyl)-2'-desoxyguanosin **4** in moderater Ausbeute. Die Entschützung der Silylgruppen an der 3'-OH- und 5'-OH-Position durch Fluoridionen war problematisch, konnte aber mit einer 2:1-Mischung von TBAF und TsOH erreicht werden. Die 5'-OH-Gruppe wurde anschließend mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid geschützt, und die 3'-OH-Gruppe wurde unter Standardbedingungen aktiviert und zum gewünschten Phosphoramidit **6** in einer Gesamtausbeute von 5 % über acht Stufen umgesetzt.

Das Phosphoramidit **6** wurde mithilfe einer „ultramilden“ DNA-Synthese nach bekannten Verfahren in Oligonucleotide eingefügt.<sup>[29,30]</sup> Nach der Synthese wurden die Oligonucleotide vom Trägermaterial abgespalten und mit Diisopropylamin/Methanol (1:10) bei Raumtemperatur 15 h lang entschützt. Die Aufreinigung wurde mit HPLC durchgeführt, und die Produkte wurden mit MALDI-TOF-MS analysiert. Das beobachtete Molekulargewicht (7769.3) des Hauptprodukts der Synthese stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht (7768.3) des Oligonucleotids **7** überein, das die NBOC-Gruppe an der N<sup>2</sup>- und die Chlorethylgruppe an der *O*<sup>6</sup>-Position des modifizierten G-Restes enthält.

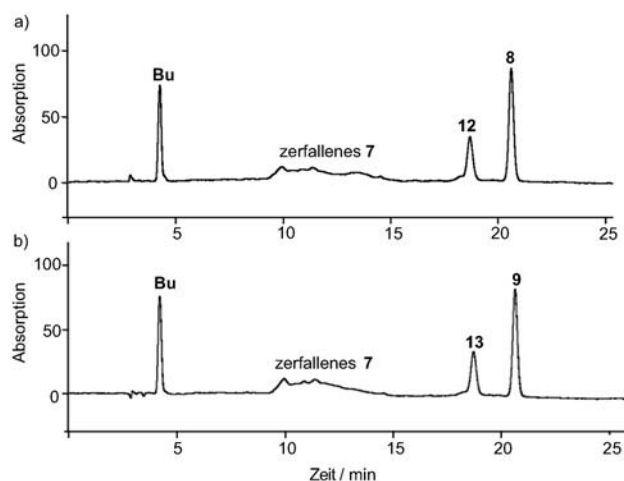


**Schema 2.** Synthese des photoaktivierbaren *O*<sup>6</sup>-Chlorethylphosphoramidits **6**: a) TBDMS-Cl, TES-Cl, Imidazol, DMF, −10 °C → RT, 20 h, 98 %; b) NBOC-Im, [18]Krone-6, NaH, THF, RT, 3 h, 55 %; c) TiPBS-Cl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 3 h 81 %; d) Chinuclidin, Ethylenglykol, THF, 0 °C, 4 h, 72 %; e) PPh<sub>3</sub>, Cl<sub>3</sub>CCN, THF, 0 °C, 20 min, 51 %; f) TBAF, TsOH, MeOH, THF, H<sub>2</sub>O, 0 °C → RT, 26 h, 53 %; g) DMTr-Cl, Pyridin, RT, 2 h, 80 %; h) (iPr<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>POC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>CN, 5-(Ethylthio)-1*H*-tetrazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 20 min, 80 %. DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TBDMS-Cl = *tert*-Butyldimethylsilylchlorid; TES-Cl = Chlortriethylsilan; TiPBS-Cl = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylechlorid; TBAF = Tetra-*n*-butylammoniumfluorid; TsOH = *p*-Toluolsulfonsäure; DMTr-Cl = 4,4'-Dimethoxytritylchlorid.

Nach der Synthese und Aufreinigung wurde Oligonucleotid **7** mit den komplementären Oligonucleotiden (**8–11**; Abbildung 1) mittels Denaturierung durch Hitze und langsames Abkühlen in wässrigem Phosphatpuffer (pH 7.4) hybridisiert. Die komplementären Oligonucleotide enthielten ein fluoreszierendes Molekül (Cy3) am 5'-Ende sowie variable Basen (N = C, T, A, G) gegenüber der ICL-Vorstufe. Die entstandenen Duplexe wurden drei Minuten mit 365-nm-Laserlicht bestrahlt, um die NBOC-Gruppe zu entfernen.<sup>[31,32]</sup> Nach der Bestrahlung wurden die Oligonucleotide 17 h bei 37 °C inkubiert und die Produkte mit denaturierendem Polyacrylamidgel (15 %) aufgetrennt (Abbildung 1). Alle vier bestrahlten DNA-Sequenzen ergaben einzelne Produkte, die eine geringe elektrophoretische Mobilität aufwiesen, übereinstimmend mit der Bildung von ICL-Duplex-DNA (Abbildung 1). Höhere Ausbeuten wurden erzielt, wenn sich anstelle von Purinen (dA und dG) Pyrimidine (dT und dC) gegenüber der ICL-Vorstufe befanden. Für die Charakterisierung der Produkte der Reaktion mit Pyrimidinen wurde HPLC zur Isolierung der ICL-Duplex-DNAs **12** und **13** genutzt (Abbildung 2). Gemäß MALDI-TOF-MS waren die molekularen Massen der ICL-DNA-Produkte (**12**: 15245.0, **13**: 15263.0) in exzellenter Übereinstimmung mit den berechneten Werten (**12**: 15245.2, **13**: 15259.0). Im Unterschied dazu ergaben die Proben, die ohne Bestrahlung bei 365 nm vorbereitet wurden, keine detektierbare ICL-Bildung (Ab-



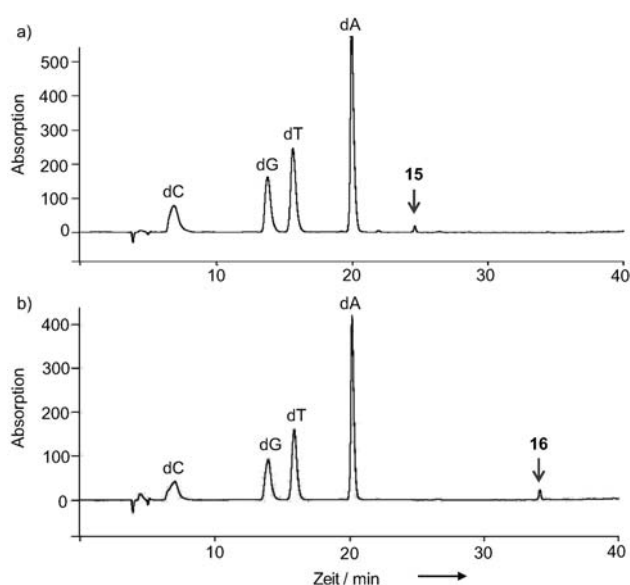
**Abbildung 1.** a) Crosslink-Reaktion. b) Analyse der ICL-Bildung mithilfe denaturierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese (DPAGE). Die Bildgebung erfolgte unter Nutzung der Cy3-Fluoreszenzemission.



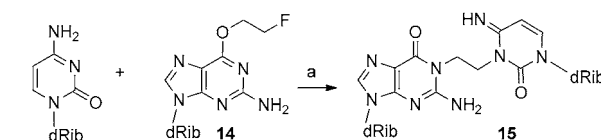
**Abbildung 2.** HPLC-Analyse der Crosslink-Bildung nach der Photoentschüttung. a) Chromatogramm einer rohen Reaktionsmischung aus den Oligonucleotiden 7 und 8 mit dem ICL-Produkt 12. b) Chromatogramm einer rohen Reaktionsmischung aus den Ausgangssubstanzen 7 und 9 mit dem ICL-Produkt 13. Bu = Pufferkomponente. Wellenlänge der Detektion: 260 nm.

bildung 1). Diese Befunde zeigen, dass die Entfernung von NBOC eine Anforderung für die effiziente ICL-Bildung ist.

Um die Strukturen der Crosslinks in 12 und 13 bestimmen zu können, wurden die aufgereinigten Oligonucleotide mit Snake-Venom-Phosphodiesterase, Exonuclease III und Shrimp-Alkaline-Phosphatase verdaut. Die Rohprodukte jeder Reaktionsmischung wurden mit HPLC und MS analysiert (Abbildung 3). Zusätzlich zu den vier bekannten Nucleosiden waren in den Chromatogrammen auch die ICL-Dinucleotide „15“ und „16“ zugegen. Dinucleotid 15 war identisch in seiner Retentionszeit und seinem hochauflösenden Massenspektrum zur authentischen Vergleichsprobe  $N^1$ (dG)-Ethyl- $N^3$ (dC), die ausgehend von  $O^6$ -(2-Fluorethyl)-2'-desoxyguanosin hergestellt wurde (Schema 3). Coinjektion



**Abbildung 3.** HPLC-Analyse des enzymatischen Verdaus der Crosslink-Oligonucleotide 12 (a) und 13 (b). Wellenlänge der Detektion: 260 nm.



**Schema 3.** Synthese von  $N^1$ (dG)-Ethyl- $N^3$ (dC)-Dinucleosid 15 gemäß Vorschrift.<sup>[33]</sup> a) NaI, DMSO, 55 °C, 11 Tage, 10%. dRib = 2'-Desoxyribose.

von 15 mit einer Rohmischung des Verdaus verifizierte zusätzlich die Struktur des gebildeten ICL (siehe Hintergrundinformationen). Das hochauflösende Massenspektrum von 16 war in Einklang mit einem G-T-Crosslink (siehe Hintergrundinformationen). Diese Befunde demonstrieren, dass DNA, die einen  $O^6$ -(2-Chlorethyl)-2'-desoxyguanosinrest enthält, mit einem C-, T-, A- oder G-Rest im gegenüberliegenden Strang reagieren kann, und lassen vermuten, dass das als Zwischenprodukt angenommene  $N^1$ , $O^6$ -Ethylenguaninkation, das nach der Entfernung von NBOC gebildet wird, ein hochreaktives und unspezifisches Elektrophil ist.

Der angenommene Mechanismus der G-C-Crosslink-Bildung mit BCNU wurde erstmals 1982 von Ludlum et al. vorgeschlagen (Schema 1),<sup>[34]</sup> jedoch nie wirklich geprüft. Vorangegangene mechanistische Studien fokussierten sich auf die Analyse komplexer Produktmischungen, die nach Zugabe von BCNU zu Duplex-DNA entstanden.<sup>[6,7]</sup> Unsere orthogonale Strategie für die Synthese von ICL-DNA nutzt den gleichen mechanistischen Weg wie den von Ludlum vorgeschlagenen und liefert das exakt gleiche  $N^1$ (dG)-Ethyl- $N^3$ (dC)-Addukt, das nach dem enzymatischen Verdau BCNU-behandelter genomischer DNA isoliert wurde.<sup>[6,7]</sup> Daher stützen unsere Befunde den vorgeschlagenen ICL-Mechanismus, und darüber hinaus liefern wir die erste Totalsynthese von DNA mit einem biologisch relevanten  $N^1$ (dG)-Ethyl- $N^3$ (dC)-Crosslink. Im Gegensatz zur BCNU-

behandelten Duplex-DNA generiert unser Verfahren homogene ICL-Duplex-DNA in ausreichender Menge für zukünftige biophysikalische und biologische Analysen.

Zusammenfassend haben wir eine neue Strategie für die Synthese örtlich definierter ICLs unter Nutzung eines an N<sup>2</sup> photoaktivierbaren O<sup>6</sup>-(2-Chlorethyl)guanins entwickelt. Während das Prinzip des „Photocaging“ und Freisetzungstrategien für die Regulierung von molekularen Erkennungsschnittstellen weit verbreitet sind,<sup>[32]</sup> entsprechen unsere Befunde nach unserem besten Wissen dem ersten Beispiel für eine photoinitierte Reaktion zwischen biologischen Makromolekülen, die durch die Freisetzung eines latenten Elektrophils erreicht wird. Diese Strategie sollte auch in anderen Situationen, in denen hoch reaktive alkylierende Zwischenprodukte für die örtlich definierte kovalente Modifizierung in wässrigem Medium verwendet werden, nutzbar sein.

### Experimenteller Teil

DPAGE-Analyse: Frische DNA-Lösungen mit 1.2 µM **7** und 1 µM **8**, **9**, **10** oder **11** (bezogen von Sigma Aldrich) in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) mit 270 mM NaCl und 5.4 mM KCl (Gesamt volumen 20 µL) wurden hergestellt. Für die Hybridisierung der DNA-Stränge wurden die Proben 1 min auf 80 °C erhitzt und langsam (2 h) auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Proben wurden anschließend mit 365-nm-Licht (3500 mW cm<sup>-2</sup>) mithilfe eines LED-Pen-Lasers (Abecon AG) 3 min bei Raumtemperatur bestrahlt und 17 h bei 37 °C inkubiert. 5 µL jeder Probe wurden mit 10 µL Auftragungspuffer (50 % Formamid, 9 mM Tris-Base/Borsäure, 0.2 mM EDTA, 6 M Harnstoff, Spuren von Bromphenolblau) verdünnt, und zusätzlich wurden 5 mg Harnstoff dazugegeben. Die Proben wurden 2 min auf 80 °C erhitzt und auf ein 15-proz. Polyacrylamidgel (19:1-Verhältnis von Acylamid zu Bisacrylamid mit 8 M Harnstoff und 14 mM Tris-Base/Borsäure, 0.3 mM EDTA) aufgetragen und 80 min bei 100 V aufgetrennt. Die Gele wurden mithilfe eines Flachbettscanners, der mit einer Cy3-Detektion ausgestattet ist, abgebildet (Typhoon 9400, GE Healthcare Bioscience-AB).

Präparative Synthese von Crosslink-DNA: Oligonucleotid **7** (6.5 µM) wurde mit Oligonucleotid **8** oder **9** (4 µM) in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) mit 420 mM NaCl, 5.4 mM KCl und 8 mM NaI (Gesamt volumen: 1 mL) gemischt. Die Proben wurden wie oben beschrieben hybridisiert und photoentschützt. Die Produkte wurden unter Verwendung eines Varian-Pro-Star-HPLC-Systems und einer C-18-Reverse-Phase-Säule (YMCbasic, B-22-10P 150 × 10 mm) aufgetrennt, mit einem linearen Gradienten von 3–40 % CH<sub>3</sub>CN in 0.1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 7) über 26 min. Die zu den Crosslink-DNAs **12** und **13** gehörenden Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert. MALDI-TOF-MS: 15245.2 (**12**; ber.: 15245.2); 15263.0 (**13**; ber.: 15259.0).

Eingegangen am 14. November 2011

Online veröffentlicht am 17. Februar 2012

**Stichwörter:** Alkylierungen · DNA · Nitrosoharnstoffe · Photoaktivierung

- [1] O. D. Schärer, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 27.
- [2] L. J. Niedernhofer, J. S. Daniels, C. A. Rouzer, R. E. Greene, L. J. Marnett, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31426.
- [3] M. P. Stone, Y.-J. Cho, H. Huang, H.-Y. Kim, I. D. Kozekov, A. Kozekova, H. Wang, I. G. Minko, R. S. Lloyd, T. M. Harris, C. J. Rizzo, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 793.
- [4] C. Auerbach, M. Moutschen-Dahmen, J. Moutschen, *Mutat. Res.* **1977**, *39*, 317.
- [5] D. M. Noll, T. M. Mason, P. S. Miller, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 277.
- [6] P. L. Fischhaber, A. S. Gall, J. A. Duncan, P. B. Hopkins, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4363.
- [7] D. B. Ludlum, *Mutat. Res.* **1990**, *233*, 117.
- [8] L. Panasci, J.-P. Paiement, G. Christodouloupoloulos, A. Belenkov, A. Malapelsa, R. Aloyz, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 454.
- [9] A. Guainazzi, O. D. Schärer, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 3683.
- [10] B. Bhat, N. J. Leonard, H. Robinson, A. H.-J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10744.
- [11] E. A. Harwood, S. T. Sigurdsson, N. B. F. Edfeldt, B. R. Reid, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5081.
- [12] H.-Y. Li, Y.-L. Qiu, E. Moyroud, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1519; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1471.
- [13] D. M. Noll, A. M. Noronha, P. S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3405.
- [14] A. M. Noronha, D. M. Noll, C. J. Wilds, P. S. Miller, *Biochemistry* **2002**, *41*, 760.
- [15] C. J. Wilds, A. M. Noronha, S. Robidoux, P. S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9257.
- [16] C. J. Wilds, F. Xu, A. M. Noronha, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 686.
- [17] F. P. McManus, Q. Fang, J. D. M. Booth, A. M. Noronha, A. E. Pegg, C. J. Wilds, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4414.
- [18] W. R. Kobertz, J. M. Essigmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5960.
- [19] I. S. Hong, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10510.
- [20] J. Alzeer, O. D. Schärer, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4458.
- [21] Z. Qiu, L. Lu, X. Jian, C. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14398.
- [22] T. Angelov, A. Guainazzi, O. D. Schärer, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 661.
- [23] X. Peng, I. S. Hong, H. Li, M. M. Seidman, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10299.
- [24] K. Hattori, T. Hirohama, S. Imoto, S. Kusano, F. Nagatsugi, *Chem. Commun.* **2009**, 6463.
- [25] M. Op de Beeck, A. Madder, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 796.
- [26] A. Guainazzi, A. J. Campbell, T. Angelov, C. Simmerling, O. D. Schärer, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12100.
- [27] A. Stutz, C. Höbartner, S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2477.
- [28] P. Wanchai, C. Warinthon, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6821.
- [29] L. C. J. Gillet, J. Alzeer, O. D. Schärer, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1961.
- [30] R. T. Pon, S. Yu, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3327.
- [31] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333.
- [32] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900.
- [33] W. J. Bodell, K. Pongracz, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 434.
- [34] W. P. Tong, M. C. Kirk, D. B. Ludlum, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 3102.